

Magdalena Frąc<sup>1\*</sup>, Stefania Jezierska-Tys<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie, Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina,  
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, tel. (081) 744 50 61 wew. 156

<sup>2</sup> Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Mikrobiologii Rolniczej,  
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin, tel. (081) 52 48 161

*Wpłynęło w lipcu 2009 r.*

1. Wprowadzenie. 2. Badania różnorodności mikrobiologicznej gleby. 3. Badania różnorodności mikrobiologicznej oparte na analizach biochemicznych. 4. Badania różnorodności mikroorganizmów oparte na metodach molekularnych. 5. Perspektywy na przyszłość

### Microbial diversity of soil environment

*Abstract:* Soil microorganisms (bacteria, fungi) play an important role in soil fertility and quality. These microorganisms influence plant health and are responsible for biogeochemical cycles and mineralization of organic compounds. This review summarizes the recent progress in the studies of soil microbial communities and shows various methods used to study microbial diversity in soil.

1. Introduction. 2. Analysis of soil microbial diversity. 3. Conventional methods for the analysis of microbial diversity in the soil environment. 4. Analysis of microbial diversity based on molecular methods. 5. Future perspectives

---

**Słowa kluczowe:** gleba, mikroorganizmy, różnorodność

**Key words:** soil, microorganisms, diversity

---

## 1. Wprowadzenie

Bakterie i grzyby glebowe odgrywają znaczną rolę w przebiegu różnych cykli biogeochemicznych [90] i są odpowiedzialne za mineralizację związków organicznych. Mikroorganizmy glebowe mają również wpływ na funkcjonowanie ekosystemów, zdrowotność roślin oraz strukturę i produktywność gleby. Glebowe mikroorganizmy są odpowiedzialne za ciągły obieg pierwiastków odżywczych w środowisku. Aktywność antropogeniczna, tj.: rozwój miast, intensyfikacja rolnictwa, stosowanie pestycydów, zanieczyszczenie środowiska mogą mieć wpływ na różnorodność glebowych mikroorganizmów [21, 60].

Wiedza dotycząca różnorodności mikroorganizmów jest ograniczona, zwłaszcza w odniesieniu do drobnoustrojów środowiska glebowego. W 1 g gleby występuje około 4000 różnych genomów bakterii [85]. Aktualnie wiadomo, że tylko ok. 1% populacji glebowych mikroorganizmów może być izolowana przy użyciu tradycyjnych metod laboratoryjnych i dlatego nowoczesne techniki, w tym biologii molekularnej są coraz częściej wykorzystywane do badania populacji bakterii i grzybów środowiska glebowego [44, 86].

Ocenia się, że obecnie znanych jest tylko 5% grzybów i 12% gatunków bakterii występujących w środowisku naturalnym. Różnorodność genetyczna glebowych mikroorganizmów może być źródłem szczepów o uznanych właściwościach biotechnologicznych, wykorzystywanych w nowych technologiach i pozyskiwaniu naturalnych produktów [12].

W pracy przedstawiono przydatność najnowszych metod stosowanych w badaniach różnorodności mikrobiologicznej gleby.

## 2. Badania różnorodności mikrobiologicznej gleby

Różnorodność mikroorganizmów można podzielić na różnorodność genetyczną, gatunkową i funkcjonalną. Pierwsza z nich związana jest z badaniami opartymi na analizie genomu [40], różnorodność gatunkowa wynika z bogactwa gatunkowego, ogólnej liczby obecnych gatunków oraz ich rozmieszczenia [65], natomiast funkcjonalna obejmuje wykorzystanie substratów organicznych przez drobnoustroje, badania ekspresji genów oraz aktywność enzymatyczną [27]. Metody badań różnorodności mikroorganizmów w glebie można podzielić

---

\* Autor korespondencyjny: Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie, Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, tel. (81) 744 50 61 wew. 156; e-mail: [m.frac@ipan.lublin.pl](mailto:m.frac@ipan.lublin.pl)

Tabela I

Metody badań różnorodności mikrobiologicznej środowiska glebowego

Metoda	Piśmiennictwo
Metody oparte na technikach biochemicznych	
Metoda płytkowa	[30, 80]
CLPP	[3, 13, 16, 23, 32, 36, 71, 96, 97]
FAME	[1, 17, 31, 33, 35, 39, 43, 96]
Metody oparte na technikach molekularnych	
Zawartość G+C	[62]
Mikromacierze	[8, 20, 25]
PCR-DGGE	[2, 4, 11, 42, 61, 69, 72, 76–78, 88, 89, 91, 93]
PCR-SSCP	[50, 67, 74, 100]
PCR-RFLP/ARDRA	[48]
T-RFLP	[28, 48, 51, 64, 84]
RISA/ARISA	[36, 81]
Regiony mikrosatelitarne	[36, 49]

na dwie grupy: oparte na technikach biochemicznych oraz oparte na technikach molekularnych (tabela I). Typowe badania różnorodności obejmują względną różnorodność populacji spowodowaną przez stres, zakłócenie warunków środowiskowych i inne czynniki biotyczne i abiotyczne [27, 65]. Trudno jest jednak, wykorzystując dostępne tradycyjne techniki, badać rzeczywistą różnorodność, jeśli nie wiemy co jest obecne w próbce i nie znamy sposobu określenia odpowiedniej metody ekstrakcji czy detekcji. Często badacze próbują ograniczyć informacje zgromadzone przez badanie różnorodności do odrębnych, numerycznych pomiarów, takich jak indeksy różnorodności [36]. Analiza środowiska glebowego pod względem obecności mikroorganizmów saprofitycznych i patogennych jest jednym z podstawowych narzędzi kontroli bezpieczeństwa i jakości gleb. Dotychczas najczęściej stosowane w mikrobiologii gleby metody identyfikacji mikroorganizmów opierają się na czasochłonnych i pracochłonnych technikach posiewu, tj. zliczaniu kolonii mikroorganizmów wzrastających na nieselektywnych i selektywnych podłożach. Przedstawione argumenty przemawiają za koniecznością stosowania w badaniach środowiska glebowego takich metod diagnostycznych, które precyzyjnie i w krótkim czasie oceniają stan drobnoustrojów występujących w glebie [40, 44, 60].

### 3. Badania różnorodności mikrobiologicznej oparte na analizach biochemicznych

Większość opisanych metod jest przydatna zarówno w badaniach bakterii, jak i grzybów, chociaż są również techniki specyficzne dla jednej z tych grup mikroorganizmów.

Tradycyjną metodą wykorzystywaną w badaniach różnorodności jest używanie selektywnych podłoży

i pośrednie liczenie odrębnych kolonii wyrosłych na pożywkach w wyniku inkubacji w odpowiednich warunkach. Te metody są szybkie, niedrogie i mogą dostarczyć informacji o aktywności heterotroficznych drobnoustrojów wchodzących w skład danej populacji. Ograniczeniem jest badanie bakterii i spor wyizolowanych z cząsteczek gleby i biofilmów, ze względu na wzrost na selektywnych podłożach, warunki wzrostu (temperatura, światło, pH), niemożliwość wyhodowania dużej liczby gatunków bakterii i grzybów obecnymi technikami oraz potencjalnie hamujące działanie jednych kolonii na inne, jak też nadmierny ich rozrost [30, 80]. Ponadto wzrost na płytkach preferuje mikroorganizmy szybko rosnące, które przez wytwarzanie dużej liczby spor przyczyniają się do zakażenia podłoża. Wszystkie te ograniczenia mogą wpływać również na różnorodność populacji mikroorganizmów.

