

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Hana Brťková

Mikrobiální komunita v sedimentech potoka kontaminovaném farmaky
Microbial community in sediments of a stream contaminated by pharmaceuticals

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha, 2020

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 6. 2020

Bc. Hana Brťková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce prof. RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, Ph.D. za jeho čas, trpělivost, odborné vedení a cenné rady v průběhu mé práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Aleně Filipové za její obětavou pomoc při práci v laboratoři a za pomoc při zpracování PLFA. Také děkuji PharmDr. Kláře Michalíkové, Ph.D. za pomoc se zpracováním analýzy farmaceutických látek a děkuji Ing. Haně Veselé, Ph.D. za pomoc se zpracováním prvkové analýzy CHNS/O. Obě tyto analýzy byly měřeny na ÚŽP, PřF UK. A v neposlední řadě děkuji celému kolektivu Laboratoře environmentální biotechnologie MBÚ AVČR, v.v.i.

ABSTRAKT

Farmaceutické látky představují mikropolutanty, které se do životního prostředí dostávají zejména přes čistírny odpadních vod (ČOV). V této práci byla studována mikrobiální komunita v sedimentech potoka, který se nachází v blízkosti ČOV a dochází k jeho kontaminaci těmito látkami. Předmětem této práce bylo stanovit výskyt farmaceutických látek a mikrobiální komunity ve studované lokalitě a poukázat na možné vzájemné vztahy mezi nimi. Ve studovaném potoku bylo identifikováno 12 farmaceutických látek v koncentracích ng/g. Tyto látky vytváří gradient, který klesá s rostoucí vzdáleností od ČOV. Pro analýzu mikrobiální biomasy byla provedena analýza fosfolipidových mastných kyselin a sekvenace DNA pro identifikaci mikrobiální komunity. Analýza fosfolipidových mastných kyselin poukázala na klesající množství mikrobiální biomasy s rostoucí vzdáleností od ČOV. Sekvenace DNA poukázala na velkou mikrobiální diverzitu ve studovaném sedimentu. Pro vyhodnocení vztahů mezi přítomnou mikrobiální komunitou byla využita analýza hlavních komponent (PCA). Výsledek PCA ukázal, že v sedimentu potoka, v hloubce 10-30 cm, *Betaproteobacteria* negativně koreluje s triclosanem a *Clostridia* negativně koreluje s tramadolem.

Klíčová slova: mikrobiální komunita, farmaka, mikropolutanty, biodegradace

ABSTRACT

Pharmaceuticals are micropollutants, that enter the environment mainly through Wastewater Treatment Plants (WWTPs). In this work microbial community has been studied in sediments of a stream, which is located near a WWTP. This sediment is contaminated with pharmaceuticals. The subject of this thesis was to determine the presence of pharmaceuticals and microbial community in this study site and to point out possible relationships between these factors. Twelve pharmaceuticals were identified at concentrations reaching levels of ng/g. The concentrations of the compounds form a gradient that decreases with the distance from WWTP. Microbial biomass was estimated using the analysis of phospholipid fatty acids and microbial community was described using next-generation DNA sequencing. The analysis of phospholipid fatty acids pointed out, that with the increasing distance from WWTP the amount of microbial biomass decreases. DNA sequencing revealed large microbial diversity in the studied sediment. For evaluation of the relationship between the microbial community and pharmaceuticals in the stream sediment, Principal Component Analysis (PCA) was used. The result of PCA showed, that in the stream sediment (depth 10-30 cm), *Betaproteobacteria* negatively correlated with triclosan and *Clostridia* negatively correlated with tramadol.

Keywords: microbial community, pharmaceuticals, micropollutants, biodegradation

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
ÚVOD	8
1 ÚLOHA MIKROORGANISMŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	10
1.1 Diverzita mikroorganismů.....	10
1.1.1 Diverzita mikroorganismů v půdě a v sedimentech.....	11
2 METODY PRO STUDIUM MIKROBIÁLNÍ DIVERZITY A IDENTIFIKACI MIKROORGANISMŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	13
2.1 Biochemické metody.....	14
2.1.1 Analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA).....	14
2.2 Molekulární metody	15
2.2.1 T-RFLP.....	17
2.2.2 Hybridizace DNA	17
2.2.3 Sekvence DNA.....	18
3 FARMACEUTICKÉ LÁTKY A JEJICH BIODEGRADACE	29
3.1 Tramadol.....	30
3.2 Karbamazepin	31
3.3 Sulfamethoxazol a sulffamethazin	32
3.4 Diklofenak	34
3.5 Paracetamol.....	35
3.6 Ibuprofen	36
4 MATERIÁL A METODIKA	37
4.1 Testované vzorky	37
4.2 Chemikálie a ostatní materiál	39
4.3 Přístrojové vybavení.....	40
4.4 Postup experimentu.....	41
4.4.1 Analýza přítomných farmak	41
4.4.2 Stanovení CHNSO a organického uhlíku ve vzorcích sedimentů	42
4.4.3 Stanovení pH	43
4.4.4 Analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA).....	43
4.4.5 Izolace DNA	46
4.5 Vyhodnocení sekvenačních dat.....	49
4.6 Statistické vyhodnocení.....	50

5	VÝSLEDKY	51
5.1	Analýza přítomných farmak	51
5.2	Stanovení CHNSO a pH.....	55
5.3	Mikrobiální komunita v sedimentech.....	58
5.3.1	Analýza PLFA	58
5.3.2	Identifikace mikroorganismů pomocí Mi-Seq.....	60
5.4	Statistické vyhodnocení.....	66
6	DISKUZE	72
6.1	Analýza přítomných farmak	72
6.2	Mikrobiální komunita přítomná v sedimentech.....	74
	ZÁVĚR	78
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ČOV	čistírna odpadních vod
CBZ	karbamazepin
DF	diklofenak
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
FAME	methylestery mastných kyselin (methyl ester fatty acid)
HCHT	hydrochlorothiazid
IBU	ibuprofen
ITS	vnitřní přepisovaný mezerník (internal transcribed spacer)
KF	kofein
MET	metoprolol
NGS	nová generace sekvenování (next generation sequencing)
OTU	operační taxonomická jednotka (operational taxonomic unit)
PAR	paracetamol
PCA	analýza hlavních komponent (principle component analysis)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PLFA	fosfolipidové mastné kyseliny (phospholip fatty acids)
SA	sulfonamidová antibiotika
SMRT	single molecule real-time
SMS	sekvenace jednotlivých molekul (single molecule sequencing)
SMX	sulfamethoxazol
SMZ	sulfamethazin
SP	sulfapyridin
TGS	třetí generace sekvenování (third generation sequencing)
TC	celkový uhlík (total carbon)
TOC	celkový organický uhlík (total organic carbon)
TRAM	tramadol
TRIC	triclosan

ÚVOD

Globální znečištění životního prostředí je jedním z nejvýznamnějších environmentálních problémů dnešní doby, který ovlivňuje všechny složky v prostředí (Fazekaš a kol. 2019). Velkou pozornost veřejnosti si zasloužila přítomnost farmaceutických sloučenin a jejich metabolitů. Farmaceutické látky jsou nezbytné pro udržení veřejného zdraví a kvality života (Caracciolo a kol. 2015). Tisíce různých léčivých látek je v dnešní době používáno ve velkém množství k léčbě či prevenci chorob u lidí a zvířat. Nicméně v posledních 20 letech, díky zvýšené schopnosti detekce pomocí pokročilých chemických analýz, byly také nalezeny jako mikrokontaminanty ve vodních a v půdních ekosystémech (Grenni a kol. 2018). Nedávné studie prokázaly, že mnoho léčivých látek není v čistírnách odpadních vod (ČOV) úplně eliminováno, takže různé látky mohou být v nezměněném stavu, popřípadě jako aktivní metabolity, vypouštěny do životního prostředí. Léčiva mohou mít v prostředí delší poločas rozpadu, a tak se mohou akumulovat a dosahovat detekovatelných a biologicky aktivních hladin (Sayadi a kol. 2010). Většina těchto léčiv, které se dostanou do životního prostředí mohou také různými způsoby ovlivňovat strukturu a činnost mikrobiální komunity (Caracciolo a kol. 2015).

Environmentální mikroorganismy hrají v životním prostředí velmi významnou roli. Jsou důležité v základních ekologických procesech, mezi které patří např. účast v koloběhu prvků (Caracciolo a kol. 2015), produkce kyslíku, regulace biomasy a odstraňování zbytků odumřelých organismů (Zhou a kol. 2009). Kromě těchto důležitých procesů mohou také přispět k degradaci organických kontaminantů. Díky těmto schopnostem jsou mikrobiální komunity nezbytné pro udržení fungujícího ekosystému (Caracciolo a kol. 2015).

Cíle diplomové práce

Teoretická část:

- Úloha a diverzita mikroorganismů v životním prostředí
- Charakteristika metod pro studium mikrobiální diverzity
- Charakteristika vybraných farmaceutických látek

Praktická část:

- Analýza přítomných farmak
- Klasifikace mikrobiálního společenstva v dané lokalitě

- Fyzikálně-chemická charakteristika prostředí

Hypotéza diplomové práce

Farmaceutické látky přítomné v sedimentech potoka mohou interagovat s přítomnou mikrobiální komunitou.

1 ÚLOHA MIKROORGANISMŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Mikroorganismy jsou všudypřítomné, mimořádně rozmanité a plní specializované role v životním prostředí (Das a kol. 2014). Řadí se k nejpočetnější skupině organismů, neboť převyšují všechny ostatní organismy jak v biomase, tak v rozmanitosti (Zhou a kol. 2009). Mikroorganismy tak lze ve všech jejich formách označit doslova jako „neviditelná většina“. V 1 g půdy či sedimentu se vyskytuje asi 10^9 prokaryotických buněk a v 1 ml mořské či jezerní vody se vyskytuje přibližně 10^6 prokaryotických buněk (Gray a Head 2008). Jsou hlavní součástí globálních ekosystémových služeb a přírodního kapitálu na světě a spolu s fyzikálně-chemickými vlastnostmi prostředí, ve kterém se vyskytují, představují vzájemně propojený komplexní systém (Zhou a kol. 2009).

Mikroorganismy jsou životně důležité pro fungování všech ekosystémů (Tyson a kol. 2004). Mají hlavní vliv na ekologické procesy napříč prostorem i časem zejména díky tomu, že představují v přírodě nejbohatší molekulární a chemickou diverzitu a také díky jejich schopnosti interagovat a udržovat dynamické vztahy mezi sebou i s vyššími organismy. Zprostředkovávají nezbytné ekosystémové procesy jako je primární produkce, dekompozice, koloběh živin, regulace klimatu, ukládání uhlíku a transformace znečišťujících látek (Esacalas a kol. 2019). Mikroorganismy přítomné v životním prostředí, které mají schopnost degradace znečišťujících látek, tak napomáhají k čištění životního prostředí a díky jejich všudypřítomnosti mohou také představovat velmi významné indikátory znečištění (Van Beelen a Doelman 1997). Metabolické aktivity mikroorganismů jsou rozsáhlé a mohou být do jisté míry rychle přizpůsobeny podmínkám daného prostředí (Uhlík a kol. 2008). V důsledku toho všeho jsou mikroorganismy zásadní pro procesy, které přispívají ke kvalitě stavu přírodního ekosystému (Caracciolo a kol. 2015) a mohou představovat také významný zdroj pro zemědělství, zpracování potravin, průmyslovou výrobu, biotechnologii a medicínu (Gray a Head 2008). Nicméně jsou to také velmi málo známé druhy organismů (Zhou a kol. 2009).

1.1 Diverzita mikroorganismů

Hlavní podíl biologické diverzity na Zemi představují mikroorganismy (Das a kol. 2014). Biologickou diverzitu lze definovat jako škálu rozdílných druhů organismů a jejich relativní hojnost v určitém souboru. Mikrobiální diverzita jednoznačně poukazuje

na biologickou rozmanitost na třech úrovních: v rámci druhu (genetická), v závislosti na počtu druhů (druhová) a v rámci komunity (ekologická). Druhovú rozmanitost se skládá ze dvou částí. První část tvoří celkový počet přítomných druhů, kterou lze označit také jako druhová bohatost. Vztahuje se tedy ke kvantitativní variaci mezi druhy. Druhou část představuje distribuce jednotlivců mezi těmito druhy, která může být označena také jako vyrovnanost (Fakruddin a kol. 2013).

Diverzita mikroorganismů hraje velmi významnou roli v udržování biosféry (Zhou a kol. 2009) a v životním prostředí hraje klíčovou roli v biogeochemických procesech. Složení anebo aktivita mikrobiální komunity může indikovat, jak dobře daný ekosystém funguje a díky důležitosti mikroorganismů v přeměně energie a uhlíku se jejich diverzita stala velmi důležitým tématem (Torsvik a kol. 1996). Znalost struktury a diverzity mikrobiální komunity je nezbytná pro pochopení vztahu mezi faktory životního prostředí a funkcí ekosystému. Tyto znalosti mohou být využity k posouzení dopadu stresových faktorů a odchylek v životním prostředí (např. znečištění různými polutanty nebo globální změny) na ekosystém (Roose-Amsaleg a kol. 2001).

Mikroorganismy se byly schopny přizpůsobit nejrůznějším prostředím a vyvinuly si rozsáhlou škálu metabolických drah. Metabolické bohatství mikroorganismů je tradičně využíváno lidmi. Lidé využívali mikroorganismy už v procesech fermentace, produkce antibiotik, ale v poslední době také pro bioprodukcii nových i obtížně syntetizovatelných sloučenin a biodegradaci xenobiotik (Jain a kol. 2005). Navzdory jejich důležitosti ale v současné době ani neznáme rozsah mikrobiální diverzity ve většině ekosystémů (Torsvik a kol. 1996). Se studiem bakteriální či houbové diverzity je spojeno několik problémů. Tyto problémy vyplývají nejen z omezení metodiky, ale také z nedostatku znalostí taxonomie. Je obtížné studovat diverzitu mikroorganismů, pokud není známo, jak třídít nebo identifikovat přítomné druhy. Mezi hlavní problémy patří např. prostorová heterogenita, neschopnost kultivace většiny mikroorganismů, limitace molekulárních metod a taxonomická nejednoznačnost mikroorganismů (Kirk a kol. 2004).

1.1.1 Diverzita mikroorganismů v půdě a v sedimentech

Zájem o biologickou rozmanitost půd a sedimentů roste, neboť se ukázalo, že v těchto lokalitách žije obrovské množství druhů (Groffman a Bohlen 1999) a mikrobiální rozmanitost sedimentů je srovnatelná s mikrobiální rozmanitostí půdy (Costa a kol. 2015).

Mikroorganismy nacházející se v půdě jsou rozhodující pro zachování její funkce v přírodních i spravovaných zemědělských půdách (Garbeva a kol. 2004). V půdě patří mezi nejhojnější skupiny mikroorganismů bakterie a houby. Půdní mikroorganismy hrají různé role v regulačních mikrobiálních aktivitách (např. specifická enzymová aktivita a půdní mikrobiální biomasa), aby prováděly mineralizaci komplexních organických sloučenin, kontrolu koloběhu živin a ukládání uhlíku v půdě. Nicméně je diverzita půdních bakterií a hub, stejně jako mikrobiologická aktivita, a tím fungování půdního ekosystému, silně ovlivněna lidskou činností a klimatickými změnami (Zhang a kol. 2017).

Sedimenty potoků jsou velmi důležité komponenty vodních ekosystémů (Rees a kol. 2006). Charakteristiky sedimentů určují jejich biologickou rozmanitost a ekologickou rovnováhu (Costa a kol. 2015). Mikrobiální společenstva jsou zodpovědná za většinu metabolické aktivity v sedimentech (Gibbons a kol. 2014) a mohou také informovat o stavu vodních ekosystémů. Mikroorganismy nacházející se ve vodním ekosystému provádí rozkládání organického materiálu, recyklaci živin (Widenfalk a kol. 2008), bakterie jsou zodpovědné za biogeochemické transformace, jako je nitrifikace a denitrifikace (Wakelin 2008), a navíc mohou být mikroorganismy schopné detoxifikace nebo degradace organických znečišťujících látek asociovaných se sedimenty. Nicméně i přítomné polutanty mohou mít nepříznivé účinky na mikroorganismy nacházející se v sedimentech (Widenfalk a kol. 2008). Účinek stresu a narušení mikrobiální komunity může mít dopad na procesy probíhající v ekosystému, stejně tak jako na biologickou rozmanitost a strukturu vodního společenstva (Wakelin 2008). Vzhledem ke složitosti detekce účinků těchto látek na mikroorganismy se tímto zabývalo pouze několik studií (Widenfalk a kol. 2008). Vliv na mikroorganismy přítomné v sedimentech může mít také vypouštění přečištěné odpadní vody z ČOV. Voda vypouštěná z ČOV může do přijímaných vodních toků ukládat velké množství organických látek a živin. Zvýšené množství organických látek může pozměnit energetické vztahy v potocích, narušit strukturu a funkci biotické komunity. Vypouštění upravených vod může také vést k ukládání písku a šterku ve vodních ekosystémech, což může ovlivňovat fyzikální vlastnosti sedimentu (Wakelin 2008).

2 METODY PRO STUDIUM MIKROBIÁLNÍ DIVERZITY A IDENTIFIKACI MIKROORGANISMŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Identifikace mikroorganismů je klíčovým prvkem pro všechny odvětví mikrobiologie. Přiřazení jména k mikrobiálnímu kmenu přináší určité předpoklady a důsledky spojené s tímto organismem (Moore a kol. 2010). Klasifikace a identifikace patří mezi hlavní vědecké disciplíny, které jsou relevantní jak pro základní, tak pro aplikovanou mikrobiologii (Goodfellow 2000). Identifikace mikroorganismů je důležitá např. i v biotechnologickém výzkumu, kdy přidělení mikroorganismu do rizikové skupiny bude mít další důsledky ohledně bezpečnosti, ale také ohledně nákladů spojených s nakládáním s mikroorganismy (Moore a kol. 2010).

Ke zjištění mikrobiální diverzity a biomasy se využívají metody vázané či nevázané na kultivaci těchto mikroorganismů (Fan a kol. 2017). Kultivační techniky, které byly jako první použity pro posouzení mikrobiální diverzity, jsou založené na kultivaci na plotnách nebo na měření metabolické aktivity mikroorganismů a pomohly ke značným pokrokům v mikrobiální ekologii. Nicméně, tyto techniky nedoceňují velkou mikrobiální rozmanitost enviromentálních vzorků (Roose-Amsaleg a kol. 2001). Použitím klasických kultivačních metod lze v laboratoři izolovat a identifikovat pouze malou část mikroorganismů skutečně přítomných v životním prostředí (Uhlík a kol. 2008). Limitace při kultivaci mikroorganismů zahrnují především obtížnost uvolnění bakterií či spor z půdních částic nebo biofilmu, výběr vhodného růstového média, podmínky růstu (teplota, pH, světlo), neschopnost kultivace velkého počtu bakteriálních a houbových druhů současnými technikami a potenciál pro vzájemnou inhibici kolonií. Mimoto, kultivace mikroorganismů na plotnách zvýhodňuje ty mikroorganismy, které jsou schopny rychlého růstu a ty houbové druhy, které produkují velké množství spor (Kirk a kol. 2004). Metody nevázané na kultivaci poskytují oproti kultivačním metodám určité výhody.

Analýza složení mikrobiálního společenstva pomocí metod nezávislých na kultivaci obecně zahrnují extrakci markerových sloučenin z organismů. Sloučeniny, které by mohly sloužit jako užitečné biomarkery, by měly být v organismech přítomny v relativně stabilním množství a ihned degradovány v půdě po buněčné smrti organismu (Leckie 2005). Z důvodu chemické rozmanitosti a bohatství buněk jsou lipidy a nukleové kyseliny

(DNA i RNA) mimořádně slibné složky využívané pro zkoumání a charakterizaci mikrobiálních komunit (Drenovsky a kol. 2004). V této kapitole jsou popsány vybrané kultivačně nezávislé metody pro stanovení mikrobiální biomasy v environmentálních vzorcích.

2.1 Biochemické metody

2.1.1 Analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA)

V prostředí jako je půda a sedimenty jsou kultivační metody pro rozlišení mikrobiální diverzity nedostačující nebo neefektivní, kvůli značné mikrobiální diverzitě a obtížnosti kultivace přirozených mikroorganismů. V tomto prostředí se tedy staly vedle nukleových kyselin důležitým ekologickým nástrojem analýza lipidů (Macalady a kol. 2000). Lipidy, jakožto hlavní buněčná komponenta, tvoří širokou škálu strukturně a funkčně rozmanitých sloučenin. Tyto variace ve složení mastných kyselin mezi mikroorganismy lze využít a odhalit rozdíly mezi jednotlivými mikrobiálními komunitami. Navíc jsou některé mastné kyseliny považovány za biomarkery pro specifické skupiny mikroorganismů, na základě jejich lipidových profilů čistých kultur (Drenovsky a kol. 2004).

Analýza esterově vázaných fosfolipidových mastných kyselin (PLFA, phospholipid fatty acid) je používaná biochemická metoda pro charakterizaci mikrobiální komunity (Palojärvi 2006). PLFA jsou široce používány jako biomarkery k charakterizaci mikroorganismů nejen v půdě, ale také v pitných a podzemních vodách a sedimentech (Fan a kol. 2017). Ke studiu celého profilu mastných kyselin mikrobiální komunity je nicméně nezbytné znát složení mastných kyselin jednotlivých druhů, které danou komunitu tvoří (Zelles 1997). PLFA jsou hlavní složkou buněčné membrány u domén *Bacteria* a *Eukarya* (Quideau a kol. 2016). Jejich polární skupiny a esterově vázané vedlejší řetězce se liší ve složení mezi eukaryoty a prokaryoty, stejně tak jako v rámci jednotlivých prokaryotických skupin (Drenovsky a kol. 2004). Za PLFA bakteriálního a fungálního původu jsou považovány PLFA převážně s délkou řetězce 14–20 atomů uhlíku. Mikroorganismy produkují různé PLFA jako prostředky k udržení integrity buněčné membrány a buněčných funkcí v reakci na bezprostřední podmínky prostředí. Ve smíšených kulturách nelze analýzu PLFA použít pro identifikaci jednotlivých mikrobiálních druhů, ale může poskytnout celkový profil mikrobiálních komunit přítomných v půdě (Fan a kol. 2017). Navíc, protože jsou PLFA rychle degradovány

po buněčné smrti, mohou být považovány za zástupce životaschopné mikrobiální komunity (Quideau a kol. 2016).

Analýza PLFA zahrnuje extrakci lipidů z půdy nebo sedimentu za pomoci organických rozpouštědel založená na protokolu Bligh a Dyer (1959), dále následuje separace fosfolipidů od ostatních lipidů na základě jejich polaritě pomocí extrakce na pevné fázi. PLFA jsou poté převedeny na methylestery mastných kyselin (FAME, fatty acid methyl ester), které jsou analyzovány plynovou chromatografií za účelem stanovení jejich typu a množství. Některé PLFA se poté používají jako markery jednotlivých specifických skupin organismů. Pro určení jednotlivých bakteriálních skupin se využívá několik typů, zatímco pro určení hub se používá pouze jeden hlavní (Leckie 2005). Jednotlivé typy PLFA využívané jako markery jsou znázorněny v tab. 2.1.

Typy PLFA	Mikroorganismy
16:1 ω 5c, 16:1 ω 7c, 16:1 ω 7t, 16:1 ω 9c, a16:0, cy17:0, 18:1 ω 5c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω tc, 18:1 ω 9c, cy19:0a	Gramnegativní bakterie
i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, a17:0, i17:0, i18:0 10Me16:0	Grampozitivní bakterie
14:0, 16:0, 18:0	Bakterie (nespecifické)
18:2 ω 6 (18:1 ω 9c, 18:3 ω 3)	Houby
10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0	Aktinobakterie

Tab. 2.1: PLFA běžně využívané jako biomarkery pro specifické skupiny mikroorganismů (Leckie 2005)

Hlavní výhodou této metody je možnost analýzy mikrobiálního společenství, protože rozdílné skupiny organismů obsahují PLFA, které se vyskytují převážně v rámci této skupiny v určitém prostředí (Klamer a Bååth 2004). Analýza PLFA má potenciál stát se levnou kvantitativní metodou pro mikrobiální profilování velkého množství komplexních vzorků (Fan a kol. 2017).

2.2 Molekulární metody

Na DNA založené identifikující metody, které fylogeneticky analyzují mikrobiální společenstva, výrazně zvýšily naše porozumění mikrobiální diverzitě. Tyto metody se staly nepostradatelnými nástroji nejen v klasické ekologii mikroorganismů, ale také v jiných oblastech výzkumu, neboť je dnes známo, že mnoho vlastností jednotlivých druhů lze vysvětlit pouze v kontextu komunity (Nocker a kol. 2007). Extrakce nukleových kyselin a jejich následná amplifikace polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) se ukázala velmi užitečná při hodnocení změn ve struktuře mikrobiálních komunit pomocí několika technik profilování mikrobiální komunity (Malik a kol. 2008).

DNA je přítomná ve všech organismech a je v ní uložena fylogenetická informace, a proto je tato látka vhodným kandidátem pro studium mikrobiálního společenstva. Hlavní přístupy k získání DNA je buď separace buněk z půdy a následná extrakce DNA z buněk anebo přímá lýze buněk v půdě pro extrakci DNA. Přímá lýze buněk je v dnešní době obecně preferovaná, protože poskytuje vyšší výtěžnost DNA a DNA je považována za reprezentativnější pro celé společenství. Přímá extrakce DNA ze vzorku zahrnuje jeden nebo více způsobů lýze buněk, které mohou být chemické (např. detergenty), enzymatické (např. lysozym) nebo mechanické (např. za pomoci malých skleněných kuliček) (Leckie 2005). Na extrakci a následné purifikaci nukleových kyselin je závislá následná PCR amplifikace, neboť nedostatečná lýze buněk může vést k přednostní extrakci DNA gramnegativních bakterií nebo příliš drsné ošetření může vést ke štěpení DNA snadno lyzovaných buněk (Malik a kol. 2008).

PCR má schopnost produkce milionů kopií části požadovaného genu, celého genu nebo genových klastrů (Malik a kol. 2008). Je to nejrozšířenější metoda pro amplifikaci DNA pro studium mikrobiální komunity (Liu a kol. 2006). Běžně se pro studium mikroorganismů využívají ribozomální genové markery (Cuscó a kol. 2019). Pro studium mikrobiální komunity se jako první využíval gen 5S rRNA, ale kvůli malé velikosti (120 nukleotidů) a tudíž nízkému obsahu informací se již nevyužívá. Dnes se pro studium bakteriální komunity využívají geny 16S (obsahující 9 hypervariabilních regionů V1-V9) nebo 23S rRNA, které jsou dostatečně dlouhé (Vondráček a kol. 2012). Pro studium fungální komunity se nejčastěji používají vnitřní přepisované mezerníky (ITS, Internal Transcribed Spacer) a geny 28S a 18S rRNA (Yarza a kol. 2017). Cílová DNA je amplifikována pomocí specifických primerů (Liu a kol. 2006). Pro detekci mikroorganismů nebo genů z kontaminovaného prostředí se často využívají dvě techniky PCR: jednoduchá a multiplexní. Jednoduchá PCR využívá pár primerů v jediné amplifikační reakci, zatímco multiplexní využívá několik párů primerů současně k amplifikaci několika genů v jedné reakci. Kromě těchto dvou technik se využívá také tzv. real-time PCR (Malik a kol. 2008). Princip tzv. real-time PCR spočívá v měření fluorescence po každém cyklu a intenzita fluorescenčního signálu odpovídá momentálnímu množství DNA ampliconů přítomných ve vzorku v daném čase. V počátečních cyklech je fluorescence nízká a postupně se zvyšuje, až dojde do bodu, kdy intenzita fluorescence je vyšší než hladina detekce a tento bod se nazývá kvantifikační cyklus a umožňuje stanovit celkovou koncentraci DNA ve vzorku pomocí kalibrační křivky. Pro vizualizaci

amplifikovaných fragmentů DNA mohou být využita nespecifická fluorescenční barviva DNA nebo fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy. Hlavní výhody real-time PCR spočívají v tom, že poskytuje rychlou a vysoce účinnou detekci a kvantifikaci cílových sekvencí DNA (Kralik a Ricchi 2017).

2.2.1 T-RFLP

Analýza polymorfismu délky terminálních restrikčních fragmentů (T-RFLP, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) je fingerprintová metoda založená na PCR, která se běžně využívá pro analýzu mikrobiálního společenstva. Tuto metodu lze využít k analýze společenstev bakterií, archea, hub, a jiných fylogenetických skupin, stejně tak i funkčních genů (Thies 2007). Nejčastěji se však tato metoda využívá k amplifikaci malých podjednotek (16S a 18S) rRNA genů pomocí PCR, přičemž jeden nebo oba použité primery jsou fluorescenčně značeny. Výsledná směs ampliconů rRNA genu je poté štěpena jedním nebo více restrikčními enzymy, a velikost a relativní četnost fluorescenčně značených restrikčních fragmentů je poté stanovena pomocí DNA sekvenátoru. Rozdíly v délce těchto fragmentů souvisí s rozdíly v sekvencích 16S rRNA genů, a umožňuje tak rozlišit fylogeneticky rozdílné organismy (Schütte a kol. 2008). Výhodou této metody je, že je rychlá, vysoce reprodukovatelná a často poskytuje větší množství operačních taxonomických jednotek (OTU, operational taxonomic units) než ostatní na PCR závislé fingerprintové metody (Thies 2007).

