



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

Aplikace nanovláknenných nosičů pro diagnostiku biomasy na kontaminované lokality

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie

Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály

Autor práce: **Bc. Magda Nechanická**

Vedoucí práce: Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.





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

Application of nanofiber carriers used for diagnosis of biomass at the contaminated site

Master thesis

Study programme: N3942 – Nanotechnology

Study branch: 3942T002 – Nanomaterials

Author: **Bc. Magda Nechanická**

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



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Magda Nechanická**
Osobní číslo: **M15000216**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Aplikace nanovlákných nosičů pro diagnostiku biomasy na kontaminované lokalitě**
Zadávací katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Nastudovat problematiku tvorby biofilmových nárostů.
2. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na metody a způsoby monitoringu biomasy na reálných lokalitách.
3. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na metody diagnostiky biomasy z kontaminovaných lokalit.
4. Navrhnout plán dlouhodobého monitoringu na reálné lokalitě.
5. Připravit a umístit nosiče vyrobené z nanovláken na lokalitu za účelem diagnostiky biomasy.
6. Provést dlouhodobý monitoring a pravidelné analýzy nosičů biomasy, průběžně interpretovat dosahované výsledky.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **40 - 60 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:

- [1] SINGH R., PAUL D., JAIN R.K., (2006): Biofilms: implications in bioremediation. Trends in Microbiology, 14(9), 389-397.
[2] DAS S., SEN B., DEBNATH N. (2015): Recent trends in nanomaterials applications in environmental monitoring and remediation. Environmental Science and Pollution Research, 22(23), 18333-18344.
[3] PEACOCK A.D., CHANG Y.J., ISTOK J.D., KRUMHOLZ L., GEYER R., KINSALL B., WATSON D., SUBLETTE K.L., WHITE D.C. (2004): Utilization of Microbial Biofilms as Monitors of Bioremediation. Microbial Ecology, 47(3), 284-292.
[4] CHIANG S.Y.D., MORA R, DIGUISEPPI W.H., DAVIS G., SUBLETTE K., GEDALANGA P., MAHENDRA S. (2012): Characterizing the intrinsic bioremediation potential of 1,4-dioxane and trichloroethene using innovative environmental diagnostic tools. Journal of Environmental Monitoring, 14(9), 2317-2326.
[5] ALBERTS B. (2014): Molecular Biology of the Cell, 6th Ed. PB, Taylor and Francis, New York US, s. 1342. ISBN: 978-0-8153-4432-2.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Ing. Lukáš Dvořák, Ph.D.**
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Iva Dolinová**
Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace
Datum zadání diplomové práce: **20. října 2016**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2017**

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan



prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 20. října 2016

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 tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 10.5. 2017

Podpis: *Technická*

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Mgr. Ing. Lukášovi Dvořákovi, Ph.D. za vedení a pomoc se zpracováním odborného textu. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Mgr. Ivě Dolinové za odborné konzultace k molekulární genetice a Denise Vlkové za pomoc při experimentální práci. Poděkování patří i Ing. Janu Dolinovi za pomoc při vzorkování. Děkuji také Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D. za snímky z elektronového mikroskopu. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a pracovnímu týmu za podporu a trpělivost.

Nakonec bych chtěla poděkovat projektu NanoEnviCZ - Výzkumná infrastruktura za možnost využít přístrojové vybavení, a tedy realizovat tuto práci.

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na aplikace nanovláknenných nosičů pro monitoring a diagnostiku biomasy v prostředí kontaminované lokality. V rámci práce byly připraveny dvě tvarové varianty nosičů s různými nánosy nanovláken (3 dtex a 10 dtex). Kromě nosičů s nanovláknem byly testovány také nosiče bez nanovláken, a to s cílem porovnat vliv nanovláken na rychlost kolonizace nosičů mikroorganismy. Všechny nosiče byly zanořeny do vrtů na reálných lokalitách s rozdílným typem kontaminace. Konkrétně se jednalo o kontaminaci chlorovanými etheny a monocyklickými aromatickými uhlovodíky – BTEX.

Nanovláknenné nosiče byly vzorkovány v měsíčních intervalech po dobu jednoho roku. Z odebraných vzorků byla izolována DNA sloužící jako templát pro qPCR analýzu. Vliv tvaru nosiče a nánosu nanovláken na bakteriální kolonizaci byl hodnocen s využitím qPCR analýzy cílené do oblasti 16S rDNA genu. Diagnostika specifické biomasy s biodegradabilním potenciálem probíhala pomocí kvantifikace funkčních genů kódujících klíčové enzymy nebo specifické bakteriální kmeny.

Mezi jednotlivými testovanými tvarovými variantami nosičů nebyly během jejich kolonizace mikroorganismy pozorovány významné rozdíly. U nosičů s nánosem nanovláken byla zjištěna rychlejší fixace mikroorganismů na povrch a vyšší stabilita biofilmu než u nosičů vyrobených pouze z nosné nitě, tj. bez nánosu nanovláken.

Klíčová slova:

BTEX, DNA, chlorované etheny, kontaminovaná lokalita, molekulární genetika, monitoring, nanovláknena, nosiče biomasy, real-time kvantitativní PCR, vzorkování

Abstract

This thesis focuses on the applications of nanofiber carriers for monitoring and diagnosis of biomass at the contaminated site. Within this work, carriers made of supporting thread coated by nanofiber layer were prepared. Individual carriers varied in shape (2) and nanofiber surface density (3 dtex and 10 dtex). To compare the effect of nanofibers on bacterial colonization, carriers without nanofibers, i.e. made of supporting thread only, were also tested. All carriers were submerged into wells at real sites with different contamination. Specifically, wells were contaminated by chlorinated ethenes and monocyclic aromatic hydrocarbons (BTEX).

Carriers were sampled in month interval for one year. DNA was isolated from the samples and used as template for qPCR analysis. For the assessment of the influence of carrier shape and nanofiber surface density, the samples were analysed by qPCR with bacterial 16S rDNA gene-targeted primers. Diagnosis of specific biomass involved in the biodegradation was performed by quantification of functional genes encoding key enzymes or specific bacterial strains.

Any significant differences between shapes of carrier in microbial growth were not observed. The results showed that nanofiber carriers supported microbial immobilization and biofilm exhibited higher stability compared to the biofilm formed on the carriers made of supporting thread only, i.e. without nanofibers.

Keywords:

BTEX, DNA, chlorinated ethenes, contaminated site, molecular genetics, monitoring, nanofibers, biomass carriers, real-time quantitative PCR, sampling

Obsah

Seznam obrázků.....	11
Seznam tabulek.....	12
Seznam zkratk.....	13
1 Úvod.....	15
2 Teoretická část.....	16
2.1 Biofilm.....	16
2.1.1 Vznik biofilmu.....	17
2.1.2 Struktura biofilmu.....	18
2.2 Metody vzorkování mikrobiální biomasy.....	19
2.3 Metody diagnostiky biomasy.....	22
2.3.1 Izolace DNA.....	24
2.3.2 Real-time PCR analýza.....	26
2.4 Metabolické dráhy kontaminantů.....	29
2.4.1 Biodegradace chlorovaných ethenů.....	30
2.4.2 Biodegradace BTEX.....	31
3 Experimentální část.....	34
3.1 Popis lokality.....	34
3.2 Vzorkování.....	35
3.3 Molekulárně-genetické analýzy.....	36
3.3.1 Izolace DNA.....	36
3.3.2 Měření koncentrace DNA.....	39
3.3.3 Real-time PCR.....	39
3.4 Ostatní analýzy.....	44
3.4.1 Mikrobiologická analýza.....	44
3.4.2 Mikroskopická analýza.....	44
4 Výsledky a diskuze.....	45
4.1 Nosiče biomasy.....	45

4.1.1	Planární uspořádání nosiče.....	46
4.1.2	Kruhové uspořádání nosiče.....	47
4.2	Vliv charakteristik nosiče.....	48
4.2.1	Vrt PV-112 (nižší kontaminace chlorovanými etheny)	49
4.2.2	Vrt PV-130 (vyšší kontaminace chlorovanými etheny)	50
4.2.3	Vrt RW6A-45 (BTEX).....	52
4.3	Dlouhodobý monitoring kontaminované lokality	53
4.3.1	Vrt PV-112 (nižší kontaminace chlorovanými etheny)	53
4.3.2	Vrt PV-130 (vyšší kontaminace chlorovanými etheny)	55
4.3.3	Vrt RW6A-45 (BTEX).....	56
4.4	Mikroskopická analýza.....	57
5	Závěr	61
	Literatura	62
	Příloha A - Charakteristika kontaminantů.....	69
	Příloha B - Koncentrace DNA ve vzorcích.....	70
	Příloha C - Souhrn dat z qPCR.....	71
	Příloha D - Obsah příloženého CD	75

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Schématické znázornění cyklických kroků tvorby biofilmu.	17
Obrázek 2 - Příklad syntrofismu mikrobiálních společenstev v biofilmu	19
Obrázek 3 - Replikační vidlice při DNA replikace	26
Obrázek 4 - Princip metody PCR - schéma prvního cyklu s teplotními fázemi	27
Obrázek 5 - Amplifikace DNA během PCR reakce.....	28
Obrázek 6 - Schéma detekce fluorescence v real-time PCR termocyklu	29
Obrázek 7 - Model lokality kontaminované chlorovanými etheny s procesy jejich biodegradace, konkrétně anaerobní reduktivní dechlorace	30
Obrázek 8 - Metabolické dráhy aerobní biodegradace BTEX.....	32
Obrázek 9 - Metabolické dráhy anaerobní biodegradace BTEX.....	32
Obrázek 10 - Geologický profil lokality kontaminované chlorovanými etheny.....	34
Obrázek 11 - Vzorovací patry s nanovláknými nosiči biomasy	35
Obrázek 12 - Schéma SPIN Filter tube.....	36
Obrázek 13 - Stručné schéma izolace DNA.....	37
Obrázek 14 - Qubit® 2.0 Fluorometer od společnosti Thermo Fisher Scientific.....	39
Obrázek 15 - Biohazard box Bio II Advance od společnosti Telstar	41
Obrázek 16 - PCR box UV Sterilizing Workstation od společnosti Ultra-Violet Products	42
Obrázek 17 - Termocykler LightCycler® 480, Roche Diagnostics.....	42
Obrázek 18 - Nosné vlákno s nánosem nanovláken s jemností 3 dtex, zvětšení: 100× (vlevo) a 1000× (vpravo). Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss ULTRA Plus.....	45
Obrázek 19 - Nosné vlákno s nánosem nanovláken s jemností 10 dtex, zvětšení: 100× (vlevo) a 1000× (vpravo). Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss ULTRA Plus.....	46
Obrázek 20 - Schéma nosiče planárního uspořádání	46
Obrázek 21 - Nosiče planárního uspořádání.....	47
Obrázek 22 - Schéma kruhového uspořádání nosné nitě	47
Obrázek 23 - Nosiče kruhového uspořádání.....	48
Obrázek 24 - Časový průběh Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu PV-112	49
Obrázek 25 - Časový průběh Ct hodnot specifických primerů DHC-RT a <i>vrA</i> ve vrtu PV-112.....	50
Obrázek 26 - Časový průběh Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu PV-130	51

Obrázek 27 - Časový průběh Ct hodnot specifických primerů DHC-RT a <i>vrA</i> ve vrtu PV-130.....	51
Obrázek 28 - Časový průběh Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu RW6A-45	52
Obrázek 29 - Časový průběh Ct hodnot specifických primerů <i>bssA</i> a DEF/G ve vrtu RW6A-45	53
Obrázek 30 - Heat-mapa Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu PV-112	54
Obrázek 31 - Heat-mapa Ct hodnot primeru DHC-RT ve vrtu PV-112.....	54
Obrázek 32 - Heat-mapa Ct hodnot primeru <i>vrA</i> ve vrtu PV-112.....	54
Obrázek 33 - Heat-mapa Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu PV-130	55
Obrázek 34 - Heat-mapa Ct hodnot primeru DHC-RT ve vrtu PV-130.....	55
Obrázek 35 - Heat-mapa Ct hodnot primeru <i>vrA</i> ve vrtu PV-130.....	55
Obrázek 36 - Heat-mapa Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu RW6A-45.....	56
Obrázek 37 - Heat-mapa Ct hodnot primeru <i>bssA</i> ve vrtu RW6A-45	57
Obrázek 38 - Heat-mapa Ct hodnot primeru DEF/G ve vrtu RW6A-45.....	57
Obrázek 39 - Snímky tvarových variant nosičů pomocí optického mikroskopu (zvětšení 50×).....	58
Obrázek 40 - Snímky z fluorescenčního mikroskopu nosných vláken s nánosem nanovláken 10 dtex z vrtu PV-112 a RW6A-45 - zvětšení 50×.	58
Obrázek 41 - Nosná vlákna s nánosem nanovláken 10 dtex z vrtů PV-130 a RW6A-45 po 8. odběru. Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss ULTRA Plus.	59
Obrázek 42 - Nosná vlákna s nánosem nanovláken 3 a 10 dtex z vrtů PV-130 a RW6A-45 po 12. odběru. Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss ULTRA Plus.	60
Obrázek 43 - Detail biofilmu na nosné niti u nosného vlákna s nánosem nanovláken 10 dtex z vrtů PV-130 po 12. odběru. Snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) značky Carl Zeiss ULTRA Plus.	61

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Přehled vzorkování a analýz během ročního monitoringu.....	35
Tabulka 2 - Seznam chemikálií použitých v izolaci DNA	36
Tabulka 3 - Seznam použitých primerů.....	40
Tabulka 4 - Objemové množství jednotlivých složek reakční směsi pro jeden vzorek.....	41
Tabulka 5 - Parametry PCR analýzy.....	42

Seznam zkratek

A	adenin
<i>bssA</i>	označení primeru detekujícího gen benzylsukcinát syntázy
BTEX	benzen, toluen, ethylbenzen a xylen
C	cytosin
DCE	1,1-dichlorethen, trans-1,2-dichlorethen nebo cis-1,2-dichlorethen
DEF/G	označení primeru detekujícího gen katechol-2,3-dioxygenázy
DES	DNA eluční roztok (<i>DNA elution solution</i>)
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>)
dsDNA	dvouvláknová DNA (<i>double-stranded DNA</i>)
ECP	extracelulární polymery
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
G	guanin
KTJ	kolonie tvořící jednotku
<i>m</i>	meta
mRNA	informační (mediátorová, messenger) RNA
NGS	sekvenační metody nové generace (<i>Next-generation sequencing</i>)
<i>o</i>	ortho
<i>p</i>	para
PCE	tetrachlorethen (perchlorethen)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PPS	precipitační činidlo pro bílkoviny (<i>protein precipitation solution</i>)
PVC	polyvinylchlorid
PVP	polyvinylpyrrolidon
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
R	purinové báze (A, G)
rDNA	ribozomální DNA
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
S	báze se 3 vodíkovými vazbami (G, C)
SDS	dodecylsírán sodný (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)

SEM	rastrovací elektronový mikroskop (<i>scanning electron microscopy</i>)
SEWS-M	promývací roztok při izolaci DNA (<i>salt/ethanol wash solution</i>)
ssDNA	jednovláknová DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
T	thymín
TCE	trichlorethen
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol (<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>)
U16SRT	označení primeru detekujícího bakteriální 16S rDNA gen
VC	vinylchlorid
<i>vrA</i>	označení primeru detekujícího gen vinylchlorid reduktázy
VOC	těkavé organické látky (<i>volatile organic compounds</i>)
Y	pyrimidinové báze (C, T)

1 Úvod

Znečištění půdy a vody obecně je významný environmentální, ale také společenský problém. Jedním z efektivních způsobů, jak jej řešit, je odstranění kontaminantů prostřednictvím přirozených mikrobiálních procesů. Mikroflóra degradující kontaminanty je buď přítomna na lokalitě a může být podpořena vhodnými fyziologickými podmínkami (pH, teplota, živiny, substrát), nebo je aplikována do půdy anebo podzemní vody.

Diagnostika specifické biomasy je jednou z metod monitoringu probíhající bioremediace nebo jejího akcelerovaného průběhu na dané lokalitě. Je také jedním z nástrojů předsanačního monitoringu, pomocí něhož je následně vybrána vhodná sanační technologie. Před samotnou analýzou biomasy je však zcela zásadní její správné vzorkování. Analyzovány mohou být vzorky z rozličných matric, např. půda, voda, filtr nebo nosič. Z hlediska dlouhodobého monitoringu je vzorkování půdní biomasy technicky a ekonomicky velmi náročné. Vzorkování biomasy z podzemní vody je naopak limitováno nízkou koncentrací, což je řešeno filtrací velkého množství podzemní vody. To má však významné limitace v podobě chemických a fyzikálních vlastností vody, např. v její viskozitě, což vede k nedostatečnému množství vzorku.

Vzorkováním biomasy ve formě biofilmu přítomné na nosiči je možné získat mikrobiální komunitu přítomnou v podzemní vodě, navíc bez problémů souvisejících s filtrací. Množství biomasy na nosiči je závislé především na velikosti aktivního povrchu. Z tohoto důvodu představují nanovláknenné nosiče slibné řešení výše uvedených problémů. Na rozdíl od dalších aktuálně využívaných „vzorkovačů“ biomasy nanovláknenné nosiče lze snadno vyrobit, efektivně a spolehlivě vzorkovat a následně bez nutnosti složitých předúprav analyzovat prostřednictvím molekulárně-genetických metod.

Cíle práce

Primárním cílem této práce bylo vyvinout efektivní metodu pro vzorkování biomasy na kontaminované lokalitě. Z tohoto důvodu bylo nutné provést několik následujících kroků:

- navrhnout plán dlouhodobého monitoringu na reálné lokalitě,
- připravit tvarové varianty nosičů biomasy s definovaným nánosem nanovláken,
- umístit je do vrtů na vybrané kontaminované lokalitě a pravidelně odebírat vzorky,
- vyhodnotit aplikovatelnost nosičů pomocí molekulárně-genetických analýz pro diagnostiku biomasy.

2 Teoretická část

2.1 Biofilm

Jednobuněčné organismy jsou schopné shlukovat se do organizovaných komunit a obklopit se vlastními produkty, tzv. extracelulárními polymery (ECP), čímž vytvářejí mikrobiální biofilm (Percival et al., 2011). Přejít z planktonní formy života k biofilmu je doprovázen změnami fenotypových charakteristik organismu s ohledem na rychlost růstu a transkripci¹ genů. Seskupení bakterií uvnitř matrice biofilmu funguje jako kooperativní konsorcium poměrně komplexním a uspořádaným způsobem. Toto konsorcium může být tvořeno jedním nebo více bakteriálními kmeny nebo i jinými mikroorganismy, houbami, řasami a prvoky (Davey a O'Toole, 2000; Singh et al., 2006). Na rozdíl od planktonní formy, organismy nacházející se uvnitř biofilmu jsou schopné odolat nedostatku živin, změnám pH, působení kyslíkových radikálů, dezinfekčních prostředků či antibiotik (Jefferson, 2004).

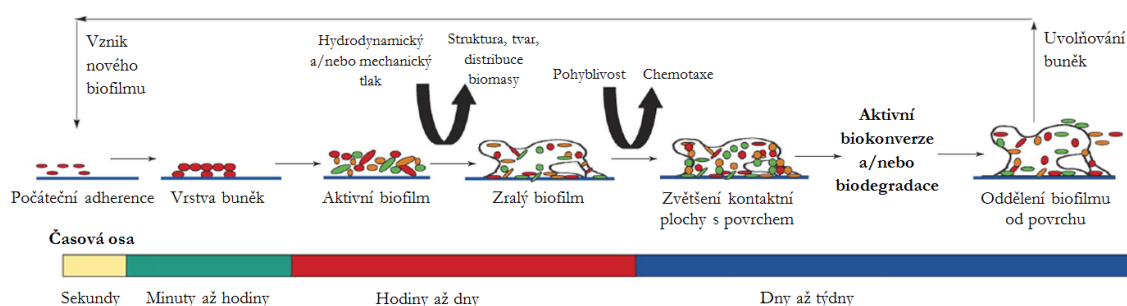
Přibližně 97 % matrice biofilmu je voda, která je buď vázána na vnější ochrannou vrstvu bakterií, nebo slouží jako rozpouštědlo, jehož fyzikální vlastnosti jsou ovlivňovány rozpuštěnými látkami. Biofilmy jsou podle biochemické analýzy ECP matrice hydrogely. Kromě vody a buněk mikroorganismů biofilm obsahuje také polymerní sekrety, absorbované živiny a metabolity, zbytky odumřelých buněk a nebuněčné materiály, např. minerální krystaly. Četné kanálky rozptýlené skrz matrici biofilmu v místech obklopujících mnohvrstevné mikrobiální shluky tvoří primitivní cirkulační systém, jehož funkce je transport substrátu a živin, ale také odstranění metabolitů tokem vodní fáze (Singh et al., 2006; Hall-Stoodley et al., 2004; Stickler, 1999).

Bylo prokázáno, že až 99 % veškeré bakteriální populace se vyskytuje ve formě biofilmu v různých stádiích růstu (Garrett et al., 2008). Této schopnosti je využíváno např. při čištění specifických odpadních vod díky vysoké resistenci takového systému. Na druhou stranu v dalších oborech lidské činnosti mají biofilmy negativní dopady, lze zmínit např. znečištění povrchů, podporu koroze, zablokování potrubí, snížení účinnosti nejrůznějších zařízení mnohdy vedoucí až k jeho selhání, ale také nepříjemný zápach a vzhled. Tvorba biofilmu přináší značná rizika ve zdravotnictví, ve kterém se jedná především o výskyt na cizích tělesech v lidském těle, např. implantátech. Vyvinutí rezistence při vzniku biofilmu je příčinou chronické povahy určitých infekcí (Garrett et al., 2008; Davey a O'Toole, 2000; Jefferson, 2004).

¹ Transkripce je proces kopírování informace z DNA sekvence do RNA sekvence = DNA-dependentní RNA syntéza (Ahern et al., 2016).

2.1.1 Vznik biofilmu

Tvorba biofilmu je řízený vývojový proces, jehož výsledkem je formace komplexní komunity (mikro)organismů. Ačkoliv je mechanismus vzniku biofilmu jedinečný pro každý mikroorganismus i skupiny mikroorganismů, je možné pozorovat některé obecné fáze jeho tvorby. Konkrétně se jedná o počáteční adhezenci k povrchu, následuje tvorba mikrokolonií a nakonec maturace mikrokolonií ve zralý biofilm obklopený extracelulárními polymery (ECP) (Davey a O'Toole, 2000; Singh et al., 2006). Schéma tvorby biofilmu je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1 - Schématické znázornění cyklických kroků tvorby biofilmu.

Převzato z (Singh et al., 2006) a upraveno autorem.

Proces přechodu z planktonní formy k biofilmu je vyvolán okolními podmínkami, které se liší mezi (mikro)organismy. Např. *Escherichia coli* O157:H7 vytváří biofilm pouze při nedostatku živin, zatímco *Pseudomonas aeruginosa* začne vytvářet biofilm za jakýchkoliv podmínek, které umožňují růst bakterií. Počáteční adhezence buněk k povrchu je dále ovlivněna osmolaritou², hodnotou pH, dostupností iontového železa, parciálním tlakem kyslíku a teplotou. Pro některé skupiny bakterií jsou pro iniciaci procesu adhezence nezbytné bičíky³ a pili⁴, jejichž přesná úloha ve vzniku biofilmu se může značně lišit mezi jednotlivými organismy (Davey a O'Toole, 2000; O'Toole a Kolter, 1998).

Jakmile se bakteriální buňky přizpůsobí imobilizaci na povrchu, ztratí bičíky a zvýší se produkce ECP. Vznikne jednovrstvá buněčná stavba, na kterou adherují ostatní mikrobiální buňky a vytváří se mikrokolonie (Davey a O'Toole, 2000). Tvorba charakteristické architektury biofilmu je ovlivněna environmentálními faktory, jako je hydrodynamický a mechanický tlak. Pro vývoj vnitřní struktury biofilmu je nezbytná mezibuněčná komunikace. Jedná se o schopnost bakterií komunikovat mezi sebou a koordinovat

² Osmolarita, také osmotická koncentrace, je molární množství osmoticky aktivních rozpuštěných látek v jednom litru roztoku (Šklubalová, 2012).

³ Bičíky jsou orgánem pohybu. Buď je jeden nebo svazek bičíků na pólu buňky, nebo mnoho bičíků po celém povrchu buňky (Bednář, 1996).