W badaniach różnorodności mikrobiologicznej wykorzystywana jest technika zwana profilowaniem fizjologicznego poziomu populacji (CLPP – community level physiological profiling), polegająca na wykorzystaniu różnorodnych źródeł węgla przez mikroorganizmy (SSCU – sole karbon source utilization patterns). Garland i Mills [19] rozwinęli tą metodę, wykorzystującą 96-dołkowe mikropłytki do oceny potencjalnej różnorodności funkcjonalnej populacji bakterii poprzez jednoczesne metabolizowanie wielu zróżnicowanych źródeł węgla. W testach firmy Biolog dostępne są płytki Gram-ujemne (GN) i Gram-dodatnie (GP), każda zawiera 95 dołków z różnymi źródłami węgla i 1 dołek kontrolny bez substratu. Płytki GN i GP były pierwotnie wykorzystywane do charakterystyki bakterii wyizolowanych z materiału klinicznego, nie do analizy populacji drobnoustrojów występujących w próbkach środowiskowych. Jednak firma Biolog wprowadziła tzw. „Eco-plates” – płytki do badań środowiskowych [9], zawierające 3 pow-

tórzenia 31 różnych, istotnych środowiskowo źródeł węgla i 1 dołek kontrolny dla każdego powtórzenia. Źródła węgla nie występujące w płytkach GN są następujące: D-celobioza, D-xyloza, kwas maleinowy, L-arginina, kwas 2-hydroksybenzoesowy i 4-hydroksybenzoesowy. Wykaz wszystkich 31 źródeł węgla występujących w płytkach „Eco-plates” przedstawiony jest w pracy Choi i Dobbs [9]. Alternatywą jest również możliwość używania przez badaczy płytek zawierających odpowiednią pożywkę i sole tetrazoliowe z firmy Biolog łącznie z dodawanym miejscowo specyficznym źródłem węgla dla badania próbek środowiskowych [36]. Sole tetrazoliowe zmieniają barwę w momencie gdy substrat jest metabolizowany. Kiedy okazało się, że wiele gatunków grzybów nie było zdolnych do redukcji soli tetrazoliowych wprowadzono płytki specyficzne dla grzybów (SFN2 i SFP2), które zawierają te same substraty co płytki GN i GP, ale bez soli tetrazoliowych [10]. Po wprowadzeniu inokulum na płytkę mikroorganizmy są cały czas monitorowane odnośnie zdolności do wykorzystania substratów i szybkości, z którą ten substrat wykorzystują. Wykorzystanie wielowymiarowej analizy do opracowania otrzymanych wyników jest przydatne w celu oszacowania różnic występujących w funkcjonalnej różnorodności pomiędzy próbkami glebowymi.

Metoda może być z powodzeniem wykorzystywana do badania potencjalnej różnorodności metabolicznej populacji mikroorganizmów środowisk zanieczyszczonych [13, 97], ryzosfery roślin [23], gleb poddanych działaniu herbicydów [16] oraz metali ciężkich [3]. Roling i wsp. [71] używali systemu Biolog łącznie z badaniami DGGE (patrz dalej) do badania populacji mikroorganizmów beztlenowych w warstwie wodonośnej. Wykazali, że połączenie tych dwóch metod pozwoliło wydzielić populacje mikroorganizmów z zanieczyszczonej warstwy wodonośnej poniżej składowiska odpadów. Badania przeprowadzone przez Zhang i wsp. [96] wykazały przydatność metody Biolog w ocenie struktury mikroorganizmów gleb nawadnianych wodami pościelowymi. El Fantroussi i wsp. [16] używali płytek Biolog w połączeniu z techniką DGGE do badania wpływu różnych herbicydów na populacje glebowych mikroorganizmów. Okazało się, że różnorodność gleby obniżała się wraz z zastosowaniem herbicydów. Natomiast Insam i Goberna [32] opracowali zmodyfikowane procedury dotyczące zastosowania CLPP w badaniach próbek środowiskowych. System Biolog działa na podobnej zasadzie jak testy API, w których dostępne są paski z różnymi źródłami węgla.

Podsumowując, system Biolog dostarcza profilu poziomu fizjologicznego populacji (CLPP) lub profilu metabolicznego populacji bakterii i grzybów zdolnych do wykorzystania specyficznych źródeł węgla. Po-

równanie z bazami danych łatwo dostarcza informacji o danym drobnoustroju i pozwala na jego szybką identyfikację. Metoda ta umożliwia zróżnicowanie pomiędzy populacjami mikroorganizmów, jest stosunkowo łatwa w użyciu, powtarzalna i dająca dużą liczbę wyników odzwierciedlających metaboliczną charakterystykę populacji [95]. Ograniczeniem profilowania metabolicznego jest fakt, że metoda ta przeznaczona jest dla charakterystyki mikroorganizmów zdolnych do wzrostu w warunkach eksperymentalnych i odzwierciedla potencjalną różnorodność metaboliczną, nie *in situ*. Ponadto źródła węgla występujące w systemie Biolog nie zawsze muszą odpowiadać źródłom węgla obecnym w badanej próbce [94]. Pomimo pewnych niedogodności CLPP jest techniką użyteczną w przypadku badania funkcjonalnej różnorodności gleb łącznie z innymi metodami badawczymi.

Metodą biochemiczną, która nie jest oparta na hodowli mikroorganizmów jest analiza estrów metylo- wych kwasów tłuszczowych (FAME – fatty acid methyl ester analysis). Metoda ta dostarcza informacji o składzie populacji mikroorganizmów w oparciu o grupowanie kwasów tłuszczowych [31]. Zawartość kwasów tłuszczowych w biomacie komórkowej jest stosunkowo stała i zapis kwasów tłuszczowych występujących w komórkach może różnicować główne grupy taksonomiczne występujące w populacji. Zmiany w profilu kwasów tłuszczowych mogą odpowiadać zmianom w populacji mikroorganizmów. Technika ta była wykorzystywana do badań składu populacji glebowych mikroorganizmów i ich zmian pod wpływem czynników chemicznych [35] oraz praktyki rolniczej [31]. W analizie FAME kwasy tłuszczowe są ekstrahowane z gleby, metylowane i analizowane z wykorzystaniem chromatografu gazowego. Profile FAME różnych gleb mogą być porównywane z wykorzystaniem analizy wielowymiarowej. Metoda ta umożliwia wychwycenie zmian w składzie populacji bakterii i grzybów, jak również umożliwia wskazanie zapisu kwasów tłuszczowych dla różnych grup mikroorganizmów. Ibekwe i Kennedy [31] wykorzystywali analizę kwasów tłuszczowych (PLFA) i CLPP do badań populacji mikroorganizmów w ryzosferze roślin uprawnych. Wyniki otrzymane tymi technikami korespondowały ze sobą. Badania Zhang i wsp. [96] wykazały przydatność FAME w ocenie struktury populacji gleb nawadnianych ściekami. Analiza FAME była również wykorzystywana w analizie populacji mikroorganizmów w glebach nawożonych gnojowicą i obornikiem [43]. Analiza populacji mikroorganizmów z wykorzystaniem tej techniki obejmowała również gleby w różnych systemach użytkowania [1], gleby zanieczyszczone odpadami zawierającymi kadm [33] i metalami ciężkimi [39] oraz ryzosferę różnych gatunków traw [17].

