

Jiho česká univerzita v českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

Identifikace denitrifikačních genů v kyselých pěsticích Šumavy: Využití metagenomického přístupu se zaměřením na archaea a plísně houby (mikromycety)

Lucie Jonátová

Vedoucí práce: Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

české Budějovice 2010

Jonátová L. (2010): Identifikace denitrifikačních genů v kyselých půdách Šumavy: Využití metagenomického přístupu se zaměřením na archaea a půdní houby (mikromycety).

[Identification of denitrification genes in the acid soil in Šumava Mountains: Application of metagenomic approach with focusing on archaea and soil micromycetes. Bachelor thesis] 21 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tato práce slouží jako grantová žádost o financování projektu, jehož cílem je identifikovat denitrifikační geny na Šumavě se zaměřením na archaea a mikromycety.

Annotation:

This thesis serves as the grant application for project funding the target of which is identification of denitrification genes in Šumava Mountains with aiming archaea and micromycetes.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím citované literatury. V souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2010

Lucie Jonátová

Abstrakt:

Denitrifikace je důležitý proces, který udržuje cyklus dusíku v chodu. Za hlavní zprostředkovatele denitrifikace v půdě byly v minulosti pokládány bakterie, dnes už je ale schopnost denitrifikovat zaznamenána i u některých eukaryot a archaeí. Pokud je denitrifikace prováděna archaei nebo mikromycetami, jejím konečným produktem není N_2 , ale N_2O , což je tzv. skleníkový plyn přispívající k závažným globálním klimatickým změnám a poškození stratosférického ozónu. Denitrifikátoři jsou součástí komplexního společenství dané lokality a jsou přizpůsobeni dlouhodobě přetrvávajícím podmínkám. Navrhovaná metagenomická analýza vzorků odebraných přímo z přirozeného prostředí není závislá na předchozí laboratorní kultivaci, umožňuje tedy identifikovat širokou škálu mikroorganismů a jejich genetickou výbavu. Prostřednictvím metagenomického přístupu lze nalézt nové geny v již známých mikroorganismech, ale i známé geny v nových druzích nebo skupinách mikroorganismů.

Abstract:

Denitrification is an important process that keeps the nitrogen cycle running. Initially bacteria were considered to be mainly responsible for denitrification in soil, but today the ability to denitrify has been noticed also in some eukaryotes and Archaea. If the denitrification is carried out by Archaea or micromycetes, its final product is not N_2 but N_2O , a so called greenhouse gas which contributes to serious global climatic changes and damages the stratospheric ozone. Denitrifiers are part of a comprehensive community of a given locality and are adapted to long-term persisting conditions. The proposed metagenomic analysis of samples taken directly from the natural environment is not dependant on preceding laboratory cultivation. This enables the identification of a wide variety of microorganisms and their genetic toolkits. It is not only possible to find new genes in an already known organism but also to find known genes in entirely new species or groups of microorganisms through a metagenomic approach.

Pod kování:

V první řadě bych ráda podkovala mému vedoucímu práce Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. za odbornou pomoc, bezmeznou trpělivost a ochotu poskytovat cenné rady, a samozřejmě také děkuji za podporu mé rodině.

Obsah:

Název projektu:.....	6
1 Shrnutí současných znalostí.....	6
1.1 Denitrifikace v kyselých pídách Šumavy.....	6
1.2 Mikrobiální společenstva kyselých píd.....	7
1.3 Denitrifikační geny archaeí a mikromycet.....	7
1.4 Metagenomický přístup.....	8
1.4.1 454 sekvenování, Genome Sequencer™ Roche.....	10
1.5 Běžné molekulární metody.....	11
2 Shrnutí vstupních podmínek.....	12
3 Cíle projektu.....	13
4 Hypotéza.....	13
5 Návrh experimentu.....	13
5.1 Odběr vzorků.....	13
5.2 Izolace DNA a analýza přístrojem Genome Sequencer™ ROCHE.....	14
5.2.1 Postup práce pro přípravu vzorků k pyrosekvenaci.....	14
5.2.2 Vyhodnocení dat.....	15
5.2.3 časový plán.....	16
5.2.4 Finanční náklady projektu.....	16
6 Očekávané výstupy projektu.....	17
7 Literatura.....	18

Název projektu:

Identifikace denitrifikačních genů v kyselých půdách Šumavy: Využití metagenomického přístupu se zaměřením na archaea a půdní houby (mikromycety).