⁴ Pili (pilus) či fimbrie jsou četná, poměrně krátká rigidní rovná vlákna, která jsou na celém povrchu bakterie. Umožňují bakteriím schopnost specifické adhezence (Bednář, 1996).

svoje chování v populaci prostřednictvím signálních molekul. Buňky ve zralém biofilmu jsou pohyblivé a dochází k jejich pohybu na základě chemického podnětu (např. chemického gradientu), tzv. chemotaxi. Chemotaxe umožňuje bakteriím najít optimální podmínky pro růst a přežití. Patří mezi základní rysy biodegradace společně se schopností bakterií degradovat xenobiotika a produkovat biosurfaktanty (Singh et al., 2006). Biosurfaktanty jsou povrchově aktivní látky, jež ve spojení s chemotaxí zvyšují biologickou dostupnost hydrofobních polutantů ve vodné fázi během bioremediačních procesů (Schreiberová et al., 2012).

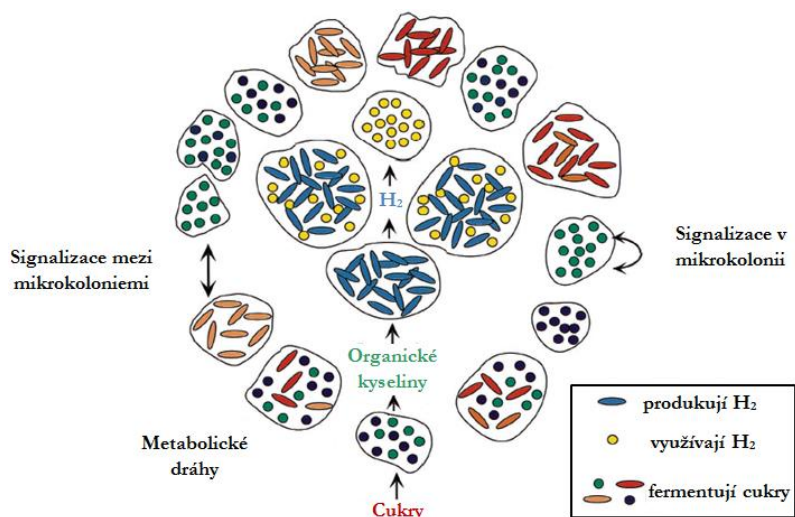
Jak bakteriální buňky v biofilmu umírají, aktivní biokonverze anebo biodegradace vede k přenosu rozpuštěných látek do nebo z okolní kapaliny, což může mít za následek oddělení biofilmu od povrchu. Procesy tvorby biofilmu a jeho odtržení od povrchu se opakují v cyklu, což umožňuje další vývoj podobných biofilmů (Singh et al., 2006).

2.1.2 Struktura biofilmu

Základní strukturní jednotka biofilmu je mikrokolonie. Malá vzdálenost mezi buňkami uvnitř mikrokolonie a mezi samotnými mikrokoloniemi poskytuje ideální prostředí pro cirkulaci substrátu a živin, výměnu genů a mezibuněčnou komunikaci. Mezibuněčné interakce v biofilmu umožňují adaptaci komunity ke změnám okolních podmínek (Donlan, 2002; Davey a O'Toole, 2000).

Biofilm dále poskytuje ideální prostředí pro vytvoření syntrofického vztahu. Syntrofismus je zvláštní případ symbiózy, ve kterém dvě nebo více metabolicky odlišné bakteriální skupiny spolupracují na degradaci substrátu či substrátů, které nejsou samy schopny zcela využít/rozložit. Tento druh symbiózy je typický pro biofilm, kde většina komplexních procesů vyžaduje mechanismus koordinovaný bakteriemi s odlišnými metabolickými schopnostmi (Davey a O'Toole, 2000; Keller a Surette, 2006). Například pro degradaci cukrů na methan a oxid uhličitý anaerobní cestou jsou potřeba nejméně tři různá bakteriální společenstva. Katabolickou přeměnu zahájí fermentující bakterie, jejichž produkty, organické kyseliny a alkoholy, jsou využity jako substráty pro acetogenní bakterie. Nakonec methanogenní bakterie získají energii přeměnou acetátu, oxidu uhličitého a vodíku na methan. Závislost jednotlivých reakcí je následující. Produkty fermentace snižují pH prostředí, což vede ke snížení aktivity fermentujících bakterií. Methanogenní bakterie jsou závislé na fermentujících a acetogenních bakteriích, jež jim poskytují zdroj energie. Proto první reakce proběhne a poskytne energii methanogenním bakteriím pouze, pokud acetogenní a methanogenní bakterie udrží nízký parciální tlak

vodíku, tedy neutrální pH prostředí. A tak žádná ze skupin nemůže růst na cukrech sama o sobě, ale společně všechny čerpají efektivně energii (Davey a O'Toole, 2000; Oliveira a Cunha, 2008). Tento příklad syntrofismu je společně s možnou organizací jednotlivých mikrokolonií v biofilmu znázorněn na obrázku 2. Čtyři mikrokolonie uprostřed schématu reprezentující acetogenní a methanogenní bakterie. Ty jsou obklopeny fermentujícími bakteriemi, které chrání citlivější mikroorganismy před vnějšími vlivy (Davey a O'Toole, 2000; Nadell et al., 2009).



Obrázek 2 - Příklad syntrofismu mikrobiálních společenstev v biofilmu.
Převzato z (Davey a O'Toole, 2000) a upraveno autorem.

2.2 Metody vzorkování mikrobiální biomasy

Diagnostika biomasy je nezbytnou součástí při monitoringu nejen kontaminované lokality. Mezi její nástroje patří mikrobiologické nebo molekulárně-genetické metody. Před samotnou analýzou biomasy je u diagnostiky rozhodující její správné vzorkování. Tato práce je zaměřena na monitorování biologických procesů s využitím vyvinutých nanovlákných nosičů biomasy, pro které jsou efektivním nástrojem molekulárně-genetické metody. Při vývoji efektivní vzorkovací metody biomasy je důležité se zaměřit na její akceleraci a automatizaci a na snížení nepřesností vzniklých během předúpravy vzorku pro izolaci DNA. Matrice analyzovaných environmentálních vzorků může být zemina, sedimenty, voda a filtr (Dolina et al., 2016; The Interstate Technology & Regulatory Council, 2011).

Mezi typické požadavky na protokol vzorkování biomasy je použití sterilních pomůcek a nádob určených pro odběr a transport vzorků do laboratoře do 24 hodin od odběru při teplotě 4 °C. Vzorkovací metody se liší v závislosti na vzorkované matici

i na podmínkách lokality. Přesto je důležité, aby protokol vzorkování dané lokality byl definován, dokumentován a udržován v průběhu celého monitoringu (The Interstate Technology & Regulatory Council, 2011).

Během dlouhodobého monitorování lokality jsou pro molekulárně-genetické analýzy v současnosti odebírány hlavně vzorky z podzemní vody, nejčastěji z vrtů. Důvodem jsou omezení při standardním odběru vzorků zeminy a sedimentů, tj. například špatná reprodukovatelnost odběru prostřednictvím vrtání. Analýzou vzorků vod není však možné dosáhnout celkového přehledu biologických procesů na kontaminované lokalitě (The Interstate Technology & Regulatory Council, 2011). Biomasa odebraná ve formě biofilmu by měla reprezentovat půdní i vodní mikrobiální komunitu. Vzorkování biomasy ve formě biofilmu může být prováděno pomocí nosičů biomasy, které jsou běžně používány pro účely intenzifikace procesů čištění odpadních vod (Jurecska et al., 2013). Nosič biomasy pro monitorování kontaminované lokality by měl splňovat stejné podmínky jako nosič pro efektivní bioremediaci a zároveň kritéria pro efektivní nedestruktivní vzorkování. Měl by mít co největší specifický povrch pro růst biofilmu. Bakterie přednostně kolonizují povrchy, které jsou hydrofobní a porézní a jejichž drsnost je na mikro a nanoúrovni (Cortés et al., 2011). Materiál nosiče by neměl být rozpustný a toxický pro imobilizovanou biomasu a zároveň pro okolí. Rovněž by měl být levný, dostupný, chemicky i fyzikálně stabilní, s vysokou pevností a vhodnou morfologií (Dzionic et al., 2016).

Nosiče používané pro vzorkování biomasy mohou být klasifikovány podle několika kritérií, např. podle materiálu na organické vs. anorganické, či podle původu přírodní vs. umělé. Přírodní organické nosiče jsou hydrofilní, biodegradabilní, biokompatibilní a levné, ovšem většinou vykazují nízkou pevnost i chemickou, fyzikální a biologickou stabilitu. Materiál těchto nosičů je obvykle z přírodních polymerů (agaru, alginátu a chitosanu), ale je používáno také dřevěného uhlí nebo bavlna (Dzionic et al., 2016). Přírodní anorganické nosiče na rozdíl od organických nejsou biodegradabilní a mají vysokou pevnost a chemickou, fyzikální a biologickou stabilitu. Jedná se např. o perlit, amorfní vulkanické sklo nebo zeolity, tj. porézní hlinitokřemičitany (Dzionic et al., 2016; Kim et al., 2015). Nosič vyrobený ze zeolitu patří mezi nosiče, které zesilují proces bioremediace i jinými vlastnostmi než jen jako imobilizační prvek specifické biomasy. Například Kim et al. (2015) ve své studii použili pro imobilizaci sulfát-redukcí bakterií nosič vyrobený ze zeolitu, jelikož tento materiál disponoval schopností zachytit kationty těžkých kovů, které byly následně využity mikroorganismy v biofilmu. Přestože jsou

některé přírodní nosiče biomasy vhodné pro bioremediační účely, nemusejí splňovat požadavky kladené na nosiče vhodné pro účely následných molekulárně-genetických analýz. Pro tyto metody je důležité získání maximálního množství biomasy z nosiče s minimálním množstvím látek, jež by interferovaly s extrakcí DNA a jejími následnými analýzami.

Výhodou umělých nosičů biomasy je možnost volby jejich mnoha charakteristik, tj. hustota, tvar, porozita, hydrofobicita. V mnoha případech lze navíc funkcionalizovat jejich povrch. Anorganické nosiče mohou být vyrobeny z keramiky, skla, kovu či jeho slitin (Dzionek et al., 2016). Pereira et al. (2000) testovali nosiče vyrobené z pěnového skla pro kolonizaci bakterií. Výsledky ukazovaly vyšší účinnost kolonizace na těchto nosičích v porovnání se skleněnými kuličkami. Ovšem v porovnání s jílovým minerálem (sepiolitem) bylo na pěnovém skle fixováno méně biomasy, což bylo způsobeno hladkým povrchem a velkou velikostí pórů těchto nosičů. Mezi organické materiály patří syntetické polymery, jako je např. polypropylen, polyethylen, polyvinylchlorid (PVC), polystyren a polyuretan (Dzionek et al., 2016). Andersson et al. (2008) např. testovali jako nosiče biomasy 20 různých materiálů, přírodních, recyklovaných a plastových. Nejlepší výsledky byly zjištěny u dvou přírodních (dřevní štěpky, vulkanická pemza) a jednoho plastového nosiče (vysokohustotní polyethylen s označením Kaldnes K1). Kaldnes K1 je komerční materiál nosičů biomasy, který byl vyvinut pro aplikace při čištění odpadních vod. Kaldnes K1 je příklad nosiče vhodného pro biologické čištění odpadních vod, ale kvůli své špatné tvarovatelnosti je nevhodný pro monitoring a následné analýzy prostřednictvím molekulárně-genetických metod. Pro izolaci DNA by tedy byla nutná předúprava. Buď rozdělení nosiče na několik menších částí, které lze následně umístit do zkumavky, nebo vytřepání biomasy z nosiče, což nejen celý proces prodlužuje, ale také prodražuje. Pro uvolnění biomasy z těchto nosičů se navíc mnohdy používají koncentrované chemikálie, které představují riziko pro člověka.

Chládek et al. (2000) ve svém patentu navrhli nosič biomasy tvořený systémem vláken orientovaných definovaným způsobem. Povrch vláken poskytuje nosiči velkou aktivní plochu vhodnou ke kolonizaci mikroorganismy a k fixaci velkého množství biomasy. Velký aktivní povrch dále umožňuje snížit objem nosiče. Pro vyšší odolnost vůči napětí je do nosiče začleněna nosná nit', která je z pevnějších vláken, ale pro tvorbu biomasy sama o sobě nevhodná. Díky snadné tvarovatelnosti vláken je vnější tvar nosiče proměnlivý a každá z těchto konstrukcí může mít libovolné rozměry. Tyto vlastnosti a snadné rozdělení nosiče na části dělají z textilních nosičů biomasy efektivní nástroj pro monitoring.

Díky velkému specifickému povrchu i vzájemnému propojení jednotlivých (nano)vláken představují nanovlákná fixovaná na vhodný podklad optimální materiál pro výrobu nosičů biomasy. Hustota nánosu, porozita a velikost pórů u nanovláken je dána parametry nastavenými při jejich výrobě (Sharma a Sharma, 2013; Niu et al., 2011). Další výhodou nanovláknenných materiálů je jejich drsnost povrchu na mikro a nanoúrovni, která podporuje adhezaci mikroorganismů, a tím i jejich imobilizaci na povrchu nosiče. To umožňuje rychlou kolonizaci povrchu nosiče, především v počáteční fázi tvorby biofilmu. V závislosti na typu použitého polymeru mohou být nanovlákná pevná, jednoduše tvarovatelná, fyzikálně a chemicky stabilní a hydrofobní (Sharma a Sharma, 2013; Chorawala a Mehta, 2015). Velký specifický povrch nanovláken může být navíc funkcionalizován nejrůznějšími chemickými skupinami měnícími jejich povrchové vlastnosti, což dále podporuje fixaci mikroorganismů na povrchu nanovláken (Bora a Dutta, 2014).

2.3 Metody diagnostiky biomasy

Velké množství (až 10^9 buněk na 1 g půdy) a druhová rozmanitost (minimálně 4 000-7 000 různých bakteriálních druhů na 1 g půdy) bakterií tvoří nejdůležitější část půdní mikroflóry. Půdní mikroorganismy hrají důležitou roli v biogeochemických cyklech hlavních (C, N, P, S, atd.) i stopových (Fe, Ni, Hg, atd.) prvků, čímž se podílejí na energetické výměně. Znalost strukturní i funkční diverzity půdních bakteriálních komunit a jejich reakcí na změny přírodního i antropogenního původu tvoří důležitý nástroj při charakterizaci sledovaného prostředí. Původní mikrobiologické metody založené na izolaci a kultivaci bakteriálních kmenů jsou v současnosti doplněny o metody molekulární genetiky (Ranjard et al., 2000; Amann et al., 1995).

▪ Mikrobiologické metody

Mikrobiologické metody umožňují pozorovat tvar a strukturu bakteriální buňky, avšak jejich hlavním omezením je velmi úzké spektrum testovaných mikroorganismů, tj. méně než 2 % celkové diverzity (Robe et al., 2003; Douterelo et al., 2014).

Při diagnostice biofilmu jsou využívány mikrobiologické metody zaměřené na detekci a určení přibližného množství celkové nebo specifické mikroflóry. Celkové množství životaschopných bakteriálních buněk se většinou stanovuje pomocí kultivační metody, při které jsou počítány kolonie narostlé po definované době na agarových plotnách za určité teploty. Předpokladem této metody je, že z jedné buňky vyrůstá jedna kolonie.

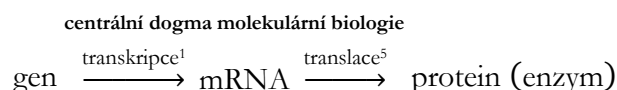
Jako jednotka pro vyjádření počtu bakterií se používá KTJ neboli kolonie tvořící jednotka. Pomocí kultivačního média lze na základě typu metabolismu kultivované bakterie zvolit, které bakteriální buňky budou růst přednostně. Tento postup je kromě kvantifikace také využíván pro izolaci specifické kultury bakterií. Například při izolaci mikroorganismů degradujících fenol je použito médium, ve kterém je fenol jediný zdroj uhlíku a energie. Proto mikroorganismy, jež nejsou schopné rozkládat fenol, v tomto prostředí nebudou růst (Tortora et al., 2013; Douterelo et al., 2014).

Kromě kultivačních metod se dále pro studium biofilmu používají metody mikroskopické. Pomocí optického mikroskopu a barviv je možné pozorovat velikost a morfologii bakteriálních buněk. Prvním krokem při diagnostice bakterií je barvení podle Grama. Tento barvicí postup odlišuje bakterie podle permeability buněčné stěny a rozděluje je na grampozitivní a gramnegativní (Ambrožová, 2004; Jandová a Kotoučková, 1996). Pomocí směsi fluorescenčních barviv lze odhadnout vitalitu buněk v preparátu na fluorescenčním mikroskopu. Pro detekci a kvantifikaci konkrétní bakterie *in situ* je používána metoda využívající genové sondy, fluorescenční *in situ* hybridizace tzv. FISH. Sondy jsou fluorescenčně označené oligonukleotidy, jež vstoupí do buňky a hybridizují s cílovou DNA v buňce, *in situ* (Tortora et al., 2013; Douterelo et al., 2014; Ambrožová, 2004).

▪ Molekulární genetika

Diagnostika biomasy pomocí molekulárně-genetických metod je založena na analýze nukleových kyselin, tj. DNA nebo RNA. Prostřednictvím těchto metod lze pozorovat funkční nebo strukturní diverzitu bakteriálního konsorcia. Tyto metody jsou limitovány nízkými výtěžky DNA a výskytem inhibičních kontaminantů ve vzorcích (Singh et al., 2006).

Přítomnost daného enzymu, např. podílejícího se na degradaci kontaminantu, je detekována prostřednictvím genu, jehož exprese vede k syntéze proteinu s funkcí daného enzymu. Tento jednosměrný tok informací se nazývá centrální dogma molekulární biologie (Alberts, 2015).



Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) lze amplifikovat (namnožit) konkrétní geny. Detekce, ale zejména kvantifikace sledovaných úseků je prováděna prostřednictvím

⁵ Translace je proces, při němž je informace uložená v mRNA použita pro řízení syntézy proteinů (Ahern et al., 2016).

modifikované PCR, tzv. real-time PCR. PCR analýzy jsou založeny na znalosti nukleotidové sekvence cílové DNA. Pro stanovení přesného pořadí jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA byly vyvinuty sekvenační metody. Nejpoužívanější sekvenační metody jsou Sangerovo sekvenování a sekvenační metody nové generace (NGS). Při Sangerově sekvenování jsou pomocí modifikovaných PCR metod čteny konkrétní geny. Pomocí NGS sekvenování je např. možné určit doposud neznámé bakteriální sekvence a tím stanovit diverzitu ve vzorku. V rámci této práce byla použita metoda real-time PCR, která je společně s extrakcí DNA z environmentálního vzorku popsána v následujících kapitolách (Singh et al., 2006; Alberts, 2015; Shokralla et al., 2012).

2.3.1 Izolace DNA

Izolace bakteriální DNA umožňuje studovat strukturu a vývoj mikrobiální komunity. Detekce konkrétních genů dovoluje sledovat strukturální i funkční diverzitu mikrobiálního konsorcia. Metody extrahujících DNA ze vzorků nahradily původní kultivační způsoby. Molekulárně-genetické metody jsou limitované přítomností inhibitorů, které mohou významně zkreslovat získané výsledky, proto je velmi důležité tyto inhibiční látky ze vzorku odstranit. Získanou izolovanou DNA je možné přechistit pomocí dalších kitů určených pro purifikaci DNA nebo přesrážením v alkoholu. Proces přečištění je limitován celkovým nízkým výtěžkem získané DNA ve vzorku. (Tsai a Olson, 1991; Robe et al., 2003).

Prvním krokem protokolu pro izolaci DNA je buněčná lýza, která slouží k rozbití buněčné stěny a membrán mikroorganismů pro uvolnění DNA. Lýzu buněk lze provádět chemicky, enzymaticky nebo fyzikálně.

Pro enzymatickou lýzu je nejpoužívanější enzym lysozym, který rozpustí bakteriální buněčnou stěnu hydrolýzou β -1,4-glykosidických vazeb v peptidoglykanech v bakteriální stěně. Některé bakterie však mohou být částečně nebo úplně rezistentní vůči působení tohoto enzymu.

Nejběžnější činidlo aplikované pro chemickou lýzu je detergent dodecylsírán sodný (SDS), který rozpustí hydrofobní materiál buněčné membrány. Mezi další používané detergenty patří EDTA⁶, pufr Tris⁷ a pufr fosfátu sodného. Výběr pufru závisí na očekávaném množství DNA a její požadované čistotě. Další funkcí detergentu je ochrana DNA prostřednictvím inaktivace nukleáz, enzymů štěpících nukleové kyseliny.

⁶ EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

⁷ Tris = 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

Fyzikální lýza, jako je např. tepelný šok (mrazení/vaření), homogenizace s kuličkami z různých materiálů nebo působení ultrazvuku, vyvolává rozpad většiny buněk. Nevýhodou fyzikální lýzy je velká pravděpodobnost štěpení DNA. Kombinací chemických a enzymatických postupů s fyzikálními se zvýší účinnost buněčné lýzy a sníží pravděpodobnost štěpení DNA. Například dochází k lepšímu průniku lyzačního pufru při dispergaci vzorku fyzikální lýzou.

Úspěšným narušením bakteriální membrány a buněčné stěny se buněčný obsah skládající se z nukleových kyselin, proteinů, lipidů a polysacharidů uvolní se zbytky buňky do extrakčního pufru. Ten musí obsahovat detergent zabraňující degradaci DNA a lze do něj přidat sloučeniny, např. polyvinylpyrrolidon (PVP), které vytváří komplex s huminovými kyselinami inhibující enzymatické procesy používané při analýze izolované DNA.

Pro získání pouze DNA musí být další látky přítomné ve vzorku odstraněny. Mezi metody purifikace DNA patří degradace bílkovin přidáním proteinázy K, vysrážení proteinů v octanu draselném nebo fenol-chloroformová extrakce. U poslední metody je k vodnému vzorku přidána směs fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu. V přítomnosti fenolu dochází k vysrážení proteinů a lipidy se rozpouštějí ve chloroformu, trichlormethanu. Isoamylalkohol, 3-methylbutan-1-ol, zabraňuje pění roztoku a usnadní oddělení fází. Po separaci fází DNA zůstane ve vrchní vodné fázi, která je odebrána do nové zkumavky a přečištěna pro odstranění zbytků fenolu (Bakken a Frostegård, 2006; Zumbo, 2012). Organická rozpouštědla jsou využívána během izolace DNA pro odstranění biologických nečistot, ale některá z nich jsou inhibitory, které v dalších fázích izolace musejí být odstraněny (Forman a Jia, 2014). Použití organických rozpouštědel při extrakci DNA je eliminováno pomocí nové metody, během které je nukleová kyselina adsorbována na silikátový nebo skleněný substrát. Přidáním chaotropních látek, které rozruší vodíkové vazby ve dvoušroubovici DNA, vznikne jednovláknová DNA (ssDNA). Báze v ssDNA poté vytvoří vodíkové můstky s povrchem silikátu (SiO_2). Navázaná DNA je promyta pomocí alkoholu a nakonec je DNA uvolněna ze substrátu přidáním pufru o nízké iontové síle, jako je voda, a rozpuštěna (Roose-Amsaleg et al., 2001; Forman a Jia, 2014; Tian et al., 2000).

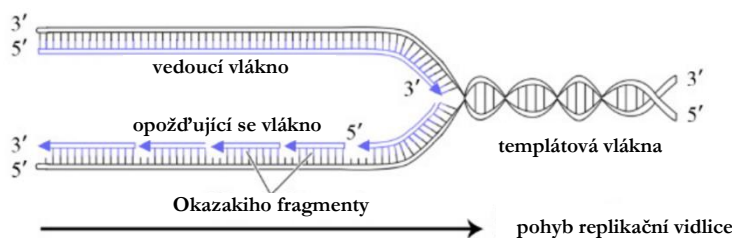
2.3.2 Real-time PCR analýza

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která generuje velké množství cílové DNA ze stopového množství biologického materiálu. Od svého prvního využití roku 1985

se PCR analýza stala rozšířenou metodou molekulární genetiky. PCR reakce se využívá ve všech odvětvích základního i aplikovaného výzkumu, kde je v současnosti nepostradatelnou metodou. Real-time PCR kombinuje klasickou PCR technologii s možností detekce a zaznamenání akumulace reakčních produktů po každém amplifikačním cyklu (Houghton a Cockerill, 2006; Tsai a Olson, 1992).

