

Sledování mikrobiologie biodegradačních pochodů pomocí molekulárně biologických metod

Bc. Lenka Janošová

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Janošová**
Osobní číslo: **T12364**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Sledování mikrobiologie biodegradačních pochodů pomocí molekulárně biologických metod**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na dané téma.
2. Pokuste se metodicky zvládnout metodu TGGE.
3. Adaptujte postup provedení TGGE pro analýzu Archaea.
4. Analyzujte bakteriální společenstva ve zvolených vzorcích.
5. Výsledky přehledně zpracujte do formy DP.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Články v odborných periodících dostupných v databázích WebOfScience, Scopus, případně dalších.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Román Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Janošová Lenka

Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 12. 5. 2014

.....
Janošová Lenka

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Práce se zaměřuje na sledování mikrobiálního zastoupení v horninovém prostředí, které bylo kontaminováno ropnými uhlovodíky. V rámci práce byla použita molekulárně biologická metoda, která se řadí mezi kultivačně nezávislé metody – TGGE (gelová elektroforéza v teplotním gradientu). Metoda TGGE byla optimalizována pro analýzu zastoupení domény *Archaea* ve vzorcích půd a digestátu z bioplynové stanice. Podrobněji bylo sledováno mikrobiální zastoupení bakterií během biodegradace ropných uhlovodíků v sanovaných půdách. Při aplikaci modifikovaného Fentonova činidla bylo možno sledovat snížení mikrobiálního osídlení. Během bioremediace docházelo k očekávanému vzrůstu počtu druhů mikroorganismů. V případě aplikace persulfátu a elektrického proudu bylo možno pozorovat oživení mikrobiálních společenstev v jílovém prostředí a snížení mikrobiálního osídlení ve štěrku.

Klíčová slova: izolace DNA, PCR, elektroforéza, TGGE, *Archaea*, *Bacterie*, sanační technologie, ropné uhlovodíky, biodegradace

ABSTRACT

The work focuses on the monitoring of microbial communities in soils contaminated with petroleum hydrocarbons. Within the work a molecular biology method was used which belongs among the cultivation independent methods - TGGE (temperature gradient gel electrophoresis). TGGE has been optimized for the domain *Archaea* for the samples from the soil environment within this work. To optimize TGGE, samples of digestion liquor from biogas plants have also been used. We studied the presence of microorganisms during the biodegradation of petroleum hydrocarbons in rehabilitated soils in details. When applying the modified Fenton's reagent the reduction of microbial colonization was observed. During bioremediation increase in the number of species of microorganisms occurred, which was expected. In the case of applications of persulfate and electric current recovery of microbial communities was observed in the clay environment and the reduction of microbial colonization in the gravel.

Key words: DNA isolation, PCR, Electrophoresis, TGGE, *Archaea*, *Bacteria*, Remediation Technologies, Petroleum Hydrocarbons, Biodegradation

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé práce doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za odborné vedení, rady, připomínky a trpělivost, které mi s ochotou v průběhu zpracovávání diplomové práce poskytoval.

Dále chci poděkovat laborantce mikrobiologické laboratoře Bc. Veronice Kučabové za věcné připomínky a její vstřícnou pomoc při praktické části této diplomové práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé mé rodině, příteli, kamarádům a kolegům za všestrannou podporu a pomoc při celém mém studiu.

„ Radost z uvažování a z chápání je nejkrásnějším darem přírody.“

Albert Einstein

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

Jana Prusáková

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIODEGRADAČNÍ POCHODY	12
2 SANAČNÍ TECHNOLOGIE.....	13
2.1 OXIDAČNÍ METODY SANACE (ISCO)	14
2.2 BIOREMEDIACE	14
2.2.1 Role mikroorganismů při bioremediacích	16
3 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY	18
3.1 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN	18
3.2 PCR.....	19
3.2.1 „TouchDown“ PCR	22
3.2.2 „Nested“ PCR.....	23
3.3 ELEKTROFORÉZA.....	24
3.3.1 Gelová elektroforéza.....	24
3.4 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA V TEPLTNÍM GRADIENTU (TGGE).....	25
4 SLEDOVANÉ DOMÉNY MIKROORGANISMŮ V PŮDĚ.....	28
4.1 DOMÉNA <i>BACTERIA</i>	28
4.2 DOMÉNA <i>ARCHAEA</i>	29
5 ROPA - ROPNÉ UHLOVODÍKY	30
5.1 MIKROORGANISMY ZODPOVĚDNÉ ZA BIODEGRADACI ROPNÝCH UHLOVODÍKŮ	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	41
6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	42
7 MATERIÁL A METODIKA.....	43
7.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A CHEMIKÁLIE	43
7.1.1 Příprava roztoků	47
7.2 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	48
7.3 MONITOROVÁNÍ MIKROORGANISMŮ POMOCÍ MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝCH METOD	50
7.3.1 Izolace DNA.....	50
7.3.1.1 Izolace DNA pomocí komerčního kitu.....	50
7.3.1.2 Izolace DNA pomocí fenol - chloroformové metody.....	51
7.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	53
7.3.3 Gelová elektroforéza.....	58
7.3.4 TGGE.....	59
8 VÝSLEDKY A DISKUZE	65
8.1 ADAPTACE TGGE PRO ANALÝZU DOMÉNY <i>ARCHAEA</i>	65
8.1.1 PCR reakce a adaptace TGGE pro doménu <i>Archaea</i> (paralelně pro doménu <i>Bacteria</i>) – DNA izolována z digestátu (z bioplynové stanice)	65
8.2 MONITOROVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH SPOLEČENSTVÍ VE VZORCÍCH HORNINOVÉHO PROSTŘEDÍ POMOCÍ METODY TGGE.....	71
8.2.1 Izolace DNA z horninového prostředí	71

8.2.2	Modifikace molekulárně biologických metod pro vzorky pocházející z horninového prostředí.....	73
8.2.3	PCR reakce a optimalizace TGGE pro doménu <i>Archaea</i> (paralelně pro doménu <i>Bacteria</i>) - DNA izolována z horninového prostředí.....	78
8.2.4	PCR reakce a detekce bakteriálních společenství ve vzorcích horninového prostředí – aplikace ISCO (modifikované Fentonovo činidlo).....	84
8.2.5	PCR reakce a detekce bakteriálních společenství ve vzorcích horninového prostředí – aplikace ISCO (persulfát + aplikace elektrického proudu).....	89
8.2.6	PCR reakce a detekce bakteriálních společenství ve vzorcích horninového prostředí – aplikace Bioremediace.....	94
ZÁVĚR.....		99
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		100
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		105
SEZNAM OBRÁZKŮ.....		106
SEZNAM TABULEK.....		109

ÚVOD

Práce se zaměřuje na sledování mikrobiálního zastoupení v půdách, které byly kontaminovány ropnými uhlovodíky. Jednalo se o vzorky z lokalit, kde byly aplikovány sanační technologie. Sanace je zásah, při kterém dochází k imobilizaci a likvidaci znečištění nebo probíhá monitorovaná atenuace (HORÁK, 2006). Na zmíněných lokalitách byly použity tři modifikace sanačních technologií. První sanační technologie byla In situ chemická oxidace s aplikací modifikovaného Fentonova činidla. Druhou technologií byla také In situ chemická oxidace, ale s aplikací persulfátu a elektrického proudu. Poslední sanační technologií byla bioremediace, při které se do horninového prostředí aplikovaly inokula mikroorganismů a nutriety. Pro analýzu mikrobiálního zastoupení byly využity vzorky horninového prostředí, odebrané ve výše zmíněných lokalitách.

Pro stanovení mikrobiálního zastoupení se vedle kultivačních technik, využívá i molekulárně biologických metod. Molekulárně biologické metody mají oproti klasickým kultivačním metodám řadu výhod, např. identifikace mikroorganismů nekultivovatelných na Petriho miskách, rychlost a přesnost. V rámci práce byly použity tyto molekulárně biologické metody – izolace nukleových kyselin (DNA), polymerázová řetězová reakce (PCR), agarózová elektroforéza a stěžejní metodou byla gelová elektroforéza v teplotním gradientu (TGGE).

Metoda TGGE byla optimalizována pro analýzu domény *Archaea* ve vzorcích horninového prostředí. Pro optimalizaci TGGE byly použity i vzorky digestátu pocházející z bioplynové stanice. Paralelně byla v daných vzorcích sledována i doména *Bacteria*. Podrobněji bylo sledováno mikrobiální zastoupení bakterií během biodegradace ropných uhlovodíků v sanovaných půdách. Metoda TGGE byla optimalizována pro analýzu DNA, která pocházela z horninového prostředí. Ze získaných výsledků lze konstatovat, že bakteriální složení během sanace půd se mění. V průběhu bioremediace, po aplikaci nutriety a inokula do horninového prostředí, bylo možno pozorovat očekávané mikrobiální oživení. Při In situ chemické oxidaci byly sledovány různé výsledky pro jednotlivé modifikace. Při aplikaci modifikovaného Fentonova činidla, docházelo pravděpodobně k inhibici mikroorganismů přítomných v sanovaných půdách. V případě aplikace persulfátu a elektrického proudu bylo možno pozorovat rozlišné výsledky v jednotlivých horninových prostředích. V jílu docházelo k mikrobiálnímu oživení. Opačné výsledky byly zjištěny ve štěrku, kde se spotřebou persulfátu se mikrobiální osídlení snižovalo.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIODEGRADAČNÍ POCHODY

Biodegradace neboli biologické odbourávání organických látek, je realizována pomocí mikroorganismů. Tyto biologické transformace, které probíhají díky enzymům (katalyzátorům), mohou provést rozsáhlé změny ve struktuře, snížit toxicitu kontaminujících látek anebo přeměnit organické látky na neškodné anorganické produkty. Mikroorganismy mají schopnost rozkládat určité polutanty, a to buď kompletně, nebo jenom částečně. Úplná biodegradace je označována jako mineralizace.

Biodegradace je prováděna jak na přírodních látkách, tak i na látkách antropogenního původu. Syntetické látky jsou rozkládány přímo v prostředí a to díky osídlení mikroorganismy s rozsáhlou biologickou aktivitou. Biodegradace polutantů může probíhat v aerobním i anaerobním prostředí, kdy fakultativně anaerobní mikroorganismy mohou provádět rozklad v obou zmíněných prostředí, ale za využití různých substrátů. Mikroorganismy patří mezi nejvýznamnější faktor, který se podílí na mineralizaci polutantů v životním prostředí (půdě, vodě, sedimentech). Společenstva bakterií a hub mohou snížit velké spektrum syntetických látek a pravděpodobně každou látku přírodního původu. (HORÁKOVÁ, 2006; SUTHERSAN, 1997; TRÖGL, 2011)

K uskutečnění biodegradace v kontaminovaném prostředí musí být splněny určité podmínky:

1. Existence mikroorganismu, který produkuje enzymy pro uskutečnění určité biodegradace.
2. Přítomnost mikroorganismu zmíněného v bodu 1 v kontaminovaném prostředí.
3. Polutant musí být danému mikroorganismu dostupný např. rozpustný ve vodě, rozkládané látky nesmí být sorbované na pevné povrchy atd.
4. Penetrace polutantu nebo transformačních produktů přes membránu. Využití extracelulárních nebo intracelulárních enzymů pro biodegradaci.
5. Vhodné podmínky v kontaminovaném prostředí pro přežití a množení aktivních mikroorganismů (předpokládaných degradérů). Mezi sledované parametry patří teplota, hodnota pH, přítomnost kyslíku, vlhkost, salinita, koncentrace dusíku a fosforu a koncentrace kontaminující látky. (HORÁKOVÁ, 2006; TRÖGL, 2011)

V rámci této diplomové práce byly sledovány biodegradační pochody probíhající při remediaci půd kontaminovaných ropnými uhlovodíky.

2 SANAČNÍ TECHNOLOGIE

Zásah, při kterém dochází k imobilizaci a likvidaci znečištění nebo probíhá monitorovaná atenuace se nazývá sanace. Cílem sanačních technologií je odstranit antropogenní kontaminanty, které se vyskytují v podzemních vodách, horninovém prostředí a v půdním vzduchu. Sanační technologie se rozlišují na: monitorovanou přirozenou atenuaci, aktivní (dochází k odstranění znečištění) a pasivní (dochází k imobilizaci znečištění).

Mezi hlavní média určená k dekontaminaci patří: zeminy a horniny, sedimenty a kaly, podzemní, povrchové vody a průsaky a vzdušné emise.

Sanační technologie se dělí dle místa sanace na:

- In situ – tyto sanační metody se provádějí přímo v místě kontaminace.
- Ex situ – tyto sanační metody se provádějí mimo místo kontaminace (odtěžení či odstranění kontaminujícího média). Tato technologie se dále dělí:
 - On site – příkladem může být sanační čerpání a čištění v sanační stanici umístěné na povrchu kontaminované lokality.
 - Off site – čištění ve speciálních zařízeních, které se nevyskytuje na kontaminované lokalitě.

Tato práce je zaměřená na sanaci půd. Příkladem sanačních metod používaných při dekontaminaci půd In situ jsou: biodegradace, bioremediace (biosanace), bioaugmentace, bioventing, bioloužení zemin, fytofarmacie, přirozená monitorovaná atenuace, elektrokinetická atenuace a chemická oxidace a redukce.

Při dekontaminaci půd metodou Ex situ se nejvíce využívá následujících metod: bioremediace ex situ, kalové hospodářství, kompostování, landfarming, sanační čerpání a praní zemin. (HORÁK, 2006)

V zájmových lokalitách byly sledovány biodegradační pochody, při kterých se využívalo sanačních technik In situ. V jedné z kontaminovaných lokalit byla použita bioremediace, neboli aplikace monokultur bakteriálních kmenů a nutrientů. A v druhé zájmové lokalitě bylo využito dvou modifikací oxidačních metod sanace (ISCO) a aplikace elektrického proudu. Obě zájmové lokality byly kontaminovány ropnými uhlovodíky. (DOSTÁLKOVÁ a MIKEŠ, 2013)

2.1 Oxidační metody sanace (ISCO)

Při aplikaci In situ chemické oxidace (ISCO) dochází ke snížení koncentrace cílových polutantů, které jsou chemicky oxidovatelné. Oxidací vznikají netoxické produkty nebo méně toxické produkty. Využívá se činidel s prvky ve vysokém oxidačním stavu. Tyto činidla jsou za normálních podmínek nestabilní a v přítomnosti látek se schopností ztratit elektrony, jim je tyto činidla odjímají. Mezi nejčastěji používané oxidační činidla patří: manganistan draselný (KMnO_4), peroxid vodíku (H_2O_2), ozon (O_3), peroxosíran sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) a Fentonova činidla ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$). Aplikované činidlo se využívá nejen k reakci s kontaminující látkou, ale i k reakci s dalšími oxidovatelnými látkami v kolektoru. (HULING a PIVETZ, 2006; ČERNÍK, 2010)

V zájmové lokalitě byly použity tyto oxidační činidla: persulfát s aplikací elektrického proudu a modifikované Fentonovo činidlo. (DOSTÁLKOVÁ a MIKEŠ, 2013)

2.2 Bioremediace

Bioremediace je odstranění toxických látek z půdy, kontrolovaným použitím biologických postupů degradace kontaminantů metabolickou činností živých organismů tzv. biodegradací. Nejčastěji se aplikují mikroorganismy, které se využívají k transformaci kontaminantů na méně škodlivé produkty nebo na produkty neškodné a ty se poté přirozeně začleňují do základních biochemických cyklů. Mikroorganismy využívají jejich širokou genetickou diverzitu a metabolickou adaptivitu. Jinak řečeno bioremediace je technologie, která využívá schopnosti mikroorganismů využít kontaminanty. Přičemž kontaminanty využívá jako zdroj uhlíku a energie pro své základní životní funkce. Nebo kontaminující látky mohou mikroorganismy transformovat na jiné sloučeniny, a to díky přítomnosti kosubstrátu. (HORÁK, 2006)

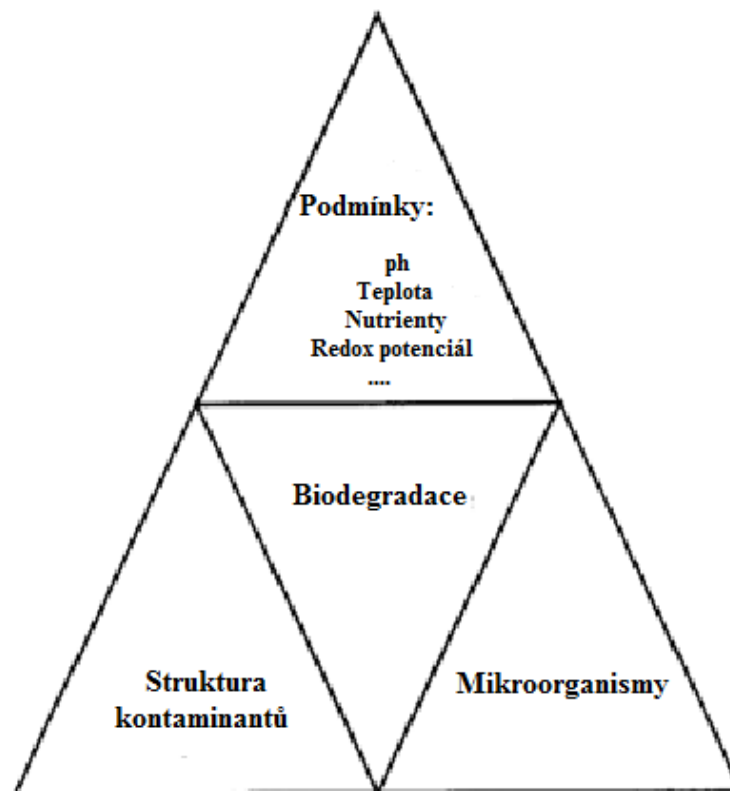
Podle stupně přeměny kontaminantu a jeho způsobu, se bioremediace dělí na:

1. Mineralizace – je úplný rozklad kontaminantu na anorganické sloučeniny (CO_2 , H_2O , NH_3 , SO_4^{2-} , atd.).
2. Biotransformace – konverze polutantu na jinou sloučeninu, která je méně toxická.
3. Kometabolismus – dochází k transformaci kosubstrátu (není nutný pro růst mikroorganismů), vedle substrátu, který je potřebný pro růst mikroorganismu. Dochází k tomu díky nižší substrátové specificitě enzymů, které jsou afinitní jak k primárnímu substrátu, tak i k strukturně podobnému kometabolitu. Kometabolit, ale

nemůže být rozkládán bez přítomnosti organických látek, které jsou potřebné pro růst, nebo bez indukované tvorby enzymů, které jsou potřebné pro degradaci.

4. Transformační reakce – příkladem může být hydrolýza, redukce a oxidace.
5. Aerobní biodegradace – důležitou podmínkou je přítomnost oxygenás, kterými jsou reakce při degradaci katalyzovány. (HORÁK, 2006)

Pro degradaci přírodní nebo syntetické látky je třeba znát degradující mikroorganismy a podmínky potřebné pro jejich aktivitu, ale také strukturu a fyzikálně chemické vlastnosti látky, která má být degradována. Závislost zmíněných parametrů jsou znázorněny na tzv. „Biodegradačním trojúhelníku“ (Obr. 1). (SUTHERSAN, 1997)



Obr. 1. Biodegradační trojúhelník (SUTHERSAN, 1997)

Na špičce biodegradačního trojúhelníku jsou podmínky, které musí být příznivé pro uskutečnění bioremediace. Mezi hlavní ovlivňující podmínky patří: teplota prostředí, pH, koncentrace a druh živin, organické látky, přítomnost surfaktantů, přítomnost toxických látek, přísun kyslíku, půdní vlhkost, redoxní potenciál, vlastnosti půdy, permeabilita, mikroskopická struktura půdní matrice a hydrogeologické a přírodní podmínky na lokalitě. (HORÁK, 2006; SUTHERSAN, 1997)

2.2.1 Role mikroorganismů při bioremediacích

Jak již bylo řečeno In situ bioremediace využívá schopnosti mikroorganismů rozkládat látky přítomné v půdách. Kontaminující látky přetrvávají v podloží, protože tam panují nevyhovující podmínky pro mikrobiální osídlení a jeho aktivitu.

Mikroorganismy mohou v půdě uvolňovat enzymy. Enzymy mají schopnost katalyzovat oxidaci mnoha různých uhlovodíků, díky jejich široké substrátové specificitě. Enzymovou aktivitu půdy, lze definovat jako součet aktivit všech akumulovaných enzymů v ní přítomných. Přirozená aktivita enzymu je výsledkem mnoha procesů, jako je třeba částečné začlenění vyprodukovaných enzymů do půdního prostředí, neboli enzymy jsou imobilizovány na povrchu částice půdy.

Dalším sledovaným parametrem je schopnost mikroorganismů růst v různých podmínkách. Aerobní mikroorganismy musí mít dostatečný přístup kyslíku pro svůj růst. Opakem aerobů jsou anaerobové, pro které je kyslík toxický a tudíž přežívají jen za nepřítomnosti kyslíku. Zvláštním typem jsou fakultativní anaerobové, kteří mohou růst v přítomnosti i v nepřítomnosti kyslíku.

Během In situ bioremediace využívají mikroorganismy pro svůj růst znečišťující látky, ale potřebují i další makroergní prvky. Mezi potřebné živiny se řadí dusík, fosfor, v menší míře síra a další stopové prvky, které jsou potřebné pro jejich růst. Optimální poměr mezi základními makroergními prvky je: $C : N : P = 100 - 120 : 10 : 1$. Pro růst je limitující zejména koncentrace fosforu.

Ve většině případů je organická látka, která zde představuje zdroj uhlíku a energie, transformována pomocí metabolických drah, které jsou charakteristické pro heterotrofní mikroorganismy. Organická látka, ale nemusí být substrátem, aby mohla být metabolizována. Existují dvě kategorie přeměn:

- V prvním případě je organická látka využívána jako zdroj uhlíku a energie.
- V druhém případě nedochází k biodegradaci, ale pouze k využití uhlíku k respiraci – zajištění životaschopnosti buňky; a dochází k tomu pouze v tom případě, jestliže je uhlík v nízké koncentraci. Zde se řadí i kometabolické transformace.

Jelikož uhlík patří mezi prvky, které jsou potřebné pro růst, mají druhy mikroorganismů se schopností využívat jako zdroj uhlíku syntetické molekuly selektivní výhodu. Před začátkem degradace kontaminantu je možné pozorovat tzv. lagovou (aklimatizační) fázi.

V lagové fázi dochází k přizpůsobení mikroorganismů. Délka aklimatizace závisí na chemické struktuře, podmínkách v prostředí, koncentraci kontaminantu a může trvat od 1 hodiny až po několik měsíců. Po aklimatizaci mikroflóry na substrát dochází ke zvýšené aktivitě jeho degradace.

Během procesu biodegradace se zvyšuje počet mikrobiálních buněk (biomasy) a tím se zvyšuje účinnost biodegradace. Neboli během mineralizace kontaminantu, buňky využívají organický substrát pro vznik nových buněk, čímž dochází k nárůstu mikrobiální populace a tím i k rychlejší mineralizaci. (HORÁK, 2006; SUTHERSAN, 1997; ZHONGYUN MA, 1999)

3 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY

V této kapitole jsou zmíněny molekulárně biologické metody používané v rámci této práce. Aplikace molekulárně biologických metod má řadu výhod. Pomocí těchto metod můžeme identifikovat i druhy mikroorganismů, které jsou pomocí klasických kultivačních metod neidentifikovatelné, např. mikroorganismy nekultivovatelné na Petriho miskách. Další výhodou je kratší čas, který je potřebný pro identifikaci mikroorganismů. Na obrázku (Obr. 2) je znázorněno postupné uspořádání molekulárně biologických metod.



Obr. 2. Posloupnost molekulárně biologických metod

3.1 Izolace nukleových kyselin

Při izolaci nukleových kyselin se používá nativního substrátu, v dostatečné čistotě a množství. Při izolaci nukleových kyselin je problematická lyze buněk, hlavně u grampozitivních bakterií, které mají ve své buněčné stěně vysoký obsah peptidoglykanu. Pro lyzi buněk se využívá např. vysokofrekvenčního třepání s kuličkami nebo se přidává lysozym (enzym) s detergentem (např. EDTA). Po lyzi buněk je třeba nukleové kyseliny zbavit všech látek, jejichž přítomnost by mohla bránit specifickému působení enzymů. Cílem izolace může být DNA nebo RNA. K odstranění nežádoucího typu nukleové kyseliny se využívá příslušné nukleázy a opakování purifikačního postupu. Mezi metody izolace nukleových kyselin patří např.: fenol - chloroformová extrakce, použití chromatografické kolony a vysolování proteinů. (ROSY PAL, 2002)

V současné praxi se k izolaci nukleových kyselin využívá komerčně prodávaných kitů.

3.2 PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) neboli polymerázová řetězová reakce. Při této metodě se cyklicky opakuje enzymová syntéza úseků řetězců DNA, prostřednictvím DNA-polymerázy, respektive amplifikace vybraných úseků dvouřetězcové DNA (ve směru 5'→3'). Celá reakce je prováděna ve zkumavce.

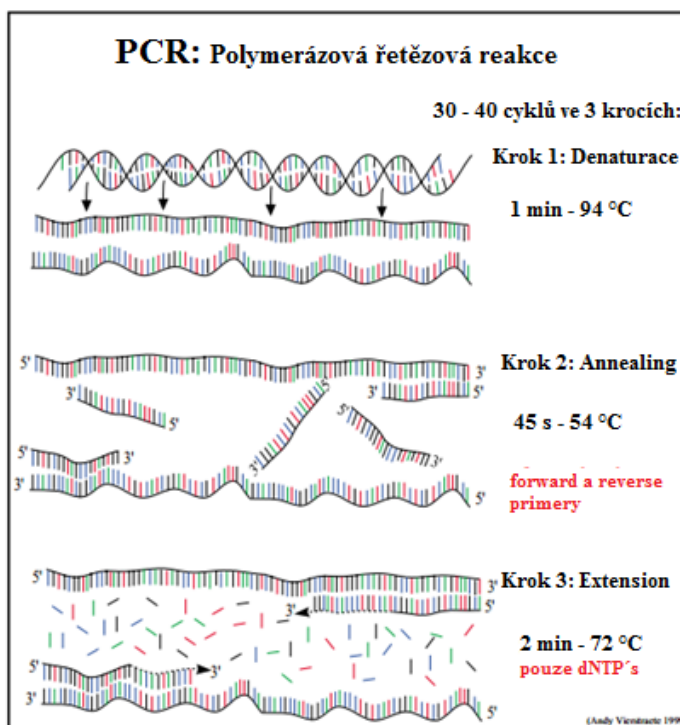
Při reakci je zapotřebí dvou primerů, které vymezují amplifikovaný úsek nukleotidové sekvence tím, že se navážou ve specifických místech protilehlých řetězců DNA. Jako DNA-polymerázy se používají polymerázy izolované z termostabilních mikroorganismů., Tyto polymerázy odolávají denaturační teplotě DNA. Příkladem může být *Taq*. DNA-polymeráza z bakterie *Thermus saquaticus*. Při PCR se nejčastěji používají tři kroky, které se opakují v 30 až 40 cyklech. Celá reakce probíhá v automatických termocyklérech, které ve velmi krátkých časových intervalech umí docílit požadovaných teplot.(ŠMARDA, 2005)

Před realizací PCR je nutné správně nakombinovat všechny komponenty potřebné pro amplifikaci DNA. Zde jsou uvedeny potřebné reagenty:

1. *Templátová DNA* – templát obsahuje segment DNA nebo cílovou sekvenci DNA, která má být pomocí PCR metody amplifikována.
2. *Primery* – primery (oligonukleotidy) jsou krátké úseky DNA, které se navazují dle komplementarity bází na rozdvojenou dsDNA (dvouřetězcová) a zapříčiní syntézu požadované sekvence DNA. Jeden primer je pojmenován jako forward primer a druhý jako reverse primer (dle místa navázání na ssDNA (jednořetězcové)).
3. *DNA-polymeráza* – je to enzym používaný pro syntézu nového řetězce DNA. DNA-polymeráza přidává další nukleotidy a prodlužuje navázané primery. Vzniká komplementární templátové vlákno.
4. *Magnesium* – magnesium (kofaktor) je obvykle přidáváno ve formě $MgCl_2$ a je potřebné pro aktivitu DNA-polymerázy.
5. *dNTPs* – deoxynukleotidtrifosfáty. Nese čtyři nukleotidy Adenin, Cytosin, Guanin a Thymin, které využívá DNA-polymeráza k prodloužení navázaných primerů.
6. *Puf* – pufr (buffer) je roztok, který zajišťuje, aby nedocházelo ke změně pH, což je důležité pro maximální aktivitu DNA-polymerázy.
7. *PCR voda* – používá se redestilovaná voda. (STEPHENSON a ABILOCK, 2012)

Dalším důležitým krokem PCR je návrh vhodných primerů (oligonukleotidů). Ideální primery obsahují 40 - 60 % G + C a tzv. „G/C svorku“ – zařazení 1 nebo 2 G a C zbytků na 3'- koncích primerů, které by měli zajistit přesnou vazbu na templát (ŠMARDA, 2005). Rovnoměrnost distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T. U obou primerů je vhodná podobná teplota tání T_m , která by měla být alespoň 50 °C. Velikost oligonukleotidů je zpravidla 18 – 25 nukleotidů. Dalšími důležitými parametry jsou: nepřítomnost vlásenek (vnitřní sekundární struktury) a komplementárních sekvencí (možný vznik duplexů). Primery jsou vyráběny komerčně syntetizátory oligonukleotidů. Pro návrh primerů se využívá programů (např. OLIGO, NationalBioSciences, GeneWorks, PCGeneIntelligence atd.). (ROUX, 1995; ŠMARDA, 2005)

PCR proces se skládá z několika kroků, které jsou znázorněny na Obr. 3.



Obr. 3. Grafické znázornění kroků PCR (VIERSTRAETE, 1999)

Reakce začíná počáteční denaturací, která se provádí při teplotě 94 – 96 °C, v závislosti na DNA-polymeráze obsažené v reakčním roztoku a její čas je 2 – 10 minut. Při počáteční denaturaci dochází ke vzniku vazebných míst pro primery, díky kompletní denaturaci templátu. (ŠMARDA, 2005)

1. Denaturace

- Teplota denaturace je obvykle 94 – 96 °C, v závislosti na použité DNA-polymeráze.
- Během denaturace se dsDNA rozděluje na dva samostatné řetězce ssDNA, všechny enzymatické reakce jsou zastaveny.

