

Streszczenie: Mikrobiom glebowy składa się z wysoce zróżnicowanych pod względem strukturalnym oraz funkcjonalnym grup mikroorganizmów. Stanowi on obiekt licznych badań od wielu lat, jednakże wciąż pozostaje nie do końca poznany. Wiadome jest, że mikroorganizmy glebowe odgrywają główną rolę w procesach biogeochemicznych. Znajomość ich różnorodności strukturalnej i funkcjonalnej pozwala zatem na ocenę stanu środowiska glebowego, co jest niezwykle istotne dla agronomii oraz ekologii. Działalność rolnicza oraz przemysłowa człowieka powoduje zmiany w aktywności gleby, które należy monitorować. W badaniach nad aktywnością i różnorodnością mikrobiologiczną gleby można wyróżnić wiele metod badawczych opracowywanych i udoskonalanych przez naukowców z całego świata. Metody biochemiczne stosowane w celu analizy aktywności mikrobiologicznej polegają na określeniu zdolności mikroorganizmów do syntezy, asymilacji bądź rozkładu określonych związków chemicznych, a także na analizie komponentów komórek drobnoustrojów. Omówiono w niniejszej pracy metody badawcze, które umożliwiają analizę zarówno funkcjonalności mikroorganizmów, jak i ich strukturalnego zróżnicowania.

1. Wprowadzenie. 2. Oznaczenia aktywności enzymatycznej. 3. Technika CLPP. 4. Analiza profili kwasów tłuszczowych. 5. Analiza profili białkowych. 6. Podsumowanie

Biochemical methods for the evaluation of the functional and structural diversity of microorganisms in the soil environment

Abstract: Soil microbiome is composed of groups of microorganisms which are structurally and functionally very different. For many years soil microbiome has been the subject of numerous studies, but still is not fully recognized. It is well known that soil microorganisms play a key role in biogeochemical processes. Knowledge of their structural and functional diversity makes it possible to assess the condition of the soil environment, which is extremely important for agronomy and ecology. The agricultural and industrial activities of humans cause changes in soil activity, which should be monitored. There are many different research methods developed to analyze soil activity and microbiological soil diversity and refined by researchers from around the world in. Biochemical methods used to analyze microbial activity are based on the determination of the ability of microorganisms to synthesize, assimilate or decompose specific chemical compounds, as well as on the analysis of microbial cell components. This study presents the research methods used for the analysis of both: the functionality of microorganisms and their structural diversity.

1. Introduction. 2. Determination of enzymatic activity. 3. CLPP technique. 4. Analysis of fatty acid profiles. 5. Analysis of protein profiles. 6. Summary

Słowa kluczowe: aktywność enzymatyczna, aktywność mikrobiologiczna, analiza kwasów tłuszczowych, analiza proteomiczna, Biolog ECOplate

Key words: Biolog ECOplate, enzymatic activity, fatty acid analysis, microbiological activity, proteomic analysis

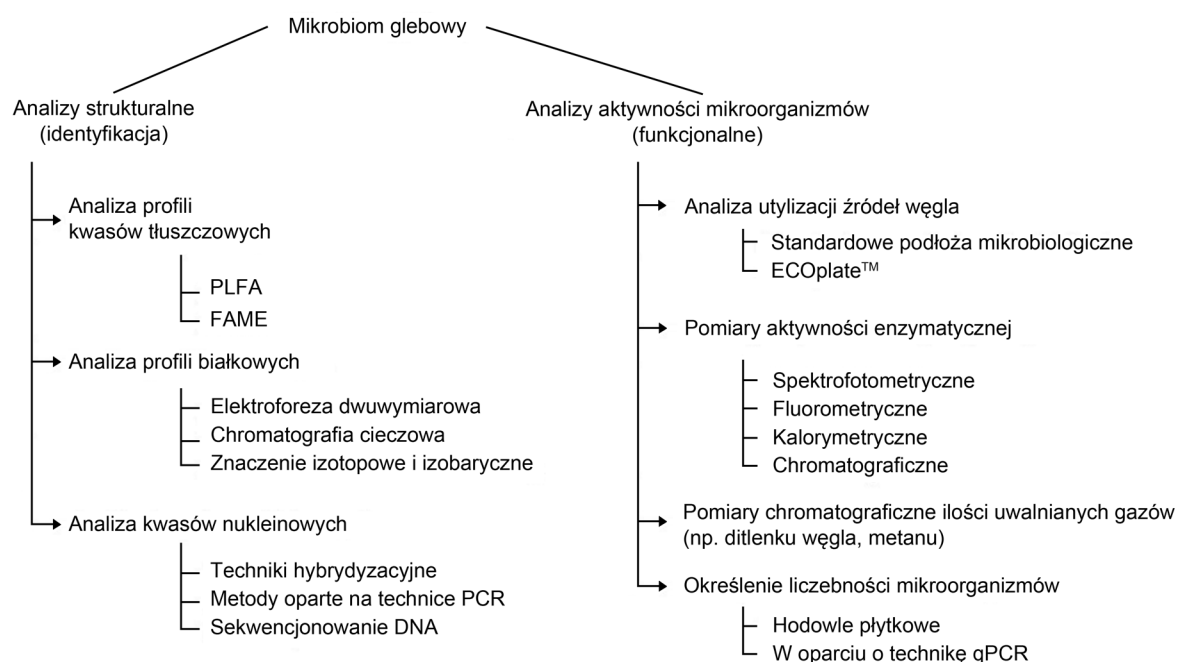
1. Wprowadzenie

Aktywność mikrobiologiczna środowiska glebowego wskazuje bezpośrednio na jakość gleby. Mikroorganizmy glebowe są bowiem odpowiedzialne za przebieg różnych procesów biogeochemicznych, uczestniczą w mineralizacji materii organicznej oraz są odpowiedzialne za obieg pierwiastków biogennych w środowisku [49]. Enzymy pochodzenia drobnoustrojowego, które występują w środowisku glebowym uczestniczą w procesach biochemicznych, takich jak: synteza białek, synteza kwasów nukleinowych, hydroliza złożonych związków azotu organicznego, dezaminacja aminokwasów [27], przemiany organicznych form fosforu [8] oraz

hydroliza estrów siarczanowych [11]. Procesy te, mają zasadnicze znaczenie w środowisku, ponieważ dzięki nim następuje uwalnianie i udostępnianie roślinom substancji odżywczych.

