

Читать
онлайн
Read
online

Ракитина Д.В., Асланова М.М., Мания Т.Р.

Методика выделения ДНК из образцов почвы

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управление медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Россия

Введение. Даже в городских условиях человек находится в постоянном контакте с почвой как объектом окружающей среды. При этом с почвенным загрязнением могут переноситься различные патогены, в том числе и опасные для животных и человека. В связи с этим остро стоит вопрос разработки методик для совершенствования мониторинга таких патогенных объектов. Метод ПЦР широко применяется в лабораторной практике, позволяя выявить и некультивируемые типы патогенов.

Цели и задачи – подобрать методику эффективного выделения из почвенных образцов ДНК, пригодной для проведения ПЦР-анализа.

Материалы и методы. Выделение ДНК из образцов поверхностного слоя дерново-подзолистого грунта проводили с использованием как химических реактивов, так и готовых коммерческих (но не специализированных) наборов. ПЦР-анализ проводили методом детекции в режиме реального времени.

Результаты. Проанализировано четыре основных метода выделения ДНК из почвы в различных сочетаниях друг с другом и с тремя видами предварительной и постобработки. Хотя ДНК выделялась из почвы всеми методами, но без дополнительной очистки она была непригодна для постановки ПЦР. Показана необходимость обработки образцов солями кальция для удаления гуминовых кислот, ингибирующих ПЦР. В результате выбраны два метода выделения ДНК из почвы. В обоих первые стадии сочетали метод с использованием бромида цетримония (СТАВ) и предобработку CaCO_3 . Более чувствительный и более дешёвый метод предполагает на третьей стадии постобработку CaCl_2 . Другой метод сильно уступает в чувствительности, но выигрывает в воспроизводимости, при его использовании третья стадия включает очистку на колонках из набора Qiagen.

Ограничения исследования. При отработке методики выделения ДНК для ПЦР-анализа были изучены образцы только одного типа почв – дерново-подзолистого грунта. Поэтому методика может быть применена только для этого типа почв.

Заключение. Разработанные методы применимы при оценке с применением метода ПЦР загрязнённости почв дерново-подзолистого типа патогенными организмами.

Ключевые слова: почва; ДНК; ПЦР; кальций; СТАВ

Соблюдение этических стандартов: исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Для цитирования: Ракитина Д.В., Асланова М.М., Мания Т.Р. Методика выделения ДНК из образцов почвы. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(5): 567–571. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-567-571>

Для корреспонденции: Мания Тамари Резоевна, науч. сотр. лаб. микробиологии и паразитологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: TManiya@cspmrz.ru

Участие авторов: Ракитина Д.В. – концепция и дизайн исследования, отбор образцов, написание текста, выделение ДНК и ПЦР-анализ; Асланова М.М. – концепция и дизайн исследования, отбор образцов, написание текста; Мания Т.Р. – редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках НИР «Разработка унифицированных методов, включающих отбор проб, для осуществления определения микробиологического и паразитологического загрязнения сточных вод» (шифр «Сточные воды») АААА-А21-121011190012-3.

Поступила: 09.02.2022 / Принята к печати: 21.04.2022 / Опубликована: 31.05.2022

Darya V. Rakitina, Mariya M. Aslanova, Tamari R. Maniya

The method of DNA extraction from soil samples

Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation

Introduction. Even in the modern urban environment humans are in constant direct and indirect contact with soil. This leads to the spread of a wide range of soil-transmitted human and animal pathogens. Therefore, the development of fast and inexpensive methods of analysis and monitoring of these pathogenic objects is of great importance. PCR method is widely applied in laboratory practice and is able to detect even the uncultivated types of pathogens.

The aim of the study was to optimize the method of DNA isolation from soil, making it suitable for PCR-assay.

Materials and methods. DNA was isolated from the samples of surface layer of forest soil rich in humus, using lab-shelf chemicals and/or commercial kit. RT-PCR-test was performed using universal bacterial primers.

