

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Charakteristika půdního mikrobiomu po provedené
remediaci půdy kontaminované ropnými deriváty**

Diplomová práce

Bc. Kamila Pavková

Rozvoj venkovského prostoru

**prof. Ing. Jiřina Száková, CSc.
RNDr. Markéta Marečková, PhD.**

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Charakteristika půdního mikrobiomu po provedené remediaci půdy kontaminované ropnými deriváty" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Jiřina Száková, CSc. a RNDr. Markéta Marečková za jejich rady a čas, který mi věnovaly při řešení dané problematiky. Jitce Pavkové, Základně taktického vojenského letectva v Čáslavi za poskytnuté informace a možnost danou problematiku na této lokalitě řešit. Velké poděkování patří Výzkumnému ústavu rostlinné výroby v Praze a výzkumnému týmu, za pomoc při laboratorních pracích. Děkuji Ing. Najmanové za laboratorní pomoc na půdě ČZU. V neposlední řadě také děkuji všem respondentům, kteří mi poskytli potřebné informace.

Charakteristika půdního mikrobiomu po provedené remediaci půdy kontaminované ropnými deriváty

Souhrn

Únikem ropných látek do půdy dochází k častým případům poškození životního prostředí. K úniku obvykle dochází při těžbě ropy, manipulaci ropnými látkami, dopravě ropných produktů, nebo nadzemním či podzemním skladování v nádržích v důsledku prosakování.

Tato práce se zabývá vlivem vybraných remediačních metod na půdní mikrobiom a enzymovou aktivitu půdních mikroorganismů v půdě kontaminované ropnými látkami.

Pro zhodnocení účinku dvou vybraných remediačních metod, ISCO – in situ chemické oxidace Fentonovým činidlem a bioremediace pomocí přídatku bakteriálního inokula, byly sledované parametry mikrobiálních společenstev hodnoceny před a po jejich aplikaci v roce 2019. Vzorky půdy byly odebrané vrtnou soupravou do hloubky 5 až 6 m. Vrty byly provedeny v místech odpovídajících pravidelnému přečišťování kontaminované spodní vody filtrací a aplikací remediačních prostředků. Odebrané vzorky se rozdělily na tři části, jedna část se lyofilizovala a druhá část byla vysušená volně na vzduchu a třetí část byla zamražena na -81 °C. Z lyofilizovaných vzorků se stanovovala enzymová aktivita. Ze vzorku sušených na vzduchu se stanovovalo pH půdy, kationtová výměnná kapacita, stanovení ropných uhlovodíků, obsah dusíku a uhlíku. Zamražené vzorky byly použité pro extrakci DNA.

V této práci bylo dokázáno, že Fentonovo činidlo jen mírně zasahuje do chemického složení půdy. Půdní mikrobiom se po aplikaci remediačních metod u vrtů liší převážně v procentuálním zastoupení různých taxonomických skupin. Jako nejvýznamnější se ukázaly rozdíly v poměrech mezi vrty AS7_s1 a AS7_s2. Po aplikaci jsou bakterie ve vrtu AS7_s2 od 1,75 – 6 m převážně vyrovnané procentuálním zastoupením v každém kmenu. Ve vrchní části vrtu u 0,5 m a 1,5 m převažuje kmen bakterií Proteobacteria. U vrtu AS26 převažovaly kmény Proteobacteria a Chloroflexi před i po aplikaci činidla. Výrazné změny nastaly v 0,25 – 2,75 m vrtu po aplikaci činidla AS26_s2, kde se zvýšil počet kmenu Chloroflexi a minimalizovalo se zastoupení kmenu Actinobacteriota. Úbytek nastal u kmenu Proteobacter a Chloroflexi, ve spodních vrstvách vrtu pak začal převažovat kmen Actinobacteriota. Mikrobiální zastoupení a enzymatická aktivita vykazuje v půdách prostorovou variabilitu, která přímo nesouvisí s kontaminací nebo půdními horizonty.

Naměřená aktivita enzymu β -galaktosidázy vzrostla ve vrtu AS7 v hloubce 4,25 m, a v této hloubce zároveň vzrostl i obsah C. V cyklu C je β -galaktosidáza velmi důležitá, protože je jedním ze základních enzymů, které štěpí glykosidické vazby uhlovodíků.

Klíčová slova: bioremediace, ropné deriváty, půda, půdní mikrobiom, mikroorganismy, enzymy

The characteristics of soil microbiome of soil contaminated by oil derivatives after accomplished remediation

Summary

The oil spill to soil represents a relatively frequent damage to the natural environment. The oil spill is commonly associated with improper oil extraction, manipulation or transport of oil products, or with inadequate storage of a crude oil in underground or ground tanks and reservoirs.

The thesis aims in evaluating the impact of two selected remediation techniques on the soil microbiome and enzyme activity of microorganisms inhabiting the soil contaminated with oil substances. The effect of both selected remediation techniques – the ISCO *in-situ* chemical oxidation with the Fenton's reagent and the bioremediation with bacterial inoculum – was assessed before and after the treatment in year summer and fall of 2019. The soil samples were taken using a percussion drilling set to the depth down to 5 to 6 m. The cores were drilled near two sites of regular groundwater cleaning via filtration. Each of the sample was divided to three parts. The first subsample was lyophilized to assess enzyme activities. The second was left to dry under the ambient conditions, to determine the pH of the soil, its cation exchange capacity, petroleum hydrocarbons', and nitrogen and carbon content. The third was frozen to -80 °C for DNA extraction.

The results revealed that the Fenton's reagent only slightly influenced the soil chemical characteristics. Yet, the soil microbiome changed after both treatments in the percentage of various taxonomic groups. The most significant differences were recorded in the core treated with bacterial inoculum between the samples AS7_s1 and AS7_s2, i.e. before and after the remediation. The percentage of the bacteria strains in the AS7_s2 sample from the depths of 1.75–6 m were relatively homogenous but the upper part of the depth between 0.5–1.5 m was dominated by Proteobacteria.

The core AS26 all contained mostly the phyla Proteobacteriota and Chloroflexi after the application of the Fenton's reagent. Significant changes were recorded in the AS26_s2 from the depth of 0.25–2.75 m – the percentage of the phylum Chloroflexi increased and the proportion of Actinobacteriota was reduced to a minimum. A decrease of Proteobacteriota and Chloroflexi occurred in the lower layers of the core, while Actinobacteriota prevailed.

The enzymatic activity and the composition of microbiological communities observed in the soil samples specify the spatial variability of the soil that is not directly related to the contamination or soil horizons. The measured activity of beta-galactosidase increased in the core AS7 at the depth of 4.25 m, in which simultaneously increased the carbon C content. For C cycle, the beta-galactosidase is a very important enzyme because it cleaves the glycosidic bonds of hydrocarbons.

Keywords: bioremediation, petroleum derivatives, soil vertical profiles, soil microbiome, microorganisms, enzymes

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1. Úvod | 10 |
| 2. Cíle práce | 11 |
| 3. Přehled literatury..... | 12 |
| 3.1. Kontaminace půdy ropnými uhlovodíky | 12 |
| 3.2. Toxikologické vlastnosti ropných uhlovodíků | 12 |
| 3.2.1. Ropné látky v půdě a vodě | 12 |
| 3.2.2. Vliv na člověka | 13 |
| 3.2.3. Vliv na ekosystém..... | 13 |
| 3.2.4. Vliv na mikroorganismy v půdě | 13 |
| 3.2.5. Chování ropných látek v horninovém prostředí..... | 14 |
| 3.3. Mikroorganismy a půda..... | 14 |
| 3.4. Mikroorganismy a ropné deriváty | 15 |
| 4. Zájmová lokalita | 16 |
| 4.1. Všeobecné údaje | 16 |
| 4.2. Ochrana přírody a krajiny v zájmovém území | 17 |
| 4.3. Přírodní poměry zájmového území..... | 17 |
| 4.3.1. Geomorfologické poměry | 17 |
| 4.3.2. Geologické poměry..... | 17 |
| 4.3.3. Hydrogeologické poměry..... | 18 |
| 4.4. Historie a zdroj kontaminace..... | 18 |
| 4.5. Charakteristika remediačních technologií pro danou lokalitu | 19 |
| 4.5.1. Sanační čerpání podzemních vod a jejich čištění | 19 |
| 4.5.2. Promývání půdy..... | 20 |
| 4.5.3. Air sparging | 20 |
| 4.5.4. Venting | 21 |
| 4.5.5. ISCO – <i>in situ</i> chemická oxidace (Fentonovo činidlo) | 22 |
| 4.5.6. Aktivní bioremediace <i>in situ</i> | 22 |
| 5. Materiál a metody | 24 |
| 5.1. Odber vzorků | 24 |
| 5.2. Stanovení pH | 24 |
| 5.3. Stanovení kationtové výměnné kapacity | 24 |
| 5.4. Stanovení celkového obsahu C a N v půdě | 25 |
| 5.5. Rezidua ropných uhlovodíků | 25 |
| 5.6. Stanovení enzymové aktivity..... | 25 |
| 5.7. Extrakce DNA | 26 |
| 5.7.1. Fenol-chloroformová extrakce s CTAB a srážením isopropanolem | 26 |
| 5.7.2. Inovovaný postup extrakce DNA | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 5.8. Elektroforéza | 27 |
| 5.9. Přechištění extrahované DNA | 28 |
| 5.9.1. HEPES a CaCl ₂ | 28 |
| 5.9.2. GeneClean Turbo kit | 28 |
| 5.10. PCR amplifikace genu pro 16S rRNA | 29 |
| 6. Výsledky | 30 |
| 6.1. Obsahy reziduí ropných uhlovodíků | 30 |
| 6.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy | 30 |
| 6.3. Stanovení enzymové aktivity | 36 |
| 6.4. Extrakce DNA | 41 |
| 6.5. Přechištění DNA | 46 |
| 6.7. PCR produkt | 50 |
| 6.8. Sekvence DNA | 56 |
| 6.8.1. Phyla (kmeny) | 56 |
| 6.8.2. Chloroflexi | 60 |
| 6.8.3. Acidobacteriota | 62 |
| 6.8.4. Planctomycetota | 64 |
| 7. Diskuze | 66 |
| 8. Závěr | 68 |
| Literatura | 69 |
| Samostatné přílohy | 75 |

1. Úvod

Kontaminace půdy ropnými látkami patří k častým případům poškození životního prostředí. K únikům ropných látek dochází při těžbě ropy, zpracování ropy v petrochemickém průmyslu, při manipulaci s ropnými látkami (např. plnění skladových nádrží), skladování v podzemních nebo nadzemních nádržích v důsledku jejich netěsnosti, nebo při dopravě ropných produktů.

Znečištění ropou se projevuje zhoršením fyzikálních, chemických a zejména biologických vlastností půdy. Pro remediaci půdy kontaminované ropnými látkami je vhodné využít zejména ty metody, které jsou založeny na biologických principech, jako je bioremediace či fyto-remediace. Z fyzikálních a chemických metod pak je v této souvislosti třeba zmínit venting, air sparging, či sorpci kontaminantu na různé materiály.

Půdní mikrobiální společenstva mají zásadní význam na degradaci ropných uhlovodíků. Postupné odstraňování kontaminantů, má ale také zpětný vliv na strukturu půdních společenstev. Během bioremediace uhlovodíků kontaminovaných uhlovodíků je proto klíčová charakterizace mikrobiálních společenstev, protože procesy biologického rozkladu do značné míry závisí na jejich aktivitě, četnosti, rozmanitosti a struktuře. Data získaná z těchto studií jsou užitečná pro optimalizaci stávajících bioremediačních strategií a pro vývoj nových. (Siles a Margesin 2018).

Ukazuje se ale, že bylo dosud provedeno málo studií, které by se podrobněji zabývaly účinky sanace na strukturu, četnost a aktivitu půdních mikroorganismů v kontaminované půdě v průběhu odstraňování uhlovodíků během sanace. To může být způsobené i tím, že molekulární metody, které jsou ke studiu mikrobiálních společenstev nutné, byly donedávna málo dostupné (Wu et al. 2017).

Kombinace remediačních metod byla využita i ve studii sanace kontaminované půdy v areálu leteckých pohonných hmot (ALPH), který patří k vojenské letecké základně v Čáslavi. Remediační opatření mohou přispět k degradaci sledovaných kontaminantů, mohou ale také ovlivnit složení a početnost půdních mikroorganismů v ošetřené půdě.

2. Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit vliv zvolených remedičních opatření ISCO – *in situ* chemická oxidace s Fentonovým činidlem a bioremediace na půdní mikrobiom a aktivitu půdních mikroorganismů. Půdní vzorky byly hodnoceny před aplikací a po aplikaci remediačních metod.

Hypotéza: remediační opatření ovlivní početnost a strukturu půdního mikrobiomu.

3. Přehled literatury

3.1. Kontaminace půdy ropnými uhlovodíky

Kontaminace půdy se hodnotí podle postupů uvedených v Metodickém pokynu MŽP č. 3/2011 pro analýzu rizik kontaminovaných území. Postup hodnocení zdravotního rizika předpokládá identifikaci rizik spočívající v určení a zdůvodnění prioritních kontaminantů, Následně je pro jednotlivé expoziční scénérie hodnocena nebezpečnost kontaminantů na zdraví obyvatel a životní prostředí, v případě že jsou překročeny limitní hodnoty legislativních norem, zejména zjištění závažného ohrožení znečištění povrchových nebo podzemních vod, vyžaduje již tato skutečnost nápravná opatření (Příbyl, 2011).

3.2. Toxikologické vlastnosti ropných uhlovodíků

3.2.1. Ropné látky v půdě a vodě

Častým zdrojem kontaminace ropnými látkami jsou benzín, nafta, topné oleje a minerální mazadla. Ropné látky jsou směsí aromatických a alifatických látek, jejichž složení a vzájemný poměr závisí na zdroji kontaminace. Pro letectví je nejvýznamnější kerosin - letecký petrolej a avgas - letecký benzín. Základním skupinovým ukazatelem kontaminace horninového prostředí a vod ropnými látkami (RL) je obsah uhlovodíků a obsah nepolárních extrahovaných látek (NEL). RL můžeme dělit následovně (Šafařík et al. 2017, upraveno):

- 1) *Tryskové palivo* petrolejového typu (včetně Jet A a Jet A-1, JP-5 a JP-8) má distribuci C₈-C₁₆; tryskové palivo se širokým řezem nebo naftové palivo (včetně Jet B a JP-4), C₅-C₁₅. Obecně jsou petroleje jsou směsí uhlovodíků C₁₂-C₁₈ vroucí v intervalu teplot 140–300 °C, letecké petroleje 250 až 275 °C. Obsahují alkylnafty, dicykloalkany, vyšší aromatické uhlovodíky, kondenzované a nekondenzované polycyklické uhlovodíky.
- 2) *Letecký benzín, avgas*. Hlavní ropnou složkou používanou při míšení avgasu je směs různých alifatických isooktanů. Benziny jsou obecně směsí uhlovodíků C₄-C₁₂, vroucí v intervalu teplot 30–210 °C. Obsahují alkylnafty, izoalkany, cyklopentany, cyklohexany, benzen apod. Alkylnafty jsou nasycené uhlovodíky s molekulou bez násobných vazeb mezi atomy uhlíku v uhlíkovém řetězci. Hlavním zdrojem alkanů je zemní plyn a ropa. Jsou lehčí než voda a jsou v ní nerozpustné. I v nízkých koncentracích ovlivňují organoleptické vlastnosti vod. Snadno biodegradují, patří k nejlépe biodegradabilním ropným uhlovodíkům. Jejich biodegradabilita ovšem s rostoucí délkou řetězce klesá. V nenasycené zóně při vyšších koncentracích způsobují významné snížení propustnosti zeminy.
- 3) *Plynové oleje* obsahují uhlovodíky C₁₆-C₂₄, vroucí většinou mezi 150 až 360 °C. V porovnání s petroleji plynové oleje obsahují více cyklických sloučenin a méně alkanů, izoalkanů, nealkylovaných aromatických uhlovodíků. Ve směsi s petroleji tvoří motorové nafty.

- 4) *Mazací oleje* definujeme jako odparafinované a odasfaltované destiláty z destilace ropy za sníženého tlaku. Obsahují uhlovodíky C₂₄–C₄₀, případně i vyšší. Převládají alkylycyklany s několika krátkými a jedním delším alkyly. Zušlechťování mazacích olejů české provenience se provádí přidavkem aditiv v koncentraci 0,1 až 10 hmotnostních % vzácněji i vyšších (VUSS Pardubice, 2001)

3.2.2. Vliv na člověka

Ropné látky mohou při styku s pokožkou způsobovat dermatózy a v některých případech nádorová onemocnění kůže. Zvyšují rozpustnost organických látek a usnadňují jejich průnik kůží. Nebezpečí otravy přímým požitím je minimální, častější je ale možnost otravy inhalací zejména u lehkých uhlovodíků. Chronické působení při inhalaci se projevuje malátností, poruchami krvetvorby, bolesti hlavy, silným drážděním očí a plic. Při působení na pokožku dochází k degenerativním změnám na játrech, slezině a ledvinách (VUSS Pardubice, 2001)

3.2.3. Vliv na ekosystém

Významným negativním účinkem ropných látek je zhoršení organoleptických vlastností vody a znehodnocení vodních zdrojů při koncentraci již od 0,001 mg.l⁻¹. Toxický efekt se projevuje až při vyšších koncentracích. Obecně platí, že ropné látky jsou toxičtější pro vodní ekosystémy než pro člověka.

Ekotoxicita je ovlivňována chemickým složením jednotlivých produktů, rozpustností různých uhlovodíků ropy a ropných produktů ve vodě, mění se v závislosti na stupni emulze. Uvádí se, že lehčí frakce ropy (benzín, petrolej) jsou toxičtější než těžší frakce (oleje). Nejvíce toxický je benzín, který v množství 3 mg.l⁻¹ ve vodě pozastavuje biochemické pochody. Ve vodě je letecký petrolej pro bezobratlé toxický v koncentraci 7,7 mg.l⁻¹, motorové oleje v koncentraci 40 mg.l⁻¹. V důsledku turbulence vody ropné látky emulgují a zalepují dýchací orgány vodních organismů. Díky slunečnímu záření se z ropných látek uvolňují naftové kyseliny, které jsou prudkým jedem pro vodní organismy. Ropné látky v půdě způsobují zpomalení pohybu vody s roztoky živin půdními kapilárami ke kořenům rostlin a znemožňují jejich růst. Znehodnocení půdy může trvat i desítky let než se obnoví podmínky vhodné pro růst rostlin. Citlivost na ropné látky ve vodě je pro různé druhy ryb odlišná. Nejcitlivěji reaguje plůdek dravých ryb (candát, bolen, pstruh), plotice a sumec jsou považovány za odolnější. Pro perloočky je velmi jedovatý, pro nitěnky středně jedovatý. Další ropné produkty jsou pro perloočky silně až velmi silně jedovaté (VUSS Pardubice, 2001).

3.2.4. Vliv na mikroorganismy v půdě

Prosakování ropy do okolní půdy bývá většinou pozvolné a proto má mikrobiální společenstvo dostatek času na jejich zpracování. Mikroorganismy si vyvinou přirozené mechanismy biodegradace ropných látek a přítomné uhlovodíky v ropě jsou pro ně jediným zdrojem uhlíku a energie. Nárůst obsahů ropných látek vyvolá enormní změny ve složení

přirozeného mikrobiálního společenstva, díky ropným látkám dojde k vytvoření přirozeného selekčního tlaku a ropu degradující bakterie začnou po velmi krátké době dominovat a konkurovat ostatním (Head et al. 2006).

3.2.5 Chování ropných látek v horninovém prostředí

Ropné látky mají nepolární charakter, takže jsou nemísitelné s vodou. Při kontaminaci horninového prostředí látky migrují vlivem gravitace k hladině podzemní vody, která působí jako bariéra dalšímu šíření kontaminantů. Záleží ale na prostředí horninového typu, druhu kontaminující látky a množství kontaminantů. U malých úniků dojde k saturaci pórového objemu zeminy, kdy může kontaminace zůstat vázaná v nesaturované zóně. Pokud je zemina látkou saturována, dochází k toku pórovým prostředím směrem k hladině podzemní vody a na hladině podzemní vody, přičemž dochází k hromadění ropných látek. Při masivním úniku může dojít k zaklesnutí hladiny podzemní vody pod obvyklou úroveň. Ropné látky se začnou šířit ve směru proudění podzemní vody a začne se vytvářet zóna zašpinění.

V horninovém prostředí dochází k částečnému rozdělování ropných látek na jednotlivé složky. V nesaturovaném prostředí se rozdělují mezi půdní vzduch, pevnou složku a vodu, v saturované zóně mezi vodu a pevnou složku. Při masivním úniku ropných látek zůstává část těchto látek v půdním roztoku ve formě fáze, která působí jako dlouhodobý zdroj kontaminace. Rozlišuje se na volnou fázi, která se volně šíří v horninovém prostředí a na zbytkovou fázi, která se pevně naváže na horninovou matici. Přítomnost volné fáze se hodnotí měřeními na hladině podzemní vody ve vhodně konstruovaných monitorovacích vrtech. Vazba na horninovou matici a šíření ropných látek v prostředí jsou ovlivněny makrostrukturou a mikrostrukturou lokality. K faktorům mikrostruktury patří podíl organického uhlíku, který je určující pro sorpci organických látek a zrnitostní složení hornin, které ovlivňují sorpční procesy a určuje velikost pórů, které jsou hlavními faktory řídicích advekčních rychlostí tekutých látek a jejich zadržitelnost v horninovém prostředí. Geologickou makrostrukturou dané lokality se rozumí zvrásněnost nebo zvrstvení, tektonické predispozice a další faktory, které mohou determinovat způsob a rychlost šíření kontaminantu v prostředí (Macháčová, 2010).

3.3. Mikroorganismy a půda

Půda je základním prostředím pro život mnoha mikroorganismů. Půda poskytuje organismům živiny a energii. Naproti tomu mikroorganismy zpětně ovlivňují fyzikální a chemické vlastnosti půdy díky své aktivitě a účasti na koloběžích živin. Půda obsahuje množství organických látek a dostatek živin, kyslíku i vody. Poskytuje příznivé podmínky pro růst a existenci organismů. Všechny organismy se podílejí na rozkladu a syntéze organických látek. Mezi půdou a živými organismy existují oboustranné výrazné vazby. Organismy ovlivňují vlastnosti půd. Svoji činností zvyšují úrodnost a naopak půda výrazně ovlivňuje existenci a životní projevy rostlin a živočichů.

Půda je tedy prostředím pro mikroorganismy, ale zároveň je i jejich produktem. Velkou roli mají půdní organismy v půdotvorných procesech, kdy napomáhají v biochemických procesech zvětrávání hornin, ale také vzniku a ukládání organické hmoty. V půdě se vyskytují organismy od mikroskopické velikosti, které se účastní rozkladu organických látek, až po obratlovce. Půdní mikroflora (bakterie, řasy, mikromycety) rozkládá organickou hmotu na jednodušší chemické sloučeniny a minerální látky, které jsou živinami pro rostliny. Hlavní činnost půdních živočichů (edafonu) spočívá v mechanickém zpracování mrtvé organické hmoty. Velký význam aktivity edafonu pak souvisí s promícháváním minerálních a organických složek půdy (Merendiak et al. 1987, Rulík et al. 2011).

Všechny skupiny organismů tak mají vliv na biologické procesy v půdě a podílejí se na zachování ekosystémových procesů, mezi které patří i přirozená bioremediace. Tím, že přírodní uhlíkaté látky nacházející se v půdě jsou velmi různorodé, mikroorganismy se dokážou adaptovat na využívání mnoha zdrojů uhlíku a energie včetně látek vytvořených člověkem. Tyto látky se pak z příznivých podmínek rozloží stejně jako přirozené látky až na CO₂ a vodu. Biodegradace probíhá dvěma odlišnými metabolickými cestami. První je spojená s růstem a nazývá se metabolická degradace. Je to proces, při kterém mikroorganismus používá cizorodou látku jako jediný zdroj uhlíku a energie. Druhá se nazývá co-metabolická degradace, působí odděleně nebo i zároveň s biodegradací, a při ní je chemická látka metabolizována v buňkách, které rostou na jiném typu uhlíku a zdroji energie. Za schopnost adaptace mikroorganismů na neznámé látky je zodpovědných několik mechanismů mezi nimiž jsou i) mutace v jednotlivých populacích, ii) horizontální genový přenos nebo iii) genová rekombinace. Tyto procesy spolupůsobí při změnách složení a struktury mikrobiálních společenstev i při změnách jejich enzymových aktivit (Poursat et al. 2018).

3.4. Mikroorganismy a ropné deriváty

Původní půdní mikroorganismy, které jsou schopné degradovat ropu a její uhlovodíkové deriváty jsou všudypřítomně distribuovány v životním prostředí. Biodegradace komplexních směsí stovky uhlovodíků v ropných odpadech vyžadují spolupráci různých skupin mikroorganismů, a proto je potřebná analýza dynamiky celého mikrobiálního společenstva během procesu bioremediace (Shahi et al. 2016). Schopnost mikroorganismů štěpit a využívat ropné uhlovodíky je závislá na chemickém složení směsi ropných uhlovodíků a na podmínkách prostředí. Degradovány jsou nejrychleji nasycené ropné uhlovodíky s menším počtem C atomů (C₁₀ – C₂₄). Hůře jsou štěpeny C₄ alkany, C₅ – C₉ alkany jsou sice některými mikroorganismy degradovány, ale pro celou řadu mikroorganismů jsou tyto uhlovodíky silně toxické. Se vzrůstající molekulovou hmotností a komplexností aromatických uhlovodíků se snižuje potenciální pravděpodobnost biodegradace. Je tedy zřejmé, že nasycené uhlovodíky a lehké aromatické uhlovodíky budou degradovány rychleji než například vysokomolekulární aromatické sloučeniny, asfaltické uhlovodíky a pryskyřice (Horáková, 2006).

Velmi nízké procento přirozených degradátorů ropných uhlovodíků obsahují půdní a vodní ekosystémy, které nejsou kontaminovány ropnými uhlovodíky. V prostředí, které je ropnými uhlovodíky kontaminováno, stoupá procentuální zastoupení mikroorganismů degradujících ropu, i když žádný z izolovaných mikroorganismů není schopen degradovat všechny složky ropy. Mezi nejvýznamnější degradátory ropy a ropných látek patří zástupci rodů *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Candida*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* (Lee and Levy 1989).

V současné době se ale klade důraz na analýzu dynamiky celých mikrobiálních společenstev. Ukazuje se, že v různých podmínkách se při degradaci uplatňují mikroorganismy, z nichž mnohé nelze kultivovat, a proto se nedají objasnit jejich degradační schopnosti přímými metodami. Změny jejich složení a aktivity ale indikují souvislost s rozkladem cizorodých uhlíkových látek, a proto jsou informace o jejich funkci během remediace potřebné pro zvýšení efektivity procesů, ale i případných nepříznivých účinků manipulace s prostředím (Siles a Margesin 2018).

V různých studiích s postupnou degradací ropných produktů korelovaly různé skupiny bakterií. Například Jiao et al. (2017) ukázali, že půdy dlouhodobě kontaminované ropnými produkty byly typické zvýšením výskytu kmenů Chloroflexi (Anaerolineales), Firmicutes, Clostridia (Clostridiales). Shahi et al. (2016) poukázali na vysokou relativní četnost Proteobacteria, Firmicutes a Bacteroidetes v půdě kontaminované ropou. Naproti tomu Siles a Margesin (2018) popsali, že zvláště třídy Gammaproteobacteria a Bacteroidia se zúčastnily rozkladu petrolejových uhlovodíků. Zdá se tedy, že v každé situaci a na odlišných lokalitách je nutné vyhodnotit změny mikrobiálních společenstev a podle nich posoudit, která ošetření jsou pro průběh sanací nejvýhodnější.

4. Zájmová lokalita

4.1. Všeobecné údaje

Sledované území tvoří areál leteckých pohonných hmot (ALPH) a okolí, které se nacházejí ve východní části Kutnohorského okresu, zhruba 3 kilometry na severozápad od města Čáslav. Nadmořské výška činí 225-235 m n. m. Území je lehce svažité povahy, areál ALPH se svažuje k toku řeky Brslenky, tedy k severovýchodu až východu. Obklopující terén je přednostně využíván, jako zemědělská plocha.

Samotný areál ALPH je nepravidelného tvaru, s rozměry cca 400 na 300 m. Nachází se přibližně 150 m východně od silnice Čáslav-Chotusice. Jeho západní strana je vzdálena cca 300 m od hranice areálu letecké základny (Misař, 1983).

4.2. Ochrana přírody a krajiny v zájmovém území

Dle vyhlášky č. 252/2013 Sb., o rozsahu údajů v evidencích stavu povrchových a podzemních vod a o způsobu zpracování, ukládání a předávání těchto údajů do informačních systémů veřejné správy § 19, se vybraná oblast nenachází v žádném chráněném území dle zvláštních předpisů ani chráněné oblasti přirozené akumulace vod (Langhammer a kol., 2010).

4.3. Přírodní poměry zájmového území

4.3.1. Geomorfologické poměry

Podle geomorfologického členění se lokalita nachází ve střední části okrsku Ronovská kotlina v podcelku, Čáslavská kotlina, který je součástí Středolabské tabule, podsoustavy Středočeská tabule, soustavy Česká tabule a jednotky prvního řádu provincie Česká vysočina. Ronovská kotlina zaujímá členitější erozně denudační reliéf okrajové části tektonické sníženiny se strukturně denudačními plošinami na křídových horninách s relikty staropleistocénních a mladotřetihorních teras s exhumovaným předkřídovým zarovnaným povrchem a těsnými erozními údolními v krystalinických horninách v povodí středního toku Klejnéřky a Doubravy. Významnými body oblasti jsou Bambousek (360 m n.m.) a U Písku (340 m n. m.). Oblast je nepatrně a málo zalesněná smrkovými prostory s příměsí borovic (Damek, 1987).

4.3.2. Geologické poměry

Z regionálně geologického hlediska leží zájmová oblast v jižní části české křídové pánve, tzv. Čáslavské křídý. Křídové sedimenty náleží převážně labskému vývoji v převažujícím slínovcovém vývoji. V širším okolí zájmového území jsou ověřena litologická souvrství perucko-korycanské (cenoman) a bělohorské (spodní turon). Bazální perucko-korycanské souvrství je zejména v pískovcovém vývoji. Na bázi bělohorského souvrství zpravidla nalézáme polohy vápnitých šedozelených glaukonitických jílovců s obsahem drobných valounů křemene a organických zbytků. Nadloží bazální polohy tvoří charakteristické převážně světle šedé a žlutavé slínovce s prachovou příměsí (opuky). Svrchní část svrchnokřídových hornin zvětrává do slinitých a jílovitých eluvií. Mocnost peruckokorycanského souvrství byla ověřena průzkumnými pracemi v oblasti ALPH v rozmezí 3,7–6,5 m a mocnost souvrství bělohorského 23,5–19,4 m.