2. Annealing

- Teplota annealingu, neboli připojování primerů je 50 – 65 °C.
- Dochází k připojení primerů k jejím komplementárním sekvencím na ssDNA. Primery se dostávají vlivem Brownova pohybu k místu navázání na ssDNA (iontová vazba) a dochází k napojení DNA-polymerázy s následným kopírováním nukleotidové sekvence. Při navrhování primerů musí být dodrženo několik důležitých pravidel, viz výše. Teplota tání primerů (T_m) je důležitá pro hybridizaci (napojení) primerů. Mezi další důležité parametry patří zastoupení bázi a délka oligonukleotidů. Teplota pro připojení primerů (T_a) se dá vypočítat z následujícího vzorce/1/ a ustáleným pravidlem je, že se T_m snižuje o 5 °C:

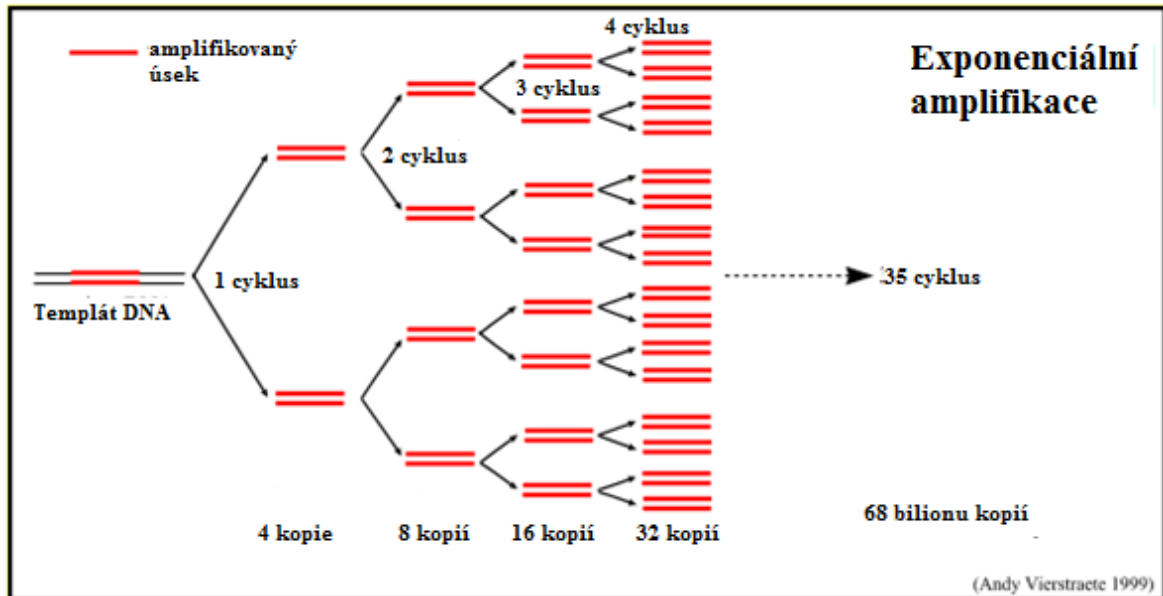
$$T_a = 0,3 \cdot T_m^{Primer} + 0,7 \cdot T_m^{Produkt} - 25 \quad (1)$$

3. Extension (prodlužování, elongace)

- Teplota extenze, neboli prodloužení primerů je 65 – 75 °C, nejčastěji však 72 °C, jedná se o syntézu nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy.
- dNTP (deoxiribonukleotidtrifosfát), hraje v tomto kroku velkou roli, jako substrát pro DNA-polymerázu. V místě syntézy se dNTP začnou samovolně připojovat ke svým komplementárním partnerům na ssDNA (prodloužení napojených primerů). Z jedné dsDNA tedy vznikají dvě dceřiné dvoušroubovice se stejnými bázemi.

Následuje závěrečná extenze (final extension), kdy je vzorek po dobu 5 – 30 minut při teplotě 72 °C. Dochází k dokončení syntézy produktů. (ROUX, 1995; VIERSTRAETE, 1999; ŠMARDA, 2005)

Při PCR dochází k exponenciálnímu nárůstu počtu kopií DNA, tedy jedna kopie bude mít po prvním cyklu 2 kopie, po dvou cyklech 4 kopie, po třech cyklech 8 kopií atd. Exponenciální nárůst kopií DNA je znázorněna na *Obr. 4.*(VIERSTRAETE, 1999)



Obr. 4. Exponenciální nárůst kopií DNA (VIERSTRAETE, 1999)

Produktem PCR reakce jsou úseky DNA, tzv. amplikony, o definované délce ($10 - 10^3$ bp). Přítomnost amplikonu v reakční směsi se stanovuje podle jejich velikosti elektroforézou v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu. Možným stanovením je kvantitativní měření množství produktu v reálném čase tzv. PCR s detekcí v reálném čase (Real-Time PCR). (ŠMARDA, 2005)

V dalších kapitolách jsou uvedeny modifikace PCR, které byly použity v této práci.

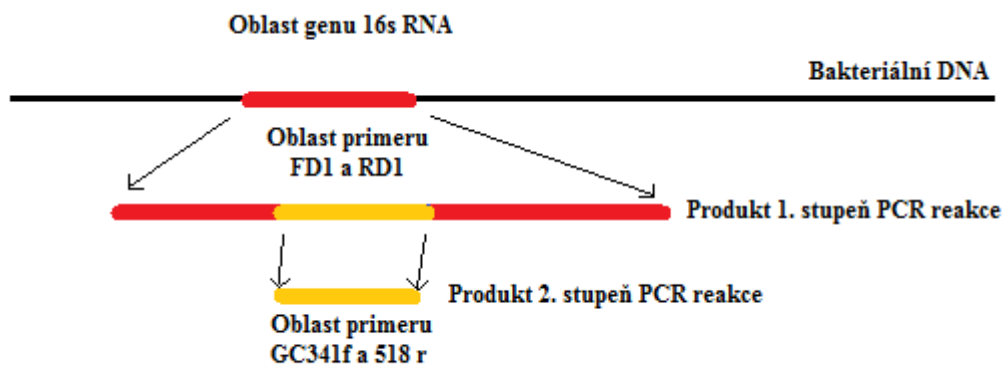
3.2.1 „TouchDown“ PCR

Metody „TouchDown“ PCR se využívá v případě, kdy primery mají odlišné teploty tání (T_m). Tudíž nalezení správné annealingové teploty (T_a) představuje problém. Při nesprávné annealingové teplotě může docházet ke vzniku nespecifických amplikonů. Pro optimalizaci annealingové teploty, zvýšení specifičnosti a odstranění vzniku nespecifických amplikonů se využívá „TouchDown“ PCR. Díky této modifikaci primery nasedají v prvních cyklech jen na templáty, které obsahují cílový amplikon (tedy s největší komplementaritou). Vytvoří se pouze specifický produkt a zabraňuje vzniku jakýkoliv nespecifických produktů. Při „TouchDown“ PCR se anealingová teplota, neboli teplota při které dochází k nasednutí primerů na ssDNA, volí o něco vyšší než ta, která byla vypočtena pomocí

vzorce (1). Zvolená anealingová teplota se poté s každým cyklem snižuje o 0,5 °C až 1 °C. Např. zvolená teplota anealingu je 65 °C, v každém dalším cyklu se teplota sníží o 1 °C, tudíž po 10 cyklech bude 55 °C. Po TouchDown PCR následuje obyčejná PCR reakce: 20 – 25 cyklů při teplotě anealingu 55 °C. (DON et al., 1991; ROUX, 1995; WUNDERLICOVÁ et al., 2013)

3.2.2 „Nested“ PCR

„Nested“ PCR se využívá k amplifikaci velmi malého množství DNA. Také se používá ke snížení množství nežádoucích produktů. Je založena na dvoustupňové PCR reakci, kdy při každém cyklu jsou používány jiné dvojice primerů. Během prvního stupně dochází k amplifikaci vybraného delšího úseku DNA. Při druhém stupni je templátem produkt z předcházejícího prvního stupně PCR – amplifikuje se vnitřní sekvence (*Obr. 5*). Ve druhém stupni PCR reakce by se měly amplifikovat pouze požadované produkty. (KOČÁREK, 2007; YOURNO, 1992)



Obr. 5. Nested PCR pro amplifikaci bakteriální DNA

3.3 Elektroforéza

Elektroforéza patří mezi nejpoužívanější separační techniky při izolaci a analýze nukleových kyselin. Principem je pohyb nabitých molekul nukleových kyselin v elektrickém poli – elektroforetická separace. Nukleové kyseliny se v elektrickém poli pohybují k anodě (opačně nabitá elektroda), kde hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou fosfátové skupiny (negativně nabité). (ŠMARDA, 2005)

3.3.1 Gelová elektroforéza

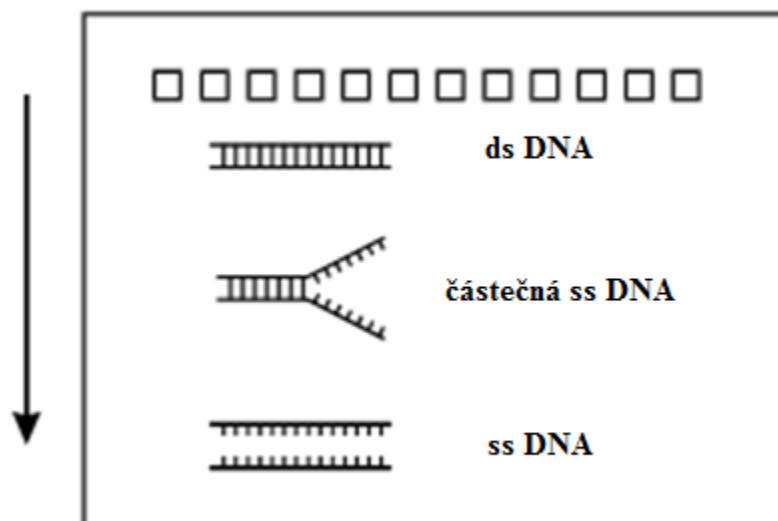
Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči, kterým je obvykle gel. Mezi nejčastěji používané elektroforetické gely pro separaci nukleových kyselin patří agarózové nebo polyakrylamidové gely. Gely vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit koncentrací polymeru a složením roztoku. Agarózové gely jsou používány pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti cca 100 bp – 50 kb, naproti tomu polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul cca 10 – 1000 bp. Gelovou elektroforézu rozlišujeme na horizontální a vertikální (dle polohy gelu na aparatuře) a na kapilární (gel je uvnitř kapiláry).

Elektroforetická pohyblivost, která je nepřímo úměrná logaritmu velikosti nukleových kyselin, udává rychlost pohybu molekul DNA v gelu. Velikost molekuly DNA nebo jejího fragmentu o neznámé velikosti, lze stanovit podle elektroforetické pohyblivosti molekul nebo fragmentů DNA o známé velikosti (hmotnostní standard – marker). Standard většinou bývá restriční fragment genomu bakteriofágů nebo plazmidových molekul (přesná velikost je stanovena sekvenováním).

Molekuly DNA se na gelu snadno zviditelní obarvením vhodným barvivem, díky kterému lze identifikovat polohy separovaných molekul. Etidiumbromid patří mezi nejčastěji používané barvivo. Vmezeňuje se mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s nimi komplex, který po ozáření UV světlem fluoreskuje. Na gelu jsou molekuly DNA viditelné jako proužky (bandy) a koncentrace DNA je úměrná jejich intenzitě. Dále k barvení může být použita skupina fluorescenčních cyaninových barviv (SYBR). Při detekci molekul DNA na polyakrylamidových gelech se využívá např. barvení stříbrem. (ŠMARDA, 2005)

3.4 Gelová elektroforéza v teplotním gradientu (TGGE)

Gelová elektroforéza v teplotním gradientu je metodou, která amplifikované fragmenty DNA separuje na základě rozdílné sekvence, ale s identickou či podobnou délkou řetězce. Separace je prováděna za přesně stanoveného teplotního gradientu, který zde působí jako denaturační faktor. Separace je prováděna v polyakrylamidovém gelu, kde se během elektroforézy DNA pohybuje v elektrickém poli a díky zvyšující se teplotě se začíná denaturovat. Při zahřívání fragmentů DNA na teplotu denaturace (T_m – melting teperature (teplota tání)) se zpomaluje jejich pohyb v gelu a z původní dvouřetězcové molekuly se stává struktura částečně jednořetězcová (tzv. vidlice), tento jev je zobrazen na obrázku (Obr. 6).



Obr. 6. Změna konformace během TGGE (TGGEMAXISystem)

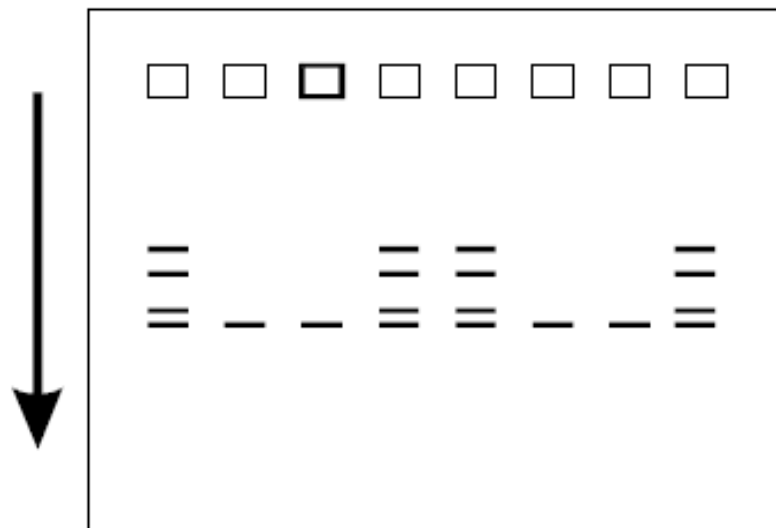
Při teplotě denaturace T_m denaturuje 50 % dvouvláknových řetězců a 50 % jednovláknových řetězců. Teplota denaturace závisí na pořadí a zastoupení jednotlivých nukleotidů v DNA, tedy i na počtu vodíkových můstků mezi páry nukleotidů. Řetězce jsou díky většímu počtu vodíkových můstků mezi GC páry stabilnější, a tudíž doputují v gelu dále. Řetězce v místech bohatých na AT páry se naopak od sebe budou lépe oddělovat. Proto jeden z použitých primerů, při amplifikaci 16S rRNA genů z DNA, obsahuje větší množství GC nukleotidů (30-50 nukleotidů). GC svorka brání úplné disociaci fragmentů DNA, a to i při vysoké koncentraci denaturačních činidel a za vysoké denaturační teploty.

Mezi další faktory, které ovlivňují TGGE patří:

- Koncentrace solí a denaturačních činidel (močoviny a formamidu), které silně ovlivňují teplotu, při které dochází k denaturaci DNA. Močovina je použita pro separaci nukleových kyselin v koncentraci 7 – 8 mol/l a formamid v koncentraci vyšší než 20 %.
- Mezi nejčastěji používané pufrů patří: TAE (Tris-acetát-EDTA pufr), TBE (Tris-borát-EDTA pufr) a MOPS (3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina). Zmíněné pufrů je možné použít opakovaně (až 8x), bez snížení pufráční kapacity.

Před analýzou je třeba určit denaturační teplotu pro jednotlivé fragmenty DNA a dobu trvání elektroforézy, aby bylo dosaženo co nejlepšího rozlišení fragmentů. Pro fragmenty obsahující od 50 do 300 nukleotidů v nukleové sekvenci je důležité správné nastavení teplotního gradientu (jednotlivé páry bází mohou mít identickou denaturační teplotu). Pokud fragmenty dosáhnou teploty denaturace, dojde k zastavení pohybu všech molekul a k zastavení převodu dsDNA do částečně rozpletené struktury. Fragmenty DNA s odlišnými sekvencemi se zastaví v gelu na různých pozicích. Pozice jsou určeny různou teplotou denaturace. S rostoucí teplotou se postupně jednotlivé fragmenty denaturují, a to díky sekvencním rozdílům v oblastech denaturace. (ANSORGE a PATRINOS, 2010; HERSCHLAG, 2009; MUYZER, 1998; TGGEMAXISystem; WARTELL et al., 1998)

Při paralelní TGGE stoupá množství denaturačních činidel a teplota ve směru od horní do spodní části (rovnoběžně ve směru elektroforézy). Teplota je nízká v horní části a naopak vysoká ve spodní části přístroje. Při paralelní elektroforéze je možno analyzovat více vzorků na stejném polyakrylamidovém gelu. Výsledkem TGGE je gel s bandy, kde počet pruhů značí počet dominantních mikroorganismů ve vzorku (*Obr. 7.*). (HERSCHLAG, 2009; MUYZER, 1998; TGGEMAXISystem)



Obr. 7. Výsledný gel s bandy u paralelní TGGE (TGGEMAXISystem)

Mezi hlavní výhody patří pozorování dominantních druhů ve vzorku a možnost sledování prostorových a časových změn ve složení mikrobiálního společenstva. Pro TGGE analýzu může být použita DNA izolovaná z jakéhokoliv prostředí, ne pouze z izolovaných kultur, které byly před vlastním stanovením kultivovány. Dále mohou být pomocí TGGE analýzy identifikovány mikroorganismy, které jsou nekultivovatelné. Mimo jiné fragmenty DNA získané pomocí TGGE mohou být z gelu vyříznuty a použity pro jiné analýzy (sekvenace). (TGGEMAXISystem)

4 SLEDOVANÉ DOMÉNY MIKROORGANISMŮ V PŮDĚ

Mezi mikroorganismy, které je možno pozorovat v půdách patří: bakterie, archaebakterie, aktynomycéty, houby a prvoci. (SUTHERSAN, 1997; ZHONGYUN MA, 1999)

V dalších kapitolách jsou stručně popsány vlastnosti sledovaných domén mikroorganismů.

4.1 Doména *Bacteria*

Bakterie jsou nejpočetnější skupinou z výše jmenovaných druhů mikroorganismů, které se vyskytují v půdách. (SUTHERSAN, 1997)

Doména *Bacteria* je rozdělena na heterotrofní a autotrofní bakterie. Autotrofní bakterie využívají anorganické materiály jako zdroj živin a oxid uhličitý jako jediný zdroj uhlíku pro svůj růst a přežití. Dále se rozděluje na fotoautotrofní (využívají energii ze slunečního záření) a chemoautotrofní (energii získávají z oxidace anorganických materiálů). Heterotrofní bakterie mohou využívat jednu nebo více organických sloučenin jako zdroj uhlíku pro svůj růst a přežití. Heterotrofní bakterie patří mezi nejdůležitější mikroorganismy, které se využívají, díky jejich schopnosti transformovat organické sloučeniny, při bioremediacích a tím zvyšují jejich účinnost. Patří mezi dominantní druh v půdní mikroflóře. Dále se bakterie dělí do dvou skupin: grampozitivní a gramnegativní bakterie. Grampozitivní bakterie obsahují peptidoglykan v buněčné stěně, tudíž se po Gramově barvení obarví tmavě modře až fialově. Gramnegativní bakterie mají složitější buněčnou stěnu, kterou obklopuje membrána tvořená tenkou vrstvou peptidoglykanu a při Gramově barvení se barví do růžové barvy. V půdách se vyskytuje téměř 100 druhů bakterií, které se dají zařadit mezi 30 rodů a které mohou oxidovat uhlovodíky. (SUTHERSAN, 1997; ZHONGYUN MA, 1999)

4.2 Doména *Archaea*

Zástupci domény *Archaea* se řadí mezi druhy mikroorganismů, které přežívají v nejextrémnějších podmínkách na Zemi. *Archaea* se dělí na tři hlavní skupiny: termofilní, methanogenní a halofilní.

Termofilní *Archaea* jsou schopny přežít při vysokých teplotách (i nad 100 °C) a v horkých pramenech, mezi nejznámější zástupce patří *Sulfolobus*.

Methanogenní *Archaea* se vyskytují v sedimentech, na dně moří nebo v trávicím traktu zvířat. Produkují methan a kyslík je pro ně toxický. Příkladem je např. *Methanococcus*.

Poslední skupinou jsou halofilové, kteří žijí v extrémně slaném prostředí, jenž by bylo pro jiné druhy mikroorganismů bylo smrtící. Vyskytují se v Mrtvém moři nebo ve Velkém slaném jezeru. Repräsentantem této skupiny je např. *Natronobacterium*. (HOWLAND, 2000)

5 ROPA - ROPNÉ UHLOVODÍKY

Ropa se získává z podzemních nalezišť. Jedná se o olejovitou hořlavou kapalinu o hustotě 800 – 990 kg/m³, která je složitou směsí různých organických materiálů a sloučenin (plynných, kapalných i tuhých). Tyto organické sloučeniny a materiály se vytvářely po dlouhou dobu chemickými přeměnami v závislosti na geologických podmínkách.

Převážná část ropy je tvořena uhlovodíky (84 – 87 % hm. uhlíku), dále se v ní nachází dusíkaté (0,01 – 1,0 % hm. dusíku – např. alkylakridiny a deriváty pyridinu), kyslíkaté (0,05 – 1,0 % hm. kyslíku – např. naftenové kyseliny, alkoholy, ethery, mastné kyseliny), sírné (0,1 – 4 % hm. síry – např. elementární síra, sulfan, thioly) a vodíkové (11 – 14 % hm. vodíku) sloučeniny a v minoritním množství anorganické a organické soli, které obsahují kovy (např. vanad, nikl, sodík, hořčík atd.).

Uhlovodíky tvoří značnou část lehkých frakcí ropy, obsahující pouze malá množství heteroatomů. Uhlovodíková část ropných frakcí je tvořena:

- *Alkeny* – jsou nenasycené uhlovodíky (C_nH_{2n}), které jsou rozvětvené i nerozvětvené a mají jednu nebo více dvojných vazeb.
- *Alkany* – jsou acyklické nasycené uhlovodíky (C_nH_{2n+2}) s rozvětveným (isoalkany) či s nerozvětveným (*n* – alkany) řetězcem.
- *Cykloalkany* – jsou cyklické uhlovodíky, které obsahují jeden nebo více kruhů (mono- C_nH_{2n}, di- C_nH_{2n-2}, tri- C_nH_{2n-4} adt.).
- *Aromáty* – mají jeden nebo více aromatických kruhů. Existují i kombinace cykloalkanických a aromatických kruhů tzv. cykloalkanoaromáty. (BLAŽEK a RÁBL, 2006)

Ropné uhlovodíky jsou směsí uhlovodíků, které se získávají z ropy. Mezi ropné uhlovodíky se řadí alifatické a aromatické uhlovodíky. Nejčastějšími kontaminanty životního prostředí, řadící se do této skupiny, jsou ropa, benzín, nafta a topné oleje.

Ropné uhlovodíky obsahují 6 až 25 uhlíků, přičemž většina obsahuje od C₁₀ po C₁₈. Benzín je lehká frakce z rozmezí C₆ až C₁₀, s bodem varu mezi 23 °C až 204 °C. Nafta je středně těžká frakce, destilát (C₆ až C₂₂) z ropy, s bodem varu mezi 202 °C až 320 °C. Topné oleje a mazadla se řadí mezi těžší frakce z ropných uhlovodíků a mají podobné složení a vlastnosti jako střední destiláty (nafta).

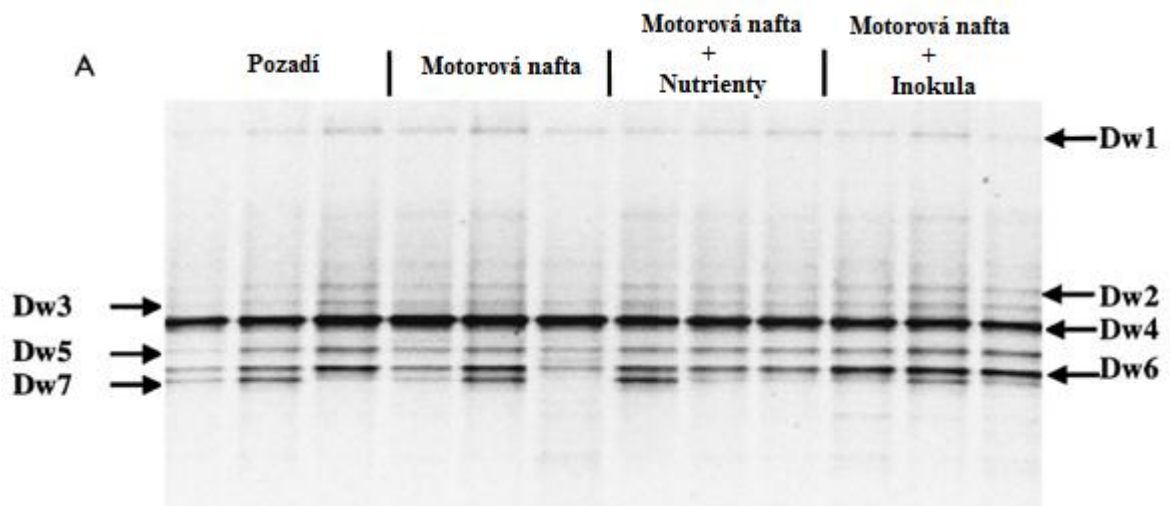
Všechny zmíněné frakce ropy mají podobné chemické a fyzikální vlastnosti. Ropné uhlovodíky jsou viskózní, nerozpustné ve vodě a relativně imobilní v půdách. Při sanacích půd se sledují tyto fyzikální vlastnosti: nestálost, rozpustnost ve vodě, měrná hmotnost a kinetická viskozita. (ZHONGYUN MA, 1999)

5.1 Mikroorganismy zodpovědné za biodegradaci ropných uhlovodíků

Mezi potvrzené degradéry, kteří se podílí na mineralizaci ropných uhlovodíků, patří rody: *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* a *Vibrio*. (ATLAS, 1981; BANAT et al., 2000; LEAHY a COLWELL, 1990)

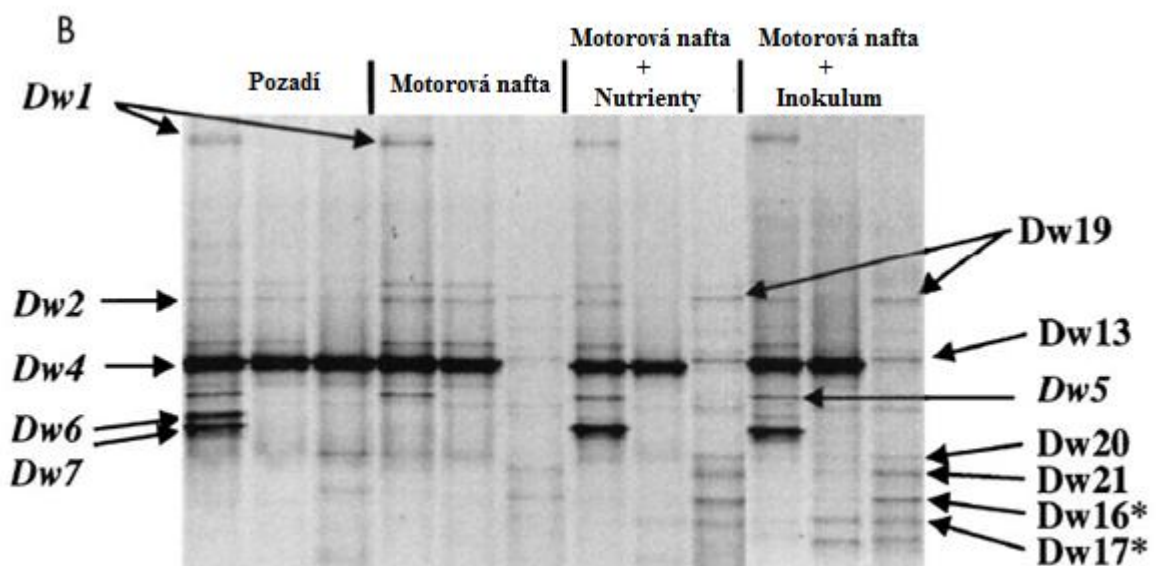
V rámci studie Ismaila Saadouna (2002) byli izolováni potenciální degradéři ropných uhlovodíků z půd znečištěných ropnou havárií. Ze získaných vzorků byly bakteriální druhy kultivovány na agarových plotnách. Získané kultury byly pro přesnější identifikaci podrobeny různým zkouškám (morfologická charakteristika, barva, velikost a tvar kolonie, Gramovo barvení a další biochemické testy). Při bližší identifikaci bylo zjištěno, že se jedná o druhy *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas maltophilia*, *Acinetobacter lowfii*, *Enterobacter cloacae* a *Rhodococcus erythopolis*. Při laboratorních testech, bylo testováno, zda výše zmíněné kmeny jsou schopny rozkládat ropné uhlovodíky. Byly zjištěny pozitivní výsledky u všech zmíněných druhů kromě *Pseudomonas maltophilia* a *Acinetobacter lowfii*. (SAADOUN, 2002)

V práci MacNaughton a kol. (1999) byla sledována změna mikrobiálního zastoupení v průběhu utilizace ropné skvrny (motorové nafty) za různých podmínek. Bylo sledováno pozadí bez přítomnosti motorové nafty, poté prostředí s přítomností pouze motorové nafty. Další sledované prostředí bylo s přítomností motorové nafty a nutrientů a posledním bylo prostředí s motorovou naftou a inokulem. Mikrobiální zastoupení bylo sledováno ve třech časových intervalech (na počátku experimentu, v 8. týdnu a ve 14. týdnu) pomocí gelové elektroforézy v gradientu denaturačních činidel (DGGE). Amplifikované úseky pomocí PCR reakce, byly sledovány na gradientovém gelu (gradient 15-55%). Výsledné gradientové gely jsou uvedeny na obrázcích (*Obr. 8, Obr. 9, Obr. 10*). Všechny označené bandy byly vyříznuty, reamplifikovány, klonovány a sekvenovány.