2.2.2 Hybridizace DNA

Nejjednodušším způsobem detekce specifických sekvencí nukleové kyseliny je metoda přímé hybridizace sondy na extrakty mikrobiální nukleové kyseliny. Buněčná DNA či RNA je přímo extrahována z environmentálního vzorku a fixována na nylonovou nebo nitrocelulózovou membránu. Na membránu mohou být přeneseny také bakteriální kolonie a jejich nukleové kyseliny jsou po lýzi vystaveny následné hybridizaci (*in situ*). Tyto hybridizační techniky se spoléhají na specifickou vazbu specifické sondy ke komplementární DNA či RNA. Tyto sondy jsou jednovláknové nukleové kyseliny s potenciálem nést detekovatelné markerové molekuly vysoce specifické pro komplementární cílovou sekvenci. Jako sondy nukleových kyselin se nejčastěji používají DNA sondy (Theron a Cloete 2000).

2.2.3 Sekvence DNA

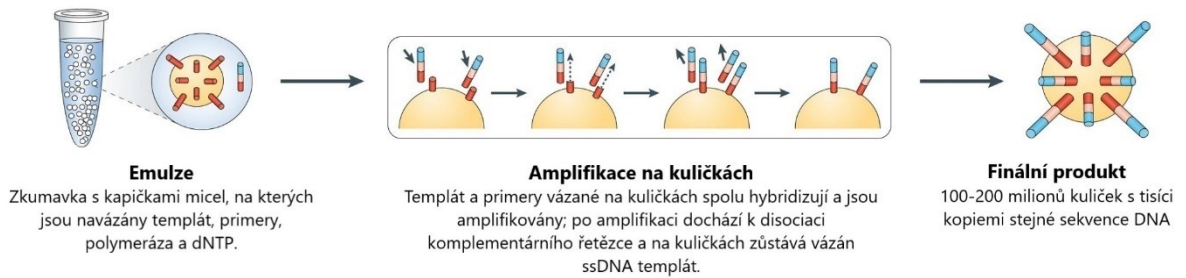
Pomocí sekvenace DNA se určuje pořadí nukleotidů v molekule DNA a tato metoda patří v současnosti mezi nejrozšířenější způsoby analyzování biologického materiálu (Kolísko 2017).

Před 40 lety se stala revoluční Sangerova metoda sekvenování (Van Dijk a kol. 2018), která je založena na syntéze DNA se začleněním nukleotidových analogů ddNTP, které předčasně přeruší syntézu nově vznikající molekuly DNA a fragmenty jsou následně analyzovány (Ahmadian a kol. 2006). Tato metoda umožnila poprvé rozluštění kompletní genomové sekvence. Druhá revoluce přišla s příchodem sekvenčních metod tzv. nové generace (NGS, next generation sequencing), díky kterým bylo genomové sekvenování mnohem rychlejší a levnější (Van Dijk a kol. 2018). Základem metod NGS je tzv. masivně paralelní sekvenování, při kterém je během jednoho experimentu v jednom okamžiku sekvenováno velké množství samostatných molekul (Krejčí a kol. 2015). Mezi platformy patřící do skupiny tzv. druhé generace sekvenování patří např. Roche/454 FLX, která byla první komerčně využívanou platformou sekvenování druhé generace a dnes se již nevyužívá, následovala Illumina/Solexa Genome Analyzer, dále SOLiD sekvenátor a Ion Torrent. Všechny tyto platformy se liší především chemií sekvenování, která vede k rozdílným hodnotám propustnosti, délkám čtení, mírám chyb, různému pokrytí genomu a nákladům (Ambardar a kol. 2016).

Ačkoliv mají jednotlivé komerčně dostupné platformy různou biochemii, tak při sekvenování jsou využívány podobné kroky: (1) extrakce DNA (2) příprava knihovny, která obvykle zahrnuje mechanické či enzymatické štěpení DNA, přidání adaptérů (krátké molekuly DNA o přesně dané sekvenci) a „barcodes“/indexů a amplifikace (vznik klastru identických molekul DNA koncentrovaných v jednom místě), (3) příprava templátu buď pomocí „můstkové“ nebo emulzní PCR, (4) automatické sekvenování (Besser a kol. 2018).

Princip emulzní PCR (emPCR, obr. 2.1) spočívá v ředění a kompartmentalizace molekul templátu v kapičkách vody v emulzi voda-olej. V ideálním případě, probíhá ředění do takové míry, aby každá kapička obsahovala jednu molekulu templátu a funguje jako mikro-PCR reaktor (Kanagal-Shamanna 2016). Tato PCR je využívána např. u sekvenování typu 454 (Roche), SOLiD (Thermo Fisher), Ion Torrent (Thermo Fisher) (Goodwin a kol. 2016).

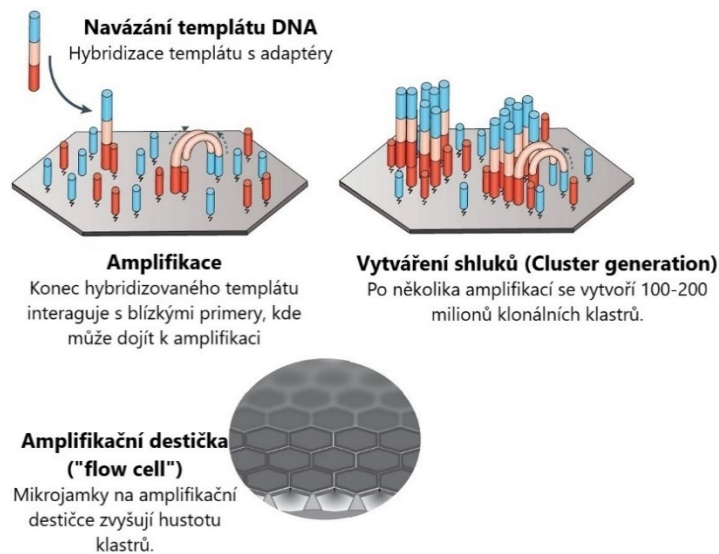
EMULZNÍ PCR



Obr. 2.1: Schématické znázornění průběhu emPCR (upraveno podle Goodwin a kol. 2016)

Princip „můstkové“ (bridge) PCR (obr. 2.2) spočívá v připojení DNA fragmentu k sekvencím adaptérů a následná vazba na primer, který je imobilizován na pevném nosiči („flow cell“). Volný konec DNA fragmentu může interagovat s blízkými primery a vytvářet strukturu „můstek“. PCR je využívána pro tvorbu druhého řetězce DNA z imobilizovaného primeru a nevázaná DNA je odstraněna. „Můstková“ PCR je využívána např. u platformy Illumina (Goodwin a kol. 2016).

Můstková („bridge“) PCR



Obr. 2.2: Schématické znázornění „můstkové“ PCR (upraveno podle Goodwin a kol. 2016)

Hlavní výhody těchto NGS představují to, že nevyžadují bakteriální klonování fragmentů DNA a elektroforetickou separaci sekvenčních produktů. Nicméně, metody NGS mají i několik nedostatků. Jedním z hlavních omezení je jejich relativně krátké čtení. Genom obvykle obsahuje mnoho repetitivních sekvencí, které jsou delší než čtecí rámec NGS. Kromě omezení, které vyplývají z krátkého čtení se také metody NGS spoléhají

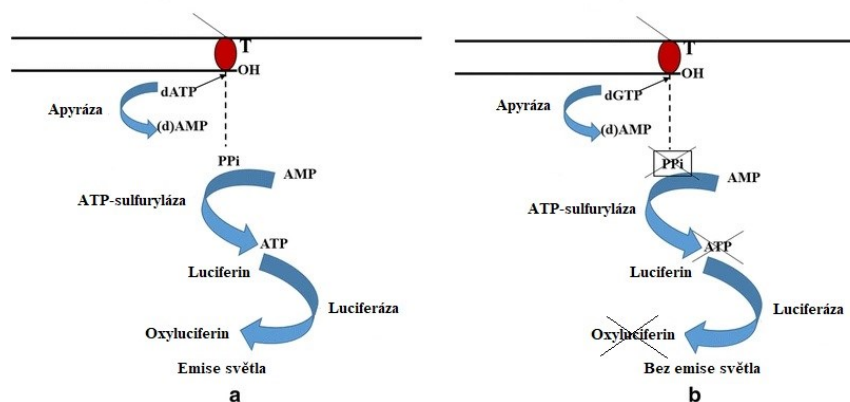
na PCR, což může způsobit obtíže s regiony s velkým počtem GC pb, neboť jsou pomocí PCR neúčinně amplifikovány (Van Dijk a kol. 2018).

Sekvenování pomocí syntézy

Sekvenování pomocí syntézy zahrnuje tři hlavní typy sekvenční chemie: (1) pyrosekvenování, (2) sekvenování reverzibilním ukončením a (3) sekvenování detekcí vodíkových iontů.

1. Pyrosekvenování (454 (Roche))

Principem pyrosekvenování je detekce pyrofosfátu (PPi), který je uvolňován během polymerační reakce DNA a využit jako indikátor inkorporace specifické báze (Obr. 2.3). Zahrnuje detekci inkorporované báze do dceřiné DNA pomocí DNA polymerázy s postupným přidáváním a odstraňováním všech 4 bází a detekci uvolňovaného pyrofosfátu kaskádou enzymů, které emitují světlo. Hlavní limitací pyrosekvenování je nepřesné homopolymerní sekvenování, kdy přidání více než pěti identických nukleotidů nelze účinně detekovat (Ambardar a kol. 2016). Další problémy nastávají při sekvenování templátů bohatých na GC páry bází (Ari a Arikan 2016). Ačkoliv bylo pyrosekvenování průkopníkem v NGS, tak se již nevyužívá (Ambardar a kol. 2016).



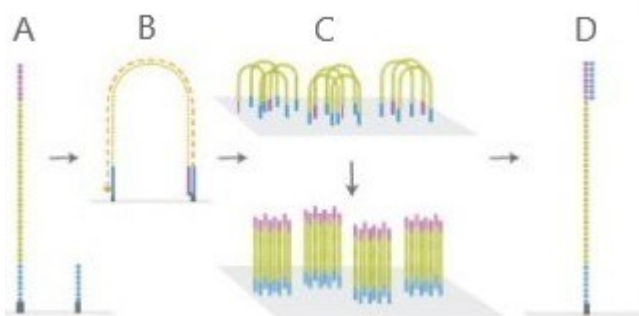
Obr. 2.3: Schématické znázornění enzymatických reakcí probíhajících při pyrosekvenování a) během inkorporace komplementárního nukleotidu a b) pokud nukleotid není inkorporován (upraveno podle Ambardar a kol. 2016)

2. Sekvenování za pomoci reverzibilních terminátorů (Illumina)

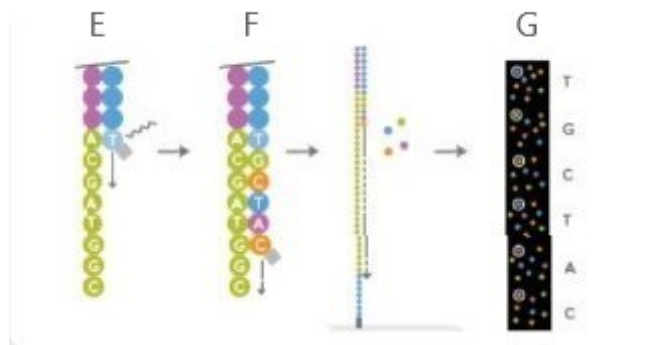
Obecný mechanismus sekvenace založené na reverzibilních terminátorech se skládá ze tří hlavních kroků: příprava knihovny, klonální amplifikace a sekvenace syntézou (Ari a Arikan 2016). Princip metody sekvenování reverzibilními terminátory spočívá v přidání směsi čtyř fluorescenčně značených nukleotidů pro čtyři báze jako reverzibilních terminátorů reakce a speciálního enzymu DNA polymerázy, který je může inkorporovat

k templátu (Bentley 2006). K sekvenování reverzibilní terminací se řadí platforma Illumina (Ambardar a kol. 2016). U této platformy jsou na oba konce DNA fragmentů ligovány adaptory a po denaturaci jsou imobilizovány na pevný nosič, který je hustě pokryt oligonukleotidy komplementární k adapterům na koncích studovaných amplikonů. Každý imobilizovaný jednovláknový fragment potom vytváří, hybridizací svým volným koncem a komplementární sekvencí na povrchu nosiče, strukturu „můstek“ (Obr. 2.4). Komplementární adaptéry na povrchu fungují jako primery pro následnou PCR amplifikaci, která je nezbytná pro získání dostatečné intenzity světelného signálu pro spolehlivou detekci přidaných bází. Po několika PCR cyklech se získá okolo 1000 kopií jednovláknových fragmentů DNA. Poté se přidá reakční směs (primery, 4 reverzibilní terminátorové nukleotidy a DNA polymeráza), která je důležitá pro sekvenční reakci a syntézu DNA. Terminátorový nukleotid, stejně jako jeho poloha, je poté detekován a identifikován pomocí fluorescenčního barviva (obr. 2.5). Reverzibilní terminátor na 3'-konci, stejně jako fluorescenční barvivo jsou poté odstraněny a může dojít k začlenění další báze (Ansorge 2009).

Sekvenátor MiSeq (Illumina) je jedním z nejmenších stolních sekvenátorů, který může v jednom cyklu provádět generování klastrů, amplifikaci, sekvenování genomické DNA a analýzu dat (Ravi a kol. 2018). Lze si přizpůsobovat délku čtení, sekvenovanou oblast nebo zajistit jednostranné či oboustranné čtení (Ansorge 2009). Mezi další platformy společnosti Illumina patří i HiSeq, která je vhodná pro sekvenování celého genomu organismů, které mají relativně velké genomy, nebo platforma NextSeq (Ari a Arikan 2016).



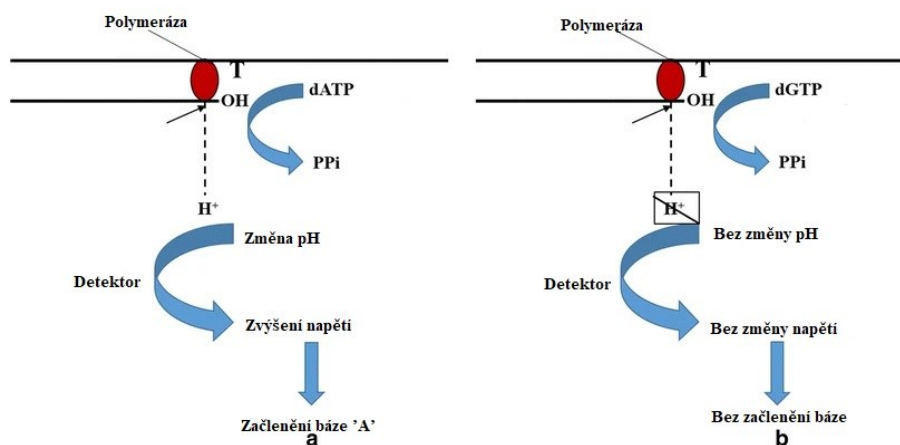
Obr. 2.4: Struktura „můstek“ vznikající při amplifikaci fragmentů DNA, (A) fragment DNA opatřený na obou koncích adaptory imobilizovaný na pevném nosiči, (B) hybridizace volného konce s navázaným oligonukleotidem, (C) isotermální amplifikace, (D) připojení sekvenačního primeru ke každému fragmentu DNA (před samotnou sekvenací) (upraveno podle Ansorge 2009)



Obr. 2.5: (E) inkorporace fluorescenčně značeného nukleotidu s navázaným reverzibilním terminátorem do řetězce, (F) odstranění blokující skupiny, pokračování syntézy na konec řetězce, (G) intenzita fluorescence detekována CCD kamerou (upraveno podle Ansorge 2009).

3. Sekvenování detekcí vodíkových iontů

Tato metoda sekvenování, známá taky jako Ion Torrent, je první, která nevyužívá fluorescenci ani luminiscenci (Heather a Chain 2016). Tato metoda je založena na detekci vodíkových iontů uvolněných při inkorporaci každého nukleotidu (obr. 2.6). Templátová DNA je navázána na iontové částice v mikrojamce tak, že každá mikrojamka obsahuje jednu iontovou částici. Do mikrojamky se přidá jeden typ dNTP a jeho inkorporace je detekována uvolněním vodíkového iontu, který spouští iontový senzor ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor). Tím dojde ke změně pH, která je detekována snímací vrstvou jamky, která převede chemický signál na digitální (Ambardar a kol. 2016). Tato technologie umožňuje velmi rychlé sekvenování během detekční fáze, ale není příliš schopná snadné interpretace homopolymerních sekvencí kvůli ztrátě signálu díky inkorporaci více shodných dNTP (Heather a Chain 2016).

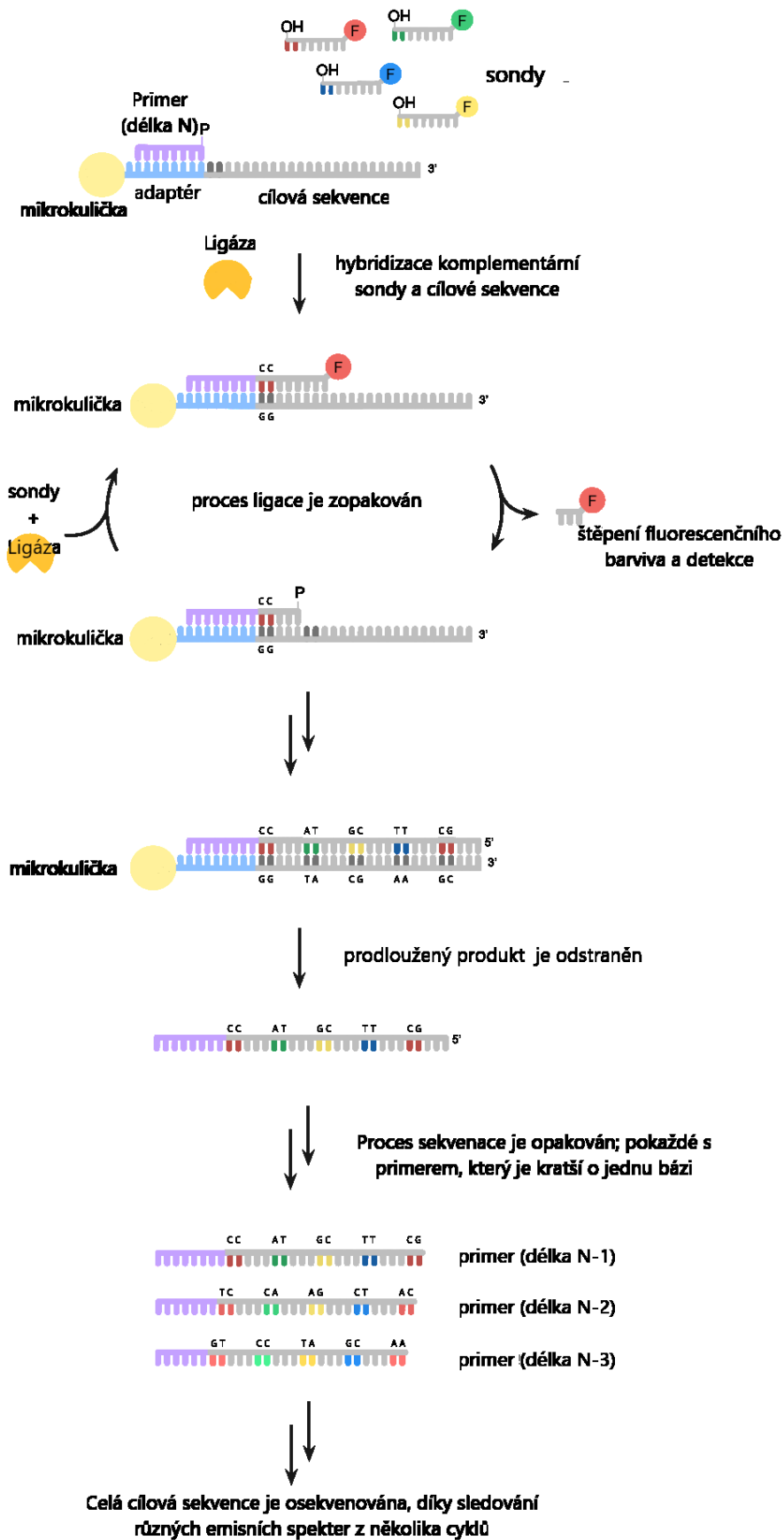


Obr. 2.6: Schématické znázornění změny pH při Sekvenování detekcí vodíkových iontů a) během začlenění komplementárního nukleotidu a b) pokud nukleotid není začleněn (upraveno podle Ambardar a kol. 2016)

Sekvenování pomocí hybridizace a ligace

Sekvenování ligázou (obr. 2.7) využívá ke stanovení nukleotidové sekvence cílové DNA enzym DNA ligázu. Princip této metody spočívá v konstrukci knihovny párových bází značením fragmentů DNA, amplifikace pomocí emPCR na povrchu kuliček a konstrukce tzv. „polonies“, imobilizace v polyakrylamidovém gelu na mikroskopickém sklíčku, sekvenace krátkých značených imobilizovaných fragmentů DNA a fluorescenční zobrazování díky specifickému značení nukleotidů na sekvenčním povrchu (Ari a Arikan 2016).

Komerčně dostupná platforma založená na sekvenaci pomocí ligace je např. SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) (Heather a Chain 2016). Příprava templátu zahrnuje jeho fragmentaci a navázání adaptéru o známé sekvenci. Adaptéry připojené k fragmentům DNA jsou poté připojeny k paramagnetickým kuličkám o velikosti 1 μm a amplifikovány pomocí emPCR (Cao a kol. 2017). Po amplifikaci jsou kuličky kovalentně navázány na skleněnou destičku. Veškerá chemie v sekvenční technologii SOLiD je založena na hybridizaci a ligaci několika různých sond k templátu. Sonda je dlouhá 8-9 bází a obsahuje 1 nebo 2 báze, které jsou následovány třemi degenerovanými a třemi univerzálními bázemi, na které je připojena fluorescenční značka. Krátký primer spolu se směsí fluorescenčních oligonukleotidových sond nasedají na cílovou komplementární DNA. Sonden jsou ligovány s primery pomocí enzymu DNA ligázy a detekovány pomocí fluorescenčního zobrazení. Nenavázané sondy jsou odstraněny. Fluorescenční značka oligonukleotidové sondy může být po detekci odštěpena, čímž se systém připraví pro další cyklus ligace. Celý tento cyklus se několikrát opakuje pro dosažení kompletní sekvenace cílové DNA (Ambardar a kol. 2016).



Obr. 2.7: Schématické zobrazení SOLiD sekvenování (převzato z www.atdbio.com)

Krátce po vzniku NGS se objevila třetí generace sekvenování (TGS, Third Generation Sequencing). TGS se charakterizuje jako technologie schopné sekvenace jednotlivých molekul (SMS, Single Molecule Sequencing), tedy bez požadavku na předchozí amplifikaci DNA, která se vyskytuje u předchozích generací (Heather a Chain 2016). TGS mají schopnost zajistit tak nízké náklady sekvenování a jednoduchou přípravu vzorků bez nutnosti předchozí PCR amplifikace v mnohem kratším čase než u NGS. Navíc jsou TGS schopny produkce dlouhých čtení, což umožní řešení problémů spojených se sestavováním a repetitivními oblastmi komplexních genomů (Kchouk a kol. 2017). Komerčně dostupné technologie TGS jsou například Pacific Biosciences (PacBio) Single Molecule Real Time (SMRT) sekvenování, Illumina Tru-Seq Synthetic Long-Read technologie a platforma the Oxford Nanopore Technologies (Lee a kol. 2016).

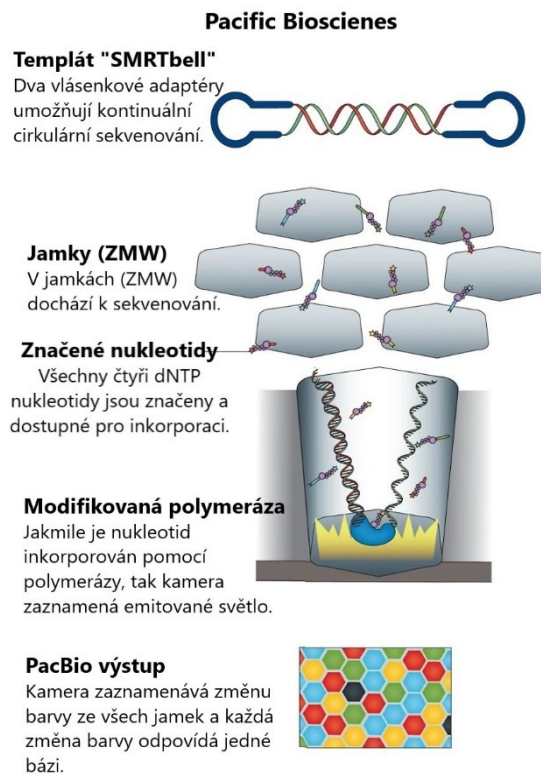
Single Molecule Real-Time (SMRT) sekvenování (PacBio)

Mezi nejzavedenější technologie TGS patří sekvenování metodou SMRT (obr. 2.8) pomocí PacBio RSII nebo Sequel sekvenátorů, která byla představena již v roce 2010. Princip SMRT sekvenování spočívá v sekvenování DNA pomocí sekvenční syntézy a následně dochází k optickému zobrazení fluorescenčně značených nukleotidů, které jsou začleněny do jednotlivých templátových molekul (Lee a kol. 2016).

Před samotným zahájením SMRT sekvenace je nutné vytvořit knihovnu z dvouvláknové DNA, která slouží jako vstupní materiál. Příprava knihovny spočívá v ligaci vlásenkových adaptérů na molekuly DNA, čímž se vytvoří uzavřené kruhové molekuly DNA (tzv. „SMRT bell“) (Ardui a kol. 2018). Předběžná příprava sekvenčního templátu spočívá v nasednutí sekvenčního primeru na ssDNA oblast SMRT adaptérů, načež dochází k navázání DNA polymerázy za vzniku aktivního polymerizačního komplexu (Buermans a den Dunnen 2014). Každá sekvenční reakce poté probíhá uvnitř asi 150 000 jamek tzv. ZMW (Zero Mode Waveguides) (Ardui a kol. 2018). ZMW jsou malé reakční jamky, z nichž každá obsahuje ideálně jeden komplex skládající se z templátové molekuly, sekvenčního primeru a DNA polymerázy navázaného na dně ZMW (Buermans a den Dunnen 2014). Během sekvenace se komplementární vlákno syntetizuje pomocí DNA polymerázy. Fluorescenční značka je umístěna na fosfátové skupině nukleotidu (Koubková a kol. 2014) a při začlenění nukleotidu do templátu dochází k emisi fluorescenčního signálu (Ardui a kol. 2018). Fluorescenční signál je poté zaznamenán v reálném čase rychlostí 75 snímků za sekundu pro jednotlivé ZMW. Toho je dosaženo

díky výkonnému optickému systému, který osvětluje zespoda jednotlivé ZMW jamky červenými a zelenými laserovými paprsky a paralelně dochází k detekci signálu. Šířka ZMW jamky je volena vzhledem k vlnové délce paprsku tak, že světlo nemůže procházet skrz ZMW, ale ve spodní části ZMW, kde je vázán polymerázový komplex, je vytvořena osvětlovací zóna velikosti zeptolitru (Buermans a den Dunnen 2014).

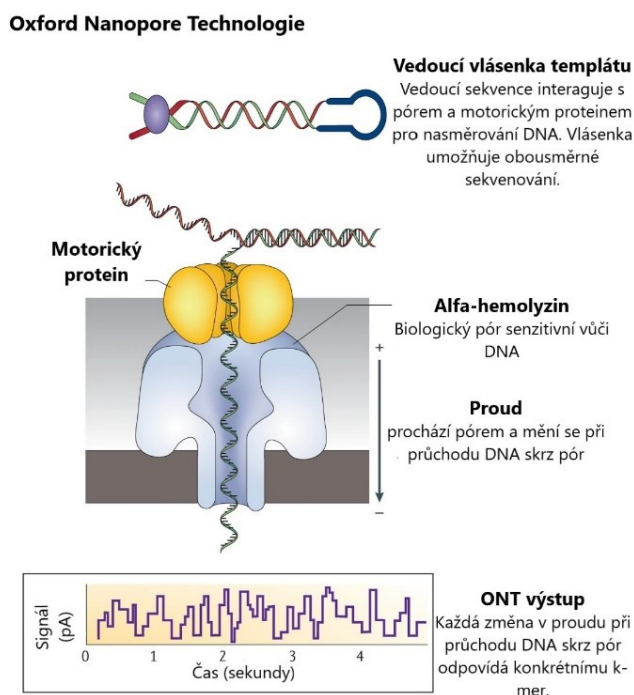
Díky tomu, že je reakce řízena pomocí DNA polymerázy, a protože jsou v téhle technologii zobrazeny jednotlivé molekuly, tak v průběhu času nedochází ke zhoršení signálu. Reakce probíhá, dokud se templát a DNA polymeráza nedisociují a průměrná délka čtení u současného přístroje PacBio RSII je okolo 12 kbp a u novějšího je průměrná délka čtení okolo 20 kbp. Tyto hodnoty jsou asi 200× delší než hodnoty, které lze získat u běžných NGS přístrojů. Díky těmto velmi dlouhým čtecím délkám bylo SMRT sekvenování využito např. při stanovení genomových sekvencí standardní délky u bakterií, metagenomové analýze bakterií a virů nebo při stanovení úplné lidské genomové sekvence (Takeda a kol. 2019).