Wiedza na temat aktywności oraz różnorodności mikroorganizmów glebowych pozwala na ocenę stanu środowiska glebowego, co jest użyteczne w rolnictwie i ekologii. Działania człowieka w środowisku naturalnym, w tym intensyfikacja rolnictwa, stosowanie środków ochrony roślin i zanieczyszczenia przemysłowe zmieniają bowiem aktywność enzymatyczną gleb [34]. Ingerencje człowieka mają także wpływ na różnorodność mikrobiologiczną gleby, co może wpływać negatywnie na wielofunkcyjność oraz trwałość tego środo-

* Autor korespondencyjny: Karolina Furtak, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy (IUNG – PIB); ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel.: 81 478 69 61; e-mail: kfurtak@iung.pulawy.pl



Rys. 1. Przykładowe metody analizy strukturalnej i funkcjonalnej mikrobiomu glebowego
Opracowanie własne na podstawie [17, 25].

wiska [15]. W konsekwencji, zmiany w mikrobiomie mogą wpływać na produktywność i różnorodność roślin [44, 50].

W badaniach nad aktywnością oraz różnorodnością mikrobiologiczną gleb można wyróżnić szereg metod kategoryzowanych w wiele grup w zależności od celu analizy, czy rodzaju wykorzystanych technik (Rys. 1).

Metody biochemiczne stosowane w analizie aktywności mikrobiologicznej polegają na określeniu zdolności mikroorganizmów do syntezy, asymilacji lub rozkładu określonych związków chemicznych. Konwencjonalne techniki biochemiczne polegają na obserwacji zmian zachodzących podczas przeprowadzanych reakcji chemicznych. Rezultatem może być zmiana zabarwienia pożywki, wytworzenie gazu, bądź zmiana barwy badanego roztworu. Metody biochemiczne umożliwiają analizę aktywności, a także identyfikację taksonomiczną mikroorganizmów również w oparciu o oznaczenie produktów ich metabolizmu lub wybranych związków wchodzących w skład struktur komórkowych.

W niniejszej pracy zaprezentowane zostały wybrane metody biochemiczne wykorzystywane aktualnie w badaniach różnorodności strukturalnej i funkcjonalnej mikroorganizmów glebowych.

2. Oznaczenia aktywności enzymatycznej

W środowisku glebowym występuje wiele enzymów, których pochodzenie związane jest z drobnoustrojami. Enzymy uczestniczą w syntezie białek i kwasów

nukleinowych, stanowią także elementy łańcuchów obiegu węgla, azotu czy fosforu. Oznaczenia aktywności enzymów glebowych cieszą się dużym zainteresowaniem w mikrobiologii, biochemii, a także naukach rolniczych. Intensyfikacja produkcji w rolnictwie powoduje poszukiwanie wskaźników, mikrobiologicznych i biochemicznych, które mogłyby służyć, jako indykatory środowiska glebowego. W opinii naukowców aktywność enzymatyczna w połączeniu z innymi właściwościami gleb dostarcza informacji wystarczających do oceny jakości gleby [1, 13, 15]. Aktywność enzymatyczna zależy od rodzaju mikroorganizmów, ich żywotności, właściwości fizyko-chemicznych gleby oraz czynników antropogenicznych, jak np. nawożenia, sposób uprawy [33]. Badając próbki glebowe należy jednak mieć na uwadze, że uzyskany wynik może obejmować także aktywność enzymów obecnych w sporach grzybowych oraz endosporach bakterii, korzeniach i nasionach roślin, które nie są związane bezpośrednio z aktywnością żywych mikroorganizmów. Określenie aktywności enzymatycznej może odbywać się poprzez ilościowe oznaczenie produktu reakcji enzymatycznej (np. jonów azotanowych) lub na obniżeniu ilości dostępnego substratu (na który działa wybrany enzym).

Wśród metod służących do oznaczania aktywności enzymatycznej wyróżnia się:

- metody spektrofotometryczne,
- metody fluorometryczne,
- metody kolorymetryczne,
- metody chemiluminescencyjne,
- metody radiometryczne,
- metody chromatograficzne.

Tabela I
Wybrane enzymy mikroorganizmów glebowych wraz z ich funkcją oraz najczęściej stosowaną metodą oznaczenia

Enzym	Funkcja w glebie	Metoda oznaczenia	Piśmien- nictwo
Dehydrogenazy (EC 1.2.1)	Stanowią element komórkowego łańcucha oddechowego oraz katalizują reakcje utleniania i redukcji.	Kolorymetryczna z zastosowaniem 2,3,5-trifenylotetrazoliowy chlorek (TTC) lub 2-p-jodofenylo-3-p-nitrofenylo-5-fenylo-tetrazoliowy chlorek (INT)	[2, 12]
Fosfatazy (EC 3.1.3)	Katalizują przemiany organicznych form fosforu w nieorganiczne fosforany, które są przyswajalne dla roślin.	Kolorymetryczna z zastosowaniem p-nitrofenylofosforanu (PNP)	[48]
Proteazy (Klasa EC 3.4)	Katalizują hydrolizę białek do mniej złożonych związków – polipeptydów i aminokwasów poprzez rozerwanie wiązań peptydowych.	Kolorymetryczne oznaczenie ilości wolnych aminokwasów powstałych w wyniku hydrolizy białka (np. kazenianu sodu)	[26]
Arylsulfataza (EC 1.3.6.1)	Katalizuje hydrolizę estrów siarczanowych poprzez rozszczepienie wiązania O-S oraz uczestniczy w obiegu siarki w glebie.	Kolorymetryczna z zastosowaniem siarczanu p-nitrofenylu potasu (PNS)	[47]
Ureaza (EC 3.5.1.5)	Katalizuje rozkład mocznika do amoniaku i CO ₂ .	Kolorymetryczna z zastosowaniem np. mocznika	[22]
Amidaza (EC 3.5.1.4)	Katalizuje hydrolizę amidów oraz podobnych związków kwasu węglowego z amoniakiem.	Kolorymetryczna z zastosowaniem np. formamidu, acetamidu	[10]
Dezaminaza (EC 3.5.4)	Katalizuje proces amonifikacji.	Kolorymetryczna z zastosowaniem np. 1,2-diamino-4-nitrobenzen	[23]

Najpowszechniej stosowane są połączenia technik kolorymetrycznych ze spektrofotometrycznymi. Metody spektrofotometryczne pozwalają na obserwowanie przebiegu reakcji biochemicznej poprzez pomiar zmiany ilości światła pochłanianego przez roztwór badany. W momencie, gdy światło znajduje się w zakresie fal widzialnych można empirycznie zaobserwować zmianę barwy roztworu i w takim przypadku mamy do czynienia z testem kolorymetrycznym. Niektóre enzymy występujące w środowisku glebowym oraz konwencjonalne metody ich oznaczania przedstawiono w Tabeli I.

