

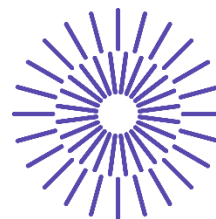
Disertační práce

Možnosti podpory biotechnologických procesů s využitím nanomateriálů a molekulárně-genetických metod

Studijní program: P3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942V001 – Nanotechnologie

Autor práce: **Ing. Magda Nechanická**
Školitel práce: Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.

Liberec 2023



Doctoral thesis

Combination of nanomaterials and molecular-genetic methods as support for biotechnological processes

Study programme: P3942 – Nanotechnology

Field of study: 3942V001 – Nanotechnology

Author: **Ing. Magda Nechanická**

Supervisor: Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.

Liberec 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé disertační práce a konzultantem.

Jsem si vědoma toho, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má disertační práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce Ing. Mgr. Lukášovi Dvořákovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a konzultace v průběhu celého studia a tvorby této práce.

Mé poděkování patří také všem spolupracovníkům a přátelům za jejich ochotu a pomocnou ruku v rámci mého studia. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině za jejich trpělivost a podporu.

Autorka děkuje za servisní služby poskytnuté výzkumnou infrastrukturou NanoEnviCz (Projekt č. LM2023066) podporovanou MŠMT ČR.

Anotace

Předmětem této práce bylo studium možností podpory biotechnologických procesů s využitím nanomateriálů a molekulárně-genetických metod. Prvně byly vyvinuty a testovány nosiče s nanovláknennou vrstvou jako pasivní metoda vzorkování mikrobiální biomasy z podzemní vody na kontaminované lokalitě pro následnou molekulárně-genetickou analýzu. Vybrané nanovláknenné nosiče, které byly vytipovány na základě dlouhodobého testování a monitoringu mikroflóry v podzemních vodách, byly následně testovány na dalších lokalitách. V další části práce byla verifikována aplikovatelnost nanovláknenných nosičů pro intenzifikaci biologických procesů čištění skládkových průsakových vod. Součástí těchto experimentů bylo studium vývoje nitrifikačních bakterií s využitím molekulárně-genetických metod. Poslední část této práce se zabývá vývojem a verifikací časově a ekonomicky nenáročných sterilizačních metod vhodných pro nanovláknenné nosiče biomasy, jejíž účinnost byla potvrzena pomocí mikrobiologických a molekulárně-genetických metod.

Poznatky a výstupy dosažené v rámci této disertační práce naleznou uplatnění nejen v oblastech bioremediace a čistírenství, ale také při aplikacích nanovláknenných struktur v čistých biotechnologiích, kde je vyžadována jejich efektivní sterilita.

Klíčová slova:

biofilm; FISH; mikrobiální biomasa; molekulárně-genetické analýzy; nanovláknenné nosiče; next-generation sequencing; nitrifikace; podzemní voda; real-time qPCR; skládková voda; sterilizace; vzorkování

Annotation

The subject of this work was the study of the possibilities of supporting biotechnological processes using nanomaterials and molecular-genetic methods. At first, carriers with a nanofiber layer were developed and tested as a passive method of sampling microbial biomass from groundwater at a contaminated site for subsequent molecular-genetic analysis. The nanofiber carriers selected based on long-term testing and monitoring of microflora in groundwater were subsequently tested at other locations. In the next part of the work, the applicability of nanofiber carriers for the intensification of biological processes of landfill leachate treatment was verified. Part of these experiments was the study of the development of nitrifying bacteria using molecular genetic methods. The last part of this work deals with developing and verifying a time- and cost-effective sterilization method suitable for nanofiber biomass carriers, the effectiveness of which was confirmed using microbiological and molecular-genetic methods.

The findings and outputs achieved within this dissertation thesis will contribute not only in the area of bioremediations and waste and landfill leachate treatments but also in the applications of nanofibers in pure biotechnologies where their effective sterilization is required.

Keywords:

biofilm; FISH; groundwater; landfill leachate; microbial biomass; molecular-genetic analysis; nanofiber carriers; next-generation sequencing; nitrification; real-time qPCR; sampling; sterilization

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Teoretická část - současný stav poznání.....	13
2.1	Nanovlákná a jejich aplikace.....	13
2.1.1	Nanovlákná.....	13
2.1.2	Nanovláknenné nosiče pro vzorkování biomasy.....	14
2.1.3	Nanovláknenné nosiče v biologickém čištění vod.....	16
2.1.4	Sterilizace nanovláken	18
2.2	Molekulárně-genetické metody.....	19
2.2.1	Izolace DNA.....	20
2.2.2	Real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce	21
2.2.3	Sekvenování nové generace	22
2.2.4	Fluorescenční in-situ hybridizace.....	24
3	Experimentální část.....	26
3.1	Vývoj a příprava nanovláknenných nosičů.....	27
3.2	Molekulárně-genetické analýzy.....	29
3.2.1	Transport a zpracování vzorků.....	30
3.2.2	Izolace DNA.....	30
3.2.3	Real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce	32
3.2.4	Next-generation sequencing	36
3.2.5	Fluorescenční in-situ hybridizace.....	42
3.3	Mikroskopická analýza	46
3.3.1	Optická mikroskopie	46
3.3.2	Konfokální mikroskopie	47
3.3.3	Rastrovací elektronová mikroskopie	47
3.3.4	Fluorescenční mikroskopie.....	47
3.4	Schéma experimentů	48
3.4.1	Nanovláknenné nosiče pro vzorkování mikrobiální biomasy.....	48
3.4.2	Nanovláknenné nosiče pro intenzifikaci biologického čištění skládkových vod	51
3.4.3	Vývoj sterilizační metody nanovláknenných nosičů.....	57

4	Výsledky a diskuze.....	67
4.1	Nanovláknenné nosiče pro vzorkování mikrobiální biomasy.....	67
4.1.1	Morfologie a uspořádání nanovláknenných nosičů.....	67
4.1.2	Vliv tvaru nosiče a lineární hustoty nanovláken na kolonizaci mikroorganismů	70
4.1.3	Vývoj složení mikrobiální komunity.....	72
4.1.4	Porovnání složení mikrobiálních komunit mezi různými matricemi.....	78
4.1.5	Testování nosičů na dalších lokalitách	81
4.1.6	Shrnutí.....	86
4.2	Intenzifikace biologického čištění skládkové vody.....	87
4.2.1	Charakterizace nanovláknenných nosičů.....	87
4.2.2	Pilotní testování nanovláknenných nosičů se skládkovou vodou	88
4.2.3	Vliv nanovláknenných nosičů a ozonizace na účinnost a stabilitu nitrifikace při biologickém čištění skládkové vody	90
4.2.4	Shrnutí.....	98
4.3	Vývoj sterilizační metody nanovláknenných nosičů biomasy.....	100
4.3.1	Vliv sterilizačních metod na morfologii nanovláken	100
4.3.2	Účinnost sterilizačních metod.....	104
4.3.3	Shrnutí.....	111
5	Uplatnění výsledků a praktický přínos práce.....	113
6	Závěr.....	115
7	Seznam výsledků z doktorského studia.....	117
7.1	Publikace v impaktovaném časopise.....	117
7.2	Publikace v recenzovaných časopisech	117
7.3	Příspěvky na konferenci	117
8	Literatura.....	119
	Přílohy.....	130
A	Skript pro obrazovou analýzu snímků z FISH analýzy	130
B	Nanovláknenné nosiče pro vzorkování mikrobiální biomasy	133
C	Validace sterilizačního protokolu od společnosti BIOINOVA	134

Seznam zkratek

16S	16 Svedberg
30S	30 Svedberg
A	adenin
AC	střídavý proud („ <i>alternating current</i> “)
AOB	amoniak-oxidující bakterie
bp	pár bází („ <i>base pair</i> “)
BTEX	benzen, toluen, ethylbenzen a xylen
CIE	chlorované etheny
C	cytosin
CCM	Česká sbírka mikroorganismů („ <i>Czech Collection of Microorganisms</i> “)
CMOS	doplňkový polovodič na bázi kovu a oxidu („ <i>complementary metal-oxide semiconductor</i> “)
Ct	prahový cyklus („ <i>cycle threshold</i> “)
ČOV	čistírna odpadních vod
D	Simpsonův index diverzity
DC	stejnoseměrný proud („ <i>direct current</i> “)
DNA	deoxyribonukleová kyselina („ <i>deoxyribonucleic acid</i> “)
dtex	decitex (jednotka lineární hustoty, 1 dtex = 0,1 g · km ⁻¹)
dsDNA	dvouvláknová DNA („ <i>double-strand DNA</i> “)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová („ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> “)
EtOH	ethanol
EUB	eubakterie (celková bakteriální biomasa)
F	forward
FA	formaldehyd
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace
G	guanin
HCH	hexachlorocyklohexan
HSV	barevný modul (barva, sytost, jas; „ <i>hue saturation value</i> “)
ISP	kontrolní částice Ion Sphere („ <i>Ion Sphere Particles</i> “)
CHSK	chemická spotřeba kyslíku
CHSK _{Cr}	chemická spotřeba kyslíku dichromanem
kGy	kilogray
KTJ	kolonie tvořící jednotka
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem („ <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> “)

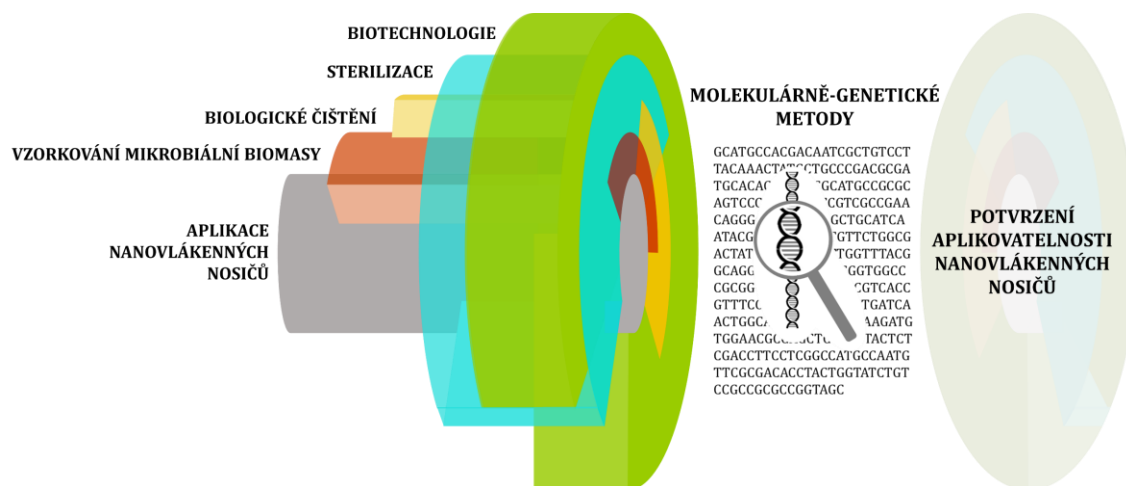
MDS	vícerozměrné škálování („ <i>multidimensional scaling</i> “)
N _{amon.}	amoniakální dusík
NGS	sekvenační metody nové generace („ <i>next-generation sequencing</i> “)
NOB	dusitan-oxidující bakterie
NTC	kontrola bez templátu („ <i>no template control</i> “)
NV	nanovlákná
OD ₄₂₀	optická denzita při vlnové délce 420 nm
ORP	oxidačně redukční potenciál
OTU	operační taxonomická jednotka („ <i>operational taxonomic unit</i> “)
OV	odpadní voda
PBS	fosfátový pufr („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PCA	neselektivní živná půda pro stanovování celkového počtu bakterií („ <i>plate count agar</i> “)
PCoA	analýza hlavních koordinát („ <i>principal coordinate analysis</i> “)
PCR	polymerázová řetězová reakce („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PE	polyethylen
PESh	polyesterové hedvábí
PET	polyethylentereftalát
PFA	paraformaldehyd
pH	hodnota pH
PP	polypropylen
PU	polyuretan
PV	pomocná vlákna
px	pixel
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
R	reverse
RGB	barevný modul (červená zelená modrá; „ <i>red green blue</i> “)
RNA	ribonukleová kyselina („ <i>ribonucleic acid</i> “)
rRNA	ribozomální RNA
SDS	dodecylsírán sodný
SEM	rastrovací elektronový mikroskop („ <i>scanning electron microscope</i> “)
ssDNA	jednovláknová DNA („ <i>single-strand DNA</i> “)
SV	skládková voda
T	thymin
TKO	tuhý komunální odpad
UV	ultrafialové
VOC	těkavé organické látky („ <i>volatile organic compounds</i> “)

1 Úvod

Nanomateriály získaly v posledním desetiletí celosvětovou pozornost díky svým unikátním vlastnostem a jejich potenciálním aplikacím v různých oblastech. Jednou z oblastí, v nichž nacházejí nanomateriály aktuálně významné uplatnění, jsou nejrůznější biotechnologie a biotechnologické systémy. Biotechnologie je multidisciplinární odvětví, jehož komplexnost se stále rozšiřuje v závislosti na vývoji nových technologií a zisku nových poznatků nejen v biologických vědách. Nanomateriály jsou využívány v různých podobách a funkcích v biotechnologických procesech, od produktů biosyntézy přes aplikace s cílem zvýšit účinnost biologických systémů po transport léčiv. Pro kontrolu a hodnocení účinnosti biotechnologických procesů, a s tím i spojené aplikovatelnosti nanomateriálů, jsou (mikro)biologické analýzy podstatným nástrojem. Mezi nejpokročilejší metody analýzy mikroorganismů patří v současnosti molekulárně-genetické metody. Tyto metody umožňují kvantifikaci a identifikaci mikroorganismů na základě jejich genotypu, což znamená, že není nutné provádět časově náročné a někdy obtížné techniky, jako jsou izolace a kultivace mikroorganismů. Kromě toho většina mikroorganismů není vzhledem k jejich specifickým nárokům pro růst kultivovatelná v daných laboratorních podmínkách, tedy ji nelze detekovat kultivačními mikrobiologickými metodami. Molekulárně-genetickými metodami lze pozorovat například nárůst či pokles biodiverzity mikrobiálního konsorcia při tvorbě biofilmu, přítomnost specifických mikrobiálních skupin a jejich reakci na změnu podmínek prostředí nebo stanovení preferenčního růstu určitého taxonu. Takovéto informace o vývoji mikrobiálního konsorcia ve sledovaném prostředí umožní získat představu o funkcích a interakcích mikroorganismů v daném prostředí a mohou posloužit k lepšímu porozumění biotechnologických procesů.

V rámci této práce je konkrétně řešena aplikovatelnost nanovlákných materiálů v environmentální biotechnologii hodnocená zejména prostřednictvím molekulárně-genetických metod. Vzhledem k aktuálnímu velmi širokému spektru environmentálních biotechnologií byly pro účely této práce zvoleny tři různé biotechnologické oblasti, kde byla nanovláknina ve formě nosičů biomasy aplikována. Tyto oblasti byly voleny tak, aby byla demonstrována funkce/přidaná hodnota aplikace nanomateriálů napříč různými aplikačními podmínkami. Konkrétně se jednalo o pasivně-aktivní využití nanovláken pro efektivní vzorkování mikrobiální

biomasy, dále o aktivní využití nanovláken při intenzifikaci a stabilizaci nitrifikačního procesu a pasivní využití nanovláken při vývoji vhodné sterilizační metody reflektující specifické charakteristiky nanovláčkových struktur/nosičů biomasy. Propojení mezi jednotlivými testovanými aplikacemi nanovláčkových nosičů biomasy skrze různá vědní odvětví je zobrazeno na Obr. 1.



Obrázek 1: Diagram propojení vědních odvětví, v nichž byla testována aplikovatelnost nanovláčkových nosičů v rámci této práce

Cíle disertační práce

Primárním cílem této práce bylo vyvinout, optimalizovat a ověřit metodiku hodnocení aplikovatelnosti nanovláken v různých odvětvích biotechnologie prostřednictvím molekulárně-genetických analýz. Jelikož správné vzorkování a manipulace se vzorkem před jeho analýzou je zcela zásadní pro dosažení přesných výsledků, prvním cílem této disertační práce byl vývoj vhodné architektury nanovláčkových nosičů, která splňuje požadavky jak pro vzorkování mikrobiální biomasy, tak pro následnou molekulárně-genetickou analýzu. Dalším cílem této práce bylo pomocí molekulárně-genetických metod ověřit aktivní úlohu nanovláčkových nosičů biomasy při biologickém čištění vod. Konkrétně se jednalo o prokázání pozitivního vlivu nanovláčkových nosičů na stabilizaci a intenzifikaci procesu nitrifikace při čištění skládkové vody. Třetím cílem práce bylo vyvinout efektivní a zároveň šetrnou sterilizační metodu pro zajištění mikrobiologické čistoty povrchu nanovláčkových nosičů a ověřit její účinnost prostřednictvím molekulárně-genetických metod.

2 Teoretická část - současný stav poznání

2.1 Nanovlákná a jejich aplikace

Přestože existence nanomateriálů byla zjištěna prostřednictvím pokročilých mikroskopických technologií, jako byl například řádkovací tunelový mikroskop, již v 80. letech 20. století, výzkum jejich aplikací ve větším měřítku započal až ve 21. století. Nanomateriály získaly celosvětově velkou pozornost téměř v každém vědním odvětví, a to zejména díky svým unikátním fyzikálním a chemickým vlastnostem, které jsou mnohdy výrazně odlišné od makroskopických materiálů. V souvislosti s využíváním nových materiálů je kladen důraz na jejich toxicitu, která v případě nanomateriálů není omezena pouze na chemické složení, ale i na jejich velikost, tvar, modifikaci povrchu, náboj apod. (Bayda et al. 2019; Saleh 2020; Skřehot a Rupová 2011). Existují různé formy nanomateriálů lišící se na základě materiálu (organické, anorganické, kompozitní apod.), velikosti (nanočástice, nanovlákná apod.), vodivosti atd. Pro účely této disertační práce byla polymerní nanovlákná vybrána jako zástupce z tohoto širokého spektra nanomateriálů.

2.1.1 Nanovlákná

Vlákná s průměrem v nanoměřítku neboli nanovlákná se včetně chemického složení mohou lišit na základě jejich poměru povrchu k objemu, pórovitosti, uspořádání vláken, lineární hustoty, povrchové modifikace apod. Diference mezi jednotlivými typy nanovláken vzniká během jejich přípravy, ať volbou techniky přípravy (elektrostatické zvlákňování, chemická depozice z plynné fáze, tažení, tavné foukání či separace fází) anebo úpravou parametrů jedné z metod. Na základě plánované aplikace nanovláken je zvolena technika jejich výroby společně s jejími parametry pro získání vhodné nanostruktury (Havlíček et al. 2020a; Sharma a Sharma 2013; Xue et al. 2019). Nejrozšířenější způsob výroby nanovláken je elektrospinning, během něhož působením silného elektrického pole na polymerní roztok dochází k překonání jeho povrchového napětí a tvorbě vláken. Vlastnosti nanovláknenné vrstvy vyrobené prostřednictvím elektrospinningu jsou ovlivněny parametry zvlákňování (např. použité elektrické pole, vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem, rychlost kolektoru), parametry polymerního roztoku (např. rozpouštědlo, koncentrace polymeru) a parametry prostředí (např. vlhkost,

teplota) (Stojanov a Berlec 2020). V rámci této práce byla použita nanovlákná vyrobená pomocí zvlákňovacích metod využívajících stejnosměrný zdroj napětí, tzv. elektrostatické zvlákňování (DC elektrospinning), a střídavý zdroj napětí (AC elektrospinning). Obě techniky zvlákňování lze použít pro průmyslovou výrobu nanovláken a jsou detailně popsány v jejich příslušných patentech (Jirsak et al. 2009; Kočiš et al. 2013; Valtera et al. 2019). Produkce nanovláken v průmyslovém měřítku společně s variabilitou parametrů při jejich přípravě, a s tím spojenou širokou škálou možných vlastností vyrobeného materiálu, zvyšuje zájem o nanovláknenné materiály v různých průmyslových odvětvích, mezi něž patří i biotechnologie. V procesech s biologickými systémy je vhodné prostředí pro růst (mikro)organismů, jako je například povrch nosiče biomasy, důležitý faktor pro zajištění vysoké účinnosti procesu. Nanovlákná mají díky svým vlastnostem potenciál vytvořit optimální strukturu pro mikrobiální kolonizaci a tvorbu biofilmu.

2.1.2 Nanovláknenné nosiče pro vzorkování biomasy

Správné vzorkování a charakterizace mikrobiální komunity jsou klíčové pro pochopení biotechnologických a přírodních procesů a jsou nezbytné pro řízení sanačních procesů, hodnocení mikrobiálního složení (odpadní) vody a v mnoha dalších aplikacích (The Interstate Technology & Regulatory 2011). Vzhledem k tomu, že odběr vzorků mikrobiální biomasy a mikrobiologická analýza jsou časově náročné, jsou sanační procesy většinou sledovány pouze fyzikálně-chemickými anebo chemickými parametry. Tyto parametry však neposkytují náhled na mikrobiální komunitu přítomnou na kontaminované lokalitě. Kombinace fyzikálně-chemických a chemických parametrů spolu s efektivní metodou vzorkování mikrobiální biomasy s následnou molekulárně-genetickou analýzou může usnadnit kompletní posouzení lokality. Díky těmto znalostem lze zvolit sanační metodu vhodnou pro odstranění kontaminantů přítomných na dané lokalitě, například injektáž syrovátky nebo nulamocného nanoželeza, kombinace různých činidel či sanačních metod. Obecně platí, že postup odběru vzorků nesmí ovlivnit podmínky ve vzorkovaném prostředí a musí být technicky a ekonomicky proveditelný (The Interstate Technology & Regulatory 2011; Hrdlička 2007; Bouchez et al. 2016).

Vzorky půdy anebo podzemní vody mohou být odebrány na kontaminované lokalitě k charakterizaci přítomných mikrobiálních konsorcií. Ačkoli vzorky půdy obvykle poskytují přesnější výsledky, vysoká prostorová heterogenita půdy komplikuje její vzorkování, což vede k jeho nízké reprodukovatelnosti (Aleer et al. 2014; Li 2019). Odběr vzorků půdy je také časově náročný a finančně nákladný, proto jsou v praxi často odebírány pouze vzorky podzemních vod, které jsou následně podrobeny chemickým, mikrobiálním nebo molekulárně-genetickým analýzám (Bruijn 2011). Hlavní nevýhodou kapalných vzorků však je nízká koncentrace přítomné biomasy resultující v nedostatečně vysoký výtěžek biomasy potřebný pro molekulárně-genetickou analýzu (Dolinová et al. 2016). Nízký výtěžek (nízká koncentrace) biomasy vyžaduje filtraci nebo centrifugaci vzorků, což je časově náročné. Zvláště komplikované je to v případě vzorků obsahujících vyšší koncentrace nerozpuštěných látek, které filtraci značně zpomalují. Navíc takováto předúprava může vést ke kontaminaci vzorku biomasy a prodlužuje dobu mezi odběrem vzorku a jeho analýzou.

Výše uvedená omezení lze překonat odběrem biomasy ve formě biofilmu, který je přítomen na povrchu vhodných nosičů biomasy. V biologických reaktorech byly doposud použity různé nosiče biomasy, avšak pro zvýšení účinnosti procesů čištění odpadních vod nebo bioremediace, nikoliv však pro odběr vzorků biomasy (Chaali et al. 2018; Dvořák et al. 2014; Jurecska et al. 2013; Song et al. 2019; Zhang et al. 2019; Havlíček et al. 2020b). Nosiče biomasy by měly mít hydrofobní porézní povrch s drsností v mikro- a nanoměřítku, protože tyto povrchové charakteristiky umožňují rychlé uchycení mikroorganismů a jejich růst (Cortés et al. 2011). Materiál nosiče biomasy musí být nerozpustný a netoxický pro imobilizovanou biomasu a životní prostředí, dále musí být také chemicky a fyzikálně stabilní a cenově dostupný (Dzionek et al. 2016; Buaisha et al. 2020; Jaroo et al. 2019). Některé materiály prokázaly slibné výsledky jako nosiče biomasy v environmentálních aplikacích. Například polyuretanová pěna byla široce používána jako inertní nosný materiál ke zvýšení účinnosti odstraňování kontaminantů při čištění odpadních vod a bioremediačních procesech. Tento materiál má nízkou sorpční kapacitu hydrofobních sloučenin a je finančně velmi dostupný (Alessandrello et al. 2017; Sandip a Kalyanraman 2019; Sonwani et al. 2019). Morfologie zmíněné polyuretanové pěny a nosičů biomasy běžně využívaných v biofilmových

reaktorech, jako jsou například AnoxKaldnes nosiče, však neumožňuje získat adekvátní množství biomasy přichycené k povrchu nosiče. Tato skutečnost negativně ovlivňuje předúpravu vzorku před izolací DNA, což je stěžejní krok předcházející molekulárně-genetické analýze. Krok předúpravy vzorku lze přeskočit použitím jednorázových nosičů vyrobených z vhodného a flexibilního materiálu, jehož morfologie umožňuje jejich umístění do zkumavky pro extrakci DNA. Přímé vložení vzorku do tzv. lyzační zkumavky umožňuje činně používaným pro izolaci DNA přímý kontakt s biofilmem a následnou lyzi adherentních buněk, čímž se zvyšuje výtěžek biomasy. Navíc je minimalizována možná kontaminace vzorku. Potencionálními kandidáty splňující požadavky jak pro molekulárně-genetickou analýzu, tak pro vzorkování mikrobiální biomasy ve formě biofilmu, jsou textilní nosiče a nosiče na bázi vláken. Přestože mají textilní nosiče, nosiče na bázi vláken nebo nanovláken potenciál pro vzorkování mikroflóry, jen málo studií je použilo pro odběr vzorků biomasy. Tyto nosiče se typicky používají v různých biologických aplikacích, například pro stabilizaci a intenzifikaci procesů výroby bioplynu nebo čištění (odpadních) vod, zejména odstraňování dusíku (An et al. 2018; Liu et al. 2017; Havlíček et al. 2020b).

Přestože byla prokázána aplikovatelnost vláknenných nosičů, lze takové nosiče dále zlepšovat, například použitím nanovláken. Ukázalo se, že nanovláknata urychlují proces kolonizace díky svému velkému specifickému povrchu a vzájemnému propojení jednotlivých nanovláken s mnoha volnými prostory pro uchycení mikroorganismů (Svobodová et al. 2019a; Havlíček et al. 2020b). Nanovláknata jsou proto perspektivními materiály pro přípravu nosičů. Další výhodou nanovláknenných materiálů je jejich povrchová drsnost v mikro- a nanoměřítku, což podporuje adhezi mikroorganismů a urychluje jejich imobilizaci na povrchu nosiče. To umožňuje rychlou kolonizaci povrchu nosiče, zejména v rané fázi tvorby biofilmu (Achinas et al. 2019).

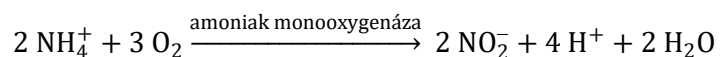
2.1.3 Nanovláknenné nosiče v biologickém čištění vod

Potenciál nanovláken jako nosičů biomasy byl dále studován v odvětví zabývajícím se biologickým čištěním odpadních vod, konkrétně při intenzifikaci procesů eliminace anorganických forem dusíku (Havlíček et al. 2021; 2020a). V rámci této disertační práce byla testována aplikovatelnost nanovláknenných nosičů

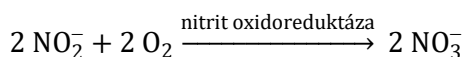
v biologických systémech čištění skládkové vody, konkrétně pro odstraňování amoniakálního dusíku.

Ekonomický rozvoj, populační růst a bohatý životní styl na celém světě doprovází rostoucí produkce tuhého komunálního odpadu (TKO). Široce používanou technologií pro likvidaci TKO je skládkování, které je oproti dalším způsobům (například spalování odpadu a vysokoteplotnímu kompostování) nákladově a energeticky výhodnější (Luo et al. 2020). Nedílnou součástí provozu každé skládky je nakládání s jejich průsakovými vodami. Výluh ze skládky je definován jako kapalina prosakující skládkou, která vzniká z odpadu a dešťové vody prosakující odpadem. V zabezpečené skládce je těleso skládky zajištěno proti průsakům výluhů do podzemní vody. Složení výluhu se mění prostorově a časově, protože závisí na několika faktorech; složení odpadu (biologická rozložitelnost, rozpustnost, toxicita), stáří skládky, fázi rozkladu, klimatických podmínkách a hydrogeologii skládky (Brennan et al. 2016; Jayawardhana et al. 2016; Miao et al. 2019; Zheng et al. 2019). Nejběžnějším přístupem k nakládání s výluhy je jejich odvoz na čistírnu odpadních vod (ČOV), kde jsou čištěny společně s přítékajícími odpadními vodami, nebo jejich čištění v samostatné ČOV přímo na skládce (Junga et al. 2015). Ačkoliv je složení skládkových vod z jednotlivých skládek velmi různorodé, existuje řada společných komponent přítomných ve vysokých koncentracích. Jedná se především o organický uhlík a amoniakální dusík ($N_{amon.}$). Amoniak se ve vodě vyskytuje v nedisociované formě (NH_3) a ve formě amonného iontu (NH_4^+), jejichž poměr je závislý na hodnotě pH prostředí. Jedním z efektivních a ekonomických způsobů odstraňování $N_{amon.}$ ze skládkových a odpadních vod je proces biologické nitrifikace. Nitrifikace probíhá ve dvou stupních:

1) Nitritace:



2) Nitratace:



Na rozdíl od komunálních odpadních vod, skládkové vody navíc obsahují velké množství nejrůznějších obtížně biologicky rozložitelných látek, které mohou proces nitrifikace negativně ovlivnit. Jejich rozložitelnost je možné zvýšit použitím pokročilých oxidačních procesů, například aplikací ozonu (Wu et al. 2004; Renou et

al. 2008). Intenzifikace čistírenských biologických procesů lze dosáhnout také prostřednictvím biofilmových reaktorů, kde je biomasa imobilizována ve formě biofilmu na vhodném nosiči. Na rozdíl od konvenčních aktivačních systémů je u biofilmových reaktorů menší pravděpodobnost úniku aktivní biomasy ze systému a nitrifikace může být provozována při mnohem vyšších koncentracích dusíku (Renou et al. 2008; Jurecska et al. 2013). Podstatným faktorem pro dosažení vysoké výkonnosti biofilmových reaktorů je správná volba vhodného typu nosiče biomasy, jehož materiál, tvar a povrchové vlastnosti podporují adhezenci mikroorganismů a následnou tvorbu biofilmu. Optimální materiál pro nosiče biomasy představují nanovlákná, která díky svým unikátním vlastnostem umožňují snadnou kolonizaci mikroorganismy a tvorbu biofilmu (Nechanická et al. 2018).

2.1.4 Sterilizace nanovláken

Navzdory výše uvedeným aplikacím, u nichž sterilita nanovláken není stěžejní faktor, je absence veškerých mikroorganismů jedním z hlavních požadavků na nanomateriály pro aplikace citlivé na mikrobiální kontaminaci například v potravinářství či zdravotnictví. Sterilizační procesy lze definovat jako operace, jejichž cílem je destrukce, trvalá inaktivace nebo fyzické odstranění všech přítomných mikroorganismů, tedy nejen bakterií, ale i všech biologických činitelů. K tomuto lze využít řadu metod, od nichž je včetně eliminace mikroorganismů vyžadováno co možná největší zachování integrity materiálu podstupujícího sterilizaci (Armenante a Akiti 2019; Tessarolo a Nollo 2008). Sterilizační proces je založen na fyzikálním či chemickém činiteli nebo na jejich kombinaci, jejichž účinkem dochází k poškození buněčné membrány anebo k denaturaci biomolekul (proteinů, DNA, RNA apod.). Mezi běžně využívané sterilizační činitele ve zdravotnictví či potravinářství patří suché a vlhké teplo, záření (mikrovlnné, ultrafialové (UV), gama), ultrazvuk, ozonizace, ethylenoxid a peroxid vodíku. Při volbě vhodné sterilizační metody polymerního materiálu, a to především v případě nanovláken, musí být zohledněny faktory jako jsou chemická a teplotní stabilita polymeru, přítomnost toxických reziduí z použité chemikálie, změna barvy materiálu, dostupnost metody a časová a ekonomická náročnost sterilizačního procesu (Tessarolo a Nollo 2008; Tipnis a Burgess 2018; Chiozzi et al. 2022). V případě polyuretanu, na jehož bázi byla vyrobena nanovlákná použitá v této práci,

musí být při vývoji sterilizační metody zohledněna například změna jeho mechanických vlastností při teplotách vyšších než 90 °C (Liu et al. 2019).

Většina studií zabývajících se sterilizací nanovláken byla z oblasti tkáňového inženýrství, kde byla nanovláknata vystavena vlhkému teplu, UV záření, plazmě, ozonizaci, kyselině peroctové, ethanolu, ethylenoxidu a jejich kombinacím. Přestože sterilita nanovláken byla potvrzena u většiny testovaných metod, byly po jejich aplikaci pozorovány zároveň negativní změny v morfologii nanovláken (průměr vláken, stupeň krystalinity, roztavení vláken apod.), ve fyzikálních (pevnost v tahu) a chemických (hydrofilita) vlastnostech nanovláken (Ghobeira et al. 2017; Tort et al. 2020; Redigueri et al. 2016).

2.2 Molekulárně-genetické metody

Podstatnou součástí hodnocení jak aplikovatelnosti nanovláknenných nosičů pro výše zmíněné biotechnologické procesy, tak účinnosti sterilizační metody je kvantifikace a identifikace mikroorganismů. Existuje široká škála metod založených na různých principech mikrobiální identifikace, která se s neustálým vývojem rozšiřuje – od kultivačních metod v/na univerzálních živných či specifických chromogenních médiích přes mikroskopii a spektrometrii po analýzu nukleových kyselin, tj. DNA nebo RNA (Franco-Duarte et al. 2019; Singhal et al. 2015). Z ekonomického hlediska jsou nejvýhodnější metody kultivační, u nichž není nutné žádné nákladné vybavení, ale jsou časově náročné a omezené pouze pro kultivovatelné mikroorganismy (Tortora et al. 2021). Mikroskopie rozliší mikroorganismy dle jejich morfologie, pohybu či fluorescence buněk a v kombinaci s barvivou stanoví například, zda bakteriální buňky patří mezi gramnegativní či grampozitivní nebo zda jsou živé či mrtvé (Madigan 2012; Mohamad et al. 2014; Douterelo et al. 2014). Spektrometrické metody v kombinaci s kapalinovou či plynovou chromatografií jsou používány pro identifikaci metabolitů, proteinů či dalších biomolekul. Tyto metody jsou dobrými nástroji pro charakterizaci mikroorganismu, ale pro identifikaci nejsou dostatečné, pouze v kombinaci s dalšími analýzami. Jednou z moderních spektrometrických metod, kterou lze použít pro přesnou identifikaci mikroorganismů, je tzv. MALDI-TOF MS, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpční a ionizační za účasti matrice s průletovým analyzátozem. Prostřednictvím MALDI-TOF MS lze rozlišit mikroorganismy

na rodové i druhové úrovni, pokud jsou jejich hmotnostní spektra již v databázi. Nevýhody této metody jsou kromě vysoké pořizovací ceny instrumentálního vybavení také vysoké minimální požadované množství buněk (10^4) pro dostatečnou kvalitu spektra nezbytného k identifikaci. Další nevýhodou této metody je omezení pro identifikaci směsi kultur, maximálně lze identifikovat 5 kultur ve směsi (Singhal et al. 2015; Topić Popović et al. 2021).

Pro přesnou identifikaci a detekci mikroorganismů v konsorciu lze použít metody založené na analýze DNA a RNA, tzv. molekulárně-genetické metody. Tyto metody jsou limitovány nízkými výtěžky DNA a zejména v případě environmentálních vzorků také potenciálním výskytem inhibičních kontaminantů (Singh et al. 2006). V rámci této práce byly mikrobiální vzorky analyzovány zejména prostřednictvím real-time kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) a sekvenování nové generace (NGS), které jsou popisovány v dalších částech práce. V případě potřeby byly některé vzorky také analyzovány prostřednictvím kultivačních metod a/nebo fluorescenční in-situ hybridizace (FISH).

2.2.1 Izolace DNA

Přesnost molekulárně-genetických analýz mikrobiální biomasy je závislá na účinnosti extrakce DNA z analyzovaného vzorku a na kvalitě izolované DNA, tj. absenci organických kontaminantů (proteinů, fenolů apod.) interferujících s následnými analýzami DNA. Komplexnost environmentálních vzorků má velký vliv na výtěžek a kvalitu izolované DNA a je hlavním faktorem při volbě procedury extrakce DNA. Protokoly izolace DNA se skládají ze dvou hlavních kroků, lyze buněk a purifikace DNA. Rozbití buněčné membrány lze provádět chemicky (dodecylsírán sodný (SDS)), enzymaticky (lysozym, proteináza K) anebo fyzikálně (tepelný šok, ultrazvuk, kuličky). Během purifikace dochází k odstranění všech buněčných komponent kromě DNA (částí buněčné stěny, proteinů, lipidů, polysacharidů, RNA) a dalších přítomných nečistot (huminových látek) ze vzorku. K tomu je nutné oddělit DNA od dalších komponent, což se provádí například prostřednictvím separace fází (fenol-chloroformová extrakce) nebo navázáním DNA na silikátový substrát. Vzhledem k toxicitě a inhibičním účinkům fenolu a chloroformu, jejichž použitím se zvýšily bezpečnostní požadavky pro ochranu uživatele a prodloužil se protokol za účelem jejich odstranění z extrahované DNA, se v komerčních soupravách pro

izolaci DNA využívá silikátový substrát místo organických rozpouštědel. Existuje široké spektrum procedur pro extrakci DNA z environmentálních vzorků. U některých nekomerčních metod byl prokázán vyšší výtěžek DNA a menší náklady v porovnání s komerčními kity. Tyto metody jsou ale časově náročnější a mají nižší kvalitu extrahované DNA z důvodu použití organických rozpouštědel (fenol, chloroform) na rozdíl od komerčních kitů (Dairawan a Shetty 2020; Kuhn et al. 2017; Lear et al. 2010). Kvalita izolované DNA je dána přítomností PCR inhibičních látek, které interferují s molekulou DNA či s funkcí DNA polymerázy během PCR reakce. Mezi PCR inhibitory patří extracelulární polymery (zejména proteiny a polysacharidy), organická rozpouštědla a huminové látky. Environmentální vzorky mohou obsahovat velké množství huminových látek, jejichž odstranění je důležité pro další molekulárně-genetické analýzy. Huminové látky mají vysokou molekulární hmotnost a jsou tvořeny heterocyklickými aromatickými sloučeninami, což způsobuje, že většina purifikačních metod nerozliší mezi těmito látkami a DNA. Z toho důvodu je do protokolu izolace DNA přidán krok pro precipitaci huminových látek pomocí například polyvinylpyrrolidonu, který vytvoří komplex s těmito látkami (Kuhn et al. 2017; Selden a Tan 2020; Wnuk et al. 2020; Bakken a Frostegård 2006).

2.2.2 Real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je v podstatě replikace DNA *in vitro*, během níž lze rychle amplifikovat specifické segmenty DNA přítomné ve vzorku na množství dostatečné pro následnou analýzu. PCR je proces skládající se z cyklicky opakujících se kroků amplifikace DNA, které lze shrnout následovně:

- denaturace templátové DNA na jednotlivé řetězce při $\sim 94\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- hybridizace dvou uměle syntetizovaných oligonukleotidových primerů, které jsou komplementární ke koncům cílové sekvence DNA, při $\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- navázání DNA polymerázy na dvouřetězcový úsek (templátová DNA + primer) a syntéza nového řetězce DNA komplementárního k řetězci templátové DNA, tzv. elongace primeru, při $\sim 72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na konci každého cyklu je ve vzorku dvojnásobek kopií cílové DNA přítomného na začátku cyklu (Madigan 2012; Tortora et al. 2021). Přidáním fluorescenčního elementu, fluorescenční sondy navázané na primer nebo

interkalačního fluorescenčního barviva, do PCR lze kvantifikovat produkt každého cyklu. Modifikovaná metoda PCR zaměřená na kvantifikaci se nazývá real-time kvantitativní PCR (qPCR) a probíhá na přístroji, jehož součástí je včetně termocykleru zařízení pro detekci fluorescenčního signálu. Pomocí real-time qPCR lze detekovat i jednu kopii specifického genu přítomnou ve vzorku. Real-time qPCR analýza se u monitoringu mikroflóry v environmentálních vzorcích používá například pro detekci a kvantifikaci specifického mikroorganismu, mikrobiální skupiny (druhu/rodu/čeledě/řádu) či genu, jehož exprese vede k syntéze sledovaného enzymu. Pro detekci archeální či bakteriální skupiny je běžně používána amplifikace genu kódujícího ribozomální RNA (rRNA), konkrétně malou subjednotku (16S) rRNA, obsahující úsek specifický pro cílovou skupinu (Madigan 2012; Scragg 2004). V rámci této práce bylo jako fluorescenční element použito interkalační fluorescenční barvivo typu SYBR Green. Funkce tohoto barviva je založena na jeho interkalaci mezi řetězce dvouvláknové DNA a následnému vytvoření komplexu, který po fotoexcitaci emituje mnohem silnější fluorescenční signál než nenavázané barvivo (Jalali et al. 2017).

2.2.3 Sekvenování nové generace

Sekvenování neboli stanovení pořadí nukleotidů v nukleových kyselinách (DNA a RNA) je klíčovým nástrojem pro molekulární biologii. Sekvenování nové generace (NGS) souhrnně popisuje sekvenační přístupy, které snížily čas a náklady a výrazně zvýšily výstup sekvence ve srovnání se Sangerovým sekvenováním (první generací sekvenování). Sangerovo sekvenování je schopno vytvořit sekvenci pouze pro jeden templát na reakci, zatímco během NGS probíhají miliony jednotlivých sekvenačních reakcí současně v procesu označovaném jako masivně paralelní sekvenování. NGS lze kategorizovat na základě délky čtení: technologie pro krátké čtení neboli technologie „druhé generace“ a technologie s dlouhým čtením, neboli technologie „třetí generace“. V porovnání s novějšími technologiemi třetí generace jsou technologie sekvenování krátkého čtení omezeny délkou sekvencí (250 – 800 bp) a tím i složitější přípravou před samotnou sekvenací, konkrétně přípravou sekvenační knihovny. Technologie třetí generace umožňují mnohem delší délky čtení DNA (více než 10 000 bp), ale jsou limitovány nízkou přesností čtení, která se postupem času neustále zlepšuje, zejména s pokroky v analýze softwaru.

Nejrozšířenějšími technologiemi druhé generace jsou Illumina a Ion Torrent, zatímco sekvenování dlouhého čtení jsou reprezentovány zejména technologiemi Pacific Biosciences a Oxford Nanopore (Hu et al. 2021; Kumar et al. 2019). V rámci této práce byla použita technologie druhé generace, konkrétně Ion Torrent. U této technologie je proces sekvenace založen na detekci změny hodnoty pH vyvolanou uvolněním vodíkového iontu při inkorporaci nukleotidu pomocí polovodičového čipu.

Nejběžnějším sekvenačním přístupem k analýze mikrobioty je analýza amplikonů 1600bp genu 16S rRNA, jenž obsahuje vysoce konzervované úseky z evolučního hlediska, které se střídají s velmi variabilními úseky (V1-V9). Protože je u technologií druhé generace omezena délka čtení sekvence, sekvenuje se kratší oblast 16S rRNA genu, konkrétně jeden z variabilních úseků (V1-V9). Z nejběžněji používaných variabilních úseků, V3, V4 a V6, vykazoval V4 region 16S rRNA nejvyšší pokrytí v doméně Bacteria a dobré rozlišení i na úrovni rodu. Cílový úsek 16S rRNA, například V4 region, je amplifikován prostřednictvím PCR a primerů komplementárních ke koncům cílové sekvence DNA tvořenými konzervovanými úseky (Murray et al. 2015; Bukin et al. 2019; Zhang et al. 2018). V případě technologie Ion Torrent jsou na amplikon, tj. produkt PCR reakce, následně navázány oligonukleotidové adaptéry specifické pro Ion Torrent platformu (A a P1) společně se specifickým krátkým úsekem oligonukleotidů, tzv. barkódem, pro rozlišení mezi vzorky. Dalším krokem přípravy sekvenační knihovny je purifikace amplikonů neboli odstranění všech oligonukleotidů (původní genomové DNA (> 100 kbp), sekvenačních primerů (20-30 bp) a jejich dimerů (30-60 bp)) kromě amplikonů (200-400 bp). Selekcí oligonukleotidů podle velikosti lze provést pomocí přístupů založených na magnetických částicích (Beckman Coulter's SPRIselect, Agencourt AMPure XP) nebo elektroforetickými metodami (Sage Sciences' Pippin Prep). Purifikace amplikonů se v současnosti nejběžněji provádí pomocí magnetických částic (Forth a Höper 2019; Hu et al. 2021). Směs vzorků obsahujících přečištěné amplikony a zředěných na stejnou koncentraci se nazývá sekvenační knihovna. Další fází protokolu sekvenace je emulzní PCR. Základním principem emulzní PCR je ředění a kompartmentalizace templátových molekul, tj. amplikonů, v kapičkách vody v emulzi voda v oleji. V případě technologie Ion Torrent jsou k templátu kromě komponent pro PCR (polymeráza, nukleotidy apod.) přidány

částice ISP („*Ion Sphere Particles*“), které jsou pokryté oligonukleotidovými sekvencemi komplementárními k adaptérům navázaným na amplikony, a biotin. V ideálním případě je při emulzní PCR ředění do stupně, kdy každá kapka obsahuje jednu templátovou molekulu a jednu částici ISP a funguje jako mikro-PCR reaktor. Během prvního cyklu PCR se templát přes jeden z adaptérů naváže na částici ISP a na konci emulzní PCR jsou na ISP částici tisíce kopií původní jednovláčkové DNA molekuly templátu (Kanagal-Shamanna 2016; Hardenbol et al. 2020).

Po emulzní PCR jsou ISP částice neobsahující templát odstraněny procesem zvaným enrichment založeným na magnetických kuličkách. Na povrchu magnetických kuliček je streptavidin, na který se naváže biotin inkorporovaný v druhém adaptéru amplikonu. Pouze templát-positivní ISP částice jsou navázány na magnetické kuličky. Po enrichmentu jsou v 1-cyklové PCR navázány sekvenační primery na jednovláčkové DNA molekuly templátu na ISP částicích. Nakonec je k ISP částicím přidána DNA polymeráza a výsledný roztok je napipetován do čipu. V ideálním případě je jedna ISP částice v jedné jamce čipu (Rothberg et al. 2011; Mardis 2013). Ion čip s ISP částicemi je poté vložen do systému pro sekvenaci Ion Torrent. Sekvenování probíhá cyklickým prouděním jednotlivých nemodifikovaných nukleotidů A, T, C a G přes templáty DNA v jamkách čipu. Když je nukleotid v toku komplementární k templátové bázi a je začleněn do syntetizovaného vlákna DNA, uvolní se vodíkový iont, který způsobí změnu v hodnotě pH úměrnou počtu nukleotidů začleněných během toku. Posun hodnoty pH je detekován polovodičovým (CMOS) pH senzorem na dně každé jamky a je převeden na napěťový signál. Ion Torrent byla první sekvenační technologie, která provádí sekvenování bez optického snímání (Kohn et al. 2013; Hu et al. 2021).

