



Využití metagenomiky při hodnocení sanace chlorovaných ethylenů *in situ* Výsledky pilotních testů

*Stavělová M., * Macháčková J., _Rídl J., ** Pačes J. ***

** Earth Tech CZ, s.r.o
** ÚMG AV ČR*



PROČ METAGENOMIKA?

- Příležitost účasti na výzkumném grantu
- Rychle rozvíjející se oblast moderní vědy zaměřená převážně na oblast základního výzkumu
- Oboustranně výhodné propojení základního výzkumu a praxe
- Praxe: hledáme možnosti efektivního využití metagenomiky pro hodnocení průběhu a výsledků sanace, nové pohledy a informace
- Věda: Vyvíjení nových postupů při zpracování reálných vzorků ze ŽP a vyhodnocování dat



CO JE METAGENOMIKA

- Umožňuje studium i nekultivovatelných mikroorganismů
- Studuje genetickou informaci mikroorganismů v daném prostředí pomocí metod molekulární biologie
- Využívá izolace veškeré DNA přímo ze vzorku, která je pak sekvenována na genomovém sekvenátoru. Získaná data jsou dále zpracovávána bioinformatickou analýzou
- Výsledkem je úplné či částečné sestavení genomu studovaného mikroorganismu či mikrokosmu
- Genom organismu představuje kompletní předpisy pro procesy vykonávané v buňkách – jde o strukturní a stavební funkce, přenosy informací či metabolické pochody



SEKVENAČNÍ ANALÝZA

- Předmětem je čtení pořadí nukleotidů řetězce DNA
- Sangerovo sekvenování (klasická metoda, ve velkých centrech, finančně i časově náročné pro účely metagenomických výzkumů)
- Alternativa – analýzy zaměřené jen na malý počet předem známých genů, informace ochuzená o neznámé sekvence a druhy
- Genomové sekvenátory – masivní paralelní čtení statisíců krátkých úseků DNA. Genomový sekvenátor GS RLX Titanium, Roche dokáže během jedné několikahodinové procedury přečíst až milion sekvenací o délce 400 bp



STUDOVANÉ LOKALITY KONTAMINOVANÉ CHLOROVANÝMI ETHYLÉNY

LOKALITA A

*Reduktivní
dehalogenace/
aplikace syrovátky*

A-1	Oblast po ukončení pilot.testu
A-2	Kontaminovaná oblast před sanací
A-3	Pozadí

LOKALITA B

*Reduktivní
dehalogenace/
aplikace syrovátky*

B-1	Kontaminovaná oblast před sanací
B-2	Pozadí

LOKALITA C

*Chemická oxidace/
aplikace ozónu*

C-1	Oblast po ukončení pilot.testu
C-2	Kontaminovaná oblast před sanací

LOKALITA A


objekt	jednotka	A-1	A-2	A-3
methan	µg/l	420,00	<5	<5
ethan	µg/l	<5	<5	<5
ethylen	µg/l	<5	<5	<5
vinylchlorid	µg/l	5,50	24,00	<4,00
cis-1,2-dichlorethylen	µg/l	680,00	1 800,00	<1,00
trichlorethylen	µg/l	17,00	9 600,00	1,70
tetrachlorethylen	µg/l	28,00	8 800,00	1,10
SUMA CIU	µg/l	730,50	20 224,00	<2,20
CHSK-Cr	mg/l	1 020,00	<5,00	<5
dusičnany	mg/l	<2,00	<2,00	19,00
sírany	mg/l	<5,00	64,00	19,00
pH	-	6,21	7,32	6,91
konduktivita	uS/cm	1804	682	1520
E(H)	mV	125	240	430
PID (atmosféra ve vrtu)	ppm	0	18	1,6
CH4 (atmosféra ve vrtu)	ppm	34717	3251,9	77,6
IR (atmosféra ve vrtu)	ppm	39672	7510	912
CO2 (atmosféra ve vrtu)	ppm	100542	26483	20540



METAGENOMICKÁ ANALÝZA

(vzorek A2, kontaminovaná oblast před sanací)

- 1L vody filtrace na filtru 0,22 μ m
- Izolace DNA z bakterií zachycených na filtru (výtěžek 774 ng DNA)
- Amplifikace, tj. namnožení DNA na 14,6 μ l (3 paralelní série)
- Příprava sekvenační knihovny
- Bioinformatická analýza
 - Anotace sekvenací, tj. porovnání s databázemi známých genů
 - Anotované sekvenace jsou vstupem pro taxonomickou analýzu (zastoupení jednotlivých mikroorganismů) a funkční analýzu (vyhledávání genů pro určité proteiny a jejich funkční seskupení do funkčních celků)



Přehled výsledků sekvenační procedury vzorku A2.