Kvartérní sedimenty jsou v zájmové lokalitě tvořeny vesměs pleistocénními sprašemi a sprašovými hlínami, charakteru prachovitých až jílovito-prachovitých hlín, svrchní část kvartérního profilu je lokálně tvořena i antropogenními navážkami. Pod nimi jsou uloženy štěrky a písky říčních teras pleistocénu o proměnlivé mocnosti, od desetin metrů až pod cca 5 m. Mocnost štěrkopísků obecně stoupá od JZ k SV, směrem k toku Brslenky. V blízkosti Brslenky jsou uloženy holocenní přeplavené hlíny. Celková mocnost kvartérních uloženin se v zájmové oblasti pohybuje od 2 do 11 m (Chlupáč, 2002)

4.3.3. Hydrogeologické poměry

Mělký oběh podzemní vody je v oblasti soustředěn na průlinově propustné polohy kvartérních štěrkopísků. Jedná se o lokálně nesouvislé zvodnění s volnou, či mírně napjatou, hladinou vlivem překrytí sprašových hlín, s nízkou transmisivitou v řádu $<1 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, chemický typ Ca-Mg-HCO₃-SO₄. Z kvalitativního hlediska je podzemní voda mělkého obzoru bezprostředně vystavena ohrožení vlivu antropogenní činnosti. Zdrojem podzemní vody v zájmovém území je téměř výhradně infiltrace atmosférických srážek.

Hlubší kolektor podzemní vody je vázán na puklinový systém podložních slínovců. Propustnost slínovců závisí především na charakteru zvětralin a na hustotě rozevření a výplni puklin. Kolektor můžeme charakterizovat též s nízkou transmisivitou v řádu $<1 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, chemický typ Ca-Mg-HCO₃-SO₄. Zvodnění bývá většinou napjaté.

Další hluboký oběh podzemní vody je v oblasti vázán na klastické sedimenty (pískovce a slepence) perucko-korycanského souvrství cenomanu (kolektor A HG rajónu 4340 Čáslavská křída). Rajón zahrnuje území souvislého výskytu křída v jihozápadním podhůří Železných hor severně od Třemošnice. Křídové vrstvy mají mírné monoklinálně uložení k SV. Zvodnění je soustředěno na západní a východní část rajónu, v centrálních částech kolektor A chybí. Předpokládá se, že drenážní účinek Doubravy člení oběh podzemní vody na pravobřežní a levobřežní část. Jedná se o kolektor s napjatou hladinou, průlino-puklinovou propustností a chemického typu Ca-Mg-HCO₃. Území na levém břehu Doubravy má vody silně mineralizované (600–930 mg.l⁻¹), pravý břeh má vody středně mineralizované (350–500 mg.l⁻¹). V podzemní vodě se objevuje zvýšené množství železa a amoniakálního dusíku. Zranitelnost podzemních vod je střední až vysoká, zátěž potenciálními zdroji znečištění nízká (Jelínek, 1984).

4.4. Historie a zdroj kontaminace

V areálu ALPH byly od padesátých do osmdesátých let dvacátého století skladovány letecké pohonné hmoty ve čtyřech blocích podzemních nádrží (A, B, C a D), každý blok se čtyřmi nádržemi o objemu 50 m³, souvisejícími stavbami a zařízením, které obsahovalo dvě nádrže objemu 10 m³. Vlivem úniku při stáčení, přečerpávání ropných produktů, netěsnosti technologických rozvodů v prostoru podzemních úložišť a strojoven docházelo k úniku leteckých pokonných hmot (LPH) neboli kerosinu. Od ohnisek kontaminace v nesaturované zóně docházelo ke kontaminaci podzemních vod a jejímu dalšímu šíření ve směru jejich proudění, primárně však prostřednictvím propustnějších štěrkových, pískových poloh a preferenčních cest podél podzemních vedení produktovodů. V souvislosti s výstavbou nových úložišť byla v letech 2004 – 2007 odstraněna primární ohniska kontaminace nesaturované zóny v prostorech úložiště „B“ a „D“, v roce 2008 úložiště „C“, nicméně v prostoru úložiště „C“ přetrvávají vysoké obsahy ropných látek v podzemních vodách a volná fáze na hladině podzemní vody. Úložiště „A“ bylo odstraněno v roce 2010. V současné době jsou tedy již

sanovány všechny původní primární zdroje kontaminace včetně vytěžení kontaminovaných zemin, avšak v areálu přetrvává poměrně masivní reziduální kontaminace v saturované a místně pravděpodobně i nesaturované zóně horninového prostředí. V areálu se také ještě místy vyskytují zbytky původních stavebních konstrukcí a podzemního vedení.

Areál ALPH je součástí průzkumných a sanačních prací v areálu LZ Čáslav. Průzkumné a sanační práce byly v tomto prostoru zahájeny již v roce 1978. V současné době probíhá (ukončení aktuálního cyklu k 30. 11. 2013) sanace „reziduální“ kontaminace v areálu po odstranění všech primárních zdrojů kontaminace. V areálu jsou umístěna dvě sanační zařízení, přičemž každé pracuje na jiném principu čištění podzemních vod, obě technologie pracují ve střídavém režimu provozu a pravidelných odstávek (Vodní zdroje Ekomonitor, spol. s r.o., 2013).

4.5. Charakteristika remediačních technologií pro danou lokalitu

4.5.1 Sanační čerpání podzemních vod a jejich čištění

Sanační čerpání podzemních vod je opatření, které bylo v posledních letech soustředěno zejména na dekontaminaci gravitačních podzemních vod v hornině, kdy jsou využívány vrty, kterými je odčerpávána voda spolu s kontaminantem (Illangasekare a Reible, 2001; Theis a kol. 2003). Následně jsou kontaminanty z odčerpané vody odstraněny (viz dále) a vyčištěná voda může být vrácena do podzemní zásobárny, nebo vypuštěna do povrchové vody (Zheng a Wang, 2002)

V našem konkrétním případě sanační práce zahrnuje sběr plovoucí fáze ropných látek a odstraňování kontaminantu na dekontaminační stanici, zajištění zdroje vody pro promývání, hydraulickou ochranu vůči úniku aplikovaných látek mimo prostor sanace. Sanační čerpání pak probíhá v blízkosti pole B a C na stávajících HG vrtech. Vzhledem k nízké vydatnosti kolektoru je čerpání aplikováno elektrickými vzduchovými čerpadly (Slouka, 1999).

Čerpaná voda se přivádí na dvě oddělené dekontaminační stanice. Maximální předpokládané zatížení na každou sanační stanici je 1,0 l/s. Vzhledem k těkavosti a charakteru kontaminace je při čištění vod využíváno těchto technologických prvků:

- gravitační odlučovač (odstranění plovoucí fáze ropných látek)
- průtočný bioreaktor s voštinami (dočištění vod, zasakování vod do systému)
- sorpční odlučovač (odstranění zbytků plovoucí fáze ropných látek ve formě filmu, rozpuštěné látky)

Objem průtočného reaktoru je minimálně 10 m³ s aktivním objemem minimálně 9 m³ (volná hladina uvnitř nádrže). S předpokládaným nízkým průtokem vod sanační stanicí je průtočný bioreaktor provzdušňován aerátory, které jsou umístěny na dně reaktoru. Zdrojem vzduchu je dmychadlo, které je napojené na elektrickou energii. Uvnitř bioreaktoru jsou voštiny instalovány jako pevné (přichycené ke stěně) a jsou tvořeny plastovými plotnami.

S využitím této technologie se předpokládá, že ropné látky bude dekontaminační stanice odstraňovat v účinnosti lepší než 50% sanačního limitu, tzn. uhlovodíky C₁₀-C₄₀ méně než 5 mg/l. Obsah sledovaných látek je monitorován jak na vstupu, tak i na výstupu z dekontaminační stanice (Wiedemeier, 1998).

Sanační čerpání podzemních vod a jejich čištění plní dvojí úlohu: odstraňuje kontaminant a zabraňuje jeho šíření do dalších složek ekosystému. Nicméně se zdá, že tato metody má i významné nevýhody: je zdlouhavá a relativně málo účinná (Illangasekare a Reible, 2001; Bayer et al. 2002).

4.5.2. Promývání půdy

Jedná se o metodu, která pomocí vhodné kapaliny (obvykle voda v kombinaci s organickými nepolárními rozpouštědly) a mechanického působení uvolňuje kontaminanty vázané na půdních částicích. Ma a Feng (2011) zaznamenali, že voda byla schopna odstranit z půdy 11,6% motorové nafty, při použití 70% etanolu se odstranilo až 80,7% motorové nafty. Rozpouštědla jsou vybírána podle jejich schopnosti rozpouštět daný kontaminant a také podle toho, zda nemohou mít nepříznivý vliv na životní prostředí nebo zdraví člověka (Asante-Duah, 1996; Feng a kol., 2001; Urum a kol., 2003). Pokud bychom chtěli kontaminant z půdy odstranit, pak je třeba vzít v úvahu, že organické polutanty se váží především na malé částice, které můžeme tímto způsobem z půdy odstranit a kontaminant z nich poté odstranit např. spalováním.

Šetrnějším způsobem odstranění kontaminace je pak způsob, kdy se kontaminant uvolní z půdy do půdního roztoku, čímž je zpřístupněn pro biodegradaci půdními mikroorganismy. Správnou volbou povrchově aktivní látky (PAL) se dosáhne zvýšené rozpustnosti ropných látek v půdním roztoku. Vymytí povrchově aktivní látkou zároveň přispívá k rušení sorpčních vazeb a tím ke zpřístupnění polutantu pro intenzivní biodegradaci, resp. chemickou oxidaci. Jako další pozitivní důsledek aplikace povrchově aktivní látky bývá emulsifikace a pseudorozpouštění polutantu, které přispívají k jeho mobilizaci a zpřístupnění pro eliminaci jinými metodami, například sanačním čerpáním.

Na naší zájmové lokalitě tento postup probíhá následovně: Aplikace povrchově aktivní látky probíhá ve třech cyklech, přičemž každý cyklus je rozdělen na 4 aplikační kola. V první dva cykly je roztok aplikován plošně při nárazové aplikaci přes aplikační sondy a vrty. V závěrečném cyklu je roztok aplikován na místa s potřebou uvolnění přetrvávající kontaminace (Slouka, 1999).

4.5.3. Air sparging

Cílem air spargingu je saturace prostředí kyslíkem a následné uvolnění kontaminantu. Air sparging vytváří vhodné podmínky pro aerobní bioremediační procesy – dochází k rozvinutí aerobních bakteriálních kmenů schopných degradovat znečištění v horninovém prostředí. Provozem air spargingu dochází:

- 1) k mechanickému uvolňování volné fáze ropných látek do půdního roztoku;
- 2) k provzdušňování, které napomáhá ventingu (zvyšuje míru vytěkávání ropných látek do půdního vzduchu).

Aktivní bioremediační proces pak zajišťuje dostatečnou koncentraci kyslíku v půdním roztoku. Při aerobní biodegradaci ropných látek hraje kyslík zásadní roli. V biochemických reakcích půdních mikroorganismů je využíván kyslík jako terminální akceptor elektronů (Johnson 2001). Sarouhan (1997) prezentoval praktické výsledky tohoto postupu v případě půdy znečištěné motorovou naftou a benzínem na základně amerického námořnictva Salton Sea v jižní Kalifornii. Remediací byla kombinací air spargingu a dodávání dostatečného množství dostupných živin pro mikroorganismy. Tato metoda vedla k odstranění 77% ropných látek (jejich úplnou oxidací na CO₂) v průběhu 6 měsíců.

4.5.4. Venting

Cílem ventingu je odsávání kontaminovaného vzduchu a uvolněných plynů, například při air spargingu a dalších biologických a chemických způsobech degradace kontaminantů. Venting je řízené odvětrávání nesaturované zóny a jeho základní metoda in situ pro sanaci těkavých organických látek (TOL) a některých částečně těkavých látek. Technologie ventingu byla vyvinuta na základě analogie s technikami odstraňování organických látek těkajících ze zeminy, zdiva a podlahy a migrujících dovnitř budov. Principem ventingu je vakuem vyvolané proudění vzduchu, do kterého jsou strhávány plynné TOL z horninové matrice a z podzemní vody uvolňované absorbované resp. rozpuštěné TOL. Odsávaný vzduch z ventovacích vrtů a sond je zbavován na čistícím zařízení od kontaminantů.

He et al. (2009) testovali v laboratorních podmínkách účinnost ventingu na půdě kontaminované motorovou naftou a pozorovali účinnost degradace kontaminantu v rozmezí 21,6-60,1% po 5 měsících trvání tohoto opatření. Brusturean a kol. (2007) se zaměřili na míru uvolňování jednotlivých TOL, které jsou složkou benzínu a motorové nafty. Testovali toluen, směs toluenu a n-heptanu, a poté směs toluenu + n-heptanu + ethylbenzenu + m-xylynu + p-xylynu. Na základě výsledků pak zkonstruovali matematický model, který může vést k přesnému odhadu chování těchto kontaminantů během ventingu.

Tato metoda je často kombinována s bioremediací kontaminované půdy, kdy provzdušňování půdy vede k rozvoji aerobních mikroorganismů schopných degradovat uvolněné kontaminanty. Tento přístup byl zvolen i na zájmové lokalitě, kde je nejprve využita fyzikální metoda ventingu, je pak v době přechodu do bioremediační části sanace převedena do režimu bioventingu, kdy je mírným odsáváním vzduchu podpořena biodegradace kontaminantů (Jelínek, 1999).

4.5.5. ISCO – *in situ* chemická oxidace (Fentonovo činidlo)

Vzhledem k navázání kontaminace jak na saturovanou tak nesaturovanou zónu horninového prostředí a přítomnosti jak rozpuštěného znečištění, tak filmu na hladině podzemní vody, je potřebné sanaci horninového prostředí intenzifikovat a současně také kombinovat. Z tohoto důvodu bude částečně sanováno také pomocí *in situ* chemických „oxidačních“ metod. Cílem provádění *in situ* chemické oxidace je tedy uvolnění a zpřístupnění kontaminantu pro biologické dočištění a dočištění obtížně sanovatelných míst.

Princip chemické oxidace *in situ* (ISCO) spočívá v infiltraci vodného roztoku oxidačního činidla do horninového prostředí tak, aby zde došlo k destrukci kontaminujících látek rozpuštěných v podzemní vodě, nasorbovaných v horninovém prostředí nebo přítomných ve formě zbytkové volné fáze (Camenzuli a Friedman, 2015). Zdaleka nejčastěji je metoda ISCO uváděna v souvislosti se sanací saturované zóny kontaminované chlorovanými etheny. Mezi dalšími cílovými kontaminanty jsou často zmiňovány benzen, toluen, ethylbenzen a xyleny, polyaromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, chlorbenzeny a další (Kubal a kol. 2008).

Pro chemickou oxidaci je možno použít různá oxidační činidla. Fentonovo činidlo je směs peroxidu vodíku a železnatých iontů ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$) v kyselém prostředí a v této souvislosti je uváděno nejčastěji. Organické kyseliny obsahující funkční skupiny a tvořící komplexy s kovy jsou často přidávány do směsi (vzniká tím modifikované Fentonovo činidlo). Použití kyselin zabraňuje vysrážení železa a celkově zabraňují snížení efektivity radikálové reakce. Intenzitu Fentonovy reakce je možné ovlivnit přidávkem stabilizátorů, přičemž tímto krokem vzniká tzv. modifikované Fentonovo činidlo. Stabilizátory jsou různé organické i anorganické látky, jejichž přítomnost ve směsi vede ke zpomalení reakce.

Kyselina citrónová se s výhodou používá jako organický stabilizátor. Díky třem karboxylovým skupinám a jedné hydroxylové skupině může až 4 násobně disociovat a tvoří tak komplexy s ionty železa. Na základě pilotních zkoušek bylo zjištěno, že aplikace 5% peroxidu za přítomnosti zdroje železa a kyseliny citronové v koncentraci 10 g.l^{-1} dochází k nežádoucímu rozbíjení jílových minerálů a k následnému ucpávání aplikačních vrtů. Z tohoto důvodu je nutné aplikovat peroxid vodíku ve zředěné formě (nejlépe 1 až 2% roztok) za přítomnosti stabilizátoru kyseliny citronové (10 g.l^{-1}) a síranu železnatého ($0,1 \text{ g.l}^{-1}$) (Ferguson, 2004).

4.5.6. Aktivní bioremediace *in situ*

Aktivní bioremediace *in situ* je nosnou technologií k odstranění rozpuštěné formy kontaminantu. Bioremediační technologie využívá aktivity konkrétního alochtonního mikroorganismu, který je schopen degradovat tento kontaminant a přeměnit ho na sloučeniny, kterou nejsou škodlivé životnímu prostředí ani člověku. Vlastní biotechnologie spočívá ve stimulaci těchto degradujících mikroorganismů, které využívají přítomné znečištění jako

jediný zdroj uhlíku a energie ve všech místech sanované lokality pro vlastní růst a rozvoj. Tyto vybrané mikroorganismy jsou pomnoženy/stimulovány a následně jako inokulum aplikovány do sanovaných prostor. Marchal et al. (2003) pozorovali vysokou biodegradabilitu benzínu (96%), ale u motorové nafty to bylo jen mezi 60 a 73%. Pro účinnost bioremediace se ukazuje jako rozhodující zastoupení jednotlivých uhlovodíků.

Aktivně řízenou bioremediační činností dochází k odbourávání (biologickému rozložení) ropných látek. Účinnost biodegradace je ovlivněna řadou environmentálních a biologických faktorů, jako je pH půdy, teplota, zásobenost kyslíkem, obsah živin, eúst a schopnost přežití degradujících mikroorganismů a dostupnost kontaminantu pro tyto organismy. Je tedy nutné vytvořit a udržovat na lokalitě optimální podmínky, tj. dostatek kyslíku a živin pro zdárný průběh biodegradace. Na počátku prací je nutná rychlá stimulace biodegradace - dochází tak k minimalizaci lag-fáze biodegradace a tím rychlému startu bioremediačních procesů. Biodegradace ropných uhlovodíků zpravidla trvá déle než fyzikální či chemické metody sanace, ale vedou k úplné degradaci kontaminantu (Koshlaf a Ball, 2017).

Jednou ze základních podmínek úspěšné bioremediační činnosti je tedy dostatek základních živin - dusíku a fosforu. Přítomnost dusíku a fosforu je důležitá zejména při zahájení bioremediační činnosti, kdy dochází k výraznému nárůstu počtu mikroorganismů. Později se jejich potřeba mění, snižuje se potřeba dusíku a zvyšuje potřeba fosforu. Významné zvýšení účinnosti biodegradace motorové nafty v půdě při aplikaci ventingu a dostatečného zásobování živinami popsali například Moller a kol. (1996).

Na zájmové lokalitě je kapalné inokulum (roztok vybraných degradujících mikroorganismů a roztoky živin) do sanovaných vrstev saturované a nesaturované zóny aplikována prostřednictvím systému aplikačních sond a vrtů při odstávce air-spargingu. K přípravě aplikačních roztoků je využita přečištěná voda ze sanačních technologií. Požadavky na aplikovaná množství vyplývají z monitoringu - dává se pouze takové množství živin, které mikroorganismy v rámci řízené bioremediační činnosti spotřebují (nedochází tedy k negativnímu ovlivnění životního prostředí a zatížení prostředí cizorodými látkami).

Pro nejefektivnější a nejrychlejší rozklad ropných látek je nutno v horninovém prostředí zajistit dostatek kyslíku. Kyslík vstupuje do reakce jako terminální akceptor elektronů (bakterie vdechují O_2 , rozkládají ropné látky a vydechují CO_2). V případě nedostatku O_2 mohou být při sanaci využívány náhradní akceptory elektronů $NO_3^- \gg MnIV \gg FeIII \gg SO_4^{2-}$; tyto jsou však jednoznačně méně efektivní pro pomalejší průběh degradace. Z těchto důvodů je třeba kontaminované místa dostatečně saturovat vzdušným kyslíkem. Ten je na zájmové lokalitě do sanovaných vrstev aplikován dmychadlem prostřednictvím hlubších air-spargingových sond v centru sanované oblasti. V rámci biotechnologie je do horninového prostředí aplikováno inokulum alochtonních mikroorganismů schopných degradovat ropné látky.

Inokulum obsahuje pouze vybrané otestované mikrobiální kmeny, které patří dle hodnotících kritérií WHO do skupiny s malou pravděpodobností vyvolat onemocnění u lidí nebo zvířat. Celkové množství inokula aplikovaného do horninového prostředí vlastní bioremediace *in situ* dosahuje cca 10% ošetřovaného prostředí a je aplikováno etapovitě, resp. dle vývoje znečištění a také klimatických podmínek. Větší objemy jsou do horninového prostředí přivedeny častější aplikací přes léto, menší naopak přes chladnější měsíce roku. Obdobně jsou aplikovány i potřebné roztoky živin (Jelínek, 1999).

5. Materiál a metody

5.1. Odber vzorků

Na lokalitě byla vybrána dvě místa pro odběr vzorků tak, že jedna lokalita byla v méně znečištěné části území, kde se provádí bakteriální inokulace druhá byla v níže položené a kontaminovanější části území, kde se zatím provádějí jen fyzikálně-chemické remedie. Sestavila se vrtná souprava (Makita HM1812 Bourací kladivo s AVT 72,8J 2000W), která byla poháněna benzínovou centrálou. Celková hloubka vrtu se pohybovala v rozmezí 5-6 m. Při každém vytažení nástavce se zeminou byl sloupec zeminy rozdělen na úseky po 25 cm. Sterilním nožem byla odstraněna svrchní část zeminy a ze středu sloupce byly do plastových uzavíratelných zkumavek o objemu 1,5 ml odebrány 3 alikvóty vzorku. Každý odběr byl pečlivě označen značkou pro dané místo a hloubku odběru a uložen do doby analýzy při teplotě -81°C. Tyto vzorky byly určeny pro mikrobiologické a enzymatické analýzy. Zbývající zemina z jednotlivých segmentů byla rozdělena na dvě části. Podvzorek určený pro stanovení fyzikálně-chemických vlastností půdy byl vysušen při laboratorní teplotě a vzorek určený pro stanovení reziduí ropných uhlovodíků byl zmrazen při teplotě -20°C a následně lyofilizován. Vzorky vysušené na vzduchu i lyofilizované byly před vlastní analýzou přesáty přes síto o velikosti 2 mm a ručně homogenizovány. Vzorky byly odebrány 9. 5. 2019 pro stanovení před biologickými a fyzikálně-chemickými úpravami a 14. 10. 2019, tj. 3 měsíce po provedených úpravách.

5.2. Stanovení pH

Pro stanovení výměnné půdní reakce bylo do PVC lahve naváženo 10 g homogenizované zeminy. K navážce byl přidán 0,01 mol.L⁻¹ roztok CaCl₂ v celkovém množství 50 ml. Takto připravená směs byla promíchávána na třepačce po dobu 60 minut. Po intenzivním protřepání se vzorky nechaly 15 minut ustálit a následně byla na pH-metru změřena hodnota pH za pomoci skleněné elektrody.

5.3. Stanovení kationtové výměnné kapacity

Kationtová výměnná kapacita byla stanovena dle metody ISO 11260. Do třepacích PE lahvíček s kulatým dnem naváženy 2 g zeminy a přidáno 20 ml 0,1 mol.L⁻¹ BaCl₂. Reakční směs byla 2 hodiny promíchávána na třepačce. Následně byly vzorky umístěny do laboratorní centrifugy a po dobu 10 minut centrifugovány při 3000 otáčkách za minutu. Supernatant byl

převeden do plastových zkumavek. Koncentrace kationtů (Ca, Mg, K, Na, Fe, Mn a Al) v roztoku byla stanovena pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP – OES, Agilent 720, Agilent Technologies Inc., USA).

5.4. Stanovení celkového obsahu C a N v půdě

Celkový obsah uhlíku a dusíku v půdě byl stanoven s využitím přístroje CHNOS Vario MACRO cube (ElementarAnalysensysteme GmbH, Německo). V tomto přístroji je nejprve 500 mg vzorku spáleno v uzavřeném systému katalytické peci a následně je obsah C a N stanoven s využitím teplotně vodivostního detektoru.

5.5. Rezidua ropných uhlovodíků

Množství přibližně 15 g homogenizované půdy bylo naváženo do skleněné baňky se zábrusem a zalito 30 ml extrakční směsí (n-hexan a aceton v poměru 2:1). Baňky s reakční směsí pak byly umístěny do ultrazvukové lázně po dobu 30 minut při teplotě 25 °C. Následně byly vzorky třepány na orbitální třepačce po dobu 60 minut při 170 otáčkách za minutu. Následně bylo k reakční směsi přidáno 50 ml demineralizované vody k rozdělení hexanové a acetonové fáze po dobu 10 minut. Z horní hexanové fáze, kam se vyextrahují analyty, byl odebrán 1 ml do tmavé skleněné vialky a uzavřen víčkem se septem, který se využívá jako přímý vzorek pro stanovení C₁₀-C₄₀ v extraktu (U.S. EPA 3550C). Stanovení uhlovodíků C₁₀-C₄₀ bylo provedeno plynovou chromatografií (GC) s plamenově-ionizačním detektorem (FID) dle technické normy ČSN EN 14039 v akreditované laboratoři ALS Czech Republic, s.r.o. Byly stanoveny také obsahy BTEX, ale ve všech případech byly naměřené hodnoty pod mezí stanovitelnosti, která je pro benzen 0.010 mg/kg suš., pro toluen 0.030 mg/kg suš., pro ethylbenzen 0.020 mg/kg suš., pro meta- & para-xylen 0.020 mg/kg suš. a pro orto-xylen 0.010 mg/kg suš.

5.6. Stanovení enzymové aktivity

Aktivita enzymů β -glukosidázy, fosfatázy, β -xylosidázy, chitinázy, celobiohydrolázy, β -galaktosidázy, α -glukosidázy, β -manosidázy, arylsulfatázy, a lipázy byla stanovena spektrofotometricky s využitím fluorescenčně značených substrátů. Jako fluorescenční molekula byl použit 4-methylumbellyferol (MUF). Jednotlivé substráty MUF, které byly použity pro stanovení aktivit konkrétních enzymů, jsou následující:

| | |
|------------------------|--|
| β -glukosidáza: | 2,75 mM 4-methylumbellyferyl- β -D- glukopyranosid (MUFG) |
| kyselá fosfatáza: | 2,75 mM 4-methylumbellyferyl-fosfát (MUFP) |
| β -xylosidáza: | 2,50 mM 4-methylumbellyferyl- β -D-xylopyranosid (MUFX) |
| chitináza: | 1,00 mM 4-methylumbellyferyl-N-acetylglukosaminid (MUFN) |
| celobiohydroláza: | 2,50 mM 4-methylumbellyferyl-N-cellobiopyranosid (MUFC) |
| β -galaktosidáza | 2,50 mM 4-methylumbellyferyl- β -D-galaktopyranosid (MUFL) |
| α -glukosidáza | 2,50 mM 4-methylumbellyferyl- α -D-glykosopyranosid (MUFaG) |
| lipáza | 2,50 mM 4-methylumbellyferyl-kaprylát (MUFY) |

Pro stanovení potenciálních aktivity enzymů byly použity suspenze tvořené 0,25 g lyofilizovaného vzorku v 50 ml 50 mM acetátového pufru s pH 5 (smícháme 2,78g octanu sodného + 11 destilované vody + 938 µl kyseliny octové). Takto připravené vzorky byly po nezbytnou dobu uchovávány při teplotě do 4 °C. Do mikrotitrační destičky byly napipetovány jednotlivé MUF substráty a kalibrační roztoky MUF standardu v předem daném ředění. K substrátům bylo do jamek napipetováno 200 µl homogenizované suspenze vzorku. Do pravé části destičky byly umístěny kalibrační řady, ve kterých postupně vzrůstala koncentrace MUF. Fluorescence byla měřena pomocí mikrodestičkového analyzátoru (Infinite F200, TECAN, Switzerland) s excitací 360 nm a emisí 465 nm. (Baldrian, P., 2009)

5.7. Extrakce DNA

5.7.1. Fenol-chloroformová extrakce s CTAB a srážením isopropanolem

Tato metoda vychází z protokolu SK (Sagová-Marečková et al. 2008). Byla použita pro vzorky z vrtu AS7. Pro extrakci DNA z odebraných vzorků si připravíme do rozbíjecí ependorfky skleněné kuličky, 250 mg kuliček o průměru 0,1 mm a 250 mg kuliček o průměru 0,5 mm. Do ependorfky s kuličkami navážíme 0,5g vzorku půdy. Přidáme 600 µl extrakčního pufru. Přidáme 150 µl fenolu a 150 µl chloroformu smíchaného s isoamylalkoholem v poměru 25v:24v:1v. Vložíme do Bead Beater (3110 BX Mini-NeadBeater-1, BioSpec, Oklahoma, USA) na 90 sekund na 2 500 otáček. Vložíme do centrifugy (Centrifuge Eppendorf 5418, Eppendorf, Německo) na 2 minuty při 12 000 otáček. Odpipetujeme supernatant do nové ependorfky o velikosti 2 ml. No ependorfky s kuličkami a se zeminou znovu přidáme 300 µl pufru. Vložíme do Bead Beateru na 30 sekund na 2 500 otáček. Vložíme do centrifugy a na 2 minuty při 12 000 otáček. Odpipetujeme supernatant do stejné ependorfky jako v předchozím kroku. Ependorfku s kuličkami vložíme do odpadu, dále s ní nepracujeme. Do odpipetovaného supernatantu přidáme polovinu objemu supernatantu chloroformu s isoamylalkoholem a polovinu objemu supernatantu phenolu. Promícháme otočením ependorfky. Vložíme do centrifugy na 5 minut při 6 000 otáček. Odpipetujeme supernatant do nové ependorfky a předchozí vyhodíme do odpadu. Do supernatantu přidáme chloroform s isoamylalkoholem ve stejném objemu jako máme supernatant. Promícháme otočením ependorfky. Vložíme do centrifugy na 5 minut při 6 000 otáček. Odpipetujeme supernatant do nové ependorfky a předchozí vyhodíme do odpadu. Do supernatantu přidáme 3/7 našeho objemu 5M NaCl. Přidáme 0,1 našeho objemu 10% CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) rozehřátého na 65°C. Promícháme otočením ependorfky. Ependorfku vložíme do předehřátého termobločku na 65°C na 30 minut. Rozehřáté ependorfky zchladíme pod studenou tekoucí vodou na 20°C. Přidáme chloroform s isoamylalkoholem ve stejném množství jako máme objem. Promícháme otočením ependorfky. Vložíme do centrifugy na 15 minut při 4 500 otáček. Odpipetujeme supernatant do nové ependorfky a přidáme 0,1 našeho objemu 3M NaAc. Přidáme 0,6 našeho objemu isopropanolu. Promícháme otočením ependorfky a necháme 30 minut odstát v pokojové teplotě. Vložíme do vychlazené centrifugy 4°C na 20 minut při 10 000 otáček. Vylejeme

supernatant a ponecháme si peletku, která na spodu ependorfky. Přidáme 70% EtOH. Vložíme do vychlazené centrifugy (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Německo) 4°C na 5 minut při 10 000 otáček. Odpipetujeme opatrně EtOH a ponecháme si peletku. Otevřenou ependorfku s peletkou vložíme do vakuové odparky (CentriVap, Missouri, USA) na vysušení při 40°C 8-10 minut. Do ependorfky přidáme 70 µl H₂O. Vložíme do termobločku na 1 hodinu při 65°C. Takto máme připravené DNA pro ověření na elektroforézu. (Sagová-Marečková et al. 2008)

5.7.2. Inovovaný postup extrakce DNA

Tato metoda byla použita pro vzorky z vrtu AS26. Pro extrakci DNA z odebraných vzorků si připravíme do rozbíjecí ependorfky skleněné kuličky, 250 mg kuliček o průměru 0,1 mm a 250 mg kuliček o průměru 0,5 mm. Do ependorfky s kuličkami navážíme 0,5 g vzorku půdy. Přidáme 1500 µl Lysis buffer, který se skládá ze 6 µl tween, 3 g SDS, 0,511 g Na₂HPO₄, 20 ml dH₂O. Krátce vortexujeme a inkubujeme na 30 minut při 70°C. Vložíme do Bead Beater na 3 x 90 sekund na 2 500 otáček. Přidáme 3 µl RNasa A, krátce vortexujeme a inkubujeme na 30 minut při 37 °C. Přidáme 7,5 µl proteinasy K, krátce vortexujeme a vložíme do rozehřátého bločku na 30 minut při 65°C. Ependorfku vložíme do centrifugy na 15 minut při 10 000 otáček. Odstředěný supernatant přepipetujeme do nové 2 ml ependorfky a inkubujeme na ledu 1,5 hodiny. V inkubovaných vzorcích se nám vysrážela bílkovina, vzorky vložíme do vychlazené 4°C centrifugy na 30 minut. Ze vzorků odpipetujeme supernatant a rozdělíme ho do dvou nových 2 ml ependorfech. Přidáme 0,1 ml 3M octanu sodného podle objemu našeho vzorku. Přidáme 1 µl GenEluteLPA a 2,5 objemu čistého etanolu. Vzorky necháme v mrazáku odstát 20 minut, poté vložíme do centrifugy na 10 minut při 10 000 otáček. Odpipetujeme supernatant a ponecháme vzniklou peletku, opláchneme 50 µl 70% etanolem a vložíme do centrifugy na 3 minuty. Odpipetujeme opatrně EtOH a ponecháme si peletku. Otevřenou ependorfku s peletkou vložíme do vakuové odparky (CentriVap, Missouri, USA) na vysušení při 40°C 8-10 minut. Po vysušení přidáme do ependorfky 50 µl TE⁻¹ a necháme peletku rozpustit v termobločku 1 hodinu při 65°C. Takto máme připravené DNA pro ověření na elektroforézu (Brennerová et al. 2009, Selenská et al. 1991, Selenská-Pobell et al. 2001).