2.2.4 Fluorescenční in-situ hybridizace

Fluorescenční in-situ hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje současnou vizualizaci, identifikaci, kvantifikaci a lokalizaci cílových mikrobiálních organismů, jako jsou bakterie, archea, kvasinky a prvoci. U FISH metody není na rozdíl od výše zmíněných molekulárně-genetických metod nutná extrakce DNA, tedy nedochází k poškození morfologie cílových buněk, a její hodnocení probíhá prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu. Limit detekce je u metody FISH $10^3 - 10^4$ buněk, zatímco pomocí real-time qPCR analýzy lze detekovat i jednu

mikrobiální buňku. Metodou FISH lze detekovat bakterie až na úrovni druhu nebo bakteriální skupinu na základě společné metabolické vlastnosti (např. amoniak-oxidující bakterie (AOB)). Princip FISH metody je založen na hybridizaci fluorescenční oligonukleotidové sondy na komplementární cílový úsek nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) v buňce. Fluorescenční komponenta sondy je fluorochrom (Wannher et al. 2019; Prudent a Raoult 2019; Frickmann et al. 2017). Postup metody FISH pro mikrobiální vzorky zahrnuje následující kroky (Nielsen et al. 2009; Amann a Fuchs 2008):

- odběr vzorku,
- fixaci mikroorganismů chemicky (paraformaldehyd) pro zachování struktury buněk,
- imobilizaci vzorku na podložní sklíčko,
- dehydrataci buněk pro zvýšení rozlišení pod mikroskopem,
- permeabilizaci buněk enzymaticky (lysozym, proteináza K apod.) či chemicky (detergenty, kyselina chlorovodíková) pro umožnění přístupu fluorescenční sondy do buněk,
- hybridizaci fluorescenčních sond na jejich cílový úsek DNA či RNA za podmínek specifických pro jednotlivé sondy,
- promytí vzorku pro odstranění nenavázaných sond,
- vizualizaci cílových mikroorganismů pod fluorescenčním mikroskopem.

3 Experimentální část

Přehled dílčích kroků potřebných pro dosažení cílů disertační práce je chronologicky zobrazen pomocí PERT diagramu na Obr. 2. Ten znázorňuje také vzájemné propojení oblastí nanomateriálů, biotechnologie a molekulárně-genetických metod, kterého bylo dosaženo v rámci této práce.



Obrázek 2: PERT diagram klíčových činností realizovaných v rámci této disertační práce

3.1 Vývoj a příprava nanovláknenných nosičů

V rámci této práce byly vyvinuty, testovány a optimalizovány nosiče biomasy s nanovláknennou vrstvou na bázi polyuretanu (PU). Pro výrobu nanovláken byl zvolen polyuretan, jelikož tento materiál v předchozích experimentech vykázal díky svým hydrofobním vlastnostem velmi dobrou kolonizovatelnost, biokompatibilitu i vysokou mechanickou odolnost (Křiklavová a Lederer 2010). Zatímco pro vzorkování mikrobiální biomasy byla připravena různá uspořádání nosné nitě s nanovláknennou vrstvou, pro intenzifikaci biologického čištění byly nosné nitě s nanovláknem uchyceny na nerezovou podpůrnou konstrukci. Příprava jednotlivých typů nanovláknenných nosičů, které se lišily nejen uspořádáním nosné nitě s nanovláknennou vrstvou, ale i technologií výroby nanovláken, je stručně popsána v následujících odstavcích. Primární zvláknovací metoda použitá pro výrobu nanovláken na bázi PU v rámci této práce byla technologie stejnosměrného zvláknování (DC elektrospinning; Jirsak et al. 2009), zatímco sekundární byla technologie střídavého elektrického zvláknování (AC elektrospinning; Valtera et al. 2019).

V případě technologie DC elektrospinning byly nanovláknenné nosiče připraveny z PU nanovláken (Larithane 1083; Novotex, Italy) a nosné nitě z polyesterového hedvábí (PES, SLOTERA, 167f 25x1x1; 501 dtex¹). Nanovláknena byla vyrobena prostřednictvím bezjehlového elektrospinningu z povrchu kapaliny a vysokonapětového zdroje (65 kV) (Jirsak et al. 2009). Lineární hustota nanovláknenných vrstev byla upravena změnou produkční rychlosti (tj. rychlosti kolektoru), což vedlo k lineárním hustotám 3 dtex a 10 dtex. Nosná niť sloužící jako kolektor byla pokryta PU nanovláknem přímo během procesu elektrostatického zvláknování. Vrstva nanovláken na nosném vláknu byla následně chráněna dvěma zkříženými monofilními vlákny z polyamidu 6 (jemnost 11 dtex) v tangenciálním směru pro zvýšení mechanické stability vrstvy PU nanovláken.

V případě sekundární zvláknovací technologie byly nanovláknenné nosiče vyrobeny z nanovláken na bázi PU (Larithane 1083; Novotex, Italy) a 3% pre-impregnované nosné příze z polyesterového hedvábí (PESh; SLOTERA) o jemnosti 1200 dtex. K výrobě PU nanovláken o lineární hustotě 2x230 dtex byla

¹ decitex (jednotka lineární hustoty, 1 dtex = 0,1 g · km⁻¹)

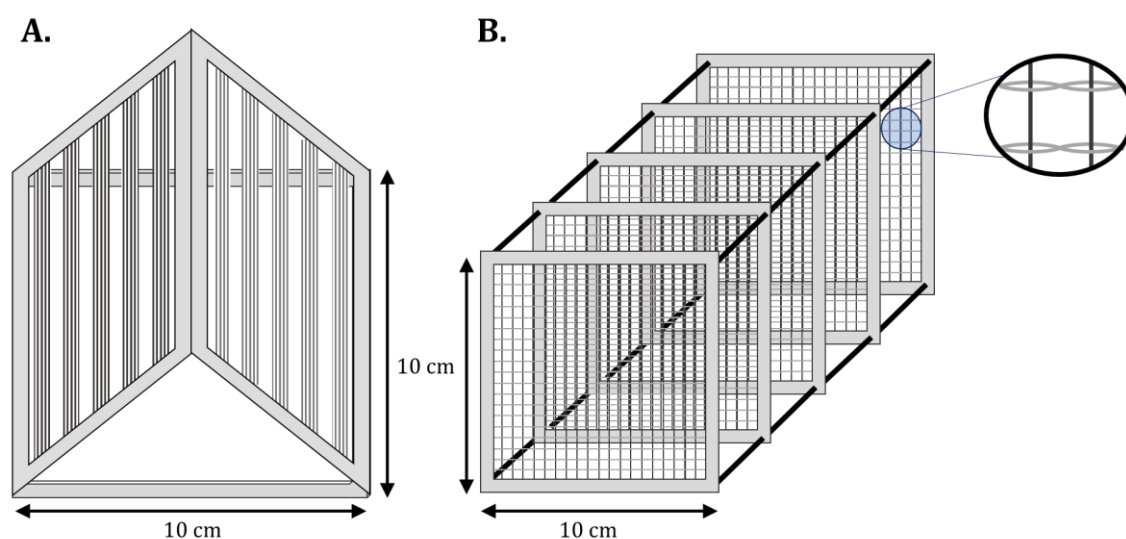
použita technologie střídavého elektrického zvlákňování (tzv. AC elektrospinning) využívající zdroj střídavého vysokého napětí s frekvencí 50 Hz (Valtera et al. 2019; Kočiš et al. 2013; Pokorný et al. 2014).

Pro vývoj nanovláknenného nosiče vhodného ke vzorkování mikrobiální biomasy byla niť s nanovláknny vyrobenými DC elektrospinningem uspořádána do čtyř různých prostorových tvarů, které tvořily tzv. planární a lineární nosič, střápec a cirkulární nosič biomasy. Na každý nosič biomasy byly použity vždy 3 m nosné nitě s daným nánosem nanovláken. Specifikace připravených a testovaných nosičů biomasy jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1: Specifikace nanovláknenných nosičů (dimenze technických schémat v mm).

Tvar	Komponenty	Technické schéma
Planární	nosná niť + nanovláknna + tavné lepidlo + vlasec	
Lineární	nosná niť + nanovláknna	
Střápec	nosná niť + nanovláknna + plastová stahovací páska	
Cirkulární	nosná niť + nanovláknna	

Experimenty s nanovláknennými nosiči pro intenzifikaci biologického čištění skládkové vody probíhaly ve dvou etapách. V první etapě byla použita nanovláknna na bázi PU vyrobená DC elektrospinningem (10 dtex) a AC elektrospinningem (2x230 dtex). Nosné nitě s nanovláknennou vrstvou byly uchyceny na nerezovou podpůrnou konstrukci o velikosti 10 x 10 cm (Obr. 3A) paralelně ve svazcích o 10 vláknlech vzdálených od sebe 1 cm. Na základě výsledků z první etapy byl pro druhou etapu zvolen typ nanovláken, který vykazoval vyšší abundanci nitrifikačních bakterií v biofilmu, konkrétně se jednalo o PU nanovláknna vyrobená AC elektrospinningem (2x230 dtex). Následně byla připravena textilní mřížka tvořená nosnou nití s nánosem nanovláken a nití bez nanovláken. Mřížka byla připevněna na nerezovou podpůrnou konstrukci o velikosti 10 x 10 cm. Pět kusů mřížky (Obr. 3B) bylo umístěno do jednoho laboratorního bioreaktoru, což představuje 9 m nosné nitě s nánosem nanovláken a 18 m nosné nitě bez nanovláken.



Obrázek 3: Schéma nosičů biomasy skládající se z dvou typů nanovláknenné vrstvy (A.) nebo textilní mřížky (B.) pro intenzifikaci biologického čištění skládkové vody

3.2 Molekulárně-genetické analýzy

Monitoring mikrobiální biomasy prostřednictvím molekulárně-genetických analýz se skládal z následujících kroků: odběr, transport a zpracování vzorků, izolace DNA ze vzorku, kvantifikace celkové bakteriální biomasy, specifických funkčních genů a mikrobiálních konsorcií pomocí real-time qPCR a stanovení bakteriálního složení prostřednictvím sekvenace nové generace (NGS).

V následujících kapitolách je popsána metodika jednotlivých analýz používaných v rámci této práce.

3.2.1 Transport a zpracování vzorků

Odebrané vzorky z lokality uskladněné ve sterilním obalu (sterilním polyethylenovém (PE) sáčku, sterilní skleněné laboratorní láhvi či sterilní 50ml zkumavce) byly převezeny v chladícím boxu do laboratoře, kde byly hned po příjezdu zpracovány nebo byly uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby izolace DNA.

Předúprava vzorků pro izolaci DNA je esenciální část protokolu molekulárně-genetických analýz preparátu. Jedná se buď o zakoncentrování biomasy, nebo o odstranění či redukci látek interferujících s izolací DNA. Pro účely této disertační práce byly vzorky podzemní či povrchové vody zfiltrány přes membránový filtr Durapore PVDF s průměrem pórů $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Merck Millipore, Německo). Biomasa ze vzorků suspenze obsahující aktivovaný kal či skládkové vody byla zakoncentrována centrifugací při rychlosti $16\ 000 \times g$ po dobu 10 min při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Filtry a peletky se zachycenou biomasou byly uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby izolace DNA. V případě nosičů biomasy byly těsně před izolací DNA odstraněny všechny komponenty nosiče kromě nosné nitě s nanovláknky (tj. vlasec, lepidlo), pokud byly přítomny. U půdních preparátů nebyla nutná předúprava, pouze po jejich homogenizaci bylo odebráno a naváženo max. 500 mg vzorku do lyzační zkumavky izolačního kitu.

3.2.2 Izolace DNA

Pro extrakci DNA z různých matric vzorků (nosiče biomasy, suspenze, půda) byl použit FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA) nebo NucleoSpin Soil kit (Macherey-Nagel, Německo) dle protokolu výrobce. Zatímco FastDNA Spin Kit for Soil byl zvolen díky vysoké výtěžnosti DNA ze vzorků zaznamenané v předchozích experimentech, NucleoSpin Soil kit je určen pro vysoce inhibované vzorky jako jsou například odpadní či skládkové vody. Oba kity jsou založeny na kombinaci mechanické a chemické lyze a probíhá u nich purifikace DNA pomocí adsorpce nukleové kyseliny na silikátový substrát. Navázaná DNA je následně promyta pomocí alkoholu a nakonec je DNA uvolněna ze substrátu přidáním pufru o nízké iontové síle (eluce) a rozpuštěna.

Jako přístrojové vybavení byl u obou kitů použit Bead Blaster 24 homogenizér (Benchmark Scientific, USA) a centrifuga Smart R17 (Hamil). U kitu FastDNA SPIN Kit for Soil byla navíc použita třepačka Mini Biomixer 3D (Benchmark Scientific, USA) a inkubátor Genius Dry Bath (Major Science). Protokoly jednotlivých kitů jsou uvedeny v Tab. 2-3. Extrahovaná DNA byla uchovávána při teplotě 4 °C, dokud nebyly provedeny všechny plánované analýzy, kterými byly měření koncentrace DNA, real-time qPCR a ve vybraných vzorcích sekvenování nové generace (NGS). Po finální analýze byl vzorek DNA uchováván při teplotě -80 °C.

Tabulka 2: Protokol pro izolaci DNA pomocí kitu FastDNA SPIN Kit for Soil

	FastDNA SPIN Kit for Soil
Lyze buněk	Nosiče biomasy či srolované filtry se zachycenou biomasou byly vloženy do zkumavek Lysing Matrix E. Ke vzorkům bylo do zkumavek přidáno 978 µl pufru fosfátu sodného a 122 µl MT pufru. Následně byly vzorky homogenizovány na homogenizátoru (2 cykly o 40 s při rychlosti 6,0 m·s ⁻¹ s pauzou 30 s) a centrifugovány při 14 000 × g po dobu 10 min. Z Lysing Matrix E zkumavek byl přenesen supernatant obsahující uvolněný obsah buněk do čistých 2ml zkumavek.
Odstranění proteinů a huminových látek	Ke vzorkům bylo přidáno 250 µl precipitačního činidla PPS a zkumavky byly 10krát ručně promíchány. Vzorek byl stočen v centrifuze po dobu 5 min při 14 000 × g. Supernatant zbarvený proteinovými nečistotami v předchozím kroku byl přenesen do 15ml zkumavek.
Navázání DNA	Ke vzorkům byl přidán 1 ml promíchané suspenze Binding Matrix obsahující SiO ₂ kuličky. Zkumavky se vzorky byly umístěny na 2 minuty na kývačku. Následovala sedimentace SiO ₂ kuliček po dobu 3 min a poté bylo opatrně odebráno 600 µl supernatantu tak, aby nedošlo k odebrání SiO ₂ kuliček s navázanou DNA. Zbytek vzorku ve zkumavkách byl promíchán na vortexu. 750 µl vzorku bylo přeneseno do kolonek umístěných ve sběrných zkumavkách ze soupravy SPIN Filter tube. Vzorky ve SPIN Filter tube byly centrifugovány při 14 000 × g po dobu 1 min. Po vyjmutí kolonek byl obsah sběrných zkumavek vyprázdněn a kolonky byly umístěny zpět do zkumavek. Na vortexu byl promíchán zbytek vzorku v 15ml zkumavce a byl přenesen (max. 750 µl) do kolonky ve vyprázdněné sběrné zkumavce SPIN Filter tube. Vzorky ve SPIN Filter tube byly znovu centrifugovány při 14 000 × g po dobu 1 min a následně byly vyprázdněny sběrné zkumavky.
Promytí DNA	Do kolonek SPIN Filter tube bylo přidáno 500 µl promývacího roztoku SEWS-M. Vzorky byly opatrně promíchány pipetou a následně byly centrifugovány při 14 000 × g po dobu 1 min. Byly vyprázdněny sběrné zkumavky a vzorky byly znovu centrifugovány při 14 000 × g po dobu 2 min. Kolonky ze SPIN Filter tube byly přeneseny do 2ml sběrných zkumavek Catch Tube. Peletky s DNA v kolonkách byly sušeny v otevřených zkumavkách při laboratorní teplotě po dobu 5 min, aby se odpařil zbytkový ethanol z promývacího roztoku.
Eluce DNA	Do kolonek bylo přidáno 100 µl DES a byla promícháním pipetou resuspendována peletka. Vzorky byly inkubovány po dobu 5 min při teplotě 55 °C a poté byly centrifugovány při 14 000 × g po dobu 2 min. Kolonky ze SPIN Filter tube byly odebrány a sběrné zkumavky Catch Tube byly uzavřeny s izolovanou DNA.

Tabulka 3: Protokol pro izolaci DNA pomocí kitu NucleoSpin Soil

	NucleoSpin Soil
Lyze buněk	Nosiče biomasy či zakoncentrovaná biomasa ve formě peletky byly přeneseny do zkumavek NucleoSpin BeadTube Type A. Do zkumavek bylo přidáno 700 µl roztoku Buffer SL1 a následně 150 µl roztoku Enhancer SX. Vzorky byly homogenizovány na homogenizátoru (1 cyklus o 30 s při rychlosti 5,0 m·s ⁻¹) a následně centrifugovány při 11 000 × g po dobu 2 min.
Odstranění proteinů a huminových látek	Do zkumavek bylo přidáno 150 µl roztoku Buffer SL3 a vzorky byly promíchány na vortexu po dobu 5 s. Následně byly vzorky inkubovány při 0-4 °C po dobu 5 min a centrifugovány při 11 000 × g po dobu 1 min. Do kolonek NucleoSpin Inhibitor Removal Column umístěných ve sběrných zkumavkách bylo přeneseno 700 µl supernatantu vzorku z předchozího kroku.
Navázání DNA	Po centrifugaci při 11 000 × g po dobu 1 min byly odstraněny kolonky a do sběrných zkumavek bylo přidáno 250 µl roztoku Buffer SB. Po promíchání obsahu zkumavek na vortexu po dobu 5 s bylo přeneseno 550 µl vzorku do kolonek NucleoSpin Soil Column (obsahují silikátovou membránu) umístěných ve sběrných zkumavkách. Po centrifugaci při 11 000 × g po dobu 1 min byly vyjmuty kolonky, vyprázdněny sběrné zkumavky a kolonky byly umístěny zpět do zkumavek. Tento proces se opakoval se zbytkem vzorku.
Promytí DNA	Do kolonek NucleoSpin Soil Column umístěných ve sběrných zkumavkách bylo přidáno 500 µl roztoku Buffer SB. Po centrifugaci při 11 000 × g po dobu 30 s byly vyjmuty kolonky, vyprázdněny sběrné zkumavky a kolonky byly umístěny zpět do zkumavek. Do kolonek bylo přidáno 550 µl roztoku Buffer SW1. Po centrifugaci při 11 000 × g po dobu 30 s byly vyjmuty kolonky, vyprázdněny sběrné zkumavky a kolonky byly umístěny zpět do zkumavek. Do kolonek bylo přidáno 650 µl roztoku Buffer SW2 a vzorky byly promíchány na vortexu po dobu 2 s. Po centrifugaci při 11 000 × g po dobu 30 s byly vyjmuty kolonky, vyprázdněny sběrné zkumavky a kolonky byly umístěny zpět do zkumavek. Do kolonek bylo znovu přidáno 650 µl roztoku Buffer SW2 a vzorky byly promíchány na vortexu po dobu 2 s. Po centrifugaci při 11 000 × g po dobu 30 s byly vyjmuty kolonky, vyprázdněny sběrné zkumavky a kolonky byly umístěny zpět do zkumavek. Následně byly vzorky centrifugovány při 11 000 × g po dobu 2 min pro odstranění reziduí ethanolu.
Eluce DNA	Kolonky NucleoSpin Soil Column byly přeneseny do čisté 2ml zkumavky a do kolonek bylo přidáno 100 µl roztoku Buffer SE. Vzorky byly inkubovány v otevřených zkumavkách po dobu 1 min při laboratorní teplotě a po centrifugaci při 11 000 × g po dobu 30 s byly odebrány kolonky a ve zkumavkách byla izolovaná DNA.

Koncentrace DNA po izolaci byla měřena pomocí fluorometru Qubit® 2.0 a souprav Qubit™ dsDNA HS Assay Kit a Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, USA) dle pokynů výrobce. Soupravy obsahují barvivo, jehož fluorescence se objeví pouze při navázání na DNA, ředící roztok a ředěné DNA standardy. Reakční směs byla připravena smícháním barviva a ředícího roztoku v poměru 1:199. Pro měření koncentrace bylo do zkumavek Qubit® Assay Tubes napipetováno 190 – 199 µl reakční směsi, ke které bylo přidáno 10 – 1 µl vzorku. Objem vzorku, a tím i objem reakční směsi, byl zvolen na základě předpokládané koncentrace DNA ve vzorku, například 10 µl vzorku bylo přidáno v případě velmi nízkého oživení vzorku. Směs se vzorkem byla nejprve 5 s promíchána na vortexu (3200 ot · min⁻¹) a následně ihned centrifugována po dobu 10 s při 2 000 × g. Po 2min inkubaci při laboratorní teplotě byla zkumavka vložena do fluorometru Qubit® 2.0 a byla změřena koncentrace DNA. Mez detekce nejcitlivější soupravy (HS Assay Kit) je 0,01 ng · µl⁻¹.

3.2.3 Real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Extrahovaná DNA ze vzorků byla použita jako templát pro real-time qPCR analýzu. Cílem qPCR analýzy bylo ve vzorcích detekovat jak celkové bakteriální

oživení, tak i přítomnost funkčních genů a klíčových mikrobiálních konsorcií specifických pro daný experiment. Například pro monitoring nitrifikačního procesu byly testovány funkční geny a klíčová mikrobiální konsorcia podílející se na obou krocích nitrifikace, oxidace amoniaku (AOB) a dusitanu (NOB), a na denitrifikaci. Pro zjednodušení je v následujícím textu pod pojmem primer míněn primerový pár forward a reverse.

Celkové archeální a bakteriální oživení bylo sledováno amplifikací genu 16S rRNA, tj. genu kódujícím malou subjednotku ribozomu, pomocí primeru s označením U16SRT. První krok nitrifikace byl sledován pomocí funkčního genu kódujícího klíčový enzym oxidace amoniaku na dusitan (*amoA*) specifického pro bakteriální rod *Nitrosomonas*. Pro druhý krok nitrifikace byly funkční geny kódující klíčové enzymy oxidace dusitanu na dusičnan detekovány pomocí primerů specifických pro bakteriální rody *Nitrobacter* (*NxrB1*, *nxA*) a *Nitrospira* (*NxrB*). Přítomnost bakteriálního rodu *Nitrospira* byla ve vzorcích také sledována amplifikací 16S rRNA genu *Nitrospira* použitím primeru s označením NSR. Abundance bakteriálního rodu *Nitrobacter* byla také stanovena pomocí amplifikace 16S rRNA genu *Nitrobacter* (primer s označením Nitrob.). Denitrifikační bakterie byly detekovány pomocí funkčních genů kódující nitrit reduktázy (*nirK*, *nirS*) a reduktázu oxidu dusného (*nosZ*). Podrobnější informace k testovaným primerům jsou uvedeny v Tab. 4.

Tabulka 4: Seznam testovaných primerů

Cílová skupina	Primer	Gen	Sekvence (5'-3') ^[1]	Annealing teplota	Reference	
archea & bakterie	U16SRT	16S rRNA	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT R: TATTACCGCGGCTGCTGGC	60 °C	(Clifford et al. 2012)	
	AOB	<i>amoA</i> amoniak monooxygenáza, <i>Nitrosomonas</i> sp.	F: GGGGTTTCTACTGGTGGT R: CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	58 °C	(Rotthauwe et al. 1997)	
nitrifikační bakterie	NSR	16S rRNA <i>Nitrospira</i> sp.	F: CCTGCTTTCAGTTGCTACCG R: GTTTCAGCGCTTGTACCG	66 °C	(Dionisi et al. 2002)	
		<i>nxB</i> nitrit oxidoreduktáza β podjednotka, <i>Nitrospira</i> sp.	F: TACATGTGGTGGAAACA R: CCGTTCCTGGTCRATCA	58 °C	(Pester et al. 2014)	
	NOB	Nitrob	16S rRNA <i>Nitrobacter</i> sp.	F: ACCCCTAGCAAATCTCAAAAACCG R: CTTACCCAGTCGCTGACC	60 °C	(Graham et al. 2007)
		<i>nxA</i> nitrit oxidoreduktáza α podjednotka, <i>Nitrobacter</i> sp.	F: CAGACCGACGTGTGCGAAAG R: TCYACAAGGAACGGAAGGTC	60 °C	(Poly et al. 2008)	
		<i>NxB1</i> nitrit oxidoreduktáza β podjednotka, <i>Nitrobacter</i> sp.	F: ACGTGGAGACCAAGCCGGG R: CCGTCTGTTGAYCTCGTTGA	66 °C	(Vanparys et al. 2007)	
denitrifikační bakterie		<i>nirK</i> Cu-nitrit reduktáza	F: GGMATGGTKCCSTGGCA R: GCCTCGATCAGRTRTGGTT	60 °C	(Braker et al. 1998)	
		<i>nirS</i> cytochrom <i>cd1</i> -nitrit reduktáza	F: GTS AACGTS AAGGARACSSG R: GASTTCGGRTGSGTCTTGA	60 °C	(Throbäck et al. 2004)	
		<i>nosZ</i> reduktáza oxidu dusného	F: CGYTGTTCMTCGACAGCCAG R: CGSACCTTSTTGCSTYGGC	60 °C	(Throbäck et al. 2004)	

^[1] S ... báze se 3 vodíkovými vazbami (G, C); Y ... pyrimidinové báze (C, T); R ... purinové báze (A, G); W ... báze se 2 vodíkovými vazbami (A, T); K ... ketony (T, G); D ... A, G, T (ne C); B ... C, G, T (ne A); N ... jakákoliv báze

Všechny qPCR reakce, včetně beztemplátové kontroly, byly provedeny v duplikátu na přístroji LightCycler® 480 (Roche, Švýcarsko). Jako fluorescenční zdroj bylo použito interkalační fluorescenční barvivo typu SYBR Green. Každá 10 μl reakce byla připravena smícháním 5 μl LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 0,4 μl směsi primerového páru (forward a reverse) o molární koncentraci 20 μmol · l⁻¹, 3,6 μl ultračisté PCR vody a 1 μl templátové DNA ze vzorku. PCR destička obsahující reakční směs s DNA byla přikryta PCR fólií a centrifugována 15 s při 500 × g. Nakonec byla destička vložena do termocykleru LightCycler® 480, u něhož byl pomocí programu LightCycler® 480 Software nastaven reakční profil. Parametry qPCR analýzy byly následující: počáteční denaturace 5 min při 95 °C, následována 45 cykly o 10 s při 95 °C, 15 s při annealing teplotě specifické pro každý primer (Tab. 4) a 20 s při 72 °C. Na konci amplifikace byla postupným zvyšováním teploty ze 72 °C na 98 °C provedena analýza křivky tání. Pomocí softwaru LightCycler® 480 byly získány Ct hodnoty metodou maxima druhé derivace amplifikační křivky („2nd Derivative Maximum“).

Přítomnost látek inhibujících DNA polymerázu během PCR byla testována ředěním extrahované DNA ultračistou vodou 5×, 10×, 20× a 40×, provedením

qPCR analýzy s primerem U16SRT a vyhodnocením. Přítomnost inhibičních látek ve vzorku byla zaznamenána nekorespondujícím rozdílem Ct hodnot mezi jeho ředěními. V tom případě bylo pro další qPCR analýzy zvoleno ředění vzorku, u něhož byla potvrzena absence inhibičních látek. Přítomnost látek inhibujících PCR a následné vysoké ředění vzorku byly hlavním faktorem pro změnu kitu pro izolaci DNA ze vzorků spojených s odpadní vodou či výluhu ze skládky neboli skládkovou vodou.

Interpretace dat z qPCR analýzy

Výsledky qPCR analýzy, tzv. Ct hodnoty byly interpretovány ve formě heatmapy průměrných Ct hodnot, relativní kvantifikace anebo heatmapy relativní kvantifikace. V následujícím textu je pod pojmem „Ct hodnota“ míněn průměr z duplikátu Ct hodnot. Interpretace výsledků qPCR analýz byla založena na nepřímé úměře, tudíž čím nižší je Ct hodnota, tím větší je množství cílové DNA ve vzorku a naopak. Konkrétně tedy v případě qPCR analýzy pomocí markeru U16SRT, čím nižší byla Ct hodnota, tím větší bylo celkové bakteriální oživení (množství bakteriální biomasy) ve vzorku. Maximální možná Ct hodnota je 40 a odpovídá nulové detekci².

Průměrné Ct hodnoty jsou zobrazeny formě heatmapy. Průměrné Ct hodnoty určitého primeru byly nejprve rozděleny na dvě množiny, hodnoty nižší než 36 a hodnoty rovné nebo vyšší než 36. Hodnoty rovné nebo vyšší než 36 byly zařazeny do skupiny na hranici detekce. Druhá množina byla rozdělena na deset intervalů o stejné velikosti (Rovnice 1). Interval s nejnižšími hodnotami byl klasifikován jako „vysoké množství“ a interval obsahující průměrnou hodnotu (Rovnice 2) byl klasifikován jako „střední množství“. Interval s nejvyššími hodnotami (< 36) byl označen jako „malé množství“. Ct hodnoty rovné 40 byly ve skupině „nedetekováno“, tedy pod mezí stanovitelnosti. Jednotlivé skupiny (intervaly) jsou v heatmapách prezentovány patřičnými barvami.

$$\text{velikost intervalu} = \frac{\max_{Ct_hodnota} - \min_{Ct_hodnota}}{10} \quad (1)$$

² U markeru U16SRT je Ct hodnota ovlivněna reziduální bakteriální DNA obsaženou ve směsi SYBR Green I Master. Ct hodnota negativní kontroly (NTC, „no template control“) se pohybuje okolo 31.

$$\text{průměrná hodnota} = \min_{Ct_hodnota} + \frac{\max_{Ct_hodnota} - \min_{Ct_hodnota}}{2} \quad (2)$$

Relativní kvantifikace popisuje relativní změnu množství daného primeru vůči referenčnímu vzorku prostřednictvím delta Ct metody (Schmittgen a Livak 2008). Pro výpočet relativní kvantifikace byl použit vztah:

$$\text{relativní kvantifikace} = Eff^{-(Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{ref}})} \quad (3)$$

, kde Eff je účinnost primeru a Ct_{target} je průměr Ct hodnot u analyzovaného vzorku a Ct_{ref} je průměr Ct hodnot u referenčního vzorku. Hodnota relativní kvantifikace referenčního vzorku je 1. Pokud je hodnota relativní kvantifikace vzorku 2, znamená to, že v tomto vzorku je dvakrát více cílové DNA než v referenčním vzorku. Hodnoty relativní kvantifikace jsou zobrazeny v jednoduchém dvojrozměrném sloupcovém grafu s logaritickým měřítkem na svislé ose nebo ve formě heatmapy. Heatmapa hodnot relativní kvantifikace byla v rámci této práce, konkrétně v části zabývající se sterilizací nanovláčkových nosičů, použita pro hodnocení celkového bakteriálního oživení ve vzorku vůči oživení v kontrole bez templátu (NTC). Heatmapa hodnot relativní kvantifikace byla vytvořena podobným způsobem jako heatmapa Ct hodnot. Hodnoty relativní kvantifikace byly nejprve rozděleny na dva intervaly, hodnoty na stejné úrovni jako hodnoty naměřené v kontrolách bez templátu a hodnoty vyšší. Hodnoty v prvním intervalu byly zařazeny do skupiny NTC, zatímco druhá množina byla rozdělena na deset intervalů o stejné velikosti (Rovnice 4). Jednotlivé intervaly jsou v heatmapách prezentovány patřičnými barvami, od intervalu s nejnižšími hodnotami prezentovaným nejsvětlejší barvou po interval s nejvyššími hodnotami prezentovaným nejtmaší barvou.

$$\text{velikost intervalu} = \frac{\max_{\text{hodnota_relativní_kvantifikace}} - \min_{\text{hodnota_relativní_kvantifikace}}}{10} \quad (4)$$

3.2.4 Next-generation sequencing

Složení mikrobiální komunity ve vzorcích bylo stanoveno prostřednictvím sekvenování ampliconu vysoce variabilního V4 regionu 16S rRNA genu pomocí platformy Ion Torrent Personal Genome Machine® (PGM; Life Technologies, USA). Systém Ion Torrent provádí detekci jednotlivých sekvenačních kroků na základě měření změny hodnoty pH (viz kap. 2.2.3). Pro amplifikaci V4 regionu 16S rRNA genu byl použit pár primerů 515F (5'-TGCCAGCMGCNGCGG-3'; Dowd et al. 2008)

a 802R (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'; Claesson et al. 2010). K označení sekvencí z jednotlivých vzorků byly použity fúzní primery. Základ fúzních primerů byly sekvence primerů 515F a 802R, kde na reverse primeru 802R byla navázána sekvence Ion Torrent barkódu o velikosti 10-12 bp jedinečná pro každý vzorek společně s adaptérem Ion A (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3'), zatímco na forward primer 515F byl navázán adaptér trP1 (5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATG-3'). Adaptéry navázané na amplikony jsou důležité pro navázání amplikonů na tzv. ISP („*Ion Sphere Particles*“) částice během emulzní PCR a pro inkorporaci biotinu sloužícímu k vazbě k streptavidinem na magnetických částicích během enrichmentu (viz kap. 2.2.3). V následujícím textu je stručně popsán protokol NGS analýzy, v němž při použití komerčně dostupného kitu specifického pro Ion Torrent systém byl postup proveden dle instrukcí výrobce.

A. Příprava knihovny

Pro vytvoření knihovny nebyl použit komerčně dostupný kit. Celý postup se skládal z pěti základních kroků: amplifikace specifického úseku DNA, připojení barkódů s adaptéry, přečištění amplikonů (odstranění krátkých sekvencí primerů), kontrola velikosti amplikonů a ředění.

- 1) **Amplifikace oblasti 16S rRNA genu** a následné navázání barkódů pro označení jednotlivých vzorků byly provedeny 2 PCR reakcemi, jejichž reakční směs je uvedena v Tab. 5 a jejichž reakční profil v termocykleru je uveden v Tab. 6. Pro přípravu knihovny byla použita KAPA HiFi DNA polymeráza (Roche, Švýcarsko).

Tabulka 5: Reakční směs PCR reakcí pro jeden vzorek

PCR reakce	PCR H ₂ O	PCR Enhancer	10µmol·l ⁻¹ 16S-IT-F	10µmol·l ⁻¹ 16S-IT-R	10µmol·l ⁻¹ 16S-barkódy	KAPA polymeráza	DNA	Produkt 1. PCR reakce
1.	4,5 µl	1 µl	0,5 µl	0,5 µl	–	7,5 µl	1 µl	–
2.	17 µl	1 µl	–	–	3 µl	25 µl	–	4 µl

Tabulka 6: Parametry PCR reakcí pro přípravu ampliconů

	1. PCR reakce			2. PCR reakce		
	Počet cyklů	Teplota	Doba	Počet cyklů	Teplota	Doba
Denaturace	1	95 °C	3 min	1	95 °C	3 min
PCR amplifikace	10	98 °C	20 s	35	98 °C	20 s
		50 °C	15 s		50 °C	15 s
		72 °C	30 s		72 °C	30 s
Elongace	1	72 °C	1 min	1	72 °C	1 min

- 2) **Přečištění ampliconu**, tj. produktu z 2. PCR reakce, bylo provedeno pomocí magnetického stojánu Magnetic Separation Rack (MagnaRack Corporation, USA) a Agencourt™ AMPure™ XP Kit (Beckman Coulter, USA) obsahujícího magnetické částice dle pokynů výrobce.
- 3) **Gelová elektroforéza** byla provedena pro vizualizaci ampliconů na 1% agarózovém gelu obsahujícím fluorescenční barvivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain (LAB MARK, ČR) s velikostním markerem 100 bp DNA ladder a zdrojem napětí ENDURO™ 300V (Labnet International, Inc., USA). Vizualizace výsledků gelové elektroforézy byla realizována pomocí systému UVIsave HD2 (UVITEC, Velká Británie).
- 4) **Ředění přečištěných ampliconů** na koncentraci 25 nmol·l⁻¹ probíhalo na základě naměřené koncentrace DNA v přečištěných vzorcích ampliconů pomocí Qubit™ dsDNA BR Assay Kit na fluorometru Qubit® 2.0 dle pokynů výrobce. Naředěné amplicony byly poté smíchány dohromady (10 µl z každého vzorku). Pro vytvoření knihovny byla směs ampliconů naředěna na 25 pmol·l⁻¹.

B. Emulzní PCR

Příprava sekvenačního templátu z knihovny byla provedena prostřednictvím emulzní PCR za využití Ion PGM™ Hi-Q™ VIEW OT2 Kit na přístroji Ion OneTouch 2 Instrument dle pokynů výrobce. Produktem emulzní PCR byly ISP částice, na jejichž povrchu byly navázány a amplifikovány jednotlivé amplicony z knihovny (1 amplicon na 1 ISP).

C. Enrichment

Enrichment (obohacení ISP kuliček) byl proveden pomocí Ion PGM™ Hi-Q™ VIEW OT2 Kit a Ion PGM™ Enrichment Beads na přístroji Ion OneTouch Enrichment System dle pokynů výrobce. V průběhu enrichmentu byly odstraněny ISP částice,

kteře neobsahovaly templát z knihovny. Produktem enrichmentu byly tzv. templát-pozitivní ISP částice

D. Sekvence

Pro sekvenování byl využit Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit, čip Ion 314™ Chip v2 BC, do kterého byly vloženy templát-pozitivní ISP částice se sekvenačním primerem (navázaným na templát během 1-cyklové PCR) a polymerázou, a přístroj Ion Personal Genome Machine® (PGM™) dle pokynů výrobce.

Analýza dat z NGS analýzy

Analýza surových dat ze sekvenace V4 regionu 16S rRNA genu byla provedena dvěma různými způsoby. V obou případech byla přesnost klasifikace verifikována a vyhodnocena vůči vzorku umělé bakteriální komunity (mock) s definovaným složením bakteriálních kmenů (*Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*). Výstupem obou analýz je tabulka operačních taxonomických jednotek („operational taxonomic unit“, OTU), tzv. OTU tabulka.

V části disertační práce zabývající se aplikací nanovlákných nosičů pro vzorkování mikrobiální biomasy byla data ze sekvenace zpracována Ing. Romanem Špánkem, Ph.D. Sekvence byly prvně rozděleny mezi jednotlivými vzorky prostřednictvím softwarového balíčku mothur napsaným v C++ (Schloss et al. 2009). Následně byly sekvence zpracovány softwarovým balíčkem DADA2 vycházejícím z algoritmu DADA („divisive amplicon denoising algorithm“) napsaným v R (Callahan et al. 2016). Krátké sekvence a sekvence s nízkou kvalitou byly odstraněny společně s chiméřními sekvencemi prostřednictvím DADA2 funkce `removeBimeraDenovo` před klasifikací. Sekvence byly klasifikovány pomocí databáze SILVA SSU 138 (Quast et al. 2013) v DADA2 balíčku.

Další způsob analýzy sekvenačních dat byl prostřednictvím programu SEED 2 (Větrovský et al. 2018) napsaným v Object Pascal. Analýza probíhala následujícím způsobem:

- 1) Byly odstraněny sekvence o průměrné kvalitě nižší než 20 (tedy sekvence, kde byla pravděpodobnost výskytu chyby vyšší než 1 %).
- 2) Byly nalezeny sekvence obsahující úsek DNA odpovídající 'reverse' primeru (802R) a jednomu z barkódů. Byly vytvořeny skupiny sekvencí podle

barkódů, které obsahovaly, a zároveň byly odstraněny sekvence, které neobsahovaly ani jeden z barkódů. Byl vložen název barkódu k jednotlivým sekvencím a ze všech sekvencí byl odstraněn hledaný úsek a jakýkoliv úsek před ním.

- 3) Byl nalezen 'forward' primer v sekvencích a byly odstraněny sekvence, které jej neobsahují. Ze všech zbývajících sekvencí byl odstraněn hledaný úsek a jakýkoliv úsek za ním.
- 4) Byly odstraněny sekvence kratší než 250 bp a delší než 300 bp. Pro klastrování sekvencí je nutné, aby všechny sekvence byly stejné délky. Všechny sekvence byly zkráceny na 250 bp.
- 5) Sekvence byly klastrovány na úroveň identity 97 % (OTU radius: 3 %) pomocí funkce VSEARCH (Rognes et al. 2016). Pomocí této funkce byly také automaticky odstraněny chiméry. Název klastru, tj. operační taxonomické jednotky (OTU, „Operational Taxonomic Units“), byl vložen k jednotlivým sekvencím.
- 6) Byla vytvořena OTU tabulka, v níž OTU odpovídaly bakteriálním taxonům na různých úrovních v jednotlivých vzorcích.
- 7) Pro každý klastr sekvencí (OTU) byla nalezena nejabundantnější sekvence klastru.
- 8) Vygenerované nejabundantnější sekvence byly porovnány s databází SILVA SSU 138 (Quast et al. 2013) pomocí algoritmu BlastN a ke každému klastru (OTU) byl přiřazen taxon s nejvyšší sekvencí identitou.
- 9) Před další analýzou sekvencí byly z OTU tabulky odstraněny sekvence klasifikované jako chloroplastové či mitochondriální.

Interpretace dat z NGS analýzy

Pro interpretaci analyzovaných dat z NGS analýzy byly v této práci použity různé přístupy, které jsou stručně popsány v následujících odstavcích.

Taxonomické složení mikrobiální komunity na úrovni bakteriálního rodu nebo čeledě v jednotlivých vzorcích bylo zobrazeno pomocí dvojrozměrných 100% skládaných grafů tzv. OTU grafů, které znázorňují situaci v jednotlivých vzorcích a lze z nich snadno odečíst podobnost nebo naopak rozdílnost sledovaných vzorků. Zároveň ukazují i nejčastěji zastoupené taxony, a to konkrétně na 2,5% či 5% hladině, tedy dochází k filtraci všech bakteriálních rodů/čeledí, které nedosahují

konkrétní frekvence. Dále OTU grafy zobrazují procentuální zastoupení sekvencí, které nebylo možné klasifikovat na úroveň bakteriálního rodu/čeledě, tzn. sekvencí, jejichž 100% identitu sdílelo více než jeden bakteriální rod/čeleď. Další možné zobrazení taxonomického složení mikrobiální komunity jsou tzv. Krona grafy, což jsou výsečové grafy zobrazující taxony v jednom vzorku na úrovních od kmene po rod na hladině 2,5 %.

Kromě taxonomického složení byla v některých vzorcích stanovena biodiverzita na dvou úrovních, alfa a beta diverzita. Zatímco alfa diverzita popisuje biodiverzitu v daném vzorku, beta diverzita popisuje rozdílnost druhového složení mezi vzorky. V rámci této práce byly jako indexy alfa diverzity použity druhová bohatost („*species richness*“) a vyrovnanost („*evenness*“) odvozená z inverzního Simpsonova indexu. Druhová bohatost je základní index diverzity vyjadřující celkový počet taxonů identifikovaných v komunitě vzorku a podává přímou informaci o rozmanitosti komunity. Simpsonův index diverzity (D) je definován jako pravděpodobnost, s jakou dva náhodně zvolení jedinci budou patřit ke stejnému druhu. Je silně závislý na nejabundantnějším taxonu a méně citlivý ke vzácným taxonům. Častěji se využívá inverzní forma indexu (D_R), která roste se zvyšující diverzitou. Výpočet Simpsonova indexu a jeho převrácené hodnoty je dán vztahem:

$$D = \sum_{i=1}^S \frac{n_i \times (n_i - 1)}{N \times (N - 1)}, \quad D_R = \frac{1}{D} \quad (5)$$

, kde S je počet taxonů ve vzorku, n_i počet jedinců i -tého taxonu a N celkový počet jedinců ve vzorku (Jarkovský et al. 2012; Magurran 2004). Variabilita jednotlivých indexů v rámci jednoho odběru byla společně s bodovým zobrazením indexů znázorněna pomocí krabicového diagramu („*box plot*“).

Pro vizualizaci rozdílů v mikrobiální diverzitě mezi jednotlivými vzorky, tj. beta diverzity mezi vzorky, byla použita metrická technika vícerozměrného škálování („*multidimensional scaling*“, MDS). Úlohou metody MDS též známé jako analýza hlavních koordinát („*principal coordination analysis*“, PCoA) byla redukce vícerozměrného prostoru, konkrétně snížit rozměr dat (transformace z matice $m \times n$, kde m je počet vzorků a n je počet taxonů, na matici $m \times 2$) s minimální ztrátou informací a zkoumat vztahy mezi vzorky, konkrétně jejich podobnost vyjádřenou vzájemnou vzdáleností, v redukovaném prostoru. Vstupem do MDS je matice vzdáleností vypočtená z primární matice pozorování, tj. OTU tabulky, na základě Bray-Curtisovy vzdálenosti a výstupem je zobrazení pozorovaných vztahů

(podobnosti) mezi vzorky v redukovaném prostoru, například v dvourozměrném grafu, tzv. konfiguraci bodů. V průběhu transformace dat dochází k rotaci původního systému os tak, aby první osa/hlavní komponenta zachycovala maximum možné variability. Druhá osa/hlavní komponenta je vedena ortogonálně na první hlavní komponentu a zachycuje co největší variabilitu dat nevyjádřenou první osou. Hlavní komponenty jsou určeny pomocí vlastních čísel a vektorů matice. Největší vlastní číslo vyjadřuje, jaký rozptyl první osa zachycuje, a její vlastní vektor určuje směr dané osy. Diagram MDS lze interpretovat zjednodušeně, čím menší vzdálenost je mezi dvěma body, tím je větší podobnost mezi těmito body (Meloun a Militký 2004; Haruštiaková et al. 2012).

3.2.5 Fluorescenční in-situ hybridizace

Vzorky suspenze o objemu 0,5 ml byly odebrány z bioreaktorů pro fluorescenční in-situ hybridizaci (FISH). Pro získání biomasy z nosičů biomasy byla nit s/bez nanovláken o délce 0,8 m vložena do 14 ml $0,15\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku NaCl a poté byla směs sonikována v ultrazvukové lázni Sonorex Digitec DT 510 H (Bandelin, Německo) po dobu 15 min. Po odstranění vlákna byla suspenze obsahující biomasu centrifugována při $6000\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 30 minut a výsledná peletka byla použita pro analýzu FISH.

Poměr nitrifikačních bakterií (AOB a NOB) v odebraných vzorcích byl stanoven pomocí metody FISH provedené dle postupů Nielsen et al. (2009) pro gramnegativní bakterie. Protokol FISH metody je uveden v Tab. 8. U každého vzorku byly separátně aplikovány sondy specifické pro AOB společně se sondami pro EUB (celková bakteriální biomasa; eubakterie) a sondy specifické pro NOB společně se sondami pro EUB. Aplikované sondy značené fluorescenčním barvivem jsou uvedeny v Tab. 7. Pro detekci označených buněk mikroskopickou analýzou byl použit fluorescenční mikroskop ZEISS Axio Imager.M2 s kamerou AxioCamICc1 a světelným zdrojem Colibri.2 a program AxioVision SE64.

