



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Vliv aplikace substrátu a nanoželeza na autochtónní mikroflóru kontaminované lokality

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály
Autor práce: **Bc. Denisa Vlková**
Vedoucí práce: Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Influence of substrate and nanoiron application on autochthonous microflora of contaminated site

Master thesis

Study programme: N3942 – Nanotechnology

Study branch: 3942T002 – Nanomaterials

Author: **Bc. Denisa Vlková**

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





Zadání diplomové práce

Vliv aplikace substrátu a nanoželeza na autochtou mikrobiální komunitu kontaminované lokality

Jméno a příjmení: **Bc. Denisa Vlková**
Osobní číslo: M17000155
Studijní program: N3942 Nanotechnologie
Studijní obor: Nanomateriály
Zadávací katedra: Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Akademický rok: **2018/2019**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na možnosti dekontaminace organických polutantů s využitím pokročilých analytických a molekulárně-genetických metod.
2. Seznámit se s možnostmi dekontaminace polutantů pomocí aplikace různých organických substrátů a nanoželeza.
3. Realizovat detailní fyzikálně-chemický a molekulárně-genetický monitoring konkrétní lokality.
4. Porovnat a zhodnotit vliv jednotlivých sanačních zásahů na autochtou mikrobiální komunitu i hlavní přítomné polutanty. Výsledky konfrontovat s doposud publikovanými fakty.
5. Vyhodnotit a interpretovat dosažené výsledky, vyvodit odpovídající závěry.

Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 40 – 60 stran
Forma zpracování práce: tištěná/elektronická



Seznam odborné literatury:

- [1] ALBERTS, B. a kol. Molecular Biology of the Cell. 5. vyd. New York: Garland Science, 2008, 1601 s. ISBN 978-0-8153-41055.
- [2] MUNSHI, A. DNA Sequencing – methods and applications. 1. vyd. Rijeka: InTech, 2012, 174 s. ISBN 978-953-51-0564-0.
- [3] POLLARD, T. D. a kol. Cell Biology. Elsevier – Health Sciences Division, 2007, 928 s. ISBN 9781416022558.
- [4] CHEREMISINOFF, Nicholas P, 2017. Groundwater remediation: a practical guide for environmental engineers and scientists. ISBN 978-1-119-40773-7.
- [5] DOLINOVÁ, I. a kol. Microbial degradation of chloroethenes: a review. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 22 s. ISSN 0944-1344.
- [6] ŠMARDA, J. a kol. Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 9788021038417.

Vedoucí práce: Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Datum zadání práce: 18. října 2018
Předpokládaný termín odevzdání: 30. dubna 2019

L. S.

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

Ing. Josef Novák, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Liberci 18. října 2018

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

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

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že texty tištěné verze práce a elektronické verze práce vložené do IS STAG se shodují.

29. 4. 2019

Bc. Denisa Vlková

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Mgr. Ing. Lukášovi Dvořákovi, Ph.D. za řádné vedení a pomoc se zpracováním odborného textu. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Mgr. Ivě Dolinové, Ph.D. za odborné konzultace k molekulární genetice. Poděkování patří i Ing. Magdě Nechanické, Mgr. Kristýně Markové a Ing. Jaroslavu Noskovi, Ph.D. za poskytnutí odborných materiálů. V neposlední řadě chci ze srdce poděkovat přáteli, své rodině a pracovnímu týmu za podporu, trpělivost a péči.

Nakonec bych chtěla poděkovat Technické univerzitě v Liberci (TUL) za možnost uskutečnění této práce.

Abstrakt

Cílem předkládané diplomové práce je detailní studium vlivu rozdílných sanačních zásahů na autochtonní mikroflóru přítomnou na lokalitách kontaminovaných chlorovanými eteny (CIE). Monitorovány a následně diskutovány jsou nejen vlivy vlastních sanačních zásahů a jejich účinnost dekontaminace přítomných organických polutantů, ale zejména jejich vliv na autochtonní mikroflóru.

Výsledky této diplomové práce popisují vliv sanačního zásahu na lokalitě, který byl studován s primárním využitím pokročilých molekulárně genetických metod, chemické analýzy a fyzikálně-chemických parametrů. Mezi využití molekulárně genetické metody patří polymerázová řetězová reakce (real-time PCR nebo qPCR) a pokročilé sekvenační metody, konkrétně sekvenování nové generace (NGS). Kromě mikrobiálního složení byla s cílem získu kompletních informací o dané lokalitě v pravidelných intervalech analyzována podzemní voda. DNA byla izolována z biomasy koncentrované pomocí filtrace. Vliv aplikací substrátu nebo nanoželeza (nZVI) na autochtonní mikroflóru byl hodnocen pomocí qPCR analýzy specifické biomasy s biodegradabilním potenciálem chlorovaných sloučenin, pomocí pokročilých sekvenačních metod i pomocí fyzikálně-chemických dat.

Výstupem diplomové práce je zhodnocení vlivu aplikace substrátu nebo nZVI na přítomnou mikroflóru lokality, kdy molekulárně genetické výsledky jsou kombinovány s fyzikálně-chemickými parametry pro doplnění komplexního přehledu o daném zásahu. Praktickým dopadem je zhodnocení biodegradabilního potenciálu lokality a predikce vlivu sanačního zásahu.

Klíčová slova:

autochtonní mikroflóra, CIE, DNA, chlorované eteny, kontaminovaná lokalita, molekulární genetika, monitoring, nZVI, podzemní voda, substrát, real-time kvantitativní PCR

Abstract

The diploma thesis is focused on a detailed study of effect of different remediation processes on autochthonous microflora which is present on a locality contaminated by chlorinated ethenes (CIE). The removal efficiency of organic pollutants as well as impact on autochthonous microflora caused by individual remediation processes are monitored and discussed.

Results of this theses describe effect of remediation intervention on a locality, which was primarily studied using advanced molecular genetics methods, chemical analysis and physico-chemical parameters. As molecular genetic methods, the Polymerase Chain Reaction (real-time PCR or qPCR) and advanced sequencing method Next-Generation Sequencing (NGS), were used. The effect of substrate or nanoiron (nZVI) application on autochthonous microflora was evaluated by qPCR analysis of specific biomass with the CIE biodegradation potential. Besides microbial composition, the chemical composition of groundwater was also analysed to obtain complete information on locality. The DNA was extracted from biomass which was concentrated by filtration of the groundwater.

The main outcome of this diploma thesis is a complex evaluation of substrate or nZVI application effect on a microflora which is present on a locality. The molecular genetics analyses are combined with advanced analytical methods for complete overview about the remediation process. The practical repercussion is an evaluation of biodegradation potential on a locality and the remediation intervention effect prediction.

Keywords:

autochthonous microflora, CIE, DNA, chlorinated ethenes, contaminated site, molecular genetics, monitoring, nZVI, groundwater, real-time quantitative PCR, substrate

Obsah

1	Úvod.....	14
2	Teoretická část.....	16
2.1	Formy znečištění životního prostředí.....	16
2.2	Bakterie ve vztahu k životnímu prostředí.....	16
2.3	Sanační technologie.....	18
2.3.1	Biodegradace chlorovaných etenů.....	19
2.3.2	Sanační zásah.....	20
2.4	Monitoring podzemní vody.....	21
2.5	Metody molekulární genetiky.....	22
2.5.1	Izolace DNA.....	23
2.5.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
2.5.3	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-time PCR).....	24
2.5.4	Elektroforéza.....	25
2.5.5	Sekvenování nové generace (NGS).....	26
3	Experimentální část.....	28
3.1	Monitorované lokality.....	28
3.1.1	Lokalita Spolchemie.....	28
3.1.2	Lokalita Nový Bydžov.....	29
3.2	Laboratorní testy za účelem výběru sanačního činidla.....	29
3.2.1	Testy v rámci lokality Spolchemie.....	30
3.2.2	Test v rámci lokality Nový Bydžov.....	31
3.3	Sanační zásah na lokalitách.....	31
3.3.1	Lokalita Spolchemie.....	31
3.3.2	Lokalita Nový Bydžov.....	33
3.4	Metodika molekulárně genetických analýz.....	35
3.4.1	Izolace a stanovení DNA.....	35

3.4.2	Real-time polymerázová řetězová reakce (qPCR)	35
3.4.3	Sekvenování nové generace (NGS).....	37
3.5	Ostatní analýzy	39
3.5.1	Fyzikálně-chemické parametry.....	39
3.5.2	Stanovení koncentrace chlorovaných etenů	39
4	Výsledky a diskuze	40
4.1	Lokalita Spolchemie.....	40
4.1.1	Laboratorní testy – výběr sanačního činidla	40
4.1.2	Sanační zásah.....	41
4.1.3	Fyzikálně-chemické parametry.....	42
4.1.4	Chemická analýza.....	43
4.1.5	Molekulárně genetická analýza.....	44
4.2	Lokalita Nový Bydžov	50
4.2.1	Laboratorní testy – výběr sanačního činidla	50
4.2.2	Sanační zásah.....	50
4.2.3	Fyzikálně-chemické parametry.....	51
4.2.4	Chemická analýza.....	53
4.2.5	Molekulárně genetická analýza - qPCR	56
4.2.6	Molekulárně genetická analýza - NGS.....	62
5	Závěr	66
	Literatura.....	68

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Bioremediační strategie lokalit o různých parametrech	18
Obrázek 2 – Enzymy účastnící se biodegradace chlorovaných etenů, včetně jednotlivých meziproduktů	20
Obrázek 3 - Princip metody PCR - schéma prvního cyklu s teplotními fázemi	24
Obrázek 4 – Ukázka detekce fluorescenčního signálu v real-time PCR termocykleru	25
Obrázek 5 - Princip metody NGS na platformě Ion Torrent.....	27
Obrázek 6 – Schéma metody direct-push pro aplikaci sanačního činidla na lokalitě.....	32
Obrázek 7 – Mapa sanované části lokality Spolchemie s vyznačením směru toku podzemní vody	33
Obrázek 8 – Mapa lokality Nový Bydžov – centrum kontaminace v okolí areálu Kovoplast	34
Obrázek 9 – Stručné schéma izolace DNA.....	35
Obrázek 10 – Relativní kvantifikace celkové bakteriální biomasy (marker U16SRT) v čase.....	46
Obrázek 11 – Relativní kvantifikace VC reduktázy (enzym <i>bvcA</i>) v čase.....	47
Obrázek 12 – Relativní kvantifikace VC reduktázy (enzym <i>vrA</i>) v čase.....	47
Obrázek 13 – Relativní kvantifikace <i>Dehalococcoides</i> sp. (DHC-RT) v čase	48
Obrázek 14 – Relativní kvantifikace <i>Desulfitobacterium</i> sp. (Dsb) v čase.....	48
Obrázek 15 – Relativní kvantifikace <i>Dehalobacter</i> sp. (Dre) v čase.....	49
Obrázek 16 – Relativní kvantifikace celkové bakteriální biomasy (marker U16SRT) v čase.....	58
Obrázek 17 – Relativní kvantifikace VC reduktázy (enzym <i>bvcA</i>) v čase.....	59
Obrázek 18 – Relativní kvantifikace VC reduktázy (enzym <i>vrA</i>) v čase.....	59
Obrázek 19 – Relativní kvantifikace <i>Dehalococcoides</i> sp. (DHC-RT) v čase	60
Obrázek 20 – Relativní kvantifikace <i>Desulfitobacterium</i> sp. (Dsb) v čase.....	60
Obrázek 21 – Relativní kvantifikace <i>Dehalobacter</i> sp. (Dre) v čase.....	61
Obrázek 22 – Časová osa vybraných odběrů pro NGS analýzu. Modrá – MR-5, zelená – ZMS-5 a červená – aplikace syrovátky.	62
Obrázek 23 – Bakteriální diverzita na úrovni čeledě s relativní četností nad 3 %. Dup – duplikát.....	63
Obrázek 24 – Vývoj bakteriální diverzity na úrovni čeledí s relativní četností vyšší než 3 %. Červená šipka – aplikace syrovátky.....	64

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Přehled testovaných mZVI.....	30
Tabulka 2 – Přehled použitých prumerů.....	36
Tabulka 3 – Přehled prumerů pro amplifikaci knihovny.....	37
Tabulka 4 – Přehled odběru vzorků lokality Spolchemie.....	41
Tabulka 5 – Hladina podzemní vody v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	42
Tabulka 6 – Hodnoty pH v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	42
Tabulka 7 – Oxidačně redukční potenciál v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	42
Tabulka 8 – Vodivost v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	43
Tabulka 9 – Koncentrace PCE v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	43
Tabulka 10 – Koncentrace TCE v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	43
Tabulka 11 – Suma koncentrací DCE v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	44
Tabulka 12 – Koncentrace VC v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	44
Tabulka 13 – Koncentrace etenu v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	44
Tabulka 14 – Koncentrace metanu v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	44
Tabulka 15 – Objem podzemní vody v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	45
Tabulka 16 – Koncentrace DNA normalizovaná na vstupní objem v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	45
Tabulka 17 – Přehled odběru vzorků lokality Nový Bydžov.....	51
Tabulka 18 – Hladina podzemní vody v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	52
Tabulka 19 – Hodnoty pH v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	52
Tabulka 20 – Oxidačně redukční potenciál v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	52
Tabulka 21 – Vodivost v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	53
Tabulka 22 – Koncentrace PCE v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	54
Tabulka 23 – Koncentrace TCE v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	54
Tabulka 24 – Suma koncentrací DCE v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	55
Tabulka 25 – Koncentrace VC v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	55
Tabulka 26 – Koncentrace etenu v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	55
Tabulka 27 – Koncentrace metanu v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	56
Tabulka 28 – Objem podzemní vody v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	57
Tabulka 29 – Koncentrace DNA normalizovaná na vstupní objem v jednotlivých monitorovaných vrtech.....	57

Seznam zkratek

A	adenin
bp	báze (<i>basis points</i>)
<i>bvcA</i>	označení primeru detekujícího gen vinylchlorid reduktázy
C	cytosin
CIE	chlorované eteny
CMC	karboxymethylcelulóza
DC	stejnsměrný elektrický proud (<i>direct current</i>)
DCE	1,1-dichloreten, trans-1,2-dichloreten nebo cis-1,2-dichloreten
DHC-RT	označení primeru detekujícího 16S rDNA gen bakteriálního rodu <i>Dehalococcoides mccartyi</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfát (<i>2'-deoxyribonucleoside-5'-triphosphate</i>)
Dre	označení primeru detekujícího 16S rDNA gen bakteriálního rodu <i>Dehalobacter sp.</i>
Dsb	označení primeru detekujícího 16S rDNA gen bakteriálního rodu <i>Desulfitobacterium sp.</i>
dsDNA	dvouvláknová DNA (<i>double-stranded DNA</i>)
G	guanin
GC	plynový chromatograf (<i>gas chromatography</i>)
emPCR	emulzní PCR
MNA	monitorovaná přirozená atenuace (<i>monitored natural attenuation</i>)
MS	hmotnostní spektrometr (<i>mass spectrometry</i>)
MSJ	detergent anionický tenzid
mRNA	informační (mediátorová, messenger) RNA
mZVI	mikroželezo (<i>microscale zerovalent iron</i>)
NGS	sekvenační metody nové generace (<i>Next-generation sequencing</i>)
nZVI	nanoželezo (<i>nanoscale zerovalent iron</i>)
ORP	oxidačně redukční potenciál (<i>oxidation reduction potential</i>)
OTU	provozní taxonomická jednotka (<i>operational taxonomic unit</i>)
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCE	tetrachloreten (perchloreten)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PHB	polyhydroxybutyrát

qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
R	purinové báze (A, G)
rDNA	ribosomální DNA
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
S	báze se 3 vodíkovými vazbami (G, C)
ssDNA	jednovláknová DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
T	thymín
TCE	trichloreten
U16SRT	označení primeru detekujícího bakteriální 16S rDNA gen
USA	Spojené státy americké (<i>United States of America</i>)
VC	vinylchlorid
<i>vrA</i>	označení primeru detekujícího gen vinylchlorid reduktázy
Y	pyrimidinové báze (C, T)

1 Úvod

Znečištění půdy a vody, včetně té podzemní, je závažný environmentální a společenský problém. Úroveň znečištění se v minulých letech řešila jen v omezeném měřítku, a tak se do okolí nejen průmyslových center dostalo značné množství, mnohdy nebezpečných, polutantů. Jejich akumulace v čase rostla a ovlivnila chemické i biologické poměry přírodního prostředí, a to až na úroveň zdraví člověka.

V současné době existuje již celá řada opatření, jak zamezit šíření znečištění v prostředí či jak tuto kontaminaci efektivně snižovat. Existuje široké spektrum metod používaných pro biodegradaci přítomných polutantů. Nejčastěji se jedná o využití přirozeného společenství mikroorganismů a jejich stimulaci pro biodegradaci kontaminantů. Biologické metody jsou navíc v porovnání s chemickými metodami mnohem šetrnější k životnímu prostředí.

Samotné bioremediační techniky mají velký potenciál na lokalitách, kde je příznivé jak bakteriální oživení, tak i geologické poměry. Je důležité sledovat tyto aspekty společně s chemickým složením a fyzikálními parametry pro kompletní analýzu plánovaného sanačního zásahu a jeho efektivitu. Ten zahrnuje aplikaci různých činidel, nejlépe bio činidel, za účelem remediace lokality. Zároveň je žádoucí, aby všechny plánované aplikační techniky byly předem otestovány a aby proběhl výběr nejefektivnějšího činidla dle potřeb lokality s ohledem na jejich možné vedlejší účinky.

Pro efektivní bioremediaci lokality je esenciální znalost metabolismu specifických bakterií nebo vybraných enzymů, dále důsledné dodržování techniky odběru vzorků, jejich skladování a zpracování především v rámci biologických analýz.

Pro účely diplomové práce byly vybrány dvě různé lokality s velmi obdobnou kontaminací jedním z nejběžnějších kontaminantů světa, chlorovanými eteny (CIE). V každé z lokalit byl plánován jiný sanační zásah, a to aplikace substrátu nebo nanoželeza (nZVI) z důvodu rozdílného prostředí. S ohledem na odlišné biologické, chemické i geologické aspekty není možné lokality mezi sebou porovnávat.

Cíle práce

Předkládaná diplomová práce má za úkol řešit problematiku sanačních technologií na kontaminované lokalitě a možnosti rozkladu přítomných polutantů za současného využití bioremediačních metod. Parciální cíle diplomové práce jsou:

- navrhnout plán dlouhodobého monitoringu na reálných lokalitách,
- realizovat aplikace substrátu pro stimulaci přirozených bioremediačních procesů nebo nanoželeza na vybrané kontaminované lokalitě,
- pravidelně odebírat vzorky dle předem sestaveného harmonogramu,
- stanovit vliv jednotlivých sanačních zásahů na autochtonní mikroflóru pomocí molekulárně genetických analýz,
- komplexně zhodnotit dosažené výsledky fyzikálně-chemických analýz společně s výsledky zacílenými na změny autochtonní mikroflóry.

2 Teoretická část

2.1 Formy znečištění životního prostředí

Kvalita životního prostředí je důležitý aspekt všeho živého. Únik kontaminantů do životního prostředí zapříčiňuje jeho znečištění a posléze i ovlivnění života organismů v něm se vyskytujících, včetně zdraví člověka a jeho kvality života.

Velký společenský a environmentální problém představují, kromě celé řady dalších složek, znečištěné půdy a podzemní vody. Půda souvisí se zemědělskými aktivitami, podzemní voda může ovlivnit povrchové toky a dokonce být zdrojem pitné vody. Oba zmiňované fakty mají tedy přímý vliv na zdraví člověka. Průmyslové i zemědělské aktivity, zejména však nadměrná aplikace nejrůznějších chemických přípravků, v minulosti ovlivnily kvalitu podzemní vody na mnoha územích, včetně těch osídlených (Cheremisinoff 2017; Alberts 2008).

Mezi nejrozšířenější polutanty na světě patří ropa a benzín (BTEX), chlorované sloučeniny, hexachlorocyklohexany (HCH) a další organické sloučeniny. Znečištění je tedy způsobeno různými zdroji kontaminace. Průmyslový rozvoj a urbanizace doprovázené spotřebou ropy způsobily úniky ropného oleje, které vedly k závažné kontaminaci území směsí nejrůznějších uhlovodíků, včetně alkanů a aromatických sloučenin. Oproti tomu hexachlorocyklohexany se dříve běžně užívaly jako pesticidy na zemědělsky důležitých plodinách a v lesnictví. Průmysl způsobil kontaminaci jedním z nejstabilnějších polutantů, a to chlorovanými eteny (CIE). Jejich stabilita je dána silnou kovalentní vazbou mezi uhlíkem a chlórem. Přírozená biodegradace CIE bývá na kontaminovaných lokalitách běžně popisována. Problémem přírozené biodegradace může být nahromadění vinyl-chloridu (VC), který je nejhůře rozložitelným meziproduktem. Významnou komplikací je jeho vysoká toxicita, která přesahuje i toxicitu všech ostatních produktů rozpadové řady (Alberts 2008; Cheremisinoff 2017; Pollard et al. 2008).

2.2 Bakterie ve vztahu k životnímu prostředí

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryontní mikroorganismy, které se vyskytují téměř ve všech přírodních prostředích, a to včetně oblastí s méně příhodnými podmínkami pro život.

Bakterie se reprodukuje pomocí buněčného dělení, tedy procesem, kdy se mateřská buňka rozdělí na dvě dceřiné prostřednictvím replikace DNA a následné separace buňky s kompletním genomem. Tato reprodukce je asexuální, protože nedochází k výměně

genetické informace, jen k její kopii. Oproti tomu během sexuální reprodukce dochází k přeskupení genů pro vzrůst genetické diverzity. Genetická variabilita je zvyšována horizontálním transferem extrachromosomové DNA. Transfer genů mezi bakteriemi může při sexuální reprodukci probíhat prostřednictvím absorpce nechráněné DNA, jejím přesunem ve virových partikulích nebo transferem mezi buňkami. Tato reprodukce je zároveň náchylnější na vznik mutací během přenosu DNA, a to velmi efektivně (Alberts 2008; Pollard et al. 2008; Clark a Pazdernik 2013).