▪ Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda amplifikace DNA založená na stejném principu, jako je replikace genetické informace probíhající při dělení každé buňky. Tento proces se odehrává na místě rozvinuté dvoušroubovice DNA, tzv. replikační vidlice - viz obrázek 3. Na vláknech DNA je vytvořen DNA primázou krátký RNA primer, který je následně odštěpen a nahrazen úsekem DNA. Na 3' konec (-OH) primeru připojí enzym DNA polymeráza první nukleotid a katalyzuje polymeraci nukleotidů ve směru 5' konec (PO_4^{2-}) → 3' konec (-OH). Vzniká tím nový řetězec komplementární k templátové DNA. Protože jsou řetězce DNA dvoušroubovice antiparalelní a DNA polymeráza syntetizuje jen v jednom směru (5' → 3'), syntéza nového řetězce probíhá spojitě pouze na jednom z řetězců. Druhý řetězec s volným 5'koncem (PO_4^{2-}) je duplikován mechanismem Okazakiho fragmentů spojovaných pomocí DNA ligázy (Alberts, 2015).



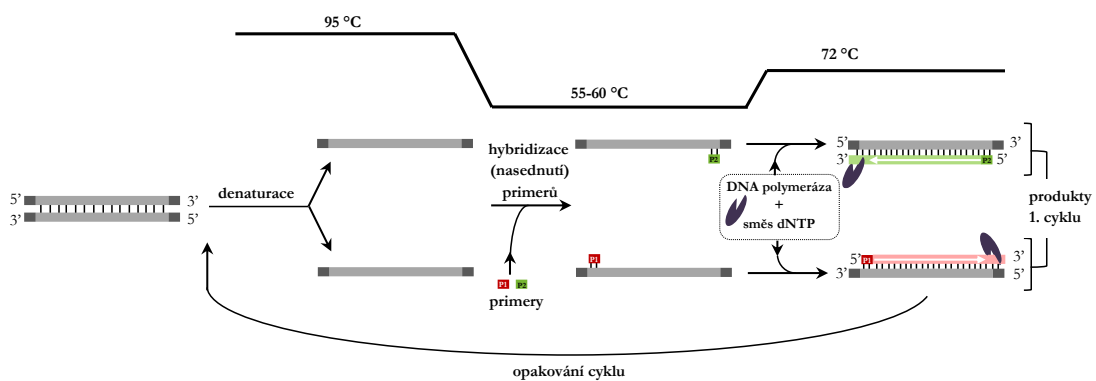
Obrázek 3 - Replikační vidlice při DNA replikaci. Převzato a upraveno z (Ahern et al., 2016).

Pomocí polymerázové řetězové reakce je možné získat velké množství určité DNA sekvence. V této metodě se využívá DNA polymeráza a pár krátkých syntetických oligonukleotidových primerů. Primery jsou obvykle okolo 20 bází dlouhé a ohraničují testovaný úsek DNA. Počáteční směs obsahující velmi malé množství vybraného úseku DNA vede v závěru reakce ke směsi s miliardami kopií testovaného úseku.

Metoda PCR je založena na cyklickém opakování tří kroků: denaturace, hybridizace⁸ primerů a elongace. Nejprve jsou odděleny řetězce DNA denaturací za vysoké teploty, běžně okolo 95 °C. Následuje pokles teploty, který umožňuje komplementární navázání

⁸ Hybridizace DNA je proces, při kterém vznikne za určitých podmínek dvouvláknová DNA, hybrid, z komplementárních jednovláknových řetězců (Hartl a Jones, 1998).

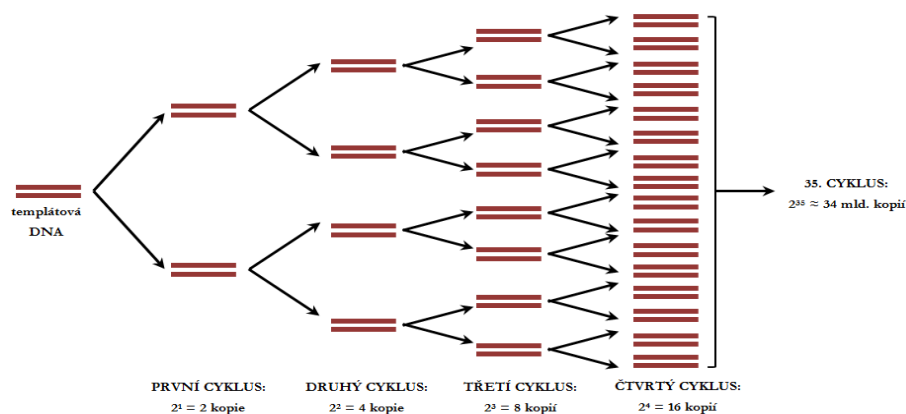
primerů na vzniklé jednořetězcové molekuly DNA. Teplota navázání primerů, tzv. annealing teplota, je specifická pro použitý primer a pohybuje se většinou mezi 40 °C a 60 °C. Na konci cyklu je teplota lehce zvýšena na hodnotu okolo 70 °C a dochází k elongaci každého navázaného primeru, tedy k syntéze komplementárních řetězců DNA polymerázou. Pro účely PCR musí být DNA polymeráza termostabilní, aby se během fáze denaturace nevratně nedegradovala vlivem vysoké teploty. Z toho důvodu je používána termostabilní DNA polymeráza zvaná *Taq* polymeráza, která byla izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Pro elongaci je dále důležité, aby základní reakční roztok obsahoval kromě *Taq* polymerázy také směs nukleotidů (dNTP). 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) jsou tedy použité jako stavební materiál při vzniku komplementárního vlákna. Průběh jednoho cyklu během amplifikace DNA je znázorněn na obrázku 4. V reakční směsi se dále nacházejí látky, jež vytvářejí ideální podmínky pro činnost DNA polymerázy (Hartl a Jones, 1998; Průša, 1997).



Obrázek 4 - Princip metody PCR - schéma prvního cyklu s teplotními fázemi.

Převzato z (Alberts, 2015) a upraveno autorem.

Produkty každého cyklu PCR jsou dvě kopie z každé molekuly obsahující sekvenci komplementární s použitými primery. Opakováním procesu je každým cyklem zdvojnásobeno množství templátové DNA vcházející do daného cyklu. Tato amplifikace DNA je znázorněna na obrázku 5. Teoreticky by po 35 cyklech amplifikace mělo být přítomno 2^{35} kopií každé templátové DNA přítomné v původní směsi (Alberts, 2015; Hartl a Jones, 1998).



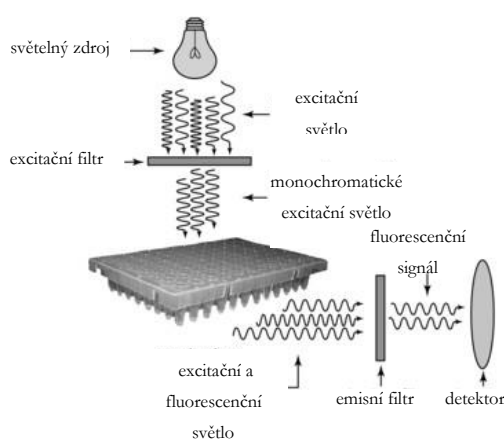
Obrázek 5 - Amplifikace DNA během PCR reakce. Převzato z (Hakhverdyan, 2008) a upraveno autorem.

Hlavní omezení PCR analýzy je nutná znalost sekvence testovaného úseku DNA, na jejímž podkladu dochází k syntéze primerů. Mezi další požadavky pro PCR analýzu patří detekce případné inhibice a její zamezení. Inhibitory jsou látky, které interferují nebo dokonce zabraňují amplifikaci DNA. Inhibiční látky ovlivňují PCR tím, že buď přímo interagují s molekulou DNA, nebo interferují s funkcí DNA polymerázy blokováním její enzymatické aktivity. Inhibitory PCR jsou přítomny v biologických materiálech (např. hemoglobin v krvi, kolagen v tkáních), v půdních (humínové kyseliny) nebo rostlinných vzorcích. Dalším důležitým zdrojem inhibičních látek jsou činidla, která přišla do kontaktu se vzorky během zpracování DNA, např. přebytek KCl, NaCl a dalších solí, iontové detergenty (SDS) nebo fenol (Warren, 2013; Horton et al., 2014).

▪ Real-time kvantitativní PCR

Real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) je modifikace PCR, která umožňuje přesnou kvantifikaci. Základem je monitorování amplifikace cílové sekvence DNA v reálném čase pomocí fluorescenční technologie. Intenzita fluorescenčního signálu je detekována na konci každého cyklu a zaznamenávána ve formě amplifikační křivky. Intenzita fluorescenčního signálu je závislá na počtu cílových úseků DNA v počáteční směsi. Čím více kopií cílové DNA je přítomno, tím dříve dojde k vytvoření dostatečně silného signálu vedoucího k překročení prahové („threshold“) hranice. Prah detekce je určen na základě hodnoty fluorescence pozadí. Počet cyklů potřebných pro překročení prahu detekce je vyjádřen jako tzv. Ct hodnota („threshold cycle“). Ta je používána k výpočtu počátečního množství DNA, k němuž je nepřímo úměrná. Tedy čím je Ct hodnota nižší, tím větší bylo počáteční množství cílové DNA a naopak (Fraga et al., 2014; Pabinger et al., 2014; Life Technologies Corporation, 2012).

Kvantifikace cílové DNA v každém cyklu je založena na měření emise fluorescenční látky. Mezi zdroje fluorescence u qPCR patří interkalační barviva vázající se do dvouvláknové DNA (dsDNA). Další možností jsou fluorescenční sondy, jež jsou komplementární k amplifikované DNA sekvenci (nejčastěji TaqMan sonda). V rámci této práce byla jako zdroj fluorescence vybrána fluorescenční barviva typu SYBR Green, která jsou nejpoužívanější interkalační barviva. Tyto barviva se vmezeří, interkalují, mezi báze dsDNA a následně dojde k vytvoření komplexu, který po fotoexcitaci emituje mnohem silnější fluorescenční signál než nenavázané barvivo (Fraga et al., 2014; Life Technologies Corporation, 2012). Excitace a detekce fluorescenčního signálu v přístroji pro qPCR je znázorněna na obrázku 6.



Obrázek 6 - Schéma detekce fluorescence v real-time PCR termocykleru.

Převzato z (Fraga et al., 2014) a upraveno autorem.

V průběhu qPCR dochází k denuraci dsDNA na jednotlivé řetězce (ssDNA) a k následnému uvolnění SYBR Green barviva, které se projeví poklesem intenzity fluorescence. Tato změna intenzity fluorescence v závislosti na teplotě je mapována prostřednictvím tzv. křivky tání. Měření fluorescence probíhá při pomalém zvyšování teploty reakčních produktů - například z 60 °C na 95 °C. Analýza křivky tání slouží k ověření specifčnosti PCR amplifikace a je nezbytná při analýze Ct hodnot (Fraga et al., 2014; Life Technologies Corporation, 2012).

2.4 Metabolické dráhy kontaminantů

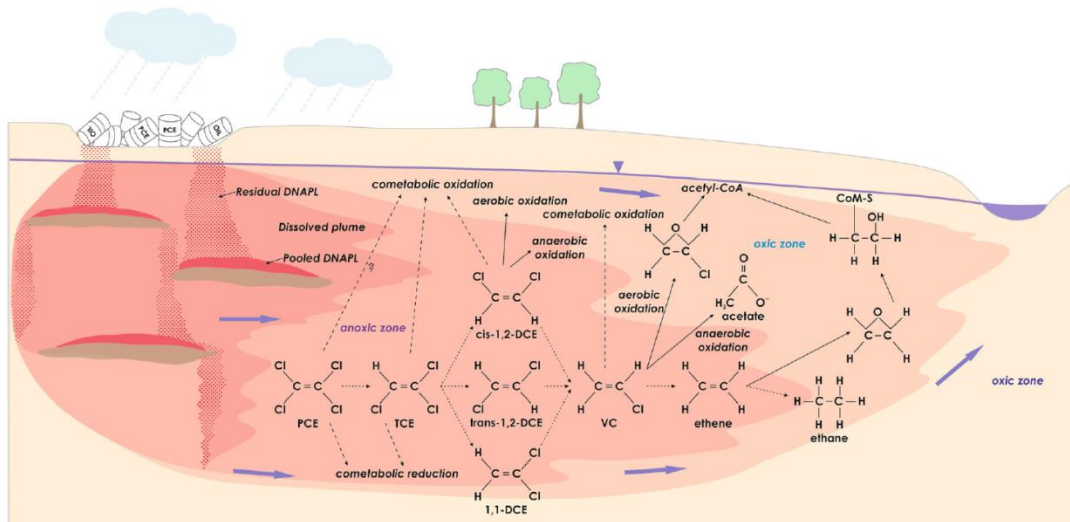
Nanovláknenné nosiče biomasy vyvíjené v rámci této diplomové práce byly testovány na reálné lokalitě kontaminované chlorovanými etheny a aromatickými uhlovodíky, konkrétně BTEX (benzen, toluen, ethylbenzen a xylen). Pro efektivní monitoring procesu jejich bioremediace pomocí kombinace nanovláknenných nosičů biomasy a molekulárně-

genetických metod je nutné rozumět mikrobiálním metabolickým procesům podléjícím se na biodegradaci těchto kontaminantů.

2.4.1 Biodegradace chlorovaných ethenů

Mezi zástupce chlorovaných ethenů patří tetrachlorethen (PCE), trichlorethen (TCE), dichlorethen⁹ (DCE) a vinylchlorid (VC). PCE a TCE byly v minulosti široce využívány jako odmašťovací činidla kovových součástek a textilií. Do životního prostředí se dostávaly tyto látky únikem při jejich výrobě či manipulaci nebo emisemi ze skládek odpadů. DCE a VC se do životního prostředí dostanou hlavně jako produkty biodegradace nebo v případě VC únikem při polymeraci PVC, kde je VC hlavní surovina (Lawrence, 2006; Wisconsin Department of Natural Resources, 2014).

Primárním mechanismem biodegradace chlorovaných ethenů je mikrobiální reduktivní dechlorace za anaerobních podmínek, tzn., že dochází k postupné výměně atomu chlóru za atom vodíku. Chlorované etheny jsou tedy využity jako akceptory elektronů (Lawrence, 2006; The Interstate Technology & Regulatory Council, 2011). Biologické procesy degradace chlorovaných ethenů jsou zobrazeny na obrázku 7.



Obrázek 7 - Model lokality kontaminované chlorovanými etheny s procesy jejich biodegradace, konkrétně anaerobní reduktivní dechlorace. Převzato z (Dolinová et al., 2017).

Většina bakteriálních kmenů je schopna pouze částečně degradovat PCE a TCE na DCE nebo VC prostřednictvím reduktivní dechlorace. Pouze někteří zástupci

⁹ Dichlorethyeny (DCE) mohou být ve formě tři izomerů: 1,1-dichlorethen, *trans*-1,2-dichlorethen a *cis*-1,2-dichlorethen. V této práci nebudou rozlišovány jednotlivé izomery dichlorethenu.

bakteriálního rodu *Dehalococcoides*¹⁰ jsou schopni kompletní redukční dechlorace PCE až na ethen (Dolinová et al., 2017). Bakterie rodu *Dehalococcoides* získávají energii během prvních tří kroků dechlorace (PCE → TCE, TCE → DCE a DCE → VC) a přeměna VC na ethen proběhne v podstatě náhodou, a to prostřednictvím tzv. co-metabolismu. Co-metabolismus je reakce, při které mikroorganismy využijí a transformují daný kontaminant i přesto, že neslouží jako jejich zdroj energie či uhlíku. Aby reakce proběhla, je nutná přítomnost primárního substrátu, jež mikroorganismy využijí jako zdroj energie či uhlíku. Proto je přeměna VC na ethen významně pomalejší než předchozí kroky dechlorace, což vede k akumulaci VC (The Interstate Technology & Regulatory Council, 2008). VC je zařazen podle klasifikace americké Agentury pro ochranu životního prostředí mezi lidské karcinogeny. Toxicita biodegradčních meziproductů je jeden z důvodů, proč je důležité rozumět procesům biodegradace chlorovaných ethenů (Dolinová et al., 2017; Lawrence, 2006).

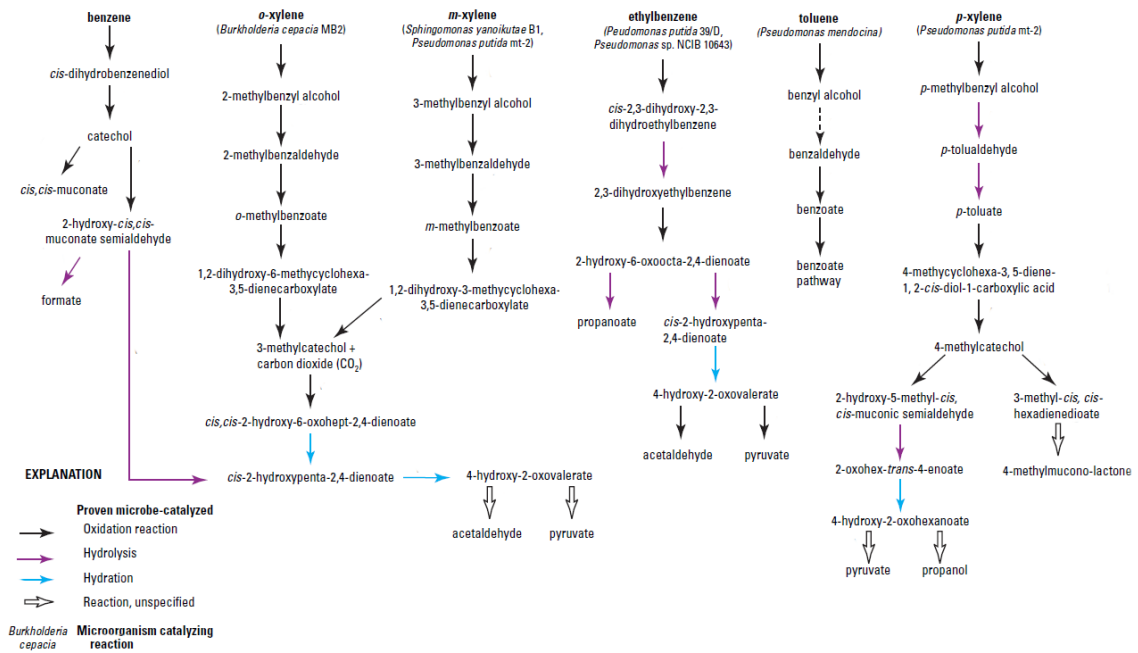
Pomocí qPCR analýzy je možné určit, zda jsou přítomny specifické bakteriální rody (*Dehalococcoides*) schopné degradovat chlorované etheny nebo funkční geny kódující enzymy (vinylchlorid reductázu), které se podílejí na degradaci (Dolinová et al., 2017).

2.4.2 Biodegradace BTEX

Primárním zdrojem kontaminace BTEX (benzen, toluen, ethylbenzen a *o*-, *m*- a *p*-xylen) je benzín, ve kterém mají podíl okolo 16 %. Do životního prostředí se mohou benzen a jeho alkylsubstituované deriváty dostat únikem z podzemních zásobníků nebo z potrubí benzínu. Jednotlivé sloučeniny BTEX jsou dále široce využívány jako rozpouštědla.

BTEX jsou mikroorganismy degradovány za aerobních a anaerobních podmínek a slouží jako zdroj uhlíku a energie. Aerobní mikroorganismy oxidují BTEX a využívají je jako primární substráty. Příklady mechanismů aerobní biodegradace BTEX jsou znázorněny na obrázku 8. Prvně dochází k přeměně BTEX sloučenin na catechol a jeho deriváty a poté je aromatické jádro štěpeno pomocí enzymů dioxygenáz.

¹⁰ *Dehalococcoides mccartyi* 195 a *D. mccartyi* BTF08. Dalším zatím jediným známým bakteriálním rodem, jenž je schopen anaerobně degradovat PCE na ethen kromě rodu *Dehalococcoides*, je rod *Propionibacterium*, konkrétně jeho zástupci: *Propionibacterium* strain HK-1 a *P. acnes* strain HK-3 (Dolinová et al., 2017).

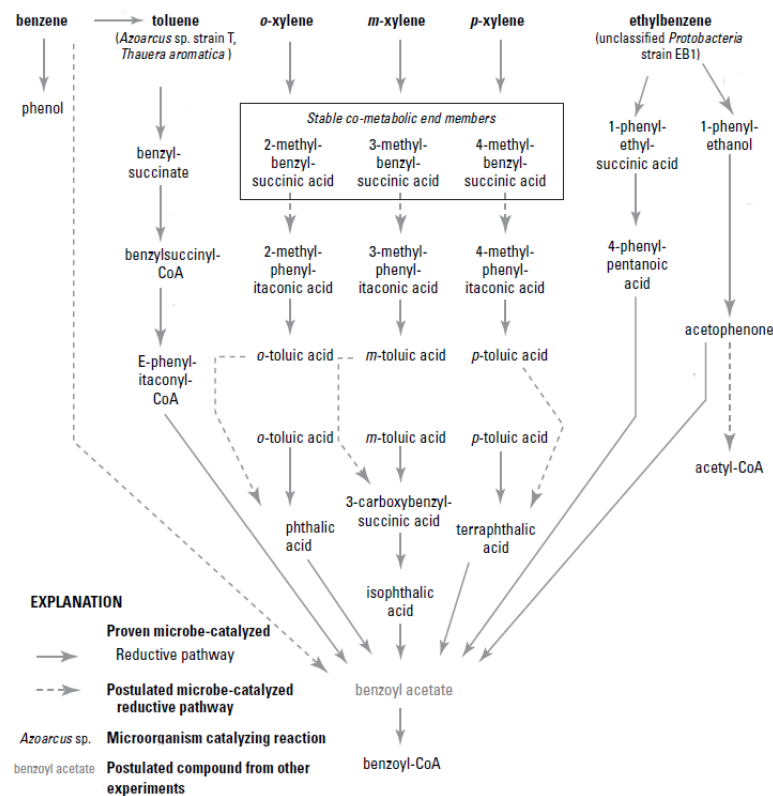


Obrázek 8 - Metabolické dráhy aerobní biodegradace BTEX.

Převzato z (Lawrence, 2006) a upraveno autorem.

Během anaerobní biodegradace jsou BTEX využívány jako donory elektronů.

Příklady mechanismů anaerobní biodegradace BTEX jsou znázorněny na obrázku 9.



Obrázek 9 - Metabolické dráhy anaerobní biodegradace BTEX.

Převzato z (Lawrence, 2006) a upraveno autorem.

Jednou ze sledovaných reakcí při anaerobní biodegradaci toluenu a benzenu přes toluen je aktivace aromatického jádra adicí fumarátu, kdy je toluen přeměněn na benzylsukcinát. Tato reakce je katalyzována benzylsukcinát syntázou, jejíž funkční gen je možné detekovat a kvantifikovat pomocí qPCR analýzy, stejně jako funkční gen katechol-2,3-dioxygenázy, která katalyzuje štěpení aromatického jádra za aerobní biodegradace (Lawrence, 2006; von Netzer et al., 2013; Mesarch et al., 2000; Martinkova et al., 2009).

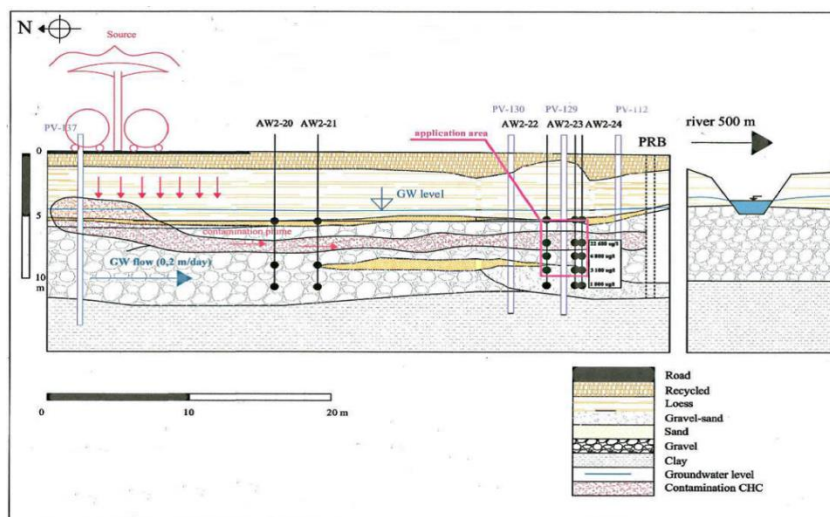
3 Experimentální část

3.1 Popis lokality

Pro účely této práce byly vybrány lokality s rozdílným charakterem kontaminace podzemní vody. Konkrétně se jednalo o kontaminaci monocyklickými aromatickými uhlovodíky (BTEX) a chlorovanými etheny – charakterizace jednotlivých kontaminantů je uvedena v příloze A. Výroba pryskyřic a freonů společně s jejich skladováním vedla k úniku těchto látek do podzemních vod. V současné době zde probíhají sanační zásahy využívající nejrůznější principy a postupy, což rovněž ovlivňuje také mikroflóru v blízkosti aplikačního místa.