1 Shrnutí souasných znalostí

1.1 Denitrifikace v kyselých půdách Šumavy

Rychlost denitrifikace v kyselých půdách je ve srovnání s půdami neutrálními i alkalickými celkově nižší, což souvisí s mírou aktivity denitrifikující komunity mikroorganismů v dané lokalitě (Šimek et al. 2002, Parkin et al. 1985). Knowles (1982) stanovil optimální pH pro průběh denitrifikace okolo 7 až 8, denitrifikátoři se však pravděpodobně dokážou adaptovat na pH půdy, ve které se nacházejí (Šimek et al. 2002, Parkin et al. 1985), a podle toho se také posouvá optimální hodnota pH pro denitrifikaci na konkrétním stanovišti.

Půda šumavských lesů je acidifikovaná vlivem výrazných síranových a dusíkatých depozic během minulého století. Zároveň je na Šumavě rozšířen smrkový porost, jehož opad je pomalu dekomponován a přispívá ke kyselému charakteru půdy. Denitrifikace patří mezi hlavní biotické mechanismy ztráty dusíku z půdy, zahrnuje postupnou redukci dusíkatých sloučenin (NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O , N_2) v anaerobních podmínkách. Fixovaný dusík se tak vrací zpět do atmosféry (Philippot 2002, Zumft 1997). Výzkumy ukazují, že v kyselých půdách bývá denitrifikační cyklus nekompletní a převažuje vznik N_2O nad N_2 (Cabello et al. 2004, Yoshimatsu et al. 2000, Zumft 1997, Šimek et al. 2002). Extrémní podmínky, jako je nízké pH acidifikovaných půd, nemusí vyhovovat většině bakteriálních denitrifikátorů, což může vést k rozvoji půdních mikromycet a acidofilních archaeí jako dominujících společenstev.

Většina denitrifikujících mikroorganismů je laboratorně nekultivovatelná. To je důvod pro se studium denitrifikace v posledních 10 letech zaměřuje na izolaci DNA z půdy, následnou kvantifikaci genů kódujících specifické reductázy pro katalýzu jednotlivých denitrifikačních kroků, a na diverzitu genů těchto enzymů. Klasické

molekulárn biologické metody studia diverzity a kvantity mikrobiálních spole enstev (DGGE, T-RFLP, qPCR) jsou však stále limitovány výb rem vhodných primer , p íp. restrikních enzym .

1.2 Mikrobiální spole enstva kyselých p d

V extrémních podmínkách, jako je nízké pH acidifikovaných šumavských p d, m že být aktivita denitrifikačních bakterií výrazn potla ena. Takovéto podmínky mohou naopak vyhovovat archaeím a mikromycetám, které mohou tvo it dominantní ást mikrobiální biomasy temperátních p d (Laughlin et al. 2002). Archaea ani mikromycety však nejsou schopny kompletního denitrifikačního procesu a finálním produktem z stává N₂O (Cabello et al. 2004, Shoun et al. 1992). D vodem je nep ítomnost N₂O reduktázy kódované genem *nos* (Cabello et al. 2004). Dominantní zastoupení denitrifikujících mikromycet a archaeí v kyselých p dách m že vést k vyššímu uvol ování N₂O do atmosféry.

1.3 Denitrifika ní geny archaeí a mikromycet

Studie mikrobiálních spole enstev nazna ují, že existují významné rozdíly ve struktu e a regulaci denitrifikačních enzym bakterií vs. archaeí a mikromycet (Cabello et al. 2004), a to i p es jisté sekven ní homologie a podobnost regulačních element denitrifikačních proces (Zumft 1997). Výzkum založený na podobnostech v kódujících sekvencích odhalil, že denitrifikující archaea obsahují homolog bakteriálního genu pro nitrit reduktázu *nirK* (obsahuje m v aktivním centru) nebo *nirS* (obsahuje cytochrom cd₁ v aktivním centru), ale gen homologní s genem *nor* (pro NO reduktázu) nebyl u v tšiny archaeí identifikován, a koliv p ítomnost NO reduktázy zaznamenána byla (Cabello et al. 2004). Gen *nirK*, nalezený u mikromycet, je na základ n kterých homologií ur en jako eukaryotní ortholog bakteriálního genu *nirK*. To by mohlo znamenat, že eukaryotní denitrifika ní systém má stejný p vod jako systém bakteriální (Kim et al. 2009). Výraznou odlišností mikromycet od bakteriálního systému je NO reduktáza z rodiny cytochrom

