MIKROORGANIZMY

jako bioindykatory środowiskowe: od badań tradycyjnych do molekularnych

G.A. Płaza

Słowa kluczowe:
mikroorganizmy, mikrobiologia, ekogenomika, genomika, proteomika

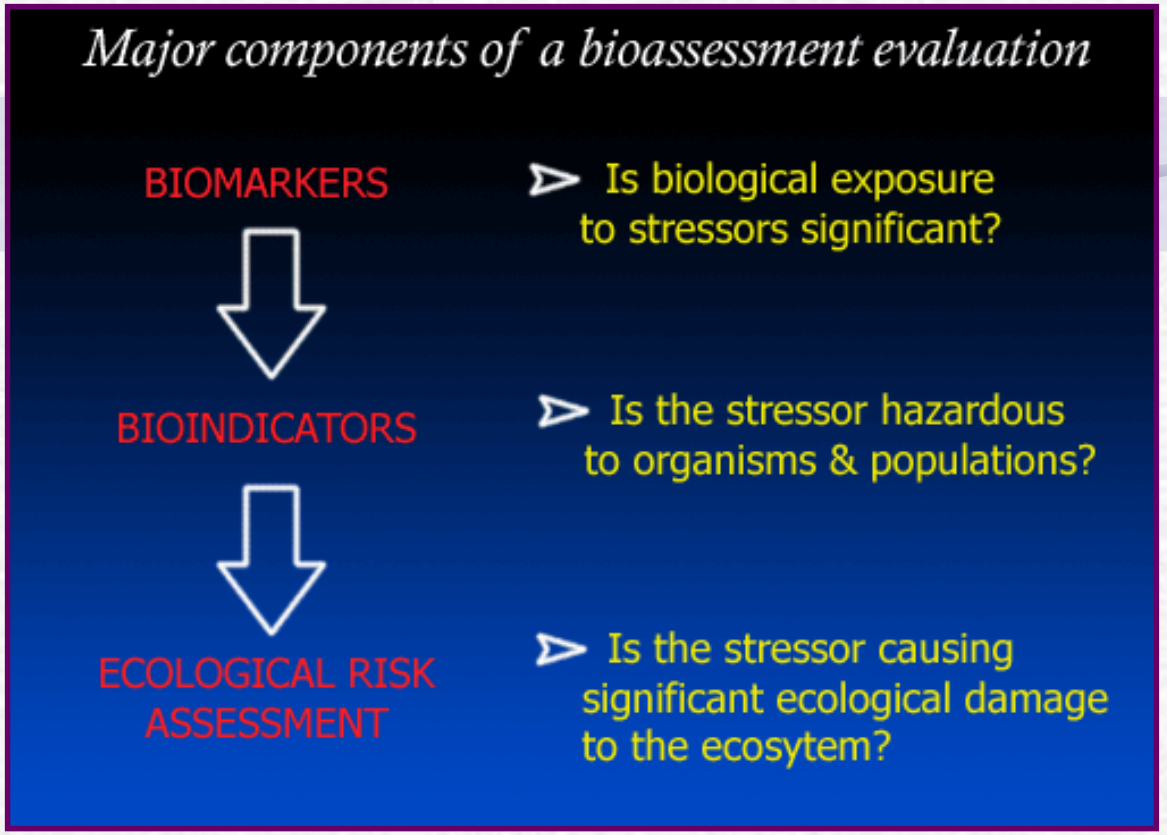
Definicja: bioindykator ???

Bioindykator – organizmy, biologiczne procesy reagujące na zmieniające się warunki środowiskowe, określające efekt jakościowy i ilościowy oddziaływania zanieczyszczenia/zmiany w środowisku

Bioindykator – biomolekularna, biochemiczna i fizjologiczna odpowiedź jednego/wielu organizmów, populacji, wspólnoty, ekosystemu na zmiany antropogeniczne zachodzące w środowisku

Bioindykator – określa połączone efekty oddziaływania różnych zanieczyszczeń na różnych poziomach organizacyjnych i określa czas trwania danego efektu

Bioindykatory (organizmy wskaźnikowe) - ich obecność (nieobecność), a także reakcja, wskazują na działanie różnych czynników, o określonym natężeniu; pojedyncze osobniki, populacje, fitocenozy, zoocenozy, biocenozy, ekosystemy i struktury krajobrazowe



The major components of a bioassessment evaluation are:

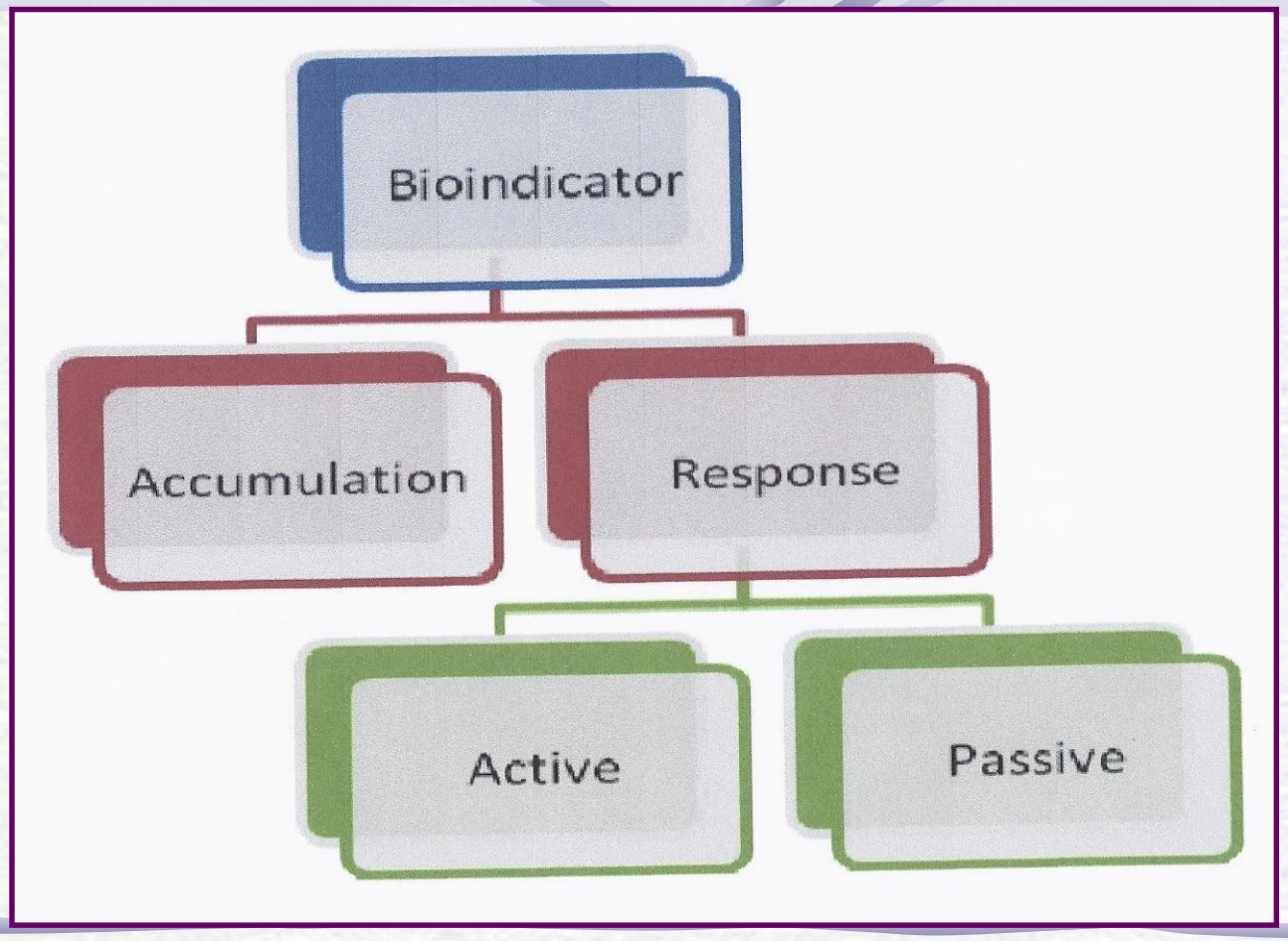
(1) determine if organisms have been exposed to stressors (biomarkers),

(2) determine the hazard or effect of stressors on organisms and populations (bioindicators)

Cechy bioindykatorów

- wrażliwość i specyficzność na dany czynnik,
- łatwość w identyfikacji,
- scharakteryzowany pod względem morfologicznym, anatomicznym i fizjologicznym,
- mała zmienność genetyczna,
- rozprzestrzenienie (przestrzennie i czasowo),
- łatwo rozpoznawalny i łatwy w poborze,
- mieć wąski zakres tolerancji na dany czynnik,
- reakcja stała, czytelne i powtarzalna
- jego obecność w środowisku powinna świadczyć o działaniu lub występowaniu danego czynnika,
- tani (efektywny kosztowo),
- i ……

Podział bioindykatorów



DLACZEGO MIKROORGANIZMY ??