Tabulka 7: Seznam použitých FISH sond

Cílová skupina	Sonda	Sekvence bázi (5' → 3')	Specifikace	Reference
bakterie	EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Většina bakterií	(Amann et al. 1990)
	EUB338II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Planctomycetales</i>	(Daims et al. 1999)
	EUB338III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	(Daims et al. 1999)
AOB	Nso190	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	Amoniak oxidující bakterie,	(Mobarry et al. 1996)
	Nso1225	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	<i>Betaproteobacteria</i>	(Mobarry et al. 1996)
NOB	Ntspa712	CGC CTT CGC CAC CGG CCT TCC	Phylum <i>Nitrospirae</i>	(Daims et al. 2001b)
	Ntspa662	GGA ATT CCG CGC TCC TCT	Genus <i>Nitrospira</i>	(Daims et al. 2001b)

Tabulka 8: Protokol fluorescenční in-situ hybridizace dle Nielsen et al. (2009)

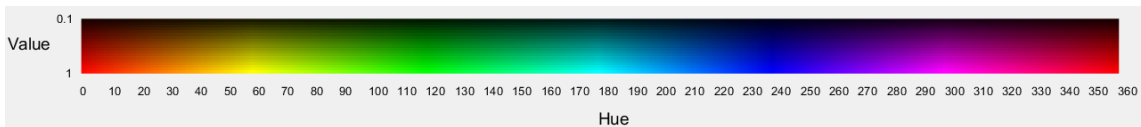
Fluorescenční in-situ hybridizace	
Fixace vzorku	K peletce obsahující biomasu z nosičů či k 500 µl suspenze byl přidán 4% paraformaldehyd (PFA) o objemu 500 µl a následně vzorky byly inkubovány při 4 °C po dobu 3 h. Po inkubaci byl odstraněn PFA ze vzorků centrifugací při 5 000 ot · min ⁻¹ po dobu 5 min a odebráním supernatantu. Peletka byla resuspendována v 1 ml ledového roztoku fosfátového pufru a absolutního ethanolu (1 : 1; PBS/EtOH). Po centrifugaci při 5 000 ot · min ⁻¹ po dobu 5 min a odebráním supernatantu byla peletka znovu promyta v ledovém roztoku PBS/EtOH. Po centrifugaci a odstranění supernatantu byl ke vzorku přidán 400 µl PBS/EtOH.
Imobilizace vzorku na sklíčko	Podložní sklíčko bylo potaženo (5min ponoření v roztoku 1% HCl a 70% EtOH → 5min ponoření v roztoku 0,01% poly-L-lysinu → 1h sušení při 43 °C) a poté bylo do jedné z jeho jamek přeneseno 5 µl vzorku, který byl rozetřen po celé jamce. Následně proběhla inkubace při 43 °C po dobu 10 min.
Dehydratace	Dehydratace imobilizovaných vzorků byla provedena sériovým promytím v roztocích EtOH se zvyšující koncentrací. Podložní sklíčko se vzorkem bylo ponořeno na 3 min do 50% EtOH, následně na 3 min do 80% EtOH a nakonec na 3 min do 96% EtOH. Zbytkový EtOH byl odstraněn inkubací při 43 °C po dobu 5 min.
Permeabilizace	K dehydratovanému vzorku bylo přidáno 100 µl lysozymu o koncentraci 0,5 mg · ml ⁻¹ a proběhla inkubace při laboratorní teplotě po dobu 20 min. Po inkubaci byl vzorek omyt 2 ml PBS a sklíčko bylo ponořeno do ledového roztoku PBS po dobu 15 s. Následně byl vzorek vysušen při 43 °C po dobu 5 min.
Hybridizace	Na vzorek bylo přidáno 20 µl hybridizačního pufru ³ obsahující FISH sondy. Podložní sklíčko bylo horizontálně umístěno do 50ml zkumavky společně s kouskem filtračního papíru navlhčeným 800 µl hybridizačního pufru bez sond. Po uzavření zkumavky proběhla inkubace při 43 °C po dobu 2 h.
Promytí	Po inkubaci bylo ze zkumavky vyjmuto podložní sklíčko a bylo omyto 2 ml pracího pufru ⁴ předehřátého na teplotu 43 °C. Následně bylo sklíčko ponořeno do pracího pufru ve vodní lázni při 43 °C po dobu 15 min. V případě aplikace sond s různou koncentrací formamidu (FA) v hybridizačním pufru (např. u AOB sond) byly zopakovány kroky hybridizace s pufrům o nižší koncentraci FA a promytí.
Příprava pro snímkování na mikroskopu	Po inkubaci podložního sklíčka v pracím pufru bylo sklíčko ponořeno do ledové ultračisté vody (18 MΩ/cm ²) na 3 s a následně vysušeno mírným proudem N ₂ . Po napipetování 7 µl Citifluoru na každý vysušený vzorek na podložním sklíčku bylo přiloženo krycí sklíčko a vzorky byly připraveny pro pozorování pod fluorescenčním mikroskopem.

³ U hybridizačního pufru všech aplikovaných FISH sond (viz Tab. 7) kromě sondy Nso190 byla koncentrace FA 20 % (180 µl 5M NaCl + 20 µl 1M Tris/HCl + 1 µl 10% SDS + 200 µl FA + 599 µl ultračisté vody), zatímco u sondy Nso190 byla koncentrace FA v hybridizačním pufru 55 % (180 µl 5M NaCl + 20 µl 1M Tris/HCl + 1 µl 10% SDS + 550 µl FA + 249 µl ultračisté vody). Do alikvót hybridizačního pufru byl přidán 1 µl od každé sondy, v případě sondy Nso190 pouze od ní. Při aplikaci hybridizačních pufrů o různé koncentraci FA byla provedena prvně hybridizace s pufrům o vyšší koncentraci FA.

⁴ Složení pracího pufru bylo závislé na koncentraci FA v hybridizačním pufru aplikovaném v předchozím kroku protokolu (pro koncentraci FA 20 %: 2,15 ml 5M NaCl + 1 ml 1M Tris/HCl + 0,5 ml 0,5M EDTA + 46,35 ml ultračisté vody; pro koncentraci FA 55 %: 0,1 ml 5M NaCl + 1 ml 1M Tris/HCl + 0,5 ml 0,5M EDTA + 48,4 ml ultračisté vody).

Obrazová analýza

Kvantitativní vyhodnocení specifických bakterií AOB, NOB a EUB na snímcích z fluorescenčního mikroskopu bylo provedeno prostřednictvím algoritmu v programu MATLAB (verze R2020b; The MathWorks). Pro každý vzorek bylo vyhodnoceno 15 snímků při zvětšení 630×, na nichž byly zobrazeny pomocí FISH metody bakterie AOB s EUB či NOB s EUB. Algoritmus je založen na hodnocení objektů v barevném modelu HSV. Barevný model HSV (Hue, Saturation, Value) byl zvolen, protože je díky dvěma jeho parametrům, Hue (barva) a Value (jas), možné izolovat určité barevné spektrum (Obr. 4), což u běžně využívaného barevného modelu RGB nelze. HSV model snímku (1388×1040 px) se skládal ze tří matic (Hue, Saturation, Value) o stejné velikosti (1388×1040), kde HSV parametry každého pixelu snímku byly uvedeny. Při izolaci specifického barevného spektra byl algoritmus zaměřen pouze na matici obsahující hodnoty parametru Hue (barva) a na matici obsahující hodnoty parametru Value (jas). V následujícím textu jsou popisovány postupy v programu MATLAB a z toho důvodu byla použita v matematických výrazech interpunkce programu MATLAB, například místo desetinné čárky byly použity tečky.



Obrázek 4: Barevná škála modelu HSV zobrazená v RGB modelu pomocí programu MATLAB

Skript algoritmu obrazové analýzy je uveden v příloze A. Průběh analýzy jednoho snímku, na němž byly zobrazeny pomocí FISH metody bakterie AOB s EUB či NOB s EUB, je stručně popsán níže:

- 1) Změnit barevný model snímku z RGB na HSV model pomocí funkce `rgb2hsv`.
- 2) Izolovat jednotlivá barevná spektra specifická pro fluorescenci FISH sond.

Pro každé spektrum byla vytvořena nulová matice o velikosti $1388 \times 1040 \times 3$. Pokud hodnoty parametrů Hue a Value pixelu snímku o souřadnicích (x, y) byly prvky intervalů specifickými pro dané barevné spektrum, byly prvky nulové matice o souřadnicích $(x, y, 1)$, $(x, y, 2)$ a $(x, y, 3)$ změněny z $(0, 0, 0)$ na $(110/360, 1, 0.996)$ v případě červeného obarvení (AOB či NOB) a na $(0, 1, 0.996)$ v případě zeleného obarvení (EUB).

Pokud hodnoty parametrů Hue a Value pixelu snímku nesplňovaly podmínky, zůstaly prvky nulové matice specifické pro daný pixel nezměněné. Výchozí nastavení intervalů specifických pro barevná spektra FISH sond je uvedeno v Tab. 9. Ukázka uloženého snímku z obrazové analýzy, konkrétně zobrazení originálního snímku společně se snímky izolovaných spekter v RGB modelu je uvedena na Obr. 5. Z uložených snímků zobrazující izolovaná spektra proběhla po obrazové analýze kontrola, zda spektra odpovídaly či byly zkresleny kvůli například červeně zabarvenému pozadí. Na základě kontroly byly chybné snímky odstraněny ze vstupních dat a obrazová analýza byla provedena znovu.

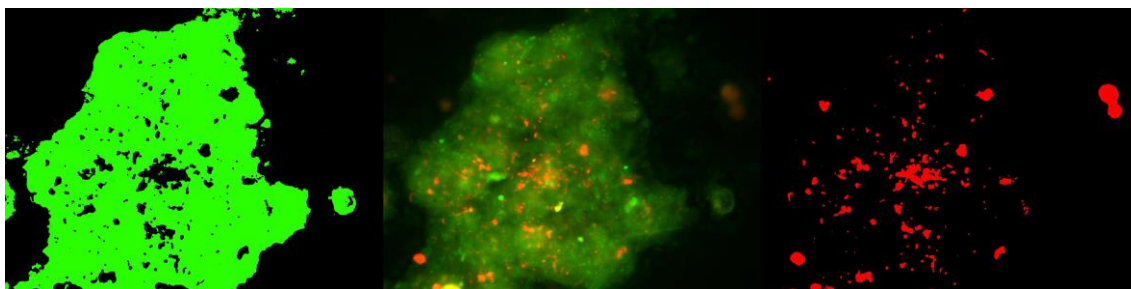
- 3) Převést snímky izolovaných spekter do binárního obrazu. Prvně byl snímek izolovaného spektra převeden z HSV modelu do RGB modelu pomocí funkce `hsv2rgb` a následně byla matice $(:, :, 1)$ z RGB modelu konvertována do binárního obrazu `im2bw`. Zjednodušeně došlo k tomu, že pixelu, který byl prvkem izolovaného spektra, byla přiřazena hodnota 1, zatímco v opačném případě hodnota 0.
- 4) Pomocí funkce `sum` byla z matice binárního obrazu vypočtena plocha izolovaných barevných spekter (GREEN, RED). Následně byl z ploch vypočten podíl AOB či NOB (RED) ve vzorku (Rovnice 6). Po kontrole snímků z obrazové analýzy (viz krok 2) a případné reanalýze byl vypočítán průměr ze všech hodnot podílů AOB a NOB pro jednotlivé vzorky.

$$\text{podíl}_{\text{AOB/NOB}} = \frac{\text{plocha}_{\text{AOB/NOB}}}{\text{plocha}_{\text{EUB}} + \text{plocha}_{\text{AOB/NOB}}} \quad (6)$$

- 5) Podíly AOB či NOB na jednotlivých snímcích a jejich mediány pro jednotlivé vzorky s mediánovou absolutní odchylkou byly zapsány do souboru Excel.

Tabulka 9: Parametry pro izolaci barevného spektra specifického pro fluorescenci FISH sond

Zbarvení	Cílová skupina	Hue	Value
červené	AOB & NOB	$\langle 0; 50 \rangle \cup \langle 345; 360 \rangle$	$\langle 0,11; 1 \rangle$
zelené	bakterie	$\langle 70; 150 \rangle$	$\langle 0,15; 1 \rangle$



Obrázek 5: Ukázka z obrazové analýzy originálního snímku (uprostřed) společně se snímky izolovaných spekter (vpravo a vlevo) v RGB modelu pomocí programu MATLAB

Interpretace dat z FISH analýzy

Průměrný podíl AOB či NOB vůči EUB s AOB či EUB s NOB byl zobrazen pomocí dvojrozměrného skládaného sloupcového grafu.

3.3 Mikroskopická analýza

Povrchová morfologie nanovlákněné vrstvy na nosné niti a samotné nosné nitě byla zobrazena pomocí optické, konfokální a rastrovací elektronové mikroskopie. Další typ mikroskopie, fluorescenční mikroskopie, byl použit pro vizualizaci fluorescenčních sond aplikovaných na bakteriální vzorky prostřednictvím FISH metody. Realizace jednotlivých zobrazovacích metod je popsána v následujících kapitolách.

3.3.1 Optická mikroskopie

Povrch nanovlákněných nosičů biomasy byl zobrazen pomocí optického mikroskopu Olympus BX51M (Olympus Corporation, Japonsko) a softwarem QuickPHOTO MICRO 2.3. Vzorek nitě s nanovlákněnou vrstvou byl přilepen k laboratornímu sklíčku pomocí lepicí pásky pro zajištění stability vzorku. Profil vláken byl nafocen ručním posuvem a následně byly série snímků pomocí modulu Deep Focus složeny. Počet snímků v sérii byl závislý na použitém objektivu – při zvětšení 50× bylo cca 20 snímků v sérii, při zvětšení 100× bylo cca 30 snímků v sérii a při zvětšení 200× bylo cca 50 snímků v sérii.

3.3.2 Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie byla provedena na 3D optickém mikroskopu S neox (Sensofar metrology, Španělsko) s objektivem EPI 20X v35, který umožňuje bezkontaktní optické 3D profilování. Neox používá senzor s vysokým rozlišením (0,69 μm / pixel) až do 1360 \times 1024 pixelů (pozorovaná plocha 850,08 \times 709,32 μm). Vzorek nitě s nanovláknennou vrstvou byl přilepen k laboratornímu sklíčku pomocí lepicí pásky pro zajištění stability vzorku a byla na něj nanесena zlatá vrstva o tloušťce 2 nm prostřednictvím přístroje Coorum Q150R ES (Quorum Technologies, UK) pro redukci transparentnosti nanovláken. Pomocí konfokálního mikroskopu byla stanovena průměrná drsnost povrchu (Havlíček et al. 2020c).

3.3.3 Rastrovací elektronová mikroskopie

Pro detailní charakterizaci povrchové morfologie nanovláknenné vrstvy na nosné niti byl použit rastrovací elektronový mikroskop UHR FE-SEM Carl Zeiss ULTRA Plus (Carl Zeiss, Německo) při zvětšení 100 – 2500 \times v režimu SE (detektor InLens) a při akceleračním napětí 2 kV. Vzorek nosné nitě s nanovláknennou vrstvou byl pro snímkování na SEM připevněn k nosnému terčíku pomocí oboustranné uhlíkové lepicí pásky. Následně byla na vzorek nanесena zlatá vrstva o tloušťce 2 nm prostřednictvím přístroje Coorum Q150R ES (Quorum Technologies, UK), aby byla zajištěna dostatečná vodivost vzorku. Pomocí SEM byl stanoven průměr vláken v nanovláknenné vrstvě.

3.3.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskop ZEISS Axio Imager.M2 s kamerou AxioCamICc1 a světelným zdrojem Colibri.2 byl použit pro detekci fluorescenčního signálu 16S rRNA gen specifických sond ve vzorcích biomasy aplikovaných prostřednictvím FISH metody. SONDY specifické pro AOB a NOB (Nso19, Nso1225, Ntspa712 a Ntspa662; Thermo Fisher Scientific, USA) obsahovaly fluorochrom Cy3 (max excitace při 554 nm; max emise při 568 nm; červená barva) a pro jejich zobrazení byl využit filtr 43 HE (vlnové délky 550/25, FT 570 (HE), 605/70, pro-Cy3 Fluorescent Dyes). SONDY EUB (EUB338, EUB338II a EUB338III) obsahovaly fluorochrom Alexa 488 (max excitace při 490 nm; max emise při 525 nm; zelená

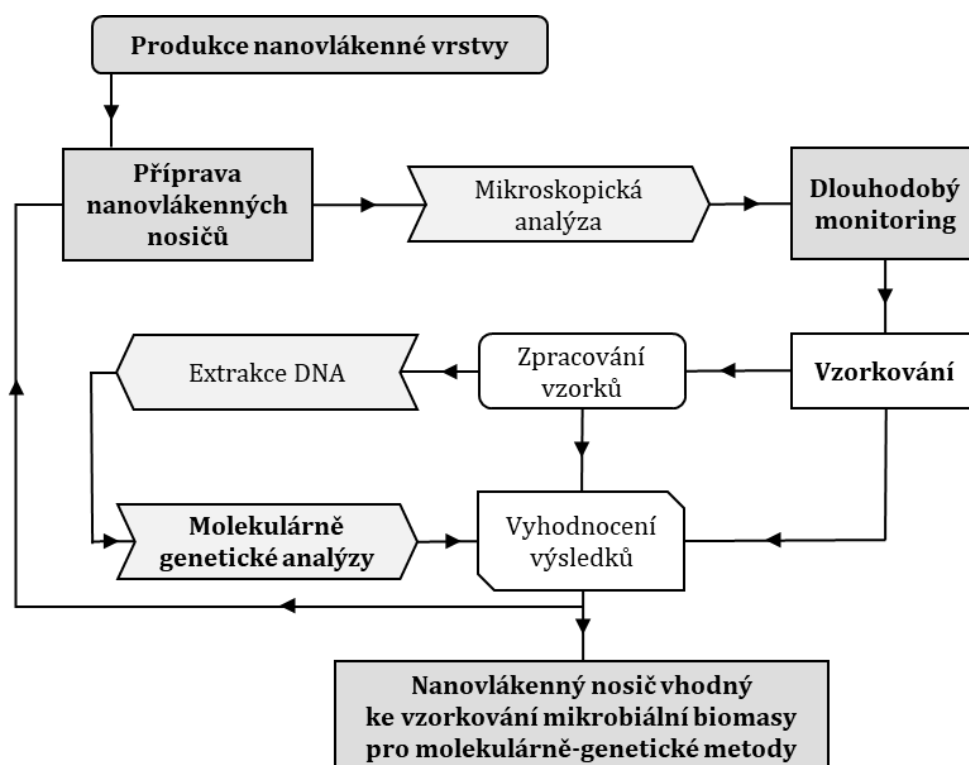
barva) a pro jejich zobrazení byl využit filtr 44 (vlnové délky 475/40, FT 500, 530/50, pro Alexa 488 Fluorescent). Pomocí programu AxioVision SE64 byly vzorky nasnímány pod příslušnými filtry při zvětšení 630×.

3.4 Schéma experimentů

V této kapitole je popsán postup řešení jednotlivých experimentů realizovaných v rámci této disertační práce.

3.4.1 Nanovláknenné nosiče pro vzorkování mikrobiální biomasy

Odběr vzorků mikrobiální biomasy je zásadní pro pochopení a kontrolu probíhajících sanačních procesů na kontaminované lokalitě, zejména při použití molekulárně-genetických analýz. V rámci tohoto experimentu bylo cílem vyvinout efektivní metodu vzorkování mikrobiální biomasy vhodnou pro molekulárně-genetické analýzy s využitím nanovláknenných nosičů biomasy. Pro dosažení tohoto cíle byly navrženy a připraveny různé tvarové varianty nanovláknenných nosičů: planární, lineární, střepec a cirkulární (viz kap. 3.1). Ke každému tvaru byla připravena varianta s nanovláknennou vrstvou o lineární hustotě 10 dtex a 3 dtex a jako reference i varianta vyrobená pouze z nosné nitě. Připravené nanovláknenné nosiče byly umístěny do monitorovacích vrtů na kontaminované lokalitě po dobu 27 měsíců, během nichž byly provedeny odběry pro monitoring mikrobiální biomasy ve formě biofilmu přítomného na povrchu jednotlivých nosičů. Izolace DNA ze vzorků nanovláknenných nosičů, podzemní vody a půdy byla provedena kitem FastDNA SPIN Kit for Soil (Tab. 2). Diagram vývoje nanovláknenného nosiče určeného pro vzorkování mikrobiální biomasy je uveden na Obr. 6.



Obrázek 6: Diagram vývoje nanovlákněného nosiče vhodného pro vzorkování mikrobiální biomasy reflektující požadavky molekulárně-genetických analýz

Vzorkovací procedura

Nanovlákněné nosiče byly upevněny do vzorkovacích patron z vysokohustotního polyethylenu a ponořeny do monitorovacích vrtů dostatečně hluboko pod hladinu podzemní vody. Po vyjmutí ze vzorkovacích patron byly nanovlákněné nosiče biomasy vloženy do sterilních uzavíratelných PE sáčků umístěny do chladicího boxu a transportovány do laboratoře při teplotě 4 °C. Vzorky podzemní vody pro NGS analýzu byly odebírány přímo z vrtu (prosté bodové vzorky) nebo metodou malého čerpaného množství (ČSN ISO 5667-11). U metody malého čerpaného množství byl proveden vlastní odběr vzorku až po ustálení fyzikálně-chemických parametrů (hodnota pH, elektrické vodivosti, ORP, koncentrace rozpuštěného O₂) v pomalu odčerpávané podzemní vodě ponorným čerpadlem Gigant (Ekotechnika, ČR). Vzorky podzemní vody byly poté filtrovány přes membránový filtr Durapore PVDF s průměrem pórů 0,22 um (Merck Millipore, Německo) pro zakoncentrování mikrobiální biomasy. Nosiče a filtry se zachycenou biomasou z podzemní vody byly před extrakcí DNA skladovány při teplotě -80 °C.

Popis lokality

Lokalita s rozdílným charakterem kontaminace podzemní vody byla vybrána pro hodnocení aplikovatelnosti připravených nanovlákných nosičů (viz kap. 3.1) pro vzorkování mikrobiální biomasy za reálných podmínek. Lokalita se nacházela v areálu společnosti Spolchemie (Ústí nad Labem, Česká republika). Tato společnost je od poloviny 20. století významnou chemickou společností v České republice, konkrétně v oblasti výroby syntetických pryskyřic. Výrobní procesy v místě vedly k historické kontaminaci půdy a podzemních vod organickými rozpouštědly, včetně monocyklických aromatických uhlovodíků (benzen, toluen, ethylbenzen a xyleny; BTEX) a chlorovaných ethenů (CLE).

Vliv charakteristik nosiče na mikrobiální kolonizaci

A. Rychlost mikrobiální kolonizace

Pro srovnání rychlosti mikrobiální kolonizace na povrchu různých nanovlákných nosičů během dlouhodobého experimentu bylo pět nosičů každé varianty (tj. kombinace tvarů a lineární hustoty nanovláken) fixováno do vzorkovacích patron a ponořeno do hloubky 7,5 – 8 m každého monitorovacího vrtu, tj. pod hladinu podzemní vody. Hladina podzemní vody se pohybovala v hloubce 3 m až 4 m pod povrchem. Délka monitoringu byla 27 měsíců. Odběr vzorků nosičů biomasy byl proveden po 4, 8, 15 a 27 měsících. Kolonizace povrchu mikrobiální biomasou přítomnou v daných vrtech byla stanovena real-time qPCR analýzou prostřednictvím markeru s označením U16SRT.

B. Mikrobiální složení biofilmu

Kromě mikrobiální kolonizace nanovlákných nosičů byl sledován také vliv tvaru nosiče a lineární hustoty nanovláken na složení mikrobiální komunity na nosičích. Za tímto účelem byla provedena NGS analýza nosičů všech testovaných tvarů s lineární hustotou nanovláken 10 dtex a planárních nosičů s lineární hustotou nanovláken 10 dtex a 3 dtex z vrtu s nejvyšším bakteriálním oživením (RW6A-7) spolu s podzemní vodou odebranou přímo z tohoto vrtu. Podzemní voda byla odebrána jako prostý bodový vzorek, který reprezentoval situaci přímo ve vrtu v čase odběru. Jako referenční nosiče byly použity planární nosiče připravené pouze z nosné nitě, tedy bez nanovlákného nánosu.

C. Porovnání mikrobiální diverzity v různých maticích

Čtyři nosiče různých tvarů s lineární hustotou nanovláken 10 dtex z vrtu RW6A-42 spolu se vzorkem podzemní vody z tohoto vrtu a vzorky půdy odebranými ve vzdálenosti 1,5 m od vrtu byly porovnány za účelem posouzení rozdílů ve složení mikrobiální komunity v různých maticích. Vrt RW6A-42 byl pro tento účel vybrán, protože v jeho bezprostřední blízkosti byla na rozdíl od dalších monitorovaných vrtů možné realizovat vrtné práce. Podzemní voda v okolí RW6A-42 byla vzorkována metodou malého čerpaného množství (viz výše; ČSN ISO 5667-11). Vzorky půdy byly odebírány vrtáním do hloubek 7,2 m a 8,4 m, tedy ze stejných hloubek, ve kterých byly nanovláknenné nosiče ponořeny ve vrtu. Mikrobiální komunita těchto vzorků byla stanovena NGS analýzou.

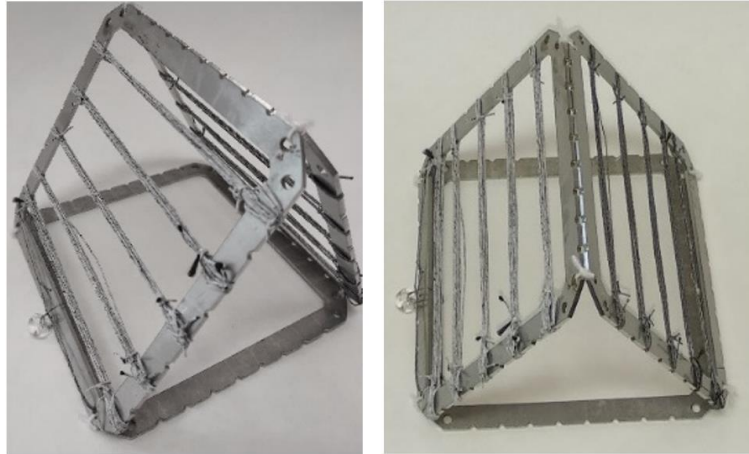
3.4.2 Nanovláknenné nosiče pro intenzifikaci biologického čištění skládkových vod

V rámci dalšího experimentu byla studována aplikace nanovláknenných nosičů biomasy pro intenzifikaci biologického čištění vod, konkrétně odstraňování amoniakálního dusíku ze skládkové vody.

V první etapě experimentu byly testována nanovláknna vyrobena DC elektrospinningem a AC elektrospinningem (viz kap. 3.1). Na základě výsledků molekulárně-genetických analýz z první etapy byl zvolen typ nanovláken (DC či AC) pro dlouhodobý provoz bioreaktorů v druhé etapě. Cílem první etapy bylo porovnat mikrobiální kolonizaci mezi nanovláknny připravenými odlišnými technologiemi. Cílem druhé etapy experimentu bylo otestovat vliv přítomnosti nanovláknenných nosičů biomasy a stupně předčištění surové skládkové vody na výkonnost laboratorního bioreaktoru, s důrazem na účinnost odstraňování amoniakálního dusíku a stabilitu procesu nitrifikace. Stabilita nitrifikace byla monitorována pomocí chemických a fyzikálně-chemických analýz přítoku a odtoku, a zároveň pomocí molekulárně-genetických analýz suspenze v systému a biofilmu přítomného na nosičích. Hlavní pozornost byla soustředěna především na vývoj citlivých a pomalu rostoucích nitrifikačních bakterií, které jsou vhodným identifikátorem stability čistírenského procesu.

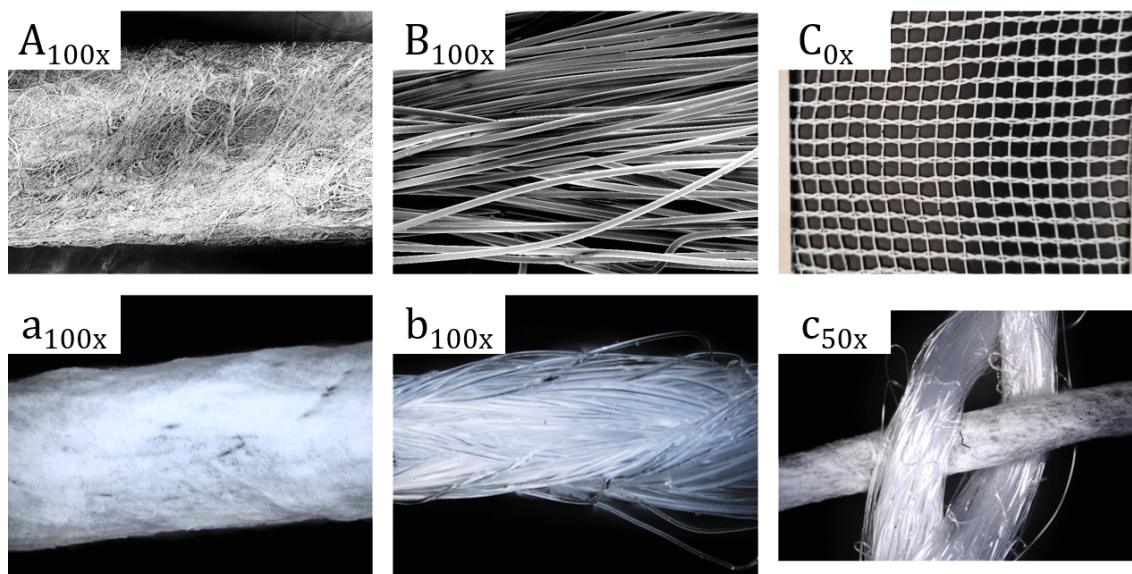
Nanovláknenné nosiče

Nanovláknenné nosiče testované v první etapě experimentu byly tvořeny nosnou nití s nanovláknenným nánosem upevněnou na nerezovou podpůrnou konstrukci – viz kap. 3.1. Fotografie nosičů použitých v první etapě experimentu jsou na Obr. 7.



Obrázek 7: Snímek nosné nitě s nanovláknny DC a AC zafixované na podpůrnou konstrukci (10 x 10 cm) před zanořením

V druhé etapě experimentu byla modifikována struktura nosičů. Pro zvýšení mechanické stability nitě s nanovláknennou vrstvou v podpůrné konstrukci byla do konstrukce přidána pomocná mikrovláknna kolmo propletená s nitěmi s nanovláknennou vrstvou vytvářející textilní mřížku (viz kap. 3.1). Fotografie textilní mřížky společně s mikroskopickými snímky nitě s nanovláknennou vrstvou a pomocného vlákna je na Obr. 8.



Obrázek 8: Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (A, B) a z optického mikroskopu (a, b) nitě s PU nanovláknennou vrstvou (A, a) a mikrovláknenné nitě (B, b) při zvětšení 100×. Fotografie a snímek z optického mikroskopu textilní mřížky (C), (c) při zvětšení 50×.

Provoz bioreaktorů

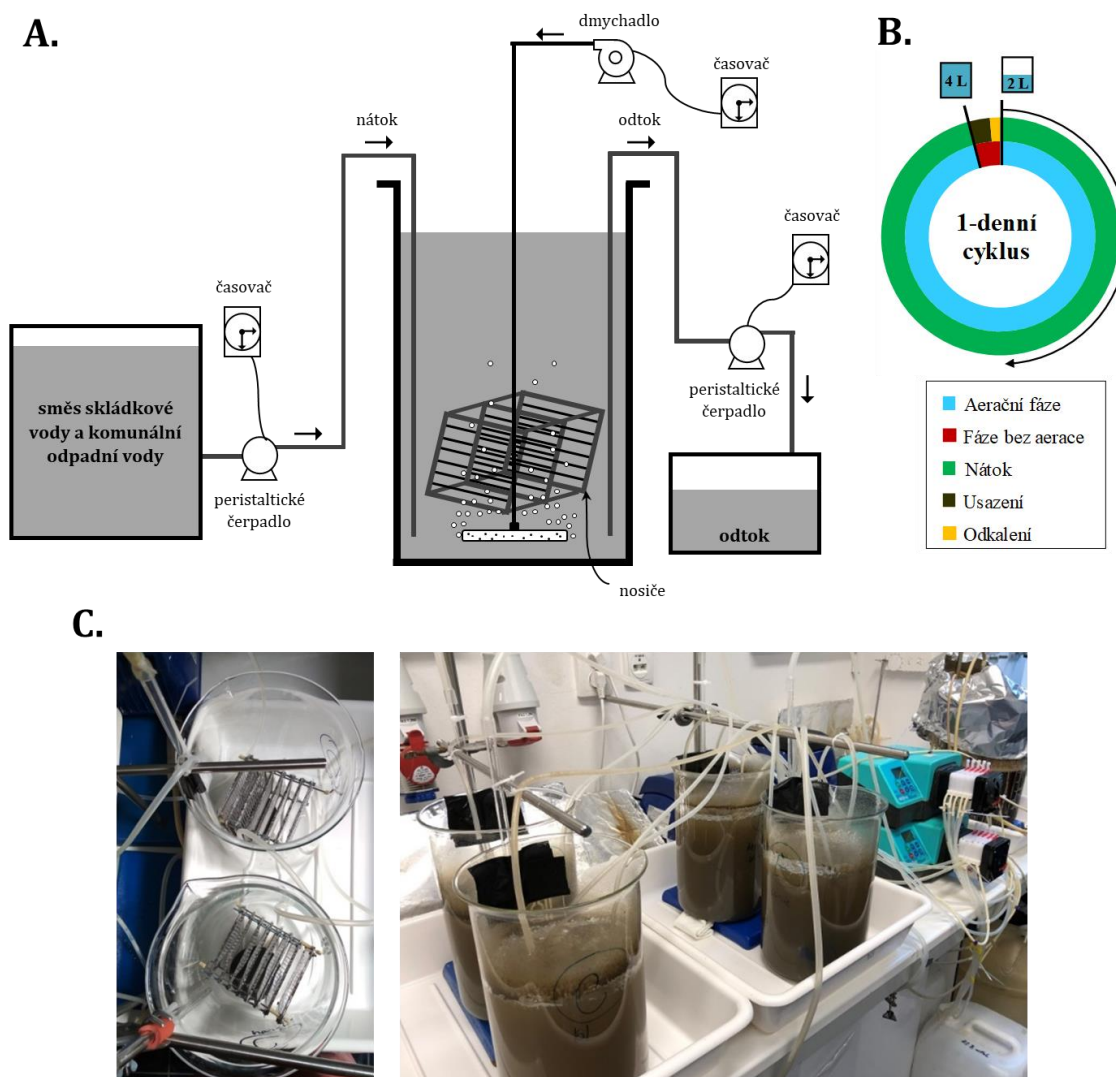
V rámci první etapy byly nosiče biomasy (Obr. 7) zanořeny do dvou vsádkových bioreaktorů R1 a R2, které se lišily předúpravou skládkové vody v nátohu. Jako nátok byla do bioreaktorů použita směs výluhu ze skládky odpadu Tušimice a surové komunální vody z ČOV Liberec. V průběhu experimentu se podíl skládkové vody v nátohu krokově zvýšil z 25 % na 35 %. V R2 byla skládková voda před vstupem do bioreaktoru prooxidována plynným ozonem, zatímco v R1 nebyla provedena žádná předúprava vstupující skládkové vody. Předúprava skládkové vody do bioreaktoru R2 byla provedena pomocí ozonu vyrobeného z okolního vzduchu ozonovým generátorem ANNIHILATOR (OZONTECH, s.r.o., ČR) o produkčním výkonu $6 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \text{ O}_3$. Nitě byly testovány v bioreaktorech po dobu 36 dnů. Odběr vzorků nosičů biomasy společně se vzorky suspenze byl proveden po 3, 8, 14, 24 a 36 dnech, v případě vzorku suspenze i v den zanoření nosičů (den 0). Izolace DNA z odebraných vzorků byla provedena pomocí NucleoSpin Soil kitu (viz kap. 3.2.2; Tab. 3). Mikrobiální kolonizace nosičů biomasy byla monitorována real-time qPCR analýzou prostřednictvím markeru s označením U16SRT univerzálního pro archea a bakterie a markerů specifických pro nitrifikační bakterie, tj. amoniak oxidujících (AOB; *amoA*) a dusitan oxidujících (NOB; NSR, *nxrB*,

NxrB1, nxrA) bakterií, a denitrifikační bakterie (*nirK, nirS, nosZ*). Detailní informace k použitým markerům jsou uvedeny v kap. 3.2.3. Na základě výsledků molekulárně-genetických analýz, konkrétně abundance nitrifikačních bakterií, byl vybrán typ nanovláken (AC), který byl dále použit pro dlouhodobý experiment v průběhu 2. etapy.

V 2. etapě byl vliv přítomnosti nanovláknenných nosičů biomasy (Obr. 8) a stupně předúpravy surové skládkové vody testován pomocí 4 různých vsádkových bioreaktorů. Každé experimentální uspořádání se skládalo ze skleněné nádoby o objemu 4 l s plochým dnem a aeračním elementem (Obr. 10A, C). Jednotlivé bioreaktory (označení A, B, C a D) se lišily předúpravou surové vody a přítomností nanovláknenných nosičů biomasy (Obr. 9). U bioreaktorů B a D byla jako směs s komunální odpadní vodou použita skládková voda prooxidovaná plynným ozonem, zatímco u bioreaktorů A a C byla použita skládková voda bez úpravy. Nanovláknenné nosiče byly instalovány v bioreaktorech C a D.

	Bez nosičů	Nanovláknenné nosiče
Surová voda bez úpravy	Bioreaktor A	Bioreaktor C
Prooxidovaná voda	Bioreaktor B	Bioreaktor D

Obrázek 9: Přehled charakteristik testovaných laboratorních bioreaktorů



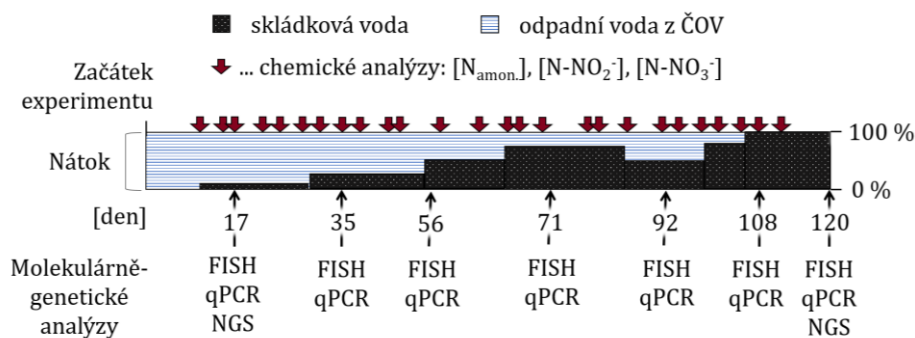
Obrázek 10: Schéma laboratorního bioreaktoru s nosiči biomasy (A), diagram provozu bioreaktoru během 24 h (B) a fotografie všech experimentálních uspořádání v provozu (C)

Jako nátok byla do všech bioreaktorů použita směs skládkové vody (Tab. 10) ze skládky tuhého komunálního odpadu Osečná (Liberecký kraj) a komunální odpadní vody (Tab. 10) z ČOV Liberec. Předúprava skládkové vody do bioreaktorů B a D byla provedena pomocí ozonu stejnou technologií jako v první etapě. Ve všech bioreaktorech byl v průběhu experimentu krokově zvyšován podíl skládkové vody: 0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 % a 100 % (Obr. 11). Podíl skládkové vody byl v nátoce do bioreaktorů zvýšen, pokud ve všech bioreaktorech byla minimálně po dobu 10 dní zaznamenána vysoká a stabilní účinnost odstraňování N_{amon} . i dostatečně vysoká a stabilní účinnost odstraňování organických látek

kvantifikovaných sumárním parametrem CHSK_{Cr} . Všechna experimentální uspořádání byla provozována při laboratorní teplotě $\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ s hydraulickou dobou zdržení 48 hodin. Diagram provozu bioreaktorů je znázorněn na Obr. 10B.

Tabulka 10: Koncentrace vybraných ukazatelů ve skládkové vodě a v komunální odpadní vodě

Parametr	Jednotka	Komunální odpadní voda	Skládková voda	Ozonizovaná skládková voda
CHSK_{Cr}	$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	320	1060	870
$\text{N}_{\text{amon.}}$	$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	17,5	159	153
N-NO_3^-	$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	3,43	2,66	2,44
N-NO_2^-	$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	0,709	0,14	1,28
pH	-	7,02	7,45	7,29



Obrázek 11: Diagram provozu a monitoringu laboratorních bioreaktorů

Časová osa jednotlivých analýz v rámci monitoringu je znázorněna na Obr. 11. Koncentrace jednotlivých forem dusíku ($\text{N}_{\text{amon.}}$, N-NO_2^- a N-NO_3^-) byly stanoveny fotometricky pomocí spektrofotometru Hach-Lange DR6000 UV-VIS (Hach, Německo) a adekvátního kyvetového testu (kyvetové testy LCK303, LCK304, LCK339, LCK340, LCK341 a LCK342; Hach, Německo) provedeného podle pokynů výrobce. Kontrolní měření a úprava hodnoty pH byly prováděny pravidelně pomocí HQ40D Portable Multi Meter a Intellical PHC101 pH elektrody (Hach, Německo). Vývoj jednotlivých skupin nitrifikačních bakterií, tj. AOB a NOB, byl v suspenzi a na nosičích monitorován pomocí fluorescenční in-situ hybridizace (FISH), real-time qPCR analýzy a sekvenování nové generace (NGS). Na rozdíl od první etapy byla pro monitoring NOB *Nitrobacter* pomocí qPCR analýzy použita kombinace markerů *NxrB1* a Nitro místo *NxrB1* a *nxA*, protože pomocí markeru

s označením Nitro lze detekovat 16S rRNA gen specifický pro *Nitrobacter*. Metodika jednotlivých molekulárně-genetických metod společně s jejich hodnocením je podrobně popsána v kap. 3.2.

3.4.3 Vývoj sterilizační metody nanovláknenných nosičů

V rámci této části disertační práce probíhal vývoj sterilizační metody nanovláknenných nosičů, která by zajišťovala dosažení povrchové čistoty nosičů v podobě absence veškerého nežádoucího mikrobiálního osídlení. Zároveň byl kladen důraz na dopad sterilizace na materiálové a strukturální vlastnosti nosičů, zejména na nanovrstvu. Na rozdíl od předchozích částí této práce byly v této části použity i metody kultivační, jejichž metodika je podrobně popsána v této kapitole společně s technologickými protokoly sterilizačních metod.

Příprava a charakterizace nanovláknenných nosičů

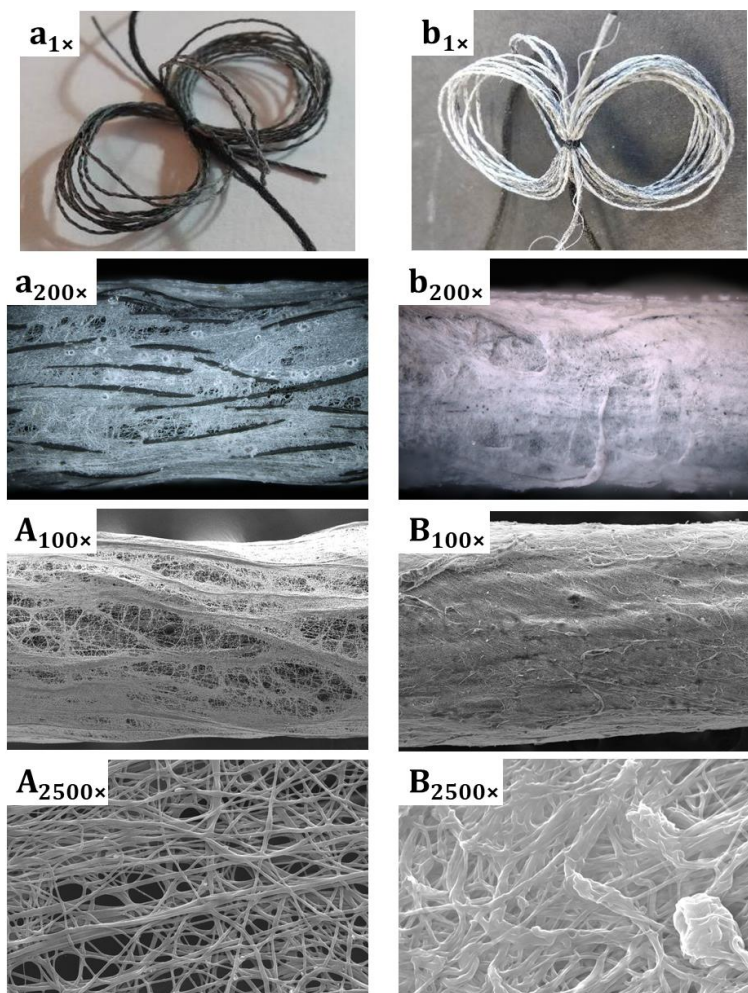
Pro testování vyvíjené metody sterilizace byly použity cirkulární nosiče vyrobené z nosné nitě z polyesterového hedvábí SLOTERA (jemnost 1200 dtex) o délce 1 m (Obr. 12) s nanovláknennou vrstvou na bázi PU vyrobenou DC elektrospinningem (10 dtex), tzv. DC nosič, a AC elektrospinningem (2x230 dtex), tzv. AC nosič. Cirkulární tvar nosiče byl zvolen jako nejvhodnější, jelikož se sestává pouze z nosné nitě s nanovláknenným nánosem a neobsahuje žádné další materiály (podpůrné konstrukce, lepidlo, výztuže apod.), což je vhodné zejména pro kultivační a molekulárně-genetické analýzy.



Obrázek 12: Technický výkres cirkulárního nanovláknenného nosiče použitého pro testování vyvíjené sterilizační metody (dimenze v mm)

Jeden z hlavních faktorů při vývoji sterilizační metody nanovláknenných nosičů byl dopad její aplikace na morfologii nanovláknenné vrstvy. Nanovláknenné nosiče použité pro vývoj sterilizační metody jsou zobrazeny na Obr. 13. Zároveň jsou uvedeny snímky nosné nitě s nanovláknenným nánosem z optického a rastrovacího

elektronového mikroskopu (SEM) dokumentující strukturu a charakter nanovláken. Vlastnosti nanovláčenné vrstvy mohou ovlivnit účinnost sterilizace, například vyšší lineární hustota nanovláken může vést k většímu počtu míst kolonizovaných mikroorganismy, které jsou méně přístupné účinkům sterilizačních činidel.

