



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí “

Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0032

EKO/MEM - Molekulární ekologie mikroorganismů

Martin Rulík, Iva Buriánková, Lenka Brablcová

LS 2015

MOLEKULÁRNÍ EKOLOGIE MIKROORGANISMŮ

LS 2015, SE - 622, 10:30 - 12:15

- 25.2. Úvod do taxonomie prokaryot, molekulární ekologie, ekologický a biologický význam mikroorganismů I**
doc. Martin Rulík
- 4.3. Úvod do taxonomie prokaryot, molekulární ekologie, ekologický a biologický význam mikroorganismů II**
doc. Martin Rulík
- 18.3. Mikroskopické metody, fylogenetické barvení, extrakční metody a PCR**
Dr. Iva Buriánková
- 1.4. Fingerprintingové metody (DGGE, TGGE, T-RFLP, ARDRA) a jejich použití při determinaci mikrobiálních společenstev**
Dr. Iva Buriánková
- 15.4. Využití mtDNA a mikrosatelitů pro detekci druhů velkých čolků v hybridní zóně**
Mgr. Zdeněk Mačát
- 22.4. Klonování a sekvenování přírodní DNA - základ pro fylogenetickou analýzu společenstva**
Dr. Iva Buriánková
- 29.4. Základy bioinformatiky a konstrukce fylogenetických stromů**
Dr. Iva Buriánková

Kurz je podpořen projektem OPVK (CZ.1.07/2.2.00/28.0032)

Molekulární ekologie (*Molecular ecology*)

je relativně mladý vědní obor, který se snaží řešit ekologické problémy molekulárními metodami (např. **druhov^á diagnostika, ochrana a hodnocení biodiverzity, závislost počtu druhů na ploše a mnohé další**)

Úzce spjata s evoluční biologii, ekologickou genetikou (*ecological genetics* = genetika přírodních populací) a ochranářskou genetikou (*conservation genetics* = aplikace gen. metod za účelem ochrany ochrany/obnovení biodiverzity) které využívá molekulární populační genetiky, molekulární fylogenetiky a genomiky při hledání odpovědí na ekologické otázky

Např. přednášky P. Muclingera (PřF UK Praha): Molekulární ekologie

ISSN 0962-1083

VOLUME 21
NUMBER 11
JUNE
2012

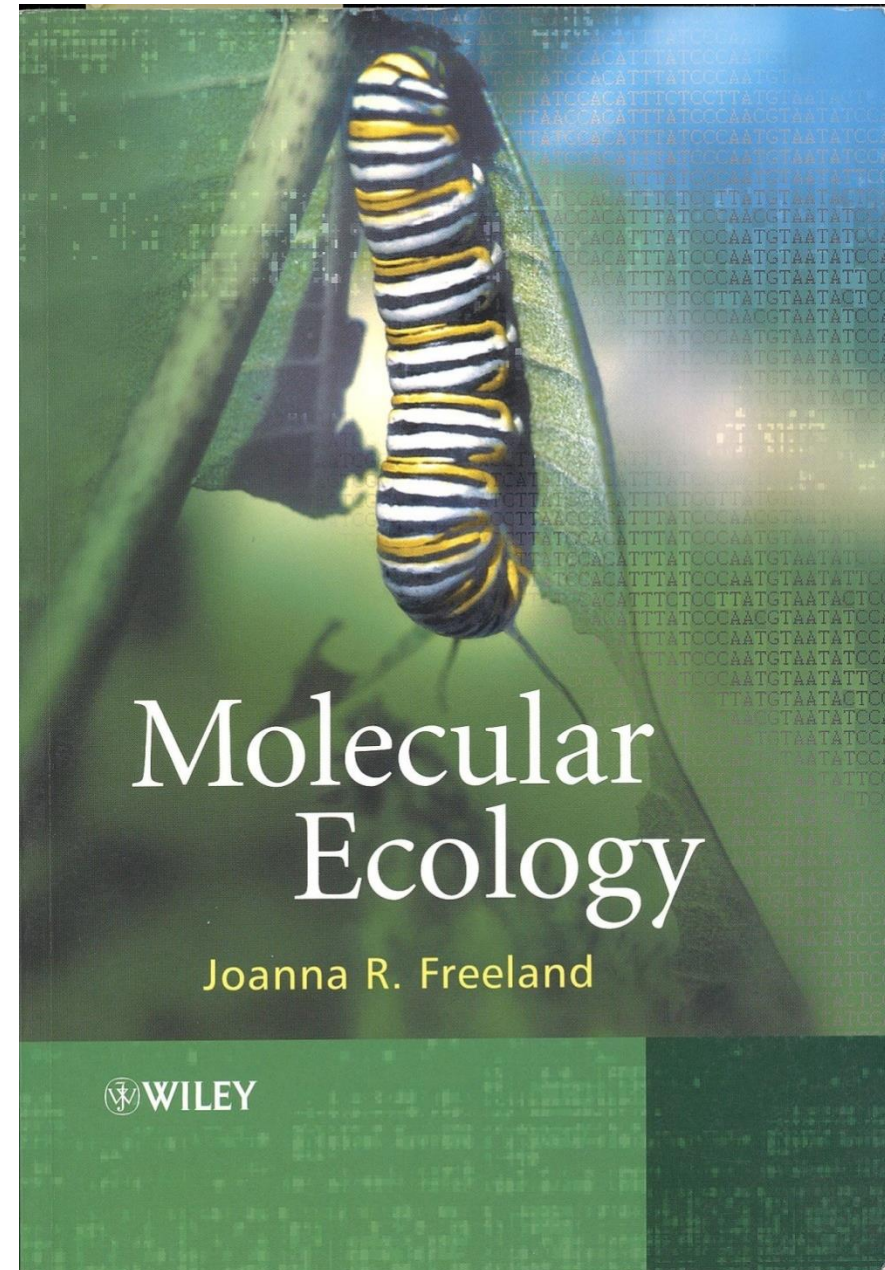
MOLECULAR ECOLOGY

FROM THE COVER: Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. See pp. 2565–2573.



Published by
Wiley-Blackwell

Discover this journal online at
WILEY ONLINE LIBRARY
wileyonlinelibrary.com/journal/mec



Molecular Ecology

Joanna R. Freeland

 **WILEY**

Proč jsou molekulární metody tak užitečné v ekologii?

- Univerzální - možnost použití pro všechny živé identity
- Preciznější a rychlejší ve srovnání s klasickými postupy
- Vyžadují nepatrné množství biologického materiálu
- Jsou nedestruktivní a neinvazivní

Informace o organismu získáváme na základě analýzy jeho molekul, např. proteinů či DNA, tzv. **molekulárních markerů**. Molekulární marker představuje fragment DNA, který je asociován s určitou lokalizací v genomu a používá se k identifikaci konkrétní sekvence DNA ve vzorku neznámé DNA.



Molekulární markery vypovídají o genetické podobnosti (tj. příbuznosti) jedinců, populací nebo druhů, umožňují rovněž dedukci evolučních a ekologických procesů

Co jsou molekulární metody?

Metody působící na molekulární úrovni, zejména metody molekulární biologie – tj. metody založené na analýze DNA, ale i dalších molekul (RNA, proteinů, pigmentů atd.)

Proč jsou molekulární metody důležité?

Chybí přímá pozorování

- vlastnosti organismů (např. mikroorganismy)
- nedostatek možností k pozorování (vzácné druhy apod.)

Omezení v trvání pozorování

(např. nemůžeme konstruovat evoluční historii)

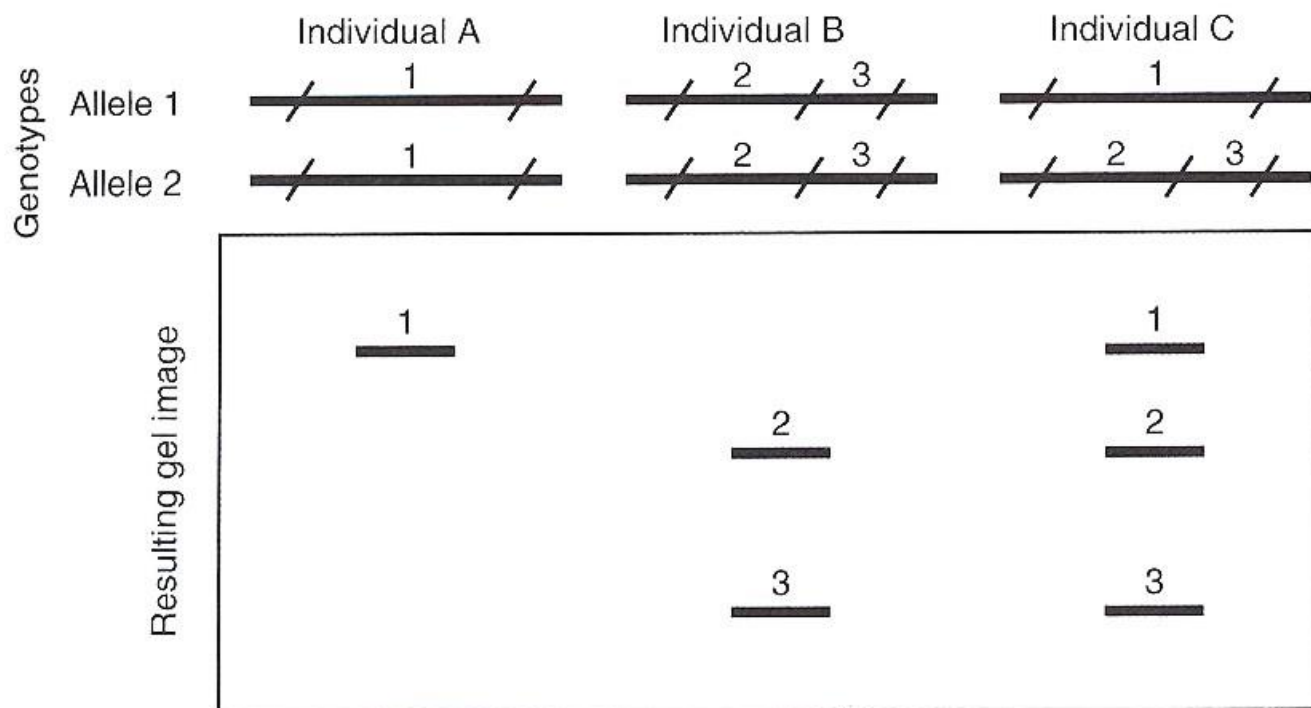
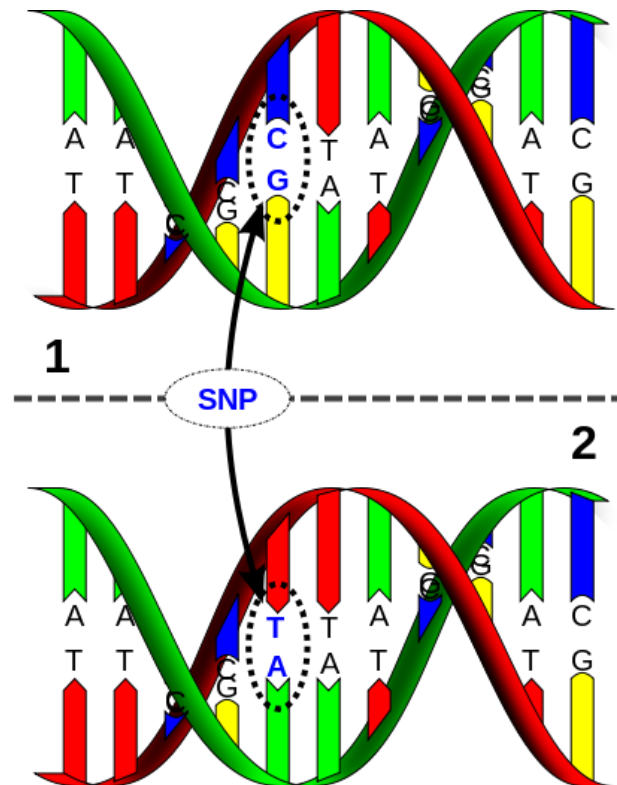


Figure 2.5 Three different RFLP genotypes result from sequence differences that affect the restriction enzyme recognition sites (designated as /). At this locus, individuals A and B are homozygous for alleles that have two and three restriction sites, respectively. Individual C is heterozygous, with two restriction sites at one allele and three restriction sites at the other allele. The numbers of bands that would be generated by the RFLP profiles are shown in the resulting gel image

Jednonukleotidový polymorfismus, SNP (z anglického *Single Nucleotide Polymorphism*), jsou odchylky individuálních nukleotidů v sekvenci DNA. Mutace takových míst probíhají velmi pomalu. Tím jsou předurčeny k mapování historie člověka a sestavení jeho genetického stromu. Označení SNP markeru sestává z písmena a čísla. Písmeno představuje laboratoř nebo výzkumný tým, který daný marker objevil. Číslo je pak pořadí objevu v rámci příslušného týmu.



Mikrosatelit (též krátké tandemové repetice nebo SSR—Simple Sequence Repeat)

je označení pro sekvenční repetitivní DNA, složené z opakujících se jednotek o velikosti přibližně 1-6 nukleotidů. Mnohdy se v jednom mikrosatelitu opakuje tato krátká sekvenční mnohokrát a tvoří řetězec o délce i 100 bází.

```
TTGTCAAAGAGTTCAGCCGAATA CAATTTATTAAGTGAGCTTAATACAGTT
AGCGACGACAAAGGAAGAAGTACAACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
ACTAGCTAGAGCCAAGCACTAAGATACAACACGC
```

Figure 2.7 A DNA sequence that includes a microsatellite region that was isolated from the freshwater bryozoan *Cristatella mucedo* (Freeland *et al.*, 1999). The microsatellite, which is (AG)₅₃, is underlined. The flanking sequence regions in bold show the locations of the primers that were used to amplify this microsatellite in a PCR reaction

Příklad mikrosatelitu

Alela A: **CACACACA** (4 opakování CA sekvenční)

Alela B: **CACACACACACA** (6 opakování CA sekvenční)

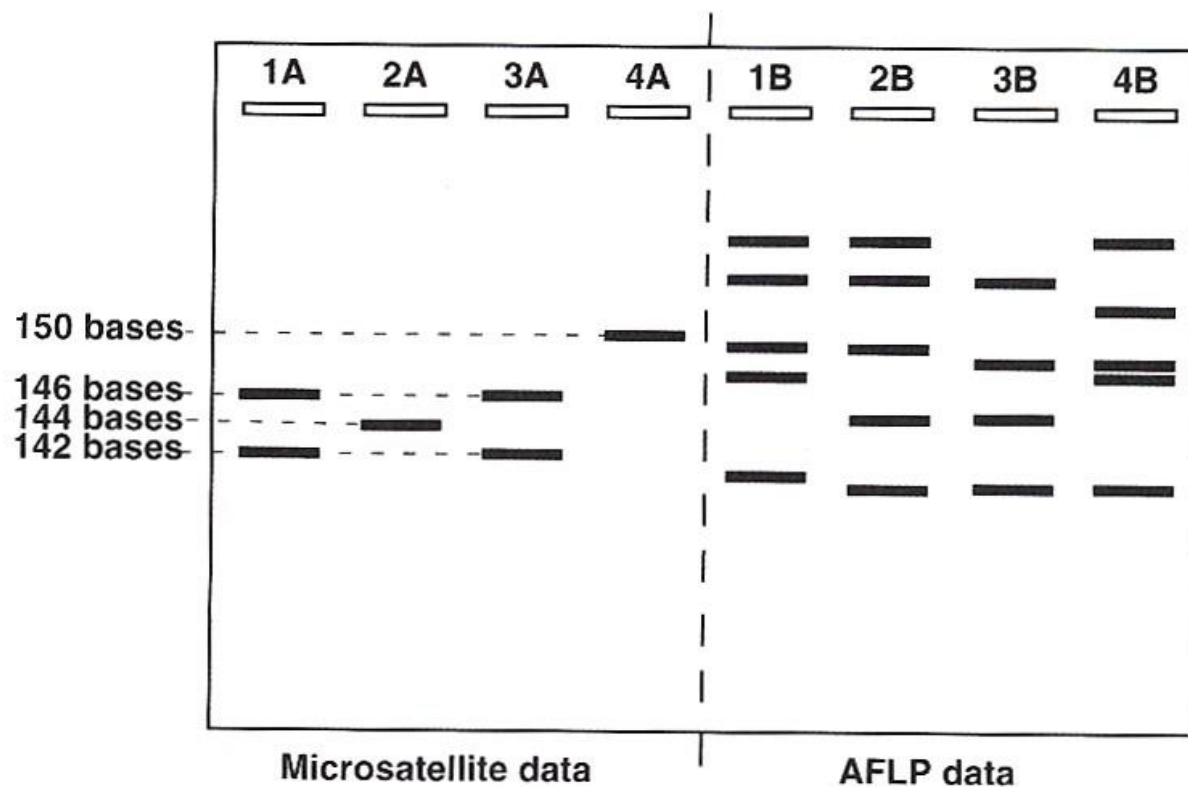
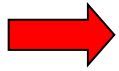


Figure 2.4 Gel showing the genotypes of four individuals based on one microsatellite (co-dominant) locus (1A–4A) and several AFLP (dominant) loci (1B–4B). According to the microsatellite locus, individuals 1 and 3 are heterozygous for alleles that are 142 and 146 bases long, whereas individuals 2 and 4 are homozygous for alleles that are 144 and 150 bases, respectively. Since there are two of each allele in this sample of eight alleles, the frequency of each microsatellite allele is 0.25. According to the AFLP marker, which screens multiple loci, all four individuals are genetically distinct but we cannot identify homozygotes and heterozygotes, nor can we readily calculate allele frequencies

Co je mikrobiální ekologie?



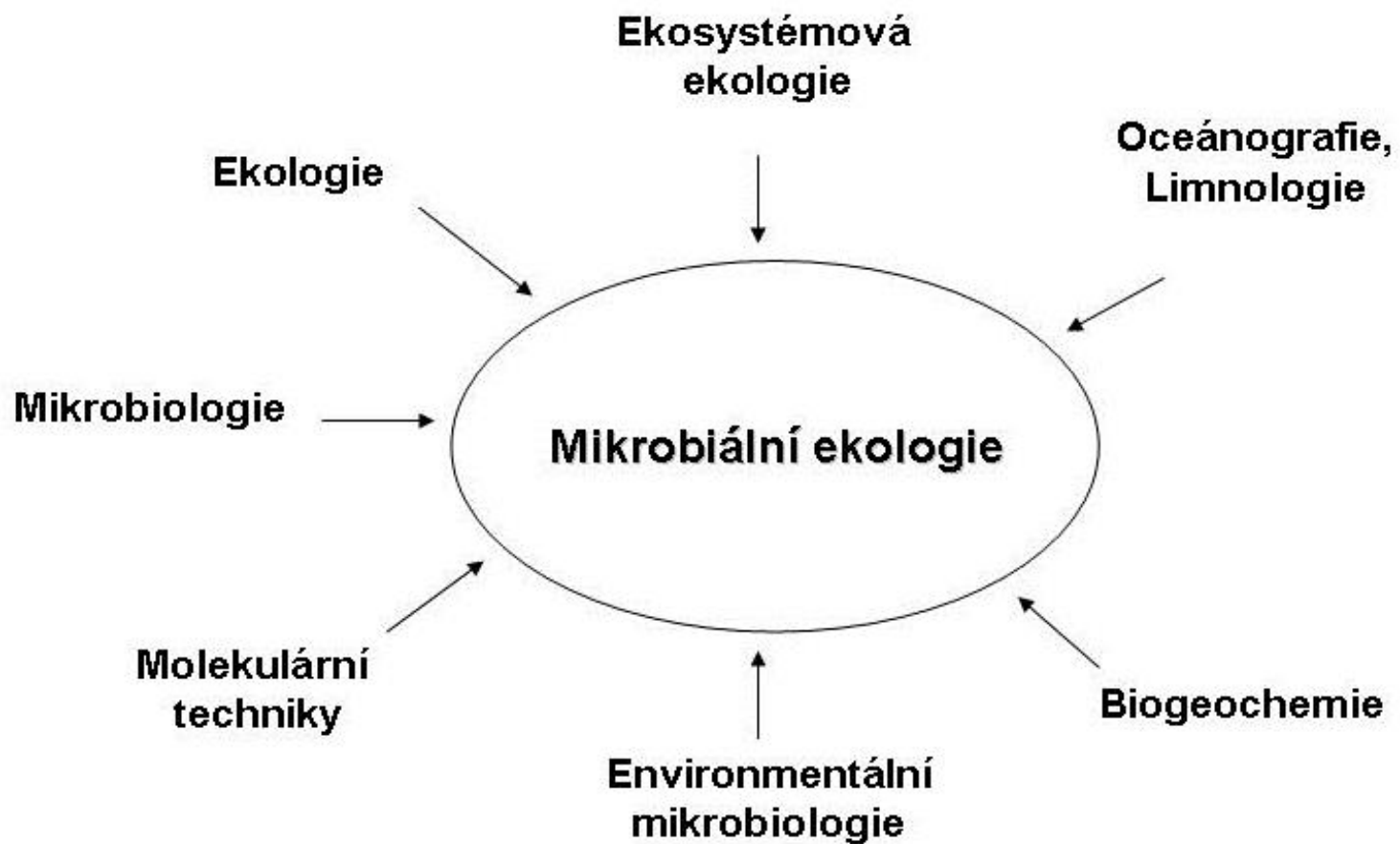
Mikrobi = zejména bakterie



Mikrobiální ekologie se zabývá vztahem mikroorganismů navzájem a vztahy mezi nimi a prostředím

3 hlavní domény Eukaryota (prvoci, rostliny, živočichové), Archea (Archaeabakterie) a Bacteria (bakterie) — a také viry.

Microorganismy ovlivňují celou biosféru, jsou všudypřítomné a jejich výskyt zahrnuje nejextrémnější habitaty od kyselých jezer a hlubokých moří a od zamrzlých biotopů po horké termální výrony.



Hlavní otázky mikrobiální ekologie:

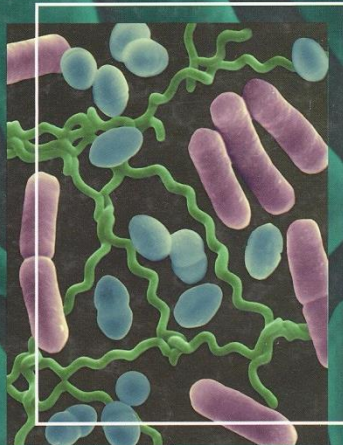
Jaký je vztah mezi **strukturou** a **funkcí** mikrobiálních společenstev?

→ **Structura**: phylogenetické složení společenstva

→ **Funkce**: metabolisms — co mikrobi dělají v přírodě

Microbial Ecology

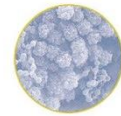
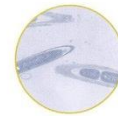
AN EVOLUTIONARY APPROACH



J Vaun McArthur



Microbial Ecology



LARRY L. BARTON • DIANA E. NORTHUP

 WILEY-BLACKWELL

UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V BRNĚ

FAKULTA PŘÍRODOVĚDECKÁ

Ekologie mikroorganismů

I.

Miroslav Němec

Státní pedagogické nakladatelství
Praha

OSTRAVSKÁ UNIVERZITA OSTRAVA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

EKOLOGIE MIKROORGANIZMŮ

Kateřina Malachová



OSTRAVA 2004

Mikrobiální ekologie vod

Martin Rulík a kolektiv



Přírodovědecká
fakulta

Molekulární mikrobiální ekologie

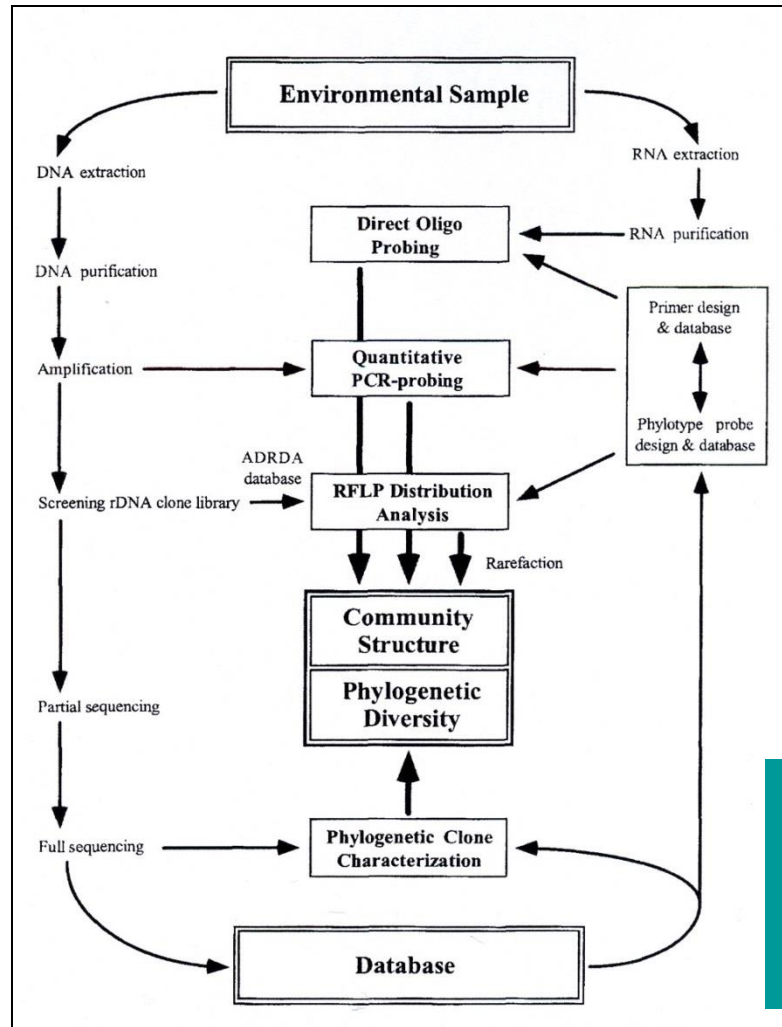
Většina mikroorganismů není kultivovatelná v laboratoři
Enormně rychlý rozvoj molekulárních technik

Molekulární ekologie mikroorganismů kombinuje poznatky a terminologii z širokého spektra různě se prolínajících oborů.

Nutné zvládnutí velkého množství základních termínů a pojmů

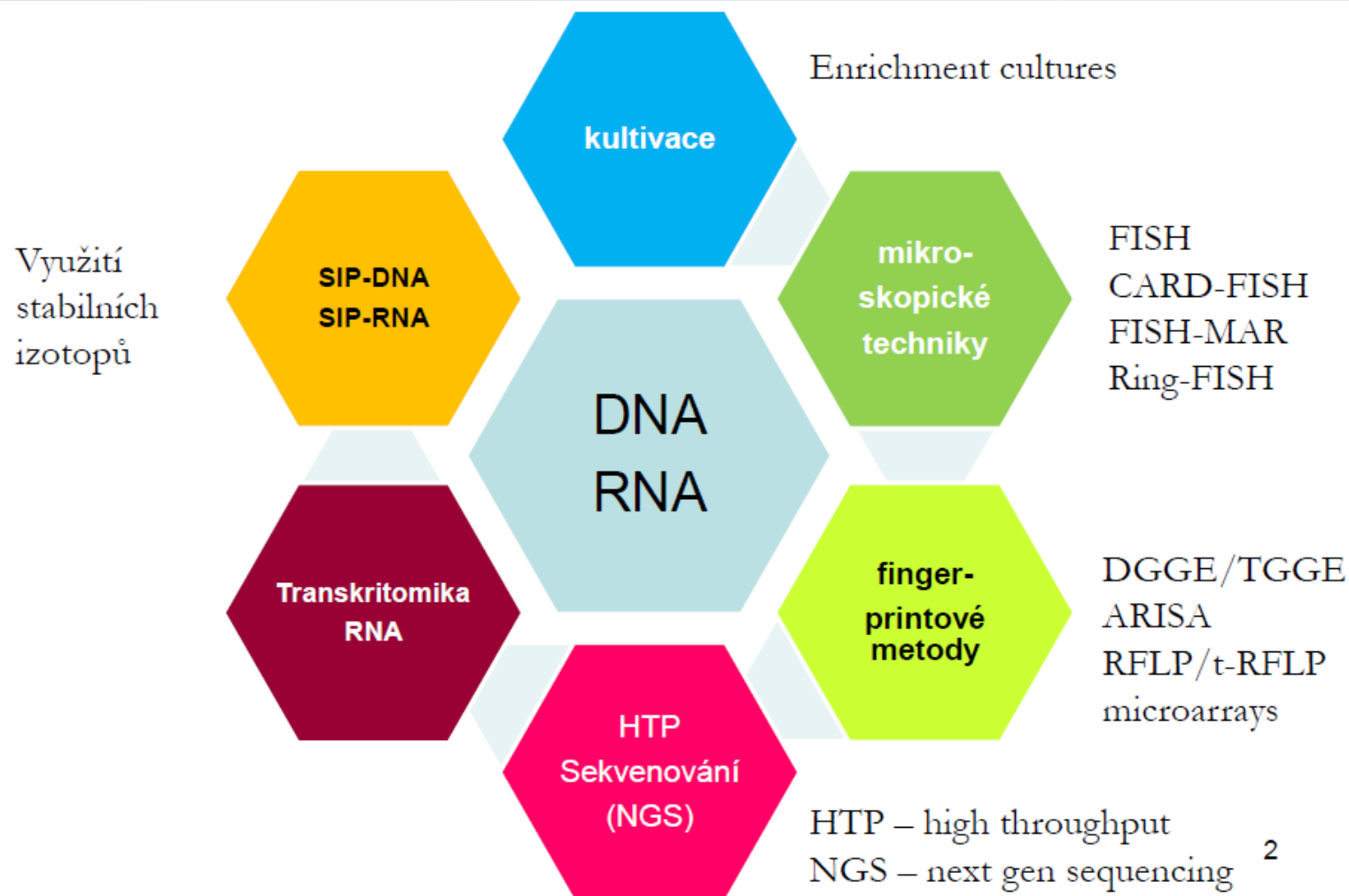
Molekulárně-biologické metody

- Identifikace nekultivovatelných bakterií (taxonomie)
- Studium bakteriálních společenstev a jejich změn (ekologie)



Schema postupu při analýze mikrobiálního společenstva pomocí molekulárních technik

Metody studia složení mikrobiálního společenstva



Několik základních pojmů (je dobré o nich minimálně vědět...)

Bakteriální DNA vs plazmid

DNA vs RNA

Ribozómy a rRNA

Genom a genomika (analýza celého genomu a jeho exprese)

Metagenomika a metagenom

Proteomika (analýza celého proteomu, tj. všech proteinů tkáně nebo organismu)

Whole genome sequencing (Environmental Shotgun Sequencing (ESS))

Sangerovo sekvenování

Pyrosekvenování

BIOINFORMATIKA (zpracování, analýza a interpretace velkých souborů dat
(NK a AMK sekvencí, gene arrays, 3D struktury proteinu atd))

GENOMIKA ...

PROTEOMIKA ...

Diverzita

Společenstvo

Bakterie vs Archea vs Eukaryota

Molecular Microbial Ecology

Edited by
A. Mark Osborn & Cindy J. Smith

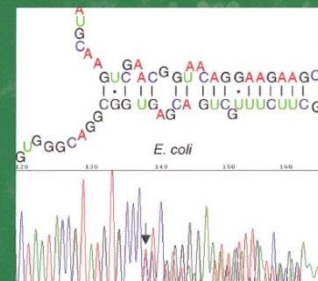
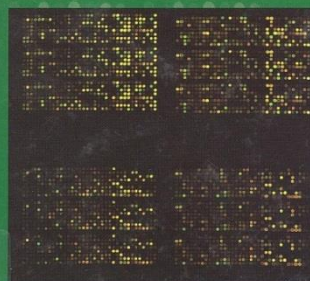
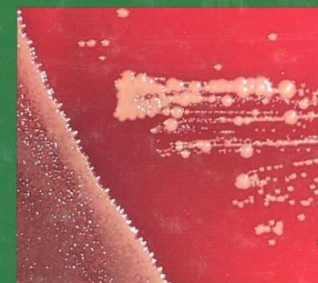
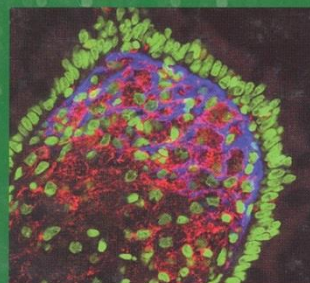


BIOS ADVANCED METHODS

MOLECULAR MICROBIOLOGY

Diagnostic Principles and Practice

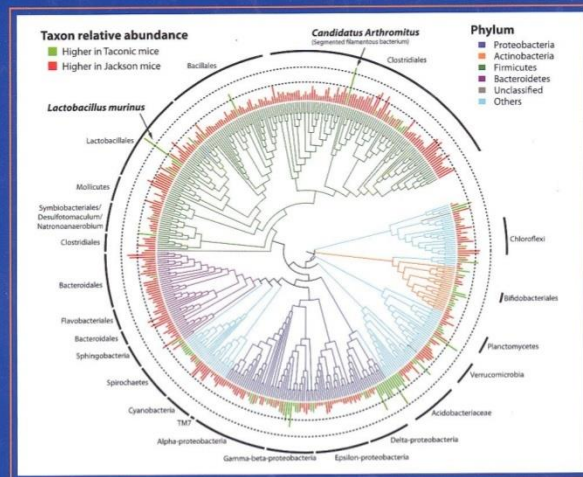
SECOND EDITION



David H. Persing, Fred C. Tenover, Yi-Wei Tang, Frederick S. Nolte,
Randall T. Hayden, and Alex Van Belkum, *Editors*

Handbook of Molecular Microbial Ecology I

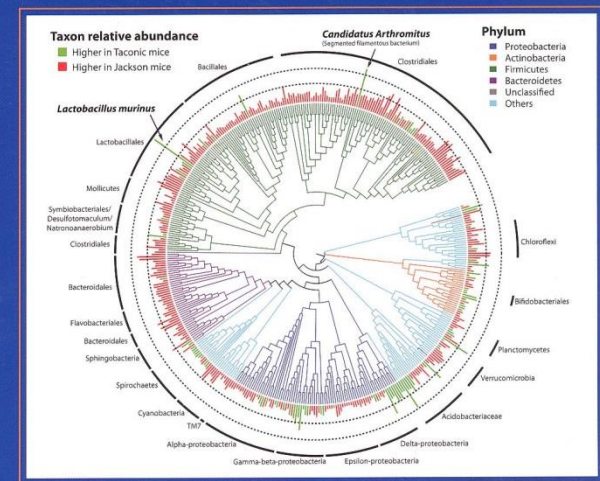
Metagenomics and Complementary Approaches



Edited by Frans J. de Bruijn

Handbook of Molecular Microbial Ecology II

Metagenomics in Different Habitats



Edited by Frans J. de Bruijn

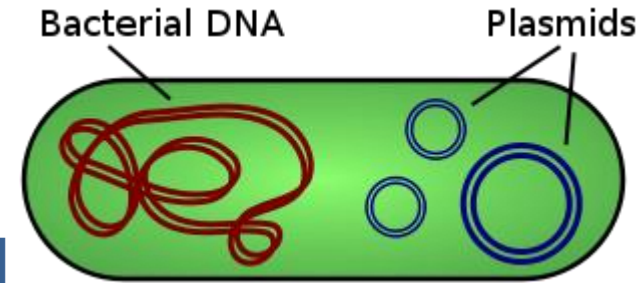
V mikrobiologii je obtížné použití tradičních pojmů (např. „druh“).