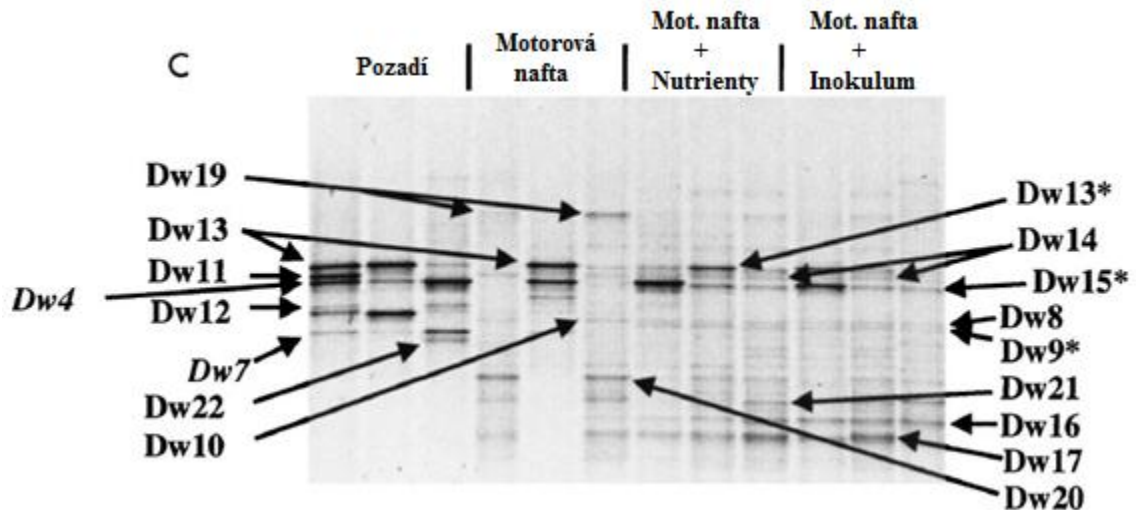
Obr. 8. Gradientový denaturační gel v čase 0 (MACNAUGHTON et al., 1999)

V čase nula (4 dny po přidání motorového oleje) byly na denaturačním gelu sledovány bandy Dw1 – Dw7 (Obr. 8). Nebyly sledovány žádné zjevné rozdíly v zastoupení společenství mikroorganismů v různých podmínkách. Bandy Dw2, Dw3, Dw4, Dw5 a Dw6 byly určeny jako společenství grampozitivních mikroorganismů z rodu *Planococcus*. Gram negativní mikroorganismy byly zastoupeny třemi bandy (Dw7), které mohou být v rámci kmene *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* nebo mohou úzce souviset s rody *Psychrobacter* a *Moraxella* v rámci gamapodskupiny proteobakterií (Dw1 a Dw4).



Obr. 9. Gradientový denaturační gel v čase 8 týdnů (MACNAUGHTON et al., 1999)

Po osmi týdnech od započetí experimentu bylo možno na gelu (Obr. 9) sledovat mikrobiální oživení v prostředí s přidavkem motorové nafty, nutrientů a inokula. Všechny bandy, pozorovatelné v čase nula, byly i nyní pozorovatelné, ale byly lépe viditelné, tudíž se ve vzorku nacházely ve větší koncentraci.

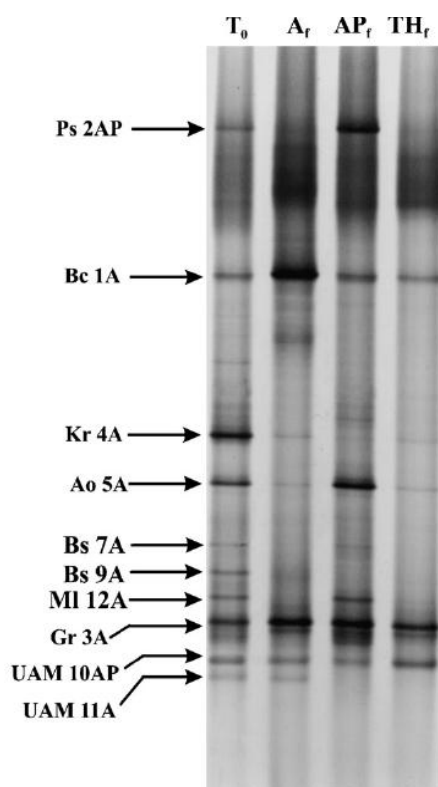


Obr. 10. Gradientový denaturační gel v čase 14 týdnů (MACNAUGHTON et al., 1999)

Po 14 týdnech byl zhotoven poslední denaturační gel (Obr. 10). V prostředí s aplikací motorové nafty a s přidavkem nutrientů a inokula, bylo možné pozorovat mnoho dominantních mikroorganismů ve srovnání s pozadím (bez aplikace motorové nafty). Dva bandy (Dw8 a Dw9) byly viditelné pouze v prostředí s aplikací motorové nafty s přidavkem nutrientů a inokula. (Kurzívou jsou označeny bandy, které byly pozorovatelné v dřívějších časových intervalech.) Nově pozorovatelné skupiny na fotkách denaturačních gelů byly v pozadí a v prostředí s přidavkem motorové nafty, nutrientů a inokula (Dw11, Dw12, Dw13, Dw22). Dw11 a Dw12 (pozorovatelné v pozadí i v prostředí s motorovou naftou) jsou ve vztahu k gram pozitivním rodům *Exiguabacterium*, *Planococcus*. Dw13 a Dw22 jsou členy *Bacteroides-Flexibacter-Cytophagales*. Dw15 patří ke gram negativním druhům v rámci kmene *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*. Po sekvenaci Dw19 nebylo stanoveno bakteriální zařazení. Dalších 5 nových bandů bylo pozorováno pouze v prostředí s aplikací motorové nafty a byly zařazeny do podskupiny proteobakterií (gram negativních) a to - Dw14, Dw15, Dw17, Dw20 a Dw21. Byl také pozorován band Dw10, který po sekvenování byl zařazen do rodu *Sphingomonas* (podskupina proteobakterií) a pozorován byl pouze v prostředí s aplikací motorové nafty. (MACNAUGHTON et al., 1999)

V práci Díaze-Ramiréze a kol (2007) byli sledováni degradéři, bakterie, izolované z půdy znečištěné ropnými látkami. V rámci práce byla sledována biodegradace alifatických, aromaticky-polárních a celkových ropných uhlovodíků. Izolovaní degradéři byli dále využiti pro navrhnutí tří definovaných smíšených kultur pro degradaci ropných frakcí.

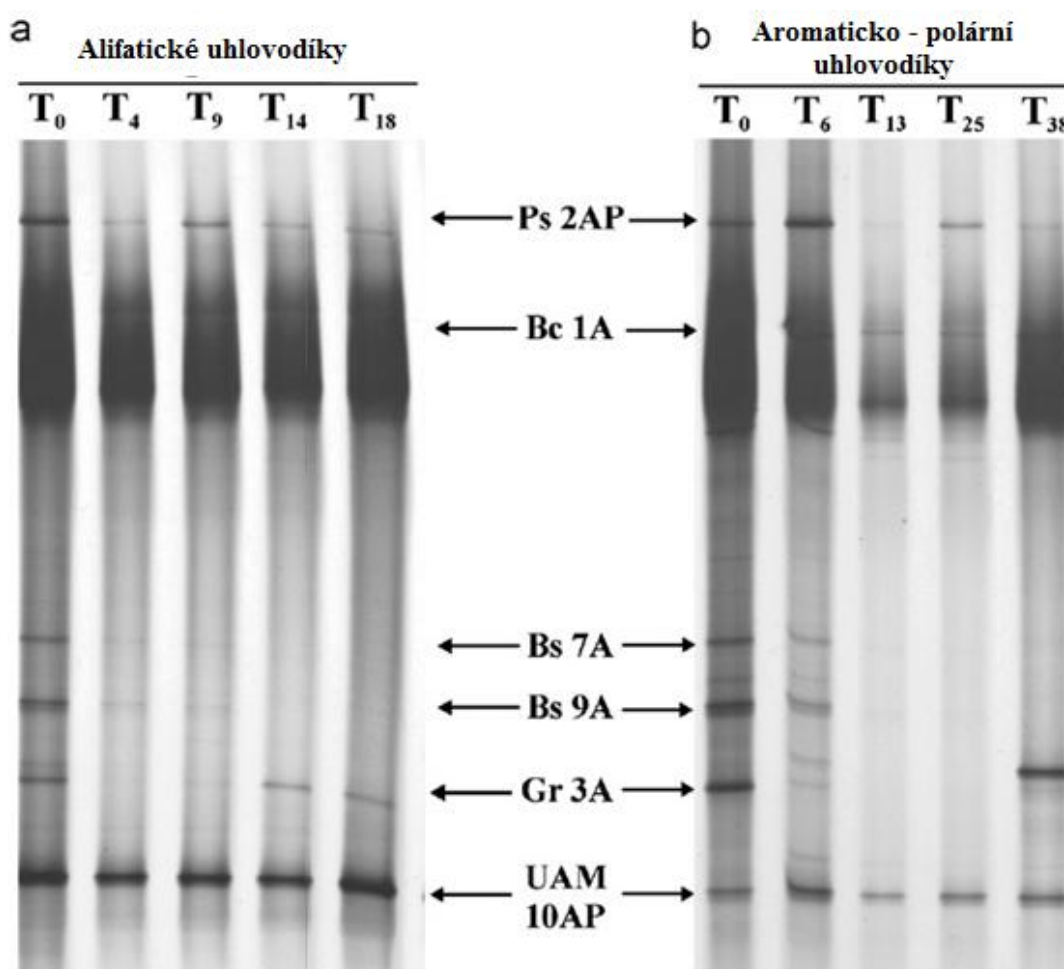
Příčemž skupina DMC-A obsahovala 10 bakteriálních kmenů: *Bacillus cereus* (Bc 1A), *Pseudomonas sp.* (Ps 2AP), *Gordonia rubripertincta* (Gr 3A), *Kocuria rosea* (Kr 4A), *Arthrobacter oxydans* (Ao 5A), *Bacillus subtilis* (Bs 7A), *B. subtilis* (Bs 9A), *Micrococcus luteus* (Ml 12A) a neidentifikovatelné kmeny (UAM 10AP and UAM 11A). Na obrázku (Obr. 11) je gel s vyznačenými bandy mikroorganismů, kde: T₀ je znázornění v počátku pokusu (po aplikaci mikroorganismů), na A_f jsou znázorněny dominantní mikroorganismy při rozkladu alifatických uhlovodíků v 16. dnu, AP_f znázorňuje dominantní mikroorganismy při degradaci aromatických-polárních uhlovodíků v 45. dnu a na TH_f jsou znázorněny bandy dominantních mikroorganismů při rozkladu celkových uhlovodíků v 16. dnu.



Obr. 11. Denaturační gradientový gel s označenými bandy skupiny DMC-A (DÍAZ-RAMÍREZ et al., 2008)

Skupina DMC-B byla tvořena 6 bakteriálními kmeny *Bacillus cereus* (Bc 1A), *Pseudomonas sp.* (Ps 2AP), *Gordonia rubripertincta* (Gr 3A), *Bacillus subtilis* (Bs 7A), *B. subtilis* (Bs 9A) a neidentifikovatelný kmen (UAM 10AP). Poslední skupina DMC-C byla složena ze tří bakteriálních kmenů: *Pseudomonas sp.* (Ps 2AP), *Gordonia rubripertincta* (Gr 3A) a neidentifikovatelný kmen (UAM 10AP).

Biodegradace alifatických (10 000 mg/l) a aromatických-polárních (5000 mg/l) frakcí byla hodnocena na DMC-B. Biodegradace celkových uhlovodíků (10 000 mg/l) a jeho frakcí byla hodnocena DMC-B a DMC-C. Bandy dominantních mikroorganismů ze skupiny DMC-B během biodegradace alifatických a aromatických-polárních uhlovodíků jsou znázorněny na gelu (Obr. 12). Kde bylo možno pozorovat změny v mikrobiálním společenstvu v časovém rozptylu 0 - 38 dní u aromaticko-polárních uhlovodíků a 0 - 18 dní u alifatických uhlovodíků.



Obr. 12. Bandy na DGGE gelu ze skupiny DCM-B, cílový region V6-V8 z 16S rDNA (DÍAZ-RAMÍREZ et al., 2008)

Průběh biologického rozkladu byl hodnocen spotřebou O₂ a produkcí CO₂ a populační dynamika dominantních kmenů pomocí metod PCR a DGGE.

Alifatické frakce byly zcela odbouratelné. Aromatické-polární frakce byly degradovatelné z 12,5 % a celkové uhlovodíky ze 40,5 %. Skupina DMC-B byla schopna degradovat aromatické frakce (31%) a polární frakce (19,6 %) přítomné v uhlovodících. Skupina DMC-C degradovala aromatické (5,6 %) a polární frakce (2 %) přítomné v uhlovodících. Snížení počtu mikroorganismů v případě skupiny DMC-C nepřineslo výrazné zlepšení biodegradovatelnosti.

Pomocí DGGE metody bylo zjištěno, že *Pseudomonas sp.*, *Gordonia rubripertincta* a neidentifikovatelné kmeny byly pravděpodobně zodpovědné za biodegradaci celkových uhlovodíků. Obecně lze říci, že nejvíce aktivní kmeny v biodegradaci ropných uhlovodíků patří do rodů *Pseudomonas sp.* (Ps 2AP), *Gordonia rubripertincta* (Gr 3A), *Bacillus cereus* (Bc 1A) a neidentifikovatelný kmen (UAM 10AP). Tyto rody byly určeny jako degradéři ropných uhlovodíků i v jiných vědeckých studiích. Kmeny *Pseudomonas* patří mezi nejčastěji izolované mikroorganismy v místech znečištěných ropnými uhlovodíky. (DÍAZ-RAMÍREZ et al., 2008)

Cílem studie Evans a kol. (2004) bylo analyzovat vliv kontaminace (ropnými uhlovodíky) a vliv biostimulantů (zvýšení pH půdy, přidavek dusíku, fosforu a síry) na rozmanitost bakteriální populace v kyselé půdě (Cambisol) v Atlantických lesích. Půda byla odebrána z hloubky 0 – 20 cm. Odebraná půda byla rozdělena na dvě poloviny. K polovině odebrané půdy byly přidány nutrienty C : N : P v poměru 100 : 10 : 1 a pH půdy bylo přidavkem CaCO₃ upraveno na 7 ± 0,2. Druhá polovina byla bez přidavku nutrientů a úpravy pH. Z každé poloviny byla odebrána další polovina a do ní byla aplikována lehká ropa. V takto získaných 4 vzorcích bylo sledováno bakteriální zastoupení v různých časech: 15, 30, 90, 180, 270 a 360 dní od začátku pokusu. V průběhu pokusu byly odebírány vzorky (v daných časových intervalech). Po izolaci DNA, PCR reakci bylo provedeno DGGE (6% akrylamidový gel s denaturačním gradientem 45-65 %). Bylo sledováno významné snížení v počtu populací v půdách s aplikací biostimulantů ve srovnání s kontrolními vzorky a to již 15 dnů po přidání živin. Výsledky ukazují, že přidavek anorganických látek do půdy, ve spojení s ropným znečištěním, má větší vliv na bakteriální osídlení. Po sekvenaci vyříznutých bandů z akrylamidového gelu bylo zjištěno, že získané sekvence jsou blízké

rodu *Bacillus* a *Planococcus*. Rody *Bacillus* byly již dříve izolovány např. z ropné nádrže v Brazílii a rod *Planococcus* byl také charakterizován jako bakterie, která je schopna degradovat ropné uhlovodíky. (EVANS et al., 2004)

Ve studii Labbé a kol. (2006) bylo sledováno zastoupení mikrobiálních společenstev v pěti nedotčených (nekontaminovaných) půdách a v devíti půdách kontaminovaných ropnými uhlovodíky. Kontaminované půdy pocházely z alpských míst nacházejících se v Tyrolsku (Rakousko) a půdy byly především kontaminovány motorovou naftou. Nedotčené půdy byly vybírány tak, aby horninovým složením co nejvíce odpovídaly sledovaným kontaminovaným lokalitám. V tabulce (Tab. 1) jsou uvedeny sledované lokality, celková koncentrace ropných uhlovodíků (TPH – total petroleum hydrocarbons), počet heterotrofních organismů a počet degradérů.

Tab. 1. Charakteristika sledovaných lokalit (LABBÁ et al., 2007)

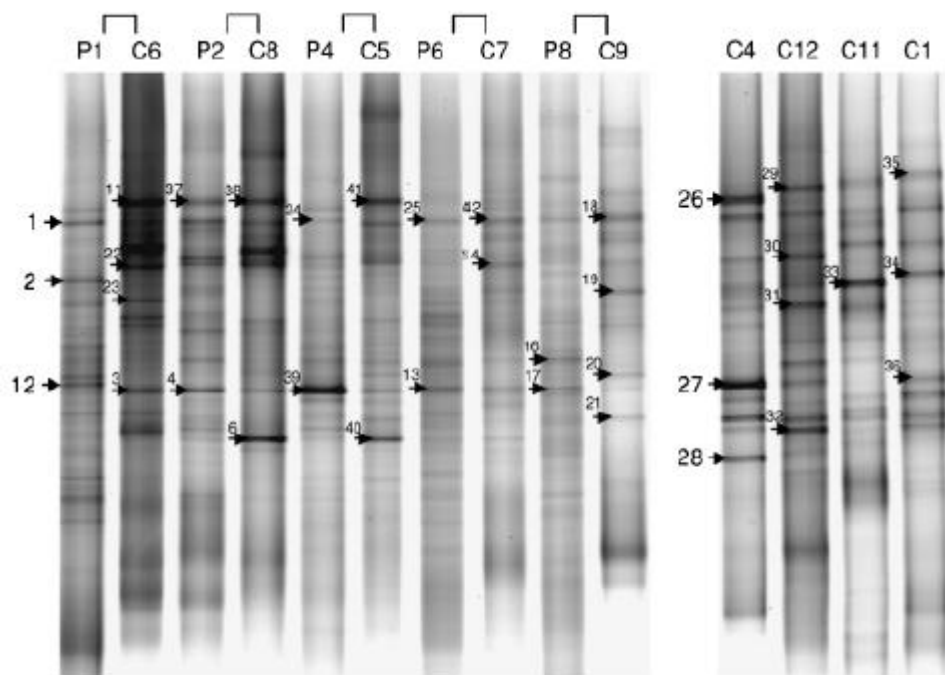
Lokality*	TPH [mg/kg]	Počet heterotrofních mikroorganismů [x 10 ⁶ CFU g ⁻¹]	Počet degradérů TPH [x 10 ⁶ CFU g ⁻¹]
P1	83	2	0,1
C6	3148	7	1
P2	41	2	0,5
C8	8385	127	11
P4	87	13	4
C5	2085	54	2
P6	89	31	18
C7	3317	268	99
P8	29	29	5
C9	13903	15	11
C1	428	3	2
C11	22447	10	2
C4	1052	67	47
C12	30644	62	40

* P – nedotčené lokality, C – kontaminované lokality

Kontaminované půdy se srovnávaly s nedotčenými: C6/P1, C8/P2, C5/P4, C7/P6, C9/P8. Dále byly zkoumány ještě další 4 lokality (C1, C11, C4 a C12). C1 a C11 jsou stejné lokality, ale s různou koncentrací TPH. A lokality C4 a C12 byly z různých míst o stejné nadmořské výšce, ale s jinou koncentrací TPH.

Pro klasifikaci mikrobiálních společenstev bylo využito PCR a DGGE. DGGE bylo realizováno na 8% akrylamidovém gelu s denaturačním gradientem 45 – 70 %.

Výsledný gel po DGGE je znázorněn na obrázku (Obr. 13.), kde jsou také vyznačeny vyřezané bandy, které byly po úpravě sekvenovány.



Obr. 13. Gradientový denaturační gel s vyznačenými bandy dominantních mikroorganismů (LABBĀ et al., 2007)

V tabulce (Tab. 2) je uvedeno procentuální zastoupení tříd mikroorganismů vyskytujících se ve sledovaných lokalitách.

Tab. 2. Třídy mikroorganismů v jednotlivých půdách a jejich procentuální zastoupení (LABBĀ et al., 2007)

Bakteriální třída	Procentuální zastoupení v nedotčené půdě	Procentuální zastoupení v kontaminované půdě
<i>Actinobacteria</i>	18	20
<i>Bacteroidetes</i>	0	4
<i>Alphaproteobacteria</i>	46	24
<i>Betaproteobacteria</i>	0	8
<i>Gammaproteobacteria</i>	0	24
Unclassified <i>Proteobacteria</i>	27	20
Unclassified Bacteria	9	0

Po vyřezání bandů z akrylamidového gelu po DGGE, bylo sekvenací určeno o jaké druhy mikroorganismů se jedná. V tabulce (Tab. 3.) jsou uvedeny lokality, kde se dané mikroorganismy vyskytovaly, číslo bandu na fotce gelu (Obr. 13), procentuální shoda s daným mikroorganismem a jejich zařazení do klasifikace. (LABBĚ et al., 2007)

Tab. 3. Klasifikace mikroorganismů (LABBĚ et al., 2007)

Lokalita	DGGE band	Shoda s sekvencí	% shoda	Klasifikace
Nedotčená				
P1	1	Uncultured bacterium clone P4-40 from inactive uranium mine	88	Unclassified Bacteria
P1	2	<i>Alphaproteobacterium</i> sj49	95	<i>Alphaproteobacteria</i>
P1	12	<i>Frankia</i> sp.	91	<i>Actinobacteria</i>
P2	4	Uncultured bacterium DGGE band I from brownfield site	91	Unclassified <i>Proteobacteria</i>
P2	37	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	94	<i>Alphaproteobacteria</i>
P4	24	<i>Sphingomonas</i> sp. SIA181-1A1	96	<i>Alphaproteobacteria</i>
P4	39	<i>Arthrobacter</i> sp. R455	96	<i>Actinobacteria</i>
P6	13	<i>Betaproteobacterium</i> HTCC304	90	Unclassified <i>Proteobacteria</i>
P6	25	<i>Sphingomonas</i> sp. SRS2	94	<i>Alphaproteobacteria</i>
P8	16	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i>	92	<i>Alphaproteobacteria</i>
P8	17	<i>Thauera</i> sp. P-4CB1	91	Unclassified <i>Proteobacteria</i>
Kontaminovaná				
C1	34	<i>Sphingopyxis flavimaris</i> str.	96	<i>Alphaproteobacteria</i>
C1	35	<i>Alphaproteobacterium</i> AP-22	99.5	<i>Alphaproteobacteria</i>
C1	36	<i>Arthrobacter</i> sp. SMCC G984	91	<i>Actinobacteria</i>
C4	26	<i>Alcaligenes</i> sp. R-21939	94	<i>Betaproteobacteria</i>
C4	27	<i>Arthrobacter rhombi</i>	100	<i>Actinobacteria</i>
C4	28	<i>Rhodococcus</i> sp. LB1	98	<i>Actinobacteria</i>
C5	40	<i>Arthrobacter</i> sp. CPA2	97	<i>Actinobacteria</i>
C5	41	<i>Sinorhizobium</i> sp. AS08	88	Unclassified <i>Proteobacteria</i>
C6	3	Uncultured bacterium DGGE band h from brownfield site	91	Unclassified <i>Proteobacteria</i>
C6	11	<i>Brevundimonas</i> sp.	97	<i>Alphaproteobacteria</i>
C6	22	<i>Sphingomonas</i> sp. ZL5	88	Unclassified <i>Proteobacteria</i>
C6	23	<i>Glacier bacterium</i> FJ150	99.8	<i>Betaproteobacteria</i>
C7	14	<i>Sphingomonas</i> sp. KIN169	89	Unclassified <i>Proteobacteria</i>
C7	42	<i>Aquimonas voraii</i> strain GPT	93	<i>Gammaproteobacteria</i>
C8	6	<i>Rhodococcus</i> sp. 5/14	99	<i>Actinobacteria</i>
C8	38	<i>Brevundimonas</i> sp.	95	<i>Alphaproteobacteria</i>
C9	18	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	90	Unclassified <i>Proteobacteria</i>
C9	19	<i>Aquimonas voraii</i>	93	<i>Gammaproteobacteria</i>
C9	20	<i>Lysobacter antibioticus</i>	97	<i>Gammaproteobacteria</i>
C9	21	<i>Aquimonas voraii</i>	93	<i>Gammaproteobacteria</i>
C11	33	<i>Xanthomonas sacchari</i>	97	<i>Gammaproteobacteria</i>
C12	29	<i>Bacteroidetes bacterium</i> Mo-0.2plat-K3	96	<i>Bacteroidetes</i>
C12	30	<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31853	96	<i>Alphaproteobacteria</i>
C12	31	<i>Marinospirillum minutulum</i>	93	<i>Gammaproteobacteria</i>
C12	32	<i>Sphingobium</i> sp. K40	99.7	<i>Alphaproteobacteria</i>

V následující tabulce (Tab. 4) jsou shrnuty degradační mikroorganismy uvedeny v zahraničních studiích:

Tab. 4. Výsledky zahraničních studií

Mikroorganismy zodpovědné za degradaci ropných uhlovodíků	
Studie:	ATLAS, 1981; BANAT et al., 2000; LEAHY and COLWELL, 1990
Rody:	<i>Micrococcus, Corynebacterium, Bacillus, Enterobacter, Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Moraxella, Aeromonas, Acinetobacter a Vibrio.</i>
Studie:	Ismail Saadoun (2002)
Metoda:	Kultivace
Druhy:	<i>Pseudomonas putida, Pseudomonas mallei, Enterobacter cloacae a Rhodococcus erythropolis</i>
Studie:	MacNaughton a kol. (1999)
Metoda:	DGGE
Rody:	Zástupce grampozitivním rodů <i>Exiguabacterium, Planococcus</i> , gramnegativním druhům v rámci kmene <i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i> , proteobakterie (gramnegativní), zástupci rodu <i>Sphingomonas</i>
Studie:	Díaz-Ramírez a kol (2007)
Metoda:	DGGE
	<i>Pseudomonas sp., Gordonia rubripertincta, Bacillus cereus a neidentifikovatelný kmen</i>
Studie:	Evans a kol. (2004)
Metoda:	DGGE
Rody:	<i>Bacillus a Planococcus</i>
Studie:	Labbé a kol. (2006)
Metoda:	DGGE
Rody:	<i>Alcaligenes, Rhodococcus, Sphingomona, atd. (viz Tab. 3)</i>

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomová práce měla několik cílů.

Prvním cílem bylo vypracovat literární rešerši na dané téma. Byla zpracována řada studií zabývajících se mikrobiálním zastoupením v půdách během biodegradace ropných uhlovodíků.

Druhým cílem bylo osvojit si a následně aplikovat molekulárně biologické metody. Jednalo se o metody: PCR (polymerázová řetězová reakce), elektroforéza v agarózovém gelu a TGGE (gelová elektroforéza v teplotním gradientu).

V rámci praktické části byly vytyčeny následující cíle:

- Optimalizovat metodu izolace DNA z reálných vzorků půd.
- Zvládnout metodiku PCR (přístroj FINNZYMES PIKO) a TGGE (přístroj TGGE Maxi System).
- Adaptovat a optimalizovat metodiku TGGE pro analýzu mikroorganismů domény *Archaea*.
- Pomocí TGGE analyzovat bakteriální společenstva v reálných vzorcích.

7 MATERIÁL A METODIKA

V první části této kapitoly jsou uvedeny použité přístroje, zařízení a chemikálie. V další části je uvedena metodika pro jednotlivé metody, které byly v rámci této práce používány.

7.1 Použité přístroje, zařízení a chemikálie

Chemikálie:

Agarose SeaKem (LONZA)

APS (Amonium persulfát - SIGMA)

Bromfenolová modř (SERVA)

Dimethylsulfoxid (Fluka Biochemika)

DNA Marker: 200 – 1600 (AscoProt Biotech)

EDTA – (Ethylendiaminetetraacetic, acid disodium salt dihydrate 99+ % - SIGMA)

Ethidiumbromid (1:30 H₂O) (SIGMA)

FastStast PCR Master (ROCHE)

Fenol (SIGMA)

Foramide ≥ 99,5% (SIGMA)

GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (LONZA)

Glycerol 99 % (SIGMA)

GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega)

Chloroform (Ing. Petr Lukeš)

Kyselina octová 99,8% (Ing. Petr Lukeš)

Lysosym (SERVA)

Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder (Biolabs. Inc. New England)

MgCl₂ 25mM Stock Solution (ROCHE)

Močovina (Urea – Promega)

Octan sodný (Lachner)

Power Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio)

Psoralen (7H-Furo[3,2-g]benzopyran-7-one – Fluka Biochemika)

- Zásobní roztok psoralenu 25x koncentrovaný
- Pracovní roztok psoralenu 2,5x koncentrovaný

SDS (Dodecylsulftsodný – SERVA)

TEMED (NNN'N' - tetraethylethylendiamin - SIGMA)

TRIS – (Tris(hydroxymethyl)aminomethane – SERVA)

Tris HCl (Trishydrochlorid - SERVA)

Trisborát (SIGMA)

Triton 0,01% (SIGMA)

Voda pro molekulárně biologické metody (SIGMA)

Primery (Eastport - Metabion):

Zásobní roztok primerů 100 pmol/μl

Pracovní roztok primerů 20 pmol/μl

Tab. 5. Přehled použitých primerů

Primer*	Sekvence**	Délka produktu
Archaea (OVREÅS et al., 1997; YAGI et al., 2011)		
PREA 46f	YTA AGC CAT GCR AGT	1054
PREA 1100r	YGG GTC TCG CTC GTT RCC	
GC PARCH 340f	CCC TAC GGG GYG CAS CAG	179
PARCH 340f	CCC TAC GGG GYG CAS CAG	
PARCH 519r	TTA CCG CGG CKG CTG	
Bacterie (MUYZER et al., 1993; WEISBURG et al., 1991)		
FD1 Weisburg	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1529
RD1 Weisburg	AAG GAG GTG ATC CAG CC	
GC 341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	177
341f Muyzer	CCT ACG GGA GGC AGC AG	
518r Muyzer	ATT ACC GCG GCT GCT GG	

*Primery, které v sekvenci obsahovaly GC svorku (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG (TGGEMAXISystem)) je v názvu uvedeno GC.

** V sekvencích jsou tzv. degenerované báze, kde kód udává více variant nukleových kyselin: Y = C nebo T, R = A nebo G, S = G nebo C, K = G nebo T (BIOINFORMATICS ORGANIZATION, 2014)

Přístroje a zařízení:

Analytické váhy (DENVER INSTRUMENT – SI64A d=0,0001 g)

Autokláv (Varioklav[®] H+P – SN 98681104)

Centrifuga (HERMLE Z 100M)

Centrifuga minispin plus (Eppendorf)

Elektroforetické soustavy:

Elektrický vařič (ZANUSSI)

Chlazená centrifuga (Andreas Hettich GmbH & Co. KG – ROTANA 460R)

Chlazená centrifuga (JOUAN SA – MR 23i)

Kulový mlýnek (Vortex – Retsch MM301)

Laboratorní sklo

Laminární box (Major Science - Aura PCR BIOAIR MP-300N)

Lednice s mrazákem (BEKO CSA34020)

Míchadlo s ohřevem (Heidolph MR Hei-Tec)

Mikropipety (Nichipet EX (NICHIRYO), Pipetman Neo (GILSON), Eppendorf Research)

Mikrovlnná trouba (Electrolux)

Navážky (KERN KB d=0,01 g)

Nitrilové rukavice (Vasco)

- Owl B1A (objem 50 ml)
- SCIE-PLAS HU10 (objem 100 ml)

Sterilní špičky

Sterilní špičky s filtrem (ExpellPlus)

Stopky

Termostat (Dry Block Heating Thermostat – Bio TDB-100 Biosan)

Termostat (Laboratorní přístroje Praha – Biological thermostat BT 120 4307)

Thermocyklér (FINNZYMES PIKO)

Transiluminátor (SYNGENE, Model InGeniusLHR)

Vortex V-1 plus (Biosan)

7.1.1 Příprava roztoků

50x TAE pufr – (2 mol/l Tris báze, 0,05 mol/l Na₂EDTA, 1mol/l CH₃COOH) 24,23 g Tris báze, 1,86 g Na₂EDTA a 5,654 ml kyseliny octové bylo kvantitativně převedeno do 100ml odměrné baňky, komponenty byly rozpuštěny (pH upraveno na 8,0 pomocí 10% roztoku NaOH). Roztok byl doplněn na objem 100 ml, sterilizován v autoklávu a skladován při laboratorní teplotě.