Počet čtení	235609
Celkový počet bází	54865456
Průměrná délka čtení	233
Délka čtení - std. dev.	65
Nejdelší čtení	425
Nejkratší čtení	22
Délka čtení - medián	213

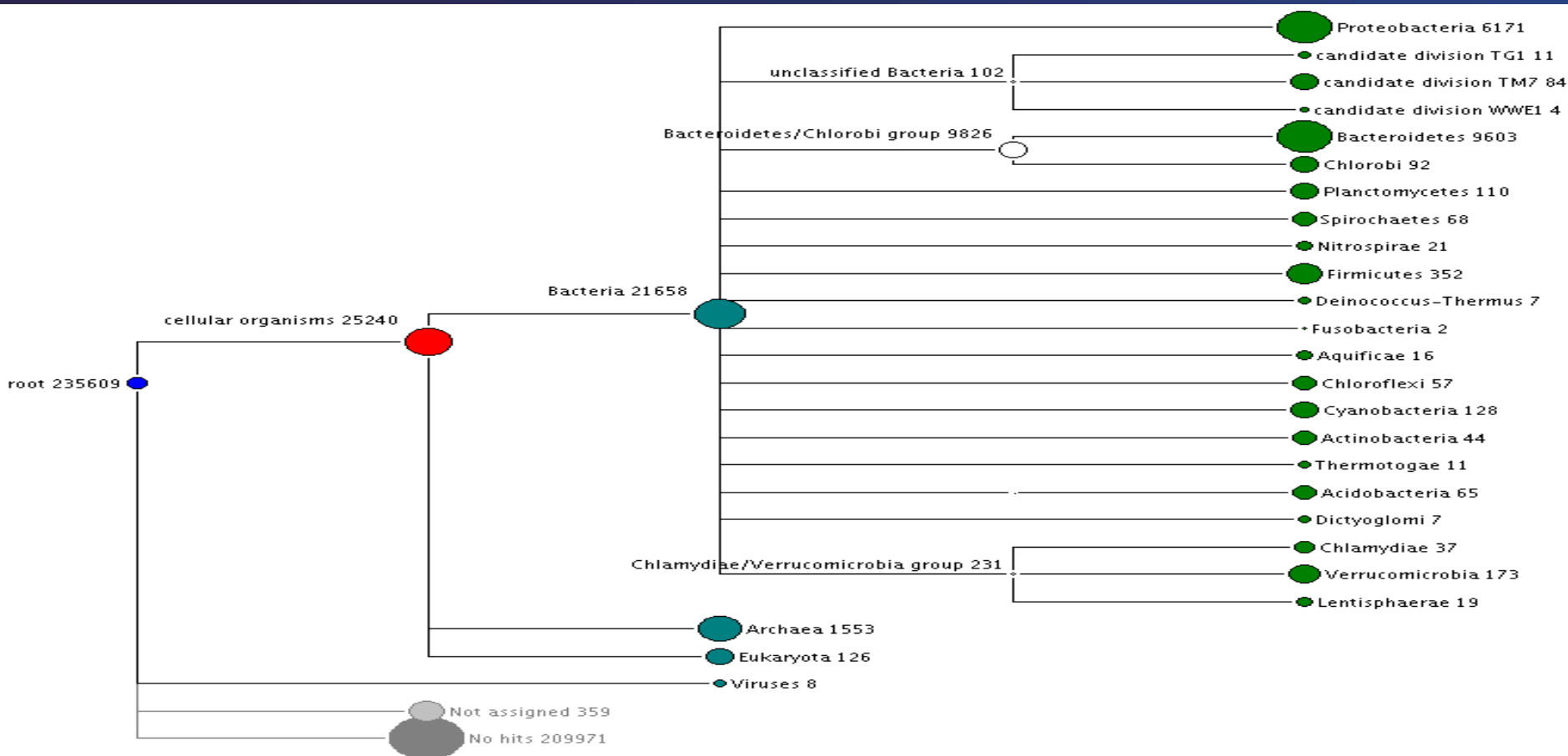


VÝSLEDKY ANALÝZY VRTU A-2

- Zastoupení mikroorganismů není xenobiotiky redukováno, na druhové úrovni lze vysledovat několik nabohacených druhů
- Byl identifikován biodegradačně aktivní gen redukční dehalogenázy, jehož nositeli jsou bakterie rodu *Dehalococcoides* – tj. potvrzení přítomnosti bakterií z požadovanými biodegradačními vlastnostmi na lokalitě před zahájením sanace
- Momentálně se zpracovávají i ostatní vzorky z lokality A (pozadí a oblast po aplikaci syrovátky) a vzorky z lokalit B a C