P-450 (Yoshimatsu et al. 2000), která je zodpovědná za redukci NO na N₂O. Protože mikromycety neobsahují reduktázu oxidu dusného (Zumft 1997), která by dále redukovala N₂O na N₂, stává se N₂O konečným produktem jejich denitrifikace. Redukce NO během denitrifikace prováděné houbami není přímo zapojena do respiračního cyklu, ale spíše funguje jako zásobárna elektronů v anaerobních podmínkách a jako detoxifikační cesta pro nebezpečný oxid dusnatý (Nakahara et al. 1993). Účast cytochromu P-450 nebyla u bakterií zaznamenána (Takaya and Shoun 2000). Enzymy zapojené do denitrifikace u mikromycet jsou lokalizovány na mitochondriích a jsou tedy spojeny se syntézou ATP za anaerobních podmínek, podobně jako denitrifikační enzymy na cytoplazmatické membráně u bakterií. To vzbudilo zájem v oblasti evoluční biologie o vztah mezi eukaryotickými mitochondriemi a denitrifikujícími bakteriemi (Kobayashi et al. 1996). Zatím ale ještě není známo, jak cytochrom P-450 interaguje s organelami jako jsou mitochondrie. Takaya and Shoun (2000) provedli pokus s delecí genu pro NO reduktázu a fúzovali jeho promotor s operonem *lacZ*. Za denitrifikačních podmínek, což je limitace kyslíkem a dostatek substrátu (NO), došlo k produkci β-galaktosidázy. To je důkaz, že promotor spustí transkripci genu v anoxických podmínkách a s dostatkem substrátového materiálu.

Dále u pěstovaných v tšiny mikromycet nebyla pozorována redukce NO₃⁻ a jako substrát tedy využívají hlavně NO₂⁻. Výjimkou jsou vláknité houby, například *Fusarium oxysporum*, obsahující enzym NADH-Nar kódovaný genem *niaD*, díky kterému jsou schopny redukovat i NO₃⁻. Limitace kyslíkem a dostupnost nitrátů podporuje denitrifikaci tím, že dojde k indukci genu *niaD*. Právě tento mechanismus by mohl mikromycety zvýhodňovat v takovýchto podmínkách, protože jsou tak schopny produkovat energii (Fujii and Takaya 2008).