10x TAE pufr – 200 ml 50x TAE pufru bylo doplněno na objem 1000 ml.

2x TAE pufr – 40 ml 50x TAE pufru bylo doplněno na objem 1000 ml. Roztok byl až 8x recyklován a skladován v temnu.

1x TAE pufr – 20 ml 50x TAE pufru bylo doplněno na objem 1000 ml.

Thermal coupling roztok – bylo připraveno 100 ml 0,01% Triton. Skladován v lednici.

Nanášecí pufr 6x – se skládal z 0,25% bromfenolové modři a 30% glycerolu. Skladován v lednici.

Pracovní roztok 2,5x psoralenu – pracovní roztok byl připravován ze zásobního roztoku psoralenu (25x koncentrovaný) – 10 μl zásobního roztoku bylo smícháno s 90 μl dimethylsulfoxidu. Roztok byl skladován při teplotě – 20 °C.

7.2 Charakteristika vzorků

Vzorky horninového prostředí (jíl a štěrk) byly poskytnuty firmou EPS, s.r.o., která se specializuje na výzkum a vývoj inovativních technologií, především biotechnologií. Dále se věnuje realizaci průzkumů znečištění horninového prostředí a na jejich sanaci, zejména pomocí bioremediačních technologií.

Vzorky pocházely z lokality kontaminované ropnými látkami. Jedná se o lokalitu o ploše cca 3 600 m², kde kontaminace vznikla v důsledku nešetrného zacházení s ropnými látkami při jejich stáčení. Ropné látky se vyskytovaly v sorbované formě na matrici zeminy, rozpuštěné formě a i ve formě filmu na hladině podzemní vody. Na lokalitě byly používány různé sanační technologie: sanační čerpání, promývání horninového prostředí předčištěnou vodou i roztokem povrchově aktivních látek, air sparging, bioventing a bioremediace. Díky nízké propustnosti nenasycené zóny bylo využito na části sanovaného území In situ chemické oxidace (ISCO). (DOSTÁLKOVÁ and MIKEŠ, 2013)

Na lokalitách byly použity tyto modifikace sanačních technologií. In situ chemická oxidace s aplikací modifikovaného Fentonova činidla. In situ chemická oxidace s aplikací persulfátu a elektrického proudu. Poslední metodou byla Bioremediace s aplikací inokul a nutrientů (PO_4^{3-} , NH_4^+).

Podrobnější informace o daných lokalitách, či způsobu aplikace oxidačních činidel a způsobu úpravy lokalit byly firemním tajemstvím.

V tabulce (*Tab. 6*) byla uvedena stručná charakteristika vzorků, datum a hloubka odběru.

Tab. 6. Charakteristika vzorků

Vzorek	Název	Hloubka [m]	Datum	Charakteristika a vzhled
1	Pozadí - 1A	2,0 - 3,0	5. 8. 2013	Kontrolní vzorek z lokality bez zásahu, obsahuje kontaminant - šedo-hnědý plastický jíl.
2	Pozadí - 1B	3,0 - 3,5	12. 9. 2013	Kontrolní vzorek z lokality bez zásahu, obsahuje kontaminant - šterk.
3	BIO - 1A	0,5 - 2,0	12. 9. 2013	Cca 2 roky probíhala aplikace inokula a nutrientů, minulý rok pouze aplikace nutrientů - šedo-hnědý plastický jíl.
4	BIO - 1B	3,0 - 3,5	12. 9. 2013	Cca 2 roky probíhala aplikace inokula a nutrientů, minulý rok pouze aplikace nutrientů - šterk.
5	ISCO - 1A	1,0 - 2,0	12. 9. 2013	Lokalita připravena na aplikaci ISCO - šedo-hnědý plastický jíl.
6	ISCO - 1B	3,0 - 4,0	12. 9. 2013	Lokalita připravena na aplikaci ISCO - šterk.
7	2A - E	2,0 - 3,0	18. 12. 2013	Lokalita po aplikaci ISCO (persulfát + elektřina) – 3 - 5 aplikací, odebráno 2 týdny po poslední aplikaci - šedo-hnědý plastický jíl.
8	2B - E	3,0 - 4,5	18. 12. 2013	Lokalita po aplikaci ISCO (persulfát + elektřina) – 3 - 5 aplikací, odebráno 2 týdny po poslední aplikaci - šterk.
9	2A - F	2,0 - 3,0	2. 12. 2013	Lokalita po aplikaci ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) – 3 - 5 aplikací, odebráno 2 týdny po poslední aplikaci - šedo-hnědý plastický jíl.
10	2B - F	3,0 - 4,5	2. 12. 2013	Lokalita po aplikaci ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) – 3 - 5 aplikací, odebráno 2 týdny po poslední aplikaci - šterk.
11	3A - E	2,0 - 3,0	26. 2. 2014	Lokalita po aplikaci ISCO (persulfát + elektřina) – 3 - 5 aplikací, odebráno cca 3 měsíce po poslední aplikaci - šedo-hnědý plastický jíl.
12	3B - E	3,0 - 4,5	26. 2. 2014	Lokalita po aplikaci ISCO (persulfát + elektřina) – 3 - 5 aplikací, odebráno cca 3 měsíce po poslední aplikaci - šterk.
13	3A - F	2,0 - 3,0	26. 2. 2014	Lokalita po aplikaci ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) – 3 - 5 aplikací, odebráno cca 3,5 měsíce po poslední aplikaci - šedo-hnědý plastický jíl.
14	3B - F	3,0 - 4,5	26. 2. 2014	Lokalita po aplikaci ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) – 3 - 5 aplikací, odebráno cca 3,5 měsíce po poslední aplikaci - šterk.
15	4A - E	2,0 - 3,0	24. 4. 2014	Lokalita po aplikaci ISCO (persulfát + elektřina) – 3 - 5 aplikací, odebráno cca 6 měsíců po poslední aplikaci - šedo-hnědý plastický jíl.
16	4B - E	3,0 - 4,5	24. 4. 2014	Lokalita po aplikaci ISCO (persulfát + elektřina) – 3 - 5 aplikací, odebráno cca 6 měsíců po poslední aplikaci - šterk.
17	4A - F	2,0 - 3,0	24. 4. 2014	Lokalita po aplikaci ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) – 3 - 5 aplikací, odebráno cca 6 měsíců po poslední aplikaci - šedo-hnědý plastický jíl.
18	4B - F	3,0 - 4,5	24. 4. 2014	Lokalita po aplikaci ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) – 3 - 5 aplikací, odebráno cca 6 měsíců po poslední aplikaci - šterk.
19	BIO - 2A	0,5 - 2,0	24. 4. 2014	Pouze aplikace nutrientů, po cca 6 měsících - šedo-hnědý plastický jíl.
20	BIO - 2B	3,0 - 3,5	24. 4. 2014	Pouze aplikace nutrientů, po cca 6 měsících - šterk.

7.3 Monitorování mikroorganismů pomocí molekulárně biologických metod

7.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena dvěma způsoby. Pomocí: fenol - chloroformové extrakce a pomocí komerčního kitu (PowerSoil™ DNA Isolation Kit).

7.3.1.1 Izolace DNA pomocí komerčního kitu

Izolace DNA ze vzorků půd byla provedena pomocí PowerSoil™ DNA Isolation Kit následovně:

1. Do rozbíjecích zkumavek bylo naváženo 0,25 g vzorku jílu nebo 0,75 g v případě vzorku šterku. Poté následovala homogenizační a rozkladná procedura. Rozbíjecí zkumavky obsahovaly pufr, který chránil nukleové kyseliny před degradací, pomáhal rozpustit půdní částice a začal rozkládat huminové kyseliny.
2. Dále bylo přidáno 60 µl pufru obsahujícího aniontový detergent (SDS) a další činidla, která byla nezbytná pro rozklad buňky. SDS rozbíjel mastné kyseliny a lipidy vázané na buněčnou membránu.
3. Rozbíjecí zkumavky byly umístěny do vodorovné polohy do vortexu (Kulový mlýnek). Vortexování probíhalo po dobu 10 minut při rychlosti 30 1/s frekvence. Tento krok byl kritický pro celkovou homogenizaci a buněčný rozklad. Buňky byly rozkládány účinkem chemických činidel (zmíněných výše) a mechanickým třepáním. Díky nepravidelnému míchání částic docházelo k narážení skleněných rozbíjecích částic do buněk mikroorganismů, což vedlo k narušení a lyzi buněk. Poté byla směs centrifugována při 14 000 RPM (otáček/min) po dobu 30 sekund.
4. V závislosti na účinnosti procesu bylo přeneseno mikropipetou do čisté mikrozkušavky (typu Eppendorf) 400 – 500 µl supernatantu.
5. Dále bylo přidáno 250 µl směsi obsahující složky srážející anorganické látky, proteiny a úlomky buněk, kyselinu huminovou a organický materiál (kromě DNA). Tyto látky je důležité odstranit, protože snižují čistotu DNA a inhibují její následné aplikace.
6. Směs byla po dobu 5 sekund vortexována a inkubována 5 minut při teplotě 4 °C, poté byla 1 minutu za laboratorní teploty centrifugována při 14 000 RPM.

7. Kromě sedimentu bylo přeneseno maximálně 600 μl supernatantu do čisté mikrozkušavky. Při odběru bylo nutné se vyhnout sraženině obsahující nežádoucí látky. K supernatantu bylo přidáno 200 μl směsi srážející anorganické a organické materiály (kromě DNA). Směs byla po dobu 5 sekund vortexována a inkubována 5 minut při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$, poté byla 1 minutu za laboratorní teploty centrifugována při 14 000 RPM.
8. Do čisté zkumavky bylo přeneseno maximálně 750 μl supernatantu a přidáno 1 200 μl koncentrovaného solného roztoku. Směs byla po dobu 5 sekund vortexována.
9. Poté bylo 675 μl směsi přeneseno na kolonku, obsaženou v sadě, a centrifugováno 1 minutu při 14 000 RPM. Přefiltrovaná kapalina byla vylita. Tento krok byl opakován 3x. Při vysoké koncentraci soli se DNA selektivně navázala na křemičitou membránu kolonky a téměř všechny kontaminující látky byly odstraněny. Na membráně se zachytila pouze DNA.
10. Následně bylo přidáno 500 μl promývacího roztoku na bázi ethanolu, díky němuž došlo k odstranění zbytků soli a ostatních nečistot navázaných na membráně. Směs byla centrifugována po dobu 30 sekund při 14 000 RPM a přefiltrovaná kapalina vylita.
11. Kolonka byla centrifugována 1 minutu při 14 000 RPM a poté opatrně přenesena, aby nedošlo k potřísnění kolonky zbytkem kapaliny, do čisté mikrozkušavky. Na membránu kolonky bylo nanášeno 100 μl sterilního eluačního pufru, (předehřátého na 37 $^{\circ}\text{C}$) a DNA se nechala 30 minut eluovat při laboratorní teplotě.
12. Nakonec byla směs 30 sekund centrifugována při 14 000 RPM. Pomocí eluačního pufru byla DNA z membrány převedena do roztoku.

7.3.1.2 Izolace DNA pomocí fenol - chloroformové metody

Izolace DNA pomocí fenol – chloroformové metody probíhala ve třech krocích:

Lyze buněk

1. Bylo naváženo 0,25 g (2 g) vzorku. Vzorek byl resuspendován v 1100 μl roztoku 1 (10 mmol/l (TrisHCl (pH 7,8) + 5 mmol/l EDTA (pH 8,0)) a poté bylo opět přidáno 1000 μl (10 ml) roztoku 1.
2. Po centrifugaci po dobu 3 minut při 15 000 RPM byl slit supernatant.

3. K sedimentu bylo přidáno 1000 μ l (10 ml) roztoku 2 (10 mmol/l TrisHCl (pH 7,8) + 5 mmol/l EDTA (pH 8,0) + lysozym 0,3 mg/ml), vzorek byl resuspendován a inkubován při 37 °C po dobu 1 hodiny.
4. Dále bylo přidáno 25 μ l (250 μ l) 20 % SDS (dodecylsulfát sodný) a 10 μ l (100 μ l) proteinázy K.
5. Vzorek byl inkubován při 55 °C do projasnění cca 3 hodiny.

Odstranění proteinů

1. K lyzátu byl přidán stejný objem predestilovaného fenolu a kývavým pohybem pořádně promícháván po dobu 4 minut. Poté následovala centrifugace 1 minutu při 10 000 RPM v chlazené centrifuze při teplotě 4 °C
2. Do čisté mikrokumavky byla opatrně odebrána vodná fáze obsahující DNA.
3. K ní byl přidán stejný objem směsi fenol:chloroform (1:1) a kývavým pohybem pořádně promícháván po dobu 4 minut.
4. Poté následovala centrifugace 1 minutu při 10 000 RPM v chlazené centrifuze při teplotě 4 °C.
5. Do čisté mikrokumavky byla odebrána vodná fáze s DNA. K ní bylo přidáno 300 μ l (3 ml) směsi chloroform:izoamylalkohol (24:1) a kývavým pohybem promícháváno po dobu 4 minut.
6. Následovala opět centrifugace 1 minutu při 10 000 RPM v chlazené centrifuze při teplotě 4 °C.
7. Nakonec byla odebrána vodná fáze s DNA do čisté mikrokumavky.

Srážení DNA etanolem

1. K DNA ve vodné fázi byla přidána 1/10 objemu 3 mol/l octanu sodného (do konečné koncentrace 0,01 - 0,03 mol/l) a roztokem byl důkladně promícháno.
2. Bylo přidáno 2,5 objemu ethanolu (96 %), roztok byl řádně promíchán a inkubován při teplotě - 20 °C po dobu 30 minut.
3. Poté byl roztok centrifugován 1 minutu při 10 000 RPM při teplotě 4 °C.
4. Byl odstraněn supernatant a sediment byl usušen v termostatu. DNA byla rozpuštěna v 50 μ l TE pufru (10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0) + 1 mmol/l EDTA (pH 8,0)).

Izolace DNA pomocí fenol – chloroformové metody byla provedena 2x – lišila se navázkou vzorku. Bylo naváženo 0,25 g a 2 g. Objemy roztoků pro navázkou 2 g jsou uvedeny v závorkách.

7.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Princip PCR reakce je popsán v teoretické části diplomové práce. Pro amplifikaci domén *Bacteria* a *Archaea* byly převzaty primery ze zahraničních studií (Tab. 5). V rámci diplomové práce byla použita „Nested“ PCR metoda v kombinaci s „TouchDown“ PCR. Nejprve byla amplifikována delší část řetězce DNA a následně kratší, která je specifitější.

U domény *Bacteria* byly pro první stupeň PCR použity primery FD1, RD1 a pro druhý stupeň PCR primery GC 341f Muyzer a 518r Muyzer. (MUYZER et al., 1993; WEISBURG et al., 1991)

U domény *Archaea* byly pro první stupeň PCR použity primery PREA 46f a PREA 1100R a pro druhý stupeň PCR primery GPCARCH 340f a PARCH 519r. (OVREÅS et al., 1997; YAGI et al., 2011)

Primery byly dodány v lyofylizované formě. Pro získání požadované koncentrace 100 pmol/μl byly doplněny určeným objemem vody – dle výrobce (Eastport - Metabion). Po zahřátí primerů na 37 °C byly lyofylizované primery rozpuštěny a naředěny na pracovní koncentraci 20 pmol/μl.

PCR programy pro jednotlivé domény jsou uvedeny níže. U denaturace byla teplota v rozmezí 94 °- 95 °C, jelikož byly použity různé Mastermixy, které obsahovaly odlišné typy polymeráz. Ze stejného důvodu byly v popisech programů i jiné doby denaturace. U mastermixu GoTaq® Hot Start Green MasterMix byla teplota denaturace 94 °C po dobu 5 minut a u mastermixu FastStast PCR Master byla teplota denaturace 95 °C po dobu 10 minut.

Postup přípravy reakční směsi pro PCR:

Reakční směs obsahovala: mastermix (polymerázu – Roche nebo Promega), 2 primery, sterilní vodu pro molekulární biologii a chlorid hořečnatý nebo psoralen (2,5x koncentrovaný – ředěno dimethylsulfoxidem), který sloužil k zamezení kontaminace vzorků. Pro 1. stupeň PCR reakce byla připravována reakční směs o objemu 20 μl a pro 2. stupeň PCR reakce byla připravována reakční směs o objemu 25 μl. Pro 2. stupeň PCR

reakce bylo při použití mastermixu GoTaq® Hot Start Green MasterMix připravován reakční objem 30 μl . Přesné složení reakčních směsí je uvedeno v tabulce (Tab. 7):

Tab. 7. Složení reakční směsi pro PCR

1. stupeň PCR reakce			
	Koncentrace pracovního roztoku	Objem v reakci	Koncentrace v reakci
Mastermix (ROCHE, Promega)	2x	10 μl	1x
Sterilní voda		6,75 μl	
MgCl ₂	25 mmol/l	0,25 μl	0,3 mmol/l
Forward primer	20 pmol/ μl	1 μl	1 $\mu\text{mol/l}$
Reverse primer	20 pmol/ μl	1 μl	1 $\mu\text{mol/l}$
DNA		1 μl	
Finální objem:		20 μl	
2. stupeň PCR reakce			
	Koncentrace pracovního roztoku	Objem v reakci	Koncentrace v reakci
Mastermix (ROCHE)	2x	12,5 μl	1x
Sterilní voda		9,25 μl	
Psoralen	2,5x	0,25 μl	0,025x
Forward primer	20 pmol/ μl	1 μl	1 $\mu\text{mol/l}$
Reverse primer	20 pmol/ μl	1 μl	1 $\mu\text{mol/l}$
DNA		1 μl	
Finální objem:		25 μl	
2. stupeň PCR reakce			
	Koncentrace pracovního roztoku	Objem v reakci	Koncentrace v reakci
Mastermix (Promega)	2x	15 μl	1x
Sterilní voda		11,1 μl	
Psoralen	2,5x	0,3 μl	0,025x
Forward primer	20 pmol/ μl	1,2 μl	1 $\mu\text{mol/l}$
Reverse primer	20 pmol/ μl	1,2 μl	1 $\mu\text{mol/l}$
DNA		1,2 μl	
Finální objem:		30 μl	

Reakční směs byla připravována v laminárním UV boxu za aseptických podmínek (vysvícení UV paprsky po dobu 20 minut) – zamezení kontaminace jednotlivých komponent. Jednotlivé komponenty reakční směsi byly dávkovány do tzv. stripů (spojených 8 PCR zkumavek o objemu 200 μ l), dle následujícího postupu:

1. Do stripů byly napipetovány jednotlivé komponenty: Mastermix, sterilní voda pro molekulární biologii, forward a reverse primery a psoralen, nebo chlorid hořečnatý.
2. Směs byla vysvícena (UV paprsky) po dobu 5 minut v transiluminátoru z důvodu zamezení kontaminace.
3. Následně byla přidána DNA izolovaná ze vzorků půd.
4. Směs byla důkladně promíchána a centrifugována. Nakonec byla vložena do termocykleru, kde byl nastaven příslušný program.

Při každé reakci byla připravena také negativní kontrola (kontrola kontaminace), místo templátu byla dávkována sterilní voda pro molekulární biologii.

Použité programy pro PCR reakci:

Pro doménu *Bacteria* byl pro první stupeň PCR použit program FD1RD1, pro druhý stupeň PCR, program V3TD

Program FD1RD1TD:

Počáteční denaturace:	94 ° - 95 °C	5 - 10 min		
Denaturace (denaturation):	94 ° - 95 °C	1 min	←	9x opakováno, každý cyklus se teplota annealingu snížila o 0,5 °C
Nasedání primeru (annealing):	57 °C	1 min		
Elongace (extension):	72 °C	2 min		
Denaturace (denaturation):	94 ° - 95 °C	1 min	←	24x opakováno
Nasedání primeru (annealing):	52 °C	1 min		
Elongace (extension):	72 °C	2 min		
Závěrečná extenze (finalextension):	72 °C	10 - 30 min		
Uchování (storage):	4 °C	∞		

Program V3TD:

Počáteční denaturace:	94 ° - 95 °C	5 - 10 min		
Denaturace (denaturation):	94 ° - 95 °C	0,5 min	←	9x opakováno, každý cyklus se teplota annealingu snížila o 0,5 °C
Nasedání primeru (annealing):	61 °C	0,5 min		
Elongace (extension):	72 °C	0,5 min		
Denaturace (denaturation):	94 ° - 95 °C	0,5 min	←	24x opakováno
Nasedání primeru (annealing):	56 °C	0,5 min		
Elongace (extension):	72 °C	1 min		
Závěrečná extenze (final extension):	72 °C	10 - 30 min		
Uchování (storage):	4 °C	∞		

U domény *Archaea* byl pro první stupeň PCR použit program ARCH46TD a pro druhý stupeň PCR program V3ARCHTD

Program ARCH46TD:

Počáteční denaturace:	94 ° - 95 °C	5 - 10 min		
Denaturace (denaturation):	94 ° - 95 °C	1 min	←	9x opakováno, každý cyklus se teplota annealingu snížila o 0,5 °C
Nasedání primeru (annealing):	56 °C	0,5 min		
Elongace (extension):	72 °C	1 min		
Denaturace (denaturation):	94 ° - 95 °C	1 min	←	24x opakováno
Nasedání primeru (annealing):	51 °C	0,5 min		
Elongace (extension):	72 °C	1,5 min		
Závěrečná extenze (final extension):	72 °C	10 - 30 min		
Uchování (storage):	4 °C	∞		

Program V3ARCHTD:

Počáteční denaturace:	94 ° - 95 °C	5 - 10 min	
Denaturace (denaturation):	94 ° - 95 °C	0,5 min	9x opakováno, každý cyklus se teplota annealingu snížila o 0,5 °C
Nasedání primeru (annealing):	56 °C	0,5 min	
Elongace (extension):	72 °C	1 min	
Denaturace (denaturation):	94 ° - 95 °C	0,5 min	24x opakováno
Nasedání primeru (annealing):	51 °C	0,5 min	
Elongace (extension):	72 °C	1 min	
Závěrečná extenze (final extension):	72 °C	10 - 30 min	
Uchování (storage):	4 °C	∞	

Připravené amplikony byly detekovány pomocí gelové elektroforézy a následně separovány pomocí TGGE.

7.3.3 Gelová elektroforéza

Po každé PCR reakci byla provedena kontrola (detekce) PCR amplikonů pomocí elektroforetické soustavy - elektroforéza.

Elektroforéza probíhala na 1% agarózovém gelu. Na přípravu 1% agarózového gelu bylo použito:

Agaróza:	0,5 – 1 g
Pufř TAE (1x koncentrovaný):	50 – 100 ml
Ethidiumbromid:	30 – 60 μ l

Množství použitých chemikálií záviselo na počtu vzorků (při počtu nad 10 vzorků byl připravován 100 ml agarózový gel). 1% agarózový gel byl připraven dle následujícího postupu:

1. Pomocí TAE pufřu byla agaróza kvantitativně převedena do Erlenmayerovy baňky. Pro dokonalé rozpuštění agarózy bylo využito mikrovlnné trouby, kde byla agaróza přivedena k bodu varu.
2. Poté bylo do směsi přidáno 30 - 60 μ l ethidiumbromidu, v závislosti na připravovaném objemu agarózového gelu.
3. Směs byla promíchána a převedena do formy. V gelu byly pomocí hřebínku vytvořeny jamky, které sloužily pro nanesení PCR produktu.
4. Po ztuhnutí byl z gelu odstraněn hřebínek a gel byl umístěn do elektroforetické vany.
5. Do první jamky elektroforetického gelu bylo nanášeno 5 μ l DNA Marker: 200 – 1600 nebo Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder tzv. velikostní standardy.
6. Do dalších jamek gelu bylo opatrně mikropipetou nanášeno 5 μ l amplifikované DNA a 2 μ l nanášecího pufřu (při použití GoTaq® Hot Start Green MasterMix se nanášecí pufř neaplikoval).
7. Při elektroforéze bylo použito napětí 90 V po dobu cca 45 minut (doba v závislosti na délce produktu).

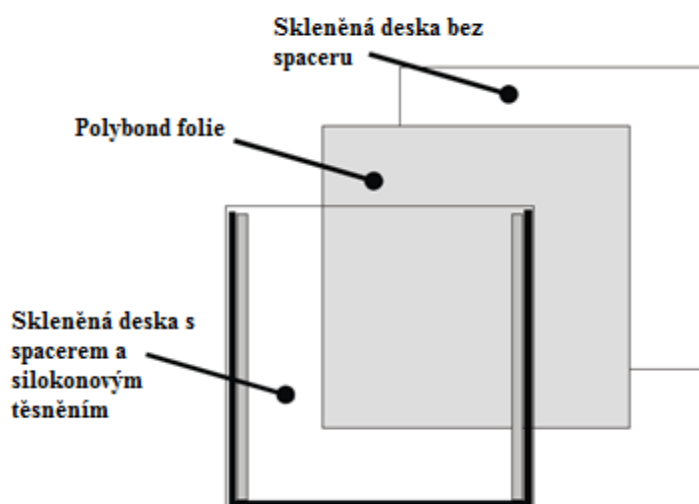
Po skončení elektroforézy byl gel přenesen do UV-transiluminátoru a osvětlen UV záření, díky ethidiumbromidu bylo možné na fotce pořízené pomocí programu GeneSnap pozorovat bandy (amplikony).

7.3.4 TGGE

Skládání skel pro polymeraci gelu

Gel byl připravován ve skleněné aparatuře. Skládání aparatury pro polymeraci gelu bylo poměrně komplikované. Aparatura musela být složena správně, aby při aplikaci roztoku gelu nedocházelo k jeho prosakování. Během celého procesu bylo nutné pracovat v rukavicích a ochranných brýlích, z důvodu manipulace s karcinogenními nebo toxickými látkami.

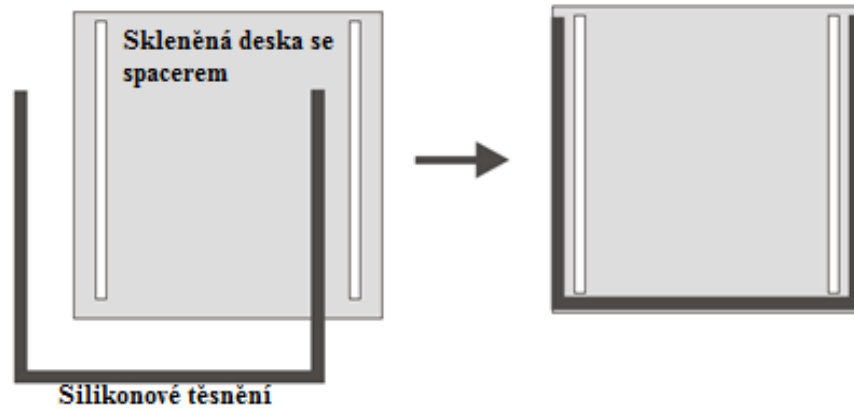
Skleněná aparatura (*Obr. 14*) se skládala ze dvou skleněných desek. Z nichž jedna byla opatřena spacerem (oddělovačem) a silikonovým těsněním. Na druhé desce byla přichycena polybond fólie, která při TGGE sloužila k optimalizaci teplotního přechodu mezi termoblokem a gelem.



Obr. 14. Složení skel pro polymeraci gelu (TGGEMAXISystem)

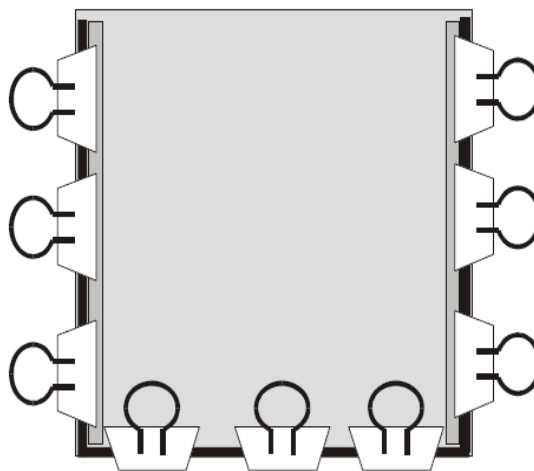
Složení skleněné aparatury probíhalo následovně:

1. Skleněné desky byly důkladně omyty saponátem, po oschnutí byly vnitřní strany opláchnuty ethanolem ze stříčky (rozpuštědlo se nechalo odpařit).
2. Na skleněnou desku bez spaceru bylo nanášeno cca 2 ml destilované vody a opatrně přiložena polybond fólie (tak aby nevznikly vzduchové bubliny pod fólií). Fólie byla na vrchní straně přilepena pomocí lepicí pásky.
3. Na skleněnou desku se spacerem bylo přiloženo silikonové těsnění (*Obr. 15*), které muselo dokonale přiléhat ke skleněným spacerům, aby nedocházelo k vytékání roztoku gelu.