5.8. Elektroforéza

Na přípravu 1% agaru budeme potřebovat 50 ml gelu, který obsahuje 50 ml TAE pufru + 0,5 g agarosy. V mikrovlnné troubě lehce rozpustíme na 2,5 minuty. Přidáme 5 µl SYBR Safe DNA Gel Stain (v DMSO v poměru 1v:9v). Nalijeme do připravené vaničky s hřebínky pro aplikaci vzorku, vytvoří nám jamky. Gel necháme ve vaničce ztuhnout. Po ztuhnutí vložíme vaničku do elektroforézy a vyndáme hřebínky. Celý gel zalijeme TAE puftrem (40 mM Tris-acetátu + 1 mM kyseliny etylendiamintetraoctové (EDTA; pH 8) (EDTA (2 mM): 0,074 g Na₂EDTA.2H₂O + 50 ml H₂O), tak, aby byl ponořený. Na parafín si připravíme vzorky 2 µl vzorku + 3 µl nanášecího pufru. Vzorek s nanášecím puftrem smícháme a přepipetujeme do připravených jamek v gelu. Zapneme elektroforézu na 95 V, cca 95 mA. Elektroforézu necháme zapnutou 15 minut, poté opatrně vyndáme vaničku s gelem. Gel detekujeme v UV

transluminátoru pomocí programu GeneSnap 7.12, a vyfotografujeme jej. Zde můžeme vidět, zda se nám izolace vzorku povedla.

5.9. Přečištění extrahované DNA

5.9.1. Hepes a CaCl₂

Z extrahovaného vzorku si odebereme 30 µl do ependorfky. Nejprve přes membránový filtr vysterilizujeme Hepes a CaCl₂, přidáme 3 µl Hepes, poté 3 µl CaCl₂ do vzorku DNA. Necháme 30 minut v pokojové teplotě reagovat. Z krabičky Gene Read Size Selection Kit si vypůjčíme Buffer SB1. Bufferu SB1 přidáme do vzorku DNA 4x více našeho objemu, tudíž 144 µl. Tento mix přepipetujeme do vychlazené MinElute zkumavky a centrifugujeme na maximální otáčky 1 minutu. Vylijeme spodní tekutinu, které nám zůstala ve spodním dílu zkumavky. Do vrchního fialového dílu zkumavky s filtrem přidáme 700 µl vychlazeného 80 % etanolu pět centrifugujeme na maximální výkon 1 minutu. Spodní část opět vylijeme a znovu přidáme etanol, centrifugujeme a vylijeme spodní tekutinu. Ještě jednou centrifugujeme na maximální rychlost 1 minutu. Fialový vršek přendáme do nové 1,5 ependorfky a snažíme se už zabránit kontaktu filtru s etanolem. Do fialové části přidáme 30 µl předehřáté vyautoklávované dH₂O na 37 °C. Fialový vršek zavřeme a necháme 2 minuty stát. Vložíme do centrifugy na maximální otáčky 1 minutu. Spodní část si ponecháme a fialový vršek vyhodíme. Ve spodní části máme přečištěnou DNA. Přečištěnou DNA vložíme do elektroforézy pro kontrolu.

5.9.2. Geneclean Turbo kit

Z extrahovaného vzorku DNA si odebereme 30 µl do ependorfky, přidáme pětinasobek roztoku Turbo GNomic Salt Solution. Promícháme poklepáním na spodní část ependorfky. Vezmeme čistou ependorfku a vložíme do ní kolonku s filtrem, do které přepipetujeme vzniklou směs. Vložíme do centrifugy na maximální otáčky 5 sekund. Vylijeme spodní tekutinu, která nám zůstala ve spodním dílu zkumavky. Kolonku s filtrem vzátíme do zkumavky a připipetujeme 500 µl Wash solution s 99 % ethanolem a centrifugujeme na maximální otáčky 5 sekund. Spodní tekutinu vylijeme a centrifugujeme znovu. Kolonku s filtrem vložíme do nové zkumavky a přidáme 30 µl předehřáté vyautoklávované dH₂O na 37 °C. Kolonku zavřeme a necháme 5 minut stát. Vložíme do centrifugy na maximální otáčky 1 minutu. Spodní část si ponecháme a kolonku vyhodíme. Ve spodní části máme přečištěnou DNA. Přečištěnou DNA vložíme do elektroforézy pro kontrolu.

5.10. PCR amplifikace genu pro 16S rRNA

Pro získání PCR produktu musíme nejprve vysvítit laminární box a plochu, na které budeme připravovat Master mix UV světlem pro sterilizaci na 30 minut. Po sterilizaci plochy připravíme mix viz. Tabulka 1.

Tab. 1. Master mix GoTag

| GoTag | |
|---------------------|------------------------------------|
| Pufř | 5 μ l |
| DMSO 5% | 1,25 μ l |
| dNTP | 0,5 μ l |
| Polymeráza GoTag | 0,125 μ l |
| Primer CS1 – 515 PF | 1 μ l (1:10 H ₂ O) |
| Primer CS2 – 806 aR | 1 μ l (1:10 H ₂ O) |
| MgCl ₂ | 3 μ l |
| DNA | Podle koncentrace na elektroforéze |
| dH ₂ O | Doplňení mixu do 25 μ l |

Tab. 2. Master mix TaKara

| TaKara | |
|---------------------|------------------------------------|
| Pufř | 2 μ l |
| DMSO 5% | 1,25 μ l |
| dNTP | 2 μ l |
| Polymeráza TaKara | 0,125 μ l |
| Primer CS1 – 515 PF | 1 μ l (1:10 H ₂ O) |
| Primer CS2 – 806 aR | 1 μ l (1:10 H ₂ O) |
| MgCl ₂ | 1 μ l |
| DNA | Podle koncentrace na elektroforéze |
| dH ₂ O | Doplňení mixu do 25 μ l |

Podle výraznosti DNA na gelu přidáváme odhadnuté množství DNA do premixu. Čím je DNA na gelu výraznější, tím méně přidáváme. Doplnění dH₂O do mixu si vypočítáme podle množství látek v mixu. Sečteme veškeré přidané látky + např. 2 μ l DNA (vždy počítáme podle nejvíce přidaného DNA)

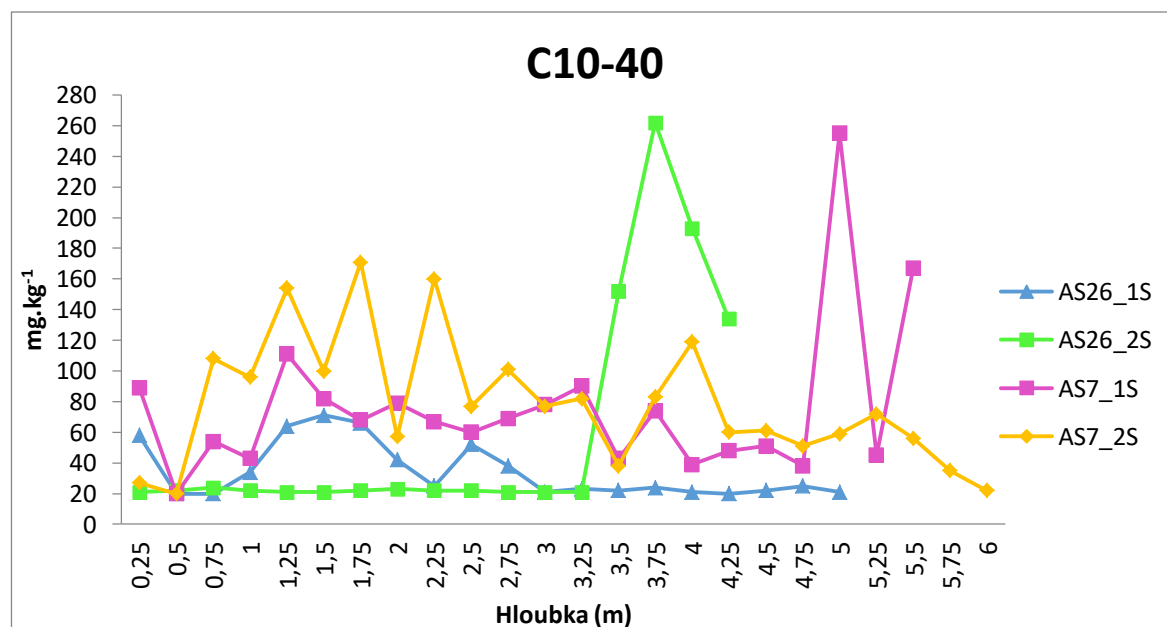
Například: Máme 4 vzorky a budeme používat polymerázu GoTag. Všechny látky si vynásobíme počtem vzorků plus dva vzorky navíc, pro jistotu (5*6, 1,25*6, 0,5*6, 0,125*6, 1*6, 1*6, 3*6). Všechny vynásobené látky sečteme (30+7,5+3+0,75+6+6+18). Tento součet vydělíme počtem vzorku (71,25/6), přičteme maximální množství přidané DNA, v našem příkladu 2 μ l (11,875+2), odečteme od požadovaného množství 25 μ l (25-13,875), vynásobíme počtem vzorku (11,125*6=66,75) výsledkem máme kolik přidáme dH₂O do směsi při 4 vzorcích + 2 náhradní.

Připravený premix si rozpipetujeme do ependorfek 23 μ l, poté ve Flowboxu přidáme 2 μ l vzorku DNA. Pokud budeme přidávat pouze 1 μ l DNA, musíme přidat do ependorfky 1 μ l dH₂O. Takto připravené vzorky vložíme do thermocykleru (C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Kalifornie, USA) a spustíme program CS1CS2GO. Po proběhnutí programu zkontrolujeme vzorky na elektroforéze, zda se nám PCR produkt vydařil.

6. Výsledky

6.1. Obsahy reziduí ropných uhlovodíků

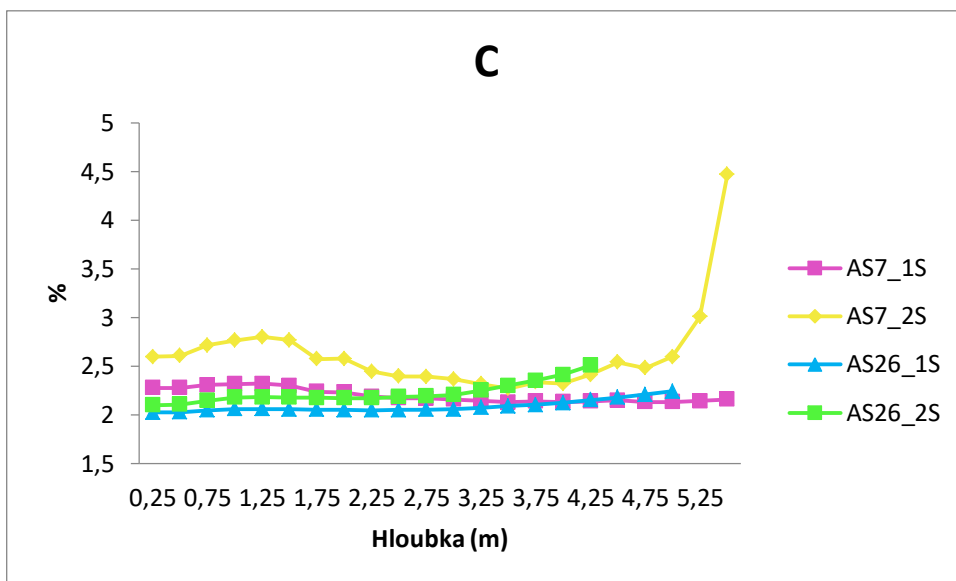
Hlubkový vrt AS7_1S před inokulací bakteriemi a hlubkový vrt AS26_2S po aplikaci Fentonova činidla mají jako jediné extrémní hodnoty dosahující 255 mg.kg^{-1} a 262 mg.kg^{-1} (Graf 1). Vrt AS26_2S po ošetření Fentonovým činidlem má až po moment extrémního nárůstu víceméně neměnné hodnoty. Oproti tomu hlubkový vrt AS7_1S před inokulací bakteriemi má neustále střídavé hodnoty. Hlubkové vrty po ošetření bakteriemi AS7_2S a vrt před aplikací Fentonova činidla AS26_1S mají naměřené klesající hodnoty, přičemž vrt AS26_1S před aplikací Fentonova činidla od hodnoty 21 mg.kg^{-1} ve 3 m již nevykazuje významné změny. Hlubkový vrt AS7_2S po ošetření bakteriemi dosahuje navzdory nejvyšším naměřeným výkyvům po celém profilu nejvyšší hodnoty obsahu ropných reziduí.



Graf 1. Obsahy ropných uhlovodíků v půdě v jednotlivých vrtech v závislosti na hloubce profilu

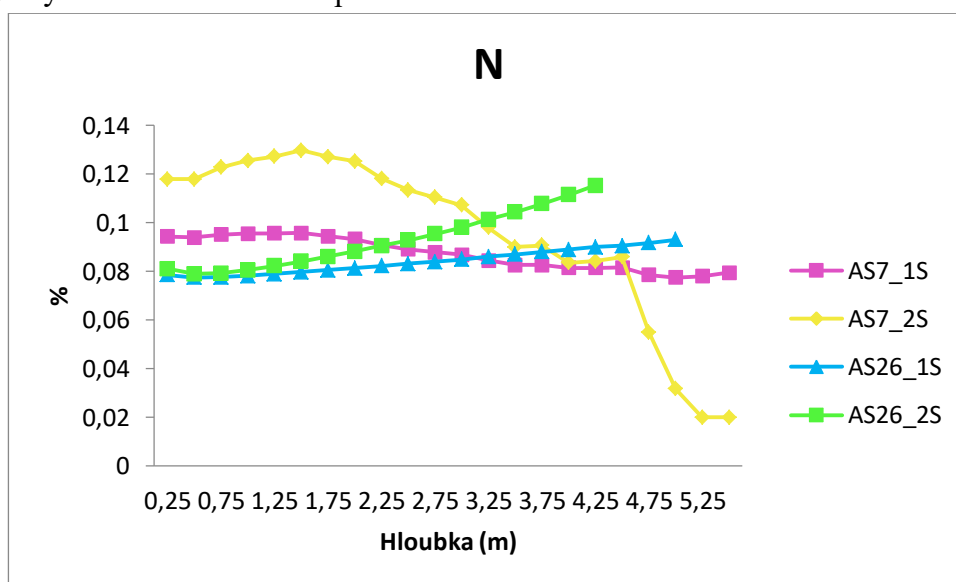
6.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy

Celkový obsah uhlíku je v hlubkových vrtech před inokulací bakteriemi AS7_1S, před a po ošetření Fentonovým činidlem AS26 velmi podobná. Hodnoty se pohybují kolem 2 %, ale u hlubkového vrtu po ošetření Fentonovým činidlem AS26_2S nastává zlom v 2,5 m, kdy se hodnoty začnou navyšovat až do 2,5 % (Graf 2). Hlubkový vrt po ošetření bakteriemi AS7_2S se od ostatních vrtů výrazněji liší. Hodnoty začnou klesat v 1,5 m a postupně klesnou na hodnotu 2,27 % v 3,5 m. V této hloubce nastane výrazný nárůst obsahu uhlíku až na 4,47 %.



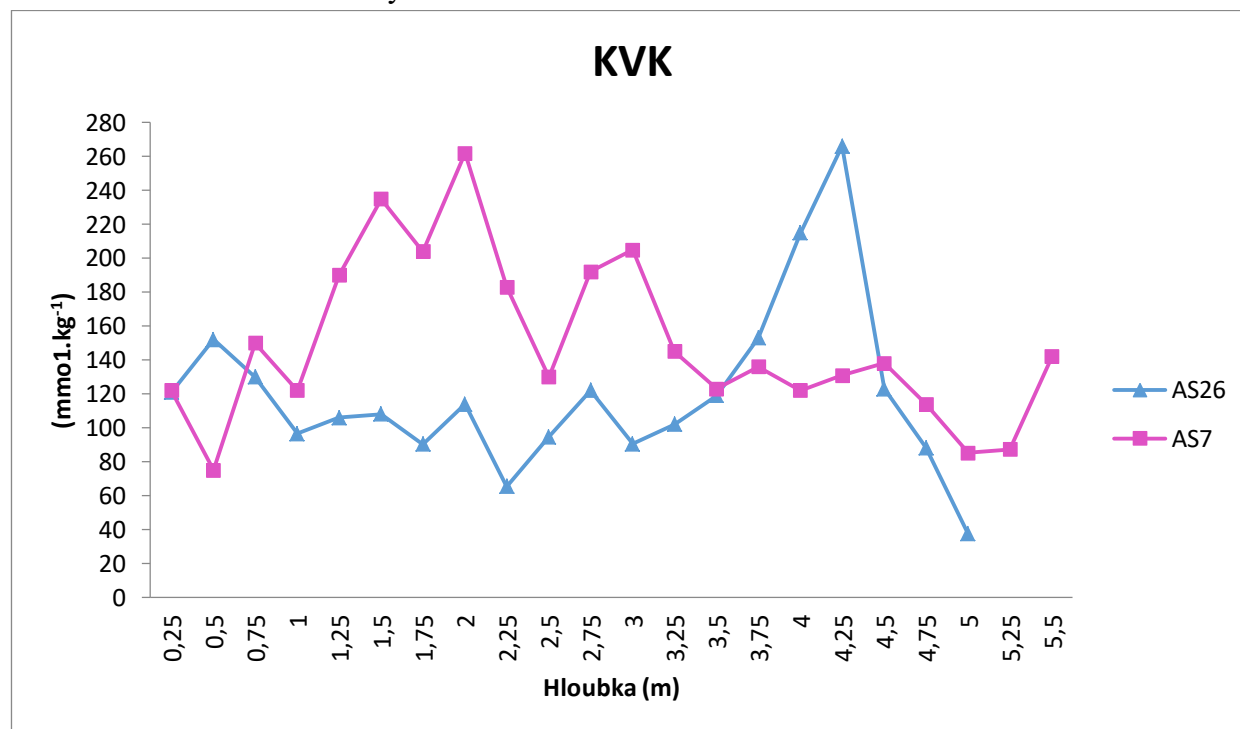
Graf 2. Celkové obsahy uhlíku v půdě v jednotlivých vrtech v závislosti na hĺoubce profilu

Po ošetření bakteriemi u hĺoubkového vrtu AS7_2S dochází s narůstající hĺoubkou k výrazné změně naměřených hodnot celkového obsahu dusíku (Graf 3), přičemž v hĺoubce 4,5 m dochází k významnému poklesu obsahu dusíku. V hĺoubce 5,25 m dochází k ustálení naměřených hodnot pro bakterie AS7_2S. V hĺoubkovém vrtu AS26_1S se naměřené hodnoty pohybují v rozmezí 0,07 – 0,09, zde nedochází k významným změnám. Před inokulací bakteriemi u hĺoubkového vrtu AS7_1S mají naměřené hodnoty opačný trend než u hĺoubkového vrtu AS26_1S před aplikací Fentonovým činidlem. S roustoucí hĺoubkou obsah dusíku klesá v rozmezí 0,09 – 0,07. Po ošetření Fentonovým činidlem dochází se zvyšující se hĺoubkou zvýšení obsahu dusíku v půdě.



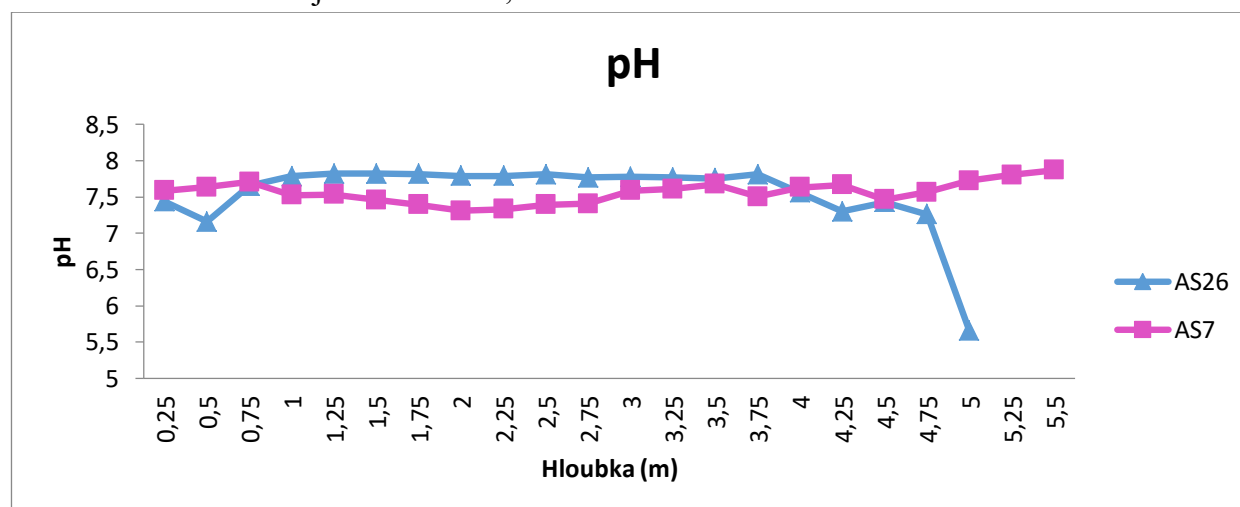
Graf 3: Celkové obsahy dusíku v půdě v jednotlivých vrtech v závislosti na hĺoubce profilu

Kationtová výměnná kapacita je vyšší v hloubkovém vrtu s bakteriemi AS7, u kterého naměřené hodnoty dosahují maximálních hodnot 262 mmol.kg^{-1} v hloubce 2 m (Graf 4). Nejnižší hodnoty v tomto vrtu byly $0,75 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ve 2 m. V hloubkovém vrtu s Fentonovým činidlem AS26 je naměřená nižší aktivita než v hloubkovém vrtu s bakteriemi AS7, přesto zde v jednom bodu dosáhla hodnota 266 mmol.kg^{-1} v hloubce 4,25 m. Kationtová výměnná kapacita klesla až na nejnižší hodnotu $37,4 \text{ mmol.kg}^{-1}$ v hloubce 5 m u hloubkového vrtu s Fentonovým činidlem AS26.

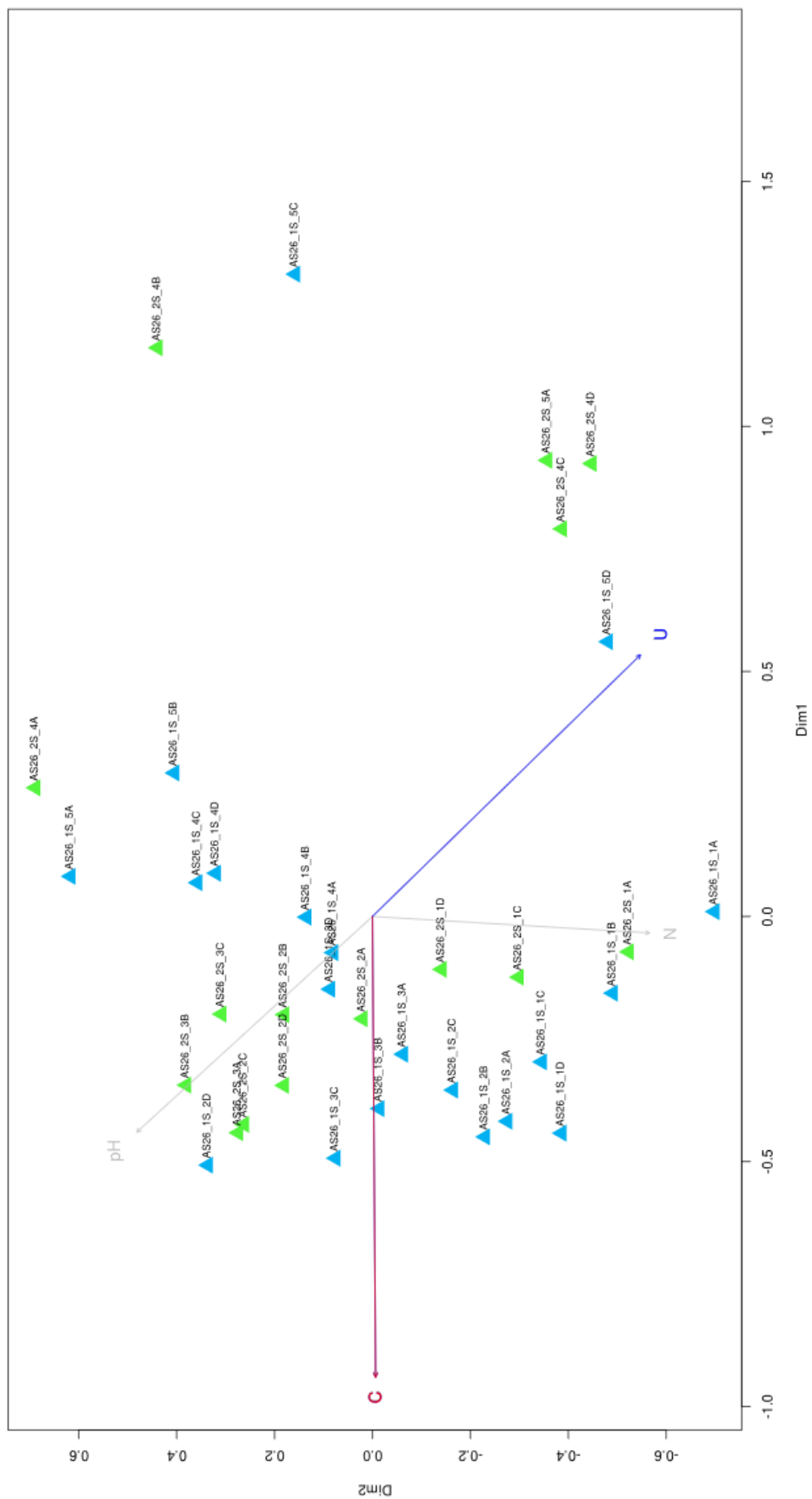


Graf 4. Kationtová výměnná kapacita půdy (KVK) v jednotlivých vrtech v závislosti na hloubce profilu

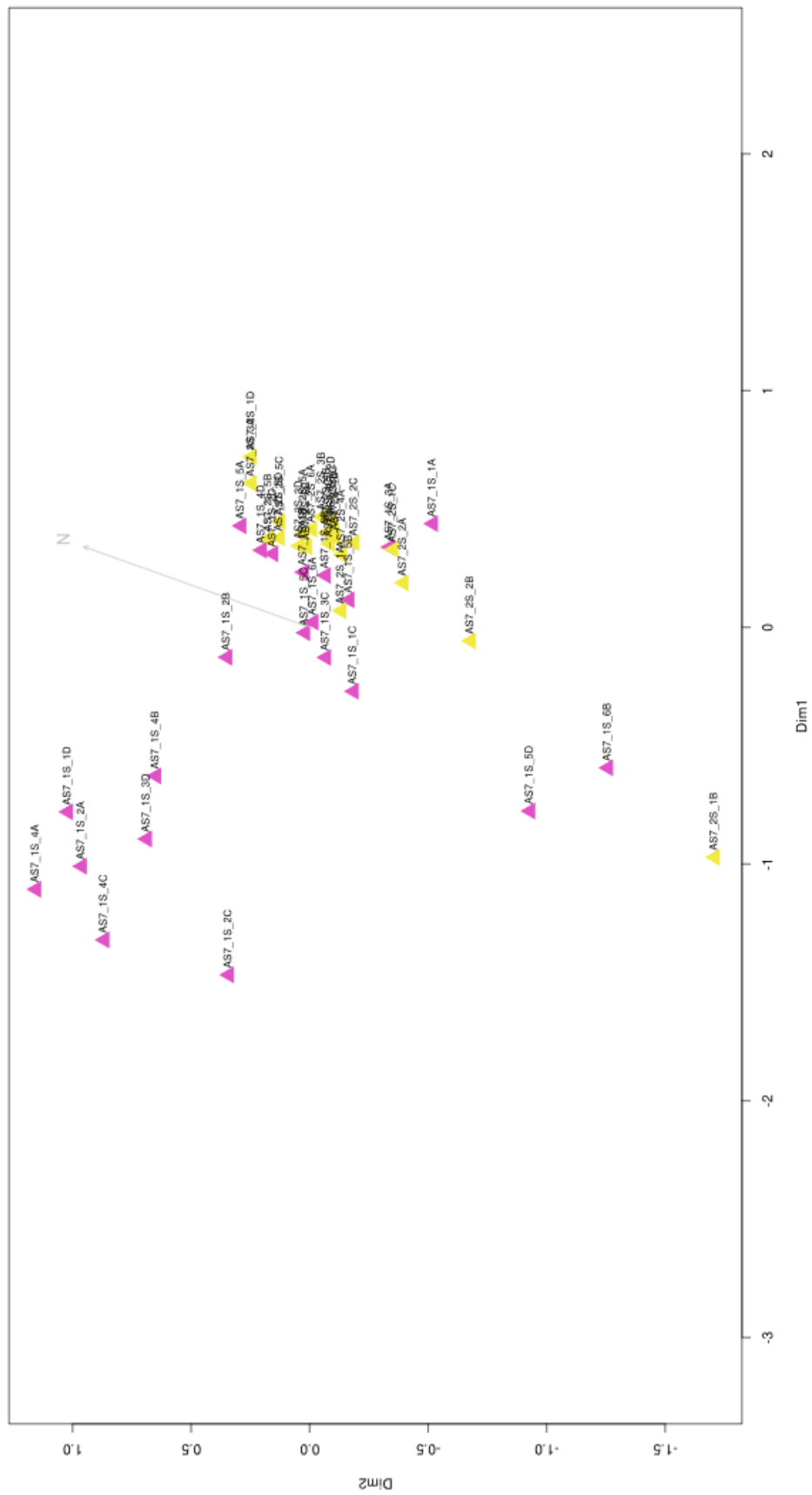
Naměřené pH v hloubkových vrtech se od sebe příliš neliší (Graf 5). Naměřené hodnoty dosahovaly zhruba 7,5. Ve vrtu před aplikací Fentonova činidla AS26 byla ve spodní části vrtu v 5 m naměřena nejnižší hodnota 5,65.