Pro sexuálně se rozmnožující organizmy s pravidelným meiotickým cyklem, jako je většina rostlin a živočichů a sexuálně se rozmnožující mikrobiální eukaryota, bylo sice navrženo asi 20 koncepcí, ale nejčastěji je používán tzv. biologický koncept druhu (*biological species concept*).

Tato koncepce říká, že **druh je soubor individuí, které se mohou navzájem křížit a produkovat potomstvo, které je dále schopné reprodukce, nemohou však produkovat fertilní potomstvo při křížení s příslušníky jiného druhu.**

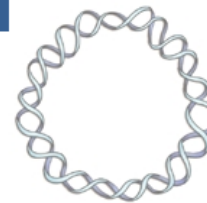
Tato definice však postrádá smysl v případě prokaryot, mnoha dalších mikroorganismů a dokonce i větších eukaryot, která se rozmnožují asexuálně a nemají pravidelný meiotický cyklus. Většina prokaryot může navíc vyměňovat genetický materiál mezi sebou a často i mezi značně nepříbuznými taxony.

Plazmid (též plasmid) je malá, většinou kruhová molekula DNA schopná replikace, která se přirozeně vyskytuje v cytoplasmě některých bakterií, archebakterií, méně obvykle i u eukaryot. Jedna bakteriální buňka může (v laboratorních podmínkách) obsahovat až několik stovek či vzácně až 3 000 molekul plazmidů. Jeden plazmid mívá velikost v rozmezí cca 1 000–200 000 párů bází



Plazmidová a virová DNA horizontální genový přenos (HGT)

Plazmidy:

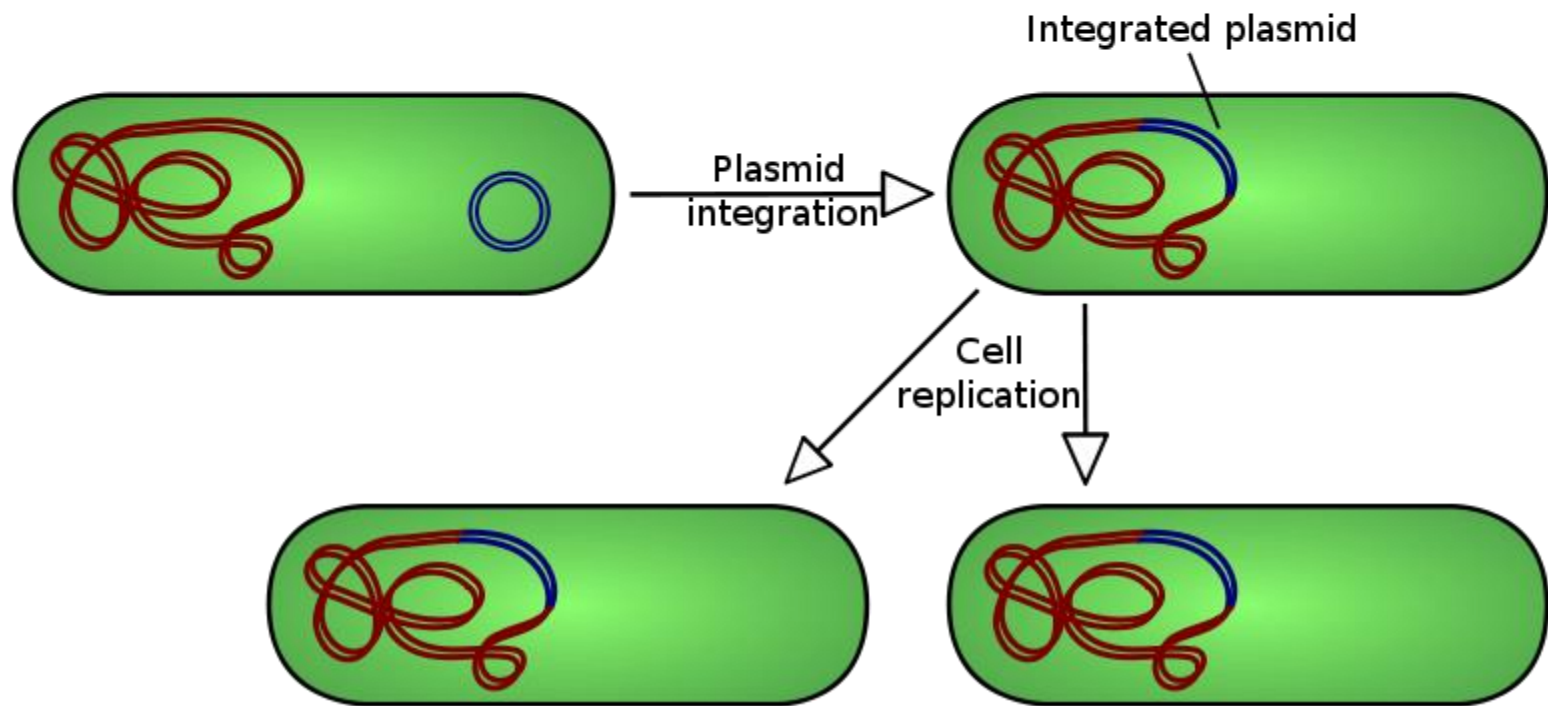
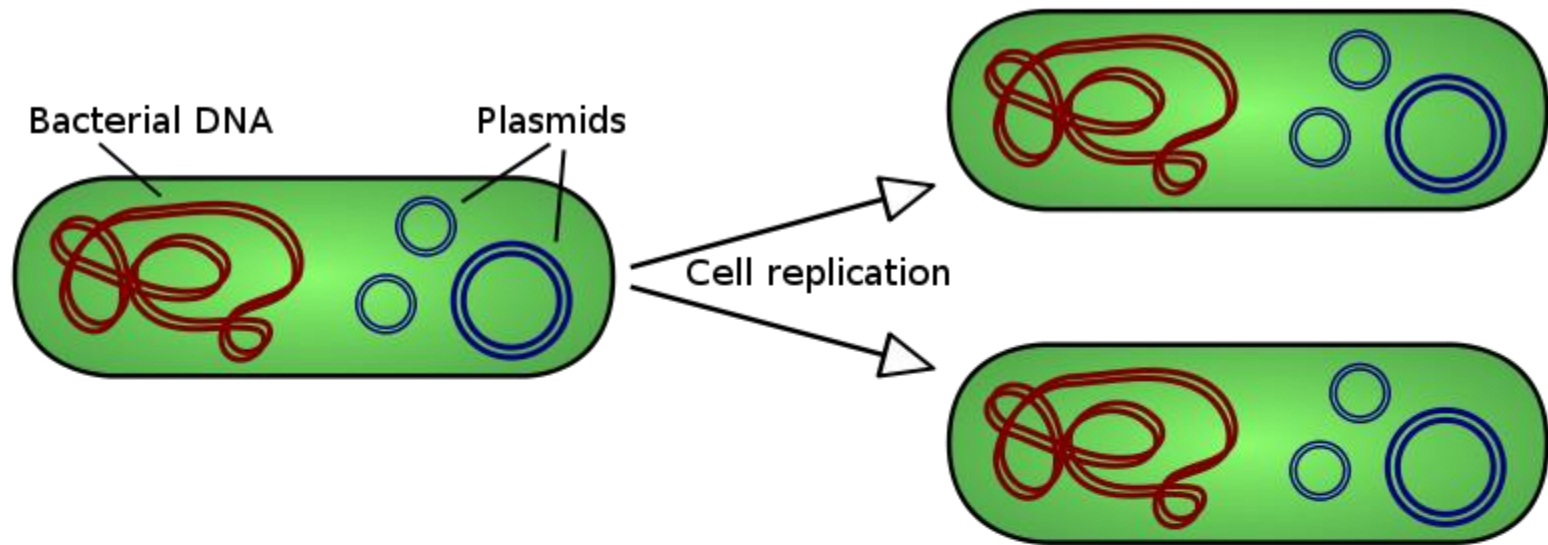


- Cirkulární formy dsDNA:
 - oc (open circle), má volné konce a alespoň 1 zlom v jednom řetězci
 - ccc (covalently closed circle), nemá volné konce a ani jeden zlom

Viry, bakteriofágy:

- Intracelulární parazité
- DNA (ds nebo ss) nebo RNA genom



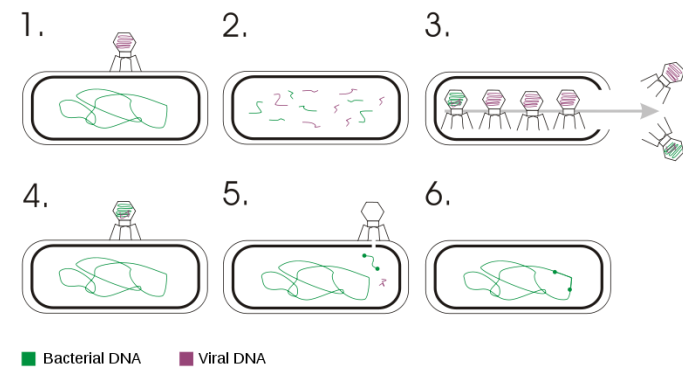
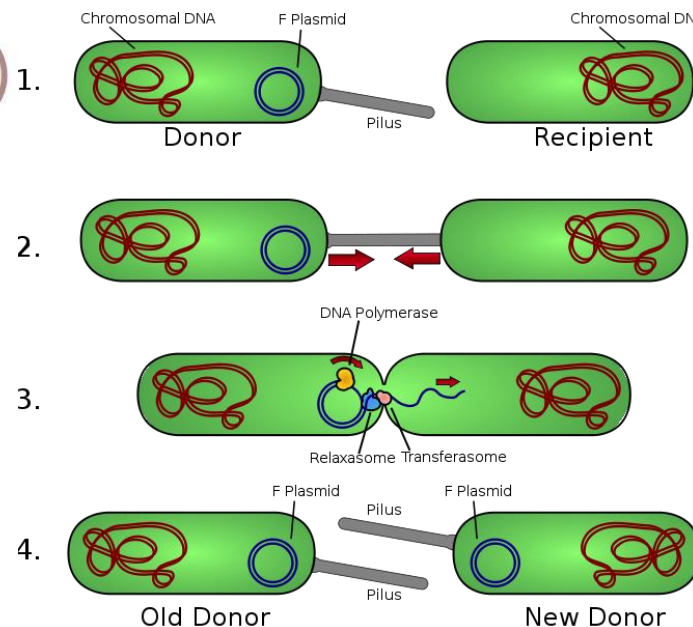
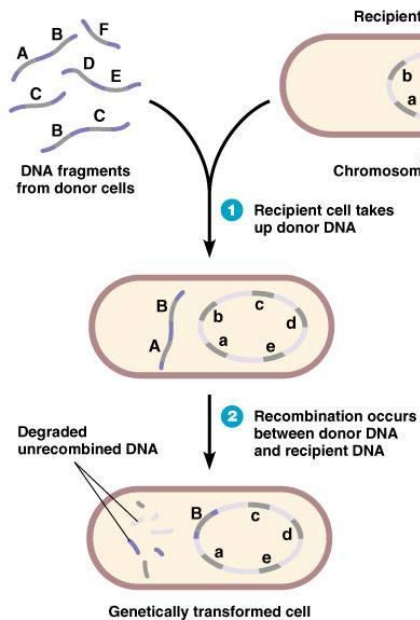


Horizontální přenos genetické informace (také laterální genový transfer)

je proces, při němž jeden organismus přijímá genetický materiál (DNA) jiného jedince, ačkoliv není jeho potomkem. Tím může získávat nové vlastnosti. Vyměňovaná DNA se někdy označuje jako **promiskuitní DNA**.

Horizontální genový transfer je významným procesem v životě bakterií i archeí. Je také důvodem, jak mohou patogenní bakterie získávat rezistenci k antibiotikům. Rozeznáváme tři základní mechanismy:

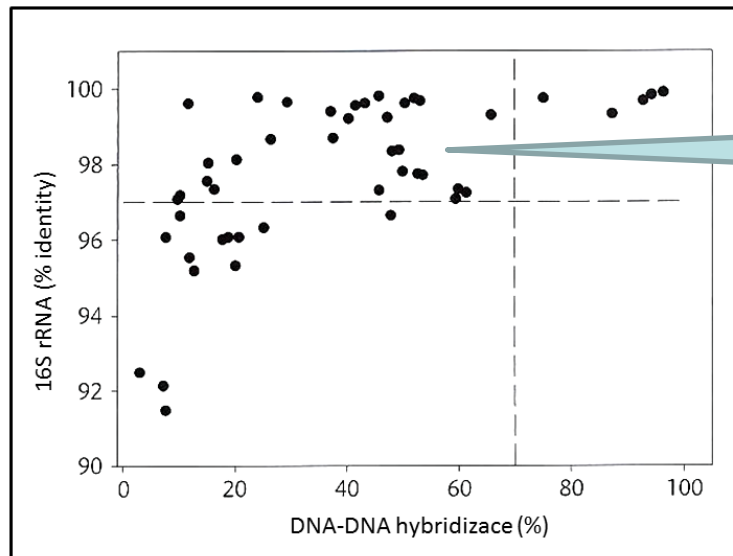
- **transformace** - příjem DNA z okolního prostředí
- **konjugace** - výměna DNA mezi bakteriemi pomocí speciálních struktur, tzv. pilusů
- **transdukce** - výměna DNA pomocí virů, které ji mezi jednotlivými jedinci přenášejí



Dvě bakterie nebo dvě archea patří do jednoho druhu, jestliže si jejich 16S rRNA geny jsou $\geq 97\%$ podobné.

Tato $\geq 97\%$ hranice je založena na datech srovnávající 16S rRNA podobnost versus DNA-DNA hybridizaci pro bakterie v čistých kulturách; DNA-DNA hybridizace je vyjádřena jako procento, kolik genomu z jednoho organismu hybridizuje (naváže se) na genom jiného organismu.

Některá data naznačují, že dva organismy patří k jednomu a téže druhu, pokud jejich DNA-DNA hybridizace byla minimálně 70%. Tato 70% hladina souhlasí s 97% prahovou hodnotou pro 16S rRNA data a $\sim 94\%$ průměrnou identitou nukleotidů na úrovni celého genomu



značný rozptyl
v okolí 97%

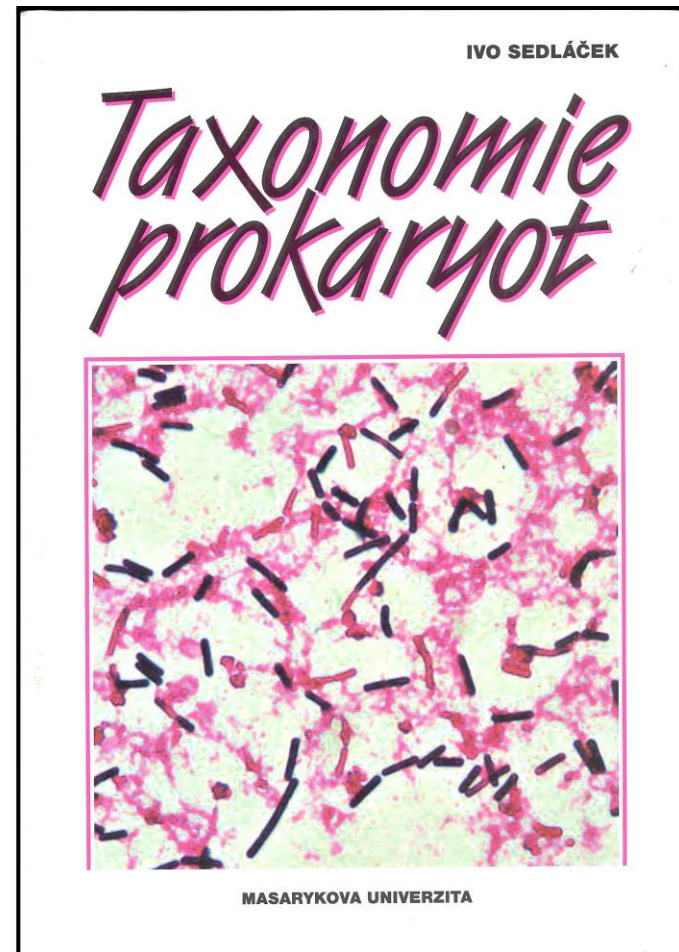
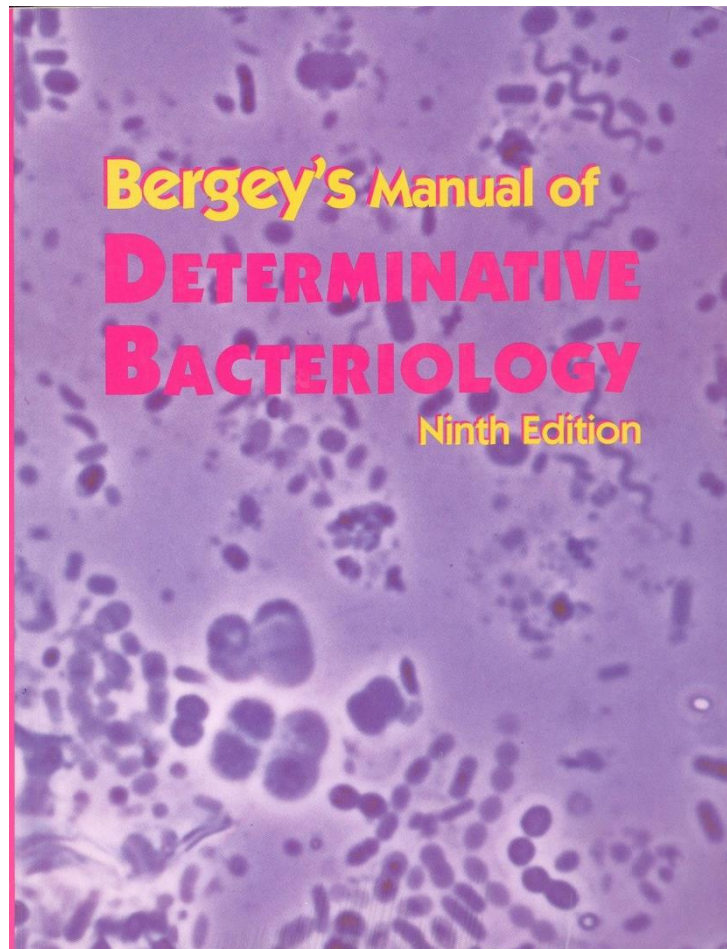
V mikrobiologii proto používáme pojmy jako:

ribotyp (*ribotype*), **fylotyp** (*phylotype*) a **operativní taxonomická jednotka** (*operational taxonomic unit*, OTU). Obvykle jsou tyto termíny používány pro popis organismů, jejichž 16S rRNA geny vykazují $\geq 97\%$ podobnost.

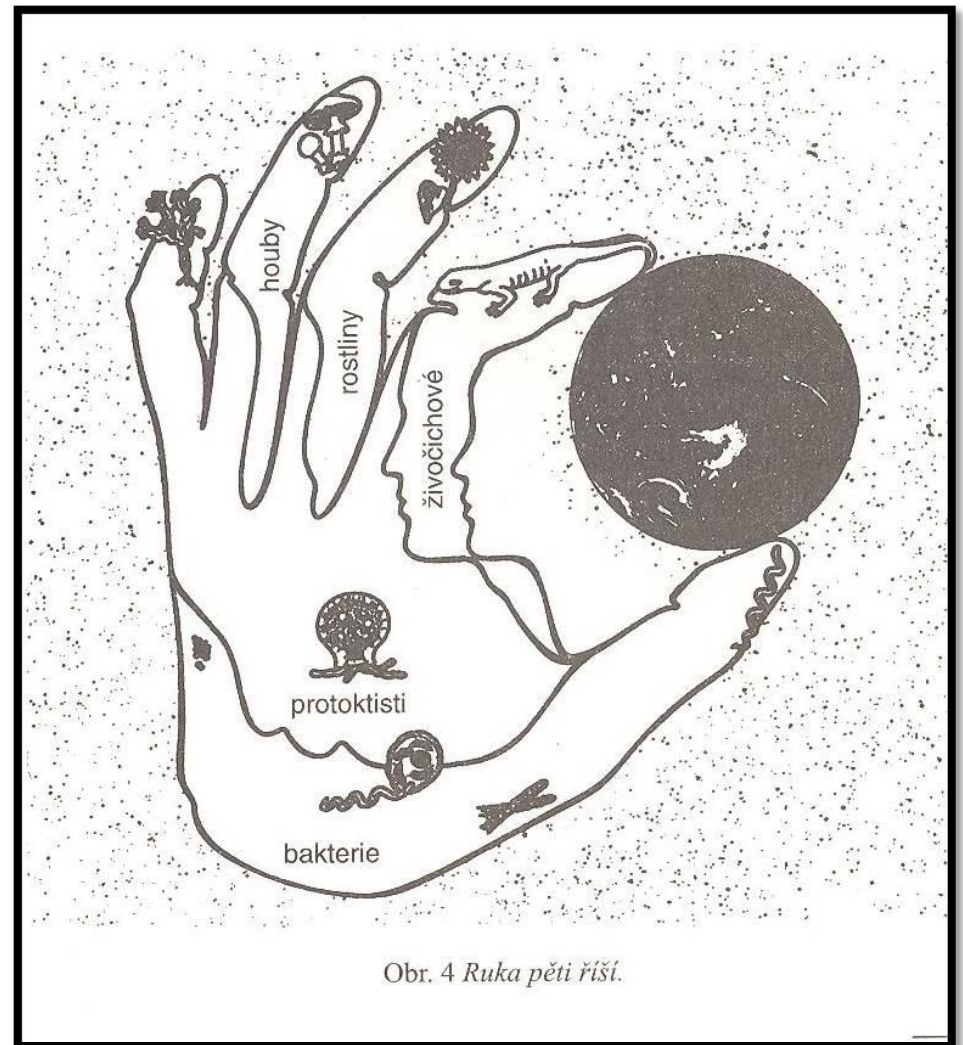
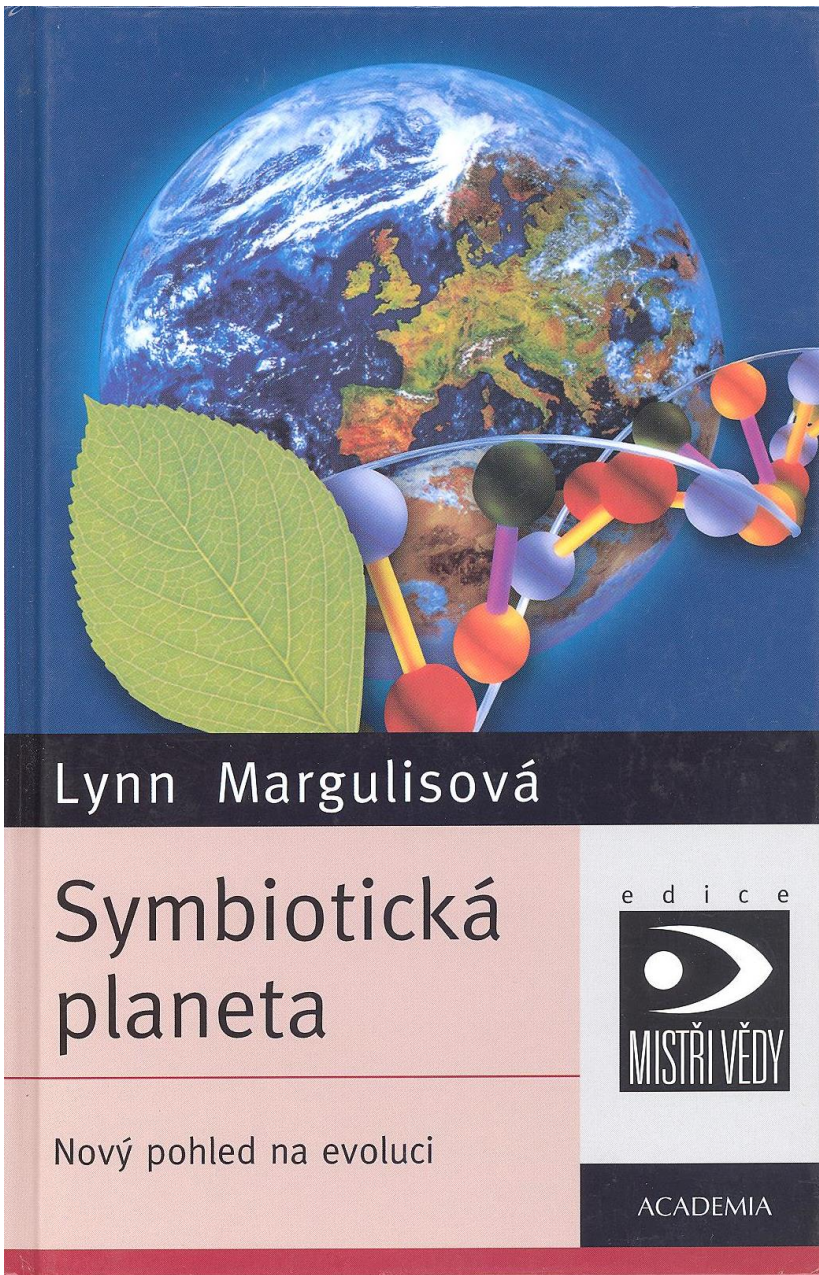
V mikrobiologii za **fylotyp** považujeme sekvenci environmetální DNA nebo skupinu sekvencí, které sdílejí více než arbitrárně zvolenou hladinu podobnosti s konkrétním genovým markerem. Dvě prokaryotické sekvence patří ke stejnému fylotypu, pokud je jejich podobnost **vyšší než 97-98%** v případě eukaryot je rozpětí hodnot podobnosti nukleotidů obecně vyšší (98-99%).

Tradiční vs fylogenetický přístup

Biologové a zejména taxonomové zpravidla klasifikují živé organizmy na základě jejich **morfologických** a **fyziologických vlastností**, avšak v případě mikroorganismů se tento přístup ukázal jako nedokonalý.



5 úrovní (říší)



Fylogenetický systém klasifikace vychází ze srovnání informačního obsahu makromolekul mikroorganismů, především nukleových kyselin a proteinů. Pokud si dva organizmy jsou blízce příbuzné, očekáváme, že sekvence individuálních jednotek v makromolekule si budou více podobné než v případě dvou nepříbuzných organismů

1977 Carl Woese a kol. **Three Domain System**

Hlavní fylogenetické skupiny

1. **Prokaryota** (2 domény)

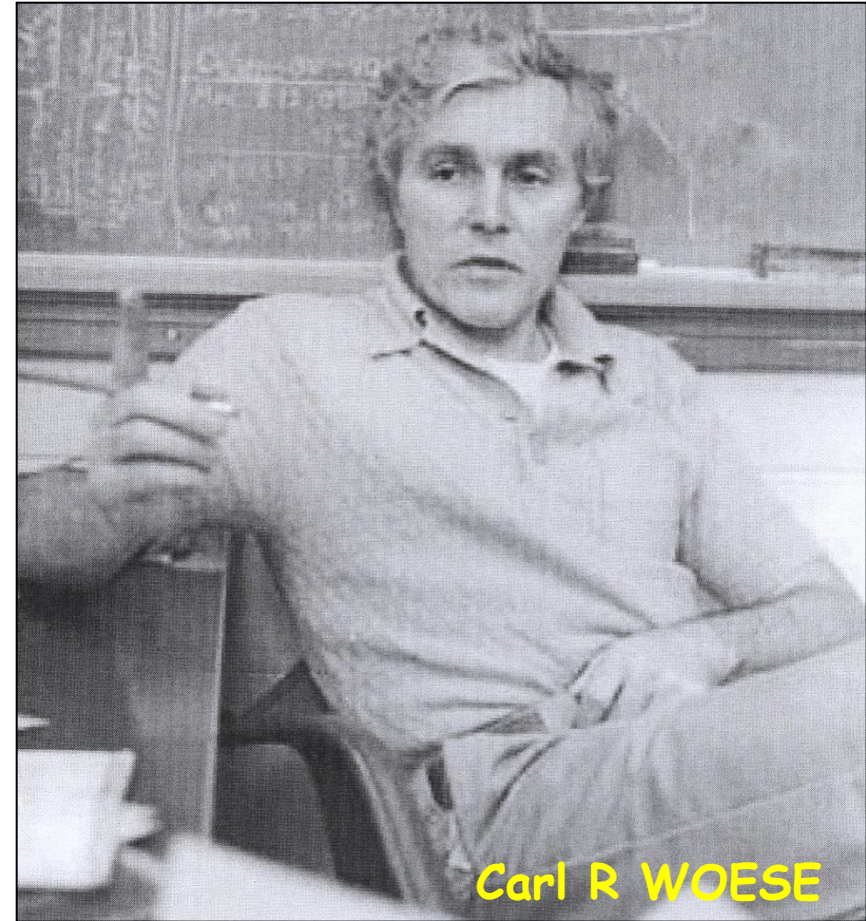
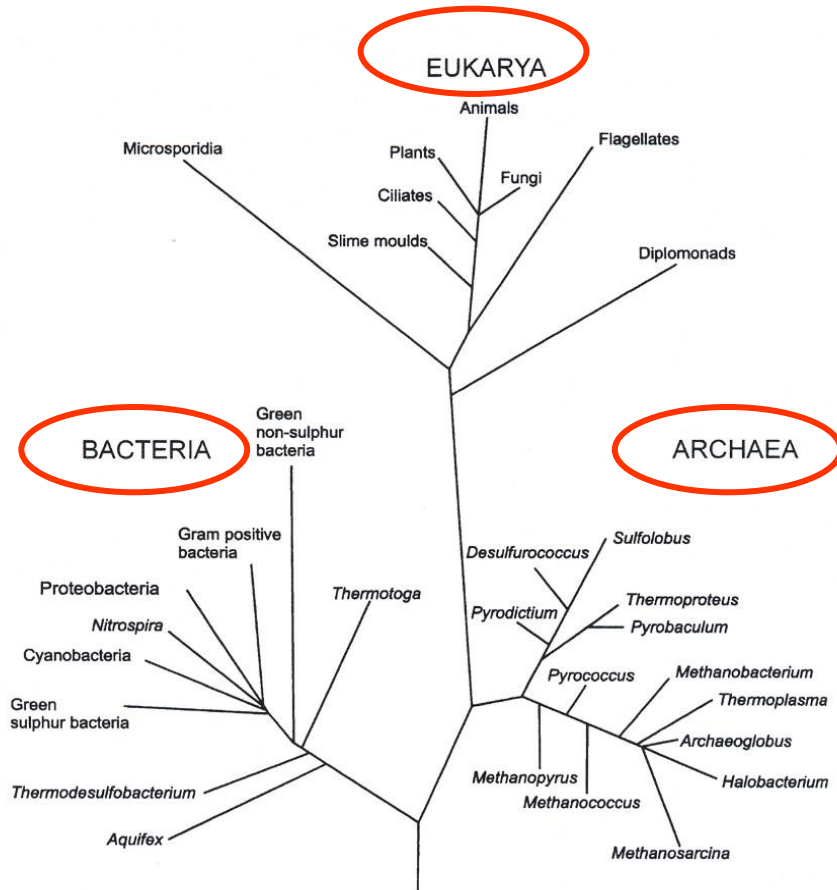
Bacteria

Archaea (Archaeabacteria)

2. **Eukaryota**, doména Eucarya

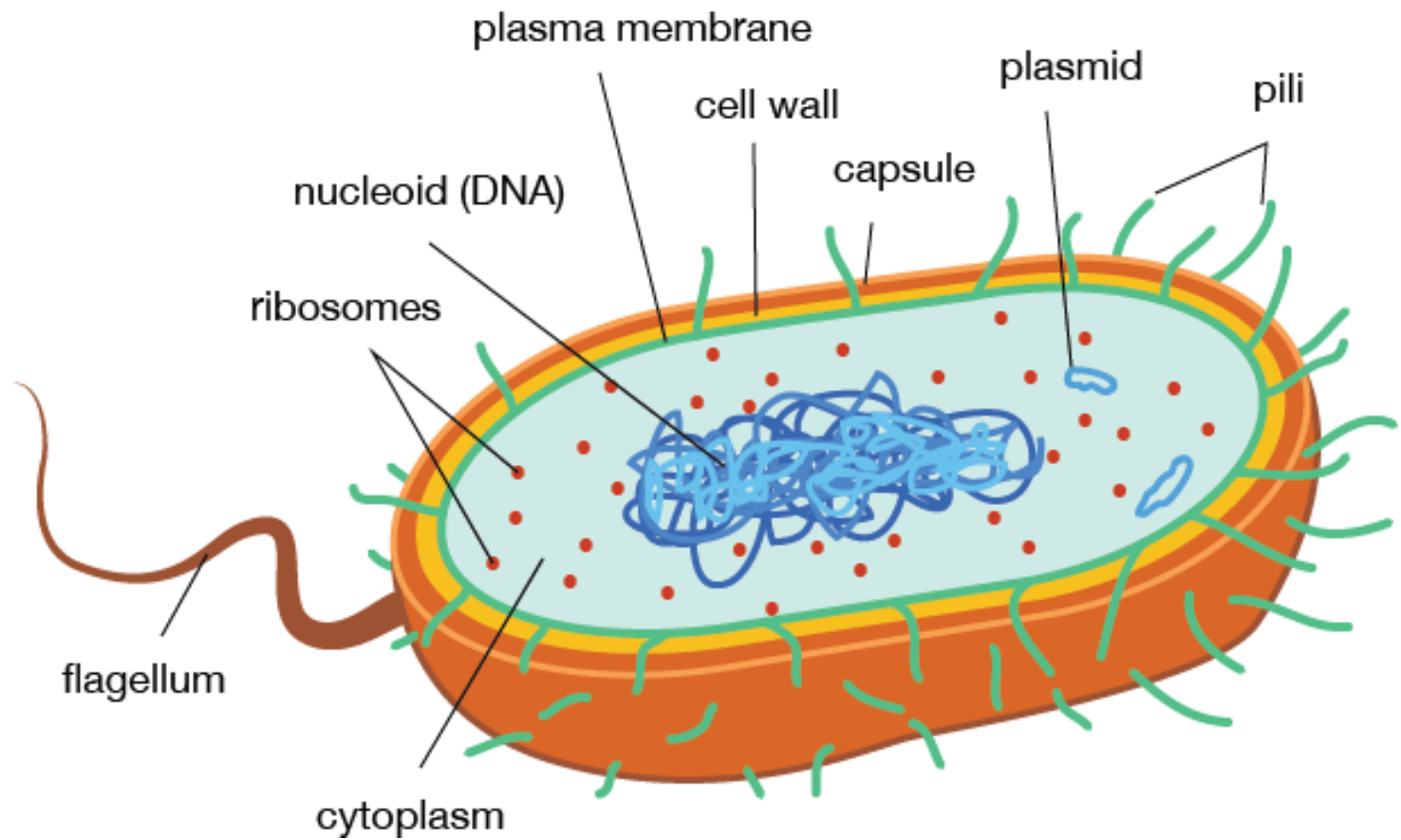
The three domains of life

(„Molecular sequence-based phylogenetic tree“)



Carl R WOESE

Woese C, Fox G (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms.".
Proc Natl Acad Sci USA 74 (11): 5088–90.