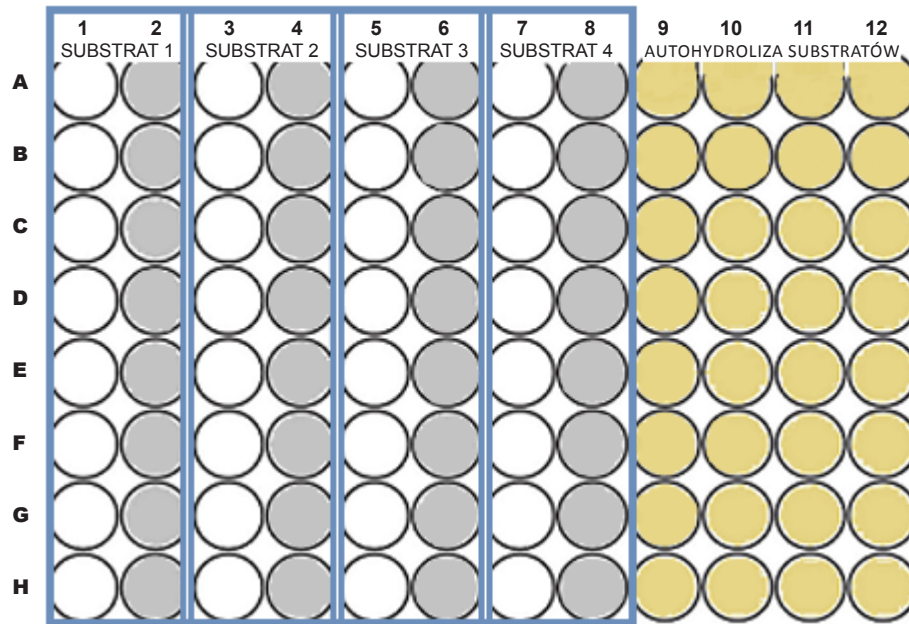
Konwencjonalne metody oznaczenia aktywności enzymów glebowych nie są jednak całkowicie wiarygodne. Większość z nich jest pracochłonna oraz czasochłonna. Dodatkowo prowadzą się do oznaczenia aktywności tylko jednego enzymu w danym czasie i w ograniczonej liczbie próbek. Trwają wprawdzie liczne badania poświęcone poszukiwaniu nowych, efektywnych akceptorów elektronów oraz bardziej wydajnych substratów [40], jednakże takie analizy zawsze będą obciążone znacznym ryzykiem błędów i licznymi ograniczeniami.

Spektrum aktywności enzymów badanych w glebach jest natomiast bardzo szerokie i stanowi przedmiot prac wielu naukowców. Stąd też istnieje ciągła potrzeba dalszych opracowań nowych metod badawczych. Zastosowanie czytnika mikroplitek i analizy fluorymetrycznej pozwala na analizę kilku enzymów w jednym czasie, przy równoległym ograniczeniu ilości analizowanej próbki. W konsekwencji możliwe jest obniżenie kosztów i czasu takiej analizy [3]. Opracowane dotychczas testy

mikroplatkowe opierają się na wykorzystaniu różnych substratów oznaczonych, jako 4-metylumbeliferony – MUF (4-Methylumbelliferyl). Dla przykładu warto podać fosforan 4-metylumbeliferonu służący do oznaczenia aktywności fosfataz oraz maślan 4-metylumbeliferonu będący substratem dla esteraz i lipaz. Standardowy układ 96-dółkowej płytki zawiera rzędy z próbkami badanymi i kontrolami dla każdej z nich (Rys. 2).

Na jednej płytce można dokonać pomiaru czterech różnych enzymów jednocześnie dla jednej próbki glebowej. Pozostałe cztery rzędy (nr 9–12) służą do oznaczenia autohydrolizy substratów enzymatycznych. W przypadku analizy większej ilości próbek w tym samym czasie, na kolejnych mikroplatkach nie trzeba sprawdzać autohydrolizy. Dodatkowo, należy natomiast przygotować jedną mikroplatkę zawierającą wzorce MUF z rosnącymi stężeniami w celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej. Analiza mikroplitek może polegać na pomiarze absorbancji, bądź fluorescencji. Pomiar fluorescencyjny jest bardziej odporny na zmętnienie próby, aczkolwiek jest ściśle zależny od temperatury i pH [3]. Czułość tej metody jest bardzo duża – czytnik pozwala na identyfikację pikomoli MUF w 200–300 µL badanego roztworu [39]. Wykorzystanie mikroplitek pozwala na analizę wielu, różnych enzymów pochodzenia glebowego, które mogą użytkować substraty MUF, co stwarza możliwość wielokierunkowej analizy środowiska.

Niektóre reakcje enzymatyczne wytwarzają światło, co można wykorzystać do wykrycia produktów. Metody wykorzystujące chemiluminescencję są bardzo czułe, jednak nie są zalecane do oznaczeń ilościowych, więc



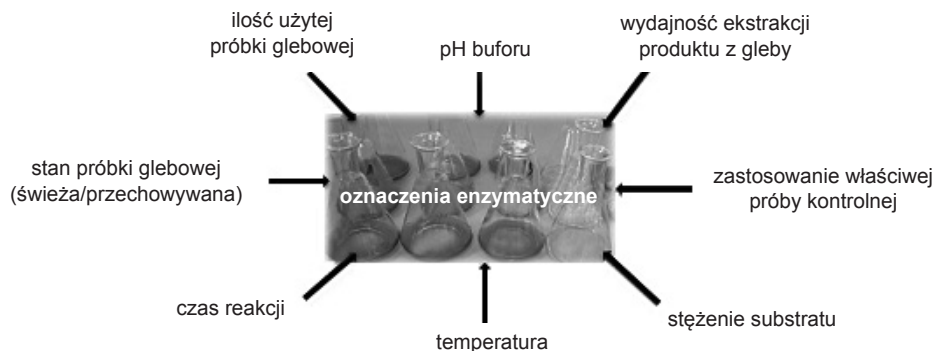
Rys. 2. Schemat mikropłytki do oznaczeń enzymatycznych z zastosowaniem czytnika płytek
Szare pola – miejsce na kontrolę; białe pola – miejsce na próbkę badaną; żółte pola – miejsce na substraty
w celu oznaczenia ich autohydrolizy. Opracowanie własne na podstawie [3].

w przypadku enzymów glebowych i oceny ich aktywności nie dają one oczekiwanych rezultatów. Zarówno metody radiometryczne, jak i chromatograficzne nie są zaliczane do metod biochemicznych, jednakże są to techniki bardzo czułe i specyficzne stosowane w enzymologii. W przypadku badań radiometrycznych do znakowania enzymów najczęściej stosowanymi izotopami są ^{14}C , ^{32}P i ^{35}S . Wśród metod chromatograficznych zazwyczaj wykorzystywana jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography), bądź chromatografia cienkowarstwowa (TLC, Thin Layer Chromatography).