Results. We have analyzed various combinations of four extraction methods and three pre- and post-treatment methods. DNA was efficiently extracted by all methods, however, without additional purification stages it was unsuitable for PCR. The calcium salts treatment was demonstrated to be necessary for removal of PCR inhibitors, presumably humic acids. Two DNA isolation methods were developed. Both methods use incubation with CaCO_3 suspension followed by cetrimonium bromide lysis. More sensitive and inexpensive method uses CaCl_2 as an additional purification stage. The less sensitive but more reproducible method included DNA isolation on Qiagen DNA (Qiagen) columns.

Limitations. When working out the technique of DNA isolation for PCR analysis, samples of the only sod-podzolic soil were studied. Therefore, the technique can be applied only for this type of soil.

Conclusion. Both methods optimized in this study can be used for evaluation of soil samples for the presence of pathogens by PCR.

Keywords: soil; DNA; PCR; calcium; CTAB

Compliance with ethical standards. This study does not require biomedical committee approval or other documents.

For citation: Rakitina D.V., Aslanova M.M., Maniya T.R. DNA extraction from soil samples. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(5): 567–571. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-567-571> (In Russian)

For correspondence: Tamari R. Maniya, researcher of Microbiology and Parasitology laboratory of the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: TManiya@cspmrz.ru

Information about the authors:Rakitiina D.V., <https://orcid.org/0000-0003-3554-7690> Aslanova M.M., <https://orcid.org/0000-0002-5282-3856> Mania T.R., <https://orcid.org/0000-0002-6295-661X>**Contribution:** *Rakitiina D.V.* – concept and design of research, sampling, writing text, DNA isolation and PCR analysis. *Aslanova M.M.* – concept and design of research, sampling, writing text. *Maniya T.R.* – editing. *All authors* are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.**Acknowledgment.** The research was carried out within the framework of the research work «Development of unified methods, including sampling, for the determination of microbiological and parasitological contamination of wastewater» (code “Wastewater”) No. 145.001.21.6 dated 12.11.2021.

Received: February 02, 2022 / Accepted: April 21, 2022 / Published: May 31, 2022

Введение

Даже в городских условиях человек находится в постоянном контакте с почвой как объектом окружающей среды. При этом с почвенным загрязнением могут переноситься различные патогены, в том числе и опасные для животных и человека [1, 2]. В связи с этим актуальной является разработка методик для облегчения мониторинга таких патогенных объектов.

Бактериальные и грибные почвенные патогены могут быть выявлены методом культивирования, как описано в МУ 1446-76 «Методические указания по санитарно-микробиологическому исследованию почвы». Однако существует целый ряд некультивируемых, но не менее опасных типов патогенов (например, паразитарные), которые в настоящее время выявляются только в ходе микроскопического исследования. В санитарно-паразитологической диагностике почв (песка, почвенного осадка сточных вод) используется набор методов, изложенных в МУК 4.2.2661-10 «Методы санитарно-паразитологических исследований» и ряде других документов. ПЦР-анализ способен облегчить рутинную практику выявления этих патогенов и улучшить качество мониторинга и предотвращения таких угроз здоровью человека и животных.

Данные литературы свидетельствуют о том, что в образцах почвы могут содержаться ингибиторы ПЦР, например, гуминовые кислоты [3, 4]. Помимо специальных наборов для выделения ДНК из почвы (DNeasy PowerMax Soil Kit, Mo Bio PowerSoil), в литературных источниках упоминаются следующие методы избавления от ингибиторов:

- осаждение кислот с помощью СТАВ (бромид цетримиона) [5, 6];
- обработка полиэтиленгликолем в присутствии 1,5 М NaCl [7];
- осаждение кислот путём обработки солями кальция. В последнем случае проблема заключается в том, что кальций сам по себе является мощным ингибитором ПЦР, поэтому от него следует избавляться либо добавлением специфического хелата EGTA, либо дополнительной очисткой (на колонке для выделения ДНК или переосаждением), либо добавлением избытка магния в ПЦР-смесь (5–10 мМ) [8].