Obr. 15. Vložení silikonového těsnění (TGGEMAXISystem)

4. Na desku opatřenou silikonovým těsněním byla opatrně přiložena druhá deska s polybond fólií. Desky k sobě byly přichyceny z každé strany třemi kovovými sponkami (Obr. 16). (TGGEMAXISystem)



Obr. 16. Finální podoba skleněné aparatury (TGGEMAXISystem)

Příprava roztoku gelu

Na přípravu 50 ml roztoku gelu byly potřebné níže zmíněné komponenty (Tab. 8):

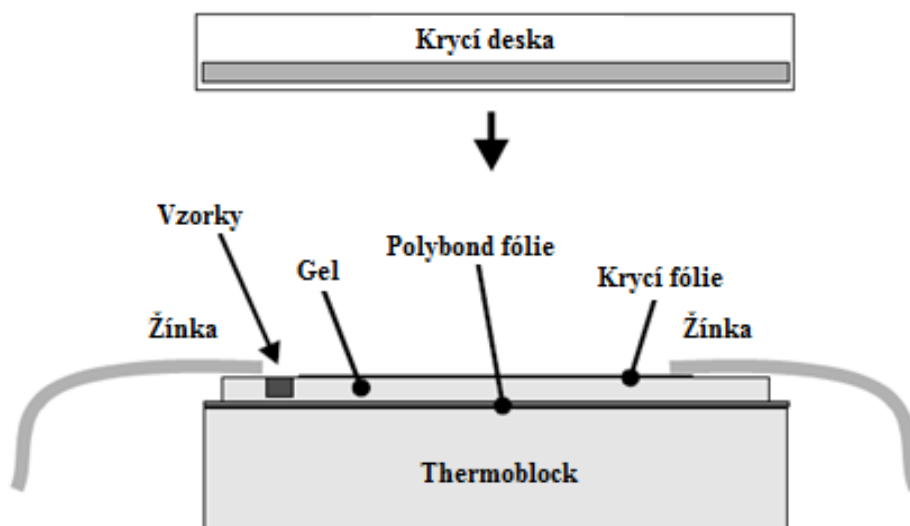
Tab. 8. Složení roztoku gelu

Komponenty (zásobní roztok)	Množství	Výsledná koncentrace
Formamid (99+%)	10 ml	20%
Akrylamid (40 %)	10 ml	8%
Močovina (pevná)	24 g	8 mol/l
TAE (50x)	2 ml	2x
Glycerol (40%)	2,5 ml	2%
Voda pro molekulární biologii	cca 5 ml	-

1. Všechny komponenty byly naváženy a pipetovány do baňky. Takto připravený roztok gelu byl míchán při 450 RPM a 50 °C do úplného rozpuštění krystalků močoviny (cca 15 – 25 min).
2. Po vychladnutí roztoku gelu na laboratorní teplotu byla přidána polymerační činidla. Bylo přidáno 50 µl 10% APS (amonium persulfát), který byl připraven následovně: 0,01 g APS bylo kvantitativně převedeno do ependorfy a rozpuštěno ve 100 µl vody určené pro molekulární biologii – roztok byl připraven vždy čerstvý. Dále bylo přidáno 110 µl TEMED (NNN'N'-tetramethyldiamin). Při přidávání polymeračních činidel bylo roztokem gelu mícháno při 950 RPM po dobu 20 – 30 sekund.
3. Roztok byl opatrně promíchán stříkačkou a přes sterilní filtr byl dávkován mezi skla skleněné aparatury. Při dávkování se bylo potřeba vyhnout vzniku bublinek v gelu.
4. Skleněná aparatura byla přenesena do termostatu (vytemperován na 30 °C), ve kterém byl roztok gelu polymerizován po dobu 2 - 3 hodin.
5. Během polymerace byla připravena elektroforetická soustava (TGGE), z důvodu předcházení vysychání gelu. Po uplynutí doby polymerace byly ze skleněné aparatury odstraněny kovové spony. Skla od sebe byla oddělena. Gel byl kovalentně navázán na polybond fólii. Ze skleněné desky bez spaceru byla odstraněna lepicí páska a gel byl přenesen na termoblok (TGGE). (TGGEMAXISystem)

Elektroforéza v teplotním gradientu

V rámci diplomové práce bylo pracováno s horizontálním elektroforetickým systémem (TGGE Maxi System, Biometra). Vedení elektrického proudu elektroforetickou soustavou bylo realizováno pomocí dvou žínek. Žínky byly na jedné straně ponořeny do pufru (TAE 2x) a na druhé straně přiléhaly na gel (*Obr. 17*).



Obr. 17. Uspořádání gelu a žínek na elektroforetické soustavě (TGGEMAXISystem)

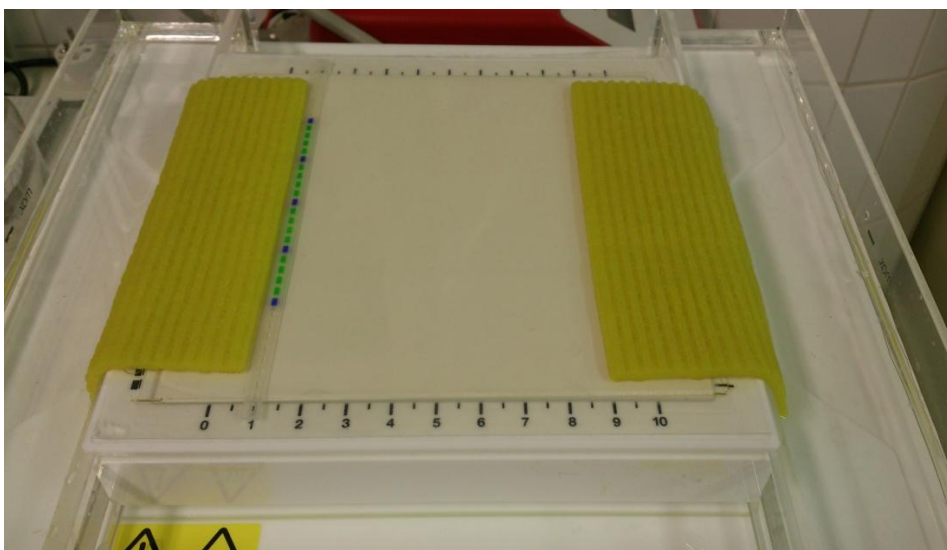
Žínky byly před sestavením elektroforetické soustavy vloženy do 800 ml skleněné kádinky, zalaty destilovanou vodou a vařeny po dobu 10 minut. (TGGEMAXISystem)

Postup pro přípravu elektroforetické soustavy pro elektroforézu v teplotním gradientu:

1. Nejprve byl odejmut z elektroforetické soustavy bezpečnostní kryt s elektrodami a poté krycí víko termobloku.
2. Oba zásobníky byly opatrně naplněny 2x TAE pufrům po rysku, aby nedošlo k potřísnění elektroforetické jednotky (termobloku).
3. Na termoblok bylo napipetováno 2 ml thermal coupling roztoku a na ten byl položen gel (polybond fólií na termoblok). Musela být zajištěna rovnoměrná distribuce thermal coupling roztoku a zamezeno vzniku bublinek.
4. Vyvařené žínky byly vyždímány a vloženy jedním koncem do zásobníku s 2x TAE pufrům (žínky byly 3 - 5 vyždímány v 2x TAE pufru) a druhým koncem byly

položeny na gel. Pro dostatečný průchod elektrického proudu aparaturou musel být konec žínky umístěn na stupnici 1 a konec druhé žínky na stupnici 9 (Obr. 18).

5. Na gel byl přiložen aplikátor na vzorky a řádně přitisknut po celé délce.
6. Dále byla na gel přiložena krycí fólie (recyklovatelná), tak že její začátek byl těsně pod aplikátorem a končil před spodní žínkou.
7. Bylo nadávkováno 5 – 10 μl vzorku, který byl předem namíchán s nanášecím pufrem 6x koncentrovaným (v případě použití GoTaq® Hot Start Green MasterMix se nanášecí pufr aplikovat nemusel, protože byl již jeho součástí).



Obr. 18. Fotografie aparatury TGGE připravené na spuštění

8. Termoblok byl zakryt krycím víkem a bezpečnostním krytem s elektrodami. Na elektroforetické soustavě TGGE Maxi System byl nastaven teplotní gradient $38^\circ - 58^\circ \text{C}$, délka separace 18 hod, elektrické napětí 130 V, elektrický proud 35 – 45 mA, v závislosti na Ohmově zákoně docházelo ke změnám proudu. (TGGEMAXISystem)

Barvení polyakrylamidového gelu

Polyakrylamidový gel byl barven pomocí fluorescenční barvičky GelStar (Cambex). Barvička GelStar (Cambex) byla skladována při teplotě -20°C . Pracovní postup:

1. Barvička GelStar byla vyjmuta z mrazícího zařízení a po roztátí byla promíchána a centrifugována.
2. Do polypropylénové vaničky bylo přidáno 450 ml destilované vody, 50 ml TAE pufru (10x) a 50 μl GelStar. S roztokem ve vaničce bylo promícháno.

3. Polyakrylamidový gel po TGGE byl vložen do polypropylénové vaničky s barvicím roztokem (polybond fólií dolů)
4. Vanička s gelem byla vložena na třepačku, zakryta Al-folií. Třepání probíhalo při 450 RPM/min po dobu 2 – 3 hodin. (TGGEMAXISystem)

Dokumentace gelu

K dokumentaci výsledného gelu bylo použito transiluminátoru.

1. Po obarvení byl gel vyjmut z barvicího roztoku a položen gelem (polybond fólie nahoře) na UV desku transiluminátoru. Transiluminátor byl uzavřen.
2. Byl zapnut zdroj UV světla a v počítači program GeneSnap.
3. Fotografie byla pořízena digitální kamerou, pomocí programu GeneSnap.
4. Fotografie byly uloženy ve formátu .sgd (Syngene) a .bmp na pevný disk.

Vyřezávání bandů z gelu

Při vyřezávání bandů bylo nutné chránit zrak před UV zářením pomocí brýlí a obličejového štítu. Ochranné rukavice byly navléknuty přes rukávy laboratorního pláště, tak aby nedošlo k expozici kůže. Bandy byly vyřezány následujícím způsobem:

1. Bandy byly označeny na transiluminátoru, který byl přenesen na stůl, kde gel byl exponován UV zářením.
2. Lihovým fixem byly označeny vybrané bandy (signály) na polybond fólii. UV záření mohlo poškodit DNA, proto bylo nutné pracovat v co nejkratším čase.
3. UV záření bylo vypnuto a gel byl položen polybond fólií směrem dolů na polypropylénový tácek.
4. K vyřezávání bandů byl použit odlamovací nůž, který byl opláchnut ethanolem ze stříčky a nechán cca minutu odpařit.
5. Opatrně byla vyříznuta pouze středová část označeného bandu a tímto způsobem byla získána nukleotidová sekvence.
6. Vyříznutý band byl vložen do sterilní označené ependorfy, takto vyřezané bandy byly skladovány při teplotě – 20 °C.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci praktické části práce měly být splněny dva cíle. Metoda gelové elektroforézy v teplotním gradientu měla být adaptována na analýzu domény *Archaea*. Druhým cílem bylo pomocí molekulárně biologických metod analyzovat bakteriální společenstva v horninovém prostředí.

8.1 Adaptace TGGE pro analýzu domény *Archaea*

V rámci diplomové práce byla metoda gelové elektroforézy v teplotním gradientu optimalizována na analýzu domény *Archaea*. Optimalizace byla paralelně prováděna i pro doménu *Bacteria*.

8.1.1 PCR reakce a adaptace TGGE pro doménu *Archaea* (paralelně pro doménu *Bacteria*) – DNA izolována z digestátu (z bioplynové stanice)

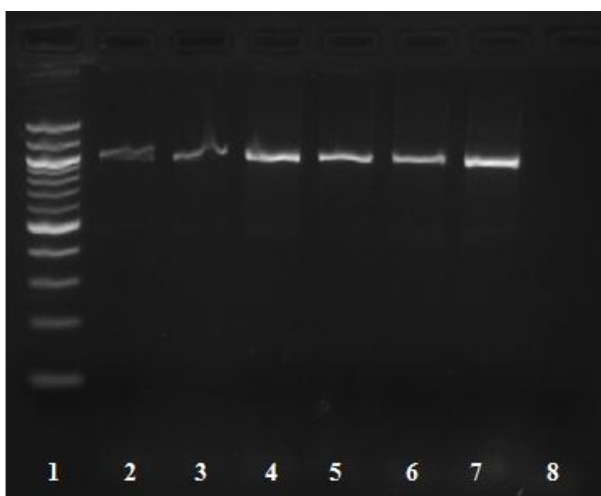
DNA byla izolována z digestátu (z bioplynové stanice), dle návodu ke kitu Powersoil DNA Isolation Kit (*Kap. 7.3.1.1*). Pro optimalizaci byly použity vzorky digestátu z diplomové práce Moniky Poláchové, jejich charakteristika je uvedena v tabulce (*Tab. 9*):

Tab. 9. Charakteristika vzorků digestátu použitých pro izolaci DNA

Vzorek	Charakteristika
1.	Slepý vzorek
2.	Vzorek digestátu + octan 1g/l
3.	Vzorek digestátu + furfural 0,1 g/l + octan 1g/l
4.	Vzorek digestátu + furfural 0,5 g/l + octan 1g/l
5.	Vzorek digestátu + furfural 1 g/l + octan 1g/l
6.	Vzorek digestátu + furfural 2 g/l + octan 1g/l

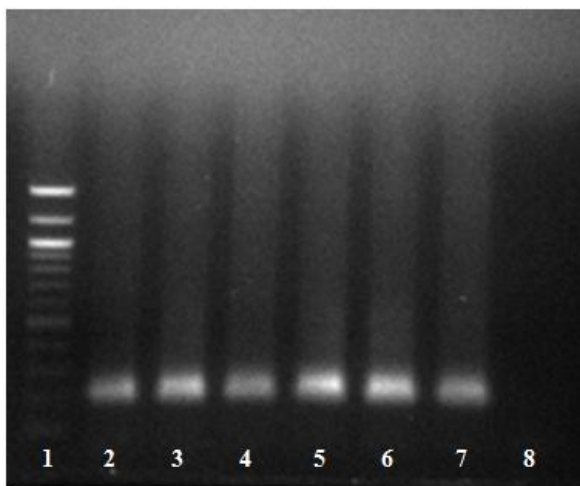
Postup amplifikace DNA je popsán v kapitole 7.3.2. Použité primery jsou uvedeny tabulce (*Tab. 5*). Pro amplifikaci byl použit FastStast PCR Master (ROCHE). Získané amplikony byly detekovány elektroforetickou soustavou (postup *Kap. 7.3.3*). Při amplifikaci DNA nebylo nutno při prvním stupni PCR reakce přidávat chlorid hořečnatý, jelikož DNA byla v dostatečné kvalitě a amplikony byly na gelu pozorovatelné. Pořadí vzorků na agarózových gelech bylo následující (*Obr. 19., Obr. 20., Obr. 21., Obr. 23.*): 1: standard, 2: vzorek 1, 3: vzorek 2, 4: vzorek 3, 5: vzorek 4, 6: vzorek 5, 7: vzorek 6 (*Tab. 9*), 8:

negativní kontrola. Jako standard byl ve všech případech použit Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder (Biolabs. Inc. New England).



Obr. 19. První stupeň PCR pro doménu Archaea - DNA izolovaná z digestátu (použité primery PREA 46f a PREA 1100R)

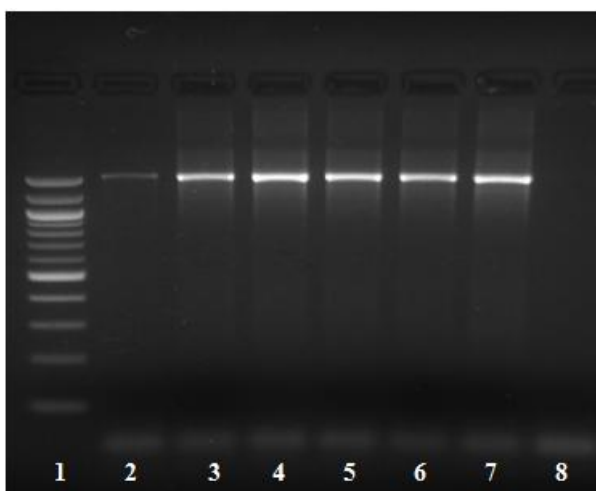
Pro první stupeň PCR reakce domény *Archaea* byly použity primery PREA 46f a PREA 1100R. Po amplifikaci bylo možné na gelu (*Obr. 19*) pozorovat amplifikované úseky DNA jako bandy s očekávanou délkou produktu. Délka produktu byla cca 1100 párů bází.



Obr. 20. Druhý stupeň PCR pro doménu Archaea - DNA izolovaná z digestátu (použité primery GCPARCH 340f a PARCH 519r)

Po druhém stupni PCR reakce bylo možno na gelu (*Obr. 20*) pozorovat bandy s délkou cca 200 párů bází. Pro amplifikaci byly použity primery s GC svorkou GCPARCH 340f a PARCH 519r. V obou případech v poslední jamce 8 byla aplikována negativní kontrola, která prokázala, že reagentie nebyly kontaminovány. Tím pádem je možno říci, že pomocí dvoustupňové PCR reakce byly získány specifické produkty.

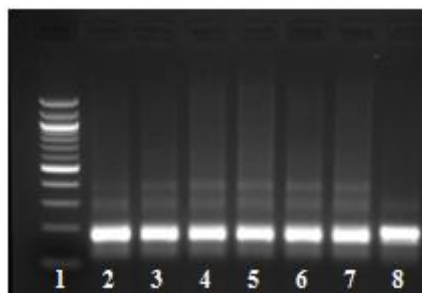
Při amplifikaci prvního stupně PCR reakce u domény *Bacteria* nebylo použito „TouchDown“ PCR. Využití této modifikace PCR reakce nebylo potřeba, jelikož všechny produkty bylo možné na agarázovém gelu pozorovat. Program PCR reakce byl následující: počáteční denaturace – 10 minut, denaturace – 1 minuta, annealingová teplota – 1 minuta, elongace – 1 minuta (opakováno 29x), finální extenze – 30 minut.



Obr. 21. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z digestátu (použité primery FD1 a RD1)

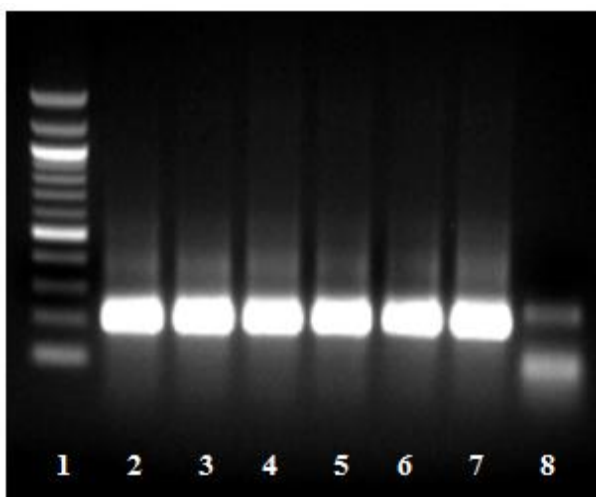
Na fotografii (*Obr. 21*) byly pozorovatelné produkty pro doménu *Bacteria* po prvním stupni PCR reakce (použité primery FD1 a RD1), kdy produkty měly předpokládanou délku cca 1500 páru bází. Krom vzorku 1 (jamka 2), byly všechny amplikony ve velké koncentraci. Menší koncentrace ve vzorku 1 byla způsobena pravděpodobně nepatrnou koncentrací DNA ve vzorku.

U druhého stupně PCR reakce bylo možné na gelu pozorovat kontaminaci v negativní kontrole (jamka 8), která byla pravděpodobně způsobena bakteriální DNA vyskytující se ve vzduchu nebo kontaminací reagentií (*Obr. 22*).



Obr. 22. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - kontaminace

Pro zamezení (redukce) kontaminace byl do reakční směsi přidáván psoralen a směs byla vysvícena po dobu 5 minut v transluminátoru. Pomocí této modifikace byla kontaminace redukována – jamka 8 (*Obr. 23*).



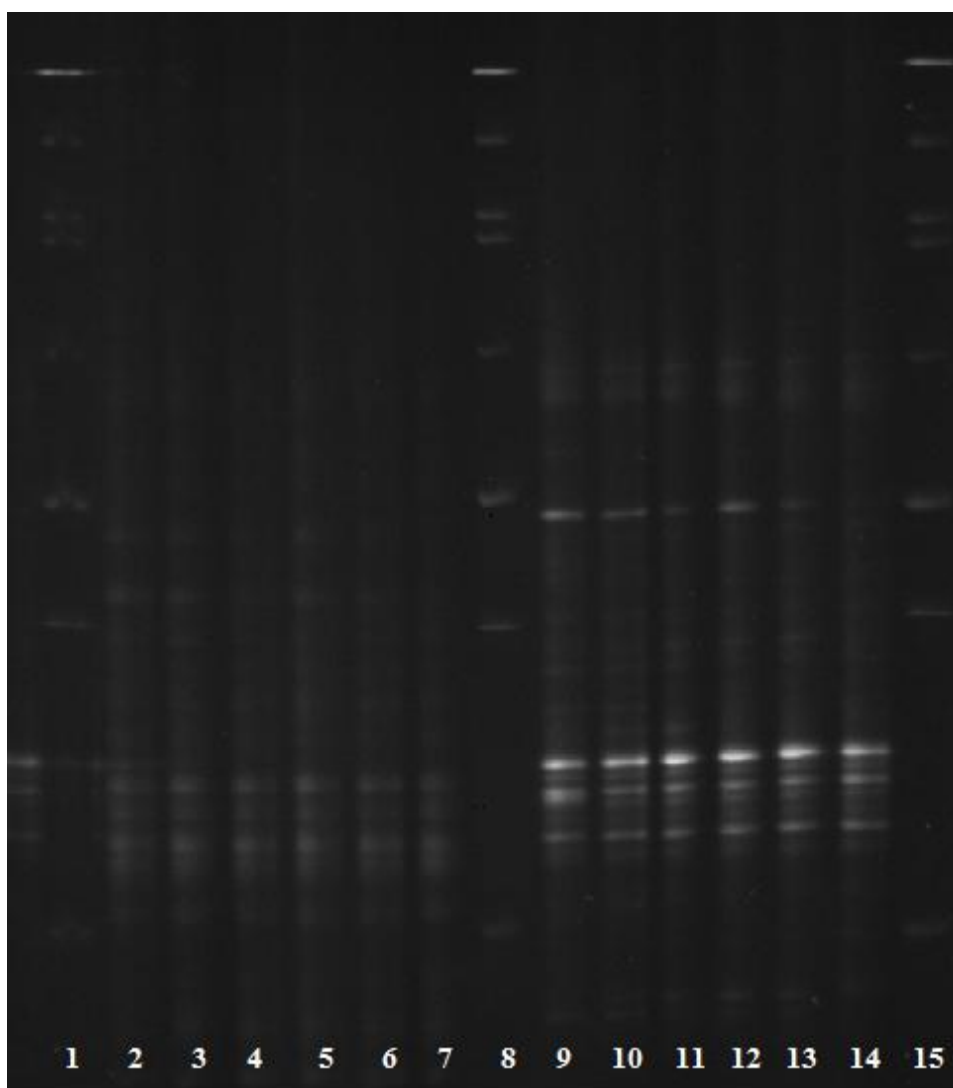
Obr. 23. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z digestátu (použité primery GC 341f a 518r)

Po amplifikaci byly na gelu pozorovatelné bandy o délce cca 200 párů bází a v dostatečné koncentraci. Pro druhý stupeň byly použity primery s GC svorkou GC 341f a 518r. Délka DNA řetězce a koncentrace byla odečtena u všech gelů pomocí standardu.

Na TGGE byly použity kratší PCR produkty s GC svorkou (pro *Bacterie* GC - 341f a 518r, pro *Archaea* - GCPARCH 340f a PARCH 519r). Do sampléru bylo aplikováno 5 μ l amplikonu + 2 μ l nanášecího pufru (6x). Bylo pracováno s horizontálním elektroforetickým systémem (TGGE Maxi System, Biometra). Postup TGGE viz. kapitola 7.3.4. Výsledek gelové elektroforézy v teplotním gradientu je znázorněn na polyakrylamidovém gelu (*Obr. 24*).

Při optimalizaci TGGE metody na DNA izolovanou z digestátu byla provedena TGGE analýza dvakrát. Při první pokusu byla teplota denaturace volena 35 – 45 °C, tento denaturační faktor se neosvědčil (bandy na polyakrylamidovém gelu nebyly pozorovatelné), z toho důvodu bylo rozmezí teplot voleno 38 – 48 °C.

Na polyakrylamidovém gelu bylo možno spatřit signály dominantních mikroorganismů, které se vyskytovaly ve vzorcích, patřících do domén *Archaea* a *Bacteria*. Pořadí vzorků na gelu (Tab. 9): 1: standard, doména *Archaea* – 2: vzorek 6, 3: vzorek 5, 4: vzorek 4, 5: vzorek 3, 6: vzorek 2, 7: vzorek 1, 8: standard, doména *Bacteria* – 9: vzorek 6, 10: vzorek 5, 11: vzorek 4, 12: vzorek 3, 13: vzorek 2, 14: vzorek 1, 15: standard.



Obr. 24. Výsledek optimalizace TGGE na analýzu domény *Archaea* (paralelně domény *Bacteria*) na polyakrylamidovém gelu – DNA izolovaná z digestátu

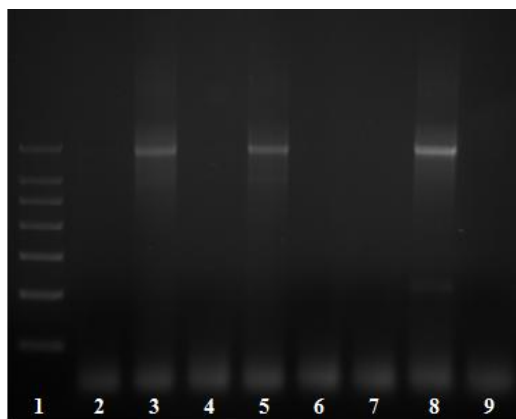
Pro doménu *Archaea* bylo na polyakrylamidovém gelu možno pozorovat 3 signálů. Pro doménu *Bacteria* bylo na polyakrylamidovém gelu možno sledovat 4 signály. Při tomto pokusu byla metoda TGGE optimalizována pro doménu *Archaea*, proto nebyly signály, které by měly naznačovat druhy mikroorganismů, určeny. Pro určení o jaký druh mikroorganismu se jednalo, by měly být bandy dominantních mikroorganismů vyříznuty, reamplifikovány, purifikovány a sekvenovány.

8.2 Monitorování bakteriálních společenství ve vzorcích horninového prostředí pomocí metody TGGE

Vzorky horninového prostředí byly poskytnuty firmou EPS s.r.o.. Horninové prostředí pocházelo z lokalit kontaminovaných ropnými uhlovodíky. Na daných lokalitách byly aplikovány 3 modifikace sanačních technologií: In situ chemická oxidace s aplikací modifikovaného Fentonova činidla, In situ chemická oxidace s aplikací persulfátu a elektrického proudu a poslední technologií byla Bioremediace, kde byly aplikovány inokula mikroorganismů a nutriety. Charakteristika vzorků je v tabulce (Tab. 6). Sledované bakteriální zastoupení v daných lokalitách pro každou modifikaci sanační technologie bylo popsáno v následujících kapitolách. Mimo jiné byla metoda TGGE adaptována (optimalizována) na analýzu domény *Archaea* ve vzorcích horninového prostředí.

8.2.1 Izolace DNA z horninového prostředí

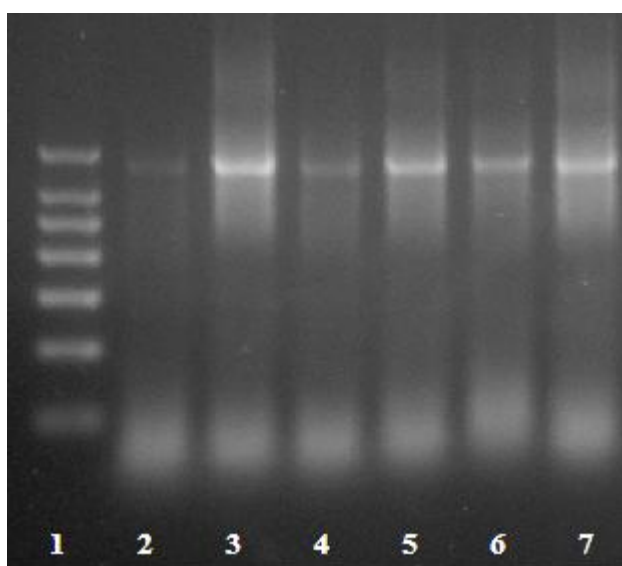
V rámci diplomové práce byly použity dvě metody izolace DNA z horninového prostředí a to izolace pomocí komerčního kitu (Powersoil™ DNA Isolation Kit) a pomocí fenol - chloroformové metody. Účinnost izolace DNA po prvním stupni PCR reakce (použité primery FD1, RD1 – doména *Bacteria* (Tab. 5)) byla detekována pomocí agaróзовé elektroforézy. Pořadí vzorku na gelu bylo následující (Obr. 25): 1: standard, 2: vzorek 9 (izolace pomocí kitu), 3: vzorek 10 (izolace pomocí kitu), 4: vzorek 9 (izolace pomocí kitu – 5x zředěná DNA), 5: vzorek 10 (izolace pomocí kitu – 5x zředěná DNA), 6: vzorek 9 (izolace pomocí fenol – chloroformové metody – 10x zředěná DNA), 7: vzorek 10 (izolace pomocí fenol – chloroformové metody – 10x zředěná DNA) – charakteristika vzorků je uvedena v tabulce (Tab. 6), 8: vzorek digestátu 6 (Tab. 9), 9: negativní kontrola.



Obr. 25. Test účinnosti izolace DNA

Po prvním stupni PCR reakce bylo možno na agarózovém gelu (*Obr. 25*) pozorovat pouze DNA pocházející ze vzorku štěrků, kde pro izolaci DNA byl použit komerční kit. Při izolaci DNA pomocí fenol – chloroformové metody nedošlo k amplifikaci PCR produktu (*Obr. 25* – jamky 6 a 7). Po druhém stupni PCR reakce bylo možné pozorovat i produkty ze vzorků jílu izolované pomocí komerčního kitu (např. *Obr. 35*).

Na základě výsledků byl pro izolaci DNA vybrán komerční kit – Powersoil™ DNA Isolation Kit. Postup izolace byl dále optimalizován pro vzorky jílu, kdy po prvním stupni PCR reakce nebylo možno na agarózovém gelu pozorovat amplikony DNA. Postup izolace DNA pomocí komerčního kitu, který je popsán v kapitole 7.3.1.1, byl modifikován pro izolaci DNA ze vzorků jílu následovně: po druhém kroku, kdy ke vzorkům byl přidán pufr obsahující aniontový detergent (SDS) a další rozkladná činidla, následovalo zahřívání roztoku po dobu 5 minut při teplotě 70 °C. Vzorek byl poté po krátkou dobu vortexován a opět zahříván při teplotě 70 °C po dobu 5 minut. Následně bylo pokračováno bodem 3. Poté byl proveden první stupeň PCR reakce – primery FD1 a RD1. Po výše zmíněné modifikaci bylo možné amplifikovanou DNA ze vzorků jílu na gelu pozorovat (*Obr. 26*).