V místě kontaminace BTEX byl pro zanoření nosičů a následný monitoring zvolen vrt s označením RW6A-45, který se nachází na hranici kontaminačního mraku. Tento vrt je hluboký 12 m a hladina podzemní vody je okolo 5 m pod povrchem. Geologický profil v okolí tohoto vrtu je tvořen třemi hlavními vrstvy: navážkou (0 - 1,1 m), hlínou (1,1 - 4,9 m) a jílovitým pískem (od 4,9 m níže). Spodní část vrtu je navíc obklopena štěrkopískem.

Ve druhém kontaminačním mraku, s chlorovanými etheny, byly vybrány dva vrty s označením PV-112 a PV-130. Mezi těmito vrty se nacházel aplikační vrt, který byl využíván v rámci jiných studií pro sanační práce, např. na aplikaci nulamocného železa. Všechny vrty se nacházely ve stejném proudu podzemní vody, kde směr toku byl od vrtu PV-130 k PV-112. Toto uspořádání vrtů bylo voleno záměrně, jelikož cílem bylo sledovat rychlost nárůstu a stabilitu vznikajícího biofilmu na nanovlákných nosičích biomasy v průběhu/po sanačních prací. Předpokladem bylo, že budou patrné rozdíly v biomase detekované v jednotlivých vrtech způsobené právě směrem toku podzemní vody (obrázek 10).



Obrázek 10 - Geologický profil lokality kontaminované chlorovanými etheny

3.2 Vzorkování

V rámci této diplomové práce připravené nanovlákněné nosiče (viz kapitola 4.1) byly prostřednictvím nitě fixovány do vzorkovacích patron (obrázek 11). Ty byly následně ponořeny do vybraných vrtů a přibližně v měsíčních intervalech byly odebrány nosiče biomasy pro molekulárně-genetické analýzy. Monitoring trval celkem 12 měsíců. Přehled vzorkování a všech analýz v průběhu monitoringu je uveden v tabulce 1.



Obrázek 11 - Vzorkovací patrony s nanovlákněnými nosiči biomasy

Patrony s nanovlákněnými nosiči byly zanořeny 29. 2. 2016. Odebrána byla vždy každá varianta nosiče a 1 l kontaminované podzemní vody ze všech tří vrtů. Odebrané nanovlákněné nosiče byly v chladicím boxu transportovány do laboratoře, kde byly uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby izolace DNA. Podzemní voda byla ještě v tentýž den zfiltrována přes membránový filtr s průměrem pórů $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Filtry se zachycenou biomasou byly uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 1 - Přehled vzorkování a analýz během ročního monitoringu

PROVÁDĚNÁ ČINNOST	Odběr											
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
	15.4.16	6.5.16	8.6.16	18.7.16	8.8.16	6.9.16	7.10.16	8.11.16	9.12.16	9.1.17	7.2.17	14.3.17
Odběr vzorků na lokalitě	21	21	21	21	20 ^{a)}	21	18 ^{b)}	17 ^{c)}	19	16 ^{d)}	16	19
Izolace DNA	21	21	21	21	20	21	18	17	19	16	16	19
qPCR analýza			63			62			54			51
SEM analýza								2				3
Mikrobiologický rozbor vody												3
Mikroskopická analýza												2

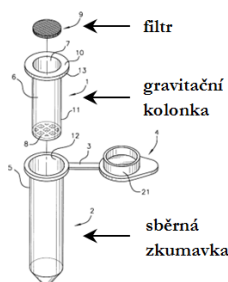
- a) Ztráta nosičů planárního uspořádání s nánosem 3 dtex ze vzorkovací patry ve vrtu PV-130. Zbyly pouze tři nosiče této varianty, jejichž vzorkování bylo naplánováno v intervalu 3 měsíců.
- b) Ztráta nosičů planárního uspořádání s nánosem 0 a 10 dtex ze vzorkovací patry ve vrtu PV-112. Nosiče s nánosem 10 dtex chyběly všechny, zatímco u varianty bez nánosu nanovláken (0 dtex) zbyly poslední 2 nosiče, jejichž vzorkování bylo naplánováno v intervalu 3 měsíců.
- c) Ztráta všech nosičů kruhového uspořádání s nánosem 10 dtex ze vzorkovací patry ve vrtu PV-112. Spojení jednotlivých variant planárních nosičů pomocí nitě ve vzorkovacích patronách ve všech vrtech.
- d) Ztráta nosičů kruhového uspořádání s nánosem 3 dtex ze vzorkovací patry ve vrtu PV-130. Zbyl pouze jeden nosič této varianty, který byl odebrán až při posledním vzorkování monitoringu.

3.3 Molekulárně-genetické analýzy

Z odebraných vzorků (celkem 18 nosičů a 3 membrány) byla do týdne izolována DNA. Vzhledem k podobnosti matric (biofilm na nosiči biomasy vs. biofilm v půdě) probíhala izolace DNA kitem cíleným na půdní vzorky, FastDNA SPIN Kit for Soil. Poté byla změřena koncentrace DNA ve vzorcích pomocí Qubit® 2.0 fluorometr. Ve tříměsíčních intervalech byla provedena analýza qPCR.

3.3.1 Izolace DNA

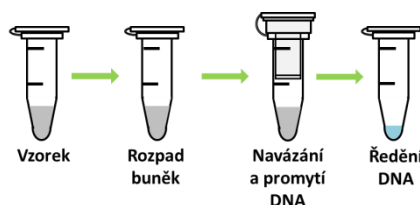
Extrakce DNA byla provedena podle návodu výrobce. Souhrnné schéma izolace je znázorněno na obrázku 13. FastDNA® SPIN Kit je založen na mechanické lzy. Souprava obsahovala soubor chemikálií (tabulka 2), 2ml zkumavky s lyzační matricí (1,4mm keramické částičky, 0,1mm křemičité částičky a skleněnou kuličku o průměru 4 mm), gravitační kolonky a 2ml sběrné zkumavky (obrázek 12). Veškeré použité laboratorní plasty (pipetovací špičky, zkumavky) byly sterilní.



Obrázek 12 - Schéma SPIN Filter tube. Převzato z (Fung a Jahid, 2001) a upraveno autorem.

Tabulka 2 - Seznam chemikálií použitých v izolaci DNA

Název	Popis chemikálie
Pufr fosfátu sodného	čínidlo s vysokou pufrací kapacitou ¹¹ <u>složení:</u> NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , Na ₃ PO ₄
MT pufr	lyzační roztok pro ochranu a rozpouštění nukleových kyselin a proteinů <u>složení:</u> SDS, PVP, NaCl, Tris
PPS (Protein Precipitation Solution)	precipitace proteinů <u>složení:</u> CH ₃ COOH
Binding Matrix	suspenze pro navázání DNA z lyzátu <u>složení:</u> SiO ₂ kuličky
SEWS-M (Salt/Ethanol Wash Solution)	promývací roztok <u>složení:</u> C ₂ H ₅ OH
DES	DNA eluční roztok <u>složení:</u> ultračistá voda (bez deoxyribonukleázy)



Obrázek 13 - Stručné schéma izolace DNA (I - zpracování vzorku, II - homogenizace a lýza buněk, III - navázání DNA, IV - promytí DNA, V - ředění DNA)

I. Zpracování vzorku

Z nosiče biomasy byly odstraněny všechny ostatní komponenty kromě nosné nitě s nanovláknky (tj. lepidlo, vlasec), pokud byly přítomny. Do zkumavky Lysing Matrix E bylo naváženo max. 500 mg vzorku. V případě vzorku kontaminované vody byla celá filtrační membrána vložena do zkumavky.

II. Homogenizace a lýza buněk

Do zkumavky Lysing Matrix E bylo ke vzorku přidáno 978 μ l pufru fosfátu sodného a 122 μ l MT pufru. Vzorek byl homogenizován ve zkumavkovém homogenizátoru BeadBlaster 24 (Benchmark Scientific) dvakrát po dobu 40 s při rychlosti 6,0 s pauzou mezi cykly 30 s. Poté byl centrifugován na centrifuze Smart R17 (Hamil) při rychlosti 14 000 \times g po dobu 10 min. Z Lysing Matrix E zkumavky byl přenesen supernatant obsahující uvolněný obsah buněk do čisté 2ml Eppendorfovy zkumavky. Bylo přidáno 250 μ l precipitačního činidla PPS (vysrážení proteinů) a zkumavka byla 10krát ručně promíchána

¹¹ Pufrací kapacita určuje množství látky, jejíž přídavek je možné vykompenzovat pomocí pufru (ANON., 2008).

opakováním otočením dnem vzhůru. Vzorek byl stočen v centrifuze po dobu 5 min při rychlosti $14\,000 \times g$.

III. Navázání DNA

Supernatant zbavený proteinových nečistot v předchozím kroku byl přenesen do 15ml zkumavky. Na vortexu byla promíchána suspenze Binding Matrix obsahující SiO_2 kuličky a ke vzorku byl přidán 1 ml suspenze. Zkumavka se vzorkem byla umístěna na 2 minuty na tzv. kývačku (třepačka Mini Biomixer 3D, Benchmack Scientific). Následovala sedimentace SiO_2 kuliček po dobu 3 min a poté bylo opatrně odebráno 600 μl supernatantu tak, aby nedošlo k odebrání SiO_2 kuliček s navázanou DNA - viz kapitola 2.3.1. Zbytek vzorku ve zkumavce byl promíchán na vortexu. 750 μl vzorku bylo přeneseno do kolonky umístěné ve sběrné zkumavce ze soupravy SPIN Filter tube. Vzorek ve SPIN Filter tube byl centrifugován při rychlosti $14\,000 \times g$ po dobu 1 min. Po vyjmutí kolonky byl obsah sběrné zkumavky vyprázdněn a kolonka byla umístěna zpět do zkumavky. Na vortexu byl promíchán zbytek vzorku v 15ml zkumavce a byl přenesen (max. 750 μl) do kolonky ve vyprázdněné sběrné zkumavce SPIN Filter tube. Vzorek ve SPIN Filter tube byl znovu centrifugován při rychlosti $14\,000 \times g$ po dobu 1 min a následně byla vyprázdněna sběrná zkumavka.

IV. Promytí DNA

Do kolonky SPIN Filter tube bylo přidáno 500 μl promývacího roztoku SEWS-M. Vzorek byl opatrně promíchán pipetou a následně 1 min centrifugován při rychlosti $14\,000 \times g$. Byla vyprázdněna sběrná zkumavka a vzorek byl znovu centrifugován při rychlosti $14\,000 \times g$ po dobu 2 min.

V. Ředění DNA

Kolonka ze SPIN Filter tube byla přenesena do 2ml sběrné zkumavky Catch Tube. Peletka s DNA byla sušena v otevřených zkumavkách při laboratorní teplotě po dobu 5 min, aby se odpařil zbytkový ethanol z promývacího roztoku. Následně bylo do kolonky přidáno 100 μl DES a byla promícháním pipetou resuspendována peletka. Vzorek byl inkubován po dobu 5 min při teplotě $55\text{ }^\circ\text{C}$ v inkubátoru Genius Dry Bath (Major Science) a následně byl centrifugován 2 min při rychlosti $14\,000 \times g$. Kolonka ze SPIN Filter tube byla odebrána a byla uzavřena sběrná zkumavka Catch Tube se vzorkem izolované DNA.

3.3.2 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA po izolaci byla naměřena pomocí fluorometru Qubit® 2.0 (obrázek 14) a soupravy Qubit® dsDNA Assay Kit. Ta obsahovala barvivo, jehož fluorescence se objeví pouze při navázání na DNA, dále ředící roztok a ředěné DNA standardy. Do zkumavek Qubit® Assay Tubes bylo napipetováno 190 µl ředícího roztoku, ke kterému bylo přidáno 10 µl vzorku. Směs byla nejprve 5 s vortexována a následně ihned centrifugována 10 s při 2 000 × g, aby obsah nezůstal na stěnách zkumavky. Vzorky byly inkubovány po dobu 2 min při laboratorní teplotě. Poté byla zkumavka vložena do fluorometru a byla změřena koncentrace DNA.



Obrázek 14 - Qubit® 2.0 Fluorometer od společnosti Thermo Fisher Scientific

3.3.3 Real-time PCR

Celkové bakteriální oživení bylo sledováno u všech vzorků amplifikací genu 16S rDNA pomocí primeru s označením U16SRT. Gen 16S rDNA slouží jako univerzální primer a kóduje malou podjednotku ribozomu nutnou pro správné životní funkce bakteriálních buněk. Další 4 použité specifické primery byly vybrány podle kontaminace vrtu. Použité primery jsou popsány v tabulce 3. Vzorky z vrtů PV-112 a PV-130 (kontaminace chlorovanými etheny) byly analyzovány specifickými primery s označením *vrA* a DHC-RT. Primer s označením *vrA* byl použit pro detekci genu vinylchlorid reduktázy a pomocí primeru s označením DHC-RT byl kvantifikován 16S rDNA gen bakteriálního rodu *Dehalococcoides mccartyi*, který je schopen dechlorace.

Vzorky z vrtu RW6A-45 (kontaminace BTEX) byly testovány na přítomnost genu *bssA* neboli benzylsukcinát syntázy a genu katechol-2,3-dioxygenázy. Benzylsukcinát syntáza je klíčový enzym anaerobního rozkladu toluenu a její gen je detekován pomocí primeru s označením *bssA*. Katechol-2,3-dioxygenáza je enzym odpovědný za aerobní

biodegradaci benzenu, toluenu, xylenu, fenolu, naftalenu a bifenylu a detekce jejího genu byla provedena pomocí primeru s označením DEF/G.

Tabulka 3 - Seznam použitých primerů

Název primeru	Gen	Sekvence primeru (3' → 5') ¹²	Annealing teplota [°C]	Účinnost primeru	Zdroj
U16SRT	16S rDNA	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	60	2,00441	(Clifford et al., 2012)
		R: TATTACCGCGGCTGCTGGC			
vcrA	vinylchlorid reduktáza	F: CCCTCCAGATGCTCCCTTTA	60	1,88449	(Behrens et al., 2008)
		R: ATCCCTCTCCCGTGTAAACC			
DHC-RT	<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	F: GGGAGTATCGACCCTCTCTG	60	1,98145	(Yoshida et al., 2005)
		R: CGTTYCCCTTTCRGTTCACT			
DEF/G	catechol-2,3-dioxygenáza	F: CGACCTGATC(AT)(CG)CATGACCGA	55	1,82648	(Mesarch et al., 2000)
		R: T(CT)AGGTCA(GT)(AC)ACGGTCA			
bssA	benzylsukcinát syntáza	F: GACATGACCGACGCSATYCT	55	1,81373	(von Netzer et al., 2013)
		R: TCGTCGTCRITGCCCCAYTT			

Nejprve bylo navrženo schéma umístění vzorků v 96 jamkové PCR destičce s příslušnými primery. Jednotlivé vzorky byly testovány v duplikátech. Pro manipulaci s primery a DNA byly využity UV-dekontaminační boxy. Veškeré použité laboratorní plasty (pipetovací špičky, zkumavky) byly sterilní a byly používány pouze pipetovací špičky s filtrem.

I. Příprava vzorků

Vzorky izolované DNA byly podle výsledků kontroly inhibice (viz níže) naředěny ultračistou vodou a důkladně promíchány na vortexu. Způsob ředění vzorků jednoho typu (např. nosiče kruhového uspořádání s nánosem 3 dtex z vrtu PV-112) bylo v průběhu monitoringu stejné.

II. Příprava reakční směsi

Reakční roztok byl připraven v UV-dekontaminačním boxu Bio II Advance (viz obrázek 15) smícháním PCR vody¹³, příslušného primeru o molární koncentraci 20 μ M a směsi SYBR Green I Master obsahující Taq DNA polymerázu, pufr, fluorescenční barvivo a směs dNTP. Objemové množství jednotlivých reaktantů směsi bylo určeno součinem množství počtu vzorků a základního množství pro jeden vzorek uvedené v tabulce 4. Reakční směs byla důkladně promíchána na vortexu a centrifugována po dobu 10 s při 2 000 \times g.

¹² S ... báze se 3 vodíkovými vazbami (G, C); Y ... pyrimidinové báze (C, T); R ... purinové báze (A, G)

¹³ PCR voda je ultračistá voda (18 M Ω -cm, ultrafiltrovaná), ze které byly odstraněny RNázy působením diethylpyrokarbonátu a autoklávováním.



Obrázek 15 - Biohazard box Bio II Advance od společnosti Telstar

Tabulka 4 - Objemové množství jednotlivých složek reakční směsi pro jeden vzorek

Chemikálie	Objem [μ l]
PCR voda	3,6
primer (20 μ M)	0,4
SYBR Green I Master	5

Po přípravě reakčního roztoku byla připravena chlazená PCR destička, do které bylo podle schématu umístění vzorků napipetováno do jedné jamky 9 μ l reakční směsi a k negativní kontrole byl přidán 1 μ l PCR vody.

III. Přidání vzorku

PCR destička byla přikryta lehce PCR fólií pro snížení možné kontaminace během přenosu do dekontaminačního PCR boxu Sterilizing Workstation (obrázek 16). Zde podle schématu byl přidán 1 μ l izolované DNA ze vzorku a destička byla opět přikryta PCR fólií, aby se minimalizovalo odpařování. Destička byla centrifugována po dobu 15 s při $500 \times g$ pomocí centrifugy MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner (Labnet) a nakonec byla vložena do termocykleru LightCycler® 480 (obrázek 17). V programu LightCycler® 480 Software (verze 1.5) byl nastaven reakční profil (viz tabulka 5) pro objem vzorku 10 μ l a byla zvolena požadovaná annealing teplota.



Obrázek 16 - PCR box UV Sterilizing Workstation od společnosti Ultra-Violet Products (UVP)



Obrázek 17 - Termocykler LightCycler® 480, Roche Diagnostics

Tabulka 5 - Parametry PCR analýzy

Programy	Počet cyklů	Mód analýzy	Cílová teplota [°C]	Doba [mm:ss]	Rychlost ohřívání [°C·s ⁻¹]	Poznámka
Počáteční denaturace	1	žádný	95	05:00	4,4	-
PCR amplifikace	45	kvantifikace	95	00:10	4,4	-
			55-60 ¹⁴⁾	00:15	2,2	-
			72	00:20	4,4	detekce fluorescence
Křivka tání	1	analýza křivky tání	98	-	0,06	-
Chlazení	1	žádný	40	00:10	2	-

¹⁴ Annealing teplota specifická pro použitý primer.

IV. Vyhodnocení

Po skončení PCR programu byla zkontrolována přesnost průběhu reakce pomocí amplifikační křivky a křivky tání. Pomocí softwaru LightCycler® 480 byla získány Ct hodnoty metodou maxima druhé derivace amplifikační křivky („2nd Derivative Maximum“). Data z analýzy qPCR byly normalizovány na množství vzorku a byl proveden průměr ze získaných hodnot duplikátu u každého vzorku. Průměr Ct hodnot u každého vzorku z prvního odběru byl považován jako referenční pro daný typ vzorku, Ct_{ref} , a pomocí této hodnoty byla vypočtena relativní kvantifikace RQ u dalších vzorků pomocí vztahu rovnice 1:

$$RQ = Eff^{-(Ct_{target} - Ct_{ref})} \quad (1)$$

, kde Eff je účinnost primeru a Ct_{target} je průměr Ct hodnot u analyzovaného vzorku.

V. Kontrola inhibice

Testování kvality vzorku určené přítomností látek inhibujících DNA polymerázu bylo provedeno ze vzorků z prvního odběru. Detekce PCR inhibitorů způsobujících zkreslené výsledky real-time PCR proběhla naředěním vzorku ultračistou vodou 5x, 10x a 20x, provedením real-time PCR a vyhodnocením experimentu. U vzorku neobsahující inhibiční látky by rozdíly mezi Ct hodnotami ředěných vzorků měly odpovídat ředění. Například Ct hodnota neředěného vzorku by měla být přibližně o 2,3 cyklu menší než u téhož vzorku ředěného 5x. Rozdíl mezi dalšími ředěními 5x-10x a 10x-20x by měl být přibližně 1 cyklus.

3.4 Ostatní analýzy

3.4.1 Mikrobiologická analýza

Ve vzorcích vody z posledního odběru bylo stanoveno celkové množství životaschopných bakteriálních buněk pomocí počítání kolonií narostlých po 3 dnech (aerobní podmínky) a po 7 dnech (anaerobní podmínky) na agarových plotnách při laboratorní teplotě. Jako živné médium byl použit Plate Count Agar¹⁵ (PCA) a pro ředění byl použit fyziologický roztok (0,85% roztok NaCl).

3.4.2 Mikroskopická analýza

Povrchová morfologie použitých nanovláken byla pozorována pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) značky Carl Zeiss ULTRA Plus. Analýzy byly provedeny s nosiči po 8. a 12. odběru. Při posledním odběru (12.) byly odebrány všechny nosiče z lokality a u nosičů, které nebyly použity pro molekulárně-genetickou analýzu, byla provedena mikroskopická analýza pomocí optického mikroskopu Olympus BX51M a fluorescenčního mikroskopu ZEISS Axio Imager M2.

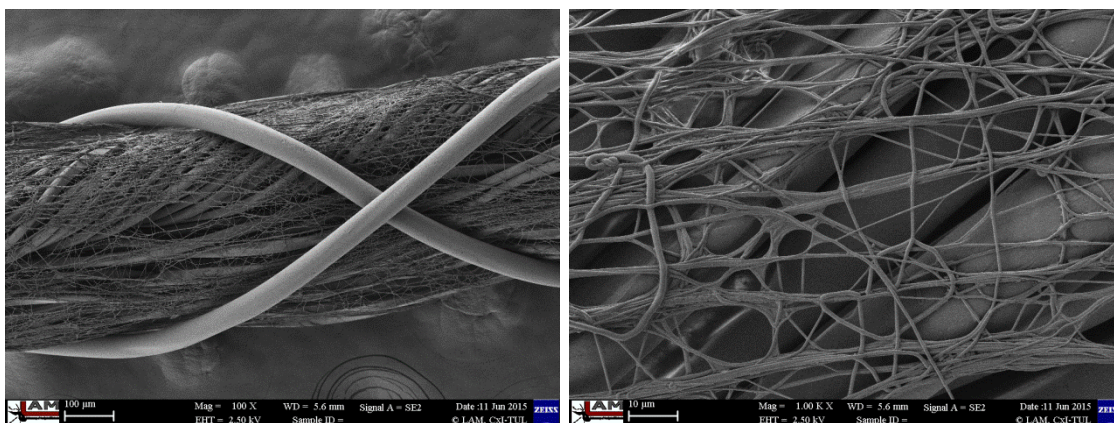
¹⁵ PCA je agar s glukózou, peptonem z kaseinu a kvasničným extraktem.

4 Výsledky a diskuze

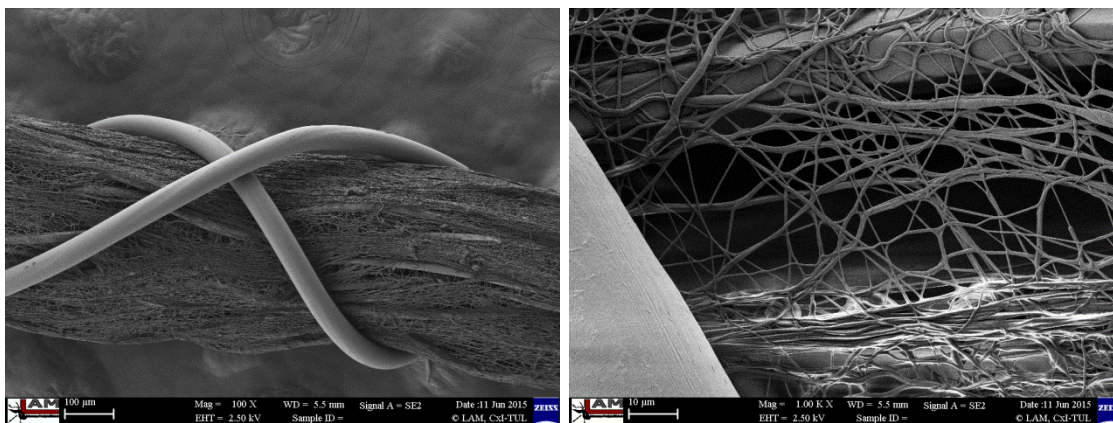
4.1 Nosiče biomasy

V rámci této práce byly připraveny dvě různé tvarové varianty nanovláknenných nosičů biomasy. Od každé tvarové varianty byly vyrobeny nosiče se dvěma nánosy nanovláken, 3 a 10 dtex. Kromě nosičů s nánosem nanovláken byly vyrobeny i nosiče bez nanovláknenného nánosu (0 dtex), které sloužily jako reference. Nosné vlákno (s nanovláknem i bez nanovláken) bylo chráněné křížovým ovínem. Cílem bylo nalézt vhodnou variantu nosiče určeného pro monitoring a následnou analýzu biomasy prostřednictvím qPCR. Celkem bylo připraveno 15 kusů od každé varianty nosiče.

