

APLIKACE METAGENOMIKY PRO HODNOCENÍ PRŮBĚHU SANAČNÍHO ZÁSAHU NA LOKALITÁCH KONTAMINOVANÝCH CHLOROVANÝMI ETHYLÉNY

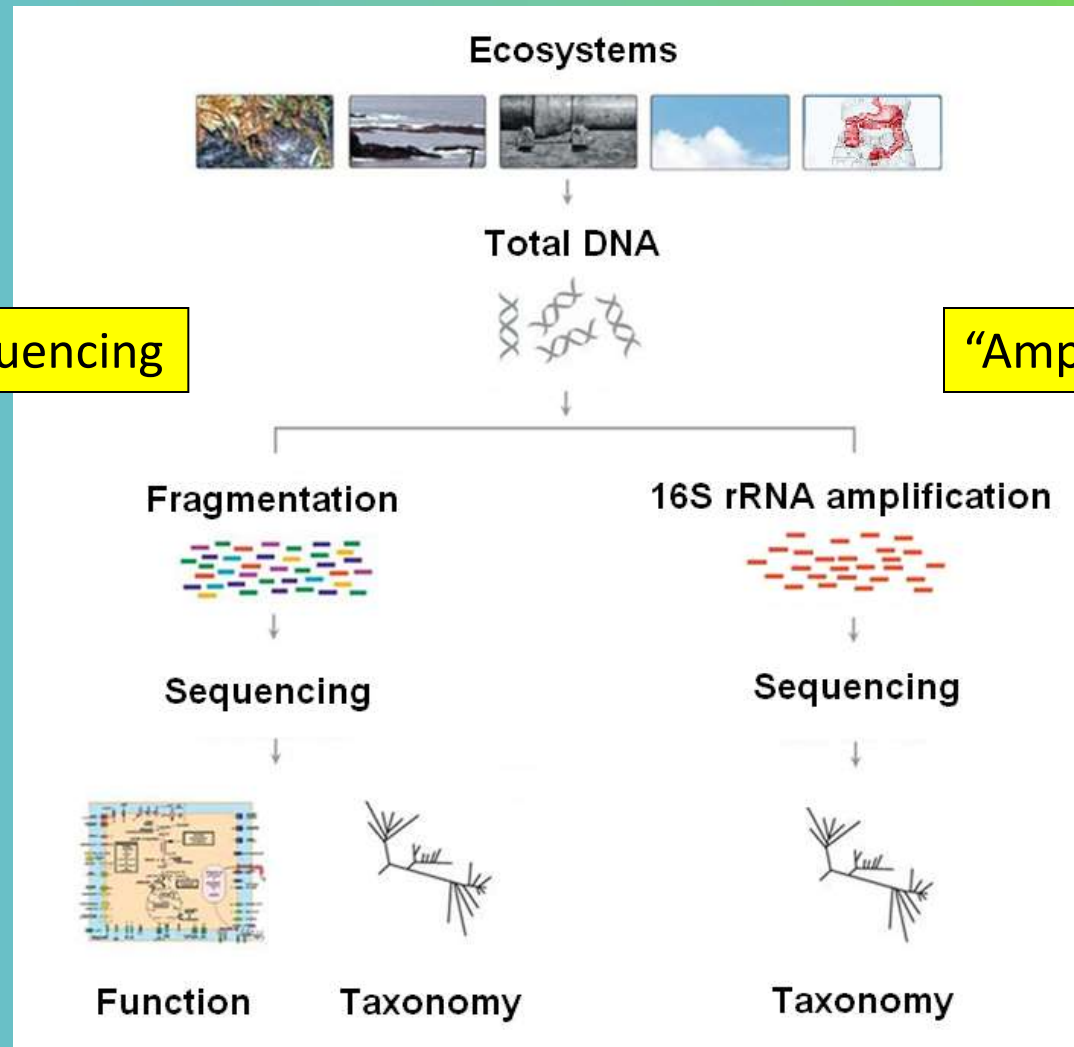
Monika Stavělová ¹, Jakub Rídl ², Maria Brennerová ³,
Hana Kosinová¹, Jan Pačes ²

¹AECOM CZ, s.r.o., ² ÚMG AV ČR, v.v.i., ³ MBÚ AV ČR, v.v.i.

1.Úvod

- Cílem projektu METAGENOM bylo smysluplné propojení výsledků a poznatků základního výzkumu s potřebami praxe
- Metagenomika studuje mikroorganismy metodou izolace veškeré DNA přítomné ve vzorku, není závislá na kultivačních metodách (1%)
- genomový sekvenátor 2. generace GS FLX (454 Life Sciences, Roche)
- Prvotní představa/očekávaný výstup od praxe – kompletní informace o složení a změnách aktivní mikrobioty v anaerobním bioreaktoru in-situ při reduktivní dehalogenaci
 - dominantní organismy
 - ověření role DHC
 - porovnání procesu na několika lokalitách
 - identifikace nežádoucích procesů v bioreaktoru in-situ
 - prokázání obnovení přirozených podmínek lokality po ukončení sanace

Metagenomická analýza a 454 pyrosekvenování



Zdroj: <http://legacy.camera.calit2.net/education/what-is-metagenomics#metadata> a
Jakub Rídl (2011)