Warto pamiętać, że stosowanie samych enzymów, jako indykatorów aktywności mikrobiologicznej gleby wciąż jest niemożliwe. Wiąże się to przede wszystkim z tym, że analizy enzymatyczne określają potencjalną, a nie rzeczywistą aktywność enzymów, a dodatkowo wiele enzymów działa na zasadzie sprzężenia z innymi

procesami, co jest często pomijane w badaniach. Kolejne utrudnienie stanowi złożoność środowiska glebowego oraz czułość enzymów na wiele czynników biotycznych i abiotycznych (Rys. 3).

Mimo wielu ograniczeń związanych z samymi metodami oraz złożoności przedmiotu badań, połączenie analiz aktywności enzymatycznej gleby z innymi, takimi jak: analizy molekularne, analiza funkcjonalna, czy oznaczeniami fizyko-chemicznymi gleby, pozwala na uzyskanie wieloaspektowego obrazu aktywności i funkcjonalności mikrobiomu glebowego. Główny cel badań nad glebą stanowi poszukiwanie indykatorów, które opisywałyby właściwie stan i jakość środowiska glebowego. Także wśród analiz aktywności mikrobiologicznej poszukuje się takich wskaźników. Mimo przeprowadzonych licznych doświadczeń i prób w tej dziedzinie oraz zgromadzonej wiedzy, cel sformułowania uniwersalnego wskaźnika jakości gleby pozostaje wciąż odległy.



Rys. 3. Przykładowe czynniki wpływające na pomiar aktywności enzymów mikroorganizmów glebowych
Opracowanie własne na podstawie [4].

3. Technika CLPP

Obok aktywności enzymatycznej w badaniach aktywności mikrobiologicznej środowiska glebowego wykorzystuje się metodę zwaną profilowaniem fizjologicznego poziomu populacji – CLPP (Community Level Physiological Profiling), która opiera się na wykorzystaniu przez mikroorganizmy środowiskowe różnych źródeł węgla [51]. Metoda CLPP służy do oceny aktywności metabolicznej nie pojedynczych drobnoustrojów, ale całych populacji mikroorganizmów pochodzących z danego środowiska. Firma Biolog® wykorzystwała zdolność drobnoustrojów do utylizacji różnych substratów i rozwinęła tę technikę tworząc 96-dołkowe płytki zawierające źródła węgla i barwnik [18]. Do badań próbek środowiskowych, w tym glebowych, stworzone zostały płytki o nazwie ECOplate™ zawierające 31 źródeł węgla w trzech powtórzeniach oraz wodę, jako próbkę kontrolną. Substraty te można sklasyfikować w pięć grup biochemicznych: (1) węglowodany, (2) kwasy karboksylowe, (3) aminy i amidy, (4) aminokwasy oraz (5) polimery (Tab. II).

Metoda oparta na ECOplate™ pozwala na badanie całych społeczności mikroorganizmów pochodzących z różnych próbek środowiskowych. Analiza opiera się na odczycie spektrofotometrycznym zmiany intensywności barwy redukującego się barwnika redoks – fioletu tetrazoliowego [21]. Wzrost mikroorganizmów na danym podłożu powoduje zmianę zabarwienia pożywki na fioletowy. Procedura analizy z wykorzystaniem ECOplate™ nie jest skomplikowana. Z próbki środowiskowej należy przygotować zawiesinę zawierającą badaną społeczność mikroorganizmów, a następnie zainokulować ją mikropłytką i inkubować [14, 16]. Przygotowanie inokulum z próbki glebowej odbywa się w trzech etapach: (1) przygotowanie zawiesiny poprzez umieszczenie 1 g gleby w 99 ml sterylnej wody (sterylna woda, 0,9% NaCl, bufor Tris), (2) wytrząsa-

nie próbek przez 20 minut w temperaturze pokojowej, (3) chłodzenie próbek w temperaturze 4°C przez 30 minut. Inkubację płytek prowadzi się w temperaturze optymalnej dla mikroorganizmów z danego środowiska. W przypadku próbek glebowych wynosi ona 25–27°C. Pierwsze zmiany zabarwienia, świadczące o zachodzącym w studzienkach metabolizmie są widoczne zaledwie po 24 h inkubacji. Jednakże, czas inkubacji jest uzależniony od rodzaju badanej próbki, a także wyników, jakie chce się uzyskać. Niektóre drobnoustroje wzrastają bardzo wolno, a pomiar ich metabolizmu może trwać do kilkunastu dni. Pomiar spektrofotometryczny dostarcza wielu wyników. Podstawowym parametrem, jaki otrzymuje się podczas analizy jest gęstość optyczna, OD (Optical Density), która odzwierciedla zagęszczenie komórek mikroorganizmów w studzience. Na jej podstawie wyliczane są wskaźniki takie jak: WCD (Well Color Development) oraz AWCD (Average Well Color Development) [14]. Ilość oraz złożoność otrzymanych wyników wymagają dokładnych analiz statystycznych [30]. Umożliwiają one sporządzenie krzywych logarytmicznych wzrostu mikroorganizmów, wyliczenie indeksu Shannon-Weaver (H'), czy indeksu jednorodności (E). Dzięki dużej ilości wyników możliwe jest oszacowanie metabolizmu mikroorganizmów, preferencji odnośnie źródeł węgla oraz różnorodności funkcjonalnej. Wśród testów firmy Biolog® są dostępne także inne płytki, m.in.:

- płytki do analizy bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich izolowanych z materiału klinicznego (GP/GN plates),
- płytki do analizy drożdży (YT plates),
- płytki do badania grzybów strzępkowych (FF plates),
- płytki do analizy mikroorganizmów beztlenowych (AN plates)
- płytki przeznaczone do identyfikacji bakterii bez ich różnicowania (GEN III plates).