Chociaż analiza FAME jest jedną z metod badania różnorodności mikroorganizmów, posiada ona szereg wad, zwłaszcza w odniesieniu do badań całych populacji mikroorganizmów. W badaniach grzybów minimalna ilość spor wykorzystywana w badaniach waha się od 120 do 150. Kolejnym ograniczeniem metody jest fakt, że zawartość kwasów tłuszczowych w komórkach może ulegać zmianom pod wpływem różnych czynników, takich jak temperatura, dostępne składniki odżywcze, możliwość wystąpienia innych organizmów o identycznych profilach FAME [22]. Ponadto odrębna analiza kwasów tłuszczowych nie może być używana do specyficznego określania gatunku, ponieważ te same kwasy tłuszczowe mogą pojawić się u więcej niż jednego gatunku mikroorganizmu [5].

#### 4. Badania różnorodności mikroorganizmów oparte na metodach molekularnych

W ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój badań z zakresu molekularnej różnorodności mikroorganizmów. W związku z tym rozwijane są różne techniki oparte o ekstrakcję kwasów nukleinowych i adaptowane do badań środowiska glebowego. Techniki te obejmują: rozdział DNA, hybrydyzację DNA-DNA i mRNA-DNA, klonowanie DNA, sekwencjonowanie i inne oparte na metodzie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – polimerase chain reaction), takie jak elektroforeza w gradiencie żelu denaturującego – DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) i elektroforeza w gradiencie temperatury – TGGE (temperature gradient gel electrophoresis), analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych RISA (ribosomal intergenic spacer analysis) i ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis) [27, 30, 81]. W pracy R o b e g o i wsp. [70] przedstawiono natomiast przegląd metod ekstrakcji DNA z gleby.

Zawartość par zasad guaniny i cytozyny (G+C) była elementem molekularnej charakterystyki mikroorganizmów najwcześniej zastosowanym w taksonomii. Różnice w zawartości guaniny i cytozyny (G+C) w DNA mogą być wykorzystywane również do badania różnorodności populacji bakterii w środowisku glebowym [62]. Technika ta oparta jest na wiedzy, że mikroorganizmy posiadają różną zawartość G+C, co pozwala zróżnicować drobnoustroje taksonomicznie [83]. Metoda ta dostarcza jednak tylko ogólnego poziomu rozkładu, jako że różne grupy taksonomiczne mogą posiadać taką samą zawartość G+C. Podczas gdy różna zawartość G+C świadczy o braku pokrewieństwa badanych szczepów (różnica większa niż 5% nie pozwala zaliczyć szczepów do jednego gatunku), to wartości zbliżone, a nawet identyczne nie mogą być jedynym kryterium świadczącym o ich pokrewień-

stwie, mogą być bowiem przypadkowe. Zaletą analizy G+C jest fakt, że nie jest to metoda zależna od techniki PCR, zawiera cały wyekstrahowany DNA, jest ilościowa i może służyć do wykrywania rzadkich gatunków w populacjach mikroorganizmów. Jednak wymaga ona dużej ilości DNA (do 50  $\mu\text{g}$ ) [62, 83].

Nusslein i Tiedje [62] używali parametru G+C łącznie z techniką ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) i analizą sekwencjonowania rDNA do badania różnorodności mikrobiologicznej gleb leśnych i pastwisk. Wszystkie metody wykazały istotny wpływ roślin na kształtowanie się populacji mikroorganizmów w środowisku glebowym.

Rozdział i hybrydyzacja DNA jest pomiarem wykorzystywanym w kompleksowej ocenie genetycznej różnorodności populacji mikroorganizmów [87]. Całkowity DNA jest ekstrahowany z próbek środowiskowych, oczyszczany, denaturowany i następnie łączony na zasadzie komplementarności zasad. Natężenie hybrydyzacji zależy od podobieństwa obecnych sekwencji. Jeżeli różnorodność sekwencji DNA wzrasta, natężenie z którym następuje wiązanie DNA obniża się [82]. Podobieństwo pomiędzy populacjami z różnych próbek może być badane przez pomiar stopnia podobieństwa DNA z wykorzystaniem kinetyki hybrydyzacji [26].

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych oparta na specyficznych sondach jest ważnym ilościowo i jakościowo narzędziem w badaniach z zakresu ekologii molekularnej bakterii [82]. Technika hybrydyzacji kwasów nukleinowych może być wykorzystywana w badaniach nad DNA i RNA wyekstrahowanym z próbek oraz techniką stosowaną *in situ*. Sondy oligo- lub polinukleotydowe zawierają sekwencje specyficzne dla danego organizmu. Kwas nukleinowy pełniący rolę sondy genetycznej jest znakowany barwnikiem fluorescencyjnym (fluoresceina lub rodamina). Hybrydyzacja ilościowa jest używana do badań wybranych grup mikroorganizmów. Próbkę jest lizowana, aby uwolnić kwasy nukleinowe. Następnie wprowadzane są sondy wykazujące homologię do unikatowych sąsiadujących ze sobą regionów tej samej cząsteczki rRNA testowanego organizmu [36]. Hybrydyzacja może przebiegać również na poziomie komórkowym i może być przeprowadzana *in situ*. Umożliwia to określenie rozmieszczenia mikroorganizmów w środowisku. Tradycyjnie, do znakowania sond oligonukleotydowych używane były radioaktywne izotopy, ale obecnie coraz częściej sondy są znakowane fluorescencyjnie. Metoda opiera się na utrwaleniu i permeabilizacji, hybrydyzacji, usunięciu niespecyficznie związanych sond i analizie mikroskopowej wybarwionych komórek w mikroskopie fluorescencyjnym, skaningowym lub cytometrycznie przepływowym. Metoda ta, zwana hybrydyzacją fluorescencyjną *in situ* (FISH – fluorescent *in situ* hybridization) była wykorzystywana do badań nad przestrzennym roz-

mieszczeniem bakterii w biofilmach [75]. Ograniczeniem FISH w badaniach próbek środowiskowych jest niska czułość metody. Głównymi czynnikami limitującymi detekcję komórek bakterii metodą FISH są: mała zawartość rybosomów w komórce bakteryjnej, specyficzność i dostępność sondy do wybranego regionu rRNA oraz niekompletna permeabilizacja ściany komórkowej niektórych drobnoustrojów, utrudniająca penetrację sondy do wnętrza komórki [15, 46].

Od niedawna hybrydyzacja DNA-DNA jest używana łącznie z mikromacierzami DNA w wykrywaniu i identyfikacji gatunków bakterii [8] oraz w badaniach różnorodności mikroorganizmów [25]. Mikromacierze różnego typu mają wiele zastosowań, z których najczęstsze to badanie ekspresji genów [73]. Dzięki miniaturyzacji możliwe jest jednoczesne badanie wielu genów w próbce. Podstawową zasadą mikromacierzy jest, jak w tradycyjnej hybrydyzacji, komplementarność kwasów nukleinowych. Próbkę kwasu nukleinowego znakuje się fluorescencyjnie i hybryduje z mikromacierzą. Cząsteczki wyznakowanego kwasu nukleinowego wiążą się do komplementarnych sekwencji. Intensywność sygnału dla poszczególnych sond mikromacierzy jest proporcjonalna do ilości kwasu nukleinowego o danej sekwencji w próbce [8]. Na ogół mikromacierze są konstruowane przez wiązanie dziesiątków tysięcy oligonukleotydów to szklanej lub nylonowej membrany, która jest następnie hybrydyzowana [63]. Typowy eksperyment wykorzystujący mikromacierze obejmuje:

- otrzymanie sond DNA oraz ich umieszczenie na podłożu,
- izolację i wyznaczenie próby z materiału biologicznego, który ma zostać scharakteryzowany,
- hybrydyzację próby (prób) do sond DNA znajdujących się na mikromacierzy,
- zebranie i analizę wyników hybrydyzacji [7, 34].