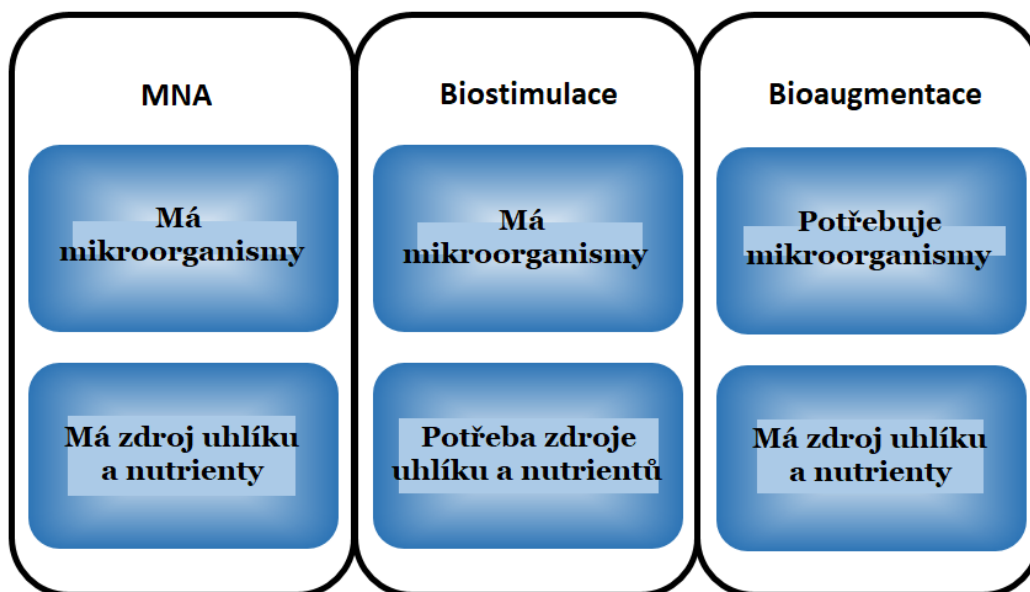
Přirozenou možností odstranění kontaminantů z lokality je využití mikrobiálních procesů. Pomocí znalosti metabolických procesů přítomné mikroflóry a bioremediačního potenciálu lze sanační zásah efektivně navrhnout. Nutností je paralelní monitoring s využitím molekulárně genetické a chemické analýzy.

Biologickou degradaci kontaminantů pomocí bakterií lze provádět třemi různými přístupy. Prvním je monitorovaná přirozená atenuace (MNA = monitored natural attenuation). Ta představuje pouhý monitoring přirozených biotických a abiotických degradačních procesů vedoucích ke snížení kontaminace, bez dalšího (externího) sanačního zásahu. Stanovení potenciálu MNA je prováděno pomocí detekce chemických/geochemických parametrů: Fe^{2+} , nitráty, sulfáty, metan, eten, oxidačně redukční potenciál (ORP), hodnota pH, teplota, salinita, rozpuštěný kyslík; společně s mikrobiálními parametry.

Tam, kde MNA není dostačující metodou pro sanaci lokality, je volbou podpořená přirozená atenuace neboli biostimulace. Biostimulace zahrnuje, kromě MNA, principy podpory přirozeného mikrobiálního společenstva pomocí dodání zdrojů uhlíku nebo jiných elektronových donorů, např. ve formě substrátu.

Třetím přístupem je bioaugmentace, tedy aplikace nejen živin pro podporu autochtonní mikroflóry, ale také aplikace specifické mikroflóry. Bioaugmentace je tedy umělé vnesení předem vykultivovaných specifických bakterií o známé, obvykle vysoké, biodegradační aktivitě. Také v případě bioaugmentace je důležitá přítomnost vhodných elektronových donorů pro efektivní biodegradaci přítomných polutantů (Cheremisinoff 2017; Dolinová et al. 2017; Nechanická et al. 2018).

Shrnutí všech tří přístupů je zobrazeno na následujícím obrázku č. 1 (Dolinová et al. 2017).



Obrázek 1 – Bioremediační strategie lokalit o různých parametrech

2.3 Sanační technologie

Sanační technologie zahrnují různé metody odstranění znečištění z podzemní vody, průsakových vod či zemin. Existují dva základní přístupy čištění: *in situ* a *ex situ*. Technologie *in situ* je velmi obecná a její aplikace se soustřeďuje na lokality o velkém objemu znečištěné vody a lokality, kde metoda *ex situ* není umožněna.

Metody sanačních technologií jsou založeny na principech chemických, fyzikálních a biologických, případně i jejich kombinací. Mezi chemické principy se řadí chemická oxidace, chemické vymývání či uvolňování sorbovaných polutantů a aplikace oxidačních činidel. Fyzikální metody jsou založené na tepelných pochodech pro podporu sanace (např. ohřev párou nebo teplou vodou, odporové zahřívání, provzdušňování). Do používaných biologických metod se řadí např. podporovaná bioremediace, biotransformace, bioredukce, biologické reaktivní bariéry nebo přirozená atenuace.

Obě technologie tak nabízejí širokou škálu možných sanačních zásahů na lokalitě za účelem odstranění polutantů jako: ropné uhlovodíky (alkany, isoalkany, cyklické alkany, monoaromatické sloučeniny, benzen, toluen, etylbenzen, BTEX), deriváty ropných uhlovodíků (halogenované, karbonyl, hydroxyl-, karboxyl-), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), CIE, dusičnany kovů, sírany a jiné (Němeček 2015; Černík et al. 2010).

2.3.1 Biodegradace chlorovaných etenů

Chlorované eteny (CIE) patří mezi běžné kontaminanty podzemních vod. Do životního prostředí se dostávají látky jako: tetrachloreten (PCE), trichloreten (TCE), dichloreten (DCE) a vinyl-chlorid (VC), a to únikem při jejich výrobě, nedůslednou manipulací nebo únikem ze skládek odpadů.

PCE a TCE byly v minulosti široce využívány například jako odmašťovací činidla kovových dílů a textilií. DCE a VC jsou v životním prostředí přítomné převážně jako produkty biodegradace. VC může být přítomen díky únikům při polymeraci PVC, kde tvoří hlavní surovinu.

Mezi tři základní procesy čištění takto kontaminovaných lokalit patří:

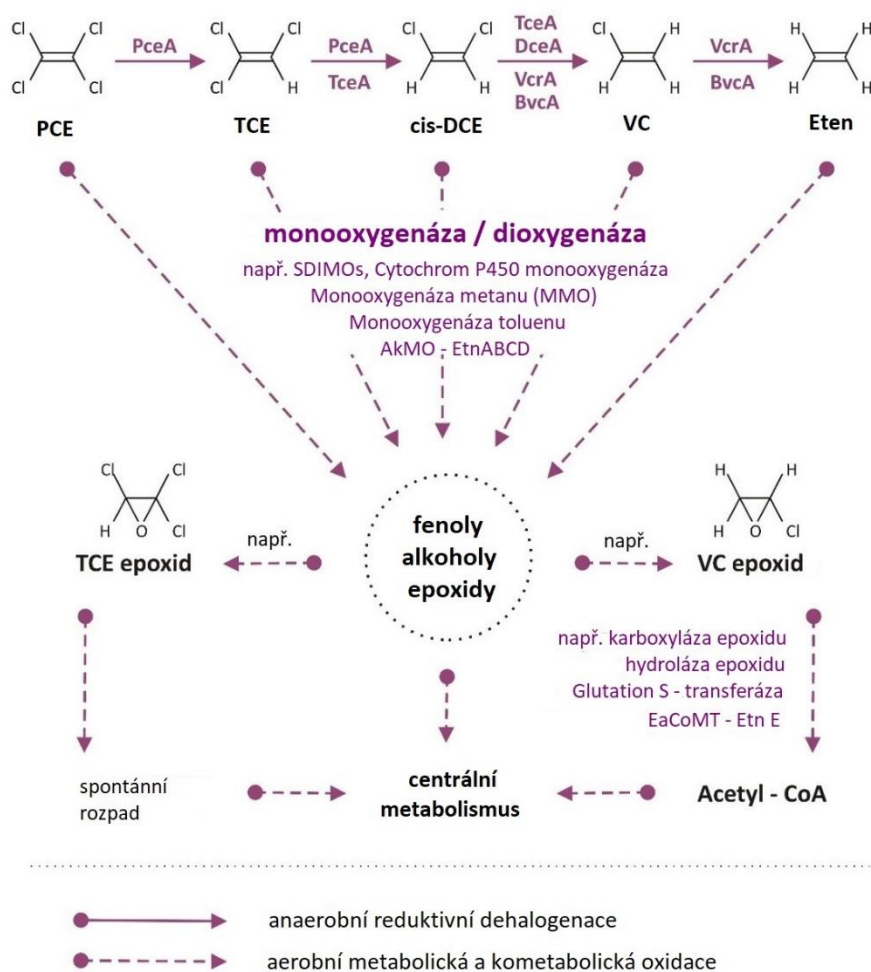
- anaerobní respirace (reduktivní dechlorace),
- aerobní respirace (metabolická dechlorace),
- kometabolická oxidativní dechlorace.

Nejčastějším mechanismem biodegradace je mikrobiální reduktivní dechlorace za anaerobních podmínek. Dochází při ní k postupné výměně atomu chlóru za atom vodíku bez přítomnosti kyslíku. Chlorované eteny jsou využívány jako akceptor elektronů, přičemž energie uvolněná z exergonické dehalogenační reakce je využívána k nárůstu mikroorganismů. Jako finální donor elektronů je využíván vodík, který se ve formě substrátů uvolňujících vodík může účastnit reduktivní dehalogenace CIE. Pro kompletní biodegradaci CIE je tak zapotřebí anaerobních podmínek, přítomnost bakteriálních kmenů schopných biodegradace těchto kontaminantů a dostatek elektronových donorů. Bakteriální rod *Dehalococcoides* je jediným známým se schopností degradovat VC na eten. Je tedy nezbytným pro kompletní biodegradaci PCE. Ostatní skupiny mikroorganismů jsou soustředěny na degradaci jednotlivých přechodů PCE a TCE na cisDCE. Degradaci PCE a TCE jsou schopné například bakteriální rody *Desulfitobacterium* a *Dehalobacter*. Enzym *vcrA* katalyzuje rozklad cisDCE na VC a eten, enzym *bvcA* jen VC na eten.

CIE mohou migrovat do aerobního prostředí, kde jsou degradovány pomocí aerobních bakterií, metabolicky nebo kometabolicky (Cheremisinoff 2017; Dolinová 2018; Němeček et al. 2017).

Přítomnost klíčových markerů (specifických bakterií, enzymů) nutných pro kompletní biodegradaci CIE (*Dehalococcoides*, *vcrA*, *bvcA*) je monitorována metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR).

Biologické procesy degradace CIE jsou zobrazeny na obrázku č. 2 (Dolinová 2018).



Obrázek 2 – Enzymy účastnící se biodegradace chlorovaných etenů, včetně jednotlivých meziproduktů

2.3.2 Sanační zásah

Pro komplexní řešení sanací podzemních vod a horninového prostředí je třeba zvážit technologické aspekty, průzkumné práce (hydrogeologický, geofyzikální, odběry vzorků), možnosti výrobního a dodavatelského procesu, finanční prostředky a především ekologickou zátěž. A to jak před sanačním zásahem, tak i předpokládaný dopad po aplikaci vybraného sanačního činidla.

Účelem sanačního zásahu je zamezení dalšího šíření kontaminace, snížení koncentrace kontaminantů až na limitní hodnoty a vyčištění podzemních vod. S tím je spojený následný monitoring sanačních prací pro vyhodnocení efektivity sanačního zásahu. Samotný sanační zásah je aplikován pouze tam, kde jiné metody, jako např. přirozená atenuace, nejsou dostatečné (Černík et al. 2010; Němeček 2015).

Existuje celá řada aplikačních činidel, způsobů a možností jejich aplikace. Mezi nejmodernější se řadí částice nulmocného železa (ZVI – zero-valent iron) a různé substráty

a to jak pro stabilizaci ZVI, tak i v roli podpory bioremediace. Dalším moderním přístupem je podpora biodegradačního potenciálu elektrickým proudem částic železa.

Částice ZVI mají v environmentálních aplikacích dlouhodobou tradici z pohledu vysoké schopnosti vyčistit rozsáhlé kontaminované území, včetně vyčištění od chlorovaných organických sloučenin a kationtů těžkých kovů. Dříve byly používány částice granulí o velikosti $> 50 \mu\text{m}$ (mZVI – micro-scale ZVI), dnes jsou již více využívány částice v nanoměřítku (nZVI – nano-scale ZVI). Důvodem je jejich velký specifický povrch a velmi vysoká reaktivita. Ovšem částice jsou při vyšších koncentracích náchylné na tvorbu agregátů, což má za následek snížení specifického reakčního povrchu a tak i snížení mobility částic v prostředí. Při nízkých koncentracích zůstávají nanočástice stabilní co se týče rizika aglomerace. Navíc ZVI může mít negativní vliv na důležité mikroorganismy účastníci se základních procesů v ekosystému. Proto je důležité zvážit účel sanačního zásahu a případně využít dalšího, přídavného činidla (Nguyen et al. 2018; Vlková 2018; Černík et al. 2010).

Substrátů, jež se mohou účastnit přirozených bioremediačních procesů, je celá řada. Substráty používané pro bioremediační účely fungují jako podpora přirozeně se vyskytujících specifických mikrobiálních společenstev schopných rozkládat organické sloučeniny, především CIE. Některé substráty mohou mít spíše roli modifikační. Typicky se používají např. pro modifikaci nZVI, kdy substrát omezuje inhibiční aktivitu částic vůči mikroorganismům. V obou případech by však měl být substrát inherentně netoxický a pomáhat degradaci původních polutantů na, v ideálním případě, sloučeniny netoxické a přirozené danému životnímu prostředí (Němeček et al. 2017; Stavělová et al 2016).

2.4 Monitoring podzemní vody

Molekulární genetika je vědní obor, který kombinuje molekulární biologii s genetikou. Molekulární biologie se zabývá studiem buněčných procesů na úrovni molekul a genetika studiem dědičnosti a proměnlivosti organismů, včetně jejich příčin. Propojením obou oborů se pozornost obrací na vzájemné interakce nukleových kyselin, genů a jejich produkty.

Ideálním propojením molekulární biologie a sanačních technologií je sledování vlivu aplikované látky na specifické skupiny mikroorganismů. K tomu je využívána jak detekce přítomnosti specifických bakterií, tak i enzymů schopných biodegradace. Sledované biodegradační skupiny mikroorganismů jsou soustředěny na degradaci jednotlivých přechodů PCE a TCE na cisDCE nebo VC. Pro vyhodnocení účinku aplikace je však nutné znát jejich metabolické či enzymatické děje (Alberts 2008; Cheremisinoff 2017).

Eliminace kontaminantů za pomoci mikroorganismů (bioremediace) na rozdíl od chemických nebo fyzikálních zákroků patří mezi metody šetrné k životnímu prostředí. Avšak bioremediace může mít i nevýhody. Mezi ně se řadí vedlejší efekty jako produkce škodlivých metabolitů, změny hodnot pH nebo jiná ovlivnění způsobená manipulací s podzemní vodou obsahující organické látky. Mezi ně se může řadit i zanášení okolního prostředí, např. půdní mikroflóry. Tyto efekty však mohou být minimalizovány nebo dokonce preventivně vyloučeny za předpokladu, že biologické a abiotické podmínky jsou adekvátně předem známé a proces bioremediace je optimalizován na základě těchto znalostí. Z tohoto důvodu je vhodné provést nejprve geologický průzkum a danou lokalitu detailně charakterizovat z hlediska fyzikálně-chemických parametrů (Cheremisinoff 2017; Dolinová 2018).

Fyzikální parametry jsou nejčastěji sledovány přímo při vzorkování podzemní vody. Patří mezi ně především hodnota pH, ORP, vodivost, teplota nebo výška hladiny podzemní vody.

Chemická analýza pomáhá popsat biologickou aktivitu na lokalitě a potvrdit její průběh. Pro esenciální informace je měřena koncentrace sledovaných kontaminantů, meziproductů a finálních productů degračních procesů. V případě kontaminace CIE je primárně sledována hladina PCE, TCE, DCE, VC, etenu.

2.5 Metody molekulární genetiky

Molekulární genetiky se zabývá studiem nukleových kyselin a jejich vzájemnými interakcemi, geny a jejich produkty a dalšími procesy na molekulární úrovni. Prostřednictvím molekulárně genetických metod je možné studovat funkční nebo strukturní diverzitu mikrobiální komunity, a to prostřednictvím analýzy nukleových kyselin, tedy RNA nebo DNA (Čalounová et al. 2008).

2.5.1 Izolace DNA

Izolace bakteriální DNA je prvním krokem molekulárně genetických testů. Umožňuje studovat strukturu a vývoj mikrobiální komunity v nejrůznějších materiálech, tedy i v environmentálních vzorcích.

Celý proces je možné rozdělit do tří dílčích částí. V prvním kroku izolačního procesu dochází k buněčné lýze pomocí enzymů nebo detergentů pro rozrušení buněčné stěny nebo membrány za účelem uvolnění buněčného obsahu, především cílené DNA. Dalším krokem je očištění lyzátu od proteinových struktur např. kolonek, které využívají separace přes membránu. Následuje promytí pomocí alkoholových roztoků a na závěr dochází k vlastnímu uvolnění nukleové kyseliny žádaného vzorku do elučního roztoku (Šmarda 2005).

Izolace DNA je v současnosti standardním procesem často využívající komerčně dodávané kity. Ty jsou specifické pro jednotlivé typy izolovaných matric a jejich výbava obsahuje i pracovní postup. To vede k výraznému zjednodušení celého procesu.

2.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) je anglický výraz pro polymerázovou řetězovou reakci. PCR je základní metoda molekulární genetiky sloužící k amplifikaci konkrétního úseku DNA z obou stran ohraničeného primery. Reakce probíhá s využitím termostabilní DNA polymerázy syntetizující nový řetězec na principu komplementarity bází. Výsledkem procesu je velké množství cílového ampikonu vznikajícího ze stopového množství vstupního materiálu (Dolinová 2018).

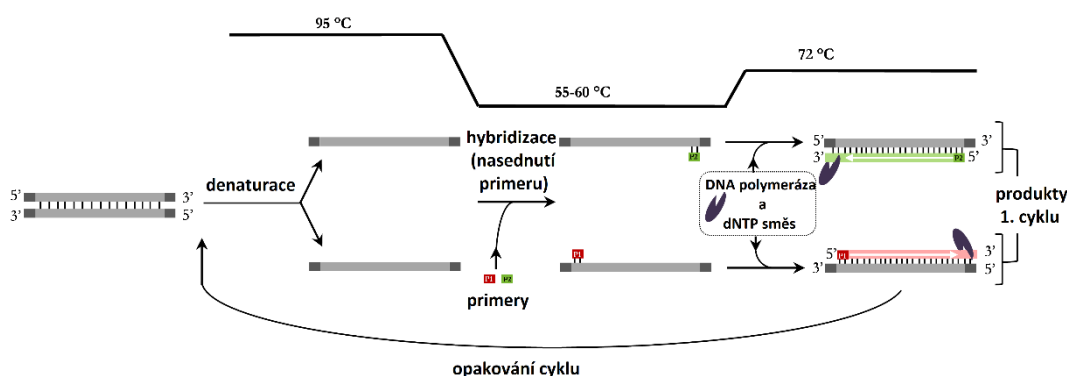
PCR patří mezi metody, které jsou dnes taktéž komerčně podpořeny různými pomocnými kity. Ty již obsahují směsi potřebných chemických sloučenin a tím zjednodušují a urychlují celý proces (Šmarda 2005).

Obsahem reakční směsi PCR je: templátová DNA, Revers a Forward primer, DNA polymeráza a deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP). Syntéza probíhá ve směru 3' → 5' (od volné OH skupiny), kdy F (forward) je primerem dopředným a R (reverse) zpětným. DNA polymeráza a dNTP bývají k dostání společně jako tzv. master mix.

Průběh PCR je iniciován počáteční denaturací DNA, tedy rozvolněním dvouřetězcové DNA působením vysoké teploty (většinou kolem 95°C). Následují cyklicky se opakující kroky jsou: denaturace, nasedání primerů (annealing) a vlastní polymerační reakce (elongace). Každý dílčí krok je provázen specifickou teplotou a definovaným časem. Počet opakování může být různý, ale většinou se pohybuje v rozmezí do 35 cyklů. V závěru reakce dochází k extenzi, tedy dosyntetizování řetězců (obvykle při 72°C) a následnému zchlazení vzorku

na 4-12°C pro stabilizaci PCR produktu (Šmarda 2005; Litvinenko 2019). Celý princip metody je zobrazen na obrázku č. 3 níže (Alberts 2008).

První využití metody PCR je datováno v roce 1985, kdy roku 1993 za ni byla udělena Nobelova cena Kary Mullisovi. PCR reakce se využívá ve všech odvětvích jak základního, tak i aplikovaného výzkumu. Její hlavní výhodou je právě citlivost, přesnost a reprodukovatelnost. K PCR reakci stačí minimální množství DNA (teoreticky 1 molekula), jež se amplifikuje na základě vzorce $2^n - 1$ kopií, kde n značí počet cyklů. Z 1 molekuly tak lze získat po 30 cyklech více než 10^9 kopií (Šmarda 2005).