Large subunit

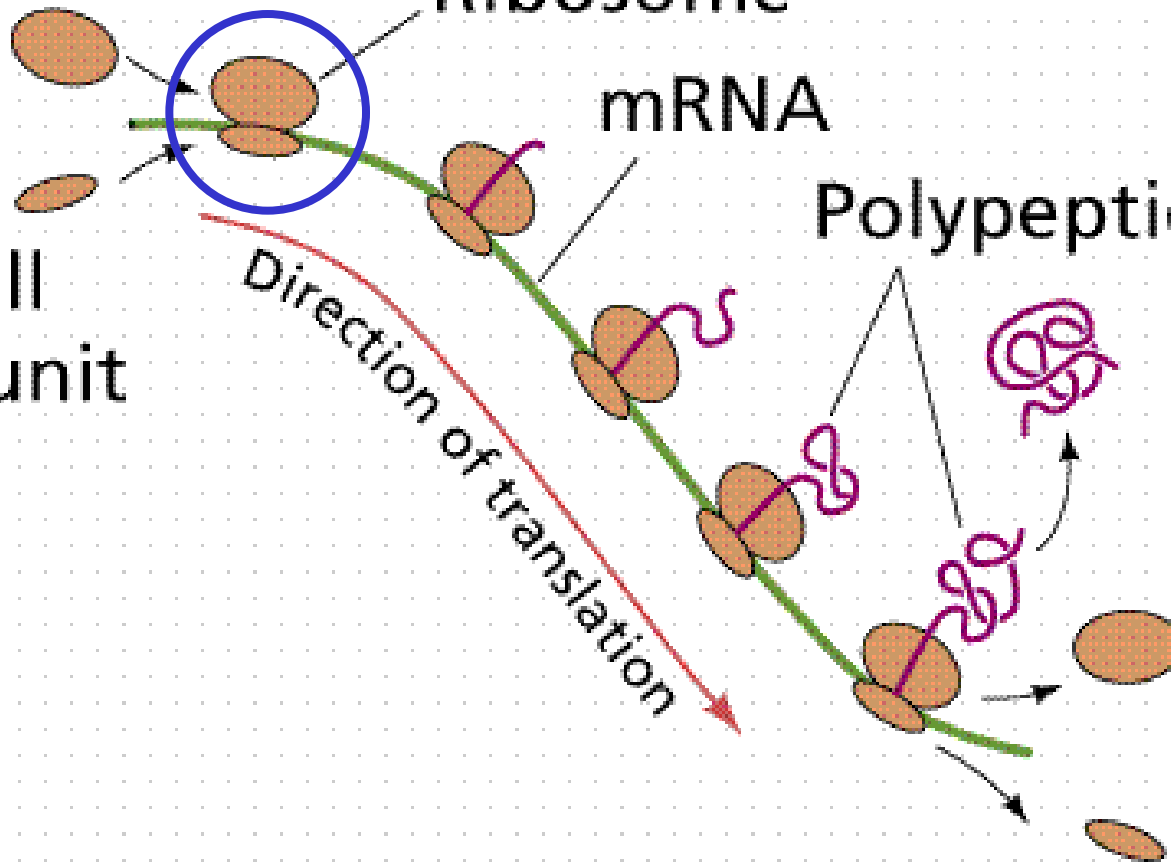
Ribosome

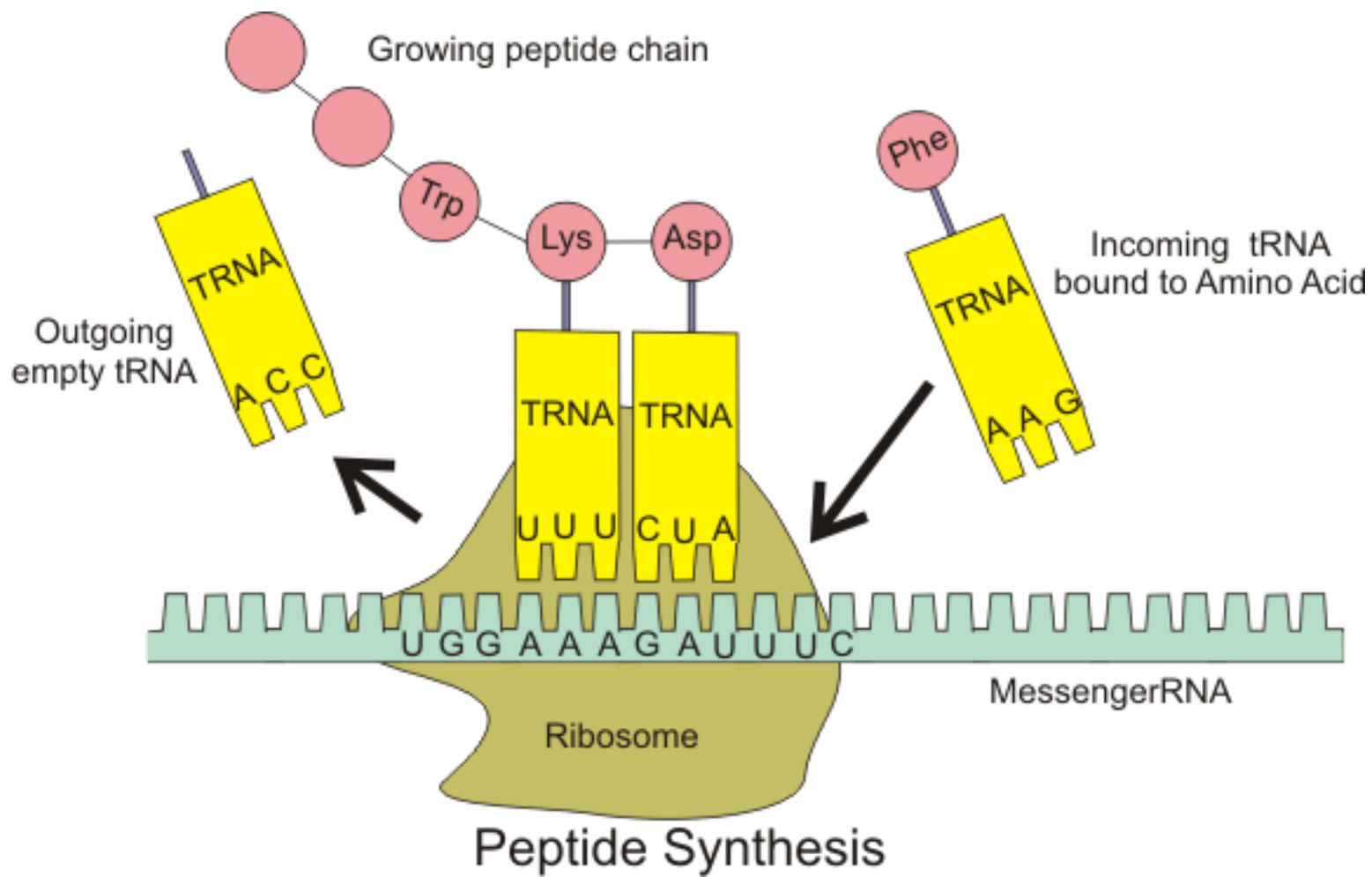
mRNA

Polypeptide chain

Small
subunit

Direction of translation





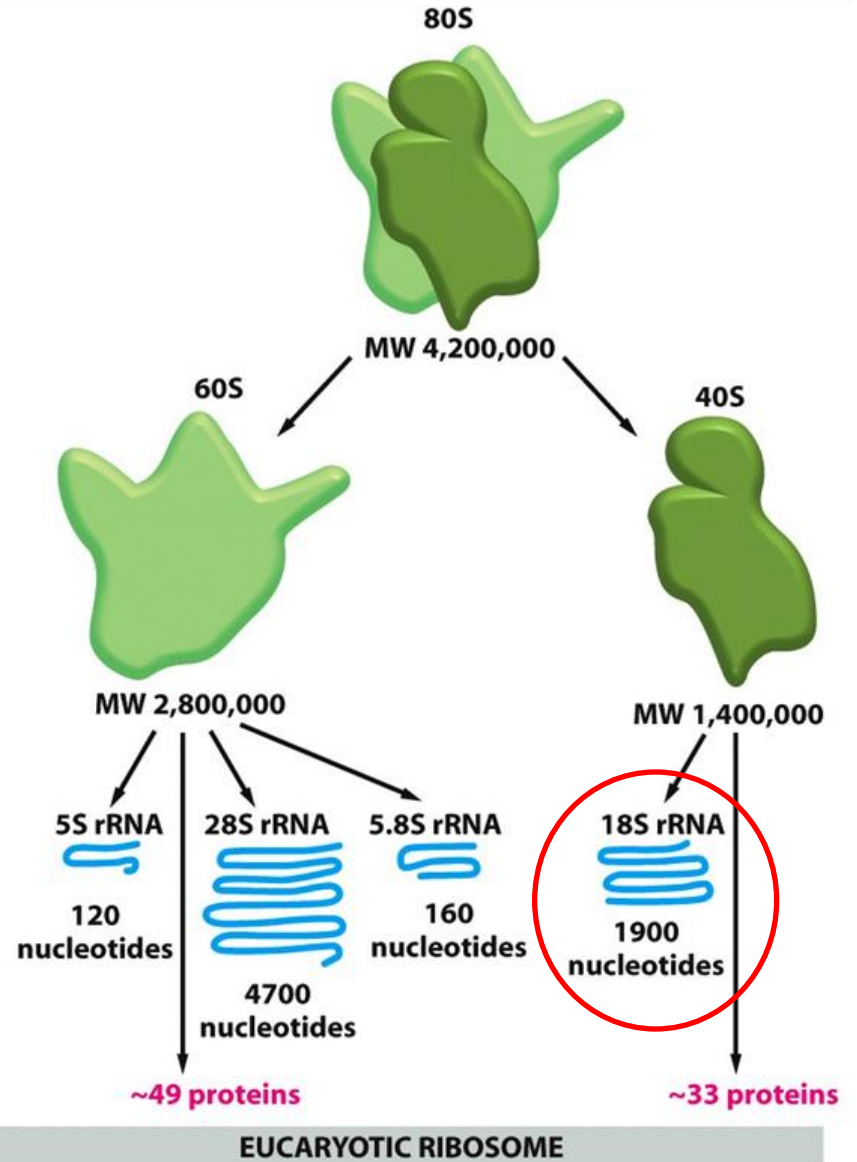
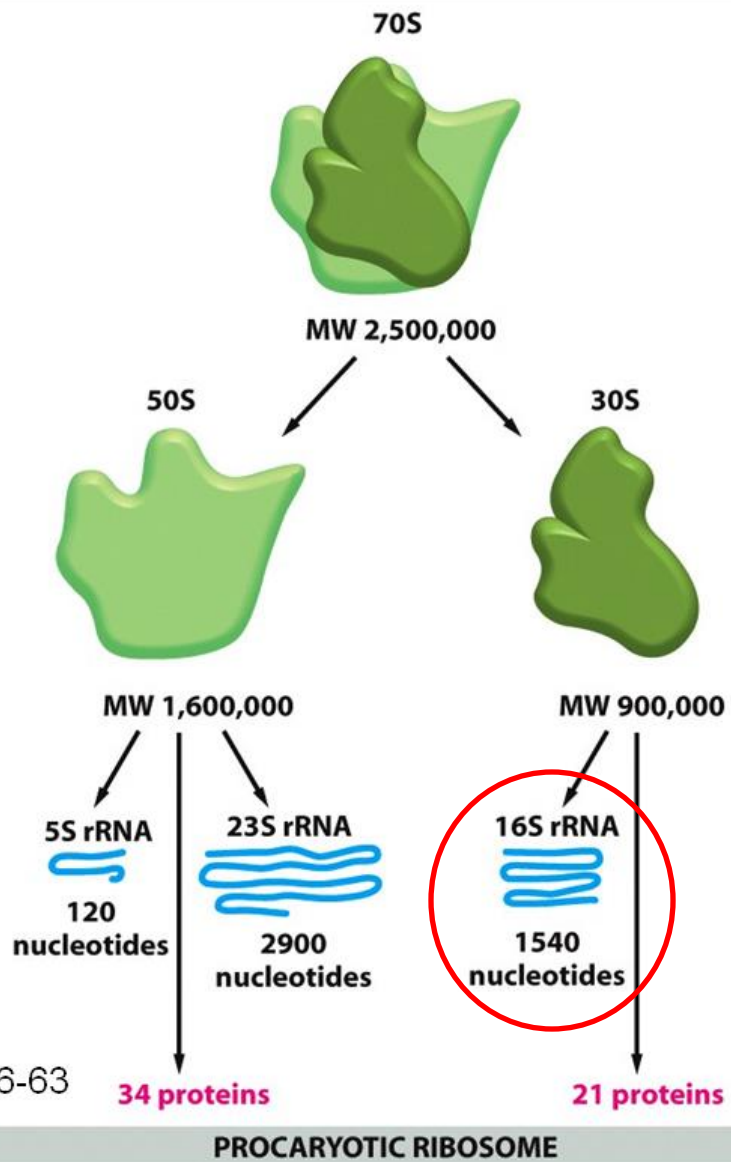
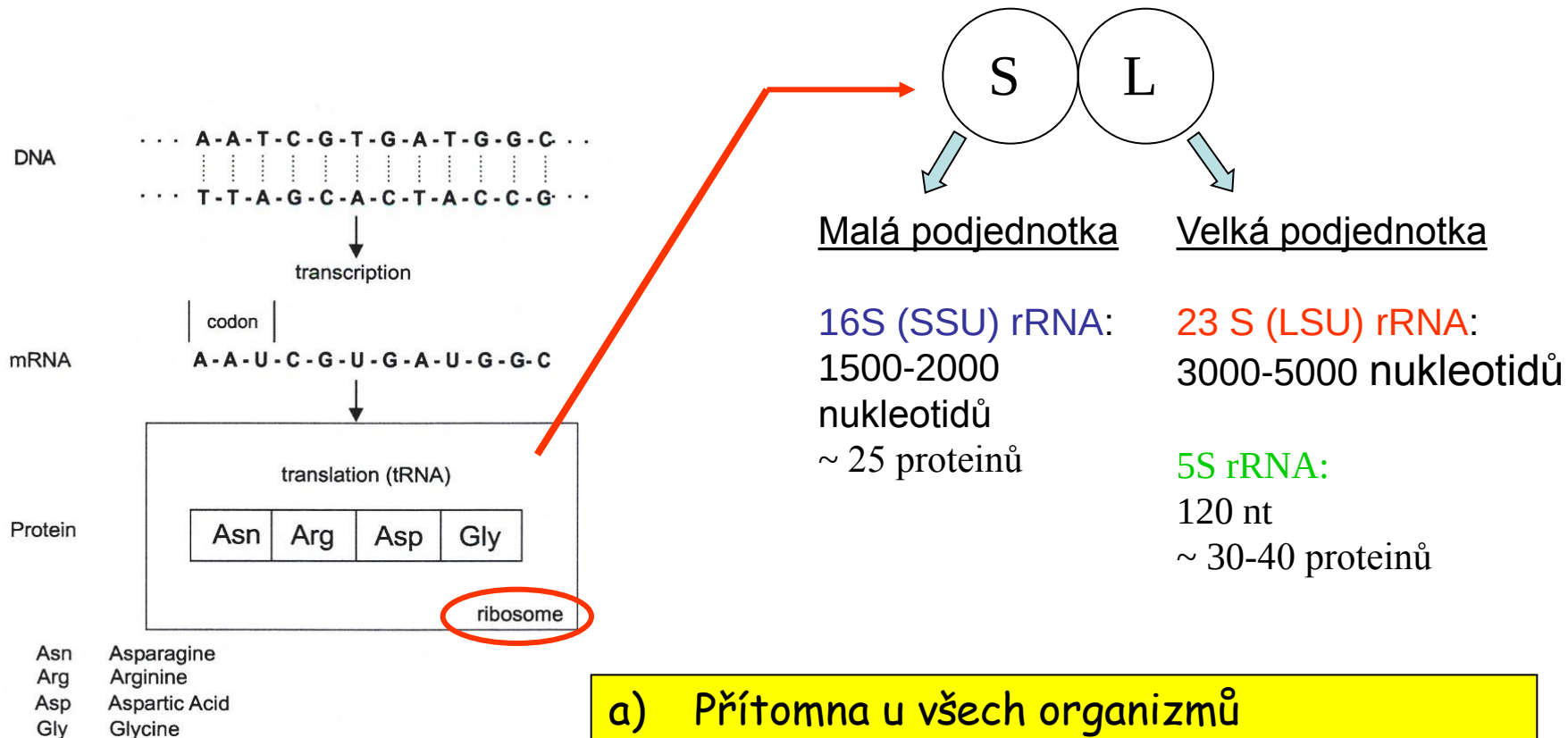


Figure 6-63

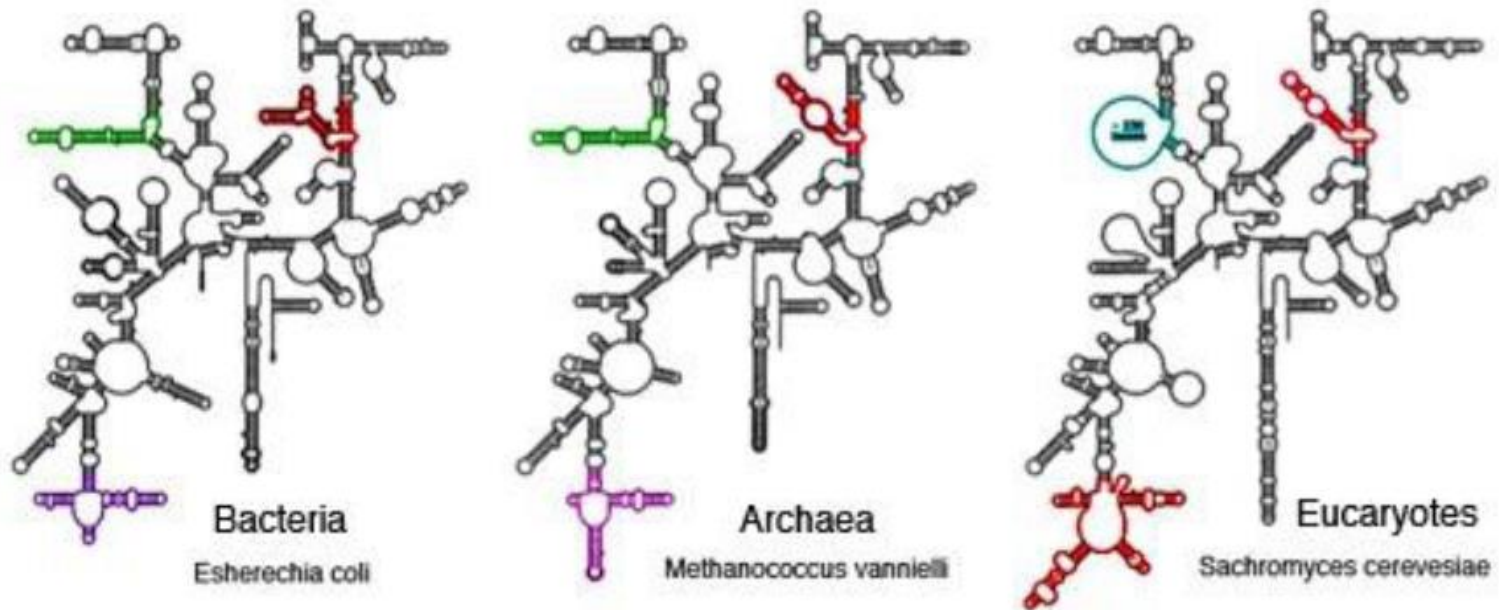
„Vhodná“ molekula pro fylogenetiku všech organismů

Ribosomální RNA (rRNA)

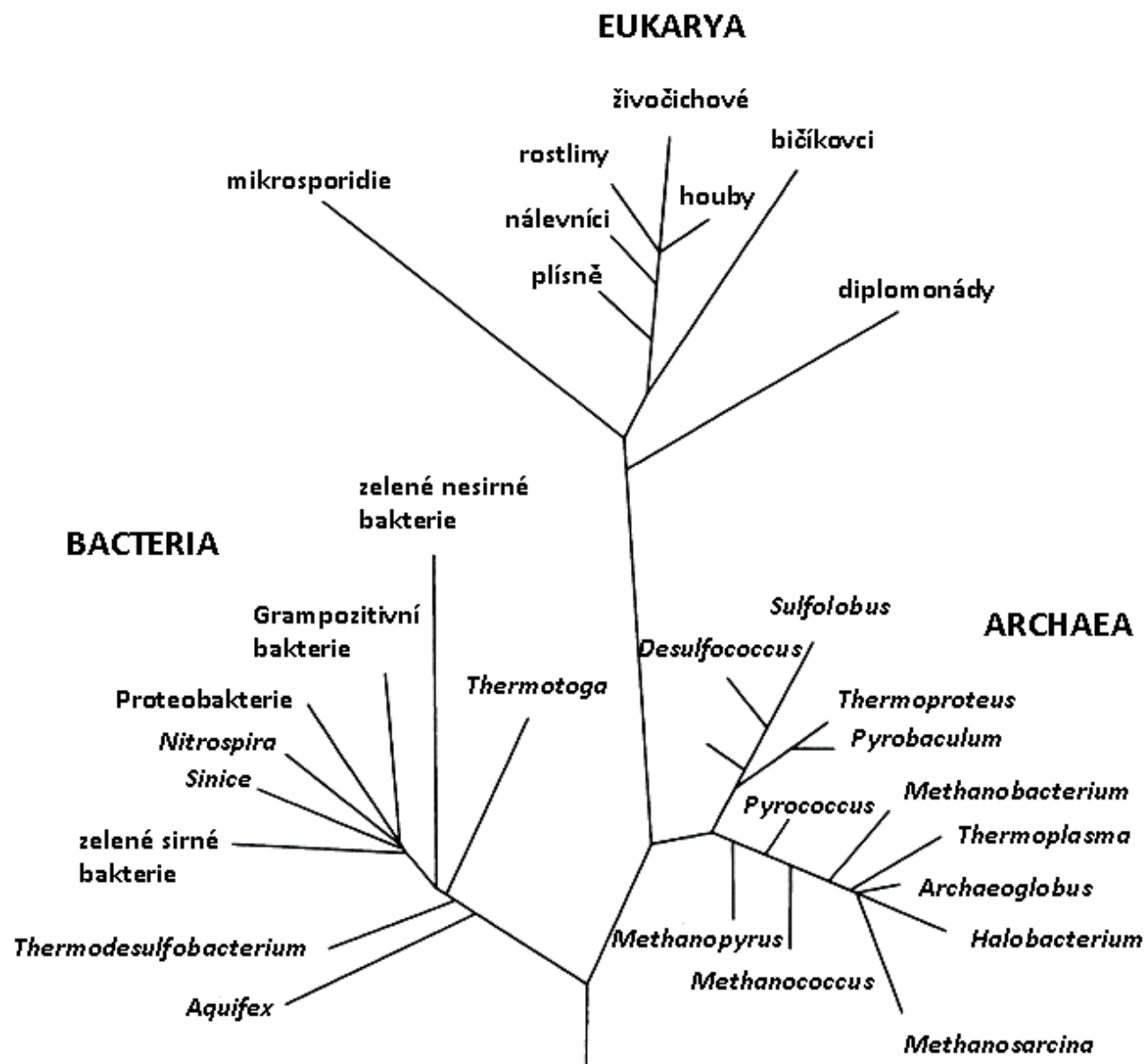


- a) Přítomna u všech organismů
- b) Syntéza proteinů
- c) Vysoce konzervativní úseky sekvencí

Strukturní rozdíly rRNA molekul



Klíčové strukturní rozdíly rRNA molekuly velké podjednotky ribozomu (LSU rRNA) odlišující 3 domény života (Woese 1987)



Mikroorganismy

Velká metabolická a genetická různorodost

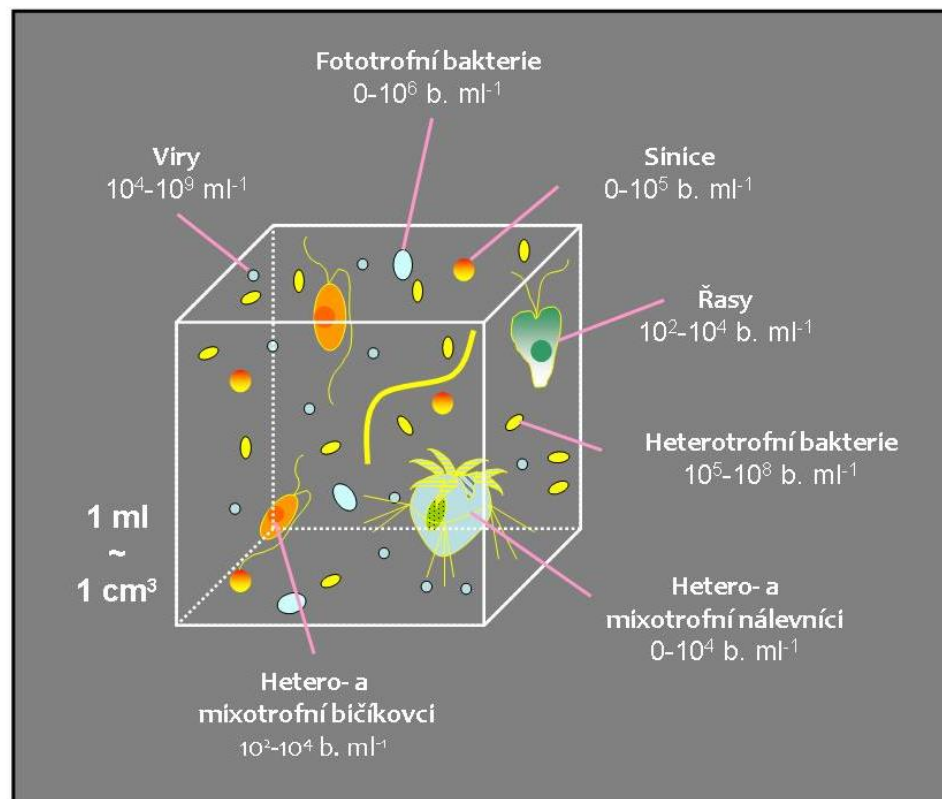
Veškeré formy života rozděleny do 3 domén:

- Archaea
- Bacteria
- Eucarya

- fylogenetická příbuznost sekvencí genu pro SSU rRNA (Woese et al., 1990)

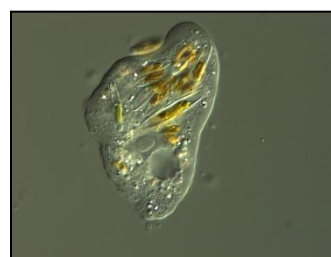
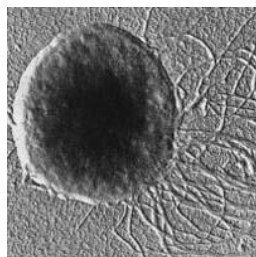
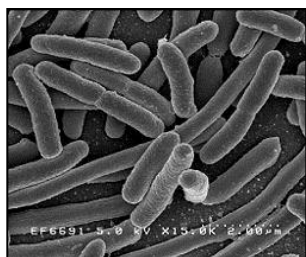
Prokaryota (Archaea a Bacteria) – 16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA

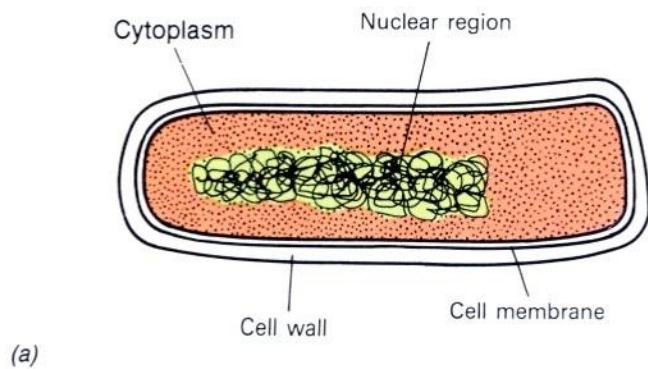
Eucarya – 18S rRNA, 5.8S rRNA, 28S rRNA, 5S rRNA



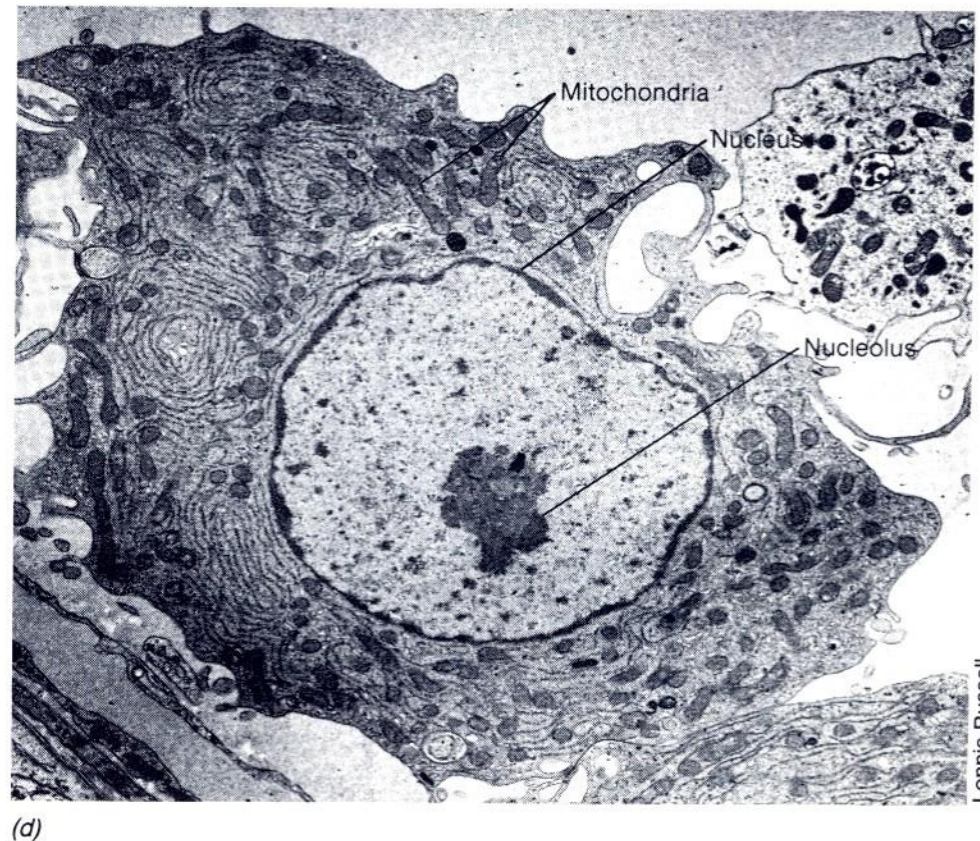
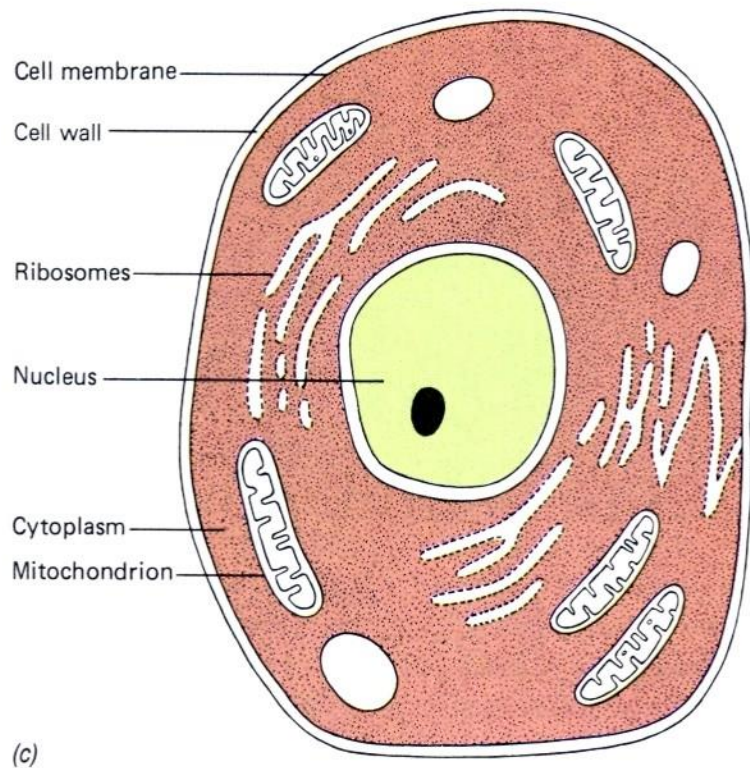
Tabulka 1.2. Hlavní vlastnosti bakterií, archeí a eukaryot (podle různých autorů)

Vlastnost	Bacteria	Archaea	Eucarya
1. Jádro	Chybí	Chybí	Přítomno
2. Buněčná stěna	Muramová kys.	Muramová kys. Chybí	Muramová kys. Chybí
3. Membránové lipidy	Esterová vazba	Etherová vazba	Esterová vazba
4. Ribosomy	70S	70S	80S (v cytoplazmě)
5. Iniciátorová tRNA	Formylmethionin	Methionin	Methionin
6. Introny v tRNA genech	Vzácně	Ano	Ano
7. RNA polymerázy	jedna (4 podjednotky)	Několik (8-12 podjednotek každá)	Tři (12-14 podjednotek každá)
8. Sensitivita k chloramfenikolu, streptomycinu a kanamycinu	Ano	Ne	Ne (cytoplazma)





Howard Gest

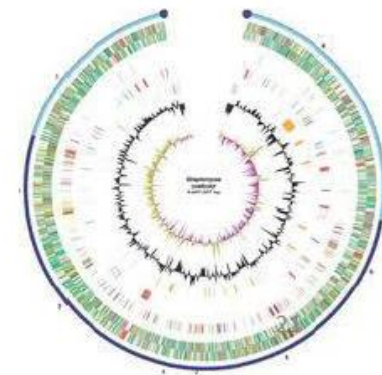
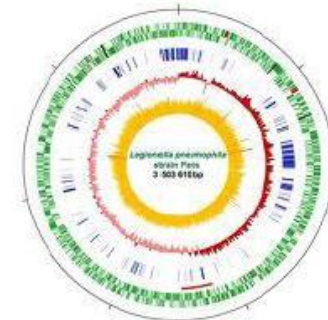


Lonnie Russell

Figure 1.9 Structure of microbial cells. (a) Diagram of a procaryote. (b) Electron micrograph of a procaryote. (c) Diagram of a eucaryote. (d) Electron micrograph of a eucaryote.