*Obr. 26. Modifikace izolace DNA – první stupeň
PCR reakce (primery FD1 a RD1)*

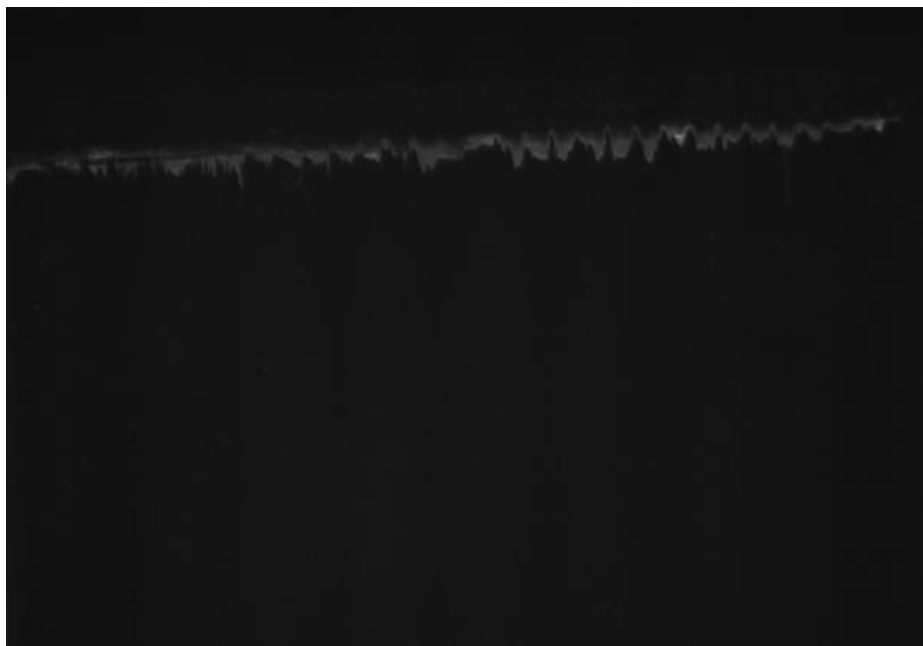
Vzorky v jamkách gelu byly v následujícím pořadí: 1: standard, 2: vzorek 7, 3: vzorek 8, 4: vzorek 11, 5: vzorek 12, 6: vzorek 15, 7: vzorek 16 (*Tab. 6*).

U domény *Archaea* bylo možno amplikony DNA, izolované pomocí komerčního kitu, pozorovat vždy již po prvním stupni PCR reakce (*Obr. 32*).

8.2.2 Modifikace molekulárně biologických metod pro vzorky pocházející z horninového prostředí

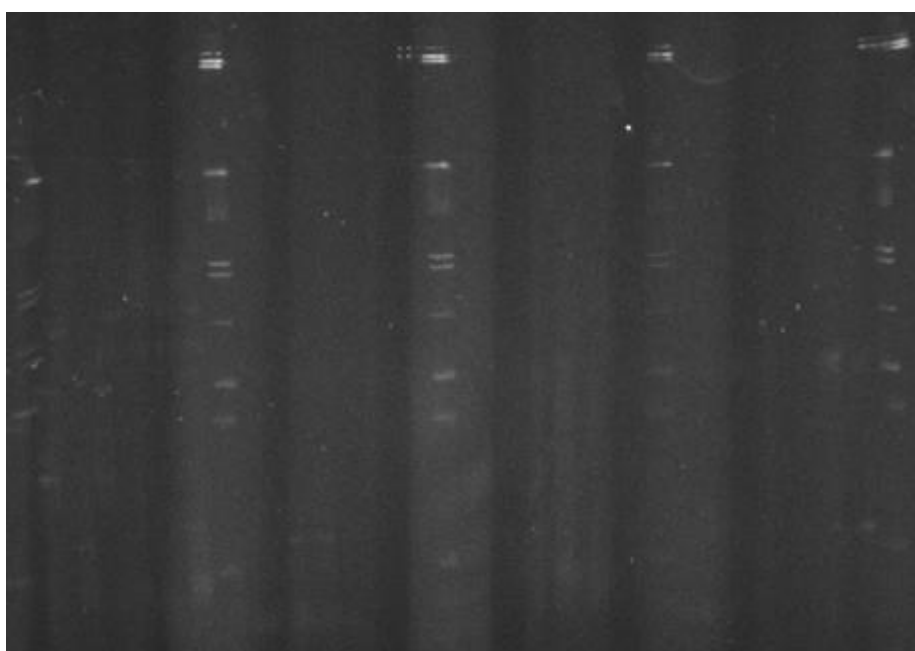
Molekulárně biologické metody bylo nutno optimalizovat kvůli velmi nízké koncentraci DNA, izolované z horninového prostředí. Pro získání většího výtěžku DNA a specifických PCR produktů byly použity následující modifikace. Byla pozměněna izolace DNA. Při lyzi buněk byla směs zahřívána po dobu 10 minut při teplotě 70 °C. Při prvním stupni PCR reakce byl do reakční směsi přidán chlorid hořečnatý (0,3 mmol/l), který podporuje aktivitu DNA - polymerázy. Dále byla pozměněna PCR reakce pro doménu *Bacteria*. Při prvním i druhém stupni PCR reakce bylo využito „TouchDown“ PCR. Byl pozměněn program při amplifikaci prvního stupně PCR reakce (viz *Kap. 7.3.2*). Doba elongace (extension) byla prodloužena z 1 minuty na 2 minuty. Důvodem prodloužení doby elongace byla délka finálního produktu (délka cca 1500 pár bází). V druhém stupni PCR reakce byl do reakční směsi přidáván psoralen (2,5x koncentrovaný), který měl zamezit možné kontaminaci, a reakční směs byla vysvícena po dobu 5 minut pod UV zářením.

Při adaptaci TGGE byla řešena řada obtíží. Při skládání skleněné aparatury se muselo dbát na těsnost. V případě netěsnosti aparatury došlo ke znehodnocení gelu. Bylo zapotřebí používat vždy čerstvý 50x TAE pufr. Formamid musel být řádně uzavřen, jelikož se jedná o velice hyroskopickou látku. Při použití starých komponent nedocházelo k separaci DNA. Dále musela být upravena pozice žínek na polyakrylamidovém gelu. Při nedostačeném kontaktu žínek s gelem nedocházelo k separaci DNA v gelu, pravděpodobně díky nedostatečnému průchodu elektrického proudu aparaturou. Na gelu bylo možno pozorovat pouze amplikony a standard v místě, kde byly dávkovány (*Obr. 27*).



Obr. 27. Nedostatečný elektrický proud v TGGE aparatuře

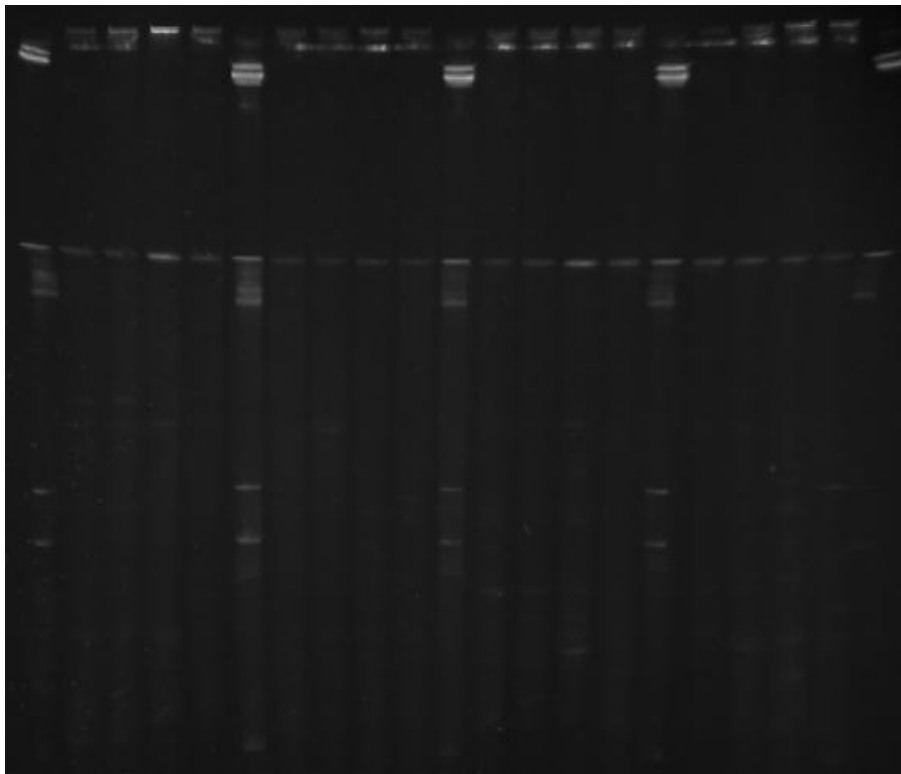
Po úpravě metody TGGE - žínky položeny na aparatuře teplotní gradientové elektroforézy do bodů 1 a 9 (*Obr. 18*).



Obr. 28. Nedostatečné množství DNA – dávkování 5 μ l DNA

Bylo možno na polyakrylamidovém gelu pozorovat pouze standard. Dávkováno bylo 5 μ l DNA po druhém stupni PCR reakce a 2 μ l nanášecí barvičky (*Obr. 28*). Pro amplifikaci byl použit FastStast PCR Master (ROCHE).

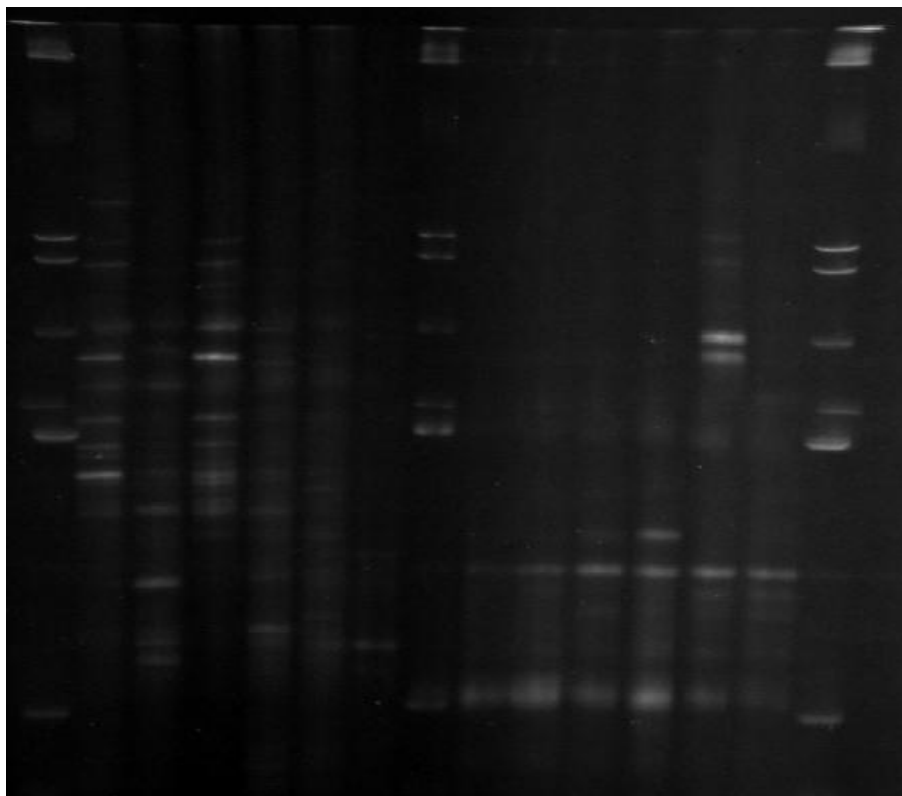
Množství aplikované DNA do sampléru bylo zvýšeno na 8 μ l (pro amplifikaci byl použit FastStast PCR Master (ROCHE)) + 2 μ l nanášecí barvičky.



Obr. 29. Nedostatečné množství DNA – dávkování 8 μ l DNA

Na fotografii polyakrylamidového gelu (*Obr. 29*) po TGGE bylo možno sledovat DNA fragmenty ve velmi nízké koncentraci. Proto bylo opět zvýšeno množství DNA, které bylo dávkováno do sampléru.

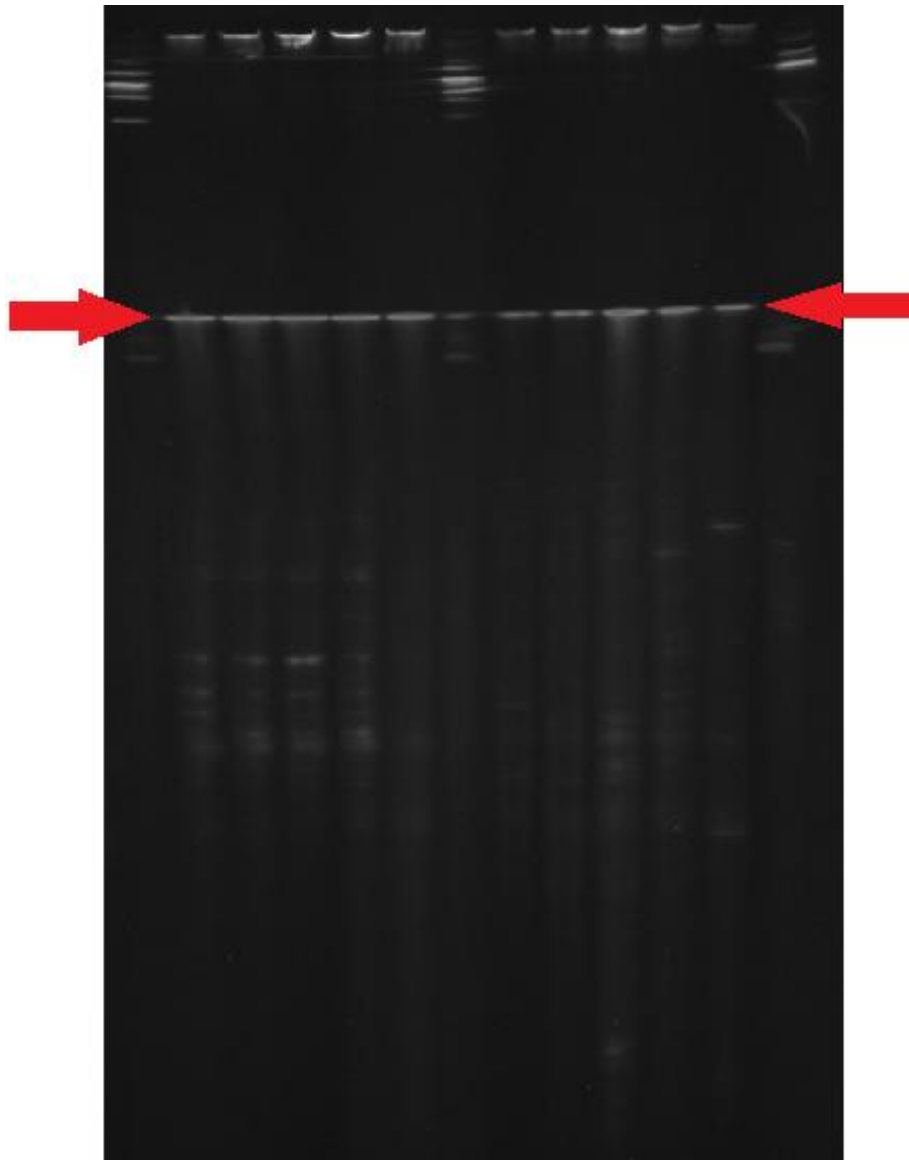
Maximální množství, které bylo možno dávkovat do sampléru, bylo 10 μ l. Proto pro druhý stupeň PCR reakce byl použit GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega) – tento mastermix ve složení obsahuje již nanášecí pufr. Po této modifikaci bylo možno DNA fragmenty sledovat v dostatečném množství (*Obr. 30*).



Obr. 30. Dostatečné množství DNA – dávkování 10 μ l DNA

Metodiku TGGE se tudíž podařilo úspěšně adaptovat na vzorky horninového prostředí, kde DNA byla v nízké koncentraci.

Při druhém stupni PCR pro doménu *Bacteria* bylo možno ve všech případech sledovat v negativní kontrole kontaminaci. To mohlo být způsobeno bakteriální DNA vyskytující se ve vzduchu nebo kontaminací reagensů. Pravděpodobně mohly být kontaminovány primery (GC341f a 518r), které byly v rámci laboratoře molekulární biologie používány celou řadou lidí. Kontaminaci bylo možno sledovat jak na agarázovém gelu (např. *Obr. 39*), tak i na polyakrylamidovém (*Obr. 31* – šipkami je označena pravděpodobná kontaminace).



Obr. 31. Pozorovatelná kontaminace na polyakrylamidovém gelu

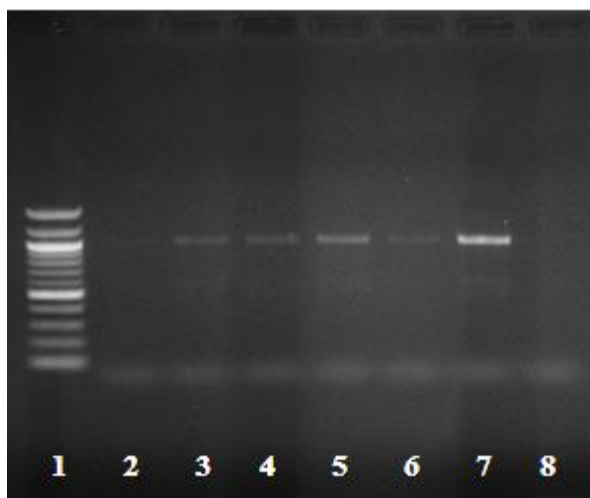
Při druhém stupni PCR reakce mohla být pravděpodobně značná část reagentů spotřebována na amplifikaci nežádoucí DNA. Z toho důvodu pravděpodobně byly amplikony DNA na polyakrylamidovém gelu méně pozorovatelné. Tuto hypotézu se z časových důvodů nepodařilo potvrdit.

8.2.3 PCR reakce a optimalizace TGGE pro doménu *Archaea* (paralelně pro doménu *Bacteria*) - DNA izolována z horninového prostředí

DNA byla izolována z horninového prostředí dle návodu ke kitu Powersoil™ DNA IsolationKit (Kap. 7.3.1.1).

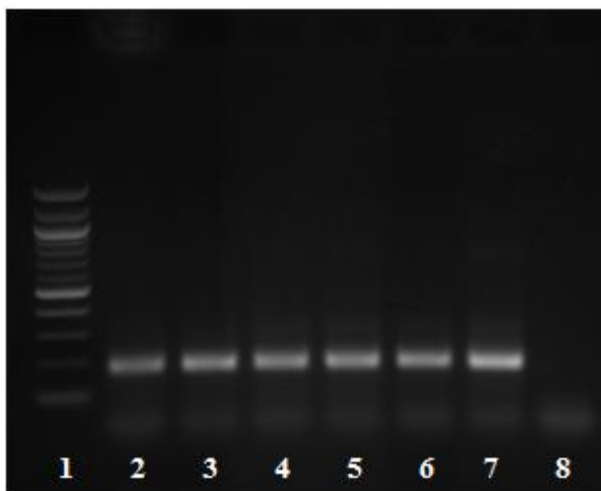
Pro optimalizaci byly použity vzorky horninového prostředí (vzorky 1 – 6). Charakteristika vzorků je uvedena v tabulce (Tab. 6). Postup amplifikace DNA je popsán v kapitole 7.3.2. Použité primery jsou uvedeny tabulce (Tab. 5). Pro amplifikaci byl použit GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega).

Získané amplikony byly detekovány elektroforetickou soustavou (postup Kap. 7.3.3). Pořadí vzorků na agarózových gelech bylo následující (Obr. 32, Obr. 33, Obr. 34, Obr. 35): 1: standard, 2: vzorek 1, 3: vzorek 2, 4: vzorek 3, 5: vzorek 4, 6: vzorek 5, 7: vzorek 6, 8: negativní kontrola (viz. Tab. 6). Jako standard byl ve všech případech, krom druhého stupně PCR reakce u domény *Bacteria*, použit Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder (Biolabs. Inc. New England).



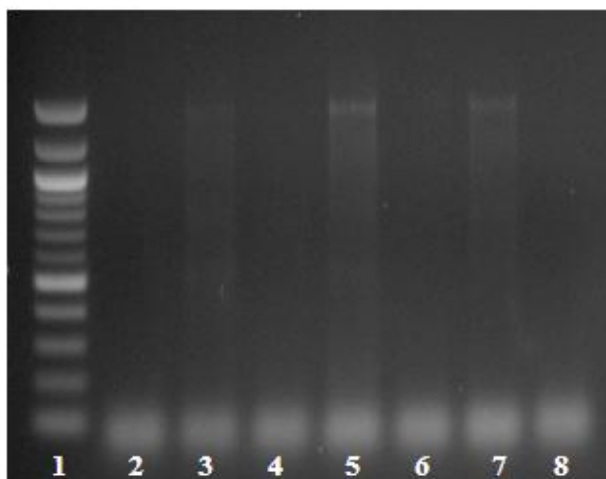
Obr. 32. První stupeň PCR pro doménu *Archaea* - DNA izolovaná z horninového prostředí - (použité primery PREA 46f a PREA 1100R)

Po izolaci DNA pomocí komerčního kitu byla získaná DNA amplifikována s primery PREA 46f a PREA 1100R. Po detekci agarózovou elektroforézou bylo možné na gelu (Obr. 32) pozorovat bandy ve velmi malé koncentraci. V dráze 2 nebylo možno bandy pozorovat, pravděpodobně díky malé koncentraci DNA ve vzorku. Zbývající amplikony měly předpokládanou délku cca 1100 párů bází.



Obr. 33. Druhý stupeň PCR pro doménu Archaea - DNA izolovaná z horninového prostředí - (použité primery GCPARCH 340f a PARCH 519r)

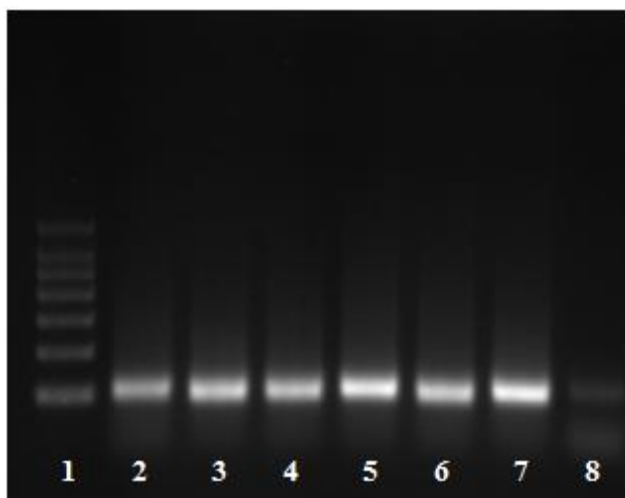
Po druhém stupni PCR (použité primery GCPARCH 340f a PARCH 519r) reakce již bylo možné DNA pozorovat (*Obr. 33*) v dostatečné koncentraci a v předpokládané délce produktu (cca 200 párů bází). Negativní kontrola byla negativní, tudíž lze říci, že byly získány specifické produkty.



Obr. 34. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí - (použité primery FD1 a RD1)

Pro doménu *Bacteria* byla amplifikace provedena pomocí primerů FD1 a RD1. DNA izolovaná ze vzorků šterku byla po první stupni amplifikace nepatrně viditelná (jamky 3, 5,

6 - očekávaná délka cca 1500 párů bází), tudíž ve velmi nízké koncentraci, a DNA izolovanou ze vzorků jílů nebylo možno na gelu spatřit (*Obr. 34*).

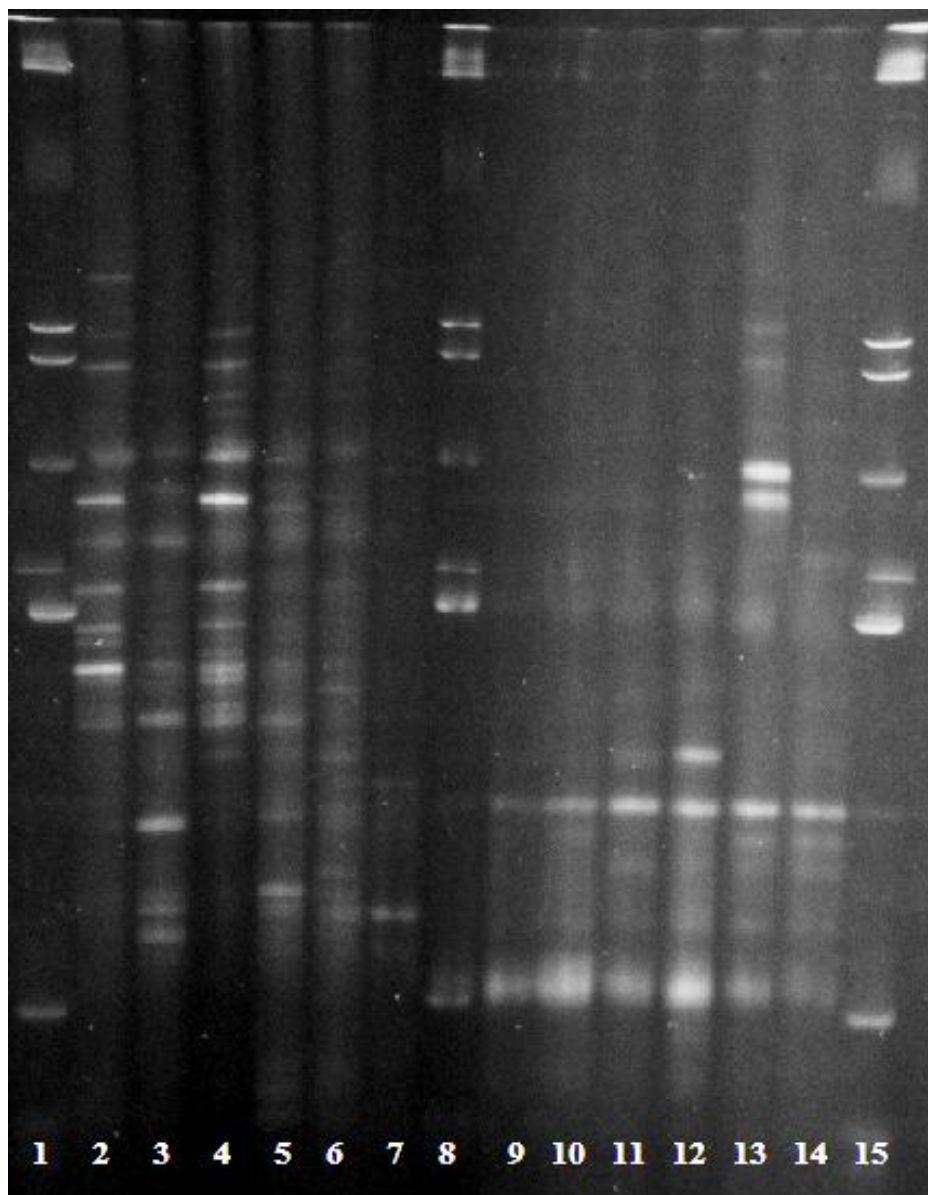


Obr. 35. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí - (použité primery GC 341f a 518r)

Po druhém stupni PCR reakce byla DNA patrná na gelu (*Obr. 35*) v dostatečné koncentraci a v očekávané délce (cca 200 párů bází). Tudíž je možno říci, že byl získán specifický produkt. Pro amplifikaci byly použity primery s GC svorkou - GC 341f a 518r. Jako standard byl použit DNA Marker: 200 – 1600 (AscoProt Biotech)

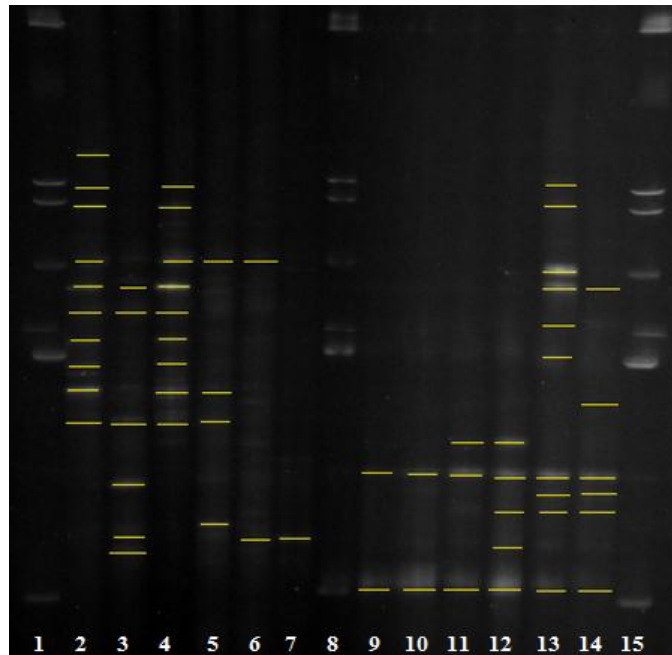
Na TGGE byly použity amplikony s GC svorkou (pro *Bacteria* GC 341f a 518r, pro *Archaea* GCPARCH 340f a PARCH 519r). Do sampléru bylo aplikováno 10 μ l amplikonu. Bylo pracováno s horizontálním elektroforetickým systémem (TGGE Maxi System, Biometra). Postup TGGE viz kapitola 7.3.4.

Výsledek teplotní gradientové gelové elektroforézy je znázorněn na polyakrylamidovém gelu (*Obr. 36*). Na fotografii polyakrylamidového gelu bylo možno vidět signály dominantních mikroorganismů, které se vyskytovaly ve vzorcích, patřících do domén *Archaea* a *Bacteria*. Pořadí vzorků na gelu (*Tab. 6*): 1: standard, doména *Bacteria* – 2: vzorek 6, 3: vzorek 5, 4: vzorek 4, 5: vzorek 3, 6: vzorek 2, 7: vzorek 1, 8: standard, doména *Archaea* – 9: vzorek 6, 10: vzorek 5, 11: vzorek 4, 12: vzorek 3, 13: vzorek 2, 14: vzorek 1, 15: standard.



Obr. 36. Výsledek optimalizace TGGE na analýzu domény Archaea (paralelně domény Bacteria) na polyakrylamidovém gelu - DNA izolovaná z horninového prostředí

Signály amplifikované DNA byly pozorovatelné pod UV zářením na transiluminátoru a byly označeny na fotografii (*Obr. 37*). Signály DNA byly z gelu vyřezány a byly uchovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro identifikaci mikroorganismů, by vyřezaná DNA měla být reamplifikována, purifikována a sekvenována.



Obr. 37. Sledované dominantní mikroorganismy - optimalizace

Pro doménu *Archaea* bylo na polyakrylamidovém gelu možno spatřit několik signálů dominantních mikroorganismů, a to v drahách 9 – 14. Největší mikrobiální zastoupení z dané domény bylo možno sledovat ve vzorcích horninového prostředí, které bylo kontaminováno ropnými uhlovodíky. Na dané vzorky nebyly použity žádné sanační technologie, jednalo se o tzv. pozadí. V jílovém prostředí (jamka 14) bylo možné sledovat 6 různých signálů mikroorganismů. V dráze 13 byla DNA z pozadí štěrkového prostředí, kde bylo možno pozorovat 10 signálů. Menší mikrobiální zastoupení bylo ve vzorcích, kde byly aplikovány inokula a nutriety (jamky 11 a 12). V dráze 12 (DNA ze štěrku) bylo možno spatřit 5 signálů a v jamce 11 (DNA z jílu) pouze 3 signály. V jamkách 9 (nukleové kyseliny izolované z jílu) a 10 (nukleové kyseliny izolované ze štěrku) byla amplifikovaná DNA z lokality připravené na aplikaci oxidačních činidel. V obou případech se ve vzorcích vyskytovaly 2 signály.