Obr. 2.8: Schéma SMRT sekvenování od Pacific Biosciences (upraveno podle Goodwin a kol. 2016)

Sekvence založená na nanopórech

Princip detekce sekvenace založené na nanopórech spočívá na iontovém proudu, který se vytváří, když molekula DNA prochází pórem v membráně (obr. 2.9). Membrána odděluje dvě komory, které jsou naplněny vodivým elektrolytem. Díky napětí prochází DNA skrz pór, což má za následek změnu iontového proudu. Čtyři rozdílné báze by měly vyvolat rozdílné hodnoty iontového proudu, což může být použito pro sekvenování řetězce DNA. Transport skrz membránu je obvykle realizován pomocí α -hemolysinu. K pórům je také připojen motorický a transportní protein, který zajišťuje translokaci DNA (denaturace dsDNA na ssDNA) skrz pór (Bruijns a kol. 2018).



Obr. 2.9: Schématické zobrazení principu sekvenování pomocí nanopóru (upraveno podle Goodwin a kol. 2016)

Firma Oxford Nanopore Technologies vyvinula zařízení MinION, které se jako další řadí mezi platformy s dlouhou délkou čtení a patří mezi nejmenší dostupné sekvenční zařízení. Princip tohoto zařízení spočívá v identifikaci DNA bází měřením změn elektrické vodivosti vytvářené při průchodu DNA vláken skrz biologický pór. Profil délky čtení je u zařízení MinIon podobné jako u PacBio, ale chybovost je ještě vyšší (12-38 %) (Besser a kol. 2018).

Hlavní výhody této metody sekvenování jsou, že nevyžadují zobrazovací zařízení pro detekci nukleotidů, náklady na zařízení MinION jsou mnohem menší a lze jej napájet přes USB (Universal Serial Bus) port přenosných počítačů, takže sekvenování lze provádět kdekoliv, dokonce i v terénu. Další výhodou, jelikož sekvenování Nanopore přímo detekuje molekulu DNA bez její předchozí amplifikace nebo syntézy, tak zde není limit pro délku DNA, která může být osekvenována. A navíc detekce změny iontového proudu, která je způsobena průchodem nukleotidů skrz nanopór, není omezena na běžné čtyři nukleové báze adenin, guanin, cytozin a thymin. Sekvenování pomocí nanopóru může přímo pozorovat modifikace bází jako je např. methylace a dokonce přímo sekvenovat molekulu RNA obsahující báze uracilu. Hlavní nevýhodou sekvenování pomocí nanopórů je relativně vysoká míra chyb (5-20 %) ve srovnání se sekvenováním krátkého čtení (Kono a Arakawa 2019).

Sekvenční analýza umožnila nový pohled na složení mikrobiálních společenstev. Vzhledem k velké diverzitě půdních mikroorganismů však mnoho sekvencí vykazuje jen malou podobnost se sekvencemi v databázi a jsou přidány do databáze jako neznámé (Leckie 2005).

3 FARMACEUTICKÉ LÁTKY A JEJICH BIODEGRADACE

Farmaceutické látky patří mezi takzvané „nově se objevující kontaminanty“ (Kraigher a kol. 2008) a zahrnují širokou škálu chemikálií s velmi odlišnými strukturami, funkcemi, vlastnostmi a aktivitou (Gauthier a kol. 2010). Přestože cílem farmaceutických látek je obecně jedinečným způsobem pozitivně ovlivnit zdraví člověka a zvířat, tak často mívají také nepříznivé účinky na životní prostředí (Lonappan a kol. 2016). Tyto látky tak získaly velkou pozornost veřejnosti, neboť představují důležitý problém v otázce znečištění životního prostředí. Jsou vyráběny nepřetržitě, široce aplikovány a uvolňovány do prostředí, čímž dochází ke kontaminaci podzemních i povrchových vod (Kraigher a kol. 2008). Proces čištění odpadní vody nezaručuje úplnou eliminaci farmaceutických látek z finálního odpadu, a proto se tyto látky mohou akumulovat i v čistírenském kalu a biosolidech (Pino-Otín a kol. 2017). Z tohoto důvodu se tak mohou dostávat do životního prostředí a určitým způsobem ovlivňovat flóru a faunu (Gauthier a kol. 2010). Přibližně 70 % podaných léčiv se do životního prostředí dostává v nezměněné podobě, což by mohlo vysvětlovat stále vzrůstající přítomnost farmaceutických látek v životním prostředí (Pino-Otín a kol. 2017).

Farmaceutické látky jsou obzvláště zajímavé kvůli jejich farmakologické aktivitě a celkové spotřebě (Kraigher a kol. 2008). Od ostatních konvenčních polutantů se farmaceutické látky liší především potenciální ekotoxikologií (Caracciolo a kol. 2015), neboť jsou navrženy tak, aby interferovaly s biologickými procesy již v malých koncentracích prostřednictvím specifického účinku a přetrvávaly v živočišném či lidském těle (Pino-Otín a kol. 2017). Mimoto, často působí na specifický cíl, který se může nacházet napříč různými organismy. Proto mohou být farmaceutické látky přítomné v životním prostředí znepokojivé, ačkoliv environmentální koncentrace bývají poměrně nízké (ng- μ g/l), protože mohou mít v některých případech efekt i na necílové organismy (Caracciolo a kol. 2015).

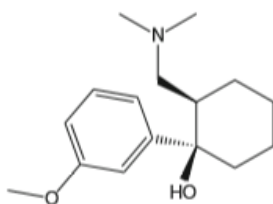
Osud farmaceutických látek v prostředí je závislý na mnoha faktorech, včetně jejich vlastních fyzikálně-chemických vlastnostech (např. lipofilita, rozpustnost ve vodě). Fyzikálně-chemické vlastnosti ovlivňující farmaceutické látky jsou např. teplota, dopadající záření nebo pH. Velmi důležitou roli ale také hraje přítomnost a aktivita mikroorganismů, které mohou mít schopnost danou látku degradovat (Caracciolo a kol. 2015). Schopnost degradace kontaminantů je převážně založena na metabolické

aktivitě mikroorganismů. Biodegradace je považovaná za nejdůležitější způsob odstranění většiny xenobiotik, včetně farmaceutických látek ze životního prostředí (Pino-Otín a kol. 2017).

Schopnost mikroorganismů degradovat určitá xenobiotika závisí na mnoha environmentálních faktorech, které ovlivňují degradační proces. Je všeobecně známo, že teplota hraje velmi důležitou roli v degradaci xenobiotik tím, že ovlivňuje fyziologii bakterií a rychlost enzymatických reakcí. Maximální rychlost degradace xenobiotik se pohybuje v rozmezí 30-40 °C. Při nižších teplotách se stává bakteriální membrána pevnější a naopak při vysoké teplotě je často bráněno membránovému transportu v důsledku denaturace proteinů asociovaných s membránou. Dalším významným faktorem ovlivňující degradaci xenobiotik je pH, které může ovlivňovat buněčnou morfologii, aktivitu a vlastnosti membrány. Dalšími důležitými faktory je také např. přítomnost dalšího zdroje uhlíku a přiměřené koncentrace xenobiotik k indukci vhodných enzymů (Žur a kol. 2018). Biodegradace sloučeniny bude také záviset na toxicitě, struktuře a koncentraci dané sloučeniny, přítomnosti dalších sloučenin a jejich koncentrace (Edrees a kol. 2017).

Následně jsou popsány farmaceutické látky, které jsou velmi často nacházeny v životním prostředí a které byly nalezeny v sedimentech potoka studovaného v experimentální části této diplomové práce.

3.1 Tramadol



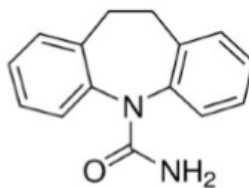
Obr. 3.1: Chemická struktura tramadolu (převzato z Bergheim a kol. 2012)

Tramadol (TRAM) je syntetické opiové analgetikum, které je vzhledem k jeho vysoké účinnosti a malé pravděpodobnosti návykovosti, široce předepisován k úlevě od bolesti. TRAM je metabolizován řadou cest a mohou vznikat specifické metabolity (Bergheim a kol. 2012). Mezi klíčové metabolity TRAM patří různý podíl O-desmethyltramadolu, N-desmethyltramadolu, N,O-didesmethyltramadolu, N,N-didesmethyltramadolu a N,N,O-tridesmethyltramadolu buď ve volné nebo konjugované formě (Kostanjevecki a kol. 2019).

Nicméně, až 30 % konzumované dávky TRAM se vylučuje v nezměněné formě (Bergheim a kol. 2012).

TRAM je obecně považován za vysoce rekalcitrantní vodní kontaminant, neboť účinnost jeho odstranění v klasické biologicko-mechanické ČOV je velmi nízká a odstranění TRAM ze životního prostředí je obtížné (Kostanjevecki a kol. 2019). K získání většího množství informací o biologické rozložitelnosti tramadolu využili Bergheim a kol. (2012) tři nejrozšířenější OECD biodegradační testy (test v uzavřených lahvích, manometrické respirační testy a modifikovanou verzi Zahn-Wellnesova testu). Nicméně, úspěšné degradace nebylo dosaženo ani jedním ze tří zkoušených testů (Bergheim a kol. 2012). Ve studii o aerobní degradaci TRAM pomocí adaptované kultury aktivovaného kalu, bylo zjištěno, že biodegradace TRAM lze dosáhnout pouze pečlivě obohacenými mikrobiálními kulturami. Experimenty, které byly ve studii provedeny naznačují, že několik rodů kmene *Firmicutes* mohou hrát roli v biotransformaci TRAM. Výsledky studie také naznačují, že k transformaci dochází primárně za kometabolických podmínek v přítomnosti snadno degradovatelných organických látek, které podporují vysokou koncentraci biomasy. Z tohoto důvodu také není pravděpodobná rozsáhlá oxidativní mikrobiální transformace v reálném vodním prostředí, jako jsou např. povrchové vody. Mimoto, biotransformace nevede ke kompletní mineralizaci TRAM na CO₂ a vodu, ale k tvorbě transformačních produktů, které jsou za aerobních podmínek poměrně stabilní (Kostanjevecki a kol. 2019).

3.2 Karbamazepin



Obr. 3.2: Struktura karbamazepinu (převzato z Nasir a kol. 2017)

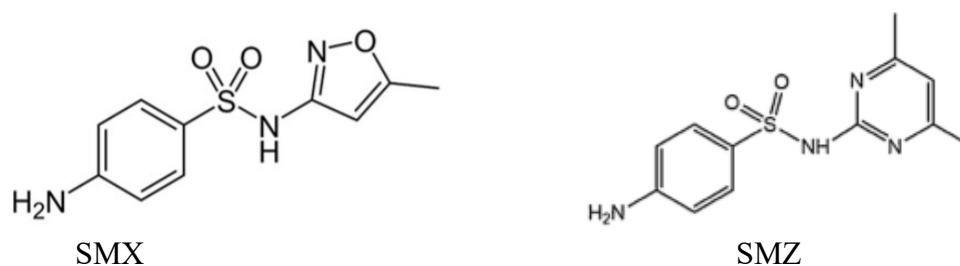
Karbamazepin (CBZ) je lék, který patří mezi antiepileptika, běžně vyžívaný pro léčbu epilepsie, bipolární poruchy a schizofrenie (Nasir a kol. 2017). Jeho struktura je tvořena dvěma benzenovými jádry sloučených do azepinového kruhu, který je spojen s amidovou skupinou (Ungureanu a kol. 2015). CBZ je dobře znám pro jeho odolnost vůči biodegradaci. V konvenčních ČOV je CBZ odstraňován pomocí biologického čištění jen velmi málo (0-8 %) (Bessa a kol. 2017). Nízká účinnost odstraňování karbamazepinu

v ČOV je dána rezistencí této molekuly k biodegradaci při nízkých koncentracích a nízkou vazbou na kal (Ungureanu a kol. 2015). V důsledku toho se CBZ často nachází ve vyšších koncentracích v již přečištěné odpadní vodě (Bessa a kol. 2017). Ačkoliv je výskyt karbamazepinu v životním prostředí velmi běžný, tak je velmi málo známo o mikroorganismech schopných jeho degradace (Thelusmond a kol. 2016).

Pro biodegradaci CBZ mohou být využity houby, jelikož mají schopnost degradace perzistentních polutantů. Mezi houbové druhy, které jsou schopny této degradace, patří např. *Trichoderma harzianum* nebo *Pleurotus ostreatus* a účinnost degradace závisí na použité metodě. *Trichoderma harzianum* a *Pleurotus ostreatus* byly schopny degradovat 72 % a 68 % karbamazepinu během 15 dnů ve stejných podmínkách v Murashige a Skoog médiu během vsádkové kultivace (Nasir a kol. 2017).

Doposud byly pouze v některých studiích identifikovány bakterie, které mají schopnost degradace CBZ. Např. *Rhodococcus rhodochrous* byla identifikována jako bakterie schopná degradovat 15 % karbamazepinu, pokud je vystavena koncentraci 10 mg/l. Nicméně informace o mikroorganismech, které by mohly být odpovědné za degradaci CBZ v půdě neexistují a nejsou dostupná žádná data, která by spojovala specifické bakterie k degradaci CBZ pro koncentrace relevantní pro životní prostředí (Thelusmond a kol. 2016).

3.3 Sulfamethoxazol a sulfamethazin



Obr. 3.3: Struktura SMX (převzato z Martins a kol. 2017) a SMZ (převzato z Xiong a kol. 2019)

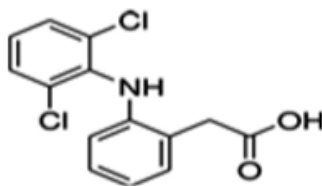
Sulfamethoxazol (SMX) a sulfamethazin (SMZ) patří mezi sulfonamidy, tedy antibiotika, která byla v minulosti používána zejména pro léčbu lidí. V dnešní době je jejich využívání omezováno z důvodů rostoucí bakteriální rezistence, možných nežádoucích účinků a dostupnosti aktivnějších antibiotik. Nicméně, se stále hojně využívají k léčbě bakteriálních onemocnění u dobytka (Vila-Costa a kol. 2017). Sulfonamidová antibiotika (SA) mají široké spektrum účinku a jsou účinná proti většině gram pozitivních a mnoha gram negativních bakterií (Yang a kol. 2016). Jejich účinek

spočívá v inhibici proliferace bakterií působením inhibice syntézy kyseliny listové, která je pro bakterie nezbytná (Martins a kol. 2017).

Konvenční ČOV nejsou obvykle schopny účinně odstraňovat zbytky SA (Yang a kol. 2016). SA se běžně vyskytují v odpadních vodách, v podzemní i povrchové vodě a v půdě. Ačkoliv se koncentrace SA v životním prostředí pohybují v rozmezí ng- μ g/l, mnoho studií naznačilo, že SA mohou vyvolat nepříznivé ekologické účinky na cílové i necílové organismy: změny v mikrobiálních komunitách, inhibice mikrobiálního růstu, snížení mikrobiální aktivity a může mít také nepříznivý dopad na denitrifikaci bakterií (Xiong a kol. 2019). Navíc antibiotické sloučeniny obecně představují jeden z největších problémů, protože se předpokládá, že jejich přítomnost povede ke vzniku rezistencí u bakterií přítomných v ČOV (aktivovaný kal) a v životním prostředí (Larcher a Yargeau 2011).

Většina studií věnovaných biodegradaci SMX se zabývala jeho odstraněním pomocí aktivovaného kalu a pouze několik studií identifikovala bakteriální kmeny, které byly zapojeny do procesu (Reis a kol. 2014). Schopnost degradace SMX byla studována např. pomocí jednotlivých bakteriálních druhů, které jsou typické pro aktivovaný kal (např. *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Rhodococcus rhodocrous*, *R. equi* a *R. zopfii*). *R. equi* byla jediná bakterie, která účinně dokázala odstranit od 15 % do 29 % SMX (s přidavkem glukózy). U ostatních bakterií došlo pouze k mírnému (0-6,6 %) odstranění SMX (Larcher a Yargeau 2011). Mezi další bakterie, které jsou schopné degradace SMX patří např. *Acinetobacter* sp. a *Microbacterium* sp. Tyto bakterie jsou schopny úplné degradace SMX při koncentraci 240 a 10 mg/l. Kromě bakterií mohou degradovat SMX také houby (např. houby bílé hniloby). Degradace organických látek pomocí hub bílé hniloby závisí zejména na extracelulárních ligninolytických enzymech (např. lakáza, lignin peroxidáza a manganová peroxidáza). Mezi houby bílé hniloby schopné degradace SMX patří např. *Pleurotus ostreatus* a *Trametes* sp. (Wang a Wang 2018).

3.4 Diklofenak

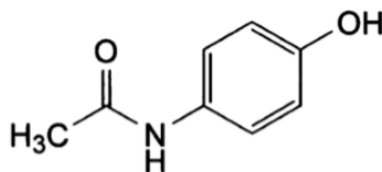


Obr. 3.4: Struktura diklofenaku (převzato z Lonappan a kol. 2016)

Diklofenak (DF) patří mezi pravidelně využívané analgetické a antirevmatické nesteroidní protizánětlivé léky (Stylianou a kol. 2018). Název DF je odvozen od chemického názvu: kyselina 2-(2,6-dichloranilin) fenyloctová. Běžně je DF používán k redukci zánětu nebo zmírnění bolesti. DF není často úplně rozložen v ČOV díky jeho nízké rozložitelnosti a vyšší míře spotřeby (Lonappan a kol. 2016). Po expozici DF o koncentraci 50 pg/l také bylo zaznamenána trvalá změna ve složení mikrobiálního společenstva v bioreaktoru pro čištění odpadních vod. Účinnost odstranění DF v ČOV bývá různá a DF bývá odstraněn v rozmezí 5 až 81 % (Stylianou a kol. 2018). Z těchto důvodů je DF často detekován v řekách, sedimentech a kalech (Lonappan a kol. 2016). Rozsáhlé celosvětové využívání diklofenaku a jeho neustálé uvolňování do životního prostředí, vyvolalo vážné obavy ohledně možného dopadu na přírodu a zdraví lidí a zvířat (Facey a kol. 2018). DF může mít také nepříznivé účinky na mikroorganismy. Ve vysokých koncentracích (50-100 mg/l) inhibuje růst gramnegativních i grampozitivních bakterií inhibicí syntézy DNA (Caracciolo a kol. 2015).

Dobře známý mechanismus odstraňování polutantů v půdách zahrnují jejich degradaci půdními bakteriemi. Nicméně doposud většina informací ohledně bakterií degradujících DF převládala z jiných mikrobiálních zdrojů/inokul, než ze zemědělských půd a tyto experimenty byly prováděny za aerobních podmínek. Např. *Enterobacter cloacae* (z domácího kompostu) byla schopna transformovat DF (Thebusmond a kol. 2018). Z aktivovaného kalu byla také izolována bakterie *Brevibacterium sp.* D4, která byla schopna degradace 90 % DF o koncentraci 10 mg/l při periodickém doplňování acetátu jako doplňkového zdroje uhlíku (Bessa a kol. 2017). Studium biodegradace DF v zemědělských půdách naznačilo, že DF je snadno přístupný pro aerobní biodegradaci v půdě. Houba bílé hniloby *Phanerochaete sordida* rychle degradovala DF a transformační produkty, hydroxylované v jednom benzylovém jádře, byly detekovány v použitém kultivačním médiu. Rovněž bakterie kmene *Actinoplanes sp.* byly schopné hydroxylace DF na různé produkty pomocí cytochromu P450 (Al-Rajab a kol. 2010).

3.5 Paracetamol



Obr. 3.5: Chemická struktura paracetamolu (převzato z Edrees a kol. 2017)

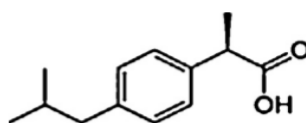
Paracetamol (PAR), také znám jako 4-acetaminophenol nebo N-(4-hydroxyphenyl)acetamid, se sestává z benzenového jádra substituovaného jednou hydroxylovou skupinou a atomem dusíku amidové skupiny navzájem v poloze para (Žur a kol. 2018). Paracetamol je velmi běžné analgetikum používané při horečce, bolestech hlavy a jiných menších bolestech (Wu a kol. 2012) a patří mezi jeden z nejčastěji užívaných léků na světě (Edrees a kol. 2017). Několik výzkumů o odstranění PAR v ČOV bylo zaměřeno na biologické procesy čištění. Podle tohoto výzkumu vykazuje PAR vysokou účinnost odstranění díky jeho vysoké odbouratelnosti (Edrees a kol. 2017). Účinnost odstranění PAR v ČOV se odhaduje okolo 86 %. Přesto jsou znalosti o dalším osudu PAR v životním prostředí stále omezené (Žur a kol. 2018). Ačkoliv PAR nepatří mezi látky, které bývají vysoce perzistentní, tak jej lze v životním prostředí nalézt ve zvýšených koncentracích. Neustálé zavádění paracetamolu do prostředí může převýšit vysokou rychlost jeho transformace (Wu a kol. 2012).

Doposud bylo izolováno několik bakteriálních kmenů, které jsou schopny degradace PAR a využívat ho jako zdroj uhlíku a energie. Metabolické cesty biodegradace jsou jen málo charakterizovány, ale byly identifikovány dva klíčové metabolity, které se vytvářejí během mikrobiální degradace PAR - 4-aminophenol a hydrochinon (Žur a kol. 2018). Mezi houbové druhy, které jsou schopny degradace PAR patří např. *Penicillium sp.* Bylo zjištěno, že tento kmen má schopnost využívat paracetamol jako jediný zdroj uhlíku a energie (Wu a kol. 2012). Mezi další PAR degradující mikroorganismus patří např. *Pseudomonas aeruginosa* (Žur a kol. 2018). Rod *Pseudomonas* představuje environmentální bakterie, které jsou známé pro svou schopnost degradace aromatických sloučenin, které představují problém pro životní prostředí (Edrees a kol. 2017).

V posledních desetiletích se výzkum související s biodegradací PAR soustředil také na identifikaci a charakterizaci metabolických meziproduktů, které jsou zapojeny v počátečních krocích aerobní bakteriální katabolické dráhy. Jednou z možností degradace PAR pomocí mikroorganismů je přes 4-aminophenol na hydrochinon, což je hlavní cesta biodegradace paracetamolu. PAR se převádí na odpovídající sloučeniny 1,4-benzenediol

nebo hydrochinon. PAR je zpočátku katalyzován amidohydrolázou uvolněním acetátu za vzniku 4-aminophenolu, u kterého je aminoskupina poté nahrazena hydroxylovou skupinou za vytvoření hydrochinonu a následuje štěpení kruhu. V druhém případě může být počáteční hydroxylace PAR potenciálně katalyzována pomocí hydrolytického enzymu k produkci hydrochinonu s uvolněním acetamidu, který může být dále přeměněn na oxamovou kyselinu (Wu a kol. 2012).

3.6 Ibuprofen



Obr. 3.6: Chemická struktura ibuprofenu (převzato z Caracciolo a kol. 2015)

Ibuprofen (IBU), také známý jako 2-(4-isobutylphenyl) propionová kyselina (Quero-Pastor a kol. 2014) patří do široké skupiny látek, které jsou klasifikovány jako nesteroidní protizánětlivé léčiva a je jedním z nejpoužívanějších aktivních farmaceutických sloučenin na světě (Ferrando-Climent a kol. 2012). IBU se používá převážně k léčbě pohybového ústrojí, ale také jako širokospektrální analgetikum ke zmírnění mírné až střední bolesti, zánětu či horečky (Quero-Pastor a kol. 2014). Díky jeho vysoké spotřebě je nacházen v různých částech životního prostředí jako jsou sedimenty a povrchové a podzemní vody (Ferrando-Climent a kol. 2012). Účinky IBU na mikroorganismy se zatím studovaly jen málo. Nicméně, některé studie uvádějí jeho významnou antibakteriální aktivitu vůči grampozitivních bakterií a také antifungální aktivitu. Bylo zjištěno, že IBU ovlivňuje růst mikrobiální komunity říčního sedimentu v kapalném médiu se sacharózou a glukózou při environmentálních koncentracích 50 ng/l (Caracciolo a kol. 2015).

Biodegradace je hlavním mechanismem odstraňování IBU v ČOV. Účinnost odstranění této farmaceutické látky je odhadována jako relativně vysoká a závisí na sezónních podmínkách (60-98 %). Nicméně i přes vysokou rychlost degradace v průběhu čištění odpadních vod je IBU detekován v již přečištěné odpadní vodě v rozmezí 0,02 a 4,24 µg/l a v povrchových vodách v rozmezí 0,04 a 1,26 µg/l v různých evropských zemích (Nowak a kol. 2013). Mikroorganismy tedy hrají důležitou roli v biodegradaci IBU, ačkoliv jeho transformace je komplexní proces. IBU může být degradován i řadou houbových organismů, např. *T. versicolor*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma lucidum* a *P. chrysosporium* byly schopné degradace IBU o koncentraci 10 mg/l v tekutém médiu do 7 dnů po jejich přidání (Caracciolo a kol. 2015).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Testované vzorky

Pro zkoumání mikrobiální komunity v prostředí kontaminovaném farmaceutickými látkami byly využity vzorky sedimentů z potoka v oblasti ČOV. Sběr vzorků byl realizován společností Dekonta, a.s. a probíhal v říjnu 2017 a v říjnu 2018. Vzorky byly odebrány ze tří odběrových míst A, B a C (znázorněno na obr. 4.1). Vzdálenosti jednotlivých odběrových míst od ČOV jsou A: 100 m, B: 370 m a C: 680 m. Vzorky byly odebrány za pomoci sondy a byly odebrány ze tří hloubek (0-10 cm, 10-30 cm a 30-50 cm). Poté byly uloženy do plastových falkon a převezeny do laboratoře, kde byly lyofilizovány a uchovány v mrazáku pro další zpracování (metoda PLFA a sekvenace DNA). Vzorky se také nechaly zpracovat pomocí granulometrické analýzy v externí laboratoři. Základní informace o textuře sedimentárních vzorků jsou znázorněny v tab. 4.1.



Obr. 4.1: Zobrazení odběrových míst na mapě (zdroj: www.seznam.cz)

Tab. 4.1: Základní informace o sedimentárních vzorcích pro následné analýzy

Označení na mapě	Odebraný vzorek	Popis vzorku
A	Sediment 0-10 cm	Svrchní sediment s písčitou texturou; podíl jílnatých částic 6,19 %
	Sediment 10-30 cm	Střední horizont s písčitou texturou (bahno, písek); podíl jílnatých částic 6,92 %
	Sediment 30-50 cm	Horizont s hlinitopísčitou texturou (černý, zetlelý, jílovitý); podíl jílnatých částic 15,5 %
B	Sediment 0-10 cm	Svrchní sediment s hlinitopísčitou texturou; podíl jílnatých částic 17 %
	Sediment 10-30 cm	Střední horizont s hlinitopísčitou texturou (bahno/písek/štěrk); podíl jílnatých částic 17,3 %
	Sediment 30-50 cm	Horizont s hlinitopísčitou texturou (černý, zetlelý, jílovitý); podíl jílnatých částic 22 %
C	Sediment 0-10 cm	Svrchní sediment s písčitou texturou; podíl jílnatých částic 5,65 %
	Sediment 10-30 cm	Střední horizont s písčitou texturou (bahno/písek/štěrk); podíl jílnatých částic 7,72 %
	Sediment 30-50 cm	Horizont s písčitolhinitou texturou (černý, zetlelý, jílovitý); podíl jílnatých částic 23,9 %

4.2 Chemikálie a ostatní materiál

Standardy:

diklofenak	Sigma-Aldrich, Čína
hydrochlorothiazid	Alfa aesar, Německo
ibuprofen	Sigma-Aldrich, Čína
karbamazepin	Sigma-Aldrich, Čína
kofein	Sigma-Aldrich, Čína
metoprolol	Alfa aesar, Německo
paracetamol	Sigma-Aldrich, USA
sulfamethazin	Sigma-Aldrich, Čína
sulfamethoxazol	Fluka, Itálie
sulfapyridin	Fluka, USA
tramadol	Sigma-Aldrich, Švýcarsko
triclosan	Fluka, Itálie
Jednotlivé FAME standardy < 98 %	Matreya LLC, USA
Standard C13:0 (methyl tridecanoate) 97 %	Sigma-Aldrich, USA

Rozpouštědla:

2-propanol 99,5%	Sigma, ČR
aceton pro HPLC	Chromservis, ČR
ethanol p.a.	Penta, ČR
fenol (10 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl, pH8; 1 mmol·l ⁻¹ EDTA)	Sigma, ČR
hexan pestapur	Chromservis, ČR
chloroform p.a.	Sigma, ČR
isoamylalkohol 98%	Sigma, ČR
methanol pro HPLC	Chromservis, ČR
Toluen pro HPLC	Chromservis, ČR

Chemikálie:

agarosa GTQ	Roth, Německo
CaCO ₃ p.a.	Sigma, ČR
CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) 98%	Sigma, ČR
EDTA (ethylendiamintetraoctová kys.) 99%	Sigma-Aldrich, USA
HCl pro mol. biologii	Sigma, ČR
ethidium bromid pro mol. biologii	Sigma, ČR
CH ₃ COONa bezvodý, p.a.	Sigma-Aldrich, USA
KH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7,4	Lachema, ČR

KOH 0,2 M v bezvodém MeOH	Lachema, ČR
kyselina octová (ledová) 99,8%	Roth, Německo
NaCl p.a.	Sigma, ČR
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O p.a.	Lachema, ČR
SDS (dodecylsírán sodný) pro mol. biologii	Sigma, ČR
Tris-HCl pro mol. biologii	Sigma, ČR
<i>Ostatní materiál:</i>	
6x Orange DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, USA
dusík na odpařování 4,0	
Glass Beads – kuličky k DNA (0,5 a 0,25 mm)	BioSpec products, USA
kolonky LiChrolut [®] Si, 25–40 μm	Merck, Německo
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, USA
mořský písek praný	PENTA s.r.o., ČR
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies, USA
stříbrné a hliníkové kapsule	Elemental Microanalysis, VB

4.3 Přístrojové vybavení

analytické váhy MX5	Mettler Toledo, Švýcarsko
aparatura pro gelovou elektroforézu Compact XS/S	Biometra, Německo
autokláv Falcon LTE	Scientific Ltd., Velká Británie
centrifuga Medifriger BL-S	J.P Selecta, Španělsko
centrifuga Spectrafuge 24D	Labnet International, Inc., USA
elementární analyzátor FlashSmart [™]	Thermo Scientific, USA
extraktor ASE 200	Dionex, Thermo Scientific [™] , USA
FastPrep [®] -24	MP Biomedicals, USA
fluorometr Qubit [®] 2.0	Life Technologies, USA
lyofilizátor	Labio, ČR
mini centrifuge	Bio-Rad, USA
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, USA
oscilační mlýn MM 400	Retsch, ČR
pH metr IQ 140	I.Q scientific instruments, USA
termocykler	T100 [™] BIO-RAD, USA
UltraCAM Digital Imaging System	Laboratory Trading., USA
vodní lázeň Julabo UC	Julabo, Německo
vortex MS 3 digital	IKA, Čína

4.4 Postup experimentu

4.4.1 Analýza přítomných farmak

Analýza přítomných farmak byla provedena metodou extrakce za zvýšeného tlaku a teploty (ASE = accelerated solvent extraction). Pro extrakci se využívají organická rozpouštědla (pro farmaceutické látky byl využit methanol). Pro analýzu farmaceutických látek byl připraven kalibrační mix se stanovovanými látkami. Finální koncentrace v mixu byly: $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro IBU, $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro PAR, KF a HCHT, $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro DF, SP, SMX, MET a SMZ a $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro TRAM, CBZ a TRIC.