„SHOTGUN“ sekvenování

A) funkční analýza

Identifikace funkčních genů a jejich sekupení do funkčních subsystémů (replikace, respirace, metabolismus, ..) dle databází známých genů → HEATMAP

B) taxonomická analýza

Identifikace a četnost přítomných bakteriálních kmenů dle databází známých genů

- ❖ *Zkoumání náhodných úseků DNA*
 - ❖ *Nutné velké množství vyizolované DNA (μg)*
 - ❖ *Časově náročné*
 - ❖ *Finančně náročné*
- (100-200tis.Kč/vzorek)*

„AMPLICON“ sekvenování

A) funkční analýza

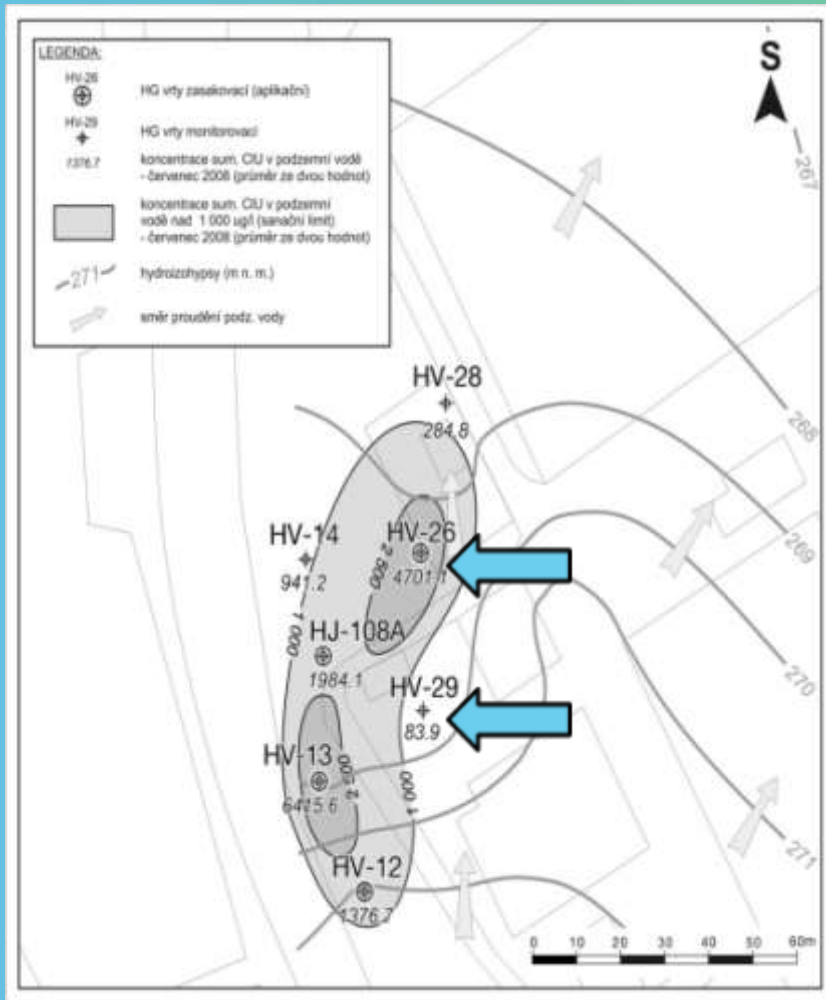
Musí být dopředu známé sekvence konkrétního genu pro tvorbu primerů a následní využití pro sekvenování

B) taxonomická analýza dle 16S rRNA genu

Identifikace a četnost přítomných bakteriálních kmenů dle předem zvolených primerů 16S rRNA genů (konkrétně primery 8F a 357R pro V1 a V2 regiony)

- ❖ *Zkoumání vytipovaných úseků DNA*
- ❖ *Nutné menší množství vyizolované DNA (10 ng)*
- ❖ *Časově málo náročné*
- ❖ *Finančně méně náročné*