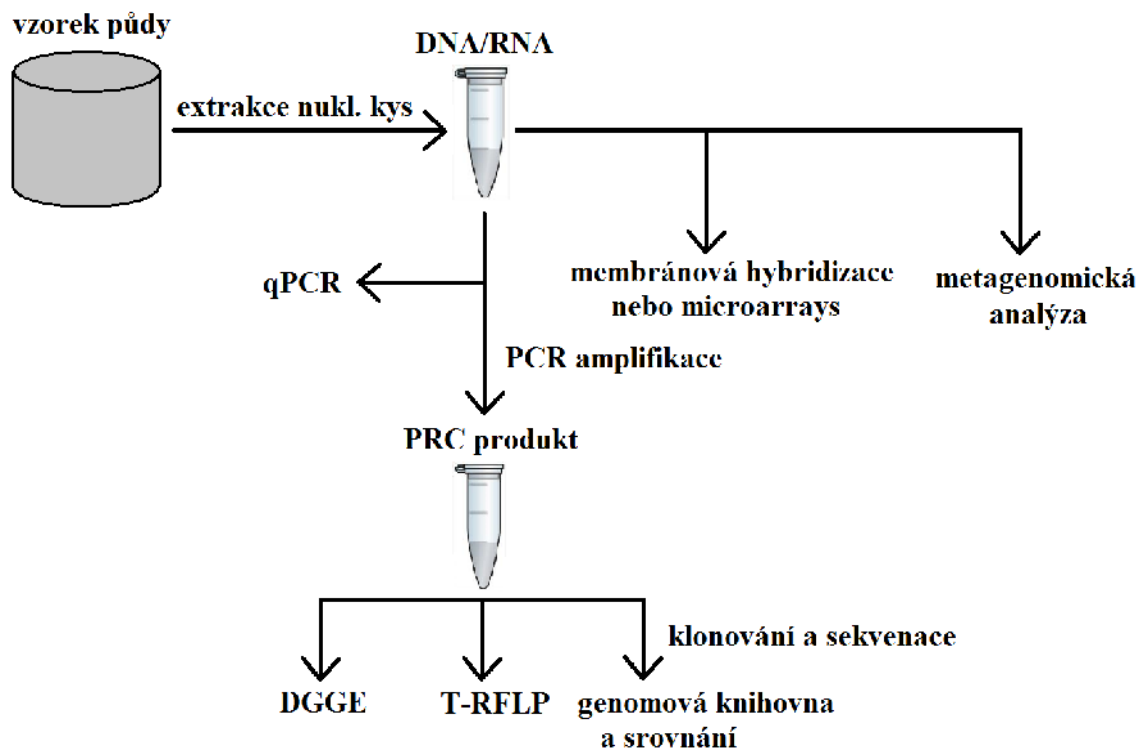
1.4 Metagenomický přístup

Metagenomická analýza je metoda nezávislá na schopnosti laboratorně kultivovat zkoumané mikroorganismy. Jedná se o metodu přímé sekvenace smíšených nukleových kyselin různých mikroorganismů izolovaných ze vzorků odebraných v přirozeném prostředí (Handelsman 2004). K práci s genetickou informací nemusíme při metagenomickém přístupu znát předem požadovanou sekvenci analyzovaných genů, jako je tomu u metod

založených na PCR amplifikaci (Obr. 1). Mnoho dosud běžně používaných metod je založeno na analýzách čistých kultur, které jsou idealizovaným stavem společenstev. Analýzy takových vzorků ale nedávají skutečné informace o tom, jak vypadá fyziologie mikrobiálních společenstev, nebo o jejich biochemických funkcích v přirozených podmínkách (Francis et al. 2007, Treusch et al. 2005).

Metagenomika umožňuje analyzovat identitu i funkční schopnosti nekultivovatelné většiny mikroorganismů, a díky tomu jsme schopni porozumět fungování mikrobiálních společenstev na úrovni ekosystému za daných podmínek (Raes et al. 2007). Součástí analýzy metagenomu je sestavení knihovny. Analýza skladby společenstva a fylogenetických vztahů je prováděna na základě sekvenace izolované 16S rRNA u analogické eukaryotní 18S rRNA (Guazzaroni et al. 2009). Naopak funkční analýza je prováděna skríníngem exprimovaných genů (Vakhlu et al. 2008). Funkční skladba je určena porovnáním ORFs (open reading frames) s BLAST databází, což je vhodný nástroj ke srovnávání vzorků získaných z přirozeného prostředí s podobnými i odlišnými ekologickými faktory, které ovlivňují vlastnosti mikrobiálních společenstev (Raes et al. 2007).

Při metatranskriptomickém přístupu je izolována mRNA. Tímto způsobem analýzy lze získat informace o právě exprimovaných genech, tj. o funkční diverzitě mikrobiální komunity v daném habitatu. Transkriptom je ovlivněn okolními podmínkami a může se v něm velmi lišit. Sekvenací metagenomu zjistíme přítomnost genů, ale to, zda jsou tyto geny aktivní je určováno metatranskriptomickou analýzou. Po izolaci je mRNA ihned přepsána do cDNA reverzní transkriptázou a dále se pracuje s DNA, jelikož je chemicky stabilnější a méně náchylná k enzymové degradaci než RNA.



Obr.1: Ilustrace běžných molekulárních technik analýzy vzorků pro studium diverzity a kvantity genů mikroorganismů. Po izolaci nukleových kyselin ze vzorků jsou analyzovány buď přímo hybridizačními metodami, nebo jsou denitrifikační geny amplifikovány pomocí PCR. PCR produkty se používají k vyhodnocení celkové struktury a diverzity daného vzorku metodou DGGE nebo T-RFLP. Sekvence nekultivovatelných organismů se dají získat klonováním a následujícím sekvenováním. qPCR je používána ke kvantifikaci relativního zastoupení genů (upraveno podle Wallenstein et al. 2006).

1.4.1 454 sekvenování, Genome Sequencer™ Roche

Jedním ze způsobů, jak analyzovat celé metagenomy mikrobiálních společenstev je 454 sekvenování uvedené na trh společností Life Science. Tento postup patří do skupiny sekvenovacích metod nové generace (next generation sequencing). Podstatnou výhodou je paralelizace analýz mnoha templátů (Chen et al. Poster). Platforma Genome Sequencer™ od společnosti ROCHE je založena na metodě pyrosekvenace (sequencing-by-synthesis) a obchází i potřebu klonování fragmentů DNA do *E.coli*. Pyrosekvenací je detekováno světlo emitované při oxidaci luciferinu na oxyluciferin prostřednictvím enzymu luciferázy.