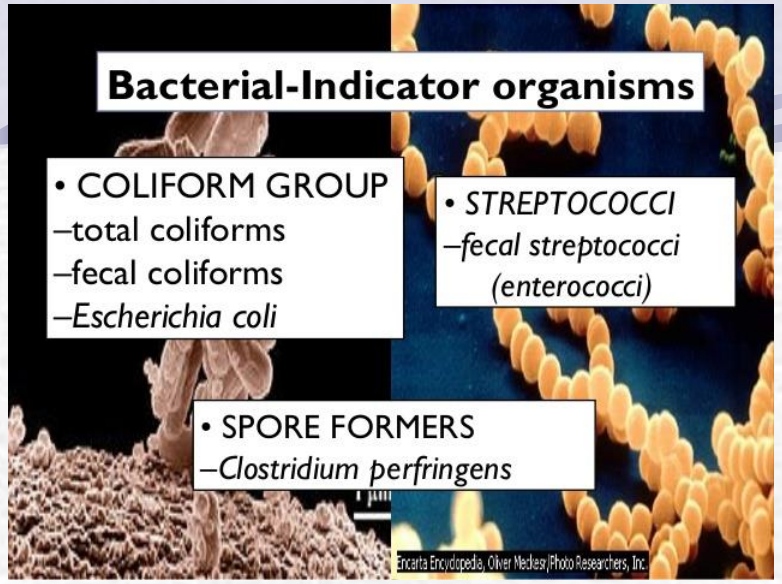
- Najliczniejsza grupa organizmów, łatwe w detekcji i poborze
- Duży stosunek powierzchni do objętości – szybka przemiana materii
- Szybki proces namnażania
- Biorą udział w obiegu azotu, siarki, fosforu, rozkładzie materii organicznej, przepływie energii i stabilności ekosystemów
- Są bardzo wrażliwe i szybko reagują na zmiany środowiska – standardowe identyfikatory zanieczyszczeń
- Szybko adaptują się do zmiennych warunków środowiska
- Specyficzność w stosunku do zanieczyszczeń (produkują specyficzne białka stresowe w odpowiedzi na zanieczyszczenia, np. Cd i benzenem

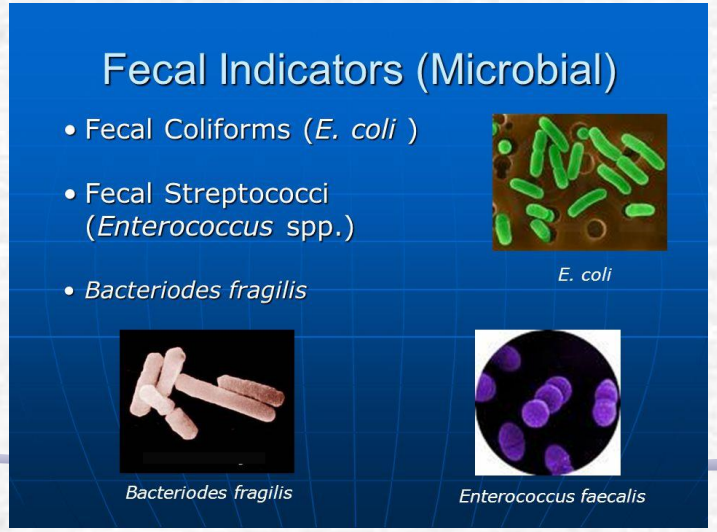
HISTORIA

- 1880 – von Fritsch opisał *Klebsiella pneumoniae* i *K. rhinoscleromatis* jako mikroorganizmy charakterystyczne w ludzkich fekaliach
- 1885 – Percy i Grace Frankland – badania bakteriologiczne wody w Londynie – określenie liczby bakterii
- 1885 – Escherich opisał *Bacillus coli* (nazwana *E. coli* - 1919)
- 1901 – *coli* bakterii
- 1905 - *Streptococci* i *Clostridium perfringens* – podłoże MacConkey'a – diagnostyka bakterii fermentujących laktozę
- oceny jakości wód pojawiły się w polskim prawie już w 1922 roku.
- Obecnie (stan obowiązujący od 2005 roku), wraz z przyjęciem przez Polskę Ramowej Dyrektywy Wodnej

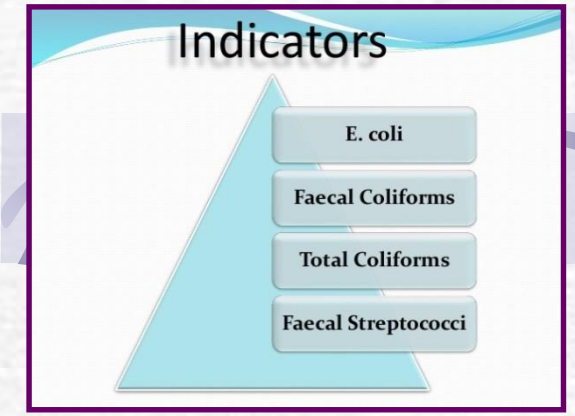
WODA - Bioindykatory mikrobiologiczne

- Bakterie z grupy *coli*
- *Escherichia coli*
- Streptokoki fekalne
- Enterokoki
- *Staphylococcus aureus*
- *Clostridium perfringens*
- Colifagi (fagi *Bacteroides fragilis*)
- Salmonella
- Legionella





WODA - wskaźniki mikrobiologiczne



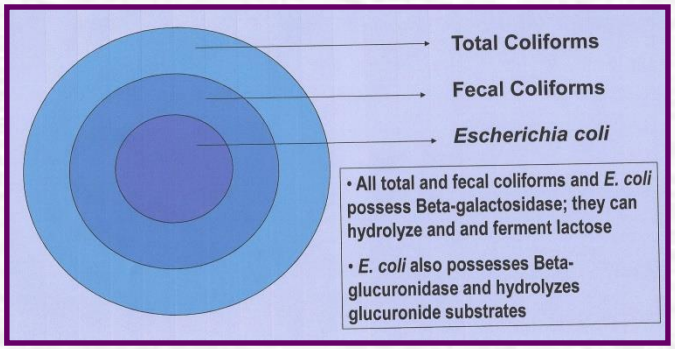
Dziennik Ustaw Nr 119 — 6515 — Poz. 765

765

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI[1)]

z dnia 18 czerwca 2008 r.

w sprawie wykonania niektórych przepisów ustawy o nawozach i nawożeniu[2)]



Dziennik Ustaw Nr 137 — 11129 — Poz. 924

924

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ŚRODOWISKA[1)]

z dnia 13 lipca 2010 r.

w sprawie komunalnych osadów ściekowych[2), 3)]

Dziennik Ustaw Nr 128 — 9034 — Poz. 1347

1347

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ŚRODOWISKA[1)]

z dnia 13 maja 2004 r.

w sprawie warunków, w których uznaje się, że odpady nie są niebezpieczne

Dziennik Ustaw Nr 168 — 11773 — Poz. 1763

1763

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ŚRODOWISKA[1)]

z dnia 8 lipca 2004 r.

w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego

Dziennik Ustaw Nr 72 — 6333 — Poz. 466

466

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA[1)]

z dnia 20 kwietnia 2010 r.

zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi[2)]

1530

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA[1)]

z dnia 16 października 2002 r.

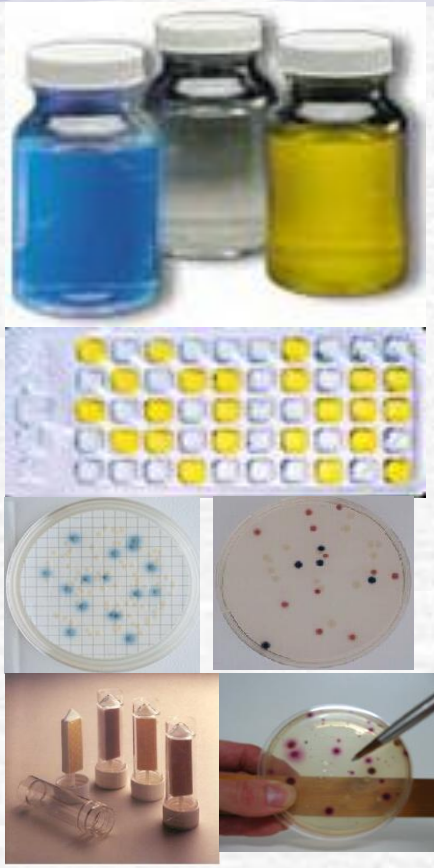
w sprawie wymagań, jakim powinna odpowiadać woda w kąpieliskach.

WODA - wskaźniki mikrobiologiczne

Podłoża płynne (NPL): testy biochemiczne, podłoża chromogenne

Podłoża stałe: tradycyjne i chromogenne

Metoda filtracji membranowej

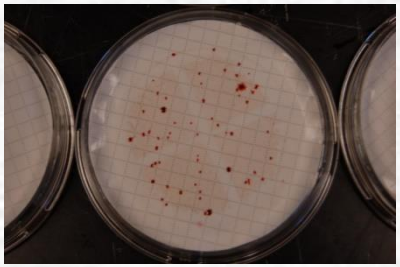


WODA - wskaźniki mikrobiologiczne

II. Oznaczanie głównych grup drobnoustrojów

Określanie ogólnej liczby kolonii metodą posiewu na agarze odżywczym wg normy PN EN ISO 6222:2004

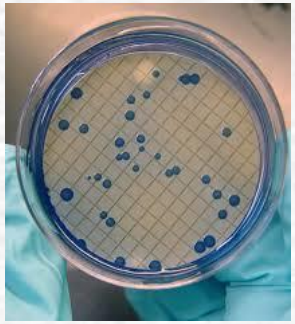
Wykrywanie i określanie ogólnej liczby bakterii grupy coli i *E. coli* metodą filtrów membranowych wg normy PN EN ISO 9308-1:2004 (wraz z Ap1/2005 oraz AC2009) oraz PN EN ISO 9308-1:2014



Wykrywanie i oznaczanie ilościowe enterokoków kałowych metodą filtracji membranowej wg normy PN EN ISO 7889-2:2004.

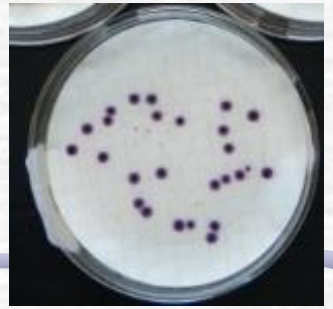
Clostridium perfringens (łącznie z przetrwalnikami) zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 20 kwietnia 2010 r.

Wykrywanie i oznaczanie ilościowe przetrwalników beztlenowców redukujących siarczyny (clostridia) metodą filtracji membranowej wg normy PN EN 26461-2:2001.



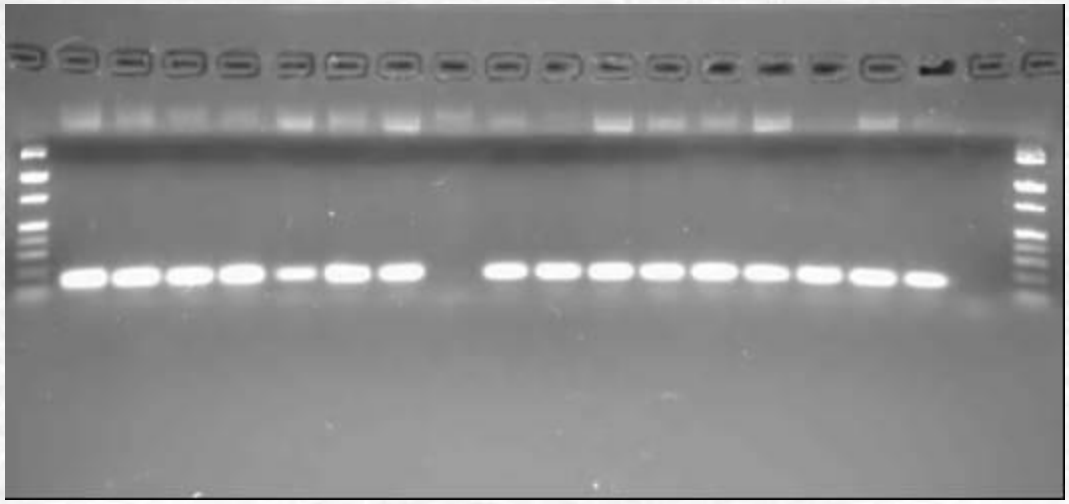
Wykrywanie i oznaczanie ilościowe *Pseudomonas aeruginosa* metodą filtracji membranowej wg normy PN EN ISO 16266:2009.

