

Analýza a hodnocení mikroorganismů v odpadních vodách metodami molekulární biologie a respirometrie

Bakalářská práce

Studijní program: Studijní obor:

B3942 – Nanotechnologie 3942R002 – Nanomateriály

Autor práce: Vedoucí práce: **Vojtěch Galáč** Ing. Karel Havlíček





Zadání bakalářské práce

Analýza a hodnocení mikroorganismů v odpadních vodách metodami molekulární biologie a respirometrie

Vojtěch Galáč

Jméno a příjmení: Osobní číslo: Studijní program: Studijní obor: Zadávající katedra: Akademický rok:

M15000134 B3942 Nanotechnologie Nanomateriály Ústav nových technologií a aplikované informatiky **2018/2019**

Zásady pro vypracování:

1. Seznamte se s problematikou čištění odpadních vod pomocí mikroogranismů.

- 2. Vypracujete rešerši zaměřenou na metody molekulární biologie.
- 3. Vypracujete rešerši zaměřenou na metody respirometrické.
- 4. Navrhněte plán experimentu.
- 5. Připravte a zprovozněte laboratorní biologický modul včetně nosičů biomasy.
- 6. Pomocí metod molekulární biologie a respirometrie analyzujte biofilm na nanovlákenných
- a mikrovlákenných nosičích a sledujte změny v reaktoru.
- 7. Zpracujte, porovnejte a diskutujte výsledky jednotlivých testů.

Rozsah grafických prací: Rozsah pracovní zprávy: Forma zpracování práce: dle potřeby 30 – 40 stran tištěná/elektronická



Seznam odborné literatury:

Ambrožová J., (2001). Aplikovaná a technická hydrobiologie, Skriptum VŠCHT Praha. ISBN 80-7080-463-7.
 Alberts B., (2014): Molecular Biology of the Cell, 6th Ed. PB, Taylor and Francis, New York US, s. 1342. ISBN: 978-0815344322.

[3] Nielsen, Daims, Lemmer, (2009). FISH handbook for biological wastewater treatment: identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH. London: IWA Publishing. ISBN 9781843392316.

[4] Azeredo J., et al., (2017). Critical review on biofilm methods. Critical Reviews in Microbiology [online]. 43(3), 313351. ISSN 1040-841X.

[5] Kogler, Clayton, Thissen, Santos, Kingshott, (2012). The influence of nanostructured materials on biointerfacial interactions. Advanced Drug Delivery Reviews [online]. 64(15), 18201839. ISSN 0169409X.
[6] Columbus Instruments, (2018). Micro-Oxymax Layman's Guide to Measurement Principles [online]. [cit. 2018-09-24]. Dostupné z: http://hazenlab.utk.edu/files/equipment/microOxymaxPrimer.pdf.

[7] Fall, C., Flores, N., Espinoza, M., Vazquez, G., Loaiza-Návia, J., van Loosdrecht, M.C., Hooijmans, C., (2011). Divergence Between Respirometry and Physicochemical Methods in the Fractionation of the Chemical Oxygen Demand in Municipal Wastewater. Water Environment Research. 83, 162172. https://doi.org/10.2175/106143010X12780288627931.

[8] ISO 9439 (1999): Water quality evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium. Carbon dioxide evolution test; ISO 9408 (1999): Water quality evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium by determination of oxygen demand in a closed respirometer; ISO 8192 (2007): Water quality test for Inhibition of Oxygen Consumption by Activated Sludge for Carbonaceous and Ammonium Oxidation.

[9] Reuschenbach, P., Pagga, U., Strotmann, U., (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. Water Research. 37, 15711582.

https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00528-6.

[10] Vanrolleghem, P., (2002). "Principles of Respirometry in Activated Sludge Wastewater Treatment." Proceedings International Workshop on Recent Development in Respirometry for Wastewater Treatment Plant Monitoring and Control, Taipei, Taiwan, October 22-23, 2/1-20.

Vedoucí práce:	Ing. Karel Havlíček Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Konzultanti práce:	Ing. Magda Nechanická Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace
	Ing. Tomáš Lederer, Ph.D. Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Datum zadání práce:	18. října 2018
Předpokládaný termín odevzdání:	30. dubna 2019

L. S.

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D. děkan Ing. Josef Novák, Ph.D. vedoucí ústavu

V Liberci 18. října 2018

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou 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 bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom 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.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

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

30.4.2019

Vojtěch Galáč

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování patří v první řadě vedoucímu práce Ing. Karlu Havlíčkovi za ochotu, trpělivost a cenné rady k této práci. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Lucii Svobodové Ph.D. za odborné rady při vyhodnocování výsledků, Ing. Magdě Nechanické za pomoc při izolaci DNA, PCR a rady v této oblasti a Bc. Petře Šubrtové a Mgr. Mileně Johnové za pomoc při přípravě vzorků na FISH analýzu. Poděkovat bych chtěl také své rodině, za podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Cílem této práce je obecné zhodnocení porovnatelnosti metod analýz biofilmu. Teoretická část práce řeší základní pojmy v oblasti biotechnologie vod a základní principy a postupy jednotlivých metod vyhodnocení biofilmu.

V dalších částech práce jsou podrobně rozebrány jednotlivé analýzy a jejich výsledky. Odborná část se zabývá provozem biologického reaktoru, kde byly umístěny vlákenné nosiče sloužící pro uchycení biomasy. Důležitým procesem pro provoz reaktoru a tvorbu biofilmu byla nitrifikace. Z nosičů byly v pravidelných intervalech během šesti týdnů odebírány vzorky biofilmu a analyzovány pomocí metod molekulární biologie, respirometrie a optické mikroskopie. Metody molekulárně biologické zahrnují izolaci DNA a následnou kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci a FISH analýzu. Ač se jednotlivé metody výrazně liší podstatou stanovení, výsledky práce ukazují na možnou porovnatelnost metod a modifikaci způsobů vyhodnocování.

Klíčová slova

Vlákenné nosiče, biomasa, molekulární genetika, respirometrie, optická mikroskopie, nitrifikace

Abstract

The aim of this work is a general assessment of comparability of biofilm evaluation methods. The theoretical part deals with the basic concepts of water biotechnology and the basic principles and procedures of individual methods of biofilm evaluation.

In the following parts of the thesis, the individual analyzes, and their results are analyzed in detail. The essence of the expert part is the solution of the operation of the biological reactor, where the fibrous carriers used for biomass attachment were placed. Nitrification was an important process for reactor operation and biofilm formation. Samples were taken from the carriers at regular intervals over six weeks and analyzed by molecular biology, respirometry and optical microscopy methods. Molecular biological methods include DNA isolation and subsequent quantitative polymerase chain reaction and FISH analysis. Although the methods differ considerably in the nature of the determination, the results show the possible comparability of the methods and modification of the evaluation methods.

Keywords

Fiber carriers, biomass, molecular genetics, respirometry, optical microscopy, nitrification

Obsah

1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Biotechnologie – čištění odpadních vod	11
2.2 Nosiče biomasy	12
2.3 Biofilm	12
2.4 Kvantitativní metody hodnocení biofilmu	13
2.4.1 Optická mikroskopie	13
2.4.2 Respirometrie	14
2.5 Chemická laboratorní analýza odpadních vod	15
2.6 Molekulárně genetické metody hodnocení biofilmu	16
2.6.1 FISH	16
2.6.2 Izolace DNA a qPCR	16
2.7 Využití metod analýz v praxi	17
3 PRAKTICKÁ ČÁST	
3.1 Použité přístroje, chemikálie a testované vzorky	
3.2 Popis biologického modulu a testovaných nosičů biomasy	
3.3 Metoda optické mikroskopie	20
3.4 Metoda respirometrie	23
3.5 Chemická analýza	25
3.6 Metoda FISH	26
3.7 Metoda molekulárně genetická	
4 DISKUZE	
5 ZÁVĚR	40
LITERATURA	41
PŘÍLOHY	44