Tabela II
Substraty umieszczone na płytce ECO

Węglowodany	Kwasy karboksylowe	Aminokwasy	Polimery	Aminy/amidy
Pirogronian metylu	Kwas D-glukozaminowy	L-arginina	Tween 40	Fenyletylo-amina
D-celobioza	γ -lakton kwasu D-galaktonowego	L-asparagina	Tween 80	Putrescyna
α -D-laktoza	Kwas D-galakturonowy	L-fenylalanina	α -Cyklodekstryna	
β -metylo-D-glukozyd	Kwas 2-hydroksy benzoesowy	L-seryna	Glikogen	
D-ksyloza	Kwas 4-hydroksy benzoesowy	L-treonina		
Erytritol	Kwas γ -hydroksymasłowy	Kwas glicylo-L-glutaminowy		
D-mannitol	Kwas itakonowy			
N-acetylo-D-glukozamina	Kwas α -oksoasłowy			
Fosforan 1-glukozy	Kwas D-jabłkowy			
Fosforan D, L- α -glicerolu				

Opracowanie własne na podstawie [52]

Dodatkowo firma stworzyła płytki zawierające sam barwnik redoks z możliwością samodzielnego przygotowania dowolnych kombinacji pożywek i specyficznych źródeł węgla.

Określanie metabolizmu populacji drobnoustrojów z zastosowaniem płytek ECO jest metodą względnie szybką oraz nieskomplikowaną. Zaletą niewątpliwie jest możliwość wyeliminowania klasycznych metod mikrobiologicznych, w tym izolacji czystych kultur mikroorganizmów i ich hodowli. Wadę stanowią natomiast wybrane źródła węgla, ponieważ substraty umieszczone na płytce nie zawsze reprezentują związki dostępne w środowisku. Należy także zwrócić uwagę, że ECOplate™ nie pozwoli na określenie specyficznych właściwości i funkcji danego konsorcjum drobnoustrojów, jak choćby zdolności do wiązania azotu atmosferycznego [31, 43].

Nie ulega wątpliwości, że zastosowanie płytek ECO do analizy społeczności mikroorganizmów glebowych dostarcza nowych informacji na temat ich różnorodności funkcjonalnej oraz może być wykorzystane do obserwacji zmian zachodzących w środowisku. Dowodzą tego liczne badania oparte na analizie metabolizmu drobnoustrojów. Dla przykładu warto podać badania Floch i wsp. (2011), które dotyczyły wpływu technik użytkowania gleby i stosowania środków ochrony roślin na funkcjonalność mikrobiomu glebowego [9]. Z zastosowaniem systemu Biolog określono także zmiany zachodzące w funkcjonowaniu mikrobiomu w wyniku akumulacji antybiotyków w glebie [29]. Funkcjonalna różnorodność mikroorganizmów jest równie ważna, co różnorodność strukturalna, bowiem poprzez pełnienie różnych funkcji mikrobiom uczestniczy w wielu procesach zachodzących w środowisku glebowym.

4. Analiza profili kwasów tłuszczowych

Metodą niewymagającą hodowli mikroorganizmów, a oceniającą ich aktywność i strukturę jest analiza kwasów tłuszczowych. Jest to metoda biochemiczno-fizyczna umożliwiająca identyfikację taksonomiczną

mikroorganizmów poprzez oznaczenie kwasów tłuszczowych wchodzących w skład struktur komórkowych.

Fosfolipidy są niezbędnym składnikiem błon komórkowych każdej żywej komórki, nie występują zaś w produktach zapasowych i martwych komórkach. W warunkach naturalnych fosfolipidy stanowią zwykle stałą proporcję biomasy organizmów. W większości przypadków konkretne rodzaje kwasów tłuszczowych dominują u poszczególnych taksonów. Mikroorganizmy posiadają kwasy tłuszczowe o prostych łańcuchach, obecne także u innych organizmów np. jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFAs, Monounsaturated Fatty Acids) z grup omega9 i omega7. Mikroorganizmy cechują się również obecnością unikalnych kwasów tłuszczowych, między innymi kwasem 3-hydroksymaślowym oraz cyklopropanem [(8)]. Większość kwasów tłuszczowych w komórkach bakteryjnych jest przyłączona do innych cząsteczek, głównie do fosfolipidów, glikolipidów i lipoprotein [57].

Kwasy znajdujące się w błonach są swoistymi biomarkerami ze względu na obecność w każdej żywej komórce oraz dużą różnorodność strukturalną i specyficzność biologiczną. Wykorzystanie tych związków do identyfikacji mikroorganizmów *in situ* jest szczególnie przydatne w taksonomii bakterii, a także w tworzeniu powiększającej się bazy danych pozwalającej na identyfikację biomarkerów.

Opierając się na założeniu, że taksony mikroorganizmów posiadają unikalne profile kwasów tłuszczowych (Tab. III) można je zidentyfikować oraz wykorzystać, jako indykatory struktury społeczności mikroorganizmów [5, 32]. Analiza lipidowa mikrobiomu glebowego polega na wyizolowaniu kwasów tłuszczowych z gleby, ekstrakcji w rozpuszczalnikach organicznych, a następnie analizie z zastosowaniem chromatografii gazowej. Powszechnie stosuje się dwie metody ekstrakcji lipidów z gleby: (1) analizę składu fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFA, Phospholipid Fatty Acid Analyses) oraz (2) analizę metylowanych estrów kwasów tłuszczowych (FAME, Fatty Acid Methyl Ester). Z zastosowaniem PLFA otrzymuje się frakcje lipidów pochodzące tylko z żywych komórek mikroorganizmów.

Tabela III

Przykładowe kwasy tłuszczowe wykorzystywane, jako biomarkery wybranych grup mikroorganizmów

Grupa mikroorganizmów	Markerowe kwasy tłuszczowe	Piśmienictwo
Bakterie Gram-dodatnie	15:0 <i>iso</i> , 15:0 <i>anteiso</i> , 16:0 <i>iso</i> , 17:0 <i>iso</i> , 17:0 <i>anteiso</i>	[38, 57]
Bakterie Gram-ujemne	kwasy cyklopropanowe: 17:0 <i>cy</i> , 19:0 <i>cy</i> , hydroksykwas	[57]
<i>Pseudomonas</i>	16:0, 16:1 ω 7c	[19]
<i>Bacterioides</i>	kwasy tłuszczowe z parzystą liczbą C	[37]
<i>Arthrobacter</i>	15:0 <i>anteiso</i> , 17:0	[19]
Grzyby	16:1 ω 5c, 18:1 ω 9c, 18:2	[36]