Mikromacierze DNA są narzędziem, które może być z wysoką dokładnością wykorzystywane w wykrywaniu bakterii i w badaniach ich różnorodności, ponieważ pojedyncza macierz może zawierać tysiące sekwencji DNA [8, 99]. Mikromacierze mogą zawierać specyficzne geny – tarcze, takie jak reduktaza azotanowa, nitrogenaza, aby dostarczyć informacji o funkcjonalnej różnorodności lub mogą zawierać próbki środowiskowe – „standarty” (fragmenty DNA – mniej niż 70% hybrydyzacji) reprezentujące różne gatunki występujące w próbkach środowiskowych [25]. Mikromacierze były wykorzystywane do analizy populacji mikroorganizmów w glebach zanieczyszczonych. Wykorzystanie tej techniki jest możliwe do detekcji najbardziej licznych gatunków [24].

Podstawową wadą, którą należy dopracować jest standaryzacja metody. Nie ustalono jeszcze jak przekształcić obserwacje poczynione za pomocą mikroma-

cierzy w proste, powtarzalne testy. Można stwierdzić, że wszystkie wady i zalety mikromacierzy DNA wpływają z tej samej ich właściwości – są one źródłem olbrzymiej ilości bardzo złożonych danych, których analiza może dostarczyć wielu informacji, jednak jest ona niezwykle skomplikowana [25, 98].

Badania różnorodności mikroorganizmów środowiska glebowego często są oparte na technice łańcuchowej reakcji polimerazy. Technika PCR 16S rDNA jest używana do badań różnorodności mikroorganizmów prokariotycznych i pozwala zidentyfikować drobnoustroje, jak też przewidzieć ich relacje filogenetyczne [66]. Regiony 18S rDNA i ITS (internal transcribed spacer – wewnętrzne międzygenowe sekwencje) są z kolei używane do badań populacji grzybów – mikroorganizmów eukariotycznych. Jakkolwiek, dostępność baz danych, w których skatalogowane są mikroorganizmy eukariotyczne nie jest tak rozbudowana, jak dla prokariotów [68].

Początkowo metody oparte na technikach molekularnych w badaniach ekologicznych oparte były o klonowanie fragmentów genów wyizolowanych z próbek środowiskowych [55]. Chociaż sekwencjonowanie stało się już metodą rutynową sekwencjonowanie tysięcy klonów jest nieefektywne i skomplikowane. Dlatego też w ostatnich latach rozwinęło się wiele innych technik wykorzystywanych w badaniach różnorodności populacji mikroorganizmów w środowisku. W metodach tych DNA jest ekstrahowany z próbek środowiskowych i oczyszczany. Regiony DNA (16S, 18S, ITS) są amplifikowane z wykorzystaniem uniwersalnych lub specyficznych starterów, a produkty amplifikacji są rozdzielane w różny sposób.

Elektroforeza w gradiencie żelu denaturującego (DGGE) i elektroforeza w gradiencie temperatury (TGGE) są to dwie podobne metody badania różnorodności mikrobiologicznej. Techniki te były pierwotnie stworzone do wykrywania mutacji punktowych w DNA. Muzyer i wsp. [56] rozwinęli metodę DGGE do badań różnorodności genetycznej mikroorganizmów. DNA jest ekstrahowany z próbek glebowych i amplifikowany z użyciem PCR wykorzystując uniwersalne startery dla fragmentów 16S lub 18S sekwencji rRNA. Koniec 5' przedniego startera zawiera klamry w postaci 35–40 par zasad GC, aby zabezpieczyć przynajmniej część DNA przed denaturacją, pozostawiając w formie podwójnie skręconej. Jest to konieczne do rozdzielania w żelu poliakrylamidowym o wzrastającym gradiencie stężenia denaturantów (formamid i mocznik) DNA w formie podwójnej helisy [36].

W elektroforezie w gradiencie żelu denaturującego mogą być rozdzielane fragmenty DNA o tej samej długości, ale z różnymi sekwencjami par zasad. Rozdział w DGGE jest oparty na mobilności elektroforetycznej cząsteczek dsDNA w żelu poliakrylamidowym

zawierającym wzrastający liniowo gradient denaturujący DNA (mocznik i formamid), który jest obniżony w porównaniu z kompletnie helikalną formą tych molekuł. Odcinki par zasad z identyczną temperaturą topnienia są nazwane domenami topnienia. Domenę topnienia z najniższą temperaturą topnienia wiąże temperatura topnienia ( $T_m$ ) w odpowiedniej pozycji w gradiencie denaturującego żelu (DGG), pojawia się przejście z helikalnych do częściowo stopniałych molekuł i migracja molekuł jest praktycznie zatrzymana. Różne sekwencje z takimi domenami z powodu ich temperatury topnienia różnią się. Różne sekwencje poszczególnych fragmentów mogą dlatego zatrzymać się w różnych pozycjach w denaturującym gradiencie żelu i od tej chwili mogą być rozdzielone efektywnie w DGGE [56, 58]. Wykorzystując te badania 50% sekwencji może być wykryta we fragmentach DNA powyżej 500 par zasad. Tam procent może wzrosnąć nawet do 100% przy wzroście sekwencji bogatych w pary GC, które mają domeny wysokotemperaturowego topnienia. Zwiększenie ilości par GC można wykonać przez klonowanie lub przez PCR. Są 2 różne typy gradientu żelu denaturującego: prostopadły (pionowy) i równoległy (poziomy) żel. Żel prostopadły ma gradient denaturacji wzrastający z lewej strony do prawej i prostopadły do kierunku elektroforezy. Próbkę są nakładane z jednej strony na całej szerokości i następuje elektroforeza przez ok. 3 godziny. Po wybarwieniu żelu bromkiem etyldyny i transiluminacji w świetle UV, wzór elektroforezy widzimy jak krzywą sigmoidalną. Cząsteczki DNA z lewej strony żelu, gdzie kumulacja denaturantów jest niska, będą migrowały jako podwójny splot DNA. Z drugiej strony żelu, gdzie koncentracja denaturantów jest wysoka, molekuły rozdzielają się tak szybko, jak wchodzi na żel i dlatego zatrzymują się bezpośrednio po zetknięciu z żelem. W pośredniej koncentracji denaturantów molekuły mają różne stopnie topnienia i różną mobilność. Równoległy gradient żelu ma wzrastający gradient denaturantów z góry do dołu, równoległy do kierunku elektroforezy. Jest on używany do analizy wielu próbek na tym samym żelu [54, 59].

Oprócz detekcji mutacji w wyizolowanych fragmentach genów DNA zamplifikowanych w PCR, technika DGGE może być używana do analizy genomowego DNA organizmów z genami o wielkości 1 mln par zasad. Z tego powodu DNA jest trawione na fragmenty z użyciem enzymów restrykcyjnych. Analiza DGGE zamplifikowanych fragmentów 16S rDNA z różnych populacji mikroorganizmów daje obecność kilku rozpoznawalnych (dających się odróżnić) prążków (od 5 do 10) w oddzielnych wzorach, które były najbardziej odpowiednio wywodzące się z dominujących wcześniej gatunków z tych populacji [54].