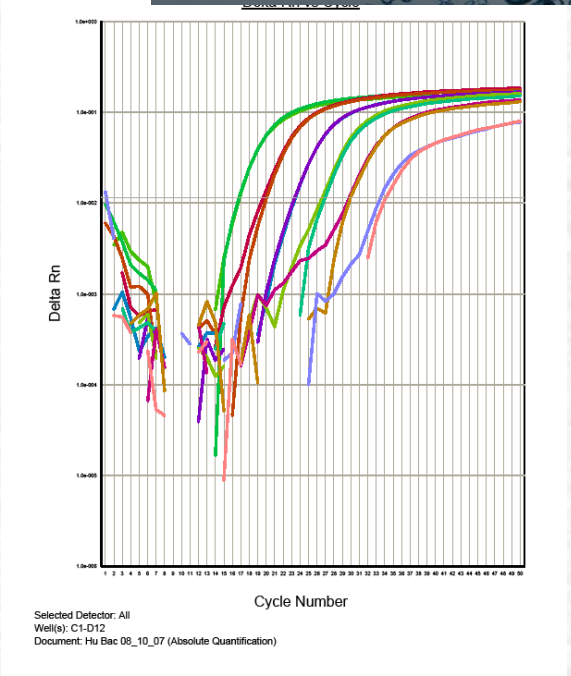
Wykrywanie i oznaczanie ilościowe bakterii z rodzaju *Legionella* metodą filtracji membranowej dla wód o małej liczbie bakterii wg normy PN ISO 11731-2:2008E.



Wykrywanie *Salmonella* z wód powierzchniowych i ścieków wg EN ISO 19250:2013

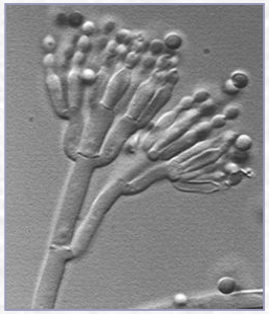
WODA - wskaźniki mikrobiologiczne





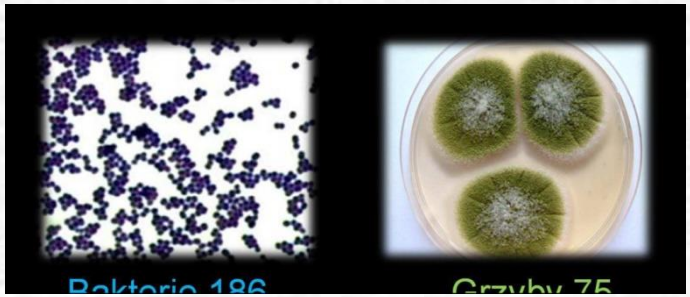
Gene target codes for outer membrane protein common to all known *E. coli: 116 bp*

POWIETRZE – wskaźniki mikrobiologiczne



Zanieczyszczenia mikrobiologiczne

- bakterie
- wirusy
- promieniowce
- grzyby i ich zarodniki
- ...



POWIETRZE – wskaźniki mikrobiologiczne

Rozporządzenie Ministra Zdrowia

w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki

Dz.U. 2005, nr 81 poz. 716 ze zm.: Dz.U. 2008, nr 48 poz. 288

Dziennik Ustaw Nr 81 — 5421 — Poz. 716

716

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA[1)]

z dnia 22 kwietnia 2005 r.

w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki[2)]

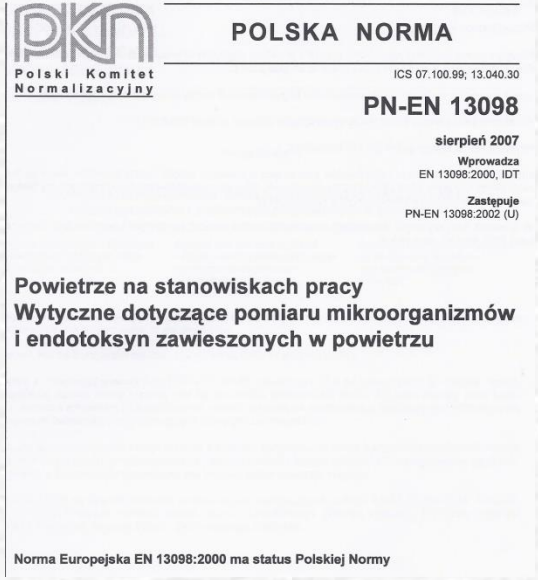
POWIETRZE – wskaźniki mikrobiologiczne

PN-89/Z04008/01 – Badania mikrobiologiczne. Postanowienia ogólne i zakres normy

PN-89/Z-04008/08 – Pobieranie próbek powietrza atmosferycznego (imisja) do badań mikrobiologicznych metodą aspiracyjną i sedymentacyjną

PN-89/Z-04111/02 – Oznaczenie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) metodą aspiracyjną i sedymentacyjną

PN-89/Z-04111/03 – Oznaczenie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) metodą aspiracyjną i sedymentacyjną



Polski Komitet Normalizacyjny

POLSKA NORMA

ICS 07.100.99; 13.040.30

PN-EN 13098

sierpień 2007

Wprowadza
EN 13098:2000, IDT

Zastępuje
PN-EN 13098:2002 (U)

Powietrze na stanowiskach pracy
Wytyczne dotyczące pomiaru mikroorganizmów i endotoksyn zawieszonych w powietrzu

Norma Europejska EN 13098:2000 ma status Polskiej Normy

Polski Komitet Normalizacyjny

POLSKA NORMA

ICS 13.040.30

PN-EN 14031

grudzień 2006

Wprowadza
EN 14031:2003, IDT

Zastępuje
PN-EN 14031:2004 (U)

Powietrze na stanowiskach pracy
Oznaczanie endotoksyn zawieszonych w powietrzu

Norma Europejska EN 14031:2003 ma status Polskiej Normy

Tabela 1. Ocena zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego przez bakterie

Table 1. The assessment of air pollution by bacteria

Ogólna liczba bakterii Total number of bacteria	Ogólna liczba promieniowców Total number of actinomycetes	Liczba gronkowców hemolizujących The number of haemolytic staphylococci		*Pseudomonas fluorescens*	Stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego The degree of atmospheric air pollution
		α	β		
jtk·m^{-3}	CFU·m^{-3}				
<1 000	<10	0	0	0	nie zanieczyszczone not contaminated
1 000–3 000	10–100	1–25	1–50	1–50	średnio zanieczyszczone slightly contaminated
>3 000	>100	>25	>50	>50	silnie zanieczyszczone highly contaminated

Źródło: opracowanie własne na podstawie PN-89/Z-04111/02.

Tabela 2. Ocena stopnia zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego przez grzyby

Table 2. The assessment of air pollution by fungi

Ogólna liczba grzybów jtk·m^{-3} Total number of fungi CFU·m^{-3}	Stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego The degree of atmospheric air pollution
3 000–5 000	przeciętnie czyste powietrze atmosferyczne moderately clean atmospheric air
5 000–10 000	zanieczyszczenie mogące negatywnie oddziaływać na środowisko naturalne człowieka contamination that may have a negative impact on human environment
>10 000	zanieczyszczenie zagrażające środowisku naturalnemu człowieka contamination hazardous for the natural human environment

POWIETRZE – wskaźniki mikrobiologiczne

PROPOZYCJE ZALECANYCH STĘŻEŃ

Czynnik mikrobiologiczny	Dopuszczalne stężenie	
	Pomieszczenia robocze zanieczyszczone pyłem organicznym	Pomieszczenia mieszkalne i użyteczności publicznej
Bakterie mezofilne	100000 jtk/m^3 *	5000 jtk/m^3
Bakterie Gram-ujemne	20000 jtk/m^3 *	200 jtk/m^3
Termofilne promieniowce	20000 jtk/m^3 *	200 jtk/m^3
Grzyby	50000 jtk/m^3 *	5000 jtk/m^3
Czynniki z grupy 3. i 4. zagrożenia	0 jtk/m^3	0 jtk/m^3
Endotoksyna bakteryjna	200 ng/m^3 (2000 JE/m^3)	5 ng/m^3 (50 JE/m^3)

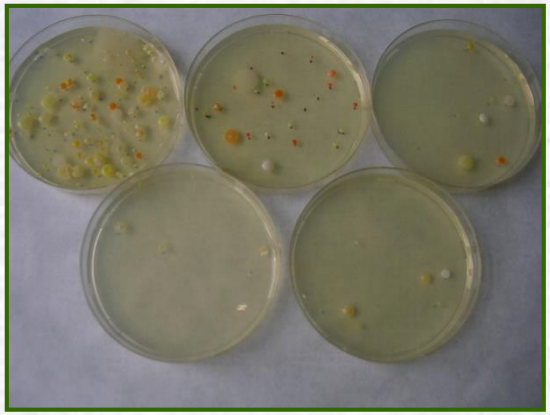
* Dla frakcji respirabilnej proponowane wartości powinny być o połowę niższe

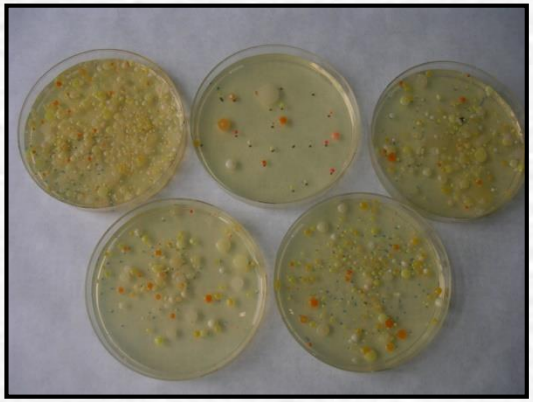
POWIETRZE – wskaźniki mikrobiologiczne

POWIETRZE ATMOSFERYCZNE: PROPOZYCJA NOWELIZACJI PN

Składnik bioaerozolu	Stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego	
	Akceptowalny	Nieakceptowalny
Bakterie razem	≤ 5000 jtk/m^3	> 5000 jtk/m^3
Bakterie Gram-ujemne	≤ 200 jtk/m^3	> 200 jtk/m^3
Termofilne promieniowce	≤ 200 jtk/m^3	> 200 jtk/m^3
Grzyby	≤ 5000 jtk/m^3	> 5000 jtk/m^3
Czynniki z grupy 3. i 4. zagrożenia	0 jtk/m^3	0 jtk/m^3
Endotoksyna	≤ 50 JE/m^3	> 50 JE/m^3