Seznam použitých zkratek a symbolů

- AOB amoniak oxidující bakterie
- NOB dusitany oxidující bakterie
- ATP adenosintrifosfát
- BOL biologicky odbouratelné látky
- BSK biochemická spotřeba kyslíku
- CHSK chemická spotřeba kyslíku
- EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová
- FA formamid
- FISH fluorescenční in situ hybridizace
- MQ milli Q
- PA polyamid
- PUR polyuretan
- PBS fosfátový pufr
- PFA paraformaldehyd
- qPCR kvantitativní polymerázová řetězová reakce
- SDS dodecylsíran sodný
- TE Tris/EDTA pufr
- Tris tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 ÚVOD

Významným globálním problémem vod je jejich znečištění, které má dopady na všechny živé organismy. Cílem systémů čistění odpadních vod je minimalizovat tyto nepříznivé dopady a zabraňovat polutantům negativně ovlivňovat životní prostředí. Důležitým prvkem v této oblasti je výzkum a vývoj nových materiálů a metod pro hodnocení jejich vlastností a účinnosti. Testování nových materiálů a postupů je v první fázi prováděno v laboratorním měřítku. Laboratorní biologické moduly se využívají pro základní testování materiálů, které jsou určené pro aplikaci v oblasti vodní biotechnologie, resp. v procesech čištění odpadních vod.

Proces nitrifikace, tedy odbourávání amonných iontů z odpadní vody pomocí mikroorganismů, je jedním z příkladů velmi důležitých procesů při čištění odpadních vod. Biofilm, který obsahuje mikroorganismy zodpovědné za tyto procesy lze hodnotit pomocí různých metod. Metody jsou založeny na různých principech a velkým nedostatkem v odborných publikacích je právě porovnatelnost těchto metod.

Mikroorganismy se přirozeně vyskytují ve vodě, půdě i vzduchu a jejich metabolické procesy jsou využívány v mnoha odvětvích. Jedná se o organismy, které jsou většinou velmi citlivé na změny jejich přirozeného prostředí a tyto změny výrazně ovlivňují jejich funkci. Ve vhodných podmínkách se snadno a rychle rozmnožují a jsou například schopny zbavovat vodu organických i anorganických polutantů, ze kterých získávají energii. Při čištění odpadních vod mají nezastupitelnou roli, a proto je jejich kvantitativní i kvalitativní hodnocení velmi důležité.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biotechnologie – čištění odpadních vod

Biologické čištění odpadních vod je proces, kdy dochází k odbourání organických i anorganických látek pomocí mikroorganismů. Tento přírodní proces je charakterizován jako "samočisticí" jev. Cílem této technologie je vytvořit čisticí proces za kontrolovaných podmínek (Sperling, 2007).

Bakterie potřebují k životu zdroj energie, uhlíku a živiny. Podle zdroje uhlíku je můžeme rozdělit na autotrofní (litotrofní) organismy, které získávají uhlík z CO₂ a heterotrofní (organotrofní) organismy, které uhlík získávají z organických látek. Podle zdroje energie je můžeme dělit na fototrofní, které energii získávají ze slunečního záření a chemotrofní, které energii získávají oxidací anorganických látek. Nitrifikační bakterie patří do skupiny chemolitotrofních bakterií (Sperling, 2007; Ambrožová, 2001).

Dusík je biogenní prvek a do vody se dostává často z uhynulých živočichů v organických sloučeninách nebo z exkrementů ve formě amoniaku, kyseliny močové nebo močoviny. Chemotrofní bakterie přeměňují organický dusík na amoniak procesem amonifikace. Amoniak dále využívají např. nitrifikační bakterie (Ambrožová, 2001).

Odstranění dusíku z vody probíhá v procesech zvaných nitrifikace a denitrifikace. Nitrifikace je proces, skládající se ze dvou kroků. Nejprve je oxidován amoniakální dusík na dusitanový (nitritace), za to jsou zodpovědné bakterie označované jako AOB (Ammonium Oxidizing Bacteria). Tuto skupinu zastupují bakterie rodu *Nitrosococcus* a *Nitrosomonas*. V dalším kroků probíhá odbourávání dusitanů na dusičnany (nitratace), pomocí bakterií označovaných jako NOB (Nitrite Oxidizing Bacteria). Do této skupiny patří bakterie rodu *Nitrobacter* a *Nitrospira* (Ambrožová, 2001; Radechovský, 2013).

Denitrifikace je proces, kdy dochází k redukci dusičnanů na plynný dusík. Probíhá v anoxickém prostředí, kde bakterie využívají jako akceptor elektronů dusičnany místo kyslíku. Příkladem denitrifikačních bakterií je rod *Pseudomonas* (Sperling, 2007; Ambrožová, 2001).

2.2 Nosiče biomasy

Bakterie mají tendenci osidlovat různé povrchy a vytvářet biofilm. K tomuto účelu slouží nosiče biomasy. Bakterie tvoří na nosiči biofilm a výhodou je tak lepší rezistence vůči toxickým vlivům okolního prostředí, dále také možnost růstu pomalu rostoucích mikroorganismů a lepší kontakt bakterií s polutanty. Vhodným nosičem biomasy jsou polymerní materiály, které mají nízkou hmotnost a velký aktivní povrch (Křiklavová, 2009). V této práci byly testovány nosiče z polyamidu a polyuretanu (obrázek 1 a 2).



Obrázek 1: Chemická struktura polyamidu



Obrázek 2: Chemická struktura polyuretanu

2.3 Biofilm

Biofilm je mikrobiální společenství adherované na povrchu nějakého materiálu. Skládá se z bakterií a extracelulární matrice (EPM), která je produkována bakterie. Tato mezibuněčná hmota se skládá z proteinů, polysacharidů, huminových a jiných látek a vytváří vhodné prostředí pro život mikroorganismů. Tvorba biofilmu je pro mikroorganismy výhodná, poskytuje jim ochranu před působením toxickými látek v okolním prostředí, predátory a mechanickému poškození. Biofilmy se vyskytují prakticky všude, kde žijí mikroorganismy. Nalezneme je ve vodovodních trubkách, na lodních trupech, ale mohou se objevit také v lidském těle při infekčním onemocnění, kdy bakterie tak lépe odolávají imunitnímu systému. Ačkoliv v těchto místech jsou biofilmy na obtíž, tak mají své využití v oblasti čištění odpadních vod (Azeredo, 2017; Rulík, 2012).

Tvorba biofilmu se skládá z několika částí. Po transportu buněk k vhodnému nosiči dochází k adhezi. Následuje růstová fáze, kdy se přichycené buňky začínají dělit a produkovat látky tvořící EPM. Vzniká primární biofilm a zároveň dochází k zachytávání okolních buněk do biofilmu. Po určité době dochází ke snížení rychlosti růstu biofilmu, což může být způsobeno omezeným transportem živin do hlubších částí. Následuje uvolňování částí biofilmu do okolí, a buňky tak mohou kolonizovat další povrchy (Azeredo, 2017; Rulík, 2012).

2.4 Kvantitativní metody hodnocení biofilmu

Tato kapitola zahrnuje metody, které sledují celkové změny v biologickém reaktoru při testování materiálů v simulovaných odpadních vodách. Zkoumá se zastoupení biofilmu na nosičích pomocí optické mikroskopie a aktivita mikroorganismů v biofilmu, která je vyjádřena veličinou BSK.

2.4.1 Optická mikroskopie

Optický mikroskop je zobrazovací zařízení, které slouží k zobrazení předmětů, které nejsou viditelné pouhým okem. Mikroskop se skládá z osvětlovací soustavy zvané kondenzor, objektivu a okuláru, pomocí nichž je předmět zobrazen. Princip optické mikroskopie je schematicky znázorněn na obr. 3. Zvětšení objektivu je obvykle 10x - 100x, zvětšení okuláru 10x. Celkové zvětšení je dáno součinem těchto dvou zvětšení. Objektiv mikroskopu je obvykle označen velikostí zvětšení a numerickou aperturou. Numerická apertura (NA) je dána součinem indexu lomu prostředí mezi předmětem a objektivem a sinem úhlu α , což je maximální úhel, pod kterým dopadá paprsek do objektivu. S vyšší numerickou aperturou roste rozlišení mikroskopu, ale snižuje se hloubka ostrosti.

$$NA = n \times \sin \alpha$$
 (1)

Pro zkoumání vlákenných nosičů byla použita metoda zobrazení v tmavém poli. Při metodě zobrazení v tmavém poli nedochází k přímému průchodu světla do objektivu a v nepřítomnosti vzorku je tak vidět pouze tmavé pole. Při pozorování vzorku se do objektivu dostane pouze světlo rozptýlené předmětem. Výhodou této metody je vysoký kontrast (Davidson, 2015).