## Wykorzystanie DGGE do analizy populacji grzybów

Grzyby stanowią fizjologicznie i genetycznie różnorodną grupę organizmów odgrywających różne role w funkcjonowaniu ekosystemu, łącznie z obiegiem biogenów w przyrodzie, aktywnością patogeniczną, właściwościami podnoszącymi wzrost roślin, degradacją ksenobiotyków. Pomimo udokumentowanego pochodzenia grzybów i ich ważności w procesach w ekosystemie mało jest wiadomo o dynamice ich populacji, strukturze i różnorodności. Przemawia to za podjęciem badań nad dynamiką populacji grzybów. Tak jak w przypadku innych mikroorganizmów, wiele grzybów trudno jest zidentyfikować używając tylko charakterystyki morfologicznej i metabolicznej. Badania populacji grzybów do tej pory były prowadzone głównie w oparciu o identyfikację gatunków rosnących na specyficznych podłożach. Chociaż te techniki mogą wykrywać wiele ważnych gatunków grzybów, często prowadzenie badań w czystych kulturach zajmuje bardzo dużo czasu [38].

W ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w ekologii mikroorganizmów i ich taksonomii wskutek rozwoju metod opartych na analizie kwasów nukleinowych, np. analizie genów rRNA. Analiza małych podjednostek rRNA różnych organizmów ma duże znaczenie w filogenetycznej klasyfikacji. Detekcja fragmentów genów SSU rRNA przez PCR była też łączona z technikami elektroforezy w gradiencie żelu (D/TGGE). Tylko w ostatnich latach mikolodzy zauważyli możliwość obecności technologii PCR i analizy rRNA do detekcji i charakterystyki grzybów i populacji grzybów. Czułość metody PCR pozwala na szybką detekcję ważnych patogenów roślin [29]. Chociaż taka analiza może odnieść duży sukces w identyfikacji patogenów bez wcześniejszej hodowli w warunkach laboratoryjnych, zwykle prowadzi się także badania w porównaniu z zastosowaniem metod konwencjonalnych. Grzybowe rDNA z *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Zygomycetes* i *Chytridiomycetes* może być pozyskiwane i analizowane z wykorzystaniem odpowiednich primerów w reakcji PCR. Badanie sekwencji 18S rDNA pozwala na uzyskanie informacji o grzybach i pozwala na charakterystykę izolatów. Możliwe jest też wyizolowanie grzybowego DNA z korzeni roślin. Mieszanka produktów PCR jest rozdzielana w żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem techniki DGGE, a główne prążki mogą być poddane oczyszczeniu i sekwencjonowaniu. Analiza filogenetyczna pozyskanego DNA może być użyta przynajmniej do częściowej identyfikacji dominujących grzybów w zależności od kompletności 18S rDNA w bazach danych [47]. Teoretyczne i praktyczne aspekty DGGE zostały przedstawione w pracy M u y z e r a i wsp. [54].

### „Zagnieżdżone” PCR – analiza grzybowego 18S rDNA z korzeni

Porównanie sekwencji grzybowego rDNA może być wykryte przez zastosowanie potencjalnych starterów PCR i amplifikację 18S rRNA. Niefortunnie, pary primerów NS1/NS8, które są zidentyfikowane jako bardziej specyficzne dla grzybów powodują 1,7 kb fragmenty w wyniku PCR, które są zbyt duże dla analizy DGGE. Dlatego w takim wypadku konieczne jest zastosowanie strategii „zagnieżdżonego” PCR (nested PCR), w którym pierwszy krok obejmuje amplifikację genu 18S rRNA, a drugi produkcję fragmentów odpowiedniej długości dla DGGE przez dodatek par GC na końcach fragmentów [38].

TGGE wykorzystuje te same reguły jak DGGE z wyjątkiem gradientu temperatury zamiast chemicznych denaturantów [36].

DGGE/TGGE mają swoje zalety ze względu na rzetelność, wiarygodność, powtarzalność, szybkość i nie są to metody drogie. Wiele próbek może być analizowanych jednocześnie wskazując możliwość zmian w populacjach mikroorganizmów [57].

Ograniczeniem DGGE/TGGE jest przygotowywanie próbek i różne metody ekstrakcji DNA [82]. Zbadano, że DGGE może wykryć tylko gatunki dominujące obecne w próbkach środowiskowych [53]. Ponadto, fragmenty DNA różnych sekwencji mogą charakteryzować się podobną mobilnością w żelu poliakrylamidowym. Dlatego 1 prążek niekoniecznie musi reprezentować 1 gatunek [20] i 1 gatunek bakterii może również przyczynić się do powstania kilku prążków z powodu kilku genów 16S rRNA z niewiele różniącymi się sekwencjami [52].

DGGE/TGGE były używane do badania różnorodności bakterii i grzybów w ryzosferze [77, 78], w glebie poddanej działaniu antropogenicznych chemikaliów [93], w glebach uprawnych [11, 89], pastwiskowych [88] oraz leśnych [2]. Znane są również badania populacji bakterii w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi [69, 91], herbicydami [76] oraz fungicydami [4]. Analiza populacji – poziomu genetycznego odcisku palca, pochodzącego ze wzoru prążków otrzymanego techniką DGGE lub TGGE jest analizowana w badaniach różnorodności w oparciu o liczbę prążków, intensywność DNA prążków oraz podobieństwo między obiektami. Specyficzne prążki DGGE/TGGE mogą być wycięte z żelu i poddane re-amplifikacji i sekwencjonowaniu lub przetransponowaniu na membranę i hybrydyzacji ze specyficznymi starterami, aby uzyskać więcej informacji z zakresu strukturalnej i funkcjonalnej różnorodności [82]. Wykorzystując sekwencjonowanie prążków można otrzymać informacje o specyficznych mikroorganizmach występujących w populacji. Nicolaisen i Ramsing [61] za-

stosowali technikę DGGE do badań różnorodności bakterii nitryfikacyjnych występujących w osadach ściekowych, natomiast Kuroi i wsp. [42] w badaniach różnorodności tej grupy bakterii w glebach zanieczyszczonych olejem z przemysłu rafineryjnego. Znane są również badania genów takich jak monooxygenaza metanowa prowadzone z wykorzystaniem techniki PCR-DGGE [37] oraz wykorzystujące tę metodę do monitorowania zmian w składzie populacji bakterii metanogennych w glebie uprawnej [92]. Badania Sakurai i wsp. [72] obejmowały ocenę zmian populacji bakterii proteolitycznych pod wpływem nawożenia organicznego i mineralnego w ryzosferze, z wykorzystaniem analizy genów kodujących aktywność proteolityczną (*apr* i *npr*) techniką elektroforezy w gradiencie żelu denaturującego.

Badania z tego zakresu dostarczają informacji o różnorodności specyficznych grup mikroorganizmów wchodzących w skład populacji oraz definiowaniu ich funkcji, takich jak: zanieczyszczenia czy degradacja [36].

Inną techniką opartą na rozdziale elektroforetycznym prążków o różnych sekwencjach DNA jest polimorfizm konformacji jednoniciowych łańcuchów DNA (SSCP – single strand conformation polymorphism). Podobnie jak technika DGGE/TGGE, technika ta była pierwotnie wykorzystywana do detekcji mutacji punktowych w DNA. Pojedynczo-skręcone DNA jest rozdzielane w żelu poliakrylamidowym w oparciu o różną mobilność spowodowaną przez ich pofałdowaną strukturę II-rzędową [45].