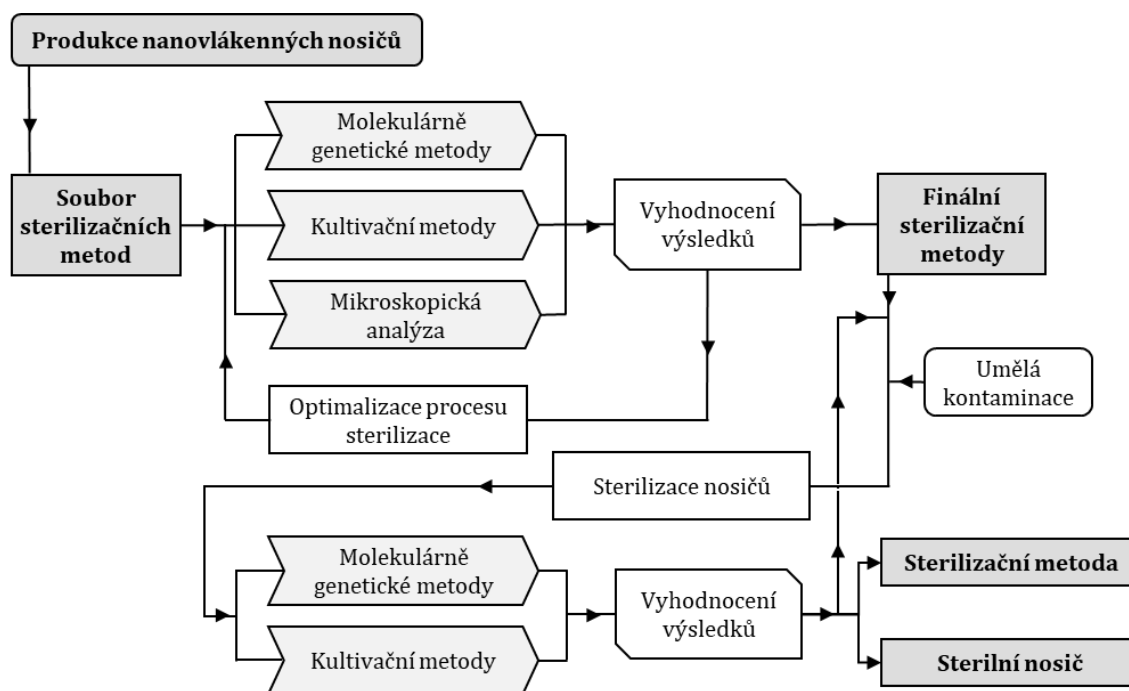


Obrázek 13: Fotografie nanovláčenných nosičů a snímky nosných nití s nanovláčny vyrobenými pomocí DC elektrospinningu (A, a) a AC elektrospinningu (B, b) z optického mikroskopu (a, b) a rastrovacího elektronového mikroskopu (A, B) při různém zvětšení (100×, 200× a 2500×).

Sterilizační metody

Nanovláčenné nosiče biomasy byly sterilizovány souborem metod, které jsou rozděleny podle charakteru působení na mikroorganismy do dvou základních skupin, a to na metody fyzikální sterilizace a metody chemické sterilizace. Obr. 14 uvádí posloupnost vývoje sterilizační metody vhodné pro nanovláčenné nosiče.

V následujících podkapitolách jsou stručně popsány jednotlivé sterilizační metody, které byly testovány na DC nosičích a AC nosičích.



Obrázek 14: Diagram vývoje sterilizační metody nanovláknenných nosičů

A. Fyzikální sterilizační metody

Celkem bylo na nanovláknenných nosičích testováno sedm fyzikálních sterilizačních metod. V souboru fyzikálních metod sterilizace byla studována sterilizace při vysoké teplotě, při vysokém tlaku, zářením o různé frekvenci (UV, mikrovlny, gama), vysokofrekvenční plazmou a ultrazvukem. U dvou metod (sterilizace vlhkým teplem a ultrazvukem) bylo navíc testováno, zda má na účinnost sterilizace vliv prostředí nosiče, konkrétně byl testován nosič ponořený v destilované vodě a nosič v suchém stavu. Detailní postupy u jednotlivých fyzikálních metod sterilizace jsou uvedeny v Tab. 11.

Tabulka 11: Přehled testovaných fyzikálních sterilizačních metod

Sterilizační metoda	Popis metody
Sterilizace vlhkým teplem (autokláv) v suchém stavu	Nanovláknenné nosiče byly umístěny do suché 100ml laboratorní skleněné láhve, která byla vložena do autoklávu Unisteri HP 336, kde proběhla sterilizace podle zvoleného sterilizačního programu ⁵ .
Sterilizace vlhkým teplem (autokláv) v destilované vodě	Nanovláknenné nosiče byly ponořeny do sterilní destilované vody ve 100ml laboratorní skleněné láhvi, která byla vložena do autoklávu Unisteri HP 336, kde proběhla sterilizace podle zvoleného sterilizačního programu ⁵ .
Sterilizace suchým teplem	Nanovláknenné nosiče byly umístěny do suché 100ml laboratorní skleněné láhve, která byla vložena do laboratorní sušárny VENTICELL 55 (BMT), kde proběhla sterilizace při teplotě 160 °C po dobu 120 min.
Sterilizace ultrazvukem v suchém stavu	Nanovláknenné nosiče byly vloženy do 100ml laboratorní skleněné láhve. Po jejím hermetickém uzavření byla láhev umístěna do vodní ultrazvukové lázně na 15 minut (frekvence 35 kHz, teplota 20 °C).
Sterilizace ultrazvukem v destilované vodě	Nanovláknenné nosiče byly ponořeny do sterilní destilované vody ve 100ml laboratorní skleněné láhvi. Po jejím hermetickém uzavření byla láhev umístěna do vodní ultrazvukové lázně na 15 minut (frekvence 35 kHz, teplota 20 °C).
Světelná sterilizace (UV)	Nanovláknenné nosiče byly umístěny na sterilní hodinové sklo, které bylo vloženo do PCR boxu UV Sterilizing Workstation (UVP), kde proběhla sterilizace pomocí UV záření o vlnové délce 254 nm po dobu 30 min.
Sterilizace mikrovlnným zářením	Nanovláknenné nosiče byly umístěny na sterilní hodinové sklo, které bylo vloženo do mikrovlnné trouby, kde proběhla sterilizace pomocí mikrovlnného záření o frekvenci 2450 MHz po dobu 1 min.
Sterilizace RF plazmou	Nanovláknenné nosiče byly umístěny na sterilní laboratorní sklo a vloženy do zařízení technologií PACVD (Radio Frequency Plasma Activated Chemical Deposition) od firmy PREVAC. Nosiče byly vystaveny vysokofrekvenčnímu elektrickému poli po dobu 1 min při parametrech napětí 120 V, frekvence 13,5 MHz a tlaku 30 Pa.
Radiační sterilizace	Nanovláknenné nosiče byly umístěny do sterilního uzavíratelného PE sáčku. Následně nosiče byly vystaveny dávce 25 kGy gama záření dle normy ČSN EN ISO 11137-2 „Sterilizace výrobků pro zdravotní péči - Sterilizace zářením - Část 2: Určení sterilizační dávky“ ve firmě BIOSTER, a.s.

⁵ Parametry sterilizačního programu autoklávu:

- sterilizační teplota: 121 °C (tlak ~ 211 kPa)
- sterilizační doba: 30 min
- počet evakuací: 4
- nastavený tlak při evakuaci: 8,0 kPa (evakuace 1); 10,0 kPa (evakuace 2-4)
- počet fází sušení: 2
- nastavená doba sušení: 2 min

B. Chemické sterilizační metody

Celkem bylo na nanovláknenných nosičích testováno sedm chemických sterilizačních metod. V souboru chemických metod sterilizace byla studována sterilizace absolutním ethanolem, peroxidem vodíku, ozonem, ethylenoxidem, roztokem chlornanu sodného a hydroxidu sodného, oxidem chloričitým a glutaraldehydem. U sterilizace ozonem bylo navíc testováno, zda má na účinnost sterilizace vliv prostředí nosiče, konkrétně byl testován nosič ponořený v destilované vodě a nosič v suchém stavu. Detailní postupy jednotlivých chemických metod sterilizace jsou uvedeny v Tab. 12.

Tabulka 12: Přehled jednotlivých chemických sterilizačních metod

Sterilizační metoda	Popis metody
Sterilizace absolutním ethanolem	Do sterilní 50ml zkumavky bylo napipetováno 50 ml absolutního ethanolu. Nanovlákněné nosiče byly ponořeny do absolutního ethanolu po dobu 5 min. Během této doby byla zkumavka vortexována. Následně byly nanovlákněné nosiče vyjmuty a promyty 3krát ve sterilní destilované vodě pro odstranění reziduí sterilizační látky - ethanolu. Stejný postup platí i pro delší čas 6 h.
Sterilizace peroxidem vodíku (30%)	Do sterilní 50ml zkumavky bylo napipetováno 50 ml 30% roztoku peroxidu vodíku. Nanovlákněné nosiče byly ponořeny do peroxidu vodíku po dobu 5 min. Během této doby byla zkumavka vortexována. Následně byly nanovlákněné nosiče vyjmuty a promyty 3krát ve sterilní destilované vodě pro odstranění reziduí sterilizační látky – peroxidu vodíku.
Sterilizace roztokem NaClO a NaOH	Do sterilní kádinky bylo odměřeno 300 ml roztoku NaClO s NaOH (SAVO; obsah volného chloru 95 %; 3-5 % NaClO + 0,1-1 % NaOH) v ředění 2:9 s destilovanou vodou. Nanovlákněné nosiče byly ponořeny do tohoto vodného roztoku po dobu 30 s. Následně byly nanovlákněné nosiče vyjmuty a promyty 3krát ve sterilní destilované vodě pro odstranění reziduí sterilizační látky. Stejný postup platí i pro delší časy 15 min a 30 minut.
Sterilizace oxidem chloričitým 0,006%, 0,015%, 0,03% a 0,3%	Do sterilní kádinky bylo odměřeno 300 ml 0,03% vodného roztoku oxidu chloričitého. Nanovlákněné nosiče byly ponořeny do 0,03% vodného roztoku oxidu chloričitého po dobu 10 až 50 min. Následně byly nanovlákněné nosiče vyjmuty a promyty 3krát ve sterilní destilované vodě pro odstranění reziduí sterilizační látky – oxidu chloričitého. Stejný postup platí i pro další koncentrace (0,3%, 0,015% a 0,006%) roztoku oxidu chloričitého.
Sterilizace glutaraldehydem 1% a 2%	Do sterilní kádinky bylo odměřeno 300 ml 2%, příp. 1% vodného roztoku glutaraldehydu. Nanovlákněné nosiče byly ponořeny do tohoto roztoku po dobu 60 až 240 min. Následně byly nanovlákněné nosiče vyjmuty a promyty 3krát ve sterilní destilované vodě pro odstranění reziduí sterilizační látky – glutaraldehydu.
Sterilizace ozonem v suchém stavu	Nanovlákněné nosiče byly umístěny do skleněné průtočné kolony, ke které byl připojen zdroj plynného ozonu. Expozice nanovlákněných nosičů ozonu trvala 30 min. Vývoj ozonu byl zajištěn pomocí generátoru ozonu OT6 (OZONTECH, s.r.o., ČR), řada ANNIHILATOR, který produkuje ozon ze vzduchu. Produkce ozonu byla udržována na 10 g/h, což odpovídá koncentraci ozonu 2 obj. %.
Sterilizace ozonem v destilované vodě	Nanovlákněné nosiče byly umístěny do skleněné kolony naplněné destilovanou vodou. Ke koloně byl připojen zdroj plynného ozonu z generátoru ozonu OT6 (OZONTECH, s.r.o., ČR), řada ANNIHILATOR, který produkuje ozon ze vzduchu. Produkce ozonu byla udržována na 10 g/h, což odpovídá koncentraci ozonu 2 obj. %. Expozice nosičů trvala 30 min.
Sterilizace ethylenoxidem	Sterilizace nanovlákněných nosičů probíhala ve sterilizátoru Anprolene AN 74i (H.W.Andersen Products Ltd., Velká Británie) dle platné normy ČSN EN ISO 11135. Nosiče byly před samotným procesem sterilizace vloženy do sterilizační role (EUROSTERIL; Euronda, Itálie), v níž byly uzavřeny pomocí svářečky sterilizačních obalů (MILLSEAL PLUS MANUAL; MOCOM, Itálie). Sterilizace ethylenoxidem probíhala za laboratorní teploty po dobu 12 h. Následovalo odvětrání materiálů pro eliminaci reziduí po dobu 7 dní při laboratorní teplotě.

Identifikace dopadu sterilizace

Hodnocení strukturálních změn nanovláknenné vrstvy po aplikaci sterilizačních metod bylo provedeno jak s využitím optického mikroskopu Olympus BX51M při zvětšení 100× a 200×, tak s využitím rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) značky Carl Zeiss ULTRA Plus, a to při zvětšení 100×, 500× a 2500×.

Hodnocení účinnosti sterilizace

Sterilita nanovláknenných nosičů po aplikaci sterilizační metody byla hodnocena prostřednictvím kombinace metod mikrobiologických (kultivačních) a molekulárně-genetických. V případě molekulárně-genetických metod bylo provedeno měření koncentrace DNA a qPCR analýza pomocí markeru U16SRT. Izolace DNA z nanovláknenných nosičů byla provedena kitem FastDNA SPIN Kit for Soil (Tab. 2). Metodika molekulárně-genetických metod je podrobně popsána v kap. 3.2. Sterilita nanovláknenného nosiče byla prokázána absencí mikroorganismů zaznamenanou kultivačními mikrobiologickými metodami, koncentrací DNA pod limitem detekce ($< 0,01 \text{ ng}/\mu\text{l}$) a Ct hodnotami na úrovni kontroly bez templátu (NTC).

Po selekci souboru metod s nejvyšší účinností sterilizace, jejíž aplikací se nemění materiálové ani strukturální vlastnosti nosičů, byly pro validaci těchto metod včetně nanovláknenných nosičů z výroby sterilizovány také nosiče uměle kontaminované referenčním kmenem *Bacillus pumilus* CCM 2218, a to jak ve formě vegetativních buněk, tak ve formě spor. Kmen CCM 2218 pochází z České sbírky mikroorganismů (CCM) se sídlem v Brně a dle dostupných údajů se jedná o kmen používaný k testům sterility dle British Pharmacopoeia.

Protokol umělé kontaminace

Rod *Bacillus* je považován za jeden z mnoha bioindikátorů primární a sekundární kontaminace surovin a potravin. *Bacillus pumilus* je bakterie běžně se vyskytující v půdě. Má schopnost tvořit velmi tvrdé, ochranné endospory, což umožňuje jeho přežití i v extrémních podmínkách životního prostředí. Bakterie *Bacillus pumilus* je díky své schopnosti přežít nepříznivé podmínky vhodný biologický indikátor pro kontrolu účinnosti sterilizační technologie.

Za účelem umělé kontaminace nanovláknenných nosičů referenčním kmenem *Bacillus pumilus* CCM 2218 ve formě vegetativních buněk byl proveden následující postup:

- 1) Inokulum referenčního kmene *Bacillus pumilus* CCM 2218 bylo připraveno inokulací kmene narostlého na *Bacillus* médiu (10 obj. %) do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml *Bacillus* média (HM Peptone B Broth (Himedia M807); složení: pepton ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), HM pepton B ($3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) a NaCl ($5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)). Baňka s inokulem byla umístěna na třepačku.
- 2) Kultivace probíhala cca 23-25 h při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 3) Standardně rostoucí kmen by měl mít v daném časovém rozmezí následující parametry: hodnotu pH v rozmezí 7 - 7,2, optickou densitu při vlnové délce 420 nm (OD_{420}) = 2,4 - 2,5 a k tomu odpovídající KTJ (kolonie tvořící jednotku) cca 10^{13} buněk v 1 ml.
- 4) Budou-li uváděné hodnoty platné, pak lze kmen buď naředit desítkovým ředěním na 10^6 , nebo upravit jeho optickou densitu na hodnotu přibližně $\text{OD}_{420} = 0,6$, čímž je rovněž získáno příslušné ředění. Bod 4 je platný pouze v případě, že kultivace proběhla standardně a splňuje parametry definované v bodě 3.
- 5) Vzorky nanovláknenných nosičů byly ponořeny do suspenze buněk kmene *Bacillus pumilus* CCM 2218 s koncentrací nativních buněk 10^6 a byly umístěny na třepačku po dobu 5 min.
- 6) Poté byly nanovláknenné nosiče vyjmuty ze suspenze sterilní pinzetou a ponechány cca 5 - 10 min v aseptickém boxu (flowboxu) pro usušení.
- 7) Následovala aplikace vybrané sterilizační metody za daných podmínek.

Za účelem umělé kontaminace nanovláknenných nosičů referenčním kmenem *Bacillus pumilus* CCM 2218 ve formě spor byl proveden následující postup:

- 1) Inokulum spor referenčního kmene *Bacillus pumilus* CCM 2218 bylo připraveno inokulací kmene narostlého v Nutrient Broth do sporulačního média pro *Bacillus pumilus* (0,8 % Nutrient Broth, $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ MnCl_2 , $0,7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CaCl_2 , $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ MgCl_2 a 500 ml destilované vody). Po týdnu byl kmen přeočkován opět do sporulačního média.
- 2) Pro otestování přítomnosti spor byl odebrán vzorek kultury a inkubován při teplotě $70 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 40 min ve vodní lázni. Po inkubaci byl vzorkem

kultury inokulován sterilní Nutrient Broth. Pokud se Nutrient Broth výrazně zakalil, byla potvrzena přítomnost spor.

- 3) Po potvrzení přítomnosti spor bylo s inokulem ve sporulačním médiu za účelem umělé kontaminace nosičů zacházeno jako s běžným inokulem *Bacilla* v Nutrient Broth.

Kultivační mikrobiologické metody

Kultivační mikrobiologická metoda detekce přítomných mikroorganismů na (ne)sterilizovaných vzorcích nanovlákných nosičů spočívala v jejich zanoření do vhodného kultivačního (živného) média. Tato metoda eliminovala řadu problémů souvisejících s potenciálním nedostatečným uvolněním buněk z povrchu nosiče a zároveň docházelo k významnému zvýšení citlivosti této kultivační metody. Zvýšení citlivosti metody spočívalo ve skutečnosti, že i jediná nativní buňka (která odolala sterilizačnímu procesu) byla v tomto typu testů zachytitelná, kultivovatelná, a tedy detekovatelná. Použitý prováděcí protokol je následující:

- 1) Byla změřena počáteční optická denzita při vlnové délce 420 nm (OD_{420}) kultivačních médií.
- 2) Vzorek analyzovaného nanovlákného nosiče (vždy 1 ks) byl po/bez procesu sterilizace ponořen do 100 ml vhodného sterilního kultivačního média umístěného ve sterilních 250 ml Erlenmeyerových baňkách. V tomto případě byly použity dva typy médií: *Bacillus* médium a Nutrient Broth, běžně používané médium ke kultivaci široké škály mikroorganismů.
- 3) Vzorky v uzavřených baňkách byly následně umístěny na třepačku a kultivovány při laboratorní teplotě a při teplotě 30 °C po dobu 24 h a 48 h.
- 4) Po 24 hodinách inkubace byla proměřena OD_{420} kultivačních médií, případně provedeno kultivační vyšetření na agarových plotnách (PCA) a odečteny počty mikroorganismů (KTJ). Při nejistotě ohledně zvýšení OD_{420} bylo vždy provedeno vyšetření pomocí kultivace na agarových plotnách. Pokud byl předpokládán výskyt pomalu rostoucích mikroorganismů, kontrolní interval byl prodloužen.
- 5) V případě, že bylo detekováno zvýšení OD_{420} anebo byla prokázána přítomnost mikroorganismů prostřednictvím KTJ na agarových plotnách, byl test považován za pozitivní.

Výsledky kultivačních metod byly interpretovány prostřednictvím heatmapy na základě semaforového principu. Pokud byla zachycena kontaminace v některém kultivačním prostředí ve více než jednom z triplikátu, byl výsledek prezentován červeně. Oranžově byly označeny ty výsledky, kdy dva testované vzorky (z triplikátu testovaných) nevykázaly kontaminaci a třetí vzorek ano. Úplná absence mikroorganismů ve všech testovaných vzorcích byla značena zeleně.

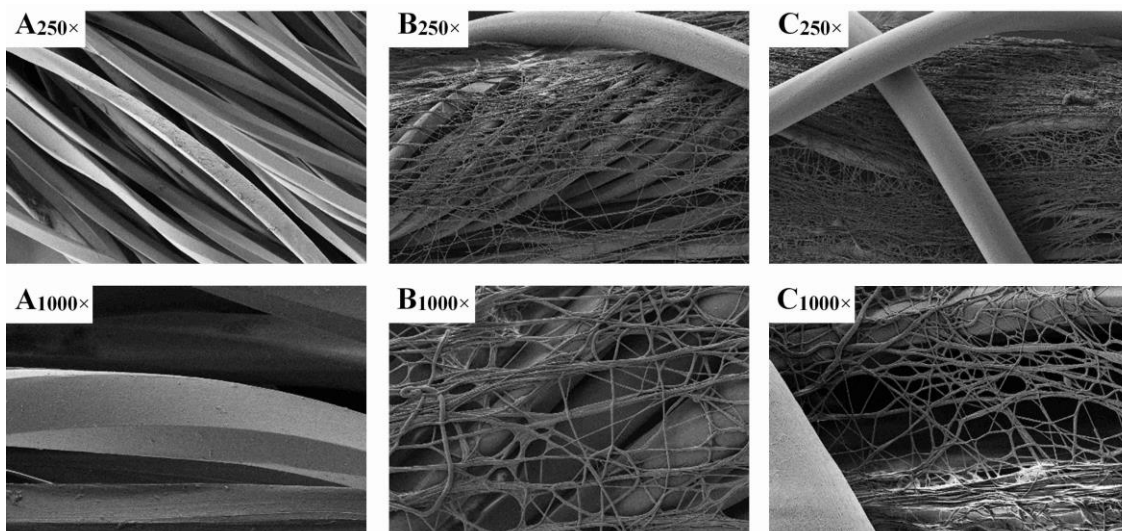
4 Výsledky a diskuze

4.1 Nanovláknenné nosiče pro vzorkování mikrobiální biomasy

Výsledky experimentů popsaných v této kapitole byly publikovány v impaktovaném časopise *Science of the Total Environment* (IF: 10,754; 2021) a v recenzovaném časopise *Vodní hospodářství*.

4.1.1 Morfologie a uspořádání nanovláknenných nosičů

Morfologie nosného vlákna s různou lineární hustotou PU nanovláknenné vrstvy byla charakterizována rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM). Na Obr. 15A je zobrazeno původní vlákno bez vrstvy nanovláken, zatímco Obr. 15B a Obr. 15C jsou SEM mikrografy nosného vlákna s nanovláknennými vrstvami s lineárními hustotami 3 dtex a 10 dtex. Jak je z těchto obrázků patrné, PU nanovláknenná vrstva vykazovala propojenou strukturu s náhodně orientovanými nanovláknky. Taková struktura poskytovala větší povrchovou plochu ve srovnání se samotnou nosnou nití. Vrstva nanovláken s vyšší lineární hustotou (10 dtex) měla menší póry mezi jednotlivými nanovláknky ve srovnání s nižší lineární hustotou (3 dtex). Tento strukturně rozmanitý povrch (vysoká pórovitost, malá velikost pórů a velký specifický povrch) byl ve studii Svobodová et al. (2019) popsán jako významný faktor pro podporu adheze buněk k povrchu. Na rozdíl od fixace buněk k hladšímu povrchu buňky adherují k nanovláknům i bez produkce extracelulárních polymerních látek, což má za následek rychlejší primární kolonizaci povrchu (Svobodová et al. 2019b).



Obrázek 15: SEM mikrografy: (A) nitě bez nanovláken, (B) nanovláčenné vrstvy o lineární hustotě 3 dtex a (C) nanovláčenné vrstvy o lineární hustotě 10 dtex; při zvětšení 250× a 1000×.

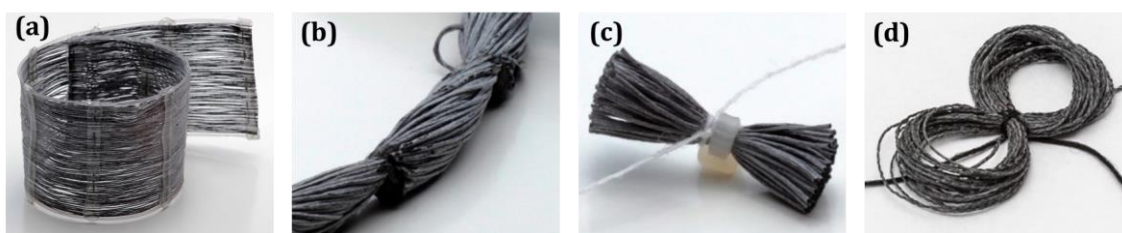
Vývoj jednotlivých prostorových tvarů nanovláčenných nosičů je společně s jejich silnými a slabými stránkami znázorněn na Obr. 16. Všechny tvarové varianty se vyznačovaly relativně nízkými nároky na výrobu. Výroba byla tudíž i relativně rychlá a nebylo zapotřebí speciálních pomůcek či nástrojů pro docílení finálních podob nosičů.



Obrázek 16: Diagram vývoje nosičů biomasy

Různé typy vyvíjených a testovaných nanovláčenných nosičů jsou zobrazeny na Obr. 17. Uspořádání nosné nitě s nanovláčennou vrstvou v planárních (Obr. 17a), strápcových (Obr. 17c) a cirkulárních (Obr. 17d) nosičích poskytlo vyšší kontaktní plochu mezi vlákny a okolím ve srovnání s lineárními nosiči (Obr. 17b), jak bylo předpokládáno při vývoji nosičů (Obr. 16). Jedním z předpokladů při vývoji lineárního nosiče byl vliv kompaktnosti vláken na mikrobiální složení

biofilmu na nosiči vytvořením místních anoxických/anaerobních podmínek uvnitř nosiče. Hlavní nevýhodou štrápcových a planárních nosičů pro molekulárně-genetickou analýzu se však ukázala přítomnost nosného materiálu (plastová rychlospojka, tavné lepidlo a silon) v jejich struktuře, který musel být před vlastní analýzou odstraněn. V případě planárních nosičů byla také určitou nevýhodou jejich velikost a menší míra flexibility. Vzhledem k tomu, že lineární a cirkulární nosiče byly složeny pouze z nosného vlákna pokrytého PU nanovláknem, nebyla nutná žádná předúprava těchto nosičů před extrakcí DNA, což byl významný fakt eliminující potenciální chyby a kontaminaci při manipulaci se vzorky před jejich analýzou.

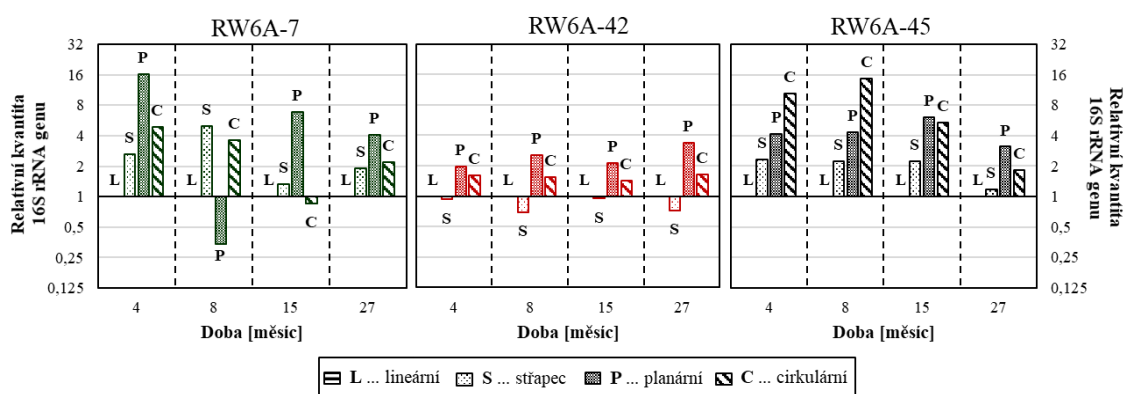


Obrázek 17: Vyvinuté tvary nanovláknenných nosičů: (a) planární nosič, (b) lineární nosič, (c) štrápcový nosič a (d) cirkulární nosič

Co se týče zpracování vzorků nanovláknenných nosičů a vzorků podzemních vod, DNA z nanovláknenných nosičů bylo možné po jejich transportu do laboratoře okamžitě extrahovat, zatímco biomasu ze vzorků podzemní vody bylo nutné zakoncentrovat prostřednictvím filtrace. Aplikace nanovláknenných nosičů tak minimalizovala potenciální kontaminaci vzorku. Nanovláknenné nosiče navíc zkrátily dobu potřebnou pro zpracování vzorků, protože filtrace vzorků podzemní vody trvala v průměru 3 hodiny a u vzorků z vrtů RW6A-7 a RW6A-42 nebylo možné z důvodu přítomnosti fáze ropných látek (BTEX) přefiltrovat více než 100 ml, což znamenalo nízký výtěžek biomasy pro následné analýzy. Obecně je filtrování vzorků vody časově náročné, protože rychlost filtrace je mnohdy významně snížena přítomností suspendovaných látek. Využití nanovláknenných nosičů navíc snižuje vystavení laboratorního personálu případným toxickým těkavým látkám přítomným v analyzované vodě během zpracování vzorků, které by mohlo vést k závažnému ohrožení zdraví pracovníka.

4.1.2 Vliv tvaru nosiče a lineární hustoty nanovláken na kolonizaci mikroorganismů

Vliv tvaru nosiče a lineární hustoty nanovláken na kolonizaci nosičů mikroorganismy byl hodnocen prostřednictvím relativní kvantifikace výsledků z real-time qPCR analýzy. Obr. 18 uvádí rozdíly mezi jednotlivými testovanými tvary nosičů; všechny tvary byly vyrobeny z nosné nitě s lineární hustotou PU nanovláken 10 dtex. Lineární nosič, na němž byla zaznamenána nejnižší bakteriální abundance ve většině odběrech v porovnání s ostatními tvary nosičů, byl zvolen jako referenční vzorek. Vzhledem k velmi nízké koncentraci biomasy detekované v monitorovacích vrtech na začátku monitoringu, bylo první vzorkování nosičů provedeno 4 měsíce po jejich zanoření.



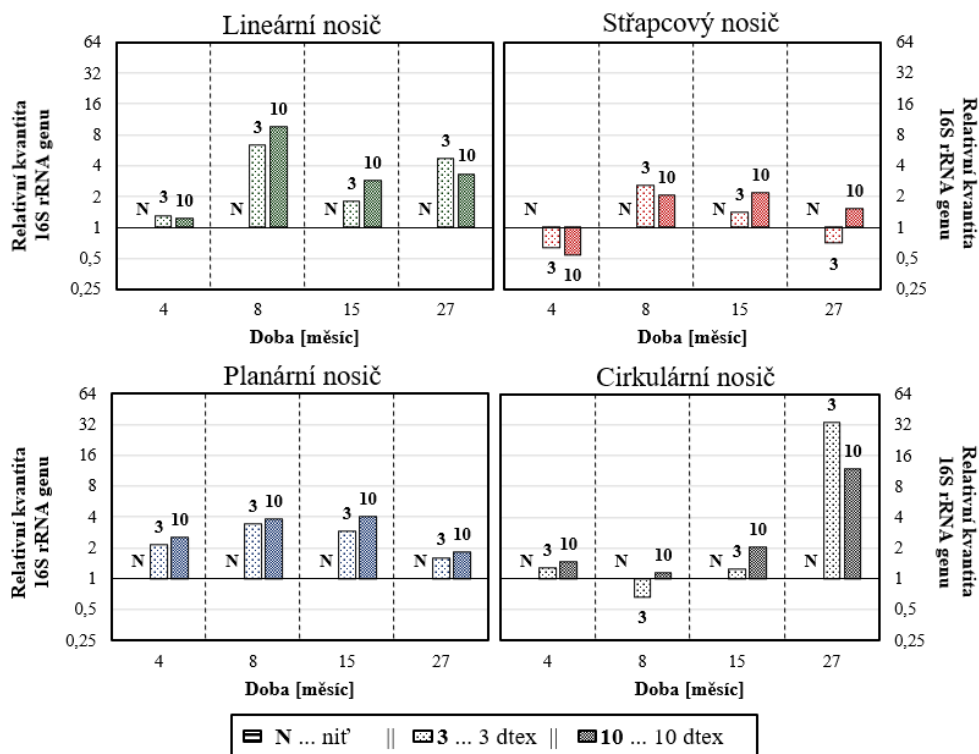
Obrázek 18: Porovnání bakteriální abundance mezi lineárním nosičem

(referenčním vzorkem) a ostatními tvary nosičů z monitorovacích vrtů prostřednictvím relativní kvantifikace. Všechny nosiče byly vyrobeny z nosné nitě s nánosem PU nanovláken o lineární hustotě 10 dtex.

Ve většině odběrech (83 %) byla detekována bakteriální abundance vyšší na nosičích cirkulárních a planárních v porovnání s dalšími dvěma tvary. Tento trend byl pravděpodobně způsoben větší kontaktní plochou vody s vlákny u cirkulárních a planárních nosičů (Obr. 17).

Vliv přítomnosti a lineární hustoty nanovlákeného nánosu na kolonizaci nosičů mikroorganismy byl hodnocen na vzorcích nosičů z monitorovacího vrtu RW6A-42. Nosiče všech testovaných tvarových variant bez nanovlákeného nánosu sloužily jako referenční vzorky pro relativní kvantifikaci (Obr. 19). V téměř všech odběrech (81 %) byla detekována bakteriální abundance vyšší na nosičích s nanovlákeným nánosem než na nosičích vyrobených pouze z nosné nitě.

Mezi nosiči s lineární hustotou nanovláken 3 dtex a 10 dtex byly pozorovány pouze nepatrné rozdíly v množství přítomné bakteriální biomasy, což mohlo být způsobeno malými rozdíly mezi jednotlivými nanovláčnými nánosy, jak je patrné z jejich struktur zobrazených na Obr. 15.



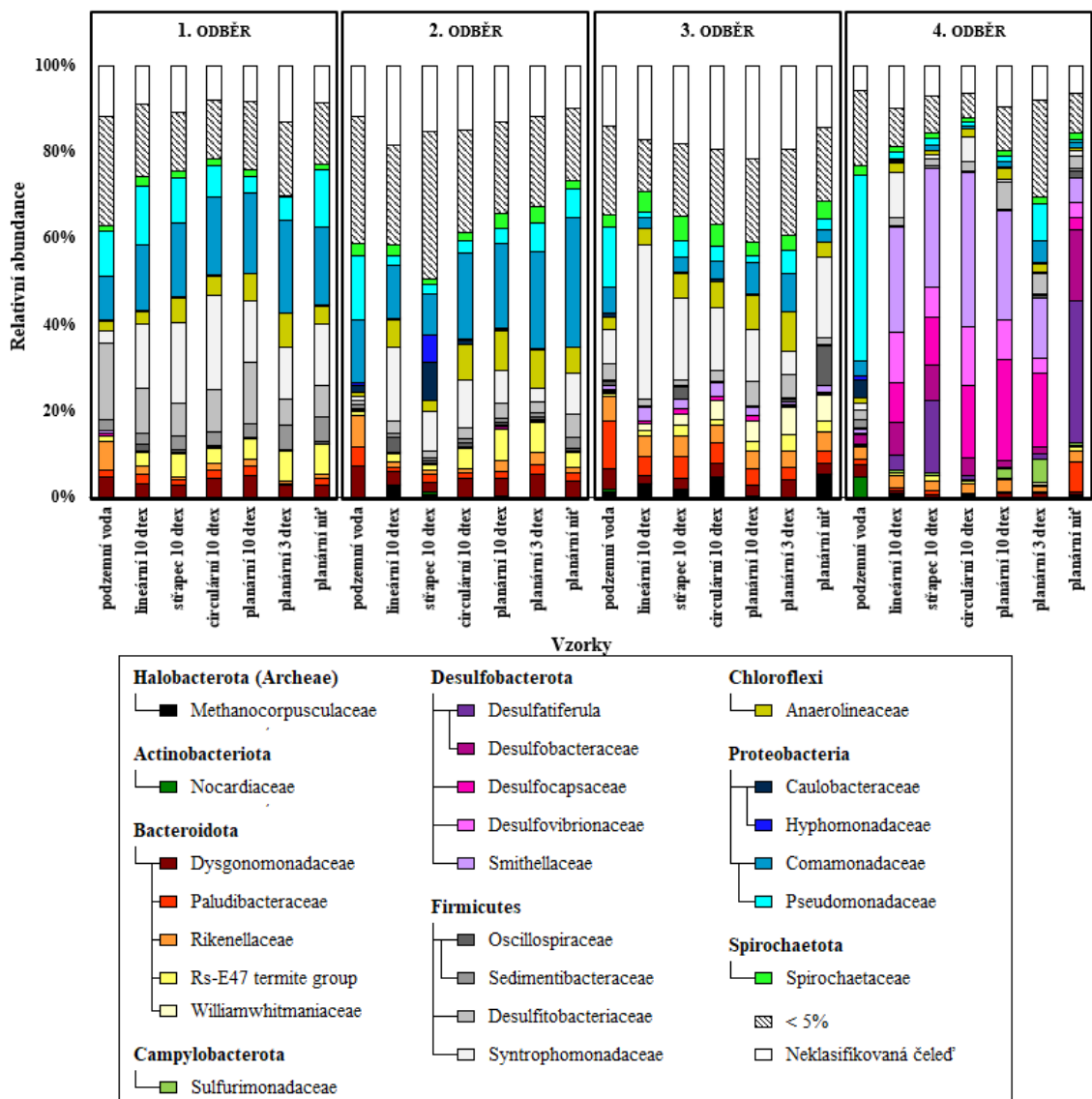
Obrázek 19: Porovnání bakteriální abundance přítomné na nosičích vyrobených pouze z nosné nitě a nosičích s PU nanovláčnou vrstvou (3 dtex a 10 dtex) v každém odběru prostřednictvím relativní kvantifikace. Pro hodnocení byly použity nosiče z monitorovacího vrtu RW6A-42.

Nosiče biomasy s lineární hustotou PU nanovláčné vrstvy 10 dtex byly také předmětem studie Lhotského et al. 2017. Autoři testovali nanovláčné nosiče pro pasivní vzorkování mikrobiální komunity v podzemní vodě kontaminované BTEX, chlorovaných ethenů (ClE) a farmaceutických látek. Bylo zjištěno, že tyto nosiče jsou aplikovatelné pro hodnocení in-situ bioremediace. V biofilmu přítomném na nosičích byl navíc detekován specifický funkční gen kódující klíčový enzym pro degradaci přítomné kontaminace (Lhotský et al. 2017). Nicméně, v této studii bylo použito odlišné prostorové uspořádání nosiče, v němž byla nosná nit s PU nanovláčny fixována na polyamidové podpůrné konstrukci, která musela být

před izolací DNA kompletně odstraněna. Nosiče vyvinuté a testované v této části disertační práce byly koncipovány tak, aby tato předúprava nebyla vyžadována.

4.1.3 Vývoj složení mikrobiální komunity

Taxonomické složení biofilmu bylo sledováno na všech tvarových variantách nosičů ve vrtu s nejvyšším bakteriálním oživením (RW6A-7) v průběhu monitoringu (Obr. 20). Mikrobiální komunita biofilmu přítomného na všech testovaných nanovlákných nosičích z jednotlivých odběrů obsahovala podobnou skupinu abundančních taxonů, tzv. core mikrobiom. Tvar nosiče biomasy tedy neměl výrazný vliv na zastoupení majoritních bakteriálních rodů přítomných v biofilmu na povrchu jednotlivých testovaných nosičů. Rozdíly v taxonomickém složení mezi tvarovými variantami nosičů byly způsobeny minoritními mikrobiálními zástupci s relativní abundancí menší než 5 %. Specifické bakteriální kmeny, včetně *Proteobacteria*, *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, byly dominantní v různých relativních abundancích během sukcese biofilmu na nanovlákných nosičích a v podzemní vodě až do posledního vzorkování. To naznačuje, že komunita biofilmu přítomná na nanovlákných nosičích byla určena počátečními mikrobiálními kolonizátory. Hlavní role okolního prostředí v počáteční tvorbě biofilmu byla pozorována i v předchozích studiích. Taxonomické složení komunit biofilmu se však v průběhu času obvykle lišilo od složení okolní vody (Basili et al. 2020; Pinto et al. 2019; Vick et al. 2019). V dříve publikovaných studiích bylo zjištěno, že hlavní bakteriální čeledě identifikované v prvním, druhém a třetím odběru vzorků, *Anaerolineaceae*, *Burkholderiaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Peptococcaceae*, *Pseudomonadaceae* a *Syntrophomonadaceae*, jsou spojené s reduktivní dechlorací (Dang et al. 2018; Němeček et al. 2017; Dolinová et al. 2017; Jin et al. 2020; Weatherill et al. 2018). Tím byla prokázána aplikovatelnost nanovlákných nosičů pro monitorování bioremediačních procesů na kontaminovaných lokalitách.



Obrázek 20: Taxonomické složení mikrobiální komunity detekované ve vzorcích nosičů a v podzemní vodě v průběhu času ve vrtu RW6A-7 s taxony na úrovni čeledě. Pruhy se vzorem reprezentují archeální a bakteriální taxony na úrovni čeledě o frekvenci nižší než 5 % z celkově klasifikovaných sekvencí. Bílé pruhy reprezentují archeální a bakteriální taxony neklasifikované na úrovni čeledě.

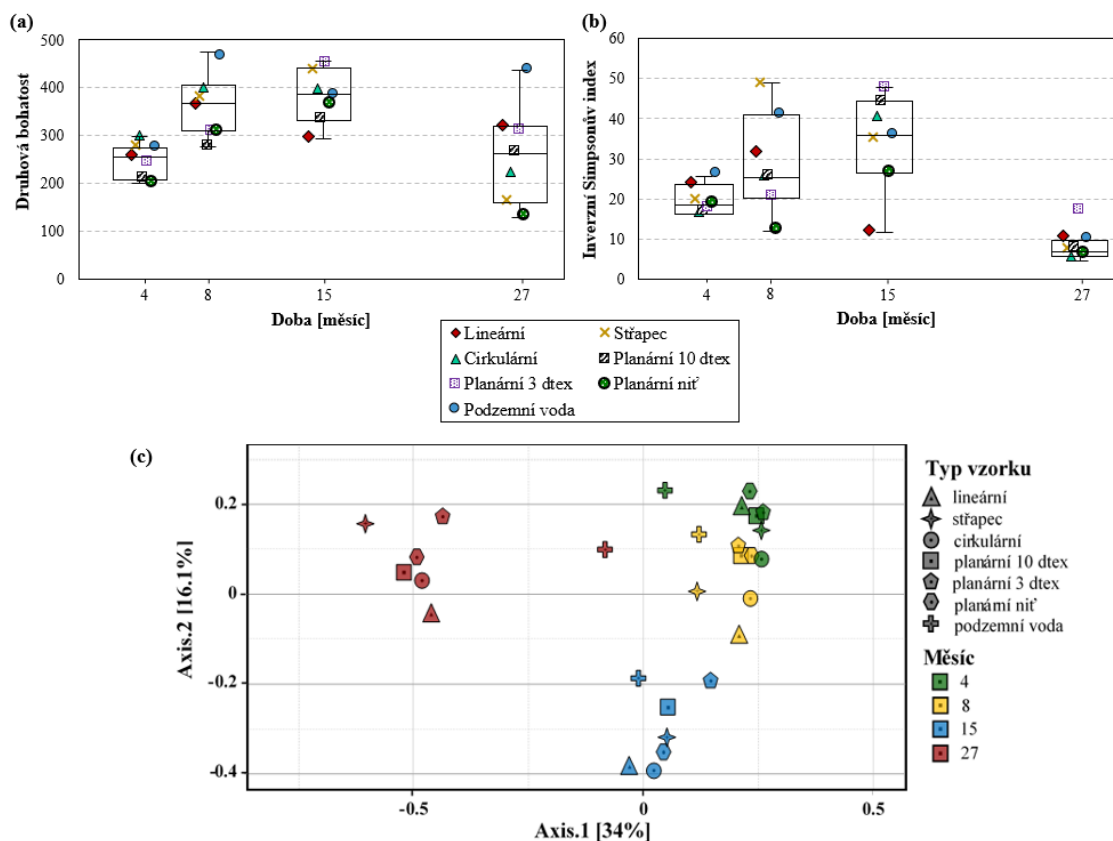
Složení mikrobiální komunity se ve všech vzorcích během 12 měsíců mezi třetím a čtvrtým odběrem výrazně změnilo (Obr. 20). Relativní četnost většiny dominantních taxonů z třetího odběru se snížila pod 5 % a podíl minoritního kmene se na všech nosičích zvýšil nad více než 50 %. Konkrétně se jednalo o bakteriální kmen *Desulfobacterota*, který po 27 měsících od zanoření nosičů dominoval (s průměrnou relativní četností až 72 %) v komunitě biofilmu na nanovlákných nosičích. Bakteriální kmen *Desulfobacterota* byl jeden ze čtyř kmenů, které byly

vytvořeny reklasifikací třídy *Deltaproteobacteria*, a zahrnuje mnoho organismů schopných disimilační redukce síranů (Waite et al. 2020). Výrazná změna ve složení bakteriální komunity biofilmu po 27 měsících od zanoření nosičů byla pravděpodobně důsledkem probíhajících sanačních aktivit v blízkosti monitorovacích vrtů realizovaných před posledním odběrem vzorků. Vzhledem k tomu, že monitorovací vrty byly součástí sanované lokality kontaminované nejen BTEX, ale i CIE, byla biostimulace anaerobní reduktivní dechlorace jednou z možných příčin detekovaných změn ve složení bakteriální komunity přítomné na nosičích biomasy. Na této lokalitě byla v minulosti ve Spolchemii několikrát aplikována syrovátka, glycerol a nanočástice nulamocného železa za účelem stimulace anaerobní reduktivní dechlorace. Tento typ aplikace mohl s největší pravděpodobností vést ke snížení rozpuštěného kyslíku a elektrochemického redox potenciálu v podzemní vodě, což podpořilo růst bakterií redukujících sírany (Obr. 20). Tento jev je ve shodě také s jinými studiemi na lokalitách kontaminovaných CIE, ve kterých byla pozorována vysoká abundance bakterií redukujících sírany po in-situ aplikaci nulamocného nanoželeza a syrovátky (Němeček et al. 2016) nebo po in-situ injektáži glycerolu (Atashgahi et al. 2017).

Komunita detekovaná v podzemních vodách a biofilmech sdílela většinu vysoce abundantních taxonů. Ty byly přítomny v různých relativních abundancích v průběhu monitoringu až do posledního vzorkování (Obr. 20). Po 27 měsících od zanoření nosičů byla čeleď *Pseudomonadaceae* nejabundantnějším taxonem (s podílem 46 %) identifikovaným v podzemní vodě. Na nanovlákných nosičích však měla tato čeleď v celkové mikrobiální komunitě menší zastoupení (v rozmezí 0,8 % - 9,2 %). Možným vysvětlením tohoto faktu je, že vzhledem k proudění podzemní vody ve vrtu bylo složení mikrobiální komunity v podzemní vodě náchylnější ke změnám chemismu než mikroflóra v biofilmu. To bylo potvrzeno také nízkým výskytem bakterií redukujících sírany ve vzorku podzemní vody, což korespondovalo s absencí, respektive relativně rychlým vyplavením sanačního činidla vedoucího k redukčnímu prostředí z monitorovacího vrtu.

Mikrobiální diverzita v jednotlivých vzorcích v průběhu dlouhodobého monitoringu byla stanovena prostřednictvím druhové bohatosti (Obr. 21a) a vyrovnanosti odvozené z inverzního Simpsonova indexu (Obr. 21b). Druhová bohatost, tj. pozorovaný počet operačních taxonomických jednotek (OTU)

přítomných ve vzorku, a vyrovnanost se zvyšovaly v průběhu sukcese biofilmu na nanovlákných nosičích až do závěrečného vzorkování. Na základě tohoto trendu, zaznamenaného též ve studii Douterelo et al. (2018), lze vyvodit, že menší množství bakterií zpočátku kolonizovalo povrch nosiče a poté se biofilm vyvinul směrem k rozmanitější komunitě. Nižší vyrovnanost společenstva zaznamenaná po 15 měsících na lineárním nosiči v porovnání s dalšími nosiči indikovala, že prostředí lineárního nosiče podporovalo růst určitých taxonů nad ostatními. Tento vývoj korespondoval s předpokladem, že kompaktnost vláken nosiče by mohla mít vliv na mikrobiální složení biofilmu na nosiči vytvořením místních anoxických podmínek uvnitř nosiče. Naopak v biofilmech na planárních, štrápcových a cirkulárních nosičích došlo pravděpodobně k částečnému potlačení konkurenčního boje přítomných mikroorganismů. K tomu dochází v případě, když mají přítomné dominantní taxony stejné či podobné podmínky pro růst, jako je dostatek zdrojů uhlíku, živin, kyslíku apod. Tento trend je typický pro biofilm ve fázi maturace, který má komplexní prostorovou strukturu poskytující přítomným mikroorganismům vysokou variabilitu stanovišť, širokou škálu dostupných zdrojů uhlíku a interní transport živin, vody a kyslíku (Jackson et al. 2001). Po 27 měsících od zanoření nosičů se oba pozorované indexy diverzity výrazně snížily (Obr. 21a, b). To bylo pravděpodobně způsobeno již zmiňovanou aplikací sanačních činidel v blízkém okolí monitorovacích vrtů. Sanační aplikace poskytla výhodu bakteriím redukujícím sírany v biofilmu, jak ukazuje Obr. 20, což ovlivnilo vyrovnanost komunity.