Pro přípravu nosičů biomasy byla použita nanovláknna na bázi polyuretanu vyrobená metodou elektrostatického zvlákňování z volné hladiny ve vysokonapětovém elektrickém poli, tzv. electrospinningem. Polyuretan byl vybrán na základě předchozích experimentů, ve kterých vykazoval nejlepší výsledky pro kolonizaci mikroorganismy díky své biokompatibilitě a hydrofobním vlastnostem. Nanovláknna byla nanesena na nosnou nit z polyesterového hedvábí SLOTERA (167f25x1x1). Byly testovány dvě hustoty nanovláken na nosném vlákně. Menší nános byl tvořen nanovláknem s jemností 3 dtex (plošná hustota $0,336 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$; obrázek 18). Vyšší nános představovala nanovláknna s jemností 10 dtex (plošná hustota $1,12 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$; obrázek 19).



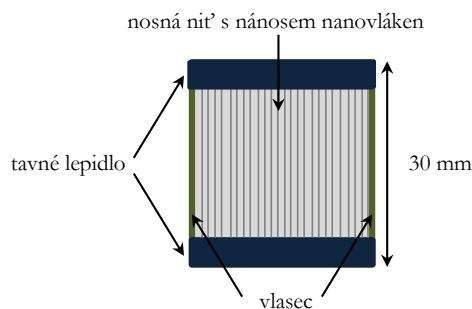
Obrázek 18 - Nosné vlákno s nánosem nanovláken s jemností 3 dtex, zvětšení: 100× (vlevo) a 1000× (vpravo). Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss ULTRA Plus.



Obrázek 19 - Nosné vlákno s nánosem nanovláken s jemností 10 dtex, zvětšení: 100× (vlevo) a 1000× (vpravo). Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss ULTRA Plus.

4.1.1 Planární uspořádání nosiče

Nosiče planárního uspořádání nosných vláken byly připraveny z nosných nití (s nánosem nanovláken i bez nanovláken), tavného lepidla z polyethylenu a vlasce. Na válec o průměru 110 mm bylo v těsné blízkosti vedle sebe navinuto celkem 100 nosných nití a z obou stran byly umístěny vlasce jako výztuž finální konstrukce nosiče. Takto uspořádané nosné nitě tvořící pás s krajními vlasci byly ve vzdálenosti 30 mm přičně fixovány pomocí tavného lepidla, což odpovídalo 3 m nosné nitě na každém nosiči, stejně jako v případě kruhového uspořádání. Schematické znázornění planárního uspořádání nosiče je uvedeno na obrázku 20. Na obrázku 21 je poté uvedena fotografie tohoto uspořádání.



Obrázek 20 - Schéma nosiče planárního uspořádání

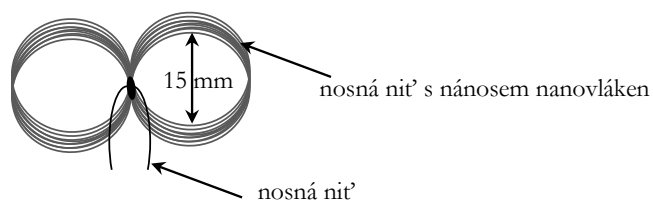


Obrázek 21 - Nosiče planárního uspořádání

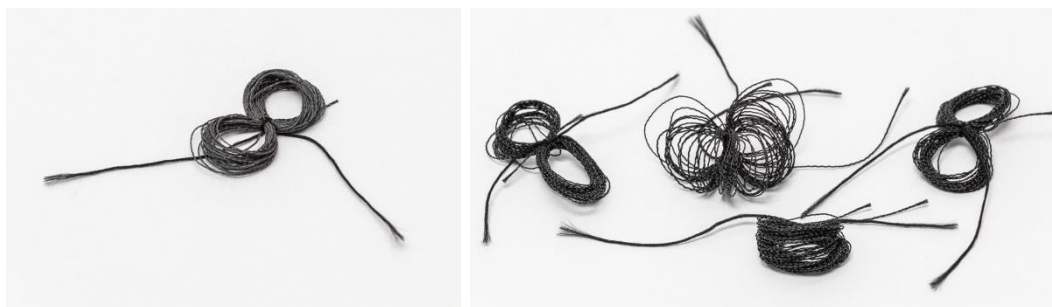
Na základě dříve provedených experimentů, které předcházely této diplomové práci, se nosiče biomasy planárního uspořádání ukázaly z hlediska nárůstu biofilmu jako nejvhodnější ze všech testovaných tvarových variant. Avšak stejně jako u ostatních testovaných tvarových variant musejí být před izolací DNA ostatní komponenty, kromě nosné nitě s nanovláknem, odstraněny. V případě nosiče planárního uspořádání je tedy nutné odstranit lepidlo a vlasec. Aby byla eliminována pracnost a zrychlena předúprava vzorku před izolací DNA, byla vyvinuta nová tvarová varianta nazvaná jako kruhové uspořádání. Ta byla vyrobena pouze z nosné nitě a nanovláken.

4.1.2 Kruhové uspořádání nosiče

Nosiče kruhového uspořádání nosných vláken byly připraveny navinutím 3 m nosné nitě s definovaným nánosem nanovláken na válec o průměru 15 mm. Navinutá vlákna jednotlivých nosičů byla následně v jednom místě fixována prostřednictvím 2 uzlů (nosnou nití bez nánosu) a rozevřena na dvě poloviny. Schématické znázornění finálního tvaru je uvedeno na obrázku 22. Na obrázku 23 je fotografie tohoto tvarového uspořádání.



Obrázek 22 - Schéma kruhového uspořádání nosné nitě



Obrázek 23 - Nosiče kruhového uspořádání

4.2 Vliv charakteristik nosiče

V následujících kapitolách jsou uvedeny výsledky získané během pravidelně prováděného ročního monitoringu na reálné lokalitě a diskutován vliv charakteristik nosiče na nárůst biofilmu v jednotlivých vrtech lišících se typem i mírou kontaminace. Hodnocení tvarových variant nosičů a nánosů nanovláken v jednotlivých vrtech bylo provedeno vyhodnocením qPCR analýz prováděných prostřednictvím univerzálního bakteriálního primeru s označením U16SRT. Specifickými primery byla dále testována přítomnost klíčových mikrobiálních konsorcií nebo funkčních genů podílejících se na biodegradaci přítomných kontaminantů. Vzorky biofilmu na nosičích byly porovnávány se vzorky podzemní vody.

V následujícím textu je pod pojmem „Ct hodnota“ míněn průměr z duplikátu Ct hodnot normalizovaných na množství vstupního materiálu. Interpretace výsledků qPCR analýz je založena na nepřímé úměře, tudíž čím nižší je Ct hodnota, tím větší je množství cílové DNA ve vzorku a naopak. Konkrétně tedy v případě qPCR analýzy pomocí primeru U16SRT, čím nižší byla Ct hodnota, tím větší bylo celkové bakteriální oživení (množství bakteriální biomasy) ve vzorku. Maximální možná Ct hodnota je 40 a odpovídá nulové detekci¹⁶.

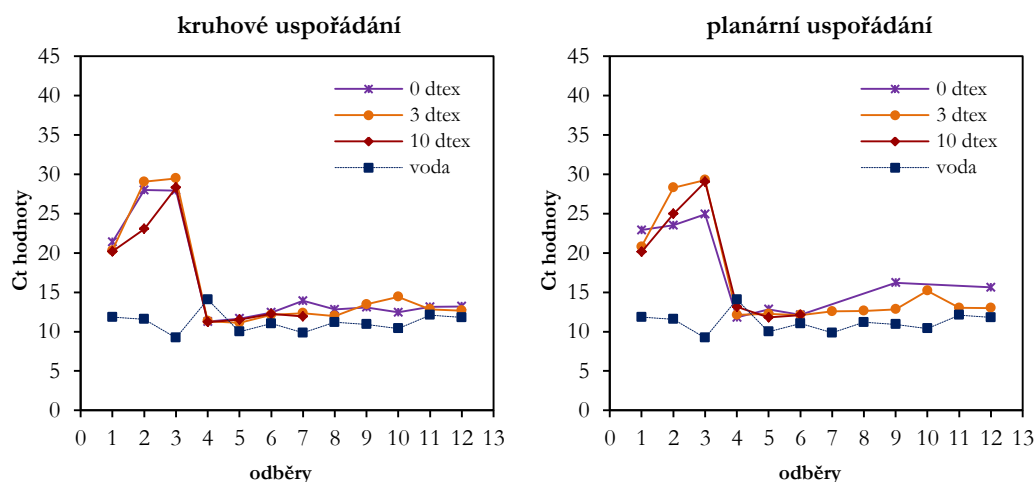
Cílem testování bylo zjistit vliv nánosů nanovláken a tvaru nosiče na kolonizaci nosičů biomasou mikrobiální populací přítomnou v podzemní vodě na reálné kontaminované lokalitě. Bylo předpokládáno, že nános nanovláken zlepší podmínky pro rychlou fixaci mikroorganismů na povrch nosiče a pro následný nárůst biofilmu. V průběhu dlouhodobého monitoringu docházelo bohužel ke ztrátě nosičů ze vzorkovacích patron. V případě, že se ztratila u určité varianty jen část nosičů a ne všechny, bylo naplánováno vzorkování v jiném než původně měsíčním intervalu, například po 3 měsících.

¹⁶ U primeru U16SRT je Ct hodnota ovlivněna reziduální bakteriální DNA obsaženou ve směsi SYBR Green I Master, jejíž přítomnost je způsobena nedostatečnou precipitací po extrakci DNA polymerázy z *Thermus aquaticus* (viz kapitola 2.3.2). Ct hodnota negativní kontroly se pohybuje okolo 31.

4.2.1 Vrt PV-112 (nižší kontaminace chlorovanými etheny)

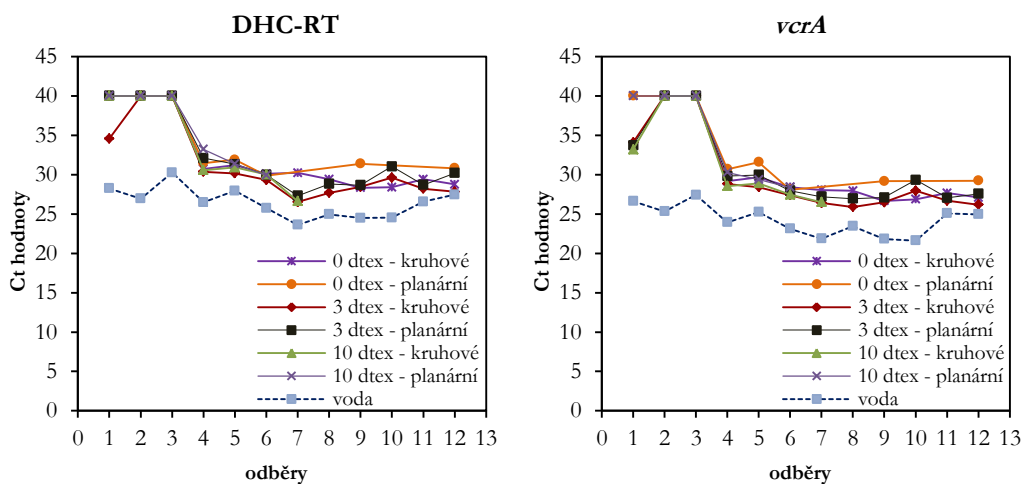
Vrt PV-112 se nacházel dále po proudu podzemní vody od centra kontaminačního mraku chlorovaných ethenů než vrt PV-130. U vzorků z vrtu PV-112 nebyla pozorována inhibice PCR. Časový vývoj Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu PV-112 je znázorněn na obrázku 24. U obou tvarových variant byly při 1. odběru detekovány nejnižší Ct hodnoty (nejvyšší nárůst biomasy) u nosičů s nánosy nanovláken, což potvrzuje předpoklad, že nanovlákná podporují rychlou fixaci mikroorganismů na nosiči. Ct hodnoty se u všech testovaných nosičů v tomto vrtu zvýšily po 1. odběru. Ovšem po 3. odběru byl zaznamenán u všech testovaných nosičů prudký pokles Ct hodnot o 13 až 18 cyklů, tj. na úroveň podzemní vody. Tento prudký pokles byl pravděpodobně způsoben inhibicí při izolaci DNA - viz kapitola 4.3.1.

Obě tvarové varianty nosičů s nánosem 10 dtex měly od 4. odběru Ct hodnoty v rozmezí 2 cyklů od Ct hodnot podzemní vody, ale bohužel po 6. a 7. odběru došlo ke ztrátám všech nosičů tohoto typu. Od 4. odběru celkové bakteriální oživení na nosičích kruhového uspořádání lépe charakterizovalo situaci v podzemní vodě než na nosičích planárního uspořádání. Po 6. odběru došlo také ke ztrátě nosičů planárního uspořádání bez nánosu nanovláken a zbyly pouze 2 nosiče této varianty, jejichž Ct hodnoty se odchyly od Ct hodnot ostatních nosičů a podzemní vody. Všechny ostatní nosiče vykazovaly stabilní bakteriální biofilm od 4. odběru. V obou grafech uvedených na obrázku 24 je patrný mírný nárůst Ct hodnot při 10. odběru u nosičů s nánosem nanovláken 3 dtex, které byly umístěny v jiné patroně než zbylé varianty nosičů. Jejich okolní podmínky (např. proudění vody) se tedy mohly mírně lišit od ostatních odebraných nosičů, při tomto odběru již pouze od nosiče kruhového uspořádání bez nánosu nanovláken.



Obrázek 24 - Časový průběh Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu PV-112 (nižší kontaminace chlorovanými etheny)

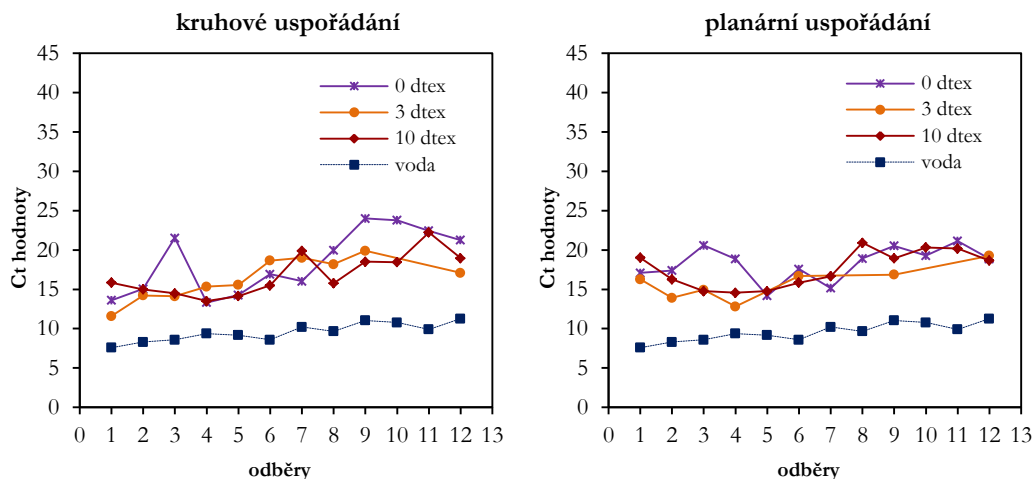
Ct hodnoty specifických prumerů DHC-RT a *vrzA* uvedených na obrázku 25 kopírovaly u vrtu PV-112 průběh celkového bakteriálního oživení. Po 3. odběru byly Ct hodnoty detekované na nosičích v rozmezí 5 cyklů od Ct hodnot zjištěných v podzemní vodě. Jejich úzký rozptyl u všech nosičů naznačuje stabilní biofilm obsahující specifické mikrobiální populace odpovědné za reduktivní dechloraci.



Obrázek 25 - Časový průběh Ct hodnot specifických prumerů DHC-RT a *vrzA* ve vrtu PV-112

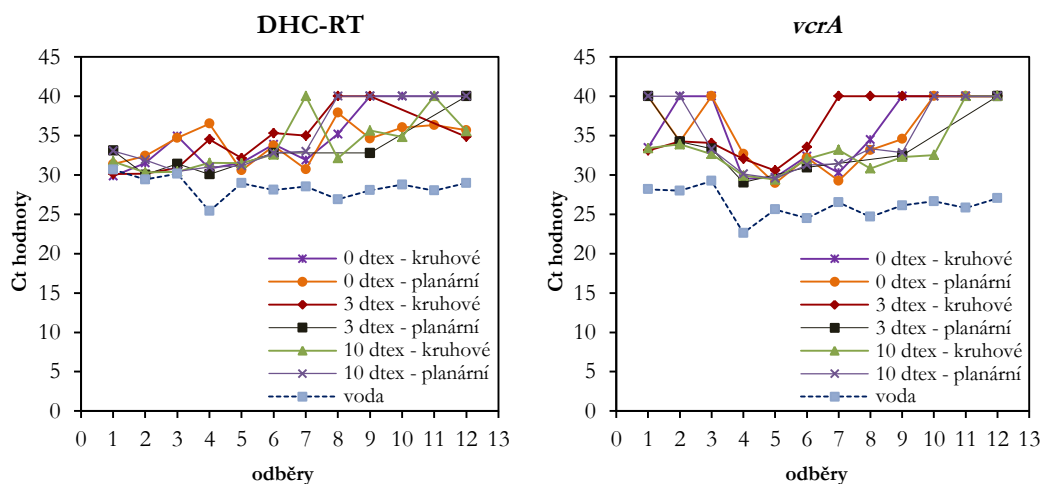
4.2.2 Vrt PV-130 (vyšší kontaminace chlorovanými etheny)

Vrt PV-130 se nacházel mezi zdrojem kontaminace chlorovanými etheny a vrtem PV-112. Směr toku podzemní vody byl od vrtu PV-130 k vrtu PV-112. U vzorků z vrtu PV-130 nebyla pozorována inhibice PCR. Ct hodnoty prumeru U16SRT u nosičů ve vrtu PV-130, byly již při 1. odběru nízké, ale nebyly na stejné úrovni jako Ct hodnoty podzemní vody (obrázek 26). Nejnižší Ct hodnoty měly při 1. odběru nosiče s nánosem 3 dtex. Nosiče s nánosem nanovláken 10 dtex měly vyšší Ct hodnoty než nosiče bez nánosu nanovláken. Nosiče s nánosem nanovláken 10 dtex vykazovaly stabilní nános biomasy mezi 1. a 6. odběrem (kruhové) a mezi 2. a 7. odběrem (planární). Během dalších odběrů už nebyl pozorován stabilní vývoj Ct hodnot u tohoto nánosu nanovláken a nebyl pozorován ani u nosičů bez nánosu nanovláken během celého monitoringu. Nosiče kruhového uspořádání s nánosem nanovláken 3 dtex vykazovaly nejstabilnější vývoj Ct hodnot ze všech nosičů během celého monitoringu. Bohužel docházelo ke ztrátám nosičů s nánosem 3 dtex a pro zbylé nosiče bylo naplánováno vzorkování po 3 měsících, u kterých nebyly sledovány oscilující Ct hodnoty jako u dalších nánosů.



Obrázek 26 - Časový průběh Ct hodnot přímeru U16SRT ve vrtu PV-130 (vyšší kontaminace chlorovanými etheny)

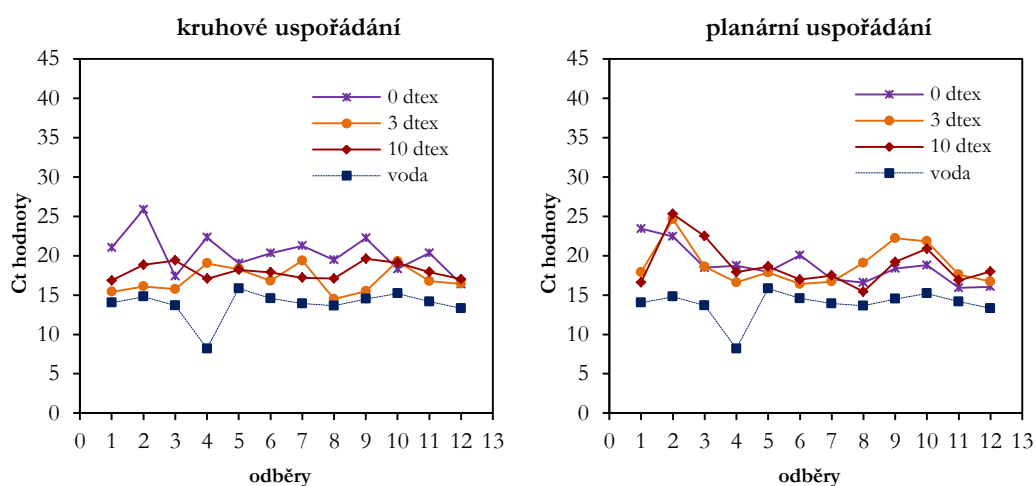
Časový vývoj Ct hodnot specifických přímerů DHC-RT a *vrA* ve vrtu PV-130 je znázorněn na obrázku 27. Bakteriální kmen *Dehalococcoides mccartyi* byl detekován v biofilmu na všech nosičích již při prvním odběru a jeho Ct hodnoty byly srovnatelné s podzemní vodou. Po cca 7. odběru nicméně tento přímer vymizel. Přítomnost funkčního genu *vrA* byla sledována při 1. odběru pouze u nosičů kruhového uspořádání a nejstabilnější vývoj Ct hodnot přímeru *vrA* byl pozorován u nosiče kruhového uspořádání s nánosem nanovláken 10 dtex. Při posledním (12.) odběru nebyl detekován funkční gen *vrA* u žádného z nosičů a u většiny nebyl detekován už od 9. odběru.



Obrázek 27 - Časový průběh Ct hodnot specifických přímerů DHC-RT a *vrA* ve vrtu PV-130

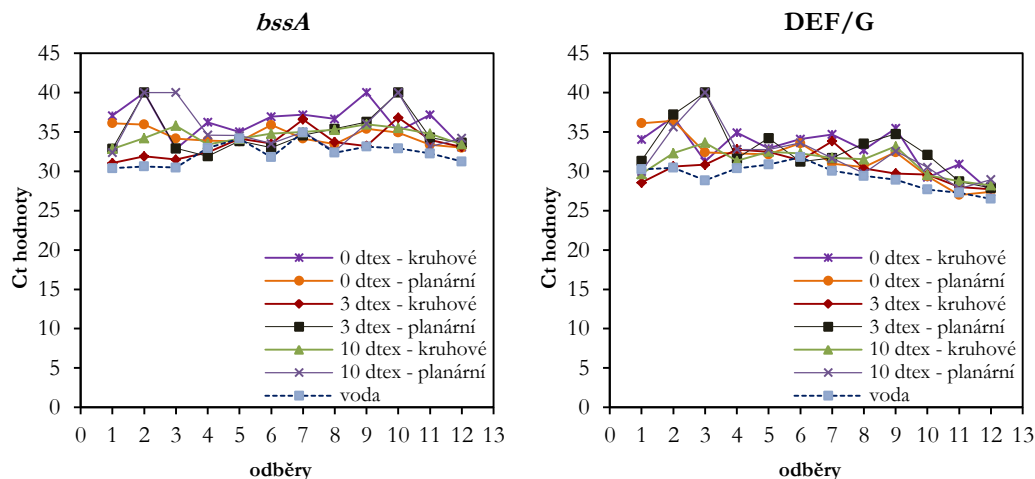
4.2.3 Vrt RW6A-45 (BTEX)

Na rozdíl od předchozích vrtů byl vrt RW6A-45 kontaminován monocyklickými aromatickými uhlovodíky - BTEX. Přítomnost inhibičních látek byla pomocí kontroly inhibice PCR potvrzena pouze ve vzorku podzemní vody v tomto vrtu. Tento vzorek musel být ředěn 20x před každou qPCR analýzou, aby nevykazoval inhibici PCR. Ostatní vzorky nemusely být ředěny v průběhu monitoringu. Časový průběh Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu RW6A-45 je uveden na obrázku 28. Pouze na nosičích kruhového uspořádání s nánosy nanovláken 3 a 10 dtex byl pozorován v průběhu celého monitoringu stabilní biofilm. U ostatních nosičů Ct hodnoty oscilovaly v rozmezí 5 i 10 cyklů od Ct hodnot zjištěných v podzemní vodě. Nosič kruhového uspořádání s nánosem nanovláken 10 dtex nejlépe charakterizoval situaci v podzemní vodě.