Kiedy fragmenty DNA są tego samego rozmiaru i denaturanty nie są obecne, pofałdowanie i mobilność będą zależały od sekwencji DNA. SSCP ma te same ograniczenia co DGGE. Również pojedynczo-skręcone DNA może formować więcej niż 1 stabilną konformację. Dlatego 1 sekwencja może być prezentowana przez więcej niż 1 prążek widoczny na żelu [83]. Jakkolwiek stosowanie klamr GC nie jest ważne w tej technice [79]. SSCP było używane do pomiaru zjawiska sukcesji populacji bakterii [67], różnorodności populacji ryzosfery [74], zmian w populacji bakterii w beztlenowych bioreaktorach [100] oraz w badaniach nad wpływem uprawy gleby stepowej na populacje grzybów [50].

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – restriction fragment length polymorphism), znany także jako analiza restrykcyjna powielonego rDNA (ARDRA) jest inną techniką używaną do badań różnorodności mikrobiologicznej opartej o polimorfizm DNA. Istotą metody jest amplifikacja (PCR) regionu DNA o znanej i specyficznej dla danego gatunku sekwencji nukleotydowej. Jako cel molekularny wybierane są najczęściej geny specyficzne dla danego gatunku drobnoustroju. Następnie produkty reakcji PCR

poddawane są trawieniu enzymami restrykcyjnymi, dobranymi w oparciu o znajomość sekwencji powielonego DNA. Dzięki temu można wykryć charakterystyczny dla badanego drobnoustroju polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), wykrywany metodą elektroforezy żelowej [41]. Technika RFLP była używana do badania struktury populacji mikroorganizmów. Metoda ta jest również używana do detekcji strukturalnych zmian w populacjach mikroorganizmów, ale nie pomiarów różnorodności lub detekcji specyficznych grup filogenetycznych [48].

Wzór prążków w zróżnicowanych populacjach staje się zbyt skomplikowany do analizy z użyciem tej techniki, ponieważ 1 gatunek może mieć od 1 do 4 fragmentów restrykcyjnych. Być może użycie 6-zasadowych enzymów tnących przyczyni się do zmniejszenia liczby fragmentów restrykcyjnych dla 1 gatunku. Wtedy wykorzystanie tej techniki w badaniach środowiskowych mogłoby się bardziej rozwinąć [36].

Polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (T-RFLP – terminal restriction fragment length polymorphism) jest techniką posiadającą podobne ograniczenia jak technika RFLP. Zgodnie z regułą RFLP z wyjątkiem, że 1 starter PCR jest znakowany barwnikiem fluorescencyjnym. Pozwala na detekcję tylko wyznakowanych terminalnych fragmentów restrykcyjnych [48]. Ten uproszczony wzór prążków pozwala na kompleksową analizę populacji, jak również uzyskanie informacji o różnorodności każdego widzialnego prążka, reprezentującego pojedynczą taksonomiczną jednostkę lub rybotyp [83]. Wzór prążków może być użyty do pomiaru bogactwa i różnorodności gatunków, jak też podobieństwa pomiędzy próbkami [48]. Procedura ta może być zautomatyzowana i pozwala pobrać i analizować dużą liczbę próbek glebowych. Jest to metoda wysoce powtarzalna, a jej różnorodność (czułość) wzrasta w zależności od zastosowanej polimerazy. Ograniczeniem techniki T-RFLP jest nie tylko ekstrakcja DNA i PCR, ale także wybór uniwersalnych starterów [64]. Żaden z obecnie dostępnych uniwersalnych zestawów starterów nie jest w stanie zamplifikować wszystkich sekwencji eukariotycznych i bakteryjnych. Ponadto startery te oparte są na istniejących bazach danych 16S rRNA i 18S rRNA i ITS, które pochodzą z mikroorganizmów, które można hodować. Dlatego mogą nie być odpowiednie w odniesieniu do różnorodności mikroorganizmów z próbki środowiskowej [48]. Różne enzymy mogą produkować różne wzory – „odciski palca” (fingerprint) [14]. Dlatego też ważne jest użycie przynajmniej dwóch lub czterech różnych enzymów restrykcyjnych [83].

T-RFLP, jak każda metoda oparta o technikę PCR może być trudna do określenia rzeczywistej różnorodności z powodu detekcji tylko dominujących gatun-

ków, ze względu na dużą ilość dostępnego DNA. Ponadto różne gatunki mogą mieć różną liczbę kopii genu i to może powodować pewne zaburzenia wyników. Pomimo tych ograniczeń, wielu badaczy wyraża opinię, że wystandaryzowana metoda T-RFLP może być użytecznym narzędziem do badań mikrobiologicznej różnorodności w środowisku [64].

Technika ta była wykorzystywana do badania zmian w populacjach bakterii [51] oraz detekcji i monitorowania populacji i szacowania różnorodności AMF w ryzosferze [84] oraz glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi [28].

Podobnie jak techniki RFLP i T-RFLP, również analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych (RISA – ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA – automated ribosomal intergenic spacer analysis) dostarczają genetycznych odcisków palca populacji mikroorganizmów opartych o badania rybosomów. W technikach tych IGS (intergenic spacer) – region pomiędzy podjednostkami rybosomu 16S i 23S jest amplifikowany techniką PCR, denaturowany i rozdzielany w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturacji. Ten region może kodować tRNAs i jest użyteczny podczas różnicowania gatunków bakterii [18]. W RISA sekwencje polimorfizmu są wykrywane z użyciem barwienia srebrem, podczas gdy w ARISA końcowy starter jest znakowany fluorescencyjnie i wykrywany automatycznie [36].

Obie techniki dostarczają wysoce powtarzalnych profili populacji bakteryjnych, ale RISA wymaga dużej ilości DNA i jest bardziej czasochłonna, a barwienie srebrem jest mało czułe [18]. Technika ta – RISA była wykorzystywana do porównywania różnorodności mikrobiologicznej gleb, ryzosfery roślin i gleb zanieczyszczonych oraz inokulowanych [36]. Badania Thakuria i wsp. [81] wykazały, że liczba rybotypów bakterii i grzybów wykrytych w glebach techniką ARISA zależała od typu użytkowania badanej gleby (użytkowanie pastwiskowe, intensywne uprawy) oraz zastosowanej metody ekstrakcji DNA.

Wiele organizmów, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych zawiera wysoce powtarzalne krótkie sekwencje DNA, zwane regionami mikrosatelitarnymi (microsatellite regions, highly repeated sequence characterization), których długość waha się od 1 do 10 par zasad powtarzających się wielokrotnie w ich genomach [83]. W zależności od stopnia ewolucji sekwencje te mogą być wykorzystywane w diagnostyce i pozwalają rozróżnić gatunki. Wysoce powtarzalne sekwencje są także znane jako regiony mikrosatelitarne i mogą być wykorzystywane w identyfikacji grzybów mikoryzowych [49].

Wykorzystanie tej metody do badań mikrobiologicznej różnorodności może być ograniczone w zależ-



ności od populacji, jakkolwiek może być użyteczne w wytwarzaniu sond do detekcji zmian w populacjach mikroorganizmów spowodowanych zmianami środowiskowymi. Innym ograniczeniem tej metody jest fakt, że regiony sekwencji mikrosatelitarnych wymagają użycia odpowiednich starterów [36].

## 5. Perspektywy na przyszłość

Badania z zakresu różnorodności mikroorganizmów środowiska glebowego są ważne nie tylko dla podstawowych badań naukowych, ale także z powodu zrozumienia powiązań pomiędzy różnorodnością oraz funkcją i strukturą populacji.