Obrázek 3 - Princip metody PCR - schéma prvního cyklu s teplotními fázemi

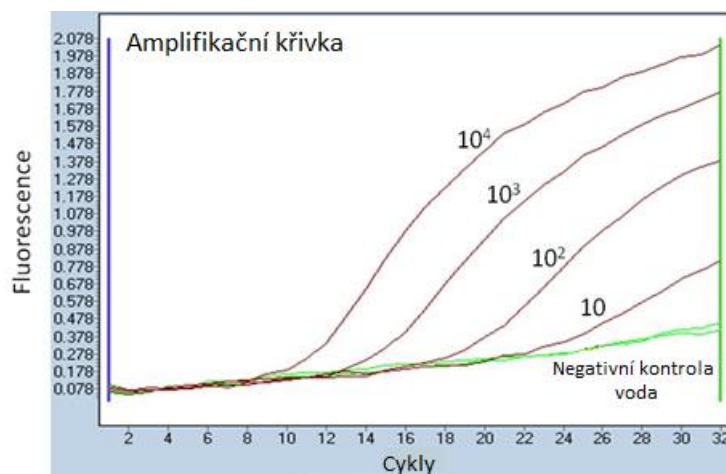
2.5.3 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-time PCR)

Real-time PCR (qPCR), neboli polymerázová řetězová reakce v reálném čase, je kombinací klasické PCR a možnosti detekce a zaznamenání nárůstu reakčních produktů po každém amplifikačním cyklu za účelem přesné kvantifikace.

Metoda je založená na měření intenzity fluorescenčního signálu na konci každého cyklu amplifikace (viz obr. 4). Změřené hodnoty jsou zaznamenávány do amplifikační křivky, kdy intenzita fluorescenčního signálu je závislá na počtu cílových úseků DNA v původním vzorku. Více cílové sekvence vede k časnějšímu vytvoření silného signálu vedoucímu k překročení prahové (threshold) hranice, vyjádřené pomocí C_q hodnoty (quantitative cycle). C_q hodnota tedy jinými slovy znamená počet cyklů potřebných pro překročení prahu detekce. Tato hodnota je používána k určení množství cílové DNA, přičemž je na ni vázána nepřímou úměrou. Čím vyšší C_q hodnota, tím nižší množství dané DNA (Šmarda 2005; Alberts 2008; JBS Science 2012).

Fluorescence může být způsobená vlivem interkalačního barviva vázající se do dvouvláknové DNA (dsDNA), nebo fluorescenční sondou, jež je komplementární

k amplifikované DNA sekvenci. Příkladem interkalačního barviva je fluorescenční barvivo SYBR Green, jež se vmezeří mezi báze nově vznikající dsDNA. Během denaturace dsDNA se toto barvivo uvolňuje a způsobuje tak pokles intenzity fluorescence, čehož se využívá při analýze tzv. křivky tání. Ta poté slouží k určení specifity PCR amplifikace a analýze C_q hodnot (Šmarda 2005).



Obrázek 4 – Ukázka detekce fluorescenčního signálu v real-time PCR termocyklu

2.5.4 Elektroforéza

Mezi separační metody, jež jsou schopné analýzy nukleových kyselin a proteinů, se řadí elektroforéza. Tato metoda se ve většině případů používá k identifikaci velikosti, případně změn v předem vzniklém PCR produktu.

Principem metody je separace na základě rozdílné rychlosti pohybu různě dlouhých nabitých molekul DNA v elektrickém poli. Čím jsou úseky DNA menší, tím rychlejší je postup záporně nabitých molekul od katody k anodě. Je třeba však vybrat vhodný nosič, kdy nejčastěji používaný je agarózový nebo polyakrylamidový gel.

Gelová elektroforéza je typ elektroforetické separace s využitím agarózového gelu. Agarózový gel je síť polysacharidových polymerních molekul s póry, které umožňují pohyb různě velkých molekul různou rychlostí. Standardně se používá pro separaci fragmentů o velikosti 100 – 50 000 bází. Jeho podstatou je agaróza (prášek z mořských řas) a TBE pufr (Tris-boritá kyselina-EDTA) jako elektrolytické rozpouštědlo o definované hodnotě pH 8.

Barviva vážící se do DNA struktur (např. SYBR Safe) pomáhají k vizualizaci separovaných fragmentů gelové elektroforézy pod světelným zdrojem o určité frekvenci, obvykle pod UV světlem (Šmarda 2005; Alberts 2008).

2.5.5 Sekvenování nové generace (NGS)

Next Generation Sequencing (NGS) je anglický ekvivalent pro sekvenování nové generace. Sekvenování DNA jako takové znamená stanovení pořadí nukleotidů C, G, A a T v molekule DNA.

NGS je pokročilá sekvenační technika založená na současné produkci až milionů sekvencí. Není omezená na čisté bakteriální kultury, tak jako Sangerovo sekvenování. Dokáže velmi rychle a relativně levně určit diverzitu směsných bakteriálních vzorků. Metodiky NGS jsou založeny na odlišných principech a je při nich využíváno několik platforem. Tato práce využívá metodu založenou na měření změny hodnoty pH prováděné na platformě Ion Torrent (Life Technologies).

Ion Torrent se od ostatních metod odlišuje tím, že není založen na optických principech, jako jsou fluorescence a chemiluminiscence a nevyžaduje tedy speciální optické nástroje (např. CCD kamera). Celý proces je založen na principu detekce změn hodnot pH (viz obr. 5). Princip opět vychází z polymerázové reakce, kdy se při navázání každé nové báze do vznikajícího řetězce uvolní proton vodíku (Victor Llaca 2012; Claesson et al. 2010).

Postup se skládá z následujících dílčích kroků: příprava genomické knihovny, příprava templátu na sféru, sekvenování na čipu a nakonec zpracování signálu.

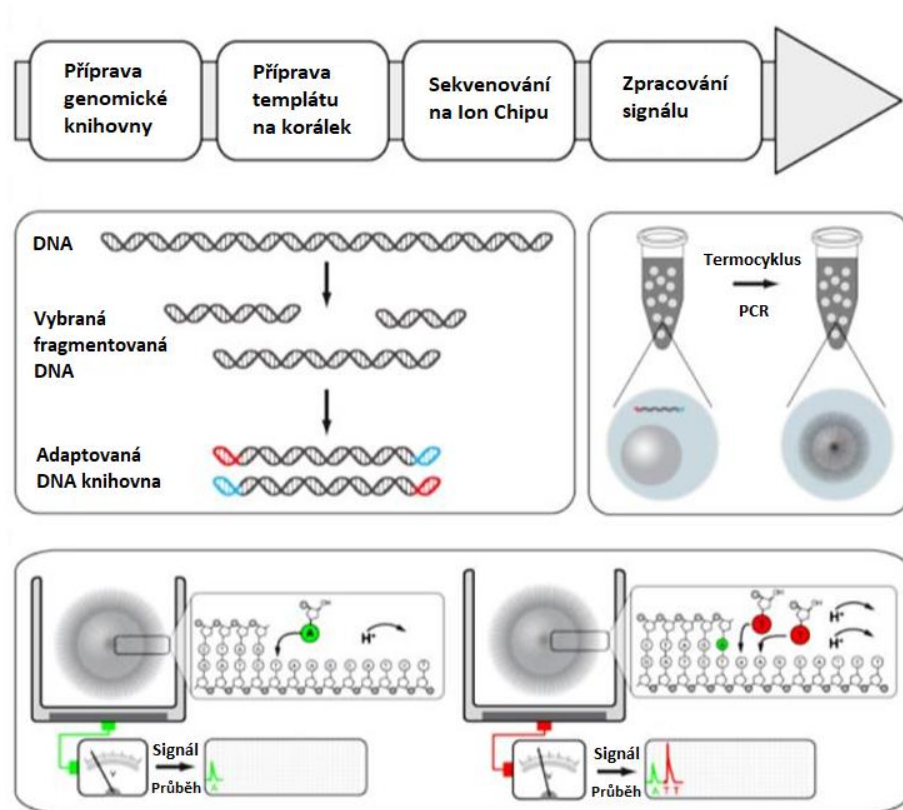
Příprava genomické knihovny pro amplikonové sekvenování je provázena dvěma po sobě následujícími PCR reakcemi. První PCR reakce slouží k vymezení žádaného úseku DNA a využívá normální F a R primery. Druhá PCR reakce identifikuje každý vzorek pomocí specifické sekvence, tzv. barcodu.

Příprava templátu na sféru zahrnuje amplifikaci PCR produktů při emulzní PCR (emPCR) s následným Enrichmentem. EmPCR probíhá na kapkách olejové emulze, kdy v každé kapce je jedna molekula DNA. Enrichment je část procesu, která slouží k přečištění a obohacení emPCR produktů.

Sekvenování na čipu symbolizuje vlastní sekvenační reakce probíhající na čipu, kam jsou vkládány pouze obohacené sféry (korálky). Ty mají na sobě vázány amplifikované produkty.

Mikročip je nástroj složený z paralelně složených polovodičů a funguje jako citlivý senzor (malé pH metry). V každém cyklu sekvenační reakce dochází k elektronické detekci změn hodnot pH vzniklé inkorporací báze a následným uvolněním protonu. Velikost změny hodnoty pH odpovídá inkorporaci jedné, dvou, tří atd. bází. Pokud nedojde k inkorporaci báze, nedojde ke změně hodnoty pH. Na jednom čipu tak dochází k současnému sekvenování stovek, tisíců až milionů sekvencí, závisících na velikosti čipu. Relativně

jednoduchým principem tak lze zjistit složení komplexních bakteriálních společenstev, což doposud neumožnila žádná molekulárně genetická metoda.



Obrázek 5 - Princip metody NGS na platformě Ion Torrent

Zpracování signálu je finální krok zahrnující třídění vzorků, úpravu hrubých dat a porovnání získaných sekvencí s dostupnými databázemi pro identifikaci taxonomických druhů (Victor Llaca 2012; Dolinová et al. 2016).

Vzhledem k potřebě studovat environmentální vzorky, NGS může být použito pro detailní analýzu bakteriálních komunit. NGS je jediná metoda, která nabízí komplexní analýzu bakteriálních komunit bez nutnosti klonování DNA fragmentů do vektorů a jejich následné kultivace do buněk. To umožňuje analýzu a porovnání bakteriálních komunit z různých kontaminovaných lokalit nebo různých vzorků matrice. Omezení metody spočívá v požadavku na minimální vstupní koncentraci izolované DNA. Koncentrace DNA nižší než 2 ng/ μ l vedou k méně reprezentativním výsledkům, zvláště pro komunity s menší pravděpodobností výskytu (Claesson et al. 2010).

3 Experimentální část

3.1 Monitorované lokality

3.1.1 Lokalita Spolchemie

Spolchemie Company a.s. je jedním z hlavních výrobců syntetické pryskyřice a freonů v Evropě od poloviny minulého století. Sídli v České republice v Ústí nad Labem.

Výroba freonů spolu se skladováním a distribucí surovin (tetrachlormetan a tetrachloreten) vedly k rozsáhlé kontaminaci podzemí organickými rozpouštědly včetně CIE.

Geologický profil Spolchemie, ovlivňující šíření kontaminace, se skládá z křídových vrstev na pískovcové bázi překrývající kvartérní vrstvu tvořenou především fluvialními sedimenty z řeky Bíliny, Labe a Klíšského potoka. Právě prostředí kvartérní vrstvy bylo kontaminováno CIE. Na nátoku je v sumě detekováno cca 55 % TCE a 40 % DCE. Toto zastoupení se ve směru toku mění a ve vrtech již DCE tvoří až 70 – 80 % z celkové sumy CIE.

Lokalita Spolchemie je sanována procesy využívajícími různé přístupy, mezi které patří i nové metody jako je aplikace nanoželeza (nZVI).

V kontaminačním mraku s CIE bylo vybráno 6 vrtů s označením AW5-57, AW5-58, AW5-60, AW5-61, AW5-62 a KJ-3. Vrty AW5-57 až AW5-62 jsou úzkoprofilové o vnitřním průměru 63 mm. Jsou vystrojeny pažnicí a ukončeny zátkou. Obsyp tvoří filtrační křemenný písek o zrnitosti 0,5 mm a má dosah 1,8 m hloubky u všech vrtů. Všechny úzkoprofilové vrty mají na filtračním písku 0,2 m mocný pískový polštář, kdy 0-1,6 m je zaizolováno cementovou kaší s příměsí bentonitu. Vrt KJ-3 je širokoprofilový o vnitřním průměru 160 mm. Nachází se ve směru toku proudu podzemní vody, dále od ostatních vrtů určených jako centrum remediačních zásahů.

V minulosti bylo v horninovém prostředí provedeno měření kontaminací půdního vzduchu v neporušených vzorcích vrtného jádra. Výsledkem bylo zmapování vertikální distribuce kontaminace s ohniskem v hloubce 5-7 m pod terénem. Výsledky měření ovlivnily následné plánování aplikace nZVI kompozitu.

Mapa lokality je uvedena na obrázku č. 7 v kapitole 3.3.

3.1.2 Lokalita Nový Bydžov

Město Nový Bydžov se nachází v Královéhradeckém kraji České republiky. Průmyslová výroba strojů, kovových řezaček, slévárny kovu nebo zařízení pro chemickou úpravu kovů způsobila rozsáhlou kontaminaci podloží.

Geologický profil Nového Bydžova se skládá především z kvartérních vrstev na bázi písčito-hlinitého až hlinito-písčitého sedimentu, který na okrajích města postupně přechází v písek a štěrk. Město je taktéž obklopeno křídovou vrstvou tvořenou vápnitým jílovcem, slínovcem a prachovcem.

Nesprávná zacházení s CIE způsobila rozsáhlou kontaminaci kvartérní vrstvy v hloubce 4-5 m tvořené písčítým štěrskem a ohraničené mezozoickou vrstvou. Ačkoliv má většina domácností Nového Bydžova přístup k pitné vodě distribuované městským vodovodem, nadále jsou soukromé vrty využívány jako zdroj pitné vody nebo při zavlažování zahrad.

V kontaminačním mraku s CIE bylo vybráno 6 vrtů s označením MR-1, MR-2, MR-4, MR-5, MR-6 a ZMS-5. Tyto vrty patří mezi úzkoprofilové, kdy vrty MR jsou v bezprostřední blízkosti největšího kontaminačního mraku a ZMS-5 byl vybrán jako kontrolní.

Mapa lokality je uvedena na obrázku č. 8 v kapitole 3.3.

3.2 Laboratorní testy za účelem výběru sanačního činidla

Výběr sanačního činidla je důležitým aspektem pro úspěšnou sanaci lokality. Důraz byl kladen na podmínky prostředí, dostupnost sanačních činidel a jejich účinek.

Laboratorní testy byly realizovány s cílem selekce adekvátního sanačního činidla aplikovaného na podzemní vodu přímo z dané lokality. Byl sledován sanační účinek testovaných činidel v čase pomocí molekulárně genetické metody qPCR v kombinaci s fyzikálně-chemickými parametry. Metoda qPCR byla zaměřena na relativní hladiny bakterií schopných dehalorespirace (dehalogenace CIE) u obou lokalit. Fyzikálně-chemické parametry zahrnovaly hodnotu pH, ORP a vodivost. Z chemického hlediska byly monitorovány koncentrace jednotlivých CIE, tedy TCE, PCE a DCE (viz metodika qPCR v kapitole 3.4.2).

3.2.1 Testy v rámci lokality Spolchemie

Pro sanaci CIE na lokalitě Spolchemie byla plánována aplikace kompozitu nano- a mikroželeza (nZVI a mZVI) v kombinaci se substráty podporujícími bioremediaci a elektrickým proudem. Cílem bylo zkombinovat sanaci pomocí redukčních činidel s podporovanou bioremediací tak, aby došlo k co nejvyšší efektivitě. Vzhledem k možnostem kombinování kompozitu a organického substrátu byl nejprve otestován účinek zvolených kombinací laboratorně, přímo na vzorku podzemní vody AW5-60 předem otestované na přítomnost dehalogenačních bakterií.

Jeden ze vstupních testů byl test reaktivity mZVI ve vialkových zkumavkách. Testováno bylo pět typů mZVI (viz tab. 1) o dvou koncentracích 5 a 10 g/l v čase (3, 7, 15 a 31 dnů). Byly sledovány pouze fyzikálně-chemické parametry (hodnota pH, ORP, vodivost) a koncentrace CIE, tedy TCE, PCE, cisDCE, a etenu.

Tabulka 1 – Přehled testovaných mZVI

Výrobce	Země	Produkt
Pometon Powder	Itálie	Ferchim Iron Powder
Hepure	USA	Ferox Target
Hoegenass	Švédsko	MH300
Rio Tinto, Metal Powders	Kanada	H ₂ Omet™ 414
LAC	ČR	-

Po výběru mZVI do kompozitu s nZVI NANO FER STAR od firmy NANOIRON s.r.o. následoval výběr substrátu. Prvním testovaným substrátem byla karboxymethylcelulóza (CMC) o koncentraci 0,25, 0,5 a 1 g/l. CMC byla testována v kombinaci s kompozitem nZVI a mZVI o celkové koncentraci 3 g/l v poměru 1:2 (1 g/l nZVI NANO FER STAR, 2 g/l mZVI H₂Omet™ 414) a stejnosměrným elektrickým proudem (DC) o příkonu 1 W. V průběhu tohoto testu byly také sledovány dehalogenační bakterie pomocí metody qPCR, a to po 20 dnech od nasazení.

Mezi další testované substráty patřily: melasa a detergent anionický tenzid s experimentálním označením MSJ o koncentraci 5, 10 a 20 g/l. Ty byly testovány s kompozitem nZVI a mZVI o celkové koncentraci 4 g/l, tedy 1,2 g/l nZVI a 2,6 g/l vybraného mZVI. Tento test byl také monitorován pomocí qPCR metody, a to v čase (12, 21 dnů).

Testy probíhaly ve formě vsádkových reaktorových testů. Z každého z nich bylo vybráno činidlo pro finální sanační zásah.

3.2.2 Test v rámci lokality Nový Bydžov

Pro sanaci CIE na lokalitě Nový Bydžov byla plánována aplikace substrátu pro podpoření bioremediace kontaminantů. Testovány byly čtyři substráty: laktát sodný, glycerol, syrovátka a polyhydroxybutyrát (PHB), každý se vstupní koncentrací 0,25 a 0,5 g/l. Laboratorní testy opět probíhaly formou vsádkových testů. Jednotlivé organické substráty byly nadávkovány přímo do podzemní vody odebrané z vrtu MR-2. Podzemní voda byla předem otestována na přítomnost žádaných specifických bakterií a sloužila jako referenční vzorek.

Laboratorní testy byly provedeny ve vzduchotěsných reaktorech s konstantní laboratorní teplotou okolo 25°C. Fyzikálně-chemické parametry (hodnota pH, ORP, vodivost), stejně tak jako chemická analýza (TCE, PCE, DCE), byly měřeny v čase po cca 10 dnech (2, 12, 22, 32 a 42 dní). qPCR analýza dehalogenačních bakterií byla provedena jen na vzorcích s aplikovanou koncentrací 0,5 g/l jednotlivých substrátů, a to pouze po 42 dnech.

3.3 Sanační zásah na lokalitách

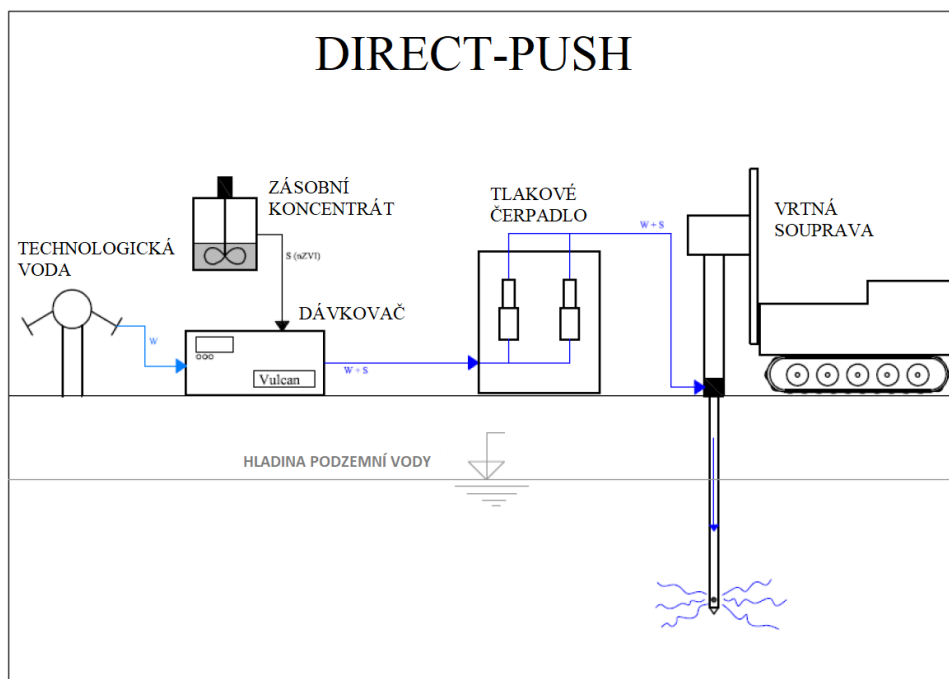
3.3.1 Lokalita Spolchemie

Na základě laboratorních testů za účelem výběru sanačního činidla byla naplánována aplikace kompozitu nZVI NANOFER STAR (NANOIRON s.r.o.) a mZVI H₂OmetTM 414 (Atomet), detergentu MSJ, vše podporované DC. Aplikována byla směs 20 kg práškového nZVI a 40 kg mZVI s koncentrací 10 g/l (poměr 1:2), dále 1 kg MSJ a DC o napětí 24 V a maximálním výkonu 750 W. Aplikáční koncentrace dosahovala hodnoty 3 g/l a celkový injektovaný objem činil 20 m³.