Таким образом, *цель настоящей работы* – подобрать методику эффективного выделения из почвенных образцов ДНК, пригодной для проведения ПЦР-анализа.

Материалы и методы

Образцы почвы. Образцы почвы для выделения ДНК были отобраны в лесопарковой зоне на территории г. Москвы. Такой тип почв был выбран как пример объекта, содержащего, с одной стороны, достаточно богатую микробиоту, а с другой – большие количества продуктов растительного распада, предположительно негативно влияющих на выделение ДНК и дальнейший ПЦР-анализ [9]. Отбор производили лабораторным совком. С каждой пробной площадки отбиралась 1 объединённая проба весом 200 г, состоящая из 10 точечных проб массой 20 г каждая. Точечные пробы отбирались на пробной площадке методом конверта, по диагонали, размер пробной площадки составлял 5 × 5 м. Затем эта почвенная масса была подвергнута тщательному перемешиванию и разделена на аликвоты для выделения ДНК разными методами.

Методы выделения ДНК. Были применены различные методы выделения ДНК.

Методика выделения ДНК со СТАВ (бромидом цетримиона) [5]. Важной частью почвенных патогенов являются паразиты, представленные в виде жизненных форм с прочными, устойчивыми к разрушению оболочками, например, яиц и ооцист. Цель использования СТАВ как катионного детергента состоит в облегчении лизиса как этих оболочек, так и эукариотических тканей внутри них. Образец почвы ресуспендировали в равном объёме буфера со СТАВ (2%-й СТАВ, 100 мМ трис-НСl pH = 7,5; 1 мМ ЭДТА; 1,5 М NaCl) и инкубировали течение 30 мин при температуре плюс 60 °С. После охлаждения добавляли равный объём хлороформа, встряхивали на вортексе 3 мин, инкубировали 5 мин на столе и центрифугировали при 16 000 g в течение 30 мин при температуре плюс 4 °С. К отобранной водной фазе добавляли равный объём изопропанола и ацетат натрия до 0,3 М. Инкубировали в течение 1 ч при температуре минус 20 °С, затем центрифугировали при 16 000 g в течение 20 мин при температуре плюс 4 °С. Осадок подсушивали 10 мин при комнатной температуре, растворяли в ТЕ-буфере (20 мМ трис-НСl pH 7,5; 1 мМ ЭДТА).

Методика выделения по С. Yeates (1998) [7] с изменениями. К навеске почвы добавляли равный объём буфера для экстракции (100 мМ трис-НСl pH 8,0; 100 мМ ЭДТА; 1,5 М NaCl), равный объём стеклянных шариков (диаметром 1–3 мм), 1/10 объёма 10%-го додецилсульфата натрия (ДСН) и встряхивали 10 мин на гомогенизаторе Qiagen TissueLyser II (Qiagen, Нидерланды). Далее отделяли жидкость от стеклянных шариков и инкубировали при температуре плюс 65 °С в течение 1 ч. Центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин. К супернатанту добавляли равный объём раствора полиэтиленгликоля (30%-й раствор полиэтиленгликоля в 1,5 М растворе NaCl) и инкубировали при комнатной температуре 2 ч. Центрифугировали при 10 000 g в течение 20 мин. Осадок разбавляли в ТЕ-буфере (0,5 объёма от исходного), добавляли ацетат калия до концентрации 0,5 М. После 5-минутной инкубации во льду центрифугировали при 16 000 g в течение 30 мин при температуре плюс 4 °С для преципитации белков и полисахаридов. После очистки фенол-хлороформом осаждали ДНК добавлением 0,6 объёма изопропанола и инкубацией в течение 2 ч при комнатной температуре, затем центрифугировали при 16 000 g в течение 30 мин при температуре плюс 4 °С. Осадок растворяли в ТЕ-буфере.

Методика выделения по М. Sagova-Marečkova (2008) [8] с модификациями. Образец почвы обрабатывали на гомогенизаторе, как описано выше, центрифугировали при 16 000 g в течение 2 мин. Супернатант подвергали очистке смесью фенола-хлороформа и затем хлороформом. К водной фракции добавляли равный объём СТАВ буфера и инкубировали при температуре плюс 65 °С в течение 30 мин. Далее очищали по протоколу выделения со СТАВ буфером.