2.4.2 Respirometrie

Respirometrií měříme míru biologické spotřeby kyslíku za dobře definovaných podmínek. Měříme změny koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého, a na tomto základě můžeme vyhodnotit aktivitu mikroorganismů. Spotřeba kyslíku přímo souvisí s růstem biomasy a spotřebou substrátu (Vanrolleghem, 2002).

Z pohledu biochemie je respirace proces výroby ATP jako zdroje energie. Některé organické i anorganické sloučeniny slouží jako donor elektronů, sloučeniny jako O₂, NO₂⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ slouží jako akceptor elektronů. Pokud je akceptorem kyslík, proces nazýváme aerobní dýchání. Opakem je anaerobní dýchání, při kterém není dostupný kyslík (Vanrolleghem, 2002).

BSK je veličina udávající hmotnostní koncentraci kyslíku rozpuštěného ve vodě, potřebného k odbourání látek biochemickou oxidací. Udává tedy míru koncentrace biologicky odbouratelných látek. Hodnota BSK je závislá na čase, úplná oxidace obvykle trvá až 20 dní, což je pro praktické využití příliš dlouhé. Nejčastěji se používá měření BSK₅ udávající biochemickou spotřebu kyslíku za 5 dní (Pitter, 2016).

Respirometry lze rozdělit na 2 skupiny podle způsobu měření kyslíku, a to měření kyslíku v kapalné fázi a měření kyslíku v plynné fázi. Pro měření kyslíku v kapalné fázi se obvykle používá elektrochemický senzor skládající se ze dvou nebo tří elektrod. Elektrody jsou od roztoku odděleny polopropustnou membránou, přes kterou difundují částice rozpuštěného kyslíku. Na katodě jsou molekuly kyslíku redukovány a vytvářejí elektrický proud, který je úměrný koncentraci rozpuštěného kyslíku. Mětoda měření kyslíku v plynné fázi využívá paramagnetických vlastností kyslíku. Měří se změna magnetického pole, která je úměrná koncentraci kyslíku. Koncentrace CO₂ je měřena pomocí IR spektroskopie (Vanrolleghem, 2002; Dřímal, 2008).



Obrázek 3: Schéma respirometru Micro-Oxymax. Součásti zařízení: kyslíkový senzor, senzor CO₂, systémové pumpy, sensory tlaku, láhve na vzorek, PC, kondenzátor a další podpůrné součásti. (čerpáno z firemní literatury Micro-Oxymax)

2.5 Chemická laboratorní analýza odpadních vod

Pro kontrolu probíhajících procesů v bioreaktoru, v našem případě zejména průběh nitrifikace, jsou sledovány koncentrace následujících látek: NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, NH₄⁺ a CHSK. Koncentrace těchto látek v reaktoru přímo dávají informaci o tom, zdali probíhají oba kroky nitrifikace (oxidace amoniaku na dusitan a oxidace dusitanu na dusičnan). Měření koncentrace těchto látek probíhá pomocí analytických metod a často je pro stanovení využívaná metoda spektroskopie. CHSK podává informaci o celkové koncentraci organických látek ve vodě. Udává množství kyslíku potřebné k oxidaci všech organických látek (Pitter, 2016).

Nitrifikační bakterie potřebují pro svou správnou funkci vhodné podmínky. Jedním z faktorů ovlivňující průběh nitrifikace je pH. Optimální hodnota pH je mezi 7 a 8,5. Hodnoty pH pod 6,5 a nad 9 už mohou významně ovlivnit její průběh. Důvodem je inhibiční působení nedisociovaných forem dusíkatých sloučenin (Radechovský, 2013; Pitter, 2016).

Nitrifikace probíhá podle rovnice č. 2. Vzniká při ní vodíkový kationt, způsobující okyselení vody a tedy pokles pH (Sperling, 2007).

$NH_4^+ + 2 O_2 \rightarrow NO_3^- + 2 H^+ + H_2O$ (2)

2.6 Molekulárně genetické metody hodnocení biofilmu

Molekulární genetika je věda zabývající se studiem nukleových kyselin a procesů s nimi spojenými (na molekulární úrovni). Bakterie patří mezi prokaryotické buňky. Ty nemají žádné buněčné jádro a jejich DNA je volně uložená v cytoplasmě. Narušením buněčné stěny se dostaneme k samotné DNA a různými fyzikálně-chemickými procesy ji můžeme izolovat od ostatních látek.

2.6.1 FISH

FISH je metoda pro identifikaci a vizualizaci úseku DNA či RNA v buňce pomocí oligonukleotidových sond. Původně se používaly sondy značené radioizotopem, ale jejich nevýhodou bylo nízké rozlišení a potřeba autoradiografie. V roce 1989 se začaly používat fluorescenčně značené sondy. Tato metoda nachází uplatnění v medicíně, zejména v oblasti genetiky, ale také v mikrobiologii při zobrazení buněk v komplexním systému bez předchozí kultivace, či izolace. Sonda pro značení ribozomální RNA obsahuje krátký úsek DNA (obvykle 15-25 bází) a je navržena tak, aby byla komplementární k úseku cílové sekvence rRNA (Nielsen, 2009; Nemčeková, 2017).

2.6.2 Izolace DNA a qPCR

Izolace DNA je proces, při kterém získáváme z buněk čistou DNA. Probíhá v několika krocích. Nejprve je třeba narušit buněčnou stěnu, aby došlo k lýze buněk. Následuje přečišťování DNA od ostatních látek jako je RNA, soli, proteiny atd. K odstranění RNA dochází pomocí RNáz, které štěpí RNA, aniž by poškodily DNA. Enzymaticky jsou odstraněny i proteiny. Od dalších látek je DNA obvykle izolována srážením v alkoholu. Po izolaci se DNA uchovává v TE (Tris/EDTA) pufru. Pro izolaci DNA bylo vyvinuto několik metod, jako je např. guanidium-thiokyanát-fenol-chloroformová extrakce nebo CTAB (cetyl amonium bromid) extrakce. Běžně se používají komerční kity, které pracují na izolaci DNA v pevné fázi, kdy je DNA během izolace navázána např. na křemičité nosiče (Chee, 2009).

Metoda qPCR je kvantitativní polymerázová řetězová reakce, která umožňuje sledovat změny koncentrace DNA v reálném čase. V principu jde o standartní PCR, skládající se z kroků denaturace DNA, nasednutí primerů a prodloužení (elongace). Rozdíl je v monitorování fluorescence po každém cyklu. Intenzita signálu je úměrná

amplifikované DNA ve vzorku. V počátečních cyklech je fluorescence příliš nízká na to, aby se dala odlišit od pozadí. V bodě, kdy intenzita fluorescence vzroste nad tuto úroveň, úměrně odpovídá počtu templátové DNA ve vzorku. Tento bod je označovaný jako Ct hodnota. Čím vyšší je Ct hodnota, tím nižší je koncentrace DNA ve vzorku. Je třeba zdůraznit, že v každém cyklu se teoreticky počet kopií zdvojnásobí. Pokud je tedy rozdíl Ct hodnot 10, znamená to, že jsou od sebe koncentrace vzdálené o 3 řády (Králík, 2017).

2.7 Využití metod analýz v praxi

Metoda FISH je diagnostická metoda široce využívána v oblasti medicíny, při detekci genetických aberací vedoucích k různým typům rakoviny nebo jiným onemocněním. (Bishop, 2010). Další je možné využití při detekci patogenů v jídle. (Rathnayaka, 2018).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce nachází široké uplatněním na poli medicíny, v potravinářství a ve forenzní genetice. Výhodou této metody je schopnost detekce jediné molekuly nukleové kyseliny ve vzorku.