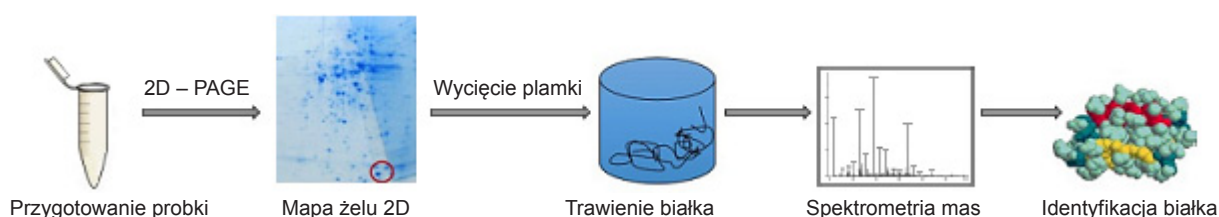
Wyizolowane w ten sposób specyficzne biomarkery lipidowe umożliwiają analizę struktury taksonomicznej mikrobiomu glebowego. Jednakże, metoda ta jest bardzo czasochłonna. Sześciodniowa procedura obejmuje: ekstrakcję kwasów tłuszczowych, izolację fosfolipidów poprzez ekstrakcję fazy stałej, przekształcenie fosfolipidów w FAME oraz analizę chromatograficzną [45]. Natomiast, analiza FAME jest mniej czasochłonna, a także wymaga mniejszej ilości materiału badawczego. Protokół zawiera czteroetapową ekstrakcję chemiczną i metylowanie wszystkich lipidów w próbce, a następnie ekstrakcję uzyskanych FAME oraz analizę chromatograficzną w ciągu jednego dnia. Należy mieć jednak na uwadze, że w trakcie analizy FAME otrzymuje się wszystkie lipidy glebowe – zarówno z żywych, jak i martwych komórek, a także z ulegającej rozkładowi biomasy zwierzęcej i roślinnej obecnej w glebie. Z tego powodu, metoda FAME nie może być używana do wiarygodnej taksonomicznej analizy mikrobiomu [7].

5. Analiza profili białkowych

Metody molekularne dostarczają biologom informacji odnośnie struktur genomu, jego funkcji oraz szlaków regulacyjnych i metabolicznych. Jednakże, do pełnego poznania metabolizmu mikroorganizmów oraz określenia jego reakcji na zmiany środowiskowe, konieczne jest scharakteryzowanie wszystkich składników komórki, czyli mRNA, białek, metabolitów i ich wzajemnych interakcji [42]. Potrzeba ta, doprowadziła do powstania nowych dziedzin nauki, takich jak: transkryptomika, metabolomika i proteomika [58]. Proteomem określa się zestaw wszystkich białek występujących w komórce, kodowanych przez genom, zatem proteomika dotyczy jego analizy, czyli badań białek, ich struktur oraz pełnionych funkcji [6]. Oznaczenie składu ilościowego i jakościowego białek komórkowych pozwala określić przynależność gatunkową mikroorganizmów. Proteomiczna identyfikacja mikroorganizmów polega na porównaniu i przypisaniu wyizolowanych z materiału białek do referencyjnego gatunku, który został już zidentyfikowany i zdeponowany w bazie [53]. Najpopularniejszą, a także największą bazą danych gromadzącą dane o strukturze

przestrzennej białek i kwasów nukleinowych jest Protein Data Bank (PDB), w której na dzień 23.02.2018 zdeponowane było 137 917 struktur białkowych, w tym 49 146 bakteryjnych oraz 9 306 wirusowych. Proteomika opiera się na dwóch głównych biochemicznych strategiach izolacji i wizualizacji białek: z zastosowaniem żelu oraz bez żelu. Najpowszechniej stosowaną metodą jest żelowa elektroforeza dwuwymiarowa, tzw. 2D-PAGE. Została ona opracowana w 1975 roku przez O'Farrell'a [35], który jako pierwszy opisał procedurę separacji białek *Escherichia coli* w żelu poliakrylamidowym. Technika 2D-PAGE składa się z dwóch etapów. Pierwszym jest ogniskowanie izoelektryczne (IEF), podczas którego białka są rozdzielane na podstawie ich punktu izoelektrycznego w gradiencie pH w żelu. Drugim etapem elektroforezy jest rozdział białek w zależności od ich masy cząsteczkowej [24]. Z uzyskanego żelu wycina się „plamkę” zawierającą białko, poddaje się trawieniu i analizie spektrometrią mas, a uzyskane wyniki identyfikuje się z zastosowaniem baz danych (Rys. 4).

Najczęściej stosowaną elektroforezą dwuwymiarową jest elektroforeza z użyciem siarczanu dodecylu sodu, tzw. SDS-PAGE. Dzięki zastosowaniu tego związku dochodzi do rozfałdowania łańcucha polipeptydowego, a polipeptydy nabywają ładunek ujemny i mogą migrować w polu elektrycznym. SDS maskuje także dodatni ładunek niektórych polipeptydów, co sprawia, że wszystkie molekuly białkowe migrują w jednym kierunku. Dodatkowo używa się β -merkaptotanolu, który ma silne właściwości redukujące i przecina mostki dwusiarczkowe (S-S) między białkami [20, 55]. Procedura takiej analizy obejmuje izolację białek komórkowych, rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym oraz barwienie rozdzielonych białek. Obecnie stosuje się różne barwniki, w tym barwniki fluorescencyjne, dzięki czemu czułość analizy białek z zastosowaniem żelu jest trochę większa, jednakże, metoda ta pozwala na identyfikację zaledwie kilkuset białek, co powoduje, że tylko proteomy o niskiej złożoności mogą być charakteryzowane w ten sposób [46, 58]. Metody niewykorzystujące żelu pozwalają na wykrycie kilku tysięcy białek oraz identyfikację białek nierozpuszczalnych [54]. Wśród technik niewymagających użycia żelu wyróżnia się przede wszystkim mikrokapilarną chromatogra-



Rys. 4. Schemat analizy proteomicznej z zastosowaniem elektroforezy dwuwymiarowej ze spektrometrią mas

Opracowanie własne na podstawie [56].

fię cieczową z spektrometrią mas (LC-MS/MS). Jednakże, obie te metody pozwalają na poznanie zaledwie 20–40% proteomu bakteryjnego. Umożliwia to identyfikację mikroorganizmów, ale nie dostarcza informacji ilościowych na temat ich białek. Wśród ilościowych metod proteomicznych, które pozwalają na dokładniejsze pomiary proteomów wyróżnia się: znaczenie izotopowe (ICAT) i znaczenie izobaryczne (iTRAQ) białek [58]. Wyzwanie w analizach proteomu stanowi fakt, że białka są bardzo trudnym obiektem badań. Związane to jest z ich złożoną, przestrzenną strukturą oraz występowaniem w kompleksach wielocząsteczkowych. Dodatkowo, proteom jest dynamiczny. Jego obraz zależy głównie od cyklu rozwojowego komórki oraz rozmieszczenia białek w strukturach komórkowych.