Modelová lokalita – fungující reduktivní dehalogenace in-situ



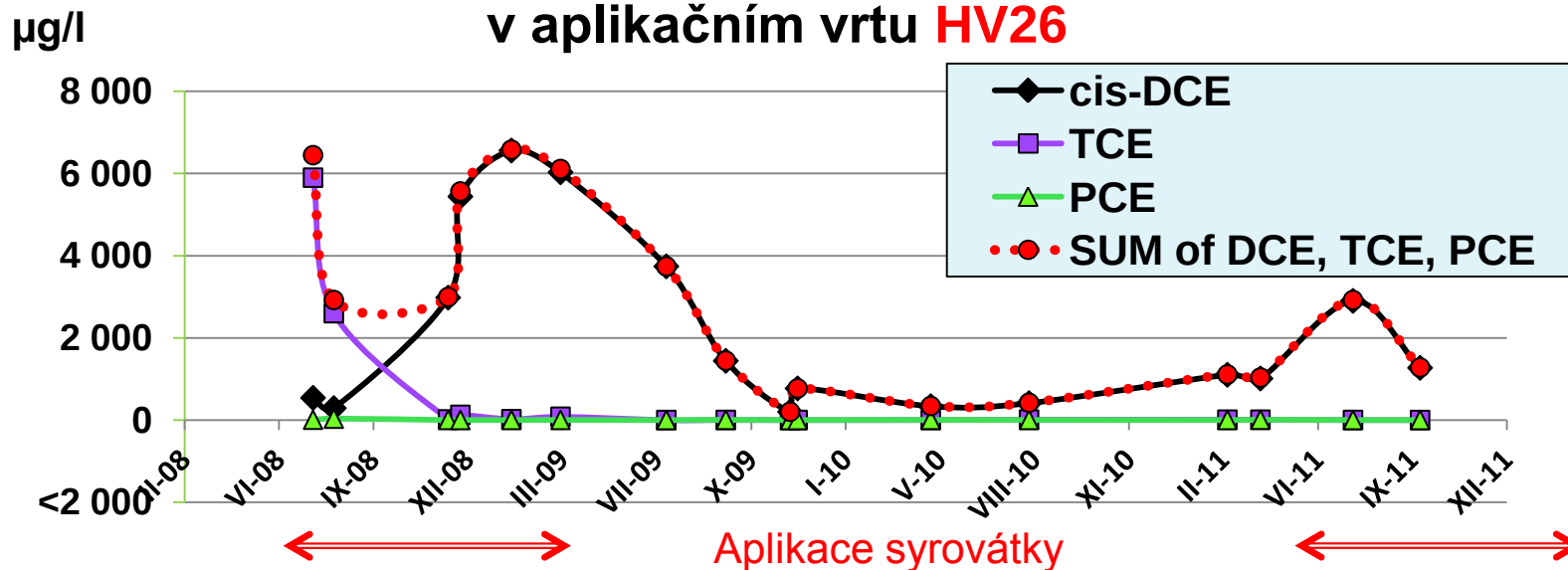
- primární kontaminace TCE + (PCE), 6 000 µg/l
- sanační limit : 1000 µg/l suma PCE,TCE,DCE
- plocha 75x25 m, mocnost zvodně 4 m, porozita 0,15
- Před sanací přítomna aktivní mikroflora (indikace cisDCE,VC)
- Sanace s aplikací syrovátky (od 05/2011) navázala na úspěšný pilotní test (trvání 17 měs.)
- Aplikační vrty:HV-12, HV-13, HJ-108A, HV-26, (HJ-29)
-  vrty sledované metagenomickými analýzami

Harmonogram aktivit na modelové lokalitě

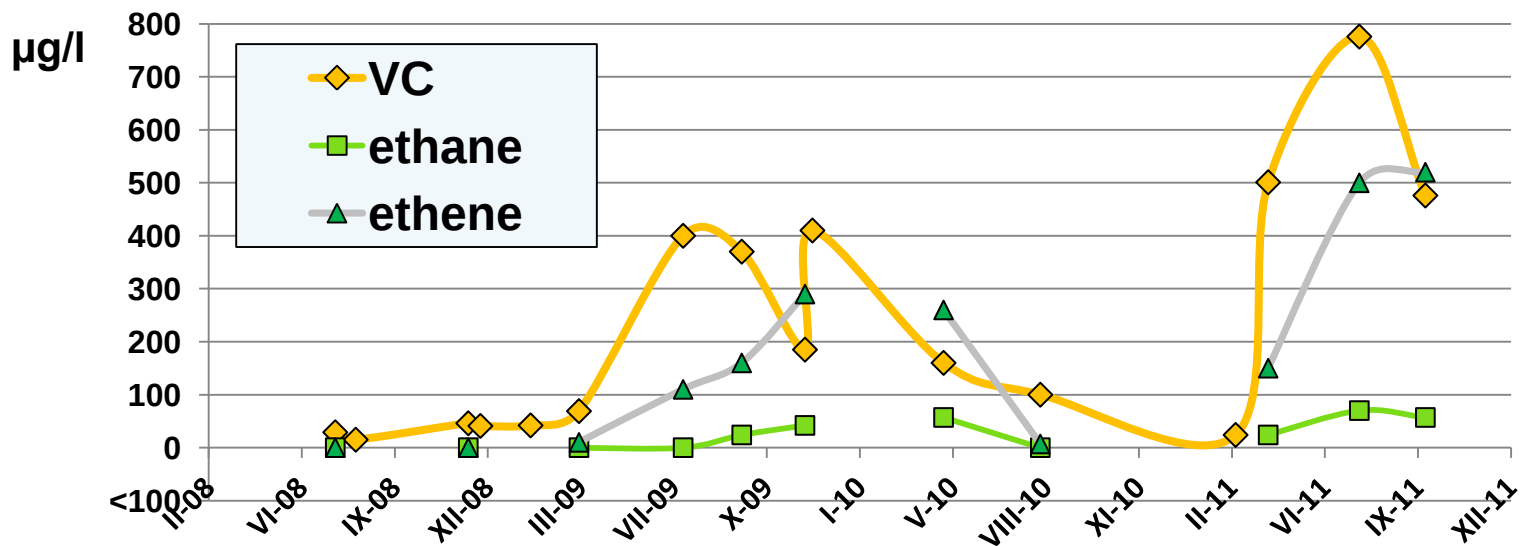
7/2008 až 10/2011

MĚSÍC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
AKTIVITA	ETAPA 0	PILOTNÍ TEST APLIKACE SYROVÁTKY									MONITORING 2 ROKY																						SANACE APLIKACE SYROVÁTKY						
ODBĚR VZORKŮ PRO METAGENOMIKU	X								X						X							X										X			X			X	
ZNAČENÍ VZORKŮ	A								B						C							D																	