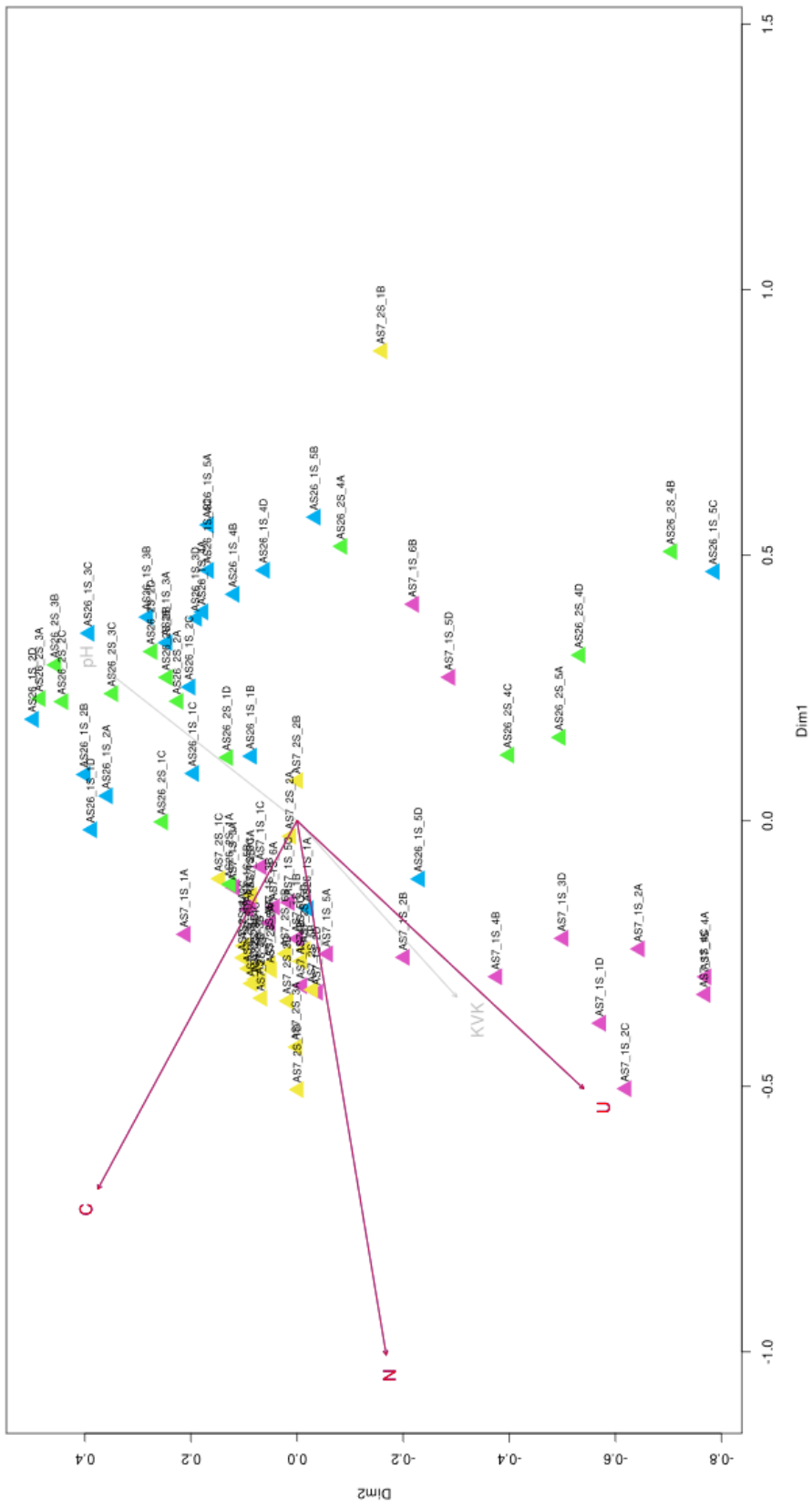
Graf 5. Hodnoty pH půdy v jednotlivých vrtech v závislosti na hloubce profilu



Graf 6. Analýza hlavních komponent obsahu dusíku, uhlíku, pH, ropných uhlovodíků u vrtu před AS26_s1 a po aplikaci AS26_s2 Fentonova číidla



Graf 7. Analýza hlavních komponent obsahu dusíku u vrtů před AS7_s1 a po ošetření AS7_s2 bakteriemi



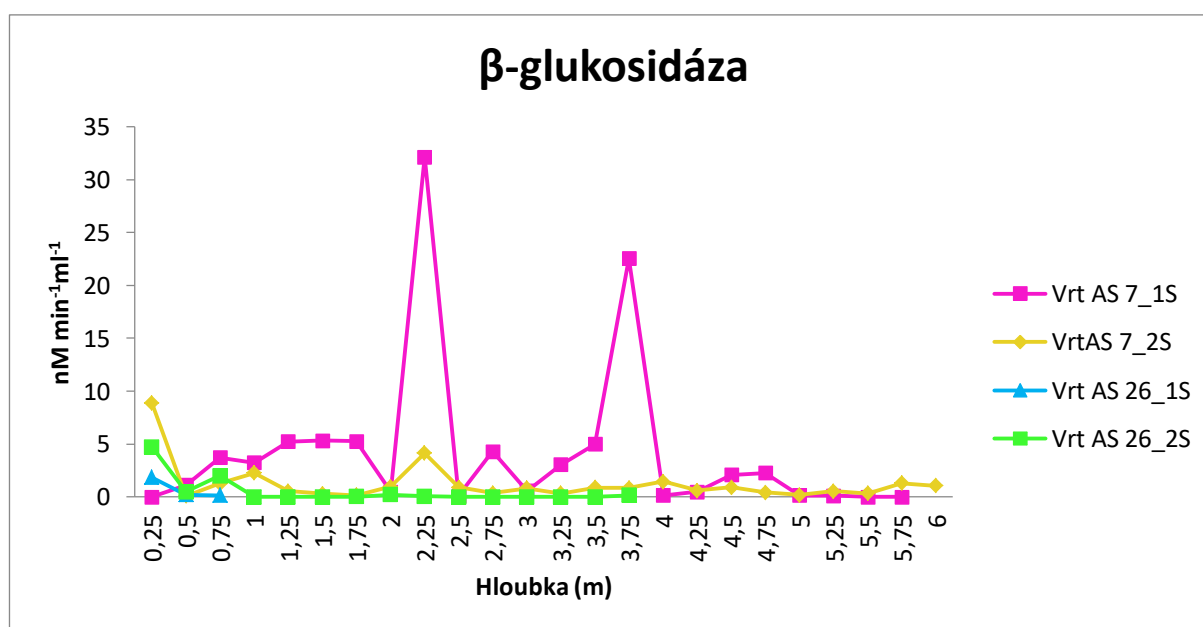
Graf 8. Analýza hlavních komponent obsahu dusíku, uhlíku, pH, ropných uhlovodíků, kationtové výměně kapacity u vrtů předaplikací AS26_s1, po aplikaci AS26_s2 Fentonova činidla, před ošetřením AS7_s1 a po ošetření AS7_s2 bakteriemi

Analýza hlavních komponent (Grafy 6-8) naznačuje, že sledované parametry byly více ovlivněny inokulací bakteriemi než aplikací Fentonova činidla.

6.3. Stanovení enzymové aktivity

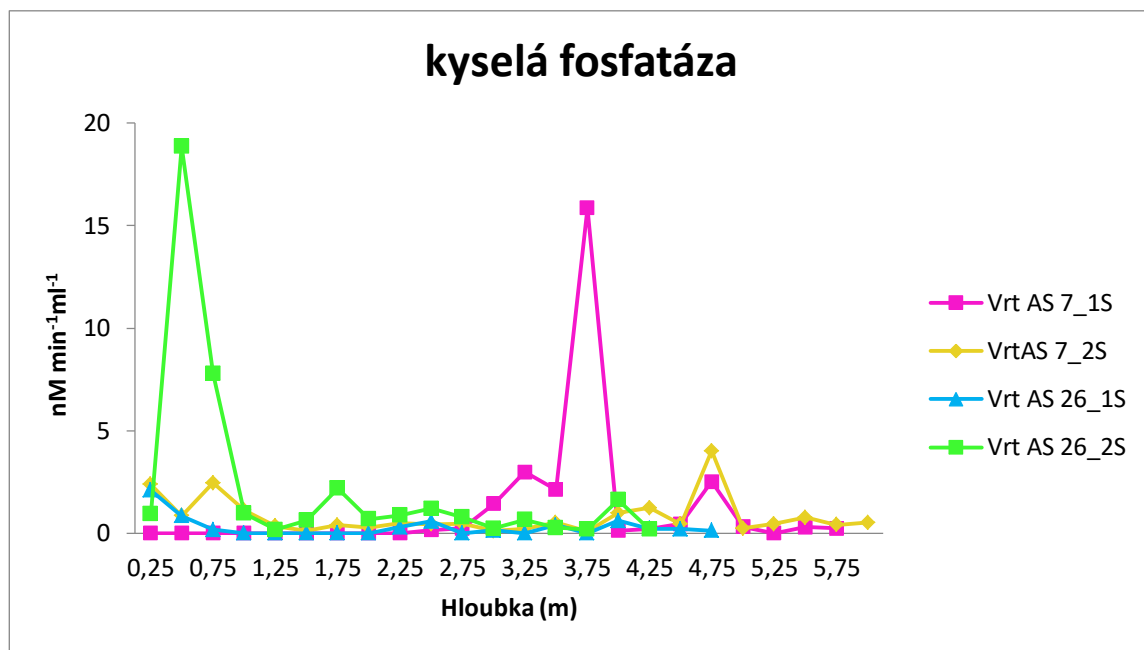
Při měření enzymových aktivit byl neaktivnější hloubkový vrt před inokulací bakteriemi AS7_1S, který obsahuje všechny naměřené enzymy kromě β -xylosidázy. U hloubkového vrtu po ošetření bakteriemi AS7_2S se naměřily aktivity všechny enzymů, i když v malé míře. Nejvyšší aktivity enzymů ve všech vrtech byly stanoveny v případě β -galaktosidázy a lipázy.

Enzym β -glukosidáza byl stanoven jako velmi aktivní u vrtu před inokulací bakteriemi AS7_1S, kde dosahoval $32,15 \text{ nM min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ v hloubce 2,25 m a $22,57 \text{ nM min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ v hloubce 3,75 m (Graf 9).



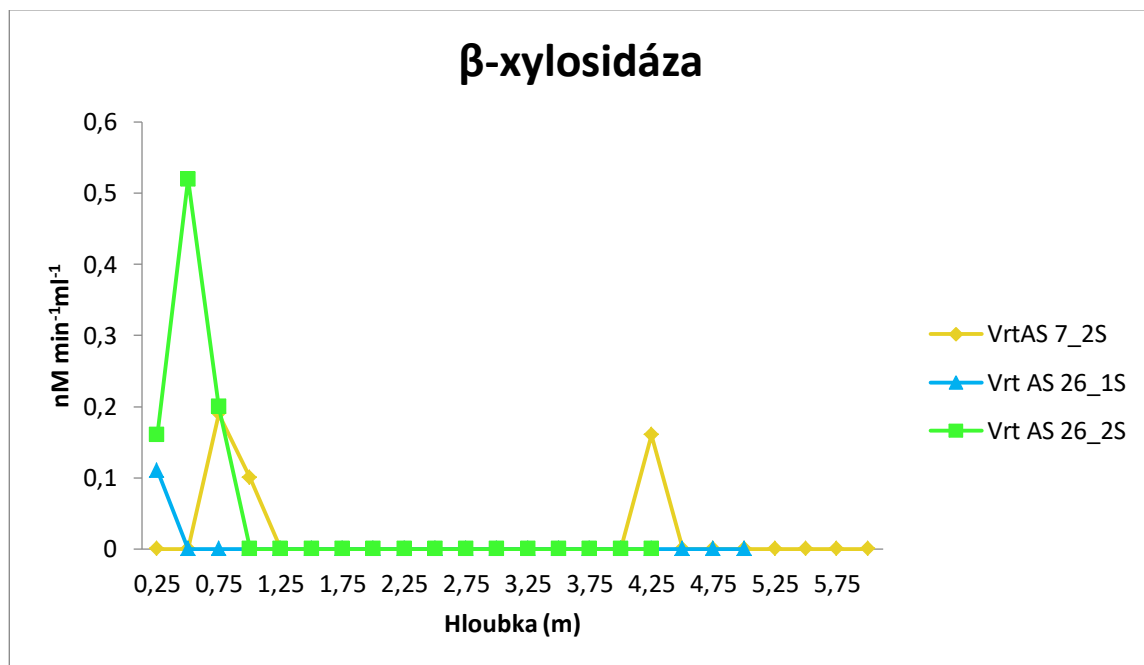
Graf 9. Aktivita enzymu β -glukosidáza v jednotlivých vrtech v závislosti na hloubce profilu

Enzym kyselá fosfatáza byla velmi aktivní ve dvou vrtech, a to před inokulací bakteriemi AS7_1S a u vrtu po aplikaci Fentonova činidla AS26_2S. Největší aktivita byla naměřena v případě vrtu AS26_2S kde dosahovala $18,87 \text{ nM min}^{-1}\text{ml}^{-1}$ v hloubce 0,5 m (Graf 10).



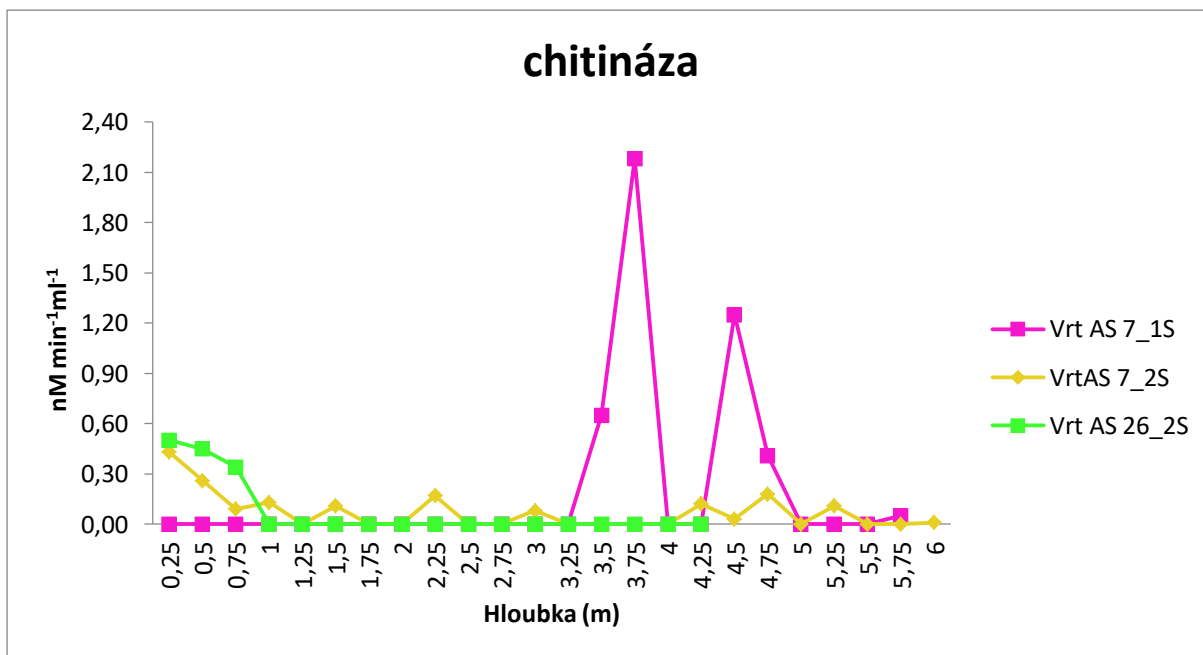
Graf 10. Aktivita enzymu kyselá fosfatáza v jednotlivých vrtech v závislosti na hloubce profilu

Enzym β -xylosidáza nebyl identifikován před inokulací bakterií AS7_1S. Nejvyšší aktivita byla naměřena u vrtu po aplikaci Fentonova činidla AS26_2S, $0,52 \text{ nM min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ v hloubce 0,5 m. β -xylosidáza se vyskytuje převážně ve svrchní vrstvě půdy (Graf 11).



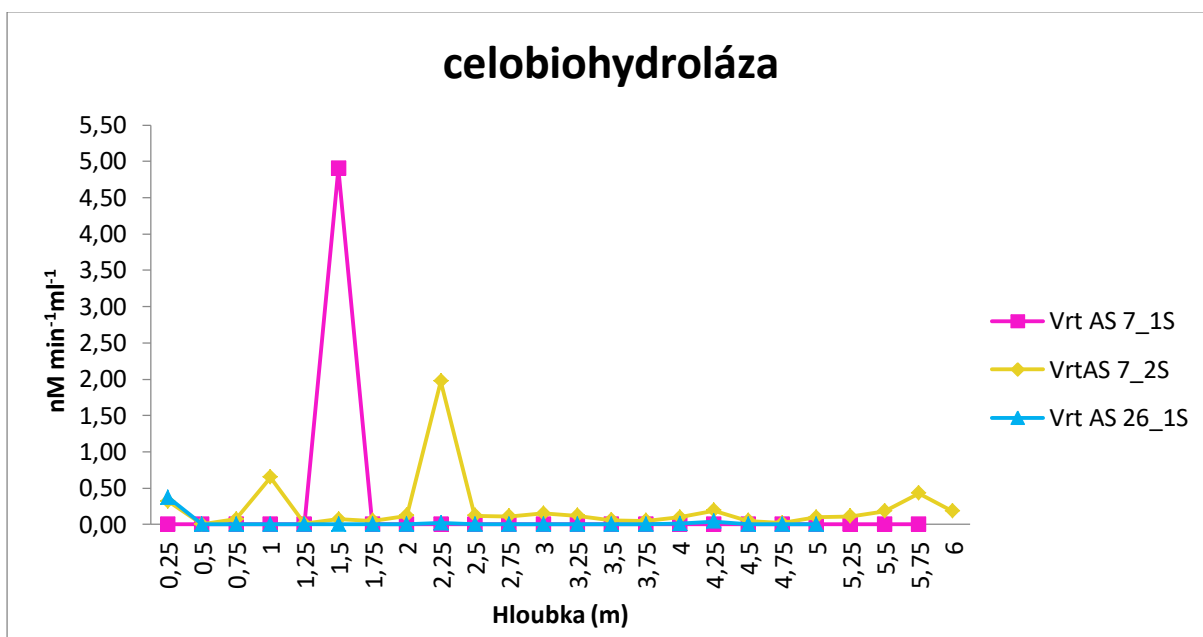
Graf 11. Aktivita enzymu β -xylosidáza v jednotlivých vrtech v závislosti na hloubce profilu

Nejvyšší aktivita enzymu chitinázy byla naměřena u vrtu před inokulací bakteriemi AS7_1S (Graf 12). Nejvyšší aktivita dosahovala $2,18 \text{ nM min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ v hloubce 3,75 m. Ve vrtu před aplikací Fentonova činidla AS26_1S nebyla aktivita tohoto enzymu identifikována.



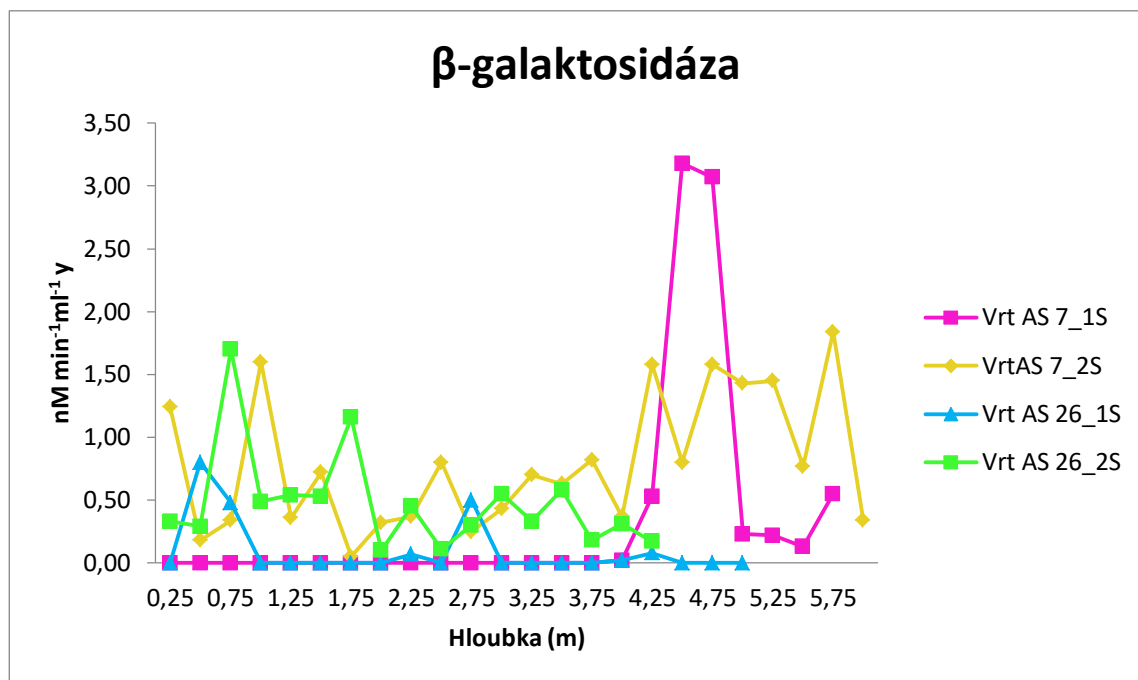
Graf 12. Aktivita enzymu chitináza v jednotlivých vrtech v závislosti na hĺoubke profilu

Celobiohydrolázu neobsahuje vrt po aplikaci Fentonova činidla AS26_2S. Nejvyšší aktivity dosahuje vrt před inokulací bakteriemi AS7_1S, u kterého se naměřilo 4,9 nM min⁻¹ ml⁻¹ v hĺoubce 1,5 m (Graf 13).



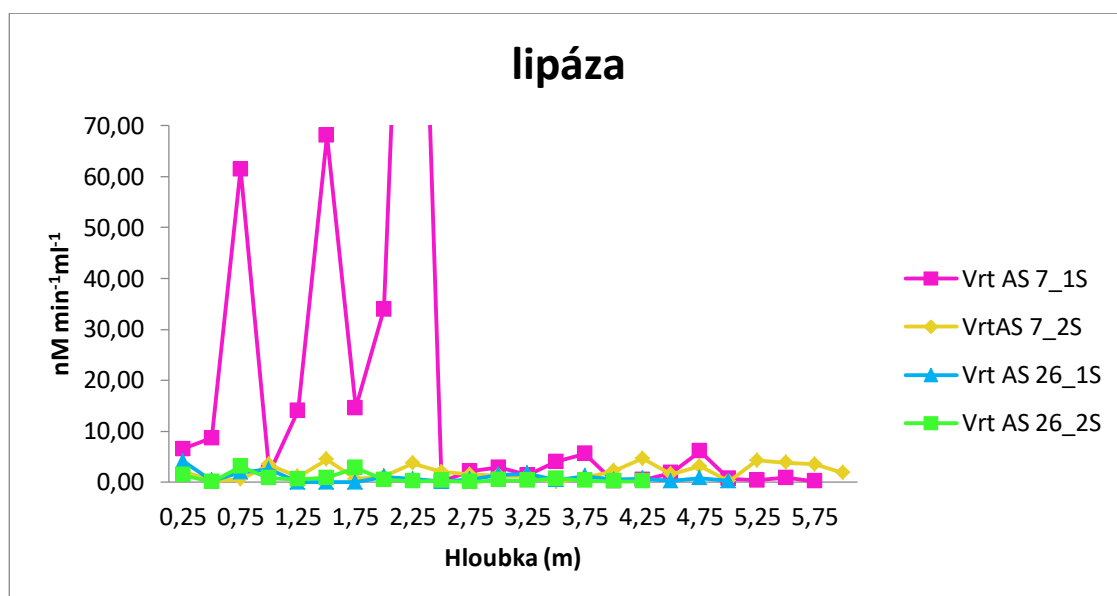
Graf 13. Aktivita enzymu celobiohydroláza v jednotlivých vrtech v závislosti na hĺoubke profilu

β-galaktosidáza, byl jeden z nejvíce aktivních naměřených enzymů (Graf 14). Největší aktivity dosahoval ve vrtech před inokulací bakteriemi AS7_1S v hĺoubce 4,25m. Naměřená aktivity dosahovala maximální hodnoty 3,18 nM min⁻¹ ml⁻¹.



Graf 14. Aktivita β-galaktosidázy v jednotlivých vrtech v závislosti na hĺoubce profilu

Aktivita enzymu lipázy byla nejvyšší u vrtu před inokulací bakteriemi AS7_1S (Graf 15). Nejvyšší aktivita $174,95 \text{ nM min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ byla zaznamenána v hĺoubce 2,25 m. Ve zbývajících hĺoubkových vrtech není enzym lipáza velmi aktivní, naměřené aktivita se pohybují okolo $3 \text{ nM min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$.