Aplikace kompozitu nZVI a mZVI společně s MSJ byla provedena metodou direct-push (obr. 6). Injektáž suspenze proběhla kombinací tlakového zásahu do třech vystrojených vrtů (AW5-57, AW5-60 a AW5-61) a direct-push metodou do čtyř nevystrojených sond (DP-1 až DP-4) v horizontu 5, 6 a 7 m pod terénem. Společně s kompozitem byl také aplikován stopovač chlorid lithný za účelem monitorování směru migrace částic. Po ukončení injektáže byla na lokalitě zároveň zahájena aplikace DC.

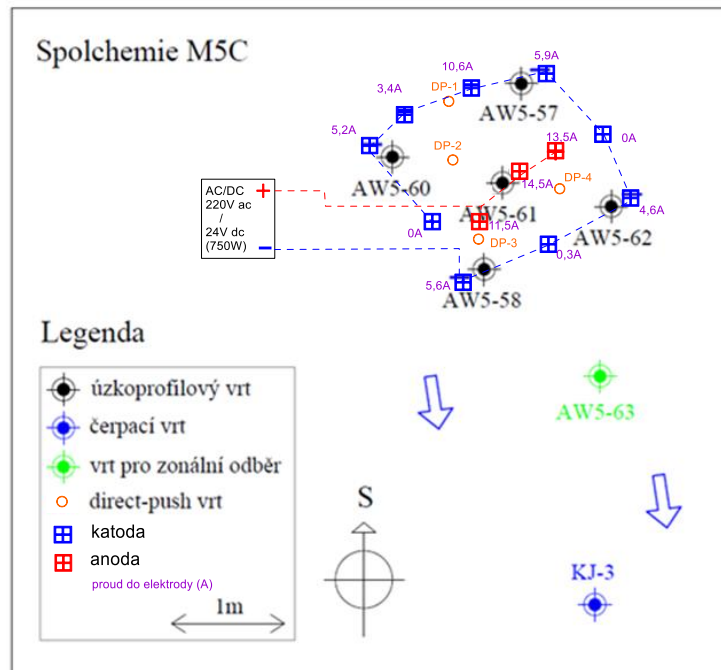
Vliv aplikovaných činidel byl podporován pomocí DC s napětím 24 V a maximálním výkonem 750 W. Elektrody byly situovány do hvězdicovité struktury, kde po obvodu bylo umístěno devět katod a centrálně tři anody v linii. Všechny elektrody měly podobu dvou ocelových tyčí o průměru 20 mm, zaražených do hloubky 9 m pod povrch. Počáteční výkon

měl hodnotu 550 W, v průběhu sanace docházelo k poklesu v důsledku pasivace a rozpuštění anod. Při ukončení monitoringu se tak výkon měniče pohyboval okolo 240 W.



Obrázek 6 – Schéma metody direct-push pro aplikaci sanačního čidla na lokalitě

Vzhledem ke sledování účinků kompozitu s MSJ a DC byla naplánována dvě předaplikační kola vzorkování, dále samotná aplikace vybraného sanačního čidla a dalších osm kol poaplikačních. Poaplikační monitoring byl stanoven v intervalech po 1, 2, 4, 8, 13, 16 a 23 týdnech s ukončením 31 týdnů po aplikaci. Mapa sanované lokality včetně zobrazení sanačního zásahu je na obrázku 7.

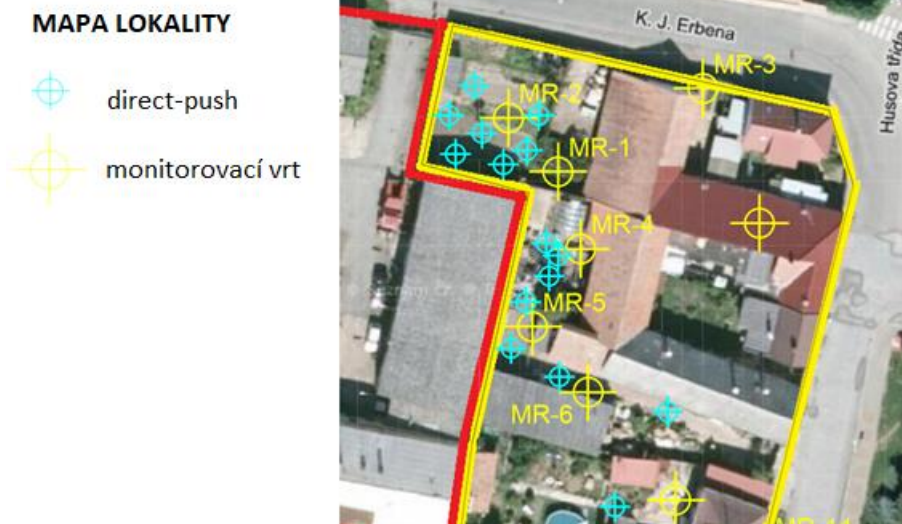


Obrázek 7 – Mapa sanované části lokality Spolchemie s vyznačením směru toku podzemní vody

Odběr vzorků byl realizován metodou pomalého odčerpávání podzemní vody do ustálení fyzikálně-chemických parametrů. Voda byla prostřednictvím odstředivého čerpadla Gigant vedena do průtočné cely, kde byla multifunkčním přístrojem YSI Professional měřena hodnota pH, ORP a konduktivita. Po ustálení fyzikálně-chemických parametrů byl do sterilních PET lahví o objemu 0,5 l odebrán vzorek podzemní vody pro molekulárně genetické analýzy a do vialek pro chemickou analýzu. V rámci qPCR analýzy byly sledovány dehalogenační bakterie a chemická analýza se soustřeďovala na CIE kontaminanty (TCE, PCE, DCE) a produkty jejich rozkladu (metan, eten).

3.3.2 Lokalita Nový Bydžov

Sanační zásah na lokalitě Nový Bydžov byl realizován na základě výsledku laboratorního testu zohledňující potřeby dané lokality. Vzhledem k vybranému zdroji uhlíku ve formě syrovátky a plánu opakované aplikace ve třech časových termínech, bylo vzorkování nejprve realizováno před aplikací a následně v přibližně měsíčních intervalech od první aplikace. Vzorkování bylo provedeno v místech s nejvyšší koncentrací CIE, tedy ve vrtech s označením MR-1, MR-2, MR-4, MR-5 a MR-6 (viz obr. 8).



Obrázek 8 – Mapa lokality Nový Bydžov – centrum kontaminace v okolí areálu Kovoplast

Předaplikační odběr byl proveden pouze v monoplikátu. Následovalo období 7 měsíců, během něhož byla syrovátka aplikována třikrát, nejdříve po 2 měsících a posléze po 5. Interval mezi aplikacemi byl stanoven na základě znalosti krátkodobého účinku syrovátky. Po poslední aplikaci byla lokalita již jen dlouhodobě monitorována, a to po 1, 2, 4, 5, 7, 8 a 9 měsících.

Odběry vzorků byly realizovány metodou pomalého odčerpávání podzemní vody do ustálení fyzikálně-chemických parametrů. Voda byla prostřednictvím odstředivého čerpadla Gigant vedena do průtočné cely, kde byla multimetrem MultiLine® Multi 3430 IDS (WTW, Germany) měřena hodnota pH, ORP a konduktivita. Po ustálení fyzikálně-chemických parametrů byly do sterilních PET lahví o objemu 0,5 l odebrány vzorky podzemní vody pro molekulárně genetické analýzy a do vialek pro chemickou analýzu. V rámci chemické analýzy byly sledovány ClE kontaminanty (TCE, PCE, DCE) a produkty jejich rozkladu (metan, eten). Molekulárně genetická analýza byla soustředěna především na metodu qPCR cílenou na detekci dehalogenačních bakterií a posléze na NGS metodu pro sledování vlivu sanačního zásahu na složení bakteriálního konsorcia.

Aplikace syrovátky byly realizovány metodou direct-push v místech přítoku podzemní vody k monitorovacím vrtům (obr. 8). Každé injektážní kolo obsahovalo deset separátních injekčních sond o průměru 32 mm. Po každé injektáži byla aplikační sonda stmelena, aby nedošlo k poškození v intervalu do další aplikace.

Celkový injektovaný objem činil 75 m³ syrovátky (1. injektáž 30 m³, 2. 30 m³ a 3. 15 m³) aplikované do horizontální vrstvy v hloubce 4,1 až 6 m pod zemí z důvodu nejlepší propustnosti přítomné písčité a jílovité vrstvy.

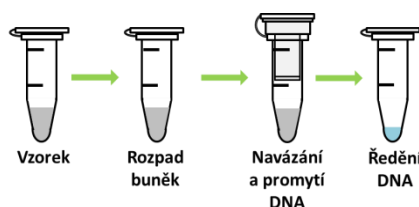
3.4 Metodika molekulárně genetických analýz

Všechny vzorky podzemní vody určené pro molekulárně genetickou analýzu byly bezprostředně po odběru zchlazeny a převezeny do laboratoře. Po převozu bylo provedeno zakoncentrování přítomné biomasy filtrací přes 0,22 μm membrány (Merck Millipore, Germany). Filtry byly uskladněny při -80°C do dalšího zpracování.

3.4.1 Izolace a stanovení DNA

Extrakce DNA z filtrů s přítomnou biomasou byla provedena pomocí komerčně dostupného izolačního kitu FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, CA, USA) dle doporučení výrobce. Kit je určen k izolaci genomické DNA z environmentálních vzorků.

Obecné schéma izolace DNA je zobrazeno na obrázku 9.



Obrázek 9 – Stručné schéma izolace DNA

Součástí procesu izolace je lýza buněk, odstranění proteinů, zakoncentrování a promytí navázané DNA. Pro buněčnou lýzu byla využita The Beads Blaster 24 homogenizační jednotka (Benchmark Scientific, NJ, USA). Pro zakoncentrování byla využita centrifuga Smart R17 (Hamil). Mezi další využitě přístrojové vybavení patří vortex Mini Biomixer 3D (Benchmark Scientific) a inkubátor Genius Dry Bath (Major Science).

Koncentrace DNA byla měřena pomocí komerčního kitu Qubit[®] dsDNA BR Assay Kit, optimalizovaného na vzorky s vyšší koncentrací DNA. 5 μl každé DNA bylo přidáno do reakční směsi dle přiloženého protokolu. Měření koncentrace DNA bylo provedeno na přístroji Qubit[®] 2.0 Fluorometr (Life Technologies, MA, USA).

3.4.2 Real-time polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) byly prováděny za účelem hodnocení relativní hladiny bakterií *Dehalococcoides* sp., *Desulfitobacterium* sp. a *Dehalobacter* sp., dále genů vinyl-chloridové reduktázy *bvcA* a *vrzA*. Relativní hladina genu 16S rDNA (celkový bakteriální ukazatel) byla stanovena jako kontrola. Všechny použité qPCR primery jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2 – Přehled použitých primerů

Zkratka	Gen	Název primeru	Sekvence primeru (3' → 5')	Velikost produktu [bp]	Annealing teplota [°C]	Účinnost primeru	Zdroj
U16SRT	16S rDNA	U16SRT-F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	180	60	2,00	Clifford et al., 2012
		U16SRT-R	TATTACCGCGGCTGCTGGC				
bvcA	vinylchlorid reduktáza	bvcA227F	TGGGGACCTGTACCTGAAAA	297	60	1,89	Behrens et al., 2008
		bvcA523R	CAAGACGCATTGTGGACATC				
vcrA	vinylchlorid reduktáza	vcrA880F	CCCTCCAGATGCTCCCTTTA	139	60	1,88	Behrens et al., 2008
		vcrA1018R	ATCCCTCTCCCGTGAACC				
DHC-RT	<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	DHC793F	GGGAGTATCGACCCTCTCTG	626	60	1,98	Yoshida et al., 2005
		DHC946R	CGTTYCCCTTTCRGTCACT				
Dsb	<i>Desulfitobacterium</i> sp.	Dsb406F	GTACGACGAAGGCCTTCGGGT	213	60	2,01	Yoshida et al., 2007
		Dsb619R	CCCAGGGTTGAGCCCTAGGT				
Dre	<i>Dehalobacter</i> sp.	Dre441F	GTTAGGGAAGAACGGCATCTGT	205	55	1,82	Smits et al., 2004
		Dre645R	CCTCTCCTGTCTCAAGCCATA				

Reakční směsi pro qPCR byly připraveny následovně: na reakční objem 10 µl bylo použito 5 µl SYBR Green I Master (Roche, Inc., MA, USA) obsahující Taq polymerázu, 0,4 µl 20 µM směsi F a R primeru (Generi Biotech, ČR, IDT, US) a 3,6 µl PCR vody (Bioline, UK). Do připraveného master mixu byl poté přidán 1 µl příslušné DNA. Každý vzorek byl analyzován v duplikátu při současné analýze vody jako negativní kontroly.

Všechny qPCR reakce byly provedeny na přístroji LightCycler® 480 (Roche, Switzerland) za následujících reakčních podmínek: počáteční denaturace při 95°C po dobu 3 min, následně 40 cyklů 95°C na 10 s, 60°C na 20 s a 72°C na 10 s. Závěrem je křivka tání s profilem 95°C po dobu 5 s, 65°C na 1 min a konečným zchlazením na 4°C. Porovnání jednotlivých křivek tání určuje čistotu amplifikovaného fragmentu. Pomocí metody druhé derivace (Second Derivative Maximum), která je k dispozici v rámci softwaru LightCycler® 480 Software, byly získány hodnoty fluorescence vzorku v určitém bodě (Cq). Relativní kvantifikace každého sledovaného markeru byla vyjádřena jako změna dvou stavů (příslušného času vzorkování a času před aplikací) za pomoci metody delta Cq. Výsledky qPCR analýz byly vyjádřeny jako relativní kvantifikace Cq hodnot, které byly normalizované na vstupní objem vzorku podzemní vody použitého na jeho filtraci. Interpretace samotných Cq hodnot je založena na nepřímé úměře, tedy čím nižší je hodnota, tím větší množství cílové DNA ve vzorku.

3.4.3 Sekvenování nové generace (NGS)

Vzorky podzemních vod z lokality Nový Bydžov byly analyzovány pomocí tzv. sekvenování nové generace (NGS) cíleného na gen 16S rDNA. Tato metoda umožňuje detailní analýzu diverzity mikrobiálního složení.

Celý proces se skládá z několika kroků. Amplifikace zvoleného V4 regionu 16S rDNA byly realizovány dvěma po sobě následujícími PCR reakcemi. Po PCR reakcích byla provedena kontrola amplifikace pomocí gelové elektroforézy. Následovala purifikace PCR produktů pomocí magnetických kuliček AMPure XP (Beckmann Coulter, CA, USA), změření koncentrace DNA na přístroji Qubit® 2.0 Fluorometr, a ředění vzorků na 25 pM roztok. Tato směs vzorků symbolizovala již připravenou knihovnu, která následovala do emPCR s využitím Ion OneTouch 2 (Life Technologies, CA, USA). Po emPCR byl amplifikovaný směsný PCR produkt přečištěn na Ion One Touch ES (Life Technologies, CA, USA). Tento proces (zvaný jako tzv. Enrichment) je poslední krok potřebný před spuštěním vlastní sekvenační reakce. Ta byla provedena na přístroji Personal Genome Machine (Life Technologies, CA, USA) platformy Ion Torrent. Veškeré kroky související s přípravou knihovny (směsi přečištěných PCR produktů) byly stanoveny na základě rešerše a dlouholetých zkušeností. Kroky, jež souvisejí s obsluhou přístrojů platformy Ion Torrent, jsou popsány v komerčně dostupných protokolech.

Sekvence primerů byla stanovena tak, aby pokryla co nejvíce rozmanitosti při současném udržování velikosti ampliconu pod 400 bází (bp). Amplifikace regionu V4 genu 16S rDNA byla stanovena barcodovými primery 515F a 802R. Laboratorně připravená mock komunita (soubor 4 bakteriálních genomů) byla sekvenována současně s testovanými vzorky a sloužila při analýze získaných výsledků jako standard. Každý vzorek byl označen unikátním barcodem (R1 – R6) připojeným k primeru 802R. Použité primery jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka 3 – Přehled primerů pro amplifikaci knihovny

Zkratka	Název primeru	Sekvence primeru (3' → 5')	Zdroj
16S IT	515F	TGCCAGCMGCGG	Dowd et al., 2008
	802R	TACNVGGGTATCTAATCC	Clæsson et al., 2010
R1	Barcode 1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TCTATTCGTCGATTACNVGGGTATCTAATCC	
R2	Barcode 2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATTACNVGGGTATCTAATCC	
R3	Barcode 3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTTCGATTACNVGGGTATCTAATCC	
R4	Barcode 4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGATTACNVGGGTATCTAATCC	
R5	Barcode 5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGATTACNVGGGTATCTAATCC	
R6	Barcode 6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAAGTTCGATTACNVGGGTATCTAATCC	

Podmínky PCR cyklů: první PCR při 95 °C po dobu 3 min; dále 10 cyklů při 98 °C na 20 s, 55 °C na 15 s a 72 °C na 45 s, se závěrečným prodloužením při teplotě 72 °C na 3 min. Druhá PCR: na 95 °C po dobu 3 min; 35 cyklů 98 °C na 20 s, 50 °C na 15 s a 72 °C na 45 s, se závěrečným prodloužením při teplotě 72 °C na 3 min.

Získané sekvence byly podrobeny analýze prostřednictvím programu Mothur, včetně odfiltrování nekvalitních sekvencí a kontroly chimer (UCHIME). Sekvence byly porovnány s databází SILVA (verze 132). Před konstrukcí OTU byly taktéž odstraněny mitochondriální a chloroplastové sekvence taktéž odstraněny. Shoda zařazení sekvencí k taxonomickým jednotkám (OTU) byla stanovena na 97 %. Počet sekvencí v každém vzorku bylo pomocí náhodného podvzorkování upraveno na 5 038. Pro další analýzy byl využit statistický program R, balíček Vegan. Taxonomické rodiny byly vizualizovány jako heat mapy s četností vyšší než 3 % a ostatní byly přiřazeny do skupiny „ostatní“ nebo „neklasifikovány“ (Schloss et al. 2009; Edgar et al. 2011).

3.5 Ostatní analýzy

3.5.1 Fyzikálně-chemické parametry

Fyzikálně-chemické parametry jako hodnota pH, oxidačně redukční potenciál (ORP) a vodivost ve vzorcích podzemních vod byly měřeny pomocí přenosného multifunkčního přístroje YSI Professional (YSI, USA), případně s využitím multimetru WTW 3430 Multimeter (WTW, Germany) vybaveného SenTix pH elektrodami (TMultiLine® Multi 3430 IDS). Hladina podzemní vody byla měřena pomocí elektronického hladinoměru G30 (NPK Europe Mfg. s.r.o., Uhřetov).

3.5.2 Stanovení koncentrace chlorovaných etenů

Koncentrace jednotlivých CIE, konkrétně tetrachloretenu (PCE), trichloretenu (TCE), dichloretenu (DCE) a vinyl-chloridu (VC), produktů jejich biodegradace, tedy metanu a etenu, byly analyzovány pomocí plynového chromatografu CP 3800/Saturn 2200 s hmotnostním detektorem (Varian, USA), eventuálně v akreditovaných laboratořích AQUATEST a.s. metodou GC/MS dle ČSN EN ISO/IEC 17025.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Lokalita Spolchemie

4.1.1 Laboratorní testy – výběr sanačního činidla

Testování vlivu mZVI odhalilo silný inhibiční efekt na přítomnou mikroflóru. Výsledný kompozitní materiál se skládal z nZVI NANOFER STAR (NANOIRON s.r.o.) a mZVI H₂OmetTM (Atomet), jelikož vykazoval vysokou reaktivitu, dobrou dostupnost a obdobné sedimentační vlastnosti. Výsledky experimentů potvrdily vysokou funkčnost vybraného kompozitu skládajícího se ze 40 hm % NANOFER STAR a 60 hm % mZVI H₂OmetTM 414. Reaktivita vybraného kompozitu byla srovnatelná s čistým nZVI. V kombinaci s DC docházelo k dalšímu, téměř 100% navýšení účinnosti a tím pádem ke snížení nákladů. nZVI přináší do kompozitu rychlý start chemické reakce, zatímco mZVI dodává setrvačnost. Vzhledem k vyšší toxicitě takto zvoleného kompozitu byla pro aplikaci snížena koncentrace nZVI a mZVI na hladinu, při které nedojde k úplnému útlumu bakteriální činnosti.

Každý z testovaných substrátů měl různé účinky v přítomnosti kompozitu nZVI a mZVI. Vliv CMC měl sice pozitivní účinek na přítomné bakteriální kmeny, avšak způsobil pasivaci kompozitu. Jeho aplikace v praxi by proto znamenala znásobení množství kompozitu, a tedy i větší toxicitu a nárůst nákladů. Podobně tomu bylo i při zhodnocení experimentů s melasou. Mezi nejvhodnější substrát se zařadil detergent MSJ. Působil sice jako silný inhibiční faktor na úrovni biologických procesů mikroorganismů, ale jeho účinek měl jiné přednosti. Mezi ně se řadí zlepšení kontaktu železitých částic s kontaminanty a migračních vlastností částic železa. Proto byl detergent MSJ vybrán pro aplikaci na lokalitě.