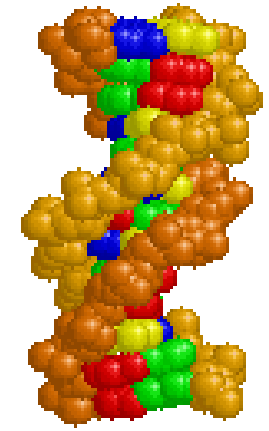
POWIETRZE – wskaźniki mikrobiologiczne



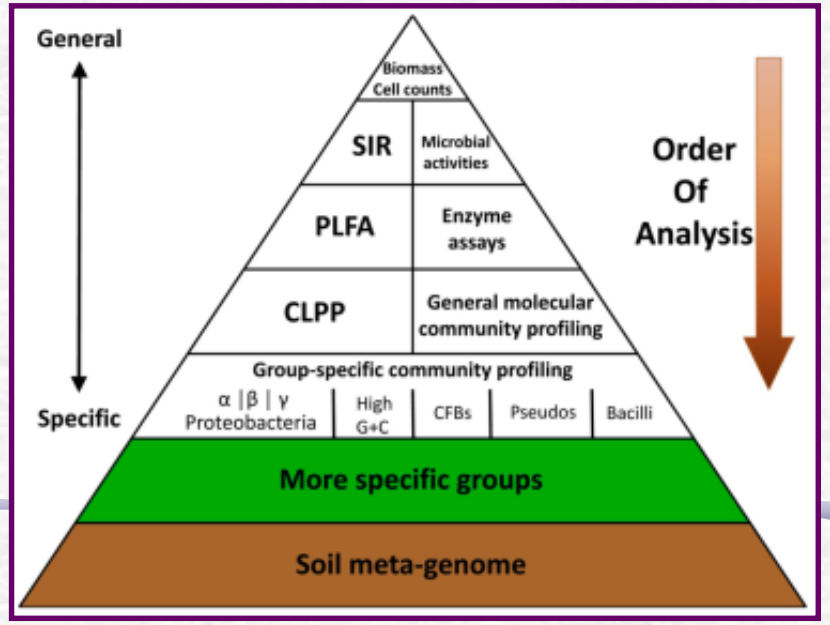


Nowoczesna mikrobiologia środowiska

GLEBA – wskaźniki mikrobiologiczne



- Biomasa i liczba mikroorganizmów (soil microbial biomass and numer)
- Aktywność mikrobiologiczna (soil microbial activity)
- Bioróżnorodność i struktura (soil microbial diversity and community structure)
- Współzależność roślina-mikroorganizm (plant-microbe interaction)



Europejskie Programy Monitorowania Jakości gleb

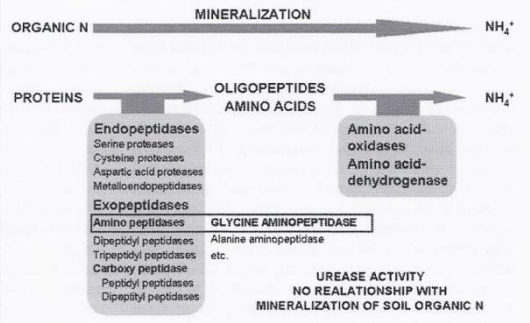
- **NIEMCY** – oddychanie, biomasa, aktywność enzymatyczna
- **HOLANDIA** – biomasa, C-mineralizacja, N-mineralizacja, DGGE, BIOLOG system
- **SZWAJCARIA** – biomasa, oddychanie, N-mineralizacja
- **CZECHY** – biomasa, oddychanie, N-mineralizacja, nitryfikacja, aktywność enzymatyczna
- **WIELKA BRYTANIA** – biomasa, oddychanie, aktywność enzymatyczna, BIOLOG system, analiza kwasów tłuszczowych (PLFA)
- **ESTONIA, FINLANDIA, WŁOCHY, ŁOTWA, SZWECJA** – oddychanie, aktywność enzymatyczna, N-mineralizacja
- **AUSTRIA** – biomasa, aktywność enzymatyczna, nitryfikacja

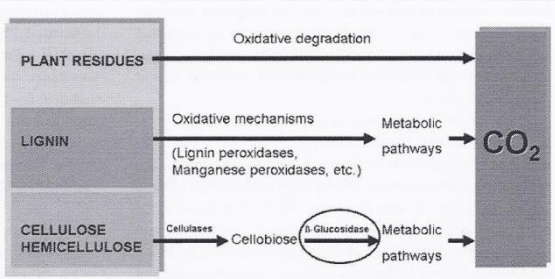
MDS (minimum data set) mikrobiologicznych wskaźników

	Country	Microbial indicators
1.	United Kingdom[a]	Microbial biomass; soil respiration; microbial diversity by Biolog; *Rhizobium* population; biosensor bacteria
2.	United States of America[a]	Microbial biomass; potential N-mineralization; soil respiration; soil enzymes
3.	Germany[a]	Soil respiration; microbial biomass; potential N-mineralization; soil enzymes; metabolic quotients
4.	The Netherlands[a]	Microbial biomass; potential C-mineralization; potential N-mineralization; microbial diversity by Biolog and DGGE
5.	Switzerland[b]	Microbial biomass; soil respiration; potential N-mineralization; arbuscular mycorrhizae
6.	Czech Republic[a]	Microbial biomass; soil respiration; nitrification; N-mineralization; soil enzymes
7.	Russia, Sweden[a], Finland	Soil respiration, soil enzymes; potential N-mineralization
8.	Austria[a]	Microbial biomass; soil enzyme; nitrification; mycorrhizae
9.	India[c]	Soil enzymes; soil respiration; microbial biomass

Modified from [a]Winding et al. 2005; [b]Mader et al. (2002); [c]Ramesh et al. (2004a, b); [c]Rao et al. (1995); [c]Sharma et al. (2005)

Aktywność enzymatyczna





Biol Fertil Soils (2012) 48:743–762
DOI 10.1007/s00374-012-0723-0

REVIEW

Soil enzymology: classical and molecular approaches

P. Nannipieri · L. Giagnoni · G. Renella · E. Puglisi ·
B. Ceccanti · G. Masciandaro · F. Fornasier ·
M. C. Moscatelli · S. Marinari

ELSEVIER
Soil Biology & Biochemistry 38 (2006) 1673–1681
www.elsevier.com/locate/soilbio

Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils

E. Puglisi[a], A.A.M. Del Re[a], M.A. Rao[b], L. Gianfreda[b,*]

Koncepcja Garbisu i wsp.

Contents lists available at ScienceDirect

Applied Soil Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsoil

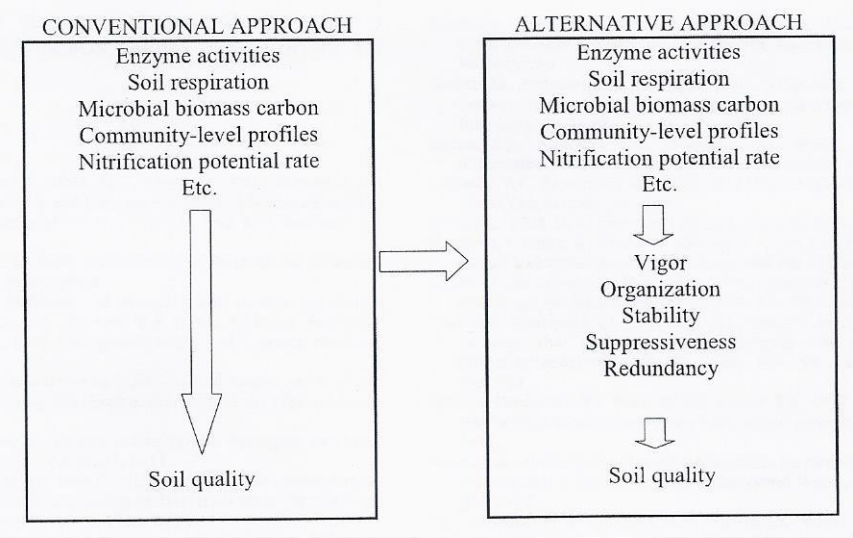
Viewpoint

Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance

Carlos Garbisu[a], Itziar Alkorta[b], Lur Epelde[a,*]

[a] NEIKER-Tecnalia, Soil Microbial Ecology Group, Berreaga 1, E-48160 Derio, Spain
[b] Dept. Biochemistry and Molecular Biology, University of the Basque Country, UPV/EHU, E-48080 Bilbao, Spain

App. Soil Ecol. 49(2011) 1-4



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Soil Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsoil

Microbial properties and attributes of ecological relevance for soil quality monitoring during a chemical stabilization field study

Lur Epelde, Aritz Burges, Iker Mijangos, Carlos Garbisu*

NEIKER-Tecnalia, Department of Ecology and Natural Resources, Soil Microbial Ecology Group, c/ Berreaga 1, E-48160 Derio, Spain

App. Soil Ecol. 75 (2014) 1-12

1.**Żywotność** – biomasa, oddychanie, aktywność enzymatyczna, ATP, produkcja roślinna

2. **Struktura** – PCR-DGGE, PLFA, mikromacierze, sekwencjonowanie

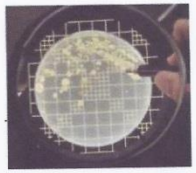
3. **Stabilność** – N-mineralizacja, nitryfikacja

4. **Supresja** – fitopatogeny i rośliny

5. **Występowanie** – specyficzne grupy, np. bakterie nitryfikacyjne, denitryfikacyjne (PCR-DGGE i mikromacierze)

DWA KIERUNKI BADAŃ

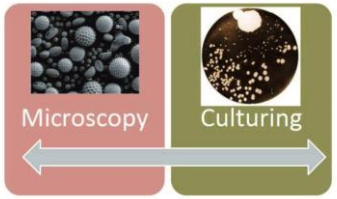
What to do once you have your cultures



- Direct counts (counting chambers/grids…)
- Culture density (for liquid cultures)
- Fancy experiments!