1. Vzorky sedimentů byly odebrány do plastových falkon a následně lyofilizovány.
2. Poté byly připraveny patrony, ve kterých se vzorky extrahovaly do vhodného rozpouštědla.
3. Do patron o objemu 11 ml byly naváženy cca 3 g vzorku sedimentu. Mrtvý objem patrony byl vyplněn praným mořským pískem.
4. EPA vialy o objemu 40 ml, do kterých byl zachytáván extrakt, byly předem zváženy pro stanovení extraktu při dalším zakoncentrování.
5. Připravené vzorky byly extrahovány pomocí methanolu do připravených vial za parametrů popsaných v tab. 4.2.

Tab. 4.2: Parametry extrakce farmaceutických látek pomocí ASE

Metoda pro stanovení farmaceutických látek	
rozpouštědlo	methanol
předehřátí [min]	5
vyhřívání [min]	5
statická fáze [min]	5
výplach [vol]	80
čištění [sec]	60
počet cyklů	3
tlak [psi]	1500
teplota [°C]	80

6. Extrakty byly poté odpařeny pod proudem dusíku na výsledný objem 2 ml.
7. Vialy s extraktem byly zváženy, navážka byla zaznamenána a následně byly vialky s extraktem promíchány na vortexu, aby se stanovované látky opláchly ze stěn vialy.
8. Do vialky o objemu 2 ml bylo odebráno 350–400 μl vzorku.
9. Následovala centrifugace (6000 otáček/min, 15 min).
10. Supernatant byl přenesen do insertu, který byl vložen do čisté vialky.

11. Takto připravené vzorky byly změřeny pomocí LC/MS analýzy na kapalinovém chromatografu (LC) Shimadzu Nexera XR připojeného k hmotnostnímu spektrometru (MS) Sciex Triple Quad 4500 s elektrosprejovou ionizací (ESI) a následně změřeny a vyhodnoceny.

LC-MS metoda

LC/MS analýza byla provedena na Ústavu pro životní prostředí, PřF UK. Chromatografická separace byla prováděna na koloně Cortecs T3 (2,7 μm , 3 mm \times 150 mm) s průtokem 0,4 ml/min při teplotě 40 °C. Mobilní fáze sestávala z 1 mM mravenčanu amonného ve vodě (pH 3,0, mravenčan amonný titrovaný kyselinou mravenčí; rozpouštědlo A) a 100% acetonitrilu (rozpuštědlo B). Program gradientové eluce byl následující: 0,1 min, 90:10 (A:B); 4 min, 50:50 (A:B); 6 min, 50:50 (A:B); 9 min, 5:95 (A:B); 11 min, 5:95 (A:B); 11,5 min, 90:10 (A:B); 15 min, 90:10 (A:B). Objem nástřiku vzorku byl 5 μl . Ionizace elektrosprejem probíhala v negativním (HCHT, IBU, DF) i pozitivním (ostatní látky) módu.

Parametry pro ESI byly následující: curting gas (protiproud dusíku) 20 psi, napětí zdroje 5,5/-4,5 kV, teplota zdroje 450 °C, zmlžující plyn (GS1) 40 psi a sušící plyn (GS2) 50 psi. Pro detekci analytů byl použit režim monitorování vybraných reakcí (MRM).

4.4.2 Stanovení CHNSO a organického uhlíku ve vzorcích sedimentů

1. Vzorky sedimentů se nechaly vysušit na skleněných Petriho miskách při 60 °C přes noc.
2. Následně byly vzorky rozemlety na analytickou jemnost pomocí oscilačního mlýnu Retsch MM400. Vzorky se mlely po dobu 20 sekund s frekvencí 25 Hz.
3. Vzorky byly naváženy do mikrozkušavek ve třech paralelách pro každý vzorek.
4. Poté se vzorky navážily (cca 4 mg) do hliníkových kapsulí pro stanovení uhlíku, vodíku, dusíku a síry a do stříbrných kapsulí pro stanovení kyslíku a navážky byly zaznamenány.
5. Pro měření organického uhlíku (TOC) byly vzorky naváženy do stříbrných kapsulí a otevřené vzorky byly vloženy do mikrotitrační destičky. Do vzorků bylo na začátku každého dne napipetováno 100 μl 6 M HCl a přes noc se nechaly vzorky při 50 °C odpařit. Celkově bylo napipetováno 3 \times 100 μl 6 M HCl (3 \times 24 hod) dle Larsona a kol. (2008).

6. Vzorčky byly následně uzavřeny a vloženy do elementárního analyzátoru, změřeny a vyhodnoceny.

4.4.3 Stanovení pH

1. Usušené vzorky byly naváženy do plastových uzavíratelných nádob (3 g), bylo přidáno 30 ml destilované vody, nádoby byly uzavřeny a nechaly se třepat hodinu na třepačce.
2. Následně byly vzorky uloženy a ponechány v klidu přes noc.
3. Vzorky byly poté přefiltrovány přes filtrační papír a následně bylo u půdních výluhů změřeno pH pomocí pH metru.

4.4.4 Analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA)

Principem analýzy fosfolipidových mastných kyselin je extrakce lipidů ze vzorků, izolace fosfolipidů (součást buněčných membrán a stěn), uvolnění mastných kyselin (FA) z fosfolipidů, převedení mastných kyselin na methylestery (FAME), detekce a stanovení methylesterů pomocí plynové chromatografie (GC) a hmotnostní spektrometrie (MS).

Extrakce lipidů – pomocí jednofázové extrakční směsi chloroform:methanol:fosfátový pufr (ve vhodném poměru) získáme ze vzorku 2 fáze (první fáze je chloroformová a obsahuje lipidy a druhá fáze skládající se z vody a methanolu obsahuje ve vodě rozpustné substance jako uhlovodíky, proteiny, DNA apod.).

Veškeré skleněné nádoby využitě při analýze PLFA bylo vypáleno v peci na 400 °C po dobu min. 4 hod.

1. Do vypálené zkumavky bylo naváženo cca 2 g lyofilizovaného sedimentu.
2. Ke vzorku se přidalo 1 ml 50 mM fosfátového pufru (KH_2PO_4), 2,5 ml methanolu a 1,25 ml chloroformu a zkumavka byla uzavřena víčkem s teflonovou vložkou.
3. Vzorky byly promíchány pomocí vortexu a ponechány 1 hodinu ve tmě při pokojové teplotě.
4. Následovala centrifugace (3500 rpm, 5 min, pokojová teplota).
5. Supernatant byl převeden vypálenou pasterovou pipetou do další vypálené zkumavky (uchováno ve tmě), která se opět uzavřela víčkem s teflonovou vložkou.
6. K sedimentu se přidalo opět 1,25 ml methanolu a 0,625 ml chloroformu.

7. Vzorky se promíchaly na vortexu a byly ponechaly 1 hod ve tmě za stejných podmínek, poté proběhla centrifugace (3500 rpm, 5 min, pokojová teplota).
8. Supernatant se odtáhl pasterovou pipetou a spojil se s minulým supernatantem.
9. Poté se znovu provedly kroky 6-8.
10. K výslednému supernatantu se přidalo 1,88 ml fosfátového pufru a 1,88 ml chloroformu, směs byla promíchána pomocí vortexu a nechala stát v ledničce přes noc.
11. Zbytek extrahovaného materiálu se zlikvidoval.
12. Další den byla provedena centrifugace vzorků (3500 rpm, 5 min, pokojová teplota) a pasterovou pipetou se přenesla spodní chloroformová část do vypálené vialky a uzavřely se víčkem se septem.
13. K vodné části se přidalo opět 1,88 ml chloroformu a následně byly vzorky promíchány pomocí vortexu.
14. Následovala centrifugace (3500 rpm, 5 min, pokojová teplota) a spodní chloroformová vrstva se spojila s minulou. Vodná část se vylila do odpadní nádoby.
15. Získaný extrakt se nechal v digestoři odpařit pod proudem dusíku.

Frakcionace lipidů

1. Před nanesením vzorku na kolonu se kolona promyla 1,5 ml chloroformu (kolona nesměla vyschnout).
2. Odpařené vzorky se důkladně rozpustily ve 450 μ l chloroformu a naneseny na kolonu.
3. Jakmile byl vzorek v náplni kolony, tak se vymývaly nejdříve neutrální lipidy, glykolipidy a poté fosfolipidy.
4. Neutrální lipidy byly vymývány 2 ml chloroformu a tato frakce nebyla analyzována a vylita do odpadní nádoby.
5. Glykolipidy byly vymývány 6 ml acetonu (3 \times 2 ml) a tato frakce také nebyla analyzována a vylita do odpadní nádoby.
6. Fosfolipidy byly vymývány 2 ml methanolu a tato frakce byla jímána do vypálené vialky.
7. Frakce fosfolipidů byla odpařena pod proudem dusíku v digestoři.

Mírná alkalická methanolýza (transesterifikace) – mastné kyseliny vázané ve fosfolipidech jsou uvolněny a převedeny na methylestery mastných kyselin (FAME)

1. Do vialy s odpařeným vzorkem bylo přidáno 0,5 ml toluenu a 0,5 ml methanolu a důkladně promíchány pomocí vortexu.
2. Poté byl přidán 1 ml čerstvě připraveného 0,2 M KOH v bezvodém methanolu a inkubováno při 37 °C 15 min ve vodní lázni.
3. Poté bylo přidáno 1,6 ml hexanu, 0,4 ml chloroformu, 0,3 ml 1 M kyseliny octové a 2 ml čerstvé destilované vody a výsledná směs byla promíchána pomocí vortexu.
4. Poté následovala centrifugace (2500 rpm, 5 min).
5. Horní fáze byla přenesena do vypálené vialky a vzorky se ještě 2 × promyly 1,6 ml hexanu a 0,4 ml chloroformu, poté byly promíchány pomocí vortexu a následovala centrifugace (2500 rpm, 5 min).
6. Spojené fáze ze všech 3 extrakcí byly odpařeny pod proudem dusíku v digestoři.
7. Vialky byly opláchnuty 950 µl hexanu pomocí vortexu, celý objem byl přenesen do krimpovací vialky, bylo přidáno 50 µl vnitřního standardu (C13:O o koncentraci 200 µg·ml⁻¹), vialky byly uzavřeny krimpovacími kleštěmi a do měření na GC-MS byly uchovány při -20 °C.

Kvantitativní stanovení PLFA

Stanovení PLFA bylo provedeno v Laboratoři environmentální biotechnologie AV ČR. Pro kvantitativní stanovení FAME byl použit plynový chromatograf Varian 450-GC (Varian, USA) s hmotnostním detektorem na principu iontové pasti Varian 240-MS (Varian, USA). Látky byly separovány na koloně DB5-MS o délce 30 m, průměru 0,25 mm a stacionární fázi 0,25 µm. Každý vzorek o objemu 1 µl byl dávkován pomocí autosempleru Combi Pal (CTC, USA). Nosným plynem bylo hélium o průtoku 1 ml/min. Teplota injektoru byla nastavena na 240 °C. Teplotní program začal isotermálně při 60 °C a trval 1 min při zavřeném děliči. Poté byl dělič otevřen (1:50) a teplota stoupala lineárně do 120 °C rychlostí 25 °C/min a poté do 240 °C rychlostí 2,5 °C/min. Detekce byla spuštěna 6 min po startu. Byla používána EI ionizace (70 eV). Celkový iontový proud byl měřen v rozsahu 50-500 m·z⁻¹. Jednotlivé FAME byly identifikovány na základě porovnání hmotnostních spekter a retenčních časů s příslušnými standardy. Koncentrace FAME byly stanoveny z výšek píků jednotlivých FAME pomocí externích kalibračních křivek, které byly sestaveny z 5-ti bodů v koncentračním rozsahu 0,05-10 µg·ml⁻¹.

4.4.5 Izolace DNA

Izolace DNA, následná PCR reakce a proces sekvenování byly využity pro stanovení složení mikrobiální komunity ve vzorcích sedimentu. Izolace DNA byla provedena podle modifikované metody dle Millera (Stach a kol. 2001).

Použité roztoky a pufr:

1 mol·l ⁻¹ CaCO ₃ suspenze	Extrakční pufr: 50 mmol·l ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ , pH8
fenol/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1)	50 mmol·l ⁻¹ NaCl
chloroform/isoamylalkohol (24:1)	500 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl pH8
5 mol·l ⁻¹ NaCl	5% SDS
3 mol·l ⁻¹ CH ₃ COONa	1xTE pufr: 10 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl pH8
10% CTAB v 0,7 mol·l ⁻¹ NaCl	1 mmol·l ⁻¹ EDTA pH8
70% ethanol	

Izolace DNA z pevných vzorků

1. Vzorky byly naváženy (0,25-0,5 g) do mikrozkuvek, ve kterých bylo 0,5 g skleněných kuliček (Glass beads) o průměru 0,25-0,5 mm.
2. Ke vzorku bylo přidáno 400-800 µl 1 M suspenze CaCO₃, vzorky byly dobře promíchány pomocí vortexu a ponechány přes noc v lednici.
3. Další den bylo ke vzorkům přidáno 300 µl extrakčního pufru, 150 µl fenol/chloroform/isoamylalkoholu (25:24:1).
4. Vzorky byly zhomogenizovány buď pomocí třepačky (30 min) nebo FastPrep®-24.
5. Poté byla provedena centrifugace vzorků (10000 g, 3 min) a supernatant byl převeden do nové mikrozkuvky. Přesný objem supernatantu byl zaznamenán.
6. Poté byla provedena extrakce supernatantu. K supernatantu bylo přidáno 0,5 × V (supernatant) fenolu a 0,5 × V (supernatant) chloroform/isoamylalkoholu (24:1), vzorky byly promíchány pomocí vortexu a proběhla centrifugace (10000 rpm, 5 min).
7. Po centrifugaci byl supernatant převeden do čisté mikrozkuvky.
8. Extrakce supernatantu. K supernatantu bylo přidáno 1 × V chloroform/isoamylalkoholu (24:1), vzorky byly promíchány pomocí vortexu a poté byla provedena centrifugace (6000 rpm, 5 min).
9. Poté byl supernatant přenesen do čisté mikrozkuvky.
10. K supernatantu bylo přidáno NaCl (1/3 × V supernatantu), CTAB (1/10 × supernatantu).

11. Vzorky byly inkubovány při 65 °C nejméně 30 min a poté ponechány v klidu, aby zchladly na laboratorní teplotu.
12. Ke směsi byl přidán chloroform/isoamylalkohol (1 × V supernatantu), vzorky byly promíchány a následovala centrifugace (4500 rpm, 15 min).
13. Supernatant přenesen do čisté mikrozkušavky.
14. Precipitace. K supernatantu se přidal isopropanol (0,6 × V supernatantu) a 3 M NaAc (0,1 × V supernatantu) a vzorky se ponechaly přes noc v mrazáku.
15. Další den proběhla centrifugace (14000 g, 20 min) hned po vytažení z mrazáku.
16. Tekutá složka byla vylita do odpadu a k sedimentu se přidalo 200 µl studeného 70 % ethanolu.
17. Vzorky byly promíchány pomocí vortexu a opět následovala centrifugace (14000 g, 20 min) a poté byla tekutá složka opět vylita do odpadu.
18. Vzorky byly vysušeny při 45 °C a následně byla peleta rozpuštěna ve 20-35 µl 1×TE pufru.

Změření koncentrace izolované DNA

K předběžnému změření koncentrace izolované DNA a zjištění přítomnosti bílkovin a anorganického znečištění byl použit NanoDrop 1000 Spectrophotometer dle příloženého návodu. Čistota DNA byla stanovena podle poměru absorbance při 260 a 230 nm (A_{260}/A_{230} , 1,5–2,0 pro čistou DNA) a absorbance při 260 a 280 nm (A_{260}/A_{280} , 1,8–1,9 pro čistou DNA). Po změření koncentrace DNA bylo případně provedeno ředění DNA (výsledná koncentrace DNA v rozmezí 50–100 ng·ml⁻¹).

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Program pro amplifikaci DNA bakterií zahrnoval zahřátí a počáteční denaturaci (94 °C, 4 min), 25 × cyklus (denaturace - 94 °C, 45 s, nasedání primerů („annealing“) – 50 °C, 1 min, elongace – 72 °C, 1 min a 15 s) a závěrečnou extenzi (72 °C, 10 min). Po skončení PCR reakce byly vzorky zchlazeny na teplotu 4 °C.

Program pro amplifikaci DNA hub zahrnoval zahřátí a počáteční denaturaci (94 °C, 5 min), 30 × cyklus (denaturace – 94 °C, 30 s, nasedání primerů („annealing“) – 56 °C, 30 s, elongace – 72 °C, 30 s) a závěrečnou extenzi (72 °C, 7 min). Po skončení PCR reakce byly vzorky zchlazeny na teplotu 4 °C.

Při PCR reakci byly využity primery 515F/806R, které sloužily pro amplifikaci hypervariabilní oblasti V4 genu 16S rRNA u bakterií (Caporaso et al., 2010).

Primer 515F: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'

Primer 806R: 5'- GGACTACHVGGGTWTCTAAT -3'

Při PCR reakci houbové DNA byly využity primery gITS7 a ITS4.

Primer gITS7: 5'-GTGAATCATCGAATCTTTG-3'

Primer ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

1. Před zahájením samotné PCR byl PCR-box vysvícen cca 20 min UV světlem. Pro snížení možné kontaminace byl pro míchání PCR používán plastový materiál certifikovaný pro PCR, tj. špičky s filtry a mikrozskumavky.
2. Poté byl připraven mix látek pro určitý počet reakcí, který byl vypočítán v závislosti na počtu vzorků. Složení mixu je znázorněno v tab. 4.3.

Tab. 4.3: Mix látek pro PCR pro 1 reakci

Látka	Množství [μl]
5×Q5 Reaction Buffer	5
PCR Nucleotide Mix (10mM)	0,5
BSA 10 mg·ml ⁻¹	1,5
5×Q5 High GC Enhancer	5
PCR H ₂ O	9,75
Q5 High-Fidelity DNA polymerase	0,25

3. Do PCR stripů se napipetovalo 0,5-1 μl DNA (v závislosti na koncentraci DNA), 2 μl specifického primeru a 22 μl připraveného mixu.
4. Reakční směs byla krátce zamíchána a umístěna do termocykleru (program pro PCR bakteriální nebo houbové DNA).
5. Po ukončení PCR reakce byl vzniklý produkt detekován pomocí agarosové elektroforézy.

Gelová elektroforéza

Pro potvrzení úspěšné PCR reakce byla provedena gelová elektroforéza.

1x TAE pufr (pH 8): 40 mmol·l⁻¹ Tris-HCl
20 mmol·l⁻¹ ledové kys. octové
1 mmol·l⁻¹ EDTA

1. Gel byl připraven z 1% agarosového roztoku v 1 × TAE pufru, po zahřátí a rozpuštění agarosy bylo přidáno 2 μl ethidium bromidu.
2. Roztok byl přelit do připravené aparatury pro elektroforézu.
3. Pro lepší aplikaci při pipetování vzorků do jamek v gelu, byly 2 μl DNA daného vzorku smíchány na parafilmu s 0,5 μl DNA Loading Dye Orange.
4. Vzorky byly nanесeny na gel a gelová elektroforéza byla zapojena na 25 minut při 90 V a 500 mA.
5. Následně byly gely vizualizovány pomocí přístroje UltraCAM Digital Imaging System.

Přečištění PCR produktů

PCR produkty byly před měřením koncentrace přečištěny podle komerčního protokolu, který je součástí MinElute PCR Purification Kitu. DNA byla z kolonky eluovaná pomocí 20 μ l PCR- H_2O .

Změření koncentrace DNA purifikovaných PCR produktů

Před samotnou sekvenací byla u purifikovaných PCR produktů změřena přesnější koncentrace a čistota DNA pomocí fluorometru Quibit.

1. Nejdříve byl připraven pracovní roztok smícháním iQuanttm reagent a iQuanttm pufru v poměru 1:199 μ l \times n (n = počet vzorků).
2. Výsledný roztok byl zabalen do alobalu, aby nedošlo ke kontaktu se světlem.
3. Jako první byly změřeny standarty (190 μ l pracovního roztoku a 10 μ l standartu bylo smícháno ve speciálních mikrozkušavkách).
4. Následně byly změřeny samotné vzorky (199 μ l pracovního roztoku a 1 μ l vzorku bylo smícháno ve speciálních mikrozkušavkách).
5. Změřené PCR produkty byly připravené pro sekvenaci na platformě Illumina Miseq. Takto připravené vzorky byly sekvenovány v externí laboratoři.

4.5 Vyhodnocení sekvenačních dat

Sekvenování proběhlo metodou pair-end sequencing a sekvenční data byla poté zpracována v programu SEED 2 (Větrovský a kol., 2018). Vyhodnocování analýzy bylo prováděno podle dostupného protokolu.

Postup zpracování bakteriálních 16S amplikonů

Pro čtení párů byla data sloučena pomocí fastqjoin. Následně byly vynechány sekvence s dvojnásobnými bázemi a sekvence s průměrem kvality <30. Ze sekvencí byly odstraněny sekvence kratší než 200 bp a delší než 350 bp. Poté byly sekvence seskupeny pomocí algoritmu UPARSE (USEARCH) (Edgar, 2013) při 97% úrovni podobnosti. Pro každý klastr (OTU) byla zkonstruována konsenzuální sekvence. Pomocí MAFT algoritmu byly vybrány nejvíce zastoupené sekvence a výsledné sekvence byly identifikovány pomocí algoritmu BLASTn proti nukleotidové databázi NCBI pro gen16S rRNA. Pro každou OTU byla nalezena nejpodobnější sekvence se známým taxonomickým zařazením na úrovni kmene a rodu („best hit“). Následně byla sestrojena OTU tabulka, tabulka s taxonomií a výsledky byly dále zpracovány v excelu.

Postup zpracování houbových ITS amplikonů

Pro čtení párů byla data sloučena pomocí fastqjoin. Následně byly vynechány sekvence s dvojnásobnými bázemi a sekvence s průměrem kvality <30. Ze sekvencí byl vybrán úsek ITS2 o min. délce 40 bp. Pomocí algoritmu UPARSE (USEARCH) (Edgar, 2013) byly sekvence seskupeny do klastrů, přičemž byly odstraněny chimerní sekvence, při 97 % úrovni podobnosti. Následně byly získány pomocí programu MAFT reprezentativní sekvence. Pro každý klastr (operační taxonomickou jednotku, OTU) byla vybrána nejzastoupenější sekvence. K identifikaci jednotlivých OTU byl použit algoritmus BLASTn proti nukleotidové databázi NCBI. Pro každou operační taxonomickou jednotku byla nalezena nejpodobnější sekvence se známým taxonomickým zařazením minimálně na úrovni kmene a rodu („best hit“). Následně byla sestrojena OTU tabulka, tabulka s taxonomií a výsledky byly dále zpracovány v excelu.

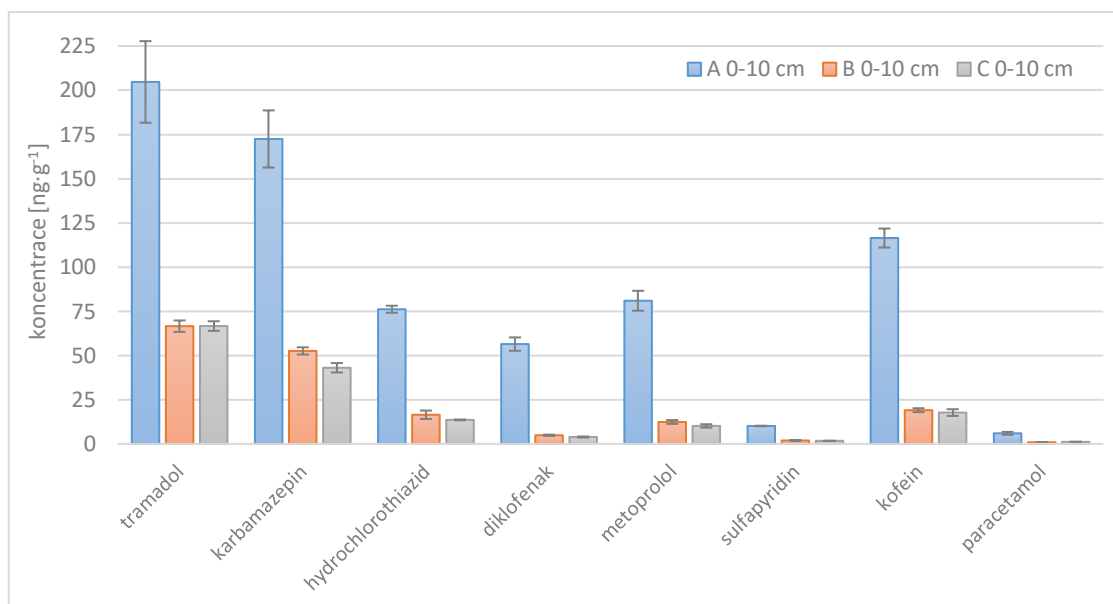
4.6 Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení výsledků byly použity programy SEED 2, Statistica 12 (Trial verze, StatSoft, ČR) a OriginPro (OriginLab, USA). Pro zpracování dat z Mi-Seq sekvenování byl využit program SEED. Pomocí programu byly identifikovány bakteriální a houbové kmeny / rody přítomné v sedimentu. Pomocí programu SEED byl také stanoven Shannon-Wienerův index diverzity, který reprezentuje počet dominantních OTU. Program Statistica byl využit pro vytvoření grafů Analýzy hlavních komponent (PCA), který byl využit pro vyhodnocení korelace mezi farmaceutickými látkami, sekvencí DNA a TOC. V programu OriginPro byly spočítány významné statistické rozdíly mezi hodnotami farmaceutických látek, hodnotami naměřených PLFA, hodnotami stanovených pro celkový a organický uhlík. Statistické rozdíly mezi těmito hodnotami byly zjišťovány pomocí *post-hoc testu* (Tukey test). Rozdíly v hodnotách na hladině významnosti $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní.