Z biologického hlediska je výběr MSJ detergentu kontroverzní. Avšak v kombinaci s kompozitem a elektrickým proudem může mít ve výsledku pozitivní vliv. Použití elektrického proudu sice v reaktorových testech vedlo k inaktivaci všech sledovaných bakteriálních kmenů, ale s přihlédnutím na přirozené jevy reálné lokality byl detergent MSJ vybrán jako vhodný. Na lokalitě totiž lze předpokládat opětovné osídlení mikrobiální populací z okolí, a tedy oživení bakteriální biomasy včetně dehalorespirujících bakterií i po aplikaci kompozitu.

4.1.2 Sanační zásah

Na základě výsledků laboratorních testů byl na lokalitě Spolchemie proveden sanační zásah aplikací směsi 20 kg práškového nZVI NANO FER STAR (NANOIRON s.r.o.) a 40 kg mZVI H₂Omet™ 414 (Atomet) společně s 1 kg detergentu MSJ a podporou DC, kdy hodnota počátečního napětí byla stanovena na 24 V a maximální výkon na 750 W.

Relativní hladina dehalogenačních bakterií byla sledována pomocí metody qPCR. Společně s molekulárně genetickou analýzou byla také měřena hladina podzemní vody, fyzikálně-chemické parametry (hodnota pH, ORP, vodivost) a koncentrace kontaminantů (PCE, TCE, suma DCE, VC, eten a metan).

Monitoring podzemní vody začal 2. 7. 2018, přičemž i následující odběr 16. 7. 2018 byl předaplikační. Obě kola sloužila jako kontrolní zhodnocení počátečních koncentrací chemických látek a přítomnosti nezbytných bakterií před samotným zásahem. Aplikace kompozitu a substrátu proběhla 24. 7. 2018 a po ní následovalo dalších 8 odběrů. Třetí a čtvrtý odběr po týdnu, pátý odběr po dvou týdnech, šestý až osmý odběr po měsíci a poslední dva odběry po dvou měsících. Přehled odběrů shrnuje následující tabulka č. 4.

Tabulka 4 – Přehled odběru vzorků lokality Spolchemie

Odběr		Rozmezí	Datum
1	předaplikační	počátek	02.07.2018
2		2 týdny	16.07.2018
aplikace			24.07.2018
3	poaplikační	1 týden	01.08.2018
4		1 týden	08.08.2018
5		2 týdny	28.08.2018
6		1 měsíc	03.10.2018
7		1 měsíc	30.10.2018
8		1 měsíc	21.11.2018
9		2 měsíce	29.01.2019
10		2 měsíce	28.03.2019

Při hodnocení efektivity sanačního zásahu je třeba brát v úvahu, že aplikace navrženého kompozitu s MSJ byla provedena pouze do malého ohniska kontaminace CIE. Lokalita Spolchemie je velmi rozsáhlá a paralelně zde probíhá více různých sanačních zásahů.

4.1.3 Fyzikálně-chemické parametry

V následujících tabulkách č. 5 – 8 jsou hodnoty hladiny podzemní vody a naměřených fyzikálně-chemických parametrů: hodnota pH, oxidačně redukční potenciál (ORP) a vodivost ze všech deseti odběrů lokality Spolchemie. Hladina podzemní vody je důležitý ukazatel, který může souviset s přítomností specifických bakteriálních skupin. Během monitoringu byla hladina podzemní vody téměř stabilní a pohybovala se okolo 3 m od povrchu země (tab. 5). Hodnota pH se pohybovala okolo neutrálních hodnot s drobnými výkyvy na mírně kyselé i mírně zásadité prostředí (tab. 6). ORP vykazoval spíše redukční podmínky prostředí (záporné hodnoty) ve všech vrtech s výjimkou vrtu KJ-3, kde byl potenciál ve většině odběrů spíše mírně oxidačního charakteru (tab. 7). Elektrická vodivost dosahovala po celou dobu monitoringu vyšších hodnot (tab. 8). Tento fakt podtrhuje potenciál lokality pro aplikaci elektrického proudu.

Tabulka 5 – Hladina podzemní vody v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Hladina podzemní vody [m]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	3,0	3,1	3,3	3,2	3,2	3,1	3,2	2,8	2,6	2,6
AW5-58	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,9	2,7	2,6	2,7
AW5-60	3,0	3,0	3,4	3,0	3,0	3,0	3,0	2,7	2,6	2,6
AW5-61	3,0	3,0	3,1	3,0	3,0	3,1	3,0	2,7	2,6	2,4
AW5-62	3,0	3,1	3,1	3,0	3,0	3,0	3,0	2,7	2,7	2,5
KJ-3	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	2,9	2,6	2,7	2,6

Tabulka 6 – Hodnoty pH v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Hodnoty pH									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	6,0	5,9	6,6	6,7	6,8	7,0	6,7	6,2	6,7	6,9
AW5-58	6,5	6,5	6,7	7,6	7,9	7,6	6,9	6,8	8,3	8,3
AW5-60	6,1	6,1	6,8	6,8	7,4	7,7	7,5	6,6	8,1	7,0
AW5-61	5,9	5,9	6,7	7,0	7,0	7,0	7,4	6,4	6,9	6,7
AW5-62	5,7	5,8	6,4	6,3	6,5	6,7	6,6	6,2	6,4	7,1
KJ-3	6,5	6,5	6,6	6,8	6,9	7,1	6,8	7,0	7,3	7,2

Tabulka 7 – Oxidačně redukční potenciál v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	ORP [mV]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	-73	-104	-115	-135	-15	-8	-7	-111	113	-85
AW5-58	-175	-97	-148	-202	-212	-114	-116	-171	-246	-141
AW5-60	-110	-127	-173	-169	-146	-211	-183	-167	-222	-124
AW5-61	-272	-116	-189	-174	-130	-114	-160	-154	-137	-41
AW5-62	-137	-114	-320	-141	-36	-93	-154	-319	-76	-64
KJ-3	-2	21	8	3	15	16	-4	91	-17	-32

Tabulka 8 – Vodivost v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Vodivost [mS/mm]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	451	445	287	267	266	290	263	390	223	246
AW5-58	371	348	288	212	189	260	301	408	357	174
AW5-60	434	426	278	332	205	151	226	438	230	299
AW5-61	395	398	313	337	332	351	327	428	225	331
AW5-62	457	457	310	365	357	317	321	386	230	277
KJ-3	425	427	438	470	372	352	373	159	127	168

4.1.4 Chemická analýza

Chemická analýza je shrnuta v následujících tabulkách č. 9 – 14. Testovány byly kontaminanty tetrachloreten (PCE), trichloreten (TCE), dichloreten (DCE), vinyl-chlorid (VC) a produkty jejich degradace eten a metan. Ve třetím odběru (1. 8. 2018) nebyla chemická analýza provedena z důvodu těsné návaznosti dalšího odběru, přičemž hodnoty koncentrace jednotlivých sloučenin by byly velmi podobné.

PCE koncentrace byla celkově po celou dobu monitoringu relativně nízká a stabilní s mírným poklesem v pozdější době po aplikaci (tab. 9). TCE koncentrace (tab. 10) společně se součtem koncentrace cis- a transDCE (tab. 11) se po aplikaci činidla výrazně snížila, což vedlo ke zvýšení produktů jejich biodegradace, VC (tab. 12), eten (tab. 13) a metan (tab. 14). Koncentrace VC i etenu v pozdějších odběrech mírně klesala, což je v případě toxického VC dobrým ukazatelem biodegradace.

Tabulka 9 – Koncentrace PCE v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	PCE [µg/l]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	18	12	-	76	2	2	2	9	4	5
AW5-58	2	5	-	41	1	1	0	3	2	4
AW5-60	76	94	-	55	1	1	2	4	2	9
AW5-61	2	2	-	36	1	1	1	2	2	3
AW5-62	1	1	-	29	1	2	2	2	6	7
KJ-3	183	122	-	200	146	139	189	298	37	78

Tabulka 10 – Koncentrace TCE v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	TCE [µg/l]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	10 700	5 570	-	13	12	7	20	20	100	466
AW5-58	86	55	-	9	3	12	17	7	11	415
AW5-60	10 200	5 710	-	87	40	68	156	169	138	852
AW5-61	385	176	-	7	3	5	6	3	5	425
AW5-62	21	250	-	6	8	48	41	66	59	455
KJ-3	1 030	437	-	518	480	411	171	601	134	407

Tabulka 11 – Suma koncentrací DCE v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Suma DCE [$\mu\text{g/l}$]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	54 400	45 300	-	14 600	11 700	12 100	19 900	26 300	15 200	9 660
AW5-58	19 500	14 700	-	1 250	859	5 280	8 170	11 100	5 740	5 790
AW5-60	34 500	24 400	-	4 570	3 060	3 930	5 310	9 430	5 880	5 790
AW5-61	11 700	11 100	-	2 930	4 390	4 140	2 690	5 840	1 680	2 590
AW5-62	7 920	7 060	-	2 130	1 710	2 130	2 740	3 960	919	1 190
KJ-3	1 840	976	-	1 310	1 070	1 180	545	1 890	589	1 070

Tabulka 12 – Koncentrace VC v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	VC [$\mu\text{g/l}$]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	4330	3570	-	3460	996	932	3690	2240	3190	1630
AW5-58	4680	3130	-	2520	2240	4380	5470	6030	4440	1600
AW5-60	1670	1190	-	2380	3690	3160	3380	1500	171	262
AW5-61	1780	1710	-	1090	1440	1330	1170	1740	800	1300
AW5-62	1380	1140	-	895	981	768	877	952	396	486
KJ-3	126	86	-	100	68	46	48	103	48	18

Tabulka 13 – Koncentrace etenu v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Eten [$\mu\text{g/l}$]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	431	158	-	122	501	100	3870	213	252	134
AW5-58	601	465	-	2100	4750	3400	9460	5110	2600	2960
AW5-60	138	114	-	826	5090	3840	7420	816	8	32
AW5-61	251	230	-	895	1210	473	1010	424	168	445
AW5-62	129	146	-	686	1190	351	425	286	62	75
KJ-3	9	9	-	11	12	10	14	25	< 5	< 5

Tabulka 14 – Koncentrace metanu v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Metan [$\mu\text{g/l}$]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	53	14	-	7	110	104	1580	95	696	333
AW5-58	33	32	-	49	81	281	1110	356	636	593
AW5-60	29	30	-	28	183	402	1080	295	< 5	19
AW5-61	89	85	-	62	268	144	328	149	358	1620
AW5-62	38	46	-	48	309	117	205	200	201	196
KJ-3	89	151	-	188	234	290	489	813	20	59

4.1.5 Molekulárně genetická analýza

Výsledky molekulárně genetické analýzy jsou uvedeny v tabulkách č. 15, 16 a na obrázcích č. 10 – 15.

Maximální objem zfiltrovaného vzorku podzemní vody byl po dobu monitoringu téměř stabilní (tab. 15). Nedošlo tedy k ovlivnění sanačním zásahem, kdy by nárůst biomasy mohl způsobit kolmataci pórů membránového filtru, a tedy snížení filtrovaného objemu. Výsledná koncentrace DNA detekovaná v jednotlivých vzorcích byla přepočtena na základě

normalizace na vstupní zfiltrovaný objem podzemní vody (tab. 16). Získané DNA výtěžky se taktéž během monitoringu příliš neměnily. Výjimkou byl jen čtvrtý poaplikační odběr (8. 8. 2018) z vrtu AW5-60, kdy došlo k úplnému vymizení veškeré DNA. To mohlo být způsobeno buď chybou odběru, možnou chybou při izolačním procesu anebo externím zásahem na lokalitě, který ovlivnil i tento vrt. Poslední aspekt však nebyl potvrzen, tudíž byl tento odběr při hodnocení ignorován.

Tabulka 15 – Objem podzemní vody v jednotlivých monitorovaných vrtech

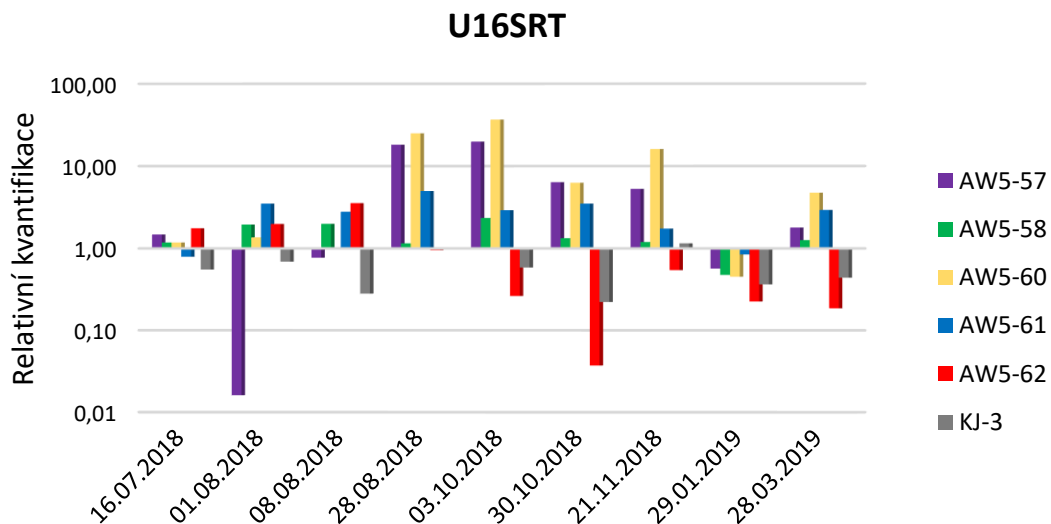
Název vrtu	Objem [l]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	0,45	0,47	0,38	0,49	0,48	0,49	0,47	0,51	0,50	0,30
AW5-58	0,50	0,48	0,47	0,30	0,40	0,49	0,49	0,48	0,40	0,20
AW5-60	0,50	0,49	0,48	0,40	0,50	0,30	0,47	0,40	0,50	0,20
AW5-61	0,48	0,47	0,48	0,49	0,48	0,49	0,48	0,49	0,45	0,53
AW5-62	0,50	0,45	0,48	0,49	0,49	0,50	0,50	0,50	0,53	0,53
KJ-3	0,49	0,50	0,47	0,50	0,50	0,48	0,50	0,50	0,53	0,53

Tabulka 16 – Koncentrace DNA normalizovaná na vstupní objem v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Výtěžek DNA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AW5-57	2,2	2,9	0,1	2,8	20,2	19,2	11,7	11,0	4,5	11,7
AW5-58	1,8	1,8	4,4	13,1	12,2	4,3	3,6	2,3	1,7	17,8
AW5-60	1,3	0,9	2,3	0	2,4	26,4	9,4	15,6	2,0	25,4
AW5-61	2,0	0,9	2,8	2,1	4,7	2,5	6,6	3,2	4,0	9,0
AW5-62	2,4	1,7	4,4	5,6	17,3	4,7	5,0	4,6	5,8	6,3
KJ-3	3,4	0,8	2,0	1,1	3,1	1,3	1,3	2,2	1,1	1,2

Výsledky qPCR analýzy jsou vyjádřeny jako relativní kvantifikace specifických bakterií v poaplikačních vzorcích vztažená k prvnímu, předaplikačnímu, odběru (2. 7. 2018). Takto je v grafech znázorněn nárůst nebo pokles bakteriální biomasy oproti předaplikačnímu stavu v logaritmickém měřítku.

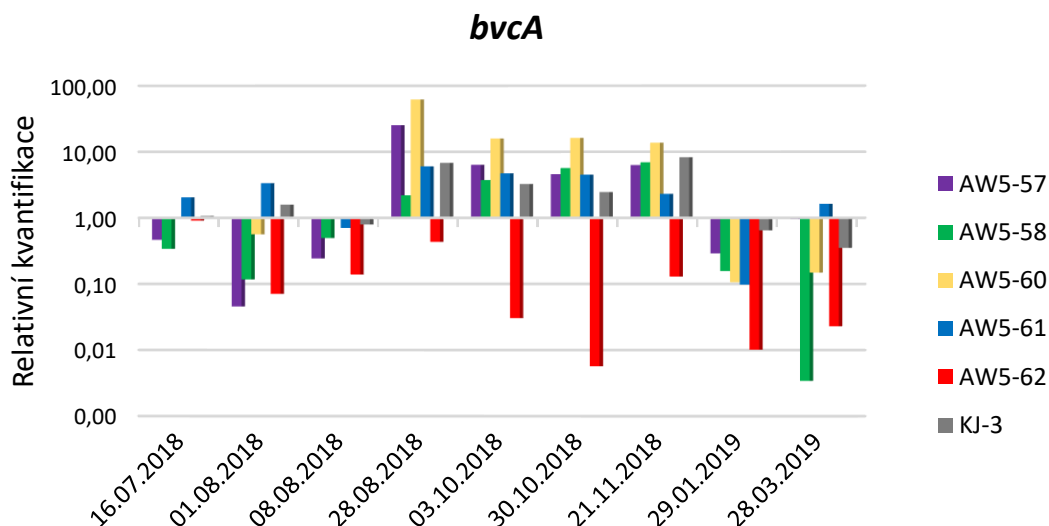
Univerzální marker U16SRT slouží jako ukazatel celkové bakteriální biomasy přítomné v příslušném vzorku (obr. 10). K jeho výraznému poklesu došlo ve vzorku AW5-57 po sanačním zásahu (1. 8. 2018). Jinak má celková bakteriální biomasa charakter mírně vzrůstající počínaje měsícem od aplikace a v pozdějších odběrech spíše ustálený trend zpět k původním hodnotám detekce.



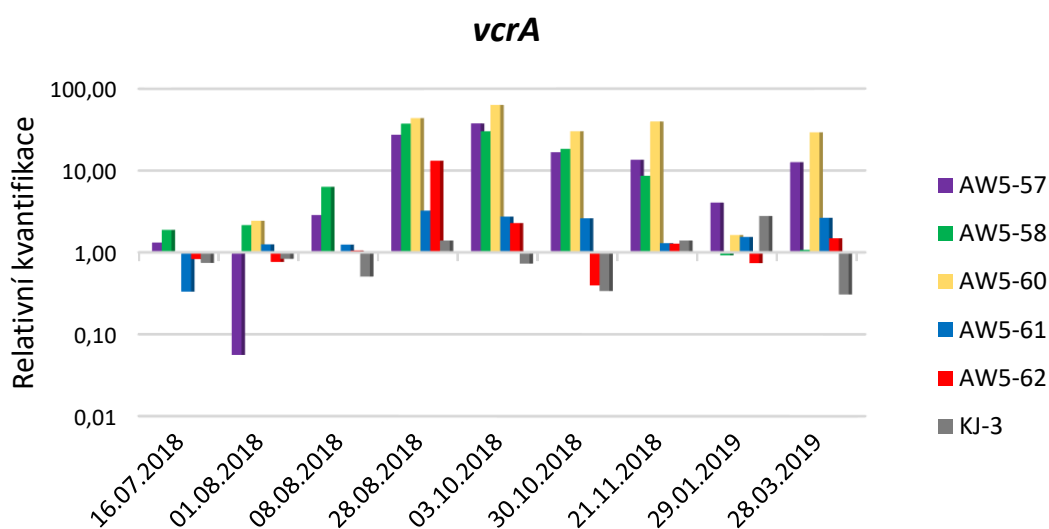
Obrázek 10 – Relativní kvantifikace celkové bakteriální biomasy (marker U16SRT) v čase

Enzymy *bvcA* (obr. 11) a *vrA* (obr. 12) účastníci se rozkladu VC na eten byly oba mírně vzrůstajícího trendu počínaje měsícem po aplikaci nanokompozitu s MSJ. Pokles byl zaznamenán u vzorku AW5-62 v případě enzymu *bvcA*, a to po celou dobu od aplikace. V pozdějších odběrech byl enzym *bvcA* téměř u všech vzorků detekován na nižší úrovni nebo srovnatelně s předaplikačním stavem. Oproti tomu enzym *vrA* měl spíše vzrůstající detekci po celou dobu od aplikace.

Sledovaná aktivita VC reduktázy pravděpodobně zamezila obecně velmi časté akumulaci toxického VC (tab. 12) a rozložila jej na netoxický eten (tab. 13). Tudíž došlo k biodegradaci VC až na základní produkty. To je také cílem úspěšného sanačního zásahu a prokazuje tak efektivitu vybraného postupu.