Genom prokaryot

- Chromozom:
 - kruhový (většina)
 - lineární (streptomycety)
- Extrachromozomální: plasmidy
- Vysoká hustota: 1 gen/1 kb vs. (člověk 1 gen/30kb)
- Mobilní genetické elementy (MGE), pseudogeny, fágy, profágy



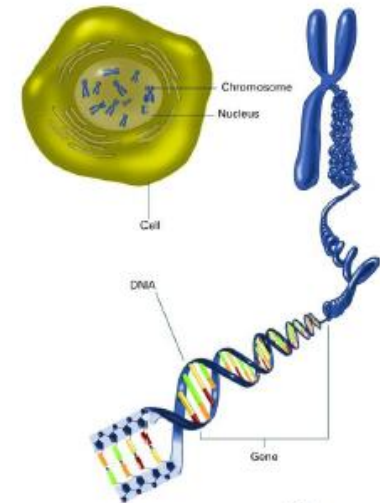
Genom eukaryot



- 1 nebo více **chromozomů** (jaderný genom)
- **Genom organel** – mitochondrie, plastidy (mtDNA, ctDNA)

Unikátní charakteristiky:

- Lineární genom s telomerami
- Splicing, trans-splicing (introny)
- Poly(A) na 3'konci mRNA
- Množení nepřekládaných oblastí genů
- Nárůst počtu genů



PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC CHROMOSOMES

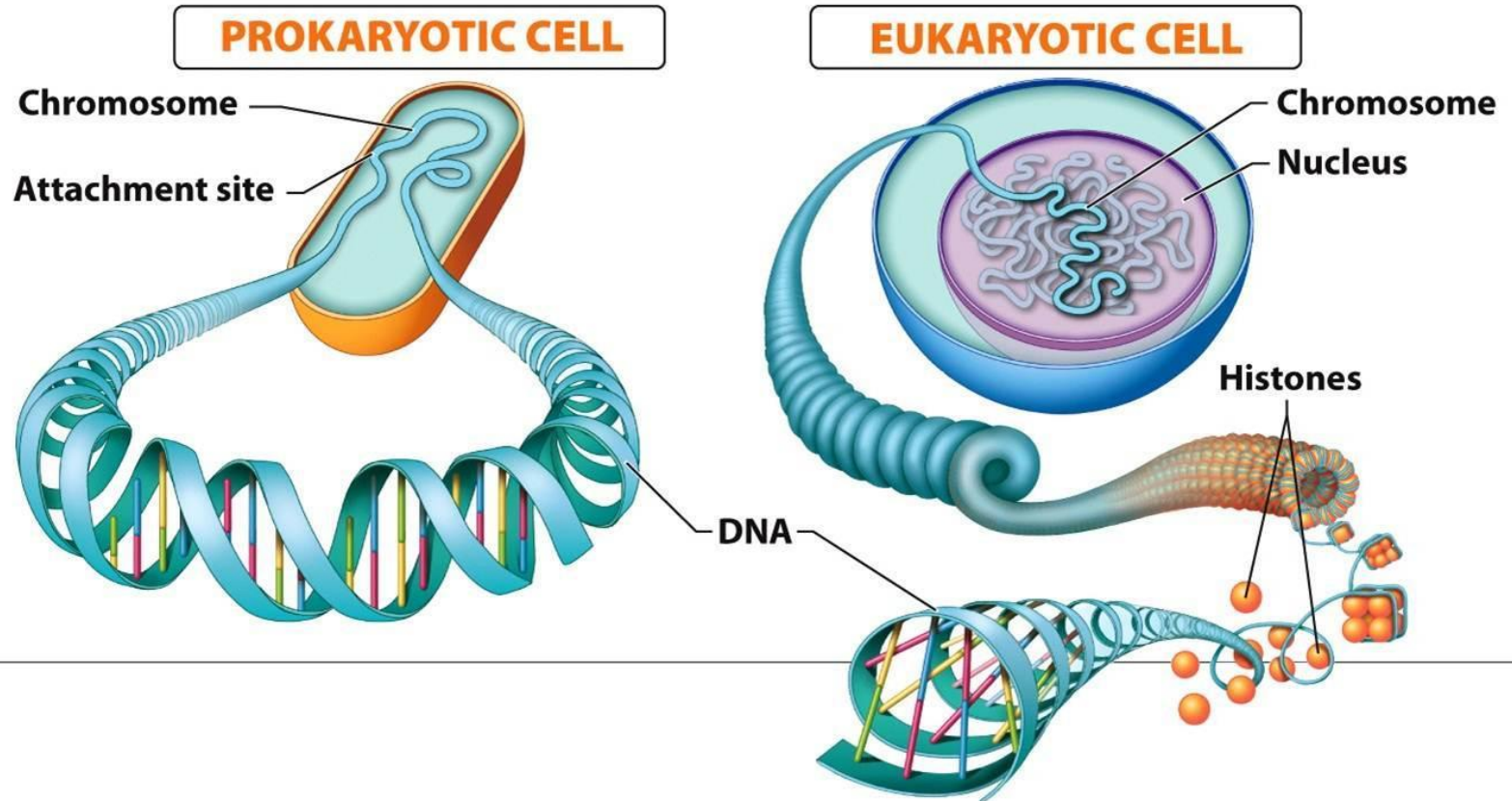


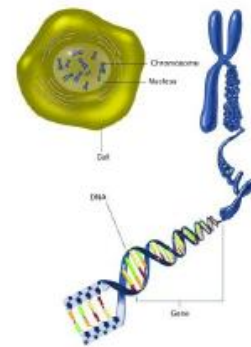
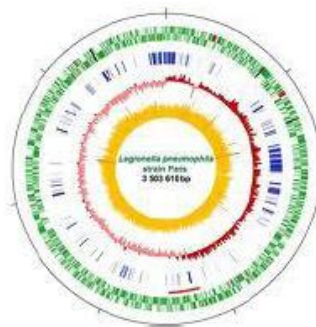
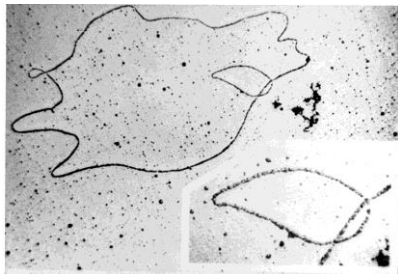
Figure 6-3

What Is Life? A Guide To Biology

© 2010 W. H. Freeman and Company

Obečné charakteristiky genomů MO

	velikost	chromozom	Repetitivní oblasti	Organizace genomu a hustota
Prokaryota	Malá (2 – 8 Mb)	Často kruhový	Žádné, nebo minimální	Vysoká hustota, žádné introny, operony
Eukaryota	Velká (20 Mb – 200 Gb)	Lineární, více kopií, plastidy	Průměrně až mnoho	Nízká hustota, introny, „junk DNA“



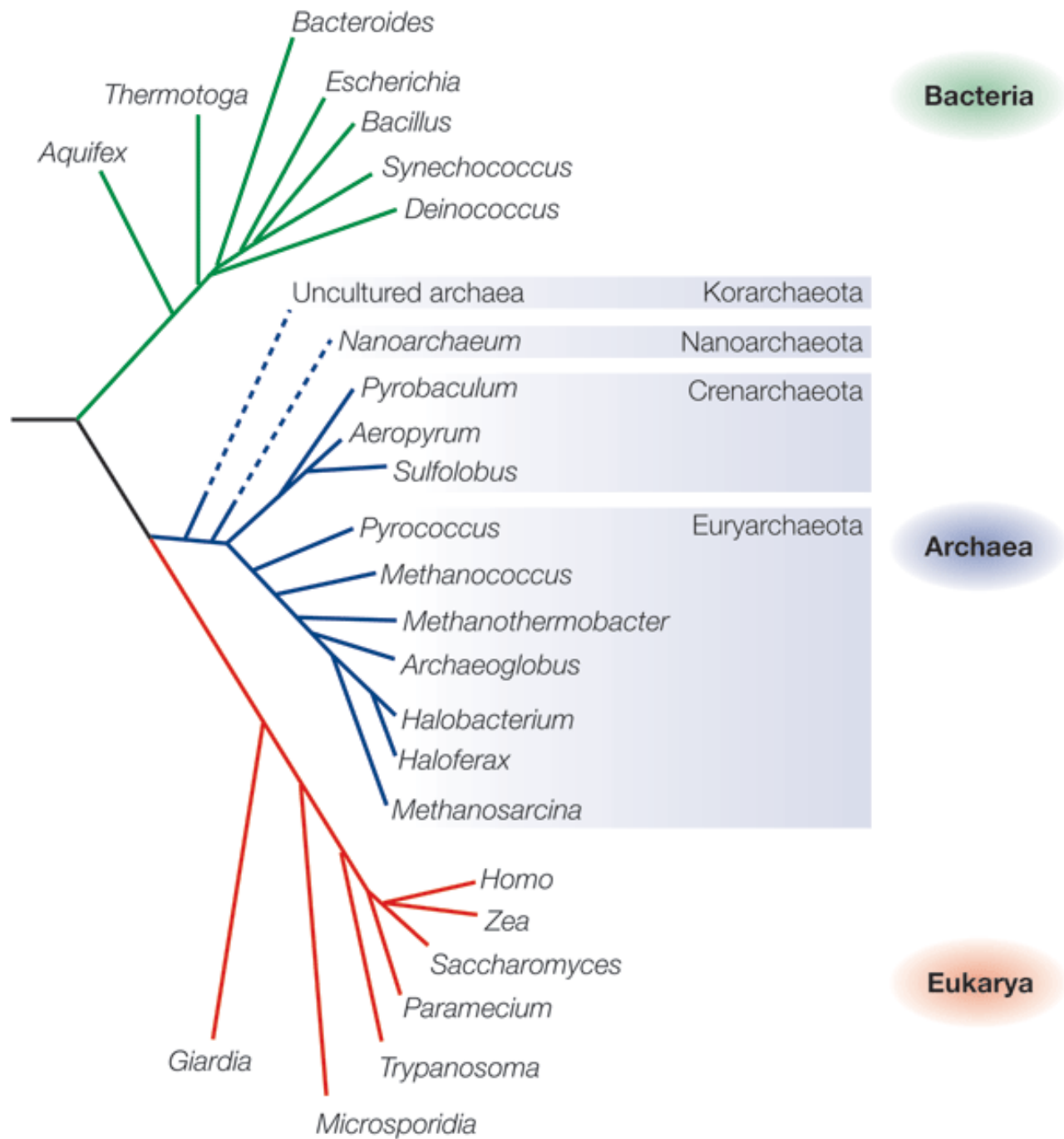
Historie (stručná)

1960... Objev **genetického kódu**

1962 Zuckermandl a Pauling: **Molecular Clock Hypothesis**

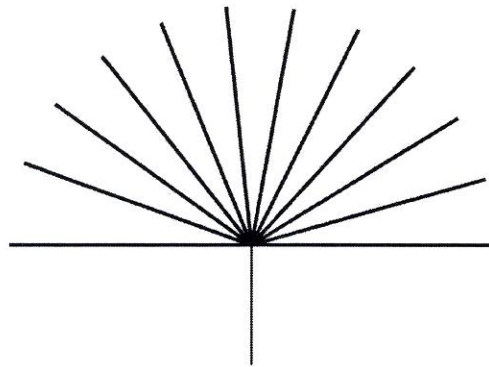
1977 Fredrick Sanger vyvinul **Sanger Sequencing Method**

1977 Carl Woese a kol. **Three Domain System**



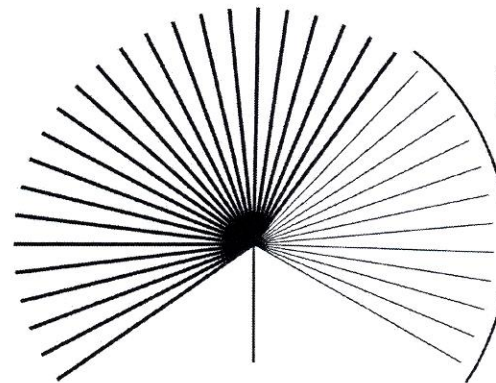
Dividing bacteria and archaea based on sequence data on small subunit rRNA (16S rRNA genes for prokaryotes)

Bacterial Diversity



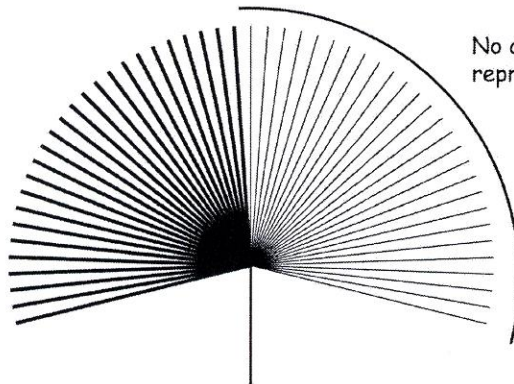
1987

(12 divisions; 12 cultured/ 0 candidate)



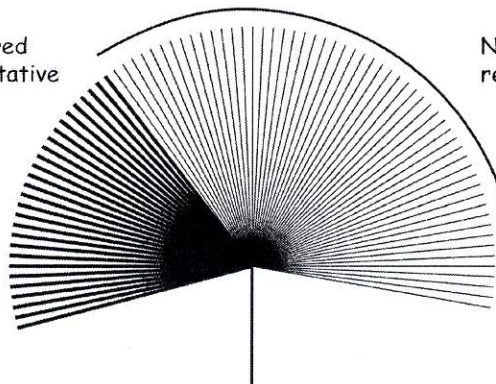
1997

(36 divisions; 24 cultured/ 12 candidate)



2003

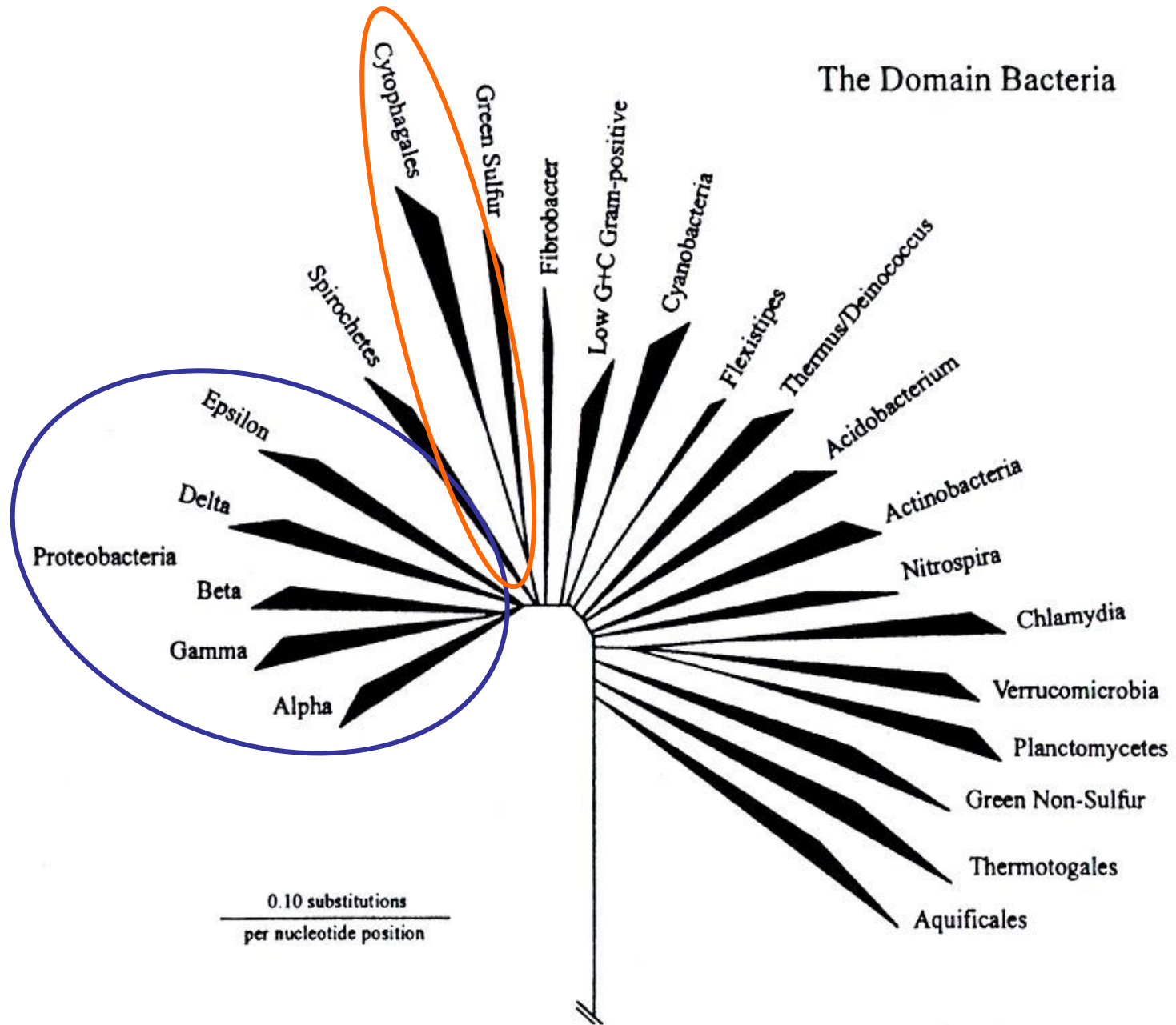
(53 divisions; 26 cultured/ 27 candidate)

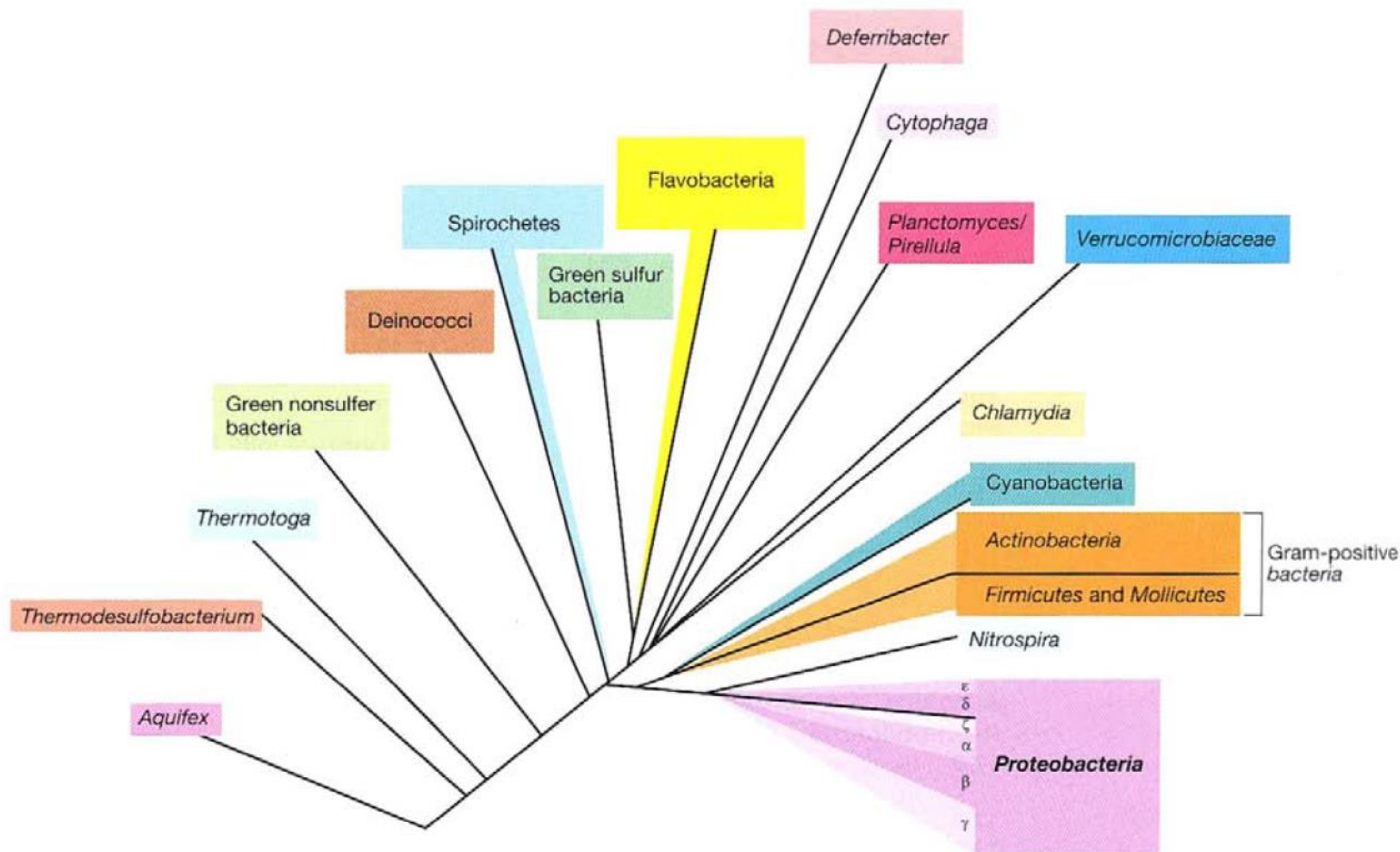


2004

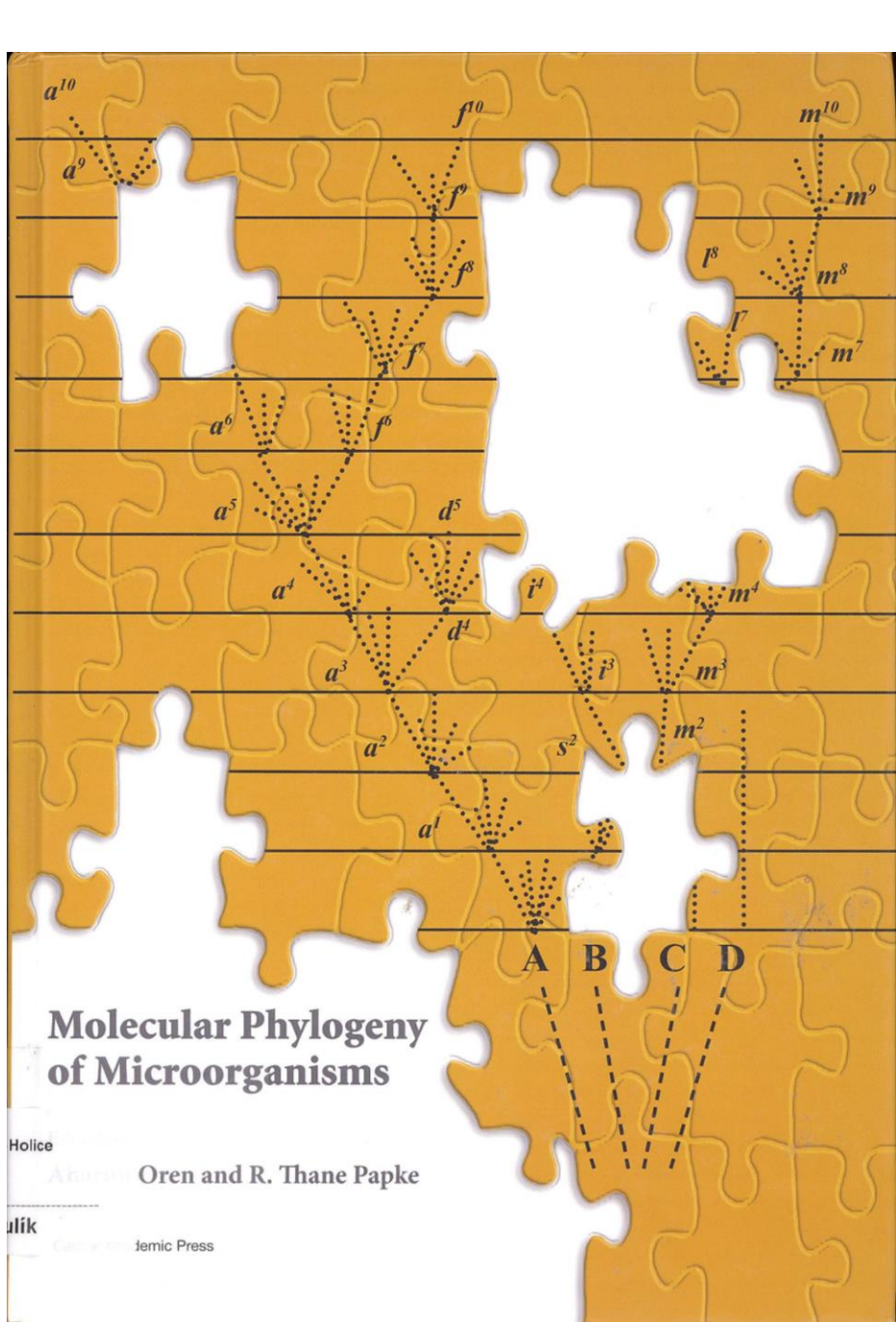
(~80 divisions; 26 cultured/ ~54 candidate)

The Domain Bacteria





Obr. 1.4. Evoluce domény Bacteria založená na analýzách 16S rRNA genů vedla k odlišení cca 80 kmenů., včetně kmenů známých pouze z environmentálních sekvencí. Největší kmen, který zahrnuje všechny známé formy mikrobiální fyziologie a patří sem zároveň většina známých bakterií z oblasti medicíny, průmyslu a zemědělství jsou *Proteobacteria* (podle Madigan et al. 2012).



Molecular Phylogeny of Microorganisms

Oren and R. Thane Papke

Benjamin Press

Erko Stackebrandt (Ed.)

Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes

With 56 Figures and 11 Tables

Bergey's Manual of
**Systematic
Bacteriology**

SECOND EDITION

Volume One

The *Archaea* and the Deeply Branching
and Phototrophic *Bacteria*

Bergey's Manual of
**Systematic
Bacteriology**

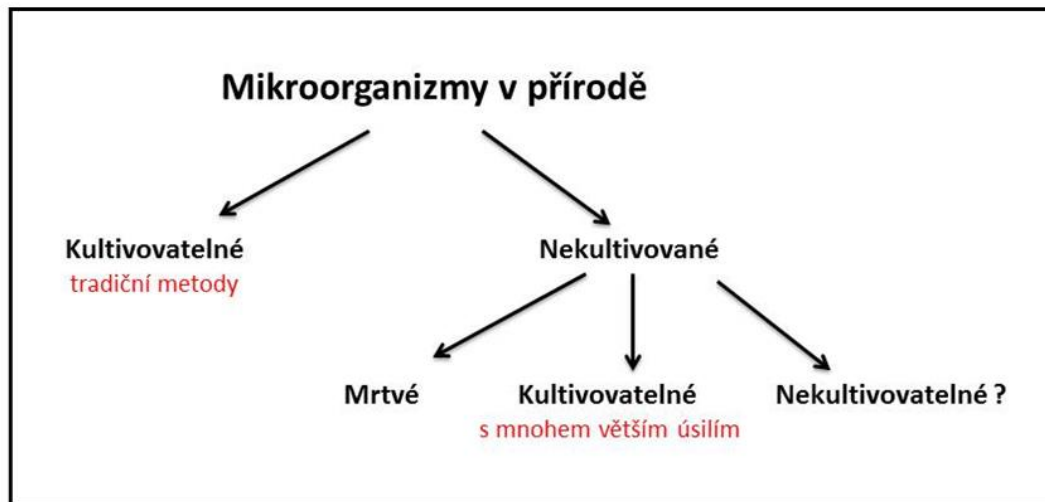
SECOND EDITION

Volume Two

The Proteobacteria

Part C The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilon*proteobacteria

Proč nejsme schopni kultivovat všechna prokaryota



Kultivovatelnost určená jako procento kultivovatelných bakterií (vyjádřených jako CFU) ve srovnání s celkovými počty. Podle Amann *et al.* (1995)

Prostředí	Kultivovatelnost (%)
Mořská voda	0.001-0.1
Sladká voda	0.25
Mesotrofní jezero	0.1-1
Neznečištěné vody estuárií	0.1-3
Aktivovaný kal	1-15
Sedimenty	0.25
Půda	0.3

Taxonomie a fylogeneze prostřednictvím genu

The Barcode of life project (*čárový kód života*)

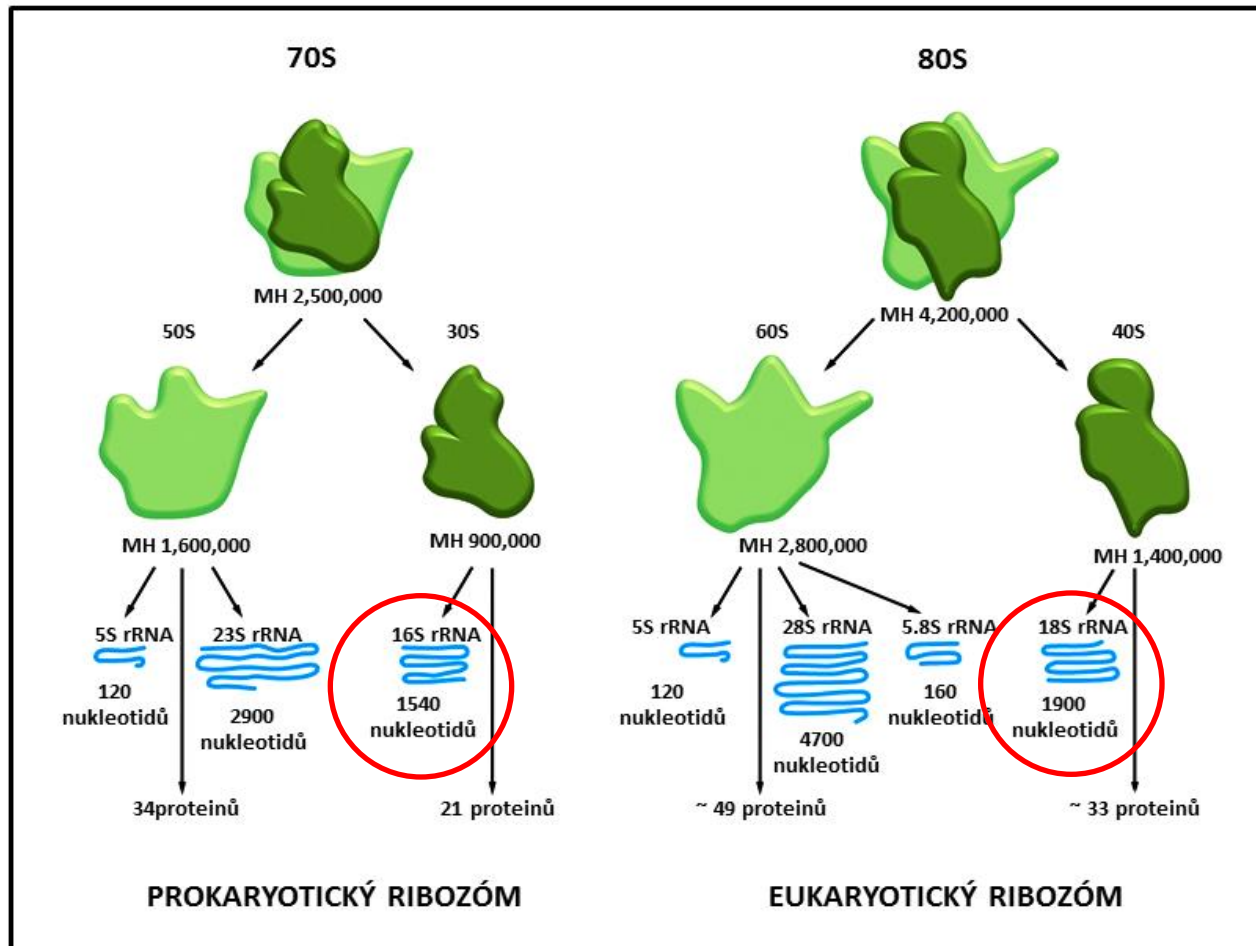
- krátký, univerzální úsek DNA z určité oblasti genomu by měl sloužit k identifikaci organismu na druhové úrovni - zatím funguje u živočichů (mitochondriální gen cytochrom c oxidázy 1 - COI)

U prokaryot se používají nejčastěji geny pro **16S rRNA**, u eukaryot pak geny pro 18S rRNA

Je několik důvodů, proč používat při studiu taxonomie a fylogeneze 16S rRNA geny:

- (1) molekuly se nacházejí ve všech živých organismech a obsahují některé sekvence, které jsou velmi konzervativní, tj. uchovávají některé úseky, které jsou běžné u všech organismů;
- (2) molekuly rRNA rovněž obsahují úseky, které se během evoluční doby měnily rychleji a mohou být použity pro detailní analýzu na druhové či poddruhové úrovni;
- (3) molekulární metody umožňují amplifikaci původně malých množství rRNA z přírodních populací a jejich analýzu a
- (4) fylogeneze odvozená ze 16S rRNA genů souhlasí s fylogenezí odvozenou z jiných genů

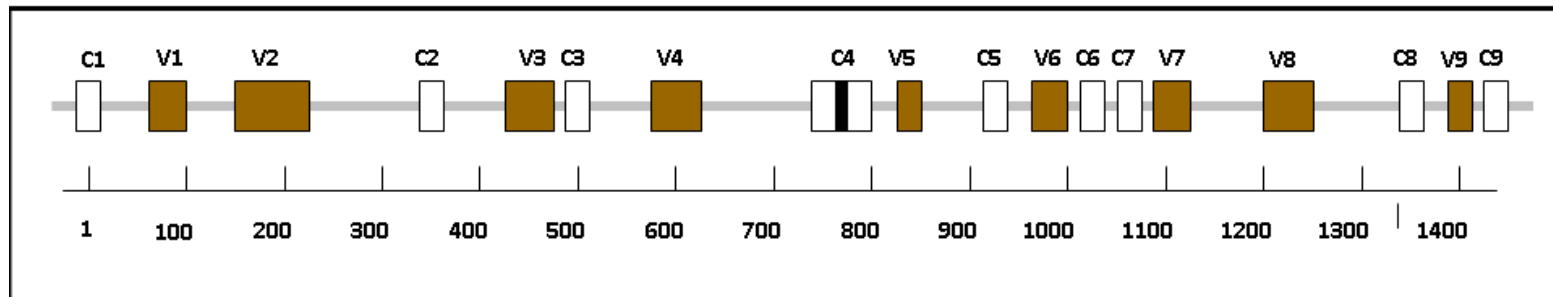
Struktura ribozómů u prokaryot (vlevo) eukaryot (vpravo) a typy RNA přítomných v malé a velké podjednotce. MH = molekulová hmotnost



Čím delší je časový úsek od evolučního rozštěpení (divergence) druhů, tím více se budou jejich sekvence lišit.

rRNA má specifická místa, která jsou vyžadována pro fungování molekuly a jiná, která jsou méně důležitá. Úseky rRNA, které jsou esenciální pro syntézu proteinů jsou vysoce konzervativní (tj. **sekvence jejich nukleotidů se mezi druhy liší málo**), protože mutace v těchto oblastech jsou obvykle fatální. Taková mutace znamená rychlou evoluční smrt. Taxonomové, kteří potřebují **srovnání na úrovni říší**, by proto měli zvolit **vysoce konzervativní úseky** rRNA, zatímco ti, kteří se snaží rozlišovat mezi úzce příbuznými **druhy**, by měli zvolit úsek, který **akumuluje mutace nejrychleji**

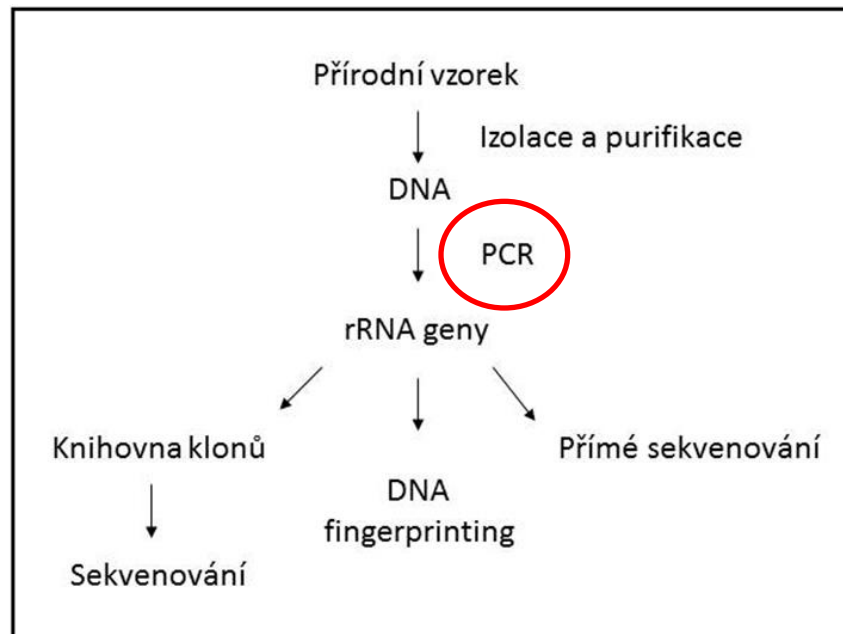
Schema genu pro 16S rRNA a lokalizace variabilních (V1-V9, fialová barva) a konzervativních (C1-C9, hnědá) úseků v kanonické bakteriální 16S rRNA. Černě označený úsek C4 je neměnný pro všechny bakterie



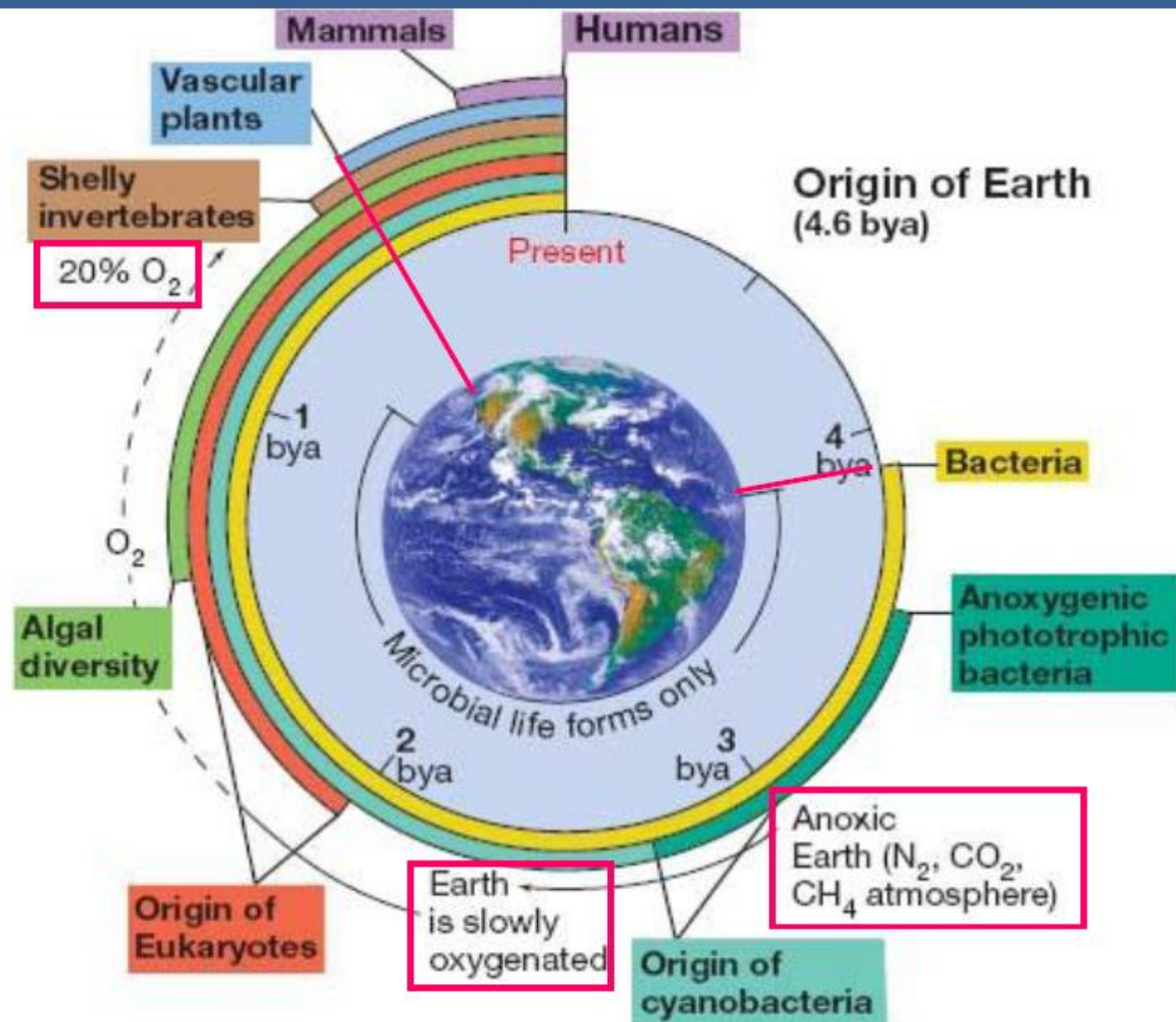
Analýza ribozomální RNA pro identifikaci mikroorganismů

Základním problémem při analýze přírodního vzorku je získání dostatečného množství 16S rRNA genů z komplexních společenstev, která se skládají z mnoha organismů s mnoha dalšími geny. Důležitým krokem v mnoha na kultivaci-nezávislých metodách je proto použití tzv. polymerázové řetězové reakce (*Polymerase chain reaction, PCR*) pro získání cílového genu, v tomto případě 16S rRNA genů

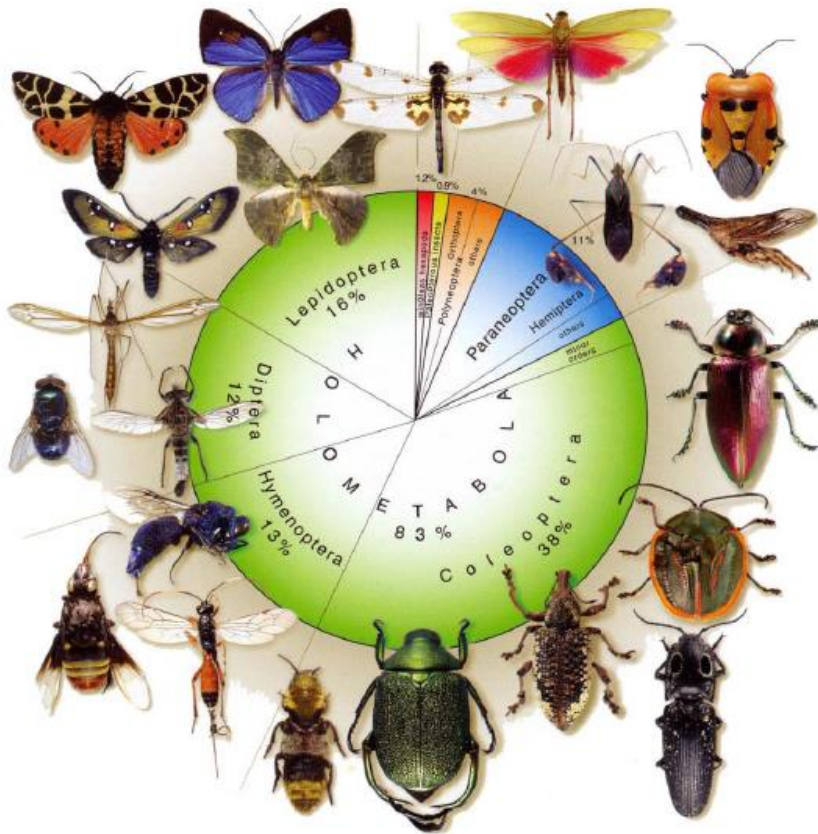
Schema postupu analýzy rRNA



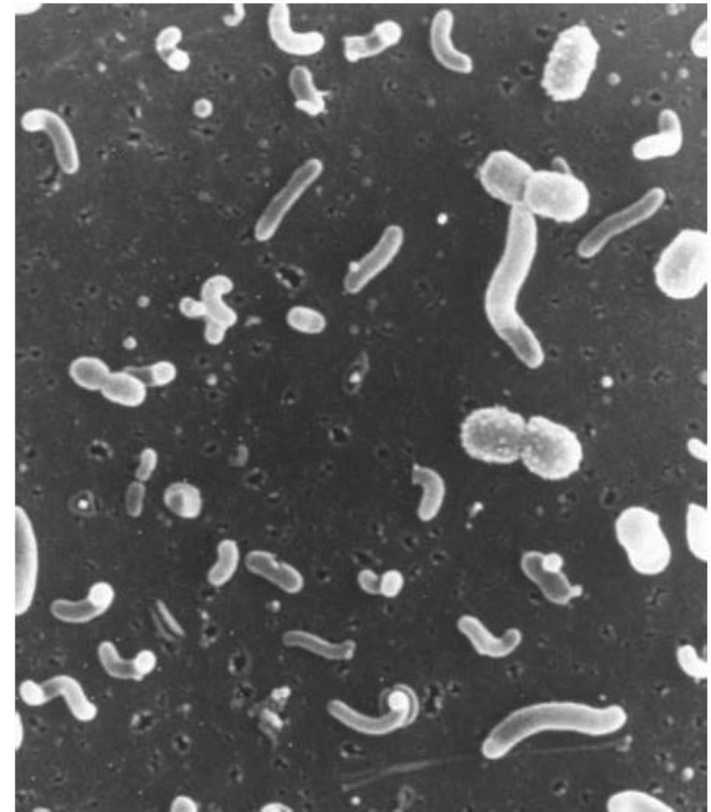
Mikroorganismy – první formy života



Prokaryota: nedostatek znalostí o jejich vlastnostech a nárocích

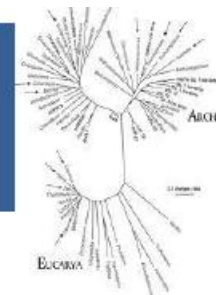


Hmyz: popsáno 950 000 druhů



Prokaryota: popsáno 10 000 druhů
(pouze 1% odhadovaného počtu druhů)

Diverzita mikroorganismů



Množství druhů prokaryot (odhad):

- 6000 (Oren 2004) až 9740 (Battistuzzi and Hodges, 2008)

x pravděpodobně jenom 30-40% reality

- Z toho 63% druhů patří do tzv. Terrabakterií
- 33% druhů patří do tzv. Hydrobakterií

Nejvíce druhově bohaté vývojové linie (>1000 druhů):

- *Actinobacteria*
- *Cyanobacteria*
- *Proteobacteria*



Copyright © 2004 Dennis Runkel / Microscopy, Inc.

Prostředí, habitaty

- **Terestrické** (pevnina, země, souš)
- **Vodní:**
 - sladkovodní
 - mořské
- **Vzduch** (většinou vnímáme jenom jako transportní médium) nebo koruny stromů

Habitaty jsou **heterogenní** (gradienty podmínek prostředí), proto:

Mikrohabitaty - menší, specializovaná jednotka, která představuje efektivně oddělené území (les, nebo list)

Ekologická nika - spojuje specifický prostor organismu a zároveň jeho funkční roli v ekosystému (jak se organismus chová, přeměňuje energii, nebo odpovídá na změny vnějších podmínek, atd'.)

Habitat = adresa

Nika = profese

Specifika habitatů

- **Terestrické:**

- Mnoho rychlých fluktuací (teplota, vlhkost a klima)
- Heterogenita (prostor)
- Světelné podmínky závislé na sezoně a nadmořské výšce
- Bariéry

- **Akvatické (vodní):**

- Lentic (stagnující) = stratifikace
- Lotic (proudící)
- Teplota, tlak, salinita, pH, dostupnost kyslíku, gradient světla, a další

Faktory, součásti habitatu

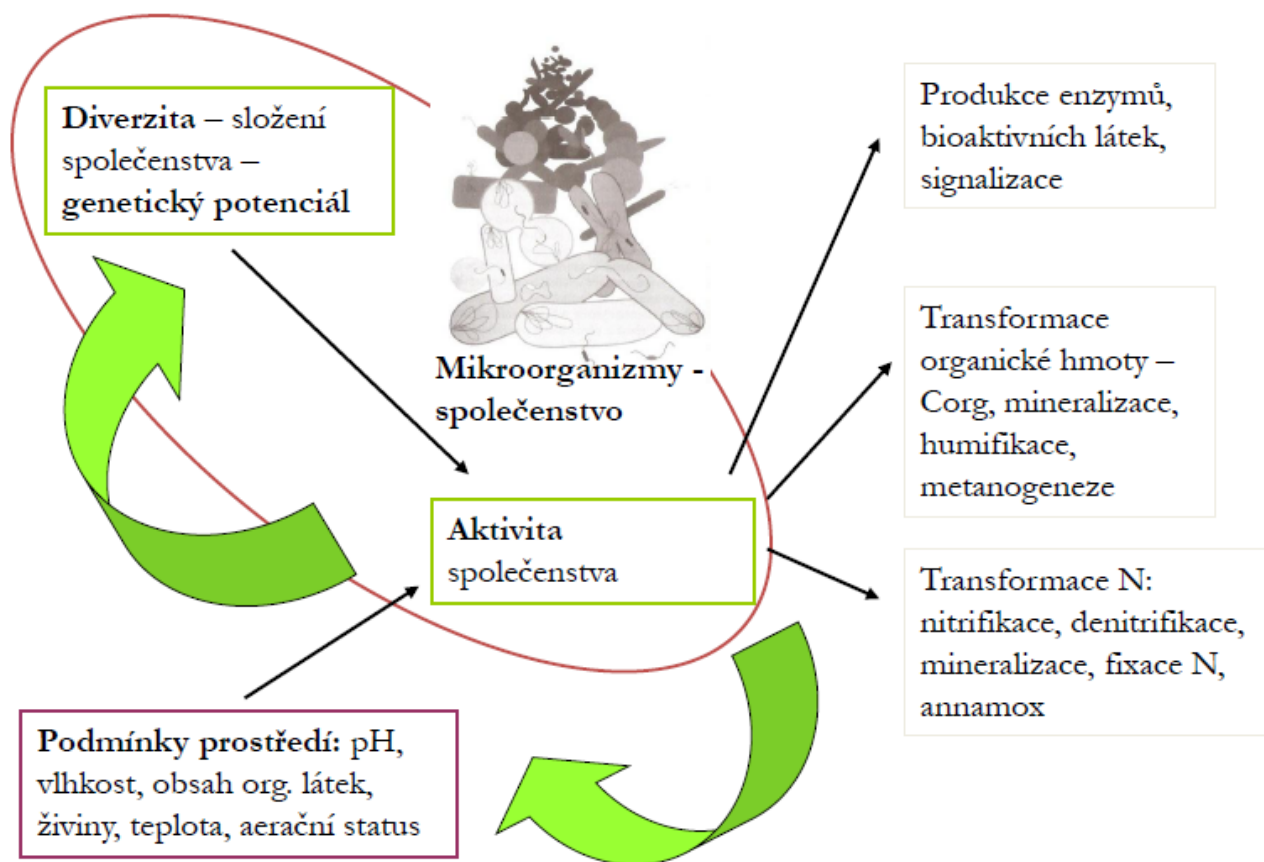
- **Abitocké faktory:**

- Klimatické: teplota, světlo, déšť, vítr, plyny, ...
- Edafické: půdní textura, pH, živiny, ...
- Fyziogeografické, nebo topografické: nadmořská výška, vystavení strmým svahům, srážy

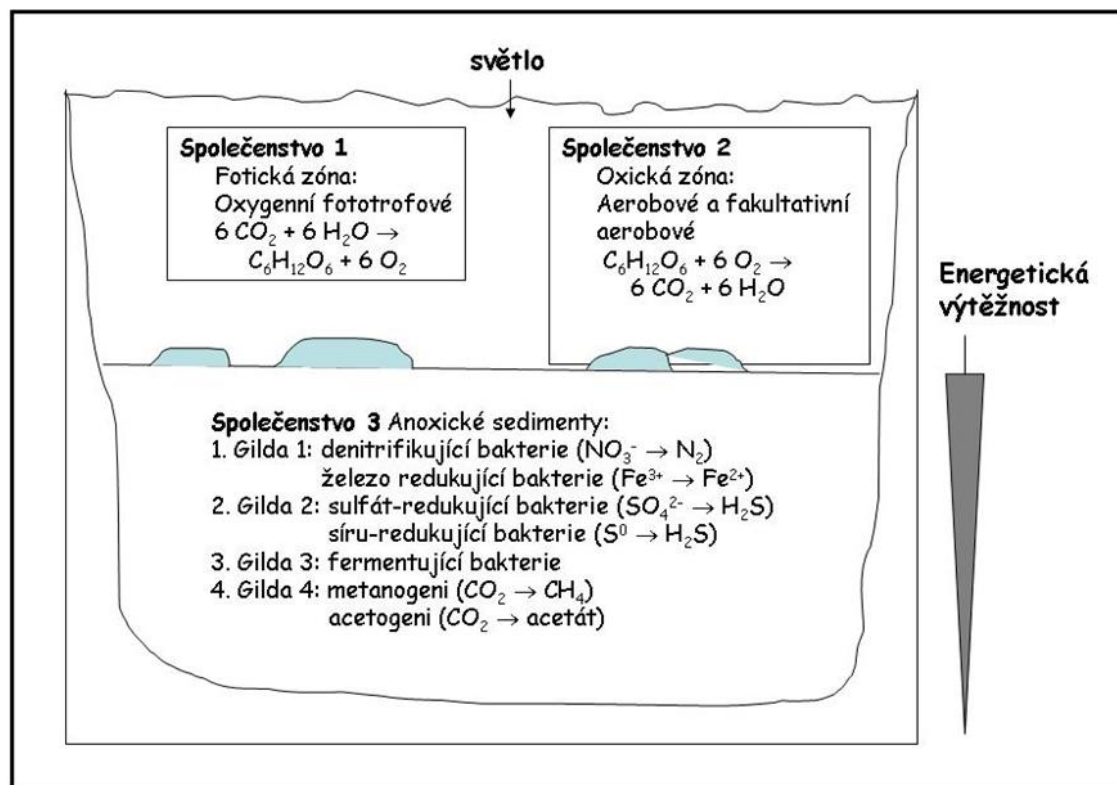
- **Biotické faktory:**

Všechny živé organizmy - rostliny zvířata, mikroorganizmy

Vztah mikroorganismů k okolí



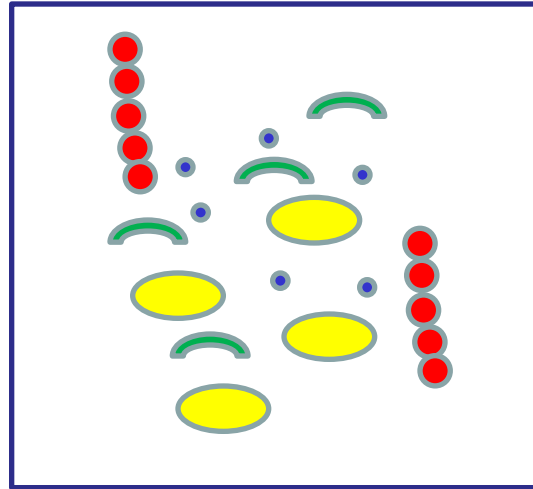
V přírodním prostředí individuální buňky rostou, dělí se a vytváří populace. Metabolicky příbuzné populace nazýváme **gildy** (*guilds*) - tyto gildy jsou ve vzájemných vztazích v rámci **mikrobiálních společenstev**



Populace, gildy a společenstva. Mikrobiální společenstva se skládají z populací buněk různých druhů. Jezerní ekosystém by měl např. společenstva uvedená zde. Redukce CO_2 , SO_4^{2-} , NO_3^- a Fe^{3+} jsou příklady anaerobních respirací. Oblasti nejvyšší aktivity pro každý z typů respirace by se měly lišit podle hloubky. Jakmile jsou energeticky vhodné akceptory elektronů vyčerpány mikrobiální aktivitou nejbližší povrchu, méně vhodné reakce se vyskytují v hlubších vrstvách sedimentu (převzato z Rulík *et al.* 2013, upraveno dle Madigan *et al.* 2012)

Co chceme jako mikrobiální ekologové vědět?

- a) Co tam žije, určení struktury společenstva
- b) Rozmanitost (diverzita) společenstva
- c) Kolik jich tam je (určení kvantity)
- d) Co dělají = jaké procesy (metabolismus)(např. potvrzení denitrifikace)
- e) Hledáme konkrétní taxon (např. potvrzení výskytu patogenní bakterie)
- f) Hledáme konkrétní molekulu, enzym, sekvenci... (např. detekce rezistence)
- g) Detekce změn ve společenstvu (např. vlivem zásahu, otravy...)



Společenstvo mikroorganismů

Co tam žije

- 1) Diverzita
- 2) Druhová struktura

Kolik jich tam je

- 1) Celkem
- 2) Konkrétní skupina (rod, druh)

Co dělají

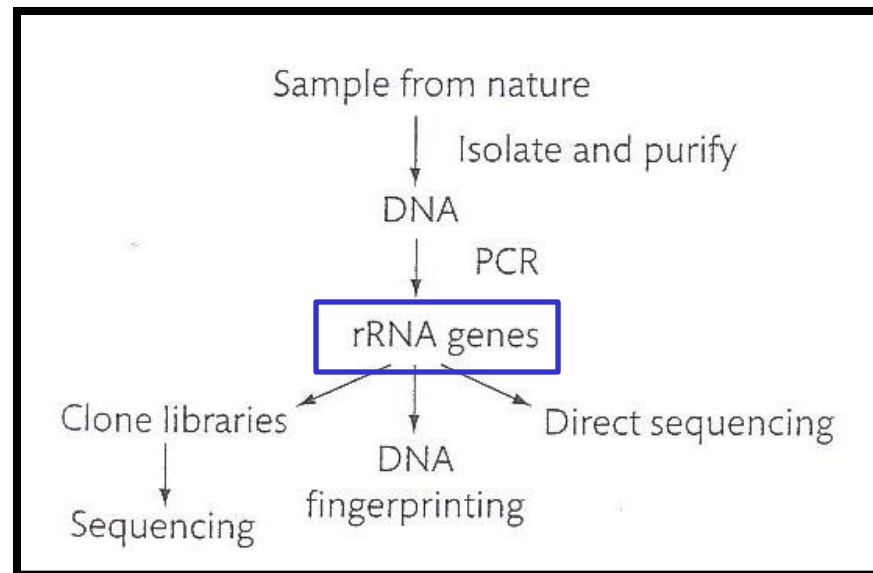
II. Metody molekulární ekologie mikroorganismů

Důležité z minulé hodiny !

16S rRNA-based methods

Sekvence 16S rRNA z malé podjednotky ribozómů použity při výzkumu a fylogenezi kultivovatelných bakterií a archeí (ale: 18S rRNA pro eukaryota)

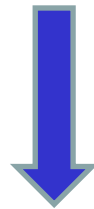
- geny pro 16S rRNA (= 16S rDNA) se nachází u všech bakterií i archeí a dokonce u eukaryot v mitochondriích a chloroplastech
- různé úseky genu mají konzervativní (tj. velmi podobné u všech organismů) a variabilní (tj. značně se liší mezi nepříbuznými organismy) oblasti
- fylogeneze odvozená ze 16S rRNA genů souhlasí s fylogenezí odvozenou z jiných genů



1. Definovat problém
2. Stanovit cíl(e) práce, popř. hypotézy, které chceme testovat

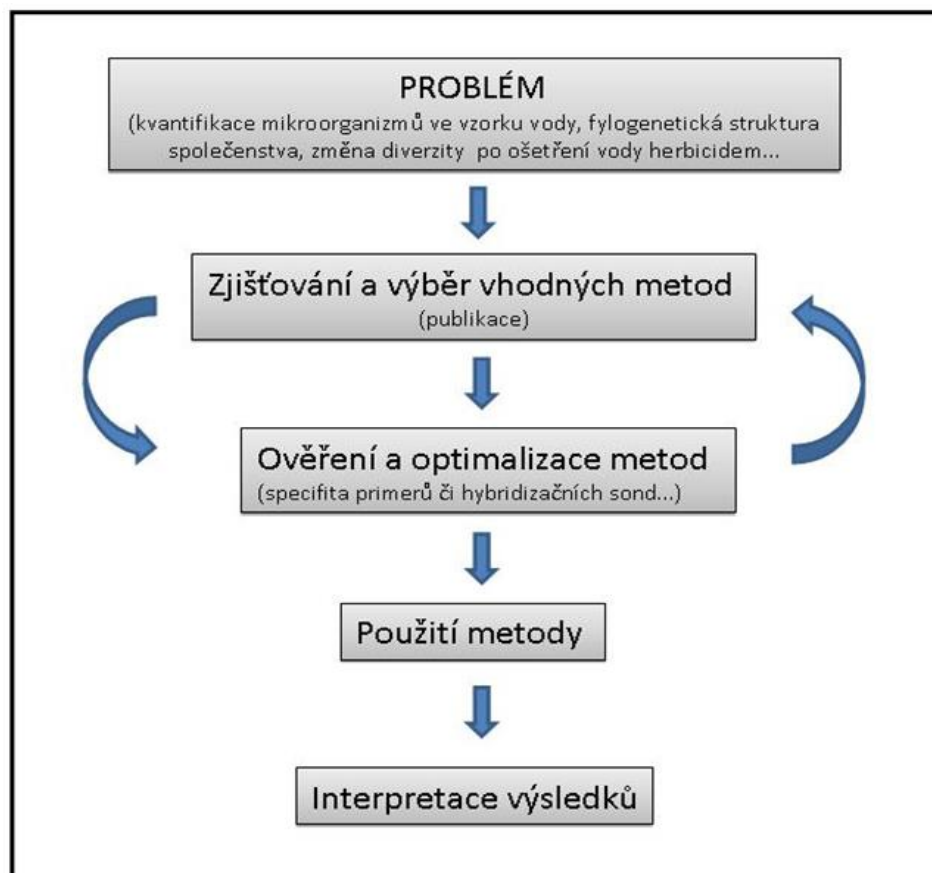


Výběr vhodné metodiky



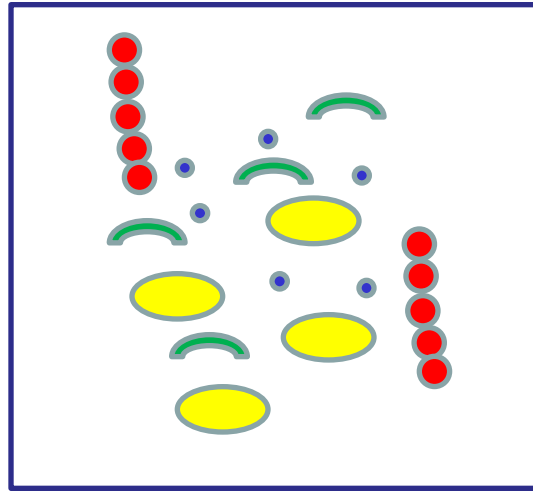
Ověření a optimalizace metod

Obecné schema metodického přístupu při použití molekulárně-biologických metod v mikrobiální ekologii (orig. M. Rulík)



Výběr vhodného markeru

Molekulární marker představuje fragment DNA, který je asociován s určitou lokalizací v genomu a používá se k identifikaci konkrétní sekvence DNA ve vzorku neznámé DNA



Společenstvo mikroorganismů

Co tam žije

- 1) Diverzita
- 2) Druhová struktura

Kolik jich tam je

- 1) Celkem
- 2) Konkrétní skupina (rod, druh)

Co dělají

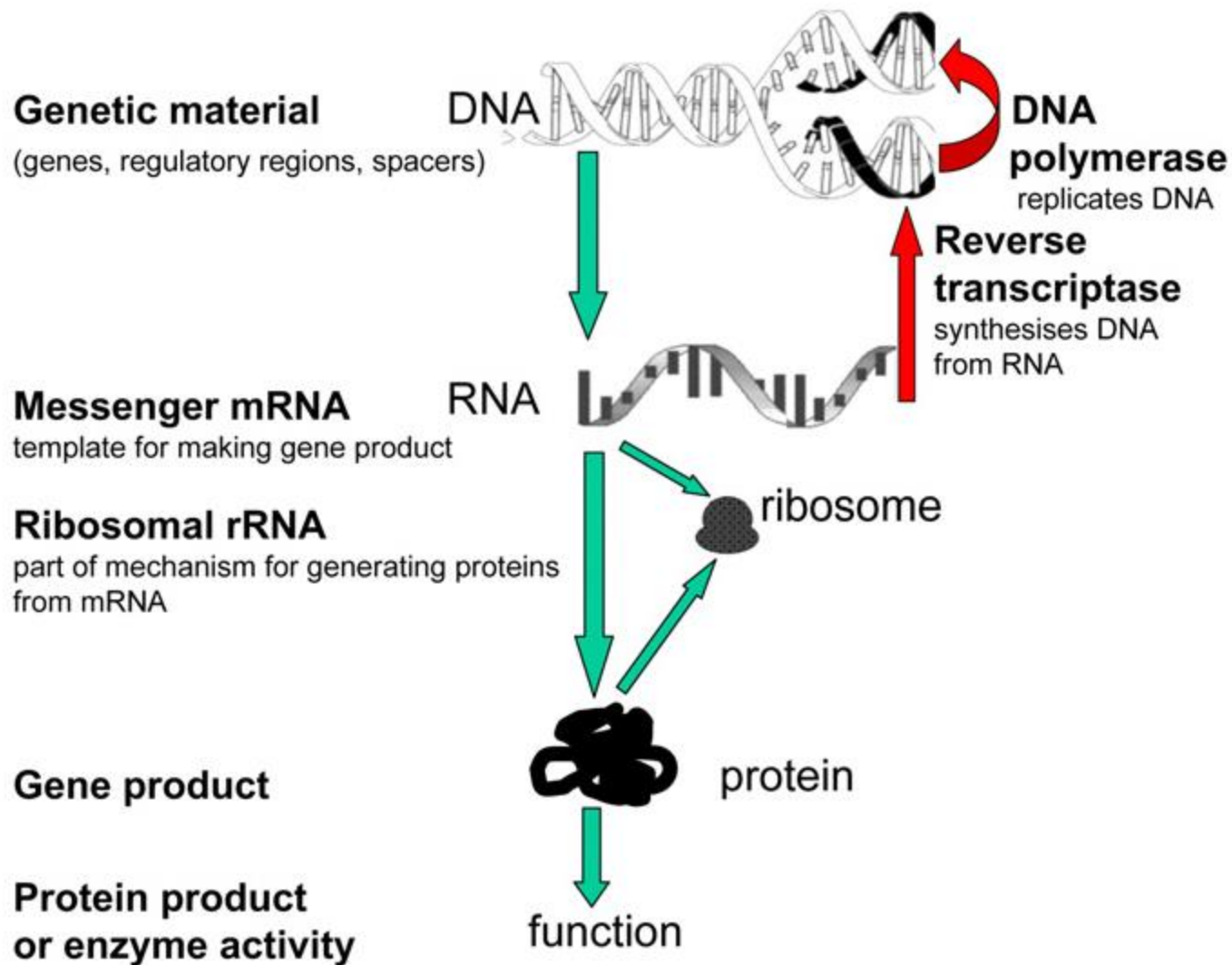
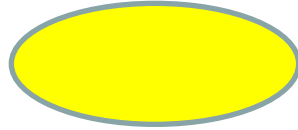


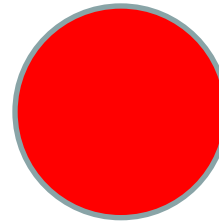
Fig. 2. The relationship between DNA, forms of RNA, protein and functions. The analysis of DNA and RNA is described as genomics; transcriptomics refers to studies of gene expression using rRNA and mRNA; proteomics and metabolomics refer to the analysis of proteins and the products of enzyme pathways, respectively.