5 VÝSLEDKY

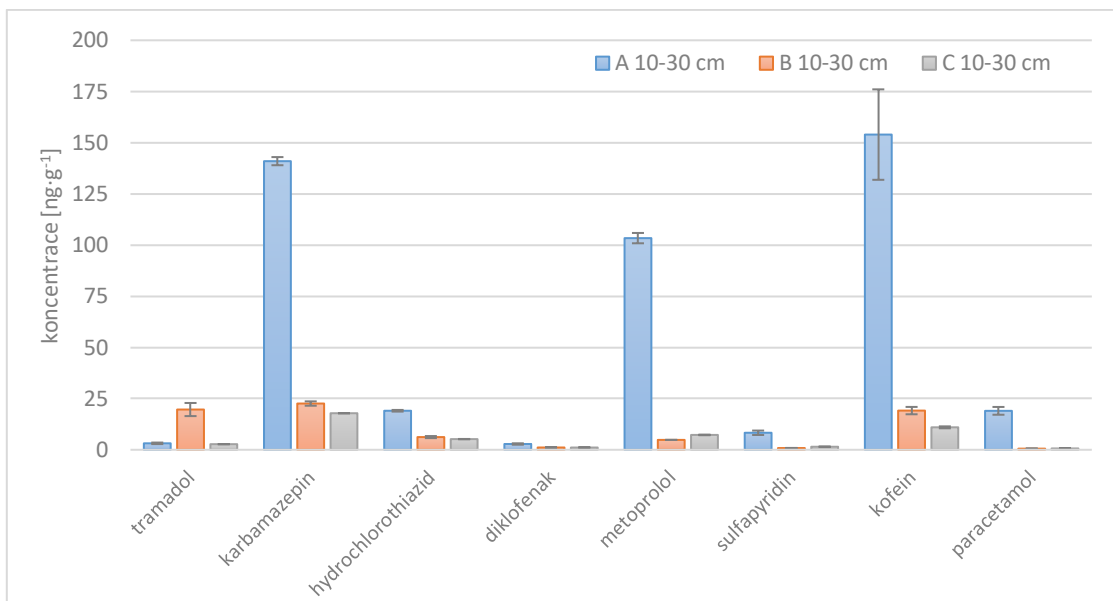
5.1 Analýza přítomných farmak

V rámci této experimentální části byla provedena analýza koncentrací farmaceutických látek přítomných v sediment. Vzorky byly analyzovány ve třech paralelách a následně byl vypočítán průměr koncentrací včetně směrodatných odchylek. Následující grafy znázorňují znečištění vzorků sedimentů naměřeno v říjnu 2017 a 2018.



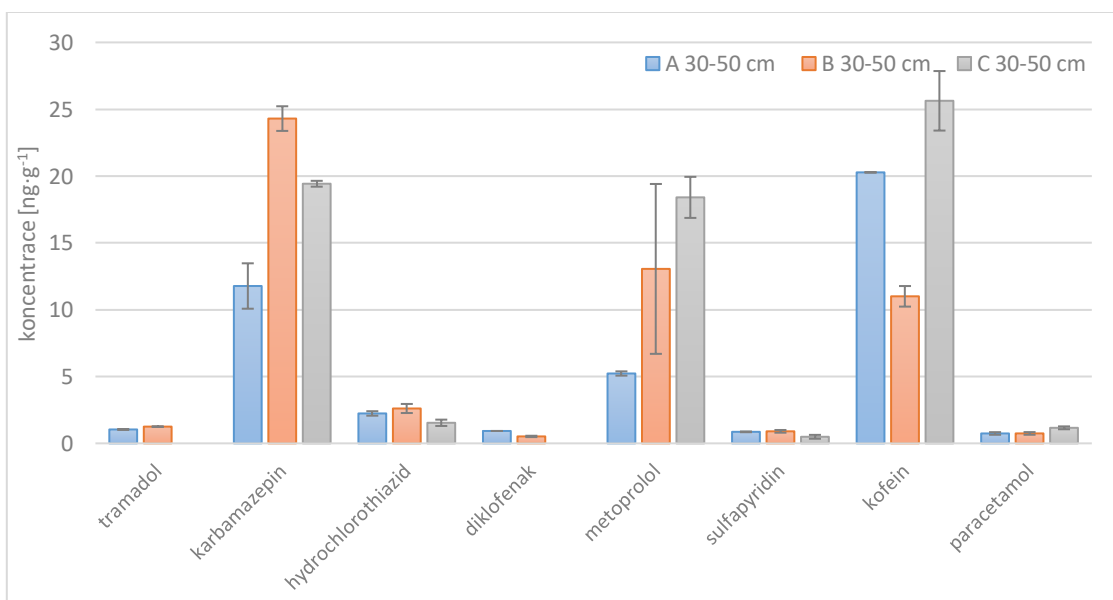
Obr. 5.1: Koncentrace farmaceutických látek přítomných v nejsvrchnější vrstvě sedimentu měřeného potoka v roce 2017

V roce 2017 byla nejvyšší naměřená koncentrace farmaceutických látek $205 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, která byla naměřena pro tramadol. V grafu (obr. 5.1) je zobrazen gradient znečištění farmaceutickými látkami v nejsvrchnější vrstvě sedimentu potoka, kdy největší koncentrace se nachází v prvním odběrovém místě A, kde dochází k vypouštění přečištěné odpadní vody z ČOV. Ve vzdálenějších bodech dochází k úbytku farmaceutických látek a v odběrových místech B a C se koncentrace podstatně neliší (Tukey test, $p < 0,05$).



Obr. 5.2: Koncentrace farmaceutických látek přítomných v prostřední vrstvě sedimentu měřeného potoka v roce 2017

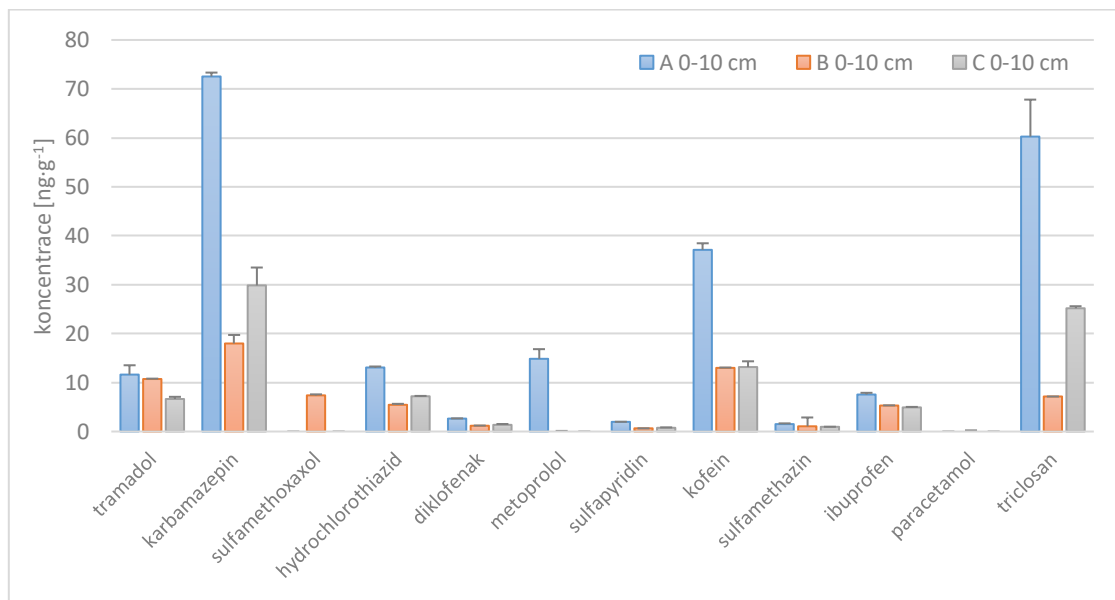
V grafu (obr. 5.2) je zobrazen gradient znečištění farmaceutickými látkami v prostřední vrstvě sedimentu. Z trendu nižší koncentrace ve vzdálenějších místech od ČOV vybočuje pouze tramadol, kde vyšší koncentrace se nachází v odběrovém místě B, nikoliv v místě A. Nicméně, koncentrace tramadolu je v prostřední vrstvě signifikantně nižší než ve svrchní vrstvě sedimentu (Tukey test, 0,05).



Obr. 5.3: Koncentrace farmaceutických látek přítomných v nejspodnější vrstvě sedimentu měřeného potoka v roce 2017

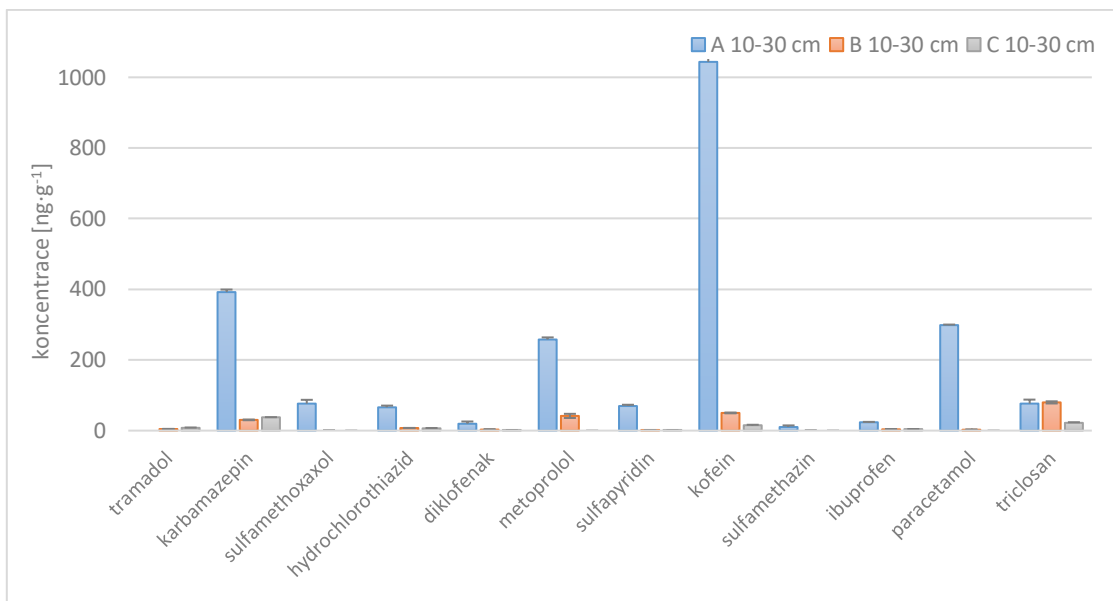
V grafu (obr. 5.3) je zobrazeno znečištění farmaceutickými látkami v nejspodnější vrstvě sedimentu. V této vrstvě sedimentu se již většinou nevyskytuje trend klesajícího

znečištění s rostoucí vzdáleností od ČOV. U některých látek dokonce dochází k nárůstu koncentrace v nejvzdálenějším odběrovém místě, nicméně koncentrace většiny látek jsou stále nižší než v nejsvrchnější vrstvě sedimentu.



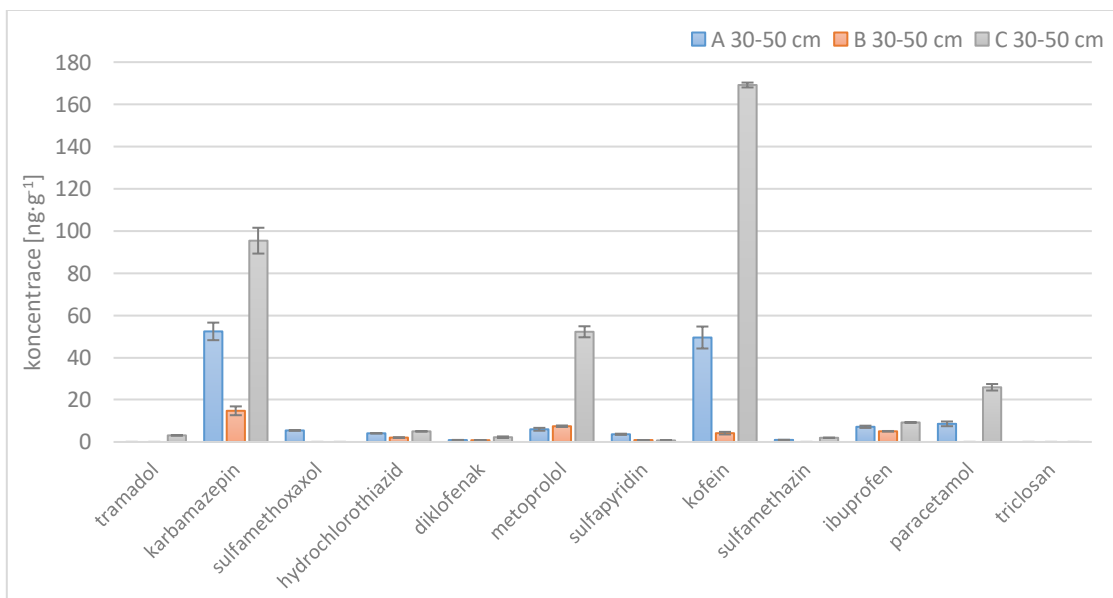
Obr. 5.4: Koncentrace farmaceutických látek přítomných v nejsvrchnější vrstvě sedimentu měřeného potoka v roce 2018

V grafu (obr. 5.4) jsou znázorněny koncentrace farmaceutických látek v nejsvrchnější vrstvě sedimentu. Z grafu vyplývá, že v roce 2018 byly koncentrace farmaceutických látek výrazně nižší než v roce 2017. V nejsvrchnější vrstvě sedimentu se stále vyskytuje nejvyšší koncentrace v prvním odběrovém místě A (Tukey test, 0,05). Hodnoty v odběrovém místě B a C se (s výjimkou triclosanu, kde dochází k mírnému nárůstu v místě C) od sebe významně neliší (Tukey test, 0,05).



Obr. 5.5: Koncentrace farmaceutických látek přítomných v prostřední vrstvě sedimentu měřeného potoka v roce 2018

Z grafu (obr. 5.5) vyplývá, že koncentrace látek výrazně stoupla oproti svrchní vrstvě sedimentu a (s výjimkou tramadolu, který v místě A nebyl detekován a triclosanu, kde není signifikantní rozdíl mezi místem A a místem B) se nejvyšší koncentrace farmaceutických látek přítomných v této hloubce sedimentu vyskytuje v odběrovém místě A (Tukey test, 0,05).



Obr. 5.6: Koncentrace farmaceutických látek přítomných v nejspodnější vrstvě sedimentu měřeného potoka v roce 2018

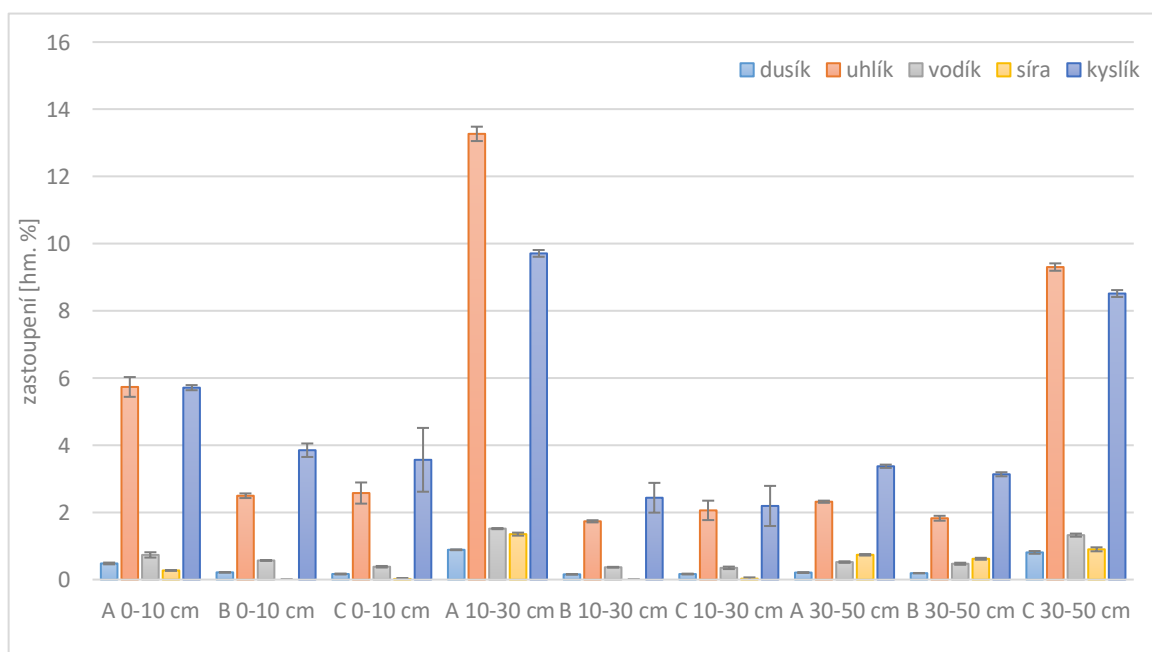
V grafu (obr. 5.6) je zobrazeno znečištění farmaceutickými látkami v nejspodnější vrstvě sedimentu. Z grafu vyplývá, že v nejvzdálenějším odběrovém místě poměrně

stoupla koncentrace stanovovaných látek a většinou převyšuje koncentraci v prvním odběrovém místě A.

Z předchozích grafů vyplývá, že v roce 2018 byly farmaceutické látky přítomny většinou v mnohem nižší koncentraci než předchozí rok nebo nebyly detekovány vůbec. Popřípadě u některých látek (např. karbamazepin) došlo ke zvýšení koncentrace. Dále byl nově stanoven triclosan, který byl detekován v určitých koncentracích ve všech třech odběrových místech. A nově se také objevuje sulfamethoxazol, sulfamethazin a ibuprofen, které v roce 2017 detekovány nebyly.

5.2 Stanovení CHNSO a pH

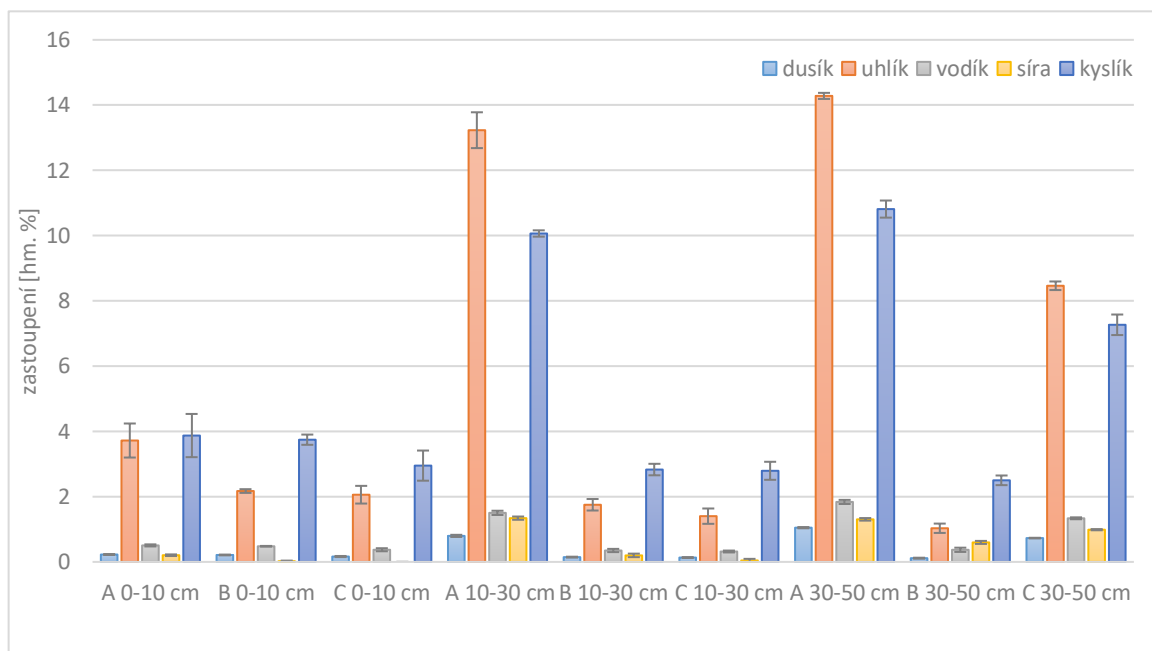
V této experimentální části byla provedena elementární analýza sedimentárních vzorků pro stanovení celkového množství uhlíku, dusíku, vodíku, síry a kyslíku. Kromě celkového uhlíku se také stanovil organický uhlík. Elementární analýza byla provedena ve třech paralelách. Z každé analýzy bylo zjištěno procentuální zastoupení jednotlivých prvků. Následně byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Kromě prvkové analýzy bylo také stanoveno pH a redoxní potenciál.



Obr. 5.7: Zastoupení prvků vyjádřené hmotnostními procenty ve vzorcích sedimentu jednotlivých odběrových míst v roce 2017

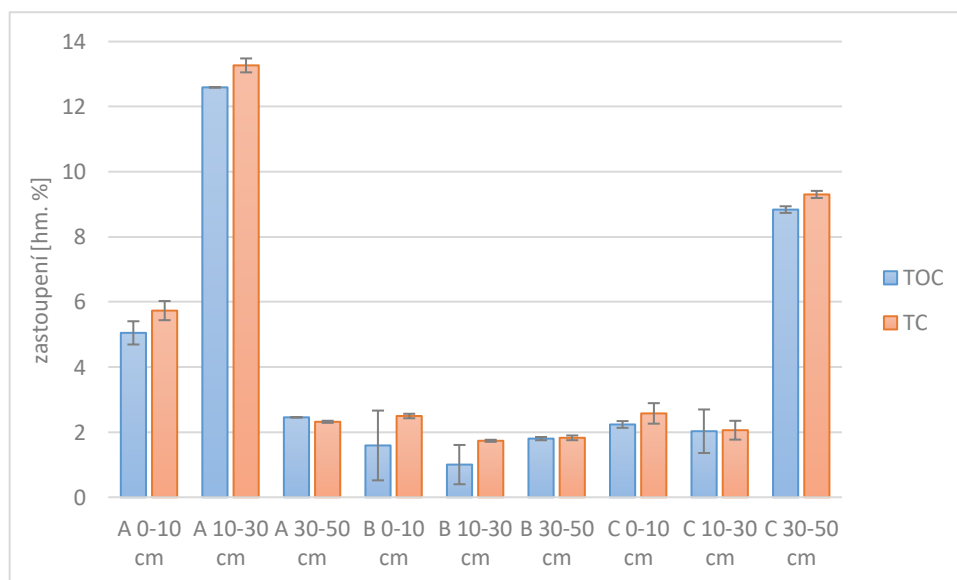
Prvková analýzy byla provedena pro dusík, uhlík, síru, vodík a kyslík. Výsledný graf (obr. 5.7) ukazuje jednotlivé zastoupení těchto prvků v jednotlivých vzorcích. Největší množství celkového uhlíku se nacházelo v prvním odběrovém místě A v hloubce 10-30 cm

a v posledním odběrovém místě C v hloubce 30-50 cm, kde bylo zastoupení větší než 9 %. V těchto dvou odběrových místech bylo také zvýšené zastoupení kyslíku.

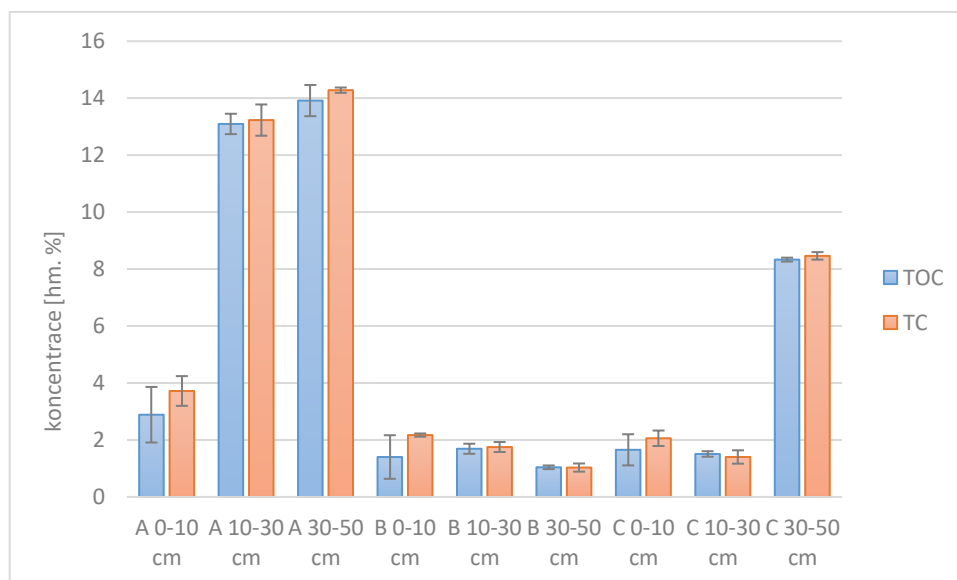


Obr. 5.8: Zastoupení prvků vyjádřené hmotnostními procenty ve vzorcích sedimentu jednotlivých odběrových míst v roce 2018

Prvková analýza byla také provedena v roce 2018. Z grafu (obr. 5.8) vyplývá, že velké zastoupení uhlíku (přes 8 %) se nacházelo v odběrových místech A (v hloubce 10-30 cm a 30-50 cm) a v místě C (v hloubce 30-50 cm). Opět byla v těchto místech změřena také vyšší koncentrace kyslíku, která se pohybovala od 7 do 11 %.



Obr. 5.9: Zastoupení celkového (TC, Total Carbon) a celkového organického (TOC, Total Organic Carbon) uhlíku ve vzorcích sedimentu vyjádřené hmotnostními procenty v roce 2017



Obr. 5.10: Zastoupení celkového (TC, Total Carbon) a celkového organického (TOC, Total Organic Carbon) uhlíku ve vzorcích sedimentu vyjádřené hmotnostními procenty v roce 2018

Předchozí grafy naznačují, že hodnoty TOC a TC se v rámci jednotlivých odběrových míst podstatně neliší a většina uhlíku je tedy organického původu.

Tab. 5.1: Hodnoty pH a redoxního potenciálu ve vzorcích sedimentu

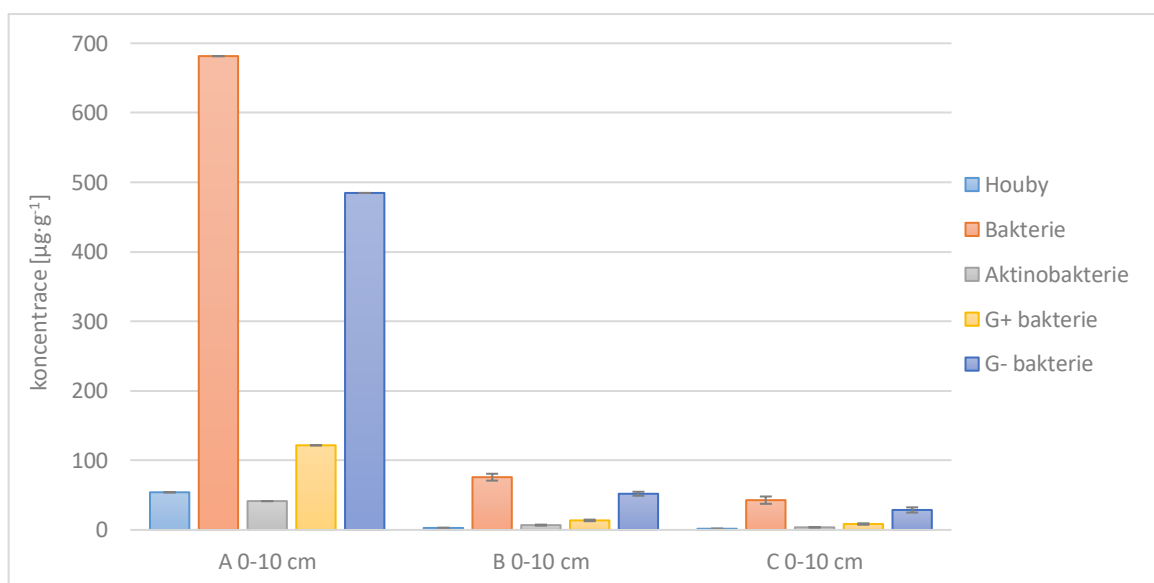
odběrové místo	hloubka	pH	Redoxní potenciál [mV]
A	0–10 cm	7,83	48,8
	10–30 cm	7,58	-92,5
	30–50 cm	7,50	-115,5
B	0–10 cm	7,88	80,3
	10–30 cm	7,95	-161,4
	30–50 cm	7,62	-220,9
C	0–10 cm	7,74	144,8
	10–30 cm	7,84	-36,9
	30-50 cm	7,46	-157,3

Hodnoty pH se výrazně nelišily z hlediska odběrových míst, ani v případě jednotlivých vrstev odebraného sedimentu a hodnota pH se pohybovala v neutrálních číslech. Hodnoty redoxního potenciálu klesaly směrem k anaerobním hodnotám s rostoucí hloubkou sedimentu potoka.

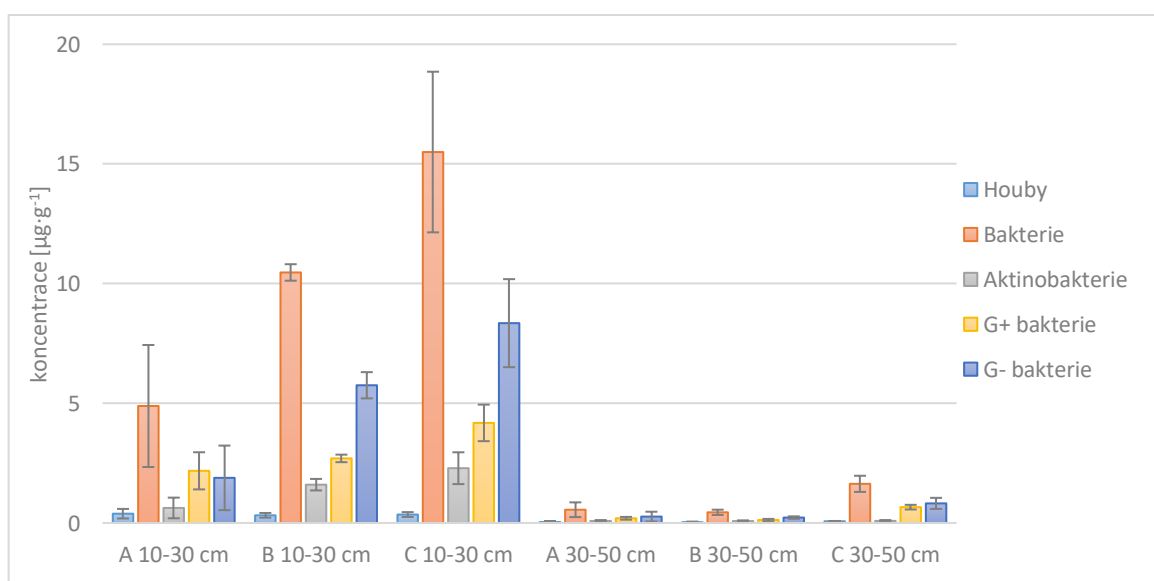
5.3 Mikrobiální komunita v sedimentech

5.3.1 Analýza PLFA

V této experimentální části byla provedena analýza specifických PLFA přítomných ve vzorcích sedimentu pro odhad mikrobiální biomasy. Vzorky byly analyzovány ve třech paralelách a následně byl vypočítán průměr koncentrací PLFA včetně směrodatných odchylek (SD). Následující grafy představují koncentrace PLFA naměřených v roce 2017 a 2018.