Vývoj koncentrace chlorovaných ethylénů v aplikačním vrtu HV26

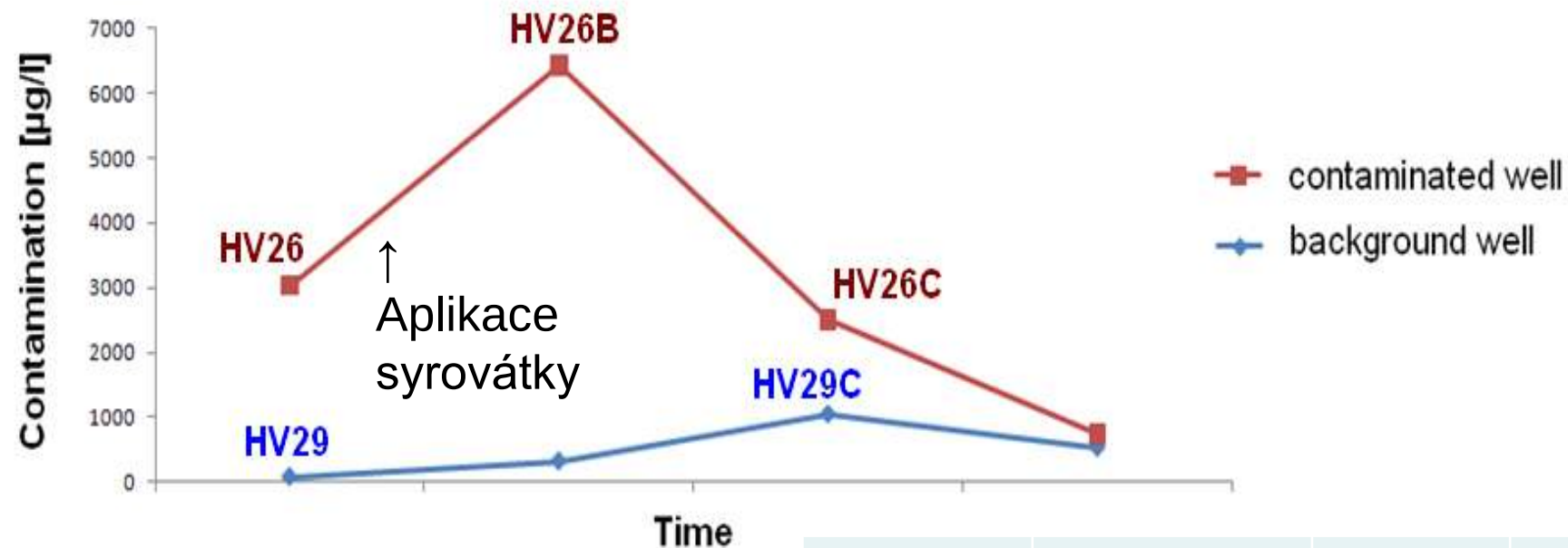


Vývoj koncentrace koncových produktů dehalogenace v aplikačním vrtu HV26



Výsledky „Shotgunového“ sekvenování - parametry

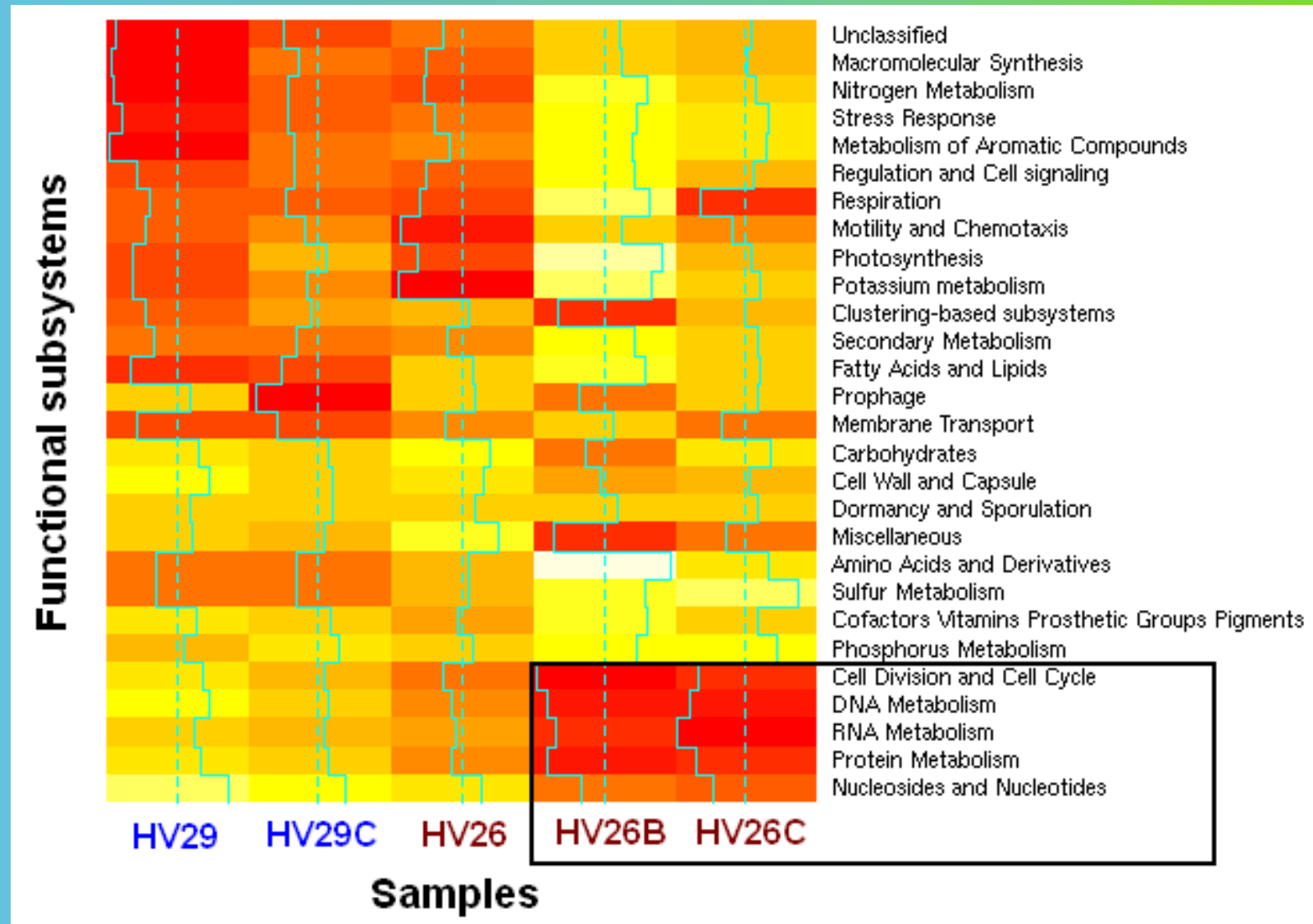