Proteomika rozwija się dynamicznie i posiada duży potencjał poznawczy. Umożliwia ona analizę zmian zachodzących w profilach białkowych mikroorganizmów pod wpływem różnych czynników środowiskowych np. stresu termicznego, braku źródła węgla, obecności antybiotyku, zmiany pH. Celem badań proteomicznych jest także odkrycie białkowych biomarkerów dla poszczególnych mikroorganizmów, co pozwoliłoby na szybką identyfikację drobnoustrojów bez konieczności analizowania całego proteomu.

6. Podsumowanie

Badania dotyczące analizy różnorodności mikrobiologicznej gleby są bardzo istotne dla zrozumienia wpływu zmian klimatu, działalności rolniczej człowieka oraz innych czynników antropogenicznych (pestycydy, metale ciężkie) na aktywność mikrobiomu glebowego, z którą związane są różnorodne procesy biogeochemiczne, a co za tym idzie jakość gleby. Opisywane w niniejszym opracowaniu metody mogą się uzupełniać oraz być skorelowane z innymi (np. molekularnymi). Połączenie badań enzymatycznych z analizą ekspresji genów, z badaniami fizyko-chemicznymi gleby oraz analizą funkcjonalną mikrobiomu daje pełen obraz jakości i funkcji gleby. Wybór konkretnej metody badawczej jest uzależniony od wyników, jakie oczekuje się uzyskać, rodzaju próbki badanej, ale także czasu oraz środków, jakie można przeznaczyć na eksperyment.

Badania mikrobiomu glebowego są znaczące zarówno dla uzyskiwania lepszej jakości plonów z gleb użytkowanych rolniczo, jak i ze względu na utrzymanie bioróżnorodności środowiska. Mikroorganizmy glebowe mimo wielu lat badań nad ich identyfikacją i różnorodnością wciąż pozostają nie do końca poznaną grupą drobnoustrojów. Z tego powodu analizy mikrobiomu glebowego stawiają przed mikrobiologami szereg wyzwań, ale jednocześnie stanowią nieocenione źródło informacji.

Podziękowania

Publikacja została opracowana w ramach realizacji zadania 1.4 w Programie Wieloletnim IUNG-PIB na lata 2016–2020 oraz tematu statutowego 2.38.

Piśmiennictwo

- Błońska E.: Enzymy glebowe i ich znaczenie w ocenie aktywności biologicznej gleb leśnych na przykładzie rezerwatów przyrody nizin i wyżyn Polski. *Roczniki Gleboznawcze*, Warszawa, **LXII**, 4, 163–172 (2011)
- Casida L.E. Jr., Klein D.A., Santoro T.: Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* **98**, 371–376 (1964)
- Deng S., Kang H., Freeman C.: Microplate Fluorimetric Assay of Soil Enzymes (w) *Methods of Soil Enzymology*, red. R.P. Dick, Soil Science Society of America, Madison, 2011, s. 311–315
- Dick W.A.: Development of a Soil Enzyme Reaction Assay (w) *Methods of Soil Enzymology*, red. R.P. Dick, Soil Science Society of America, Madison, 2011, s. 71–84
- Ding C.H., He J.: Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 925–941 (2010)
- Dmitrzak-Węglarz M., Hauser J.: Wykorzystanie badań proteomicznych w poszukiwaniu markerów biologicznych dla chorób psychicznych. *Via Medica*, **3**, 118–127 (2006)
- Dunfield K.E.: Lipid-Based Community Analysis (w) *Soil Sampling and Methods of Analysis*, red. M.R. Carter, E.G. Gregorich, 2nd Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008, s. 557–567
- Eivazi F., Tabatabai M.A.: Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* **9**, 167–172 (1977)
- Floch C., Chevremont A.C., Joanico K., Capowiez Y., Criquet S.: Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog[®] Ecoplates. *Eur. J. Soil Biol.* **47**, 256–263 (2011)
- Frankenberger W.T., Tabatabai M.A.: Amidase activity in soils. I. Method of assay. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **44**, 282–287 (1980)
- Freney J.R., Williams C.H.: The sulphur cycle in soil (w) *The global biogeochemical sulfur cycle*, red. M.V. Ivanov, J.R. Freney, CSOPE 19, John Wiley & Sons, New York, 1983, s. 129–201
- Friedel J.K., Mälter K., Fischer W.R.: Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazolium chloride and iononitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils.* **18**, 292–296 (1994)
- Furtak K., Gajda A.M.: Activity of dehydrogenases as an indicator of soil environment quality. *Pol. J. Soil Sci.* **50**, 1, 33–40 (2017)
- Furtak K.: Analiza profilu metabolicznego populacji mikroorganizmów z zastosowaniem techniki ECOpate Biolog (w) *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki Przyrodnicze*, red. M. Panfil, Wydawnictwo Młodzi Naukowcy, Poznań, 2017, Część I, s. 31–37
- Gajda A.M.: Mikrobiologiczne i biochemiczne wskaźniki jakości gleb pod pszenicą w zależności od systemu uprawy roli. *Monografie i Rozprawy Naukowe, IUNG-PIB*, 46, Puławy, 2015
- Gajda A.M., Czyż E.A., Stanek-Tarkowska J., Dexter A.R., Furtak K.M., Grządziel J.: Effects of long-term tillage practices on the quality of soil under winter wheat. *Plant Soil Environ.* **63**, 5, 236–242 (2017)
- Gałązka A., Łyszcz M., Abrymczyk B., Furtak K., Grządziel J., Czaban J., Pikulicka A.: Bioróżnorodność środowiska glebowego – przegląd parametrów i metod w analizach różnorodności biologicznej gleby. *Monografie i Rozprawy Naukowe, IUNG-PIB*, 49, Puławy, 2016