Doménu *Bacteria* bylo možné sledovat v jamkách 2-7. V drahách 6 a 7 bylo možné pozorovat dominantní bakteriální druhy, které se vyskytovaly v kontaminovaném prostředí - pozadí. V dráze 7 byla aplikována DNA ze vzorku jílu. V dané dráze bylo možné pozorovat jeden signál. V jamce 6 bylo možné pozorovat 2 signály – jednalo se o DNA ze vzorku štěrku.

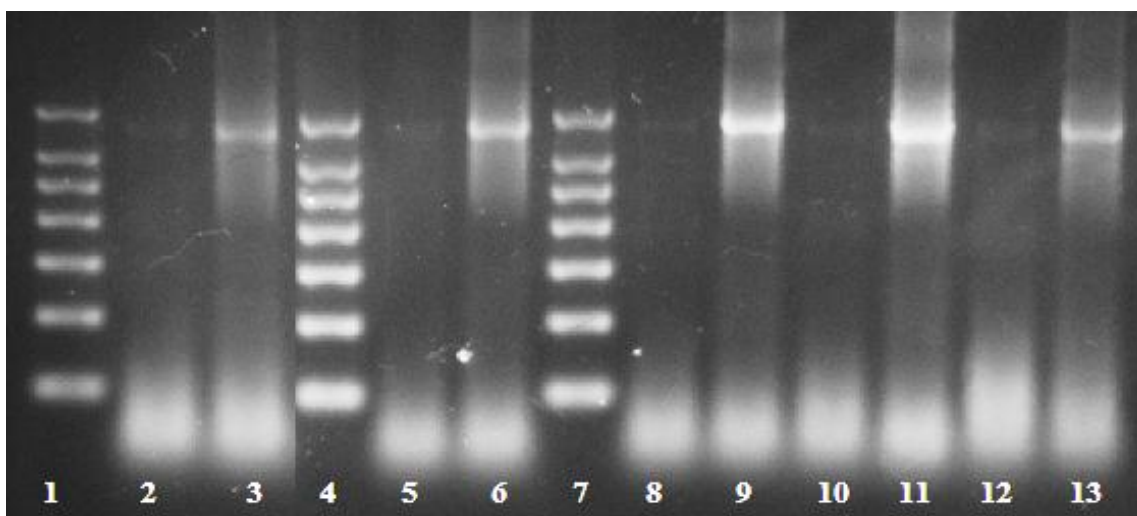
V drahách 4 a 5 bylo možné sledovat amplikony ze vzorků horninového prostředí - jednalo se o vzorky z lokality, kde byly po dva roky aplikovány inokula a nutrienty. V dráze 5 byly pozorovatelné 4 signály, které se vyskytovaly v jílovém prostředí. Z prostředí štěrku bylo možné na gelu pozorovat 9 signálů.

V dráhách 2 a 3 byly aplikovány amplikony pocházející z horninového prostředí, které bylo kontaminováno ropnými uhlovodíky, a daná lokalita byla připravena na aplikaci oxidačních činidel. V jamce 5 byly amplifikované nukleové kyseliny pocházející z jílového prostředí a sledováno bylo 6 signálů. A v dráze 2 bylo možno pozorovat 10 signálů. DNA pocházela ze štěrkového prostředí.

8.2.4 PCR reakce a detekce bakteriálních společenství ve vzorcích horninového prostředí – aplikace ISCO (modifikované Fentonovo činidlo)

DNA byla izolována z horninového prostředí, na kterém byla aplikována In situ chemická oxidace. Na dané lokalitě byly aplikovány modifikace In situ chemické oxidace – aplikace modifikovaného Fentonova činidla (vzorky: 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18), charakteristika vzorků je uvedena v tabulce (Tab. 6). Vzorky byly porovnávány s pozadím (vzorky 1 a 2). Izolace DNA byla provedena dle návodu ke kitu Powersoil DNA Isolation Kit (Kap. 7.3.1.1). Při izolaci byla použita modifikace izolace, kdy vzorky byly při lyzi zahřáty na teplotu 70 °C.

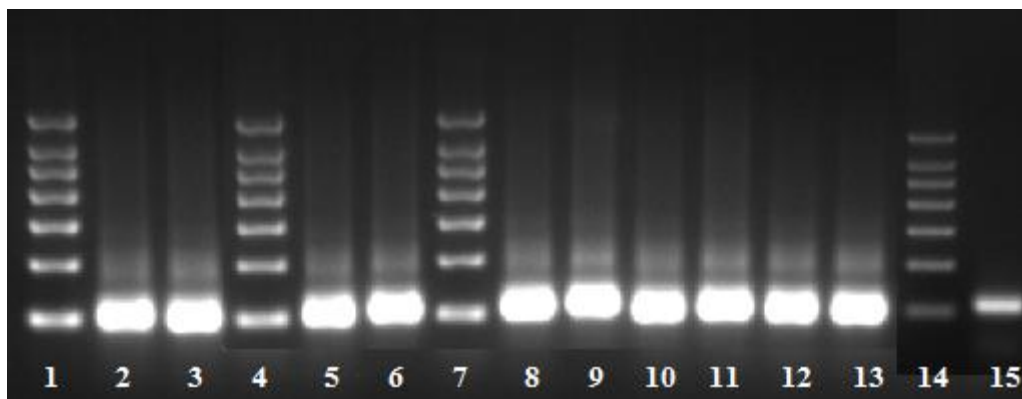
Postup amplifikace DNA je popsán v kapitole 7.3.2. Použité primery jsou uvedeny tabulce (Tab. 5). Pro amplifikaci kratšího DNA řetězce byly použity primery s GC svorkou. Získané amplikony byly detekovány elektroforetickou soustavou (postup Kap. 7.3.3). Jako standard byl pro agarózovou elektroforézu použit DNA Marker: 200 – 1600 (AscoProt Biotech). Pro amplifikaci prvního stupně i druhého stupně byl použit GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega).



Obr. 38. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) – (použité primery FDI a RD1)

Pořadí vzorků na agarózovém gelu po prvním stupni PCR reakce bylo následující (Obr. 38): 1: standard, 2: vzorek 1, 3: vzorek 2, 4: standard, 5: vzorek 5, 6: vzorek 6, 7: standard, 8: vzorek 9, 9: vzorek 10, 10: vzorek 13, 11: vzorek 14, 12: vzorek 17, 13: vzorek 18 (Tab. 6). Negativní kontrola byla negativní. Na agarózovém gelu bylo možné pozorovat úspěšně amplifikovanou DNA izolovanou ze štěrku, (jamky 3, 6, 9, 11, 13).

Amplifikované úseky DNA izolované z jílu bylo možno na gelu pozorovat ve velmi nízké koncentraci (jamky 2, 5, 8, 10, 12). Všechny získané bandy měly očekávanou délku (cca 1500 párů bází).

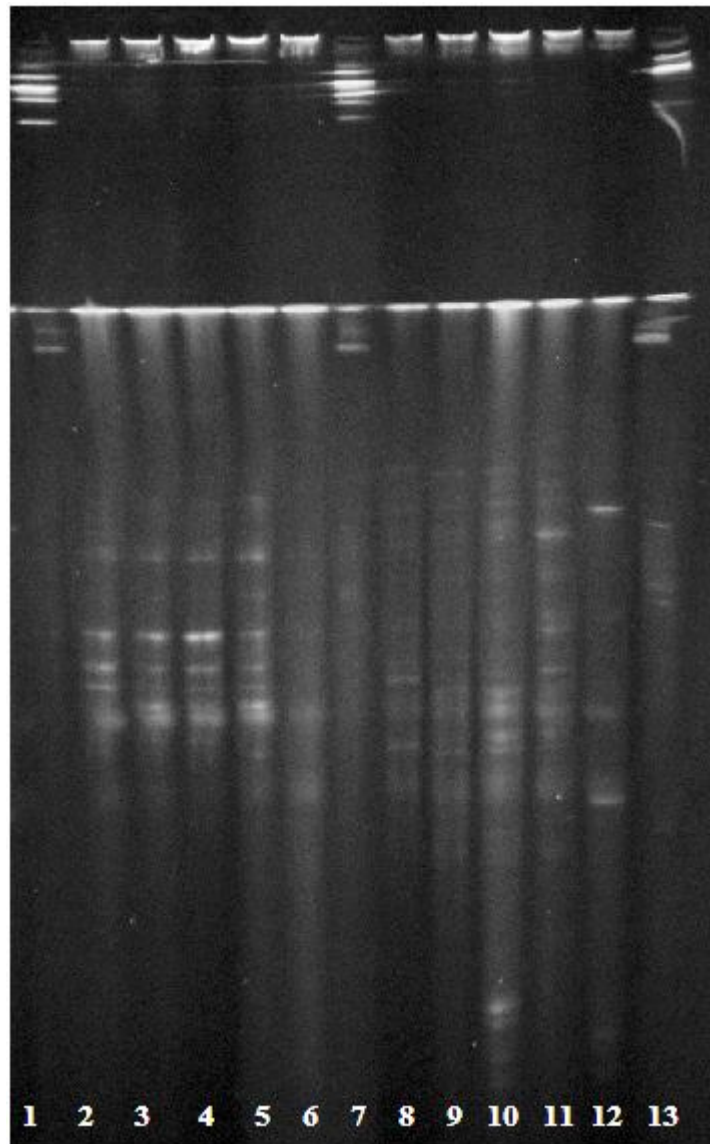


Obr. 39. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) - (použité primery GC 341f a 518r)

Pořadí vzorků na gelu po druhém stupni PCR reakce bylo následující (*Obr. 39*): 1: standard, 2: vzorek 1, 3: vzorek 2, 4: standard, 5: vzorek 5, 6: vzorek 6, 7: standard, 8: vzorek 9, 9: vzorek 10, 10: vzorek 13, 11: vzorek 14, 12: vzorek 17, 13: vzorek 18, 14: standard, 15: negativní kontrola (*Tab. 6*). Na gelu je možné sledovat amplikony DNA v dostatečné koncentraci a v předpokládané délce cca 200 párů bází.

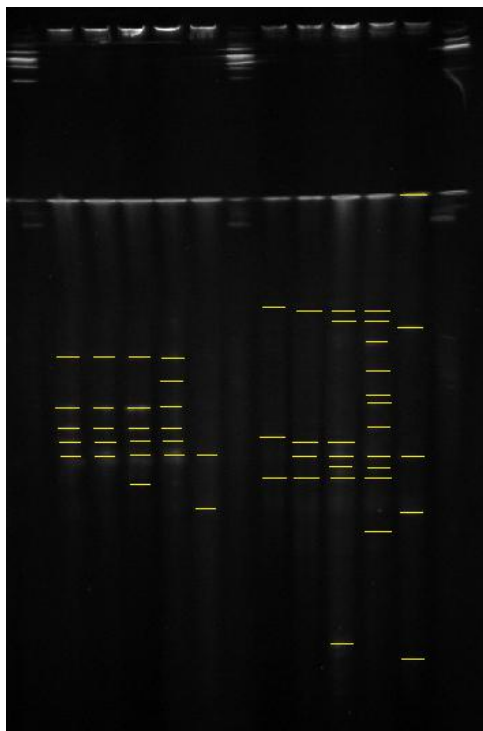
Na TGGE byly použity kratší PCR produkty s GC svorkou (GC 341f a 518r). Do sampléru bylo dávkováno 10 μ l amplikonu. Bylo pracováno s horizontálním elektroforetickým systémem (TGGE Maxi System, Biometra - postup TGGE viz. *Kap. 7.3.4*). Jako standard byl použit Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder (Biolabs. Inc. New England).

Výsledek gelové elektroforézy v teplotním gradientu je znázorněn na polyakrylamidovém gelu (*Obr. 40*). Na fotografii je možno vidět signály dominantních mikroorganismů, které se vyskytovaly ve vzorcích patřících do domény *Bacteria*. Pořadí vzorků na polyakrylamidovém gelu bylo následující: 1: standard, 2: vzorek 18, 3: vzorek 14, 4: vzorek 10, 5: vzorek 6, 6: vzorek 2, 7: standard, 8: vzorek 17, 9: vzorek 13, 10: vzorek 9, 11: vzorek 5, 12: vzorek 1, 13: standard.



Obr. 40. Výsledek TGGE analýzy domény Bacteria na polyakrylamidovém gelu - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (modifikace Fentonova činidla)

Počet signálů dominantních mikroorganismů bylo možno sledovat při ozáření gelu UV zářením na transiluminátoru. Pozorované signály mikroorganismů byly označeny, z gelu vyřezány (*Obr. 41*) a uchovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro identifikaci mikroorganismů, by vyřezaná DNA měla být reamplifikována, purifikována a sekvenována.



Obr. 41. Sledované dominantní mikroorganismy – ISCO (modifikované Fentonovo činidlo)

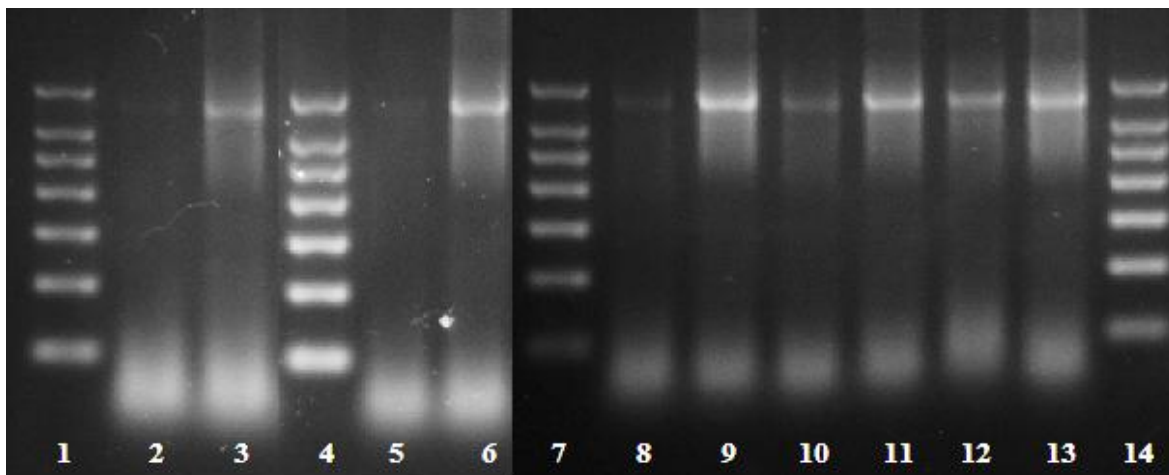
Na gelu bylo možno pozorovat mikrobiální zastoupení v horninovém prostředí, které bylo kontaminováno ropnými uhlovodíky a v dané lokalitě bylo použito In situ sanační technologie (In situ chemická oxidace – modifikované Fentonovo činidlo). V jamkách 2 – 6 byla dávkována DNA, izolovaná ze vzorků štěrku. V jamkách 7 – 12 byla dávkována DNA izolovaná ze vzorků jílu. V dráhách 6 a 12 bylo možné pozorovat dominantní mikroorganismy, které se vyskytovaly v kontaminované lokalitě před aplikací In situ chemické oxidace (odběr: vzorek 1 (5. 8. 2013) a vzorek 2 (12. 9. 2013)). V jamce 12 bylo možné sledovat 4 signály a v dráze 6 – 2 signály. V jamkách 5 (6 signálů) a 11 (11 signálů) bylo možno vidět signály, které se vyskytovaly ve vzorcích horninového prostředí, které bylo připraveno na aplikaci modifikovaného Fentonova činidla (odběr 12. 9. 2014). V dráhách 8 – 10 a 2 – 4 bylo možné pozorovat mikroorganismy, které se vyskytovaly v horninovém prostředí, na kterém byly použity sanační technologie – modifikované Fentonovo činidlo. Činidlo bylo aplikováno ve 3 – 5 opakování a vzorek byl odebrán 2 týdny po posledním dávkování. Vzorky byly odebrány: 8 a 9 (2. 12. 2013), 13 a 14 (26. 2. 2014), 17 a 18 (24. 4. 2014). V jamkách 8 – 10 byla aplikována DNA z jílu. V dráze 10 bylo možné pozorovat 7 signálů mikroorganismů. 4 signály byly sledovány v jamce 9. A 3

signály byly viditelné v dráze 8. Ze získaných výsledků vyplývá, že modifikované Fentonovo činidlo pravděpodobně mohlo působit inhibičně na mikroorganismy, které se v dané lokalitě vyskytovaly. Stejný trend byl sledován i ve vzorcích šterku. V jamkách 4 – 2 docházelo také k úbytku pozorovatelných signálů dominantních mikroorganismů: jamka 4 (6 signálů), jamka 3 (5 signálů) a jamka 2 (5 signály). I po aplikaci modifikovaného Fentonova činidla, bylo možno pozorovat ve šterkovém prostředí signály mikroorganismů, které byly pravděpodobně totožné se signály v pozadí (kontaminovaná lokalita, bez sanačního zásahu). Ve šterkovém prostředí, po aplikaci modifikovaného Fentonova činidla, byl však na rozdíl od signálů v pozadí, jeden ze signálů inhibován.

8.2.5 PCR reakce a detekce bakteriálních společenství ve vzorcích horninového prostředí – aplikace ISCO (persulfát + aplikace elektrického proudu)

DNA byla izolována z horninového prostředí, na kterém byla aplikována In situ chemická oxidace. Na dané lokalitě byly aplikovány modifikace In situ chemické oxidace – aplikace persulfátu a elektrického proudu (vzorky: 5, 6, 7, 8, 11, 12, 15, 16), charakteristika vzorků je uvedena v tabulce (Tab. 6). Vzorky byly porovnávány s pozadím (vzorky 1 a 2). Izolace DNA byla provedena dle návodu ke kitu Powersoil DNA IsolationKit s modifikací lyze buněk (Kap. 7.3.1.1). Postup amplifikace DNA je popsán v kapitole 7.3.2. Použité primery jsou uvedeny tabulce (Tab. 5). Pro amplifikaci kratšího DNA řetězce byly použity primery s GC svorkou. Získané amplikony byly detekovány elektroforetickou soustavou (postup Kap. 7.3.3). Jako standard byl pro agarózovou elektroforézu použit DNA Marker: 200 – 1600 (AscoProt Biotech). Pro amplifikaci prvního stupně i druhého stupně byl použit GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega).

Pořadí vzorků na agarózovém gelu po prvním stupni PCR reakce bylo následující (Obr. 42): 1: standard, 2: vzorek 1, 3: vzorek 2, 4: standard, 5: vzorek 5, 6: vzorek 6, 7: standard, 8: vzorek 7, 9: vzorek 8, 10: vzorek 11, 11: vzorek 12, 12: vzorek 15, 13: vzorek 16, 14: standard (Tab. 6). Negativní kontrola byla negativní.

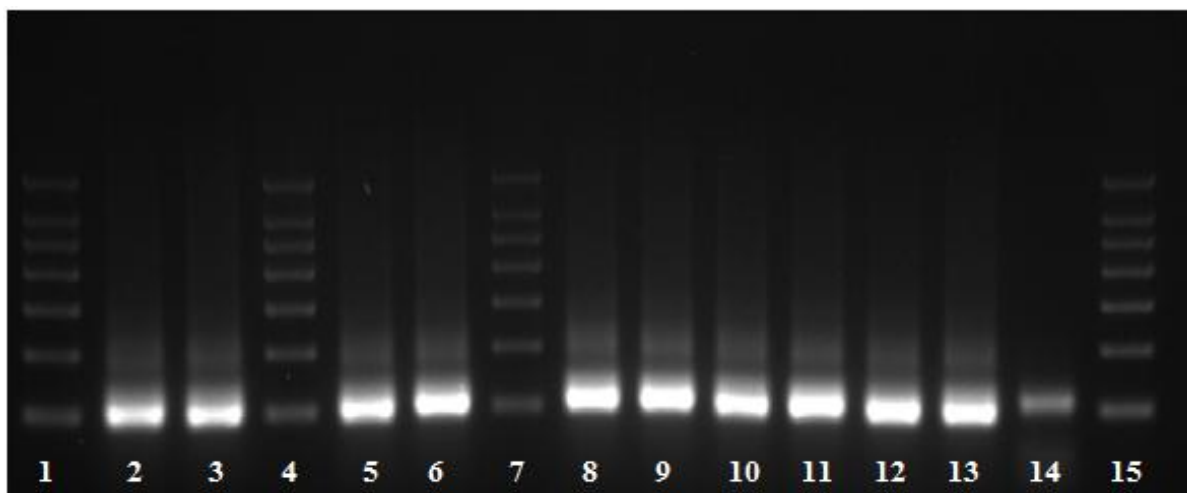


Obr. 42. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (persulfát + elektrický proud) – (použité primery FDI a RD1)

Na agarózovém gelu bylo možno pozorovat amplikony v očekávané délce cca 1500 pár bází. DNA izolovaná ze vzorků jílu byla na gelu pozorována ve velmi malé koncentraci (dráhy 2, 5, 8, 10). Po amplifikaci bylo možno na gelu pozorovat DNA pocházející ze šterku (jamky: 3, 6, 9, 11, 13) v dostatečné koncentraci. Taktéž DNA pocházející z jílu

(jamka 12) byla pozorovatelná v dostatečné koncentraci. Pro amplifikaci byly použity primery FD1 a RD1.

Po druhém stupni PCR reakce bylo možno vzorky na gelu pozorovat ve stejném pořadí jako v předchozím případě, s rozdílem - dráha 14: negativní kontrola a 15: standard.

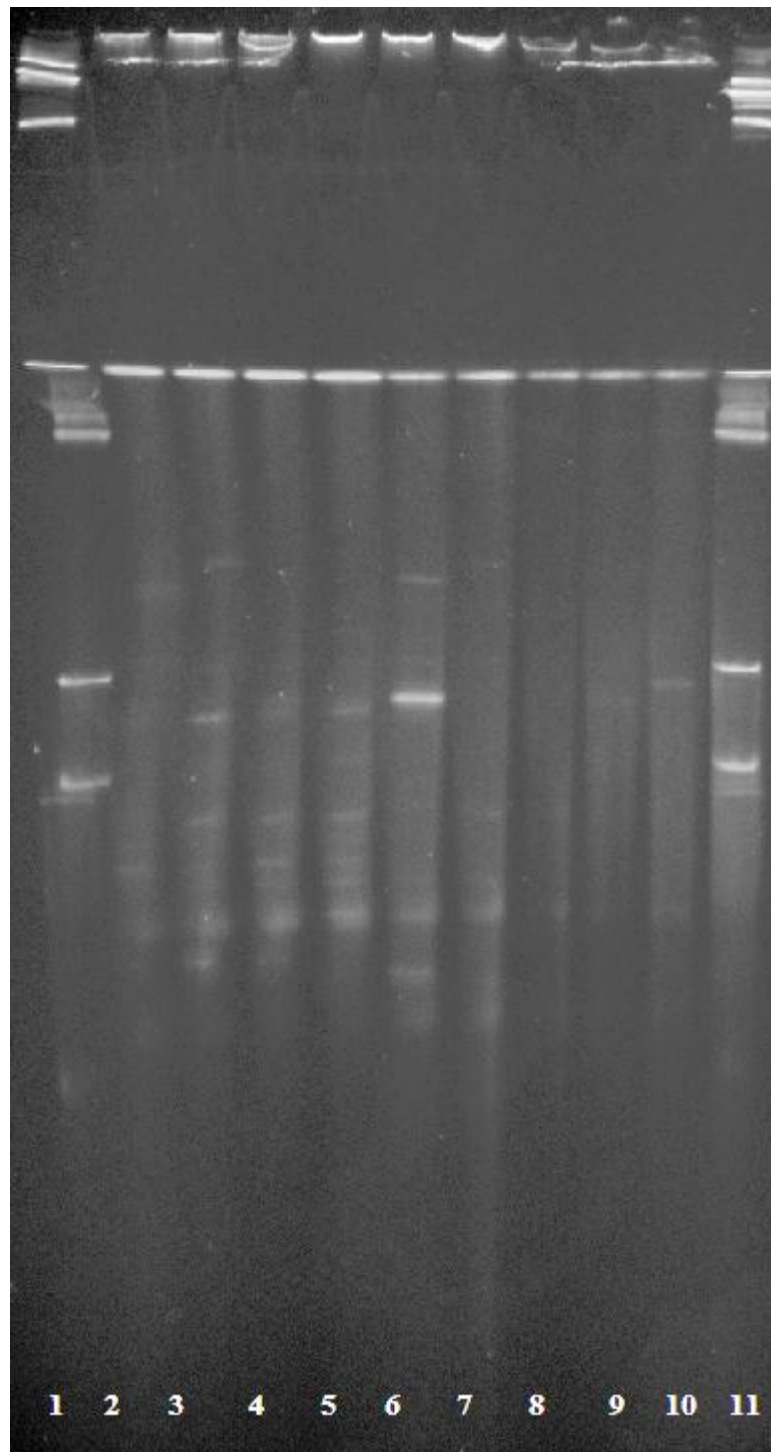


Obr. 43. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (persulfát + elektrický proud) - (použité primery GC 341f a 518r)

Po amplifikaci DNA s primery GC 341f a 518r bylo možno pozorovat produkty (*Obr. 43*) v očekávané délce (cca 200 párů bází).

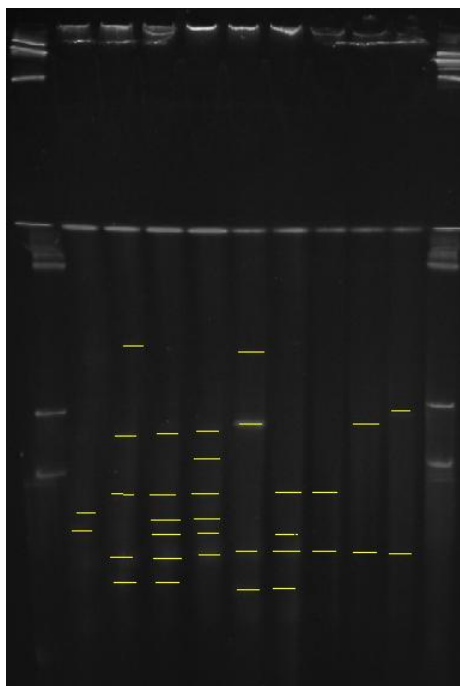
Na TGGE byly použity kratší PCR produkty s GC svorkou (GC 341f a 518r). Do sampléru bylo aplikováno 10 μ l amplikonu. Bylo pracováno s horizontálním elektroforetickým systémem (TGGE Maxi System, Biometra - Postup TGGE viz *Kap. 7.3.4*). Jako standard byl použit Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder (Biolabs. Inc. New England).

Výsledek gelové elektroforézy v teplotním gradientu je znázorněn na polyakrylamidovém gelu (*Obr. 44*). Na fotografii je možno vidět signály dominantních mikroorganismů, které se vyskytovaly ve vzorcích, patřících do domény *Bacteria*. Pořadí vzorků na polyakrylamidovém gelu bylo následující (*Tab. 6*): 1: standard, 2: vzorek 16, 3: vzorek 12, 4: vzorek 8, 5: vzorek 6, 6: vzorek 15, 7: vzorek 11, 8: vzorek 7, 9: vzorek 5, 10: vzorek 1, 11: standard.



Obr. 44. Výsledek TGGE analýzy domény Bacteria na polyakrylamidovém gelu - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (persulfát + elektrický proud)

Signály dominantních mikroorganismů bylo možno sledovat při ozáření gelu UV zářením na transiluminátoru. Pozorované signály byly označeny a z gelu vyřezány (Obr. 45) a uchovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro identifikaci mikroorganismů, by vyřezaná DNA měla být reamplifikována, purifikována a sekvenována.



Obr. 45. Sledované dominantní mikroorganismy – ISCO (persulfát + elektrický proud)

V jamkách 10 - 2 bylo DNA z lokalit, na které byl aplikován persulfát a elektrický proud (3 – 5 aplikací). V dráze 4 (vzorek 8) a 8 (vzorek 7) byly vzorky odebrané 18. 12. 2013, a to 2 týdny po poslední aplikaci oxidačních činidel a elektrického proudu. V jamkách 7 (vzorek 11) a 3 (vzorek 12) bylo možno sledovat amplikony DNA ze vzorků, které byly odebrány 26. 2. 2014 (3 měsíce po poslední aplikaci). Vzorky, které byly odebrány 6 měsíců po poslední aplikaci (odběr 24. 4. 2014), bylo možno pozorovat v jamkách 6 (vzorek 15) a 2 (vzorek 16).

V dráhách 10 – 6 byly amplikony DNA ze vzorků jílu. V jamce 10, kde se nacházelo pozadí, bylo možno pozorovat dva signály. Taktéž bylo možno pozorovat dva signály mikroorganismů v dráze 9 – lokalita, které byla připravena na aplikaci oxidačních činidel. V drahách 8 – 6 je možno pozorovat postupné mikrobiální oživení: jamka 8 – 2 signály, jamka 7 – 4 signály a jamka 6 – 4 signály.

V drahách 5 – 2 bylo možno sledovat amplikony DNA pocházející ze šterkového horninového prostředí. V jamce 5 bylo možno pozorovat mikroorganismy (6 signálů), jednalo se o vzorek z lokality připravené na aplikaci oxidačních činidel. V dráze 4 bylo možno pozorovat taktéž 6 signálů. V jamkách 2 a 3 došlo k úbytku dominantních mikroorganismů. V dráze 3 bylo možno pozorovat již jen 5 signálů a v jamce 2 pouze dva signály.

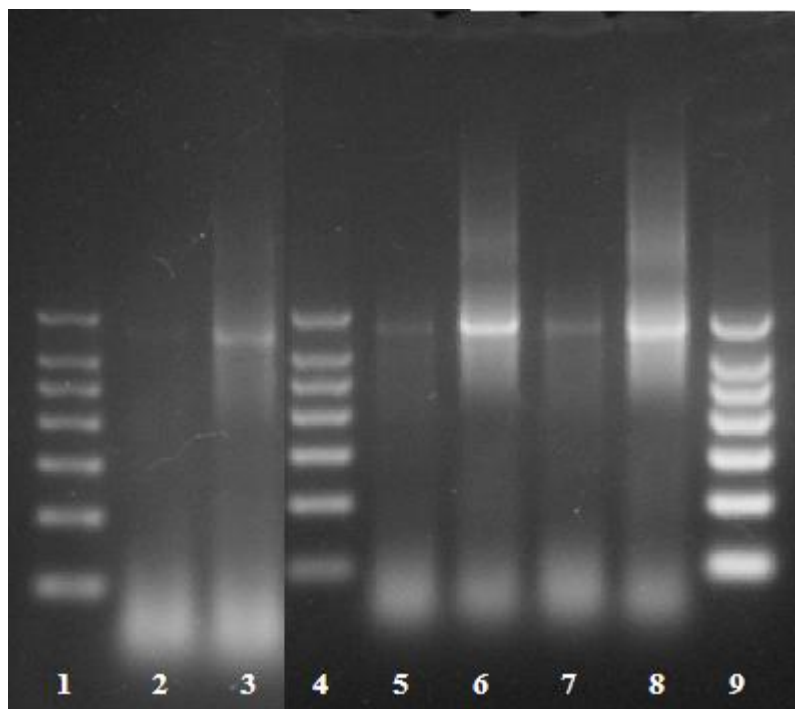
Ve vzorcích jílu a šterku bylo možno pozorovat opačné tendence. V jílovém prostředí docházelo k oživení mikrobiálních společenstev. Po aplikaci persulfátu se počet mikroorganismů s narůstajícím časem zvětšoval. Přítomné mikrobiální druhy mohly pravděpodobně persulfát využívat jako zdroj energie. Opačnou tendenci bylo možno pozorovat ve vzorcích pocházejících ze šterku, kde se mikrobiální osídlení postupně zmenšovalo. Po aplikaci persulfátu došlo k nepatrnému oživení mikrobiálních společenstev, poté pravděpodobně v důsledku jeho spotřebování docházelo k úbytku dominantních druhů.