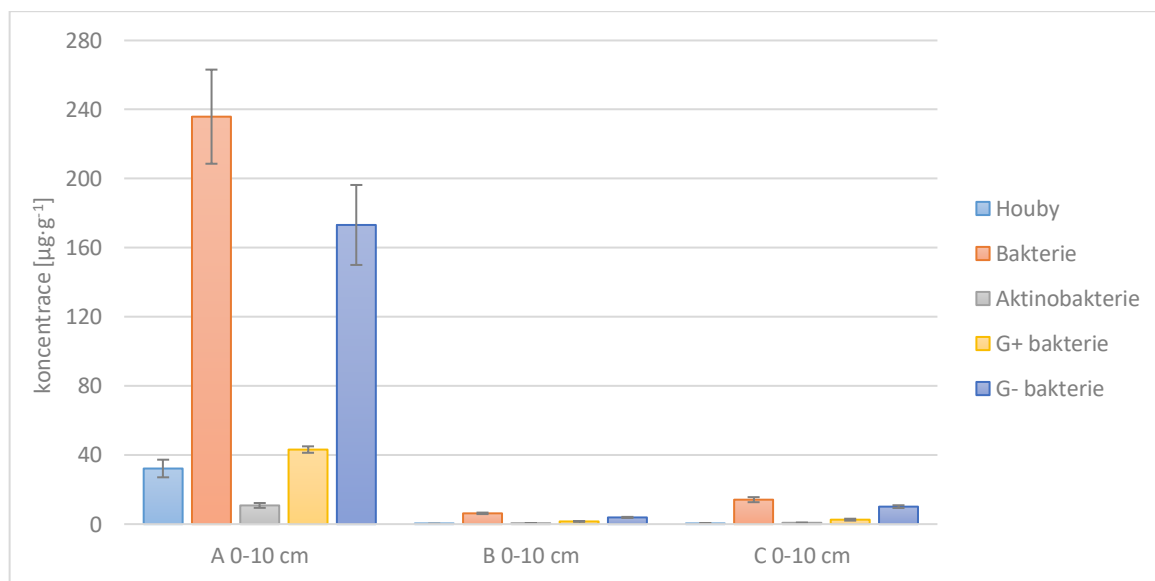


Obr. 5.11: Zastoupení biomasy vyjádřené koncentracemi specifických PLFA v nejsvrchnější vrstvě sedimentu v roce 2017

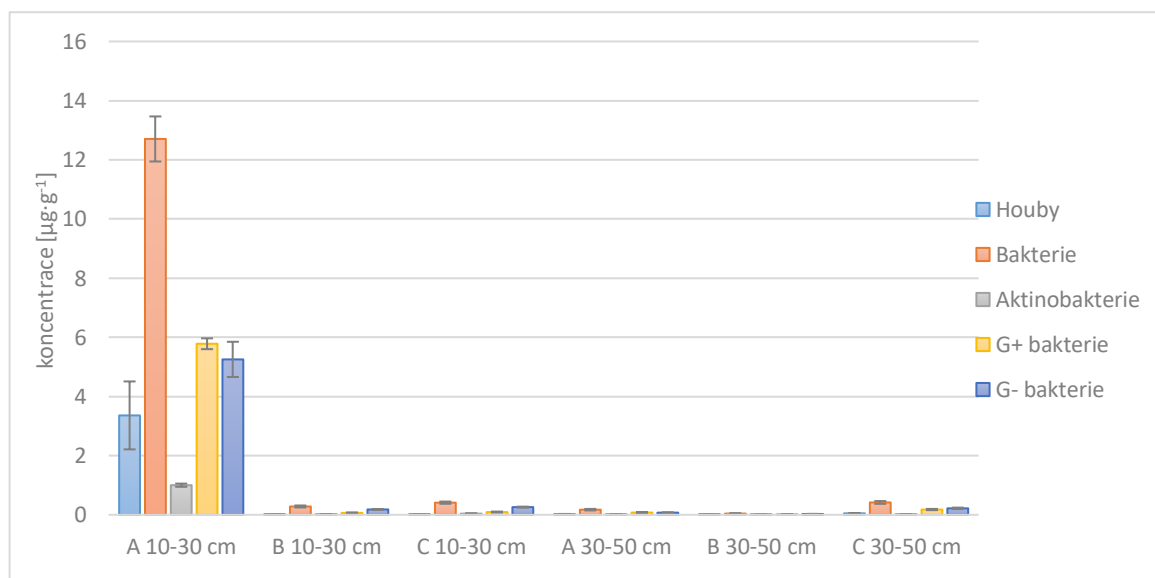


Obr. 5.12: Zastoupení biomasy vyjádřené koncentracemi specifických PLFA ve spodních vrstvách sedimentu v roce 2017

Z předchozích grafu (obr. 5.11 a 5.12) vyplývá, že největší množství biomasy se nachází v prvním odběrovém místě (nejblíže ČOV) ve svrchním sedimentu (Tukey test, 0,05) a ve vzdálenějších místech dochází ke snížení množství biomasy, vzniká gradient. Naopak v prostřední vrstvě sedimentu (10-30 cm) dochází k nárůstu celkové bakteriální biomasy se vzdáleností od ČOV. Houbové druhy se vyskytují ve dvou vrchních vrstvách sedimentu a ve spodním sedimentu (30-50 cm) se nevyskytují.



Obr. 5.13: Zastoupení biomasy vyjádřené koncentracemi specifických PLFA v nejsvrchnější vrstvě sedimentu v roce 2018



Obr. 5.14: Zastoupení biomasy vyjádřené koncentracemi specifických PLFA ve spodních vrstvách sedimentu v roce 2018

Z analýzy specifických PLFA v roce 2018 vyplývá, že největší množství biomasy se nacházelo opět v prvním odběrovém místě ve svrchním sedimentu (Tukey test, 0,05).

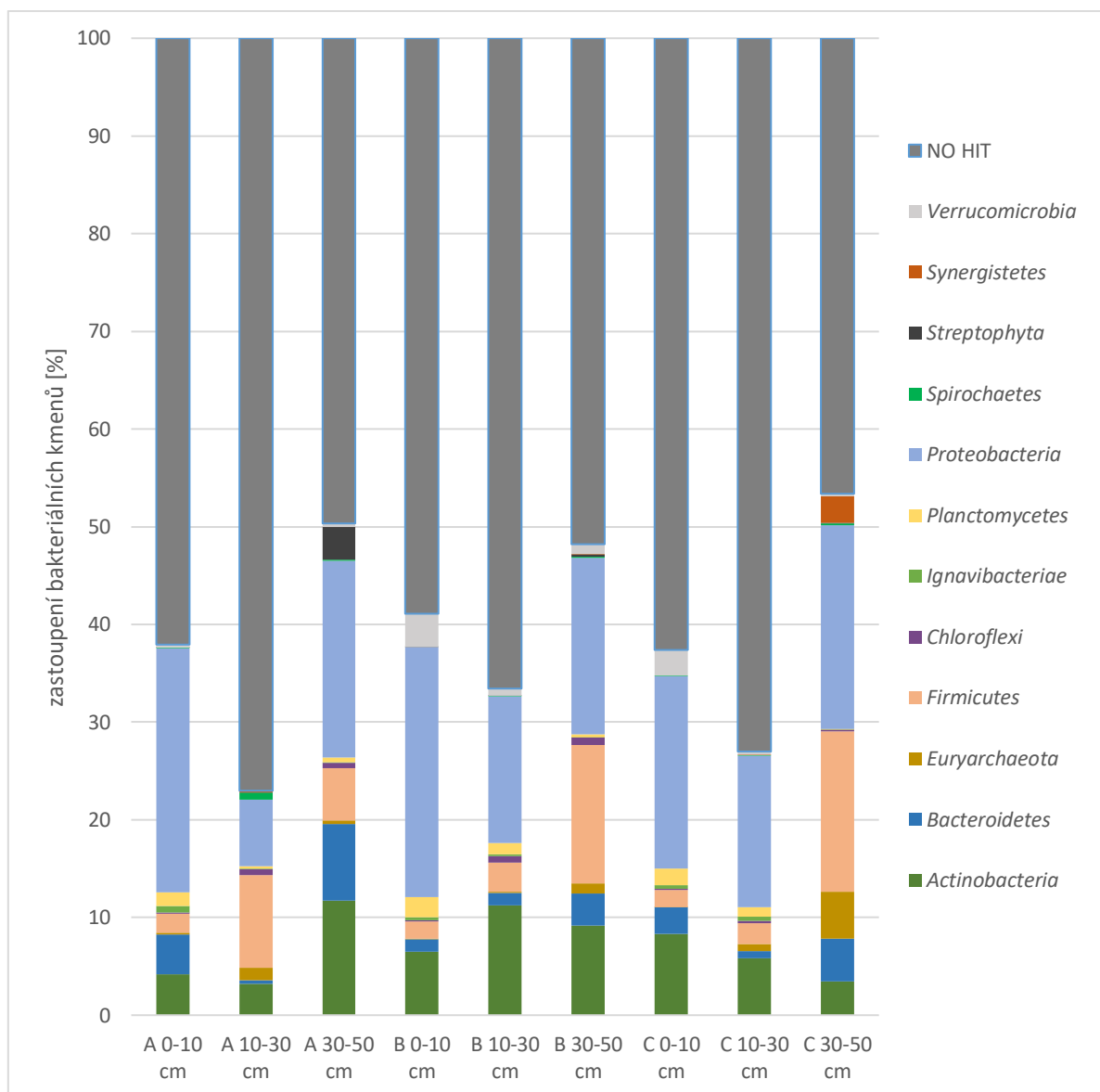
Následně se množství biomasy jen snižovalo a celkově bylo množství biomasy menší než v předchozím roce.

5.3.2 Identifikace mikroorganismů pomocí Mi-Seq

Sekvence genu 16S rRNA získané pomocí Mi-Seq byly použity pro identifikaci bakterií nacházející se v sedimentu potoka (obr. 5.15). Po odstranění nekvalitních sekvencí (příliš krátkých nebo příliš dlouhých) bylo v roce 2017 získáno celkově 426 735 sekvencí. Z celkového počtu sekvencí bylo 167 571 sekvencí zařazeno do 3 168 OTU na 97% úrovni podobnosti. Z celkového počtu sekvencí vykazovalo cca 60 % sekvencí nižší úroveň podobnosti proti NCBI GenBank databázi (označené jako NO HIT).

Proteobacteria (průměrné zastoupení sekvencí 18,5 %), *Actinobacteria* (7,0 %) a *Firmicutes* (6,2 %) vyskytující se ve vzorcích patří mezi nejzastoupenější bakteriální kmene v roce 2017. Dále byly přítomny méně zastoupené kmene jako např. *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* a *Planctomycetes*, které byly přítomny stále v poměrně vysokém zastoupení.

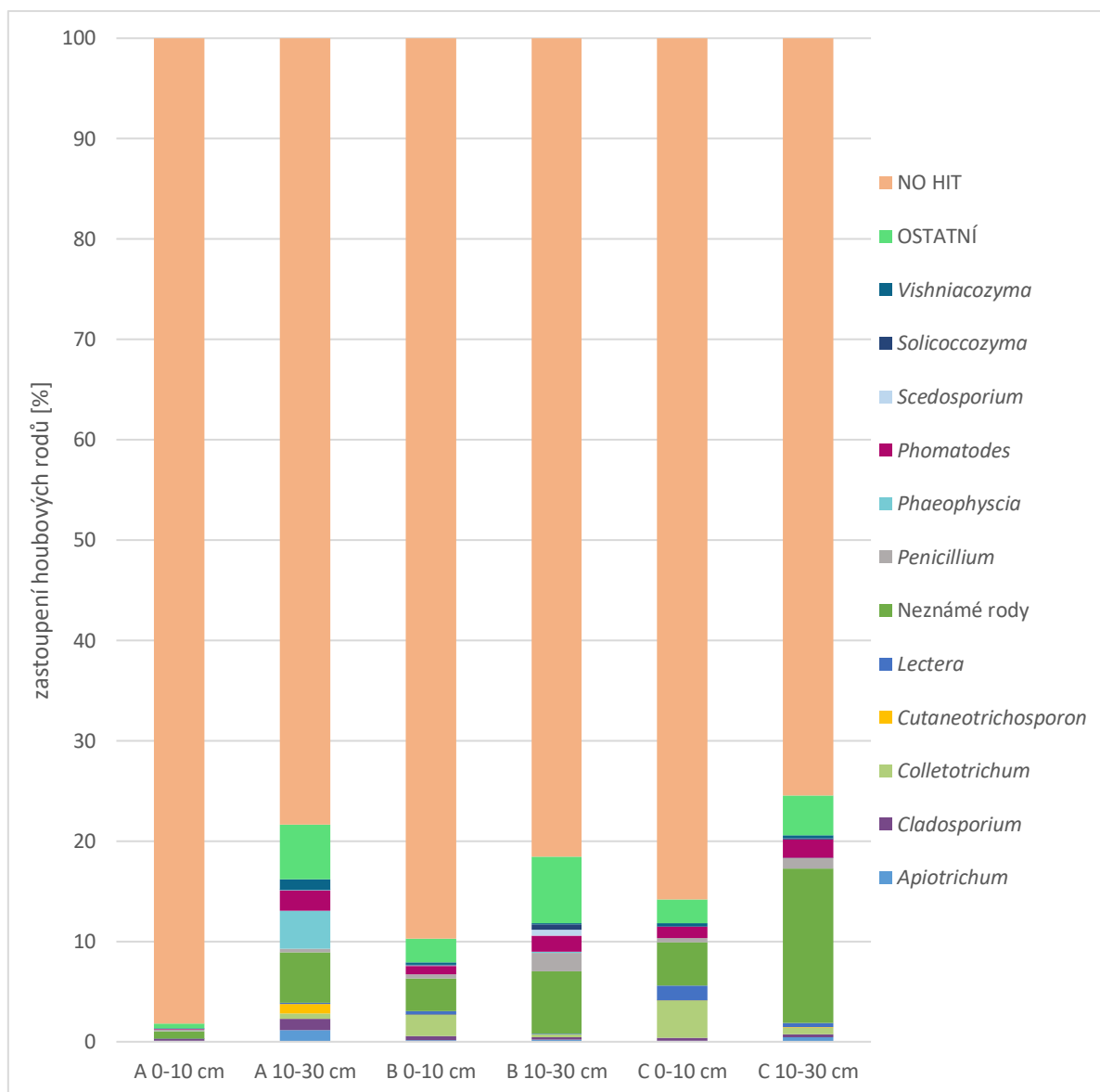
Z kmene *Proteobacteria* byla nejvíce přítomen rod *Oleigrimonas*, *Chitinimonas* nebo *Pseudomonas*, z *Firmicutes* např. *Clostridium* a *Bacillus*, z *Actinobacteria* např. *Streptomyces* a *Mycolicibacterium*, z *Bacteroidetes* např. *Flavobacterium* a z *Verrucomicrobia* např. *Luteolibacter*.



Obr. 5.15: Relativní zastoupení bakteriálních kmenů v sedimentech odebraných v roce 2017

Sekvence ITS2 získané pomocí Mi-Seq byly použity pro identifikaci hub nacházející se v sedimentu potoka v roce 2017 (obr. 5.16). Po odstranění nekvalitních sekvencí (příliš krátkých) bylo získáno celkově 446 938 sekvencí. Z celkového počtu sekvencí bylo 63 590 sekvencí zařazeno do 1 615 OTU na 97% úrovni podobnosti. Z celkového počtu sekvencí vykazovalo cca 85 % sekvencí nižší úroveň podobnosti proti NCBI GenBank databázi (označené jako NO HIT).

Mezi nejzastoupenější houbové rody v roce 2017 patří *Phomatodes* (1,2 %), *Colletotrichum* (1,2 %), *Penicillium* (0,7 %) a *Phaeophyscia* (0,7 %). Nicméně, vysoké procento sekvencí nebylo na úrovni rodu identifikováno. Tyto neznámé rody se vyskytují ve všech vzorcích a v odběrovém místě C se vyskytují s abundancí až 15 %.

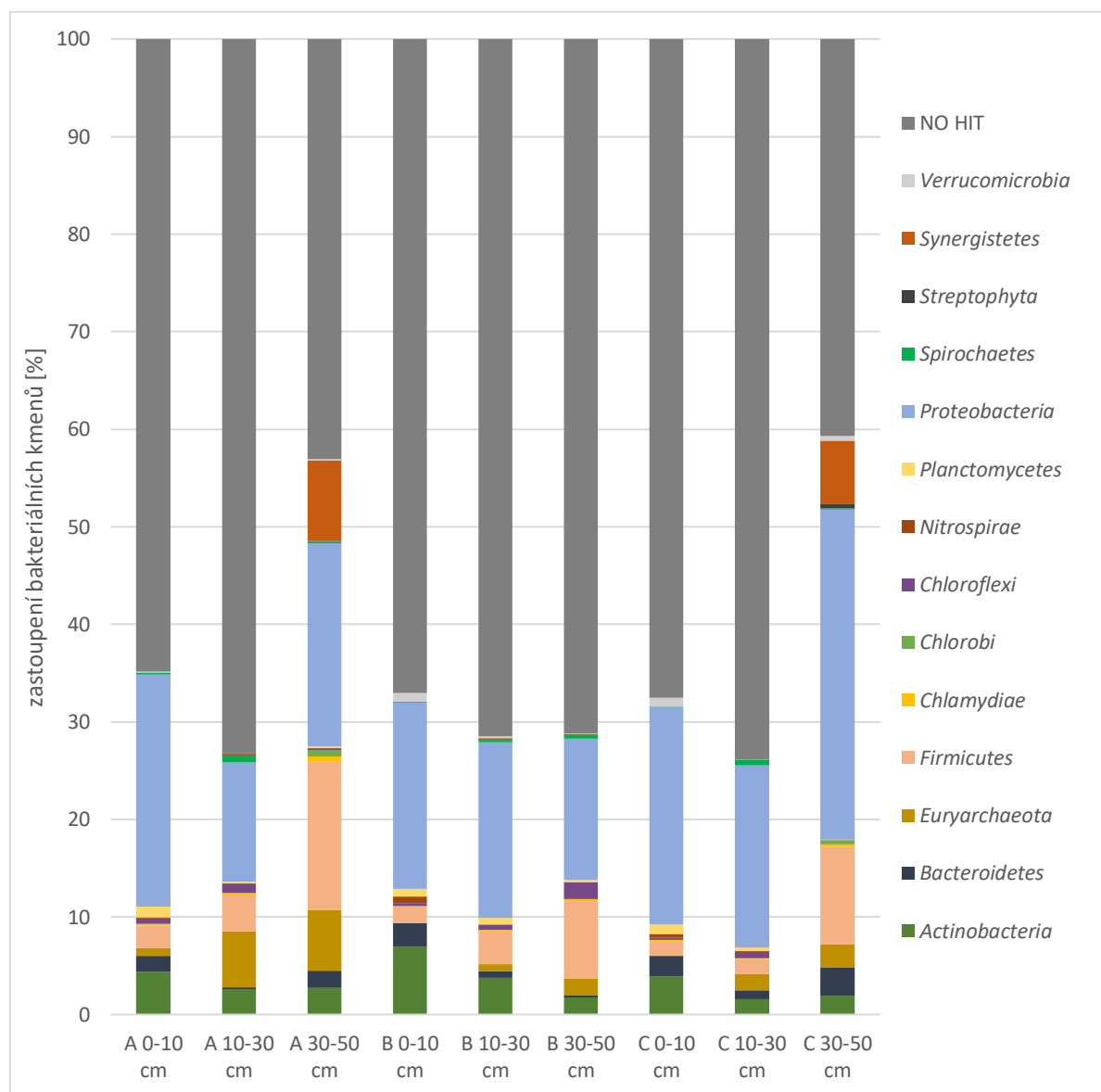


Obr. 5.16: Relativní zastoupení houbových rodů v sedimentech odebraných v roce 2017

Sekvence genu 16S rRNA získané pomocí Mi-Seq byly použity pro identifikaci bakterií nacházející se v sedimentu potoka také pro rok 2018 (obr. 5.17). Po odstranění nekvalitních sekvencí (příliš krátkých nebo příliš dlouhých) bylo v roce 2018 získáno celkově 558 498 sekvencí. Z celkového počtu sekvencí bylo 199 443 sekvencí zařazeno do 2 993 OTU na 97% úrovni podobnosti. Z celkového počtu sekvencí vykazovalo cca 65 % sekvencí nižší úroveň podobnosti proti NCBI GenBank databázi (označené jako NO HIT).

Proteobacteria (20,4 %), *Firmicutes* (5,3 %) a *Actinobacteria* (3,3 %) patří mezi nejzastoupenější bakteriální kmeny v sedimentárních vzorcích v roce 2018. Mezi další početně vyskytující se kmeny patří *Euryarchaeota* (které se řadí do *Archaea*; 2,1 %), *Bacteroidetes* (1,4 %) a *Planctomycetes* (0,5 %).

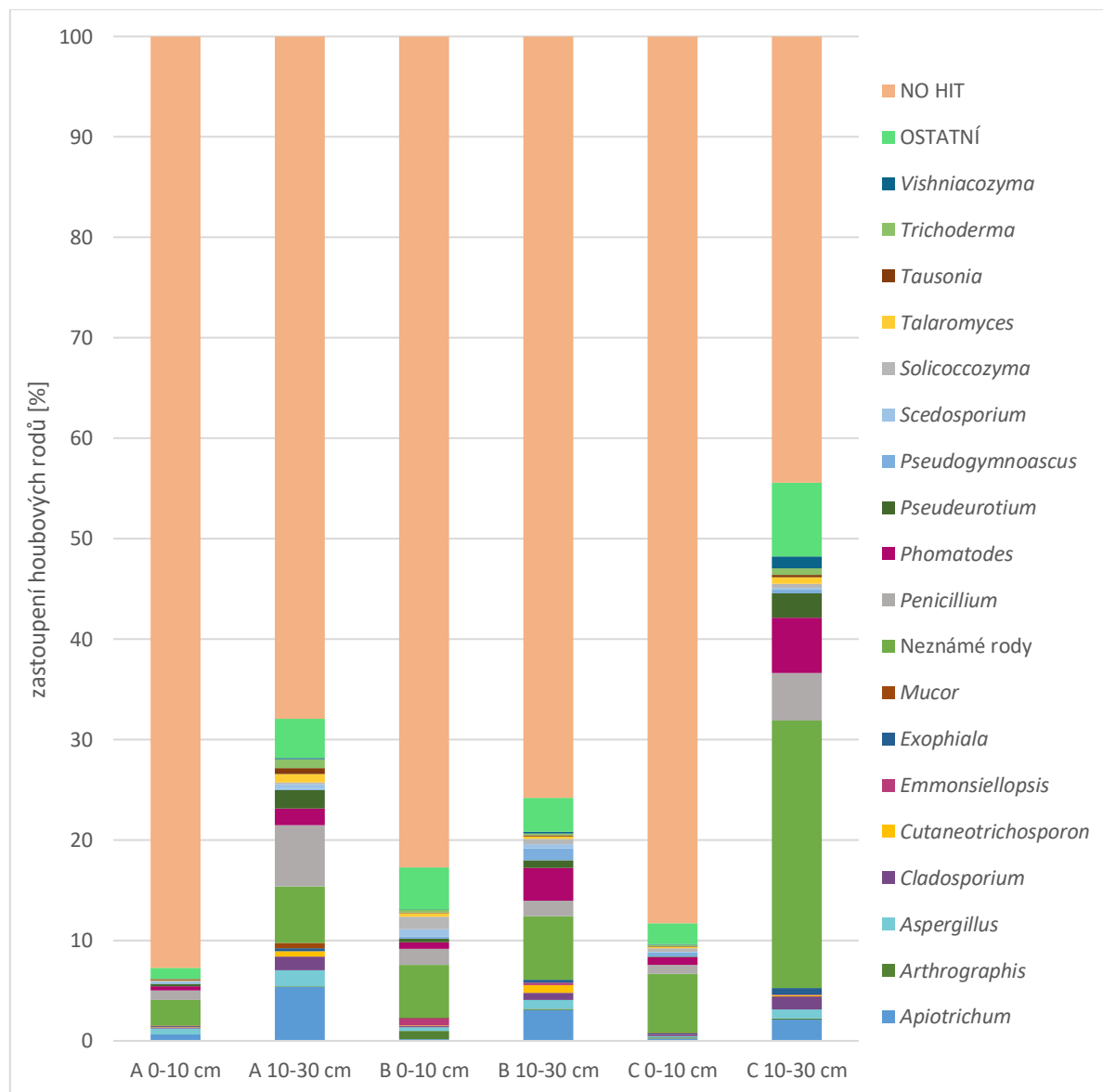
Z kmene *Proteobacteria* byl nejvíce přítomem rod *Thiobacillus*, *Oleigrimonas*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*, *Syntrophus* nebo *Chitinimonas* z *Firmicutes* např. *Clostridium* a *Bacillus*, z *Euryarchaeota* např. *Methanothrix* a z *Actinobacteria* např. *Streptomyces*.



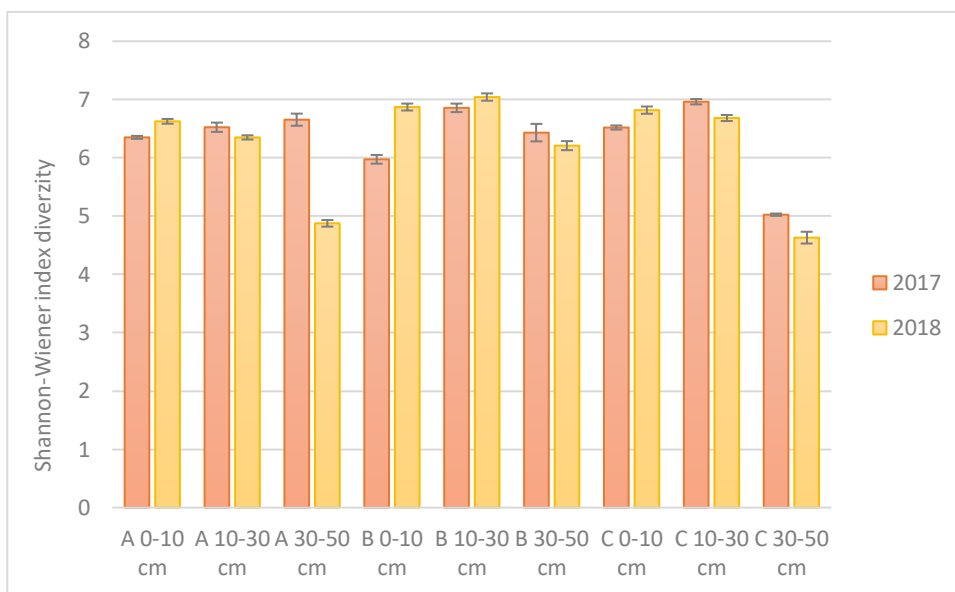
Obr. 5.17: Relativní zastoupení bakteriálních kmenů v sedimentech odebraných v roce 2018

Sekvence ITS2 získané pomocí Mi-Seq byly použity pro identifikaci hub nacházející se v sedimentu potoka také v roce 2018 (obr. 5.18). Po odstranění nekvalitních sekvencí (příliš krátkých) bylo získáno celkově 173 822 sekvencí. Z celkového počtu sekvencí bylo 39 546 sekvencí zařazeno do 1 570 OTU na 97% úrovni podobnosti. Z celkového počtu sekvencí vykazovalo cca 77 % sekvencí nižší úroveň podobnosti proti NCBI GenBank databázi (označené jako NO HIT).