autor *Jakub Rídl*



Sample	Reads	Length	Bases
HV29	600,000	368bp	220Mb
HV29C	651,000	389bp	253Mb
HV26	644,000	393bp	253Mb
HV26B	570,000	381bp	217Mb
HV26C	438,000	354bp	155Mb

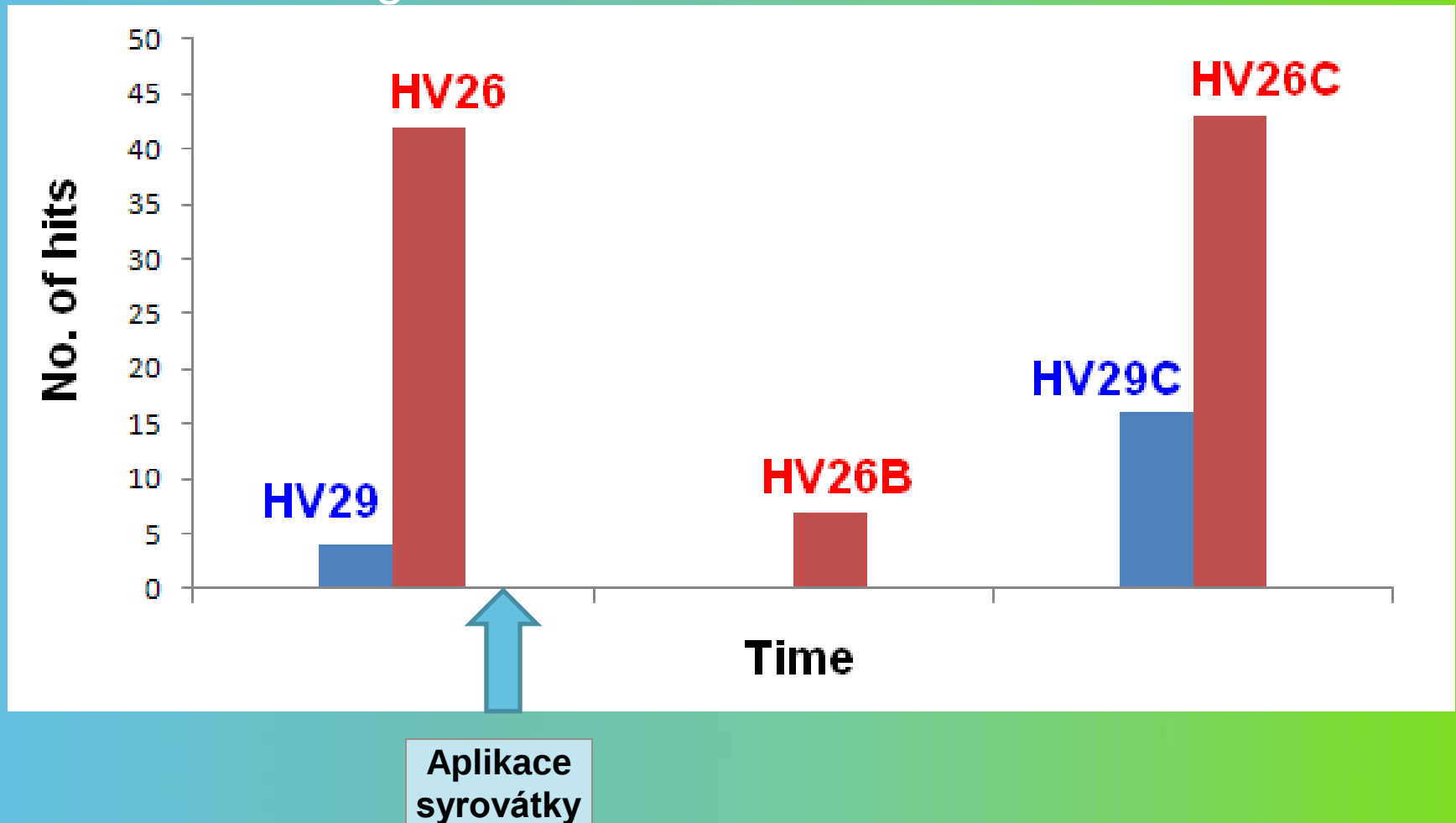
Shotgunové sekvenování - funkční analýza (Heatmap)