16S rRNA

DNA

Funkční geny



16S rRNA

DNA

Funkční geny

Otázka zní: které geny jsou vhodné jako cílové ?

- 1) Geny kódující malou podjednotku rRNA obsahují fylogenetickou informaci...
- 2) Geny kódující enzymy pro různé metabolické funkce

Které molekuly (tzv. marker molecules) jsou používány?

DNA

Geny
Nekódující DNA

RNA

rRNA
mRNA

jiné molekuly

mastné kyseliny
pigmenty
proteiny

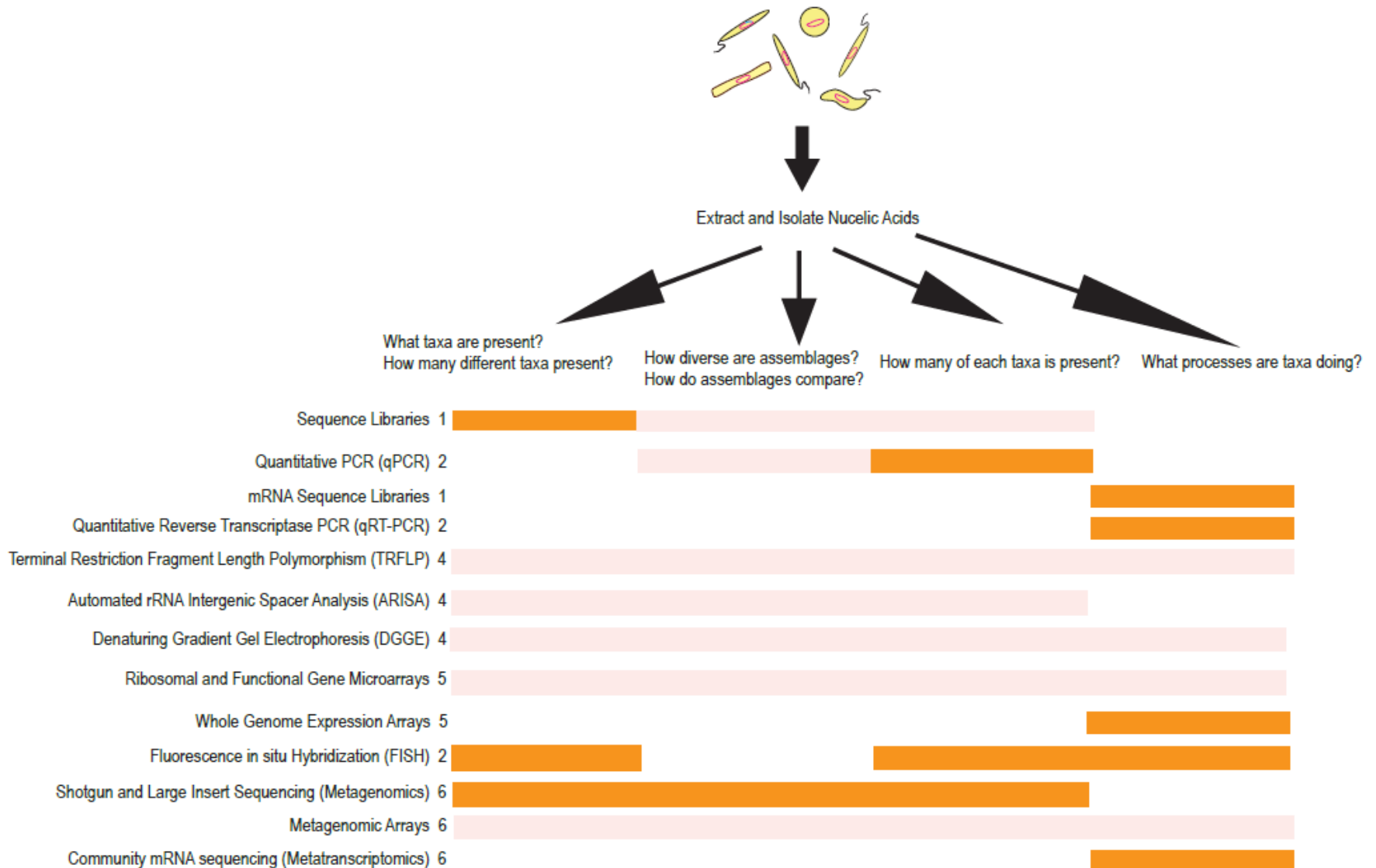
Table 2.5 Summary of some of the properties of genetic markers

Genetic marker	Inheritance	Target genome	Development time ^a	Cost ^b	Comparison of data between studies	Suitability for inferring evolutionary relationships	Overall variability
Allozymes	Co-dominant	Nuclear	Low	Low	Limited	Limited	Low-moderate
PCR-RFLPs	Co-dominant	Nuclear Organelle	Moderate	Low	Limited	Limited	Low-moderate
DNA sequences	Co-dominant	Nuclear Organelle	Low-high	Moderate	Yes	High	Low-moderate
SNPs	Co-dominant	Nuclear Organelle	High	Moderate-high	Yes	High	Moderate
Microsatellites	Co-dominant	Nuclear Organelle	High	Moderate-high	Yes	Limited	High
RAPDs	Dominant	Nuclear	Low	Low	Limited	Limited	High
AFLPs	Dominant	Nuclear	Moderate	Moderate	Limited	Limited	High

^aAssuming relevant markers have not been developed already for the species in question (or close relative). Note that some development is required for all markers.

^bCost here is relative, because all molecular work is expensive. Cost will be reduced if relevant markers have been developed already for the species in question.

Různé molekulární metody řeší různé otázky



Výběr markerových molekul a molekulární metody

Závisí na:

- studovaném problému (tj. co nás zajímá)
- studovaném organismu (tj. prokaryota vs eukaryota)
- požadovaném fylogenetickém rozlišení
- kvalitě vzorku (tj. např. individuální druh z kultury vs environmentální DNA)

Quality of samples available

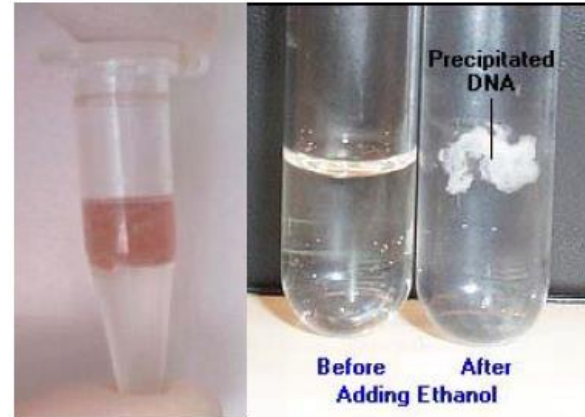
Environmental DNA



Sample (water, soil)



Harvesting (water: filtration)



DNA extraction

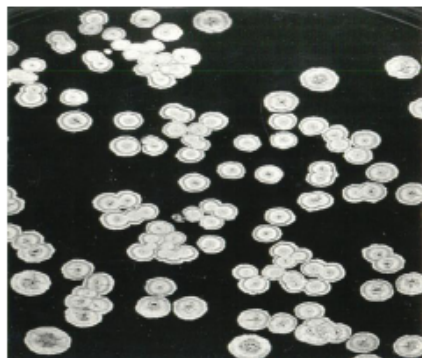
Individual specimen



Abundance a denzita mikroorganizmů v prostředí

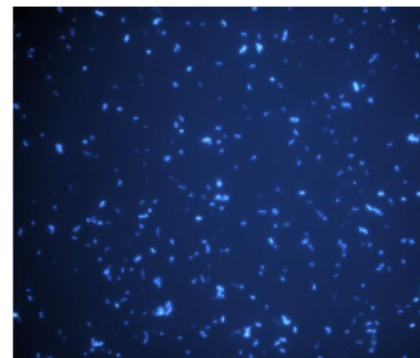
Tradiční vs. Molekulární metody

- **Kultivovatelná část společenstva:**
Strain or species level



- Charakteristika cca 0.1 – 1% bakterií
- ✓ Identifikace organismu a jeho funkcí (detailní informace o metabolismu)
- ✓ Možnost studovat mikroorganismus *in vitro*
- ✓ Manipulace a ekologické studie (adaptační mechanismy)
- ✓ Biotechnologické aplikace

- **Komplexní mikrobiální společenstvo:**
Community level



- Na DNA úrovni není možné rozlišit aktivní a pasivní složku
- Není možno odvodit fyziologické vlastnosti jednotlivých mikroorganismů
- ✓ Potenciálně celé společenstvo
- ✓ Možnost charakterizovat půdu jako komplexní systém
- ✓ Dnes možné studovat také pomocí exprese v cizích hostitelských buňkách

Kultivace vs přímé počty

- ➔ Kultivací stanovíme cca 1 % všech přítomných bakterií
 - Selektivní substrát pro hygienicky významné kmeny bakterií
 - Substrátový šok
 - „viable but nonculturable“
 - Vykultivované bakterie jsou v přirozeném společenstvu nevýznamné

- ➔ Přímé počty stanovují i mrtvé buňky
 - Vzorky pro přímé počty můžeme fixovat (2 % formaldehyd)
 - Možnost stanovení velikosti buněk (biomasa)



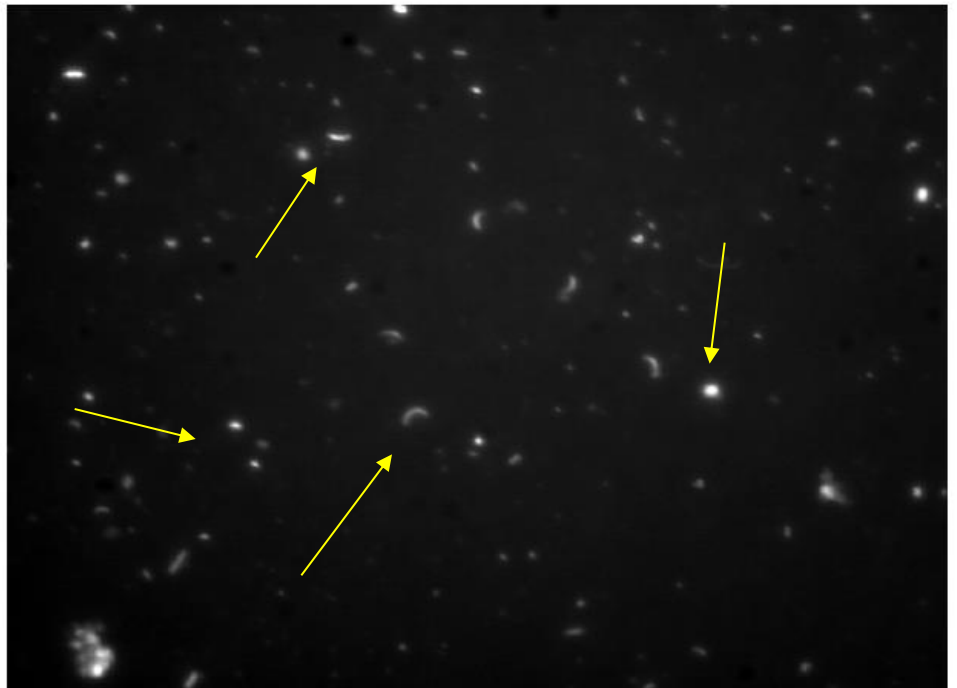
DNA metody

1) Metody pro detekci a /nebo kvantifikaci

Přítomnost, absence a počty genů nebo organismů

Např. výzkum přítomnosti/absence nebo počet buněk bakteriálního taxonu ve vzorku vody

Bakterioplankton v jezeru



Barvící fluorescenční metody - DAPI, SYBR Green, SYTO apod...

Umožňují kvantifikaci buněk, tj. stanovení přímého počtu buněk ve vzorku, vyjádřeného na jednotku plochy, objemu či hmotnosti

Kombinace s fylogenetickým barvením - FISH (Fluorescenční hybridizace *in situ*)

Detekce kvantity, resp. podílu určité skupiny (druhu) ve společenstvu

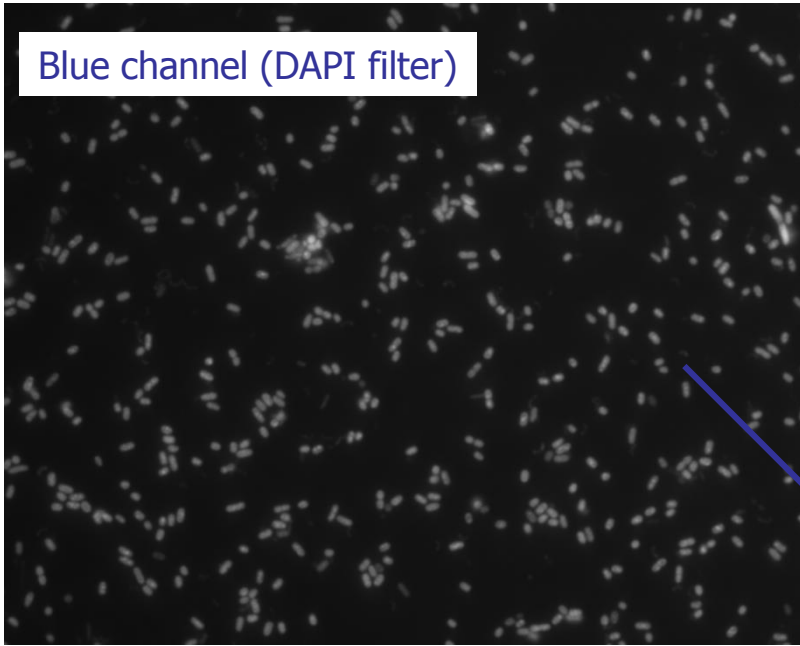
Tzv. Whole cell **Fluorescence in situ Hybridization (FISH)**

- vhodné pro vodní mikroorganismy
- markerová molekula: ribozomální RNA (nízké fylogenetické rozlišení !)
- vhodná pro kvantifikaci buněčných počtů

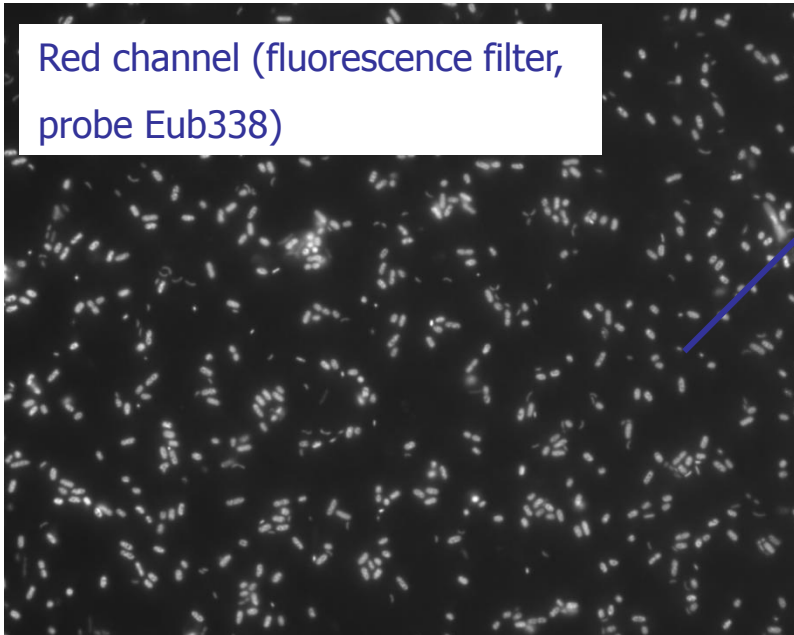
Výhodou obou metod je, že pracujeme s buňkami, které můžeme použít pro další práci (např. stanovení biomasy atd...)

Obarvení - fluorescenční mikroskop - počítačová analýza obrazu

Blue channel (DAPI filter)

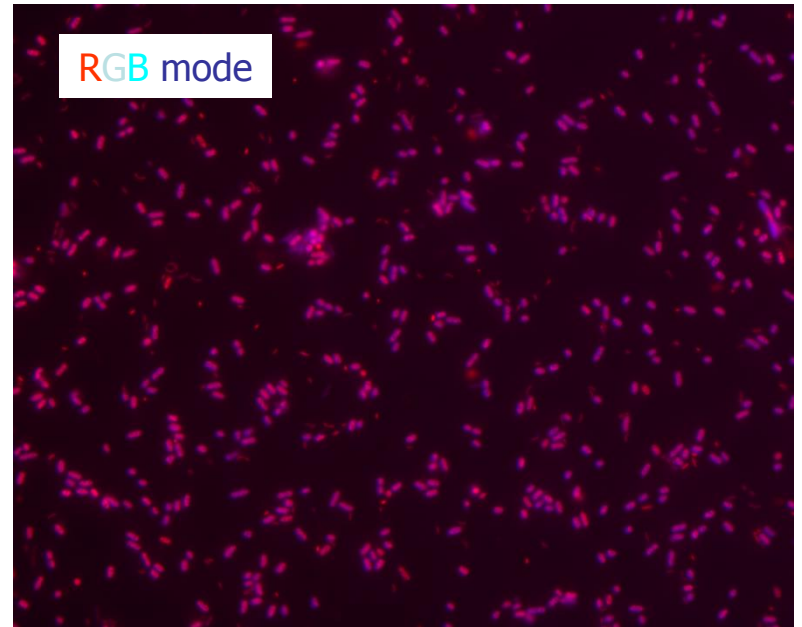


Red channel (fluorescence filter,
probe Eub338)



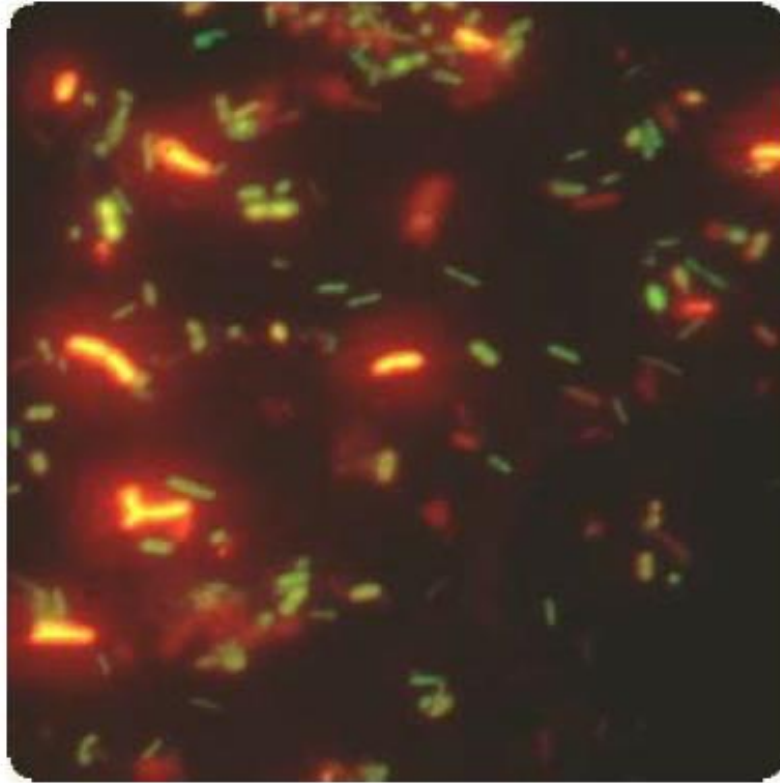
Stanovení fylogenetických
skupin bakterií pomocí FISH

RGB mode



All bacteria are members of domain Eubacteria

FISH



Analysis by microscopy
Cell counts (cell numbers)

PCR a kvantitativní PCR (qPCR), real-time PCR

- vhodné pro všechny organizmy
- markerová molekula: jakákoliv DNA sekvence (není limitace ve fylogenetickém rozlišení)
- qPCR poskytuje kopie genů (ne počty buněk či jedinců) = qPCR kvantifikujete **PŮVODNÍ množství genu v prostředí**

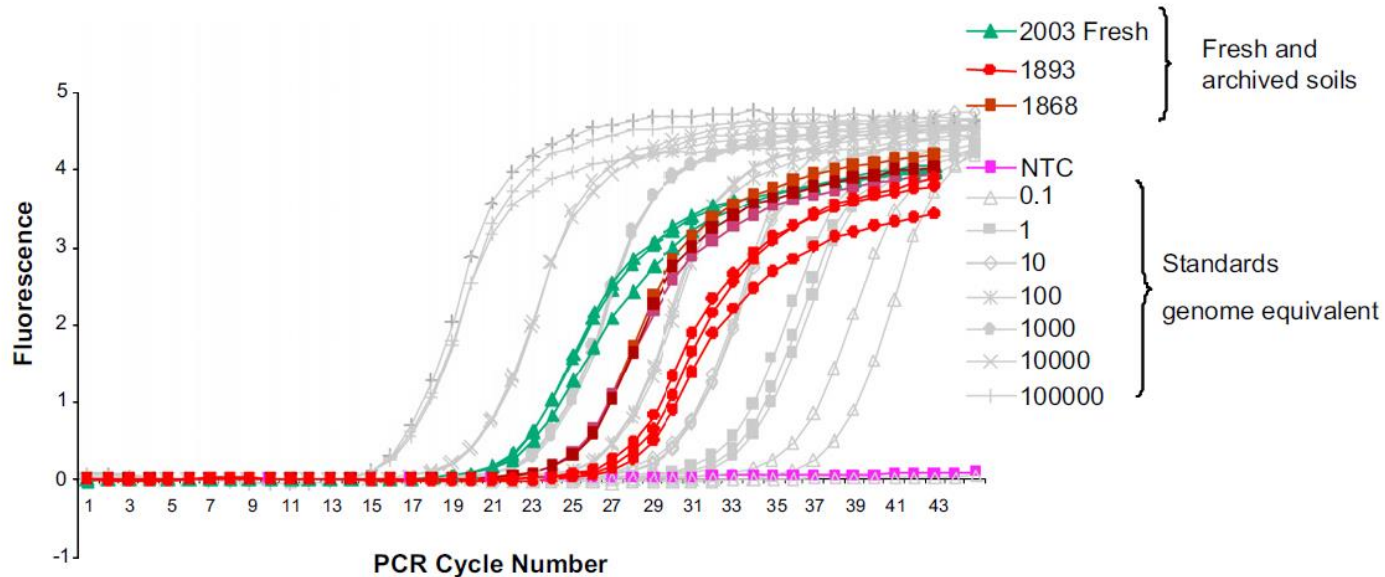
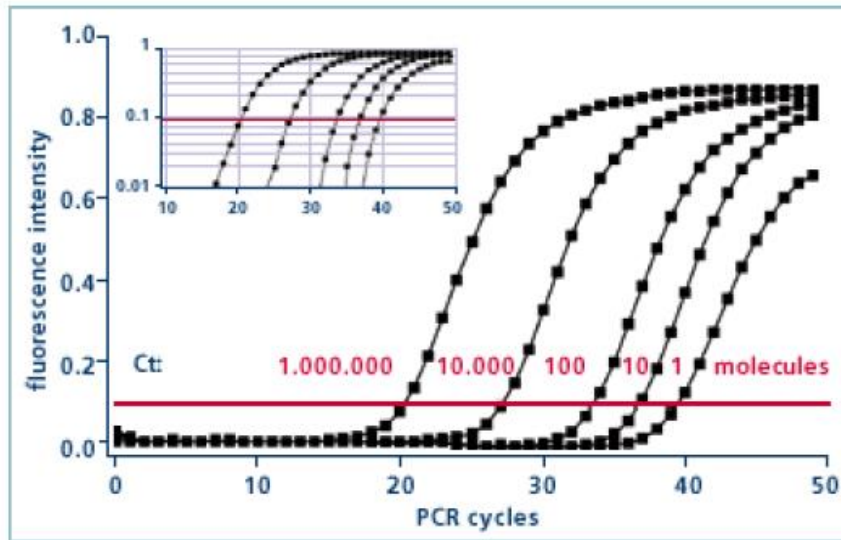


Fig. 4. Survival of *Pseudomonas* DNA in archived and fresh soils using quantitative real-time PCR. The rate of amplification of the target sequence in each sample is detected by fluorescence, and compared to standards with a known amount of *Pseudomonas* DNA. The results show here that *Pseudomonas* genomes are more abundant in the 2003 sample and least abundant in the 1893 sample.

DNA methods

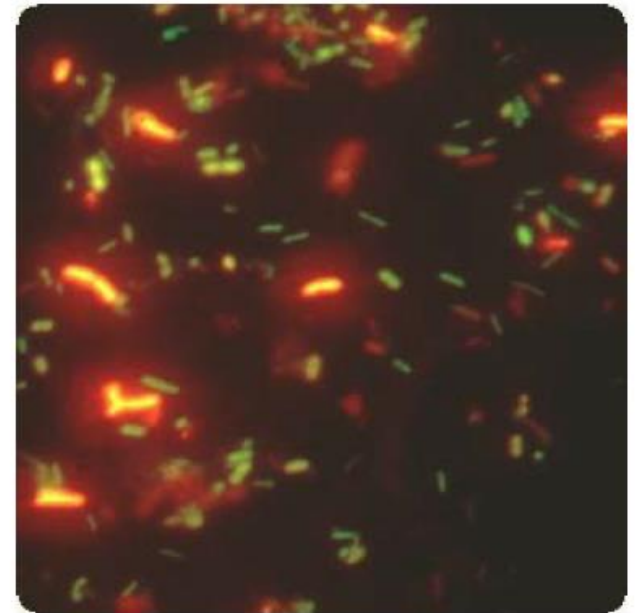
1) Methods for detection and/or quantification

qPCR



Determination of gene (marker)
copy numbers
Determination of cell numbers
is difficult

FISH



Analysis by microscopy
Cell counts (cell numbers)

Struktura a diverzita společenstva

Metody otisku DNA (Genetic fingerprinting = DNA profiling)

- Elektroforetický vzor bandů (žádná analýza sekvencí)
- Cíl: odhalit rozdíly v sekvencích DNA mezi dvěma DNA vzorky
- DNA vzorky mohou představovat jedince stejných druhů, zástupce různých druhů či různých společenstev organizmů

Mnoho metod, mnoho různých markerů

RFLP (T-RFLP) polymorfismus délky restričních fragmentů
(Restriction fragment length polymorphism)

ARDRA (Amplified restriction fragment length polymorphism)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

DGGE denaturační gradientová gelová elektroforéza

ARISA automatická analýza vnitřního transkribovaného mezerníku

(Automated rRNA intergenic spacer analysis)

Mikrosatelity

atd....

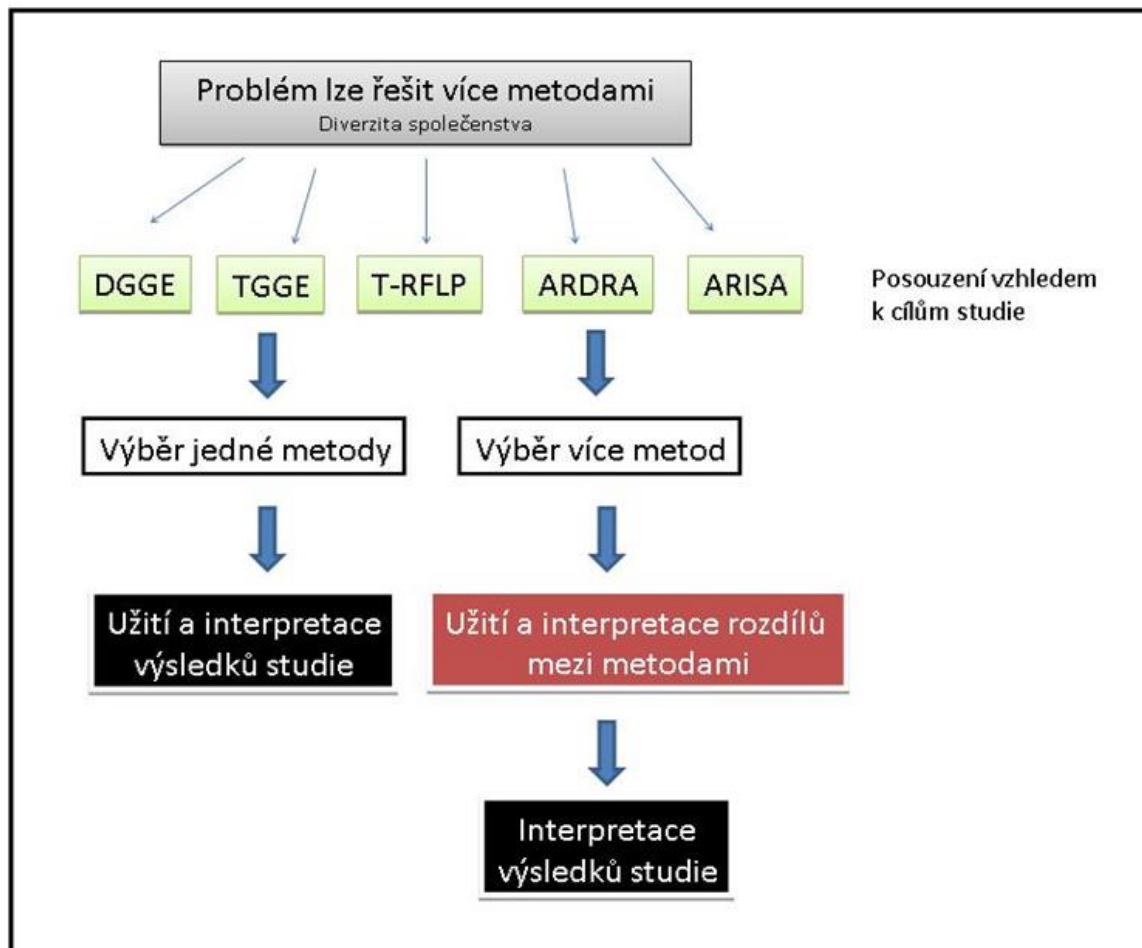
Fingerprinting společenstva (*Community fingerprinting*) zahrnuje použití molekulárně-biologických metod, které umožňují rychle charakterizovat profil (otisk) diverzity mikrobiálního společenstva.