18. Garland J.L., Mills A.: Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization: *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351 (1991)
19. Haack S.K., Garchow H., Odelson D.A., Forney L.J., Klug M.J.: Accuracy, reproducibility, and interpretation of Fatty Acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 7, 2483–2493 (1994)
20. Hames D.B., Hooper N.M.: *Biochemia-krótkie wykłady*. Wyd. Naukowe PWN, 2009, s. 68–71
21. Hatzinger P.B., Palmer P., Smith R.L., Pe Arrieta C.T., Yoshinari T.: Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **52**, 47–58 (2003)
22. Hoffman G., Teicher K.: Ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Böden. *Zeit. Pflanzenernähr. Dung. Bodenkunde*, **95**, 55–63 (1961)
23. Killham K., Rashid M.A.: Assay of activity of a soil deaminase. *Plant Soil*, **92**, 15–21 (1986)
24. Kim M.R., Kim C.W.: Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *J. Chromatogr.* **849**, 203–210 (2007)
25. Kozdrój J.: Metagenom – źródło nowej informacji o mikroorganizmach glebowych. *Post. Mikrobiol.* **52**, 2, 185–200 (2013)
26. Ladd J.N., Butler J.H.A.: Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrate. *Soil Biol. Biochem.* **4**, 19–30 (1972)
27. Ladd J.N., Jackson R.B.: Biochemistry of ammonification (w) Nitrogen in agricultural soils red. F.J. Stevenson, *Am. Soc. Agron. Madison*, 1982, s. 173–228
28. Lechevalier M.P.: Lipids in bacterial taxonomy (w) Practical handbook of microbiology, red. O'Leary W.M., CRC, Boca Raton, 1989, s. 455–561
29. Liu F., Wu J., Ying G.G., Luo Z., Feng H.: Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1615–1623 (2012)
30. Lv T., Zhang Y., Carvalho P.N., Zhang L., Button M., Arias C.A., Weber K.P., Brix H.: Microbial community metabolic function in constructed wetland mesocosms treating the pesticides imazalil and tebuconazole. *Ecol. Eng.* **98**, 378–387 (2017)
31. Malosso E., English L., Hopkins D.W., O'Donnell A.G.: Community level physiological profile response to plant residue additions in Antarctic soils. *Biol. Fertil. Soils*. **42**, 60–65 (2005)
32. Marchut-Mikołajczyk O., Kwapisz E., Antczak T.: Enzymatyczna bioremediacja ksenobiotyków. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, **16**, 39–55 (2013)
33. Mocek-Plóćiniak A.: Wykorzystanie aktywności enzymatycznej do oceny wpływu antropogenicznych zmian wywołanych przez metale ciężkie w środowisku glebowym. *Nauka Przyr. Technol.* **4**, 86 (2010)
34. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G.: Microbial diversity and soil function. *Eur. J. Soil Sci.* **54**, 655–670 (2003)
35. O'Farrell P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021 (1975)
36. Olsson P.A., Larsson L., Bago B., Wallander H., van Aarle I.M.: Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **159**, 1, 7–10 (2003)
37. Olsson S., Persson P.: The composition of bacterial populations in soil fractions differing in their degree of adherence to barley roots. *Appl. Soil. Ecol.* **12**, 205–215 (1999)
38. Pennanen T., Perkiomaki J., Kiikkila O., Vanhala P., Neuvonen S., Fritze H.: Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**, 291–300 (1998)
39. Pritsch K., Raidl S., Marksteiner E., Blaschke H., Agerer R., Schloter M., Hartmann A.: A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *J. Microbiol. Methods*. **58**, 233–241 (2004)
40. Prosser J.A., Speir T.W., Stott D.E.: Soil Oxidoreductases and FDA Hydrolysis (w) *Methods of Soil Enzymology*, red. R.P. Dick, SSSA Book Series, no. 9, Soil Science Society of America, Madison, USA, 2011, s. 103–124
41. Protein Data Bank (PDB): Protein-only Structures Released Per Year, <https://www.rcsb.org/pdb> (18.01.2018)
42. Rocha E.P.: The organization of the bacterial genome. *Annu Rev. Genet.* **42**, 211–223 (2008)
43. Ross M., Goberna M., Pascual J.A., Klammer S., Insam H.: 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *J. Microb. Meth.* **72**, 221–226 (2008)
44. Scherer-Lorenzen M., Palmberg C., Prinz A., Schulze E.D.: The role of plant diversity and composition for nitrate leaching in grasslands. *Ecology*, **84**, 6, 1539–1552 (2003)
45. Smithwick E.A.H., Turner M.G., Metzger K.L., Balsler T.C.: Variation in NH_4^+ mineralization and microbial communities with stand age in lodgepole pine (*Pinus contorta*) forests, Yellowstone National Park (USA). *Soil Biol. Biochem.* **37**, 1546–1559 (2005)
46. Sonck K.A., Kint G., Schoofs G., Vander Wauven C., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.: The proteome of *Salmonella typhimurium* grown under in vivo-mimicking conditions. *Proteomics*, **9**, 565–579 (2009)
47. Tabatabai M.A., Bremner J.M.: Factors affecting soil arylsulfatase activity. *Soil Sei. Soc. Amer. Proc.* **34**, 427–429 (1970)
48. Tabatabai M.A., Bremner J.M.: Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* **1**, 301–307 (1969)
49. Tabatabai M.A., Dick W.A.: Enzymes in soil: Research and developments in measuring activities (w) *Enzymes in the Environment*, red. R.G. Burns, R.P. Dick, Marcel Dekker, New York, 2002, 21, s. 567–996
50. Wagg C., Bender S.F., Widmer F., van der Heijden M.G.A.: Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14, 5266–5270 (2014)
51. Weber K.P., Legge R.L.: Community-level physiological profiling. *Methods Mol Biol.* **599**, 263–281 (2010)
52. Weber K.P., Legge R.L.: One-dimensional metric for tracking bacterial community divergence using sole carbon source utilization patterns. *J. Microbiol. Meth.* **79**, 55–61 (2009)
53. Welker M.: Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics*, **11**, 3143–3153 (2011)
54. Wolff S., Otto A., Albrecht D., Zeng J.S., Buttner K., Gluckmann M., Hecker M., Becher D.: Gel-free and gel-based proteomics in *Bacillus subtilis*: a comparative study. *Mol. Cell Proteomics*, **5**, 1183–1192 (2006)
55. Wu W., Zhang H.H.: Analysis of gene expression at the proteomic level (w) *Gene Biotechnology*, red. W. Wu, M.J. Welsh, P.B. Kaufman, H.H. Zhang, CRC Press LLC, 2004, s. 265–287
56. Zarag S.M., Gupta N., Mir R.A., Rai V.: Shift from Gel Based to Gel Free Proteomics to Unlock Unknown Regulatory Network in Plants: A Comprehensive Review. *J. Adv. Res. Biotech.* **1**, 2, 19 (2016)
57. Zelles L.: Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fert. Soils*. **29**, 111–129 (1999)
58. Zhang W., Li F., Nie L.: Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology*, **156**, 287–301 (2010)