- zvýrazněny subsystémy, které jsou spojené s růstem a dělením buněk



SHOTGUNOVÉ SEKVENOVÁNÍ - FUNKČNÍ ANALÝZA

počet sekvencí vykazujících podobnost s geny kódujícími reductivní dehalogenaci PCE



AMPLIKONOVÉ SEKVENOVÁNÍ

TAXONOMICKÁ ANALÝZA 16S rRNA GENU

Phylum	HV29	HV29C	HV26	HV26B	HV26C	Whey
Acidobacteria	74	55	53	48	18	0
Actinobacteria	24	63	30	58	59	0
Bacteroidetes	877	245	150	3736	1254	0
Chloroflexi	6	24	52	11	89	0
Firmicutes	98	5	19	2621	676	7960
Fusobacteria	1	0	0	11	1	0
Gemmatimonadetes	1	1	0	0	0	0
Lentisphaerae	0	0	1	2	2	0
Nitrospira	10	2	1	0	0	0
OD1	3	5	3	22	50	0
OP10	1	3	2	1	0	0
Proteobacteria	5874	6520	6987	381	4461	4
Spirochaetes	12	1	0	38	11	0
SR1	2	0	1	30	14	0
TM7	27	21	4	427	89	0
Verrucomicrobia	1	2	1	0	1	0
Unidentified	989	1053	696	614	1275	36

**95.5%
Lactococcus**

**2.9%
Lactococcus**

SHOTGUNOVÉ SEKVENOVÁNÍ

TAXONOMICKÁ ANALÝZA – vzorek A2

/JINÁ LOKALITA

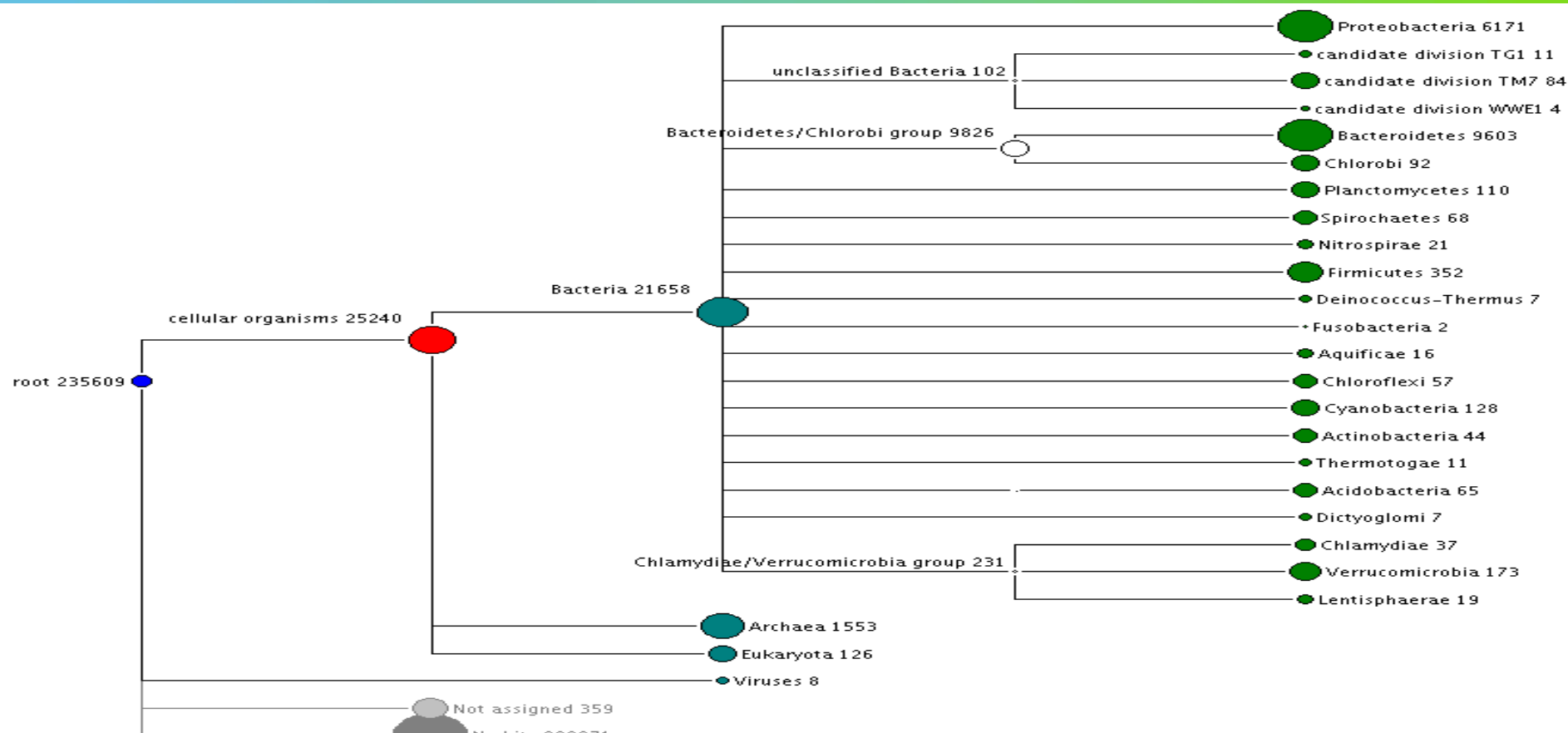
Celkový počet čtení (hits)