Obrázek 28 - Časový průběh Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu RW6A-45 (kontaminace BTEX)

V biofilmu na nosičích odebraných z vrtu RW6A-45 byly detekovány specifické bakteriální populace schopné degradovat BTEX za anaerobních (*bssA*) a aerobních (DEF/G) podmínek. Ct hodnoty specifických primerů u všech nosičů byly v průběhu monitoringu na stejné úrovni jako Ct hodnoty detekované v podzemní vodě (obrázek 29). Na nosiči kruhového uspořádání s nánosem 3 dtex nanovláken bylo již od 1. odběru detekováno množství genů benzylsukcinát syntázy a katechol-2,3-dioxygenázy srovnatelné s podzemní vodou. U ostatních nosičů bylo množství specifické biomasy srovnatelné s podzemní vodou dosaženo až při 3. nebo 4. odběru.



Obrázek 29 - Časový průběh Ct hodnot specifických primerů *bssA* a DEF/G ve vrtu RW6A-45

4.3 Dlouhodobý monitoring kontaminované lokality

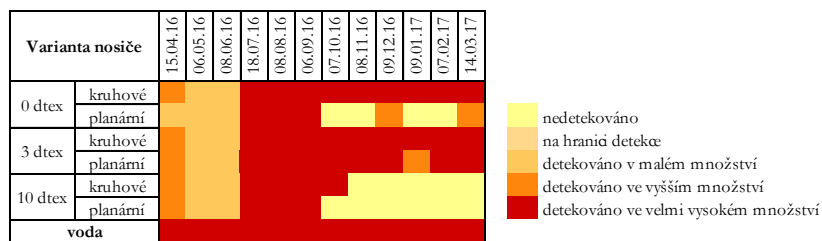
Pomocí qPCR analýzy všemi primery byla dlouhodobě monitorována situace na kontaminované lokalitě. Pro vyhodnocení výsledků dlouhodobého monitoringu jsou naměřené Ct hodnoty interpretovány ve formě tzv. heat-map. Aby byly heat-mapy správně interpretovány, je v následujícím odstavci popsán způsob jejich tvorby.

Vypočtené Ct hodnoty určitého primeru byly nejprve rozděleny na dvě množiny, hodnoty nižší než 36 a hodnoty rovné nebo vyšší než 36. Hodnoty rovné nebo vyšší než 36 byly zařazeny do skupiny na hranici detekce. Druhá množina byla rozdělena na tři stejné intervaly $\left(\frac{\max-\min}{3}\right)$ a postupně od nejnižších hodnot byly intervaly zařazeny do skupin: detekováno ve velmi vysokém množství, detekováno ve vyšším množství a detekováno v malém množství. Ct hodnoty rovné 40 jsou ve skupině nedetekováno. Jednotlivé skupiny (interval) jsou v heat-mapách prezentovány patřičnými barvami.

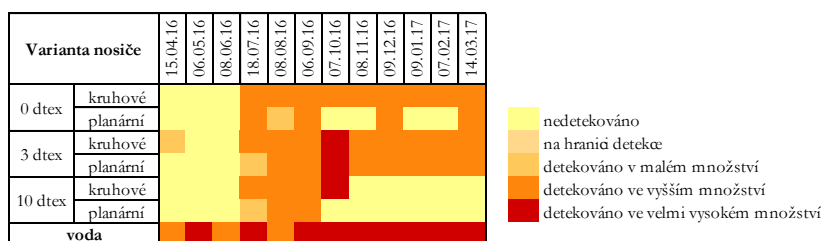
Hodnoty koncentrací DNA ve vzorcích v průběhu monitoringu jsou uvedeny v příloze B. Průměrné Ct hodnoty normalizované na množství vzorku z qPCR analýzy jsou uvedeny v příloze C.

4.3.1 Vrt PV-112 (nižší kontaminace chlorovanými etheny)

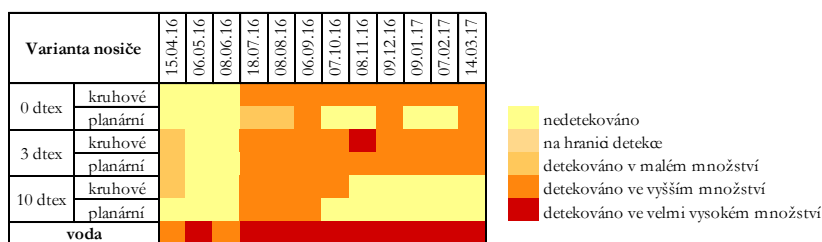
Časové vývoje Ct hodnot primeru U16SRT a specifických primerů detekovaných ve vrtu PV-112 jsou uvedeny ve formě heat-mapy na obrázcích 30, 31 a 32. Po prudkém poklesu Ct hodnot sledovaném u všech testovaných primerů mezi 3. a 4. odběrem byl již pozorován stabilní průběh.



Obrázek 30 - Heat-mapa Ct hodnot prameru U16SRT ve vrtu PV-112; rozmezí Ct hodnot: 7,6-29,5



Obrázek 31 - Heat-mapa Ct hodnot prameru DHC-RT ve vrtu PV-112; rozmezí Ct hodnot: 23,6-35,7



Obrázek 32 - Heat-mapa Ct hodnot prameru *verA* ve vrtu PV-112; rozmezí Ct hodnot: 21,6-34,9

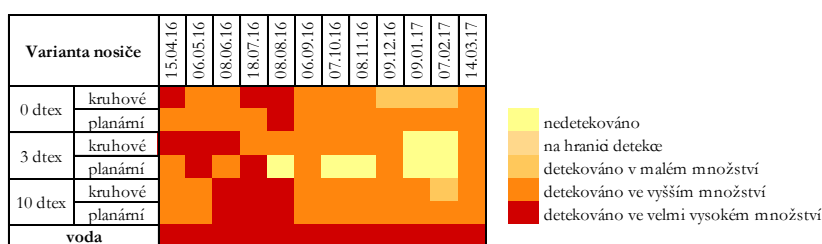
Po celkovém zhodnocení dat bylo rozhodnuto o provedení testu kontroly inhibice u vzorků z 2. a 3. odběru ve vrtu PV-112. Z výsledků vyplynulo, že prudký pokles Ct hodnot zjištěný ve vzorcích mezi 3. a 4. odběrem by mohl být způsoben přítomností inhibitorů izolace DNA při 2. a 3. odběru. Inhibice izolace DNA způsobila velmi nízkou koncentraci izolované DNA z nosičů, což způsobilo zvýšení Ct hodnot při 2. a 3. odběru a zároveň zvětšení rozdílu hodnot z 3. na 4. odběr. Takto strmý nárůst biomasy, tj. pokles Ct hodnot o 17 cyklů, není na reálné lokalitě během jednoho měsíce možný, ovšem pokles Ct hodnot o 9 cyklů během 3 měsíců je pravděpodobnější. Látky inhibující izolaci DNA proto s největší pravděpodobností ulpěly po 1. odběru na nosičích. K jejich pravděpodobnému uvolnění či úplnému vymytí došlo až po 3. odběru. Vrt PV-112, kde byly tyto změny detekovány, je totiž situován v aktivně sanované lokalitě. Bohužel není znám přesný harmonogram prováděných sanačních zásahů a jejich charakter (např. typy činidel, objemy, způsoby aplikace apod.), nelze jednoznačně identifikovat skutečný vliv těchto zásahů. Navíc vzhledem k tomu, že nejsou k dispozici detailní chemické rozborů

podzemní vody (nebyly předmětem této práce), které by potvrdily inhibiční vliv na izolaci DNA, nelze jednoznačně vysvětlit prudký pokles Ct hodnot.

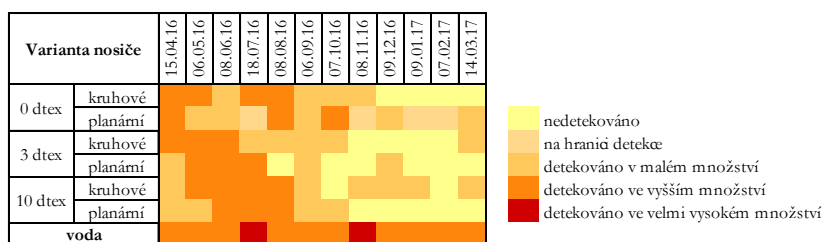
Pomocí kultivační metody na agarových plotnách byl stanoven počet životaschopných bakterií na $8,4 \cdot 10^4$ KTJ na 1 ml vody v aerobním prostředí a na $1,5 \cdot 10^2$ KTJ na 1 ml vody v anaerobním prostředí.

4.3.2 Vrt PV-130 (vyšší kontaminace chlorovanými etheny)

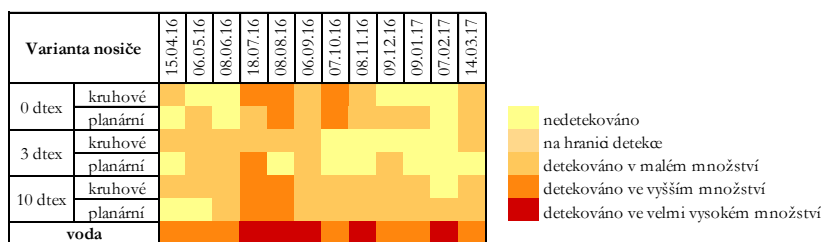
Časové vývoje Ct hodnot primeru U16SRT a specifických primerů detekovaných ve vrtu PV-130 jsou zobrazeny ve formě heat-map na obrázcích 33, 34 a 35. Nosiče v tomto vrtu již od 1. odběru vykazovaly větší celkové bakteriální oživení než předešlý vrt, PV-112. V průběhu monitoringu setrvaly Ct hodnoty U16SRT na vysoké úrovni a jejich průběh byl stabilní. Ct hodnoty specifických primerů DHC-RT a *verA* byly během celého monitoringu detekovány méně stabilně než ve vrtu PV-112.



Obrázek 33 - Heat-mapa Ct hodnot primeru U16SRT ve vrtu PV-130; rozmezí Ct hodnot: 7,6-29,5



Obrázek 34 - Heat-mapa Ct hodnot primeru DHC-RT ve vrtu PV-130; rozmezí Ct hodnot: 23,6-35,7



Obrázek 35 - Heat-mapa Ct hodnot primeru *verA* ve vrtu PV-130; rozmezí Ct hodnot: 21,6-34,9

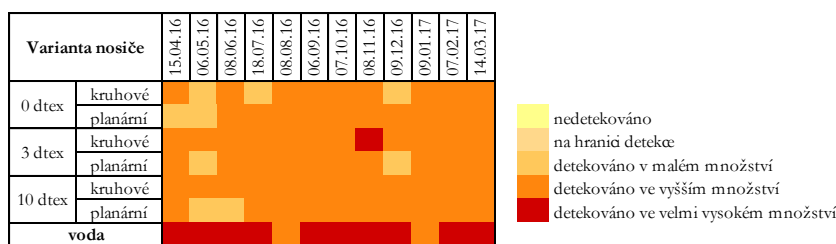
Na heat-mapách specifických prumerů jsou od 1. odběru patrné vysoké Ct hodnoty prumeru DHC-RT, kterým byl detekován bakteriální rod *Dehalococcoides mccartyi* rozkládající chlorované etheny na VC. Zatímco Ct hodnoty prumeru *vrA*, pomocí kterého je detekován gen vinylchlorid reduktázy odpovědné za přeměnu VC na ethen, byly nejvyšší po 3. odběru. Tento vývoj Ct hodnot specifických prumerů s největší pravděpodobností indikuje probíhající reduktivní dechloraci.

Kolísání Ct hodnot specifických prumerů mohlo být způsobeno nízkou koncentrací kontaminantů ve vrtu anebo špatnými okolními podmínkami pro specifické bakteriální kmeny. Tyto kmeny obecně vykazují zvýšenou citlivost na fyzikálně-chemické parametry a např. při hodnotách pH mimo rozmezí 6,5 až 8 dochází k jejich vymizení (Loffler et al., 2013).

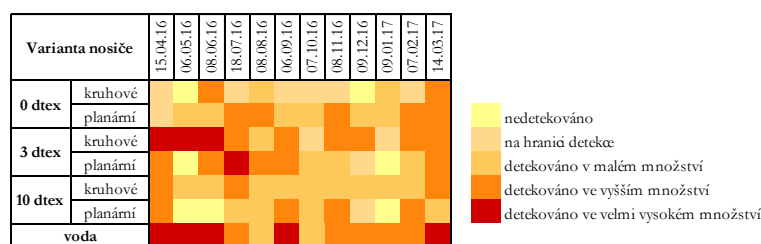
Pomocí kultivační metody na agarových plotnách byl stanoven počet životaschopných bakterií na $1,4 \cdot 10^4$ KTJ na 1 ml vody v aerobním prostředí a na $> 10^4$ KTJ na 1 ml vody v anaerobním prostředí.

4.3.3 Vrt RW6A-45 (BTEX)

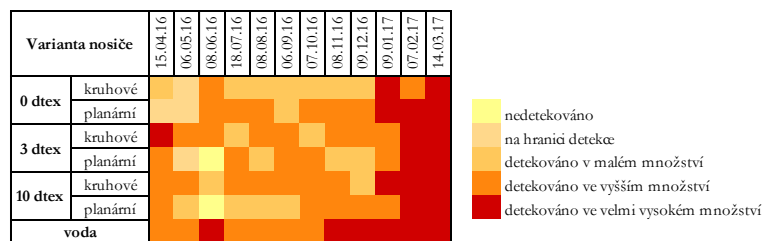
Časové vývoje Ct hodnot prumeru U16SRT a specifických prumerů detekovaných ve vrtu RW6A-45 jsou zobrazeny ve formě heat-mapy na obrázcích 36, 37 a 38. Po dobu celého monitoringu bylo na nosičích pozorováno velké celkové bakteriální oživení. U všech nosičů byl také zjištěn stabilní vývoj Ct hodnot prumeru U16SRT v průběhu monitoringu.



Obrázek 36 - Heat-mapa Ct hodnot prumeru U16SRT ve vrtu RW6A-45 ; rozmezí Ct hodnot: 7,6-29,5



Obrázek 37 - Heat-mapa Ct hodnot prumeru *bssA* ve vrtu RW6A-45; rozmezí Ct hodnot: 30,4-36,0



Obrázek 38 - Heat-mapa Ct hodnot prumeru DEF/G ve vrtu RW6A-45; rozmezí Ct hodnot: 26,5-35,6

Ct hodnoty specifických prumerů naznačovaly, že ve vrtu RW6A-45 převažovala aerobní biodegradace BTEX katalyzovaná katechol-2,3-dioxygenázou nad anaerobní biodegradací katalyzovanou *bsx4*. Bez fyzikálně-chemické a chemické analýzy však nelze jednoznačně vysvětlit nárůst Ct hodnot specifických prumerů při posledních odběrech.

Pomocí kultivační metody na agarových plotnách byl stanoven počet životaschopných bakterií na $7,6 \cdot 10^4$ KTJ na 1 ml vody v aerobním prostředí a na $5,9 \cdot 10^2$ KTJ na 1 ml vody v anaerobním prostředí.

4.4 Mikroskopická analýza

Kromě rozsáhlých molekulárně-genetických analýz nosičů biomasy byly vybrané nosiče obou tvarových variant z posledního (12.) odběru analyzovány také pomocí optického mikroskopu Olympus BX51M. Byl vybrán nosič kruhového uspořádání bez nánosu nanovláken z vrtu PV-112 a nosič planárního uspořádání s nánosem nanovláken 10 dtex z vrtu PV-130 (obrázek 39).



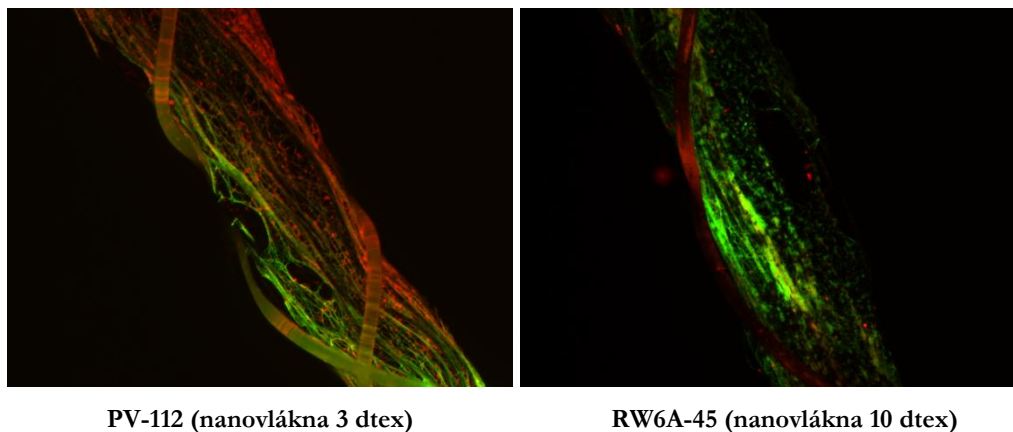
kruhové uspořádání (bez nanovláken)

planární uspořádání (nanovlákná 10 dtex)

Obrázek 39 - Snímky tvarových variant nosičů pomocí optického mikroskopu (zvětšení 50×)

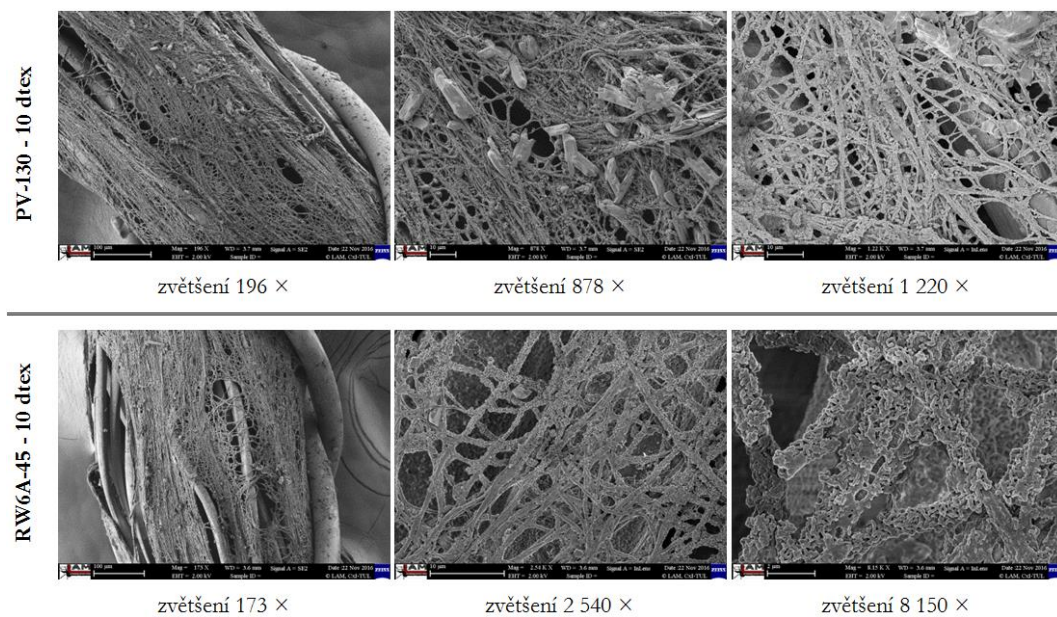
Pomocí fluorescenčního mikroskopu ZEISS Axio Imager M2 a kitu LIVE/DEAD[®] BacLight Bacterial Viability Kits byla po posledním (12.) odběru analyzována životaschopnost bakteriálních buněk přítomných na nosičích. Po aplikaci barviv (kitu) se buňky s neporušenou membránou, tedy živé, zbarví zeleně, zatímco buňky s porušenými

membránami (mrtvé) se zbarví červeně. Fotografie z fluorescenčního mikroskopu indikující životaschopnost buněk na nosičích z vrtu PV-112 a RW6A-45 jsou zobrazeny na obrázku 40. Jak je zřejmé z tohoto obrázku, na obou nosičích byly detekovány živé i mrtvé buňky, které se vyskytovaly ve formě biofilmu. Bohužel nanovlákná po přidání fluorescenčních barviv také fluoreskovala a proto docházelo k mírnému zkreslení analýzy.

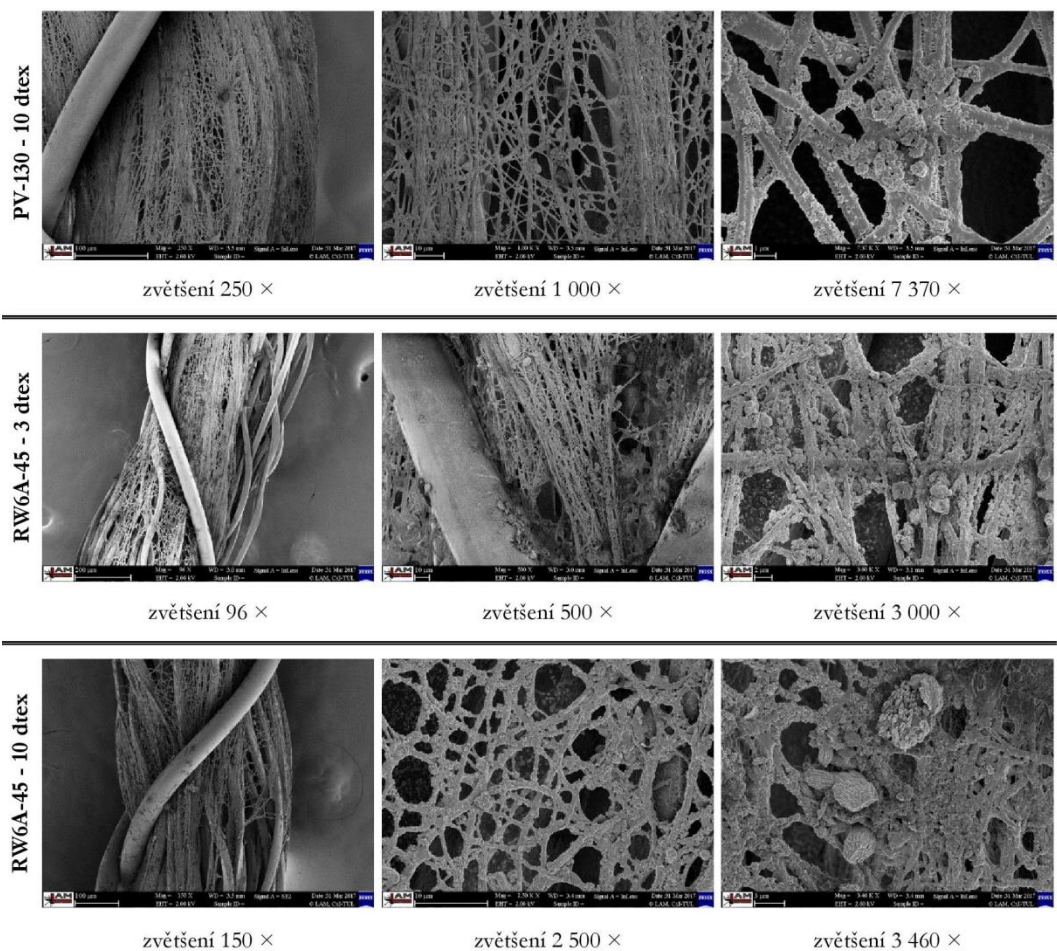


Obrázek 40 - Snímky z fluorescenčního mikroskopu nosných vláken s nánosem nanovláken 10 dtex z vrtu PV-112 a RW6A-45 - zvětšení 50×.

Pomocí mikroskopických technik byla také hodnocena dlouhodobá stabilita nanovláknenného nánosu. Za tímto účelem byly snímkovány nosné nitě s nánosem nanovláken 10 dtex, které byly odebrány z vrtů PV-130 a RW6A-45 po 8. odběru. Po 12. odběru byly snímkovány nosiče s nánosem nanovláken 3 a 10 dtex z vrtu RW6A-45 a 10 dtex z vrtu PV-130. Povrchová morfologie byla pozorována pomocí SEM značky Carl Zeiss ULTRA Plus. Na obrázku 41 jsou uvedeny snímky vláken s nánosem nanovláken 10 dtex odebraných po 8 měsících ve vrtech s rozdílnou kontaminací. Nános nanovláken byl přítomen na obou nosných nitích a nevykazoval významné změny ve své struktuře.