Obrázek 21: Porovnání alfa diverzity na nanovlákných nosičích a v podzemní vodě v průběhu času vyjádřené pomocí druhové bohatosti (a) a inverzního Simpsonova indexu (b). (c) Multidimenzionální škálování (MDS) ordinace Bray-Curtisových vzdáleností mezi bakteriálními komunitami nosičů a vzorků podzemní vody z monitorovacího vrtu RW6A-7.

Rozdíly v mikrobiální diverzitě mezi jednotlivými vzorky byly vizualizovány pomocí MDS ordinace odvozené z matice vzdáleností vypočtené na základě Bray-Curtisovy vzdálenosti (Obr. 21c). Na tomto diagramu je podobnost mezi vzorky dána jejich blízkostí, tedy čím menší vzdálenost je mezi dvěma body, tím je mezi těmito body/vzorky větší podobnost (viz kap. 3.2.4). MDS diagram odhalil těsné shlukování vzorků nosičů odebraných po 4 měsících od umístění nosičů ve vrtu RW6A-7. To odpovídá velmi malým změnám v mikrobiální komunitě mezi tvary nosičů, což bylo viditelné i na taxonomickém složení vzorků (Obr. 20). Tento jev ukazuje, že tvar nosiče a lineární hustota nanovláken měly pouze malý vliv na mikrobiální diverzitu během adheze a počáteční tvorby biofilmu. Charakteristiky nosiče biomasy měly významnější vliv až v pozdější sukcesní fázi, což koresponduje také s jinými studiemi (Felföldi et al. 2015; Pinto et al. 2019). Po prvním odběru se

rozdíly ve složení biofilmu mezi vzorky nosičů odebranými v rámci jednoho odběru postupně zvětšovaly. To bylo s největší pravděpodobností způsobeno maturací (zráním) biofilmu, a v případě závěrečného odběru již zmiňovanou aplikací sanačního činidla v blízkosti monitorovacího vrtu.

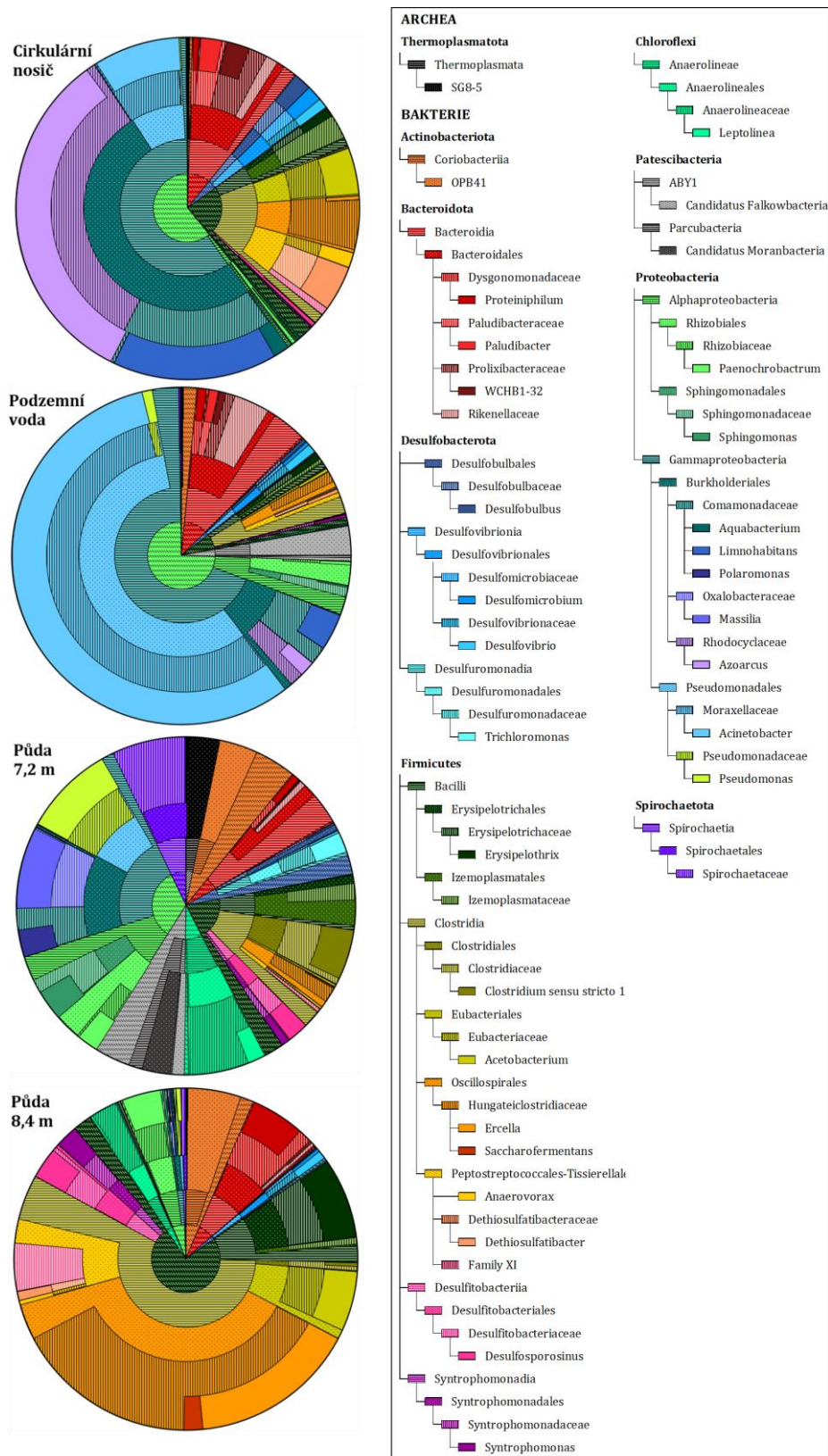
MDS diagram (Obr. 21c) také odhalil, že podobnost mezi podzemní vodou a shlukem nosičů, zejména planárních nosičů, se během 4 měsíců mezi prvním a druhým vzorkováním zvýšila. Vzorky nosičů z posledního odběru (27 měsíců od zanoření) byly výrazně odděleny od všech předchozích vzorků, pravděpodobně z důvodu sanačního zásahu v blízkosti monitorovacího vrtu. Navíc v posledním odběru byl vzorek podzemní vody viditelně oddělen od vzorků nosičů a byl více podobný vzorkům z prvního a druhého odběru. Tento jev lze vysvětlit tím, že mikrobiální komunity přítomné v biofilmu jsou chráněny extracelulární maticí před vlivy okolního prostředí, např. sanačním činidlem, na rozdíl od mikroorganismů přítomných v planktonní formě. Dalším vysvětlením může být také rychlý návrat bakteriální komunity přítomné v podzemní vodě na její původní složení (složení před sanačním zásahem), a to díky postupnému vyplavení sanačního činidla z vrtu.

Souhrnně lze konstatovat, že studium mikrobiálních komunit na nanovlákných nosičích v průběhu času odhalilo zanedbatelný vliv tvaru nosiče a testované lineární hustoty PU nanovláken na taxonomické složení biofilmu. To bylo pozorováno jak při tvorbě biofilmu, tak po aplikaci sanačního činidla. Během maturace biofilmu se rozdíly v mikrobiální diverzitě mezi vzorky nosiče a podzemní vody snížily, ale žádný tvar nosiče nevykazoval výraznou podobnost s podzemní vodou ve všech odběrech. Mikrobiální komunita přítomná na nosičích navíc odrážela změny v chemismu podzemní vody pozorované například během aplikace sanačního činidla v blízkosti monitorovaného vrtu. Nanovlákné nosiče tak mohou být použity pro hodnocení taxonomického složení mikroflóry v podzemní vodě z monitorovacích vrtů.

4.1.4 Porovnání složení mikrobiálních komunit mezi různými matricemi

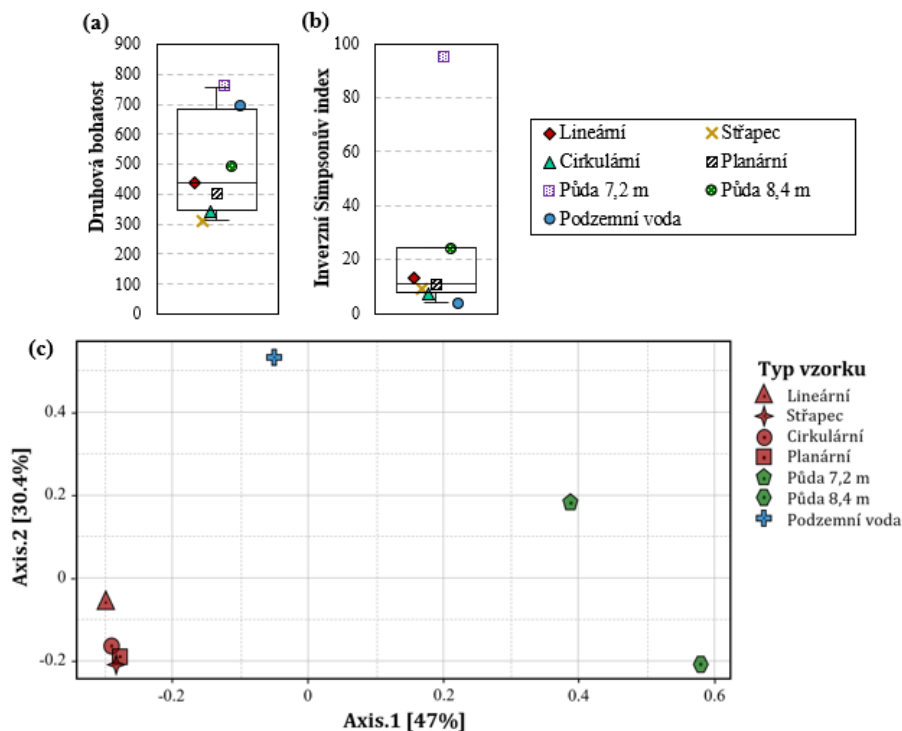
Variabilita mikrobiálních komunit ve vzorcích nosičů, podzemní vody a půdy byla hodnocena stanovením taxonomického složení zobrazeném ve formě Krona grafů (Obr. 22) a alfa a beta diverzitou (Obr. 23). Vzorky matric byly odebrány z vrtu RW6A-42, v jehož bezprostřední blízkosti byla možná realizace vrtné práce, tj. odběru vzorku půdy. Podobné taxonomické složení bylo pozorováno mezi jednotlivými nanovláknými nosiči, jejichž dominantními bakteriálními čeleděmi byly *Rhodocyclaceae*, *Comamonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Dethiosulfatibacteraceae*, a *Hungateiclostridiaceae*. Krona grafy jednotlivých uspořádání nanovlákných nosičů jsou uvedeny v příloze B. Ve vzorku podzemní vody tvořila bakteriální čeleď *Moraxellaceae* více než polovinu identifikované taxy (58%). Bakteriální čeleď *Hungateiclostridiaceae* tvořila více než jednu třetinu identifikované taxy (37%) v půdním vzorku odebraného z hloubky 8,4 m. Naproti tomu mikrobiální komunita půdního vzorku odebraného z hloubky 7,2 m (hloubka podzemní vody se pohybovala od 3 m do 4 m pod povrchem) byla tvořena taxony s procentuálním podílem 10 % či nižším. Různá taxonomická složení v půdních vzorcích ze dvou různých hloubek indikovala vysokou prostorovou heterogenitu podloží, proto získat přehled o autochtonní půdní mikroflóře na dané lokalitě bylo značně obtížné. Pro získání reprezentativní půdní mikroflóry ve vymezeném prostoru je běžně odebírán tzv. směsný vzorek, což je několik dílčích vzorků půdy smíšených dohromady. Jednou z metod odběru směsného vzorku půdy je klasická čtvercová metoda, během níž je použito pět vzorkovacích bodů, jeden ve středu čtverce a čtyři v jeho rozích (Hrdlička 2007; Onet et al. 2019). Odběry směsného vzorku půdy jsou ekonomicky a časově náročné, zejména v případě monitoringu půdní mikroflóry v hloubce větší než 1 m pod povrchem.

Rozdíly v proporcionálním zastoupení taxonů (např. *Moraxellaceae* a *Hungateiclostridiaceae*) byly pozorovány napříč různými matricemi (nosič, podzemní voda a půda). Tato odchylka byla pravděpodobně způsobena rozdíly v podmínkách mezi matricemi, tj. skupenství, koncentrace kyslíku, přísun živin apod. Nicméně většina bakteriálních čeledí s relativním zastoupením více než 2,5 % v podzemní vodě nebo půdě byla detekována zároveň na nanovlákných nosičích.



Obrázek 22: Taxonomické složení a relativní abundance majoritních taxonů (> 2,5 %) detekovaných ve vzorcích nanovláčkových nosičů biomasy, podzemní vody a půdy odebraných z monitorovacího vrtu RW6A-42 a jeho okolí prezentované formou Krona grafů.

Mikrobiální diverzita v jednotlivých maticích byla vyjádřena prostřednictvím druhové bohatosti (Obr. 23a) a vyrovnanosti odvozené z inverzního Simpsonova indexu (Obr. 23b). Nejnižší druhová bohatost byla mezi maticemi zjištěna u vzorků nanovlákných nosičů a nejvyšší u půdního vzorku odebraného z hloubky 7,2 m. U obou parametrů alfa diverzity byla zaznamenána prostorová heterogenita mezi půdními vzorky. Výrazně vyšší diverzita, tj. vyšší hodnoty obou parametrů, byla detekována u vzorku půdy odebrané z hloubky 7,2 m, zatímco hodnoty obou parametrů u vzorku půdy odebrané z hloubky 8,4 m byly mírně vyšší než u nanovlákných nosičů. V případě vzorku podzemní vody byla pozorována vysoká druhová bohatost, ale nízký inverzní Simpsonův index, což odpovídá vysokému podílu bakteriálního rodu *Acinetobacter* ve vzorku (Obr. 22) a velkému množství minoritních taxonů, ke kterým je Simpsonův index méně citlivý.



Obrázek 23: Porovnání alfa diverzity ve vzorcích nanovlákných nosičů, půdy a podzemní vody, vyjádřené pomocí druhové bohatosti (a) a inverzního Simpsonova indexu (b). (c) Multidimenzionální škálování (MDS) ordinace Bray-Curtisových vzdáleností mezi bakteriálními komunitami detekovanými na nosičích, v podzemní vodě a půdě odebranými z monitorovacího vrtu RW6A-42 a jeho okolí.

Rozdíly v mikrobiální diverzitě mezi jednotlivými vzorky byly vizualizovány ve dvou rozměrech pomocí MDS ordinace odvozené z matice vzdáleností vypočtené na základě Bray-Curtisovy vzdálenosti (Obr. 23c). MDS diagram ilustruje těsné shlukování vzorků nosičů, zatímco vzorky podzemní vody a půdy byly viditelně odděleny od nosičů a také od sebe navzájem. Vysoká mikrobiální diverzita mezi nosiči a podzemní vodou, která neodpovídá vzorkům z monitorovacího vrtu RW6A-7 (Obr. 20), byla pravděpodobně způsobena vzorkováním podzemní vody z vrtu RW6A-42 metodou malého čerpaného množství. Na rozdíl od monitorovacího vrtu RW6A-42 byly vzorky podzemní vody odebírány přímo z vrtu RW6A-7. Metoda malého čerpaného množství byla použita k získání vzorku podzemní vody z místa odběru vzorků půdy za účelem porovnání matic. MDS diagram spolu s taxonomickým složením vzorků (Obr. 22) odhalil, že environmentální a prostorová heterogenita brání určení složení mikrobiální komunity jedné matice pomocí jiné matice. Toto pozorování je také v souladu se studií autorů Luo et al. (2020). Dlouhodobý monitoring mikrobiálních komunit na nanovlákných nosičích a v podzemní vodě, ve které byly nosiče ponořeny (Obr. 20-23), ukázal, že přibližné stanovení mikrobiálního složení může být relevantní, pokud jsou různé matice v kontaktu nebo v těsné blízkosti. Aplikace nosičů k analýze četnosti taxonů v podzemní vodě a půdě tedy vyžaduje další studium.

4.1.5 Testování nosičů na dalších lokalitách

Na základě výsledků dlouhodobého monitoringu byly cirkulární nosiče s lineární hustotou nanovláken 10 dtex vybrány jako nejvhodnější kandidáti pro testování na dalších lokalitách (Tab. 13). Vzorkovací procedura byla stejná jako u dlouhodobého experimentu v případě vzorkování z podzemních vod (viz kap. 3.4.1).

Tabulka 13: Seznam lokalit, na kterých byly testovány cirkulární nanovláčkové nosiče pro vzorkování mikrobiální biomasy

Typ vody	Lokalita	Sledovaná kontaminace	Cílové mikroorganismy
pitná voda	studna	-	veškeré bakterie
povrchová voda	rybník	-	veškeré bakterie
podzemní voda	monitorovací vrty	CIE + BTEX	bakterie podílející se na degradaci přítomné kontaminace
	bioreaktivní permeabilní stěna a její okolí	izomery hexachlorocyklohexanu	
	monitorovací vrty	CIE + ropné látky	
	laboratorní diskontinuální reaktory	CIE + methan	
skládková voda	systém biologického čištění vody z rekultivované skládky TKO	sloučeniny dusíku	(de)nitrifikační bakterie

Ve všech testovaných prostředích byly na nosičích detekovány cílové mikroorganismy a v případě pitné a povrchové vody bylo stanoveno složení přítomné mikrobiální flóry, které je níže popsáno. Z testování nosičů i na dalších lokalitách vyplynuly následující výhody jejich aplikace:

- úspora času při zpracování vzorků,
- významně nižší riziko kontaminace vzorků při jejich zpracování,
- eliminace rizika expozice laboratorního personálu případným toxickým látkám během filtrace kapalných vzorků,
- uživatelsky příznivější transport nanovláčkových nosičů ve sterilních uzavíratelných PE sáčcích (velikost nosiče je 1,5 x 3 x 0,5 cm, což představuje objem max. 2,3 cm³) v porovnání s transportem kapalných vzorků ve sterilních skleněných láhvích (minimální objem je 500 cm³),
- eliminace odběrů kapalných vzorků pro monitoring přítomné specifické mikrobiální flóry ze systému s omezeným objemem, např. z laboratorního diskontinuálního reaktoru s nízkým mikrobiálním oživením,
- nosiče nahrazují odběr kapalných vzorků, ve kterých mohou být přítomny látky inhibující molekulárně-genetické analýzy, nedochází tudíž k chybám během analýz⁶.

Nicméně, je třeba zmínit i nevýhody aplikací nanovláčkových nosičů pro vzorkování mikrobiální biomasy. Mezi hlavní nevýhodu patří potenciální uvolňování nanovláček do životního prostředí. Ve všech experimentech této práce

⁶ Inhibiční látky jsou přítomné například v odpadních a skládkových vodách. Pro zakonzentrování biomasy u vzorků těchto vod před izolací DNA je používána centrifugace, během níž dochází i k zakonzentrování inhibičních látek. Přítomnost inhibičních látek snižuje kvalitu izolované DNA. Více informací je uvedeno v kap. 2.2.1 a 3.2.3.

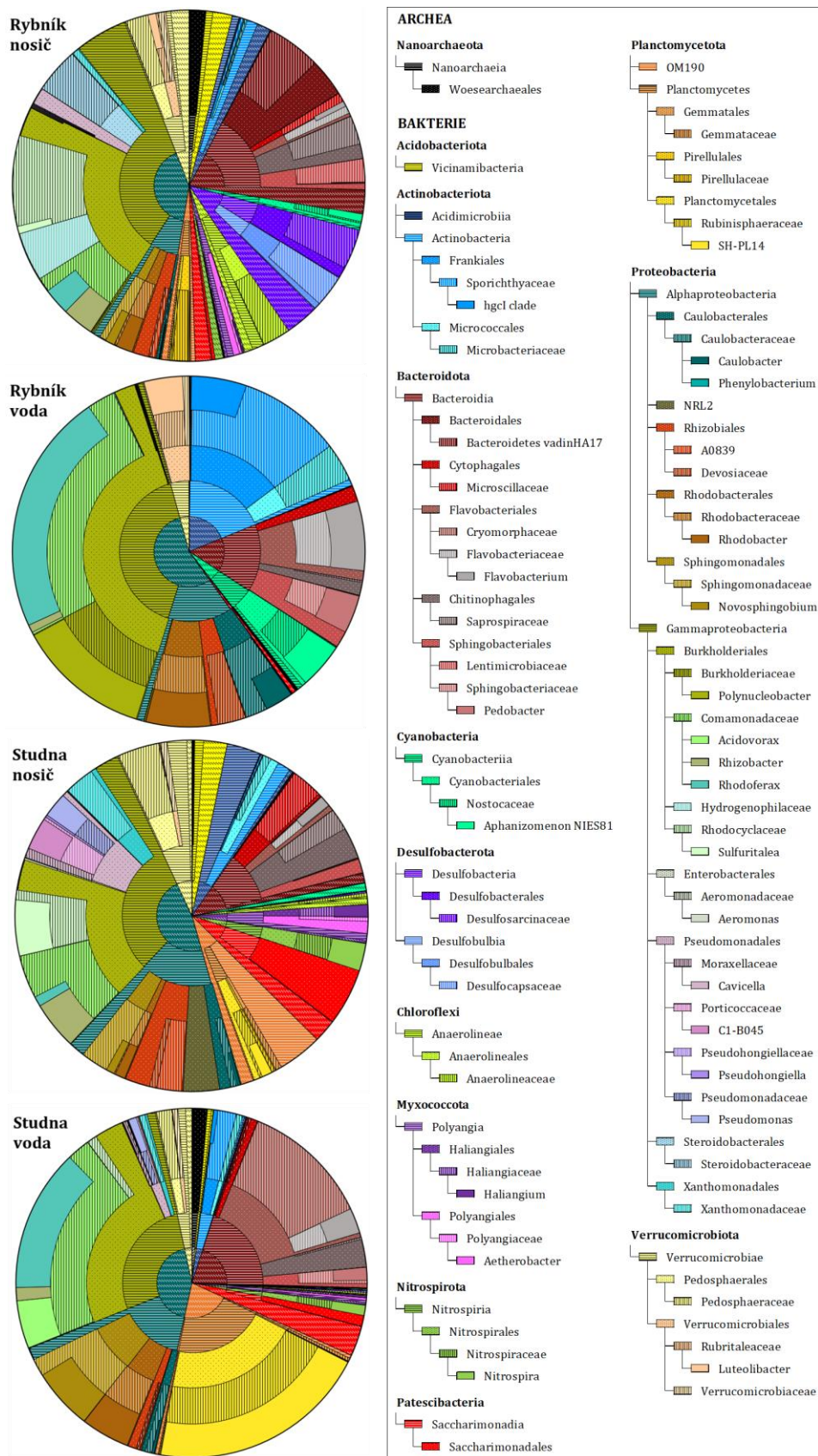
však vykazovala nanovláknenná vrstva na bázi polyurethanu chráněná tangenciálním ovínem stabilitu a v případě jejího poškození byla sice narušena její celistvost, ovšem nedošlo k jejímu rozpadu. Pokud došlo k uvolnění nanovláken v rámci experimentů, bylo jejich množství zanedbatelné. Další nevýhodou nanovláknenných nosičů mohou být náklady na jejich přípravu, které se ale s pokrokem technologií výroby nanovláken a s rostoucím množstvím vyráběného materiálu neustále snižují. Obecně pro vzorkování mikrobiální biomasy ve vodním prostředí pomocí nosičů může být nevýhodou, že mikroflóra na nosičích reflektuje biofilm na stěnách vrtu, nádrže apod. a nemusí obsahovat všechny taxony přítomné ve vodě. Přesto v rámci dlouhodobého monitoringu (viz kap. 4.1.3) komunita na nosičích a ve vodních vzorcích sdílela většinu vysoce abundantních taxonů, až na vzorky odebraných po sanačním zásahu v okolí monitorovacího vrtu. Jedna z potenciálních nevýhod aplikace nosičů ve vodním prostředí, které se vyznačuje nízkým mikrobiálním oživením, může být mikrobiální kontaminace vody způsobena nesterilními nosiči. Tomu je možné předejít sterilizací nosičů před jejich aplikací, což je řešeno v rámci poslední části této disertační práce (viz kap. 0).

Celkově je možné konstatovat, že cirkulární nanovláknenné nosiče se ukázaly jako vhodný nástroj pro monitoring veškeré a specifické mikrobiální biomasy ve všech testovaných prostředích. Možnou optimalizací vzorkování mikroflóry nanovláknennými nosiči by v případě monitoringu zaměřeného na detekci určité mikrobiální skupiny či specifického mikroorganismu mohla být modifikace nanovláknenné vrstvy na nosičích, např. funkcionalizací povrchu specifickými protilátkami pro detekci patogenních bakterií (Pal et al. 2017; Ayu Widyasari et al. 2022). Modifikace by mohla podpořit povrchovou kolonizaci specifickými mikroorganismy a tím zvýšit pravděpodobnost detekce určitého mikroorganismu.

Pitná a povrchová voda

Na nosičích umístěných do rybníku a studny, stejně tak ve vzorcích vod z těchto lokalit, byla kromě celkového množství bakteriální biomasy analyzována také mikrobiální diverzita pomocí NGS analýzy. Celkové archeální a bakteriální oživení na jednom nanovláknenném nosiči (3 m nosné nitě s nanovláknenným nánosem) bylo v případě studny významně vyšší než ve vzorku vody o objemu 1 l, zatímco v případě rybníku bylo pouze mírně vyšší než ve vzorku vody o objemu 0,3 l. Mikrobiální složení bakteriální komunity přítomné na nosičích a ve vzorcích vody

odebraných ze studny a z rybníka je prezentováno formou Krona grafů na Obr. 24. Většina majoritních taxonů identifikovaných ve vzorcích vod byla detekována také ve vzorcích nosičů. Taxony přítomné na nosičích pravděpodobně refletovaly biofilm na stěnách studny či v rybníku. Na nosičích byla detekována vyšší mikrobiální diverzita v porovnání s vodou v obou případech, konkrétně byly na nosičích pozorovány vyšší parametry alfa diverzity, druhová bohatost a inverzní Simpsonův index. Tento trend indikuje, že biofilm přítomný na nosičích byl již ve fázi maturace, tedy měl komplexní prostorovou strukturu poskytující přítomným mikroorganismům vysokou variabilitu stanovišť, širokou škálu dostupných zdrojů uhlíku a interní transport živin, vody a kyslíku. V takovém prostředí dochází k potlačení konkurenčního růstu přítomných mikroorganismů, protože dominantní taxony využívají různé zdroje anebo se vyskytují v odlišných oblastech biofilmu (Jackson et al. 2001).



Obrázek 24: Taxonomické složení a relativní abundance majoritních taxonů (> 2,5 %) detekované ve vzorcích nosičů a vody odebraných z rybníka a studny prezentované formou Krona grafů.

4.1.6 Shrnutí

Přínos metody vzorkování mikrobiální biomasy prostřednictvím vyvinutých nanovlákných nosičů namísto vzorků vod a jejich filtrace byl prokázán jak při dlouhodobém monitoringu na reálné kontaminované lokalitě, tak i během monitoringu na dalších lokalitách s odlišnými typy vod. Hlavní výhody nosičů spočívaly v jednoduchosti a tedy rychlosti manipulaci s nosiči během vzorkování, ve výrazně menším objemu chladicího kontejneru nezbytného pro transport nosičů a především ve významném zkrácení doby zpracování vzorků před izolací DNA, tudíž i v minimalizaci potenciální kontaminace vzorku.

Porovnání nosičů s různými tvary a nanovláknými vrstvami během 27měsíčního monitoringu prokázalo, že cirkulární a planární nanovlákné nosiče vykazovaly nejrychlejší mikrobiální kolonizaci povrchu. Zatímco různé charakteristiky nosičů (tvar, nanovlákný nános) významně neovlivnily složení mikrobiální komunity během tvorby biofilmu, mikrobiální diverzita mezi jednotlivými variantami nosičů se během maturace biofilmu postupně zvyšovala. Analýza mikrobiální komunity ve vzorcích půdy, podzemní vody a nosičů prokázala, že environmentální a prostorová heterogenita brání použití jedné matrice k přesnému odhadu složení mikrobiální komunity jiné matrice, pokud nejsou matrice v kontaktu nebo v těsné blízkosti. Nanovlákné nosiče tak mohou být použity k odhadu složení mikrobiální komunity v podzemní vodě a pravděpodobně také v biofilmech na stěnách vrtů.

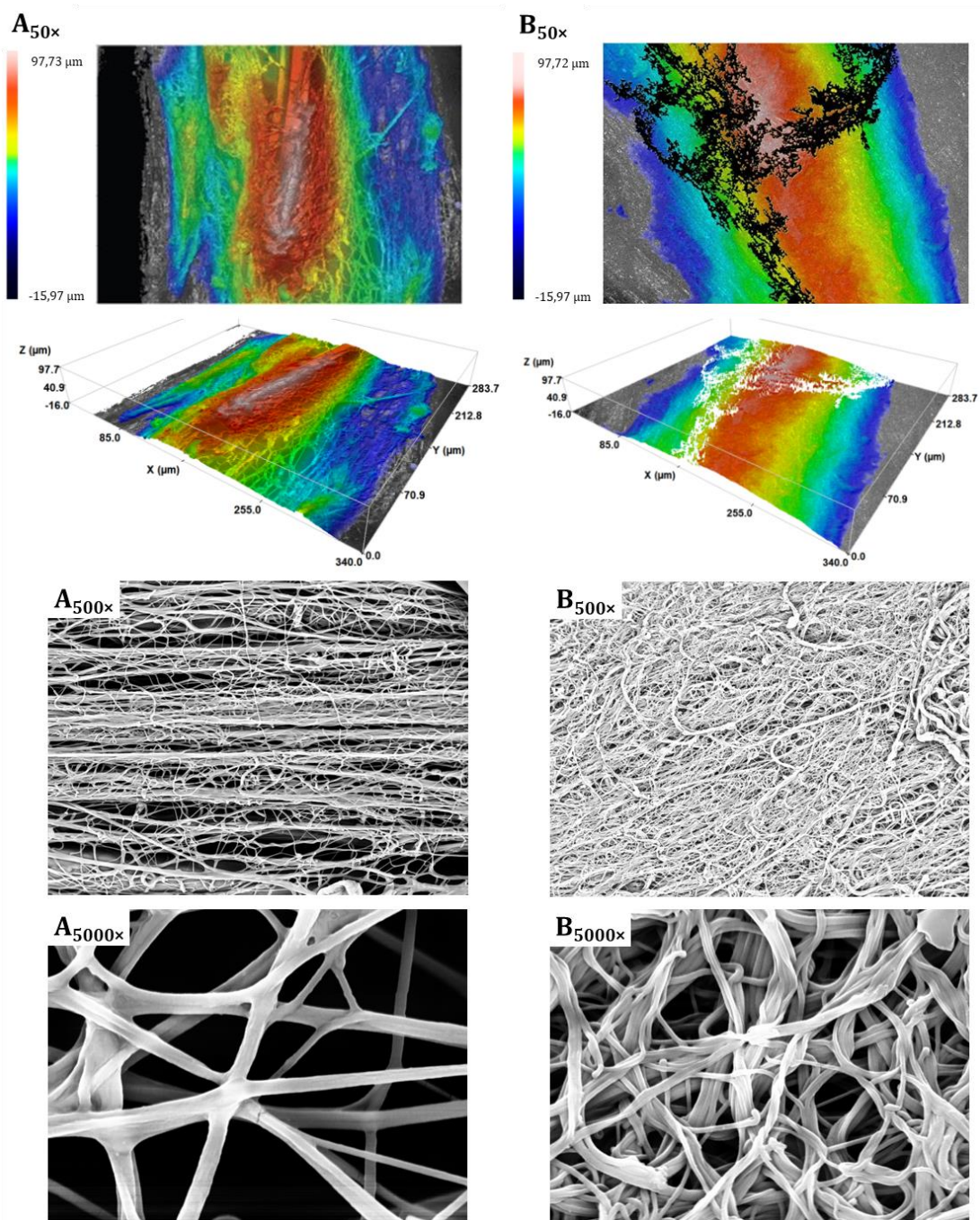
Cirkulární nanovlákné nosiče byly vybrány jako nejvhodnější typ nosiče pro vzorkování mikrobiální biomasy před molekulárně-genetickými analýzami, jelikož nejsou tvořeny žádným balastním či podpůrným konstrukčním materiálem, který by musel být před analýzami odstraněn (např. lepidlo, vlasce, plastové spojky a jiný konstrukční materiál). Nanovlákné nosiče se ukázaly jako účinný nástroj pro charakterizaci mikrobiálních konsorcií přítomných v podzemních vodách (nejen) na kontaminované lokalitě, kde změna v mikrobiální komunitě biofilmu jasně indikovala sanační zásah realizovaný v blízkém okolí monitorovacího vrtu.

4.2 Intenzifikace biologického čištění skládkové vody

V druhé experimentální části disertační práce byly nejprve testovány nosiče s nanovláknou vrstvou připravenou AC a DC elektrospinningem ve dvou laboratorních bioreaktorech R1 a R2, kde jako nátok byla použita směs skládkové vody (prooxidované v případě bioreaktoru R2) a komunální odpadní vody. Na základě dosažených výsledků byl poté zvolen typ nanovláken pro dlouhodobý test se skládkovou vodou realizovaný ve čtyřech bioreaktorech A, B, C a D provozovaných v různých experimentálních uspořádání.

4.2.1 Charakterizace nanovláknenných nosičů

Členitost povrchů jednotlivých PU nanovláknenných vrstev vyrobených DC a AC zvlákněním analyzována pomocí konfokální mikroskopie je uvedena na Obr. 25 společně se snímky rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). Pomocí konfokální mikroskopie byla stanovena průměrná drsnost povrchu vláken $14,867 \mu\text{m}$ u DC nanovláknenné vrstvy (10 dtex) a $15,851 \mu\text{m}$ u AC nanovláknenné vrstvy (2x230 dtex). Průměr vláken v DC nanovláknenné vrstvě byl $304 \pm 23 \text{ nm}$, zatímco v AC nanovláknenné vrstvě byl $339 \pm 57 \text{ nm}$. Přestože byla lineární hustota u AC nanovláknenné vrstvy výrazně vyšší než u DC nanovláknenné vrstvy, rozdíly v povrchové drsnosti a průměru vláken mezi nanovláknennými vrstvami byly minimální. Rozdíly mezi vrstvami jsou viditelné na SEM snímcích (Obr. 25), konkrétně menší prostory mezi nanovláknny u AC nanovláknenné vrstvy v porovnání s DC nanovláknennou vrstvou vedoucí k vyšší porozitě vrstvy.

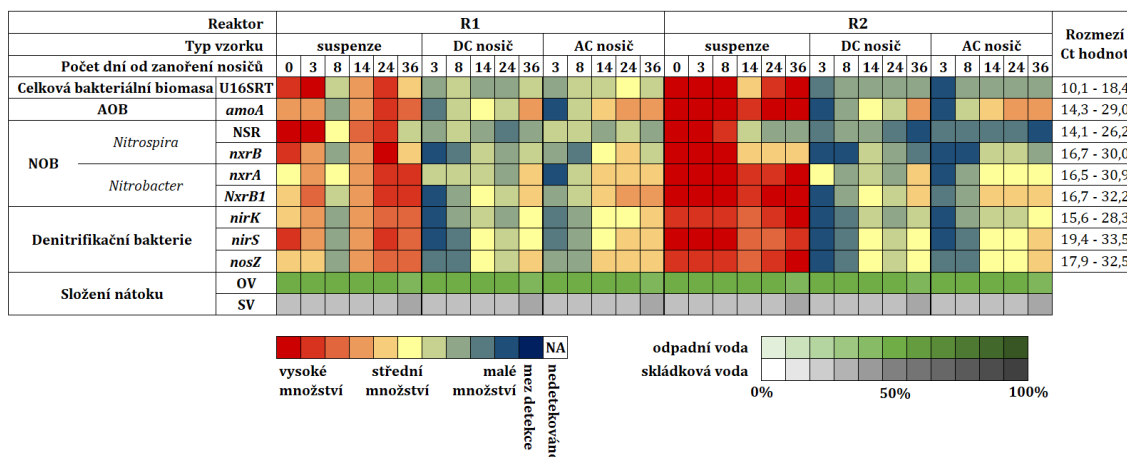


Obrázek 25: Snímky povrchu nosné nitě s nanovláknennou vrstvou na bázi PU připravenou pomocí DC elektrospinningu (A) a AC elektrospinningu (B) z konfokálního mikroskopu při zvětšení 50× a rastrovacího elektronového mikroskopu při zvětšení 500× a 5000×.

4.2.2 Pilotní testování nanovláknenných nosičů se skládkovou vodou

Výsledky z qPCR analýzy nanovláknenných nosičů biomasy a suspenze aktivovaného kalu odebraných z reaktorů R1 (nátok skládkové vody bez jakékoliv předúpravy) a R2 (prooxidovaná skládková voda) jsou zobrazeny ve formě

heatmapy Ct hodnot⁷ na Obr. 26. Všechny markery specifické pro nitrifikační a denitrifikační bakterie byly detekovány ve vzorcích suspenze a v biofilmu na nosičích. V obou reaktorech R1 a R2 byla abundance všech testovaných markerů vyšší v suspenzi v porovnání s nosiči biomasy kromě odběru 8 dní od umístění nosičů u bioreaktoru R1. Vyšší množství testované biomasy v suspenzi v porovnání s nosiči bylo předpokládáno vzhledem ke krátké době zanoření nosičů a vsádkovému režimu reaktorů, během něhož docházelo pouze k mírným ztrátám aktivovaného kalu ze systému. Na rozdíl od biomasy v suspenzi nereagovala biomasa ve formě biofilmu přítomného na nosičích na výkyvy aerace v bioreaktorech. Při srovnání mezi různými typy nosičů (DC a AC) bylo v obou bioreaktorech v druhé polovině experimentu detekováno mírně vyšší množství testované specifické biomasy, zejména AOB, na nosičích s nanovláknennou vrstvou vyrobenou prostřednictvím AC elektrospinningu. Příčinou lepší kolonizovatelnosti specifickými mikroorganismy AC nanovláknenné vrstvy byla pravděpodobně vyšší porozita vrstvy v porovnání s DC nanovláknennou vrstvou (viz kap. 4.2.1).



Obrázek 26: Heatmapa Ct hodnot sledovaných primerů detekovaných v bioreaktorech se skládkovou vodou z Tušimic v průběhu monitoringu první etapy; OV – odpadní voda, SV – skládková voda.

Na konci experimentu byl v obou bioreaktorech zaznamenán pokles NOB *Nitrospira* (*NSR*, *nxB*), zejména v suspenzi, ale i na nosičích. Pokles NOB pravděpodobně souvisel se zvýšením koncentrace dusitanů v odtoku z obou

⁷ V případě suspenze byly Ct hodnoty normalizovány na organický podíl nerozpuštěných látek, zatímco u nosičů byly Ct hodnoty normalizovány na hmotnost vzorku vloženého do lyžační zkumavky.

reaktorů (z méně než $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$ na téměř $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$) po zvýšení podílu skládkové vody v přítoku z 25 % na 35 % 25 dní od umístění nosičů. Inhibiční účinek vysoké koncentrace dusitanů na NOB *Nitrospira* byl pozorován i v dalších studiích (Kim a Kim 2006). Přestože mezi nosiči s různými nanovláčnými vrstvami nebyly zaznamenány výrazné rozdíly ve vývoji mikroflóry, byly pro dlouhodobý provoz bioreaktorů vybrány nosiče s AC nanovláčnou vrstvou, u nichž byla zaznamenána vyšší kolonizace nitrifikačními bakteriemi v porovnání s nosiči s DC nanovláčnou vrstvou.

4.2.3 Vliv nanovláčných nosičů a ozonizace na účinnost a stabilitu nitrifikace při biologickém čištění skládkové vody

Na základě výsledků testování v první etapě (vyšší povrchové kolonizace nitrifikačními bakteriemi) byly pro druhou etapu připraveny nosiče s nanovláčnou vrstvou připravenou AC elektrospinningem. Pro zvýšení mechanické stability nití s nanovláčnou vrstvou v podpůrné konstrukci byla do konstrukce přidána pomocná mikrovlákna kolmo propletená s nitěmi s nanovláčnou vrstvou vytvářející textilní mřížku (viz kap. 3.4.2; Obr. 8). Nosiče ve formě textilních mřížek fixovaných na nerezové podpůrné konstrukci byly umístěny do dvou ze čtyř laboratorních bioreaktorů, konkrétně do bioreaktorů s označením C a D. U bioreaktorů B a D byla jako nátok použita skládková voda prooxidovaná plynným ozonem, zatímco u bioreaktorů A a C byla použita skládková voda bez úpravy⁸ (Obr. 9).

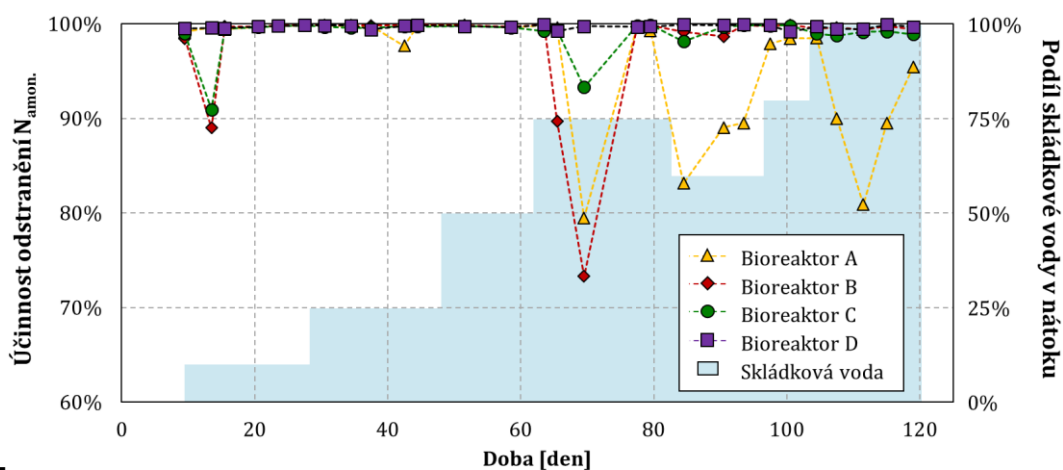
Vývoj koncentrací jednotlivých forem dusíku, tj. N_{amon} , N-NO_2^- a N-NO_3^- , v jednotlivých bioreaktorech a jejich vzájemné porovnání z hlediska účinnosti odstranění N_{amon} jsou zobrazeny na Obr. 27. Ve všech bioreaktorech se během první poloviny experimentu pohybovala koncentrace N_{amon} v odtoku v rozmezí $0,07\text{-}1,6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, což odpovídá účinnosti odstranění 97,7-99,9 %. Po zvýšení podílu skládkové vody v nátku z 50 % na 75 % 63 dní po zahájení experimentu byl

⁸ Přehled charakteristik testovaných laboratorních bioreaktorů:

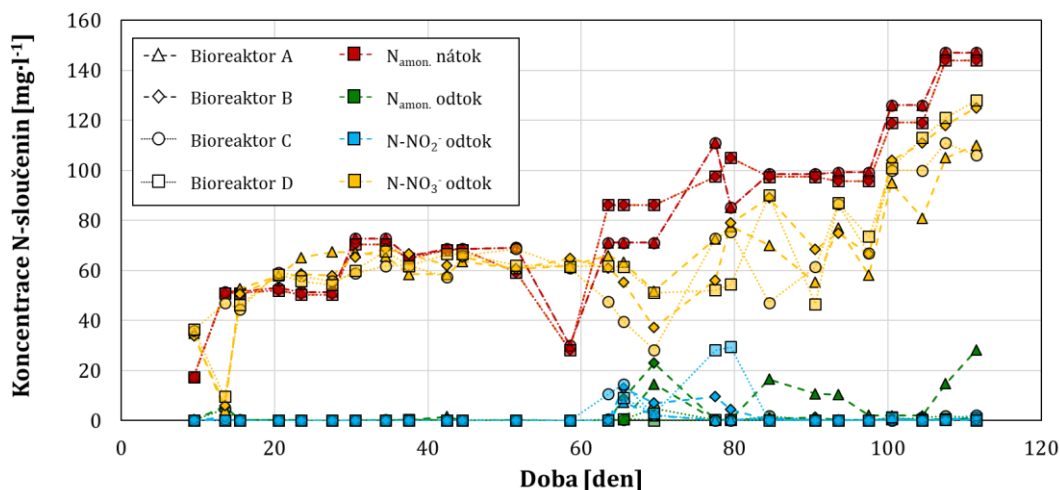
	Bez nosičů	Nanovláčenné nosiče
Surová voda bez úpravy	Bioreaktor A	Bioreaktor C
Prooxidovaná voda	Bioreaktor B	Bioreaktor D

zaznamenán pokles účinnosti odstranění N_{amon} u všech bioreaktorů kromě bioreaktoru D, tj. bioreaktoru s nanovláknennými nosiči a prooxidovanou skládkovou vodou. Tento trend společně s poklesem koncentrace $N\text{-NO}_3^-$ a nárůstem koncentrace $N\text{-NO}_2^-$ (meziproduktu nitrifikace) indikoval krátkodobou inhibici procesu nitrifikace. To bylo pravděpodobně způsobeno zvýšením podílu AOB a poklesem NOB *Nitrospira* v bioreaktorech A, B a C, což prokázaly jak výsledky FISH metody, tak výsledky qPCR analýzy (viz níže). Po opětovném nárůstu účinnosti odstranění N_{amon} nad 98 % vykazovaly všechny bioreaktory, kromě bioreaktoru A, stabilní provoz. Ten byl pozorován i při zvýšení podílu skládkové vody na 100 %.

A.