Ta bere energii ve formě ATP z p em n něho pyrofosfátu, který vzniká jako vedlejší produkt po inkorporaci dNTP DNA polymerázou. Emitované světlo je detekováno CCD kamerou. Délka čtení je od 250 do 450 bp (podle typu přístroje) a na jeden run získáme 0.1 až 0.5 Gbp dat (propagační materiály ROCHE).

Tato metoda je více než 10 krát levnější než Sangerova metoda (Pistoupilová 2008) založená na elektroforetické separaci dNTP fragmentů s rozlišováním jedné báze. Průměrná rychlost se u 454 sekvenování pohybuje okolo 1000 bp a u Sangerovy metody kolem jednoho megabáse (Chen et al. poster).

1.5 Běžné molekulární metody

Polymerázová řetězová reakce (PCR) patří mezi nejčastěji používané molekulární metody. Hlavní limitací je závislost na předem známé sekvenci, na jejímž základě je nutné sestavit vhodné primery. To je hlavní překážkou v identifikaci nových genů. Při analýzách mikrobiálních DNA z prvních vzorků je častým problémem přítomnost huminových kyselin, což jsou enzymové inhibitory, které negativně ovlivní průběh reakce (Wintzingerode et al. 1997). Dalšími komplikacemi mohou být tvorba sekundárních struktur na templátu, tvorba chimérických molekul, rychlé hromadění náhodně vzniklých chyb, nízká rychlost amplifikace určitých sekvencí a nutnost optimalizace podmínek, za kterých reakce probíhá optimálně. Tím může dojít k nadhodnocení výsledků a k vyvození chybného závěru (Becker et al. 2000).

Principem metody terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) je měření míry polymorfie terminálních restrikčních fragmentů (Marsh 1999). Konec PCR produktu se na primeru označí fluorescenční barvou a po amplifikaci je DNA nastříhána restrikčními enzymy na jednotlivé terminální restrikční fragmenty (T-RFs) v restrikčních místech. Fragmenty jsou separovány gelovou elektroforézou a fluorescenčně vizualizovány. Výstupem je profil mikrobiálního společenstva v daném vzorku. Ten se pak porovnává s databází. Metoda je nezávislá na kultivovatelnosti analyzovaných mikroorganismů (Blackwood et al. 2002). Limitací T-RFLP je fluorescenční značení jen terminálních konců fragmentů (Marsh, 1999), výběr vhodných restrikčních enzymů a fakt,

že DNA detekovaná na gelu nelze dále zpracovávat pro klonování a sekvenování (Hester et al. 2008). Nezáskáme tak konkrétní sekvence genů.

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je metoda separace DNA fragmentů na základě odlišného poměru GC k AT vystavením nukleové kyseliny denaturačnímu gradientu za zvýšené teploty v polyakrylamidovém gelu. Vzorky s nižším obsahem GC se rozpadají rychleji, a proto prochází gelem pomaleji, čímž dochází k separaci. Jednotlivé bandy na polyakrylamidovém gelu by měly představovat různé mikroorganismy přítomné ve vzorku (Baughman 2005, Wallenstein et al. 2006). Takto separovanou DNA lze přenést na hybridizační membránu s próbou a zviditelnit úseky s požadovanou sekvencí. DNA o různých sekvencích může být vyseparována v jednom společném bandu, protože nedochází k separaci podle přesné sekvence, ale jen podle poměru obsahu AT/CG (Muyzer et al. 1993, Hester et al. 2008). Možnosti použití jsou omezeny závislostí na PCR amplifikaci.

2 Shrnutí vstupních podmínek

Je pravděpodobné, že v kyselých lesních podmínkách dominují mikrobiální společenstva archaeí a mikromycet, která by mohla velkou měrou ovlivňovat množství N_2O v atmosféře, čímž by významně přispívala k závažnému problému klimatických změn. Z ekologického hlediska je zajímavé sledovat geny mikroorganismů, které by mohly zvyšovat podíl N_2O v atmosféře (Shoun and Tanimoto 1991). Analýzy vzorků půdy z extrémních podmínek šumavských smrkových lesů za využití metagenomického přístupu by mohly přispět k identifikaci genů a jejich nositelů, kteří v takovýchto podmínkách uskutečňují denitrifikační proces, a tak získávají energii pro život.

3 Cíle projektu

1. Identifikovat mikroorganismy a dosud neznámé geny, které se podílejí na denitrifikačních procesech v extrémně kyselých půdách šumavských smrkových lesů.
2. Navrhnout nové primery pro studium diverzity a kvantity půdních mikromycet a archaeí metodami DGGE, T-RFLP a qPCR.