Czynniki antropogeniczne – zanieczyszczenie, rolnictwo, zastosowanie chemikaliów mogą mieć niekorzystny wpływ na różnorodność biologiczną i funkcjonowanie ekosystemu. Na przykład Buckley i Schmidt [6] stwierdzili istotnie większą zawartość 16S rRNA dla wszystkich badanych grup mikroorganizmów w glebach nigdy nie uprawianych w porównaniu do gleb uprawianych rolniczo. Sugeruje to obniżenie biomasy bakterii oraz ich aktywności w glebach uprawnych. Jakkolwiek nie wiadomo jak obniżenie takie wpływa na funkcjonowanie ekosystemu. Dla stabilności ekosystemu ważne jest żeby powiązać różnorodność mikroorganizmów i ich funkcje w środowisku glebowym.

Wiedza dotycząca różnorodności mikroorganizmów i funkcji w glebie jest ograniczona z powodu taksonomicznych i metodologicznych czynników limitujących, związanych z badaniami tych organizmów. Chociaż metody badań różnorodności ilościowej, taksonomicznej, strukturalnej są polepszane zarówno dla bakterii, jak i grzybów, jednak nadal nie jest jasne powiązanie różnorodności z funkcją. Różnorodność bakterii i grzybów powoduje poprawę jakości gleby i wzrost jej produktywności. Mikroorganizmy te spełniają bardzo ważną rolę w obiegu pierwiastków odżywczych i zdrowotności roślin. Dodatkowo populacje mikroorganizmów ryzosferycznych podnoszą zdrowotność roślin i mogą pomóc roślinom radzić sobie ze stresem biotycznym i abiotycznym, takim jak patogeny czy zanieczyszczenie gleby [36].

Obecnie dostępne badania i wiedza z zakresu mikrobiologicznej różnorodności gleby napotyka ograniczenia taksonomiczne i metodologiczne. Mikrobiolodzy środowiskowi mają trudne zadanie, aby zdefiniować, zidentyfikować i połączyć mikroorganizmy z funkcją pełnioną w środowisku. Praca przedstawia wybrane metody biochemiczne i molekularne wykorzystywane do badań różnorodności populacji glebowych mikroorganizmów.

## Piśmiennictwo

- Acosta-Martinez V., Acosta-Mercado D., Sotomayor-Ramirez D., Cruz-Rodriguez L.: Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils. *Appl. Soil Ecol.* **38**, 249–260 (2008)
- Agnelli A., Ascher J., Corti G., Ceccherini M.T.: Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 859–868 (2004)
- Akmal M., Jianming X., Zhaojun L., Haizhen W., Huaiying Y.: Effects of lead and cadmium nitrate on biomass and substrate utilization pattern of soil microbial communities. *Chemosph.* **60**, 508–514 (2005)
- Bending G.D., Rodriguez-Cruz M.S., Lincoln S.D.: Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosph.* **69**, 82–88 (2007)
- Bossio D.A., Scow K.M., Gunapala N., Graham K.J.: Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipids fatty acid profiles. *Microb. Ecol.* **36**, 1–12 (1998)
- Buckley D.H., Schmidt T.M.: The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microb. Ecol.* **42**, 11–21 (2001)
- Call B.R., Borucki M.K., Loge F.J.: Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J. Microbiol. Methods*, **53**, 235–243 (2003)
- Cho J.C., Tiedje J.M.: Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3677–3682 (2001)
- Choi K.H., Dobbs F.C.: Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *J. Microbiol. Methods*, **36**, 203–213 (1999)
- Classen A.T., Boyle S.I., Haskins K.E., Overby S.T., Hart S.C.: Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**, 319–328 (2003)
- Crecchio C., Gelsomino A., Ambrosoli R., Minati J.L., Ruggiero P.: Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1873–1883 (2004)
- Daniel R.: The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 199–204 (2004)
- Derry A.M., Staddon W.J., Trevors J.T.: Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole-carbon-source-utilization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 571–578 (1998)
- Dunbar J., Ticknor L.O., Kuske C.R.: Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2943–2950 (2000)
- Eickhorst T., Tippkötter R.: Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and micropedological methods. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 1284–1293 (2008)
- El Fantroussi S., Verschuere L., Verstraete W., Top E.M.: Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 982–988 (1999)

17. Fang C., Radosevich M., Fuhrmann J.J.: Characterization of rhizosphere microbial community in five similar grass species using FAME and BIOLOG analyses. *Soil. Biol. Biochem.* **33**, 679–682 (2001)
18. Fisher M.M., Triplett E.W.: Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4630–4636 (1999)
19. Garland J.L., Mills A.L.: Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351–2359 (1991)
20. Gelsomino A., Keijzer-Wolters A.C., Cacco G., van Elsas J.D.: Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*, **38**, 1–15 (1999)
21. Giller K.E., Beare M.H., Lavelle P., Izac A.M.N., Swift M.J.: Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* **6**, 3–16 (1997)
22. Graham J.H., Hodge N.C., Morton J.B.: Fatty acid methyl ester profiles for characterization of Glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 58–64 (1995)
23. Grayston S.J., Wang S., Campbell C.D., Edwards A.C.: Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 369–378 (1998)
24. Green E.A., Kay J.G., Jaber K., Stehmeier L.G., Voordouw G.: Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5282–5289 (2000)
25. Greene E.A., Voordouw G.: Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *J. Microbiol. Methods*, **53**, 211–219 (2003)
26. Griffiths B.S., Ritz K., Ebbelwhite N., Dobson G.: Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 145–153 (1999)
27. Gupta V.V.S.R., Dick R.P., Coleman D.C.: Functional microbial ecology: Molecular approaches to microbial ecology and microbial habitats. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 1269–1271 (2008)
28. Hartmann M., Frey B., Kölliker R., Widmer F.: Semi-automated analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *J. Microbiol. Methods*, **61**, 349–360 (2005)
29. Henson J.M., French R.: The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 81–109 (1993)
30. Hill G.T., Mitkowski N.A., Aldrich-Wolfe L., Emele L.R., Jurkonie D.D., Ficke A., Maldonado-Ramirez S., Lynch S.T., Nelson E.B.: Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.* **15**, 25–36 (2000)
31. Ibekwe A.M., Kennedy A.C.: Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**, 151–163 (1998)
32. Insam H., Goberna M.: Use of Biolog for the community level physiological profiling (CLPP) of environmental samples. *Mol. Microb. Ecol. Manual*, **4**, 853–860 (2004)
33. Kamaludeen S.P.B., Megharaj M., Naidu R., Singleton I., Juhasz A.L., Hawke B.G., Sethunathan N.: Microbial activity and phospholipids fatty acid pattern in long-term tannery waste-contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **56**, 302–310 (2003)
34. Karczmarczyk M., Bartoszcze M.: Mikromacierze DNA – nowe narzędzie w wykrywaniu czynników biologicznych. *Przegl. Epidemiol.* **60**, 803–811 (2006)
35. Kelly J.J., Haggblom M., Tate III R.L.: Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 1445–1465 (1999)
36. Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Kliro-nomos J.N., Lee H., Trevors J.T.: Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods*, **58**, 169–188 (2004)
37. Knief C., Lipski A., Dunfield P.F.: Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6703–6714 (2003)
38. Kowalchuk G.: Fungal community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Mol. Microb. Ecol. Manual*, **3**, 1–16 (1999)
39. Kozdrój J., van Elsas J.D.: Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Appl. Soil Ecol.* **17**, 31–42 (2001)
40. Kozdrój J.: Współczesna ocena różnorodności mikroorganizmów w glebie. *Acta Agr. Et Sil.* **92**, 5–28 (2004)
41. Krawczyk B.: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Microbiol.* **46**, 367–378 (2007)
42. Kurola J., Salkinoja-Salonen M., Aarnio T., Hulman J., Romantschuk M.: Activity, diversity and population size of ammonia-oxidising bacteria in oil-contaminated landfarming soil. *FEMS Microbiol. Let.* **250**, 33–38 (2005)
43. Larkin R.P., Honeycutt C.W., Griffin T.S.: Effect of swine and dairy manure amendments on microbial communities in three soils as influenced by environmental conditions. *Biol. Fertil. Soils*, **43**, 51–61 (2006)
44. Leckie S.E.: Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *For. Ecol. Manag.* **220**, 88–106 (2005)
45. Lee D.H., Zo Y.G., Kim S.J.: Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3112–3120 (1996)
46. Li Y., Dick W.A., Tuovinen O.H.: Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms – a review. *Biol. Fertil. Soils*, **39**, 301–311 (2004)
47. Liang Z., Drijber R.A., Lee D.J., Dwiekat I.M., Harris S.D., Wedin D.A.: A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 956–966 (2008)
48. Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J.: Characterization of microbial diversity by denaturing terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4516–4522 (1997)
49. Longato S., Bonfante P.: Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol. Res.* **101**, 425–432 (1997)
50. Lowell J.L., Klein D.A.: Comparative single-strand conformation polymorphism (SSCP) and microscopy-based analysis of nitrogen cultivation interactive effects on the fungal community of a semiarid steppe soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**, 85–92 (2001)
51. Lukow T., Dunfield P.F., Liesack W.: Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**, 241–247 (2000)