Очистку с помощью набора Qiagen Blood & Tissue Kit (Qiagen, Нидерланды) проводили согласно протоколу производителя.

В дополнение к методам очистки были использованы следующие варианты предобработки образцов.

1) Предварительная инкубация в течение 1 ч с 1 М взвесью CaCO₃ со встряхиванием (предполагается, что кислоты связывались, а свободного кальция в растворе не появлялось) [8].

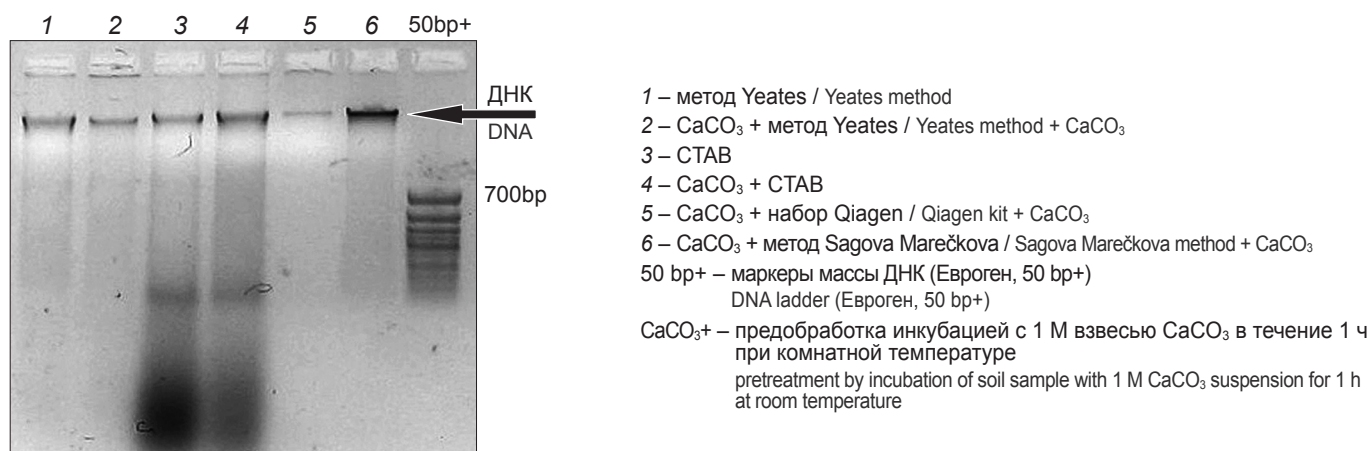


Рис. 1. Выделение ДНК из почвы различными методами. Показан результат электрофореза (агарозный гель 1% TBE, окраска бромистым этидием, нанесена 1/40 часть ДНК, выделенной из 0,5 г почвы).

Fig. 1. The comparison of quantity of DNA extracted from soil by various methods. Electrophoresis gel (1% agarose on TBE, ethidium bromide staining, in each lane 1/40 part of DNA extracted from 0.5 grams of soil).

2) Добавление в буфер для экстракции 50 мМ CaCl₂ (предполагалось, что гуминовые кислоты выпадут в осадок, а от свободного кальция удастся избавиться в процессе очистки ДНК) [10].

3) Инкубирование лизата со взвесью активированного угля [11, 12].

ПЦР-анализ. ПЦР-анализ производили на приборе Bio-Rad Real-Time PCR CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) с использованием реактивов набора для ПЦР с Taq-полимеразой (PK114, Евроген) согласно протоколу производителя. Реакцию детектировали с помощью флуоресцентного красителя Sybr Green (PB025M, Евроген), добавленного в реакционную смесь согласно инструкции производителя. Применяли синтетические олигонуклеотиды для микробиоты, амплифицирующие ген *16S* РНК: 341F 5'-ССТАСGGGNGGCWGCAG-3' и 805R 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3', используемые также для анализа микробиома почвы [13]. Условия проведения реакции: денатурация при температуре плюс 95 °С в течение 5 мин – 25 циклов (температура плюс 95 °С в течение 40 с; плюс 55 °С в течение 2 мин; плюс 72 °С в течение 1 мин); финальная элонгация при температуре плюс 72 °С в течение 7 мин.