4 Hypotéza

V silně acidifikovaných půdách bude převažovat podíl denitrifikujících mikromycet a archaeí oproti denitrifikujícím bakteriím.

5 Návrh experimentu

5.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků pro izolaci DNA/RNA bude proveden v lokalitě silně acidifikovaných lesních půd Šumavy, a to na plochách v povodí Plešného a Mertova jezera. Na těchto plochách již několik let probíhá intenzivní výzkum - provádí se základní chemické analýzy půdy (celkový obsah C, N, P, dostupné formy C, N, P) a sleduje se zde vyplavování NO_3^- z opadového a humusového půdního horizontu. V rámci navrhovaného projektu budou provedeny odběry půdy na šesti plochách na každém povodí s cílem získat přehled o prostorové variabilitě celého povodí. Na každé této ploše budou provedeny tři paralelní odběry z půdních horizontů v rozmezí 0-2cm, 2-5cm a 5-10cm od povrchu.

5.2 Izolace DNA a analýza pomocí nástroje Genome Sequencer™ ROCHE

Pro izolaci DNA a RNA z půdního vzorku bude použit PowerSoil DNA Isolation Kit, resp. PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc).

Izolovaná DNA bude sekvenována na Genome Sequencer™ (ROCHE). Izolovaná mRNA bude ihned přepsána reverzní transkriptázou do cDNA a bude sestavena cDNA knihovna podobná jako u DNA. Kvalita izolované DNA/RNA bude stanovena spektrofotometricky. Pro analýzu Genome Sequencer™ je potřebné množství DNA v jednotkách µg. DNA bude pročištěna kationtovou filtrační kolonkou a eluovaná DNA bude dále upravena, aby jí bylo možné analyzovat na Genome Sequencer™ (Harkins and Jarvie 2007).

5.2.1 Postup práce pro přípravu vzorků k pyrosekvenaci

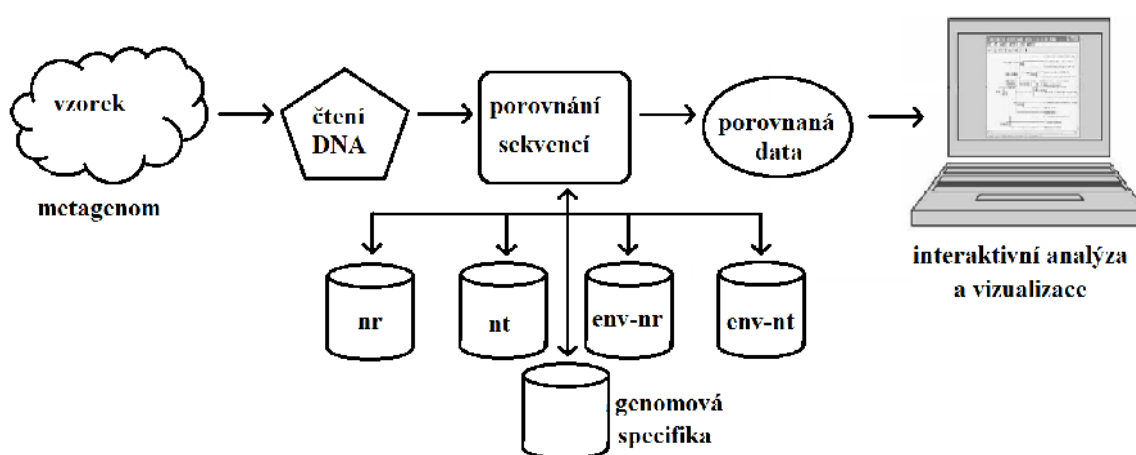
Prvním krokem po izolaci DNA je konstrukce DNA knihovny. Genomová DNA je rozfragmentována nebulizací a k fragmentům jsou ligovány speciální adaptory dvojitého typu (jedním se přichycují ke sbírací kuličce). Genomová knihovna je bez klonování tvořena jednovláknovou DNA.

Druhým krokem je emulsní PCR, při které se amplifikují molekuly DNA přichycené ke speciálním nosičům (water-in-oil).

Těmto krokem je umístění nosičů s navázaným templátem do mikrokomůrek na titrační destičku PicoTiterPlate™, na které jsou jamky o velikosti právě pro jeden nosič. Zde dochází k pyrosekvenaci za přítomnosti DNA polymerázy a vždy jednoho typu nukleotidu (dATP, dGTP, dCTP nebo dTTP), tzv. sequencin-by-synthesis.