- Keep the culture (continuous culture/chemostat)
- Store the culture (e.g. glycerol stocks)

"Historical" approaches…



Always valuable tools

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

Journal of Microbiological Methods 58 (2004) 169–188

Journal of Microbiological Methods

www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Review

Methods of studying soil microbial diversity

Jennifer L. Kirk[a], Lee A. Beaudette[a,1], Miranda Hart[b], Peter Moutoglis[c], John N. Klironomos[b], Hung Lee[a], Jack T. Trevors[a,*]

[a] Department of Environmental Biology, University of Guelph, Ontario, Canada, Ontario N1G 2W1, Canada

FEMS

RESEARCH ARTICLE

Soil microbial diversity patterns of a lowland spring environment

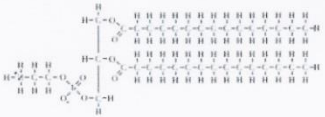
Sotirios Vasileiadis[1], Edoardo Puglisi[2], Maria Arena[1], Fabrizio Cappa[2], Johannes A. van Veen[3], Pier S. Cocconcelli[2] & Marco Trevisan[1]

[1]Institute of Agricultural and Environmental Chemistry, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy; [2]Institute of Microbiology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy; and [3]Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Wageningen, The Netherlands

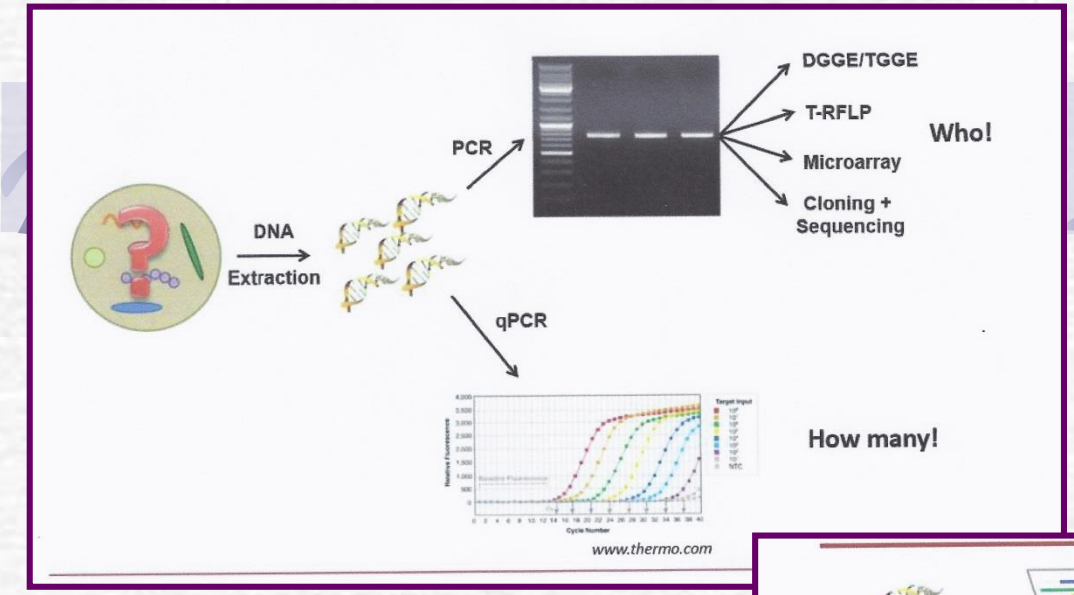
IV. Molecular Tools

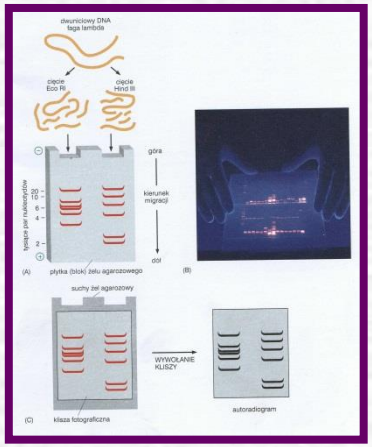
- *In vitro*
- No need for cultivation
- Total community or specific populations within a community

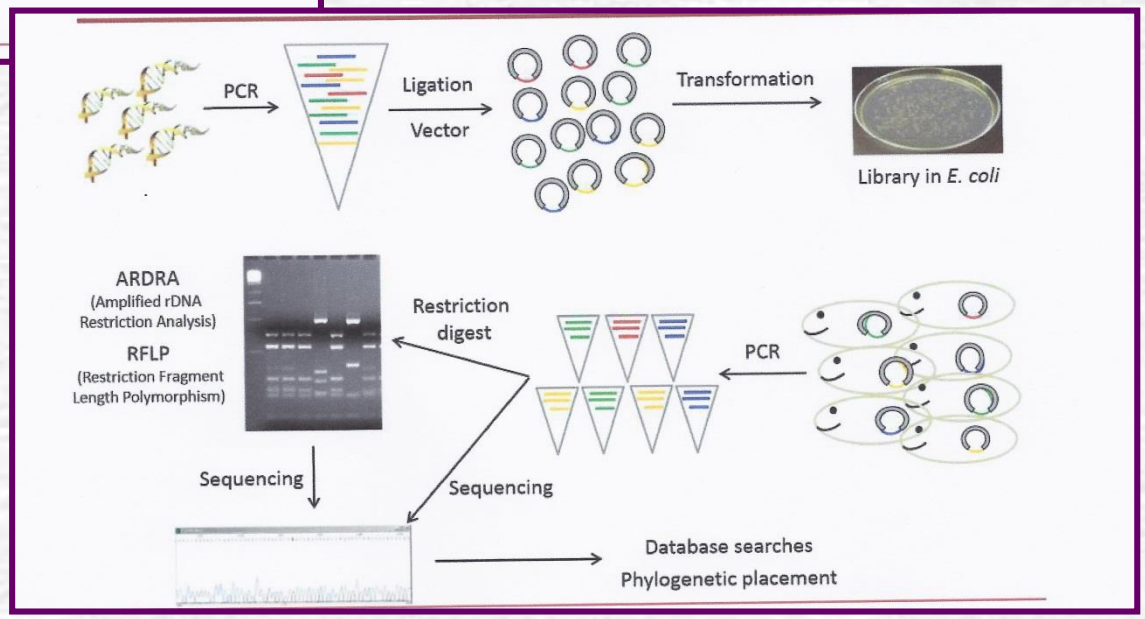
- Based on specific molecules:
  - Nucleic acids (DNA, RNA)
  - Proteins / Enzymes
  - Lipids



BADANIA MOLEKLARNE







METAGENOMIKA – badanie materiału genetycznego bezpośrednio z próbki środowiskowej

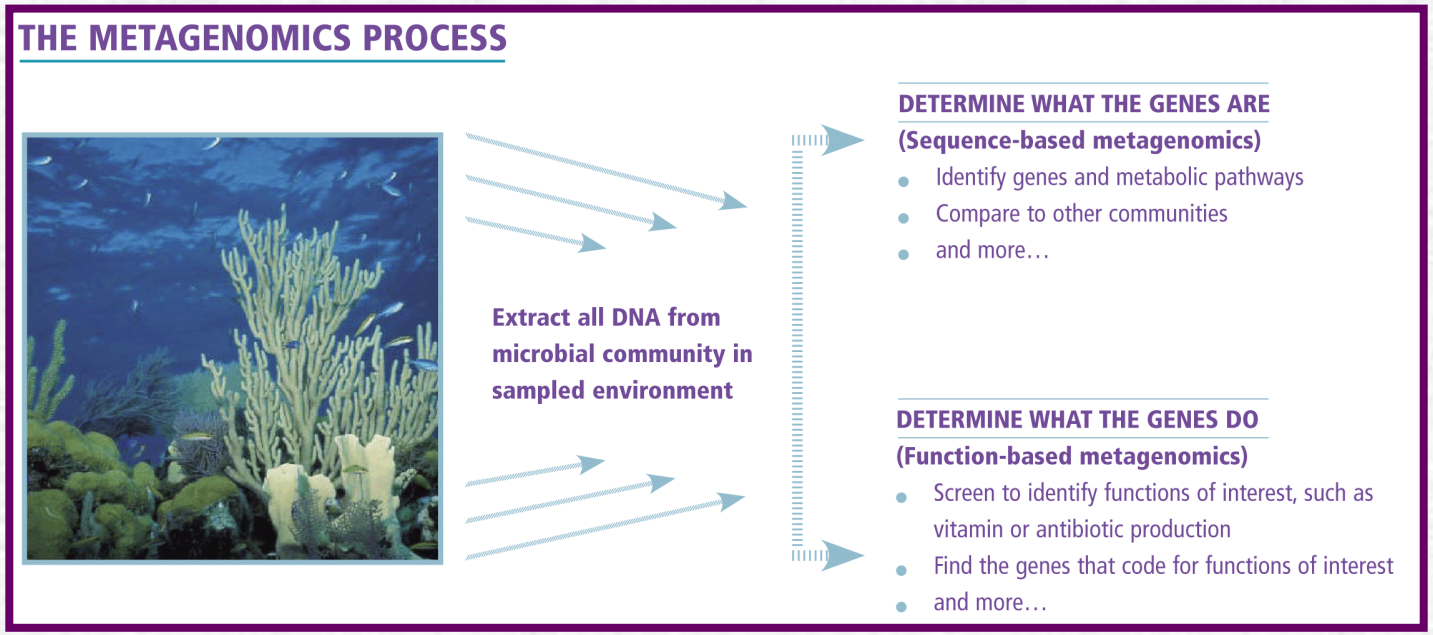
Thomas et al. Microbial Informatics and Experimentation 2012, 2:3
http://www.microbialinformaticsj.com/content/2/1/3