Результаты

Было проведено выделение ДНК из почвы различными методами с использованием как лабораторных реактивов и материалов, так и коммерческих наборов для выделения ДНК (не специализированных для почвы). Всеми испытанными методами ДНК из почвы выделяется эффективно (рис. 1). Метод очистки с помощью набора Qiagen даёт наименьшее количество РНК, а метод М. Sagova-Marečkova – наибольшее. Больше всего примесей посторонних нуклеиновых кислот (пятна на геле в области низких молекулярных весов) выделяется в методах с использованием CTAB.

Однако при анализе полученных образцов ДНК с помощью ПЦР универсальные бактериальные олигонуклеотиды не давали продукта реакции. Также было показано, что эти образцы оказывали ингибирующее действие на ПЦР-реакцию при добавлении их к реакционной смеси, содержащей другую ДНК-матрицу (рис. 2). Образцы были подвергнуты дополнительным стадиям очистки, и результат оценивали по прямому ПЦР-анализу полученных образцов и по отсутствию ингибирующего действия на ПЦР-реакцию с другой ДНК-матрицей. Некоторого уменьшения ингибирующего эффекта удастся достичь при применении после

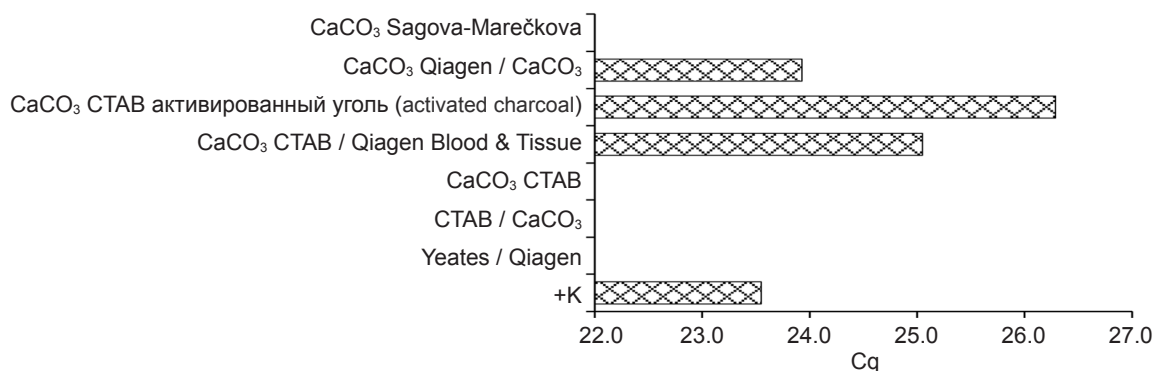


Рис. 2. Ингибирующий эффект выделенных различными методами почвенных образцов на ПЦР добавленной ДНК-матрицы. +K – положительный контроль (ПЦР на ДНК-матрице без добавления почвенных образцов). Сочетание различных методов очистки (первый метод/метод повторной очистки). «CaCO₃» – инкубация с 1 М взвесью CaCO₃ в течение 1 ч при комнатной температуре; «/ CaCO₃» – пост-инкубация; «CaCl₂» – инкубация со 100 мМ CaCl₂. Приведены средние значения Cq для трёх технических повторов.

Fig. 2. Inhibition effect of DNA samples extracted from soil by various methods on PCR reaction of added DNA matrix.

+K – positive control (PCR on DNA matrix with no soil DNA samples added). Combination of various DNA extraction methods (1st method / 2nd method). «CaCO₃» – pretreatment by incubation of soil sample with 1 M CaCO₃ suspension for 1 h at room temperature; «/ CaCO₃» – post-treatment of samples; «CaCl₂» – incubation with 100 mM CaCl₂. Medium Cq values are given for three mechanical repeats.