Spíše než přímá identifikace nebo počítání buněk v environmentálním vzorku tyto techniky ukazují, **kolik variant genu je přítomno v daném vzorku.**

Fingerprinting společenstev je používán mikrobiology, kteří studují různé mikrobiální systémy (např. mořské, sladkovodní, půdu) s cílem popsat diverzitu či sledovat změny ve struktuře společenstva během času.

Metody analyzují environmentální vzorky prostřednictvím analýzy genomové DNA.

Fingerprinting společenstva neposkytuje přímo identifikaci individuálních druhů mikroorganismů, místo toho **ukazuje všobecný obraz mikrobiálního společenstva, čili jeho profil.**



Různé metody poskytují různé výsledky !!!

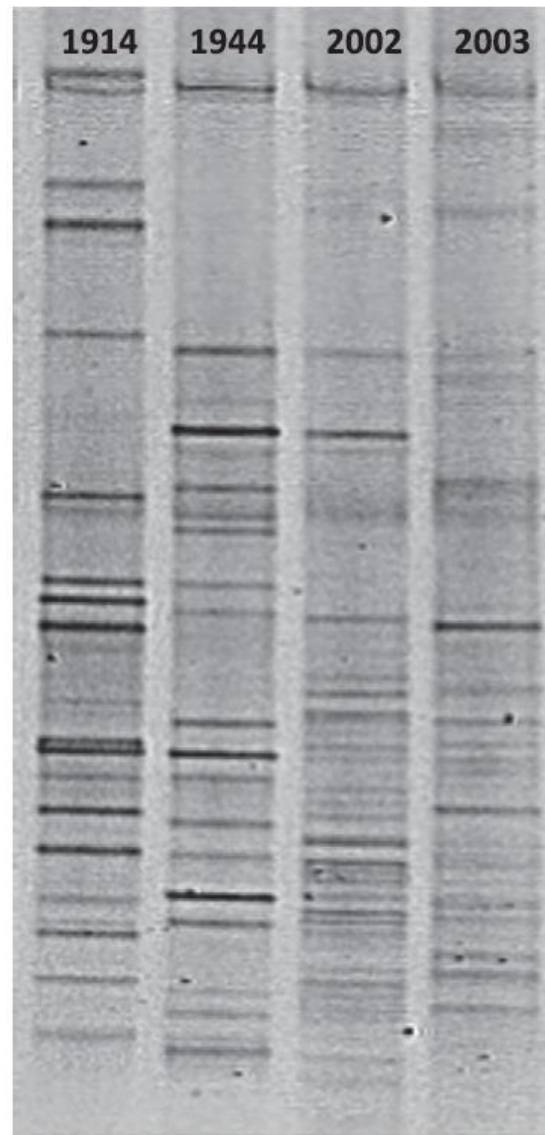
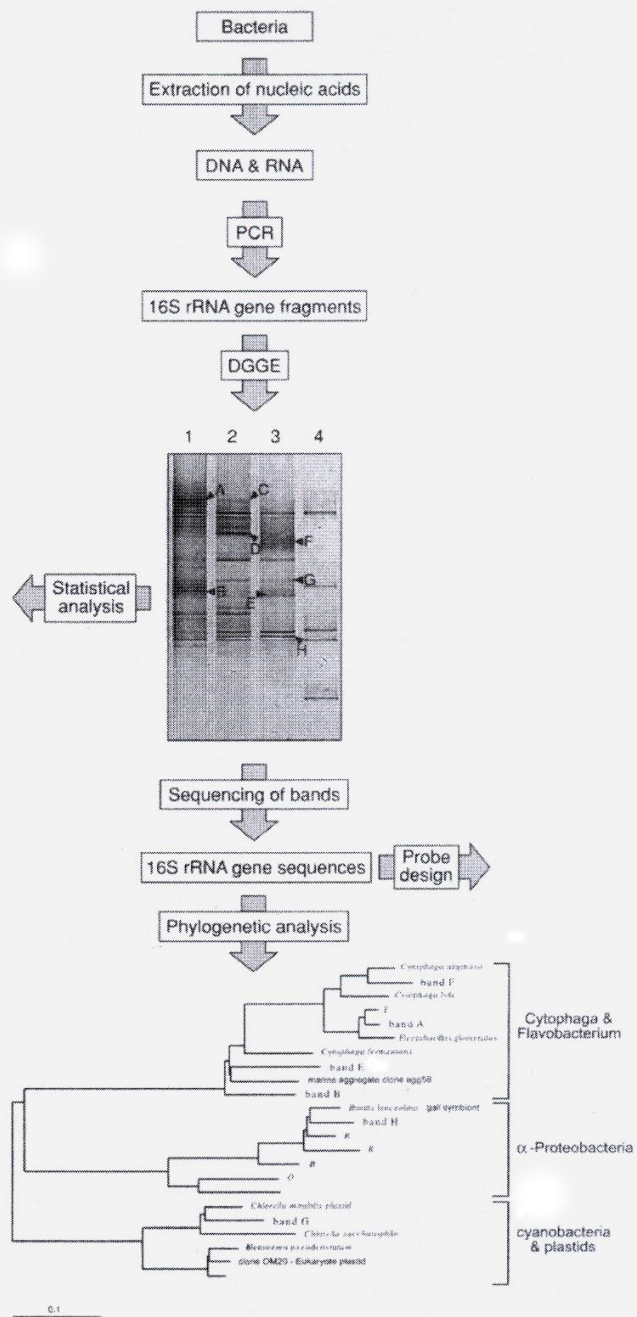
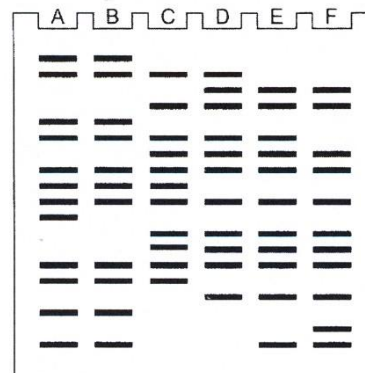


Fig. 5. DGGE profiles of 16S rRNA genes in archived soils. The recently archived samples appear to have more bands of similar relative intensity compared to the older samples where fewer, more intense bands indicate differential survival of DNA from some bacterial groups.



DGGE patterns



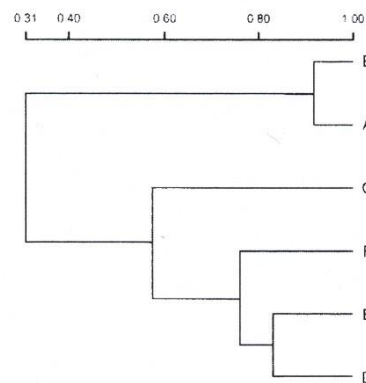
binary matrix

A	B	C	D	E	F
1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	0	0
0	0	0	1	1	1
0	0	1	1	1	1
1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	0
0	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1
1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	1	1

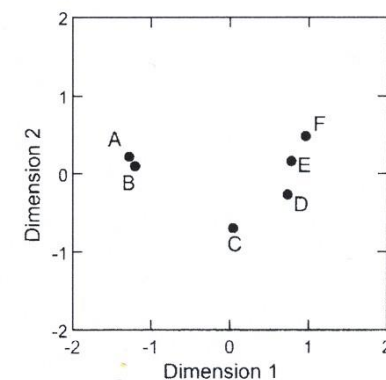
distance matrix (Jaccard coefficient)

	A	B	C	D	E	F
A	100	-	-	-	-	-
B	91.7	100	-	-	-	-
C	43.8	46.7	100	-	-	-
D	27.8	29.4	69.2	100	-	-
E	27.8	29.4	57.1	83.3	100	-
F	21.1	22.2	46.7	69.2	83.3	100

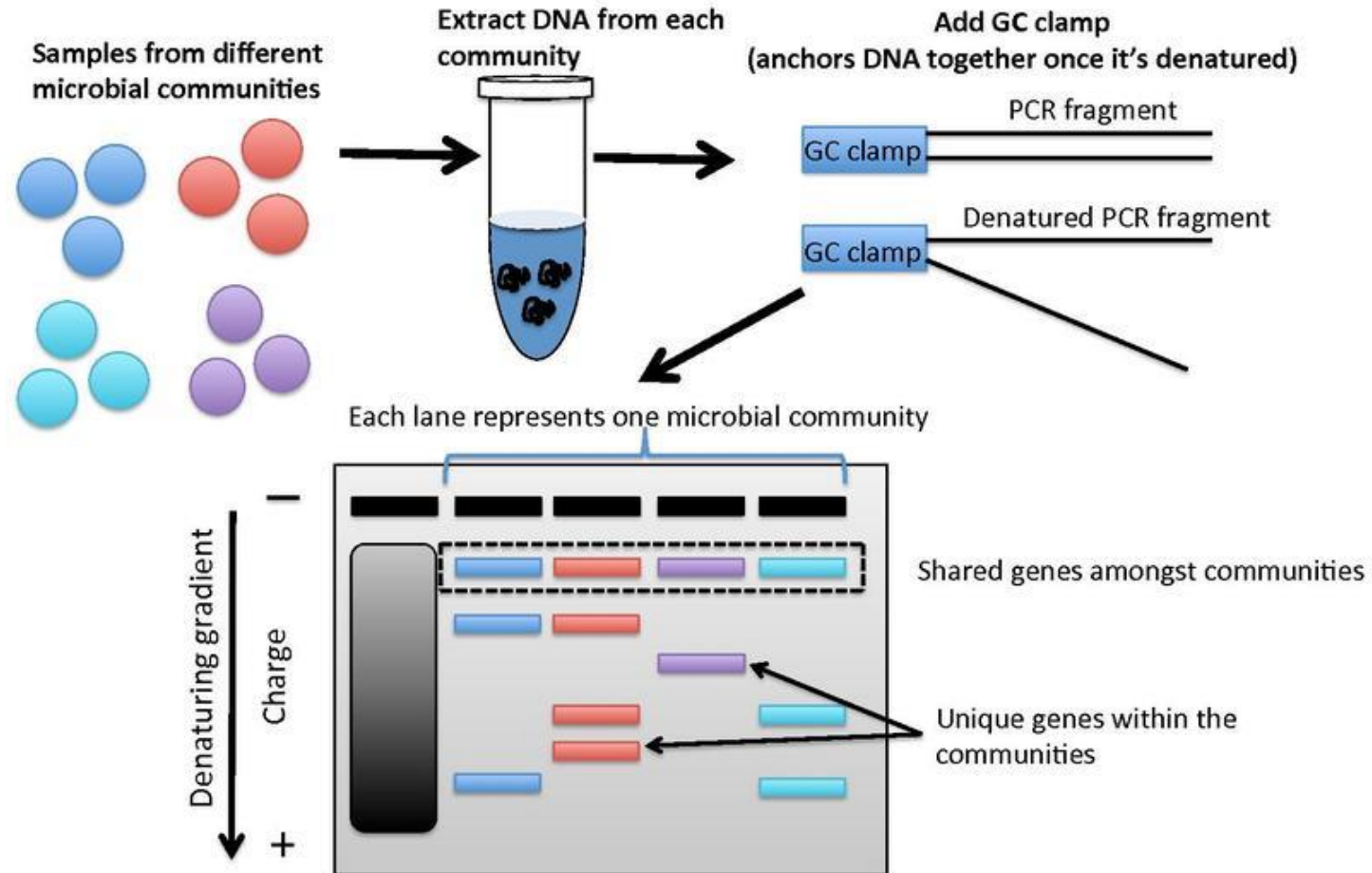
UPGMA



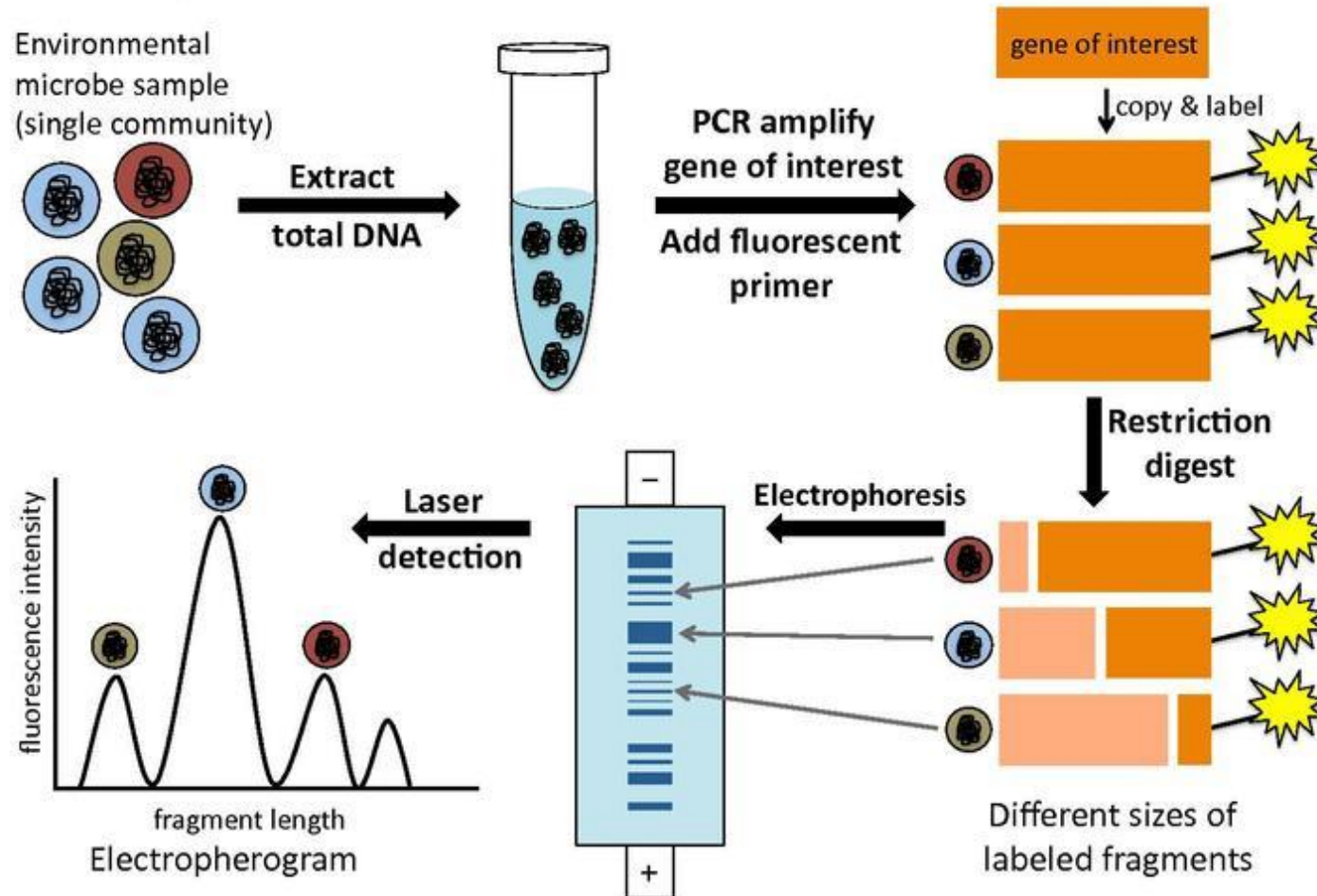
Multi-dimensional scaling



DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis



T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

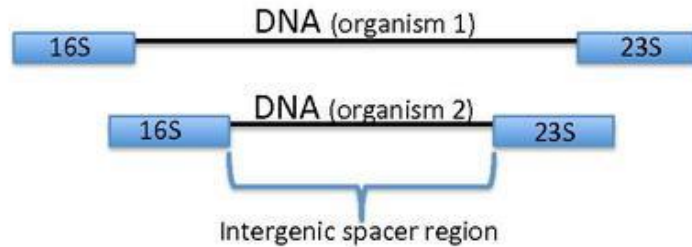


ARISA: Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

Samples from different microbial communities



Total DNA extracted from one community



Pathway 1

Pathway 2

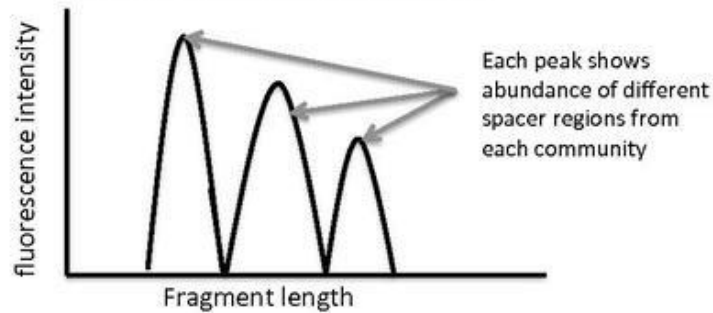
Spacer region amplified by PCR with fluorescent primers



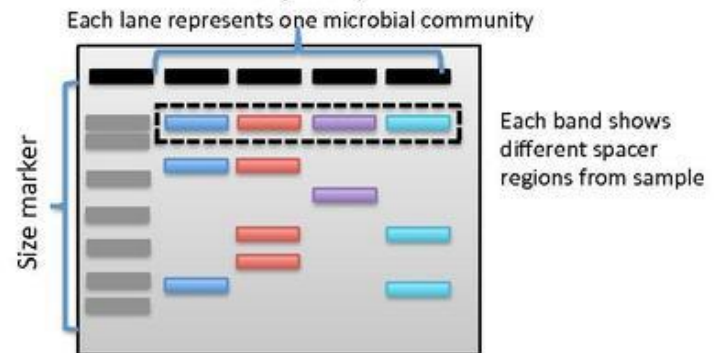
Spacer region amplified by PCR

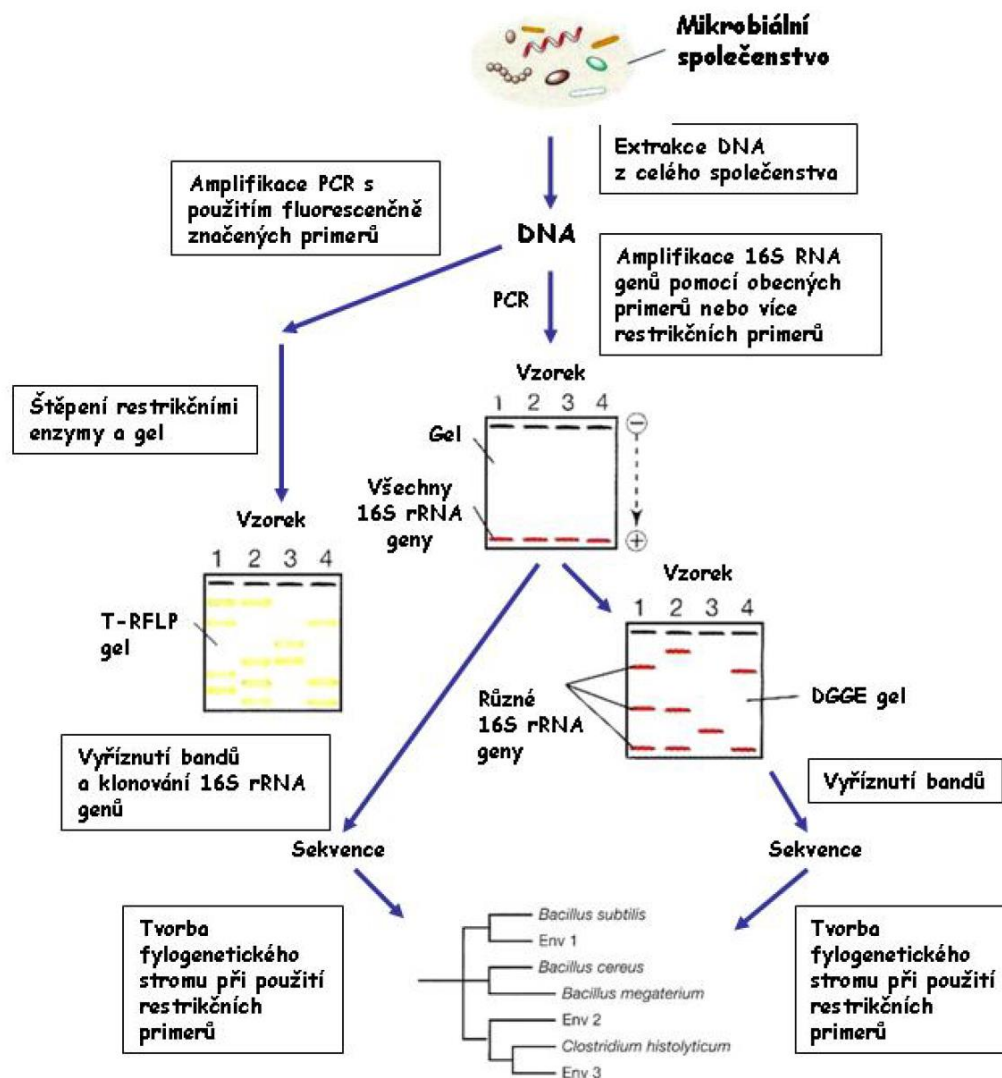


Electropherogram (ARISA)



Gel (RISA)





Obr. 2.4. Postup při analýze mikrobiálního společenstva založený na biodiverzitě jednoho genu. Z DNA celého společenstva jsou amplifikovány 16S rRNA geny za použití primerů (v případě DGGE) cílených pouze na *Firmicutes*, skupinu gram pozitivních bakterií. PCR proužky (bandy) jsou poté vyříznuty a rozdílné 16S rRNA geny separovány buď klonováním či DGGE. Po následné sekvenaci je vytvořen fylogenetický strom. „Env“ označuje environmentální sekvence (fylotypy). V případě analýzy T-RFLP počet bandů indikuje počet fylotypů (upraveno podle Madigan et al. 2012)

Analýza funkčních genů

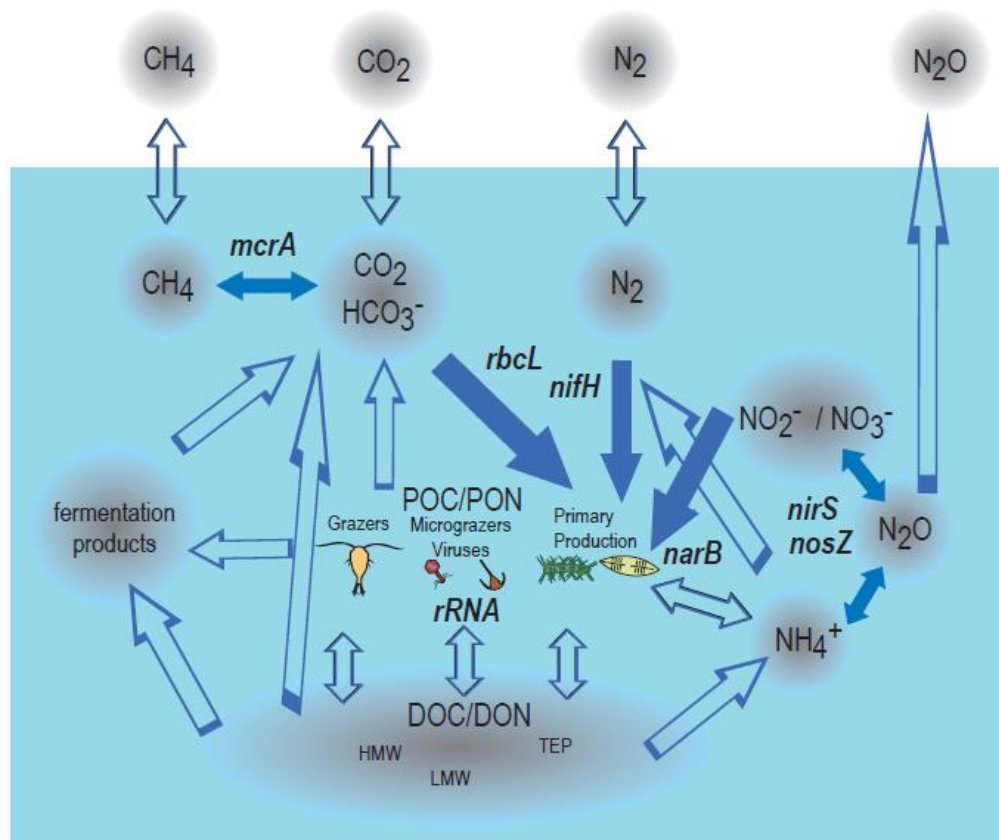


Fig. 3. Examples of dominant nutrient cycling pathways that may be useful targets for molecular detection, including those deployed on environmental sensing platforms. The genes involved in processes are indicated in boldface. *mcrA*=methycoenzyme reductase A; *rbcL*=ribulose biphosphate carboxylase-oxidase; *nifH*=nitrogenase Fe protein; *narB*=assimilatory nitrate reductase B; *nirS*=nitrite reductase S; *nosZ*=nitrous oxide reductase Z; rRNA=ribosomal RNA.

Tabulka 2.2. Geny běžně používané pro zhodnocení specifických mikrobiologických procesů v prostředí pomocí PCR (podle Madigan et al. 2012)

Metabolický proces	Cílový gen	Kódovaný enzym
Denitrifikace	narG	Nitrát reduktáza
	miK, nirS	Nitrit reduktáza
	norB	Oxid dusnatý reduktáza
	nosZ	Oxid dusný reduktáza
Fixace dusíku	nifH	Nitrogenáza
Nitrifikace	amoA	Amoniak monooxygenáza
Oxidace metanu	pmoaA	Metan monooxygenáza
Sulfátová redukce	apsA	Adenosin fosfosulfát reduktáza
	dsrAB	Sulfit reduktáza
Produkce metanu	mcrA	Metyl koenzym M reduktáza
Degradace ropných sloučenin	nahA	Naftalen dioxygenáza
	alkB	Alkan hydroxyláza
Anoxygenní fotosyntéza	pufM	M podjednotka fotosyntetického reakčního centra

Ideálně by funkční geny použité pro studium procesů a fylogeneze měly mít následující vlastnosti:

- (1) gen kóduje enzym, který katalyzuje jednu specifickou reakci;
- (2) je dostupná velká databáze sekvence genu pro odvození fylogenetické identity environmentální sekvence;
- (3) nukleotidová sekvence je dostatečně konzervativní, takže geny mohou být kompletně cílené skupinově-specifickými sondami, jako jsou PCR primery;
- (4) evoluční historie je dostatečně omezená, takže můžeme identifikovat organizmy, které gen získaly bočním (laterálním) přenosem

Ne všechny funkční geny jsou specifické pro jediný proces

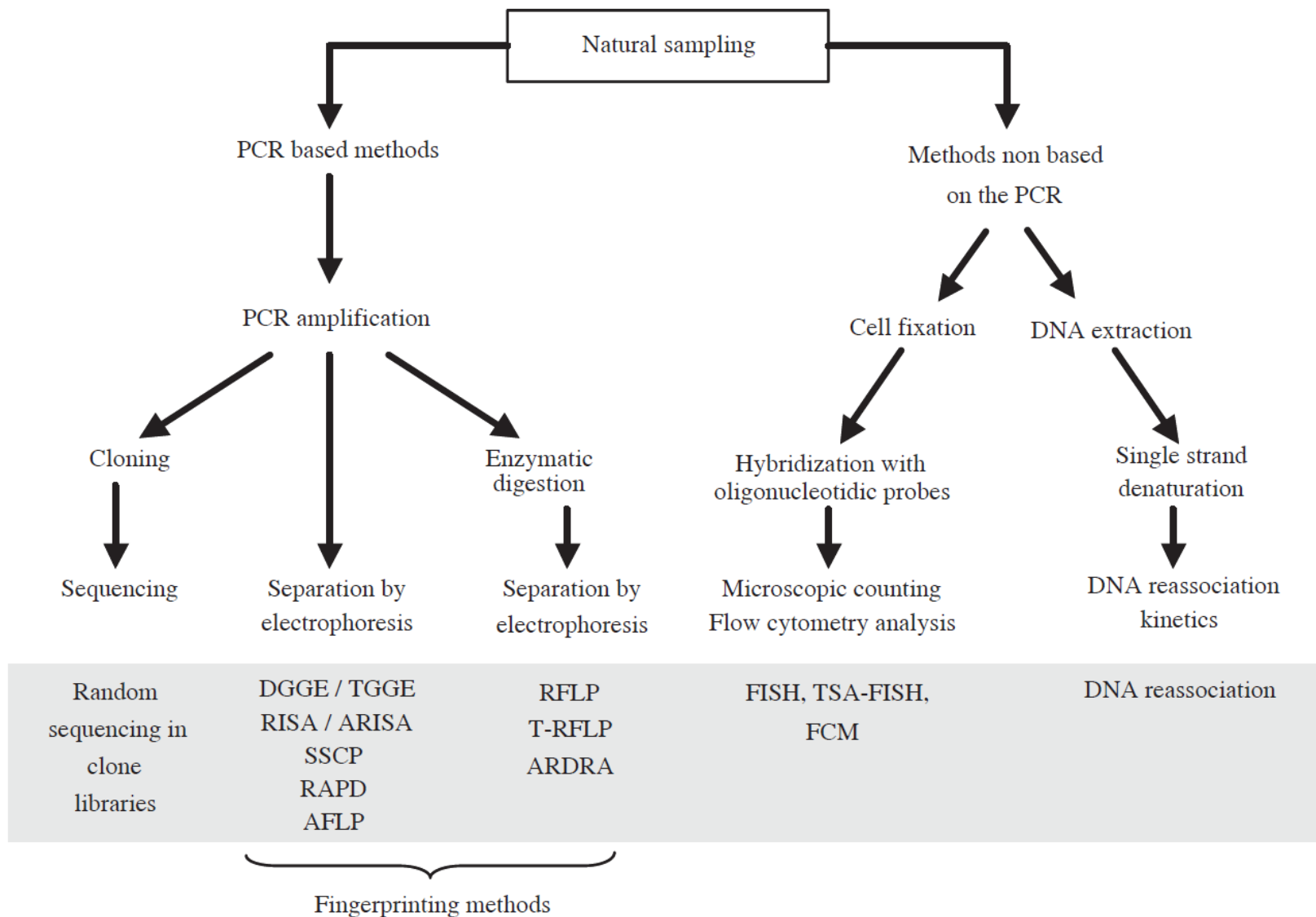
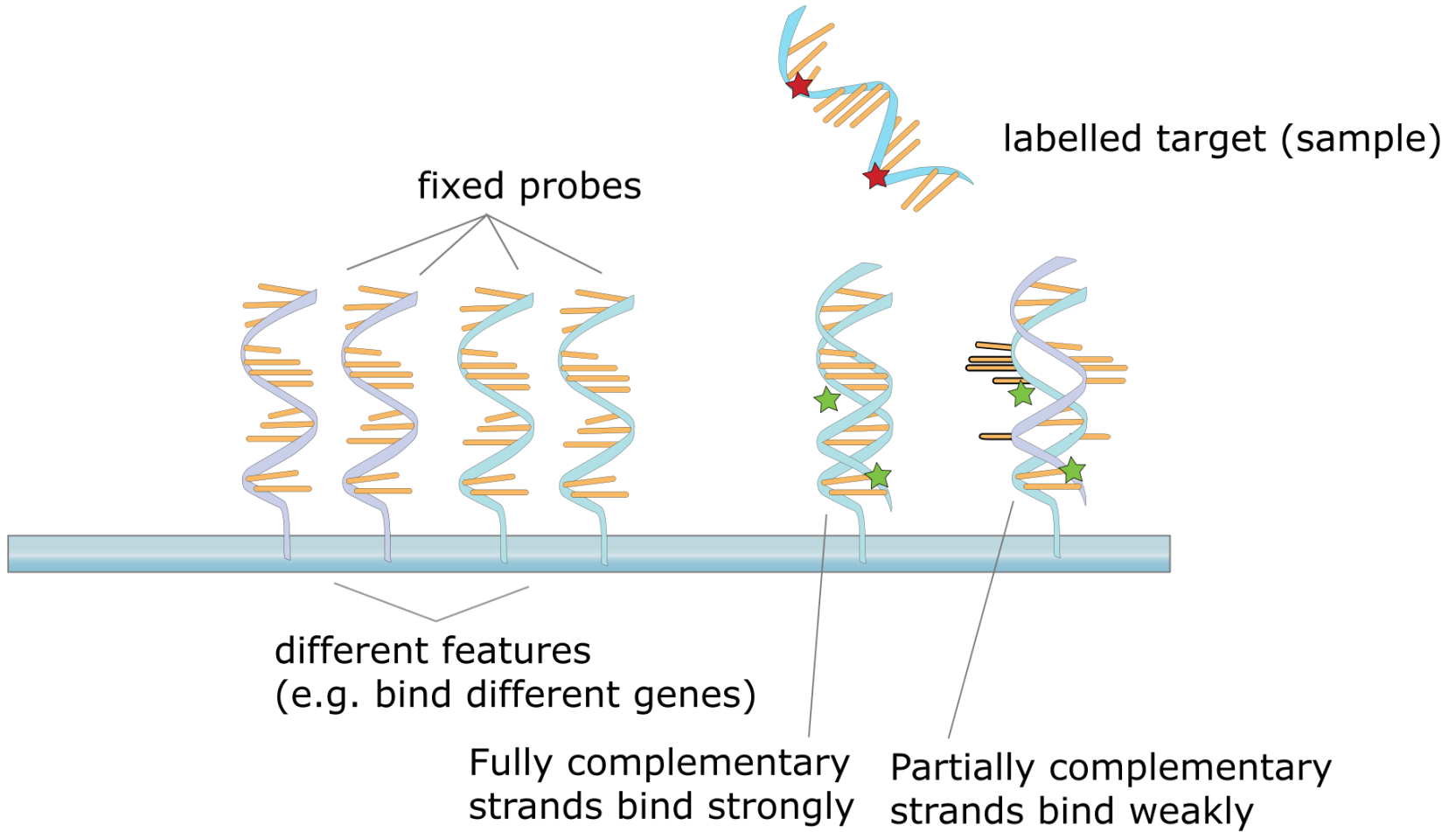
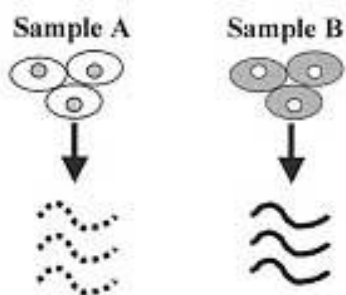


Fig. 1. Diagram of the different molecular approaches for assessing the genetic diversity of microbial communities. DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis, TGGE: Temperature gradient gel electrophoresis, RISA: Ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA: Automated ribosomal intergenic spacer analysis, SSCP: Single strand conformation polymorphism, RAPD: Random amplified polymorphic DNA, AFLP: Amplified fragment length polymorphism, (t)-RFLP: (terminal)- Restriction fragment length polymorphism, ARDRA: Amplified ribosomal DNA restriction analysis, (TSA)-FISH: (tyramide signal amplification)-Fluorescence in situ hybridization, FCM: Flow cytometry.