REVIEW Open Access

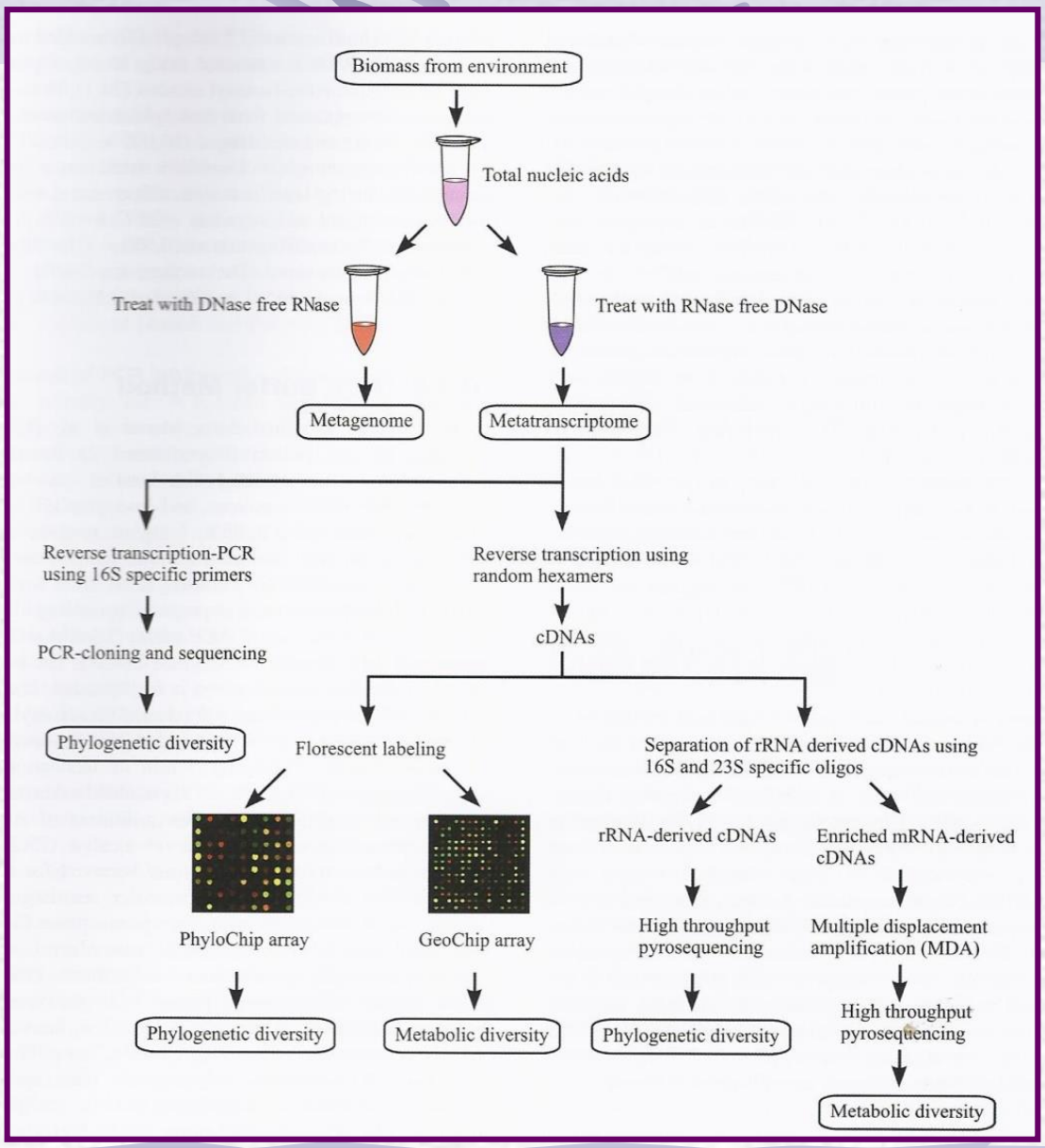
Metagenomics - a guide from sampling to data analysis

Torsten Thomas[1*], Jack Gilbert[2,3] and Folker Meyer[2,4]

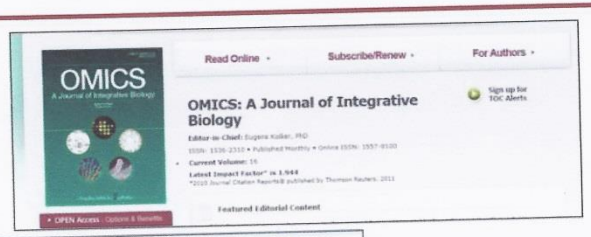
Genomika środowiskowa, Ekogenomika



BRAK informacji o aktywności i funkcji


Biomass from environment
Total nucleic acids
Treat with DNase free RNase
Treat with RNase free DNase
Metagenome
Metatranscriptome
Reverse transcription-PCR using 16S specific primers
Reverse transcription using random hexamers
PCR-cloning and sequencing
cDNAs
Phylogenetic diversity
Florescent labeling
Separation of rRNA derived cDNAs using 16S and 23S specific oligos
rRNA-derived cDNAs
Enriched mRNA-derived cDNAs
PhyloChip array
GeoChip array
High throughput pyrosequencing
Multiple displacement amplification (MDA)
Phylogenetic diversity
Metabolic diversity
Phylogenetic diversity
High throughput pyrosequencing
Metabolic diversity

V. "-Omics"



Caister Academic Press www.caister.com

Omics in Soil Science

Edited by: **Paolo Nannipieri, Giacomo Pietramellara and Giancarlo Renella**
(Department of Plant, Soil and Environmental Sciences, University of Firenze, Italy)

c. 200 (plus colour plates) pp, March 2014 ISBN: 978-1-908230-32-4, $319/£159
Published by: Caister Academic Press www.caister.com

Soil is a unique biological system with an abundant microflora and a very high microbial diversity capable of performing multiple key ecosystem functions. The detection of genes in soil has improved the knowledge of unculturable microorganisms and led to a greater understanding of potential soil metabolic pathways. Further advances in understanding soil functionality are being realised by harnessing omics technologies such as metagenomics, metatranscriptomics, proteomics and volatilomics. The next challenge of systems biology and functional genomics is to integrate the information from omic approaches to give a more complete picture of soil as a biological system.

This volume presents the state-of-the-art of omic applications in soil science, a field that is advancing rapidly on many fronts. Distinguished authors describe the application of metagenomics, metatranscriptomics and proteomics to soil science. In particular the book covers the current and emerging omics techniques and the contribution of these approaches to a better assessment of soil functionality. The authors also explore the specific problems encountered in the application of various omics technologies to soil science and the future research requirements necessary to overcome the current limitations in this area. Topics covered include soil functional genomics, soil metagenomics, soil microbial ecology, soil metatranscriptomics, soil proteomics, soil volatilomics and soil proteogenomics. Omics techniques are also discussed in comparison with classical techniques.

This book is both a practical guide and a recommended reference volume for all soil scientists.

Chapter 1. Soil as a Biological System. *Nannipieri Paolo*
Chapter 2. Functional Genomics Analysis of Key Bacterial Traits Involved in Rhizosphere Competence during Microbial-Host Interactions. *Matthieu Barret, John P. Morrissey and Fergal O'Gara*
Chapter 3. Soil Metagenomics: Potential Applications and Methodological Problems. *Jan Dirk van Elsas, Mariana Silvia Cretoiu, Anna Maria Kielak and Francisco Dini-Andreote*
Chapter 4. Screening Phylogenetic and Functional Marker Genes in Soil Microbial Ecology. *Sotirios Vasileiadis, Edoardo Puglisi, PierSandro Cocconcelli and Marco Trevisan*
Chapter 5. Soil Metatranscriptomics. *Yongkyu Kim, Carl-Eric Wegner and Werner Liesack*
Chapter 6. Soil Proteomics. *Giancarlo Renella, Laura Giagnoni, Mariarita Arenella and Paolo Nannipieri*
Chapter 7. Soil Volatile Organic Compounds as Tracers for Microbial Activities in Soils. *Heribert Insam*
Chapter 8. Proteogenomics: a New Integrative Approach for a Better Description of Protein Diversity Found in Soil Microflora. *Céline Bland and Jean Armengaud*
Chapter 9. Analysis of Soil Metagenomes using the MEtaGenome ANalyzer (MEGAN). *Daniel H. Huson and Nico Weber*
Chapter 10. Classical Techniques versus Omics Approaches. *David D. Myrold and Paolo Nannipieri*

"-Omics"

"**Omics** informally refers to a field of study in biology ending in *-omics*, such as **genomics, proteomics** or **metabolomics**. The related suffix **-ome** is used to address the objects of study of such fields, such as the **genome, proteome** or **metabolome**...."

www. en.wikipedia.org

DNA
↓
Genome
↓
Genomics

→

mRNA
↓
Transcriptome
↓
Transcriptomics

→

Proteins
↓
Proteome
↓
Proteomics

Same GENOME
but
different PROTEOME

Metatranscriptomics

Approach:

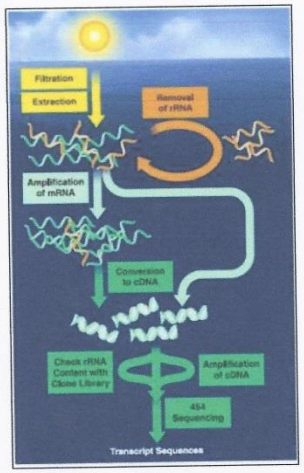
- "Metagenomics" based on mRNA

ADVANTAGES

- Detection of transcribed genes only
- Identification of processes simultaneously mediated in a community

DISADVANTAGES

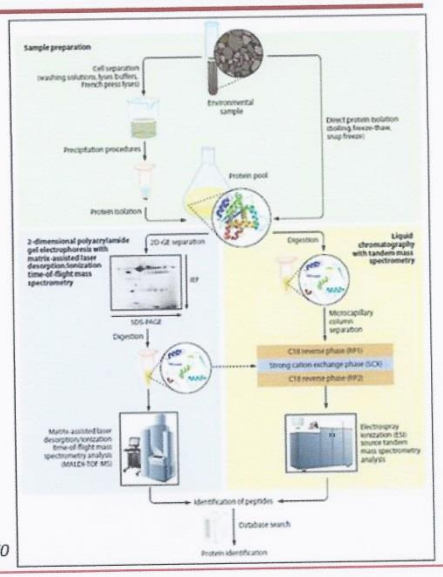
- Extraction of mRNA from environmental samples challenging
- Data analysis and annotation
- Predicted function versus real function?