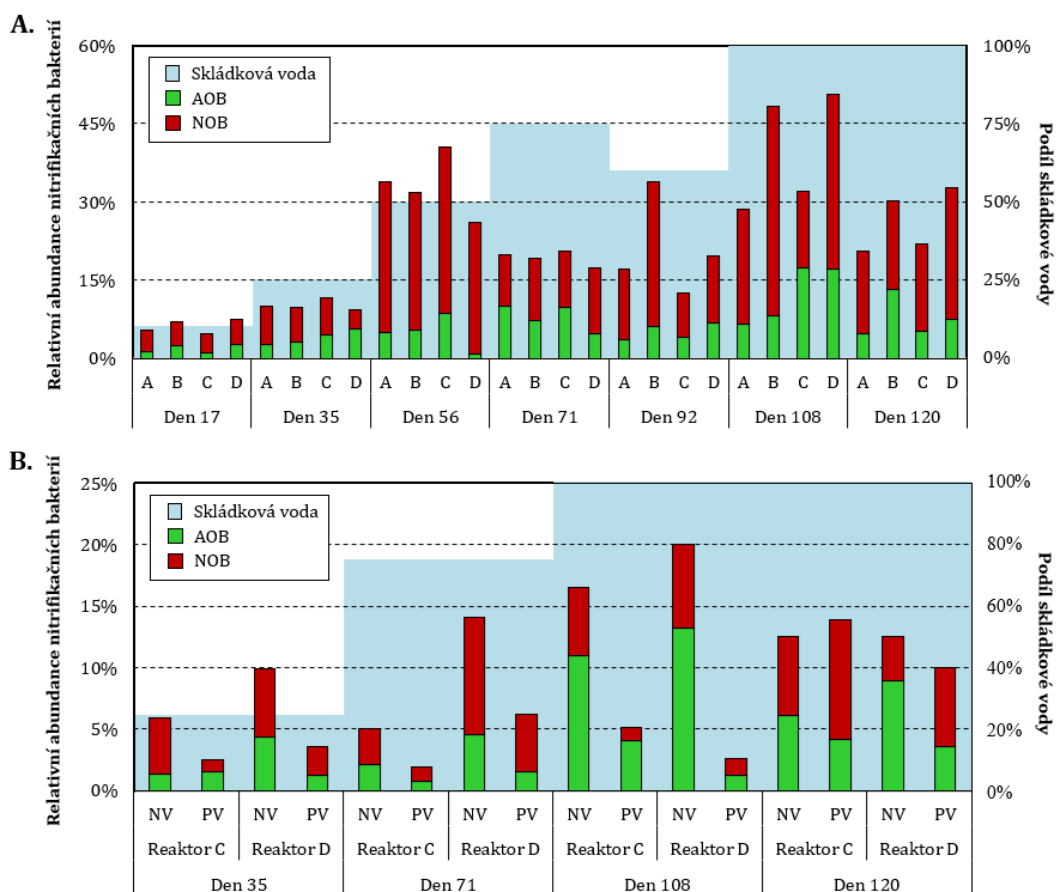


B.



Obrázek 27: Vývoj účinnosti odstranění N_{amon} . (A.) a vývoj koncentrací jednotlivých forem dusíku (B.) v jednotlivých bioreaktorech; A – surová SV bez nosičů, B – prooxidovaná SV bez nosičů, C – surová SV s nosiči, D – prooxidovaná SV s nosiči; SV - skládková voda.

Vývoj abundance AOB a NOB v bioreaktorech v průběhu experimentu monitorovaný prostřednictvím FISH metody je zobrazen na Obr. 28. Během krokového zvyšování podílu skládkové vody v nátoku až do 50 % byl pozorován postupný nárůst zastoupení AOB i NOB v suspenzi ve všech bioreaktorech (Obr. 28A). Po zvýšení podílu skládkové vody v nátoku na 75 %, kdy byla zaznamenána inhibice nitrifikace (viz Obr. 27), byl v suspenzi detekován významně nižší podíl AOB i NOB v porovnání s odběrem před změnou. Další pokles podílu nitrifikačních bakterií (AOB a NOB) v suspenzi byl zaznamenán ve všech bioreaktorech po 2 týdnech provozu s nátokem tvořeným pouze skládkovou vodou, tj. při 100% podílu. Nezávisle na přítomnosti nanovláknenných nosičů bylo v bioreaktorech s prooxidovanou skládkovou vodou (B a D) zastoupení nitrifikačních bakterií vyšší v průběhu experimentu v porovnání s ostatními bioreaktory. Podíl NOB vůči AOB v suspenzi se pohyboval mezi 0,7 a 5,7 místo teoretického podílu 0,5 dle termodynamiky a přenosu elektronů v rovnovážném nitrifikačním systému (Yao a Peng 2017). Vyšší podíl NOB než AOB ve vzorcích indikoval, že zdroj dusitanů (NO_2^-) nebyly pouze AOB, ale ještě například nitrát-redukující bakterie, které byly aktivní v anoxických částech bioreaktorů. Vyšší podíl NOB vůči AOB byl pozorován v laboratorních nitrifikačních reaktorech také v dalších studiích (Yu et al. 2020; Winkler et al. 2012; Havlíček et al. 2021; Yao a Peng 2017). V opačném případě, tedy při vyšším podílu AOB než NOB v reaktoru, by docházelo k akumulaci dusitanů, které by vedlo k vytvoření toxického prostředí v systému a k jeho následnému kolapsu. Po zvýšení podílu skládkového podílu z 50 % na 75 % byl v odběru 71 dní od zahájení experimentu detekován téměř stejný poměr AOB vůči NOB v bioreaktorech A, B a C, u nichž byl v odtoku zaznamenán pokles účinnosti odstranění N_{amon} a akumulace dusitanů (viz Obr. 27).

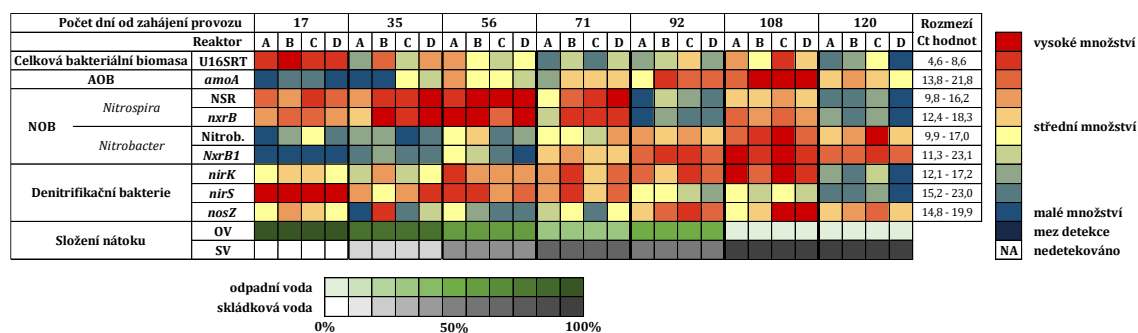


Obrázek 28: Procentuální zastoupení AOB a NOB v průběhu monitoringu v bioreaktorech v suspenzi (A.) a na nosičích (B.); NV - nanovlákná, PV - pomocná vlákna.

V bioreaktorech C a D byly na nosičích (Obr. 28B), jak na niti s nanovláknem, tak na pomocném vlákně, detekovány nitrifikační bakterie. Jejich zastoupení bylo od prvního odběru vyšší na nanovlákněch ve srovnání s pomocným vláknem. V průběhu experimentu se podíl AOB i NOB zvýšil na niti s nanovláknem i na pomocné niti a v posledních dvou odběrech byl podíl nitrifikačních bakterií na pomocné niti na stejné úrovni jako na nanovlákněných nosičích. Vývoj nitrifikačních bakterií na nosičích stanovený pomocí FISH metody prokázal, že nanovlákná podpořila adhezenci AOB a NOB a jejich růst v biofilmu. Po vytvoření vrstvy zralého biofilmu na povrchu nanovlákněného nánosů již pravděpodobně nebyl vývoj jeho konsorcia ovlivněn unikátními vlastnostmi nanovlákn (povrchovou drsností apod.) a tedy se nelišil od vývoje biofilmu v této fázi na pomocném vlákně. Další možné vysvětlení pro stejné zastoupení AOB a NOB v posledním odběru je, že biofilm na nanovlákněné vrstvě byl již ve finální fázi svého

vývoje, během níž dochází k odloučení buněk z povrchu biofilmu. Na nosičích byl zaznamenán 108 dní od zahájení experimentu vyšší podíl AOB než NOB, který na rozdíl od suspenze v předchozím odběru (71 dní od zahájení experimentu, viz výše) neovlivnil negativně účinnost procesu nitrifikace v systému.

Dosažené výsledky z qPCR analýzy jsou interpretovány ve formě heatmapy Ct hodnot⁹, která je zobrazena na Obr. 29. Kromě nižší abundance v bioreaktoru A ve srovnání s ostatními bioreaktory zaznamenané v několika odběrech, nebyl mezi jednotlivými uspořádáními detekován významný rozdíl. V průběhu provozu bioreaktorů byl ve všech uspořádáních detekován postupný nárůst AOB *Nitrosomonas* (marker s označením *amoA*) až do posledního odběru, kdy byl po 2 týdnech provozu bioreaktorů pouze se skládkovou vodou zaznamenán pokles AOB. Abundance NOB *Nitrospira* (markery s označením NSR a *nxB*) byla již od prvního odběru vysoká, ale po mírném nárůstu v první polovině experimentu byl se snižováním podílu komunální odpadní vody v nátoku pozorován její pokles ve všech uspořádáních bioreaktorů až do konce experimentu. Na rozdíl od FISH metody bylo možné pomocí qPCR analýzy detekovat i NOB *Nitrobacter* (markery s označením Nitrob. a *NxrB1*), jejíž množství se postupným zvyšováním podílu skládkové vody v nátoku výrazně zvýšilo. Stejně jako u všech ostatních testovaných markerů byl po 2 týdnech s nátokem tvořeným pouze skládkovou vodou zaznamenán pokles abundance NOB *Nitrobacter*.



Obrázek 29: Heatmapa Ct hodnot detekovaných v bioreaktorech se skládkovou vodou z Osečné v průběhu dlouhodobého monitoringu druhé etapy; OV – odpadní voda, SV – skládková voda.

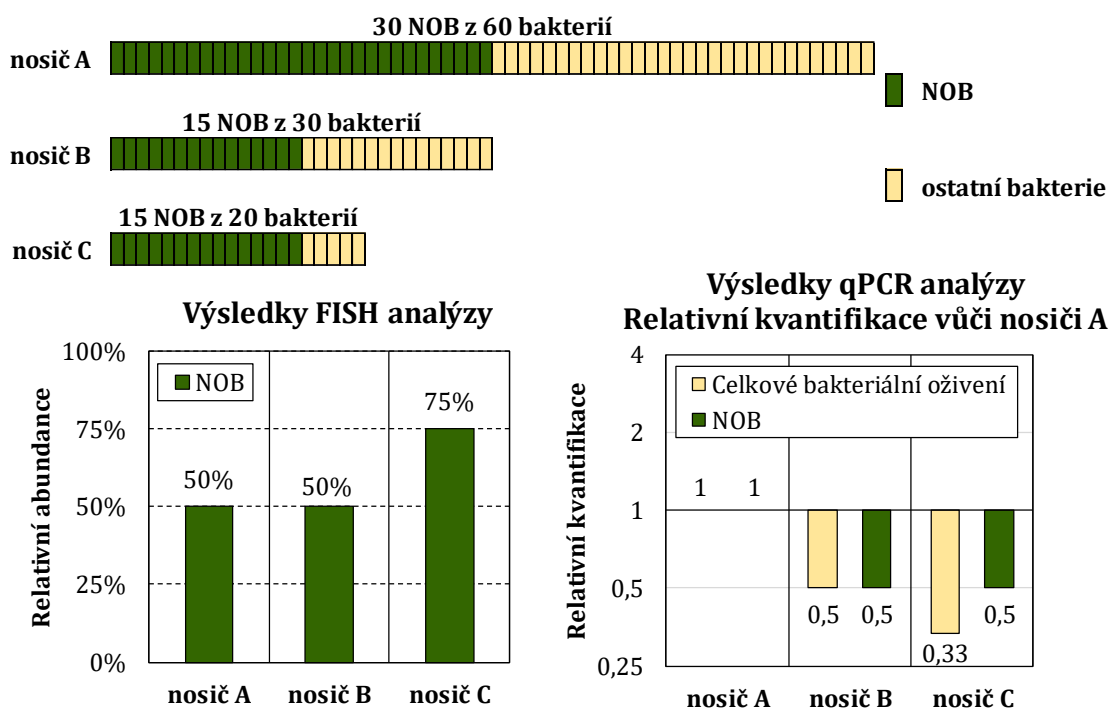
⁹ V případě suspenze byly Ct hodnoty normalizovány na organický podíl nerozpuštěných látek, zatímco u nosičů byly Ct hodnoty normalizovány na hmotnost vzorku vloženého do lyžační zkumavky.

Na rozdíl od FISH metody lze pomocí qPCR analýzy pozorovat i změny ve složení denitrifikační komunity v suspenzi během postupné adaptace mikrobiálního konsorcia na skládkovou vodu (Obr. 29). V případě jednoho z markerů detekujících funkční gen nitrit reduktázy, konkrétně markeru s označením *nirS*, byl detekován pokles jeho abundance se zvyšujícím podílem skládkové vody v nátoku. Naopak u druhého markeru detekujícího funkční gen nitrit reduktázy, *nirK*, byl pozorován nárůst jeho abundance v průběhu provozu bioreaktorů. Jedním z možných vysvětlení tohoto trendu je zvyšující se koncentrace organických látek (CHSK) v nátoku do bioreaktorů v průběhu experimentu (z $\sim 200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ na $\sim 600\text{-}900 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Pozitivní korelace mezi množstvím bakterií s genem *nirK* a koncentrací organických látek společně s negativní korelací mezi množstvím bakterií s genem *nirS* a koncentrací organických látek byla již pozorována ve studiích Bárta et al. (2010) a Assémien et al. (2019). Na konci experimentu byla zaznamenána nízká abundance u obou markerů detekujících funkční gen nitrit reduktázy (*nirS* a *nirK*). Tento trend společně s nárůstem koncentrace dusičnanů (Obr. 27) ve všech bioreaktorech na konci experimentu lze vysvětlit částečnou inhibicí denitrifikačního procesu, která byla pravděpodobně způsobena poklesem hodnoty pH pod 6 v bioreaktorech po zvýšení podílu skládkové vody v nátoku na 100 %. U posledního testovaného markeru denitrifikačních bakterií, *nosZ*, nebyly pomocí qPCR analýzy zaznamenány významné změny v jeho abundanci během experimentu.

Nosiče z bioreaktorů C a D byly odebrány pro qPCR analýzu až v posledním odběru. Veškerá testovaná specifická biomasa detekovaná v suspenzi byla detekována i na nosičích z obou bioreaktorů, jak na niti s nanovláknem, tak na pomocném vláknu. Na obou typech vláken bylo množství AOB i NOB na stejné úrovni, tedy preferenční růst mikroflóry specifické pro nitrifikaci na nanovlákně nebyl pomocí qPCR analýzy potvrzen. Stejně množství nitrifikačních bakterií na nosičích na konci experimentu koresponduje s výsledky FISH metody.

Rozdíl ve výsledcích FISH metody a qPCR analýzy lze vysvětlit citlivostí metody FISH, která je citlivější na malé změny než qPCR analýza. Zatímco dvojnásobný rozdíl v množství AOB či NOB je dobře viditelný pod fluorescenčním mikroskopem během FISH analýzy, dvojnásobné množství cílové DNA je v qPCR analýze roven rozdílu jednoho cyklu ($\Delta C_t = 1$). Rozdíly v C_t hodnotách menší nebo

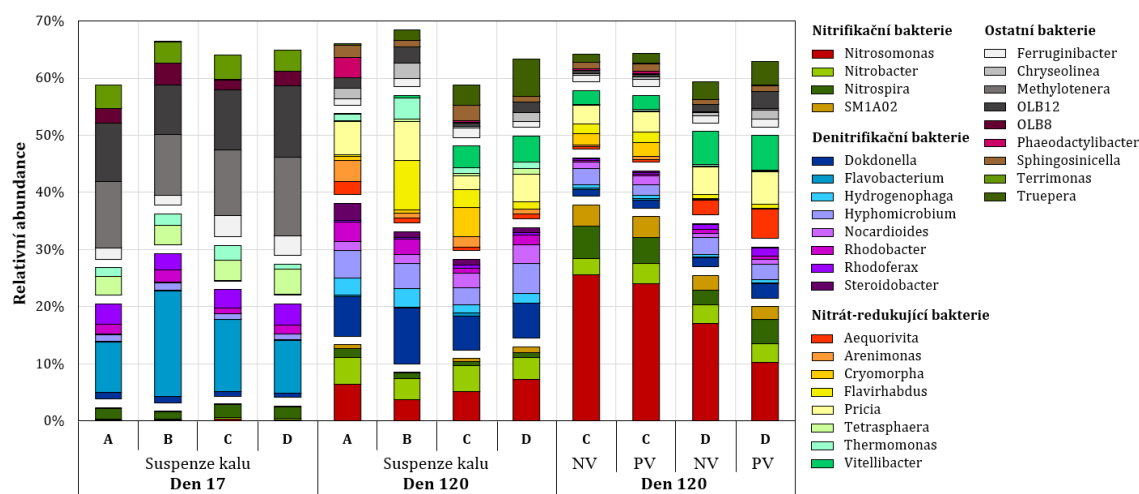
rovné 1 jsou v rámci standardní odchylky analýzy qPCR. Navíc prostřednictvím FISH metody je stanoven podíl AOB či NOB ve vzorku, zatímco qPCR analýzou jsou detekovány rozdíly v množství AOB či NOB mezi jednotlivými vzorky. Například, jsou-li nosiče A, B a C (viz Obr. 30), na nichž je podle FISH metody detekován nejvyšší podíl NOB na nosiči C, zatímco na nosičích A a B je detekován stejný podíl NOB, ale podle qPCR analýzy je nejvyšší množství NOB na nosiči A a na nosičích B a C je stejné množství NOB, znamená to, že na nosiči C probíhá preferenční růst NOB v porovnání s nosiči A a B, ale nosič A vykazuje lepší podmínky k růstu všem přítomným bakteriím včetně NOB.



Obrázek 30: Příklad porovnání interpretace dat z FISH metody a qPCR analýzy na 3 nosičích (A, B, C) se známým množstvím celkové bakteriální biomasy a NOB

Výsledky NGS analýzy jsou zobrazeny pomocí OTU grafu (Obr. 31), na kterém jsou znázorněny nejčastěji zastoupené rody přítomné v daných vzorcích, a to konkrétně na 2,5% hladině. Po postupné adaptaci na skládkovou vodu se v suspenzi ve všech bioreaktorech zvýšilo množství bakteriálních rodů, jejichž zástupci se podílejí na biologické eliminaci anorganických forem dusíku. Ze skupiny nitrifikačních bakterií byly ve vzorcích suspenze a vláken identifikovány AOB *Nitrosomonas*, NOB *Nitrospira*, NOB *Nitrobacter* a dosud nekultivovaný bakteriální rod *SM1A02*. Další skupinu tvořily bakteriální rody *Dokdonella*,

Flavobacterium, *Hydrogenophaga*, *Hyphomicrobium* a *Rhodobacter*, jejichž zástupci jsou schopni aerobní denitrifikace (Pishgar et al. 2019; Zhao et al. 2017). Změna v zastoupení denitrifikačních bakterií v suspenzi bioreaktorů během experimentu, zejména pokles podílu bakteriálních rodů *Flavobacterium* a *Rhodobacter*, by mohla korespondovat s poklesem abundance markeru *nirS* detekovaným pomocí qPCR analýzy. Důvodem je identifikace sekvence genu *nirS* kódujícím cytochrom cd1-nitrit reduktázu u zástupců *Flavobacterium* a *Rhodobacter* (Jones et al. 2008; Pang et al. 2022). Relativní abundance denitrifikačních bakterií identifikovaných v suspenzi pomocí NGS analýzy nebyla významně nižší na konci experimentu v porovnání se začátkem experimentu na rozdíl od výsledků z qPCR analýzy. To lze vysvětlit výrazně nižším celkovým bakteriálním oživením v suspenzi na konci experimentu v porovnání s odběrem 17 dní od zahájení provozu bioreaktorů (Obr. 29). Nižší celkové bakteriální oživení vedlo k tomu, že se významně snížil podíl denitrifikačních bakterií v rámci bakteriálního konsorcia zaznamenaný prostřednictvím NGS analýzy, přestože se snížilo množství denitrifikačních bakterií.



Obrázek 31: Změna struktury bakteriální populace v bioreaktorech po postupné adaptaci na skládkovou vodu. Znázorněny mikroorganismy na úrovni rodu s abundancí > 2,5 %. NV - nanovlákná, PV - pomocná vlákna.

Pomocí NGS analýzy nebyl v suspenzi pozorován vliv stupně předčištění skládkové vody nebo přítomnosti nanovláknenných nosičů na abundanci majoritně zastoupených rodů odpovědných za nitrifikaci nebo denitrifikaci, kromě nižšího podílu denitrifikačních bakterií v bioreaktorech C a D obsahující nosiče. V biofilmu na nosičích byl na konci experimentu v porovnání se vzorky suspenze detekován

výrazně vyšší podíl nitrifikačních bakterií, především AOB *Nitrosomonas*. V případě denitrifikačních bakterií byl sledován výrazně nižší podíl u nosičů než v suspenzi. V bioreaktoru C byla abundance AOB a NOB na niti s nanovlákněným nánosem na stejné úrovni jako na pomocném vláknu, zatímco v bioreaktoru D byl na niti s nanovlákněným nánosem vyšší podíl AOB než na pomocném vláknu. Tento trend byl pozorován na konci experimentu i pomocí FISH metody a qPCR analýzy, jak bylo diskutováno výše (Obr. 28-29). Na rozdíl od vzorků suspenze byl na nosičích zaznamenán negativní vliv prooxidované skládkové vody v nátoku na nitrifikační bakterie, hlavně AOB *Nitrosomonas*. Možným vysvětlením je vznik toxických sloučenin (meziproduktů) ozonizací skládkové vody o nízké koncentraci, které absorpcí do biofilmu narušily přítomné konsorcium včetně nitrifikačních bakterií. Na nosičích byl včetně již prokázaných nitrifikačních bakterií identifikován dosud nekultivovaný bakteriální rod *SM1A02* (kmen *Planctomyces*), o kterém se předpokládá, že patří mezi anammox bakterie, přestože byl identifikován v aerobních nitrifikačních bioreaktorech (Tian et al. 2017). Anaerobní oxidace amoniakálního dusíku tzv. anammox je způsob odstraňování $N_{amon.}$, během něhož dochází k oxidaci $N_{amon.}$ na plynný dusík (N_2) s dusitanovým iontem (NO_2^-) jako elektronovým akceptorem (Op den Camp et al. 2007; Wanner et al. 2019).

4.2.4 Shrnutí

Na základě výsledků první etapy byly pro dlouhodobý experiment zvoleny nosiče s nanovlákněnou vrstvou vyrobené AC elektrosponingem. V druhé etapě bylo pomocí chemických a molekulárně-genetických analýz potvrzeno, že postupná adaptace mikrobiálního konsorcia z ČOV na skládkovou vodu je účinný a efektivní přístup ke zvýšení výkonnosti a stability procesu nitrifikace během čištění skládkových průsakových vod. Vyšší poměr NOB vůči AOB v systému indikoval, že v bioreaktorech byly anoxické oblasti, v nichž docházelo k redukci dusičnanů na dusitany. V případě podílu AOB stejného či většího než NOB v suspenzi byla zaznamenána akumulace dusitanů v bioreaktorech vedoucí ke snížení účinnosti nitrifikace. Ze čtyř testovaných bioreaktorů dosahoval nejvyšší účinnosti odstraňování amoniakálního dusíku (>99 % v průběhu celého experimentu) systém s prooxidovanou skládkovou vodou a s instalovanými nanovlákněnými nosiči. Přínos nanovlákněných nosičů biomasy pro stabilizaci procesu nitrifikace byl

potvrzen také prostřednictvím druhého bioreaktoru s nosiči, kde byla jako nátok použita surová (neprooxidovaná) skládková voda. V tomto bioreaktoru dosahovala účinnost odstraňování amoniakálního dusíku více než 90 % v průběhu celého experimentu. Dále bylo pomocí molekulárně-genetických metod prokázáno, že nanovláknna podporují adhezenci a růst nitrifikačních bakterií. Po postupné adaptaci na skládkové vody byly v bioreaktorech nejvíce zastoupeny nitrifikační bakterie *Nitrosomonas*, *Nitrospira* a *Nitrobacter*.

4.3 Vývoj sterilizační metody nanovláknenných nosičů biomasy

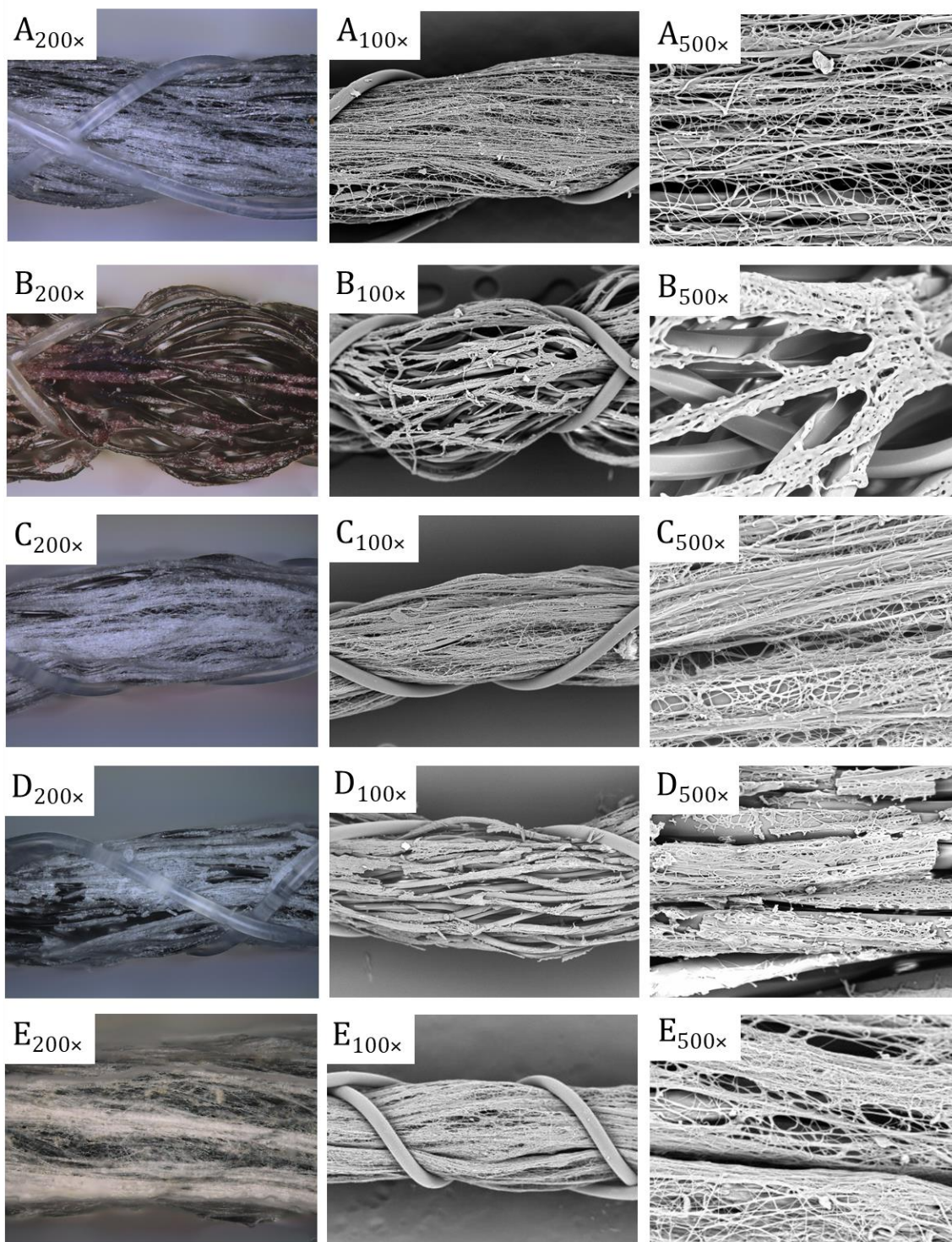
V rámci této části disertační práce byl vyvíjen soubor sterilizačních metod reflektující specifické požadavky pro sterilizaci nanovláknenných nosičů. Charakterizace nanovláknenných nosičů použitých pro vývoj sterilizační metody je v kap. 3.4.3.

4.3.1 Vliv sterilizačních metod na morfologii nanovláken

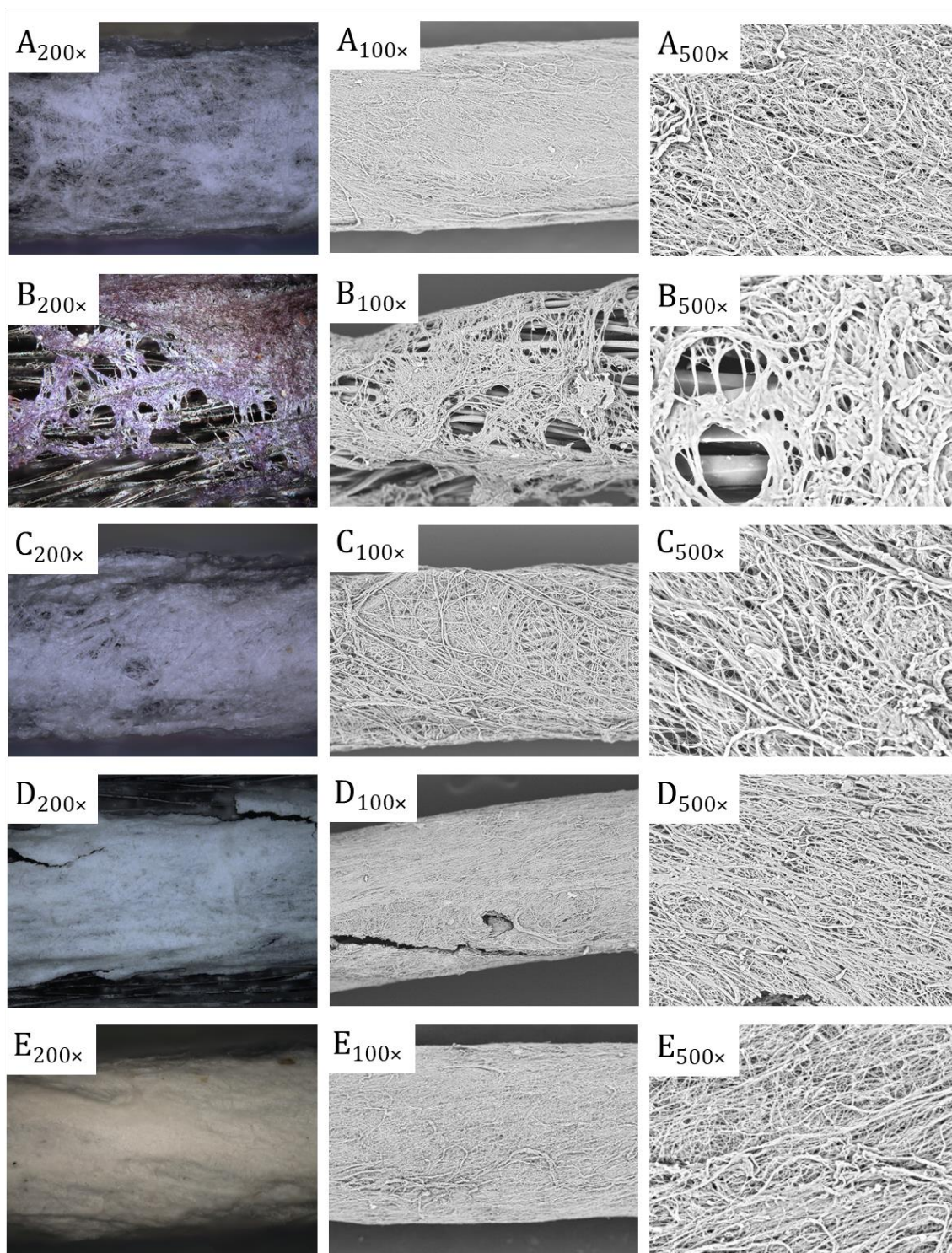
Identifikace případného poškození nanovláknenné vrstvy po aplikaci jednotlivých sterilizačních metod byla provedena prostřednictvím optické a rastrovací elektronové mikroskopie. Dosažené výsledky jsou shrnuty v Tab. 14. Ukázka snímků, prostřednictvím kterých bylo provedeno hodnocení dopadu sterilizace na morfologii nanovláken je pro DC nosiče na Obr. 32 a pro AC nosiče na Obr. 33. Jako příklad jsou tu včetně snímků nanovláknenné vrstvy před sterilizací uvedeny snímky, na nichž je viditelné poškození nanovláknenné vrstvy vlivem sterilizačních metod (fyzikálních i chemických) nebo naopak, na kterých nebyly pozorovány žádné strukturální změny. Výrazné poškození nanovláknenné vrstvy bylo detekováno zejména po sterilizačních metodách, u kterých byly nosiče vystaveny vysoké teplotě, tedy po sterilizaci vlhkým či suchým teplem. Po vystavení vysoké teplotě (120 °C a výše) došlo k roztavení nanovláknenné vrstvy, a zcela zmizela původní 3D struktura, což vedlo ke vzniku míst zcela bez nanovláken. Morfologie nanovláknenné vrstvy nevykazovala žádné významné změny po expozici záření o různých frekvencích ani po expozici gama záření kromě mikrovláknenného záření. Z chemických metod sterilizace byly nejvýrazněji viditelné strukturální změny po aplikaci ozonu a po dlouhodobém vystavení absolutnímu ethanolu. V případě sterilizace ozonem se vytvořily praskliny v nanovláknenné vrstvě a docházelo k jejímu značnému zkrěhnutí, které způsobilo rozpad vrstvy i při nízkém mechanickém zatížení. Po aplikaci roztoku NaOH s NaClO (3-5 % NaClO + 0,1-1 % NaOH v ředění 2:9 s destilovanou vodou) a 0,3% roztoku oxidu chloričitého bylo pozorováno vyšší poškození nanovláknenné vrstvy o nižší lineární hustotě (DC) než u vrstvy s vyšší lineární hustotou (AC), u níž byly strukturální změny zanedbatelné nebo nebyly vůbec pozorovány. U ostatních chemických metod sterilizace nebyl zaznamenán žádný negativní dopad na morfologii nanovláknenné vrstvy.

Tabulka 14: Identifikace dopadu sterilizačních metod na morfologii nanovlákněné vrstvy vyrobené AC resp. DC elektrospinningem

Typ metody	Sterilizační metoda	Prostředí / Parametry sterilizace	Doba expozice	Poškození nanovlákněné vrstvy		
				AC	DC	
Fyzikální metody	Vlhké teplo	v suchém stavu	15 min	ANO	ANO	
		v destilované vodě	15 min	ANO	ANO	
	Suché teplo	160 °C	120 min	ANO	ANO	
	Ultrazvuk	v suchém stavu	15 min	NE	NE	
		v destilované vodě	15 min	NE	NE	
	Světelná sterilizace	254 nm (UV)	30 min	NE	NE	
	Mikrovlnné záření	2450 MHz	1 min	ANO	ANO	
	RF plazma	13,5 MHz	1 min	NE	NE	
	Gama záření	25 kGy		NE	NE	
Chemické metody	Ethanol	100%	5 min	NE	NE	
			6 h	ANO	ANO	
	Peroxid vodíku	30%	5 min	NE	NE	
	Roztok NaOH s NaClO	~ 21 % Cl ₂	15 min	NE	ANO	
			30 min	NE	ANO	
	Oxid chloričitý	0,006%	30 min	NE	NE	
			40 min	NE	NE	
			20 min	NE	NE	
			10 min	NE	NE	
			5 min	NE	ANO	
	Glutaraldehyd	1%	240 min	NE	NE	
			2%	150 min	NE	NE
				240 min	NE	–
	Ozon	v suchém stavu	30 min	ANO	ANO	
			v destilované vodě	30 min	ANO	ANO
Ethylenoxid	100%	12 h	NE	NE		



Obrázek 32: Ukázka z hodnocení strukturálních změn nanovlákněné vrstvy vyrobené DC elektrospinningem (A, B, C, D, E) před sterilizací (A) a po sterilizaci pomocí vlhkého tepla v destilované vodě (B), ultrazvuku v destilované vodě (C), ozonu v destilované vodě (D) a ethylenoxidu (E). Snímky z optického mikroskopu při zvětšení 200× společně se SEM mikrografy při zvětšení 100× a 500×.



Obrázek 33: Ukázka z hodnocení strukturálních změn nanovlákněné vrstvy vyrobené AC elektrospinningem (A, B, C, D, E) před sterilizací (A) a po sterilizaci pomocí vlhkého tepla v destilované vodě (B), ultrazvuku v destilované vodě (C), ozonu v destilované vodě (D) a ethylenoxidu (E). Snímky z optického mikroskopu při zvětšení 200× společně se SEM mikrografy při zvětšení 100× a 500×.

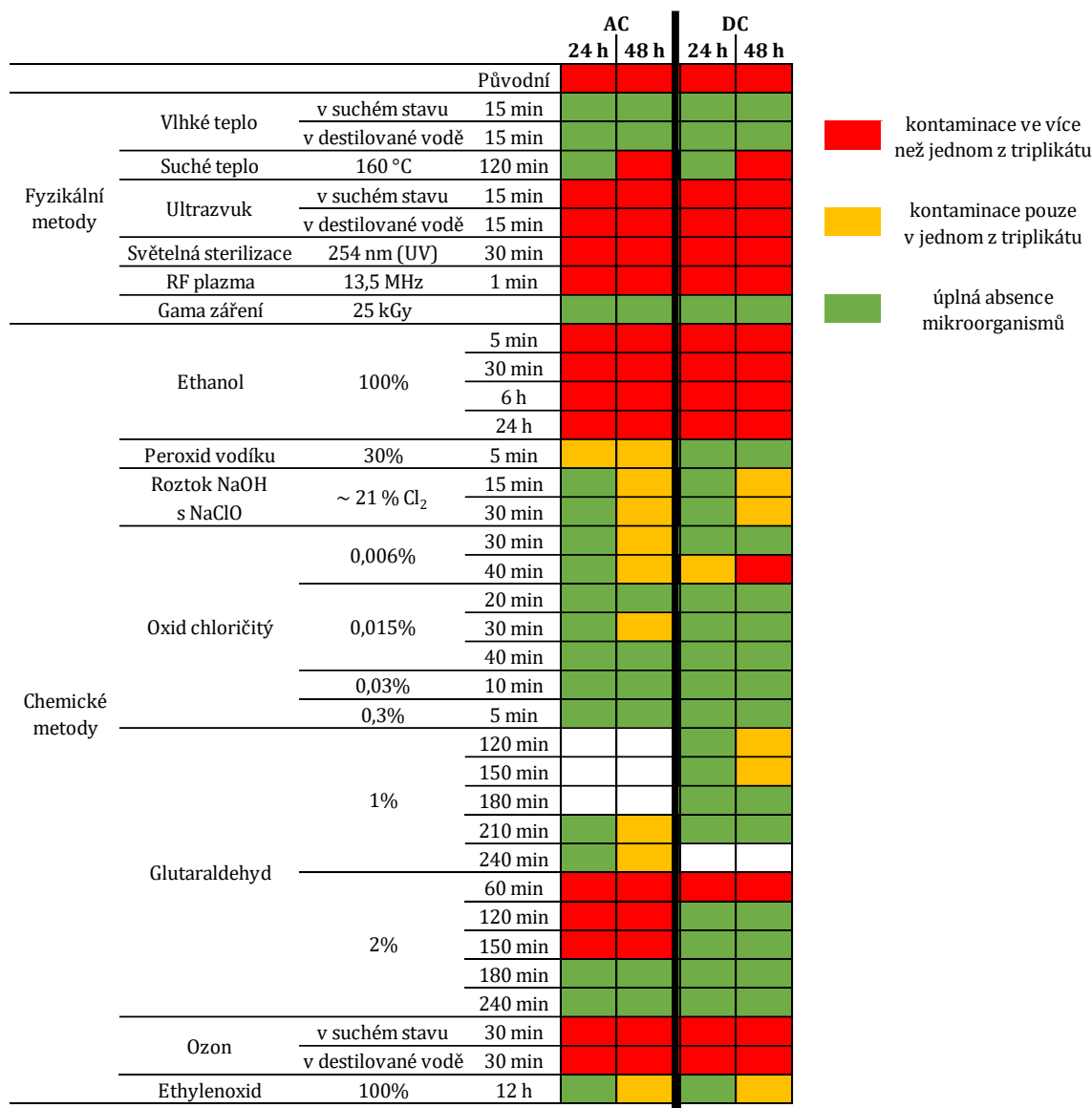
4.3.2 Účinnost sterilizačních metod

Hodnocení kultivačními metodami

Účinnost jednotlivých sterilizačních metod stanovená na základě výsledků konvenčních kultivačních metod byla následně vyhodnocena tzv. semaforovou metodou. Úplná absence mikroorganismů v obou typech živných médií (*Bacillus* médium a Nutrient Broth) při teplotě 23 °C a 30 °C v čase kultivace 24 h a v čase 48 h byla značena zeleně, což bylo považováno za sterilní. Pokud byla zachycena kontaminace v některém kultivačním prostředí ve více než jednom z triplikátu, byl výsledek prezentován červeně. Oranžově byly označeny ty výsledky, kdy dva testované vzorky (z triplikátu) nevykázaly kontaminaci a třetí vzorek ano.

Na Obr. 34 jsou uvedeny výsledky kultivačních analýz po sterilizaci jednotlivými sterilizačními metodami aplikovanými na nanovláknenné nosiče přímo z výroby, tedy bez jejich umělé kontaminace (viz dále). Po většině sterilizačních metod, fyzikálních i chemických, byla zaznamenána kontaminace v jednom z kultivačním prostředí nejpozději po 48 h. U nosičů s vyšší lineární hustotou, tj. u AC nosičů, byla pozorována nižší účinnost sterilizace v porovnání s nosiči s DC nanovláknennou vrstvou. To bylo pravděpodobně způsobeno větší pórovitostí AC nanovláknenné vrstvy v porovnání s DC nanovláknennou vrstvou (viz Obr. 13), což vedlo k většímu množství míst, v nichž byly mikroorganismy „chráněny“ od účinků sterilizace, např. z důvodu pomalejší či minimální difuze sterilizačního činidla či minimalizace kontaktní plochy sterilizačního činidla s vnější stěnou buňky, která byla „chráněna“ okolními přiléhajícími nanovláknny. Z tohoto důvodu byla v případě některých chemických metod testována na AC nosičích delší doba expozice než na DC nosičích. Jediné metody, u nichž nebyla pozorována kontaminace ani po 48 h v žádném kultivačním prostředí u obou typů nosičů, a tudíž tyto metody lze považovat za dostatečně účinné, byly:

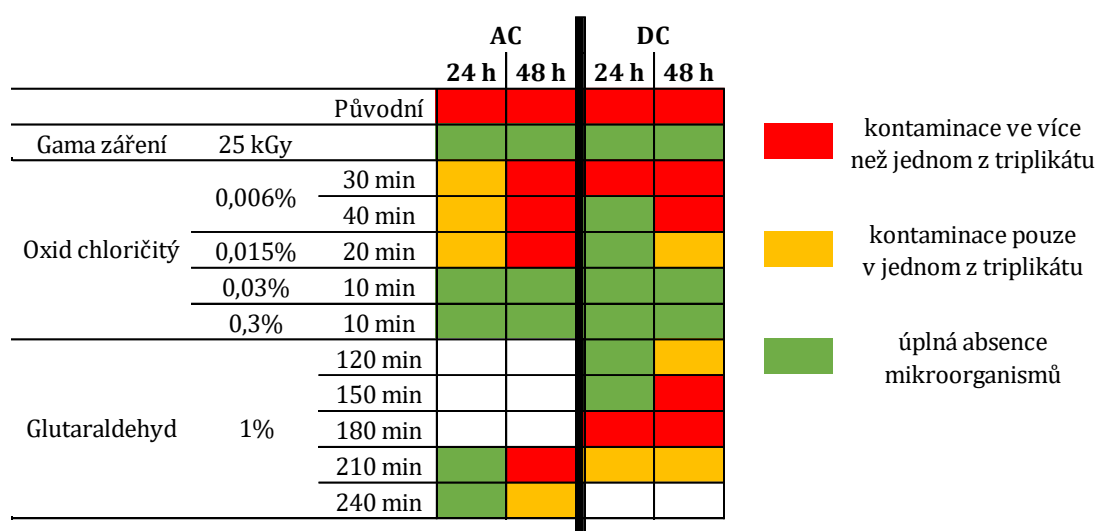
- sterilizace vlhkým teplem (v suchém stavu i v destilované vodě),
- gama záření,
- expozice 0,015%, 0,03% či 0,3% vodnému roztoku oxidu chloričitého,
- expozice 2% vodnému roztoku glutaraldehydu.



Obrázek 34: Heatmapa výsledků kultivačních metod na AC a DC nosičích před a po sterilizaci jednotlivými metodami

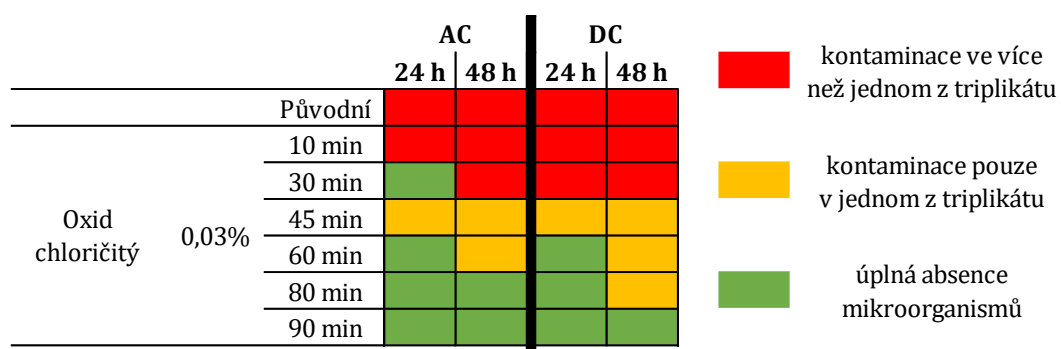
Pouze aplikace roztoku oxidu chloričitého a roztoku glutaraldehydu jsou ze sterilizačních metod, u nichž byla potvrzena účinnost sterilizace v případě kultivovatelných mikroorganismů, uživatelsky dostupné a vykazují zanedbatelnou míru poškození nanovláčkové vrstvy. Z praktického hlediska je sterilizace pomocí 0,03% vodného roztoku oxidu chloričitého po dobu 10 min nejvýhodnější, a to díky své krátké době expozice. Aplikace vodného roztoku oxidu chloričitého o vyšší koncentraci (0,3 %) je sice též dostatečně účinná z hlediska sterilizačního účinku, ovšem může již snadno způsobit podráždění dýchacích cest.

V další fázi vývoje sterilizační metody byla účinnost sterilizace testována na nosičích uměle kontaminovaných referenčním taxonem *Bacillus pumilus* (viz kap. 3.4.3). Testované sterilizační metody byly vybrány na základě výsledků kultivačních metod (viz Obr. 34) společně s výsledky z mikroskopické analýzy (viz Tab. 14). Konkrétně byly zvoleny tři sterilizační metody: gama záření, vodný roztok oxidu chloričitého o koncentracích 0,3%, 0,03%, 0,015% a 0,006% a 1% vodný roztok glutaraldehydu. Na Obr. 35 jsou shrnuty výsledky kultivačních metod po sterilizaci uměle kontaminovaných nanovláknenných nosičů. Pouze po sterilizaci nanovláknenných nosičů gama zářením a po 10min aplikaci 0,03% i 0,3% vodného roztoku oxidu chloričitého nebyla zaznamenána žádná mikrobiální kontaminace, tudíž nosiče lze považovat ze sterilní.