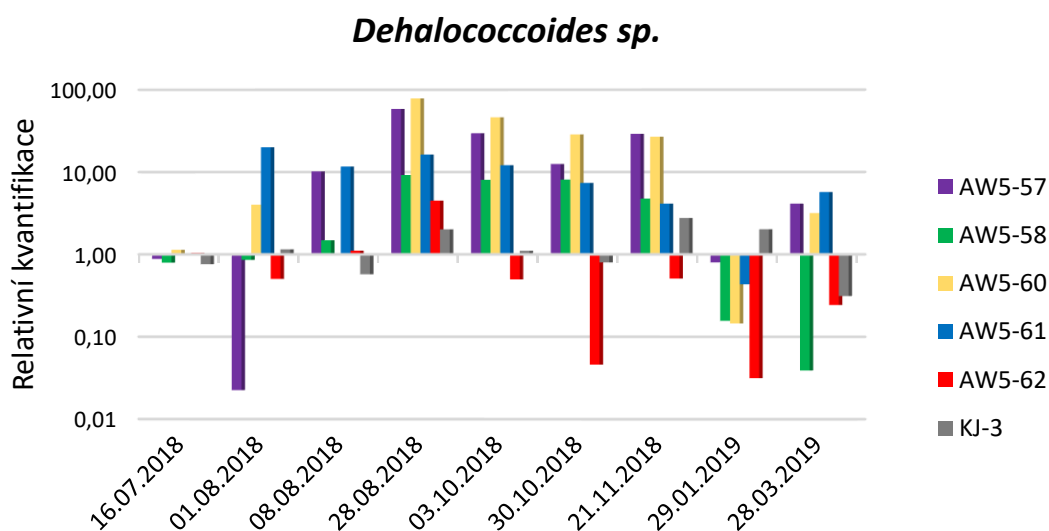
Obrázek 11 – Relativní kvantifikace VC reduktázy (enzym *bvcA*) v čase



Obrázek 12 – Relativní kvantifikace VC reduktázy (enzym *vcrA*) v čase

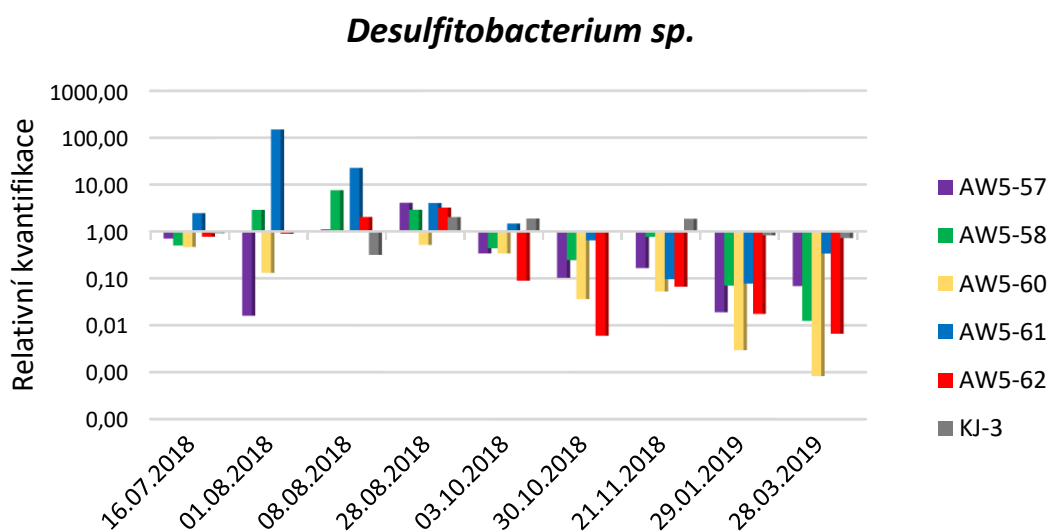
Specifické bakterie *Dehalococcoides* (marker DHC-RT), *Desulfitobacterium* (marker Dsb) a *Dehalobacter* (marker Dre) jsou schopné degradovat PCE a TCE na DCE a *Dehalococcoides* až na eten. Hladina *Dehalococcoides* sp. po sanačním zásahu byla, podobně jako enzym *vcrA*, vzrůstajícího trendu (obr. 13). V pozdějších odběrech byl však efekt aplikace postupně utlumen. Detekované množství bylo srovnatelné s původní hodnotou specifické mikroflóry nebo dokonce klesající, a to ve vzorku AW5-57 z 1. 8. 2018 a AW5-62 v posledních odběrech.

Ačkoli byla většina kontaminace tvořená právě hůře redukovatelným DCE (tab. 11), došlo k masivnímu poklesu jeho koncentrace a zároveň nárůstu produktů dehalogenačního procesu: VC (tab. 12), eten (tab. 13) a metan (tab. 14).



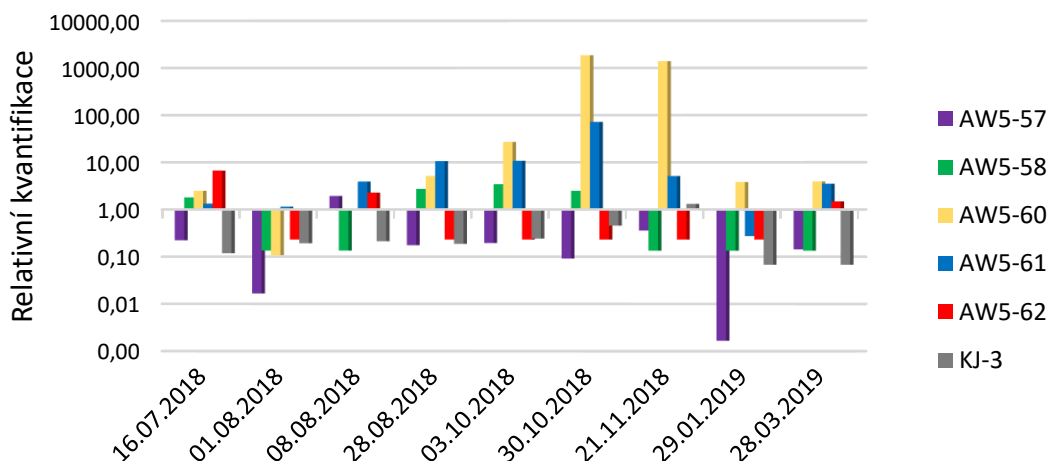
Obrázek 13 – Relativní kvantifikace *Dehalococcoides sp.* (DHC-RT) v čase

Desulfitobacterium sp. (obr. 14) a *Dehalobacter sp.* (obr. 15) byly detekovány spíše ve stabilním nebo klesajícím trendu s mírně kolísajícím charakterem. Tento aspekt byl pravděpodobně zapříčiněn poklesem PCE a TCE, jež tyto bakteriální kmeny rozkládají (tab. 9, 10). Po jejich vymizení došlo také k poklesu příslušných bakterií a uvolnění místa pro jiné bakterie.



Obrázek 14 – Relativní kvantifikace *Desulfitobacterium sp.* (Dsb) v čase

Dehalobacter sp.



Obrázek 15 – Relativní kvantifikace *Dehalobacter sp.* (Dre) v čase

Po aplikaci kompozitu s MSJ došlo k přechodnému negativnímu vlivu na mikroflóru podzemní vody s rychlým nárůstem mikroorganismů nad původně detekované hodnoty pravděpodobně způsobené nátokem nové vody. Nárůst mikroorganismů byl předpokládán na základě přirozeného procesu nátoku podzemní vody z okolí, přičemž aplikovaný detergent se pravděpodobně rychle vyplavil a proto dále nedocházelo k inhibici specifické mikroflóry. Došlo tedy ke kvantitativnímu nárůstu mikroflóry a tedy podpoře biodegradace CIE kontaminantů.

Z biologického hlediska je aplikace samotného nZVI nepřijatelná pro podporu biodegradace, avšak při kombinaci s MSJ substrátem byla prokázána funkčnost této kombinace, kdy MSJ s největší pravděpodobností udržovalo pH lokality. Hodnota pH lokality po sanaci nZVI za podpory DC totiž neklesala a umožňovala tak obnovu autochtonní mikroflóry.

Pro porovnání efektivity sanačního zásahu lze uvést destrukční účinek samotného nZVI a elektrického proudu, jak bylo aplikováno na lokalitě kontaminované CIE mezi léty 2015 – 2017 (Vlková et al. 2018). nZVI s elektrickým proudem změnilo hodnotu pH dané lokality do kyselé oblasti (pH okolo 3) a tím zcela znemožnilo mikroorganismům přežít. Po odeznění účinků došlo k nátoku mikroorganismů z okolí a obnovení přirozené atenuace lokality.

Jelikož je nZVI považováno za toxické činidlo, je jeho výlučná aplikace kombinována s jinými činidly, ať už za účelem redukce toxického účinku, snížení aplikované koncentrace nebo zamezení tvorby agregátů. Zároveň je pro účely bioremediace výhodnější jeho negativní efekt na mikroorganismy omezit a přitom zohlednit možnou finanční úsporu.

4.2 Lokalita Nový Bydžov

4.2.1 Laboratorní testy – výběr sanačního činidla

Všechny testované organické substráty vedly k nárůstu bakteriálního osídlení, přičemž největší vliv na celkovou biomasu byl pozorován v případě syrovátky. U ostatních substrátů byl nárůst biomasy menší, po řadě PHB, glycerol a nejméně u laktátu. Konkrétně dehalogenační bakterie naopak po 42 dnech u syrovátky narostly v nejmenším měřítku. Důvodem je předpoklad, že všechny toxické kontaminanty byly rychle po aplikaci rozloženy, a tak na konci experimentu již neměly možnost výrazně proliferovat. Tento fakt byl upřednostněn před jinými možnými aspekty a syrovátka byla vybrána pro sanační zásah na reálné lokalitě.

4.2.2 Sanační zásah

Na základě výsledků laboratorních testů byla na lokalitě Nový Bydžov naplánována aplikace syrovátky ve třech různých kolech: 3. 10. 2017, 5. 12. 2017 a 25. 5. 2018. V prvních dvou kolech bylo aplikováno 30 m³ syrovátky a v posledním 15 m³, dohromady tedy 75 m³ syrovátky během sedmi měsíců.

Podobně jako u lokality Spolchemie, byla sledována hladina dehalogenačních bakterií molekulárně genetickými metodami, a to jak pomocí qPCR, tak i pomocí NGS. Společně s molekulárně genetickou analýzou byla opět měřena hladina podzemní vody, fyzikálně-chemické parametry (pH, ORP, vodivost) i koncentrace kontaminantů (TCE, PCE, suma DCE, VC, eten a metan).

Monitoring byl započat 25. 9. 2017 odběrem vzorků předaplikačních. 3. 10. 2017 proběhla první aplikace syrovátky a poté následovaly dva poaplikační monitorovací odběry s měsíčním odstupem. Druhá dávka syrovátky byla aplikována 5. 12. 2017, následovaná čtyřmi poaplikačními monitorovacími odběry opět s měsíčními odstupy. Poslední aplikace proběhla 25. 5. 2018 a po ní následovalo sedm dalších monitorovacích kol až do konce března 2019. Přehledná tabulka č. 17 shrnuje provedený monitoring podzemní vody na lokalitě Nový Bydžov.

Tabulka 17 – Přehled odběru vzorků lokality Nový Bydžov

Odběr		Datum
1	předaplikační	25.09.2017
1. aplikace		03.10.2017
2	poaplikační	26.10.2017
3		22.11.2017
2. aplikace		05.12.2017
4	poaplikační	11.01.2018
5		21.02.2018
6		27.03.2018
7		02.05.2018
3. aplikace		25.05.2018
8	poaplikační	03.07.2018
9		08.08.2018
10		11.10.2018
11		29.11.2018
12		29.01.2019
13		26.02.2019
14		29.03.2019

Při hodnocení výsledků je třeba brát v úvahu, že lokalita Nový Bydžov je trvale osídlená a samotné vrty jsou v blízkosti občanské vybavenosti včetně např. základní školy. Veškeré práce tudíž musely být konzultovány s vlastníky pozemků, u nichž se vrty nacházejí a plánovaná sanace navíc musela být vzhledem k prostředí co nejšetrnější.

4.2.3 Fyzikálně-chemické parametry

V následujících tabulkách č. 18 – 21 jsou shrnuty hodnoty hladiny podzemní vody a fyzikálně-chemické parametry: hodnoty pH, oxidačně redukční potenciál (ORP) a vodivost ze všech čtrnácti odběrů lokality Spolchemie. Hladina podzemní vody byla po celou dobu monitoringu stabilní (tab. 18), jen s drobnými výchyly nejspíše vzhledem k sezónním vlivům. Ve dvou odběrech nebyla hladina podzemní vody změřena z důvodu nefunkčního hloubkoměru (8. 8. 2018 a 29. 3. 2019). Hodnota pH lokality byla po celou dobu v neutrální oblasti, a tudíž optimální pro dehalogenační mikroorganismy (tab. 19). ORP (tab. 20) společně s vodivostí (tab. 21) ukazoval spíše na redukční podmínky prostředí. Tato data byla po celou dobu téměř stabilní, pouze s výjimkou vzrůstu vodivosti ve vzorku MR-1 ke konci roku 2018.

Tabulka 18 – Hladina podzemní vody v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Hladina podzemní vody [m]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	3,8	3,5	3,3	3,5	3,7	3,8	3,9
MR-2	3,6	3,8	3,4	4,3	4,5	4,4	4,7
MR-4	3,7	3,4	3,0	3,5	3,5	3,5	3,9
MR-5	3,5	3,4	2,9	3,0	3,4	3,5	3,6
MR-6	3,8	4,2	3,0	2,7	-	3,5	3,3

Název vrtu	Hladina podzemní vody [m]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	4,3	-	3,7	3,5	3,4	3,4	-
MR-2	4,7	-	3,8	3,7	3,5	3,5	-
MR-4	3,6	-	3,5	3,4	3,2	3,2	-
MR-5	3,6	-	3,5	3,4	3,2	3,3	-
MR-6	-	-	3,6	3,4	3,1	3,3	-

Tabulka 19 – Hodnoty pH v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Hodnoty pH						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	7,1	7,2	7,0	6,7	6,9	6,9	6,7
MR-2	7,0	6,3	6,4	6,6	6,8	6,8	6,7
MR-4	6,9	6,6	7,0	7,1	7,4	7,3	7,4
MR-5	7,0	7,1	7,6	7,4	7,4	7,1	6,9
MR-6	6,9	5,7	6,0	6,6	6,8	6,8	6,8

Název vrtu	Hodnoty pH						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	5,6	6,0	6,6	6,6	6,6	6,2	6,2
MR-2	6,5	6,7	6,8	6,8	6,8	6,2	6,3
MR-4	7,0	6,9	7,3	6,6	6,9	6,2	6,2
MR-5	6,8	6,8	7,0	6,8	6,8	6,3	6,3
MR-6	6,6	6,5	6,8	6,6	6,6	6,2	6,2

Tabulka 20 – Oxidačně redukční potenciál v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	ORP [mV]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	-109	-113	-152	-112	-139	-114	-157
MR-2	-61	-132	-167	-135	-126	-110	-290
MR-4	-85	-149	-134	-148	-169	-152	-186
MR-5	51	-133	-204	-178	-197	-163	-183
MR-6	-122	-95	-133	-136	-155	-156	-292

Název vrtu	ORP [mV]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	-110	-130	-62	-186	-126	-85	-138
MR-2	-239	-203	-86	-177	-164	-145	-135
MR-4	-198	-168	-112	-181	-121	-100	-89
MR-5	-213	-181	-87	-179	-111	-107	-106
MR-6	-123	-185	-90	-174	-136	-118	-112

Tabulka 21 – Vodivost v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Vodivost [$\mu\text{S}/\text{mm}$]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	174	199	323	421	233	200	170
MR-2	121	324	664	270	206	162	122
MR-4	137	370	243	226	152	167	146
MR-5	231	327	227	221	213	210	194
MR-6	219	459	475	304	291	305	292

Název vrtu	Vodivost [$\mu\text{S}/\text{mm}$]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	785	433	313	1180	88	136	123
MR-2	90	78	84	45	27	90	90
MR-4	135	139	139	135	147	152	164
MR-5	168	179	177	178	180	178	179
MR-6	296	276	203	184	170	162	162

4.2.4 Chemická analýza

Chemická analýza je shrnuta v následujících tabulkách č. 22 – 27. Testovány byly, obdobně jako v případě lokality Spolchemie, tetrachloreten (PCE), trichloreten (TCE), dichloreten (DCE), vinyl-chlorid (VC) a produkty jejich degradace eten a metan. V posledním odběru (29. 3. 2019) nebyla chemická analýza provedena z důvodu poruchy přístroje.

Koncentrace PCE (tab. 22) a TCE (tab. 23) byla u většiny sledovaných vzorků nízká a po aplikaci syrovátky klesla u tří vzorků až pod detekční limit. Pouze ve vzorku MR-5 byla indikována vzrůstající a posléze klesající koncentrace, přičemž hodnota se vrátila k počáteční. Obdobně tomu bylo i v případě součtu cis- a transDCE izomerů (tab. 24) a koncentrace VC (tab. 25), kde byla však konečná hodnota koncentrace ve vzorku MR-5 vícenásobně vyšší než počáteční. Koncentrace etenu jako produktu úspěšné degradace CIE měla také obdobný trend jako ostatní sledované chlorované sloučeniny (tab. 26). Dva z pěti vrtů vykazovaly podlimitní koncentraci na konci monitoringu, ostatní vrty měly obdobnou

koncentraci, jako na počátku. Co se týče koncentrace metanu, v tomto případě došlo k mírnému nárůstu nejspíš vzhledem k degradaci výše zmíněných CIE (tab. 27).

Tabulka 22 – Koncentrace PCE v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	PCE [$\mu\text{g/l}$]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	24	40	119	3	1	< 1	< 1
MR-2	2	< 1	3	2	1	< 1	< 1
MR-4	16	46	47	7	50	14	113
MR-5	843	29	224	311	1 150	1 290	2 390
MR-6	2	7	11	4	8	6	19

Název vrtu	PCE [$\mu\text{g/l}$]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	-
MR-2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	-
MR-4	528	356	80	138	81	67	-
MR-5	4 190	4 600	561	1 000	1 350	1 050	-
MR-6	41	27	2	< 1	7	7	-

Tabulka 23 – Koncentrace TCE v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	TCE [$\mu\text{g/l}$]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	3	8	17	1	< 1	< 1	< 1
MR-2	1	3	3	1	< 1	< 1	< 1
MR-4	6	64	75	8	13	3	42
MR-5	70	485	192	63	244	443	840
MR-6	3	2	3	1	1	< 1	4

Název vrtu	TCE [$\mu\text{g/l}$]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	-
MR-2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	-
MR-4	304	121	10	20	2	5	-
MR-5	1 300	1 880	89	85	127	124	-
MR-6	5	6	< 1	< 1	< 1	< 1	-

Tabulka 24 – Suma koncentrací DCE v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Suma DCE [µg/l]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	223	824	510	5	6	1	< 1
MR-2	3	7	9	3	2	1	< 1
MR-4	9	224	773	265	352	67	240
MR-5	92	168	980	788	1 280	1 550	1 380
MR-6	46	19	10	26	7	4	4

Název vrtu	Suma DCE [µg/l]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	2	4	< 1	< 1	< 1	< 1	-
MR-2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	-
MR-4	1 060	851	197	179	92	119	-
MR-5	4 110	4 570	649	613	931	930	-
MR-6	31	25	450	5	< 1	< 1	-

Tabulka 25 – Koncentrace VC v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	VC [µg/l]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	154	247	234	< 1	< 1	< 1	< 1
MR-2	< 1	5	5	< 1	< 1	< 1	< 1
MR-4	5	11	36	31	74	46	178
MR-5	6	4	10	24	73	141	138
MR-6	61	18	5	< 1	< 1	< 1	< 1

Název vrtu	VC [µg/l]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	-
MR-2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	-
MR-4	420	222	159	109	56	40	-
MR-5	302	353	108	86	162	164	-
MR-6	10	13	238	12	< 1	< 1	-

Tabulka 26 – Koncentrace etenu v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Eten [µg/l]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	19	41	71	< 2	< 2	< 2	< 2
MR-2	77	18	8	< 2	< 2	< 2	< 2
MR-4	4	5	12	38	52	18	26
MR-5	4	6	4	11	47	121	108
MR-6	< 2	< 2	4	5	< 2	< 2	< 2

Název vrtu	Eten [µg/l]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	-
MR-2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	-
MR-4	53	65	90	34	23	25	-
MR-5	175	323	80	54	42	35	-
MR-6	2	8	178	104	20	5	-

Tabulka 27 – Koncentrace metanu v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Metan [µg/l]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	3 700	2 910	7 680	13 600	14 900	15 700	16 700
MR-2	11 100	4 380	9 940	7 260	14 000	14 900	21 900
MR-4	9 770	11 200	13 100	16 300	15 800	15 500	17 000
MR-5	1 030	2 060	8 070	14 200	14 600	15 700	22 100
MR-6	1 840	5 670	8 570	13 300	14 000	13 500	17 200

Název vrtu	Metan [µg/l]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	8 370	16 800	24 600	16 100	24 100	18 900	-
MR-2	23 600	26 900	19 600	15 300	12 600	10 500	-
MR-4	16 200	17 500	9 900	5 100	6 560	9 830	-
MR-5	17 700	25 100	20 500	17 900	6 780	14 100	-
MR-6	21 500	30 900	26 800	22 900	23 200	2 360	-

4.2.5 Molekulárně genetická analýza - qPCR

Výsledky molekulárně genetické analýzy jsou zobrazeny v následujících tabulkách č. 28, 29 a grafech na obrázcích č. 16 – 23.

Vzhledem k aplikaci syrovátky byl objem zfiltrovaného množství u některých vzorků podzemní vody rozdílný (tab. 28). V případě vzorku MR-2 a MR-5 byl objem zfiltrovaného vzorku redukován již po první aplikaci, v případě vzorku MR-1 došlo ke snížení zfiltrovaného objemu až po třetí aplikaci. Tento aspekt se dal očekávat vzhledem k hustotě aplikovaného substrátu, který velmi rychle vyplnil póry ve filtru, a tudíž nebylo možné zfiltrovat větší množství vzorku přes jednu membránu v reálném čase.

Koncentrace DNA byla přepočtena na základě normalizace na vstupní zfiltrovaný objem podzemní vody (tab. 29). Výtěžek DNA získaný ze zfiltrovaného množství každého vzorku potvrzuje předpokládaný nárůst mikroorganismů po aplikaci syrovátky. Tento nárůst lze pozorovat i v posledním odběru, přestože nejmasivnější nárůst byl zjištěn v období těsně poaplikačním.