Respirometrie je široce využívaná metoda v oblasti analýz půd a odpadních vod. Široké uplatnění nachází v testování metabolických aktivit bakterií, které se nacházejí ve zkoumaném substrátu. Existuje mnoho modifikací této metody, které využívají odlišné principy stanovení, např. měření BSK pomocí změny tlaku v uzavřené nádobě při produkci CO₂ bakteriemie, měření BSK pomocí změn koncentrací kyslíku a oxidu uhličitého, měření produkce metanu a vodíku u anaerobních procesů a další.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Použité přístroje, chemikálie a testované vzorky

Laboratorní experiment byl realizován v nádobě o objemu 20 l. Pro přítok média a odtah odpadní vody z reaktoru byla použita peristaltická průtoková čerpadla Watson-Marlow. Jako nosiče biomasy byly vybrány 2 typy materiálů, a to polyuretanová nanovlákna na nosné niti z polyesterového hedvábí SLOTERA a nit z mikrovláken ze 100% polyamidu o průměru 33 µm. Nitě byly namotány na ocelové nebo plastové rámečky o rozměrech 10×10 cm do svazků (obr. 6).

Pro chemickou analýzu byly použity kyvetové testy od firmy Hach-Lange, konkrétně LCK 304, LCK 314, LCK 339, LCK 341, LCK 342, LCK 348. Měření koncentrace probíhalo na spektrofotometru HACH DR 6000 UV-VIS. Měření pH probíhalo na altimetru WTW inoLab Multi 9420 se sondou pro měření pH.

Měření úbytku kyslíku probíhalo na respirometru Micro-Oxymax od firmy Columbus Instruments (obr. 3).

Pro fixaci vzorků na FISH byly použity následující látky: lysozom, PBS pufr, NaCl, Tris, HCl, SDS, FA, PFA, MQ voda a Citifluor.

Izolace DNA byla provedena pomocí kitu FastDNA SPIN Kit for Soil. Koncentrace byla měřena pomocí fluorometru Qubit® 2.0. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce byla provedena na přísroji Light Cycler[®] 480 od firmy Roche.

Focení vlákenných nosičů probíhalo na optickém mikroskopu Olympus BX51M pomocí fotoaparátu Canon EOS 700D při zvětšení 50×. Vzorky z FISH byly foceny na optickém mikroskopu Axio Imager.M2 při zvětšení 630×.

3.2 Popis biologického modulu a testovaných nosičů biomasy

Hlavní část experimentu byla realizována v biologickém reaktoru. Reaktor se skládá ze skleněné nádoby o celkovém objemu 20 l. Do nádoby byla na počátku experimentu přidána odpadní voda s vysokou koncentrací amonných iontů.

Pro hodnocení procesu nitrifikace byla použita nit z polyamidových mikrovláken (PA) a nit z polyuretanových nanovláken na nosné niti (PUR). Pro všechny testy byly vzorky v duplikátech, označované jako PA 1 a PA 2, respektive PUR 1 a PUR 2. Tyto

vlákenné nosiče sloužila pro zachytávání biomasy, kterou jsme analyzovali. Vlákna byla namotána na ocelových nebo plastových rámečcích. Pro respirometrii a analýzu DNA byl na rámeček namotán celý svazek vláken (10 obtočení). Pro ostatní analýzy byla ponechána pouze jedna nit dlouhá 8,7±0,1 cm. Do nádoby bylo kontinuálně po celou dobu experimentu přidáváno živné médium pomocí peristaltického čerpadla rychlostí 4 litry za 24 hodin. Na dně nádoby byl umístěn provzdušňovací kámen napojený na dmychadlo. Provzdušňování probíhalo 23 hodin, poté bylo vypnuto na 1 hodinu, kdy docházelo k sedimentaci. Následně byla odsána odpadní voda pomocí peristaltického čerpadla na objem 4 l a celý proces se opakoval.

Schéma biologického reaktoru s čerpadly pro přítok média i odtah odpadní vody (obrázek 4) bylo sestaveno dle experimentu. Připravené nitě a svazky nití na rámečcích byly umístěny na dno tak, aby byly po celou dobu experimentu ponořeny, tedy ovlivňovány simulovanou odpadní vodou v reaktoru.



Obrázek 4: Schematické znázornění laboratorního modulu s testovanými nosiči biomasy



Obrázek 5: Snímek biologického reaktoru



Obrázek 6: Namotané nitě na rámečcích před vložením do bioreaktoru

3.3 Metoda optické mikroskopie

Focení nosičů probíhalo na optickém mikroskopu v softwaru QuickPHOTO MICRO 2.3, při 50× zvětšení. Nit byla postupně prostřena po celé hloubce ostrosti a byl vyfocen potřebný počet snímků (přibližně 15 až 35). Tyto snímky byly následně složeny v programu QuickPHOTO MICRO 3.1 do jedné výsledné fotografie. Každé vlákno bylo vyfoceno celkem pětkrát po celé délce vlákna.



Obrázek 7: Příklad snímku PUR nosiče s biofilmem z optické mikroskopie při 3. odběru



Obrázek 8: Příklad snímku PA nosiče s biofilmem z optické mikroskopie při 3. odběru

Snímky nití byly vyhodnocovány v Matlabu programem od Ing. Lucie Svobodové Ph.D., která pomáhala s vyhodnocováním snímků. Hodnoceno bylo procentuální zastoupení biofilmu na nosiči. Výsledky z optické mikroskopie jsou zobrazeny v grafech č. 1 a 2. V následujících grafech jsou vidět změny v zastoupení biofilmu. V grafu 2 je patrný nárůst biofilmu na PA niti v průběhu celého testu, zatímco u PUR nitě hodnoty kolísají a maximální zastoupení je již v 2. odběru.



Graf 1: Počet detekovatelných částí biofilmu na niti



Graf 2: Procentuální zaplnění biofilmu na niti

3.4 Metoda respirometrie

Respirometrické testy byly založeny na měření koncentračních změn O₂ a CO₂ v plynné fázi. Pro analýzu pomocí respirometrie byl odebrán svazek nití. Odběry probíhaly každé 2 týdny. Svazek byl umístěn do 300 ml lahve obsahující 90 ml odtoku z reaktoru, dále 10 ml fosfátového pufru a roztok chloridu amonného s celkovým obsahem 10 mg/l dusíku v amonných iontech.

Na respirometru byla sledována spotřeba kyslíku po dobu přibližně 47 až 50 hodin. V posledním testu byla spotřeba sledována 138 hodin kvůli stanovení maximální možné respirace.



Graf 3: Hodnoty BSK z respirometrického měření pro 1. odběr



Graf 4: Hodnoty BSK z respirometrického měření pro 2. odběr



Graf 5: Hodnoty BSK z respirometrického měření pro 3. odběr

Po ukončení měření na respirometru byla také změřena konečná koncentrace amonného a dusičnanového dusíku. Tento test byl prováděn jako kontrola. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1 až 3.