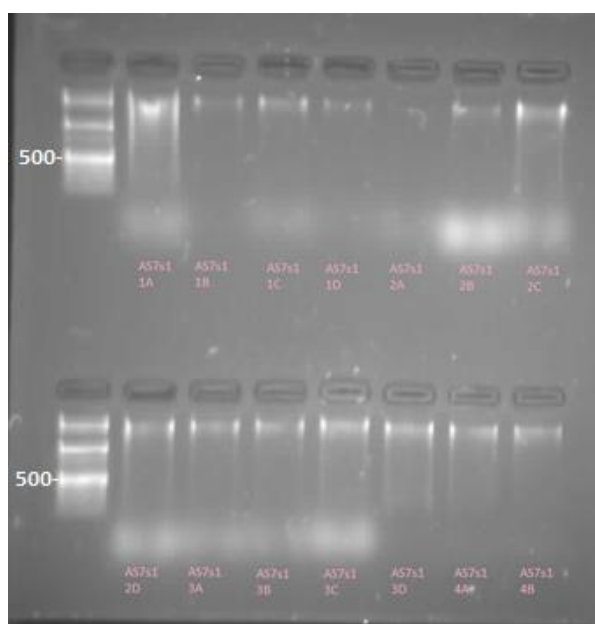
Graf 15. Aktivita enzymu lipázy v jednotlivých vrtech v závislosti na hĺoubce profilu

Tabulka 3 prezentuje vzájemnou korelaci aktivit sledovaných enzymů v jednotlivých vrtech.

| Vrty | β -Glukosidáza | Kyselá fosfatáza | β -Xylosidáza | Chitináza | Celobiohydroláza | β -Galaktosidáza | Lipáza |
|-------------------|----------------------|------------------|---------------------|-----------|------------------|------------------------|----------|
| AS7_s1 / AS7_s1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AS7_s1 / AS7_s2 | 0,3381 | 0,009965 | 0,08774 | 0,1478 | 5,067E-08 | 1,179E-05 | 0,1308 |
| AS7_s1 / AS26_s1 | 5,737E-06 | 0,6929 | 0,2926 | 0,03473 | 0,1267 | 0,6732 | 0,003368 |
| AS7_s1 / AS26_s2 | 0,0007426 | 0,007788 | 0,04169 | 0,6954 | 0,4184 | 0,0003969 | 0,001651 |
| AS7_s2 / AS7_s1 | 0,3381 | 0,009965 | 0,08774 | 0,1478 | 5,067E-08 | 1,179E-05 | 0,1308 |
| AS7_s2 / AS7_s2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AS7_s2 / AS26_s1 | 3,677E-07 | 0,001684 | 0,4233 | 0,0004483 | 1,41E-06 | 2,296E-06 | 0,008554 |
| AS7_s2 / AS26_s2 | 9,421E-05 | 0,2551 | 0,5758 | 0,1371 | 6,816E-08 | 0,02997 | 0,001244 |
| AS26_s1 / AS7_s1 | 5,737E-06 | 0,6929 | 0,2926 | 0,03473 | 0,1267 | 0,6732 | 0,003368 |
| AS26_s1 / AS7_s2 | 3,677E-07 | 0,001684 | 0,4233 | 0,0004483 | 1,41E-06 | 2,296E-06 | 0,008554 |
| AS26_s1 / AS26_s1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| AS26_s1 / AS26_s2 | 0,03283 | 0,000381 | 0,2227 | 0,06422 | 0,05175 | 4,962E-05 | 0,5365 |
| AS26_s2 / AS7_s1 | 0,0007426 | 0,007788 | 0,04169 | 0,6954 | 0,4184 | 0,0003969 | 0,001651 |
| AS26_s2 / AS7_s2 | 9,421E-05 | 0,2551 | 0,5758 | 0,1371 | 6,816E-08 | 0,02997 | 0,001244 |
| AS26_s2 / AS26_s1 | 0,03283 | 0,000381 | 0,2227 | 0,06422 | 0,05175 | 4,962E-05 | 0,5365 |
| AS26_s2 / AS26_s2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

Tab. 3. Porovnaní hodnot enzymové aktivity mezi vrty před aplikací AS26_s1, po aplikaci AS26_s2 Fentonova činidla, před aplikací AS7_s1 a po inokulaci AS7_s2 bakteriemi

6.4. Extrakce DNA



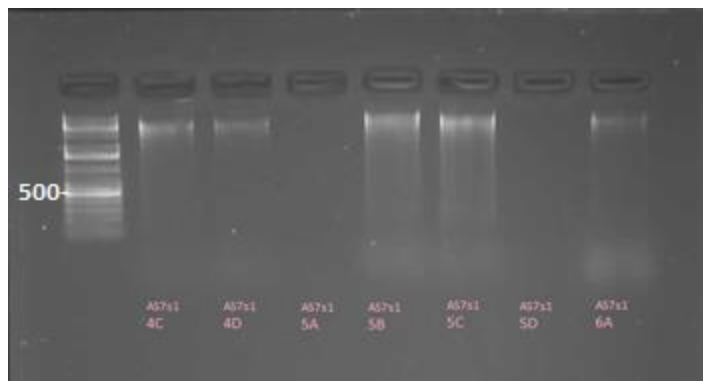
Na agarozovém gelu jsou vzorky DNA extrahované z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi z hloubek 0 - 5,75 m (Obr. 1). DNA z hloubky 0,25 - 1 m a 1,5 - 3,5 m byla dostatečně koncentrovaná, ale u 1,25 m byla DNA vzorku málo koncentrovaná (Tabulka 4).

Obr.1. Půdní DNA z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi

Tab. 4. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Navážka vzorku (g) | Objem nanášecího pufu (μl) | Detekce DNA |
|--------|----------|-------------|--------------------|----------------------------|-------------|
| 1 | AS7s1 1A | 0,25 | 0,5 | 3 | +++ |
| 2 | AS7s1 1B | 0,5 | 0,5 | 3 | ++ |
| 3 | AS7s1 1C | 0,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 4 | AS7s1 1D | 1 | 0,5 | 3 | ++ |
| 5 | AS7s1 2A | 1,25 | 0,5 | 3 | + |
| 6 | AS7s1 2B | 1,5 | 0,5 | 3 | ++ |
| 7 | AS7s1 2C | 1,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 8 | AS7s1 2D | 2 | 0,5 | 3 | +++ |
| 9 | AS7s1 3A | 2,25 | 0,5 | 3 | +++ |
| 10 | AS7s1 3B | 2,5 | 0,5 | 3 | +++ |
| 11 | AS7s1 3C | 2,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 12 | AS7s1 3D | 3 | 0,5 | 3 | +++ |
| 13 | AS7s1 4A | 3,25 | 0,5 | 3 | +++ |
| 14 | AS7s1 4B | 3,5 | 0,5 | 3 | +++ |

- DNA nebyla detekována
 + detekována DNA o slabé intenzitě
 ++ detekována DNA o střední intenzitě
 +++ detekována DNA o silné intenzitě



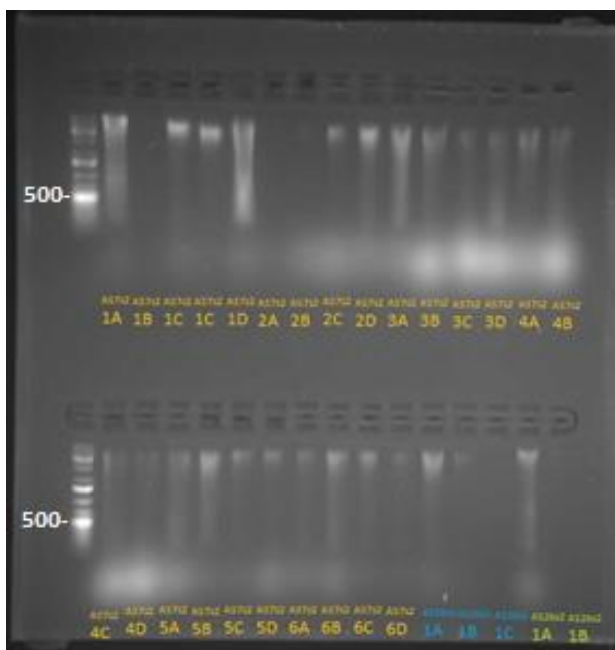
Obr. 2. Půdní DNA z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi

Tab. 5. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Navážka vzorku (g) | Objem nanášecího pufu (μ l) | Detekce DNA |
|--------|----------|-------------|--------------------|----------------------------------|-------------|
| 1 | AS7s1 4C | 3,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 2 | AS7s1 4D | 4 | 0,5 | 3 | ++ |
| 3 | AS7s1 5A | 4,25 | 0,5 | 3 | - |
| 4 | AS7s1 5B | 4,5 | 0,5 | 3 | +++ |
| 5 | AS7s1 5C | 4,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 6 | AS7s1 5D | 5 | 0,5 | 3 | - |
| 7 | AS7s1 6A | 5,25 | 0,5 | 3 | ++ |

Na agarozovém gelu jsou DNA extrahované z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi z hloubek 0 - 5,75 m (Obr. 2). DNA z hloubky 3,75 - 4 m, 4,5 - 4,75 m a 5,25 m byla dostatečně koncentrována, ale u 4,25 m a 5 m byla DNA vzorku málo koncentrována. Extrakce byla provedena inovovanou metodou (Tab. 5).

- DNA nebyla detekován
- + detekována DNA o slabé intenzitě
- ++ detekována DNA o střední intenzitě
- +++ detekována DNA o silné intenzitě



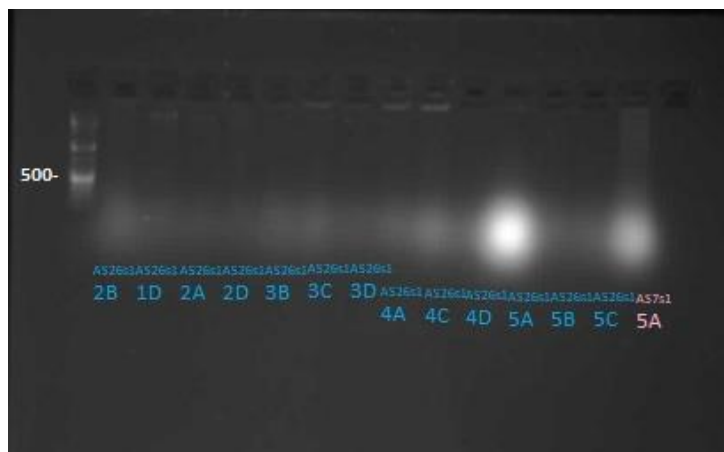
Obr. 3. Půdní DNA z vrtu AS7_2S po ošetření bakteriemi

Na agarozovém gelu je DNA extrahovaná z vrtu AS7_2S po ošetření bakteriemi z hloubek 0 - 6 m (Obr. 3). DNA z hloubky 0,25 m, 0,75 – 1,25 m a 1,75 – 6 m byla dostatečně koncentrována. U vzorků z hloubky 0,5 m a 1,5 m byla DNA vzorku málo koncentrována. U vzorku z hloubky 1,25 m se DNA nevyextrahovala. Na tomto agarozovém gelu se nachází i DNA extrahovaná z vrtu AS26_1S před ošetřením Fentonovým činidlem z hloubek 0 – 0,75 m. DNA z hloubky 0,25 – 0,5 m je dostatečně koncentrována a z hloubky 0,75 m se DNA nevyextrahovala. Dále se na gararozovém gelu nachází DNA z prtu AS26_2S po aplikaci Fentonova činidla 0,25 – 0,5 m. DNA z hloubky 0,25 m je dostatečně koncentrována, ale z hloubky 0,5 m se DNA nevyextrahovala (Tabulka 6).

Tab. 6. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Navážka vzorku (g) | Objem nanášecího pufru (μl) | Detekce DNA |
|--------|-----------|-------------|--------------------|-----------------------------|-------------|
| 1 | AS7s2 1A | 0,25 | 0,5 | 3 | +++ |
| 2 | AS7s2 1B | 0,5 | 0,5 | 3 | - |
| 3 | AS7s2 1C | 0,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 4 | AS7s2 1C | 0,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 5 | AS7s2 1D | 1 | 0,5 | 3 | +++ |
| 6 | AS7s2 2A | 1,25 | 0,5 | 3 | - |
| 7 | AS7s2 2B | 1,5 | 0,5 | 3 | + |
| 8 | AS7s2 2C | 1,75 | 0,5 | 3 | ++ |
| 9 | AS7s2 2D | 2 | 0,5 | 3 | +++ |
| 10 | AS7s2 3A | 2,25 | 0,5 | 3 | +++ |
| 11 | AS7s2 3B | 2,5 | 0,5 | 3 | +++ |
| 12 | AS7s2 3C | 2,75 | 0,5 | 3 | ++ |
| 13 | AS7s2 3D | 3 | 0,5 | 3 | ++ |
| 14 | AS7s2 4A | 3,25 | 0,5 | 3 | +++ |
| 15 | AS7s2 4B | 3,5 | 0,5 | 3 | ++ |
| 16 | AS7s2 4C | 3,75 | 0,5 | 3 | ++ |
| 17 | AS7s2 4D | 4 | 0,5 | 3 | ++ |
| 18 | AS7s2 5A | 4,25 | 0,5 | 3 | ++ |
| 19 | AS7s2 5B | 4,5 | 0,5 | 3 | +++ |
| 20 | AS7s2 5C | 4,75 | 0,5 | 3 | ++ |
| 21 | AS7s2 5D | 5 | 0,5 | 3 | ++ |
| 22 | AS7s2 6A | 5,25 | 0,5 | 3 | ++ |
| 23 | AS7s2 6B | 5,5 | 0,5 | 3 | +++ |
| 24 | AS7s2 6C | 5,75 | 0,5 | 3 | ++ |
| 25 | AS7s2 6D | 6 | 0,5 | 3 | ++ |
| 26 | AS26s1 1A | 0,25 | 0,5 | 3 | +++ |
| 27 | AS26s1 1B | 0,5 | 0,5 | 3 | ++ |
| 28 | AS26s1 1C | 0,75 | 0,5 | 3 | - |
| 29 | AS26s2 1A | 0,25 | 0,5 | 3 | +++ |
| 30 | AS26s2 1B | 0,5 | 0,5 | 3 | - |

- DNA nebyla detekována
 + detekována DNA o slabé intenzitě
 ++ detekována DNA o střední intenzitě
 +++ detekována DNA o silné intenzitě



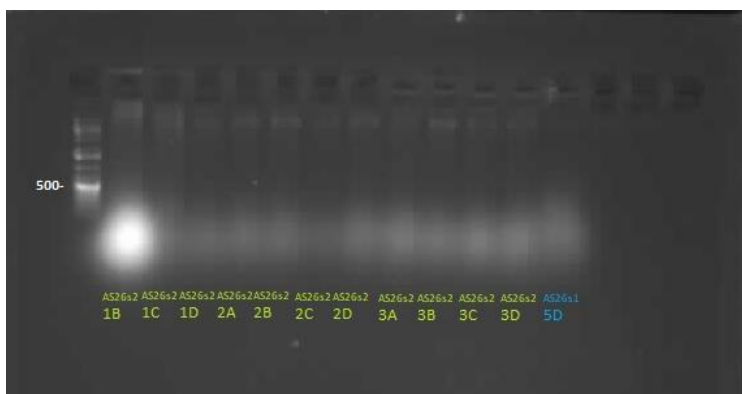
Obr. 4. Půdní DNA z vrtu AS26_1S před ošetřením Fentonovým činidlem.

Tab. 7. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Navážka vzorku (g) | Objem nanášecího pufu (μl) | Detekce DNA |
|--------|-----------|-------------|--------------------|----------------------------|-------------|
| 1 | AS26s1 2B | 1,5 | 0,5 | 3 | + |
| 2 | AS26s1 1D | 1 | 0,5 | 3 | ++ |
| 3 | AS26s1 2A | 1,25 | 0,5 | 3 | + |
| 4 | AS26s1 2D | 2 | 0,5 | 3 | + |
| 5 | AS26s1 3B | 2,5 | 0,5 | 3 | ++ |
| 6 | AS26s1 3C | 2,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 7 | AS26s1 3D | 3 | 0,5 | 3 | + |
| 8 | AS26s1 4A | 3,25 | 0,5 | 3 | +++ |
| 9 | AS26s1 4C | 3,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 10 | AS26s1 4D | 4 | 0,5 | 3 | + |
| 11 | AS26s1 5A | 4,25 | 0,5 | 3 | + |
| 12 | AS26s1 5B | 4,5 | 0,5 | 3 | + |
| 13 | AS26s1 5C | 4,75 | 0,5 | 3 | + |
| 14 | AS7s1 5A | 4,25 | 0,5 | 3 | ++ |

Na agarozovém gelu jsou DNA extrahované z vrtu AS26_1S před ošetřením Fentonovým činidlem z hloubek 1 - 4,75 m a vrt před aplikací bakteriemi AS7_1S (Obr.4). DNA z hloubky 1 m, 2,5 – 2,75 m a 3,25 – 3,75 m byla dostatečně koncentrovaná. U vrtků z hloubky 1,25 - 1,5 m, 2 m, 3 m a 4 – 4,75 m byla DNA vzorku málo koncentrovaná, ale i tak se touto extrakcí dále pracovalo. DNA z hloubkového vrtu AS7_1S z 5 m je dostatečně koncentrovaná (Tabulka 7).

- DNA nebyla detekována
 + detekována DNA o slabé intenzitě
 ++ detekována DNA o střední intenzitě
 +++ detekována DNA o silné intenzitě



Obr. 5. Půdní DNA z vrtu AS26_2S po ošetření Fentonovým činidlem

Tab. 8. Detekce půdní DNA

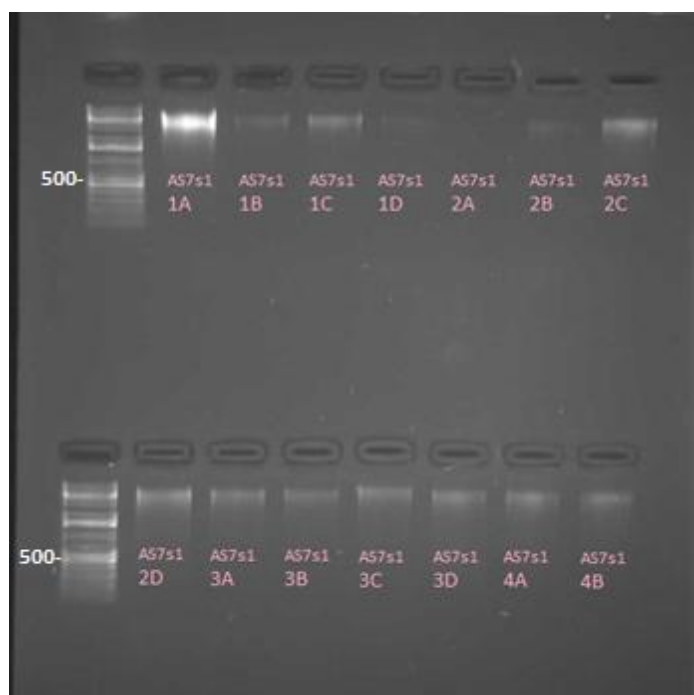
| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Navážka vzorku (g) | Objem nanášecího pufu (μ l) | Detekce DNA |
|--------|-----------|-------------|--------------------|----------------------------------|-------------|
| 1 | AS26s2 1B | 0,5 | 0,5 | 3 | +++ |
| 2 | AS26s2 1C | 0,75 | 0,5 | 3 | ++ |
| 3 | AS26s2 1D | 1 | 0,5 | 3 | ++ |
| 4 | AS26s2 2A | 1,25 | 0,5 | 3 | ++ |
| 5 | AS26s2 2B | 1,5 | 0,5 | 3 | +++ |
| 6 | AS26s2 2C | 1,75 | 0,5 | 3 | ++ |
| 7 | AS26s2 2D | 2 | 0,5 | 3 | +++ |
| 8 | AS26s2 3A | 2,25 | 0,5 | 3 | ++ |
| 9 | AS26s2 3B | 2,5 | 0,5 | 3 | +++ |
| 10 | AS26s2 3C | 2,75 | 0,5 | 3 | ++ |
| 11 | AS26s2 3D | 4 | 0,5 | 3 | ++ |
| 12 | AS26s1 5D | 5 | 0,5 | 3 | + |

Na agarozovém gelu jsou DNA extrahované z vrtu AS26_2S po ošetření Fentonovým činidlem z hloubek 0,5 – 4 m a vrtu AS26_1S před ošetřením Fentonovým činidlem z hloubky 5 m (Obr. 5). DNA z hloubky 0,5 - 4 m byla dostatečně koncentrována (Tabulka 8). DNA z hloubkového vrtu AS26_1S z 5 m byla málo koncentrována, ale i tak se s ní dále pracovalo.

- DNA nebyla detekována
 + detekována DNA o slabé intenzitě
 ++ detekována DNA o střední intenzitě
 +++ detekována DNA o silné intenzitě

6.5. Přečištění DNA

Extrahované vzorky se přečišťovaly dvěma způsoby. U hloubkových vztů s bakteriemi AS7_1S a AS7_2S byla použita metoda s Hapes a CaCl₂. Tato metoda nebyla vhodná pro vrtů s Fentonovým činidlem AS26_1S a AS26_2S, touto metodou se DNA ztrácela, proto byl použit Geneclean Turbo kit.



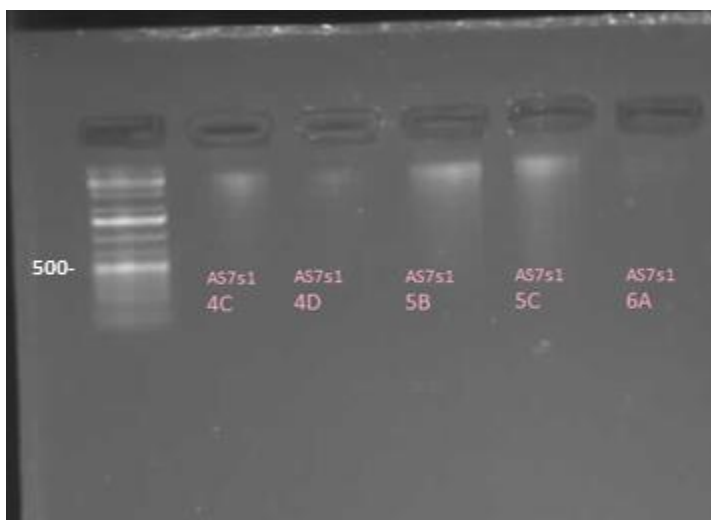
Obr. 6. Přečištěné půdní DNA z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi

Tab. 9. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem extrahovanéh o vzorku (μl) | Objem nanášecího pufu (μl) | Detekce DNA |
|--------|----------|-------------|----------------------------------|----------------------------|-------------|
| 1 | AS7s1 1A | 0,25 | 30 | 3 | +++ |
| 2 | AS7s1 1B | 0,5 | 30 | 3 | + |
| 3 | AS7s1 1C | 0,75 | 30 | 3 | ++ |
| 4 | AS7s1 1D | 1 | 30 | 3 | + |
| 5 | AS7s1 2A | 1,25 | 30 | 3 | - |
| 6 | AS7s1 2B | 1,5 | 30 | 3 | + |
| 7 | AS7s1 2C | 1,75 | 30 | 3 | ++ |
| 8 | AS7s1 2D | 2 | 30 | 3 | ++ |
| 9 | AS7s1 3A | 2,25 | 30 | 3 | ++ |
| 10 | AS7s1 3B | 2,5 | 30 | 3 | ++ |
| 11 | AS7s1 3C | 2,75 | 30 | 3 | ++ |
| 12 | AS7s1 3D | 3 | 30 | 3 | ++ |
| 13 | AS7s1 4A | 3,25 | 30 | 3 | ++ |
| 14 | AS7s1 4B | 3,5 | 30 | 3 | ++ |

Na agarozovém gelu jsou přečištěné DNA extrahované z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi z hloubek 0 - 3,5 m (Obr. 6). Přečištěná DNA z hloubky 0,25 - 1 m a 1,5 - 3,5 m byla dostatečně koncentrovaná. U vzorku z hloubky 0,5 m, 1 m a 1,5 m byla DNA málo koncentrovaná, ale i tak se s ní dále pracovalo (Tabulka 9). U vzorku z hloubky 1,25 m se po přečištění DNA ztratila. Přečištění bylo zopakováno pomocí Geneclean Turbo kit.

- DNA nebyla detekován
 + detekována DNA o slabé intenzitě
 ++ detekována DNA o střední intenzitě
 +++ detekována DNA o silné intenzitě



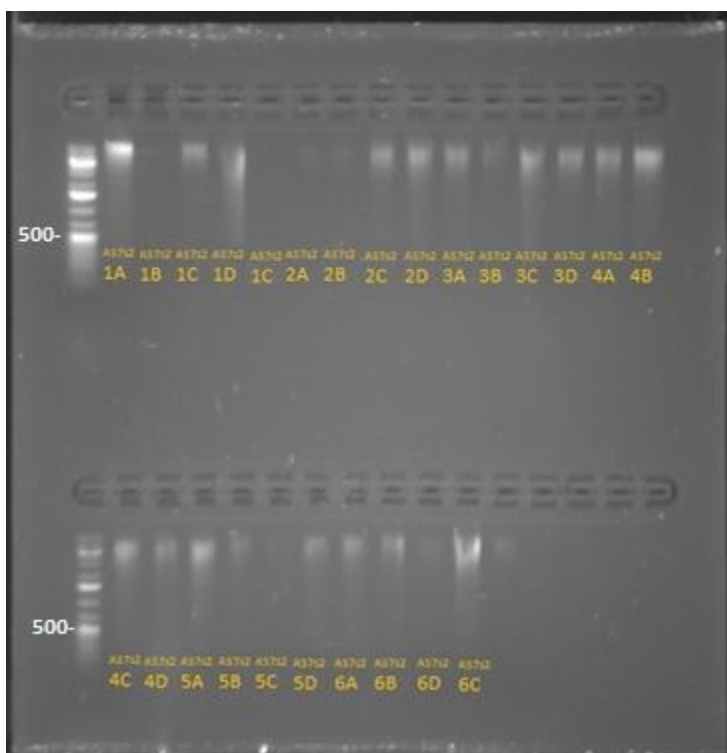
Obr. 7. Přečištěné půdní DNA z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi

Tab. 10. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem extrahovaného vzorku (μl) | Objem nanášecího pufru (μl) | Detekce DNA |
|--------|----------|-------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------|
| 1 | AS7s1 4C | 3,75 | 30 | 3 | ++ |
| 2 | AS7s1 4D | 4 | 30 | 3 | + |
| 3 | AS7s1 5B | 4,5 | 30 | 3 | +++ |
| 4 | AS7s1 5C | 4,75 | 30 | 3 | +++ |
| 5 | AS7s1 6A | 5,25 | 30 | 3 | + |

Na agarozovém gelu jsou přečištěné DNA extrahované z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi z hloubek 3,75 – 5,25 m (Obr. 7). Přečištěná DNA z hloubky 3,75 m a 4,5 – 4,75 m byla dostatečně koncentrovaná. U vzorku z hloubky 4 m a 5,25 m byla DNA málo koncentrovaná, ale i tak se s ní dále pracovalo (Tabulka 10).

- DNA nebyla detekována
 + detekována DNA o slabé intenzitě
 ++ detekována DNA o střední intenzitě
 +++ detekována DNA o silné intenzitě



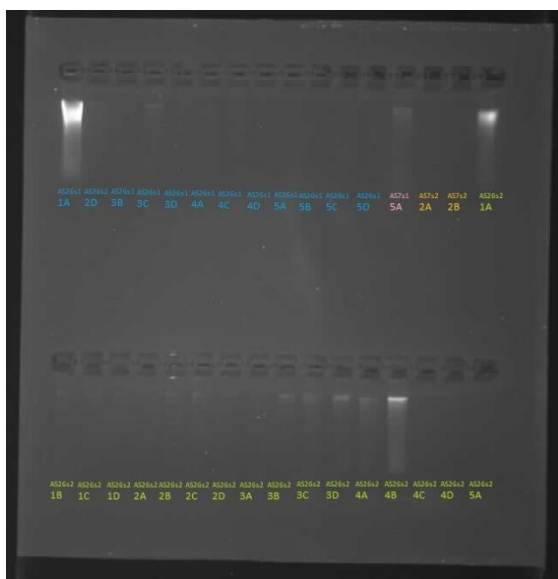
Obr. 8. Přečištěné půdní DNA z vrtu AS7_2S po inokulaci bakteriemi

Tab. 11. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem extrahovaného vzorku (μl) | Objem nanášecího pufru (μl) | Detekce DNA |
|--------|----------|-------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------|
| 1 | AS7s2 1A | 0,25 | 30 | 3 | +++ |
| 2 | AS7s2 1B | 0,5 | 30 | 3 | - |
| 3 | AS7s2 1C | 0,75 | 30 | 3 | +++ |
| 4 | AS7s2 1D | 1 | 30 | 3 | ++ |
| 5 | AS7s2 1C | 0,75 | 30 | 3 | - |
| 6 | AS7s2 2A | 1,25 | 30 | 3 | + |
| 7 | AS7s2 2B | 1,5 | 30 | 3 | + |
| 8 | AS7s2 2C | 1,75 | 30 | 3 | +++ |
| 9 | AS7s2 2D | 2 | 30 | 3 | +++ |
| 10 | AS7s2 3A | 2,25 | 30 | 3 | +++ |
| 11 | AS7s2 3B | 2,5 | 30 | 3 | ++ |
| 12 | AS7s2 3C | 2,75 | 30 | 3 | +++ |
| 13 | AS7s2 3D | 3 | 30 | 3 | +++ |
| 14 | AS7s2 4A | 3,25 | 30 | 3 | +++ |
| 15 | AS7s2 4B | 3,5 | 30 | 3 | +++ |
| 16 | AS7s2 4C | 3,75 | 30 | 3 | +++ |
| 17 | AS7s2 4D | 4 | 30 | 3 | ++ |
| 18 | AS7s2 5A | 4,25 | 30 | 3 | +++ |
| 19 | AS7s2 5B | 4,5 | 30 | 3 | ++ |
| 20 | AS7s2 5C | 4,75 | 30 | 3 | + |
| 21 | AS7s2 5D | 5 | 30 | 3 | ++ |
| 22 | AS7s2 6A | 5,25 | 30 | 3 | ++ |
| 23 | AS7s2 6B | 5,5 | 30 | 3 | ++ |
| 24 | AS7s2 6D | 6 | 30 | 3 | + |
| 25 | AS7s2 6C | 5,75 | 30 | 3 | +++ |

Na agarozovom gelu jsou přečištěné DNA extrahované z vrtu AS7_2S po inokulaci bakteriemi z hloubek 0 - 6 m (Obr. 8). Přečištěná DNA z hloubky 0,25 m, 0,75 - 1 m, 1,75 - 4,5 m, 5 - 5,5 m a 5,75 m byla dostatečně koncentrována. U vzorku z hloubky 1,25 m - 1,5 m, 4,75 m a 6 m byla DNA málo koncentrována, ale i tak se s ní dále pracovalo. U vzorku z hloubky 0,5 m, 0,75 m se po přečištění DNA ztratila (Tabulka 11). Přečištění bylo zopakováno pomocí Geneclean Turbi kit.