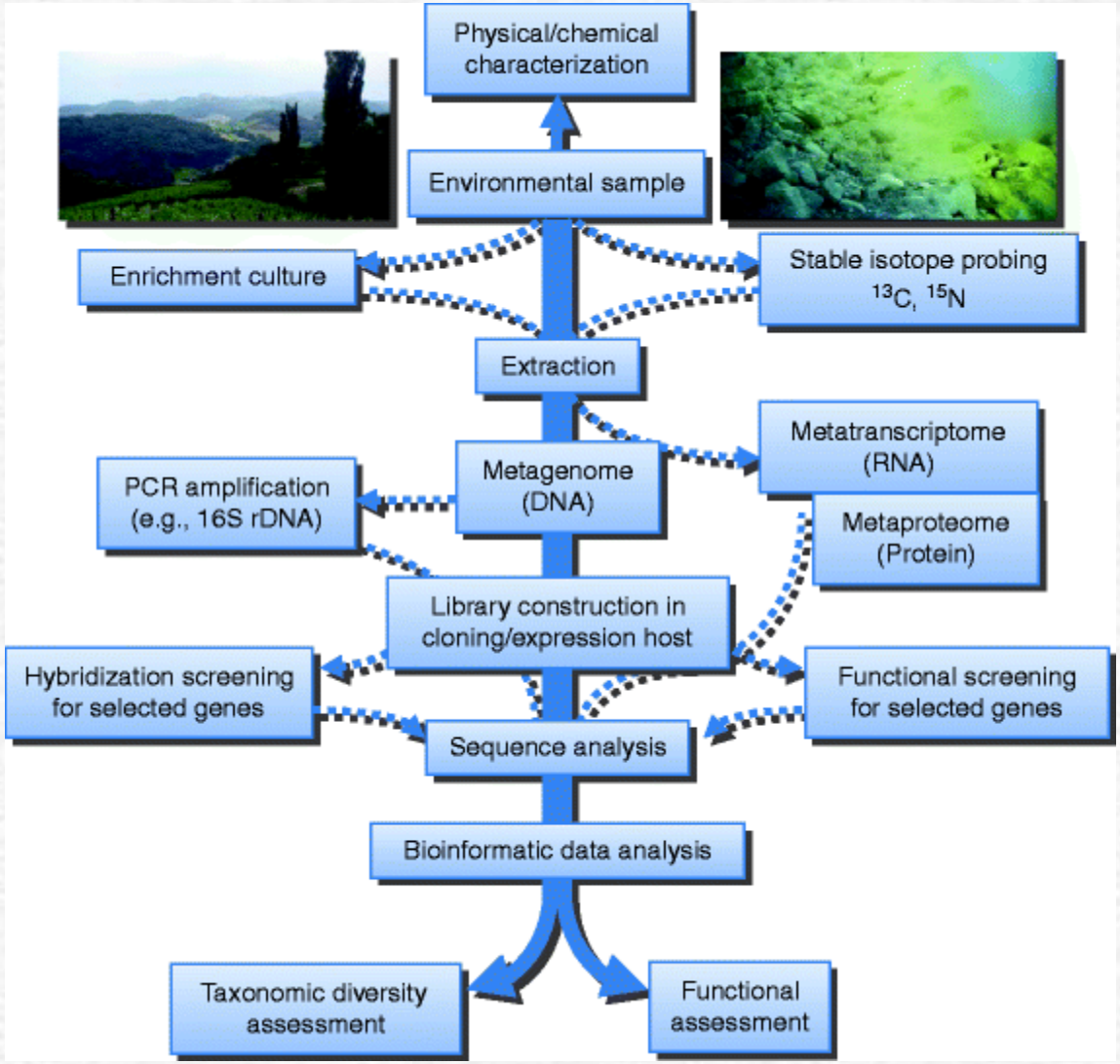
Moran, 2009, Microbe Magazine 4(7)

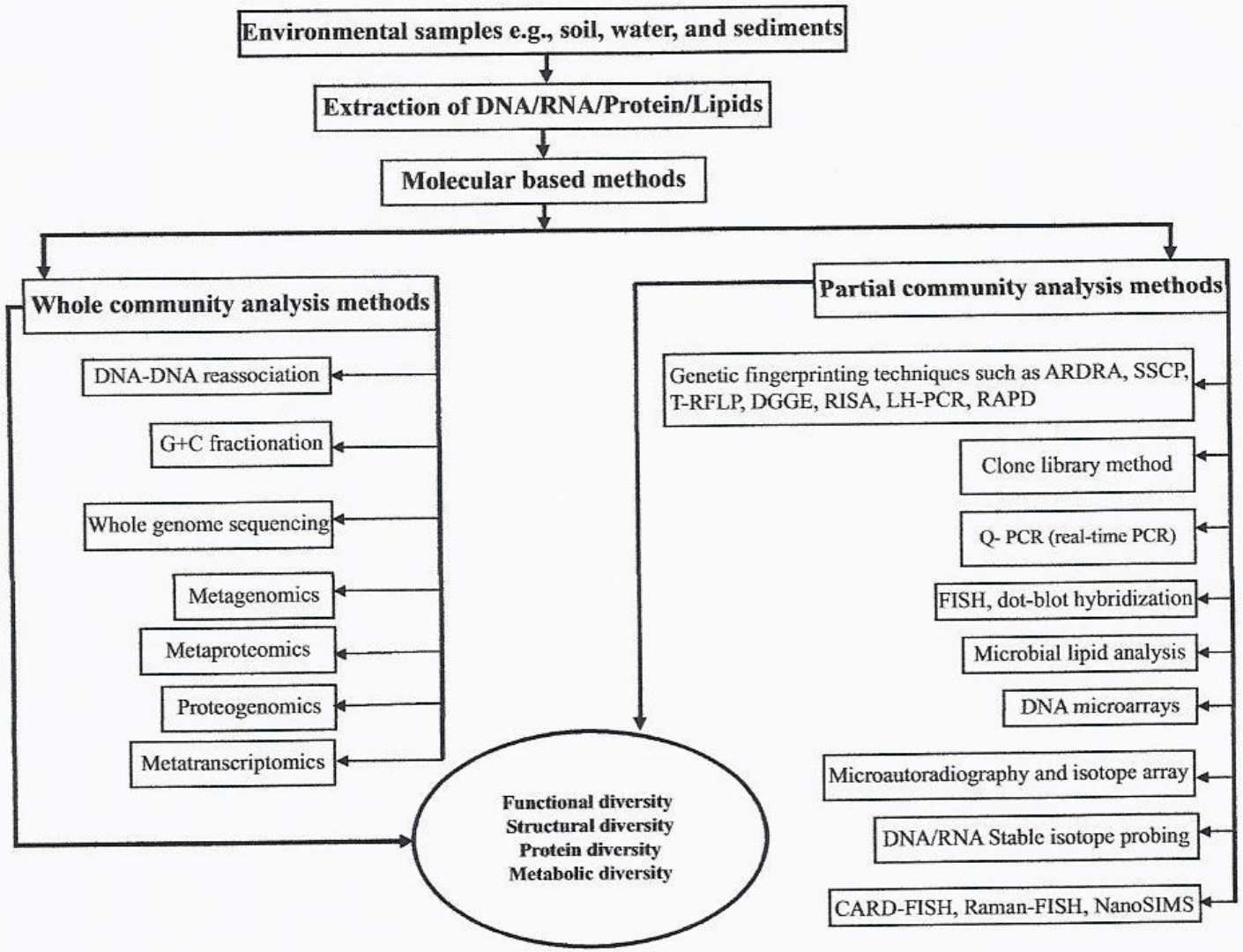
Metaproteomics

- Approach
  - Extraction of proteome from environmental sample
  - Digestion and analysis of peptides (2D-gels, mass spectrometry)
  - Identification of individual peptides through database searches



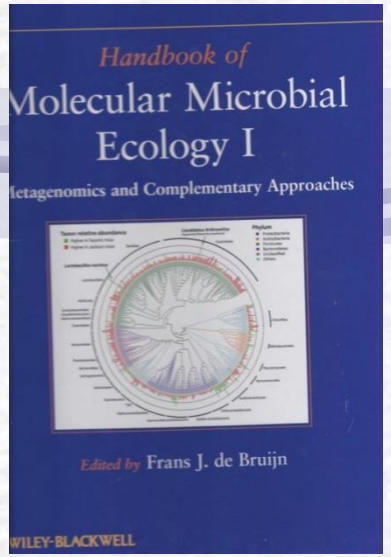
Keller and Hettich, 2009,
Microbiology and Molecular Biology Reviews, 73:62-70


Physical/chemical characterization
Environmental sample
Enrichment culture
Stable isotope probing
^{13}C, ^{15}N
Extraction
Metatranscriptome (RNA)
PCR amplification (e.g., 16S rDNA)
Metagenome (DNA)
Metaproteome (Protein)
Library construction in cloning/expression host
Hybridization screening for selected genes
Functional screening for selected genes
Sequence analysis
Bioinformatic data analysis
Taxonomic diversity assessment
Functional assessment


Environmental samples e.g., soil, water, and sediments
Extraction of DNA/RNA/Protein/Lipids
Molecular based methods
Whole community analysis methods
DNA-DNA reassociation
G+C fractionation
Whole genome sequencing
Metagenomics
Metaproteomics
Proteogenomics
Metatranscriptomics
Partial community analysis methods
Genetic fingerprinting techniques such as ARDRA, SSCP, T-RFLP, DGGE, RISA, LH-PCR, RAPD
Clone library method
Q- PCR (real-time PCR)
FISH, dot-blot hybridization
Microbial lipid analysis
DNA microarrays
Microautoradiography and isotope array
DNA/RNA Stable isotope probing
CARD-FISH, Raman-FISH, NanoSIMS
Functional diversity
Structural diversity
Protein diversity
Metabolic diversity

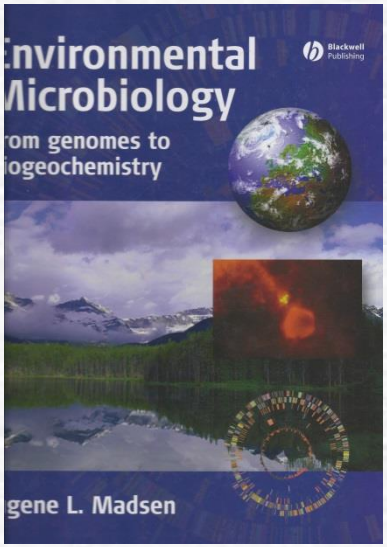
Handbook of Molecular Microbial Ecology I, II
Metagenomics and Complementary Approaches
Metagenomics in Different Habitants