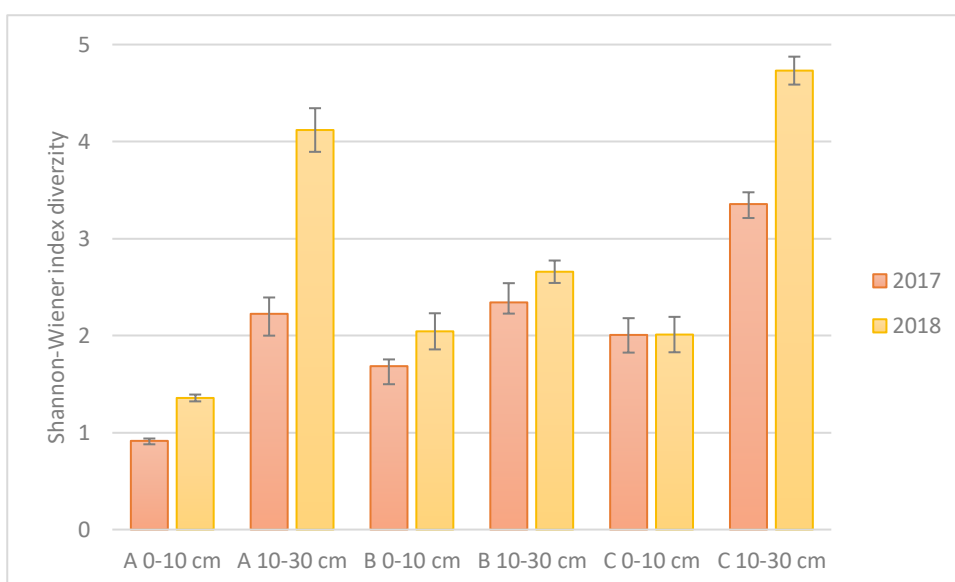
Mezi nejzastoupenější houbové rody patří *Penicillium* (2,3 %), který se vyskytuje ve všech vzorcích. Dalšími hojně zastoupenými rody jsou *Apiotrichum* (1,9 %), *Phomatodes* (2,0 %), *Aspergillus* (0,7 %), *Pseudeurotium* (0,9 %) a *Cladosporium* (0,6 %). Nicméně, největší zastoupení mají neznámé houbové rody. Tyto rody se vyskytují ve všech vzorcích a v odběrovém místě C se vyskytují s abundancí až 26 %.



Obr. 5.18: Relativní zastoupení houbových rodů v sedimentech odebraných v roce 2018



Obr. 5.19: Hodnoty Shannon-Wienerova indexu diverzity bakteriálních rodů naměřené v roce 2017 a 2018

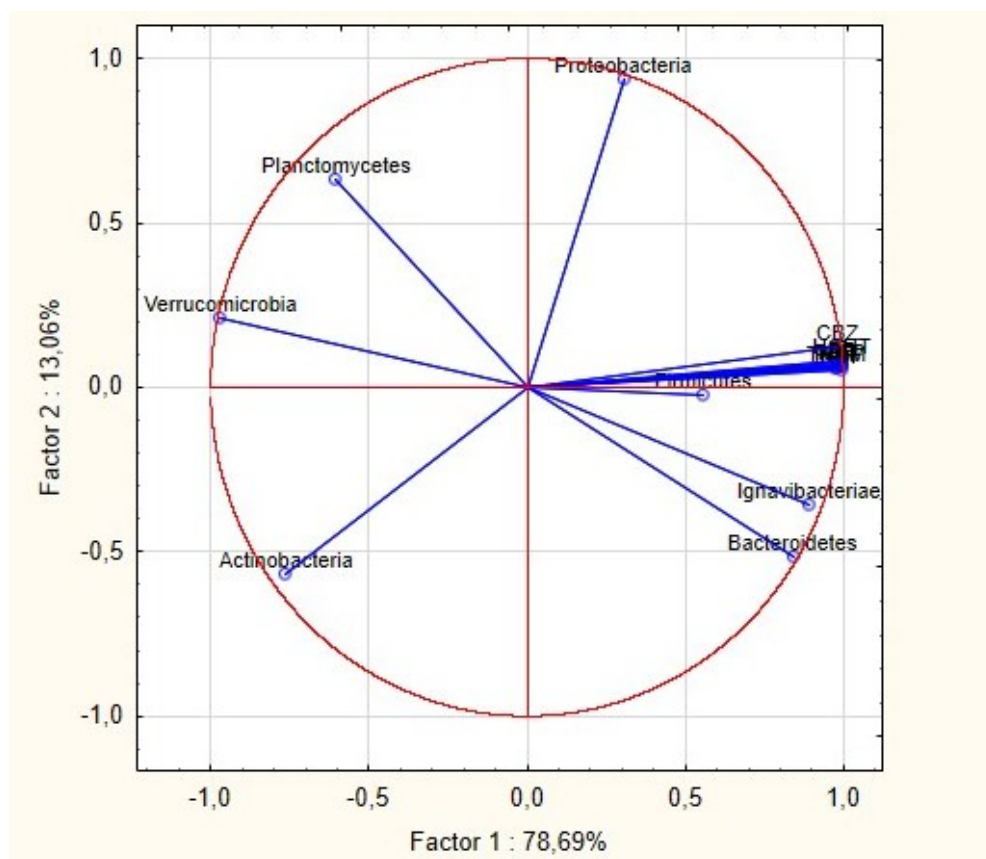


Obr. 5.20: Hodnoty Shannon-Wienerova indexu diverzity houbových rodů naměřené v roce 2017 a 2018

Z grafů (obr. 5.19 a 5.20) znázorňující diverzitu bakteriálních a houbových rodů vyplývá, že v sedimentech potoka se vyskytovala vysoká mikrobiální diverzita. Diverzita bakteriálních rodů byla vysoká, což naznačuje nepřítomnost žádného dominujícího rodu. Houby se vyskytovaly pouze v hloubce sedimentu 0-10 cm a 10-30 cm. Diverzita hub byla ve většině vzorků malá a značila o možné dominanci několika druhů hub.

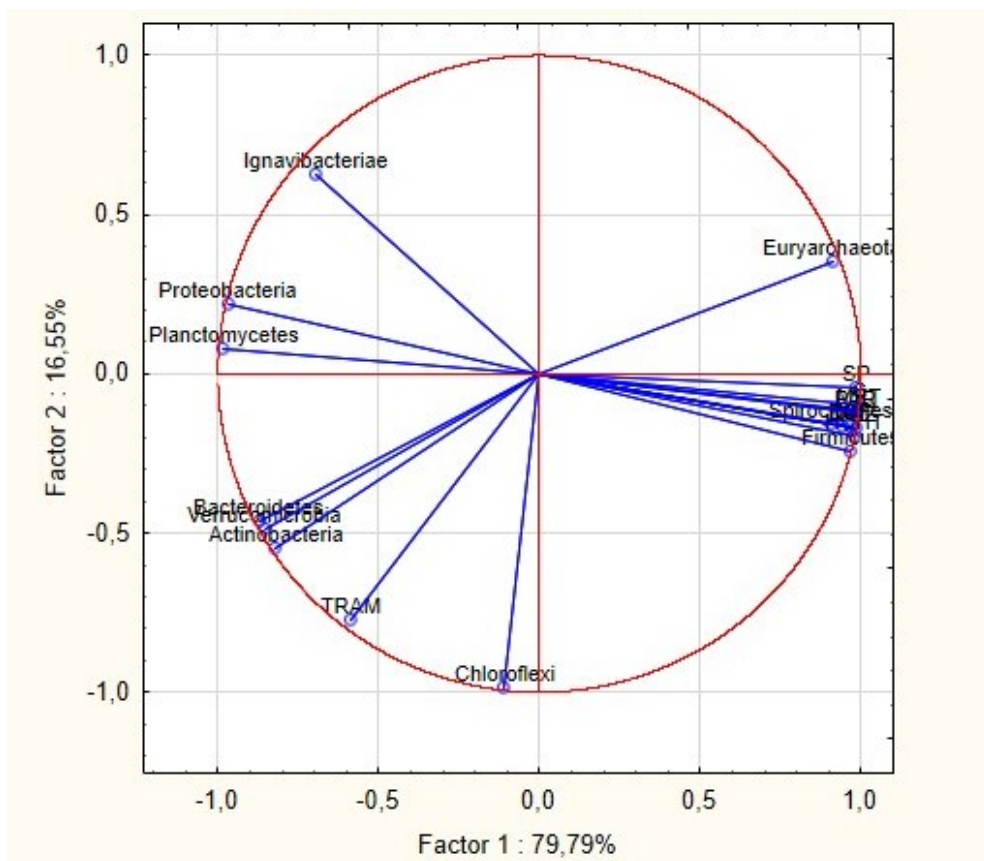
5.4 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení byl použit program Statistica, ve kterém byly vytvořeny grafy analýzy hlavních komponent (PCA). Tyto grafy byly vytvořeny z výsledků koncentrací farmaceutických látek, výsledků sekvenování bakteriální DNA a analýzy TOC pro stanovení vzájemné korelace. Ve výsledných grafech jsou příslušné farmaceutické látky označeny zkratkami: IBU – ibuprofen, HCHT – hydrochlorothiazid, PAR – paracetamol, DF – diklofenak, TRAM – tramadol, CBZ – karbamazepin, MET – metoprolol, SP – sulfapyridin, KF – kofein, SMX – sulfamethoxazol, SMZ – sulfamethazin, TRIC – triclosan.



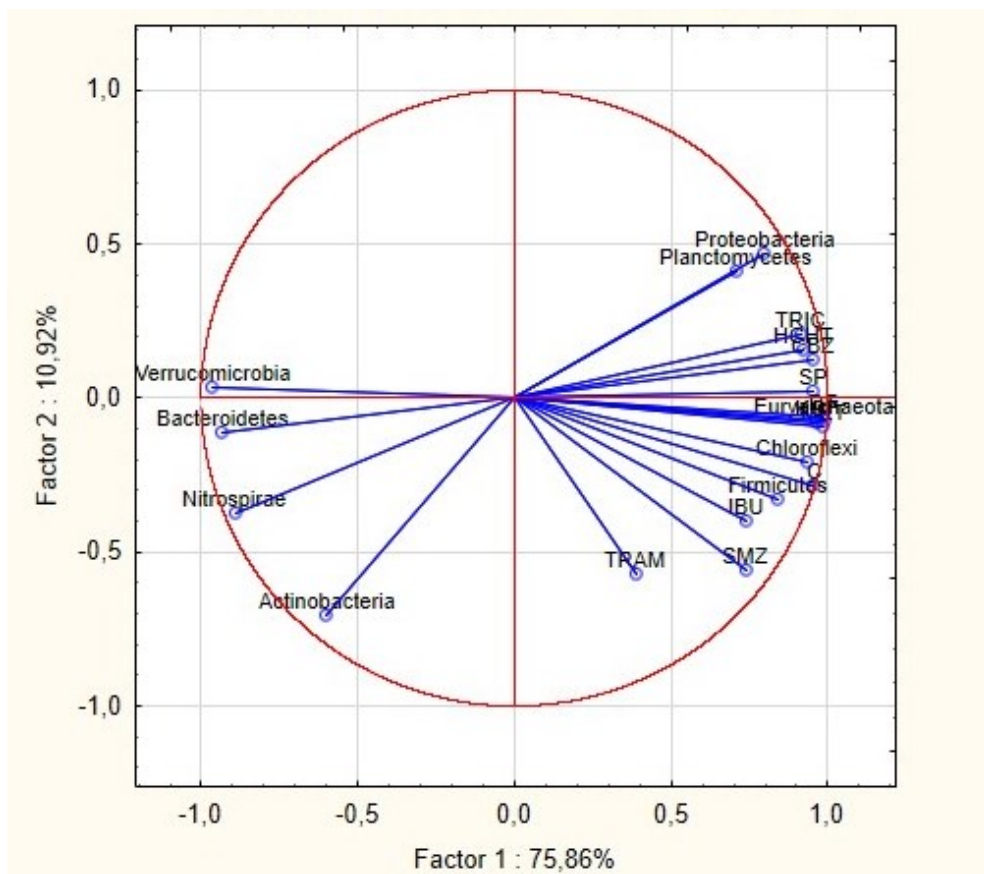
Obr. 5.21: PCA výsledných bakteriálních kmenů stanovených metodou sekvenace, koncentrací farmaceutických látek a analýzy TOC ve vzorcích sedimentů v hloubce 0-10 cm stanovených v roce 2017 (farmaceutické látky: IBU, HCHT, PAR, DF, TRAM, CBZ, MET, SP a KF)

První dva faktory vysvětlují 78,7% a 13,1% celkové variability. Z grafu vyplývá, že většina farmaceutických látek je v pozitivní korelaci s organickým uhlíkem, tzn. nachází se v místě, kde je vyšší koncentrace uhlíku. V grafu nelze rozeznat jednotlivé farmaceutické látky a TOC.



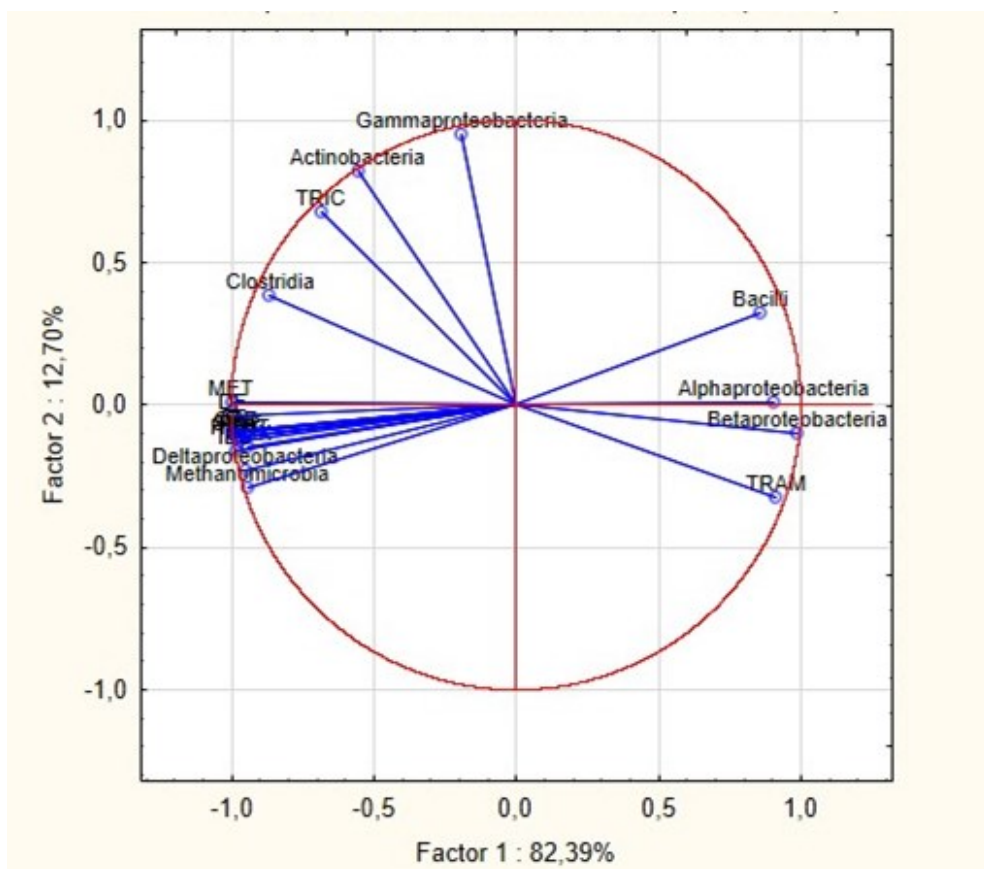
Obr. 5.22: PCA výsledných bakteriálních kmenů stanovených metodou sekvenace, koncentrací farmaceutických látek a analýzy TOC ve vzorcích sedimentů v hloubce 10-30 cm stanovených v roce 2017 (farmaceutické látky: IBU, HCHT, PAR, DF, TRAM, CBZ, MET, SP a KF)

První dva faktory vysvětlují 79,8% a 16,5% celkové variability. Z grafu vyplývá, že většina farmaceutických látek (s výjimkou tramadolu) je v pozitivní korelaci s organickým uhlíkem. S většinou farmaceutických látek a koncentrací TOC negativně korelují kmeny *Proteobacteria* a *Planctomycetes*. S tramadolem pozitivně korelují kmeny bakterií *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* a *Verrucomicrobia*. Naopak negativně koreluje archeální kmen *Euryarcheota* s tramadolem.



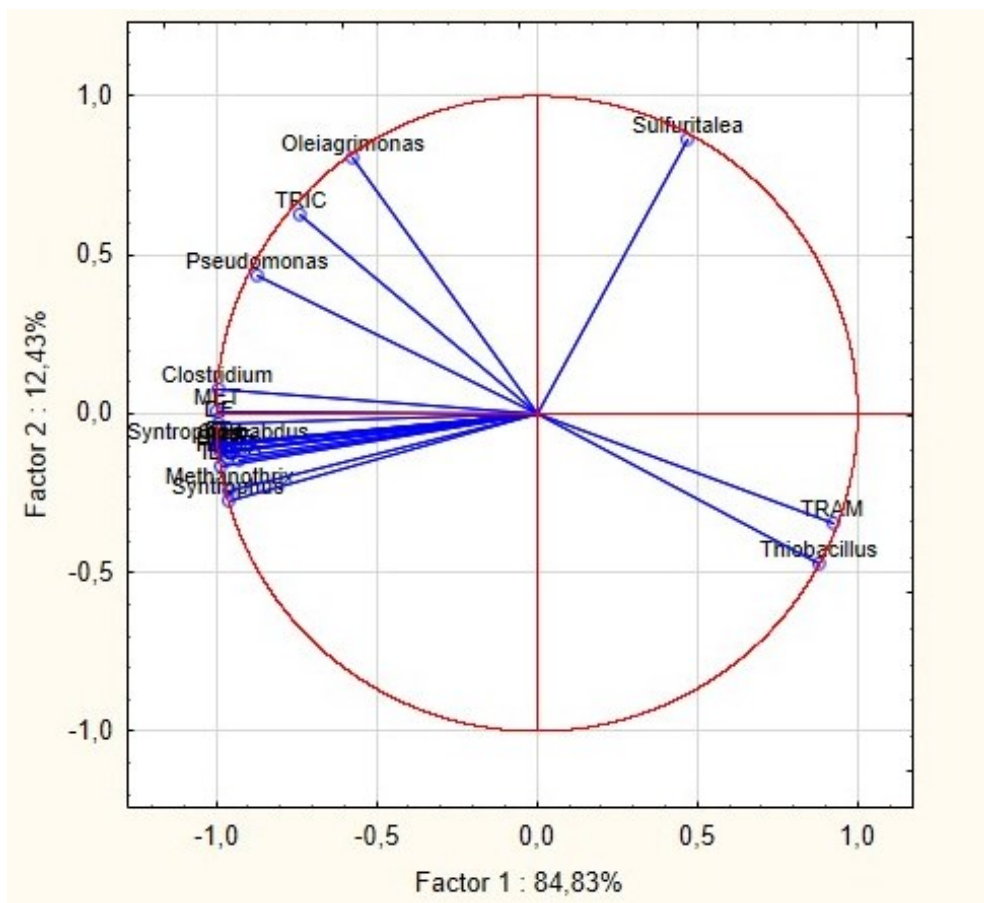
Obr. 5.23: PCA výsledných bakteriálních kmenů stanovených metodou sekvenace, koncentrací farmaceutických látek a analýzy TOC ve vzorcích sedimentů v hloubce 0-10 cm stanovených v roce 2018 (farmaceutické látky: IBU, HCHT, PAR, DF, TRAM, CBZ, MET, SP, KF a TRIC)

První dva faktory vysvětlují 75,9% a 10,9% celkové variability. Z grafu vyplývá, že většina farmaceutických látek je v pozitivní korelaci s organickým uhlíkem. S většinou farmaceutických látek a koncentrací TOC negativně korelují kmeny *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* a *Nitrospirae*.



Obr. 5.25: PCA výsledných bakteriálních tříd stanovených metodou sekvenace, koncentrací farmaceutických látek a analýzy TOC ve vzorcích sedimentů v hloubce 10-30 cm stanovených v roce 2018 (farmaceutické látky: IBU, HCHT, PAR, DF, TRAM, CBZ, MET, SP, KF a TRIC)

První dva faktory vysvětlují 82,4% a 12,7% celkové variability. Z grafu vyplývá, že většina farmaceutických látek je v pozitivní korelaci s organickým uhlíkem a z této korelace vystupují látky tramadol a triclosan. Z grafu je patrná negativní korelace tramadolu a bakteriální třídy *Clostridia* a částečná negativní korelace triclosanu a třídy *Betaproteobacteria*. Naopak v pozitivní korelaci jsou s triclosanem *Actinobacteria* a *Gamaproteobacteria* a s tramadolem *Betaproteobacteria* a *Alfaproteobacteria*.



Obr. 5.26: PCA výsledných bakteriálních rodů stanovených metodou sekvenace, koncentrací farmaceutických látek a analýzy TOC ve vzorcích sedimentů v hloubce 10-30 cm stanovených v roce 2018 (farmaceutické látky: IBU, HCHT, PAR, DF, TRAM, CBZ, MET, SP, KF a TRIC)

První dva faktory vysvětlují 84,8% a 12,4% celkové variability. Z grafu vyplývá, že většina farmaceutických látek (s výjimkou tramadolu a triclosanu) pozitivně koreluje s TOC. Z grafu je patrná negativní korelace tramadolu a rodu *Pseudomonas* a negativní korelace triclosanu a rodu *Thiobacillus*.

6 DISKUZE

6.1 Analýza přítomných farmak

Dnes je přítomnost farmaceutických látek v životním prostředí hlášena po celém světě. Mimoto, jsou stále nové údaje o zdrojích, osudu a účincích farmaceutických látek v prostředí, které naznačují možnost negativního dopadu na různé ekosystémy a představují hrozbu pro veřejné zdraví (Santos a kol. 2010). Ačkoliv určitým zdrojem kontaminace prostředí může být skládka nebo nesprávná likvidace léčiv, tak pravděpodobně jde pouze o malý zdroj kontaminace. Většina léčiv je uvolňována do prostředí vylučováním pacientů nebo v menší míře odpadní vodou z výrobních procesů. Ačkoliv ČOV představují důležitý mezník v osudu těchto látek, čistící procesy nebyly navrženy pro odstranění farmaceutických látek, a tak u většiny nedochází k celkovému odstranění (Jones a kol. 2001). Ve studovaném sedimentu potoka bylo identifikováno až 12 farmaceutických látek. Potok se nachází v blízkosti ČOV, a tak se jedná o vodní tok, který přijímá již vyčištěnou odpadní vodu. Farmaceutické látky byly identifikovány v koncentracích $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ a nejvyšší koncentrace farmaceutických látek se obvykle vyskytovaly v místě nejbližší k místu vypouštění odpadní vody z ČOV. Tato tendence byla pozorována i ve výzkumu sediment-voda interakcí farmaceutických látek v říčním prostředí. Studované farmaceutické látky se obdobně nacházely v sedimentu v koncentracích ng/g a nejhojněji se vyskytovaly v místě vypouštění vody z ČOV (Zhou a Broodbank 2014). Nejvyšší koncentrace ve studovaném sedimentu byly naměřeny pro tramadol, karbamazepin, metoprolol a kofein. Karbamazepin patří mezi běžně využívané léky v psychiatrii k léčbě epilepsie a hyperaktivity. Blízkost psychiatrické léčebny ve studované lokalitě, by mohla vysvětlit vysokou koncentraci karbamazepinu, který se do životního prostředí dostává převážně odpadní vodou (Rozman a kol. 2015). Tramadol je kvůli jeho vysoké účinnosti a nízké míry možné návykovosti široce předepisován k útlumu bolesti. Díky tomuto lze očekávat vyšší koncentrace tarmadolu v životním prostředí (Bergheim a kol. 2012). Kofein je pravděpodobně nejvíce konzumovanou léčivou látkou bez nutnosti předpisu. V některých studiích bylo také potvrzeno přetrvávání kofeinu v půdě (Bradley a kol. 2007).

Sorpce je jedním z klíčových faktorů, které ovlivňují vstup, transport a transformaci farmaceutických látek ve vodním prostředí. Rozsah sorpce farmaceutických látek na pevné látky v životním prostředí je velmi variabilní, částečně z důvodu toho, že farmaceutické

látky zahrnují širokou škálu látek, které mohou mít ve vodě různou mobilitu. Větší výskyt farmaceutických látek se bude pravděpodobně nacházet tam, kde je vyšší obsah organických částic (Hajj-Mohamad a kol. 2017). Míra sorpce na organický uhlík se často popisuje použitím rozdělovacích koeficientů, kdy nejčastěji tabelovaný koeficient popisující hydrofobitu je rozdělovací koeficient oktanol-voda (K_{ow}) (Menzie a kol. 2000). Látky s vysokými hodnotami $\log K_{ow}$ mají tedy tendenci se snadněji adsorbovat na organickou hmotu v půdách nebo sedimentech kvůli nízké afinitě k vodě (www.chemsafetypro.com). Hodnoty $\log K_{ow}$ u farmaceutických látek, které se vyskytovaly v nevyšší koncentraci, jsou 3,01 pro tramadol, 2,45 pro karbamazepin, 4,51 pro diklofenak, 1,88 pro metoprolol a 4,76 pro triclosan (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). V sedimentu byla provedena i prvková analýza, včetně stanovení organického uhlíku. Nicméně, hodnoty organického uhlíku se v podstatě nelišily od hodnot celkového uhlíku. Lze tedy předpokládat, že většina uhlíku přítomná v sedimentu je organického původu. S koncentrací TOC přítomným v sedimentu by měla tedy korelovat koncentrace farmaceutických látek. V jednotlivých vzorcích byla znázorněna závislost mezi koncentrací TOC a farmaceutickými látkami. Nicméně, ve vzorku sedimentu odebraného z hloubky 10-30 cm v roce 2017 i 2018 tramadol nekoreluje s koncentrací TOC. Vyšší hodnota $\log K_{ow}$ u tramadolu naznačuje tendenci k vyšší adsorbci na TOC, proto by jeho odchylka mohla být způsobena např. degradací. Ve studovaném sedimentu tramadol negativně koreluje s bakteriální třídou *Clostridia*. *Clostridia* patří mezi striktně anaerobní bakterie, které se často nacházejí v půdě. Mezi *Clostridia* patří např. rod *Clostridium*, který má velký význam v environmentální biotechnologii, díky obrovské metabolické diverzitě, která jim umožňuje účastnit se biodegradace organických polutantů (Guerrero-Barajas 2012). Ve studii provedli Bergheim a kol. (2012) laboratorní testy pro biologickou degradaci tramadolu, které jsou blíže popsány v kapitole 3.1 Tramadol. V žádném z provedených aerobních biodegradačních testů nebyla pozorována mineralizace ani částečná biotransformace tramadolu, stejně tak jako u testů fotochemické degradace (Bergheim a kol. 2012). Nicméně, některé novější studie poukázaly na možnost lepší transformace tramadolu za anaerobních podmínek (Falås a kol. 2016).

Obdobně i koncentrace triclosanu, který byl měřen v roce 2018, nekoreluje s koncentrací TOC a vzhledem k jeho vyšší hodnotě $\log K_{ow}$ by měl stejně jako ostatní látky korelovat s TOC. Pro jednotlivé třídy byly vytvořeny grafy PCA pro analýzu farmaceutických látek, organického uhlíku a bakterií. V druhé hloubce poměrně viditelně

negativně koreluje *Betaproteobacteria* s triclosanem. Novo a kol. (2013) studovali bakteriální komunitu v městských odpadních vodách. V jejich studii se zabývali antibiotickou rezistencí a výskytem antimikrobiálních reziduí a byla prokázána negativní korelace *Betaproteobacterií* vůči triclosanu (Novo a kol. 2013). PCA graf byl následně vytvořen také pro jednotlivé rody bakterií. V roce 2018 došlo oproti roku 2017 ke zvýšení zastoupení rodu *Thiobacillus*, který se řadí do třídy *Betaproteobacteria*. V grafu PCA lze vidět, že v roce 2018 negativně koreluje s triclosanem.

V hloubce 30-50 cm již není patrná vzájemná závislost koncentrace farmaceutických látek a TOC, což může být způsobeno velkým zatížením chybami.

6.2 Mikrobiální komunita přítomná v sedimentech

Analýza mastných kyselin poskytuje informace o biomase mikrobiální komunity přítomné v půdě a sedimentech. Analýza PLFA byla využita pro odhad mikrobiální biomasy nacházející se v jednotlivých vrstvách sedimentu potoka. Nicméně, koncentrace mastných kyselin by se měly převádět na biomasu velmi opatrně (Welch a kol. 2012). Pro zjištění přítomnosti houbových organismů v sedimentech byla využita pouze jedna mastná kyselina, zatímco pro odhad bakterií lze použít 17 mastných kyselin.

Analýza PLFA ukázala, že mikrobiální komunita je nejvíce zastoupena v nejsvrchnější vrstvě sedimentu, tedy v hloubce 0-10 cm. V nižších vrstvách byla přítomná mikrobiální biomasa v nižších koncentracích. Podobný trend v biomase mikrobiálních skupin byl pozorován také v půdních vzorcích, kde mikroorganismy obývající hlubší půdní horizont byly považovány za méně důležité právě kvůli nízké biomase (Fierer a kol. 2003). Kromě klesající mikrobiální biomasy s rostoucí hloubkou se také ukázalo, že mikrobiální komunita se v nejvyšší koncentraci nachází v prvním odběrovém místě A, které je nejbližší k ČOV a kde dochází k vypouštění vody z ČOV. Největší mikrobiální biomasa v nejbližším místě souhlasí s tvrzením, že voda vycházející z ČOV je známá pro zvyšování mikrobiální biomasy (Wakelin a kol. 2008).