- DNA nebyla detekována
 + detekována DNA o slabé intenzitě
 ++ detekována DNA o střední intenzitě
 +++ detekována DNA o silné intenzitě



Obr. 9. Přechištěné půdní DNA z vrtu AS26_1S před ošetřením Fentonovým činidlem

Tab. 12. Detekce půdní DNA

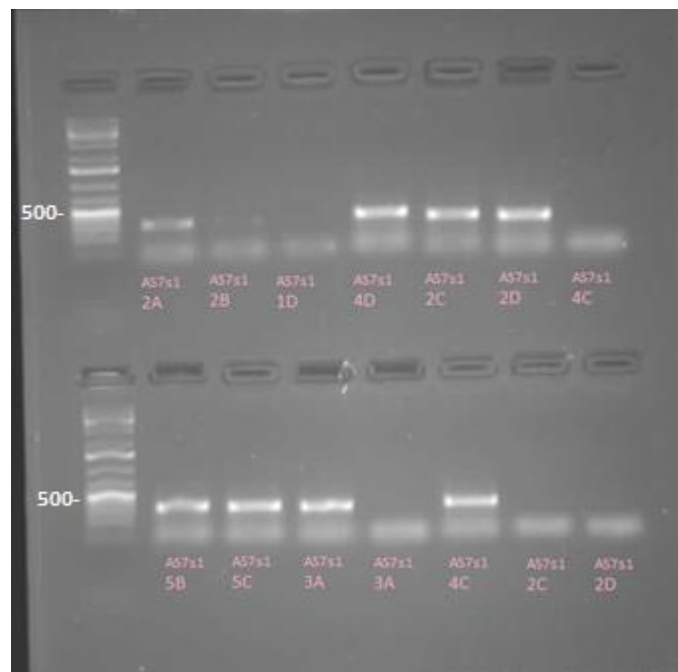
| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem extrahovaného vzorku (μl) | Objem nanášečeho pufru (μl) | Detekce DNA |
|--------|-----------|-------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------|
| 1 | AS26s1 1A | 0,25 | 30 | 3 | +++ |
| 2 | AS26s1 2D | 2 | 30 | 3 | ++ |
| 3 | AS26s1 3B | 2,5 | 30 | 3 | + |
| 4 | AS26s1 3C | 2,75 | 30 | 3 | ++ |
| 5 | AS26s1 3D | 3 | 30 | 3 | + |
| 6 | AS26s1 4A | 3,25 | 30 | 3 | + |
| 7 | AS26s1 4C | 3,75 | 30 | 3 | + |
| 8 | AS26s1 4D | 4 | 30 | 3 | + |
| 9 | AS26s1 5A | 4,25 | 30 | 3 | + |
| 10 | AS26s1 5B | 4,5 | 30 | 3 | + |
| 11 | AS26s1 5C | 4,75 | 30 | 3 | + |
| 12 | AS26s1 5D | 5 | 30 | 3 | + |
| 13 | AS7s1 5A | 4,25 | 30 | 3 | ++ |
| 14 | AS7s2 2A | 1,25 | 30 | 3 | + |
| 15 | AS7s2 2B | 1,5 | 30 | 3 | + |
| 16 | AS26s2 1A | 0,25 | 30 | 3 | +++ |
| 17 | AS26s2 1B | 0,5 | 30 | 3 | + |
| 18 | AS26s2 1C | 0,75 | 30 | 3 | + |
| 19 | AS26s2 1D | 1 | 30 | 3 | + |
| 20 | AS26s2 2A | 1,25 | 30 | 3 | + |
| 21 | AS26s2 2B | 1,5 | 30 | 3 | ++ |
| 22 | AS26s2 2C | 1,75 | 30 | 3 | ++ |
| 23 | AS26s2 2D | 2 | 30 | 3 | + |
| 24 | AS26s2 3A | 2,25 | 30 | 3 | + |
| 25 | AS26s2 3B | 2,5 | 30 | 3 | ++ |
| 26 | AS26s2 3C | 2,75 | 30 | 3 | ++ |
| 27 | AS26s2 3D | 3 | 30 | 3 | ++ |
| 28 | AS26s2 4A | 3,25 | 30 | 3 | ++ |
| 29 | AS26s2 4B | 3,5 | 30 | 3 | +++ |
| 30 | AS26s2 4C | 3,75 | 30 | 3 | + |
| 31 | AS26s2 4D | 4 | 30 | 3 | + |
| 32 | AS26s2 5A | 4,25 | 30 | 3 | + |

Na agarozovém gelu jsou pomocí GeneClean Turbikitu přečištěné DNA extrahované z vrtu AS26_1S před aplikaci Fentonova činidla z hloubek 0 – 5 m, AS26_2S po aplikaci Fentonova činidla z hloubky 0 – 4,25 m, AS7_1S před aplikací bakteriemi z hloubky 4,25 m a AS7_2S po aplikaci bakteriemi z hloubek 1,25 - 1,5 m (Obr. 9). Přechištěná DNA z vrtu AS26_1S z hloubky 0,25 m, 2 m a 2,75 m byla dostatečně koncentrovaná. U vrtu AS26_2S z hloubky 0,25 m, 1,5 – 1,75 m a 2,5 – 3,5 m byla dostatečně koncentrovaná. U vrtu AS7_1S z hloubky 4,25 m byla dostatečně koncentrovaná. U vzorků z vrtu AS26_1S z hloubky 2,5 m, 3 - 5 m byla DNA málo koncentrovaná, ale i tak se s ní dále pracovalo. U vzorků z vrtu AS26_2S z hloubky 0,5 m – 1,25 m, 2 – 2,25 m a 3,75 – 4,25 m byla DNA málo koncentrovaná, ale i tak se s ní dále pracovalo. U vzorků z vrtu AS7_2S z hloubky 1,25 m – 1,5 m byla DNA málo koncentrovaná, ale i tak se s ní dále pracovalo (Tabulka 12).

- DNA nebyla detekována
 + detekována DNA o slabé intenzitě
 ++ detekována DNA o střední intenzitě
 +++ detekována DNA o silné intenzitě

6.7. PCR produkt

Pro PRC produkt byly použity dva různé mixy GoTak a TaKara. Vzorky, které byly na gelu slabé, se znovu zopakovaly s jiným množstvím přidaného DNA do mixu.



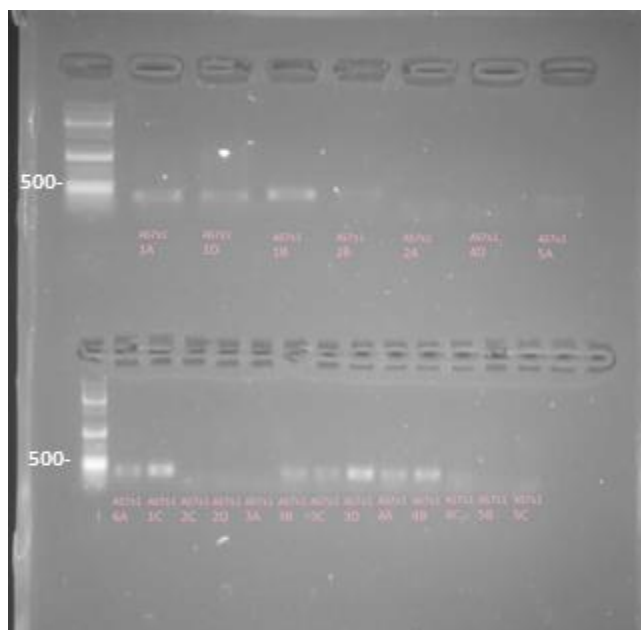
Obr. 10. PCR produkt z půdní DNA z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi

Tab. 13. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem DNA do směsi (μl) | Objem nanášecího pufu (μl) | Detekce PCR produktu |
|--------|----------|-------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|
| 1 | AS7s1 2A | 1,25 | 4 | 3 | ++ |
| 2 | AS7s1 2B | 1,5 | 4 | 3 | + |
| 3 | AS7s1 1D | 1 | 4 | 3 | + |
| 4 | AS7s1 4D | 4 | 3 | 3 | +++ |
| 5 | AS7s1 2C | 1,75 | 0,25 | 3 | +++ |
| 6 | AS7s1 2D | 2 | 0,25 | 3 | +++ |
| 7 | AS7s1 4C | 3,75 | 0,5 | 3 | - |
| 8 | AS7s1 5B | 4,5 | 0,5 | 3 | +++ |
| 9 | AS7s1 5C | 4,75 | 0,5 | 3 | +++ |
| 10 | AS7s1 3A | 2,25 | 1,5 | 3 | +++ |
| 11 | AS7s1 3A | 2,25 | 0,5 | 3 | - |
| 12 | AS7s1 4C | 3 | 1,5 | 3 | +++ |
| 13 | AS7s1 2C | 1,75 | 0,5 | 3 | - |
| 14 | AS7s1 2D | 2 | 0,5 | 3 | - |

Na agarozovém gelu jsou PCR produkty z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi (Obr. 10) z hloubek 1 – 4,75 m. Na tyto PCR produkty byl použit mix GoTak. PCR produkt z hloubky 1,25 m, 4 m, 1,75 – 2 m, 4,5 – 4,75 m, 2,25 m a 3 m byl dostatečně koncentrovaný. U vzorku z hloubky 1,5 m, 1 m, 3,75 m, 2,25 m a 1,75 – 2 m byl PCR produkt málo koncentrovaný (Tabulka 13). U málo koncentrovaných vzorků se PCR zopakoval s přidáním jiného množství DNA do směsi

- PCR produkt nebyl detekován
 + detekován PCR produkt o slabé intenzitě
 ++ detekován PCR produkt o střední intenzitě
 +++ detekován PCR produkt o silné intenzitě



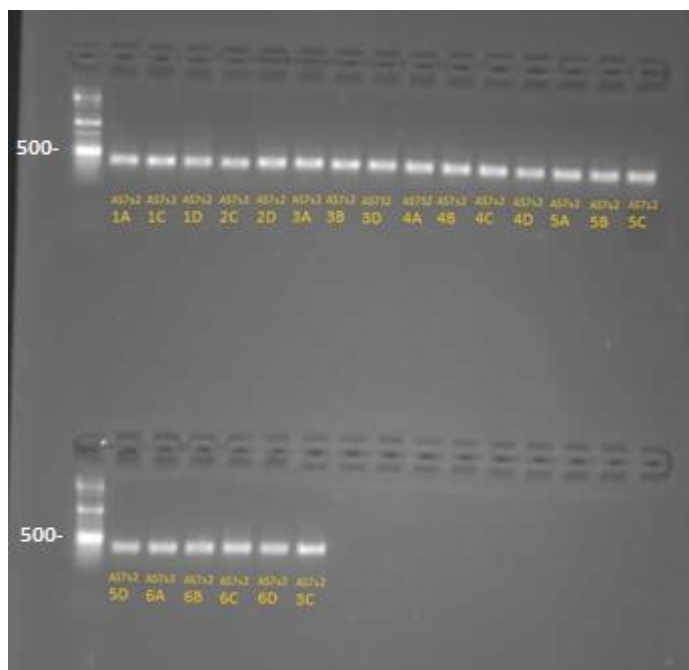
Obr. 11. PCR produkt z půdní DNA z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi

Tab. 14. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem DNA do směsi (μl) | Objem nanášecího pufu (μl) | Detekce PCR produktu |
|--------|----------|-------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|
| 1 | AS7s1 1A | 0,25 | 0,5 | 3 | ++ |
| 2 | AS7s1 1D | 1 | 2 | 3 | ++ |
| 3 | AS7s1 1B | 0,5 | 1,5 | 3 | ++ |
| 4 | AS7s1 2B | 1,5 | 2 | 3 | + |
| 5 | AS7s1 2A | 1,25 | 2 | 3 | - |
| 6 | AS7s1 4D | 4 | 2 | 3 | - |
| 7 | AS7s1 5A | 4,25 | 2 | 3 | - |
| 8 | AS7s1 6A | 5,25 | 2 | 3 | ++ |
| 9 | AS7s1 1C | 0,75 | 1 | 3 | +++ |
| 10 | AS7s1 2C | 1,75 | 1 | 3 | - |
| 11 | AS7s1 2D | 2 | 1 | 3 | - |
| 12 | AS7s1 3A | 2,25 | 1 | 3 | - |
| 13 | AS7s1 3B | 2,5 | 1 | 3 | ++ |
| 14 | AS7s1 3C | 2,75 | 1 | 3 | ++ |
| 15 | AS7s1 3D | 3 | 1 | 3 | +++ |
| 16 | AS7s1 4A | 3,25 | 1 | 3 | ++ |
| 17 | AS7s1 4B | 3,5 | 1 | 3 | ++ |
| 18 | AS7s1 4C | 3,75 | 1 | 3 | + |
| 19 | AS7s1 5B | 4,5 | 1 | 3 | - |
| 20 | AS7s1 5C | 4,75 | 1 | 3 | - |

Na agarozovém gelu jsou PCR produkty z vrtu AS7_1S před inokulací bakteriemi z hloubek 0 – 5,25 m (Obr. 11). Na tyto PCR produkty byl použit mix GoTak. PCR produkt z hloubky 0,25 m, 1 m, 0,5 m, 5,25 m, 0,75 m a 2,5 – 3,5 m byl dostatečně koncentrován. U vzorku z hloubky 1,5 m, 1,25 m, 4 – 4,25 m, 1,75 – 2,25 m, 3,75 m a 4,5 – 4,75 m byl PCR produkt málo koncentrován. U málo koncentrovaných vzorků se PCR zopakoval s přidáním jiného množství DNA do směsi (Tabulka 14).

- PCR produkt nebyl detekován
 + detekován PCR produkt o slabé intenzitě
 ++ detekován PCR produkt o střední intenzitě
 +++ detekován PCR produkt o silné intenzitě



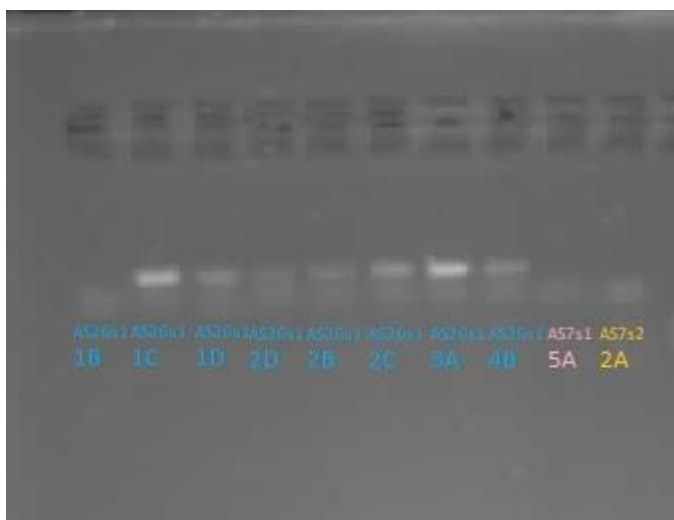
Obr. 12. PCR produkt z půdní DNA z vrtu AS7_2S po inokulaci bakteriemi

Tab. 15. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem DNA do směsi (μl) | Objem nanášecího pufu (μl) | Detekce PCR produktu |
|--------|----------|-------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|
| 1 | AS7s2 1A | 0,25 | 2 | 3 | +++ |
| 2 | AS7s2 1C | 0,75 | 2 | 3 | +++ |
| 3 | AS7s2 1D | 1 | 2 | 3 | +++ |
| 4 | AS7s2 2C | 1,75 | 2 | 3 | +++ |
| 5 | AS7s2 2D | 2 | 2 | 3 | +++ |
| 6 | AS7s2 3A | 2,25 | 2 | 3 | +++ |
| 7 | AS7s2 3B | 2,5 | 2 | 3 | +++ |
| 8 | AS7s2 3D | 3 | 2 | 3 | +++ |
| 9 | AS7s2 4A | 3,25 | 2 | 3 | +++ |
| 10 | AS7s2 4B | 3,5 | 2 | 3 | +++ |
| 11 | AS7s2 4C | 3,75 | 2 | 3 | +++ |
| 12 | AS7s2 4D | 4 | 2 | 3 | +++ |
| 13 | AS7s2 5A | 4,25 | 2 | 3 | +++ |
| 14 | AS7s2 5B | 4,5 | 2 | 3 | +++ |
| 15 | AS7s2 5C | 4,75 | 2 | 3 | +++ |
| 16 | AS7s2 5D | 5 | 2 | 3 | +++ |
| 17 | AS7s2 6A | 5,25 | 2 | 3 | +++ |
| 18 | AS7s2 6B | 5,5 | 2 | 3 | +++ |
| 19 | AS7s2 6C | 5,75 | 2 | 3 | +++ |
| 20 | AS7s2 6D | 6 | 2 | 3 | +++ |
| 21 | AS7s2 3C | 2,75 | 2 | 3 | +++ |

Na agarozovém gelu jsou PCR produkty z vrtu AS7_2S po inokulaci bakteriemi z hloubek 0 – 6 m (Obr. 12). Na tyto PCR produkty byl použit mix TaKara. PCR produkty na tomto gelu jsou dostatečně koncentrované (Tabulka 15).

- PCR produkt nebyl detekován
 + detekován PCR produkt o slabé intenzitě
 ++ detekován PCR produkt o střední intenzitě
 +++ detekován PCR produkt o silné intenzitě



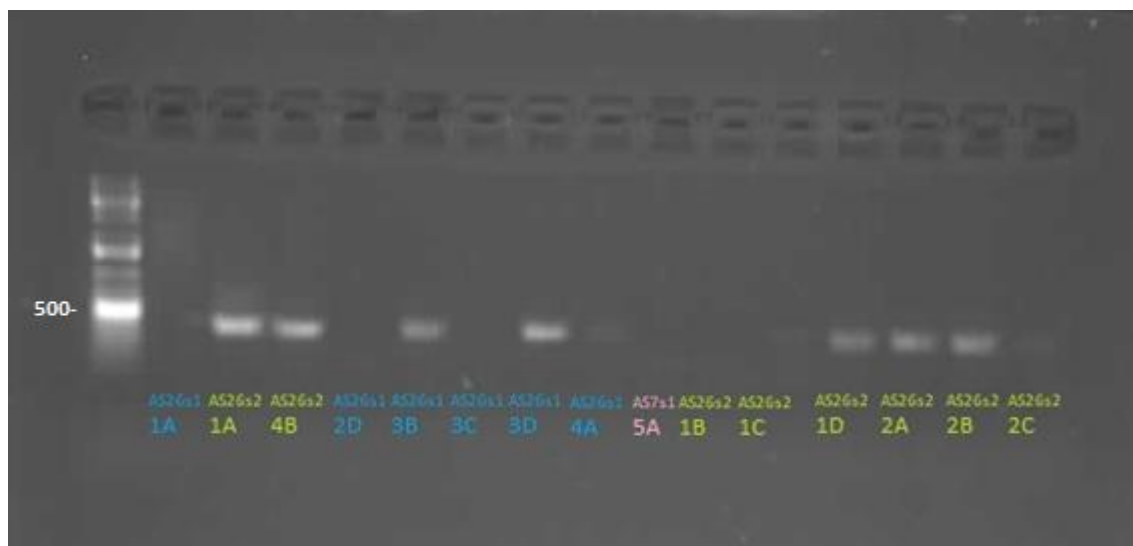
Obr. 13. PCR produkt z půdní DNA

Na agarozovém gelu jsou PCR produkty z vrtu AS26_1S před aplikací Fentonova činidla z hloubek 0,5 – 2,5 m, AS7_1S před aplikací bakteriemi z hloubky 4,25 m a AS7_2S po aplikaci bakteriemi z hloubky 1,25 m (Obr. 13). Na tyto PCR produkty byl použit mix TaKara. PCR produkt AS26_1S z hloubky 0,75 - 1 m, 1,75 m, 2,25 m a 3,5 m byl dostatečně koncentrovaný. U vrtu AS26_1S z hloubky 0,5 m, 2 m, 1,5 m, byl PCR produkt málo koncentrovaný. U vrtu AS7_1S z hloubky 4,2 m byl PCR produkt málo koncentrovaný. U vrtu AS7_2S z hloubky 1,25 m byl PCR produkt málo koncentrovaný (Tabulka 16). U málo koncentrovaných vzorků se PCR zopakoval s přidáním jiného množství DNA do směsi.

Tab. 16. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem DNA do směsi (μl) | Objem nanášecího pufru (μl) | Detekce PCR produktu |
|--------|-----------|-------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|
| 1 | AS26s1 1B | 0,5 | 2 | 3 | - |
| 2 | AS26s1 1C | 0,75 | 2 | 3 | +++ |
| 3 | AS26s1 1D | 1 | 2 | 3 | ++ |
| 4 | AS26s1 2D | 2 | 2 | 3 | + |
| 5 | AS26s1 2B | 1,5 | 2 | 3 | + |
| 6 | AS26s1 2C | 1,75 | 2 | 3 | ++ |
| 7 | AS26s1 3A | 2,25 | 2 | 3 | +++ |
| 8 | AS26s1 4B | 3,5 | 2 | 3 | ++ |
| 9 | AS7s1 5A | 4,25 | 2 | 3 | - |
| 10 | AS7s2 2A | 1,25 | 2 | 3 | - |

- PCR produkt nebyl detekován
 + detekován PCR produkt o slabé intenzitě
 ++ detekován PCR produkt o střední intenzitě
 +++ detekován PCR produkt o silné intenzitě



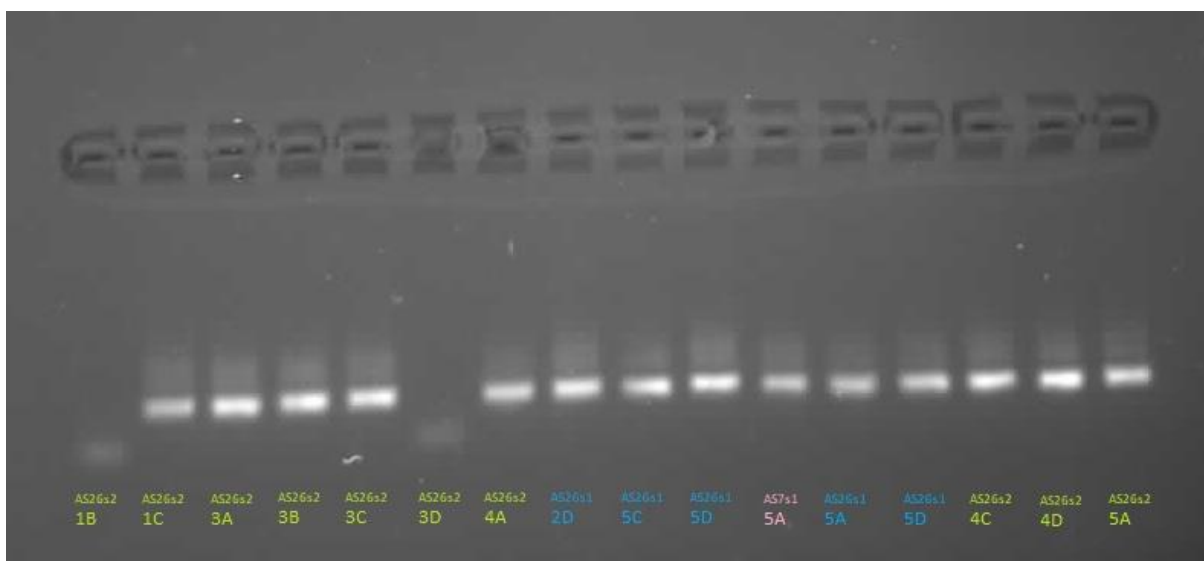
Obr. 14. PCR produkty z půdní DNA

Na agarozovém gelu jsou PCR produkty z vrtu AS26_1S před aplikací Fentonova činidla z hloubek 0 – 3,25 m, AS26_2S po aplikaci Fentonova činidla z hloubky 0 – 3,5 m a AS7_1S před inokulací bakteriemi z hloubky 4,25 m (Obr. 14). Na tyto PCR produkty byl použit mix TaKara. PCR produkt AS26_1S z hloubky 2,5 m, 3 m byl dostatečně koncentrovaný. PCR produkt AS26_2S z hloubky 0,25 m, 3,5 m a 1 – 1,5 m byl dostatečně koncentrovaný. U vrtu AS26_1S z hloubky 0,25 m, 2 m, 2,75 m a 3,25 m byl PCR produkt málo koncentrovaný. U vrtu AS26_2S z hloubky 0,5 – 0,75 m a 1,75 m byl PCR produkt málo koncentrovaný. U vrtu AS7_S z hloubky 4,25 m byl PCR produkt málo koncentrovaný (Tabulka 17). U málo koncentrovaných vzorků se PCR zopakoval s přidáním jiného množství DNA do směsi.

Tab. 17. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem DNA do směsi (μl) | Objem nanášecího pufru (μl) | Detekce PCR produktu |
|--------|-----------|-------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|
| 1 | AS26s1 1A | 0,25 | 1 | 3 | - |
| 2 | AS26s2 1A | 0,25 | 1 | 3 | +++ |
| 3 | AS26s2 4B | 3,5 | 1 | 3 | +++ |
| 4 | AS26s1 2D | 2 | 2 | 3 | - |
| 5 | AS26s1 3B | 2,5 | 2 | 3 | ++ |
| 6 | AS26s1 3C | 2,75 | 2 | 3 | - |
| 7 | AS26s1 3D | 3 | 2 | 3 | +++ |
| 8 | AS26s1 4A | 3,25 | 2 | 3 | + |
| 9 | AS7s1 5A | 4,25 | 2 | 3 | - |
| 10 | AS26s2 1B | 0,5 | 2 | 3 | - |
| 11 | AS26s2 1C | 0,75 | 2 | 3 | + |
| 12 | AS26s2 1D | 1 | 2 | 3 | ++ |
| 13 | AS26s2 2A | 1,25 | 2 | 3 | ++ |
| 14 | AS26s2 2B | 1,5 | 2 | 3 | ++ |
| 15 | AS26s2 2C | 1,75 | 2 | 3 | + |

- PCR produkt nebyl detekován
 + detekován PCR produkt o slabé intenzitě
 ++ detekován PCR produkt o střední intenzitě
 +++ detekován PCR produkt o silné intenzitě



Obr. 15. PCR produkt z půdní DNA

Na agarozovém gelu jsou PCR produkty z vrtu AS26_1S před aplikací Fentonova činidla z hloubek 2 – 5 m, AS26_2S po aplikaci Fentonova činidla z hloubky 0,5 – 4,25 m a AS7_1S před inokulací bakteriemi z hloubky 4,25 m (Obr. 15). Na tyto PCR produkty byl použit mix TaKara. PCR produkt AS26_1S z hloubky 2 m, 4,75 – 5 m, 4,25 m a 5 m byl dostatečně koncentrován. PCR produkt AS26_2S z hloubky 0,75 m, 2,25 – 2,75 m, 3,25 m, 3,75 – 4,25 m byl dostatečně koncentrován. PCR produkt AS7_S z hloubky 4,25 m byl dostatečně koncentrován. U vrtu AS26_2S z hloubky 0,5 m a 3 m byl PCR produkt málo koncentrován (Tabulka 18). U málo koncentrovaných vzorků se PCR zopakoval s přidáním jiného množství DNA do směsi.

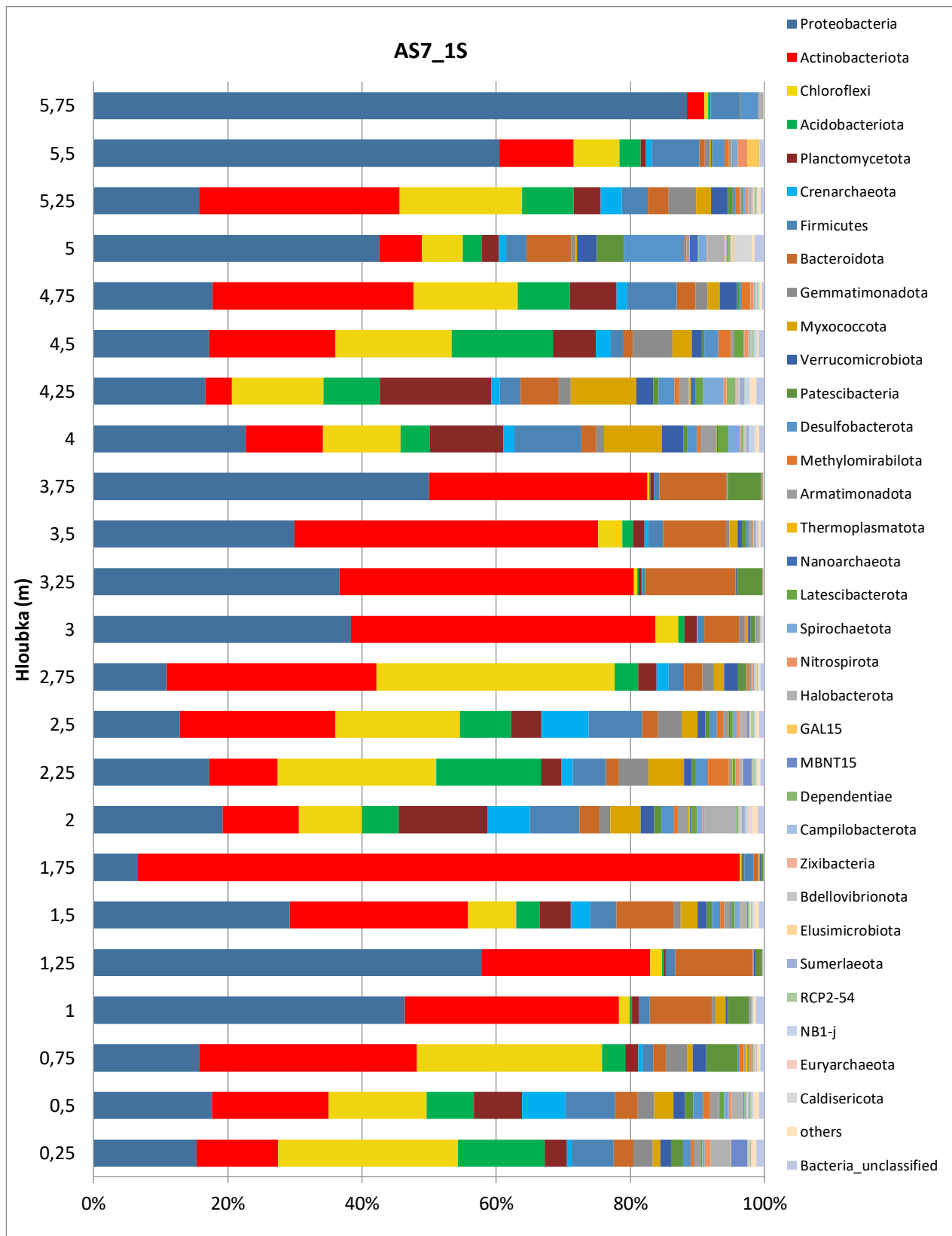
Tab. 18. Detekce půdní DNA

| Běh č. | Vzorek | Hloubka (m) | Objem DNA do směsi (μl) | Objem nanášecího pufry (μl) | Detekce PCR produktu |
|--------|-----------|-------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|
| 1 | AS26s2 1B | 0,5 | 3 | 3 | - |
| 2 | AS26s2 1C | 0,75 | 3 | 3 | +++ |
| 3 | AS26s2 3A | 2,25 | 3 | 3 | +++ |
| 4 | AS26s2 3B | 2,5 | 3 | 3 | +++ |
| 5 | AS26s2 3C | 2,75 | 3 | 3 | +++ |
| 6 | AS26s2 3D | 3 | 3 | 3 | - |
| 7 | AS26s2 4A | 3,25 | 3 | 3 | +++ |
| 8 | AS26s1 2D | 2 | 3 | 3 | +++ |
| 9 | AS26s1 5C | 4,75 | 3 | 3 | +++ |
| 10 | AS26s1 5D | 5 | 3 | 3 | +++ |
| 11 | AS7s1 5A | 4,25 | 3 | 3 | +++ |
| 12 | AS26s1 5A | 4,25 | 3 | 3 | +++ |
| 13 | AS26s1 5D | 5 | 3 | 3 | +++ |
| 14 | AS26s2 4C | 3,75 | 3 | 3 | +++ |
| 15 | AS26s2 4D | 4 | 3 | 3 | +++ |
| 16 | AS26s2 5A | 4,25 | 3 | 3 | +++ |