Obrázek 35: Heatmapa výsledků kultivačních metod na AC a DC nosičích uměle kontaminovaných referenčním taxonem *Bacillus pumilus* před a po sterilizaci vybranými sterilizačními metodami

Verifikace účinnosti sterilizační metody, která vykázala nejlepší účinky v předešlých testech a zanedbatelnou míru poškození nanovláknenné vrstvy a byla uživatelsky dostupná, byla provedena s nosiči uměle kontaminovanými spory referenčního kmene *Bacillus pumilus*. Konkrétně se jednalo o sterilizaci pomocí 0,03% vodného roztoku oxidu chloričitého, u kterého byly testovány různé expoziční časy: 10, 30, 45, 60, 80 a 90 min. Dosažené výsledky jsou uvedeny na Obr. 36. Úplná absence kmene *Bacillus pumilus* ve formě sporů byla zaznamenána po 90min expozici nosičů 0,03% vodného roztoku oxidu chloričitého.



Obrázek 36: Testování vlivu expozice 0,03% vodného roztoku oxidu chlorigitého na AC a DC nosiče uměle kontaminovanými spory prostřednictvím kultivačních metod

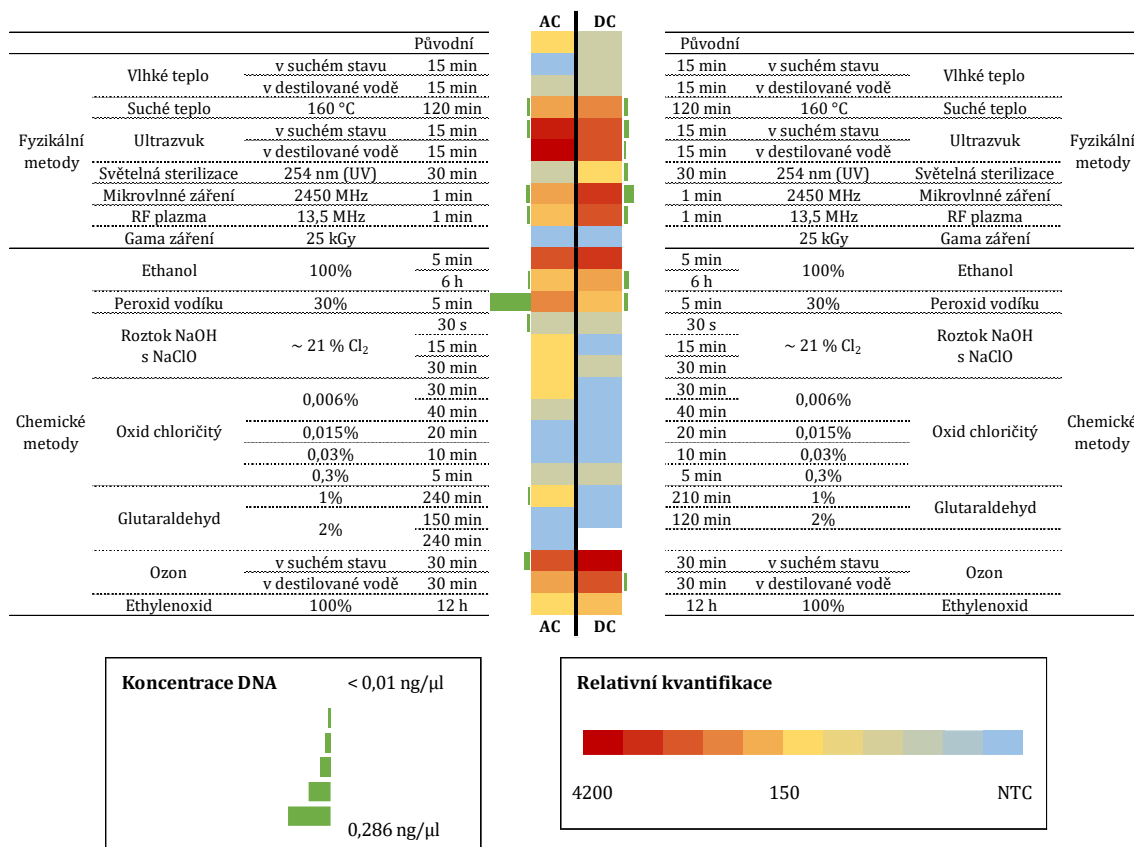
Hodnocení molekulárně-genetickými metodami

Sterilita nanovlákných nosičů byla také hodnocena prostřednictvím koncentrace DNA a relativní kvantifikace výsledků z real-time qPCR analýzy. Kontroly bez templátu (NTC) v jednotlivých analýzách představovaly referenční vzorky. Relativní kvantifikace archeálního a bakteriálního oživení na nosičích před a po sterilizaci jednotlivými sterilizačními metodami je zobrazena ve formě heatmapy na Obr. 37.

Po aplikaci většiny sterilizačních metod, fyzikálních i chemických, byla zaznamenána mikrobiální kontaminace přítomná na nanovlákných nosičích. Na rozdíl od kultivačních metod bylo pomocí molekulárně-genetických metod detekováno již před sterilizací nízké bakteriální oživení přítomné na nosičích. Absence mikrobiální kontaminace na nosičích, tj. relativní kvantifikace na úrovni NTC, byla potvrzena na obou typech nosičů pouze po aplikaci následujících sterilizačních metod:

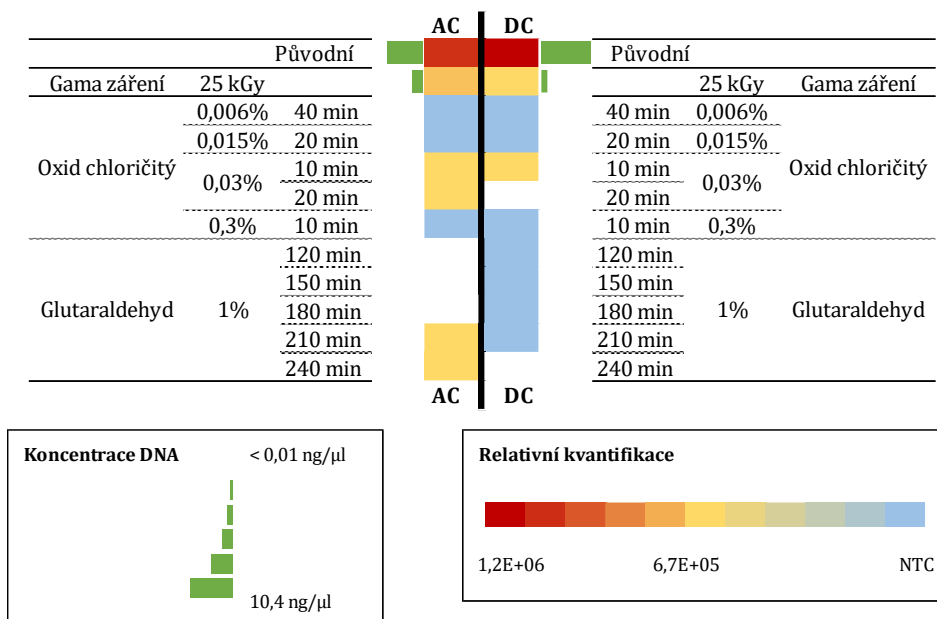
- vlhké teplo (v suchém stavu i v destilované vodě),
- gama záření,
- 0,015%, 0,03% či 0,3% vodný roztok oxidu chlorigitého,
- 2% vodný roztok glutaraldehydu.

Toto zjištění koresponduje zároveň s výsledky dosažených prostřednictvím kultivačních metod (Obr. 34).



Obrázek 37: Heatmapa relativní kvantifikace primeru U16SRT a koncentrace DNA na AC a DC nosičích před a po sterilizaci jednotlivými metodami

Výsledky molekulárně-genetických analýz uměle kontaminovaných nanovlákných nosičů před a po sterilizaci vybranými metodami jsou uvedeny na Obr. 38. Na nosičích po sterilizaci gama zářením bylo detekováno velmi vysoké archeální a bakteriální oživení, což nekorespondovalo s výsledky kultivačních metod, přestože nosiče byly kontaminovány kultivovatelným kmenem *Bacillus pumilus* CCM 2218 ve formě vegetativních buněk, který by měl být detekován také pomocí kultivačních metod. Vzhledem k vysokému oživení nosičů byl tento jev pravděpodobně způsoben externí kontaminací nosičů, např. během jejich manipulace či transportu, nekultivovatelnými mikroorganismy, které byly detekovány molekulárně-genetickými analýzami, ale ne kultivačními metodami.



Obrázek 38: Heatmapa relativní kvantifikace primeru U16SRT a koncentrace DNA na AC a DC nosičích uměle kontaminovaných referenčním taxonem *Bacillus pumilus* před a po sterilizaci jednotlivými metodami

Úplná absence mikrobiální kontaminace byla potvrzena u obou typů nosičů pouze po aplikaci vodného roztoku oxidu chloričitého o všech testovaných koncentracích kromě 0,03 %. Abundance archeální a bakteriální biomasy na nosičích sterilizovaných prostřednictvím 0,03% vodného roztoku oxidu chloričitého a též 2% vodného roztoku glutaraldehydu byla výrazně nižší (min. 1000x nižší) než po sterilizaci gama zářením. V případě nosičů sterilizovaných 0,03% vodným roztokem oxidu chloričitého byla pomocí qPCR analýzy pravděpodobně detekována externí nekultivovatelná mikrobiální kontaminace nebo DNA z mrtvých buněk *Bacillus*, jelikož pomocí kultivačních mikrobiologických metod byla v triplicátu¹⁰ potvrzena sterilita těchto nosičů. Referenční kmen *Bacillus* patří mezi kultivovatelné mikroorganismy, které je možné snadno detekovat pomocí kultivačních metod. V případě, že DNA z mrtvých buněk ve vzorku nedenukuje, je izolována společně s DNA z živých buněk a nelze ji bez specifického protokolu¹¹ pomocí qPCR analýzy odlišit. Navíc byla sterilita nosičů potvrzena i u nižších koncentrací oxidu

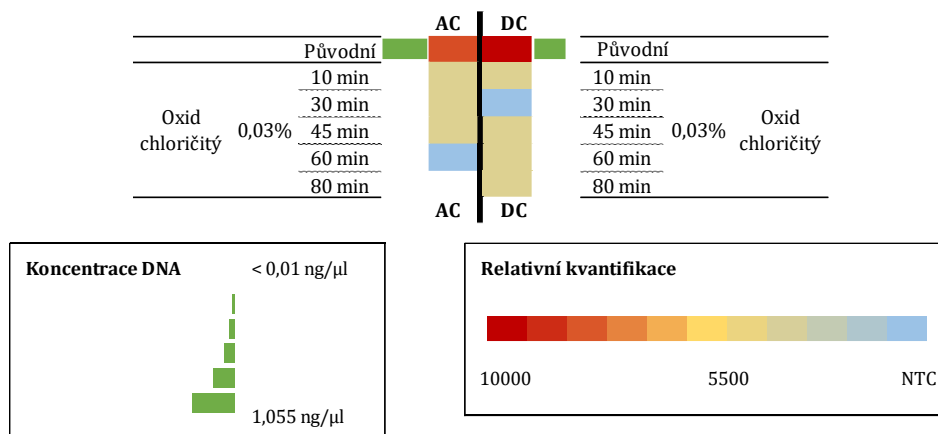
¹⁰ V triplicátech v obou typech živných médií (*Bacillus* médium a Nutrient Broth) při teplotě 23 °C a 30 °C v čase 24 h a v čase 48 h, tedy v celkem ve 24 vzorcích.

¹¹ Přidání barviva (např. propidium monoazidu) pro modifikaci volné DNA před izolací způsobující deaktivaci její amplifikace při qPCR.

chloridického. Abundance DNA na nosičích po aplikaci 0,03% vodného roztoku oxidu chloridického byla pouze 15-30krát vyšší než po aplikaci nižších koncentrací, u nichž byla abundance archeální a bakteriální DNA na úrovni NTC. V případě nejvyšší testované koncentrace oxidu chloridického (0,3%) došlo během sterilizace pravděpodobně k fragmentaci veškeré DNA, ke které dochází po aplikaci vodného roztoku oxidu chloridického o koncentracích vyšších než 0,01 % ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) (Zhu et al. 2013). Fragmenty DNA nebylo po jejich extrakci z buněk možné detekovat prostřednictvím qPCR analýzy kvůli poškození sekvencí komplementárních k primerům (U16SRT) anebo poškození samotné cílové sekvence (Sedlackova et al. 2013).

Pro stanovení příčiny detekce mikrobiální kontaminace na nosičích sterilizovaných 0,03% vodným roztokem oxidu chloridického byla u těchto vzorků provedena NGS analýza (viz kap. 3.2.4). Na obou typech nosičů byl identifikován bakteriální rod *Pseudomonas* s vysokým procentuálním podílem, konkrétně 95,6 % na AC nosiči a 98,8 % na DC nosiči. Podíl bakteriálního rodu *Bacillus* byl na DC nosiči nulový a na AC nosiči 0,03 %. Z toho vyplývá, že detekce přítomnosti bakteriální biomasy na nosičích sterilizovaných 0,03% vodným roztokem oxidu chloridického byla způsobena externí kontaminací nosičů bakterií *Pseudomonas* a ne referenčním kmenem *Bacillus pumilus* CCM 2218, kterým byly nosiče uměle kontaminovány před sterilizací. Ke kontaminaci nosičů bakterií *Pseudomonas*, která patří do skupiny všudypřítomných mikroorganismů, mohlo dojít během manipulace nebo transportu nosičů.

Výsledky z molekulárně-genetických analýz při verifikaci sterilizačního postupu u metody, která vykazala nejlepší sterilizační účinky v předešlých testech, tj. u sterilizace 0,03% vodným roztokem oxidu chloridického jsou uvedeny na Obr. 39. Pomocí real-time qPCR analýzy byla po sterilizaci nanovláčkových nosičů uměle kontaminovanými sporami referenčního kmenu *Bacillus pumilus* zaznamenána velmi nízká mikrobiální kontaminace – téměř na úrovni NTC (Obr. 39). Množství spor bylo sterilizací sníženo o téměř 100 %. Podobně jako v případě sterilizace nosičů uměle kontaminovaných vegetativními buňkami mohla být detekce mikrobiální kontaminace způsobena nedenaturovanou DNA z mrtvých buněk či externí kontaminací během manipulace nebo transportu nosičů.



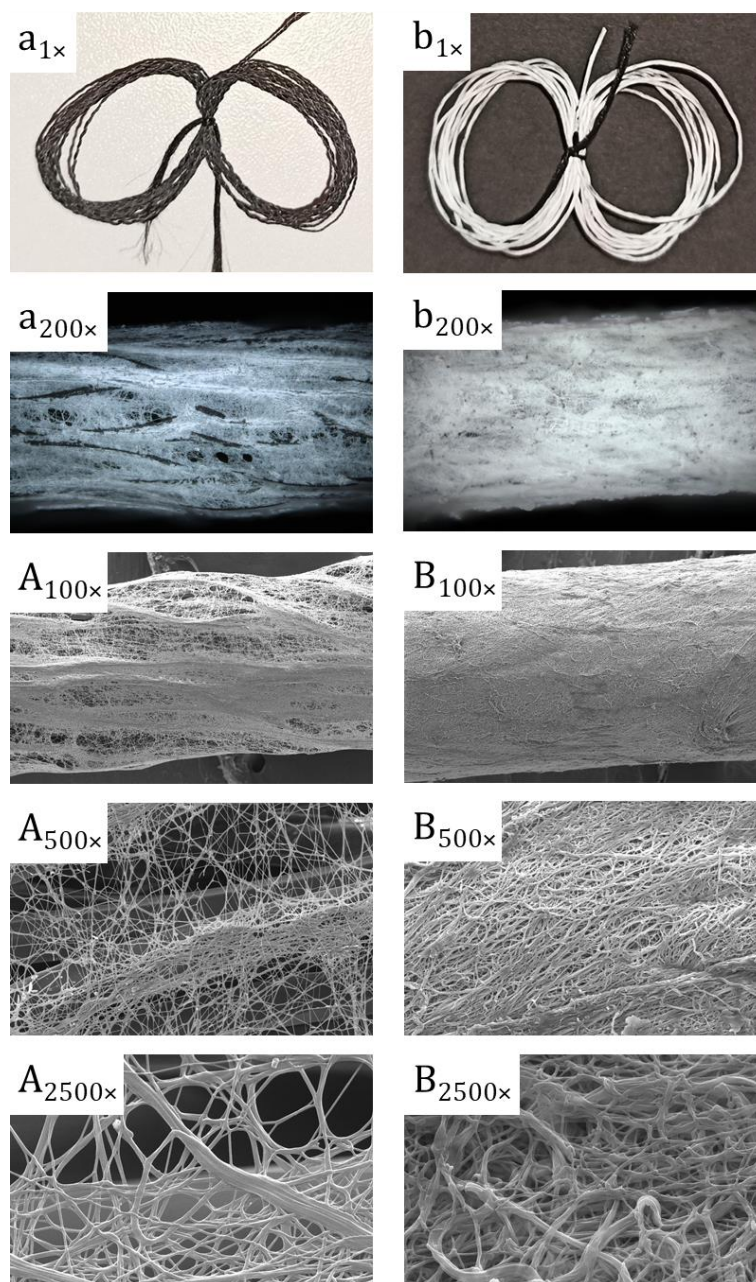
Obrázek 39: Heatmapa relativní kvantifikace primeru U16SRT a koncentrace DNA na uměle kontaminovaných nosičích sporami před a po sterilizaci aplikací 0,03% vodného roztoku oxidu chloričitého

Analýzou účinnosti sterilizace uměle kontaminovaných nosičů použitím kultivačních a molekulárně-genetických metod se ukázalo, jak se mohou v případě monitoringu kultivovatelných mikroorganismů doplňovat tyto metody. Detekce 16S rRNA genu na nosičích pomocí qPCR analýzy a zároveň potvrzení absence mikroorganismů, tj. kmene *Bacillus pumilus*, ve dvou různých živných médiích inkubovaných při teplotách 23 °C a 30 °C po dobu 24 h či 48 h indikuje buď externí nekultivovatelnou mikrobiální kontaminaci, nebo DNA z mrtvých buněk detekovanou pomocí qPCR analýzy.

4.3.3 Shrnutí

Aplikace 0,03% vodného roztoku oxidu chloričitého po dobu 10 minut je účinná sterilizační metoda nanovlákných nosičů, po které nedošlo k žádné změně materiálových ani strukturálních vlastností nanovláken přítomných na nosičích (Obr. 40) a zároveň bylo dosaženo vysoké míry sterility. V případě umělé kontaminace vegetativními buňkami, resp. spormi byla doba expozice prodloužena na 20 min, resp. 90 min. Účinnost této sterilizační metody byla opakovaně prokázána prostřednictvím kultivačních a molekulárně-genetických metod. Jedná se o levnou a široce dostupnou metodu s velmi malými nároky na instrumentaci. Po sterilizaci je nosič uchováván ve sterilním obalu, konkrétně ve sterilním uzavíratelném PE sáčku typu Whirl-Pak®. Verifikace účinnosti technologického protokolu sterilizační metody byla provedena českou biotechnologickou společností

BIOINOVA. Dokumentace k validaci metody obsahující metodiku a výsledky je přiložena v příloze C.



Obrázek 40: Nosné nitě s nanovláknennou vrstvou vyrobenou pomocí DC (a, A) resp. AC elektrospinningu (b, B) po sterilizaci 0,03% vodným roztokem oxidu chloričitého. Snímky z optického mikroskopu (a, b) a rastrovacího elektronového mikroskopu (A, B) při různém zvětšení (100×, 200×, 500× a 2500×).

5 Uplatnění výsledků a praktický přínos práce

Jedním z hlavních výstupů této disertační práce je soubor nanovláknenných nosičů vhodných pro vzorkování mikrobiální biomasy společně s návodem jejich aplikace pro efektivní monitoring vodní mikroflóry hodnocený prostřednictvím molekulárně-genetických metod. Aplikovatelnost nanovláknenných nosičů pro vzorkování mikrobiální biomasy z vod byla dlouhodobě ověřena na několika reálných lokalitách. Monitoring mikroflóry pomocí nanovláknenných nosičů by mohl nalézt uplatnění nejen ve vodním či v půdním prostředí, ale i ve vinařství či pivovarnictví. Využití nanovláknenných nosičů pro monitoring mikroflóry vede ke zjednodušení procesu vzorkování biomasy, snížení prostorové náročnosti transportu vzorků, významnému urychlení zpracování vzorků před molekulárně-genetickými analýzami a zejména k významné redukci rizika kontaminace vzorků při jejich zpracování.

Dalším výstupem této disertační práce bylo ověření aplikovatelnosti nanovláknenných nosičů pro stabilizaci procesu nitrifikace v biologickém systému čištění skládkové vody. Díky nosičům biomasy nedocházelo k úniku aktivní biomasy ze systému a zároveň systém vykazoval v průběhu celého 120denního experimentu vyšší stabilitu nitrifikace, tj. účinnost odstraňování amoniakálního dusíku vyšší než 90 %, při vyšších koncentracích skládkové vody v nátoku a při akumulaci dusitanů v systému. Nanovláknenné nosiče naleznou uplatnění jak při čištění skládkových vod či podobných obtížně biologicky čistitelných vod, tak při biologickém čištění komunálních odpadních vod.

Posledním výstupem je, v rámci této disertační práce vyvinutý, sterilizační protokol reflektující specifika nanovláknenných materiálů, respektive sterilní nanovláknenný nosič biomasy. Vyvinutý sterilizační protokol zajišťuje dosažení povrchové čistoty nanovláknenných nosičů biomasy v podobě absence veškerého nežádoucího mikrobiálního osídlení při současném minimálním vlivu na morfologii nanovláken. Vyvinutý sterilizační protokol nalezne uplatnění v oblastech vyžadujících vysokou míru sterility, což je většina biotechnologických aplikací (nano)vláknenných materiálů. Jedná se například o využití nanovláknenných struktur jako nosičů biomasy v potravinářství (konzervační nosiče ve fermentačních procesech ve vinařství či pivovarnictví) a zdravotnictví (scaffoldy či kožní kryty).

Vyvinutý sterilizační protokol je však možné využít i pro sterilizaci jiných materiálů než nanovlákných, například mikrovlákných materiálů. Nezávislá verifikace účinnosti sterilizační metody byla provedena biotechnologickou společností BIOINOVA, která o výsledky projevila zájem.

6 Závěr

V rámci této práce byly vyvinuty různé tvarové varianty nanovláknenných nosičů biomasy, které v kombinaci s molekulárně-genetickými metodami vedly k vytvoření efektivní metody monitoringu mikrobiální biomasy ve vodním prostředí. Na základě výsledků dlouhodobého experimentu na kontaminované lokalitě společně s požadavky pro nosič biomasy vhodný pro molekulárně-genetickou analýzu byl z vyvinutých nosičů zvolen cirkulární nosič s nanovláknennou vrstvou na bázi polyuretanu jako optimální nástroj pro dlouhodobý monitoring mikrobiální biomasy ve vodním prostředí. Cirkulární nanovláknenné nosiče byly následně aplikovány v rámci dalších verifikačních experimentů na 7 odlišných lokalitách, během nichž byla také prokázána jejich využitelnost jako efektivního nástroje monitoringu autochtonní mikrobiální biomasy ve vodním prostředí. Vzorkování mikrobiální biomasy prostřednictvím cirkulárních nanovláknenných nosičů je nejen uživatelsky, ekonomicky a časově nenáročný, ale i snižuje riziko kontaminace vzorků při jejich zpracování a eliminuje riziko expozice laboratorního personálu případným toxickým látkám během filtrace kapalných vzorků.

Na základě potvrzení aplikovatelnosti vyvinutých nanovláknenných nosičů pro vzorkování mikrobiální biomasy byly nanovláknenné nosiče testovány v laboratorních systémech biologického čištění skládkové vody. V rámci této části disertační práce bylo prokázáno, že nanovláknena podporují adhezenci a růst nitrifikačních bakterií a že kombinace instalace nanovláknenných nosičů a ozonizace vstupní skládkové vody zvyšuje stabilitu procesu nitrifikace. Konkrétně postupná adaptace mikrobiálního konsorcia z ČOV na skládkové vody v bioreaktoru s nanovláknennými nosiči biomasy ve spojení s ozonizací vstupní skládkové vody vedla k účinnosti odstraňování amoniakálního dusíku vyšší než 99 % po celou dobu experimentu i při nátoku tvořeném pouze skládkovou vodou. Vývoj nitrifikační biomasy v bioreaktorech korespondoval s výsledky chemických analýz odtoků, například při zvýšení poměru AOB vůči NOB byla zaznamenána akumulace dusitanů vedoucí ke snížení účinnosti odstraňování amoniakálního dusíku.

V návaznosti na vyvinuté nanovláknenné nosiče biomasy a požadavky povrchové sterility u aplikací citlivých na mikrobiální kontaminaci byl v této práci dosažen nezávisle verifikovaný technologický protokol sterilizace nanovláknenných nosičů. Celkem bylo testováno čtrnáct způsobů sterilizace, fyzikálních a chemických,

společně s jejich modifikacemi, jako byly například rozdílné koncentrace aplikovaných chemických látek či změna doby expozice. Na základě výsledků mikroskopických, kultivačních a molekulárně-genetických metod byla 10min expozice nosiče 0,03% vodnému roztoku oxidu chloričitého zvolena jako vhodná sterilizační metoda nanovlákných nosičů, která je uživatelsky, časově a ekonomicky nenáročná. Verifikace účinnosti sterilizační metody byla provedena českou biotechnologickou společností BIOINOVA a dokumentace k ní je uvedena v příloze C.

V rámci této práce byl pro analýzu mikrobiální biomasy použit soubor biologických metod, jejichž výsledky dávaly informace o mikrobiotě z jiných úhlů pohledu a které se vzájemně doplňovaly. Například kombinací kultivačních mikrobiologických metod a qPCR analýzy v případě vzorku obsahujícího pouze kultivovatelný bakteriální kmen bylo dosaženo rozdílných výsledků, které byly pravděpodobně způsobeny detekcí DNA z mrtvých buněk či externí kontaminací během manipulace nebo transportu nosičů. Tedy v případě monitoringu vývoje čistých kultivovatelných kmenů při nízkých koncentracích by měly být použity metody kultivační společně s molekulárně-genetickými analýzami.

Preferenční růst specifické biomasy v rámci mikrobiální komunity je možné stanovit pomocí FISH metody nebo NGS analýzy, zatímco preferenční růst specifické biomasy mezi vzorky je detekován qPCR analýzou. Vysoký podíl specifické biomasy v biofilmu je důležitý pro účinnost systému, například během provozu biofilmových reaktorů. Pro detekci reakce mikrobioty na změnu chemismu na lokalitě (např. sanační zásah) či v reaktoru (např. zvýšení zatížení systému) se jako vhodný diagnostický nástroj ukázala qPCR analýza (nárůst či pokles specifických mikroorganismů) a NGS analýza (změna složení konsorcia).

Výsledky této disertační práce byly publikovány v několika odborných publikacích a byly prezentovány na národních i mezinárodních konferencích. Poznatky získané během vypracování disertační práce, ať v oblasti nanovlákných nosičů biomasy či molekulárně-genetických analýz, byly aplikovány v dalších činnostech, například v rámci řešení několika VaV projektů.

7 Seznam výsledků z doktorského studia

7.1 Publikace v impaktovaném časopise

NECHANICKÁ, Magda, Iva DOLINOVÁ, Roman ŠPÁNEK, Denisa TOMEŠOVÁ a Lukáš DVOŘÁK, 2021. Application of nanofiber carriers for sampling of microbial biomass from contaminated groundwater. *Science of The Total Environment* [online]. 780, 146518. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146518.

HAVLÍČEK, Karel, Magda NECHANICKÁ, Tomáš LEDERER a Brigita KOLČAVOVÁ SIRKOVÁ, 2021. Analysis of nitrifying bacteria growth on two new types of biomass carrier using respirometry and molecular genetic methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 225, 112795. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112795

NĚMEČEK, Jan, Magda NECHANICKÁ, Roman ŠPÁNEK, František EICHLER, Josef ZEMAN a Miroslav ČERNÍK, 2019. Engineered in situ biogeochemical transformation as a secondary treatment following ISCO – a field test. *Chemosphere* [online]. 237, 124460. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124460.

SVOBODOVÁ, Lucie, Karel HAVLÍČEK, Magda NECHANICKÁ, Roman ŠPÁNEK, Brigita Kolčavová SIRKOVÁ, Irena LENFELDOVÁ, Ondřej LOUDA, Eva MOUČKOVÁ a Tomáš LEDERER, 2021. Microfiber structure for enhanced immobilization of nitrifying bacteria in a post-nitrification reactor. *Environmental Technology & Innovation* [online]. 21, 101373. ISSN 2352-1864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2021.101373.

7.2 Publikace v recenzovaných časopisech

NECHANICKÁ, Magda, Iva DOLINOVÁ, Denisa VLKOVÁ, a Lukáš DVOŘÁK, 2018. Využití nanovláknenných nosičů pro monitoring biomasy na kontaminované lokalitě. *Vodní hospodářství*. 68(6), 11–15. ISSN 1211-0760.

HAVLÍČEK, Karel, Magda NECHANICKÁ a Lucie SVOBODOVÁ, 2020. Příprava a hodnocení nanovláknenných materiálů pro aplikace v oblasti čištění odpadních vod. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. 62(4), 16–24. ISSN 0322-8916, 1805-6555.

7.3 Příspěvky na konferenci

NECHANICKÁ, Magda, Iva DOLINOVÁ, Denisa VLKOVÁ a Lukáš DVOŘÁK, 2018. Development of nanofiber carrier for monitoring of biomass at a contaminated site. In: *NANOCON 2017 - Conference Proceedings, 9th International Conference on Nanomaterials - Research and Application*. s. 397–403. ISBN 978-80-87294-81-9.

NECHANICKÁ, Magda, Lukáš DVOŘÁK a Iva DOLINOVÁ, 2019. Use of nanofiber carriers for monitoring of microbial biomass. In: *Topical Issues of Rational Use of Natural Resources - Proceedings Of The International Forum-Contest of Young Researchers, 2018*. s. 361–370. ISBN 978-0-367-02743-8.

NECHANICKÁ, Magda a Lukáš DVOŘÁK, 2019. Sterilization of nanofiber biomass carriers for biotechnology applications. In: Topical Issues of Rational use of Natural Resources 2019 Proceedings of the XV International Forum-Contest of Students and Young Researchers under the auspices of UNESCO (St. Petersburg Mining University, Russia, 13-17 May 2019). s. 53. ISBN 978-5-94211-875-4.

NECHANICKÁ, Magda, Milena JOHNOVÁ a Lukáš DVOŘÁK, 2020. Intenzifikace biologického čištění skládkových vod nanovláknými nosiči. In: *Mladá voda břehy mele 2020*. Brno: Young Water Professionals Czech republic, s. 1–8. ISBN 978-80-270-8323-7.

NECHANICKÁ, Magda, Kristýna MARKOVÁ a Jaroslav NOSEK, 2019. Evaluation of nZVI injection at the contaminated site using newly developed software. In: *World Nanotechnology Conference*.

NECHANICKÁ, Magda, Elisabet PERONA-VICO, Karel HAVLÍČEK, Narcís POUS, Sebastià PUIG, Lukáš DVOŘÁK a Lluís BAÑERAS, 2021. Development and application of conductive nanomaterials for bioelectrochemical denitrification. In: *5th European Meeting of the International Society for Microbial Electrochemistry and Technology*.

8 Literatura

- ACHINAS, Spyridon, Nikolaos CHARALAMPOGIANNIS a Gerrit Jan Willem EUVERINK, 2019. A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Applied Sciences* [online]. **9**(14), 2801. Dostupné z: doi:10.3390/app9142801
- ALEER, Sam, Eric M. ADETUTU, John WEBER, Andrew S. BALL a Albert L. JUHASZ, 2014. Potential impact of soil microbial heterogeneity on the persistence of hydrocarbons in contaminated subsurface soils. *Journal of Environmental Management* [online]. **136**, 27–36. ISSN 0301-4797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2014.01.031
- ALESSANDRELLO, Mauricio J., Eduardo A. PARELLADA, María S. JUÁREZ TOMÁS, Adriana NESKE, Diana L. VULLO a Marcela A. FERRERO, 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacterial cells using annonaceous acetogenins for biofilm formation stimulation on polyurethane foam. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. **5**(1), 189–195. ISSN 2213-3437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2016.11.037
- AMANN, R. I., B. J. BINDER, R. J. OLSON, S. W. CHISHOLM, R. DEVEREUX a D. A. STAHL, 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**(6), 1919–1925. ISSN 0099-2240.
- AMANN, Rudolf a Bernhard M. FUCHS, 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **6**(5), 339–348. ISSN 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro1888
- AN, Yong-zhen, Chun-hua WANG, Peng MIAO, Xiao-xu WANG, Jie-ying LIANG a Jie LIU, 2018. Improved decontamination performance of biofilm systems using carbon fibers as carriers for microorganisms. *New Carbon Materials* [online]. **33**(2), 188–192. ISSN 1872-5805. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-5805(18)60334-8
- ARMENANTE, Piero M. a Otute AKITI, 2019. Sterilization Processes in the Pharmaceutical Industry. In: *Chemical Engineering in the Pharmaceutical Industry* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, s. 311–379 [vid. 2022-09-28]. ISBN 978-1-119-60080-0. Dostupné z: doi:10.1002/9781119600800.ch64
- ASSÉMIEN, Féline L., Amélie A. M. CANTAREL, Alessandro FLORIO, Catherine LERONDELLE, Thomas POMMIER, Jean Tia GONNETY a Xavier LE ROUX, 2019. Different groups of nitrite-reducers and N2O-reducers have distinct ecological niches and functional roles in West African cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. **129**, 39–47. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2018.11.003
- ATASHGAHI, Siavash, Yue LU, Ying ZHENG, Edoardo SACCENTI, Maria SUAREZ-DIEZ, Javier RAMIRO-GARCIA, Heinrich EISENMANN, Martin ELSNER, Alfons J. M. STAMS, Dirk SPRINGAEL, Winnie DEJONGHE a Hauke SMIDT, 2017. Geochemical and microbial community determinants of reductive dechlorination at a site biostimulated with glycerol. *Environmental Microbiology* [online]. **19**(3), 968–981. ISSN 1462-2920. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.13531
- AYU WIDYASARI, Diaz, Anis KRISTIANI, Ahmad RANDY, Robeth V. MANURUNG, Rizna TRIANA DEWI, Agustina SUS ANDREANI, Brian YULIARTO a S. N. AISYIYAH JENIE, 2022. Optimized antibody immobilization on natural silica-based nanostructures for the selective detection of E. coli. *RSC Advances* [online]. **12**(33), 21582–21590. Dostupné z: doi:10.1039/D2RA03143D
- BAKKEN, Lars R. a Åsa FROSTEGÅRD, 2006. Nucleic Acid Extraction from Soil. In: Paolo NANNIPIERI a Kornelia SMALLA, ed. *Nucleic Acids and Proteins in Soil* [online]. B.m.: Springer Berlin Heidelberg, Soil Biology, s. 49–73 [vid. 2023-02-12]. ISBN 978-3-540-29448-1. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-29449-X_3
- BÁRTA, Jiří, Tereza MELICHOVÁ, Daniel VANĚK, Tomáš PICEK a Hana ŠANTRŮČKOVÁ, 2010. Effect of pH and dissolved organic matter on the abundance of nirK and nirS denitrifiers in spruce forest soil. *Biogeochemistry* [online]. **101**(1), 123–132. ISSN 1573-515X. Dostupné z: doi:10.1007/s10533-010-9430-9

- BASILI, Marco, Grazia Marina QUERO, Donato GIOVANNELLI, Elena MANINI, Carla VIGNAROLI, Carlo Giacomo AVIO, Rocco DE MARCO a Gian Marco LUNA, 2020. Major Role of Surrounding Environment in Shaping Biofilm Community Composition on Marine Plastic Debris. *Frontiers in Marine Science* [online]. **7** [vid. 2021-11-28]. ISSN 2296-7745. Dostupné z: doi:10.3389/fmars.2020.00262
- BAYDA, Samer, Muhammad ADEEL, Tiziano TUCCINARDI, Marco CORDANI a Flavio RIZZOLIO, 2019. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* [online]. **25**(1), 112. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25010112
- BOUCHEZ, T., A. L. BLIEUX, S. DEQUIEDT, I. DOMAIZON, A. DUFRESNE, S. FERREIRA, J. J. GODON, J. HELLAL, C. JOULIAN, A. QUAISER, F. MARTIN-LAURENT, A. MAUFFRET, J. M. MONIER, P. PEYRET, P. SCHMITT-KOPLIN, O. SIBOURG, E. D'OIRON, A. BISPO, I. DEPORTES, C. GRAND, P. CUNY, P. A. MARON a L. RANJARD, 2016. Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. *Environmental Chemistry Letters* [online]. **14**(4), 423-441. ISSN 1610-3661. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-016-0581-3
- BRAKER, Gesche, Andreas FESEFELDT a Karl-Paul WITZEL, 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and environmental microbiology*. **64**(10), 3769-3775.
- BRENNAN, R. B., M. G. HEALY, L. MORRISON, S. HYNES, D. NORTON a E. CLIFFORD, 2016. Management of landfill leachate: The legacy of European Union Directives. *Waste Management* [online]. **55**, SI:Sanitary Landfilling, 355-363. ISSN 0956-053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2015.10.010
- BRUIJN, Frans J. de, 2011. *Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*. B.m.: John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-64719-6.
- BUAISHA, Magdi, Saziye BALKU a Şeniz Özalp YAMAN, 2020. Heavy Metal Removal Investigation in Conventional Activated Sludge Systems. *Civil Engineering Journal* [online]. **6**(3), 470-477-477. ISSN 2476-3055. Dostupné z: doi:10.28991/cej-2020-03091484
- BUKIN, Yu S., Yu P. GALACHYANTS, I. V. MOROZOV, S. V. BUKIN, A. S. ZAKHARENKO a T. I. ZEMSKAYA, 2019. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data* [online]. **6**(1), 190007. ISSN 2052-4463. Dostupné z: doi:10.1038/sdata.2019.7
- CALLAHAN, Benjamin J, Paul J MCMURDIE, Michael J ROSEN, Andrew W HAN, Amy Jo A JOHNSON a Susan P HOLMES, 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* [online]. **13**(7), 581-583. ISSN 1548-7091, 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.3869
- CLAESSON, Marcus J., Qiong WANG, Orla O'SULLIVAN, Rachel GREENE-DINIZ, James R. COLE, R. Paul ROSS a Paul W. O'TOOLE, 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* [online]. **38**(22), e200. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq873
- CLIFFORD, Robert J., Michael MILILLO, Jackson PRESTWOOD, Reyes QUINTERO, Daniel V. ZURAWSKI, Yoon I. KWAK, Paige E. WATERMAN, Emil P. LESHU a Patrick MC GANN, 2012. Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR. *PLoS ONE* [online]. **7**(11), e48558. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0048558
- CORTÉS, Maria Esperanza, Jessika Consuegra BONILLA a Ruben Dario SINISTERRA, 2011. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv*. **2**, 896-905.
- DAIMS, H., J. L. NIELSEN, P. H. NIELSEN, K.-H. SCHLEIFER a M. WAGNER, 2001a. In Situ Characterization of Nitrospira-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **67**(11), 5273-5284. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.67.11.5273-5284.2001
- DAIMS, Holger, Andreas BRÜHL, Rudolf AMANN, Karl-Heinz SCHLEIFER a Michael WAGNER, 1999. The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all Bacteria: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. **22**(3), 434-444. ISSN 0723-2020. Dostupné z: doi:10.1016/S0723-2020(99)80053-8

- DAIMS, Holger, Jeppe L. NIELSEN, Per H. NIELSEN, Karl-Heinz SCHLEIFER a Michael WAGNER, 2001b. In Situ Characterization of Nitrospira-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **67**(11), 5273–5284. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.67.11.5273-5284.2001
- DAIRAWAN, Mariyam a Preetha J. SHETTY, 2020. The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research*. **8**(1), 39.
- DANG, Hongyu, Yogendra H. KANITKAR, Robert D. STEDTFELD, Paul B. HATZINGER, Syed A. HASHSHAM a Alison M. CUPPLES, 2018. Abundance of Chlorinated Solvent and 1,4-Dioxane Degrading Microorganisms at Five Chlorinated Solvent Contaminated Sites Determined via Shotgun Sequencing. *Environmental Science & Technology* [online]. **52**(23), 13914–13924. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b04895
- DIONISI, Hebe M., Alice C. LAYTON, Gerda HARMS, Igrid R. GREGORY, Kevin G. ROBINSON a Gary S. SAYLER, 2002. Quantification of Nitrosomonas oligotropha-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria and Nitrospira spp. from Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **68**(1), 245–253. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.1.245-253.2002
- DOLINOVÁ, Iva, Marie CZINNEROVÁ, Lukáš DVOŘÁK, Vojtěch STEJSKAL, Alena ŠEVCŮ a Miroslav ČERNÍK, 2016. Dynamics of organohalide-respiring bacteria and their genes following in-situ chemical oxidation of chlorinated ethenes and biostimulation. *Chemosphere* [online]. **157**, 276–285. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.030
- DOLINOVÁ, Iva, Martina ŠTROJSOVÁ, Miroslav ČERNÍK, Jan NĚMEČEK, Jiřina MACHÁČKOVÁ a Alena ŠEVCŮ, 2017. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **24**(15), 13262–13283. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-017-8867-y
- DOUTERELO, I., K. E. FISH a J. B. BOXALL, 2018. Succession of bacterial and fungal communities within biofilms of a chlorinated drinking water distribution system. *Water Research* [online]. **141**, 74–85. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2018.04.058
- DOUTERELO, Isabel, Joby B. BOXALL, Peter DEINES, Raju SEKAR, Katherine E. FISH a Catherine A. BIGGS, 2014. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Research* [online]. **65**, 134–156. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2014.07.008
- DOWD, Scot E., Todd R. CALLAWAY, Randall D. WOLCOTT, Yan SUN, Trevor MCKEEHAN, Robert G. HAGEVOORT a Thomas S. EDRINGTON, 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC microbiology* [online]. **8**, 125. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2180-8-125
- DVOŘÁK, L., T. LEDERER, V. JIRKŮ, J. MASÁK a L. NOVÁK, 2014. Removal of aniline, cyanides and diphenylguanidine from industrial wastewater using a full-scale moving bed biofilm reactor. *Process Biochemistry* [online]. **49**(1), 102–109. ISSN 1359-5113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2013.10.011
- DZIOŃEK, Anna, Danuta WOJCIESZYŃSKA a Urszula GUZIK, 2016. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. **23**, 28–36. ISSN 0717-3458. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejbt.2016.07.003
- FELFÖLDI, Tamás, Laura JURECSKA, Balázs VAJNA, Katalin BARKÁCS, Judit MAKK, Gábor CEBE, Attila SZABÓ, Gyula ZÁRAY a Károly MÁRIALIGETI, 2015. Texture and type of polymer fiber carrier determine bacterial colonization and biofilm properties in wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* [online]. **264**, 824–834. ISSN 1385-8947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2014.12.008
- FORTH, Leonie F a Dirk HÖPER, 2019. Highly efficient library preparation for Ion Torrent sequencing using Y-adapters. *BioTechniques* [online]. **67**(5), 229–237. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/btn-2019-0035

FRANCO-DUARTE, Ricardo, Lucia ČERNÁKOVÁ, Snehal KADAM, Karishma S. KAUSHIK, Bahare SALEHI, Antonio BEVILACQUA, Maria Rosaria CORBO, Hubert ANTOLAK, Katarzyna DYBKASTĘPIEŃ, Martyna LESZCZEWICZ, Saulo RELISON TINTINO, Veruska Cintia ALEXANDRINO DE SOUZA, Javad SHARIFI-RAD, Henrique Douglas MELO COUTINHO, Natália MARTINS a Célia F. RODRIGUES, 2019. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms* [online]. 7(5), 130. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7050130

FRICKMANN, Hagen, Andreas Erich ZAUTNER, Annette MOTER, Judith KIKHNEY, Ralf Matthias HAGEN, Henrik STENDER a Sven POPPERT, 2017. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 43(3), 263–293. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.3109/1040841X.2016.1169990

GHOBEIRA, Rouba, Charlot PHILIPS, Valerie DE NAEYER, Heidi DECLERCQ, Pieter COOLS, Nathalie DE GEYTER, Ria CORNELISSEN a Rino MORENT, 2017. Comparative Study of the Surface Properties and Cytocompatibility of Plasma-Treated Poly-ε-Caprolactone Nanofibers Subjected to Different Sterilization Methods. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 13(6), 699–716. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2017.2377

GRAHAM, David W., Charles W. KNAPP, Erik S. VAN VLECK, Katie BLOOR, Teresa B. LANE a Christopher E. GRAHAM, 2007. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *ISME Journal* [online]. 1(5), 385–393. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2007.45

HARDENBOL, Paul, Pranav PATEL, Benjamin HINDSON, Paul William WYATT, Keith BJORNSON, Indira WU a Kamila BELHOCINE, 2020. Processes and systems for preparation of nucleic acid sequencing libraries and libraries prepared using same [online]. US10557158B2. [vid. 2022-10-03]. 11. únor 2020. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US10557158B2/en>

HARUŠTIÁKOVÁ, Danka, Jiří JARKOVSKÝ, Simona LITTNEROVÁ a Ladislav DUŠEK, 2012. *Víceozměrné statistické metody v biologii*. Brno: Akademické nakladatelství CERM. ISBN 978-80-7204-791-8.

HAVLÍČEK, Karel, Magda NECHANICKÁ, Tomáš LEDERER a Brigita KOLČAVOVÁ SIRKOVÁ, 2021. Analysis of nitrifying bacteria growth on two new types of biomass carrier using respirometry and molecular genetic methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 225, 112795. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112795

HAVLÍČEK, Karel, Lucie SVOBODOVÁ, Totka BAKALOVA a Tomáš LEDERER, 2020a. Influence of electrospinning methods on characteristics of polyvinyl butyral and polyurethane nanofibres essential for biological applications. *Materials & Design* [online]. 194, 108898. ISSN 0264-1275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2020.108898

HAVLÍČEK, Karel, Magda NECHANICKÁ a Lucie SVOBODOVÁ, 2020b. Příprava a hodnocení nanovlákných materiálů pro aplikace v oblasti čištění odpadních vod. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. 62(4), 16–24. ISSN 0322-8916, 1805-6555.

HAVLÍČEK, Karel, Lucie SVOBODOVÁ a Totka BAKALOVA, 2020c. Pokročilá obrazová analýza mikroskopických snímků nanovlákných vrstev. *Jemná mechanika a optika*. 65(9), 243–248. ISSN 0447-6441.

HRDLIČKA, Petr, 2007. *Vzorkovací práce v sanační geologii - Metodický pokyn MŽP*. 2007. B.m.: Ministerstvo životního prostředí.