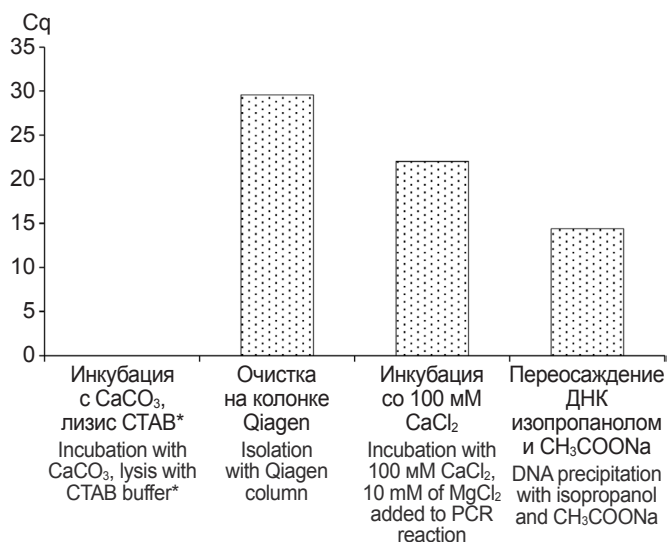


Рис. 3. Повышение эффективности ПЦР (снижение значения Cq) по мере очистки одного образца. Приведены средние значения Cq для трёх технических повторов.

Fig. 3. PCR efficiency at different stages of DNA isolation. Medium Cq values are given for three mechanical repeats.

метода CaCO₃-СТАВ инкубации с активированным углём и очистки на колонках из набора Qiagen. Наилучший же эффект даёт сочетание выделения набором Qiagen с пред- и постобработкой CaCO₃.

Для выявления роли каждой из стадий очистки использовали ПЦР-анализ, проведённый последовательно на всех стадиях очистки одним из методов для одного образца (рис. 3). Стадиями очистки были: предобработка CaCO₃ и выделение СТАВ, дополнительная очистка на колонках Qiagen, обработка CaCl₂ и переосаждение изопропанолом. Выяснилось, что каждая из дополнительных стадий очистки приводит к весьма существенному увеличению эффективности ПЦР: разница в значении Cq более чем на 7 циклов, то есть разница в предполагаемом количестве выявляемой целевой ДНК составляла бы 128 раз.

Примеры сочетания различных методов очистки образцов ДНК из почвы представлены в таблице. Эффективность этих

методов оценивали по эффективности ПЦР-реакции. Наиболее эффективным методом (с наименьшим значением Cq) оказалось выделение методом СТАВ в сочетании с предобработкой CaCO₃ и постобработкой CaCl₂. Следует отметить, что метод, показавший наименьшее ингибирование реакции ПЦР на сторонней матрице (очистка на колонках Qiagen с двойной обработкой CaCO₃) (см. рис. 2), показал наилучшие результаты в собственном ПЦР-анализе и потому в дальнейшем не использовался. В то же время метод M. Sagova-Marečkova давал образец, полностью ингибирующий ПЦР (см. рис. 2) даже при предобработке CaCO₃, однако добавление к нему постобработки хлоридом кальция приводило к серьёзному повышению эффективности ПЦР (см. таблицу). При этом сочетание CaCO₃ – СТАВ с дополнительной очисткой на колонках из набора Qiagen показывает промежуточные по эффективности, но наиболее стабильные результаты с наименьшим разбросом между повторными выделениями.

Таким образом, нами выбраны два метода выделения ДНК из почвы. Более чувствительный и более дешёвый, требующий только сравнительно недорогих химических реактивов, – метод СТАВ в сочетании с предобработкой CaCO₃ и постобработкой CaCl₂. Если же требуется количественное сравнение разных образцов, вероятно, более предпочтителен следующий метод.

1. Инкубация образца почвы в течение 1 ч с равным объёмом 1 М взвеси CaCO₃ с перемешиванием.