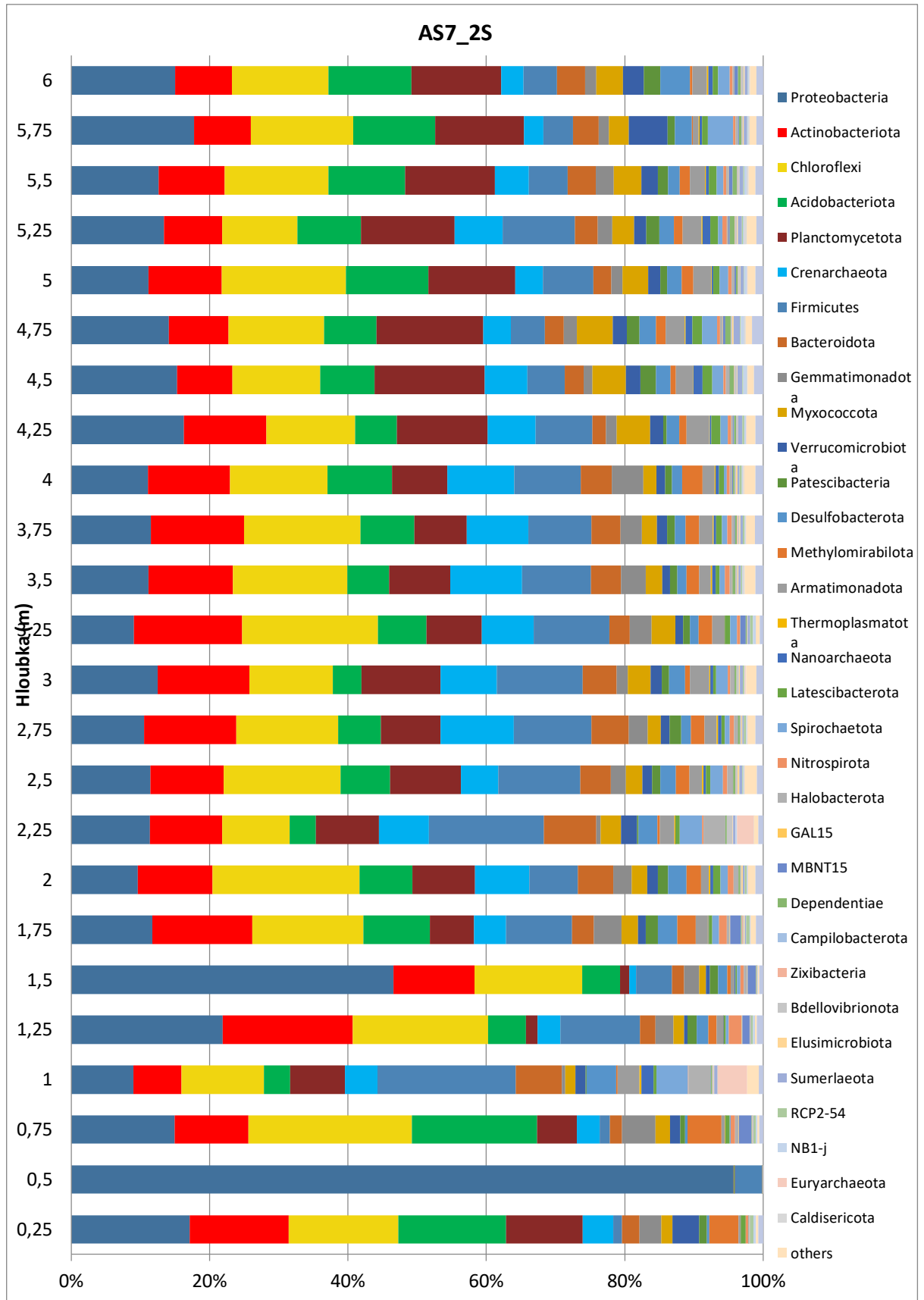
- PCR produkt nebyl detekován
 + detekován PCR produkt o slabé intenzitě
 ++ detekován PCR produkt o střední intenzitě
 +++ detekován PCR produkt o silné intenzitě

6.8. Sekvence DNA

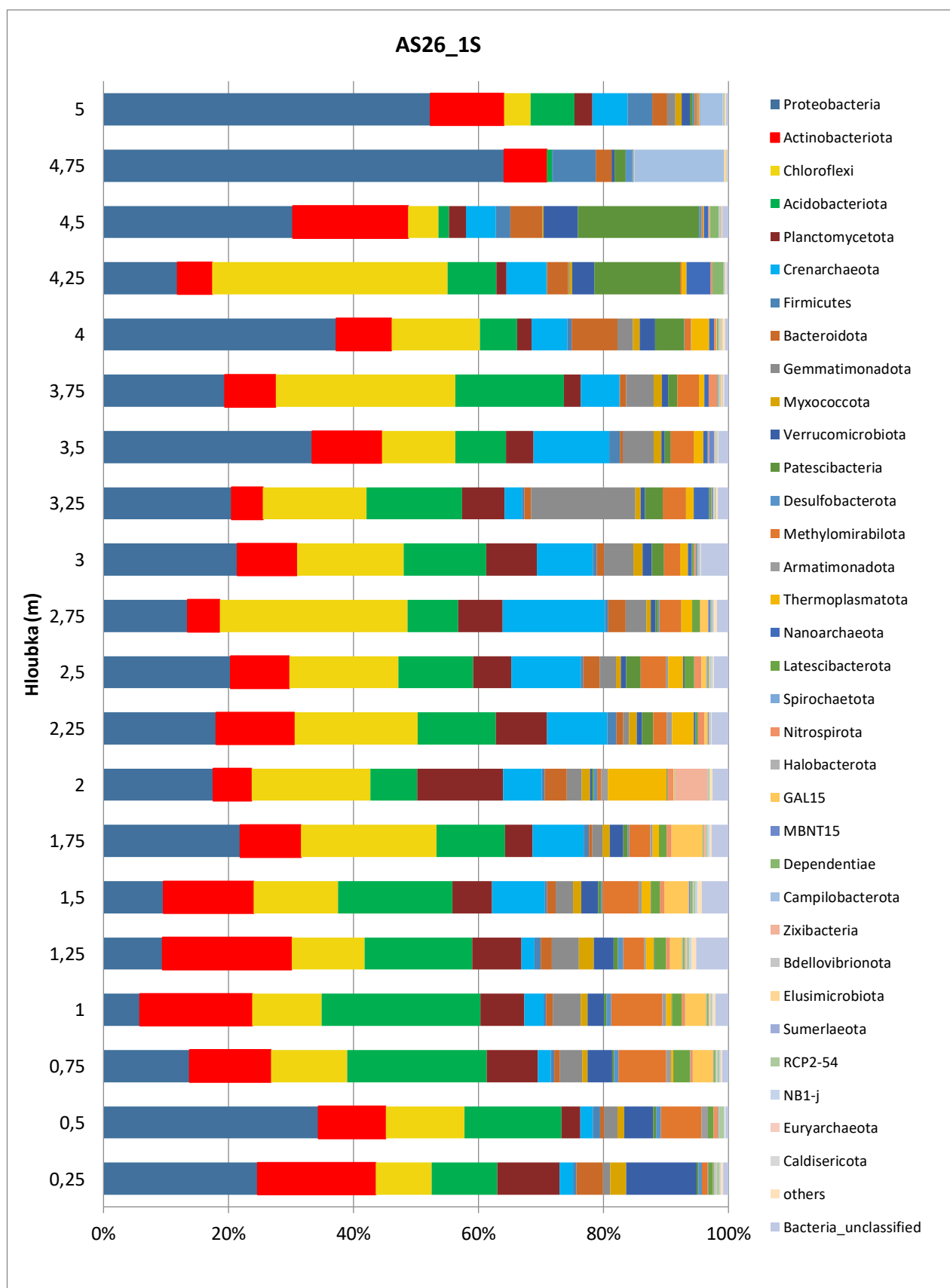
6.8.1. Phyla (kmeny)



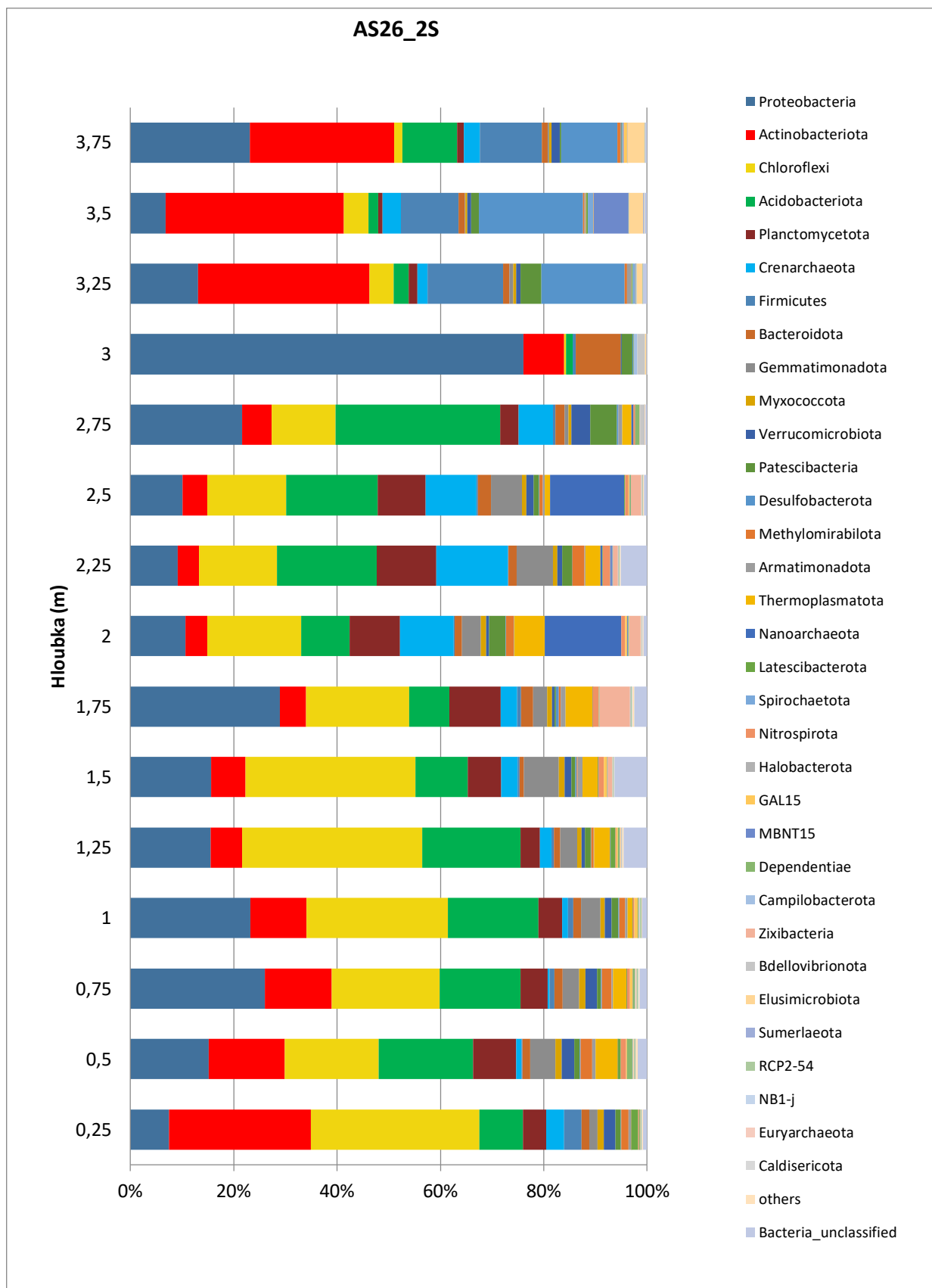
Graf. 16. Taxonomické zařazení do tříd v hloubkovém vrtu po ošetření bakteriemi AS7_1S.



Graf 17. Taxonomické zařazení do tříd v hloubkovém vrtu před ošetření bakteriemi AS7_2S.

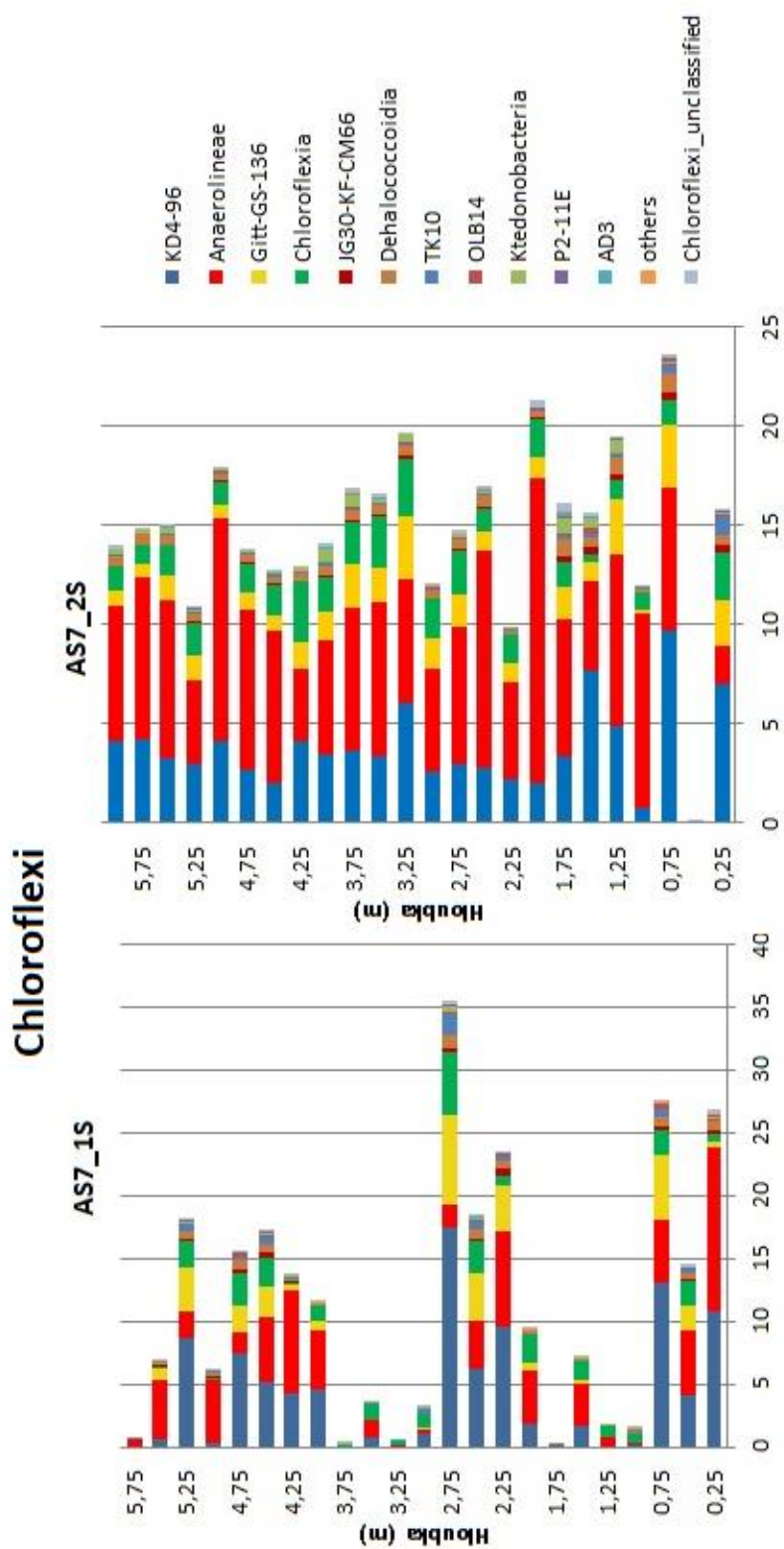


Graf 18. Taxonomické zařazení do třídy v hloubkovém vrtu před aplikací Fentonova činidla AS26_1S.



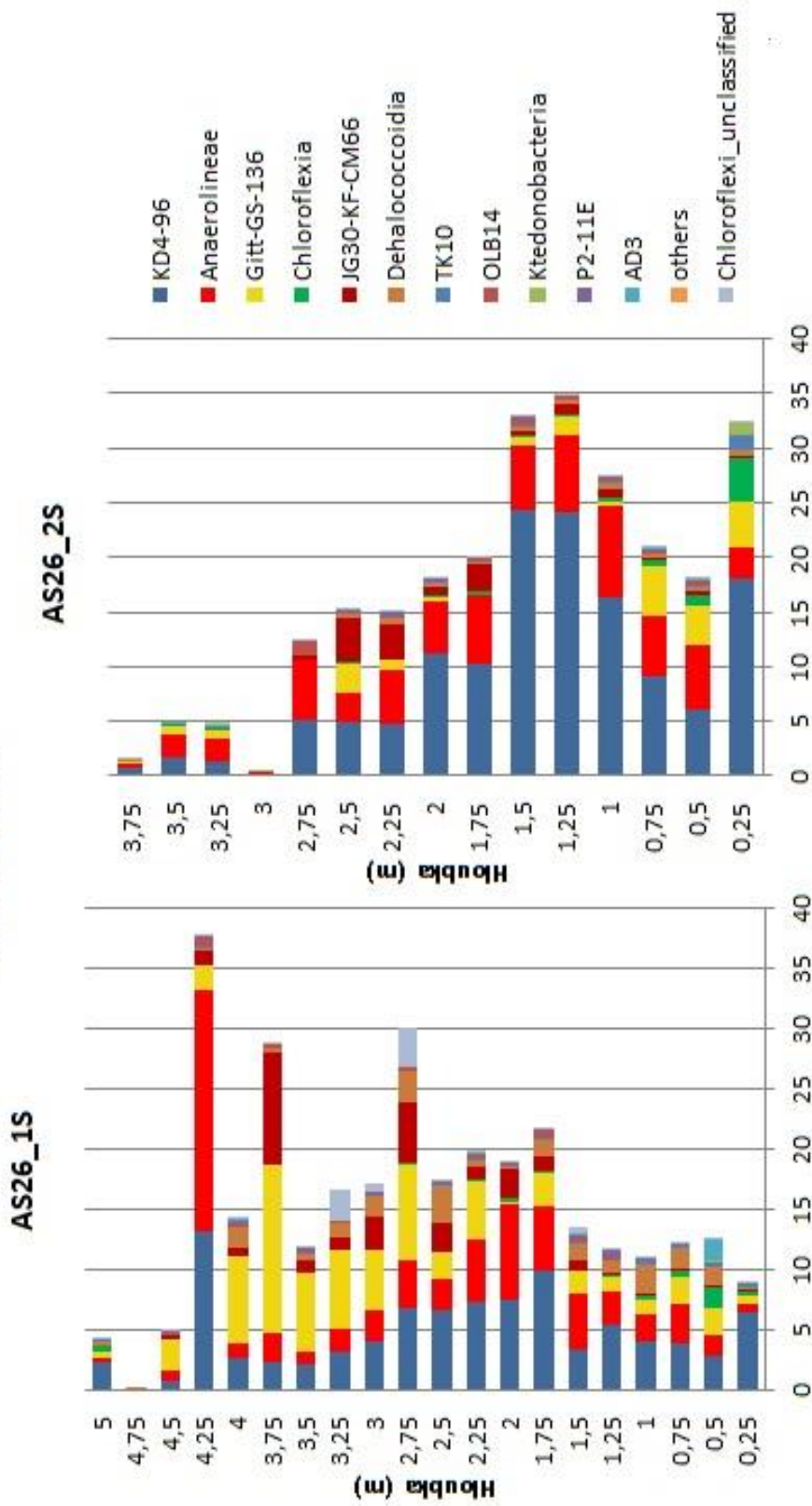
Graf 19. Taxonomické zařazení do tříd v hloubkovém vrtu po ošetření Fentonovým činidlem AS26_2S

6.8.2. Chloroflexi



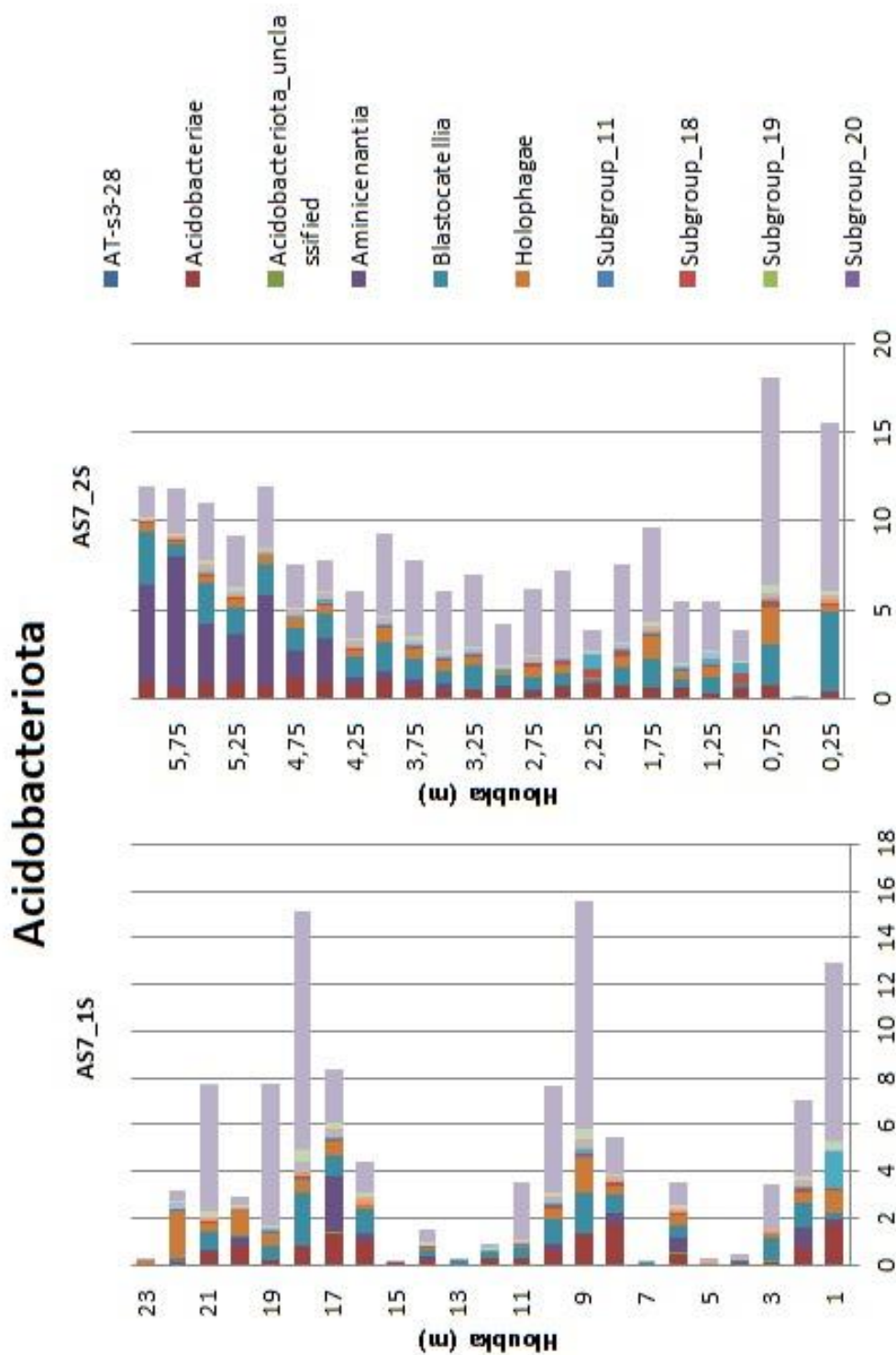
Graf 20. Taxonomické rozdělení kmenu Chloroflexi na řády v hloubkovém vrtu s bakteriemi

chloroflexi



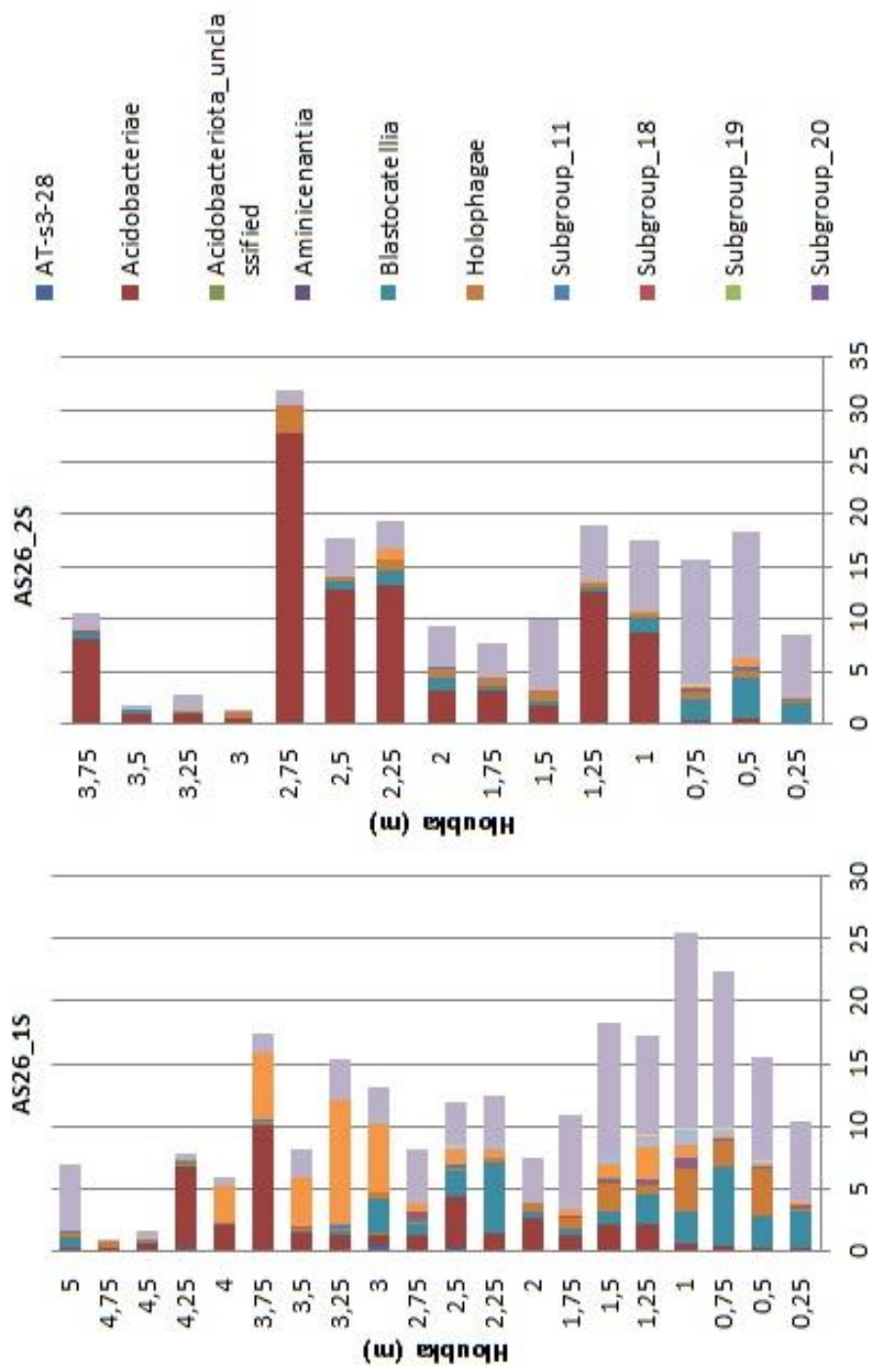
Graf 21. Taxonomické rozdělení kmenu Chloroflexi na řády v hloubkovém vrtu s Fentonovým činidlem

6.8.3. Acidobacteriota



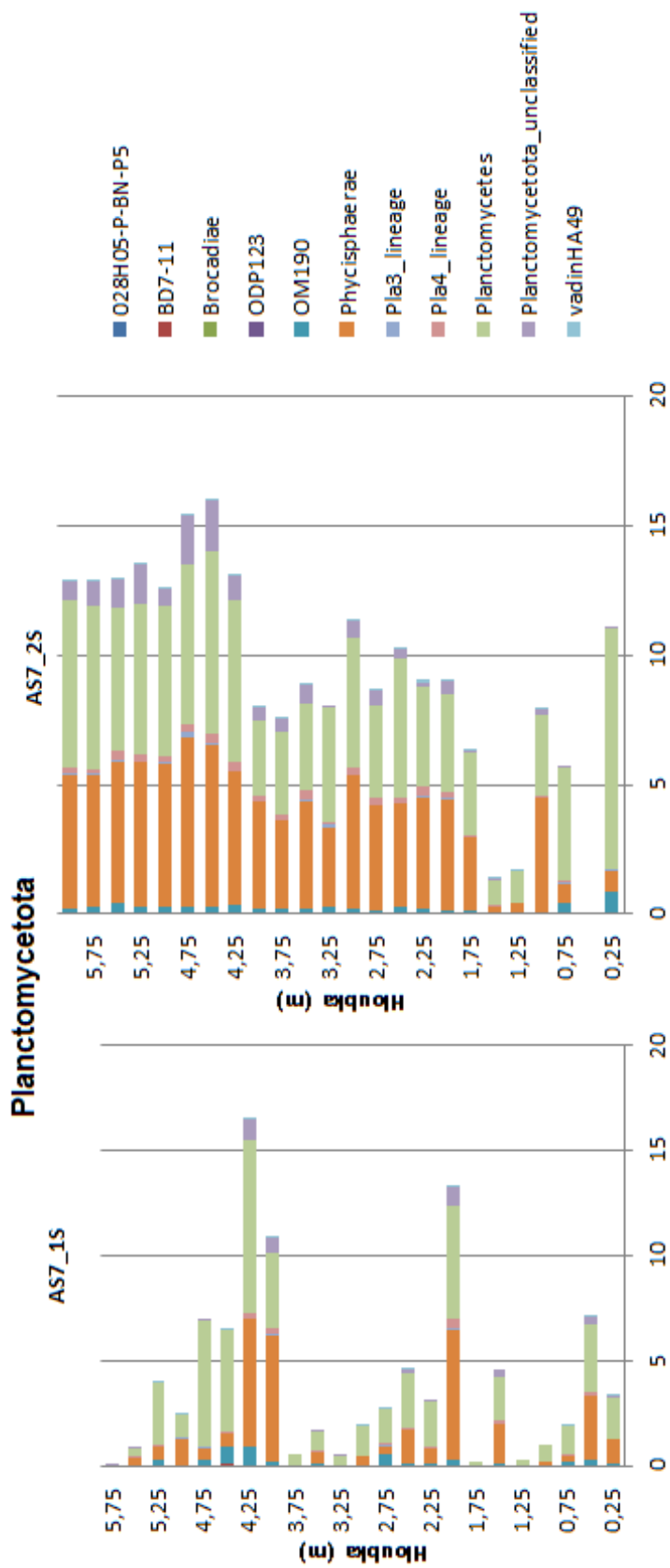
Graf 22. Taxonomické rozdělení kmenu Acidobacteriota na řády v hloubkovém vrtu s bakteriemi