8.2.6 PCR reakce a detekce bakteriálních společenství ve vzorcích horninového prostředí – aplikace Bioremediace

DNA byla izolována z horninového prostředí, na kterém byla aplikována sanační technologie - Bioremediace (vzorky 2, 4, 19, 20). Charakteristika vzorků je uvedena v tabulce (Tab. 6). Vzorky byly porovnávány s pozadím (vzorky 1 a 2). Izolace DNA byla provedena dle návodu ke kitu Powersoil DNA IsolationKit (Kap. 7.3.1.1). Byla použita modifikace izolace, kdy vzorky byly při lyzi zahřáty na teplotu 70 °C.

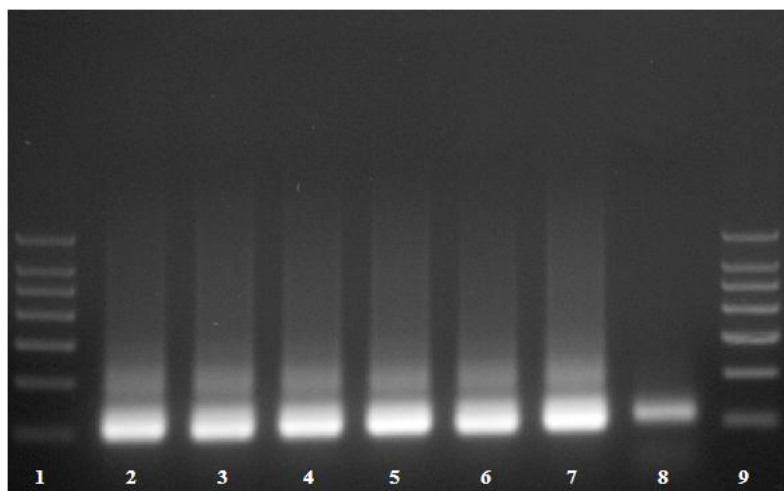
Postup amplifikace DNA je popsán v kapitole 7.3.2. Použité primery jsou uvedeny tabulce (Tab. 5). Pro amplifikaci kratšího DNA řetězce byly použity primery s GC svorkou. Získané amplikony byly detekovány elektroforetickou soustavou (postup Kap. 7.3.3). Jako standard byl pro agarózovou elektroforézu použit DNA Marker: 200 – 1600 (AscoProt Biotech). Pro amplifikaci prvního stupně i druhého stupně byl použit GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega).

Vzorky je na agarózovém gelu možno sledovat v následujícím pořadí (Obr. 46): 1: standard, 2: vzorek 1, 3: vzorek 2, 4: standard, 5: vzorek 3, 6: vzorek 4, 7: vzorek 19, 8: vzorek 20, 9: standard (Tab. 6). Negativní kontrola byla negativní.



Obr. 46. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace Bioremediace – (použité primery FD1 a RD1)

Na agarózovém gelu bylo možno pozorovat bandy DNA. Amplifikovanou DNA ze vzorků jílu (dráhy: 2, 5, 8, 9) bylo na gelu možno sledovat také, ale ve velmi malé koncentraci. Po amplifikaci bylo možno na gelu pozorovat DNA pocházející ze štěrku (jamky: 3, 6, 9, 11) v dostatečné koncentraci. Všechny amplifikované úseky měly požadovanou délku cca 1500 párů bází.



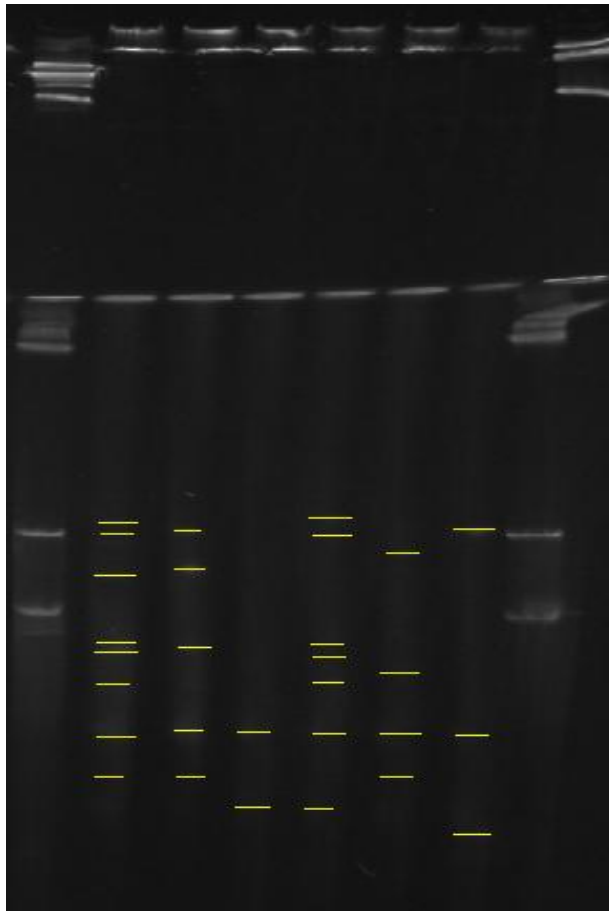
Obr. 47. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace Bioremediace - (použité primery GC 341f a 518r)

Pro amplifikaci druhého stupně PCR reakce bylo využito primerů GC341f a 518r. Na agarózovém gelu (*Obr. 47*) bylo možno pozorovat amplikony o dostatečné koncentraci a předpokládané délce (cca 200 párů bází). Pořadí vzorku bylo následující: 1: standard, 2: vzorek 1, 3: vzorek 2, 4: vzorek 3, 5: vzorek 4, 6: vzorek 19, 7: vzorek 20, 8: negativní kontrola, 9: standard (*Tab. 6*)

Na TGGE byly použity kratší PCR produkty s GC svorkou (GC 341f a 518r). Do sampléru bylo dávkováno 10 μ l amplikonu. Bylo pracováno s horizontálním elektroforetickým systémem (TGGE Maxi System, Biometra - postup TGGE viz kapitola 7.3.4). Jako standard byl použit Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder (Biolabs. Inc. New England).

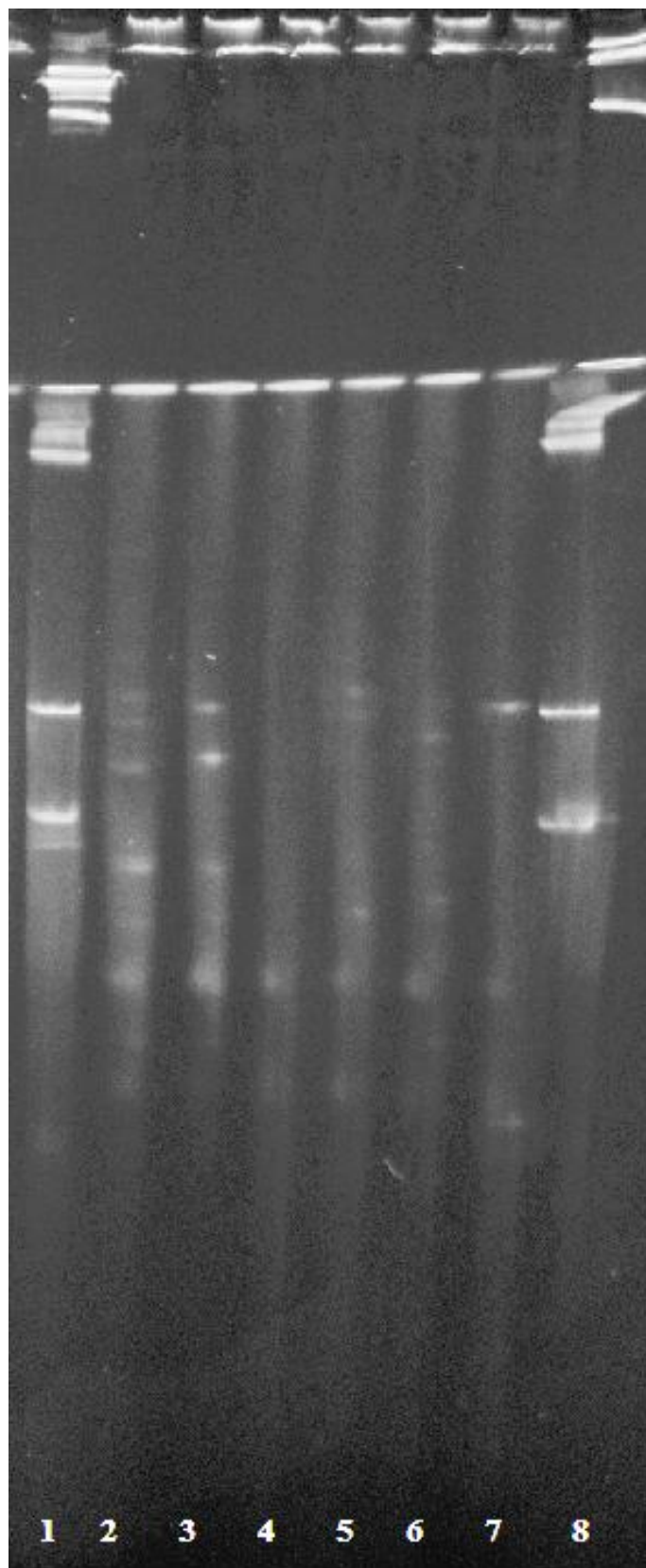
Výsledek gelové elektroforézy v teplotním gradientu je znázorněn na polyakrylamidovém gelu (*Obr. 49*). Na fotografii je možno vidět signály dominantních mikroorganismů, které se vyskytovaly ve vzorcích, patřících do domény *Bacteria*. Pořadí vzorků na

polyakrylamidovém gelu bylo následující: 1: standard, 2: vzorek 20, 3: vzorek 4, 4: vzorek 2, 5: vzorek 19, 6: vzorek 3, 7: vzorek 1, 8: standard (*Tab. 6*).



Obr. 48. Sledované dominantní mikroorganismy – Bioremediace

Počet dominantních mikroorganismů bylo opět možno pozorovat při ozáření gelu UV zářením na transiluminátoru. Pozorované signály byly označeny a z gelu vyřezány (*Obr. 48*) a uchovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro identifikaci mikroorganismů, by vyřezaná DNA měla být reamplifikována, purifikována a sekvenována.



Obr. 49. Výsledek TGGE analýzy domény Bacteria na polyakrylamidovém gelu - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace Bioremediace

Na obrázcích (*Obr. 48, Obr. 49*) je pozorovatelná změna v mikrobiálním osídlení při bioremediaci půd. Do kontaminovaných půd byly dávkovány inoluka a nutrienty. Vzorky 3 (dráha 6) a 4 (dráha 3) byly odebrány 12. 9. 2013 a na dané lokalitě probíhala po dobu cca 2 roky aplikace inokula a nutrientů, minulý rok pouze aplikace nutrientů. V jamkách 5 (vzorek 19) a 2 (vzorek 20), se nacházely vzorky odebrané dne 24. 4. 2014, na lokalitě byly aplikovány pouze nutrienty, po cca 6 měsících. V drahách 7 a 4 bylo možno sledovat mikrobiální osídlení v pozadí, které bylo kontaminované ropnými uhlovodíky.

V jamkách 5 – 7 byly vzorky pocházející z prostředí jílu a v drahách 4 – 2 se nacházely vzorky ze štěrku.

V horninovém prostředí bylo možno pozorovat očekávané mikrobiální oživení. Amplikony pocházející ze vzorků štěrku: pozadí – vzorek 2 (jamka 4) – 2 signály, vzorek 4 (jamka 3) – 5 signálů a vzorek 20 (jamka 2) – 8 signálů. Podobný trend je sledovatelný i u amplikonů z jílu: pozadí – vzorek 1 (dráha 7) – 3 signály, vzorek 3 (dráha 6) – 4 signály a vzorek 19 (dráha 5) – 7 signálů.

Ze získaných výsledků je patrné, že po aplikaci inokula a nutrientů byly podpořeny aplikované inokulované mikroorganismy. Následně došlo i k podpoření mikrobiálních dalších společenstev, díky opakované aplikaci nutrientů, které se vyskytovaly v daném prostředí.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na sledování mikrobiologie biodegradčních procesů pomocí molekulárně biologických metod. V rámci práce bylo využito dvou modifikací PCR reakce („TouchDown“, „Nested“). Pro detekci amplifikovaných úseků bylo využito klasické agaróзовé elektroforézy a pro jejich separaci gelové elektroforézy v teplotním gradientu (TGGE). Metoda TGGE byla adaptována na analýzu domény *Archaea*. Pro adaptaci bylo využito nukleových kyselin izolovaných z digestátu a z horninového prostředí. Horninové prostředí, kde bylo analyzováno mikrobiální zastoupení, pocházelo z lokality kontaminované ropnými uhlovodíky. Na lokalitě byly aplikovány tři modifikace sanačních technologií: In situ chemická oxidace (modifikované Fentonovo činidlo), In situ chemická oxidace (persulfát + elektrický proud) a Bioremediace.

Podrobněji byly sledovány změny mikrobiálního zastoupení během biodegradace ropných uhlovodíků pro doménu *Bacteria*.

Na základě získaných výsledků, lze konstatovat:

- pro izolaci nukleových kyselin z horninového prostředí je optimální využít komerčně prodávaného kitu s modifikací lyze buněk,
- byla úspěšně provedena adaptace TGGE pro analýzu domény *Archaea*,
- metoda TGGE byla optimalizována na analýzu DNA, která pocházela z horninového prostředí,
- lze konstatovat, že bakteriální složení během sanace půd se mění,
- při aplikaci modifikovaného Fentonova činidla, dochází pravděpodobně k inhibici mikroorganismů přítomných v sanovaných půdách,
- v případě aplikace persulfátu a elektrického proudu bylo možno pozorovat rozlišné výsledky,
- v jílovém prostředí po aplikaci persulfátu došlo k mikrobiálnímu oživení,
- ve štěrku se se spotřebou persulfátu, který byl aplikován, mikrobiální osídlení snižovalo,
- při aplikaci nutrientů a inokula do horninového prostředí (bioremediace), bylo možno pozorovat očekávané mikrobiální oživení.

Závěrem, lze říci, že metoda TGGE byla úspěšně adaptována na analýzu mikrobiálních společenstev v horninovém prostředí, kde se DNA nacházela v nízké koncentraci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANSORGE, W., and G. P. PATRINOS, 2010. *Molecular diagnostics*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. ISBN 978-0-12-374537-8.

ATLAS, R. M., 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*[online]. Vol. 45, No. 1, s. 180-209 [cit. 2013-12-26]. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/content/45/1/180.full.pdf>.

BANAT, I. M., R. S. MAKKAR, and S. S. CAMEOTRA, 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2000-5-15, vol. 53, issue 5, s. 495-508 [cit. 2013-12-26]. DOI: 10.1007/s002530051648. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051648>.

BIOINFORMATICS ORGANIZATION, 2014. *The Sequence Manipulation Suite: IUPAC codes* [online]. [cit. 2014-03-15]. Dostupné z: <http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>.

BLAŽEK, J., and V. RÁBL, 2006. *Základy zpracování a využití ropy*. 2., přepr. vyd. Praha: VŠCHT, s. 8 - 43. ISBN 80-708-0619-2.

DON, R. H., P. T. COX, B. J. WAINWRIGHT, K. BAREK, and J. S. MATTICK, 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* [online]. Vol. 19, issue 14, s. 4008-4008 [cit. 2013-11-18]. DOI: 10.1093/nar/19.14.4008. Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/19.14.4008>.

DOSTÁLKOVÁ, J., and J. MIKEŠ, 2013. EPS, s.r.o. *Využití potenciálu DGGE a PLFA pro zjištění změny mikrobiální diverzity v průběhu sanace na lokalitě kontaminované ropnými uhlovodíky*. Kunovice.

DÍAZ-RAMÍREZ, I. J., E. ESCALANTE-ESPINOSA, E. FAVELA-TORRES, M. GUTIÉRREZ-ROJAS, and H. RAMÍREZ-SAAD, 2008. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *International Biodeterioration* [online]. Vol. 62, issue 1, s. 21-30 [cit. 2013-12-28]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2007.11.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096483050700159X>.

ČERNÍK, M., 2010. *Chemicky podporované in situ sanační technologie*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, s. 17 - 44, 348 s. ISBN 978-80-7080-767-5.

EVANS, F. F., A. S. ROSADO, G. V. SEBASTIÁN, R. CASELLA, P. L. O. A. MACHADO, C. HOLMSTRÅM, S. KJELLEBERG, J. D. ELSAS, and L. SELDIN, 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. Vol. 49, issue 2, s. 295-305 [cit. 2014-01-07]. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.04.007. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.femsec.2004.04.007>.

HERSCHLAG, D., 2009. *Biophysical, chemical, and functional probes of RNA structure, interactions and folding: Part A* [online]. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, c2009 [cit. 2014-04-02]. *Methods in enzymology*, vol. 468. ISBN 978-0-12-374399-2.

HORÁK, P., 2006. *Mechanismy biodegradací kontaminantů a bioasanační techniky*. Vyd. 1. Ústí nad Labem: Fakulta životního prostředí UJEP. ISBN 80-7044-814-8.

HORÁKOVÁ, D., 2006. *Bioremediace* [online]. 1. vyd. Brno: Masarykova Univerzita Přírodovědecká fakulta, s. 5 - 62. [cit. 2013-12-12]. Dostupné z: http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3062932/bioremediace_FRVS_2006-2.pdf.

HOWLAND, J. L., 2000. *The surprising archaea: discovering another domain of life*. New York: Oxford University, s. 3-22. ISBN 0195111834. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=25LQQRBJI8QC&lpg=PP1&hl=cs&pg=PA10#v=onepage&q&f=false>.

HULING, S. G., and B. E. PIVETZ, 2006. In-Situ Chemical Oxidation. *Environmental Protection Agency Washington DC Office of Water* [online]. s. 61 [cit. 2013-12-26]. Dostupné z: <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA507297>.

KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, s. 103 - 104, 218 s. ISBN 978-807-0134-504.

LABBÀ, D., R. MARGESIN, F. SCHINNER, L. G. WHYTE, and C. W. GREER, 2007. Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated Alpine soils. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. Vol. 59, issue 2, s. 466-

475 [cit. 2013-12-27]. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00250.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6941.2006.00250.x>.

LEAHY, J. G., and R. J. L. COLWELL, 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. Vol. 54, No. 3, s. 305-315 [cit. 2013-12-26]. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/content/54/3/305.full.pdf>.

MACNAUGHTON, S. J., J. R. STEPHEN, A. D. VENOSA, G. A. DAVIS, Y.-J. CHANG, and D. C. WHITE, 1999. Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. Vol. 65, No.8, s. 3566-3574 [cit. 2013-12-26]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/65/8/3566>.

MUYZER, G., 1998. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. vol. 73, issue 1, s. 127-141 [cit. 2014-04-02]. DOI: 10.1023/A:1000669317571. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1000669317571>.

MUYZER, G., E. C. DE WAAL, and A. G. UITIERLINDEN, 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. s. 695-700 [cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/59/3/695.full.pdf+html>.

OVREÅS, L., L. FORNEY, F. L. DAAE, and V. TORSVIK, 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 63 (9), 3367–3373 [cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168642/>.

ROSYPAL, S., 2002. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, s. 904-1200. ISBN 80-902-5624-4.

ROUX, K. H., 1995. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2009-04-01, issue 4 [cit. 2013-11-19]. DOI: 10.1101/pdb.ip66. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.ip66>, p. S185-S194.

SAADOUN, I., 2002. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. *J. Basic Microbiol* [online]. [cit. 2014-01-17]. DOI: 10.1002/1521-4028(200212)42:6<420::AID-JOBM420>3.0.

STEPHENSON, F. H., and M. C. ABILOCK, 2012. PCR Optimization Student Guide Fall 2012: Optimizing the Polymerase Chain Reaction. In: *Applied Biosystems: BABEC* [online]. [cit. 2013-11-19]. Dostupné z: http://www.babec.org/files/PCR_2012/PCR_Optimization_Student_Guide_2012.pdf.

SUTHERSAN, S. S., 1997. *Remediation engineering: design concepts*. Boca Raton, Fl.: CRC-Lewis Publishers, c1997, 362 p. ISBN 15-667-0137-6.

ŠMARDA, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, s. 5 - 104, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.: Brno.

TGGEMAXISystem, BIOMETRA. 2012. *Instruction Manual Ver. 05/12* [online]. 65 s. Dostupné z: http://www.biometra.com/fileadmin/biometra/_products/Electrophoresis/tgge/docs/Manual_TGGE_MAXI_May_2012.pdf.

TRÖGL, J., 2011. Biodegradace. *Univerzita Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem* [online]. 2011 [cit. 2013-12-12]. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~trog11Mikr11Biodegradace.pdf>.

VIERSTRAETE, A., 1999. Principle of the PCR. [online]. [cit. 2013-11-19]. Dostupné z: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>, University of Ghent.

WARTELL, M. R., S. HOSSEINI, and S. POWELL, 1998. Detecting single base substitutions, mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods. *Journal of Chromatography A*. [online]. Vol. 806, s. 169-185 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: http://ww2.chemistry.gatech.edu/~williams/bCourse_Information/6582/announce/papers/sarah_tannenbaum.pdf.

WEISBURG, W. G., S. M. BARNS, D. A. PELLETIER, and D. J. LANE, 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of bacteriology* [online]. s. 697-703 [cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207061/pdf/jbacter00092-0291.pdf>.

WUNDERLICOVÁ, L., L. BUŇKOVÁ, M. KOUTNÝ, T. VALENTA, and F. BUŇKA, 2013. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food Microbiology* [online]. Vol. 34, issue 2, s. 268-276 [cit. 2013-11-19]. DOI: 10.1016/j.fm.2012.09.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002012002341>.

YAGI, H., F. NINOMIYA, M. FUNABASHI, and KUNIOKA, 2011. RNA analysis of anaerobic sludge during anaerobic biodegradation of cellulose and poly(lactic acid) by RT-PCR–DGGE. *Polymer Degradation and Stability* [online]. Vol. 96, issue 4, s. 547-552 [cit. 2014-03-28]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391011000152>.

YOURNO, J., 1992, A method for nested PCR with single closed reaction tubes. *Genome Research* [online]. Vol. 2, issue 1, s. 60-65 [cit. 2014-04-02]. DOI: 10.1101/gr.2.1.60. Dostupné z: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.2.1.60>.

ZHONGYUN MA, B., 1999. *Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil using indigenous cultures*. Ottawa: National Library of Canada = Bibliothèque nationale du Canada. Master these. University of Newfoundland. ISBN 06-123-4201-8. Dostupné z: http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk2/tape17/PQDD_0011/MQ34201.pdf.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Adenin.
bp	Páry bází.
C	Cytosin.
DGGE	Gelová elektroforéza v gradientu denaturačních činidel.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
dNTPs	Deoxynukleotidtrifosfáty.
dsDNA	Dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina.
G	Guanin.
ISCO	In situ chemická oxidace.
kp	Kilo bází.
PCR	Polymerázová řetězová reakce.
RPM	Počet otáček za minutu.
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina.
ssDNA	Jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina.
T	Thymin.
TGGE	Gelová elektroforéza v teplotním gradientu.
TPH	Total petroleum hydrocarbons.
UV	Ultrafialové záření.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Biodegradační trojúhelník (SUTHERSAN, 1997).....</i>	15
<i>Obr. 2. Posloupnost molekulárně biologických metod.....</i>	18
<i>Obr. 3. Grafické znázornění kroků PCR (VIERSTRAETE, 1999)</i>	20
<i>Obr. 4. Exponenciální nárůst kopií DNA (VIERSTRAETE, 1999)</i>	22
<i>Obr. 5. Nested PCR pro amplifikaci bakteriální DNA</i>	23
<i>Obr. 6. Změna konformace během TGGE (TGGEMAXISystem).....</i>	25
<i>Obr. 7. Výsledný gel s bandy u paralelní TGGE (TGGEMAXISystem)</i>	27
<i>Obr. 8. Gradientový denaturační gel v čase 0 (MACNAUGHTON et al., 1999)</i>	32
<i>Obr. 9. Gradientový denaturační gel v čase 8 týdnů (MACNAUGHTON et al., 1999).....</i>	32
<i>Obr. 10. Gradientový denaturační gel v čase 14 týdnů (MACNAUGHTON et al., 1999).....</i>	33
<i>Obr. 11. Denaturační gradientový gel s označenými bandy skupiny DMC-A (DÍAZ-RAMÍREZ et al., 2008)</i>	34
<i>Obr. 12. Bandy na DGGE gelu ze skupiny DCM-B, cílový region V6-V8 z 16S rDNA (DÍAZ-RAMÍREZ et al., 2008)</i>	35
<i>Obr. 13. Gradientový denaturační gel s vyznačenými bandy dominantních mikroorganismů (LABBĚ et al., 2007).....</i>	38
<i>Obr. 14. Složení skel pro polymeraci gelu (TGGEMAXISystem)</i>	59
<i>Obr. 15. Vložení silikonového těsnění (TGGEMAXISystem).....</i>	60
<i>Obr. 16. Finální podoba skleněné aparatury (TGGEMAXISystem)</i>	60
<i>Obr. 17. Uspořádání gelu a žinek na elektroforetické soustavě (TGGEMAXISystem).....</i>	62
<i>Obr. 18. Fotografie aparatury TGGE připravené na spuštění</i>	63
<i>Obr. 19. První stupeň PCR pro doménu Archaea - DNA izolovaná z digestátu (použité primery PREA 46f a PREA 1100R)</i>	66
<i>Obr. 20. Druhý stupeň PCR pro doménu Archaea - DNA izolovaná z digestátu (použité primery GCPARCH 340f a PARCH 519r)</i>	66
<i>Obr. 21. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z digestátu (použité primery FDI a RD1).....</i>	67
<i>Obr. 22. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - kontaminace</i>	68
<i>Obr. 23. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z digestátu (použité primery GC 341f a 518r).....</i>	68

Obr. 24. Výsledek optimalizace TGGE na analýzu domény Archaea (paralelně domény Bacteria) na polyakrylamidovém gelu – DNA izolovaná z digestátu	69
Obr. 25. Test účinnosti izolace DNA.....	71
Obr. 26. Modifikace izolace DNA – první stupeň PRC reakce (primery FD1 a RD1).....	72
Obr. 27. Nedostatečný elektrický proud v TGGE aparatuře	74
Obr. 28. Nedostatečné množství DNA – dávkování 5 μ l DNA.....	74
Obr. 29. Nedostatečné množství DNA – dávkování 8 μ l DNA.....	75
Obr. 30. Dostatečné množství DNA – dávkování 10 μ l DNA	76
Obr. 31. Pozorovatelná kontaminace na polyakrylamidovém gelu	77
Obr. 32. První stupeň PCR pro doménu Archaea - DNA izolovaná z horninového prostředí - (použité primery PREA 46f a PREA 1100R).....	78
Obr. 33. Druhý stupeň PCR pro doménu Archaea - DNA izolovaná z horninového prostředí - (použité primery GCPARCH 340f a PARCH 519r).....	79
Obr. 34. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí - (použité primery FD1 a RD1).....	79
Obr. 35. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí - (použité primery GC 341f a 518r)	80
Obr. 36. Výsledek optimalizace TGGE na analýzu domény Archaea (paralelně domény Bacteria) na polyakrylamidovém gelu - DNA izolovaná z horninového prostředí.....	81
Obr. 37. Sledované dominantní mikroorganismy - optimalizace.....	82
Obr. 38. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) – (použité primery FD1 a RD1)	84
Obr. 39. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (modifikované Fentonovo činidlo) - (použité primery GC 341f a 518r).....	85
Obr. 40. Výsledek TGGE analýzy domény Bacteria na polyakrylamidovém gelu - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (modifikace Fentonova činidla)	86
Obr. 41. Sledované dominantní mikroorganismy – ISCO (modifikované Fentonovo činidlo).....	87

<i>Obr. 42. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (persulfát + elektrický proud) – (použité primery FDI a RD1)</i>	<i>89</i>
<i>Obr. 43. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (persulfát + elektrický proud) - (použité primery GC 341f a 518r)</i>	<i>90</i>
<i>Obr. 44. Výsledek TGGE analýzy domény Bacteria na polyakrylamidovém gelu - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace ISCO (persulfát + elektrický proud)</i>	<i>91</i>
<i>Obr. 45. Sledované dominantní mikroorganismy – ISCO (persulfát + elektrický proud)</i>	<i>92</i>
<i>Obr. 46. První stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace Bioremediace – (použité primery FDI a RD1)</i>	<i>94</i>
<i>Obr. 47. Druhý stupeň PCR pro doménu Bacteria - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace Bioremediace - (použité primery GC 341f a 518r)</i>	<i>95</i>
<i>Obr. 48. Sledované dominantní mikroorganismy – Bioremediace</i>	<i>96</i>
<i>Obr. 49. Výsledek TGGE analýzy domény Bacteria na polyakrylamidovém gelu - DNA izolovaná z horninového prostředí – aplikace Bioremediace</i>	<i>97</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Charakteristika sledovaných lokalit (LABBĀ et al., 2007).....</i>	37
<i>Tab. 2. Třídý mikroorganismů v jednotlivých půdách a jejich procentuální zastoupení (LABBĀ et al., 2007)</i>	38
<i>Tab. 3. Klasifikace mikroorganismů (LABBĀ et al., 2007)</i>	39
<i>Tab. 4. Výsledky zahraničních studií.....</i>	40
<i>Tab. 5. Přehled použitých primerů.....</i>	45
<i>Tab. 6. Charakteristika vzorků.....</i>	49
<i>Tab. 7. Složení reakční směsi pro PCR</i>	54
<i>Tab. 8. Složení roztoku gelu.....</i>	61
<i>Tab. 9. Charakteristika vzorků digestátu použitých pro izolaci DNA.....</i>	65