2. Лизис образца с помощью СТАВ-буфера (инкубация в течение 30–60 мин при температуре плюс 60 °С с перемешиванием).

3. Центрифугирование при 3500 g в течение 15 мин.

4. Добавление к супернатанту буфера AL Qiagen и 96%-го этанола (в объёмном соотношении 1 : 1 : 1), перемешивание, нанесение на колонку Qiagen и последующее проведение очистки по протоколу производителя.

5. Проверка чистоты выделения путём тестирования на отсутствие эффекта, ингибирующего ПЦР-реакцию с добавленной ДНК-матрицей.

6. При наличии ингибирования на стадии 5 проводится дополнительная очистка инкубированием в 100 мМ растворе хлорида кальция и удаление хлорида кальция – либо переосаждением с изопропанолом и ацетатом натрия, либо добавлением специфического хелата кальция EGTA.

Необходимость стадии 6 устанавливается в конкретных случаях в зависимости от типа почвы и её насыщенности продуктами растительного распада, гуминовыми кислотами, поскольку для разных типов почв количество этих компонентов сильно отличается [8].

Сравнение эффективности различных методов выделения ДНК из почвы

The comparison of efficiency of various methods of DNA isolation from soil

Метод предварительной обработки Pretreatment method	Метод выделения ДНК DNA extraction method	Метод повторной очистки Additional purification method	Дополнительная очистка CaCl ₂ Complementary CaCl ₂ treatment	Cq (16S 341F-804R) после переосаждения изопропанолом с CH ₃ COONa Cq after DNA reprecipitation with isopropanol and CH ₃ COONa
–	C. Yeates, 1998	Qiagen Blood & Tissue	CaCl ₂	Нет продукта реакции No reaction product
–	Qiagen	–	CaCl ₂	Нет продукта реакции No reaction product
–	СТАВ	–	CaCl ₂	22.38
CaCO ₃	СТАВ	Qiagen	–	15.04
CaCO ₃	СТАВ	Активированный уголь Activated charcoal	CaCl ₂	19.54
CaCO ₃	СТАВ	–	CaCl ₂	7.26
CaCO ₃	Qiagen	CaCO ₃	–	24.68
CaCO ₃	M. Sagova-Marečkova	–	CaCl ₂	14.40

Примечание. CaCO₃ – инкубация с 1 М взвесью CaCO₃ в течение 1 ч при комнатной температуре; CaCl₂ – инкубация со 100 мМ CaCl₂.

Note: Incubation of soil sample with 1 M CaCO₃ suspension for 1h at room temperature; incubation with 100 mM CaCl₂.

Обсуждение

Неожиданным в нашем исследовании оказалось то, что ряд методов, судя по литературным данным, широко и успешно применяемых для выделения ДНК из почвы, показали себя в нашем случае либо неэффективными (метод С. Yeates и применение активированного угля), либо требующими дополнительных стадий очистки (метод М. Sagova-Marečkova). Это может быть объяснено тем, что образцы почв резко отличаются друг от друга по целому ряду параметров, принципиально влияющих на выделение ДНК. Например, богатство растительности существенным образом влияет на содержание продуктов жизнедеятельности растений, в том числе мешающих как выделению ДНК, так и ПЦР-реакции [8, 14]. Другим таким фактором может быть pH (считается, что более кислые почвы представляют меньше трудностей) [15, 16]. Третьим фактором варибельности является богатство микробиоты (чем богаче почва, тем менее эффективным методом можно пользоваться и всё-таки получить детектируемое количество ДНК). Четвёртым фактором является содержание глинистых частиц, поскольку они, будучи негативно заряженными, могут адсорбировать ДНК и препятствовать её выделению [17, 18].

В связи с таким разнообразием почв возникает проблема их сравнительного анализа. Действительно, зачастую складывается впечатление, что в каждой отдельной работе авторы разрабатывают метод именно для конкретного типа почвы.

Мы считаем целесообразным при выделении ДНК включить обязательную стадию оценки эффективности выделение и очистки двумя методами:

- ПЦР с универсальными бактериальными праймерами;
- путём оценки угнетающего влияния образцов на эффективность ПЦР-реакции в сторонней тест-системе на добавленной ДНК-матрице.