HU, Taishan, Nilesh CHITNIS, Dimitri MONOS a Anh DINH, 2021. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* [online]. 82(11), Next Generation Sequencing and its Application to Medical Laboratory Immunology, 801–811. ISSN 0198-8859. Dostupné z: doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012

CHAALI, Mona, Mitra NAGHDI, Satinder K. BRAR a Antonio AVALOS-RAMIREZ, 2018. A review on the advances in nitrifying biofilm reactors and their removal rates in wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 93(11), 3113–3124. ISSN 1097-4660. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jctb.5692>

- CHIOZZI, Viola, Sofia AGRIPOULOU a Theodoros VARZAKAS, 2022. Advances, Applications, and Comparison of Thermal (Pasteurization, Sterilization, and Aseptic Packaging) against Non-Thermal (Ultrasounds, UV Radiation, Ozonation, High Hydrostatic Pressure) Technologies in Food Processing. *Applied Sciences* [online]. **12**(4), 2202. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app12042202
- JACKSON, Colin R., Perry F. CHURCHILL a Eric E. RODEN, 2001. Successional Changes in Bacterial Assemblage Structure During Epilithic Biofilm Development. *Ecology* [online]. **82**(2), 555–566. ISSN 1939-9170. Dostupné z: doi:10.1890/0012-9658(2001)082[0555:SCIBAS]2.0.CO;2
- JALALI, Mehdi, Justyna ZABOROWSKA a Morteza JALALI, 2017. Chapter 1 - The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In: Morteza JALALI, Francesca Y. L. SALDANHA a Mehdi JALALI, ed. *Basic Science Methods for Clinical Researchers* [online]. Boston: Academic Press, s. 1–18. ISBN 978-0-12-803077-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1
- JARCOVSKÝ, Jiří, Simona LITTNEROVÁ, Ladislav DUŠEK, MASARYKOVA UNIVERZITA, a INSTITUT BIOSTATISTIKY A ANALÝZ, 2012. *Statistické hodnocení biodiverzity*. Brno: Akademické nakladatelství CERM. ISBN 978-80-7204-790-1.
- JAROO, Suhad Shamil, Ghufuran F. JUMAAH a Talib R. ABBAS, 2019. Photosynthetic Microbial Desalination Cell to Treat Oily Wastewater Using Microalgae *Chlorella Vulgaris*. *Civil Engineering Journal* [online]. **5**(12), 2686–2699. ISSN 2476-3055, 2676-6957. Dostupné z: doi:10.28991/cej-2019-03091441
- JAYAWARDHANA, Y., P. KUMARATHILAKA, I. HERATH a M. VITHANAGE, 2016. Chapter 6 - Municipal Solid Waste Biochar for Prevention of Pollution From Landfill Leachate. In: M. N. V. PRASAD a Kaimin SHIH, ed. *Environmental Materials and Waste* [online]. B.m.: Academic Press, s. 117–148. ISBN 978-0-12-803837-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803837-6.00006-8
- JIN, Decai, Fengsong ZHANG, Yi SHI, Xiao KONG, Yunfeng XIE, Xiaoming DU, Yanxia LI a Ruiyong ZHANG, 2020. Diversity of bacteria and archaea in the groundwater contaminated by chlorinated solvents undergoing natural attenuation. *Environmental Research* [online]. **185**, 109457. ISSN 0013-9351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2020.109457
- JIRSAK, Oldrich, Filip SANETRIK, David LUKAS, Vaclav KOTEK, Lenka MARTINOVA a Jiri CHALOUPEK, 2009. Method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method [online]. US7585437B2. [vid. 2022-09-06]. 8. září 2009. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US7585437/en>
- JONES, Christopher M., Blaž STRES, Magnus ROSENQUIST a Sara HALLIN, 2008. Phylogenetic Analysis of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide Respiratory Enzymes Reveal a Complex Evolutionary History for Denitrification. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **25**(9), 1955–1966. ISSN 0737-4038. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/msn146
- JUNGA, Petr, Tomáš VÍTĚZ, Petr TRÁVNÍČEK, MENDELOVA UNIVERZITA, a AGRONOMICKÁ FAKULTA, 2015. *Technika pro zpracování odpadů*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-209-0.
- JURECSKA, Laura, Katalin BARKÁCS, Éva KISS, Gergő GYULAI, Tamás FELFÖLDI, Balázs TÖRŐ, Róbert KOVÁCS a Gyula ZÁRAY, 2013. Intensification of wastewater treatment with polymer fiber-based biofilm carriers. *Microchemical Journal* [online]. **107**, 108–114. ISSN 0026-265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2012.05.028
- KANAGAL-SHAMANNA, Rashmi, 2016. Emulsion PCR: Techniques and Applications. In: Rajyalakshmi LUTHRA, Rajesh R. SINGH a Keyur P. PATEL, ed. *Clinical Applications of PCR* [online]. New York, NY: Springer, Methods in Molecular Biology, s. 33–42 [vid. 2022-10-03]. ISBN 978-1-4939-3360-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-3360-0_4
- KIM, Dong-Jin a Sun-Hee KIM, 2006. Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics. *Water Research* [online]. **40**(5), 887–894. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2005.12.023

- KOČIŠ, Lubomír, Pavel POKORNÝ, David LUKÁŠ, Petr MIKEŠ, Jiří CHVOJKA, Eva KOŠTÁKOVÁ, Jaroslav BERAN, Martin BÍLEK, Jan GERKEN, Evžen AMLER, Matěj BUZGO a Andrea MÍCKOVÁ, 2013. Zpusob výroby polymerních nanovláken zvláknováním roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli a lineární útvar z polymerních nanovláken vytvořený tímto způsobem [online]. CZ304137B6. [vid. 2022-09-06]. 13. listopad 2013.
Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/CZ304137B6/cs>
- KOHN, Andrea B., Tatiana P. MOROZ, Jeffrey P. BARNES, Mandy NETHERTON a Leonid L. MOROZ, 2013. Single-Cell Semiconductor Sequencing. In: Trygve O. TOLLEFSBOL, ed. *Biological Aging* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, *Methods in Molecular Biology*, s. 247–284 [vid. 2022-10-03]. ISBN 978-1-62703-555-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-556-9_18
- KŘIKLAVOVÁ, Lucie a Tomas LEDERER, 2010. The use of nanofiber carriers in biofilm reactor for the treatment of industrial wastewaters. *Nanocon, Olomouc, Ceska Republika*.
- KUHN, Ramona, Jörg BÖLLMANN, Kathrin KRAHL, Isaac Mbir BRYANT a Marion MARTIENSSEN, 2017. Comparison of ten different DNA extraction procedures with respect to their suitability for environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **143**, 78–86. ISSN 0167-7012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2017.10.007
- KUMAR, Kishore R., Mark J. COWLEY a Ryan L. DAVIS, 2019. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [online]. **45**(7), 661–673. ISSN 0094-6176, 1098-9064. Dostupné z: doi:10.1055/s-0039-1688446
- LEAR, Gavin, Yimin DONG a Gillian LEWIS, 2010. Comparison of methods for the extraction of DNA from stream epilithic biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. **98**(4), 567–571. ISSN 1572-9699. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-010-9464-y
- LHOTSKÝ, Ondřej, Eva KRÁKOROVÁ, Lucie LINHARTOVÁ, Zdena KŘESINOVÁ, Jana STEINOVÁ, Lukáš DVOŘÁK, Torgeir RODSAND, Alena FILIPOVÁ, Kristýna KROUPOVÁ, Lenka WIMMEROVÁ, Jan KUKAČKA a Tomáš CAJTHAML, 2017. Assessment of biodegradation potential at a site contaminated by a mixture of BTEX, chlorinated pollutants and pharmaceuticals using passive sampling methods – Case study. *Science of The Total Environment* [online]. **607–608**, 1451–1465. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.193
- LI, Jianwei, 2019. Sampling Soils in a Heterogeneous Research Plot. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (143) [vid. 2022-05-03]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/58519
- LIU, Shang-Hao, Ming-Yuan SHEN, Chen-Feng KUAN, Hsu-Chiang KUAN, Cing-Yu KE a Chin-Lung CHIANG, 2019. Improving Thermal Stability of Polyurethane through the Addition of Hyperbranched Polysiloxane. *Polymers* [online]. **11**(4), 697. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym11040697
- LIU, Yongdi, Yingdong ZHU, Honghua JIA, Xiaoyu YONG, Lijuan ZHANG, Jun ZHOU, Zebin CAO, Andrea KRUSE a Ping WEI, 2017. Effects of different biofilm carriers on biogas production during anaerobic digestion of corn straw. *Bioresource Technology* [online]. **244**, 445–451. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.07.171
- LUO, Hongwei, Yifeng ZENG, Ying CHENG, Dongqin HE a Xiangliang PAN, 2020. Recent advances in municipal landfill leachate: A review focusing on its characteristics, treatment, and toxicity assessment. *Science of The Total Environment* [online]. **703**, 135468. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135468
- MADIGAN, Michael T., ed., 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 978-0-321-64963-8.
- MAGURRAN, Anne E., 2004. *Measuring biological diversity*. Malden, Ma: Blackwell Pub. ISBN 978-0-632-05633-0.
- MARDIS, Elaine R., 2013. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry* [online]. **6**(1), 287–303. ISSN 1936-1327, 1936-1335. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-anchem-062012-092628
- MELOUN, M. a Jiří MILITKÝ, 2004. *Statistická analýza experimentálních dat*. Vyd. 2., upravené a rozšířené. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-1254-8.

- MIAO, Lei, Gangqing YANG, Tao TAO a Yongzhen PENG, 2019. Recent advances in nitrogen removal from landfill leachate using biological treatments – A review. *Journal of Environmental Management* [online]. **235**, 178–185. ISSN 0301-4797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2019.01.057
- MOBARRY, B K, M WAGNER, V URBAIN, B E RITTMANN a D A STAHL, 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(6), 2156–2162. ISSN 0099-2240.
- MOHAMAD, Noor Amaleena, Noorain Awang JUSOH, Zaw ZAW HTIKE a Shoon LEI WIN, 2014. Bacteria Identification From Microscopic Morphology: A Survey. *International Journal on Soft Computing, Artificial Intelligence and Applications* [online]. **3**(2), 1–12. ISSN 2319-4081, 23191015. Dostupné z: doi:10.5121/ijsc.2014.3201
- MURRAY, Dáithí C., Megan L. COGLAN a Michael BUNCE, 2015. From Benchtop to Desktop: Important Considerations when Designing Amplicon Sequencing Workflows. *PLOS ONE* [online]. **10**(4), e0124671. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0124671
- NECHANICKÁ, Magda, Iva DOLINOVÁ, Denisa VLKOVÁ a Lukáš DVOŘÁK, 2018. Využití nanovlákných nosičů pro monitoring biomasy na kontaminované lokalitě. **68**(6), s. 11-15. ISSN 1211-0760.
- NĚMEČEK, Jan, Iva DOLINOVÁ, Jiřina MACHÁČKOVÁ, Roman ŠPÁNEK, Alena ŠEVČŮ, Tomáš LEDERER a Miroslav ČERNÍK, 2017. Stratification of chlorinated ethenes natural attenuation in an alluvial aquifer assessed by hydrochemical and biomolecular tools. *Chemosphere* [online]. **184**, 1157–1167. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.06.100
- NĚMEČEK, Jan, Petr POKORNÝ, Ondřej LHOTSKÝ, Vladislav KNYTL, Petra NAJMANOVÁ, Jana STEINOVÁ, Miroslav ČERNÍK, Alena FILIPOVÁ, Jan FILIP a Tomáš CAJTHAML, 2016. Combined nanobiotechnology for in-situ remediation of mixed contamination of groundwater by hexavalent chromium and chlorinated solvents. *Science of The Total Environment* [online]. **563–564**, 822–834. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.019
- NIELSEN, Per Halkjær, Holger DAIMS a Hilde LEMMER, ed., 2009. *FISH handbook for biological wastewater treatment: identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. London: New York : IWA Publishing. ISBN 978-1-84339-231-6.
- ONET, Aurelia, Lucian C. DINCĂ, Paola GRENNI, Vasile LASLO, Alin C. TEUSDEA, Diana L. VASILE, Raluca E. ENESCU a Vlad E. CRISAN, 2019. Biological indicators for evaluating soil quality improvement in a soil degraded by erosion processes. *Journal of Soils and Sediments* [online]. **19**(5), 2393–2404. ISSN 1614-7480. Dostupné z: doi:10.1007/s11368-018-02236-9
- OP DEN CAMP, Huub J. M., Mike S. M. JETTEN a Marc STROUS, 2007. Chapter 16 - Anammox. In: Hermann BOTHE, Stuart J. FERGUSON a William E. NEWTON, ed. *Biology of the Nitrogen Cycle* [online]. Amsterdam: Elsevier, s. 245–262 [vid. 2022-09-30]. ISBN 978-0-444-52857-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044452857-5.50017-5
- PAL, Monalisa, Sanghee LEE, Donghoon KWON, Jeongin HWANG, Hyeonjeong LEE, Seokyoung HWANG a Sangmin JEON, 2017. Direct immobilization of antibodies on Zn-doped Fe₃O₄ nanoclusters for detection of pathogenic bacteria. *Analytica Chimica Acta* [online]. **952**, 81–87. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.11.041
- PANG, Qingqing, Wenwen XU, Fei HE, Fuquan PENG, Xiang ZHU, Bin XU, Jianghua YU, Zewei JIANG a Longmian WANG, 2022. Functional genera for efficient nitrogen removal under low C/N ratio influent at low temperatures in a two-stage tidal flow constructed wetland. *Science of The Total Environment* [online]. **804**, 150142. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150142
- PESTER, Michael, Frank MAIXNER, David BERRY, Thomas RATTEI, Hanna KOCH, Sebastian LÜCKER, Boris NOWKA, Andreas RICHTER, Eva SPIECK, Elena LEBEDEVA, Alexander LOY, Michael WAGNER a Holger DAIMS, 2014. NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira. *Environmental Microbiology* [online]. **16**(10), 3055–3071. ISSN 1462-2920. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/1462-2920.12300

- PINTO, Maria, Teresa M. LANGER, Thorsten HÜFFER, Thilo HOFMANN a Gerhard J. HERNDL, 2019. The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession. *PLOS ONE* [online]. **14**(6), e0217165. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0217165
- PISHGAR, Roya, John Albino DOMINIC, Zhiya SHENG a Joo Hwa TAY, 2019. Denitrification performance and microbial versatility in response to different selection pressures. *Bioresource Technology* [online]. **281**, 72–83. ISSN 1873-2976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.02.061
- POKORNY, P., E. KOSTAKOVA, F. SANETRNÍK, P. MIKES, J. CHVOJKA, T. KALOUS, M. BILEK, K. PEJCHAR, J. VALTERA a D. LUKAS, 2014. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Physical chemistry chemical physics: PCCP* [online]. **16**(48), 26816–26822. ISSN 1463-9084. Dostupné z: doi:10.1039/c4cp04346d
- POLY, Franck, Sophie WERTZ, Elisabeth BROTHIER a Valérie DEGRANGE, 2008. First exploration of Nitrobacter diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene nxrA. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. **63**(1), 132–140. ISSN 0168-6496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00404.x
- PRUDENT, Elsa a Didier RAOULT, 2019. Fluorescence in situ hybridization, a complementary molecular tool for the clinical diagnosis of infectious diseases by intracellular and fastidious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **43**(1), 88–107. ISSN 0168-6445. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/fuy040
- QUAST, Christian, Elmar PRUESSE, Pelin YILMAZ, Jan GERKEN, Timmy SCHWEER, Pablo YARZA, Jörg PEPLIES a Frank Oliver GLÖCKNER, 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* [online]. **41**(D1), D590–D596. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks1219
- REDIGUIERI, Carolina Fracalossi, Rogério Corte SASSONIA, Kamal DUA, Irene Satiko KIKUCHI a Terezinha DE JESUS ANDREOLI PINTO, 2016. Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. **82**, 181–195. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016
- RENOU, S., J. G. GIVAUDAN, S. POULAIN, F. DIRASSOUYAN a P. MOULIN, 2008. Landfill leachate treatment: Review and opportunity. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **150**(3), 468–493. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2007.09.077
- ROGNES, Torbjørn, Tomáš FLOURI, Ben NICHOLS, Christopher QUINCE a Frédéric MAHÉ, 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* [online]. **4**, e2584. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.2584
- ROTHBERG, Jonathan M., Wolfgang HINZ, Todd M. REARICK, Jonathan SCHULTZ, William MILESKI, Mel DAVEY, John H. LEAMON, Kim JOHNSON, Mark J. MILGREW, Matthew EDWARDS, Jeremy HOON, Jan F. SIMONS, David MARRAN, Jason W. MYERS, John F. DAVIDSON, Annika BRANTING, John R. NOBILE, Bernard P. PUC, David LIGHT, Travis A. CLARK, Martin HUBER, Jeffrey T. BRANCIFORTE, Isaac B. STONER, Simon E. CAWLEY, Michael LYONS, Yutao FU, Nils HOMER, Marina SEDOVA, Xin MIAO, Brian REED, Jeffrey SABINA, Erika FEIERSTEIN, Michelle SCHORN, Mohammad ALANJARY, Eileen DIMALANTA, Devin DRESSMAN, Rachel KASINSKAS, Tanya SOKOLSKY, Jacqueline A. FIDANZA, Eugeni NAMSARAEV, Kevin J. MCKERNAN, Alan WILLIAMS, G. Thomas ROTH a James BUSTILLO, 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* [online]. **475**(7356), 348–352. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature10242
- SALEH, Tawfik A., 2020. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation* [online]. **20**, 101067. ISSN 2352-1864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2020.101067
- SANDIP, Magdum a V. KALYANRAMAN, 2019. Enhanced simultaneous nitri-denitrification in aerobic moving bed biofilm reactor containing polyurethane foam-based carrier media. *Water Science and Technology* [online]. **79**(3), 510–517. ISSN 0273-1223. Dostupné z: doi:10.2166/wst.2019.077
- SCRAGG, A. H., 2004. *Environmental biotechnology*. 2nd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-926867-2.

- SEDLACKOVA, Tatiana, Gabriela REPISKA, Peter CELEC, Tomas SZEMES a Gabriel MINARIK, 2013. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological Procedures Online* [online]. **15**(1), 5. ISSN 1480-9222. Dostupné z: doi:10.1186/1480-9222-15-5
- SELDEN, Richard F. a Eugene TAN, 2020. Nucleic acid purification [online]. US20200215544A1. [vid. 2022-10-02]. 9. červenec 2020. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US20200215544A1/en>
- SHARMA, Vikas a Akhilesh SHARMA, 2013. Nanotechnology: an emerging future trend in wastewater treatment with its innovative products and processes. *Nanotechnology* [online]. **1**(2). ISSN 2319-7463. Dostupné z: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=8e25a0f904d33ab529d0ce840b0f17fd5b39ad01>
- SCHLOSS, Patrick D., Sarah L. WESTCOTT, Thomas RYABIN, Justine R. HALL, Martin HARTMANN, Emily B. HOLLISTER, Ryan A. LESNIEWSKI, Brian B. OAKLEY, Donovan H. PARKS, Courtney J. ROBINSON, Jason W. SAHL, Blaz STRES, Gerhard G. THALLINGER, David J. Van HORN a Carolyn F. WEBER, 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **75**(23), 7537–7541. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01541-09
- SCHMITTGEN, Thomas D. a Kenneth J. LIVAK, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* [online]. **3**(6), 1101–1108. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2008.73
- SINGHAL, Neelja, Manish KUMAR, Pawan K. KANAUIA a Jugsharan S. VIRDI, 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* [online]. **6** [vid. 2022-08-14]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00791>
- SKŘEHOT, Petr a Marcela RUPOVÁ, 2011. *Nanobezpečnost*. Vyd. 1. Praha: Výzkumný ústav bezpečnosti práce, v.v.i. ISBN 978-80-86973-89-0.
- SONG, Zi, Xinbo ZHANG, Huu Hao NGO, Wenshan GUO, Pengfei SONG, Yongchao ZHANG, Haitao WEN a Jianbo GUO, 2019. Zeolite powder based polyurethane sponges as biocarriers in moving bed biofilm reactor for improving nitrogen removal of municipal wastewater. *Science of The Total Environment* [online]. **651**, 1078–1086. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.173
- SONWANI, Ravi Kumar, Ganesh SWAIN, Balendu Shekhar GIRI, Ram Sharan SINGH a Birendra Nath RAI, 2019. A novel comparative study of modified carriers in moving bed biofilm reactor for the treatment of wastewater: Process optimization and kinetic study. *Bioresource Technology* [online]. **281**, 335–342. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.02.121
- STOJANOV, Spase a Aleš BERLEC, 2020. Electrospun Nanofibers as Carriers of Microorganisms, Stem Cells, Proteins, and Nucleic Acids in Therapeutic and Other Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. **8** [vid. 2022-07-17]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00130>
- SVOBODOVÁ, L., T. LEDERER, P. ROSICKÁ, P. SVOBODA, L. NOVÁK, J. DOSTÁLKOVÁ a V. JIRKŮ, 2019a. Advanced characterization of natural biofilm on nanofiber scaffold. *Physiological Research* [online]. S491–S499. ISSN 1802-9973, 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.934384
- SVOBODOVÁ, L., T. LEDERER, P. ROSICKÁ, P. SVOBODA, L. NOVÁK, J. DOSTÁLKOVÁ a V. JIRKŮ, 2019b. Advanced characterization of natural biofilm on nanofiber scaffold. *Physiological Research* [online]. S491–S499. ISSN 1802-9973, 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.934384
- TESSAROLO, Francesco a Giandomenico NOLLO, 2008. Sterilization of biomedical materials. In: [online]. s. 2501–2510. ISBN 978-1-4200-7802-2. Dostupné z: doi:10.3109/9781420078039.238
- THE INTERSTATE TECHNOLOGY & REGULATORY, The Interstate Technology & Regulatory, 2011. Environmental Molecular Diagnostics Fact Sheets [online]. Dostupné z: <http://www.itrcweb.org/GuidanceDocuments/EMD1.pdf>

- THROBÄCK, Ingela Noredal, Karin ENWALL, Åsa JARVIS a Sara HALLIN, 2004. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS microbiology ecology*. **49**(3), 401–417.
- TIAN, Shaonan, Zhe TIAN, Hong YANG, Min YANG a Yu ZHANG, 2017. Detection of Viable Bacteria during Sludge Ozonation by the Combination of ATP Assay with PMA-Miseq Sequencing. *Water* [online]. **9**(3), 166. Dostupné z: doi:10.3390/w9030166
- TIPNIS, Namita P. a Diane J. BURGESS, 2018. Sterilization of implantable polymer-based medical devices: A review. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **544**(2), Advances in Drug Delivery Related Biosensors and Medical Devices, 455–460. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.12.003
- TOPIĆ POPOVIĆ, Natalija, Snježana P. KAZAZIĆ, Krunoslav BOJANIĆ, Ivančica STRUNJAK-PEROVIĆ a Rozelindra ČOŽ-RAKOVAC, 2021. Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: A review. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. mas.21739. ISSN 0277-7037, 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21739
- TORT, Serdar, Fatmanur Tuğcu DEMİRÖZ, Sulhiye YILDIZ a Füsün ACARTÜRK, 2020. Effects of UV Exposure Time on Nanofiber Wound Dressing Properties During Sterilization. *Journal of Pharmaceutical Innovation* [online]. **15**(3), 325–332. ISSN 1939-8042. Dostupné z: doi:10.1007/s12247-019-09383-7
- TORTORA, Gerard J., Berdell R. FUNKE a Christine L. CASE, 2021. *Microbiology: an introduction*. Thirteenth edition, global edition. Harlow: Pearson. ISBN 978-1-292-27626-7.
- VALTERA, Jan, Tomas KALOUS, Pavel POKORNY, Ondrej BATKA, Martin BILEK, Jiri CHVOJKA, Petr MIKES, Eva Kuzelova KOSTAKOVA, Petr ZABKA, Jana ORNSTOVA, Jaroslav BERAN, Andrei STANISHEVSKY a David LUKAS, 2019. Fabrication of dual-functional composite yarns with a nanofibrous envelope using high throughput AC needleless and collectorless electrospinning. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 1801. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-38557-z
- VANPARYS, Bram, Eva SPIECK, Kim HEYLEN, Lieven WITTEBOLLE, Joke GEETS, Nico BOON a Paul DE VOS, 2007. The phylogeny of the genus Nitrobacter based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. **30**(4), 297–308. ISSN 0723-2020. Dostupné z: doi:10.1016/j.syapm.2006.11.006
- VĚTROVSKÝ, Tomáš, Petr BALDRIAN a Daniel MORAIS, 2018. SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics* [online]. **34**(13), 2292–2294. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bty071
- VICK, Silas H. W., Paul GREENFIELD, Kaydy L. PINETOWN, Neil SHERWOOD, Se GONG, Sasha G. TETU, David J. MIDGLEY a Ian T. PAULSEN, 2019. Succession Patterns and Physical Niche Partitioning in Microbial Communities from Subsurface Coal Seams. *iScience* [online]. **12**, 152–167. ISSN 2589-0042. Dostupné z: doi:10.1016/j.isci.2019.01.011
- WAITE, David W, Maria CHUVOCHINA, Claus PELIKAN, Donovan H. PARKS, Pelin YILMAZ, Michael WAGNER, Alexander LOY, Takeshi NAGANUMA, Ryosuke NAKAI, William B. WHITMAN, Martin W. HAHN, Jan KUEVER a Philip HUGENHOLTZ, 2020. Proposal to reclassify the proteobacterial classes Deltaproteobacteria and Oligoflexia, and the phylum Thermodesulfobacteria into four phyla reflecting major functional capabilities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **70**(11), 5972–6016. ISSN 1466-5026, 1466-5034. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.004213
- WANNER, Jiří, Iveta RŮŽIČKOVÁ a Andrea BENÁKOVÁ, 2019. *Biologická kontrola čistíren odpadních vod*. první. B.m.: Medim, spol. s r.o. pro Sdružení oboru vodovodů a kanalizací ČR, z.s. (SOVAK ČR). ISBN 978-80-907303-3-5.
- WEATHERILL, John J., Siavash ATASHGAHI, Uwe SCHNEIDEWIND, Stefan KRAUSE, Sami ULLAH, Nigel CASSIDY a Michael O. RIVETT, 2018. Natural attenuation of chlorinated ethenes in hyporheic zones: A review of key biogeochemical processes and in-situ transformation potential. *Water Research* [online]. **128**, 362–382. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2017.10.059

- WINKLER, Mari K. H., João P. BASSIN, Robbert KLEEREBEZEM, Dimitry Y. SOROKIN a Mark C. M. VAN LOOSDRECHT, 2012. Unravelling the reasons for disproportion in the ratio of AOB and NOB in aerobic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **94**(6), 1657–1666. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-012-4126-9
- WNUK, Ewa, Adam WAŚKO, Anna WALKIEWICZ, Piotr BARTMIŃSKI, Romualda BEJGER, Lilla MIELNIK a Andrzej BIEGANOWSKI, 2020. The effects of humic substances on DNA isolation from soils. *PeerJ* [online]. **8**, e9378. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.9378
- WU, Jerry J., Chih-Chao WU, Hong-Wen MA a Chia-Chi CHANG, 2004. Treatment of landfill leachate by ozone-based advanced oxidation processes. *Chemosphere* [online]. **54**(7), 997–1003. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2003.10.006
- XUE, Jiajia, Tong WU, Yunqian DAI a Younan XIA, 2019. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical Reviews* [online]. **119**(8), 5298–5415. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00593
- YAO, Qian a Dang-Cong PENG, 2017. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *AMB Express* [online]. **7**(1), 25. ISSN 2191-0855. Dostupné z: doi:10.1186/s13568-017-0328-y
- YU, Lifang, Yu WANG, Ren LI, Ru ZHANG, Xingxiu ZHANG, Sisi HUA a Dangcong PENG, 2020. The differential proliferation of AOB and NOB during natural nitrifier cultivation and acclimation with raw sewage as seed sludge. *RSC Advances* [online]. **10**(47), 28277–28286. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/d0ra05252c
- ZHANG, Junyi, Xiao DING, Rui GUAN, Congmin ZHU, Chao XU, Bingchuan ZHU, Hu ZHANG, Zhipeng XIONG, Yingang XUE, Jing TU a Zuhong LU, 2018. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of The Total Environment* [online]. **618**, 1254–1267. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.228
- ZHANG, Wen, Xiaohui REN, Jun HE, Qingrui ZHANG, Cui QIU a Baomin FAN, 2019. Application of natural mixed bacteria immobilized carriers to different kinds of organic wastewater treatment and microbial community comparison. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **377**, 113–123. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2019.05.068
- ZHAO, Jianqiang, Jinna WU, Xiaoling LI, Sha WANG, Bo HU a Xiaoqian DING, 2017. The Denitrification Characteristics and Microbial Community in the Cathode of an MFC with Aerobic Denitrification at High Temperatures. *Frontiers in Microbiology* [online]. **8** [vid. 2022-04-15]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.00009
- ZHENG, Min, Siqi LI, Qian DONG, Xia HUANG a Yan Chen LIU, 2019. Effect of blending landfill leachate with activated sludge on the domestic wastewater treatment process. *Environmental Science: Water Research & Technology* [online]. **5**(2), 268–276. ISSN 2053-1400, 2053-1419. Dostupné z: doi:10.1039/C8EW00799C
- ZHU, Chuanhe, Zhao CHEN a Guoyong YU, 2013. Fungicidal mechanism of chlorine dioxide on *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology* [online]. **63**(2), 495–502. ISSN 1869-2044. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-012-0494-8

Přílohy

A Skript pro obrazovou analýzu snímků z FISH analýzy

```
clc
clear all
close all
warning off all
format long g
Y='Y';y=Y;N='N';n=N;
gap=0;
samples=1;

%% PARAMETRY HSV ANALÝZY
RED_HSV_V=0.11;      % Čím nižší hodnota tím tmavší červenou software zaznamená
GREEN_HSV_V=0.15;   % Čím nižší hodnota tím tmavší zelenou software zaznamená
RED_HSV_H_1=345;
RED_HSV_H_2=60;
GREEN_HSV_H_1=70;
GREEN_HSV_H_2=150;

%% NAČÍTÁNÍ SNÍMKŮ ZE SLOŽKY
% Složka uložených snímků
fileFolder = fullfile('C:/Users/magda/MATLAB/FISH/input/');
dirOutput = dir(fullfile(fileFolder, '*.jpg')); % Specifikace názvu a typu
FileNames = {dirOutput.name};
NumberOfPictures = length(FileNames);
%% SOUPIS PARAMETRŮ
disp('GREEN = EUB, RED = NOB nebo AOB ...');
VycetParametru = {strcat(' '); ...
    strcat('Zastoupení dle POCTU ', ' [%]'); ...
    strcat('Zastoupení dle PROCENT ', ' [%]'); ...
};

%% HLAVNÍ SMYČKA - FOR PRO VŠECHNY OBRAZY v SOUBORU
% -----
mainroot = 1;

for mainroot = 1:NumberOfPictures
    %% NAČTENÍ SNÍMKU
    name = sprintf('%s',char(strcat('C:/Users/magda/MATLAB/FISH/input/',
        FileNames(mainroot))));
    ImageOrig = (imread(name));
    [Width, Length, swl] = size(ImageOrig);
    RED_NAME = char(FileNames(mainroot));
    RED_NAME = RED_NAME(1:length(RED_NAME)-4);

    %% VÝPOČET POZADÍ
    % -----
    while 1
        Image = rgb2hsv(ImageOrig);
        H_Image=Image(:,:,1);
        H_Image_stup=H_Image*360;
        S_Image=Image(:,:,2);
        V_Image=Image(:,:,3);
        [L H]=size(H_Image);
        RED=zeros(L,H,3);
        for i=1:L
            for j=1:H
                if H_Image_stup(i,j)>=RED_HSV_H_1
                    if V_Image(i,j)>=RED_HSV_V
                        RED(i,j,1)=0;
                        RED(i,j,2)=1;
                        RED(i,j,3)=0.996;
                    end
                end
                if H_Image_stup(i,j)<=RED_HSV_H_2
                    if V_Image(i,j)>=RED_HSV_V
                        RED(i,j,1)=0;
                        RED(i,j,2)=1;
                        RED(i,j,3)=0.996;
                    end
                end
            end
        end
    end
end
```

```

        end
    end
end
RED_RGB=hsv2rgb(RED); % snímek AOB či NOB zobrazen v RGB
GREEN=zeros(L,H,3);
for i=1:L
    for j=1:H
        if H_Image_stup(i,j)>=GREEN_HSV_H_1
            if H_Image_stup(i,j)<=GREEN_HSV_H_2
                if V_Image(i,j)>=GREEN_HSV_V
                    GREEN(i,j,1)=110/360;
                    GREEN(i,j,2)=1;
                    GREEN(i,j,3)=0.996;
                end
            end
        end
    end
end
end
GREEN_RGB=hsv2rgb(GREEN); % snímek EUB zobrazen v RGB

%% PŘEVEDENÍ IZOLOVANÁ SPEKTRA DO BINÁRNÍHO OBRAZU
RED_BIN = im2bw(RED_RGB(:,:,1)); % binární obraz AOB či NOB
AOB_or_NOB_area = sum(sum(RED_BIN)); % plocha izolovaného spektra AOB či NOB
GREEN_BIN = im2bw(GREEN_RGB(:,:,2)); % binární obraz EUB
EUB_area = sum(sum(GREEN_BIN)); % plocha izolovaného spektra EUB

%% ZÁPIS DAT DO EXCELU
clear vysledkyOBRAZU;
if strfind(num2str(cell2mat(FileNames(mainroot))), 'NOB')~=0
    replyR = upper('NOB');
else
    replyR = upper('AOB');
end
replyR2(mainroot) = cellstr(replyR);
name2 = char(FileNames(mainroot));
name = name2(1:length(name2)-4);
koneckonec = size(name, 2);
if (koneckonec <= 8)
    NazevExcel = strcat(name, '.xls');
else
    NazevExcel = name(1:8);
end
NazevExcel = strcat('C:/Users/magda/MATLAB/FISH/output/', NazevExcel, '-', date);
nameXLS = name(1:8);
nameXLS2(mainroot, :)=nameXLS;
reactor=name(10);
reactor2(mainroot, :)=cellstr(reactor);
datum=nameXLS(1:8);
datum2(mainroot, :)=cellstr(datum);
SampleName2(mainroot)=cellstr(FileNames(mainroot));
if strfind(num2str(cell2mat(FileNames(mainroot))), 'suspenze')~=0
    SampleName3(mainroot)=cellstr('suspenze_');
else
    if strfind(num2str(cell2mat(FileNames(mainroot))), 'NANO')~=0
        SampleName3(mainroot)=cellstr('NANO');
    else
        if strfind(num2str(cell2mat(FileNames(mainroot))), 'PV')~=0
            SampleName3(mainroot)=cellstr('_PV_');
        end
    end
end
end
nameXLS_Sum='Summary';

%%
RATIO = AOB_or_NOB_area/(AOB_or_NOB_area+EUB_area); % podíl AOB či NOB ve vzorku
RATIO2(mainroot) = RATIO;

REDGREEN_outnameOBJ = strcat('C:/Users/magda/MATLAB/FISH/output/REDGREEN/',
    RED_NAME, '-anal-', 'REDGREEN', '.jpg');
imwrite([GREEN_RGB, hsv2rgb(rgb2hsv(ImageOrig)), RED_RGB], REDGREEN_outnameOBJ,
'jpg'); % uložení snímků originálního snímku společně se snímky izolovaných
spekter v RGB modelu
disp(strcat(char(SampleName2(mainroot)))); %
if mainroot<NumberOfPictures
    name3 = char(FileNames(mainroot+1));
    datum3 = cellstr(name3(1:8));
    reactor3 = cellstr(name3(10));
end

```

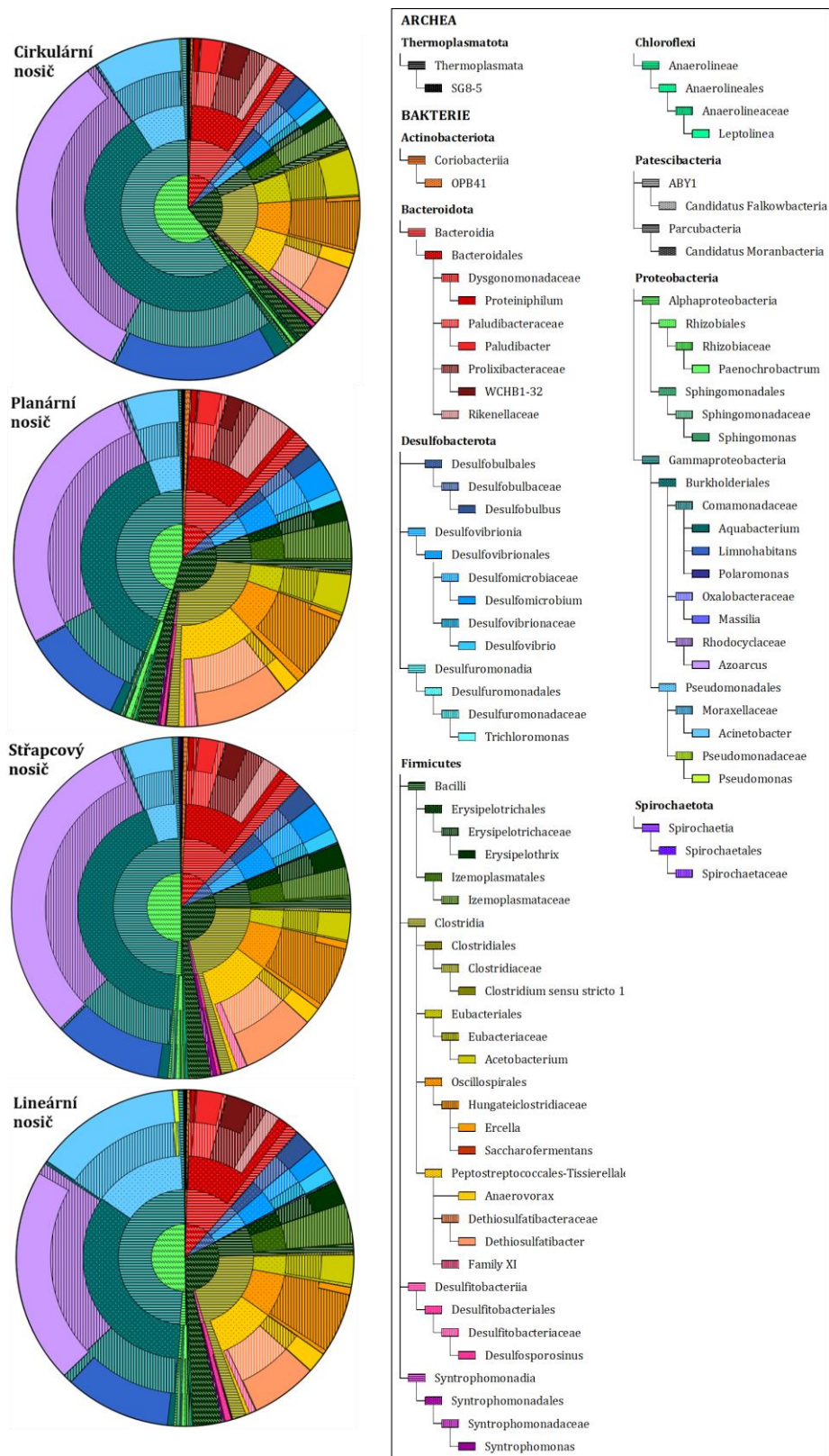
```

if strfind(num2str(cell2mat(FileNames(mainroot+1))), 'suspenze')~=0
    SampleName4=cellstr('suspenze_');
else
    if strfind(num2str(cell2mat(FileNames(mainroot+1))), 'NANO')~=0
        SampleName4=cellstr('NANO');
    else
        if strfind(num2str(cell2mat(FileNames(mainroot+1))), 'PV')~=0
            SampleName4=cellstr('_PV_');
        end
    end
end
end
if strfind(num2str(cell2mat(FileNames(mainroot+1))), 'NOB')~=0
    replyR3 = cellstr(upper('NOB'));
else
    replyR3 = cellstr(upper('AOB'));
end
gap2=gap;
G1 = char(reactor2(mainroot,:)) ~= char(reactor3);
G2 = sum(char(datum2(mainroot,:)) ~= char(datum3));
CH3 = char(SampleName3(mainroot));
CH4 = char(SampleName4);
G4 = sum(CH3(1:2) ~= CH4(1:2));
G5 = sum(char(replyR2(mainroot)) ~= char(replyR3));
G3 = G2 + G1 + G4 + G5;
if sum(G3)~=0;
    gap=mainroot;
    median2(samples)=median(RATIO2(gap2+1:gap));
    mad2(samples)=mad(RATIO2(gap2+1:gap));
    replyR4(samples,:)=replyR2(mainroot);
    SampleName5(samples,:)=SampleName3(mainroot);
    reactor4(samples,:)=reactor2(mainroot,:);
    datum4(samples,:)=datum2(mainroot,:);
    samples=samples+1;
end
else
    gap2=gap;
    gap=mainroot;
    median2(samples)=median(RATIO2(gap2+1:gap));
    mad2(samples)=mad(RATIO2(gap2+1:gap));
    replyR4(samples,:)=replyR2(mainroot);
    SampleName5(samples,:)=SampleName3(mainroot);
    reactor4(samples,:)=reactor2(mainroot,:);
    datum4(samples,:)=datum2(mainroot,:);
end
break
end
end
end

xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('AOB / NOB')), nameXLS, 'A1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Reaktor')), nameXLS, 'B1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Datum')), nameXLS, 'C1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Typ vzorku')), nameXLS, 'D1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Název vzorku')), nameXLS, 'E1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Zastoupení dle POCTU ', ' [ ]')), nameXLS, 'F1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Zastoupení dle PROCENT ', ' [%]')), nameXLS, 'G1');
xlswrite(NazevExcel, replyR2, nameXLS, 'A2');
xlswrite(NazevExcel, reactor2, nameXLS, 'B2');
xlswrite(NazevExcel, datum2, nameXLS, 'C2');
xlswrite(NazevExcel, SampleName3, nameXLS, 'D2');
xlswrite(NazevExcel, SampleName2, nameXLS, 'E2');
xlswrite(NazevExcel, RATIO2, nameXLS, 'G2');
xlswrite(NazevExcel, replyR4, nameXLS_Sum, 'A2');
xlswrite(NazevExcel, SampleName5, nameXLS_Sum, 'B2');
xlswrite(NazevExcel, reactor4, nameXLS_Sum, 'C2');
xlswrite(NazevExcel, datum4, nameXLS_Sum, 'D2');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Reaktor')), nameXLS, 'B1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Datum')), nameXLS, 'C1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Typ vzorku')), nameXLS, 'D1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Medián zastoupení dle PROCENT ', ' [%]')),
nameXLS_Sum, 'E1');
xlswrite(NazevExcel, cellstr(strcat('Mediánová absolutní odchylka ', ' [%]')),
nameXLS_Sum, 'F1');
xlswrite(NazevExcel, median2, nameXLS_Sum, 'E2');
xlswrite(NazevExcel, mad2, nameXLS_Sum, 'F2');

```

B Nanovláknenné nosiče pro vzorkování mikrobiální biomasy



Obrázek 41: Taxonomické složení a relativní abundance majoritních taxonů (> 2,5 %) na nanovláknenných nosičích odebraných z monitorovacího vrtu RW6A-42 prezentované formou Krona grafů.

C Validace sterilizačního protokolu od společnosti BIOINOVA



Testování sterility – validace sterilizačního postupu nanovláken

Vzorky nanovláken byly vloženy do 50 ml kónických zkumavek se šroubovacím uzávěrem a bylo k nim přidáno 10 ml bujónu CASO. Zkumavky byly vloženy do inkubátoru a inkubovány při teplotě 24°C a po dobu 72 hodin. U vzorků poté byla kvalitativně hodnocena turbidita kultivačního média (viz. Tabulka a pro ilustraci Obr. 1). U sterilizovaných nanovláčkových vzorků nedošlo k zakalení roztoku ani v jednom případě, přičemž všechny nesterilizované vzorky vykazaly mikrobiální kontaminaci.

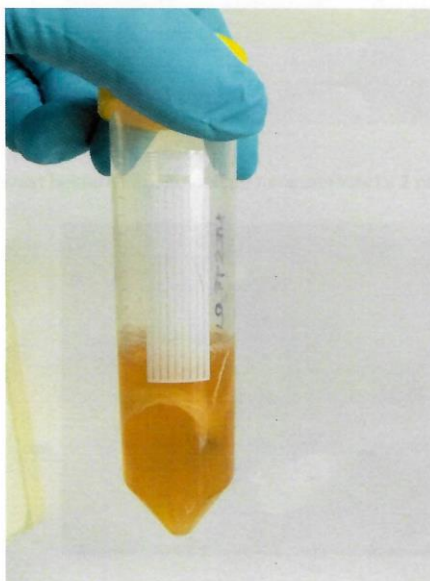
Tabulka.

Nanomateriál	Vzorky	Sterilizace	CASO – zakalení (% vzorků)	TS agar – přítomnost kolonií (% vzorků)
AC nosič + P. putida	1-6	N	100	100
DC nosič + P. putida	7-12	N	100	100
AC nosič + P. putida	13-18	A*	0	0
DC nosič + P. putida	19-24	A*	0	0
AC nosič	25-30	N	100	100
DC nosič	31-36	N	100	100
AC nosič	37-42	A**	0	0
DC nosič	43-48	A**	0	0

* Sterilizace 20 minut ve 0,03% vodném roztoku ClO₂

** Sterilizace 10 minut ve 0,03% vodném roztoku ClO₂

Obrázek 1. Zakalení bujónu CASO po inkubaci vzorku 2.



Ze vzorků bylo odebráno 100 μ l suspenze, která byla nanesen a rozetřen na kulturační plotny s Tryptic Soy (TS) agarem. Následná kultivace probíhala po dobu 72 hodin při teplotě 24°C. U všech nesterilních vzorků došlo k masivnímu nárůstu bakteriálních kolonií (pro ilustraci viz Obr. 2), zatímco ani u jednoho sterilizovaného vzorku nebyla pozorována žádná kolonie (viz Tabulka). Reprezentativní nesterilní vzorky v bujónu CASO (č. 2, 11, 25 a 32) pak byly zředěné (ředění 10^6) pro lepší diskriminaci jednotlivých 100 μ l suspenze bylo znovu nasazeno ke kultivaci na TS agaru. Plotny byly kultivovány při teplotě 33 °C po dobu 48 hodin. U všech vzorků došlo k nárůstu kolonií (pro ilustraci viz Obr. 3).

Obrázek 2. Masivní nárůst bakteriálních kolonií po nanesení vzorku 2 na TS agar.



Obrázek 3. Nárůst bakteriálních kolonií po nanesení vzorku 2 na TS agar při zředění 10^6 .



Pro definitivní vyloučení kontaminace vzorků obsahujících sterilizovaný materiál, byla použita alternativní zkouška na sterilitu pomocí zařízení Bact/ALERT (dle dokumentu BI-KSOP-22.7), který se v společnosti Bioinova používá v rámci kontroly kvality v režimu Správné výrobní praxe. Zařízení velice citlivě detekuje i minimální mikrobiální kontaminace na základě monitorování metabolické aktivity v roztoku, a to jak aerobní, tak anaerobní organismy.

Alternativní zkouška na sterilitu se provádí podle platného Českého lékopisu v čistých prostorách (ČP) v laminárním boxu o třídě čistoty A umístěném v pracovním boxu o třídě čistoty B metodou přímého očkování. Následná kultivace pak probíhá mimo ČP až 14 dní.

Vzorky půd se po kultivaci v zkumavkách naočkovaly do lahviček s půdou inzulinovými stříkačkami Omnican 50 I.U., resp. 100 I.U. skrz pryžovou zátku, na každé očkování se použila nová stříkačka. Po 14 dnech kultivace nebyla zaznamenána kontaminace ani v jednom takto testovaném vzorku.

Závěr

Sterilizační postup nanovláken hodnotíme jako vysoce efektivní, kdy nebyla pozorována ani u jednoho sterilizovaného vzorku žádná mikrobiální kontaminace ani při prodloužené inkubaci na bakteriálních kultivačních mediích.

V Praze 8.12.2021



Vypracoval: MUDr. Peter Bauer, Ph.D.