52. Maarit-Niemi R., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K.: Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods*, **45**, 155–165 (2001)
53. MacNaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y.J., White D.C.: Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3566–3574 (1999)
54. Muyzer G., Hottenträger S., Teske A., Wawer C.: Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Mol. Microb. Ecol. Manual*, **3**, 1–23 (1996)
55. Muyzer G., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127–141 (1999)
56. Muyzer G., Waal E.C.D., Uitterlinden A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700 (1993)
57. Muyzer G.: DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 317–322 (1999)
58. Nakatsu C.H., Torsvik V., Ovreas L.: Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **64**, 1382–1388 (2000)
59. Nakatsu C.H.: Soil Microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **71**, 562–571 (2007)
60. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G.: Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* **54**, 655–670 (2003)
61. Nicolaisen M.H., Ramsing N.B.: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **50**, 189–203 (2002)
62. Nusslein K., Tiedje J.M.: Soil bacteria community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3622–3626 (1999)
63. Ogram A.: Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 1499–1504 (2000)
64. Osborn A.M., Moore E.R.B., Timmis K.N.: An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**, 39–50 (2000)
65. Ovreas L.: Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecol. Lett.* **3**, 236–251 (2000)
66. Pace N.R.: Microbial ecology and diversity. *ASM News*, **65**, 328–333 (1999)
67. Peters S., Koschinsky S., Schwieger F., Tebbe C.C.: Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single – strand – conformation – polymorphism – based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 930–936 (2000)
68. Prosser J.I.: Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant Soil*, **244**, 9–17 (2002)
69. Renella G., Mench M., Gelsomino A., Landi L., Nannipieri P.: Functional diversity and microbial community structure in soils amended with biometallic sludges. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 1498–1506 (2005)
70. Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T.M., Simonet P.: Extraction of DNA from soil. *Europ. J. Soil Biol.* **39**, 183–190 (2003)
71. Roling W.F.M., van-Breukelen B.M., Braster M., Goelton M.T., Groen J.: Analysis of microbial communities in a landfill leachate polluted aquifer using a new method for anaerobic physiological profiling and 16S rDNA based fingerprinting. *Microb. Ecol.* **40**, 177–188 (2000)
72. Sakurai M., Suzuki K., Onodera M., Spinano T., Osaki M.: Analysis of bacterial communities in soil by PCR-DGGE targeting protease genes. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 2777–2784 (2007)
73. Saleh-Lakha S., Miller M., Campbell R.G., Schneider K., Elahimanesh P., Hart M.M., Trevors J.T.: Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *J. Microbiol. Methods*, **63**, 1–19 (2005)
74. Schmalenberger A., Schwieger F., Tebbe C.C.: Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3557–3563 (2001)
75. Schramm A., Larsen L.H., Revsbech N.P., Ramsing N.B., Amann R., Schleifer K.H.: Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4641–4647 (1996)
76. Seghers D., Verthe K., Reheul D., Bulcke R., Siciliano S.D., Verstraete W., Top E.M.: Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**, 139–146 (2003)
77. Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot R., Heuer H., Berg G.: Bula and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4742–4751 (2001)
78. Song Y.N., Marschner P., Li L., Bao G., Sun J.H., Zhang F.S.: Community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the rhizosphere of intercropped wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), faba bean (*Vicia faba* L.). *Biol. Fertil. Soils*, **44**, 307–314 (2007)
79. Stach J.E.M., Bathe S., Clapp J.P., Burns R.G.: PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**, 139–151 (2001)
80. Tabacchioni S., Chiarini L., Bevivino A., Cantale C., Dalmastrì C.: Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microb. Ecol.* **40**, 169–176 (2000)
81. Thakuria D., Schmidt O., Siurtain M.M., Egan D., Doohan F.M.: Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 1390–1403 (2008)
82. Theron J., Cloete T.E.: Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**, 37–57 (2000)
83. Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K., Marsh L., Flynn S.J.: Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 109–122 (1999)
84. Tonin C., Vandenkoornhuysen P., Joner E.J., Straczek J., Leyval C.: Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza*, **10**, 161–168 (2001)

85. Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L.: High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782–787 (1990)
86. Torsvik V., Ovreas L.: Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 240–245 (2002)
87. Torsvik V., Sorheim R., Goksoyr J.: Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 170–178 (1996)
88. Wakelin S.A., Gregg A.L., Simpson R.J., Li G.D., Riley I.T., McKay A.C.: Pasture management clearly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria. *Pedobiol.* **52**, 237–251 (2009)
89. Wakelin S.A., Macdonald L.M., Rogers S.L., Gregg A.L., Bolger T.P., Baldock J.A.: Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 803–813 (2008)
90. Wall D.H., Virginia R.A.: Controls on soil biodiversity: insights from extreme environments. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 137–150 (1999)
91. Wang Y.P., Li Q.B., Shi J.Y., Lin Q., Chen X.C., Wu W., Chen Y.X.: Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and non-accumulator. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 1167–1177 (2008)
92. Watanabe T., Kimura M., Asakawa S.: Community structure of methanogenic arche in paddy field soil under double cropping (rice-wheat). *Soil Biol. Biochem.* **38**, 1264–1274 (2006)
93. Whiteley A.S., Bailey M.J.: Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2400–2407 (2000)
94. Yao H., He Z., Wilson M.J., Campbell C.D.: Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microb. Ecol.* **40**, 223–237 (2000)
95. Zak J.C., Willig M.R., Moorhead D.L., Wildman H.G.: Accelerated paper: functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* **26**, 1101–1108 (1994)
96. Zhang Y.L., Dai J.L., Wang R.Q., Zhang J.: Effects of long-term sewage irrigation on agricultural soil microbial structural and functional characterizations in Shandong, China. *Eur. J. Soil Biol.* **44**, 84–91 (2008)
97. Zhou D.M., Cang L., Alshawabkeh A.N., Wang Y.J., Hao X.Z.: Pilot-scale electrokinetic treatment of a Cu contaminated red soil. *Chemosph.* **63**, 964–971 (2006)
98. Zhou J., Thompson D.K.: Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 204–207 (2002)
99. Zhou J.: Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 288–294 (2003)
100. Zumstein E., Moletta R., Godon J.J.: Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* **2**, 69–78 (2000)