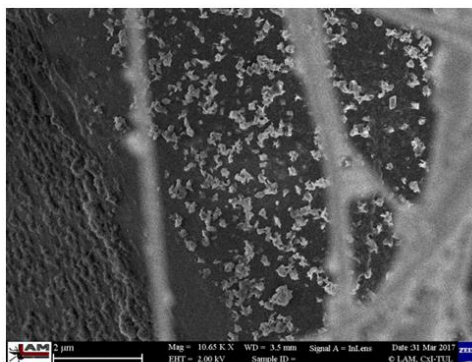
Obrázek 41 - Nosná vlákna s nánosem nanovláken 10 dtex z vrtů PV-130 a RW6A-45 po 8. odběru. Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss ULTRA Plus.



Obrázek 42 - Nosná vlákna s nánosy nanovláken 3 a 10 dtex z vrtů PV-130 a RW6A-45 po 12. odběru. Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss ULTRA Plus.

Po 12 měsících na reálné lokalitě bylo na některých nosných nitích s nanovláknou pozorováno pouze mírné poškození nanovláknenného nánosu (obrázek 42). Na snímku nosné nitě s nánosem nanovláken 3 dtex odebrané z vrtu RW6A-45 je při nejmenším zvětšení zřejmé, že nanovláknenný nános byl přítomen především v blízkosti křížového ovinu. Nosná nit' s nánosem nanovláken 10 dtex odebraná z vrtu PV-130 však nejevila žádné poškození nanovláken. Stabilita nánosu nanovláken na nosné niti po dlouhodobém vystavení reálným podmínkám na lokalitě byla tedy potvrzena.

Snímky buněk zachycených na nanovláknách (obrázek 41 a 42) potvrzují předpoklad, že velký specifický povrch nanovláken a jejich vzájemné propojení poskytuje velké množství míst, kde dochází k účinné adhezaci a fixaci mikroorganismů, což následně vede k tvorbě kompaktního biofilmu. I když k fixaci buněk mikroorganismů docházelo taky na nosné niti nosiče, nebyl pozorován kompaktní biofilm (obrázek 43 vs. obrázek 41 a 42).



zvětšení 10 650 ×

Obrázek 43 - Detail biofilmu na nosné niti u nosného vlákna s nánosem nanovláken 10 dtex z vrtů PV-130 po 12. odběru. Snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss ULTRA Plus.

Výhody nanovláken a nosičů biomasy vyrobených z nanovláknenných materiálů byly na základě dlouhodobého monitoringu provedeného v rámci této diplomové práce prokázány a jejich aplikace může poskytovat velmi cenné informace o probíhajících dějích v podmínkách reálných lokalit.

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo otestovat různé varianty nanovlákněných nosičů pro vzorkování biomasy na kontaminované lokalitě během dlouhodobého monitoringu. Byly připraveny dvě tvarové varianty, kruhové a planární uspořádání, s různými nánosy nanovláken (3 a 10 dtex). Jako reference byly vyrobeny nosiče bez nánosu nanovláken. Nosiče byly zanořeny do tří vrtů s rozdílnou kontaminací a dlouhodobě monitorovány. Vrty PV-112 a PV-130 byly kontaminovány chlorovanými etheny a vrt RW6A-45 BTEX.

Mezi jednotlivými tvarovými variantami nosičů nebyly pozorovány významné rozdíly, tudíž nebyl jednoznačně prokázán vliv tvaru nosiče na kolonizaci bakteriální populací. Kruhové uspořádání nosiče bylo však v porovnání s planárním uspořádáním lepší z hlediska předúpravy nutné pro extrakci DNA. Rovněž bylo prokázáno, že nosiče s nánosy nanovláken vykazovaly rychlejší oživení povrchu bakteriemi než nosiče vyrobené pouze z nosné nitě. Nejlepší výsledky qPCR analýz, nízké Ct hodnoty, a také stabilní biofilm, byly zjištěny u nosičů s nánosem nanovláken 3 dtex. Hodnocení celkového bakteriálního osídlení nosičů vykazovalo relativně rychlý nárůst a jeho dlouhodobě setrvalý stav, což potvrzuje vhodnost použitých (nano)materiálů. Navíc byla potvrzena dlouhodobá stabilita nanovlákněného nánosu na nosné niti nosiče.

V průběhu dlouhodobého monitoringu nebyly ve vrtech PV-130 a RW6A-45 na nosičích biomasy pozorovány významné změny celkového bakteriálního oživení. Ve vrtu PV-112 byl mezi 3. a 4. odběrem pozorován prudký pokles Ct hodnot primeru U16SRT. Poté však již nebyly významnější změny zaznamenány. Přítomnost bakteriálního rodu *Dehalococcoides mccartyi* a funkčního genu *vrA* byla detekována v rozdílném množství ve vrtech kontaminovaných chlorovanými etheny (PV-112 a PV-130). Ve vrtu PV 112 pokleslo množství specifických primerů od 4. odběru a následně zůstal o stabilní až do konce monitoringu. Ve vrtu PV-130 indikoval vývoj těchto primerů v první polovině monitoringu probíhající reduktivní dechloraci. Z Ct hodnot specifických primerů *bssA* a DEF/G vyplynulo, že ve vrtu RW6A-45 převažovala aerobní biodegradace BTEX nad anaerobní biodegradací.

Kromě konkrétních výsledků tato diplomová práce také prokázala nutnost kombinace výsledků molekulárně-genetických analýz s výsledky fyzikálně-chemických a chemických analýz. Pouze molekulárně-genetické či chemické analýzy nemohou poskytnout kompletní obraz o dějích probíhajících na dané lokalitě.

Literatura

AHERN, Kevin, Indira RAJAGOPAL a Taralyn TAN, 2016. *Biochemistry Free For All* [online]. Corvallis (Oregon): Oregon State Universit. Dostupné z: <http://biochem.science.oregonstate.edu/files/biochem/ahern/Biochemistry%20Free%20for%20All%20Final.compressed.pdf>.

ALBERTS, Bruce, 2015. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group. ISBN 978-0-8153-4432-2.

AMANN, Rudolf I, Wolfgang LUDWIG a Karl-Heinz SCHLEIFER, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*. **59**(1), 143–169. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239358/pdf/590143.pdf>.

AMBROŽOVÁ, Jana, 2004. *Mikrobiologie v technologii vod* [online]. 1. vyd. Praha: VŠCHT. ISBN 80-708-0534-X. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-534-X/pages-img/.

ANDERSSON, Sofia, Mirja NILSSON, Gunnel DALHAMMAR a Gunaratna KUTTUVU RAJARAO, 2008. Assessment of carrier materials for biofilm formation and denitrification. *Vatten*. **64**, 201–207. Dostupné z: http://www.tidskriftenvatten.se/wp-content/uploads/2017/04/48_article_3539.pdf.

ANON., 2008. Pufry, pufráční kapacita, oxidoredukce, elektrodové děje. *WikiSkripta* [online]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Pufry,_pufráční_kapacita,_oxidoredukce,_elektrodové_děje&oldid=283862.

BAKKEN, Lars R. a Åsa FROSTEGÅRD, 2006. Nucleic Acid Extraction from Soil. In: Paolo NANNIPIERI a Kornelia SMALLA, ed. *Nucleic Acids and Proteins in Soil* [online]. B.m.: Springer Berlin Heidelberg, s. 49–73 [vid. 2017-03-04]. ISBN 978-3-540-29448-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/3-540-29449-X_3.

BEDNÁŘ, Marek, Věra FRANKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA, 1996. *Lékařská mikrobiologie -- Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.

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]. 15. 9., **74**(18), 5695–5703 [vid. 2017-02-25]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: [doi:10.1128/AEM.00926-08](https://doi.org/10.1128/AEM.00926-08).

BORA, Tanujjal a Joydeep DUTTA, 2014. Applications of Nanotechnology in Wastewater Treatment—A Review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 1. 1., **14**(1), 613–626 [vid. 2017-03-19]. ISSN 1533-4880, 1533-4899. Dostupné z: [doi:10.1166/jnn.2014.8898](https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8898).

CLIFFORD, Robert J., Michael MILILLO, Jackson PRESTWOOD, Reyes QUINTERO, Daniel V. ZURAWSKI, Yoon I. KWAK, Paige E. WATERMAN, Emil P. LESHU a Patrick MC GANN, 2012. Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification

of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR. *PLoS ONE* [online]. 6. 11., 7(11), e48558 [vid. 2017-02-25]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0048558.

CORTÉS, Maria Esperanza, Jessika Consuegra BONILLA a Ruben Dario SINISTERRA, 2011. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. In: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* [online]. Badajoz: Formatex Research Center, s. 10. ISBN 978-84-939843-2-8. Dostupné z: <http://www.formatex.info/microbiology3/book/896-905.pdf>.

DAVEY, M. E. a G. A. O'TOOLE, 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 12., 64(4), 847–867. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000.

DOLINA, Jan, Iva DOLINOVÁ, Roman ŠPÁNEK a Lukáš DVOŘÁK, 2016. Development of nanofiber biomass carrier for effective sampling: differences in microbial community on carries and groundwater. In: *3rd Thünen Symposium on Soil Metagenomics* [online]. Dostupné z: http://www.soil-metagenomics.org/index.php?eID=tx_nawsecuredl&u=0&g=0&t=901491892983&hash=1ddec6a1ff47b35c876f87d7113b5c8bebe1c691&file=fileadmin/congress/media/sm/druckelemente/Soil_Metagenomics_2016_Program.pdf.

DOLINOVÁ, Iva, Martina ŠTROJSOVÁ, Miroslav ČERNÍK, Jan NĚMEČEK, Jiřina MACHÁČKOVÁ a Alena ŠEVČŮ, 2017. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 5. 4. [vid. 2017-04-17]. ISSN 0944-1344, 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-017-8867-y.

DONLAN, Rodney M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 9., 8(9), 881–890 [vid. 2015-02-10]. ISSN 1080-6040, 1080-6059. Dostupné z: doi:10.3201/eid0809.020063.

DOUTERELO, Isabel, Joby B. BOXALL, Peter DEINES, Raju SEKAR, Katherine E. FISH a Catherine A. BIGGS, 2014. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Research* [online]. 11., 65, 134–156 [vid. 2017-03-07]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2014.07.008.

DZIOŃEK, Anna, Danuta WOJCIESZYŃSKA a Urszula GUZIK, 2016. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 9., 23, 28–36 [vid. 2016-12-31]. ISSN 0717-3458. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejbt.2016.07.003.

EUGRIS, 2006. EUGRIS library. *EUGRIS: portal for soil and water management in Europe* [online] [vid. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://www.eugris.info/library.asp>.

FORMAN, S. a X. JIA, 2014. Nucleic Acid Purification [online]. Irvine, US 20140051844 A1. Únor 2014. Dostupné z: <https://www.google.com/patents/US20140051844>.

FRAGA, Dean, Tea MEULIA a Steven FENSTER, 2014. Real-Time PCR. In: Sean R. GALLAGHER a Emily A. WILEY, ed. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., s. 10.3.1–10.3.40 [vid. 2017-03-17]. ISBN 978-0-470-08994-1. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470089941.et1003s08>.

FUNG, B.K.K. a S. JAHID, 2001. Spin filter assembly for isolation and analysis [online]. Irvine, Kalifornie, US6221655 B1. Duben 2001. Dostupné z: <https://www.google.com/patents/US6221655>.

GARRETT, Trevor Roger, Manmohan BHAKOO a Zhibing ZHANG, 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* [online]. 9., **18**(9), 1049–1056 [vid. 2017-03-06]. ISSN 1002-0071. Dostupné z: doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001.

HAKHVERDYAN, Mikhayil, 2008. *Basics of the Polymerase Chain Reaction* [online]. 2008. B.m.: Swedish National Veterinary Institute. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/266879516_Basics_of_the_Polymerase_Chain_Reaction.

HALL-STOODLEY, Luanne, J. William COSTERTON a Paul STOODLEY, 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2., **2**(2), 95–108 [vid. 2017-03-14]. ISSN 1740-1526, 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro821.

HARTL, Daniel L. a Elizabeth W. JONES, 1998. *Genetics: principles and analysis*. 4th ed. Sudbury, Mass: Jones and Bartlett Publishers. ISBN 0-7637-0489-X.

HORTON, J.K., M.R. LOOKER, S.L.J. STUBBS a P.J. TATNELL, 2014. *Polymerase chain reaction method for amplifying nucleic acid* [online]. B.m.: Google Patents. Dostupné z: <https://www.google.com/patents/WO2014023790A1?cl=en>.

HOUGHTON, Scott G. a Franklin R. COCKERILL, 2006. Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery* [online]. 1., **139**(1), 1–5 [vid. 2017-03-05]. ISSN 0039-6060. Dostupné z: doi:10.1016/j.surg.2005.02.010.

CHLÁDEK, L., P. VOJTA, M. NEMEC, D. HORAKOVA, B. PILLER, J. JELINEK, B. SKOPALEK, K. KOSAR a T. SRUMA, 2000. Carrier of biomass, method of fermentation therewith and devices therefor [online]. WO2000049140 A2. Srpen 2000. Dostupné z: <https://www.google.com/patents/CA2372438A1?cl=enGo>.

CHORAWALA, Karishma K. a Mehali J. MEHTA, 2015. Applications of Nanotechnology in Wastewater Treatment. *International Journal of Innovative and Emerging Research in Engineering* [online]. **2**(1). ISSN 2394-3343. Dostupné z: <http://ijiere.com/FinalPaper/FinalPaper20152372433628.pdf>.

JANDOVÁ, Božena a Ludmila KOTOUČKOVÁ, 1996. *Praktikum z mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-1374-5.

JEFFERSON, K, 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* [online]. 15. 7., **236**(2), 163–173 [vid. 2017-02-23]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsle.2004.06.005.

JURECSKA, Laura, Katalin BARKÁCS, Éva KISS, Gergő GYULAI, Tamás FELFÖLDI, Balázs TÖRŐ, Róbert KOVÁCS a Gyula ZÁRAY, 2013. Intensification of wastewater treatment with polymer fiber-based biofilm carriers. *Microchemical Journal* [online]. 3., **107**, 108–114 [vid. 2017-03-17]. ISSN 0026-265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2012.05.028.

KELLER, Laurent a Michael G. SURETTE, 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 4., **4**(4), 249–258 [vid. 2017-03-17]. ISSN 1740-1526, 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro1383.

KIM, In Hwa, Jin-Ha CHOI, Jeong Ock JOO, Young-Kee KIM, Jeong-Woo CHOI a Byung-Keun OH, 2015. Development of a Microbe-Zeolite Carrier for the Effective Elimination of Heavy Metals from Seawater. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 28. 9., **25**(9), 1542–1546 [vid. 2017-03-17]. ISSN 1017-7825, 1738-8872. Dostupné z: doi:10.4014/jmb.1504.04067.

LAWRENCE, Stephen J, 2006. *Description, Properties, and Degradation of Selected Volatile Organic Compounds Detected in Ground Water—A Review of Selected Literature*. Atlanta, Georgia, U. S. Geological Survey, Open-File Report 2006-1338, 62 p. Dostupné z: <http://pubs.usgs.gov/ofr/2006/1338/>.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION, 2012. *Real-time PCR Handbook* [online]. 2012. B.m.: Life Technologies Corporation, USA. Dostupné z: [http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf](http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf).

LOFFLER, F. E., J. YAN, K. M. RITALAHTI, L. ADRIAN, E. A. EDWARDS, K. T. KONSTANTINIDIS, J. A. MULLER, H. FULLERTON, S. H. ZINDER a A. M. SPORMANN, 2013. Dehalococcoides mccartyi gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, Dehalococcoidia classis nov., order Dehalococcoidales ord. nov. and family Dehalococcoidaceae fam. nov., within the phylum Chloroflexi. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 1. 2., **63**(Pt 2), 625–635 [vid. 2017-05-05]. ISSN 1466-5026, 1466-5034. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.034926-0.

MARTINKOVA, L, B UHNAKOVA, M PATEK, J NESVERA a V KREN, 2009. Biodegradation potential of the genus Rhodococcus. *Environment International* [online]. 1., **35**(1), 162–177 [vid. 2017-03-17]. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2008.07.018.

MESARCH, M. B., C. H. NAKATSU a L. NIES, 2000. Development of Catechol 2,3-Dioxygenase-Specific Primers for Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1. 2., **66**(2), 678–683 [vid. 2017-02-25]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.66.2.678-683.2000.

NADELL, Carey D., Joao B. XAVIER a Kevin R. FOSTER, 2009. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 1., **33**(1), 206–224 [vid. 2017-03-17]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x.

NIU, Haitao, Xungai WANG a Tong LI, 2011. Needleless Electrospinning: Developments and Performances. In: Tong LIN, ed. *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications* [online]. B.m.: InTech [vid. 2016-12-20]. ISBN 978-953-307-420-7. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/nanofibers-production-properties-and-functional-applications/needleless-electrospinning-developments-and-performances>.

OLIVEIRA, A a Mlrs CUNHA, 2008. Bacterial biofilms with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical*

Diseases [online]. **14**(4), 572–596 [vid. 2017-03-17]. ISSN 1678-9199. Dostupné z: doi:10.1590/S1678-91992008000400003.

O'TOOLE, George A. a Roberto KOLTER, 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology* [online]. 4., **28**(3), 449–461 [vid. 2017-03-22]. ISSN 0950-382X, 1365-2958. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.

PABINGER, Stephan, Stefan RÖDIGER, Albert KRIEGNER, Klemens VIERLINGER a Andreas WEINHÄUSEL, 2014. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification* [online]. 9., **1**(1), 23–33 [vid. 2017-03-22]. ISSN 2214-7535. Dostupné z: doi:10.1016/j.bdq.2014.08.002.

PERCIVAL, Steven L., Sladjana MALIC, Helena CRUZ a David W. WILLIAMS, 2011. Introduction to Biofilms. In: Steven PERCIVAL, Derek KNOTTENBELT a Christine COCHRANE, ed. *Biofilms and Veterinary Medicine* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 41–68 [vid. 2016-10-09]. ISBN 978-3-642-21288-8, 978-3-642-21289-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-21289-5_2.

PEREIRA, M A, M M ALVES, J AZEREDO, M MOTA a R OLIVEIRA, 2000. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 1. 3., **24**(3), 181–186 [vid. 2017-03-18]. ISSN 1367-5435, 1476-5535. Dostupné z: doi:10.1038/sj.jim.2900799.

PRŮŠA, Richard, 1997. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta : Lambda Bio-Med. ISBN 80-238-0940-7.

RANJARD, Lionel, Franck POLY a Sylvie NAZARET, 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* [online]. 4., **151**(3), 167–177 [vid. 2017-03-14]. ISSN 0923-2508. Dostupné z: doi:10.1016/S0923-2508(00)00136-4.

ROBE, Patrick, Renaud NALIN, Carmela CAPELLANO, Timothy M. VOGEL a Pascal SIMONET, 2003. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology* [online]. 10., **39**(4), 183–190 [vid. 2017-02-27]. ISSN 1164-5563. Dostupné z: doi:10.1016/S1164-5563(03)00033-5.

ROOSE-AMSALEG, C.L, E GARNIER-SILLAM a M HARRY, 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* [online]. 9., **18**(1), 47–60 [vid. 2017-03-04]. ISSN 0929-1393. Dostupné z: doi:10.1016/S0929-1393(01)00149-4.

SHARMA, Vikas a Akhilesh SHARMA, 2013. Nanotechnology: an emerging future trend in wastewater treatment with its innovative products and processes. *Nanotechnology* [online]. **1**(2). ISSN 2319-7463. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.379.2606&rep=rep1&type=pdf>.

SHOKRALLA, Shadi, Jennifer L. SPALL, Joel F. GIBSON a Mehrdad HAJIBABAEI, 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research: NEXT-GENERATION SEQUENCING FOR ENVIRONMENTAL DNA.

Molecular Ecology [online]. 4., **21**(8), 1794–1805 [vid. 2017-04-08]. ISSN 0962-1083. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x.

SCHREIBEROVÁ, Olga, Petra HEDBÁVNÁ, Alena ČEJKOVÁ, Vladimír JIRKŮ a Jan MASÁK, 2012. Effect of surfactants on the biofilm of *Rhodococcus erythropolis*, a potent degrader of aromatic pollutants. *New Biotechnology* [online]. 11., **30**(1), 62–68 [vid. 2017-03-08]. ISSN 1871-6784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2012.04.005.

SINGH, Rajbir, Debarati PAUL a Rakesh K. JAIN, 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* [online]. 9., **14**(9), 389–397 [vid. 2016-10-23]. ISSN 0966-842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2006.07.001.

STICKLER, David, 1999. Biofilms. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 6., **2**(3), 270–275 [vid. 2017-03-05]. ISSN 1369-5274. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-5274(99)80047-2.

ŠKLUBALOVÁ, Zdeňka, 2012. Odhad osmolarity infuzních roztoků pomocí metod USP. *Praktické lékařství*. **8**(4), 175–176.

THE INTERSTATE TECHNOLOGY & REGULATORY COUNCIL, 2008. *In Situ Bioremediation of Chlorinated Ethene: DNAPL Source Zones* [online]. 2008. BioDNAPL-3. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Bioremediation of DNAPLs Team. Dostupné z: <http://www.itrcweb.org/Guidance/GetDocument?documentID=12>.

THE INTERSTATE TECHNOLOGY & REGULATORY COUNCIL, 2011. Environmental Molecular Diagnostics Fact Sheets [online]. EMD-1. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Environmental Molecular Diagnostics Team. Dostupné z: <http://www.itrcweb.org/GuidanceDocuments/EMD1.pdf>.

TIAN, Huijun, Andreas F.R. HÜHMER a James P. LANDERS, 2000. Evaluation of Silica Resins for Direct and Efficient Extraction of DNA from Complex Biological Matrices in a Miniaturized Format. *Analytical Biochemistry* [online]. 8., **283**(2), 175–191 [vid. 2017-03-04]. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.2000.4577.

TORTORA, Gerard J., Berdell R. FUNKE a Christine L. CASE, 2013. *Microbiology: an introduction*. 11th ed. Boston: Pearson. ISBN 978-0-321-73360-3.

TSAI, Yu-Li a Betty H OLSON, 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and environmental microbiology*. **57**(4), 1070–1074. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182847/pdf/aem00057-0188.pdf>.

TSAI, Yu-Li a Betty H OLSON, 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(2), 754–757. Dostupné z: <http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC195321/pdf/aem00043-0330.pdf>.

VON NETZER, F., G. PILLONI, S. KLEINDIENST, M. KRUGER, K. KNITTEL, F. GRUNDGER a T. LUEDERS, 2013. Enhanced Gene Detection Assays for Fumarate-Adding Enzymes Allow Uncovering of Anaerobic Hydrocarbon Degraders in Terrestrial and Marine Systems. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 15. 1., **79**(2), 543–552 [vid. 2017-02-25]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02362-12.

WARREN, Joseph, 2013. A Review of PCR Inhibition and It's Implications for Human Identity Testing. In: [online]. Austin. Texas. [vid. 2017-03-16]. Dostupné z: <http://afdaa.org/2013/wp-content/uploads/2013/01/A-Review-of-PCR-Inhibition-JWarren.pdf>.

WISCONSIN DEPARTMENT OF NATURAL RESOURCES, 2014. RR-699, *Understanding Chlorinated Hydrocarbon Behavior in Groundwater Guidance on the Investigation, Assessment and Limitations of Monitored Natural Attenuation* [online]. Dostupné z: <http://dnr.wi.gov/files/PDF/pubs/rr/RR699.pdf>.

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]. 1. 8., **71**(8), 4325–4334 [vid. 2017-02-25]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.8.4325-4334.2005.

ZUMBO, Paul, 2012. *Phenol-chloroform extraction* [online]. 2012. B.m.: Department of Physiology and Biophysics, Weill Cornell Medical College. [vid. 2017-03-04]. Dostupné z: <http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/PHENOL-CHLOROFORM.pdf>.

Příloha A - Charakteristika kontaminantů

Všechny kontaminanty vyskytující se na lokalitě spadají do kategorie tzv. těkavých organických látek. Ty jsou definovány jako uhlovodíkové sloučeniny s tenzí par vyšší než 2 mmHg (0,267 kPa) při 25 °C (Lawrence, 2006). Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti hlavních kontaminantů vyskytujících se na lokalitě jsou uvedeny v tabulce níže.