5.2.2 Vyhodnocení dat

Získaná data budou zpracována pomocí softwaru MEGAN (metagenome analyzer), který data uspořádá a vyhodnotí (Obr. 2). Funkční analýza bude provedena porovnáním výsledků s databází BLAST a NCBI (Harkins and Jarvie 2007, Huson et al. 2007), kde se metagenomická data porovnávají se známými sekvencemi genů. Diverzita společenstev bude stanovena porovnáním 16S rRNA/18S rRNA. Sekvenční data budou dále využita pro design vhodných primerů k dalším molekulárním analýzám DNA (DGGE, T-RFLP, qPCR).



Obr. 2: Postup při vyhodnocování metagenomických dat (upraveno podle Huson et al. 2007).

Genetické profily skladby mikrobiálního společenstva související s okolními ekologickými podmínkami příslušného habitatu budou porovnány mezi jednotlivými lokalitami a s databází výsledků z jiných míst. Porovnáním genetických profilů může být identifikována korelace okolních podmínek a genetické adaptace přítomných mikroorganismů.

5.2.3 časový plán

Úkol	2011			2012			2013		
Odběr vzorků									
Izolace DNA/mRNA									
454 sekvenace									
Porovnání sekvenčních dat s databázemi									
Návrh primerů pro DGGE, T-RFLP, qPCR									

5.2.4 Finanční náklady projektu

	Náklady/rok 2011 (v tis. Kč)	Náklady/rok 2012 (v tis. Kč)	Náklady/rok 2013 (v tis. Kč)
Neinvestiční materiál	500	500	150
Investiční materiál	3 000	0	0
Služby	10	10	10
Cestovné	15	15	15
Platy a odměny	120	130	140
Celkem/rok	3645	655	315
Celkem (v tis. Kč)	4615		

Neinvestiční materiál: enzymy, sekvenční kity, titrační destičky, rukavice, špičky k pipetám, plastové sáčky na vzorky a jiné běžně používané vybavení a spotřební materiál.

Investiční materiál: zakoupení sekvenčního přístroje k uskutečnění projektu (GS Junior, Roche).

Služby: tisk poster, nutné opravy a pravidelná údržba sekvestoru GS Junior, Roche, atd.

Cestovné: cestovní náklady spojené s odběrem vzorků, konferenční poplatky.

Platy a odměny: zahrnují odměnu pro řešitele a plat pro technika zajišťujícího sekvenční analýzy.

6 Očekávané výstupy projektu

Navrhovaný projekt se zabývá metagenomickým přístupem pro analýzu mikrobiálních společenstev a jejich genů. Tento postup umožňuje celogenomové sekvenování přímo izolované DNA, takže není limitován konkrétní znalostí předem sekvenovaných genů. 454 sekvenování je metoda, která dovoluje identifikovat zcela nové geny nebo organismy, které dané geny obsahují. Projekt se zaměřuje na identifikaci genů, které hrají roli v denitrifikačním cyklu prováděném archaei a mikromycetami. Právě tyto skupiny se mohou hojně vyskytovat v extrémních podmínkách, které panují v acidifikovaných porostech smrkových lesů na Šumavě. Dosavadní molekulární biologické studie ukazují, že archaea a mikromycety nejsou schopny provádět kompletní denitrifikační proces, a že je finálním produktem N_2O , který se může uvolňovat do atmosféry. N_2O je skleníkový plyn a jeho vyšší uvolňování ze silně acidifikovaných lesních porostů může přispívat ke globálním změnám klimatu. Doposud používané klasické molekulární biologické metody jsou stále limitovány výběrem vhodných primerů pro PCR (DGGE), nebo použitím specifických restrikních enzymů (T-RFLP). Využitím metagenomického přístupu získáme velké množství dat - sekvence genů, které mohou být využity pro zpěsňování klasických PCR metod (DGGE, T-RFLP, qPCR). Získaná data umožní navržení nových primerů, které pokryjí širší diverzitu denitrifikujících archaeí a mikromycet.

7 Literatura

Baughman K. (2005). Principles and applications of DGGE. Microbac laboratorie, Inc. http://www.microbac.com/technical_articles/news_detail.php?news_ID=7

Becker S., Böger P., Oehlmann R., Ernst A. (2000). PCR bias in ecological analysis: A case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analysis of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4945-4953.

Blackwood Ch. B., Marsh T., Kim S. H., Paul E. A. (2002). Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 926-932.