TAXONOMICKÁ ANALÝZA – vzorek A2

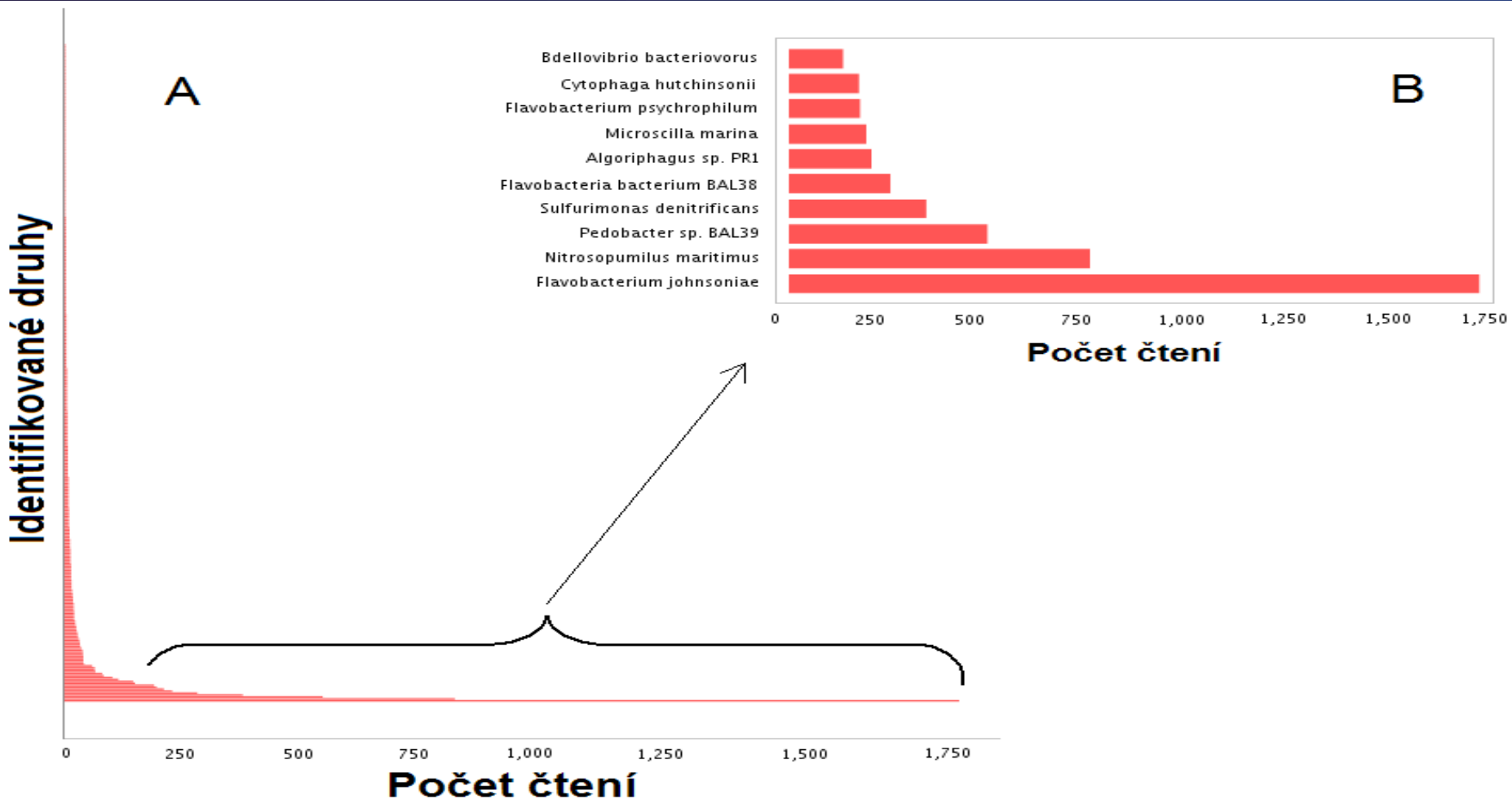
Z celkového počtu 235609 čtení (modře *root*) bylo taxonomicky zařazeno 25240 (červeně *cellular organisms*). Ostatní čtení nevykazují podobnost se známými geny (*No hits*) nebo jejich podobnost není dostatečná pro taxonomickou analýzu (*Not assigned*). Zeleně jsou zvýrazněny bakteriální taxony na úrovni řádu.



Počet čtení přiřazených identifikovaným druhům ve vzorku A2.

A) Graf všech identifikovaných druhů.

B) Graf počtu čtení přiřazených k 10 nejčastěji identifikovaným druhům.





Počet čtení přiřazený známým mikrobiálním degradérům spojeným s redukční dechlorací

Bakterie	Počet čtení
Desulfotomaculum reducens	5
Desulfitobacterium hafniense	6
Dehalococcoides	9



OČEKÁVANÉ KONKRÉTNÍ VÝSTUPY PRO OBLAST SANAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

Např. odpovědi na otázky:

- je pro úspěšný průběh reduktivní dehalogenace nezbytně nutná přítomnost bakterie rodu *Dehalococoides*?
- je na všech lokalitách při aplikaci reduktivní dehalogenace přítomna mikroflóra s obdobnou či odlišnou skladbou?
- Pokud má mikroflóra skladbu odlišnou, je funkční genová skladba obdobná či odlišná?
- Existují nezastupitelné druhy či geny pro kompletní průběh reduktivní dehalogenace?
- Za jak dlouho se po ukončení sanačního zásahu na lokalitě objeví původní půdní mikroflóra?
- K jakým změnám půdní mikroflóry dojde po aplikaci ozónu?



DĚKUJI ZA POZORNOST