По результатам этой оценки следует применять дополнительные стадии очистки, а также уравнивать количество ДНК в анализируемых образцах для корректного сравнения.

Ограничения исследования заключаются в том, что при отработке методики выделение ДНК для ПЦР-анализа были изучены образцы только одного типа почв – дерново-подзолистый грунт. Поэтому методика без дополнительной оптимизации может быть применена только для этого типа почв.

Заключение

В результате исследования были подобраны два метода выделения ДНК из почвы, сочетающие обработку образцов солями кальция с лизисом с помощью бромида цетримония, с возможным применением колонок с готовым сорбентом ДНК. Разработанные методы могут быть использованы при оценке загрязнённости почв дерново-подзолистого типа патогенными организмами методом ПЦР.

Литература / References

1. Steffan J.J., Derby J.A., Brevik E.C. Soil pathogens that may potentially cause pandemics, including severe acute respiratory syndrome (SARS) coronaviruses. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*. 2020; 17: 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.08.005>
2. Jourdan P.M., Lamberton P.H.L., Fenwick A., Addiss D.G. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet*. 2018; 391(10117): 252–65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31930-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31930-X)
3. Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62(2): 316–22. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.316-322.1996>
4. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 2012; 113(5): 1014–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
5. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1997; 15(1): 8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
6. Verma S.K., Singh H., Sharma P.C. An improved method suitable for isolation of high-quality metagenomic DNA from diverse soils. *3 Biotech*. 2017; 7(3): 171. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0847-x>
7. Yeates C., Gillings M. Rapid purification of DNA from soil for molecular biodiversity analysis. *Let. Appl. Microbiol.* 1998; 27(1): 49–53. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00383.x>
8. Sagova-Marečkova M., Cermak L., Novotna J., Plhachova K., Forstova J., Kopecky J. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(9): 2902–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.02161-07>
9. Charlop-Powers Z., Pregitzer C.C., Lemete C., Ternei M.A., Maniko J., Hover B.M., et al. Urban Park soil microbiomes are a rich reservoir of natural product biosynthetic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016; 113(51): 14811–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615581113>
10. Braid M.D., Daniels L.M., Kitts C.L. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *J. Microbiol. Methods*. 2003; 52(3): 389–93. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00210-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00210-5)
11. Sharma S., Sharma K.K., Kuhad R.C. An efficient and economical method for extraction of DNA amenable to biotechnological manipulations, from diverse soils and sediments. *J. Appl. Microbiol.* 2014; 116(4): 923–33. <https://doi.org/10.1111/jam.12420>
12. Barbarić L., Bačić I., Grubić Z. Powdered activated carbon: an alternative approach to genomic DNA purification. *J. Forensic. Sci.* 2015; 60(4): 1012–5. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12773>
13. Herlemann D.P.R., Labrenz M., Juergens K., Bertilsson S., Wanek J.J., Andersson A.F. Transition in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 2011; 5(10): 1571–9. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
14. Bürgmann H., Pesaro M., Widmer F., Zeyer J. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *J. Microbiol. Methods*. 2001; 45(1): 7–20. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00213-5)
15. Baidoo R., Yan G., Nelson B., Skantar A.M., Chen S. Use of chemical flocculation and nested PCR for *Heterodera glycines* detection in DNA extracts from field soils with low population densities. *Plant Dis*. 2017; 101(7): 1153–61. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1163-RE>
16. Miller D.N., Bryant J.E., Madsen E.L., Ghiorse W.C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(11): 4715–24. <https://doi.org/10.1128/aem.65.11.4715-4724.1999>
17. Frostegård A., Courtois S., Ramišse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., et al. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(12): 5409–20. <https://doi.org/10.1128/aem.65.12.5409-5420.1999>
18. He J., Xua Z., Hughes J. Pre-lysis washing improves DNA extraction from a forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 2005; 37(12): 2337–41. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.04.016>