Tabulka 1: Hodnoty koncentrací amonného a dusičnanového dusíku ve vzorcích z poslední fáze respirometrie pro vzorky ze 14. dne odběru

Den 14	Koncentrace [mg/l]							
201121	PUR 1	PUR 2	PA 1	PA 2	K1	K2		
NH₄⁺-N	0,91	0,93	6,2	6,1	10	10		
NO₃ ⁻ -N	9,8	10,1	5,1	5	0,51	0,43		

Tabulka 2: Hodnoty koncentrací amonného a dusičnanového dusíku ve vzorcích z poslední fáze respirometrie pro vzorky z 28. dne odběru

Den 28	Koncentrace [mg/l]							
	PUR 1	PUR 2	PA 1	PA 2	K1	K2		
NH₄⁺-N	0,8	0,82	4,5	4,6	9,85	9,9		
NO₃⁻-N	8,34	8,92	7,82	7,81	1,2	1,23		

Tabulka 3: Hodnoty koncentrací amonného a dusičnanového dusíku ve vzorcích z poslední fáze respirometrie pro vzorky z 39. dne odběru

Den 39	Koncentrace [mg/l]							
Den 05	PUR 1	PUR 2	PA 1	PA 2	K1	K2		
NH₄⁺-N	0,14	0,12	3,5	3,9	10	10		
NO₃⁻-N	11,8	11,9	6,8	7,1	1,1	0,8		

3.5 Chemická analýza

Vzorky pro chemickou analýzu byly odebírány každý týden přímo z reaktoru. Odebraná voda byla filtrována přes filtr s průměrem pórů 45 μm. Následně byla měřena koncentrace těchto látek; NO₂⁻-N, NO₃⁻-N, PO₄³⁻-P, NH₄⁺-N z filtrátu a CHSK z filtrované i nefiltrované vody. Koncentrace v jednotlivých dnech jsou zaznamenány v tabulce 4.

Koncentrace [mg/l] Den 7 Den 14 Den 21 Den 28 Den 35 Den 39 **CHSK**_{nef} 63,4 69,8 70,8 105 71,2 52 **CHSK**_{filtr} 8,99 11,1 17,2 12,3 17,6 11,8 NO₂⁻-N 0,025 0,05 0,41 0,199 0,591 0,356 NO₃⁻-N 12,1 11,4 10,6 12,5 10,3 10,9 NH4⁺-N 0,706 0,363 0,921 0,234 1,41 1,03 PO₄³⁻-P 20,5 20 16,6 19,4 20,6 21,8

Tabulka 4: Změny chemického složení v reaktoru v průběhu testu

V reaktoru bylo každý týden měřeno pH a udržováno okolo hodnoty 7. Pokud došlo k výraznějšímu poklesu, bylo pH upraveno pomocí roztoku NaOH. Průběh pH je zaznamenán v tabulce 5.

Tabulka 5: Hodnoty pH v bioreaktoru v průběhu testu

	Den 7	Den 14	Den 21	Den 28	Den 35	Den 39
pH před úpravou	6,43	6,6	6,7	6	6,83	6,5
pH po úpravě	7,5	7,5	6,7	7,5	6,83	6,5

Při každé výměně živného média byla v médiu měřena koncentrace NH4⁺-N a PO4³–P. Koncentrace jsou zobrazeny v tabulce 6.

	Koncentrace [mg/l]									
	Den 1	Den 7	Den 11	Den 15	Den 21	Den 28	Den 32	Den 35		
NH₄⁺-N	15,2	10,8	11	10,6	10,8	10,4	10,7	10,8		
PO4 ³⁻ -P	11,7	18,1	19,5	19,3	19,9	18,8	19,5	19,5		

Tabulka 6: Koncentrace amoniakálního dusíku a fosforečnanů v živném médiu pro bioreaktor

3.6 Metoda FISH

Pro tuto metodu bylo odstřiženo každý týden jedno vlákno dlouhé 8,7 cm. Následně byl vzorek vložen do 10 ml zkumavky s médiem a vytřepán po dobu 10 minut na třepačce. Ze zkumavky bylo odebráno vlákno a médium s biomasou z vláken bylo centrifugováno. Po centrifugaci byl odlit supernatant a celý proces se ještě jednou opakoval. Po druhé centrifugaci byla peletka biomasy resuspendována v 1 ml destilované vody. Před fixací byl vzorek uložen v mrazicím boxu při teplotě -22 °C.

Fixace vzorku na sklíčko probíhala dle zavedeného postupu v laboratoři mikrobiologie v následujících krocích:

1. Aplikace vzorku na sklíčko

V prvním kroku bylo naneseno malé množství vzorku (μl) do jamky na mikroskopickém sklíčku. Sklíčko se vzorkem bylo vysušeno v termostatu při teplotě 42 °C.

2. Permeabilizace

Vzorek byl pokryt vrstvou lysozomu pro permeabilizaci buněk a inkubován po dobu 20 minut. Následně byl lysozom ze vzorků omyt pomocí PBS a sklíčko bylo opět vysušeno v termostatu.

3. Dehydratace

Vzorek byl dehydratován v ethanolu, kdy bylo sklíčko postupně ponořeno do několika zkumavek s rostoucí koncentrací ethanolu. Poté bylo sklíčko opět sušeno v termostatu.

4. Hybridizace

V tomto kroku dochází k nanesení hybridizačního pufru na sklíčko. Hybridizační pufr obsahuje specifické fluorescenční sondy. Pro AOB a NOB se sondy liší. V obou pufrech je pak společná sonda pro většinu bakterií označená jako EUB338mix. Po aplikaci pufru na dehydratovaný vzorek je sklíčko vloženo do zkumavky a inkubováno v termostatu po dobu 1,5 - 2 hod.

5. Praní

Po inkubaci je sklíčko omyto v pracím pufru, kdy dochází k vymytí balastu ze vzorku.

6. Příprava sklíčka pro mikroskopování

Sklíčko je vysušeno mírným proudem dusíku. Do každé jamky je pipetován Citifluor a vzorek je překryt krycím sklíčkem. Tímto krokem je vzorek připraven k mikroskopování.

Sklíčko bylo pozorováno pod optickým mikroskopem s fluorescenční lampou při 630násobném zvětšení za použití filtrů (43 Cy3 a 44 FTIC). Focení probíhalo v programu Axio vision a každý výsledný snímek byl poskládán z několika dílčích snímků v různých hloubkách ostrosti. Z každé jamky bylo nafoceno několik výsledných snímků, optimálně 15 až 20. U některých vzorků však bylo málo biomasy, a nebylo tak možné vyfotit potřebný počet. V těchto případech byl nafocen maximální možný počet snímků a hodnocení probíhalo z menšího počtu fotek.

Vyhodnocení fotek probíhalo v softwaru Matlab, v programu od Ing. Lucie Svobodové Ph.D., která pomáhala s vyhodnocením snímků. Vyhodnocovalo se procentuální zastoupení nitrifikačních bakterií, tj. AOB a NOB v kalu.



Obrázek 9: Optický mikroskop Axio Imager.M2

Na snímku z optického mikroskopu (obrázek 10) je zobrazena obarvená biomasa s nitrifikanty. Zeleně obarvená část je sonda barvicí většinu bakterií, červeně je pak vyobrazena sonda pro AOB nebo NOB.



Obrázek 10: Ukázka obarvené biomasy s bakteriemi, v tomto případě NOB na PUR nosiči při 2. odběru (14. den)

Po vyhodnocení byly odstraněny odlehlé hodnoty, a také byly smazány vzorky, kde bylo méně než 5 snímků, aby nebyly výsledky zavádějící. Z tohoto důvodu u některých vzorků chybí duplikát. Výsledné hodnoty, udávající procentuální zastoupení námi sledovaných AOB, či NOB bakterií v biomase, jsou zobrazeny v grafech č. 6-9.



Graf 6: Zastoupení AOB na PUR nosiči pro jednotlivé odběry

V grafu 6 je zobrazeno procentuální zastoupení AOB nitrifikantů v biomase z PUR nanovláken. V průběhu experimentu nedochází k výraznějším změnám a podíl nitrifikantů je přibližně stejný.



Graf 7: Zastoupení NOB na PUR nosiči pro jednotlivé odběry

U NOB nitrifikantů na PUR nanovláknech hodnoty v průběhu experimentu značně kolísají. Při porovnání posledních odběrů s prvními je však vidět pokles.



Graf 8: Zastoupení AOB na PA nosiči pro jednotlivé odběry

Podíl AOB nitrifikantů z PA mikrovláken se v průběhu testu také příliš nemění. Z obou vláken tedy můžeme usoudit, že první krok nitrifikace, tedy oxidace amonných iontů na dusitany probíhá konstantně.



Graf 9: Zastoupení NOB na PA nosiči pro jednotlivé odběry

Graf zobrazující podíl NOB nitrifikantů z PA mikrovláken má klesající charakter. Příčinou může být pokles koncentrace dusitanů.