235609

Taxonomicky zařazeno

25240 (10,7 %)

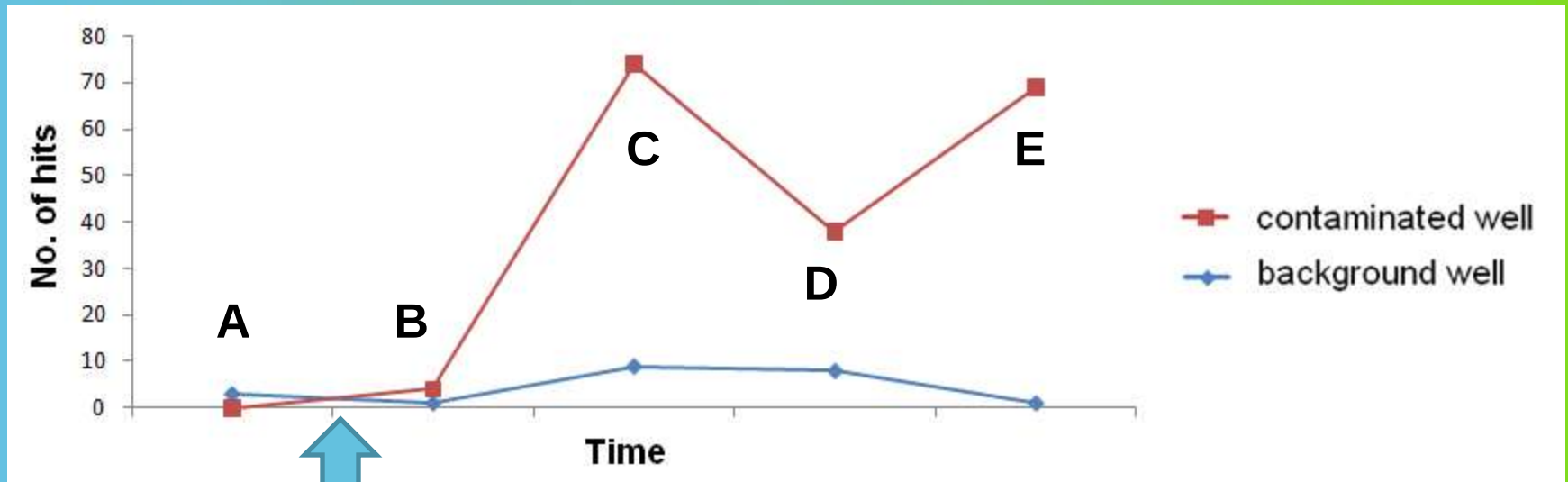
Ostatní čtení nevykazují podobnost se známými geny (*No hits*) nebo jejich podobnost není dostatečná pro taxonomickou analýzu (*Not assigned*).



AMPLIKONOVÉ SEKVENOVÁNÍ

- TAXONOMICKÁ ANALÝZA 16S rRNA,

sekvence podobné k bakteriím druhu *Dehalococcoides* ve vrtu HV-26



Aplikace
syrovátky

- nárůst DHC nenastupuje krátce po aplikaci syrovátky (HV26B) – ale se zpožděním (HV26C).
- Vysvětlení - bakterie *Dehalococcoides* se uplatňují více až v dalších mezikrocích reduktivní dehalogenace.

- ❖ DATA ZÍSKANÁ ZE SEKVENAČNÍCH TECHNIK NE ZCELA KORESPONDUJÍ S INFORMACEMI ZÍSKANÝMI KLASICKÝMI METODAMI
- ❖ DOSUD ZÍSKANÉ INFORMACE NEPŘINESLY PRO BĚŽNOU SANAČNÍ PRAXI ZÁSADNÍ NOVÉ INFORMACE

❖ Jak dál??????????