Tabulka 28 – Objem podzemní vody v jednotlivých monitorovaných vrtech

Název vrtu	Objem [l]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	0,53	0,52	0,55	0,53	0,50	0,32	0,54
MR-2	0,53	0,09	0,20	0,20	0,30	0,13	0,30
MR-4	0,53	0,30	0,54	0,30	0,30	0,30	0,40
MR-5	0,54	0,09	0,40	0,40	0,50	0,40	0,54
MR-6	0,54	0,10	0,20	0,10	0,30	0,10	0,10

Název vrtu	Objem [l]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	0,03	0,03	0,04	0,05	0,25	0,30	0,20
MR-2	0,40	0,51	0,56	0,57	0,57	0,57	0,56
MR-4	0,50	0,51	0,56	0,57	0,57	0,57	0,57
MR-5	0,40	0,30	0,56	0,50	0,57	0,56	0,57
MR-6	0,54	0,08	0,30	0,35	0,30	0,40	0,25

Tabulka 29 – Koncentrace DNA normalizovaná na vstupní objem v jednotlivých monitorovaných vrtech

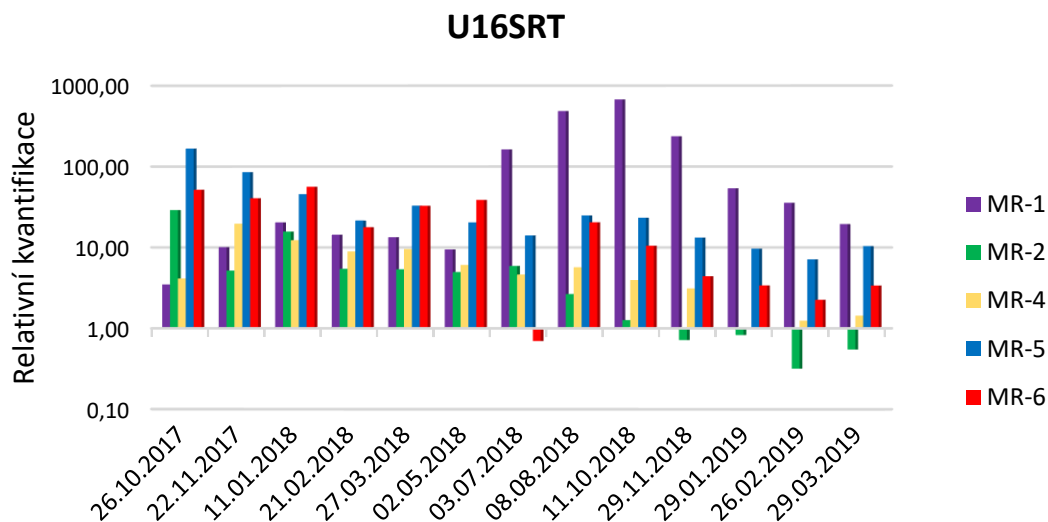
Název vrtu	Výtěžek DNA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]						
	1	2	3	4	5	6	7
MR-1	1,1	4,3	6,4	11,8	16,8	23,6	10,1
MR-2	3,5	104,9	18,1	49,8	20,0	33,9	23,3
MR-4	4,2	17,9	53,3	20,5	22,1	28,7	16,4
MR-5	1,5	143,3	74,0	27,0	12,3	28,5	17,0
MR-6	2,4	82,0	102,0	165,0	55,3	144,0	174,0

Název vrtu	Výtěžek DNA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]						
	8	9	10	11	12	13	14
MR-1	73,0	182,7	317,5	210,0	68,0	48,0	28,2
MR-2	37,8	12,3	5,4	5,2	4,7	2,5	5,9
MR-4	20,0	17,3	13,4	14,3	4,9	6,5	5,0
MR-5	8,9	20,8	20,4	13,9	12,5	8,2	9,6
MR-6	5,2	132,5	66,0	25,4	25,3	17,7	19,8

Výsledky qPCR metody jsou vyjádřeny jako relativní kvantifikace specifických bakterií v poaplikačních vzorcích vzhledem k prvnímu, referenčnímu, odběru (25. 9. 2017). Tímto způsobem lze z grafů vyčíst nárůst nebo pokles bakteriální biomasy oproti předaplikačnímu stavu v logaritmickém měřítku. Vzhledem k velmi rozdílným hodnotám filtrovaného množství je nutné brát zřetel na zjištěné hodnoty. I přes normalizaci na vstupní množství lze totiž předpokládat větší chybu při stanovení relativních trendů.

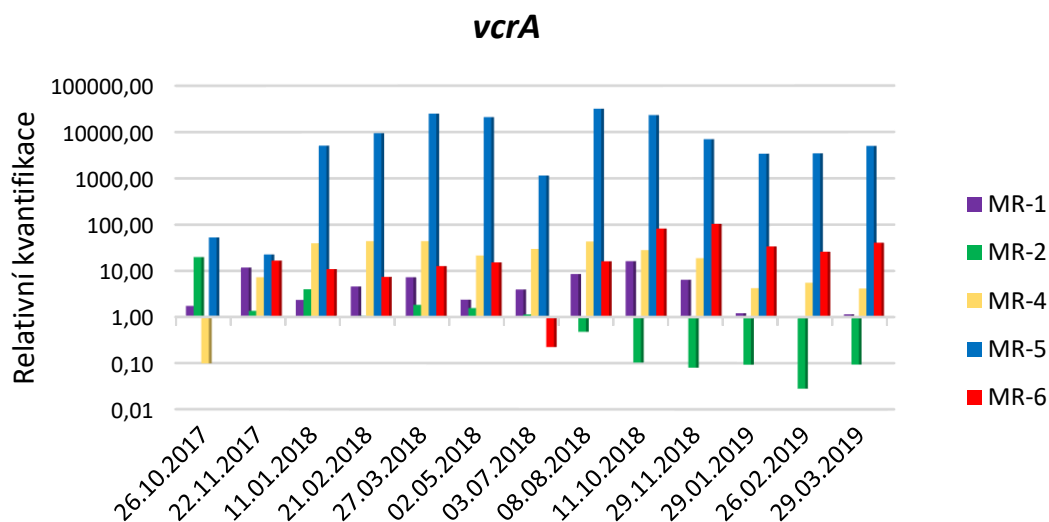
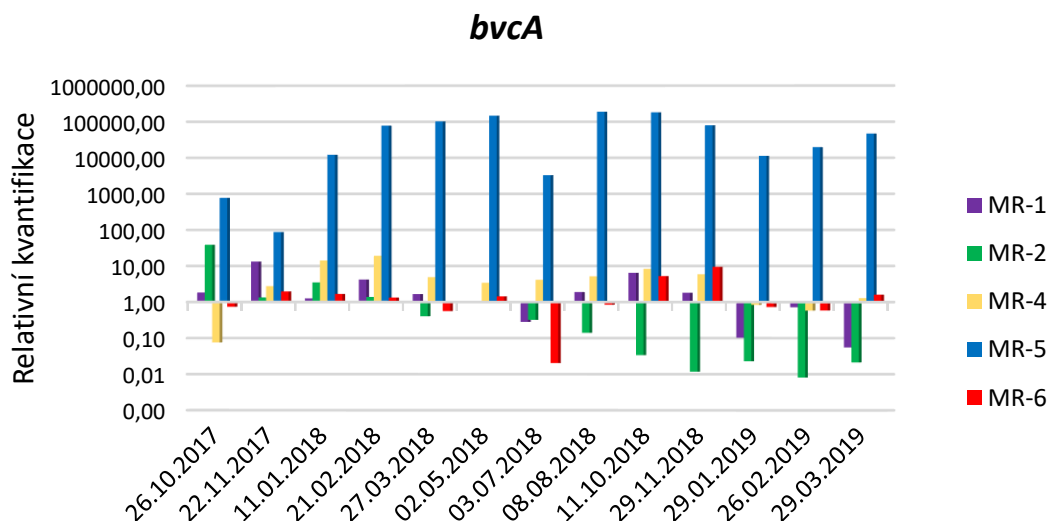
Univerzální marker U16SRT^T je ukazatelem celkové bakteriální biomasy přítomné v příslušném vzorku (obr. 16). Po aplikaci syrovátky došlo k jeho nárůstu v čase, přičemž největší nárůst byl ve všech vzorcích pozorován po první aplikaci (odběr 26. 10. 2017).

Nejvýraznější nárůst byl pozorován ve vrtu MR-1 po třetí aplikaci (odběr 8. 8. 2018). Oproti tomu nejmenší ovlivnění biomasy bylo zaznamenáno ve vrtu MR-2. V pozdějších odběrech se hladina celkové bakteriální biomasy u všech vzorků ustalovala na původních hodnotách.



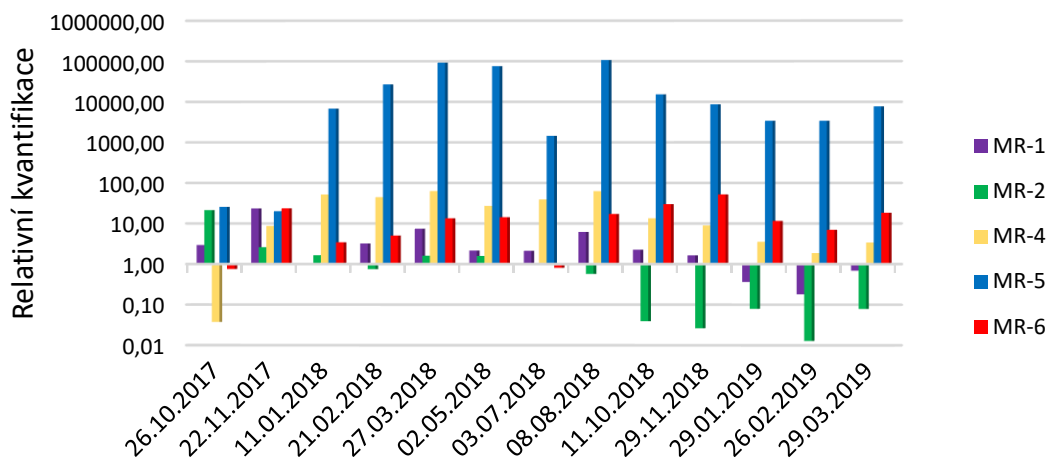
Obrázek 16 – Relativní kvantifikace celkové bakteriální biomasy (marker U16SRT) v čase

Enzymy *bvcA* (obr. 17) a *vrA* (obr. 18) účastníci se především rozkladu VC na eten měly po aplikaci syrovátky mírně rostoucí charakter. Největší nárůst byl pozorován u vzorku MR-5, kde hodnoty vzrostly až 100 000 násobně již po druhé aplikaci syrovátky. Výsledky tak korelují s chemickou analýzou, kde právě ve vzorku MR-5 došlo k nárůstu koncentrace VC během bioremediace (tab. 25). V ostatních případech byla pozorována stabilita specifické biomasy nebo úbytek vzhledem k poklesu koncentrace VC. Při detekci enzymu *vrA* byl navíc zjištěn narůstající trend ve vzorcích MR-4 a MR-6, což vzhledem k výsledkům z chemické analýzy pravděpodobně znamená, že došlo k nátoku podzemní vody s mikroorganismy z prostředí. Naopak ve vzorku MR-2 dokonce došlo k mírnému poklesu tohoto enzymu v pozdějších odběrech a tudíž se dá opět předpokládat, že došlo k nátoku podzemní vody.



Specifické bakterie *Dehalococcoides* (marker DHC-RT), *Desulfitobacterium* (marker Dsb) a *Dehalobacter* (marker Dre) jsou schopné degradovat PCE a TCE na DCE a *Dehalococcoides* až na eten. Hladiny *Dehalococcoides* sp. byly, podobně jako enzym *vcrA*, vzrůstajícího charakteru (obr. 19), nejvýrazněji ve vzorku MR-5 po druhém sanačním zásahu (odběr 11. 1. 2018). Mírný nárůst byl, obdobně jako u enzymu *vcrA*, pozorován ve vzorku MR-4 a MR-6, přičemž ve vzorku MR-2 byl v pozdějších odběrech detekován mírný pokles specifické biomasy.

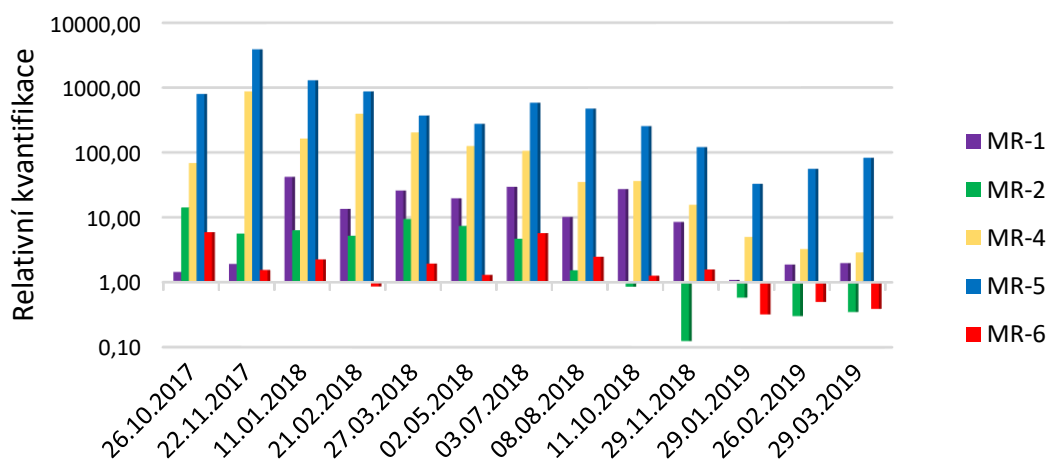
Dehalococcoides sp.



Obrázek 19 – Relativní kvantifikace *Dehalococcoides sp.* (DHC-RT) v čase

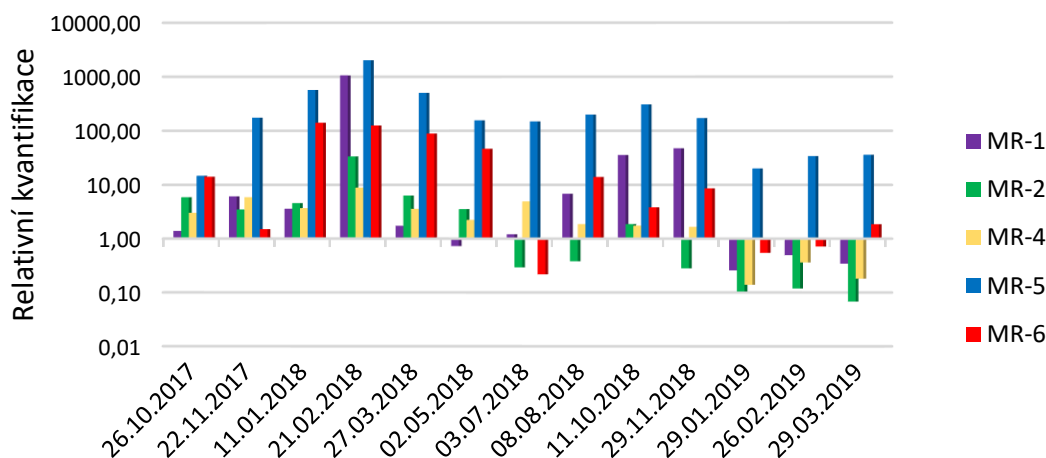
U markerů pro *Desulfitobacterium sp.* (obr. 20) a *Dehalobacter sp.* (obr. 21) byl po aplikaci syrovátky taktéž detekován vzrůstající trend, opět nejvíce ve vzorku MR-5. Ostatní vzorky ale také vykazovaly nárůst specifické biomasy, přičemž v pozdějších odběrech byl tento nárůst postupně snižován až k hodnotám blízkým původnímu stavu před aplikací nebo dokonce k mírnému poklesu v případě detekce bakteriálního kmene *Dehalobacter*. Nejmenší vliv syrovátky byl v případě *Desulfitobacterium* pozorován ve vzorku MR-6 a MR-2, pro *Dehalobacter* MR-4 a MR-2. Tyto výsledky zároveň korelují s chemickou analýzou (tab. 22, 23), kdy klíčové kontaminanty (TCE, PCE) byly perzistentní právě ve vzorku MR-5 a pro vzorky MR-2 a MR-6 přestaly být klíčové díky podlimitní hladině koncentrace.

Desulfitobacterium sp.



Obrázek 20 – Relativní kvantifikace *Desulfitobacterium sp.* (Dsb) v čase

Dehalobacter sp.



Obrázek 21 – Relativní kvantifikace *Dehalobacter sp.* (Dre) v čase

Z výsledků real-time PCR metody vyplývá, že všechny testované markery byly na lokalitě přítomné i před aplikací. Vlastní aplikace syrovátky podporovala a stimulovala proces bioremediace již na lokalitě běžící. Největší vliv byl pozorován po první aplikaci syrovátky (3. 10. 2017), kdy došlo k radikálnímu nárůstu specifických bakteriálních kmenů. Ze sledovaných vrtů byl největší nárůst pozorován ve vzorku MR-5. V tomto vzorku také přetrvávaly vyšší koncentrace chlorovaných sloučenin až do konce monitorování, což pravděpodobně povede k budoucí biodegradaci. Tento jev je evidentně podporován i nátokem podzemní vody z okolí sanačního zásahu, protože ani po dalších dvou aplikacích (5. 12. 2017 a 25. 5. 2018) nedošlo k výraznému snížení koncentrací polutantů a sledovaných bakteriálních kmenů ve vzorku. Tyto další aplikace zároveň pomohly k dlouhodobějšímu udržení podporované biodegradace CIE. Tento jev byl potvrzen i nárůstem etenu jakožto produktu jejich biodegradace. Přítomnost enzymů VC reduktázy také dokazuje, že proces biodegradace nekončí na toxickém VC, ale je dále tento produkt rozkládán na eten. Všechny pozorované aspekty svědčí o úspěšné bioremediaci a efektivním sanačním zásahu na lokalitě.

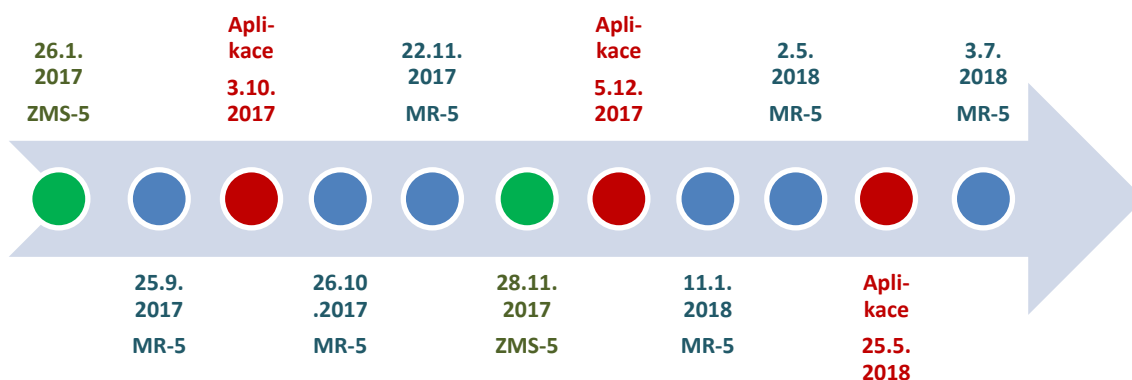
Aplikace substrátů patří mezi úspěšné bioremediační metody, jak rozkládat CIE, ale i jiné polutanty. Další úspěšnou aplikaci syrovátky na reálné lokalitě popisuje Němeček et al. (2016), a to jak samotného substrátu, tak v kombinaci s nZVI. Popisuje zde, že došlo nejen k dechloraci CIE, ale také odstranění šestimocného chromu - Cr(VI).

Dalším příkladem, kde byla vybrána pouze aplikace substrátu jako šetrnější metody, je Lacinova et al. (2012). Tento sanační zásah se týkal využití laktátu jako úspěšného bioremediačního činidla vzhledem k biodegradaci CIE.

4.2.6 Molekulárně genetická analýza - NGS

Výsledky real-time PCR analýzy přinesly velmi zajímavé výsledky, které vyvolaly otázky ohledně celkové změny bakteriálního konsorcia díky opakované aplikaci syrovátky. Vzhledem ke složitosti a finanční náročnosti NGS metody byly vybrány pouze dva vrty: MR-5 jako vrt ovlivněný sanačním zásahem a ZMS-5 jako vrt kontrolní, neovlivněný. Tento vrt byl paralelně vzorkován v rámci monitorování přirozené atenuace na lokalitě a jeho poloha je mimo oblast sanačního zásahu (viz mapa na obr. č. 8).

Byly vybrány následující odběry vzorku MR-5, vždy před a po každé aplikaci syrovátky: 25. 9. 2017, 26. 10. 2017, 22. 11. 2017, 11. 1. 2018, 2. 5. 2018 a 3. 7. 2018. Pro kontrolní vzorek byly vybrány odběry dle potřeby pozorování možného ovlivnění sanačním zásahem, a to před aplikací syrovátky 26. 1. 2017 a po první aplikaci 28. 11. 2017. Všechny odběry byly analyzovány v duplikátu. Následující obrázek č. 22 shrnuje časovou osu vybraných odběrů pro přehled.

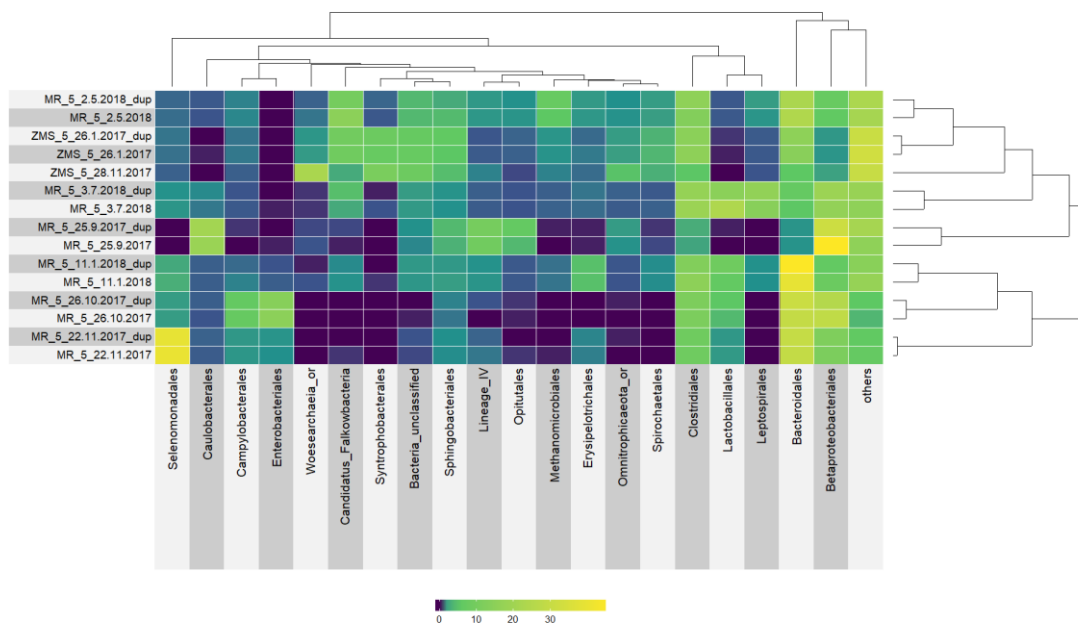


Obrázek 22 – Časová osa vybraných odběrů pro NGS analýzu. Modrá – MR-5, zelená – ZMS-5 a červená – aplikace syrovátky.