3.7 Metoda molekulárně genetická

Pro analýzu DNA byl každý týden odebrán svazek vláken v duplikátu. Z odebraných vláken byla izolována DNA pomocí kitu. Každý svazek vláken byl zvážen, aby byla možnost udávat koncentraci izolované DNA na hmotnost nosiče.

Po izolaci byla změřena koncentrace izolované DNA na fluorometru a výsledky byly přepočtem v jednotkách µg DNA/g nosiče. Nárůst koncentrace je v grafech 10 a 11. Testovány byly duplikáty, proto jsou u každého odběru 2 hodnoty.

U PUR vláken nejsou v průběhu testu pozorovány významnější změny v koncentraci DNA, patrný je jen menší nárůst mezi 3. a 4. odběrem.



Graf 10: Změny koncentrace DNA z PUR vláken přepočtené na gram nosiče

Změny v koncentraci izolované DNA z PA vláken jsou podstatně výraznější než u PUR vláken. Je zde vidět nárůst mezi 2. a 3. odběrem, dále pak vzrostla koncentrace u posledního odběru. Nárůst v průběhu experimentu signalizuje nárůst biofilmu na PA nosiči, nehledě na přesné bakteriální složení. Tento trend potvrzuje i graf 1 (kapitola 3.3) zobrazující zastoupení biofilmu pomocí optické mikroskopie.



Graf 11: Změny koncentrace DNA z PA vláken přepočtené na gram nosiče

Z izolované DNA byla provedena real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR analýza) na přístroji. Jako fluorescenční zdroj bylo použito fluorescenční barvivo typu SYBR Green. Cílem qPCR analýzy bylo ve vzorku detekovat jak celkové bakteriální oživení, tak i přítomnost funkčních genů a klíčových mikrobiálních konsorcií podílejících se na biologické eliminaci dusíkatých sloučenin. Konkrétně byly sledovány bakterie podílející se na obou krocích nitrifikace, oxidace amoniaku (AOB) a dusitanu (NOB).

Celkové bakteriální oživení bylo sledováno amplifikací genu 16SrDNA kódující malou podjednotku prokaryot pomocí markeru s označením U16SRT. První krok nitrifikace byl sledován pomocí funkčního genu kódujícího klíčový enzym oxidace amoniaku na dusitan (*amoA*) specifického pro bakteriální rod *Nitrosomononas*. Pro druhý krok nitrifikace byly funkční geny kódující klíčové enzymy oxidace dusitanu na dusičnan detekovány pomocí markerů specifických pro bakteriální rody *Nitrobacter*

(*NxrB1, nxrA*) a *Nitrospira* (*NxrB*). Přítomnost bakteriálního rodu *Nitrospira* byla ve vzorcích také sledována amplifikací 16S rDNA genu *Nitrospiry* použitímmarkeru s označením NSR. Podrobnější informace k testovaným markerům jsou uvedeny v tabulce 7.

Cílová skupina	Marker	Gen	Sekvence primeru ¹ (5' \rightarrow 3')	Zdroj	
			F:		
bakterie	U16SRT	16SrDNA	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	(Clifford et al., 2012)	
			R: TATTACCGCGGCTGCTGGC		
		amoniak	F: GGGGTTTCTACTGGTGGT	(Rotthauwe et al	
AOB	amoA	monooxygenáza,	Ρ. CCCTCVCSAAACCCTTCTTC	1007)	
		Nitrosomonassp.	R. CCCTCRGSAAAGCCTTCTTC	1997)	
	NCD	165×DNA Nitrochirach	F: CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	(Dianisi at al. 2002)	
	INSK	16SrDNA <i>Nitrospira</i> sp.	R: GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	(Diomsi et al., 2002)	
		nitrit oxidoreduktáza F: ACGTGGAGACCAAGCCGGG		(Vanparys et al.,	
	NxrB1	β subjednotka,		2006; Geets et al.,	
		Nitrobactersp.	R. CONGCIGITGATCICOTIGA	2007)	
NOB		nitrit oxidoreduktáza	F: CAGACCGACGTGTGCGAAAG		
	nxrA	α subjednotka,		(Poly et al., 2008)	
		Nitrobactersp.	R: TCYACAAGGAACGGAAGGTC		
		nitrit oxidoreduktáza	F: TACATGTGGTGGAACA		
	nxrB	β subjednotka, <i>Nitrospira</i> sp.	R: CGGTTCTGGTCRATCA	(Pester et al., 2013)	

Tabulka 7: Sekvence primerů pro nitrifikanty

Výsledky qPCr analýzy jsou vyjádřeny tzv. heatmapou v obrázku 10. Data z analýzy qPCR byla normalizována na množství vzorku (vzorec: $Ct_{value} + \frac{\log(hmotnostvlákna)}{\log(účinnostprimeru)}$) a byl proveden průměr ze získaných hodnot duplikátu u každého vzorku.

Heatmapa je vytvořena následujícím postupem: 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

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

hranici detekce. Druhá množina byla rozdělena na tři stejně široké intervaly a postupně od nejnižších hodnot byly intervaly zařazeny do skupin: vysoké množství, střední množství a malé množství. Ct hodnoty rovné 40 jsou ve skupině nedetekováno, tedy pod mezí stanovitelnosti. Jednotlivé skupiny (intervaly) jsou v heatmapách prezentovány patřičnými barvami.

Tabulka 8: Heatmapa

		celková bakteriální biomasa	AOB		NO	3	
Vzorek	Odběr	U16SRT	amoA	NSR	NxrB1	nxrA	nxrB
	1.	++	++	+++	+-	+	++
	2.	+	++	++	+-	+-	++
DUR	3.	+	+	++	+-	+	++
TON	4.	+++	+	++	+-	+	++
	5.	++	++	++	+	+	++
	6.	++	++	+++	++	+++	+++
	1.	+++	+++	+++	+	++	+++
	2.	++	+++	+++	++	++	+++
ΡΔ	3.	++	+++	+++	+++	+++	+++
	4.	+++	++	++	++	+++	++
	5.	++	+	+	+	+	+
	6.	+++	++	++	+++	+++	++
+++	vysoké množství						
++	střední množství						
+	malé množství						
+-	mez	detekce					
NA	nede	tekováno					

Při pohledu na PUR vlákno v heatmapě je zřejmý nárůst NOB bakterií. Zejména markery NxrB1 a nxrA specifické pro bakteriální rod *Nitrobacter*. Tomu by měla odpovídat větší míra zastoupení NOB bakterií v biofilmu hodnocených metodou FISH v grafu č. 7, ale není tomu tak. Vysvětlit to lze tím, že qPCR analýza sleduje pouze malé změny a Ct hodnoty (Příloha, tabulka 9) pro rod *Nitrobacter* jsou vysoké. Znamená to tedy, že už od počátku testu bylo jejich zastoupení velice malé. Mnohem větší

zastoupení mají markery NSR a nxrB pro *Nitrospira sp.* U AOB nitrifikantů nedochází k výraznějším změnám.

U PA nosiče jsou Ct hodnoty vyšší a jen v 5. odběru dochází k výraznějšímu poklesu u všech nitrifikačních bakterií. Porovnáním obou nosičů lze dospět k závěru, že zatímco u PUR nanovlákna se bakteriální složení biofilmu mění a sledujeme nárůst NOB, u PA nosiče se složení biofilmu nemění a změny v zastoupení AOB a NOB nitrifikantů jdou "ruku v ruce".

Relativní kvantifikace popisuje relativní změnu množství daného primeru vůči referenčnímu vzorku, kterým je například vzorek z prvního odběru monitoringu. Hodnota relativní kvantifikace referenčního vzorku je 1 pokud je hodnota relativní, 2 pokud v tomto vzorku je dvakrát více cílové DNA než v referenčním vzorku. Výsledky jsou v grafech 12 a 13.

U PUR nanovláken nedochází během prvních 5 odběrů k výrazným změnám, pouze ve 4. odběru pozorujeme pokles AOB. U posledního odběru je vidět nárůst NOB nitrifikantů.