- ❖ Nové zásadní informace se objevují každý měsíc

ZAMĚŘENO NA KONKRÉTNÍ GENY, DHC A POUZE NĚKOLIK KONKRÉTNÍCH BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ

PCE -> TCE -> DCE (cis-1,2-DCE) -> VC -> ethylen

geny: *pceA* *tceA* *vcrA*, *bvcA*

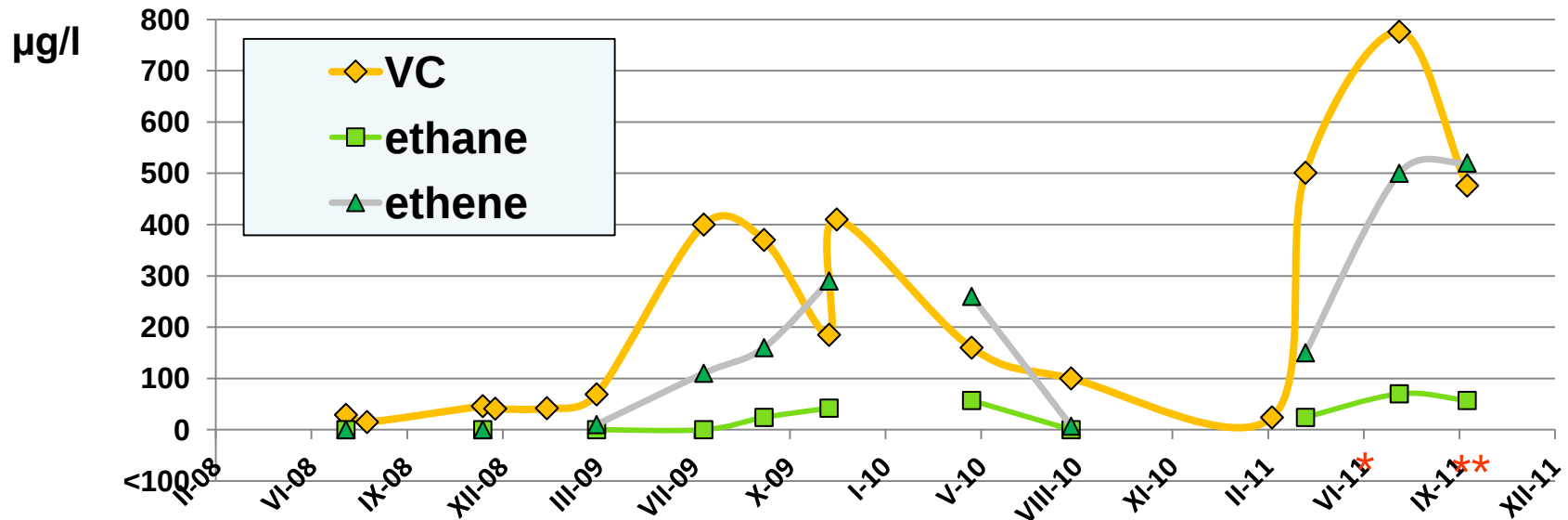
dehalogenázy *bvcA* a *vcrA* byly nalezeny u *Dehalococcoides* sp. BAV1, *Dehalococcoides* sp. VS, *Dehalococcoides ethenogenes* 195

Přítomnost DHC zaručuje pouze proces transformace PCE/TCE na cis-DCE/VC. Přítomnost genů *vcrA* and *bvcA* indikuje úplnou přeměnu cis-DCE/VC na ethen).

V průmyslových preparátech je DHC cca 8%. Nízké koncentrace DHC v environmentálních vzorcích neznamenaají, že dehalogenace neprobíhá.

DETEKCE PŘÍTOMNOSTI *DEHALOCOCCOIDES* A GENŮ PRO PŘEMĚNU *cis*DCE/VC NA ETHEN

Vývoj koncentrace koncových produktů dehalogenace v aplikačním vrtu HV26

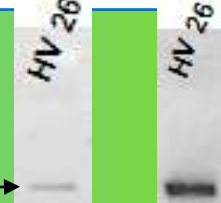


Autor PCR dat: Olesya Korotkevych

Dehalococcoides:

PCR použitím primerů zaměřených na 16S rRNA geny u *Dehalococcoides*

1377 bp →



Reduktivní dehalogenace *cis*DCE/VC → ethene:

PCR použitím primerů specifických pro *vcrA* a *bvcA* geny

❖ Stejný množství DNA pro PCR → rozdílný signál → změna v složení a množství degradátorů a jejich funkčních genů



SOUHRN POZNATKŮ Z SHOTGUNOVÉHO A AMPLIKONOVÉHO SEKVENOVÁNÍ ENVIRONMENTÁLNÍCH VZORKŮ

- ❖ Přínos v oblasti základního výzkumu
- ❖ Shotgunové sekvenování v současné době není vhodná metoda pro běžné praktické využití v sanační praxi – málo informací o environmentálních vzorcích v bioinformatických databázích
- ❖ Výhledově slibná metoda pro doplnění informací o celkové skladbě mikrobiálního konsorcia
- ❖ pro běžné účely praxe postačí qPCR zaměřená na identifikaci a kvantifikaci konkrétních funkčních genů a identifikaci a kvantifikaci konkrétních degradatérů

PODĚKOVÁNÍ:

Projekt METAGENOM (č. 2B08031).
je podporován z veřejných finančních
prostředků v rámci **Národního program
výzkumu - NPV II** od **MSMT** a
kofinancován z neveřejných finančních
prostředků **AECOM CZ, s.r.o**



Děkuji za pozornost