F. J. de Bruijn



Environmental Microbiology
From Genomes to Biogeochemistry

E. L. Madsen



EcoPlate™

Biolog system – płytki Eco

A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α-Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ-Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Carbohydrates
- α-D-Lactose
- D-Cellobiose
- D-Mannitol
- D-Xylose
- I-Erythritol
- *N*-Acetyl-D-glucosamine
- ß-Methyl-D-glucoside

Polymers
- α-Cyclodextrin
- Glycogen
- Tween 40
- Tween 80

Carboxylic acids
- 2-Hydroxy benzoic acid
- 4-Hydroxy benzoic acid
- α-Ketobutyric acid
- D-Galactonic acid γ-lactone
- D-Galacturonic acid
- D-Glucosaminic acid
- D-Malic acid
- γ-Hydroxybutyric acid
- Itaconic acid

Amines
- Phenylethylamine
- Putrescine

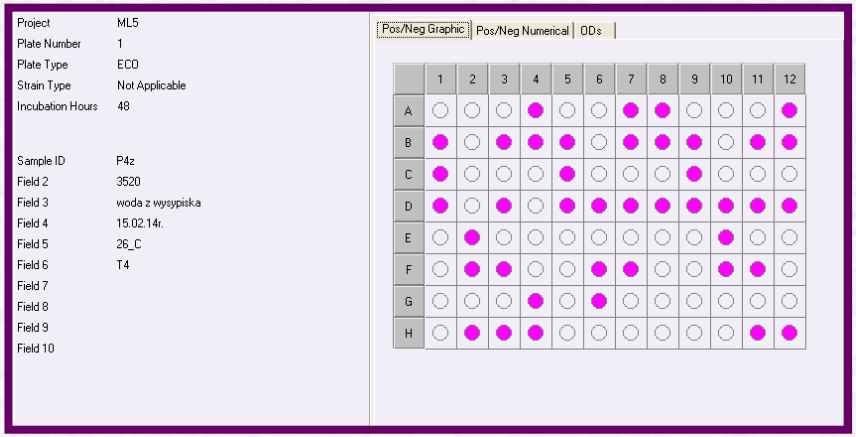
Amino acids
- Glycyl-L-glutamic acid
- L-Arginine
- L-Asparagine
- L-Phenylalanine
- L-Serine
- L-Threonine

Miscellaneous
- D,L-α-Glycerol phosphate
- Glucose-1-phosphate
- Pyruvic acid methyl ester

Biolog system – płytki Eco

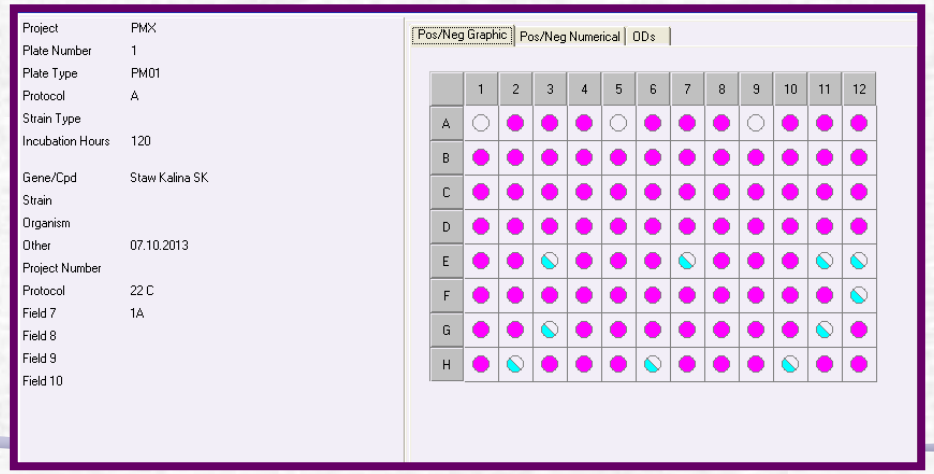
Project	ML5
Plate Number	1
Plate Type	ECO
Strain Type	Not Applicable
Incubation Hours	48
Sample ID	poprocesowa woda
Field 2	15.02.14r.
Field 3	26_C
Field 4	T4
Field 5	
Field 6	
Field 7	
Field 8	
Field 9	
Field 10	

Pos/Neg Graphic | Pos/Neg Numerical | ODs



Project	ML5
Plate Number	1
Plate Type	ECO
Strain Type	Not Applicable
Incubation Hours	48
Sample ID	P4z
Field 2	3520
Field 3	woda z wysypiska
Field 4	15.02.14r.
Field 5	26_C
Field 6	T4
Field 7	
Field 8	
Field 9	
Field 10	

Pos/Neg Graphic | Pos/Neg Numerical | ODs

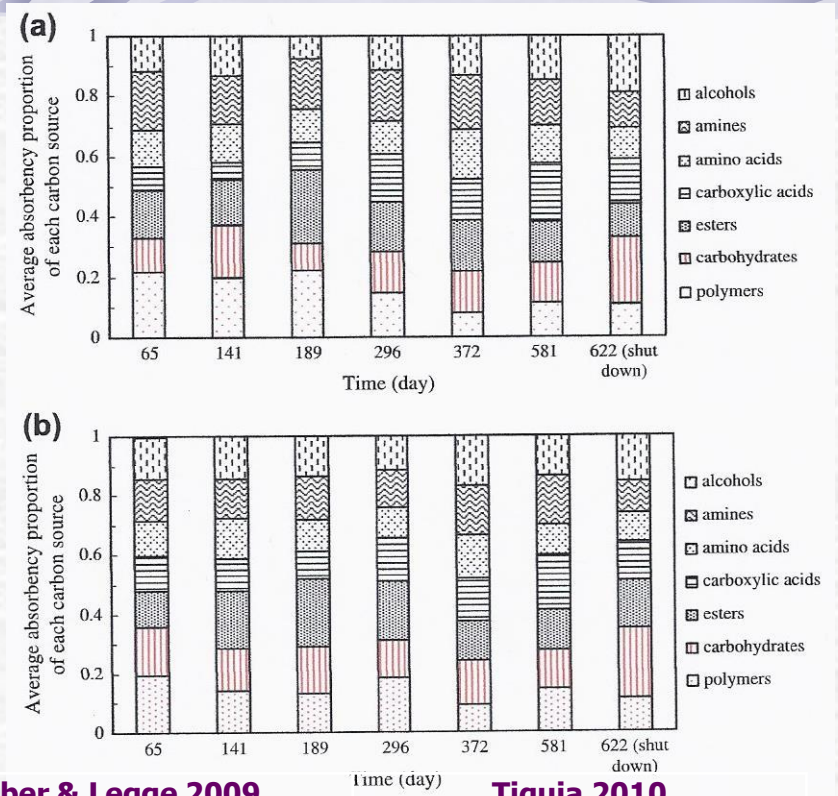


Project	PMX
Plate Number	1
Plate Type	PM01
Protocol	A
Strain Type	
Incubation Hours	120
Gene/Cpd	Staw Kalina SK
Strain	
Organism	
Other	07.10.2013
Project Number	
Protocol	22 C
Field 7	1A
Field 8	
Field 9	
Field 10	

Pos/Neg Graphic | Pos/Neg Numerical | ODs

WYNIKI BADAŃ – EcoPlates

Indices	Phenolic water	Post-processing water
AWCD (average well-color development)	1.5	0.17
AUC (Area Under the Curve)	740.10	100.21
H (Shannon-Weiner diversity index)	1.46	1.47
E (Shannon Evenness)	0.98	0.98
S (Substrate richness)	30	1.33



CARBON SOURCES	TECHNOLOGY A			TECHNOLOGY B			TECHNOLOGY C			
	IN	EF	LS	IN	EF	RM	IN	EF	BBM	LS
Amines & Amides (A & A)										
Phenylethylamine										
Putrescine										
Aminoacids (AA)										
Glycyl-Lghtamic Acid										
L-Arginine										
L-Asparagine										
L-Phenylalanine										
L-Serine										
L-Threonine										
Carboxylic & acetic acids (C & AA)										
γ- Hydroxybutyric Acid										
α-Ketobutyric Acid										
2-Hydroxy Benzoic Acid										
4-Hydroxy Benzoic Acid										
D-Galactonic Acid γ-Lactone										
D-galacturonic Acid										
D-glucosaminic Acid										
D-Malic Acid										
Itaconic Acid										
Carbohydrates (Carb)										
α-D-Lactose										
β-Methyl-D-Glucoside										
D-Cellobiose										
D-Mannitol										
D-Xylose										
i-Erythritol										
N-Acetyl-D-Glucosamine										
D,L-α-Glycerol Phosphate										
Glucose-1-Phosphate										
Pyruvic Acid Methyl Ester										
Polymers (Poly)										
α-Cyclodextrin										
Glycogen										
Tween 40										
Tween 80										
Σ	23	8	20	23	31	31	22	21	26	21
SUBSTRATES ≥ 4%	11	6	10	15	3	2	13	11	6	9

CLPPs

(Weber & Legge, 2009)

Zag et all. 1994

- Amines & Amides (A & A)
- Aminoacids (AA)
- Carboxylic acids (C A)
- Carbohydrates (Carb)
- Polymers (Poly)
- Miscellaneous (M)

Weber & Legge 2009

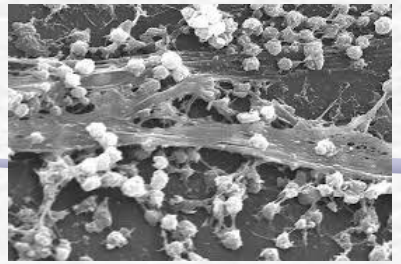
- Amines & Amides (A & A)
- Aminoacids (AA)
- Carboxylic & acetic acids (C & AA)
- Carbohydrates (Carb)
- Polymers (Poly)

Tiquia 2010

- Amines & Amides (A & A)
- Aminoacids (AA)
- Carboxylic acids (C A)
- Carbohydrates (Carb)
- Polymers (Poly)
- Phenolic compunds (PhC)

BADANIA

- gleby zanieczyszczone metalami ciężkimi; efektywność procesów remediacyjnych
- charakterystyka zwałowisk odpadów popłuczkowych dawnej kopalni rud Pb/Zn
- wody przemysłowe: wody zanieczyszczone związkami fenolowymi; wody z podziemnego zgazowania węgla
- odcieki z wysypiska odpadów komunalnych
- rozkład foli polietylenowych przez populacje mikroorganizmów w kompoście
- charakterystyka biofilmu sieci dystrybucji wody pitnej
- charakterystyka ścieków z przydomowych oczyszczalni ścieków



DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