Graf 12: Relativní kvantifikace PUR vláken, popisující změny koncentrace jednotlivých genů v průběhu experimentu. Odběry jsou označeny různými barvami.

U PA vláken dochází ve srovnání s PUR vlákny k výraznějším změnám během jednotlivých odběrů. Patrný je pokles AOB nitrifikantů ve 4. a 5. odběru. V posledních 3 odběrech dochází také k poklesu NSR a nxrB markerů specifických pro bakteriální rod *Nitrospira*.



Graf 13: Relativní kvantifikace PA vláken, popisující změny koncentrace jednotlivých genů v průběhu experimentu. Odběry jsou označeny různými barvami.

4 DISKUZE

Respirometrií byla měřena koncentrace spotřebovávaného kyslíku za současné produkce oxidu uhličitého. Na základě těchto výsledků byla stanovena hodnota BSK (viz. kapitola 2.4.2) pro jednotlivé vzorky ve druhém, čtvrtém a šestém odběru. Vyhodnocením BSK jednotlivých měření můžeme sledovat koncentraci biologicky odbouratelných látek (BOL), které jsou přítomné na testovaných vláknech v podobě biofilmu. Hodnoty BSK pro vlákenné vzorky v druhém odběru byly po odečtení kontroly záporné, což znamená nulovou koncentraci BOL na vláknech. Ve čtvrtém odběru došlo k mírnému nárůstu biofilmu na vláknech, který se projevil zvýšením hodnot BSK oproti kontrole. Další výrazný nárůst byl zaznamenám v posledním avšak **BSK** (šestém) odběru, hodnoty jsou velmi rozdílné (i v rámci duplikátu). Na základě tohoto trendu lze usuzovat na nerovnoměrném rozložení biofilmu na vláknech. Rozdíl v rámci PUR a PA vláken se ve druhém a čtvrtém odběru neprojevuje. U obou typů vláken se v posledním odběru projevila nehomogenita. Výrazně vyšší obsah BOL byl naměřenu nanovláken PUR.

Metodou optické mikroskopie bylo hodnoceno procentuální zastoupení biofilmu na testovaných vláknech. U polyamidových mikrovláken se v průběhu experimentu množství biomasy zvyšuje. Naopak v případě PUR nanovláken nejprve dochází k výraznému nárůstu biofilmu, jehož množství od 3. odběru mírně klesá. Tento trend může být způsoben slabou adhezí biofilmu k povrchu vláken a jeho následnou ztrátou vlivem mechanického (střižného) namáhání (aerace systému).

Na základě FISH analýzy můžeme určit zastoupení jednotlivých AOB a NOB mikroorganismů, které se podílejí na procesu nitrifikace, tedy na odstraňování amonných sloučenin z odpadní vody reaktoru a ve značné míře tvoří biofilm na vláknech. Množství NOB je v případě obou vláken vyšší než AOB, což lze vysvětlit zvýšenou produkcí dusitanových iontů, které tvoří vhodné podmínky právě pro NOB. Na polyamidových mikrovláknech je procentuální zastoupení AOB i NOB vyšší než na polyuretanových nanovláknech. Vývoj zastoupení NOB byl v průběhu experimentu spíše klesající pro obě vlákna, zatímco vývoj AOB má značně kolísavý charakter. S poklesem NOB také souvisí narůstající koncentrace dusitanů, jejíž výsledky máme z chemické analýzy. Molekulárně genetická metoda umožnuje specifické analýzy biofilmu na základě níž můžeme v jednotlivých vzorcích sledovat specifické zastoupení testovaných bakteriálních genů kódující enzymy, jenž se podílí na procesu nitrifikace. Pomocí koncentrace DNA bylo pozorováno množství mikroorganismů na vláknech. Z naměřených hodnot vidíme nárůst mikrobiální biomasy v průběhu experimentu především na PA mikrovláknech. Výsledky qPCR, představující konkrétnější zastoupení mikroorganismů, tj. AOB a NOB, které jsou znázorněny ve formě heatmapy a pomocí relativní kvantifikace. Na heatmapě lze pozorovat větší množství AOB i NOB na PA mikrovláknech. U mikrovláken je detekováno vyšší množství bakteriálního rodu *Nitrobacter* než u nanovláken. V průběhu experimentu byl na mikrovláknech zaznamenán nárůst bakterií rodu *Nitrobacter*a pokles bakterií rodu *Nitrospira*. Na grafech relativní kvantifikace lze pozorovat, že změny zastoupení testovaných genů na obou typech vláken byly minimální (do jedné šestnáctiny).

Celkovým pohledem na jednotlivé metody lze dospět k následujícím poznatkům. Zastoupení biofilmu a v něm obsažených mikroorganismů se podle jednotlivých metod mírně liší, avšak sledováním trendů lze dojít ke shodným závěrům. Výsledky z optické mikroskopie a respirometrie (BSK) ukazují značné shody, odchylky jsou dány tím, že při stanovení na optické mikroskopii se vzorek v průběhu analýzy nijak nemění, zatímco během respirometrie se vzorek nachází v dynamickém systému. Porovnáním metod molekulárně genetických s metodou respirometrie a OM je možné vidět určitý kolísavý trend během experimentu. Zásadní rozdíl mezi metodami FISH a molekulární genetiky může být v přítomnosti DNA v biofilmu. Zatímco molekulárně genetická metoda analyzuje veškerou nedenaturovanou DNA v biofilmu (tedy i z mrtvých buněk), metodou FISH se stanoví pouze DNA v celistvých (neperforovaných) buňkách.

Výsledky chemické analýzy sloužily především pro kontrolu, zda nitrifikace probíhá. Koncentrace dusičnanů celou dobu zůstávaly přibližně stejné. Koncentrace dusitanů byla zpočátku experimentu nižší, zvýšila se až při třetím odběru. Tento pokles je v souladu s výsledky z FISH.

5 ZÁVĚR

Náplní této práce bylo analyzovat účinnost mikroorganismů v odpadních vodách pomocí několika metod. Ačkoliv se v principu jedná o zcela odlišné metody, tak nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl ve výsledcích a lze na základě určitých modifikací tyto metody používat pro vzájemné ověření. Je třeba mít na paměti, že se jedná o biologický pokus s živými organismy, které jsou citlivé na vnější podmínky. Při porovnání je třeba brát v potaz podstatu stanovení, způsob vyhodnocení, citlivost jednotlivých metod a vliv prostředí na sledované parametry.

Metoda FISH má svá úskalí a je třeba důsledně dodržovat postup při přípravě vzorku. V případě nedodržení může dojít ke špatnému určení. Dalším problémem je hustota biomasy. V případě málo hustého vzorku nemusí být na sklíčku dostatek biomasy pro vyfocení potřebného počtu snímků. V opačném případě, kdy bude vzorek příliš hustý, dojde k navrstvení kalu a pro vyfocení v celé hloubce ostrosti bude potřeba větší počet snímků. Výhodou této metody je přesné určení zastoupení AOB, či NOB bakterií v biomase.

Analýza DNA pomocí qPCR je vhodná metoda, pokud v biomase je malé zastoupení sledovaných bakterií. Oproti FISH pracujeme se samostatnou izolovanou DNAa nemůžeme vizualizovat celistvé buňky, ale můžeme sledovat i malé změny uvnitř biofilmu. PCR je citlivá metoda a je teoreticky schopna identifikovat jediný gen.

Z výsledků relativní kvantifikace vyplývá, že v dalších experimentech by bylo vhodné začít se vzorkováním již třetí den od spuštění, jelikož po týdnu od zanoření vláken do reaktoru se již množství specifické biomasy výrazně neměnilo. Na druhou stranu v dalších metodách se na počátku experimentů nedějí výrazné změny. Tento jev je pravděpodobně dán prvotním utvářením biofilmu nejen na povrchu vláken, ale i uvnitř, kdy pouze metoda qPCR odhalí i menší změny. Ostatní metody nejsou schopné zjistit utváření méně aktivního biofilmu uvnitř vláken.