Tabulka - Fyzikálně-chemické vlastnosti kontaminantů (Lawrence, 2006; EUGRIS, 2006)

Kontaminant	Hustota (při 20 °C) [g·cm ⁻³]	Rozpustnost ve vodě (při 25 °C) [mg·l ⁻¹]	Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda log(K _{ow})	Tenze par (při 25 °C) [kPa]	Henryho konstanta [kPa·m ³ ·mol ⁻¹]
benzen	0,876	1 780	2,13	10,133	0,557
toluen	0,867	531	2,73	2,933	0,660
ethylbenzen	0,867	161	3,15	0,933	0,843
<i>m</i> -xylen	0,864	161	3,20	0,800	0,730
<i>p</i> -xylen	0,861	181	3,15	0,867	0,690
<i>o</i> -xylen	0,880	207	3,12	0,667	0,551
PCE	1,623	210	2,88	2,533	1,730
TCE	1,464	1 280	2,53	9,866	1,030
DCE	1,213	2 420	2,13	66,661	2,620
VC	0,910	2 700	1,38	354,638	2,680

Příloha B - Koncentrace DNA ve vzorcích

Tabulka - Koncentrace DNA ve vzorcích v průběhu monitoringu

Vrt	Varianta nosiče	DATE OF SAMPLING													
		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17		
		1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr		
		Koncentrace DNA [ng · μl ⁻¹]													
PV-112	0 dtex	kruhové	0,0292	too low	too low	4,88	5,82	2,00	1,3	2,31	1,92	2,62	1,7	1,5	
		planární	0,0182	too low	too low	3,86	1,94	2,68	-	-	0,194	-	-	0,242	
	3 dtex	kruhové	0,0493	too low	too low	6,38	7,48	2,94	2,58	4,08	1,49	1,09	2,46	2,4	
		planární	0,0447	too low	too low	3,98	4,5	2,24	1,89	1,96	1,98	0,311	1,6	2,5	
	10 dtex	kruhové	0,517	too low	too low	5,22	6,82	2,92	3,46	-	-	-	-	-	
		planární	0,0567	too low	too low	1,14	3,9	3,22	-	-	-	-	-	-	
	voda		32	18,2	42,5	17,3	40,7	44,4	72,2	28	32,8	68,9	9,89	20,6	
	PV-130	0 dtex	kruhové	1,23	0,476	0,0176	3,34	2,18	0,31	0,398	0,068	too low	too low	too low	0,031
			planární	0,155	0,164	0,032	0,107	2,26	0,187	1,07	0,138	0,0268	0,156	0,018	0,0782
		3 dtex	kruhové	5,67	0,984	1,02	0,94	0,8	0,062	0,034	0,146	0,0238	-	-	0,166
planární			0,25	0,956	0,744	2,52	-	0,213	-	-	0,195	-	-	0,0276	
10 dtex		kruhové	0,393	0,688	1,06	2,74	2,61	0,712	0,0256	0,606	0,0944	0,175	0,0146	0,0998	
		planární	0,0618	0,394	1,11	0,94	1,36	0,464	0,233	0,025	0,0392	0,0524	0,0458	0,077	
voda		270	121	54,6	16,8	36,2	156	44	76,8	20,5	24,6	44,5	20,4		
RW6A-45		0 dtex	kruhové	0,0382	too low	0,22	0,0114	0,192	0,0598	0,0306	0,165	0,0156	0,496	0,073	0,83
			planární	0,014	0,0122	0,114	0,214	0,422	0,0794	0,626	1,11	0,258	0,322	1,6	1,61
		3 dtex	kruhové	0,918	0,472	0,85	0,0996	0,264	0,488	0,076	2,5	0,986	0,222	0,656	0,752
	planární		0,207	too low	0,125	0,59	0,358	0,704	0,788	0,143	0,0184	0,0398	0,522	0,916	
	10 dtex	kruhové	0,465	0,0928	0,0488	0,64	0,424	0,32	0,594	0,84	0,152	0,274	0,362	0,64	
		planární	0,44	too low	0,0108	0,344	0,312	0,638	0,35	1,61	0,127	0,0952	0,618	0,42	
	voda		82,2	49,4	44,4	17,8	37,9	75,8	75,1	104	64,9	24,0	54,7	94,4	

Příloha C - Souhrn dat z qPCR

C.1. Primer U16SRT

Tabulka C.1.1 - Průměrné Ct hodnoty primeru U16SRT normalizované na množství vzorku

PRIMER: U16SRT		Datum vzorkování												
GEN: 16S rDNA		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17	
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr	
PV-112	0 dtex	kruhové uspořádání	21,37	27,98	27,93	11,28	11,66	12,43	13,92	12,81	13,08	12,46	13,14	13,20
		planární uspořádání	22,89	23,52	24,91	11,80	12,84	12,13			16,21			15,62
	3 dtex	kruhové uspořádání	20,29	29,05	29,48	11,33	11,13	12,13	12,35	11,98	13,47	14,43	12,83	12,67
		planární uspořádání	20,79	28,29	29,27	12,12	12,24	12,09	12,58	12,63	12,83	15,19	13,03	13,90
	10 dtex	kruhové uspořádání	20,18	23,05	28,30	11,21	11,51	12,24	11,92					
		planární uspořádání	20,12	24,96	29,01	13,14	11,79	12,11						
		voda	11,85	11,57	9,21	14,07	9,99	11,02	9,85	11,19	10,92	10,40	12,10	11,81
PV-130	0 dtex	kruhové uspořádání	13,61	15,04	21,52	13,32	14,27	16,93	16,02	19,97	24,00	23,78	22,43	21,25
		planární uspořádání	17,09	17,40	20,58	18,86	14,17	17,58	15,16	18,91	20,53	19,27	21,12	18,88
	3 dtex	kruhové uspořádání	11,60	14,22	14,12	15,34	15,56	18,65	19,00	18,18	19,90			17,09
		planární uspořádání	16,27	13,91	14,93	12,81		16,69			16,87			19,26
	10 dtex	kruhové uspořádání	15,85	15,00	14,48	13,52	14,15	15,49	19,87	15,77	18,51	18,46	22,24	18,96
		planární uspořádání	19,02	16,26	14,77	14,57	14,77	15,84	16,65	20,90	18,93	20,32	20,17	18,65
		voda	7,60	8,30	8,58	9,38	9,17	8,58	10,21	9,67	11,06	10,78	9,91	11,27
RW6A-45	0 dtex	kruhové uspořádání	21,00	25,86	17,39	22,32	19,05	20,32	21,26	19,46	22,23	18,32	20,33	16,39
		planární uspořádání	23,43	22,43	18,48	18,73	17,96	20,06	17,02	16,57	18,37	18,79	15,91	16,06
	3 dtex	kruhové uspořádání	15,39	16,09	15,75	19,01	18,29	16,81	19,36	14,48	15,48	19,29	16,77	16,41
		planární uspořádání	17,90	24,60	18,59	16,60	17,86	16,40	16,71	19,07	22,21	21,82	17,59	16,72
	10 dtex	kruhové uspořádání	16,84	18,84	19,39	17,06	18,20	17,89	17,20	17,09	19,61	19,11	17,91	17,01
		planární uspořádání	16,57	25,27	22,47	17,90	18,62	16,96	17,48	15,42	19,20	20,87	16,85	17,99
		voda	14,02	14,79	13,67	8,18	15,83	14,56	13,91	13,64	14,51	15,20	14,16	13,30

Tabulka C.1.2 - Relativní kvantifikace u primeru U16SRT

PRIMER: U16SRT		Datum vzorkování												
GEN: 16S rDNA		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17	
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr	
PV-112	0 dtex	kruhové uspořádání	1	0,0101	0,0104	1112,07	856,0698	499,6241	177,9894	382,7534	318,7766	489,8412	305,3450	293,4385
		planární uspořádání	1	0,6480	0,2457	2242,06	1085,22	1785,69			103,9883			157,5513
	3 dtex	kruhové uspořádání	1	0,0023	0,0017	508,7458	585,2653	292,7587	250,0344	324,6743	115,2516	58,9971	179,5660	200,8187
		planární uspořádání	1	0,0054	0,0027	415,5983	381,5105	422,7901	301,2480	291,6071	253,6664	49,2640	220,9959	225,1310
	10 dtex	kruhové uspořádání	1	0,1360	0,0035	513,3663	416,2531	249,5215	312,5700					
		planární uspořádání	1	0,0347	0,0021	128,3262	327,3495	263,0037						
		voda	1	1,2078	6,2607	0,2129	3,6450	1,7746	4,0033	1,5767	1,9018	2,7310	0,8356	1,0255
PV-130	0 dtex	kruhové uspořádání	1	0,3694	0,0041	1,2228	0,6321	0,0994	0,1874	0,0120	0,0007	0,0008	0,0022	0,0049
		planární uspořádání	1	0,8066	0,0886	0,2926	7,5953	0,7136	3,8323	0,2825	0,0914	0,2190	0,0605	0,2872
	3 dtex	kruhové uspořádání	1	0,1613	0,1739	0,0741	0,0639	0,0074	0,0058	0,0103	0,0031			0,0220
		planární uspořádání	1	5,1454	2,5334	11,0374		0,7473			0,6594			0,1250
	10 dtex	kruhové uspořádání	1	1,8069	2,5850	5,0589	3,2607	1,2792	0,0608	1,0556	0,1575	0,1627	0,0117	0,1145
		planární uspořádání	1	6,8083	19,2496	22,1514	19,2093	9,1673	5,2017	0,2712	1,0660	0,4057	0,4506	1,2969
		voda	1	0,6131	0,5055	0,2900	0,3363	0,5058	0,1634	0,2370	0,0904	0,1099	0,2005	0,0777
RW6A-45	0 dtex	kruhové uspořádání	1	0,0341	12,3097	0,4011	3,8970	1,6048	0,8399	2,9360	0,4261	6,4887	1,5976	24,8370
		planární uspořádání	1	2,0040	31,2682	26,2397	44,8618	10,4364	86,4803	117,8248	33,6100	25,1579	187,0410	168,5873
	3 dtex	kruhové uspořádání	1	0,6151	0,7776	0,0804	0,1333	0,3733	0,0632	1,8820	0,9376	0,0665	0,3838	0,4917
		planární uspořádání	1	0,0095	0,6219	2,4675	1,0324	2,8380	2,2944	0,4441	0,0502	0,0656	1,2388	2,2755
	10 dtex	kruhové uspořádání	1	0,2485	0,1695	0,8578	0,3887	0,4831	0,7807	0,8404	0,1455	0,2065	0,4750	0,8878
		planární uspořádání	1	0,0024	0,0166	0,3970	0,2399	0,7597	0,5308	2,2157	0,1604	0,0501	0,8201	0,3733
		voda	1	0,5834	1,2755	58,1641	0,2838	0,6861	1,0820	1,3054	0,7114	0,4388	0,9050	1,6491

C.2. Primer DHC-RT

Tabulka C.2.1 - Průměrné Ct hodnoty primeru DHC-RT normalizované na množství vzorku

PRIMER: DHC-RT		Datum vzorkování											
GEN: Dehalococcoides sp.		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr
PV-112	0 dtex	40,00	40,00	40,00	30,71	31,22	30,10	30,22	29,41	28,33	28,38	29,41	28,75
	planární uspořádání	40,00	40,00	40,00	31,46	31,89	29,85			31,38			30,81
	3 dtex	34,55	40,00	40,00	30,36	30,16	29,33	26,52	27,67	28,46	29,62	28,21	27,83
	planární uspořádání	40,00	40,00	40,00	32,10	31,33	29,98	27,31	28,82	28,67	31,03	28,69	30,21
	10 dtex	40,00	40,00	40,00	30,57	30,92	30,01	26,62					
	planární uspořádání	40,00	40,00	40,00	33,21	31,36	29,92						
	voda	28,26	26,95	30,27	26,49	27,95	25,76	23,61	24,96	24,49	24,54	26,56	27,45
PV-130	0 dtex	29,84	31,50	34,92	30,79	31,53	33,89	31,88	35,19	40,00	40,00	40,00	40,00
	planární uspořádání	31,36	32,40	34,69	36,51	30,57	33,71	30,71	37,88	34,63	36,02	36,31	35,67
	3 dtex	30,12	30,15	30,90	34,52	32,13	35,32	34,99	40,00	40,00			34,84
	planární uspořádání	33,08	30,01	31,40	30,08		32,78			32,78			40,00
	10 dtex	31,71	30,31	30,40	31,53	31,47	32,58	40,00	32,11	35,64	34,81	40,00	35,56
	planární uspořádání	33,05	31,91	30,44	31,00	31,15	32,79	32,99	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
	voda	30,68	29,42	30,14	25,41	28,94	28,08	28,51	26,90	28,04	28,76	28,01	28,96

Tabulka C.2.2 - Relativní kvantifikace u primeru DHC-RT

PRIMER: DHC-RT		Datum vzorkování											
GEN: Dehalococcoides sp.		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr
PV-112	0 dtex				1	0,7055	1,5158	1,3977	2,4381	5,0968	4,9037	2,4221	3,8047
	planární uspořádání				1	0,7452	2,9983			1,0493			1,5512
	3 dtex	1			17,5750	20,1556	35,4303	242,1217	110,4669	64,6228	29,1330	76,6162	98,9694
	planární uspořádání				1	1,6963	4,2634	26,5571	9,4250	10,4746	2,0840	10,2945	3,6506
	10 dtex				1	0,7877	1,4628	14,8806					
	planární uspořádání				1	3,5538	9,5053						
	voda	1	2,4478	0,2515	3,3433	1,2319	5,5215	24,0198	9,5095	13,1524	12,7167	3,1942	1,7307
PV-130	0 dtex	1	0,3196	0,0310	0,5209	0,3136	0,0625	0,2472	0,0258				
	planární uspořádání	1	0,4923	0,1026	0,0295	1,7239	0,2012	1,5633	0,0116	0,1075	0,0414	0,0339	0,0524
	3 dtex	1	0,9772	0,5871	0,0494	0,2528	0,0286	0,0359					0,0396
	planární uspořádání	1	8,1650	3,1497	7,7717		1,2290			1,2290			
	10 dtex	1	2,6119	2,4567	1,1291	1,1756	0,5502		0,7600	0,0682	0,1197		0,0719
	planární uspořádání	1	2,1718	5,9227	4,0612	3,6634	1,1887	1,0411					
	voda	1	2,3736	1,4417	36,8624	3,2880	5,9123	4,4061	13,2947	6,0640	3,7264	6,2127	3,2443

C.3. Primer *vrA*

Tabulka C.3.1 - Průměrné Ct hodnoty primeru *vrA* normalizované na množství vzorku

PRIMER: <i>vrA</i>		Datum vzorkování												
GEN: Vinyl chloride reductase		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17	
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr	
PV-112	0 dtex	kruhové uspořádání	40,00	40,00	40,00	29,17	29,66	28,41	28,04	27,94	26,67	26,87	27,67	27,09
		planární uspořádání	40,00	40,00	40,00	30,70	31,58	28,08			29,17			29,23
	3 dtex	kruhové uspořádání	34,09	40,00	40,00	28,81	28,41	27,39	26,41	25,89	26,47	27,95	26,68	26,18
		planární uspořádání	33,72	40,00	40,00	29,81	29,96	27,97	27,18	26,95	27,09	29,33	27,04	27,56
	10 dtex	kruhové uspořádání	33,18	40,00	40,00	28,53	28,89	27,45	26,51					
		planární uspořádání	40,00	40,00	40,00	30,29	29,37	28,37						
	voda	26,62	25,31	27,42	23,94	25,24	23,12	21,86	23,45	21,83	21,63	25,07	24,95	
PV-130	0 dtex	kruhové uspořádání	33,46	40,00	40,00	29,50	29,68	32,38	30,29	34,49	40,00	40,00	40,00	33,42
		planární uspořádání	40,00	34,25	40,00	32,67	28,93	32,18	29,24	33,15	34,55	31,90	40,00	33,54
	3 dtex	kruhové uspořádání	33,08	34,27	34,04	32,04	30,57	33,55	40,00	40,00	40,00			34,94
		planární uspořádání	40,00	34,22	33,33	29,05		30,96			32,47			40,00
	10 dtex	kruhové uspořádání	33,40	33,88	32,65	29,90	29,41	32,01	33,18	30,81	32,28	32,53	40,00	34,40
		planární uspořádání	40,00	40,00	33,26	30,13	29,55	31,26	31,42	33,32	32,82	33,56	32,87	32,44
	voda	28,18	27,99	29,23	22,63	25,60	24,48	26,49	24,68	26,12	26,65	25,81	27,04	

Tabulka C.3.2 - Relativní kvantifikace u primeru *vrA*

PRIMER: <i>vrA</i>		Datum vzorkování												
GEN: Vinyl chloride reductase		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17	
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr	
PV-112	0 dtex	kruhové uspořádání				1	0,7337	1,6216	2,0513	2,1866	4,8894	4,2992	2,5897	3,7375
		planární uspořádání				1	0,5716	5,2355			2,6276			2,5394
	3 dtex	kruhové uspořádání	1			28,3508	36,6416	69,7666	129,9492	180,7753	124,6247	48,9834	109,1702	150,5497
		planární uspořádání	1			11,9527	10,8192	38,3431	62,9631	72,9789	66,9873	16,2078	68,9125	49,5664
	10 dtex	kruhové uspořádání	1			19,0932	15,1473	37,7421	68,6304					
		planární uspořádání				1	1,7855	3,3724						
	voda	1	2,2809	0,5996	5,4468	2,3900	9,1755	20,3880	7,4442	20,6822	23,5868	2,6552	2,8652	
PV-130	0 dtex	kruhové uspořádání	1			12,3057	10,9736	1,9859	7,4607	0,5204				1,0244
		planární uspořádání		1		2,7326	29,1191	3,7132	23,9562	2,0108	0,8286	4,4291		1,5675
	3 dtex	kruhové uspořádání	1	0,4717	0,5454	1,9423	4,9334	0,7439						0,3086
		planární uspořádání		1	1,7607	26,5199		7,9053			3,0365			
	10 dtex	kruhové uspořádání	1	0,7396	1,6098	9,1965	12,5421	2,4230	1,1527	5,1653	2,0416	1,7442		0,5310
		planární uspořádání			1	7,2643	10,5006	3,5495	3,2177	0,9643	1,3249	0,8273	1,2789	1,6851
	voda	1	1,1217	0,5128	33,6765	5,1111	10,3823	2,9050	9,1755	3,6685	2,6250	4,4883	2,0577	

C.4. Primer *bssA*

Tabulka C.4.1 - Průměrné Ct hodnoty primeru *bssA* normalizované na množství vzorku

PRIMER: <i>bssA</i>		Datum vzorkování												
GEN: Benzylsukcinát syntáza		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17	
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr	
RW6A-45	0 dtex	kruhově uspořádání	37,05	40,00	32,85	36,22	35,00	36,93	37,18	36,65	40,00	35,08	37,18	33,07
		planární uspořádání	36,09	35,94	34,15	33,90	33,78	35,87	34,14	33,43	35,38	34,93	33,35	32,99
	3 dtex	kruhově uspořádání	31,04	31,89	31,48	32,39	34,13	33,52	36,59	33,69	33,22	36,80	33,98	33,09
		planární uspořádání	32,84	40,00	32,91	31,92	33,85	32,98	34,58	35,39	36,26	40,00	34,28	33,62
	10 dtex	kruhově uspořádání	32,85	34,21	35,77	33,42	34,13	34,78	34,99	35,26	35,96	35,50	34,75	33,42
		planární uspořádání	32,36	40,00	40,00	34,60	34,53	33,51	34,98	32,55	36,04	40,00	33,14	34,21
	voda		30,39	30,61	30,46	32,95	34,14	31,79	34,95	32,36	33,13	32,92	32,25	31,24

Tabulka C.4.2 - Relativní kvantifikace u primeru *bssA*

PRIMER: <i>bssA</i>		Datum vzorkování												
GEN: Benzylsukcinát syntáza		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17	
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr	
RW6A-45	0 dtex	kruhově uspořádání	1		12,2060	1,6446	3,3974	1,0788	0,9298	1,2684		3,2329	0,9284	10,7333
		planární uspořádání	1	1,0956	3,1747	3,6823	3,9582	1,1440	3,1969	4,8763	1,5276	2,0021	5,1100	6,3400
	3 dtex	kruhově uspořádání	1	0,6009	0,7703	0,4476	0,1583	0,2285	0,0367	0,2057	0,2730	0,0323	0,1736	0,2951
		planární uspořádání	1		0,9629	1,7343	0,5496	0,9213	0,3555	0,2198	0,1310		0,4256	0,6303
	10 dtex	kruhově uspořádání	1	0,4451	0,1762	0,7133	0,4676	0,3168	0,2809	0,2389	0,1571	0,2065	0,3231	0,7126
		planární uspořádání	1			0,2642	0,2749	0,5043	0,2101	0,8962	0,1124		0,6322	0,3328
	voda		1	0,8772	0,9563	0,2175	0,1071	0,4335	0,0663	0,3087	0,1953	0,2220	0,3298	0,6021

C.5. Primer DEF/G

Tabulka C.5.1 - Průměrné Ct hodnoty primeru DEF/G normalizované na množství vzorku

PRIMER: DEF/G		Datum vzorkování												
GEN: katechol-1,2-dioxygenáza		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17	
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr	
RW6A-45	0 dtex	kruhově uspořádání	34,05	36,90	31,24	34,90	32,90	34,08	34,67	32,71	35,44	29,23	30,90	27,37
		planární uspořádání	36,11	36,43	32,40	32,25	32,14	33,55	30,98	30,52	32,42	29,37	26,99	27,40
	3 dtex	kruhově uspořádání	28,56	30,60	30,83	32,77	32,46	31,36	33,82	30,35	29,72	29,56	28,01	27,72
		planární uspořádání	31,32	37,21	40,00	31,60	34,21	31,22	31,70	33,51	34,73	32,09	28,69	27,88
	10 dtex	kruhově uspořádání	29,64	32,29	33,62	31,31	32,49	32,27	31,71	31,53	33,15	29,52	28,74	28,22
		planární uspořádání	29,97	35,61	40,00	32,76	32,77	33,62	31,65	29,73	32,53	30,50	27,80	28,95
	voda		30,24	30,44	28,85	30,37	30,86	31,78	30,07	29,40	28,92	27,67	27,28	26,50

Tabulka C.5.2 - Relativní kvantifikace u primeru DEF/G

PRIMER: DEF/G		Datum vzorkování												
GEN: katechol-1,2-dioxygenáza		15.04.16	06.05.16	08.06.16	18.07.16	08.08.16	06.09.16	07.10.16	08.11.16	09.12.16	09.01.17	07.02.17	14.03.17	
Vrt	Varianta nosiče	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr	6. odběr	7. odběr	8. odběr	9. odběr	10. odběr	11. odběr	12. odběr	
RW6A-45	0 dtex	kruhově uspořádání	1	0,1794	5,4481	0,5980	1,9932	0,9794	0,6869	2,2445	0,4329	18,2130	6,6730	55,8340
		planární uspořádání	1	0,8221	9,3124	10,2226	10,9095	4,6569	22,0171	28,9969	9,2239	57,7959	242,2821	190,2587
	3 dtex	kruhově uspořádání	1	0,2930	0,2545	0,0793	0,0953	0,1858	0,0422	0,3401	0,4963	0,5468	1,3946	1,6580
		planární uspořádání	1	0,0288		0,8436	0,1752	1,0599	0,7968	0,2669	0,1279	0,6298	4,8756	7,9269
	10 dtex	kruhově uspořádání	1	0,2033	0,0910	0,3659	0,1802	0,2060	0,2883	0,3208	0,1207	1,0785	1,7261	2,3605
		planární uspořádání	1	0,0335		0,1862	0,1851	0,1108	0,3641	1,1581	0,2140	0,7270	3,6985	1,8517
	voda		1	0,8838	2,3102	0,9247	0,6884	0,3941	1,1072	1,6528	2,2091	4,6766	5,9381	9,4616

Příloha D - Obsah příloženého CD

I. Diplomová práce v elektronické podobě

- Diplomová práce 2017.pdf

II. Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Carl Zeiss

ULTRA Plus

- 8. odběr - PV-130 - 10 dtex - zvětšení 196 X
- 8. odběr - PV-130 - 10 dtex - zvětšení 878 X
- 8. odběr - PV-130 - 10 dtex - zvětšení 1 220 X
- 8. odběr - RW6A-45 - 10 dtex - zvětšení 173 X
- 8. odběr - RW6A-45 - 10 dtex - zvětšení 2 540 X
- 8. odběr - RW6A-45 - 10 dtex - zvětšení 8 150 X
- 12. odběr - PV-130 - 10 dtex - zvětšení 250 X
- 12. odběr - PV-130 - 10 dtex - zvětšení 1 000 X
- 12. odběr - PV-130 - 10 dtex - zvětšení 7 370 X
- 12. odběr - PV-130 - 10 dtex - zvětšení 10 650 X
- 12. odběr - RW6A-45 - 3 dtex - zvětšení 96 X
- 12. odběr - RW6A-45 - 3 dtex - zvětšení 500 X
- 12. odběr - RW6A-45 - 3 dtex - zvětšení 3 000 X
- 12. odběr - RW6A-45 - 10 dtex - zvětšení 150 X
- 12. odběr - RW6A-45 - 10 dtex - zvětšení 2 500 X
- 12. odběr - RW6A-45 - 10 dtex - zvětšení 3 460 X