Princip čipu (microarray)

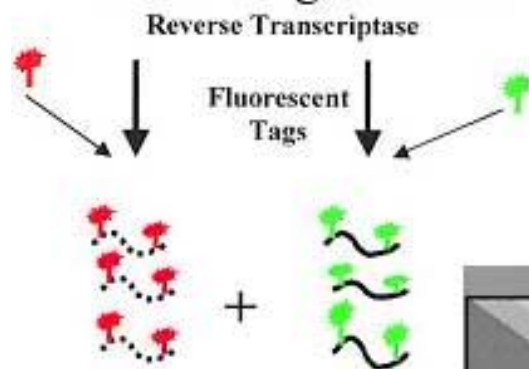


A. RNA Isolation

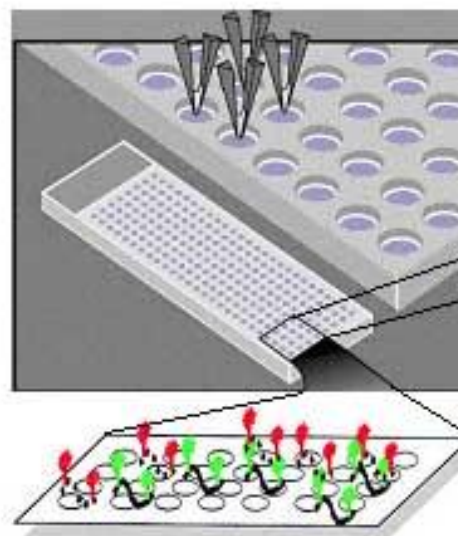


B. cDNA Generation

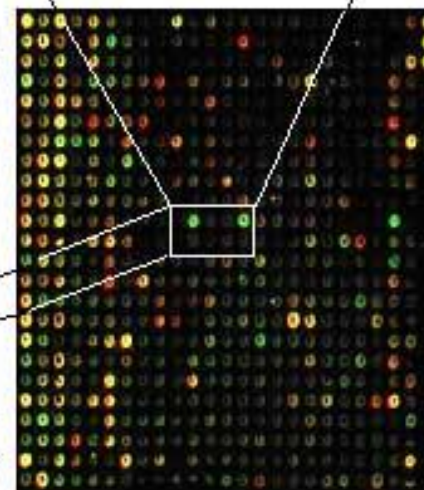
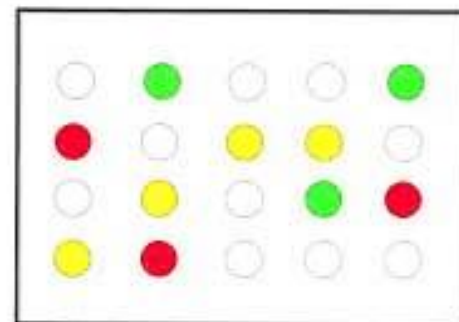
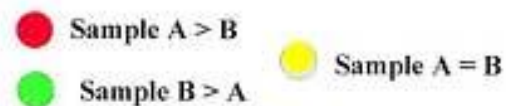
C. Labeling of Probe



D. Hybridization to Array



E. Imaging



AFFYMETRIX®

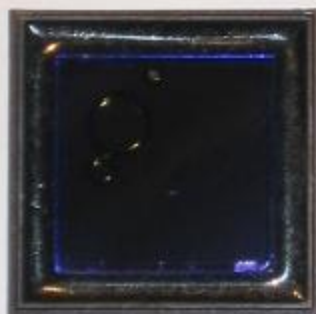


@52001900552056050706401000885092

GeneChip®

1/2

Human Genome
U133 Plus 2.0



P/N: 520019

Lot #: 4010008

Exp. Date: 05/07/06

For Research Use Only

AFFYMETRIX®



@52002900588841112406401511225338

GeneChip®



Mouse Genome
430 2.0 Array



P/N: 520029

Lot #: 4015112

Exp. Date: 11/24/06

For Research Use Only



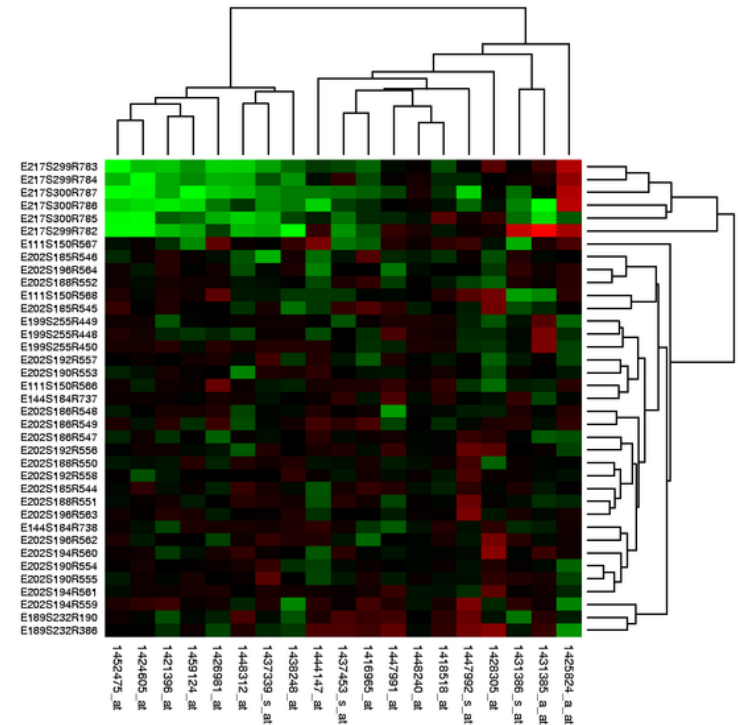
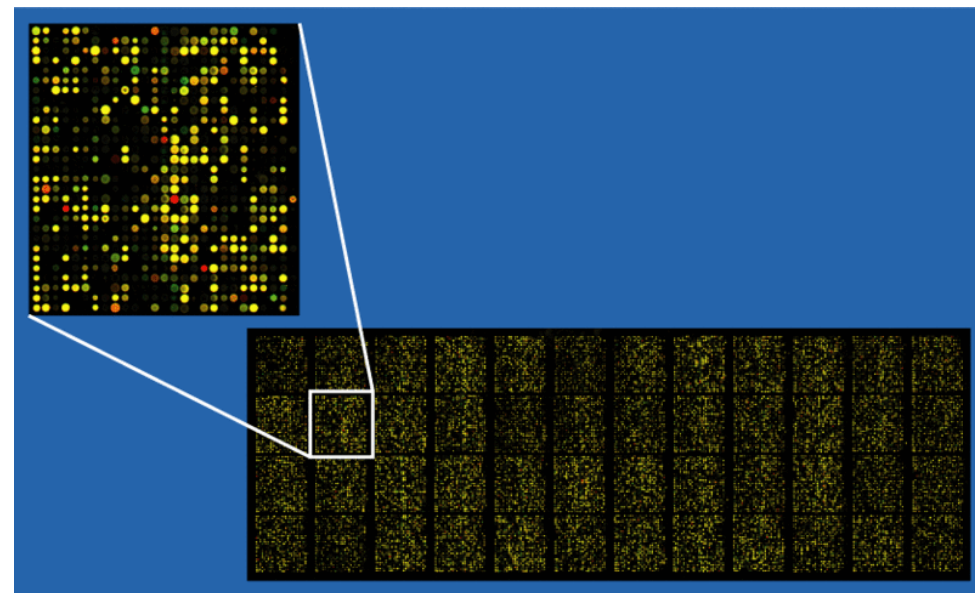
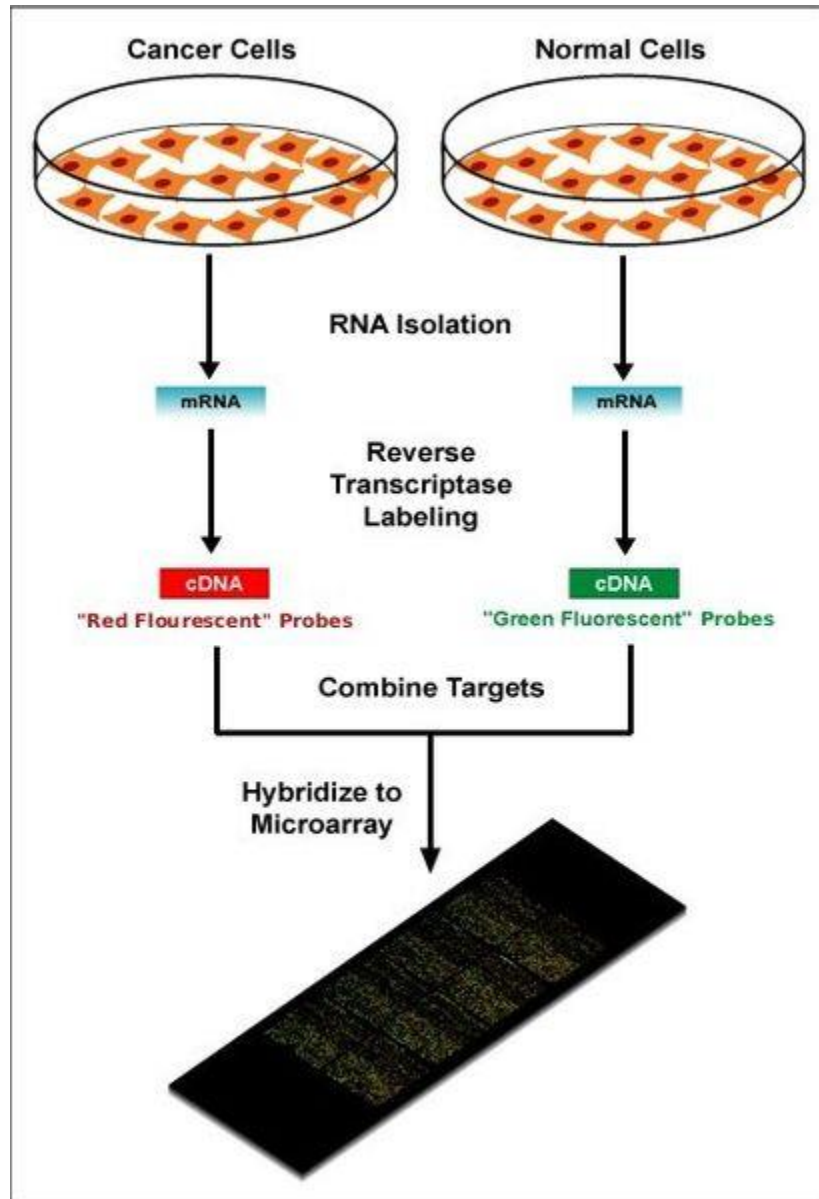


Table 1 Summary of the numbers of probes by functional gene category on the GeoChip

<i>Gene category</i>	<i>Unique probes</i>	<i>Group probes</i>	<i>Total</i>
Nitrogen cycling	3896	1414	5310
Nitrogen fixation	1225	0	1225
Denitrification	1805	501	2306
Nitrification	251	96	347
Nitrogen mineralization	615	817	1432
Carbon cycling	3708	891	4599
Carbon fixation	739	279	1018
Cellulose degradation	1213	72	1285
Lignin degradation	423	90	513
Chitin degradation	651	93	744
Methane production	194	243	437
Methane oxidation	243	93	336
Others	245	21	266
Sulfate reduction	1286	329	1615
Phosphorus utilization	89	56	145
Metal reduction and resistance	4039	507	4546
Arsenic resistance	775	102	877
Cadmium resistance	237	45	282
Chromium resistance	303	16	319
Mercury resistance/reduction	439	109	548
Nickel resistance	135	5	140
Zinc resistance	110	18	128
Other metals and metalloids	1450	182	1632
Other metal resistance/reduction	590	30	620
Contaminant degradation	6941	1087	8028
BTEX and related aromatics	3652	524	4176
Chlorinated aromatics	79	11	90
Nitoaromatics	134	18	152
Heterocyclic aromatics	176	37	213
Hydrocarbons (e.g. PAHs)	597	144	741
Polychlorinated biphenyls (PCBs)	303	85	388
Chlorinated solvents	178	54	232
Pesticides	504	54	558
Other chemicals & by-products	1297	160	1457
Others	21	0	21
Total	19 959	4284	24 243

Table 1

Summary of representative applications of FGAs for microbial community analyses.

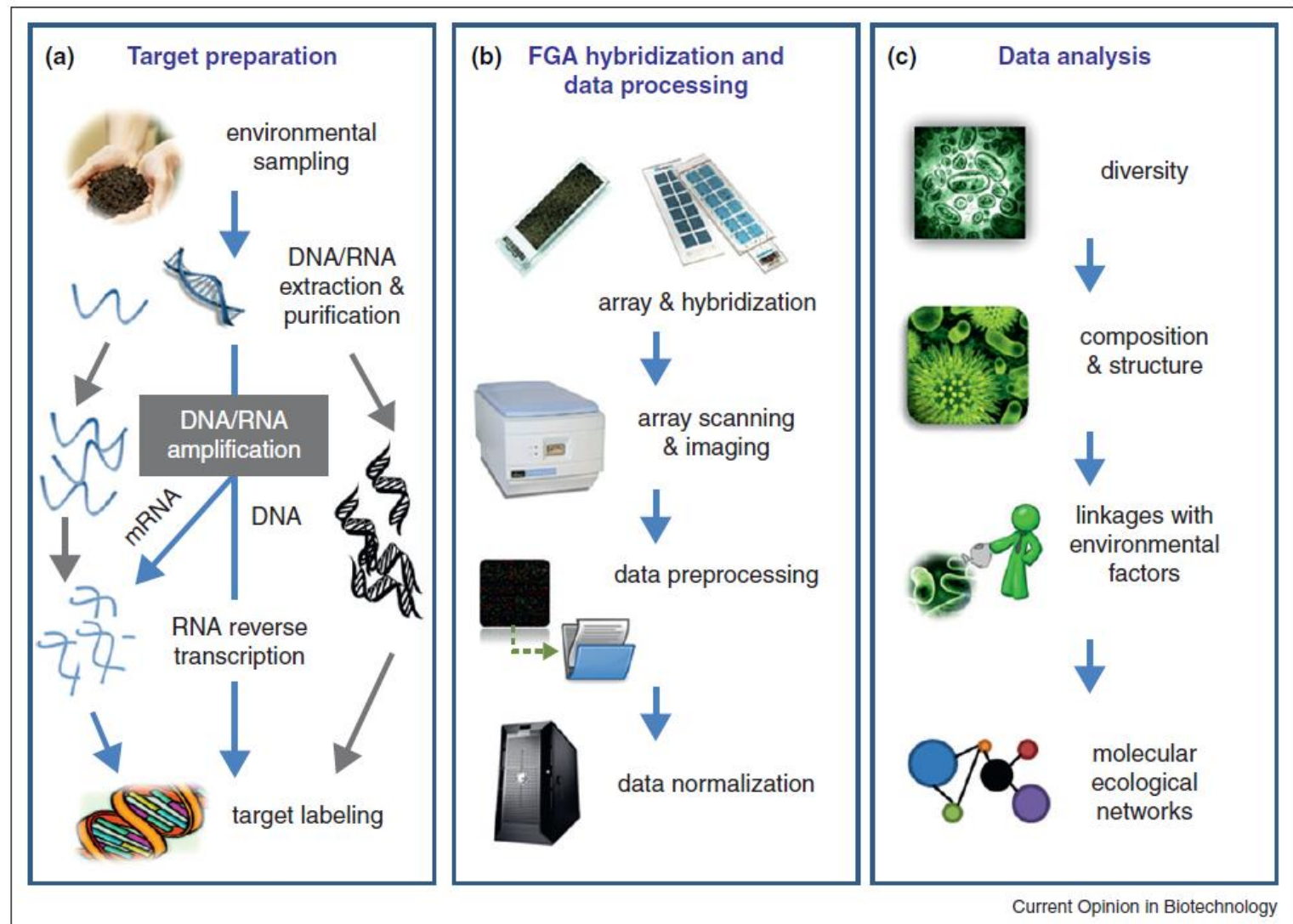
Habitat or system	Ecosystem/sample type	FGA description	Ref
Aquatic systems	Choptank River sediment	N cycling gene array	[10]
	Choptank River water	<i>nifH</i> gene array	[33]
	Tap/river water, and tertiary effluent	VMG Biochip with >30 genes	[12]
	Marine microbial mats	<i>nifH</i> gene arrays	[36]
	Marine sediment	GeoChip 1.0	[29]
	Ebro and Elbe river sediment	GeoChip 2.0	[35]
	Coral-associated marine water	GeoChip 2.0	[34 [•]]
Soils	Landfill soil	Methanotroph array (<i>pmoA</i>)	[9]
	Antarctic latitudinal transect soil	GeoChip 2.0	[28]
	Deciduous forest soil	GeoChip 2.0	[26]
	Native grassland soil	GeoChip 2.0	[39]
	Strawberry farmland soil	GeoChip 2.0	[37]
	Grassland soil	GeoChip 2.0	[40]
	Agricultural soil	E-FGA	[8 ^{••}]
	Grassland soil	GeoChip 3.0	[22 ^{••}]
	Citrus rhizosphere soil with	GeoChip 3.0	[38 [•]]
Contaminated sites	U-contaminated underground water	GeoChip 1.0/2.0	[17,27,41]
	U-contaminated sediment	GeoChip 2.0	[31]
	PCB-contaminated soil	GeoChip 2.0	[42]
	Oil-contaminated soil	GeoChip 2.0	[16 [•]]
	Arsenic-contaminated soil	GeoChip 3.0	[43]
	Oil-spill sea water	GeoChip 4.0	[7 ^{••} ,11 ^{••}]
Extreme environments	Bioleaching system (water)	Bioleaching array	[44]
	Deep sea hydrothermal vent (chimney)	GeoChip 2.0	[45]
	Deep sea basalt samples	GeoChip 2.0	[46]
	GSL hypersaline water	GeoChip 2.0	[47]
	Acid mine drainage (water)	GeoChip 2.0	[48 [•]]
Bioreactors	Fluidized bed reactor for bioremediation	GeoChip 2.0	[49]
	Microbial electrolysis cell for hydrogen production	GeoChip 3.0	[50 [•]]

Table 1**Summary of representatives of various functional gene arrays**

Functional process (FGA)	No. functional gene families	Probe type	No. functional gene probes	Refs
N cycling and methanotroph	4 (<i>amoA</i> , <i>nirS</i> , <i>nirK</i> , <i>pmoA</i>)	Amplicons	89	[11]
N cycling	4 (<i>amoA</i> , <i>nifH</i> , <i>nirS</i> , <i>nirK</i>)	70-mer oligos	61 and 64	[25]
Antibiotic resistance	2 (<i>tet</i> , <i>bla_{TEM-1}</i>)	Amplicons	18	[31]
N cycling (N fixation)	1 (<i>nifH</i>)	Amplicons	88	[26]
N cycling, methanotroph, S reduction	6 (<i>amoA</i> , <i>nirS</i> , <i>nirK</i> , <i>nifH</i> , <i>pmoA</i> , <i>dsrAB</i>)	50-mer oligos	763	[12]
Contaminant degradation, metal resistance	NS ^a	50-mer oligos	2042	[13]
N cycling (nodulation)	1 (<i>nodC</i>)	41–50 meroligos	130	[27]
Methanotroph	1 (<i>pmoA</i>)	~20-mer oligos	59 and 68	[29,30]
Virulence	2 (<i>invA</i> , <i>sopB</i>)	70-mer oligos	4	[32]
Virulence, antibiotic resistance	NS ^a	Amplicons	120	[33]
Comprehensive (GeoChip 2.0)	>150	50-mer oligos	24 243	[7]
Bioleaching	NS ^a	50-mer oligos	501	[37]
N fixation	1 (<i>nifH</i>)	~20-mer oligos	194	[28]
Virulence	>30	Oligos	791 and 2034	[35]
Virulence, antibiotic resistance (NimbleGen)	160	Oligos	1245	[34]
Antimicrobial resistance	NS ^a	Amplicons	800	[36]
Comprehensive(GeoChip 3.0)	292	50-mer oligos	27 812	[8**]
Comprehensive	NS ^a	cDNA clones	13 056	[38**]
Comprehensive (GeoChip 4.0, NimbleGen)	539 ^b	50-mer oligos	120 054	[9*,10]

^a NS: not specify.

^b GeoChip also contains genes targeting human microbiomes with 36,062 probes in 139 functional gene families.

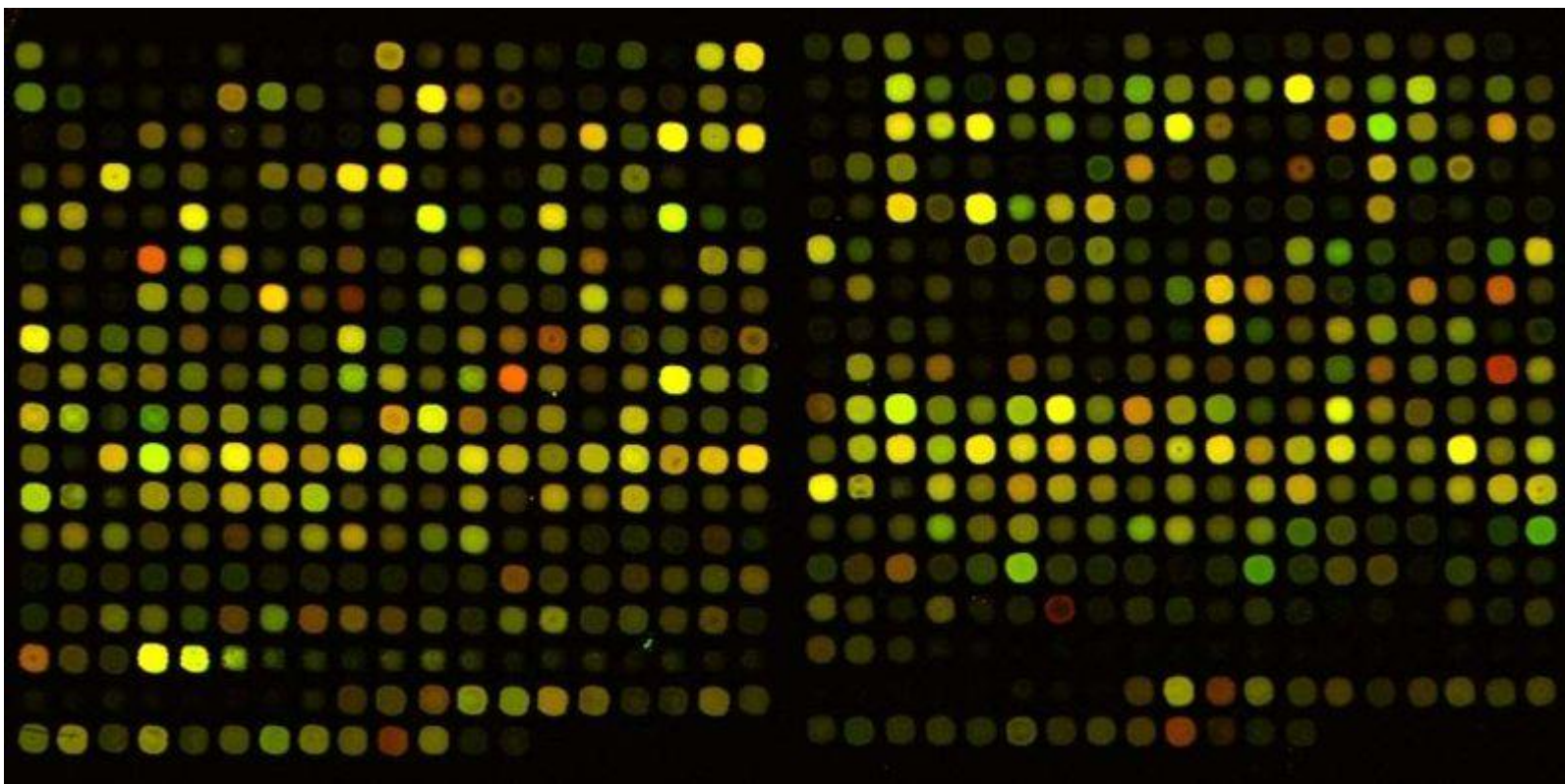


Schematic presentation of FGA applications in analysis of microbial communities from a variety of habitats. **(a)** Target preparation; **(b)** hybridization and data processing; **(c)** data analysis. The DNA/RNA amplification steps highlighted in gray are optional but often used if the amount of RNA or DNA is not enough for GeoChip analysis.

Table 1

Summary of representative applications of FGAs for microbial community analyses.

Habitat or system	Ecosystem/sample type	FGA description	Ref
Aquatic systems	Choptank River sediment	N cycling gene array	[10]
	Choptank River water	<i>nifH</i> gene array	[33]
	Tap/river water, and tertiary effluent	VMG Biochip with >30 genes	[12]
	Marine microbial mats	<i>nifH</i> gene arrays	[36]
	Marine sediment	GeoChip 1.0	[29]
	Ebro and Elbe river sediment	GeoChip 2.0	[35]
	Coral-associated marine water	GeoChip 2.0	[34 [•]]
Soils	Landfill soil	Methanotroph array (<i>pmoA</i>)	[9]
	Antarctic latitudinal transect soil	GeoChip 2.0	[28]
	Deciduous forest soil	GeoChip 2.0	[26]
	Native grassland soil	GeoChip 2.0	[39]
	Strawberry farmland soil	GeoChip 2.0	[37]
	Grassland soil	GeoChip 2.0	[40]
	Agricultural soil	E-FGA	[8 ^{••}]
	Grassland soil	GeoChip 3.0	[22 ^{••}]
Contaminated sites	Citrus rhizosphere soil with	GeoChip 3.0	[38 [•]]
	U-contaminated underground water	GeoChip 1.0/2.0	[17,27,41]
	U-contaminated sediment	GeoChip 2.0	[31]
	PCB-contaminated soil	GeoChip 2.0	[42]
	Oil-contaminated soil	GeoChip 2.0	[16 [•]]
	Arsenic-contaminated soil	GeoChip 3.0	[43]
Extreme environments	Oil-spill sea water	GeoChip 4.0	[7 ^{••} ,11 ^{••}]
	Bioleaching system (water)	Bioleaching array	[44]
	Deep sea hydrothermal vent (chimney)	GeoChip 2.0	[45]
	Deep sea basalt samples	GeoChip 2.0	[46]
	GSL hypersaline water	GeoChip 2.0	[47]
	Acid mine drainage (water)	GeoChip 2.0	[48 [•]]
Bioreactors	Fluidized bed reactor for bioremediation	GeoChip 2.0	[49]
	Microbial electrolysis cell for hydrogen production	GeoChip 3.0	[50 [•]]



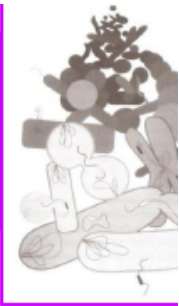
Detail DNA čipu po dvoukanálovém experimentu.

Různý poměr molekul z jednotlivých vzorků hybridizovaných na sondách způsobuje různé zabarvení světla vyzářeného z míst jednotlivých vlastností



Figure 6 Hierarchical cluster analysis of gene relationships of groundwater microbial communities in the monitoring well FW 102-3 based on GeoChip hybridization signal intensity. Representative genes were from different samples of Well FW 102-3 at different days. These genes showed significant correlations ($P \leq 0.05$) with uranium concentrations based on the Mantel test.

Metagenom - metagenomika



Metagenom - suma všech genomů v daném prostředí:

- Chromozomální DNA
- Plasmidová DNA
- Organelová DNA (mitochondrie, chloroplasty)
- Ostatní mobilní genetické elementy
- Viry, bakteriofágy
- Extracelulární DNA (mimo buněk)

Metagenomika – sekvenování a analýza DNA získaná přímo z prostředí

Metody založené na analýze nukleových kyselin

Mikrobiální ekologové používají celou řadu technik založených na izolaci a analýze nukleových kyselin. Většina z těchto metod je aplikována při charakterizaci mikroorganismů v kulturách, např. při precizní taxonomické identifikaci či při diagnóze onemocnění; u mnoha kultivovatelných mikroorganismů již byla dokonce publikována sekvence celých genomů.

Určitou revoluci však tyto metody zaznamenaly až s nástupem tzv. environmentální genomiky (*environmental genomics*), tj. metod pro detekci a identifikaci mikroorganismů, které jsou založeny na přímé extrakci genetického materiálu z prostředí, bez nutnosti kultivace.

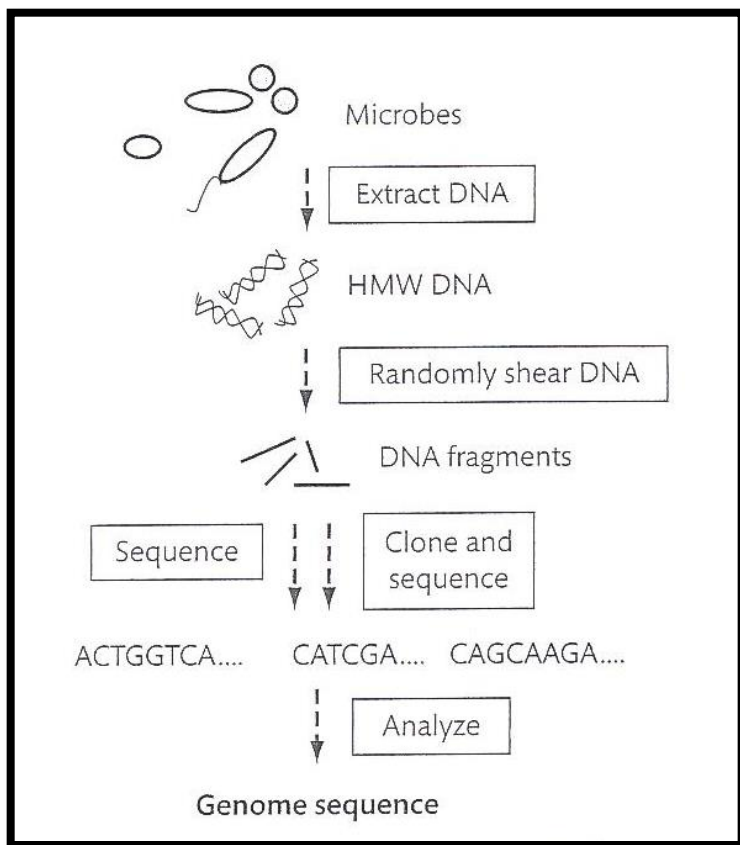
Tyto tzv. „na kultivaci nezávislé molekulární metody“ (*culture -independent molecular methods*) jsou velmi senzitivní a umožňují rozlišit malé množství specifických organismů nebo virů mezi ostatními organismy. Přímá analýza genů přítomných v environmentálním vzorku nebo porovnání společenstev pomocí technik genetických profilů (*genetic fingerprinting*) nám umožňuje si udělat představu o diverzitě, abundanci a aktivitě mikroorganismů ve vodách. Rychlý rozvoj molekulárních metod zaměřených na izolaci, amplifikaci a sekvenování DNA nastal zejména po roce 2000 a byl doprovázen souběžně pokroky v bioinformatice, která je nezbytná k pochopení získaných genomických dat.

Protože jsme nyní schopni získat a analyzovat celkovou genetickou informaci z mikrobiálních společenstev v prostředí (tzv. metagenom), používáme pro tento analytický přístup pojem metagenomika.

Sekvenování genomu(ů)

- **Whole-genome shotgun** metoda - při této metodě se genom rozštípe na náhodně velké fragmenty, každý z nich se osekvenuje a následně se tyto sekvence seřadí (pomocí počítačového softwaru). Toto seřazení však komplikují různé repetitivní úseky. Navíc je nutné celý genom v podstatě osekvenovat několikrát (asi 7-9krát), aby jednotlivé sekvence dostatečně přesahovaly a bylo možné podle těchto přesahů sestavit genom.

- **BAC sekvenování** („Clone-by-clone“) - využívá se tzv. BAC plazmidů (BAC - *bacterial artificial chromosome*). Postup je poněkud opačný, než u předchozí metody. Nejprve se vytvoří jakási mapa celého genomu, jež rozdělí tento genom na sekvence o délce asi 150 000 párů bází, každá jednotlivá sekvence se vloží do bakterie v podobě uměle připraveného plazmidu, načež se jednotlivé klony mohou sekvenovat - a to vlastně shotgunovou metodou v malém měřítku. Výhodou je, že u této metody odpadá často složitá práce se seřazováním obrovského množství sekvencí, jako u předchozí metody



Princip tzv. shotgun sequencing