Acidobacteriota

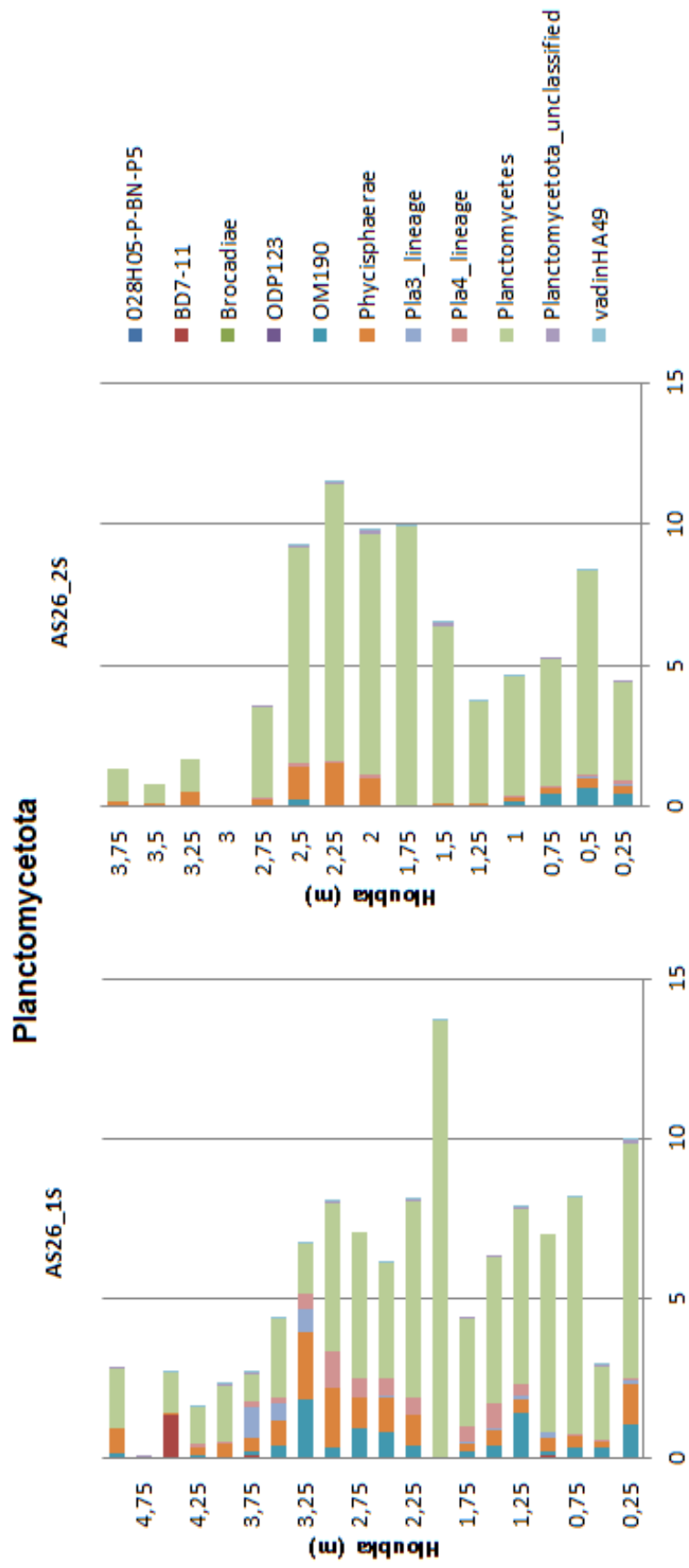


Graf 23. Taxonomické rozdělení kmenu Acidobacteriota na řády v hloubkovém vrtnu s Fentonovým činidlem

6.8.4. Planctomycetota



Graf 24. Taxonomické rozdělení kmenu Planctomycetota na řády v hloubkovém vrtu s bakteriemi



Graf 25. Taxonomické rozdělání kmenu Planctomycetota na řády v hloubkovém vrtu s Fentonovým činidlem

7. Diskuze

Na monitorované lokalitě byly provedeny dva hloubkové vrty, které se liší použitými remediačními metodami. Tyto vrty se nacházejí ve svažitém terénu, které mají rozdílnou hladinu spodní vody, na které se koncentrují kontaminující látky. Vrty jsou hodnocené před a po aplikaci dvou remediačních metod. AS26_s1 označuje vrt, kde se aplikovalo Fentonovo činidlo v roce 2013 a AS26_s2 označuje vrt, kde se Fentonovo činidlo aplikovalo v roce 2019. Tento vrt se nachází pod svahem a hladina podzemní vody se nachází v 7 m. AS7 označuje vrt, ve kterém dříve aplikovala remediační metoda pomocí Fentonova činidla a poté se začaly aplikovat bakterie, které mají už danou lokalitu dočišťovat. Vzhledem k zadržování kontaminace na hladině podzemní vody a k návaznosti i na saturovanou tak nesaturovanou zónu, je zapotřebí remediační postupy kombinovat (Camenzuli a Friedman, 2015). Tento vrt se nachází na svahu, kde se hladina vody nachází v 8 m. AS7_s1 se označuje vrt, ve kterém se aplikovali bakterie v roce 2013 a AS7_s2 označuje vrt, kde se aplikovala bakteriální inokula v roce 2019. Podle ústního sdělení nrtm. Plaché se měsíční úhrny srážek pohybovaly v roce 2019 v rozmezí od 19,2 mm v prosinci do 67,2 mm v srpnu. Je tedy zřejmé, že hladina podzemní vody se může během sezóny měnit. Postavení vrtů ve svahu a hladina podzemní vody ovlivňuje bakteriální a enzymovou aktivitu (Bardelli T., 2009).

Na zkoumané ploše klesala hladina spodních vod a došlo k vyplavení vodních kapes s kontaminací, což mělo vliv na koncentrace aromatických uhlovodíků C₁₀ - C₄₀ v různých půdních vrstvách. Nejvyšší úroveň kontaminace se naměřila u vrtu AS26_s1 před ošetřením Fentonovým činidlem v hloubce 4,25 m. Fentonovo činidlo jen mírně zasahuje do chemického složení půdy, zatímco u vrtu AS7 je kontaminace nižší díky prvotnímu předčištění Fentonovým činidlem. Vliv Fentonova činidla byl patrně omezen, protože v obou vrtech bylo půdní pH převážně neutrální, a to omezuje jeho účinnost, protože se aplikace ideálně provádí při kyselé půdní reakci pH 4 – 6. Chemická oxidace pomocí Fentonova činidla způsobuje destrukci kontaminujících látek rozpuštěných v podzemní vodě a nasorbovaných v horninovém prostředí tak, aby byly lépe přístupné pro následující biologické dočištění. Po aplikaci činidla se naměřily vyšší hodnoty dusíku a uhlíku než před aplikací, právě díky zminované chemické oxidaci (Camenzuli a Friedman, 2015).

Většina bakterií a hub preferuje spíše neutrální pH půdy. Dibble a Bartha (1979) uvádějí jako optimální pH hodnotu 7,8 pro mikroorganismy, které degradují ropné produkty v usazeninách. V našem případě se naměřené hodnoty pH pohybovaly v rozmezí 7,4 – 7,8, což splňuje optimální hodnoty pro biodegradaci. Naměřená kationtová výměnná kapacita se mezi vrty výrazně liší. Vyšší hodnoty jsou u vrtu AS7, kde mohou být způsobené předchozí chemickou oxidací. Jsou výhodné pro řízenou biodegradaci. Biodegradace je ovlivněna řadou dalších faktorů například teplotou, zásobeností kyslíkem, obsahem živin, schopností přežití degradujících mikroorganismů a dostupností kontaminantů jako potravy pro tyto organismy. Je tedy nutné vytvořit a udržovat na lokalitě optimální podmínky, tj. dostatek kyslíku a živin pro zdárný průběh biodegradace (Koshlaf a Ball, 2017).

Ve svrchní vrstvě půdy jednotlivých vrtů jsou aromatické uhlovodíky C₁₀ - C₄₀ často vázané jemným kořenovým systémem rostlin. (Aber a Mellilo 2001). Pro úspěšnou biodegradaci je nutná přítomnost dostatečného množství dusíku, protože dochází k nárůstu počtu mikroorganismů, které ho potřebují pro svůj růst (Moller a kol. 1996). V našich

podmínkách hodnoty dusíku klesly po aplikaci bakterií AS7_s2, což ukazuje, že aplikace byla úspěšná, protože inokulované bakterie začaly spotřebovávat dusík.

Extrace půdní DNA byla provedena několika postupy, protože u vrtu AS26 se opakovaně nepodařilo získat dostatečné množství čisté DNA. U vrtu AS7 s bateriemi byla úspěšně použita fenol-chlorová extrakce, ale pro kontaminované vzorky z vrtu AS26 ošetřené Fentonovým činidlem se ukázalo, že v tomto případě není vhodné používat metody založené na fenol-chloroformových metodách. Fentonovo činidlo se používá na širokou škálu polutantů, např. chlorovaná rozpouštědla, ropné uhlovodíky, BTEX, MTBE, fenoly, chlorofenolů, nitrofenolů, PAU (PAH), PCB, chlorbenzeny, organické pesticidy, muniční látky. (Huling a Pivetz 2006) To je způsobeno tím, že je fenol hydroxylovaný na hydrochinon a následně oxidovaný na chinon a alifatické kyseliny, které jsou relativně stabilní vůči působení hydroxylových radikálů (Yavuz et al. 2007). Pro extrakci půdní DNA z vrtu AS26 byla proto použita inovovaná metoda, ve které se přidává srážedlo GenEluteLPA (Brennerová et al. 2009, Selenská et al. 1991, Selenská-Pobell et al. 2001).

Zastoupení jednotlivých taxonomických skupin bakterií a enzymatická aktivita vykazuje ve sledovaných půdách prostorovou variabilitu. Enzymatická aktivita naznačuje, že činnost mikroorganismů klesá spolu s hloubkou vrtů (Enowashu et al. 2009, Fierer et al. 2003). Mezi horizonty AS26_a AS7 byl zaznamenán výrazný pokles bakteriální diverzity. Naměřená aktivita enzymu β -galaktosidázy ale vzrostla ve vrtu AS7 v hloubce 4,25 m, a v této hloubce zároveň vzrostl i obsah C. V cyklu C je β -galaktosidáza velmi důležitá, protože je jedním ze základních enzymů, které štěpí glykosidické vazby uhlovodíků. Produkty vzniklé hydrolyzou jsou potom důležitým zdrojem energie a uhlíku pro půdní mikroorganismy (Silva Gouveia, 2008), takže se zdá, že v této vrstvě probíhal rozklad kontaminovaných látek neaktivněji. Rozkladné procesy také zvyšují spotřebu, protože N jeho dostupnost totiž ovlivňuje růst a enzymatickou aktivitu a tím současně ovlivňuje i rychlost biodegradace ropných uhlovodíků (Lee and Levy 1989).

Půdní mikrobiom se po aplikaci remediačních metod u vrtů liší převážně v procentuálním zastoupení. U vrtu AS26 převažovaly kmeny Proteobacteria a Chloroflexi před i po aplikaci činidla. Výrazné změny naslaly v 0,25 – 2,75 m vrtu po aplikaci činidla AS26_s2, kde se zvýšil počet kmenu Chloroflexi a minimalizovalo se zastoupení kmenu Actinobacteriota. Ve 3 m vrtu došlo k velkému nárůstu Proteobactirií a kmen Chloroflexi téměř vymyzel. Poté nastal úbytek kmenu Proteobacter, Chloroflexi ve spodních vrstvách vrtu a začal převažovat kmen Actinobacteriota. Změny procentuálního zastoupení kmenů jsou ovlivněné remediačními technologiemi. Na domácí mikrobiální zormanitost má Fentonovo činidlo mírný dopad, snížilo se procentuální zastoupení (Liao et al. 2019). U vrtu AS7 se procentuální zastoupení před a po aplikaci bakterií výrazně liší. Před aplikací procentuálně převažují kmeny Proteobacteria a Actinobacteriota. Po aplikaci jsou bakterie ve vrtu AS7_s2 od 1,75 – 6 m převážně vyrovnané procentuálním zastoupením v každém kmenu. Ve vrchní části vrtu u 0,5m a 1,5 m převažuje kmen bakterií Proteobacteriota. Lze shrnout, že spodní část vrtu je ovlivněna aplikací bioremediační metody a zastoupení kmenů ve vrchní části pravděpodobně ovlivnil kořenový systém rostlin (Fierer et al. 2003).

8. Závěr

- Zvolené remediační opatření ISCO – *in situ* chemická oxidace s Fentonovým činidlem a bioremediace ovlivňuje půdní mikrobiom a aktivitu půdních mikroorganismů. Půdní vzorky, které byly hodnoceny před aplikací a po aplikaci remediačních metod tyto změny prokazují.
- Remediační metody jen mírně zasahují do chemického složení půdy. Po aplikaci činidla se naměřily větší hodnoty dusíku a uhlíku než před aplikací díky chemické oxidaci, která vzniká pomocí Fentonova činidla
- Remediační opatření ISCO – *in situ* chemická oxidace s Fentonovým činidlem bylo patrně omezeno ve vrtech AS26_s1 a AS26_s2, protože pH bylo naměřené převážně neutrální, ideální aplikace tohoto činidla se provádí při kyselém pH.
- Byly naměřeny optimální pH hodnoty pro biodegradaci mikroorganismy, optimální pH se uvádí převážně zásadité.
- Ukázalo, že Fentonovo činidlo není vhodné používat pro metody založené na fenol-chloroformových metodách. Fentonovo činidlo způsobí, že je fenol hydroxylovaný na hydrochinon a následně oxidovaný.
- Půdní mikrobiom se po aplikaci remediačních metod u vrtů liší převážně v procentuálním zastoupení jednotlivých taxonomických skupin.
- Mikrobiální zastoupení a enzymatická aktivita vykazuje v půdách prostorovou variabilitu.
- Byla potvrzena hypotéza, že remediační opatření ovlivní početnost a strukturu půdního mikrobiomu.

Literatura

Alvarez HM. 2010. Biology of Rhodococcus. Springer Heidelberg, Berlín. 2010.

Ambrož Z. 1986. Mikrobiologie (obecná část). VŠZ v Brně, Brno.

AQUATEST – Stavební geologie, a. s Johnson, R.L et al (2001): Diagnosis of In Situ Air Sparging Performance Using Transient Groundwater Pressure Changes during Startup and Shutdown, CRC Press.

Asante-Duah DK. 1996 Managing Contaminated Sites: Problem Diagnosis and Development of Site Restoration, Wiley, New York, NY.

Baldrian, P., 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. Plant, Soil Environ. 55, 370–378. doi:10.1007/s11104-008-9731-0

Bardelli T, Gómez-Brandón M, Ascher-Jenull J, Fornasier F, Arfaioli P, Francioli D, Egli M, Sartori G, Insam H, Pietramellara G. 2017. Effects of slope exposure on soil physico-chemical and microbiological properties along an altitudinal climosequence in the Italian Alps. Science of the Total Environment **575**:1041-1055.

Bayer P, Finkel M, Teutsch G. 2002. Reliability of hydraulic performance and cost estimates of barrier-supported pump-and-treat systems in heterogeneous aquifers, IAHS-AISH Publication **277**: 331–338.

Brennerová MV, Josefiová J, Brenner V, Pieper DH, Junca H. 2009. Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. Environmental Microbiology **11**:2216-2227.

Brusturean GA, Todinca T, Perju D, Carre J, Bourgos J. 2007. Soil clean up by venting: Comparing between modelling and experimental voc removal results. Environmental Technology **28**: 1153-1162.

Camenzuli D, Freidman BL. 2015. On-site and in situ remediation technologies applicable to petroleum hydrocarbon contaminated sites in the Antarctic and Arctic. Polar Research **34**:1-19.

ČSN EN 14039 Charakterizace odpadů – Stanovení obsahu uhlovodíků C₁₀-C₄₀ plynovou chromatografií, květen 2005.

Damek J 1987: Obecná geomorfologie. Academia. Praha.

Dibble JT, Bartha, R. 1979. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. Applied Environmental Microbiology **37**: 729-739.

- Enowashu E, Poll CH, Lamersdorf N, Kandeler E. 2009. Microbial biomass and enzyme activities under reduced nitrogen deposition in a spruce forest soil. *Applied Soil Ecology* **43**:11-21.
- Feng D, Lorenzen L, Aldrich C, Mare PW. 2001. Ex-situ diesel contaminated soil washing with mechanical methods. *Minerals Engineering* **14**:1093–1100.
- Fernandez M, Niqui-Arroyo JL, Conde S, Ramos JL, Duque AE. 2012. Enhanced tolerance to naphthalene and enhanced rhizoremediation performance for *Pseudomonas putida* KT2440 via the NAH7 catabolic plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* **18**:5104-5110.
- Fierer N, Schimel JP, Holden PA. 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry* **32**:167–176.
- He W, Chen HH, Liu F, Yang JF, Sun YY. 2009. Venting remediation of unsaturated soil contaminated by diesel hydrocarbon. Proc. 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Beijing, Jun 11-16, 2009, str. 5629.
- Head IM, Jones DM, Röling WFM. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology* **4**:173–182.
- Horáková D. 2006. Bioremediace. Masarykova univerzita Brno, Brno.
- Huling SG, Pivetz BE. 2006. In-Situ Chemical Oxidation. <http://stinet.dtic.mil/oai/oai?&verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA507297>
- Chlupáč I, Brzobohatý R, Kovanda J, Stráník Z. 2002. Geologická minulost České republiky. Academia, Praha.
- Illangasekare TH, Reible DD. 2001. Pump-and-Treat for Remediation and Plume Containment: Applications, Limitations, and Relevant Processes, Manuals and Reports on Engineering Practice, American Society of Civil Engineers **100**:79–119.
- ISO 11260. 1994. Standard of soil quality - Determination of effective cation exchange capacity and base saturation level using barium chloride solution. International Organization for Standardization.
- Jelínek J. 1984. Čáslav – I. etapa. Závěrečná zpráva o hydrogeologickém průzkumu v areálu VSB 0112 Čáslav. Stavební geologie, n. p. Praha.
- Jelínek J. (1999): Čáslav – sanační čerpání – Informační zpráva o sanačním čerpání na Čáslavském letišti v roce 1998.
- Jiao S, Chen W, Wei G. 2017. Biogeography and ecological diversity patterns of rare and abundant bacteria in oil-contaminated soils. *Molecular Ecology* **26**:5305-5317.

- Jyothsna S, Rahul TSK., Ramaprasad EVV, Sasikala C, Ramana ACV. 2013. *Arcobacter anaerophilus* nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **12**:4619-4625.
- Langhammer, J, Hartvich, F., Zbořil, A., 2010. *Metodika vymezení útvarů povrchových vod*. PřF UK, Praha.
- Lee K, Levy EM. 1989. Biodegradation of Petroleum in the Marine Environment and its Enhancement. In *Aquatic Toxicology and Water Quality Management*, Nriagu JA., John Wiley and Sons (ed), New York, 1989, s. 217-243.
- Liao X, Wu Z, Li Y, CAO H, Su C. 2019. Effect of various chemical oxidation reagents on soil indigenous microbial diversity in remediation of soil contaminated by PAHs. *Chemosphere* **226**:483-491.
- Madigan, MT. 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Macháčová, J. 2010. *Faktory ovlivňující intenzitu biodegradace leteckého petroleje v horninovém prostředí*, disertační práce. ČZU Praha.
- Marendiak D, Kopčanová Ľ, Leitgeb S. 1987. *Polnohospodárska mikrobiológia. Príroda*, Bratislava.
- Marchal R, Penet S, Solano-Serena F, Vandecasteele JP. 2003: Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology-Revue D IFP Energies Nouvelles* **58**:441-448.
- Melillo A, Aber JD. 2001. *Terrestrial Ecosystems*, Second edition, A Harcourt Science and Technology Company. San Diego, USA.
- Mísař Z.et. at. 1983. *Geologie ČSSR I. Český masiv*. SPN Praha, Praha.
- Moller J, Winther P, Lund B, Kirkebjerg K, Westermann P. 1996: Bioventing of diesel oil-contaminated soil: Comparison of degradation rates in soil based on actual oil concentration and on respirometric data. *Journal of Industrial Microbiology* **16**:110-116.
- Morton AC, Begg AP, Anderson GA, Takai S, Lämmle C, Browning GF. 2001. Epidemiology of *Rhodococcus equi* strains on Thoroughbred horse farms. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:2167-2175.
- Příbyl J. 2011. *Ministerstvo životního prostředí, Impax, spol. s r.o. Praha*.
- Rulík M, Holá V, Růžička F, Votava M. 2011. *Mikrobiální biofilmy*. Univerzita Palackého v Olomouci, 447 s.

Sagová-Marečková M., Čermák I., Novotná J., Plhačková K., Forstova J., Kopecký J. 2008. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 2902 – 2907

Sarouhan BJ. 1997. Monitoring microbial activity in elevated saline conditions. Proc. 4th International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. Book Series: Bioremediation Series **4**:359-364.

Selenská-Pobell S, Kampf G, Flemming K, Radeva G, Satchanska G. 2001. Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval. *Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology* **79**:149-161.

Selenská S, Klingmuller W. 1991. Direct detection of nif-gene sequences of *Enterobacter agglomerans* in soil. *FEMS microbiology letters - Federation of European Microbiological Societies* **80**:243-245.

Shahi A, Aydin S, Ince B, Ince O. 2016. Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. *Chemical Engineering Journal* **306**:60–66.

Siles JA, Margesin R. 2018. Insights into microbial communities mediating the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**:4409–4421.

Slouka J. 1999. Posouzení účinnosti sanačního čerpání – letiště Čáslav. *Vodní zdroje Holešov*.

Silva JC, Gouveia ER. 2008 Algumas propriedades de endoglucanases produzidas por *Streptomyces* spp. em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* **2**:60-70.

Šafařík Z, Princ I, Mička J. 2017. Únik ropných látek a jejich vliv na životní prostředí. *The Science for Population Protection* **2**:1-12.

Šimek M. 2003. *Základy nauky o půdě 3. Biologické procesy a cykly prvků*. Skriptum. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Theis TL, O'Carroll DM, Vogel DC, Lane AB, Collins K. 2003. Systems analysis of pump-and-treat groundwater remediation. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* **7**:177–181.

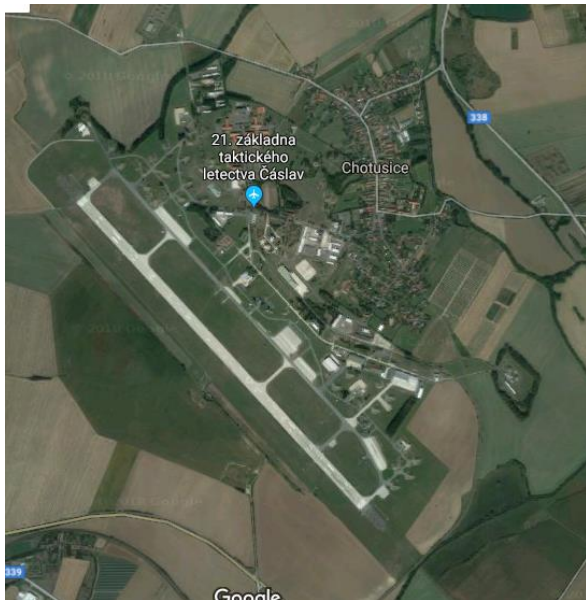
U.S. EPA, Method 3550C (SW-846). 2007a. Ultrasonic Extraction. Environmental Protection Agency, USA.

- Urum K, Pekdemir T, Gopur M. 2003. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. *Process Safety and Environmental Protection: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part B* **81**:203–209.
- Vaněk V, Němeček R., Najmanová J. 1997. Vliv stanoviště a způsobu hospodaření na obsahu minerálního a mineralizovaného dusíku v půdách. *Rostl. Výr.* **43**:463 – 471.
- Vaněk V. a kol. 2012. *Výživa zahradních rostlin*. Vyd. 1. Academia, Praha.
- Vodní zdroje Ekomonitor, spol. s r.o., 2013.
- Vojtková H. 2014. Pseudomonas: New Isolates of Metal Resistant Bacteria from the Anthropogenic Sediments of Settling Basins. *Technická univerzita v Košiciach, Košice*.
- VUSS Pardubice, (2001): *Analýza rizik související s rozsahem znečištění horninového prostředí a podzemní vody*, G-servis Praha spol. s r. o.
- Wiedemeier TH. 1998. Technical Protocol for Evaluating Natural Attenuation of Chlorinated Solvents in Ground Water. US EPA – EPA/600/R-98/128. Washington DC.
- Wu M, Li W, Dick WA, Ye X, Chen K, Kost D, Chen L. 2017. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleumcontaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere* **169**:124-130.
- Yavuz Y, Savas Koparal A, Bakur Öğütveren Ü. 2007. Phenol removal through chemical oxidation using fenton reagent. *Chemical Engineering & Technology* **30**: 583-586.
- Zheng C, Wang PP. 2002. A field demonstration of the simulation optimization approach for remediation system design. *Ground Water* **40**:258–265.

Seznam použitých zkratk a symbolů

- RL - vodropná látka
- NEL - nepolární extrahovaná látka
- ALPH - areál leteckých pohoných hmot
- LPH - letecké pohonné hmoty
- PAL - povrchově aktivní látky
- TOL - těkavá organická látka

Samostatné přílohy



Obr. 1. Zájmová lokalita



Obr. 2. Vykopané rozvody pro letecké palivo



Obr. 3. Vykopané nádrže s leteckým palivem



Obr. 4. Vybagrovávání kontaminované půdy



Obr. 5. Vykopané nádrže s leteckým palivem



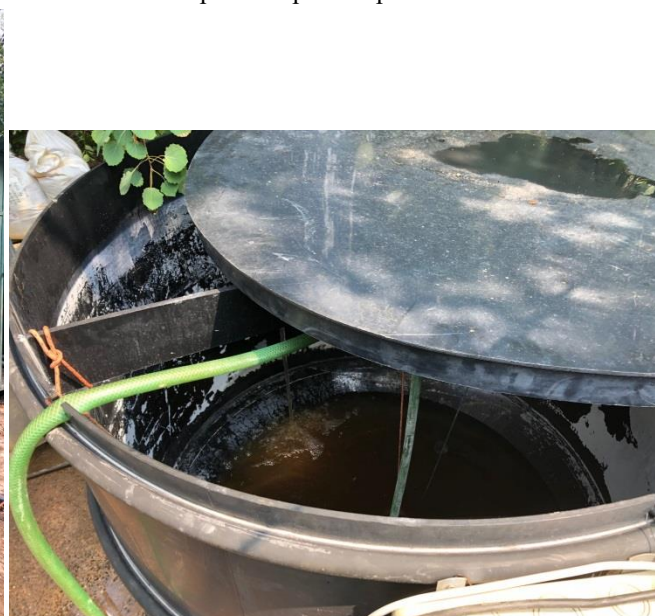
Obr. 6. Vybagrovaná kontaminovaná půda



Obr. 7. Aplikační potrubí pro Fentonovo činidlo



Obr. 8. Aplikační potrubí pro bakterie



Obr. 9, 10. Aplikační nádrž s bakteriemi



Obr. 11., 12. Vrtná souprava pro odběr vzorků před aplikací remediačních metod



Obr. 13, 14. Svrchní část hloubkového vrtu AS26_s1



Obr. 15. Vrtná souprava po aplikaci remediačních metod

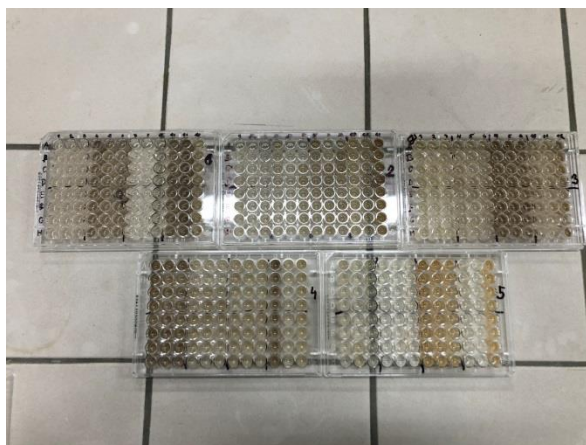
Obr. 16. Hloubkový vrt AS7_s2



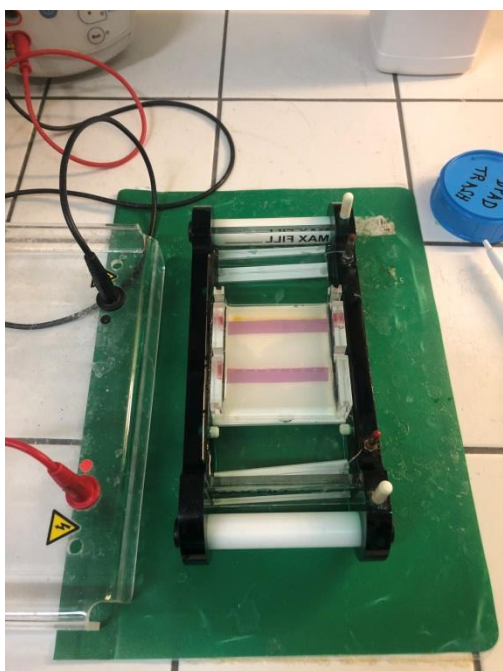
Obr. 17. Hloubkový vrt AS7_s2



Obr. 18. Homogenizér pro stanovení enzymové aktivity



Obr. 19. Aplikační destičky pro stanovení enzymové aktivity



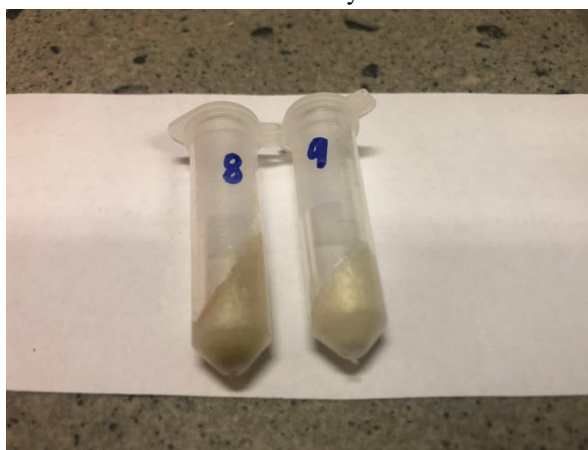
Obr. 20. Elektroforeza



Obr. 21. PCR Cycler



Obr. 22. PCR produkt z půdní DNA



Obr. 23. Sražená bílkovina pomocí GenEluteLPA