Bakteriální komunity a jejich vývoj v čase byl vyhodnocen na úrovni čeledě s relativní četností vyšší než 3 %.

Následující heat mapa (obr. 23) demonstruje vysokou uniformitu mezi jednotlivými duplikáty. Mezi vzorkem MR-5 z posledních odběrů (2. 5. 2018 a 3. 7. 2018) a ZMS-5 z obou odběrů (26. 1. 2017 a 28. 11. 2017) byla zjištěna vysoká similarita, přičemž druhý odběr ZMS-5 mohl být ovlivněný aplikovaným substrátem. Další shoda byla pozorována mezi

vzorky MR-5 ze tří odběrů po první a druhé aplikaci syrovátky (odběry 26. 10. 2017, 22. 11. 2017 a 11. 1. 2018). První předaplikační odběr vzorku MR-5 byl od ostatních nejrozdílnější.



Obrázek 23 – Bakteriální diverzita na úrovni čeledě s relativní četností nad 3 %. Dup – duplikát.

NGS analýza prokázala změnu struktury bakteriálních komunit ve spojení s aplikací syrovátky (obr. 24). Vzhledem k vysoké podobnosti duplikátů je v následujícím obrázku č. 24 uveden průměr z duplikátu.

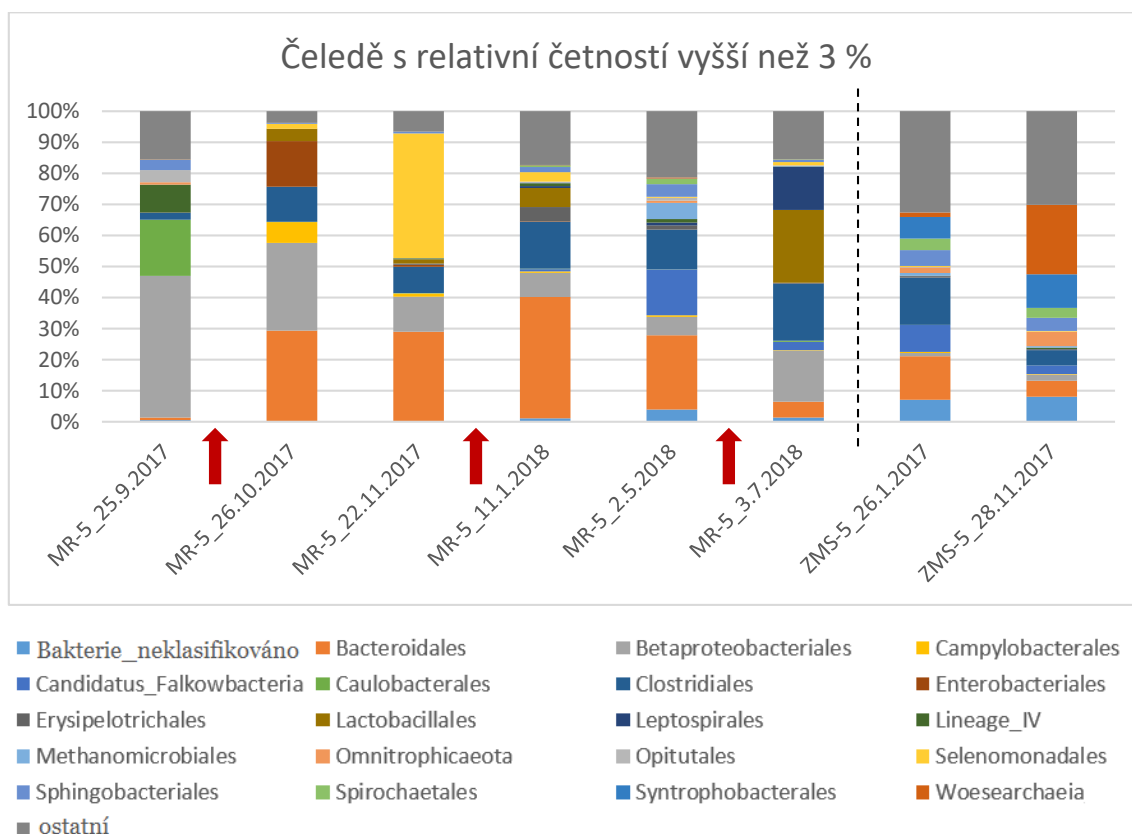
Ve vzorku MR-5 z prvního předaplikačního odběru (25. 9. 2017) byla zjištěna vysoká četnost denitrifikačních bakterií (*Betaproteobacteriales*, *Caulobacterales*). Během aplikace syrovátky došlo k poklesu četnosti těchto čeledí na úkor nárůstu jiných bakteriálních komunit. V obou odběrech kontrolního vzorku ZMS-5 byla detekována jen jejich nízká četnost.

Po první aplikaci syrovátky do vrtnu MR-5 (3. 10. 2017) došlo k rapidnímu nárůstu nebo objevení anaerobních bakterií s respiračním nebo fermentativním metabolismem (*Selenomonadales*, *Enterobacteriales*) nebo bakterií indikujících fekální znečištění (*Bacteroidales*). Četnost těchto čeledí postupně klesala v následujících odběrech až k původnímu stavu a jejich výskyt nebyl potvrzen v referenčním vzorku ZMS-5. Obdobný trend byl pozorován i v případě metanogenních bakterií, což evidentně naznačuje spojitost s aplikací syrovátky.

Ostatní pozorované čeledi patří k saprofytickým a/nebo patogenním bakteriím, jako např. *Clostridiales*, *Leptospirales* a *Spirochaetales*. Čeď *Clostridiales* byla přítomna během celého monitoringu v obou vrtech a je známa jako obligátní anaerobní mikroorganismus, jehož enzymy se často využívají při bioremediaci a jsou detekovány i na jiných lokalitách

kontaminovaných CIE. Čeleď *Leptospirales* se objevila v posledním odběru (3. 7. 2018), přičemž *Spirochaetales* byly pozorovány spíše v kontrolním vrtu ZMS-5.

Referenční vrt ZMS-5 měl v porovnání s ovlivněným vrtem MR-5 větší bakteriální diverzitu. Přítomnost sulfát-redukujících komunit (*Syntrophobacteriales*, *Candidatus-Falkowbacteria*) a anaerobní čeledi *Woesearchaeia*, byla pozorována především v referenčním vrtu ZMS-5.



Obrázek 24 – Vývoj bakteriální diverzity na úrovni čeledí s relativní četností vyšší než 3 %. Červená šipka – aplikace syrovátky.

Z výsledků NGS analýzy lze vyvodit, že na lokalitě byla zjištěna markantní přítomnost denitrifikačních bakterií v jednom z nejvíce kontaminovaných míst lokality. Tyto bakterie mají zároveň silnou vazbu na aplikaci syrovátky. Přestože mezi nejčetnějšími bakteriálními konsorciemi nebyly vyzorovány dehalogenační bakterie, jejich přítomnost byla ověřena pomocí real-time PCR analýzy. Nehledě na počet opakování aplikace syrovátky, největší změna bakteriální diverzity byla zjištěna po první aplikaci (3. 10. 2017). Referenční vrt ZMS-5 byl oproti ovlivněnému vrtu MR-5 dlouhodobě stabilnější a nedošlo zde ke změnám bakteriální diverzity vzhledem k aplikaci syrovátky jako ve vzorku MR-5.

Pro porovnání efektivity sanačního zásahu lze opět uvést účinek nZVI a elektrického proudu, jak již bylo výše popsáno (Vlková et al. 2018). Tato aplikace dokázala zcela změnit bakteriální diverzitu prostředí a to bez ohledu na nátok podzemní vody s mikroflórou z okolí.

Substráty mají v bioremediaci důležitou roli, navíc jsou šetrné pro sanované prostředí. Jejich účinek ve srovnání s nZVI je však pomalejší, ale není závislý na nátoku podzemní vody z okolí. I v tomto případě se tedy jedná o alternativu vhodnou pro efektivní bioremediaci v případě přítomnosti příslušné specifické mikroflóry.

5 Závěr

Předkládaná diplomová práce shrnuje výsledky získané v průběhu realizovaných sanačních zásahů na lokalitách Spolchemie a Nový Bydžov, které byly kontaminované CIE. Kromě předaplikačního a poaplikačního monitoringu zacíleného na koncentrace jednotlivých polutantů, byl důraz také kladen na změny autochtonní mikroflóry, které byly vyvolané daným sanačním zásahem.

Lokalita Spolchemie, sanovaná kompozitem nZVI a mZVI v kombinaci s detergentem MSJ a DC, ukázala velmi zajímavý efekt sanačního činidla podporovaného přirozenými procesy. Po aplikaci kompozitu s MSJ a DC došlo k vyčištění podzemní vody ve vrtech, kdy substrát udržoval vhodné pH prostředí pro růst biomasy. Po jeho rychlém vyplavení s nátokem podzemní vody z okolí urychlil bioremediační proces, který byl sledován prostřednictvím qPCR analýzy. Ačkoli tedy patří nZVI mezi sanační činidla s rychlým nástupem, ale krátkodobým účinkem, ve vybrané kombinaci došlo k prodloužení účinku a zvýšení efektivity sanačního zásahu vzhledem k dehalogenačním bakteriím a biodegradaci CIE polutantů. Zároveň byla snížena pravděpodobnost možné toxicity, a to díky snížení aplikovaného množství na úkor směsi s mZVI. Těmito kroky byly tedy omezeny rizikové faktory sanačního činidla a zároveň došlo k efektivnímu sanačnímu zásahu.

Lokalita Nový Bydžov byla s ohledem na podmínky prostředí sanována šetrnější metodou, a to syrovátkou. Vzhledem ke známým účinkům tohoto činidla byla aplikace opakována ve třech navazujících injektážích. Monitorování účinků syrovátky v čase přineslo opět zajímavé výsledky. Nejen, že došlo ke dlouhotrvajícímu účinku, ale také byla pozorována mírná akumulace ve dvou z pěti sledovaných vrtů za současného vyčištění ostatních. Zároveň ale díky přítomné syrovátce byla i tato akumulace redukována s potenciálem vymizení v případně budoucích monitorovacích aktivit. Vzhledem k nečekaným změnám bylo v nejovlivněnějším vrtu také testováno, zda nedošlo k změně bakteriální kompozice po sanačním zásahu. NGS analýza potvrdila, že byla pozorována především přítomnost denitrifikačních bakterií a sanační zásah ovlivnil pouze přirozený nárůst bakterií se schopností fermentace. Tímto tedy byla potvrzena šetrnost sanačního zásahu. I v nepřítomnosti radikálnějšího činidla došlo k efektivní sanaci, avšak za cenu delšího času potřebného pro její kompletní průběh.

Z obecného hlediska je pro sanační zásah vždy nutné zvážit podmínky každé lokality, typ kontaminace, její závažnost a dopad na prostředí. Aplikace nZVI sice patří k nejmodernějším způsobům sanačního zásahu, avšak jeho možný toxický účinek je čím dál více diskutovaným tématem a často tak dochází k upřednostnění jiné metody. Ovšem

s přihlédnutím na možnost snížení jeho aplikační koncentrace např. za cenu kompozitní směsi s mZVI nebo kombinace s jiným činidlem se stává velmi účinnou metodou. Má rychlejší nástup účinku, hlubší dopad na kontaminanty a v případě příhodných podmínek dojde k znovuoobnovení lokality a následné bioremediaci zbytkových koncentrací kontaminantů. Oproti tomu aplikace substrátu je sice pomalejší metodou, avšak šetrnější. Zachovává přítomnou přirozenou bakteriální diverzitu a podporuje její účinek. Zároveň jde o finančně méně náročnou metodu a její podmínkou je přítomnost specifické bakteriální mikrobioty pro biodegradaci polutantů.

Pro plánovaný sanační zásah je tedy důležité přihlédnout na všechny aspekty dané lokality, zvážit možnosti, očekávaný účinek a dostupnost žádaných metod. Od toho se odvíjí výběr sanačního činidla a žádaných analýz. Doporučuje se přihlížet nejen na molekulárně genetické metody, ale také na fyzikálně-chemické parametry a geologii lokality. Jen kombinací všech metod lze docílit efektivního monitorování sanačního zásahu a správného hodnocení či predikce dopadu.

Literatura

ALBERTS, Bruce, ed., 2008. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4105-5.

BEHRENS, S., M. F. AZIZIAN, P. J. MCMURDIE, A. SABALOWSKY, M. E. DOLAN, L. SEMPRINI a A. M. SPORMANN, 2008. Monitoring Abundance and Expression of „Dehalococcoides” Species Chloroethene-Reductive Dehalogenases in a Tetrachloroethene-Dechlorinating Flow Column. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **74**(18), 5695–5703. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00926-08.

CLAESSON, Marcus J., Qiong WANG, Orla O’SULLIVAN, Rachel GREENE-DINIZ, James R. COLE, R. Paul ROSS a Paul W. O’TOOLE, 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* [online]. **38**(22), e200–e200. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq873.

CLARK, David P. a Nanette J. PAZDERNIK, 2013. Bacterial Genetics. In: *Molecular Biology* [online]. B.m.: Elsevier, s. e641–e646 [vid. 2019-04-20]. ISBN 978-0-12-378594-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-378594-7.00060-3.

CLIFFORD, Robert J., Michael MILILLO, Jackson PRESTWOOD, Reyes QUINTERO, Daniel V. ZURAWSKI, Yoon I. KWAK, Paige E. WATERMAN, Emil P. LESHO a Patrick MC GANN, 2012. Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR. *PLoS ONE* [online]. **7**(11), e48558. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0048558.

ČALOUNOVÁ, Gabriela, Eduard KOČÁREK a Jakub MINKS, nedatováno. Sborník textů: Vybrané aspekty lékařské genetiky, 2008. In: *Projekt Metabolické vzdělávací centrum CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048: Vybrané aspekty lékařské genetiky*. Praha: Ústav dědičných metabolických poruch, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, s. 97.

ČERNÍK, Miroslav, VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE a TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI, 2010. *Chemicky podporované in situ sanační technologie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-767-5.

DOLINOVÁ, Iva, 2018. *Molecular biology tools for diagnostics of ongoing remediation*. Liberec: Technická univerzita v Liberci.

DOLINOVÁ, Iva, Marie CZINNEROVÁ, Lukáš DVOŘÁK, Vojtěch STEJSKAL, Alena ŠEVCŮ a Miroslav ČERNÍK, 2016. Dynamics of organohalide-respiring bacteria and their genes following in-situ chemical oxidation of chlorinated ethenes and biostimulation. *Chemosphere* [online]. **157**, 276–285. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.030.

DOLINOVÁ, Iva, Martina ŠTROJISOVÁ, Miroslav ČERNÍK, Jan NĚMEČEK, Jířina MACHÁČKOVÁ a Alena ŠEVCŮ, 2017. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **24**(15), 13262–13283. ISSN 0944-1344, 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-017-8867-y.

DOWD, Scot E, Todd R CALLAWAY, Randall D WOLCOTT, Yan SUN, Trevor MCKEEHAN, Robert G HAGEVOORT a Thomas S EDRINGTON, 2008. Evaluation of

the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology* [online]. **8**(1), 125. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2180-8-125.

EDGAR, Robert C., Brian J. HAAS, Jose C. CLEMENTE, Christopher QUINCE a Rob KNIGHT, 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* [online]. **27**(16), 2194–2200. ISSN 1460-2059, 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btr381.

CHEREMISINOFF, Nicholas P., ed., 2017. *Groundwater remediation: a practical guide for environmental engineers and scientists*. Beverly, MA: Scrivener Publishing. ISBN 978-1-119-40773-7.

JBS SCIENCE. PRODUCTS. *TP53 codon 249T hotspot mutation PCR Quantification Kit* [online]. ©2012 [vid. 2019-04-20]. Dostupné z: <http://www.jbs-science.com/TP53.php>.

LACINOVA, Lenka, Petr KVAPIL a Miroslav CERNIK, 2012. A field comparison of two reductive dechlorination (zero-valent iron and lactate) methods. *Environmental Technology* [online]. **33**(7), 741–749. ISSN 0959-3330, 1479-487X. Dostupné z: doi:10.1080/09593330.2011.592225.

LITVINENKO, Vladimir a INTERNATIONAL FORUM-CONTEST OF YOUNG RESEARCHERS, 2019. *Topical issues of rational use of natural resources: proceedings of the International Forum-Contest of Young Researchers, April 18-20, 2018, St. Petersburg, Russia* [online] [vid. 2019-04-14]. ISBN 978-0-429-67499-0. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=1917376>.

NECHANICKÁ, Magda, Iva DOLINOVÁ, Denisa VLKOVÁ a Lukáš DVOŘÁK, 2018. Využití nanovlákných nosičů pro monitoring biomasy na kontaminované lokalitě. *Vodní hospodářství*. ISSN 1211-0760.

NĚMEČEK, Jan, 2015. *Výzkum kombinované biologicko-chemické metody sanace podzemních vod znečištěných chromem*. Liberec: Technická univerzita v Liberci.

NĚMEČEK, Jan, Iva DOLINOVÁ, Jiřina MACHÁČKOVÁ, Roman ŠPÁNEK, Alena ŠEVCŮ, Tomáš LEDERER a Miroslav ČERNÍK, 2017. Stratification of chlorinated ethenes natural attenuation in an alluvial aquifer assessed by hydrochemical and biomolecular tools. *Chemosphere* [online]. **184**, 1157–1167. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.06.100.

NĚMEČEK, Jan, Petr POKORNÝ, Ondřej LHOTSKÝ, Vladislav KNYTL, Petra NAJMANOVÁ, Jana STEINOVÁ, Miroslav ČERNÍK, Alena FILIPOVÁ, Jan FILIP a Tomáš CAJTHAML, 2016. Combined nano-biotechnology for in-situ remediation of mixed contamination of groundwater by hexavalent chromium and chlorinated solvents. *Science of The Total Environment* [online]. **563–564**, 822–834. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.019.

NGUYEN, Nhung H. A., Roman ŠPÁNEK, Vojtěch KASALICKÝ, David RIBAS, Denisa VLKOVÁ, Hana ŘEHÁKOVÁ, Pavel KEJZLAR a Alena ŠEVCŮ, 2018. Different effects of nano-scale and micro-scale zero-valent iron particles on planktonic

microorganisms from natural reservoir water. *Environmental Science: Nano* [online]. **5**(5), 1117–1129. ISSN 2051-8153, 2051-8161. Dostupné z: doi:10.1039/C7EN01120B.

POLLARD, Thomas D., William C. EARNSHAW a Jennifer LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2008. *Cell biology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier. ISBN 978-1-4160-2255-8.

SCHLOSS, P. D., S. L. WESTCOTT, T. RYABIN, J. R. HALL, M. HARTMANN, E. B. HOLLISTER, R. A. LESNIEWSKI, B. B. OAKLEY, D. H. PARKS, C. J. ROBINSON, J. W. SAHL, B. STRES, G. G. THALLINGER, D. J. VAN HORN a C. F. WEBER, 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **75**(23), 7537–7541. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01541-09.

SMITS, Theo H.M, Christiane DEVENOGES, Katia SZYNALSKI, Julien MAILLARD a Christof HOLLIGER, 2004. Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* [online]. **57**(3), 369–378. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2004.02.003.

STAVĚLOVÁ, Monika, Iva DOLINOVÁ, Radek HEŘMÁNEK, Maria BRENNEROVÁ a Roman ŠPÁNEK, 2016. Reduktivní dehalogenace chlorovaných etenů – diskuse výsledků terénních, chemických a molekulárně genetických analýz tří vrtů z ohniska kontaminace ze tří různých lokalit. *Sanační technologie XIX*.

ŠMARDA, Jan, 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-3841-7.

VICTOR LLACA, 2012. *Sequencing Technologies and Their Use in Plant Biotechnology and Breeding*. B.m.: INTECH Open Access Publisher. ISBN 978-953-51-0564-0.

VLKOVÁ, Denisa, 2017. *Využití systému kapilární elektroforézy při detekci bakteriálních kmenů*. Liberec: Technická univerzita v Liberci.

VLKOVÁ, Denisa, Iva DOLINOVÁ, Roman ŠPÁNEK, Alena ŠEVČŮ a Jaroslav NOSEK, 2018. Effect of electric current on organohalide respiring bacteria from contaminated locality treated by nZVI. *Scopus*. **2018**. ISSN ISBN: 9788087294819.

YOSHIDA, N., N. TAKAHASHI a A. HIRAISHI, 2005. Phylogenetic Characterization of a Polychlorinated-Dioxin- Dechlorinating Microbial Community by Use of Microcosm Studies. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **71**(8), 4325–4334. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.8.4325-4334.2005.