Cabello P., Roldán M. D., Vivián C. M. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology* 150, 3527-3546.

Francis Ch. A., Beman J. M., Kuypers M. M. M. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: The microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal* 1, 19-27.

Fujii T., Takaya N. (2008). Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* involves NADH-nitrate reductase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72 (2), 412-420.

Guazzaroni M. E., Beloqui A., Golyshin P. N., Ferrer M. (2009). Metagenomics as a new technological tool to gain scientific knowledge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 945-954.

Handelsman J. (2004). Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 669-685.

Harkins T., Jarvie T. (2007). Metagenomics analysis using the Genome SequencerTM FLX system. *Nature Methods* 4. <http://www.nature.com/nmeth/journal/v4/n6/full/nmeth1054.html>

Hester R. E., Harrison R. M. (2008). Environmental forensics, capture microbial techniques for environmental forensics.: **Ball A. S., Pretty J. N., Mahmud R.** *Issues in Environmental Science and Technology* 26, 17-33.

http://books.google.cz/books?id=0HI0CJNQf6kC&pg=PA29&lpg=PA29&dq=princip+trflp&source=bl&ots=xbmRkpvrM&sig=HKgmHzPIRjlwGhIvtRgAQIVmA-Y&hl=cs&ei=QIu_S9jpLuSXOLzkkJcE&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=6&ved=0CDAQ6AEwBQ#v=onepage&q&f=false

Huson D. H., Auch A. F., Qi J., et al. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research* 17, 377-386.

Chen F., Alessi J., Kirton E., Singan V., Richardson P. Comparison of 454 sequencing platform with traditional Sanger sequencing: A case study with *de novo* sequencing of *Prochlorococcus marinus* NATL2A genome. LBNL-59003 Poster.

Kim S. W., Fushinobu S., Zhou S., Wakagi T., Shoun H. (2009). Eukaryotic *nirK* genes encoding copper-containing nitrite reductase: Originating from the protomitochondrion? *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2652-2658.

Knowles R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews* 46, 43-70.

Kobayashi M., Matsuo Y., Takimoto A., Suzuki S., Maruo F., Shoun H. (1996). Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 16263-16267.

Laughlin R. J., Stevens R. J. (2002). Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. *Soil Science Society of America Journal* 66, 1540-1548.

Marsh T. L. (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2, 323-327.

Muyzer G., De Waal E. C., Uitterlinden A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.

Nakahara K., Tanimoto T., Hatano K., Usuda K., Shoun H. (1993). Cytochrom P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 8350-8355.

Parkin T. B., Sexstone A. J., Tiedje J. M. (1985). Adaptation of denitrifying populations to low soil pH. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1053-1056.

Philippot L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577, 355-376.

Pistoupilová A. (2008) Bakalářská práce: Nové techniky sekvenace lidského genomu a jejich uplatnění ve studiu molekulární podstaty a diagnostiky dědičných onemocnění. Univerzita Karlova, vedoucí práce Kmoch S.

Raes J., Foerstner K. U., Bork P. (2007). Get the most of your metagenome: Computational analysis of environmental sequence data. *Current Opinion in Microbiology* 10, 1-9.

ROCHE – propagační materiály firmy.

Shoun H., Kim D. H., Uchiyama H., Sugiyama J. (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters* 94, 277-282.

Shoun H., Tanimoto T. (1991). Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 11078-11082.

Šimek M., Jíšová L., Hopkins D. W. (2002). What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? *Soil Biology & Biochemistry* 34, 1227-1234.

Takaya N., Shoun H. (2000). Nitric oxide reduction, the last step in denitrification by *Fusarium oxysporum*, is obligatorily mediated by cytochrome P450nor. *Molecular and General Genetics* 263, 342-348.

Treusch A. H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S. C., Klenk H. P., Schleper Ch. (2005). Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* 7 (12), 1985-1995.

Vakhlou J., Sudan A. K., Johri B. N. (2008). Metagenomics: Future of microbial genomics. *Indian Journal of Microbiology* 48, 202-215.

Wallenstein M. D., Myrold D. D., Firestone M., Voytek M. (2006). Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: Insights from molecular methods. *Ecological Applications* 16, 2143-2152.

Wintzingerode F., Göbel U. B., Stackebrandt E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21, 213-229.

Yoshimatsu K., Sakurai T., Fujiwara T. (2000). Purification and characterization of dissimilatory nitrate reductase from a denitrifying halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*. *FEBS Letters* 470, 216-220.

Zumft W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 533-616.