Porovnáním metod molekulárně genetických s metodami respirometrie a optické mikroskopie dostáváme úplně nový náhled na analýzu biofilmu. Do budoucna se v této oblasti vyskytuje řada možností pro další zlepšování a snahou bude provedení série pokusů, které budou statisticky vyhodnoceny.

LITERATURA

AMBROŽOVÁ, Jana, 2004. *Mikrobiologie v technologii vod*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha. Str. 112-157. ISBN 80-7080-534-X.

AZEREDO, Joana, Nuno F. AZEVEDO, Romain BRIANDET, Nuno CERCA, Tom COENYE, Ana Rita COSTA, Mickaël DESVAUX, Giovanni DI BONAVENTURA, Michel HÉBRAUD, Zoran JAGLIC, Miroslava KAČÁNIOVÁ, Susanne KNØCHEL, Anália LOURENÇO, Filipe MERGULHÃO, Rikke Louise MEYER, George NYCHAS, Manuel SIMÕES, Odile TRESSE a Claus STERNBERG, 2017. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. **43**(3), Str. 313–351. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/1040841X.2016.1208146.

BISHOP, Ryan, 2010. Applications of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance, *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, květen 2010, Str. 85–95.

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

DIONISI, Hebe M., Alice C. LAYTON, Gerda HARMS, Igrid R. GREGORY, Kevin G. ROBINSON a Gary S. SAYLER, 2002. Quantification of Nitrosomonasoligotropha-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria and Nitrospira spp. from Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 68(1), Str. 245–253. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.1.245-253.2002.

DŘÍMAL, Pavel a Jaromír HOFFMANN. Automatizovaný systém kontinuálního sledování aerobního biologického rozkladu látek ve vodním i půdním prostředí. *Chemické listy* [online]. 2008, ISSN 1213-7103. Str. 139-147.

GEETS, Joke, Michaël DE COOMAN, Lieven WITTEBOLLE, Kim HEYLEN, Bram VANPARYS, Paul DE VOS, Willy VERSTRAETE a Nico BOON, 2007. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 75(1), 211–221. ISSN 0175-7598, 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-006-0805-8.

KRÁLÍK, Petr a Matteo RICCHI. 2017. "A Basic Guide to Real Time PCR in MicrobialDiagnostics: Definitions, Parameters, and Everything." *Frontiers in microbiology*. 2017, doi:10.3389/fmicb.2017.00108.

KŘIKLAVOVÁ, Lucie, 2009. *Technologický návrh biofilmového reaktoru s nanovlákenným nosičem pro čištění průmyslových odpadních vod*. Liberec. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci. Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií. Str. 33-34.

NEMČEKOVÁ, Klára, 2017. *Metoda FISH pro detekci biofilmu*. Pardubice. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická.

NIELSEN, Per Halkjær, Holger DAIMS a Hilde LEMMER, ed., 2009. FISH handbook for biological wastewater treatment: identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH. Londýn: New York : IWA Publishing, ISBN 978-1-84339-231-6.

PESTER, Michael, Frank MAIXNER, David BERRY, Thomas RATTEI, Hanna KOCH, Sebastian LÜCKER, Boris NOWKA, Andreas RICHTER, Eva SPIECK, Elena LEBEDEVA, Alexander LOY, Michael WAGNER a Holger DAIMS, 2013. NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira. *Environmental Microbiology* [online]. **16**(10), 3055–3071. ISSN 1462-2920. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.12300.

PITTER, Pavel, Hana KUJALOVÁ a Vladimír SÝKORA. 2016. *Hydrochemie: pro studenty bakalářského studia*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, ISBN 978-80-7080-949-5.

POLY, Franck, Sophie WERTZ, Elisabeth BROTHIER a Valérie DEGRANGE, 2008. First exploration of Nitrobacter diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene nxrA. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. **63**(1), 132–140. ISSN 0168-6496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00404.x.

RADECHOVSKÝ, Josef, ŠVEHLA, Pavel, HRNČÍŘOVÁ, Helena, PACEK, Lukáš. INHIBIČNÍ PŮSOBENÍ SLOUČENIN DUSÍKU PŘI NITRIFIKACI ODPADNÍCH VOD. *Chemické listy*. 5. Str. 892-896.

RATHNAYAKA, Udaya & DIAS, Gayani, 2018. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in food pathogen detection. *International Journal of Molecular Biology*. 3. Dostupné z doi:10.15406/ijmboa.2018.03.00066.

RULÍK, Martin, Veronika HOLÁ, 2012. Mikrobiální biofilmy 1. *Živa*. Všudypřítomný a přitom málo známý fenomén 3. Academia, Str. 104-106.

ROTTHAUWE, J H, K P WITZEL a W LIESACK, 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(12), 4704–4712. ISSN 0099-2240.

SPERLING, Marcos von a Marcos SPERLING, 2007. *Basic principles of wastewater treatment*. Londýn: IWA Publ. Biological wastewater treatment series, Marcos von Sperling. Str. 7-80 ISBN 978-1-84339-162-3.

SIUN CHEE Tan a BEOW CHIN Yiap. 2009. "DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present." *Journal of biomedicine & biotechnology* vol. 2009 (2009): 574398. Dostupné z: doi:10.1155/2009/574398.

VANPARYS, B., P. BODELIER a P. DE VOS, 2006. Validation of the correct start codon of norX/nxrX and universality of the norAXB/nxrAXB gene cluster in nitrobacter species. *Current Microbiology* [online]. **53**(3), 255–257. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-006-0161-z.

VANROLLEGHEM, Peter, 2002. "Principles of Respirometry in Activated Sludge Wastewater Treatment." *Proceedings International Workshop on Recent Development in Respirometry for Wastewater Treatment Plant Monitoring and Control*, Taipei, Taiwan. 2002, P.2/1-20, P.2/1-20.

PŘÍLOHY

	Průměrné Ct hodnoty normalizované na vstupní množství vzorku								
Účinnost ı	markerů:	2,004412	1,861265	1,8	1,873283	1,8	1,8		
		celková bakte- riální biomasa	AOB		NOB				
Odběr	Vzorek	U16SRT	amoA	NSR	NxrB1	nxrA	nxrB		
	PUR 1	16,37	32,55	20,95	36,65	36,20	28,47		
1.	PUR 2	16,36	32,62	20,62	36,89	35,51	28,26		
1.	PA 1	15,62	31,19	19,14	36,85	34,37	26,72		
	PA 2	15,79	31,35	19,35	34,19	34,58	26,99		
	PUR 1	16,99	32,89	21,22	36,41	36,14	28,84		
2	PUR 2	17,35	33,02	20,97	36,89	36,50	28,95		
2.	PA 1	16,43	30,43	19,99	34,55	34,16	26,74		
	PA 2	16,97	30,99	20,87	34,49	34,18	27,63		
3	PUR 1	17,81	33,12	21,45	38,12	35,94	28,79		
	PUR 2	18,00	35,13	21,49	37,27	35,38	28,76		
5.	PA 1	16,51	31,22	20,64	33,40	32,73	27,42		
	PA 2	16,32	31,35	20,31	33,83	32,45	27,51		
	PUR 1	15,38	35,92	21,60	37,23	34,99	29,48		
Л	PUR 2	15,40	35,67	21,27	36,65	35,91	28,96		
4.	PA 1	15,08	34,50	22,05	34,61	33,22	29,86		
	PA 2	14,50	32,39	21,03	35,38	33,40	28,74		
	PUR 1	16,84	33,06	21,17	35,06	35,15	28,67		
5	PUR 2	16,72	33,71	20,63	35,44	35,23	28,91		
5.	PA 1	16,37	34,15	23,47	35,10	34,23	31,45		
	PA 2	16,93	34,40	24,31	35,55	35,69	31,69		
	PUR 1	15,97	32,77	19,39	34,29	33,45	26,36		
F	PUR 2	15,91	32,07	19,18	34,73	33,67	25,58		
0.	PA 1	15,46	31,40	21,12	33,57	32,40	28,38		
	PA 2	15,73	33,63	21,16	35,21	34,54	29,76		

Tabulka: Ct hodnoty v průběhu testu normalizované na množství vzorku