Sediment je zvláštní útvar vodního ekosystému, který se vyznačuje velmi vysokou diverzitou. V sedimentu se vyskytují mikroorganismy a organické látky, které se zde dostávají z horní vodní vrstvy a poskytuje matici komplexních živin a pevného povrchu pro mikrobiální růst (Wang a kol. 2012). Proto byly u jednotlivých vzorků vypočítány také indexy diverzity. Pro měření diverzity je hojně využíván Shannon-Wienerův index

diverzity. Nízké hodnoty jsou dosaženy, pokud ve vzorcích dominuje několik druhů, zatímco vysoké hodnoty se objevují v případě, kdy žádný druh není dominantní. Pokud hodnoty jednotlivých druhů rostou či klesají stejně, pak hodnoty indexu zůstávají neměnné (Van Strien a kol. 2012). Hodnoty Shannon-Wienerova indexu byly stanoveny pro každý vzorek. V roce 2017 byla průměrná hodnota indexu 6,37 a v roce 2018 byla průměrná hodnota 6,23 pro bakterie. Tyto hodnoty značí, že v sedimentech je velká diverzita bakteriálních druhů. Wang a kol. (2012) studovali bakteriální diverzitu ve sladkovodních a mořských sedimentech. V jejich studii prokázali, že rozmanitost mikroorganismů je vyšší ve sladkovodních sedimentech. Index diverzity u sladkovodních sedimentů byl v rozmezí od 7,63 do 8,03 a u mořských sedimentů byla v rozmezí od 6,53 do 6,95 (Wang a kol. 2012). V jiné studii se zabývali bakteriální diverzitou v sedimentech řeky, u které se Shannon-Wienerův index diverzity pohyboval v rozmezí od 2,17 do 4,28 (Xia a kol. 2014).

Shannon-Wienerův index diverzity byl stanoven také pro houbové organismy. V roce 2017 byla průměrná hodnota indexu 2,09 a v roce 2018 byla průměrná hodnota 2,82 pro houby. Houbové druhy se vyskytovaly pouze v hloubce sedimentu 0-10 cm a 10-30 cm. Z těchto hodnot lze odhadnout, že v sedimentu potoka není diverzita hub tak velká a bude zde dominovat několik druhů hub. Diverzitou houbových druhů se zabývali také ve studiu mokřadních sedimentů v hloubce 0-40 cm v okolí řeky v Číně. Hodnoty diverzity Shannon-Wienerova indexu se pohybovaly v rozmezí od 2,22 do 2,86 (Wu a kol. 2013). Tyto hodnoty jsou podobné průměrným hodnotám diverzity hub ve studovaném sedimentu v této práci.

Při sekvenaci DNA izolované ze vzorků sedimentů v obou letech bylo zastoupeno velké množství sekvencí, které vykazovaly menší podobnost s NCBI GenBank databází. Kvůli nízké shodě byly tyto sekvence označeny jako neznámé (NO HIT).

Ve vzorcích sedimentu bylo v roce 2017 identifikováno 12 bakteriálních kmenů a v roce 2018 bylo nalezeno 14 bakteriálních kmenů, u kterých bylo zastoupení sekvencí nad 0,5 %. Při sekvenování sedimentárních vzorcích byl v obou letech nejvíce zastoupen kmen bakterií *Proteobacteria*, skupina gram-negativních bakterií, která je charakterizována svou všudypřítomností a metabolickou různorodostí často detekovaná ve sladkovodních sedimentech (Zothanpuia a kol. 2018). Z kmene *Proteobacteria* byly ve vzorcích nejvíce zastoupeny třídy *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria*. Třídy *Deltaproteobacteria* a *Epsilonproteobacteria* se zde nacházely také, ale v menším

zastoupení. Druhým hojně vyskytujícím se kmenem je kmen *Actinobacteria*, různorodá skupina grampozitivních bakterií. Jsou považovány za účinné rozkladače farmaceutických produktů, jako jsou např. antibiotika a rovněž průmyslových enzymů (Zothanpuia a kol. 2018). Také výskyt těchto bakterií není překvapivý, neboť hrají zásadní roli v bentickém koloběhu dusíku a uložení organických sloučenin (Bucci a kol. 2014). Dalším významným kmenem bakterií vyskytujícím se hojně v obou letech je kmen *Bacteroidetes*. *Bacteroidetes* jsou gram-negativní heterotrofní bakterie, které jsou také velmi časté ve sladkovodním ekosystému a jsou známé jejich degradací vysokomolekulárních organických sloučenin (Drury a kol. 2013). Další hojně se vyskytující kmen bakterií je *Firmicutes*. Mikroorganismy z kmene *Firmicutes* mohou degradovat řadu organických polutantů (Zhang a kol. 2014). Mezi rokem 2017 a 2018 nebyly podstatné rozdíly v rozmanitosti bakteriálních kmenů. Nicméně, v roce 2018 se například zvýšilo zastoupení gram-negativních anaerobních bakterií kmene *Synergistetes*, které se vyskytovaly pouze v hloubce sedimentu 30-50 cm. Obtížná kultivace této skupiny bakterií je příčinou obecného nedostatku znalostí o většině bakterií tohoto kmene, a ačkoliv jsou obvykle velmi rozšířené, tak většinou představují minoritní populaci (Jumas-Bilak a Marchandin 2014). Kmeny bakterií, které se zde vyskytovaly v největším zastoupení, tedy kmen *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* a *Firmicutes* jsou hlavními kmeny bakterií nacházející se v odpadních vodách a většinu je stále obtížné kultivovat (Novo a kol. 2013).

Pro zjištění bakteriální komunity v sedimentech, které přijímají přečištěnou odpadní vodu z ČOV, bylo provedeno několik studií. Wakelin a kol. studovali bakteriální komunitu pomocí PCR-denaturační gradientové gelové elektroforézy genů 16S rRNA. V jejich studii byl jako dominantní kmen určen *Proteobacteria* (Wakelin a kol. 2008), stejně tak ve studii Lu a Lu (2014), kde bakteriální komunity určili pomocí 454-pyrosequencingu genu 16S rRNA, byl také jako dominantní kmen stanoven *Proteobacteria*, jako další kmen byl stanoven *Bacteroidetes* (Lu a Lu 2014).

Říše Fungi (houby) zahrnuje organismy s jedinečnými adaptivními schopnostmi, které houbám umožňují kolonizovat širokou škálu míst výskytu, od mořského přes sladkovodní až po suchozemské stanoviště (Rédou a kol. 2015). Ve studovaném sedimentu byla provedena i analýza houbových organismů. V obou letech bylo v sedimentu největší zastoupení kmene *Ascomycota*, což není překvapivé, neboť většina hub nacházející se ve vodním prostředí patří do skupiny *Ascomycota* (Romaní a kol. 2017). *Ascomycota* hrají důležitou roli v rozkladu rostlinného materiálu ve vodním prostředí a jejich schopnost

rozkladu organického materiálu uvnitř je obzvláště výhodná ve vodních stanovištích, neboť minimalizuje vyplavování exoenzymů a jejich produktů (Röhl a kol. 2017). Dále se zde nacházely *Basidiomycota* a v roce 2018 i v některých vzorcích byl nalezen kmen *Mucoromycota*. Při zpracování výsledků byly houby rozděleny také v rámci rodů. V roce 2018 se oproti roku 2017 zvýšilo zastoupení některých houbových rodů, např. *Penicillium*, *Apiotrichum*, *Phomatodes*, *Aspergillus* a *Cladosporium*. Největší zastoupení ale v roce 2017 i v roce 2018 měly houbové rody, které nebyly proti NCBI GenBank databázi identifikovány a v databázi byly označeny jako nekultivovatelné houby. Také byl ve studovaném sedimentu velký podíl sekvencí, které byly zařazeny do skupiny NO HIT (shoda nalezené sekvence se sekvencí v databázi byla menší než 97 %). Většina houbové diverzity byla doposud studována zejména v suchozemských stanovištích a houby ve vodním prostředí jsou stále málo prozkoumané (Wahl a kol. 2018), což může mít za následek velké zastoupení těchto neznámých sekvencí ve studovaném sedimentu. Studium hub ve vodním prostředí se zaměřuje hlavně na houby rozkládající listy v řekách, mangrovech a mokřadech. Nicméně, znalosti této fylogenetické skupiny organismů jsou stále omezené. Ve studii o diverzitě, prostorovém rozšíření a aktivitě hub ve sladkovodních ekosystémech je kladen důraz na potřebu zvýšení úsilí pro vzorkování v celosvětovém měřítku pro zkoumání různých míst vodního ekosystému, včetně sedimentů, neboť představují místo s vysokou diverzitou hub (Lepère a kol. 2019).

ZÁVĚR

Cílem této práce byl popis mikrobiální komunity přítomné v sedimentu potoka, který se nachází v blízkosti ČOV a je kontaminován farmaceutickými látkami.

V teoretické části této práce byly shrnuty poznatky o úloze a diverzitě mikroorganismů v životním prostředí a charakterizovány kultivačně nezávislé metody pro jejich studium. Dále byly popsány vybrané farmaceutické látky nacházející se ve studovaném sedimentu. Z teoretické části vyplývá, jak jsou mikroorganismy důležité pro životní prostředí a jaké mikroorganismy by mohly mít schopnost degradace farmaceutických látek přítomných v životním prostředí.

Praktická část této práce byla zaměřena na stanovení farmaceutických látek vyskytujících se ve vzorcích sedimentu potoka, který se nachází v blízkosti ČOV. Ve vzorcích sedimentu bylo nalezeno až 12 farmaceutických látek, které byly přítomné v koncentracích desítek ng/g. Farmaceutické látky nacházející se v sedimentu vytváří koncentrační gradient, přičemž se největší koncentrace vyskytovala v odběrovém místě nejbližší ČOV, kde dochází k vypouštění přečištěné vody. Analýza PLFA poskytla informaci o mikrobiální biomase nacházející se ve studovaném sedimentu. Největší množství biomasy se stejně jako největší koncentrace farmaceutických látek vyskytovala v nejbližším odběrovém místě ČOV. Kromě analýzy PLFA byla provedena sekvenace bakteriální a houbové DNA pro identifikaci vyskytujících se mikroorganismů. Pro zjištění vztahu mezi přítomnými farmaceutickými látkami, koncentrací TOC a mikroorganismy byla využita analýza hlavních komponent, která poukázala na negativní korelaci některých farmaceutických látek vůči specifickým skupinám mikroorganismů, např. bakteriální třídy *Clostridia* nebo *Betaproteobacteria* (včetně rodu *Thiobacillus*). Výsledek sekvenace DNA poukázal na obrovskou mikrobiální diverzitu, která se nachází ve studovaném sedimentu potoka. Značná část sekvencí při srovnání s NCBI GenBank databází nebyla identifikována, což značí, že sedimenty jsou velmi málo studovány a mohou se zde nacházet mikroorganismy, které ještě nebyly zcela identifikovány. Z analýzy hlavních komponent vyplývá, že v sedimentech se mohou vyskytovat mikroorganismy, které by mohly určitým způsobem interagovat s přítomnými farmaceutickými látkami a případně je i degradovat.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahmadian, A., Ehn, M., Hober, S. (2006):** Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363, 83-94
- Al-Rajab, A. J., Sabourin, L., Lapen, D. R., Topp, E. (2010):** The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac is readily biodegradable in agricultural soils. *Science of The Total Environment*, 409, 78-82
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., Vakhlu, J. (2016):** High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian J Microbiol*, 56, 394-404
- Ansorge, W. J. (2009):** Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 25, 195-203
- Ardui, S., Ameer, A., Vermeesch, J.R., Hestand, M.S. (2018):** Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Research*, 46, 2159-2168
- Ari, Ş., Arikan, M. (2016):** Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages and Future. In: Hakeem K., Tombuloğlu H., Tombuloğlu G. (eds): *Plant Omics: Trends and Applications*, online ISBN: 978-3-319-31703-8, 109-135
- Bentley, D.R. (2006):** Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16, 545-552
- Bergheim, M., Gieré, R., Kümmerer, K. (2012):** Biodegradability and ecotoxicity of tramadol, ranitidine, and their photoderivatives in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 72-85
- Bessa, V. S., Moreira, I. S., Tiritan, M. E., Castro, P. M. L. (2017):** Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 135-142
- Besser, J., Carleton, H. A., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R. L., Trees, E. (2018):** Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 24, 335-341
- Bradley, P.M., Barber, L.B., Kolpin, D.W., McMahon, P.B., Chapelle, F.H. (2007):** Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: implications for use as wastewater indicators. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 1116-1121
- Bruijns, B., Tiggelaar, R., Gardeniers, H. (2018):** Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis*, 39, 2642-2654
- Bucci, J.P., Szempruch, A.J., Caldwell, J.M., Ellis, J.C., Levine, J.F. (2014):** Seasonal Changes in Microbial Community Structure in Freshwater Stream Sediment in a North Carolina River Basin. *Diversity*, 6, 18-32
- Buermans, H. P. J., den Dunnen, J. T. (2014):** Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842, 1932-1941
- Cao, Y, Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., Srikumar, S. (2017):** A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1829, 1-16
- Caracciolo, A. B., Topp, E., Grenni, P. (2015):** Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106, 25-36

- Costa, P. S., Reis, M. P., Ávila, M. P., Leite, L. R., de Araújo, F. M. G., Salim, A. C. M., Oliveira, G., Barbosa, F., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. M. A. (2015):** Metagenome of a Microbial Community Inhabiting a Metal-Rich Tropical Stream Sediment. *Plos One*, 10
- Cuscó, A., Catozzi, C., Viñes, J., Sanchez, A., Francino, O. (2019):** Microbiota profiling with long amplicons using Nanopore sequencing: full-length 16S rRNA gene and the 16S-ITS-23S of the operonrrn. *F1000Research*, 7, 1755
- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S. (2014):** Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 80-100
- Drenovsky, R. E., Elliott, G. N., Graham, K. J., Scow, K. M. (2004):** Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 1793-1800
- Drury, B., Rosi-Marshall, E., Kelly, J. J. (2013):** Wastewater Treatment Effluent Reduces the Abundance and Diversity of Benthic Bacterial Communities in Urban and Suburban Rivers. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 1897-1905
- Edgar, R.C. (2013):** UPARSE: highly accurate OTU sequences from micorbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10, 996-1000
- Edrees, W. H. A., Abdullah, Q. Y. M., AL-Kaf, A. G., Naji, K. M. (2017):** A review on comparative study between the physicochemical and biological processes for paracetamol degradation. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 18-27
- Escalas, A., Hale, L., Voordeckers, J. W., Yang, Y., Firestone, M. K., Alvarez-Cohen, L., Zhou, J. (2019):** Microbial functional diversity: From concepts to applications. *Ecology and Evolution*, 9, 12000-12016
- Facey, S. J., Nebel, B. A., Kontny, L., Allgaier, M., Hauer, B. (2018):** Rapid and complete degradation of diclofenac by native soil microorganisms. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 55-61
- Fakruddin, Md., Mannan, K. S. B. (2013):** Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon Journal of Science*, 41, 19-33
- Falås, P., Wick, A., Castronovo, S., Habermacher, J., Ternes, T.A., Adriano, J. (2016):** Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment. *Water Research*, 19, 240-249
- Fan, F., Zhang, B., Morrill, P. L. (2017):** Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis for profiling microbial communities in offshore produced water. *Marine Pollution Bulletin*, 122, 194-206
- Fazekaš, J., Fazekašová, D., Adamišín, P., Huličová, P., Benková, E. (2019):** Functional diversity of microorganisms in metal- and alkali-contaminated soils of Central and North-eastern Slovakia. *Soil and Water Research*, 14, 32-39
- Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2012):** Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 438, 404-413
- Fierer, N., Schimel, J. P., Holden, P. A. (2003):** Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 167-176
- Garbeva, P., Van Veen, J. A., Van Elsas, J. D. (2004):** Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*. 42, 243-270

- Gauthier, H., Yargeau, V., Cooper, D. G. (2010):** Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. *Science of The Total Environment*, 408, 1701-1706
- Gibbons, S. M., Jones, E., Bearquiver, A., Blackwolf, F., Roundstone, W., Scott, N., Hooker, J., Madsen, R., Coleman, M. L., Gilbert, J. A. (2014):** Human and Environmental Impacts on River Sediment Microbial Communities. *PLoS ONE*, 95, e97435
- Goodfellow, M. (2000):** Microbial systematics: Background and uses. In: Priest, F. G., Goodfellow, M. (eds). *Applied Microbial Systematics*. ISBN 978-94-0114020-1. Springer, Dordrecht
- Goodwin, S., McPherson, J. D., McCombie, W. R. (2016):** Coming of age: ten years of next generation sequencing technologies. *Nature Review, Genetics*, 17, 333-351
- Gray, N. D., Head, I. M. (2008):** Microbial Ecology. *Encyclopedia of Ecology*, ISBN 9780080454054, 2357-2368
- Grenni, P., Ancona, V., Caracciolo, A. B. (2018):** Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25-39
- Groffman, P. M., Bohlen, P. J. (1999):** Soil and Sediment Biodiversity. *BioScience*, 49, 139-148
- Grossart, H-P., Van den Wyngaert, S., Kagami, M., Wurzbacher, C., Cunliffe, M., Rojas-Jimenes, K. (2019):** Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Review, Microbiology*, 17, 339-354
- Guerrero-Barajas, C. (2012):** Biodegradation of organic pollutants, reduction of metals and energy generation involving *Clostridium* Sp. *Biotechnology, Medicinal Applications and implications*, 1-53
- Hajj-Mohamad, M., Darwano, H., Vo Duy, S., Sauv e, S., Pr evost, M., Arp, H.P.H., Dorner, S. (2017):** The distribution dynamics and desorption behaviour of mobile pharmaceuticals and caffeine to combined sewer sediments. *Water Research*, 108, 57-67
- Heather, J. M., Chain, B. (2016):** The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107, 1-8
- Jain, R. K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P. M., Bhattacharya, D., Thakur, I. S. (2005):** Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Current Science*, 89, 101-112
- Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N. (2001):** Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment, A Review. *Environmental Technology*, 22, 1383-1394
- Jumas-Bilak, E., Marchandin, H. (2014):** The Phylum Synergistetes. The Prokaryotes, In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) Springer, ISBN 978-3-642-38954-2
- Kanagal-Shamanna R. (2016):** Emulsion PCR: Techniques and Applications. In: Luthra R., Singh R., Patel K. (eds) *Clinical Applications of PCR. Methods in Molecular Biology*, 1392. Humana Press, New York, NY
- Kchouk, M., Gibrat, J-F., Elloumi, M. (2017):** Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*, 9, 1-8
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., Trevors, J. T. (2004):** Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169-188
- Klamer, M., B a ath, E. (2004):** Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2 6,9. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 57-65
- Kolisko, M. (2017):** Modern ı metody sekvenov anı DNA. *Živa*, 3, LXIII-LXXVI

- Kono, N., Arakawa, K. (2019):** Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. *Development, Growth & Differentiation*, 61, 316-326
- Kostanjevecki, P., Petric, I., Loncar, J., Smital, T., Ahel, M., Terzic, S. (2019):** Aerobic biodegradation of tramadol by pre-adapted activated sludge culture: Cometabolic transformations and bacterial community changes during enrichment. *Science of the Total Environment*, 687, 858-866
- Koubková, L., Vojtěšek, B., Vyzula, R. (2014):** Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klin Onkol*, 27, S61-S68
- Kraigher, B., Kosjek, T., Heath, E., Kompare, B., Mandic-Mulec, I. (2008):** Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water Research*, 42, 4578-4588
- Krejčí, A., Müller, P., Vojtěšek, B. (2015):** Bioinformatika a Sekvenování nové generace. *Klinická Onkologie*, 28, 2S91-2S96
- Kralik, P., Ricchi, M. (2016):** A Basic Guide To Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8:108
- Larcher, S., Yargeau, V. (2011):** Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 211-218
- Larson, T.E., Heikoop, J.M., Perkins, G., Chipera, S.J., Hess, M.A. (2008):** Pretreatment technique for siderite removal for organic carbon isotope and C:N ratio analysis in geological samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 865-872
- Leckie, S. E. (2005):** Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *Forest Ecology and Management*, 220, 88-106
- Lee, H., Gurtowski, J., Yoo, S., Nattestad, M., Marcus, S., Goodwin, S., McCombie, W. R., Schatz, M. C. (2016):** Third-generation sequencing and the future of genomics. *The Reprint server for Biology*
- Lepère, C., Domaizon, I., Humbert, J-F., Jardillier, L., Hugoni, M., Debroas, D. (2019):** Diversity, spatial distribution and activity of fungi in freshwater ecosystems. *PeerJ*, 7:e6247
- Liu, B. R., Jia, G. M., Chen, J., Wang, G. (2006):** A Review Of Method for Studying Microbial Diversity in Soils. *Pedosphere*, 16, 18-24
- Lonappan, L., Brar, S. K., Das, R. K., Verma, M., Surampalli, R. Y. (2016):** Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity – A review. *Environment International*, 96, 127-138
- Lu, X-M., Lu, P-Z. (2014):** Characterization of Bacterial Communities in Sediments Receiving Various Wastewater Effluents with High-Throughput Sequencing Analysis. *Environmental Microbiology*, 67, 612-623
- Macalady, J. L., Mack, E. E., Nelson, D. C., Scow, K. M. (2000):** Sediment Microbial Community Structure and Mercury Methylation in Mercury-Polluted Clear Lake, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1479-1488
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. (2008):** The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environmental International*, 34, 265-276
- Martins, G. S., da Costa Luchiari, N., Lamarca, R. S., da Silva, B. F., de Lima Gomes, P. C. F. (2017):** Removal of sulfamethoxazol and trimethoprim using horizontal-flow anaerobic immobilized bioreactor. *Scientia Chromatographica*, 9, 253-264
- Menzie, C., Burke, A. M., Grasso, D., Harnois, M., Magee, B., McDonald, Montgomery, C. D., Nichols, A., Pignatello, J., Price, B., Price, R., Rose, J., Shatkin, J. A., Smets, B.,**

- Smith, J., Svirsky, S. (2000):** An Approach for Incorporating Information on Chemical Availability in Soils into Risk Assessment and Risk-Based Decision Making. *Human and Ecological Risk Assessment*, 6, 479-510
- Moore, E. R. B., Mihaylova, S. A., Vandamme, P., Krichevsky, M. I., Dijkshoorn, (2010):** Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Research in Microbiology*, 161, 430-438
- Nasir, N. M., Talib, S. A., Hashim, S. N., Tay, C. C. (2017):** Biodegradation of carbamazepine using fungi and bacteria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9, 124-146
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A. K. (2007):** Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*, 54, 276-289
- Novo, A., André, S., Viana, P., Nunes, O. C., Manaia, C. M. (2013):** Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Research*, 47, 1875-1887
- Nowak, K. M., Girardi, C., Miltner, A., Gehre, M., Schäffer, A., Kästner, M. (2013):** Contribution of microorganisms to non-extractable residue formation during biodegradation of ibuprofen in soil. *Science of the Total Environment*. 445-446, 377-384
- Palojärvi, A. (2006):** Phospholipid Fatty Acid (PLFA) Analyses. In: *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. 204-211
- Pino-Otín, M. R., Muñoz, S., Val, J., Navarro, E. (2017):** Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms. *Science of the Total Environment*, 595, 441-450
- Quero-Pastor, M. J., Garrido-Perez, M. C., Acevedo, A., Quiroga, J. M. (2014):** Ozonation of ibuprofen: A degradation and toxicity study. *Science of the Total Environment*. 466-467, 957-964
- Quideau, S. A., McIntosh, A. C. S., Norris, C. E., Lloret, E. Swallow, M. J. B., Hannam, K. (2016):** Extraction and Analysis of Microbial Phospholipid Fatty Acids in Soils. *Journal of Visualized Experiments*, 114, e54360
- Ravi, R.K., Walton, K., Khosroheidari, M. (2018):** MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. In: DiStefano J. (eds) Disease Gene Identification. *Methods in Molecular Biology*, vol 1706. Humana Press, NY, ISBN 978-1-4939-7471-9
- Rédou, V., Navarri, M., Meslet-Cladière, L., Barbier, G., Burgaud, G. (2015):** Species Richness and Adaptation of Marine Fungi from Deep-Subseafloor Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3571-3583
- Rees, G. N., Watson, G. O., Baldwin, D. S., Mitchell, A. M. (2006):** Variability in sediment microbial communities in a semipermanent stream: impact of drought. *Journal of the North American Benthological Society*, 25, 370-378
- Reis, P. J. M., Reis, A. C., Ricken, B., Kolvenbach, B. A., Manaia, C. M., Corvini, P. F. X., Nunes, O. C. (2014):** Biodegradation of sulfamethoxazole and other sulfonamides by *Achromobacter denitrificans* PR1. *Journal of Hazardous Materials*, 280, 741-749
- Röhl, O., Peršoh, D., Mittelbach, M., Elbrecht, V., Brachmann, A., Nuy, J., Boenigk, J., Leese, F., Begerow, D. (2017):** Distinct sensitivity of fungal freshwater guilds to water quality. *Mycological Progress*, 16, 155-169
- Romaní, A.M., Chauvet, E., Febria, C., Mora-Gómez, J., Risse-Buhl, U., Timoner, X., Weitere, M., Zeglin, L. (2017):** The Biota of Intermittent Rivers and Ephemeral Streams: prokaryotes, Fungi and Protozoans. *Intermittent Rivers and Ephemeral Streams*, 161-188
- Roose-Amsaleg, C. L., Garnier-Sillam, E., Harry, M. (2001):** Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, 18, 47-60

- Rozman, D., Hrkal, Z., Eckhardt, P., Novotná, E., Boukalová, Z. (2015):** Pharmaceuticals in groundwaters: a case study of the psychiatric hospital at Horní Beřkovice, Czech Republic. *Environ Earth Sci*, 73, 3775-3784
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M. (2010):** Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous materials*, 175, 45-95
- Sayadi, M. H., Trivedy, R. K., Pathak, R. K. (2010):** Pollution of pharmaceuticals in environment. *Journal of Industrial Pollution Control*, 26, 89-94
- Schütte, U.M.E, Abdo, Z., Bent, S.J., Shyu, C., Williams, C.J., Pierson, J.D., Forney, L.J. (2008):** Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 365-380
- Stach J.E.M., Bathe S., Clapp J.P., Burns R.G. (2001):** PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 139-151
- Stylianou, K., Hapeshi, E., Vasquez, M. I., Fatta-Kassinos, D., Vyrides, I. (2018):** Diclofenac biodegradation by newly isolated *Klebsiella* sp. KSC: Microbial intermediates and ecotoxicological assessment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 3242-3248
- Takeda, H., Yamashita, T., Ueda, Y., Sekine, A. (2019):** Exploring the hepatitis C virus genome using single molecule real-time sequencing. *World Journal of Gastroenterology*, 25, 4661-4672
- Thelusmond, J. R., Strathmann, T. J., Cupples, A. M. (2016):** The identification of carbamazepine biodegrading phylotypes and phylotypes sensitive to carbamazepine exposure in two soil microbial communities. *Science of The Total Environment*, 571, 1241-1252
- Thelusmond, J-R., Kawka, E., Strathmann, T. J., Cupples, A. M. (2018):** Diclofenac, carbamazepine and triclocarban biodegradation in agricultural soils and the microorganisms and metabolic pathways affected. *Science of the Total Environment*, 640-641, 1393-1410
- Theron, J., Cloete, T. E. (2000):** Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments. *Critical Reviews in Microbiology*, 26, 37-57
- Thies, J.E. (2007):** Soil Microbial Community Analysis using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Molecular-Based Approaches to Soil Microbiology*, 71, 579-591
- Torsvik, V., Sørheim, R., Goksøyr, J. (1996):** Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 170-178
- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., Banfield, J. F. (2004):** Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428, 37-43
- Uhlík, O., Ječná, K., Macková, M., Leigh, M. B., Demnerová, K., Macek, T. (2008):** Využití značení stabilními isotopy pro detekci mikroorganismů aktivních při degradaci xenobiotik. *Chemické Listy*, 102, 474-479
- Ungureanu, C. P., Favier, L., Bahrim, G., Amrane, A. (2015):** Response surface optimization of experimental conditions for carbamazepine biodegradation by *Streptomyces* MIUG 4.89. *New Biotechnology*, 32, 347-357
- Van Beelen, P., Doelman, P. (1997):** Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere*, 34, 455-499
- Van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., Thermes, C. (2018):** The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*, 34, 666-681

- Van Strien, A.J., Soldaat, L.L., Gregory, R.D. (2012):** Desirable mathematical properties of indicators for biodiversity change. *Ecological Indicators*, 14, 202-208
- Větrovský, T., Baldrian, P., Morais, D. (2018):** SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*, 34, 2292-2294
- Vila-Costa, M., Gioia, R., Acena, J., Pérez, S., Casamayor, E. O., Dachs, J. (2017):** Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism. *Water Research*, 115, 309-317
- Vondráček, J., Lovecká, P., Uhlík, O., Musilová, L., Macková, M. (2012):** Biodiversita – Definice a vysvětlení základních pojmů. *Chemické listy*, 106, 246-252
- Wahl, H. E., Raudabaugh, D. B., Bach, E. M., Bone, T. S., Luttenton, M. R., Cichewicz, R. H., Miller, A. N. (2018):** What lies beneath? Fungal diversity at the bottom of Lake Michigan and Lake Superior. *Journal of Great Lakes Research*, 44, 263-270
- Wakelin, S. A., Colloff, M. J., Kookana, R. S. (2008):** Effect of Wastewater Treatment Plant Effluent on Microbial Function and Community Structure in the Sediment of a Freshwater Stream with Variable Seasonal Flow. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2659-2668
- Wang, J., Wang, S. (2018):** Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 3573-3582
- Wang, Y., Sheng, H-F., He, Y., Wu, J-Y., Jiang, Y-X., Tam, N. F-Y., Zhou, H-W. (2012):** Comparison of the Levels of Bacterial Diversity in Freshwater, Intertidal Wetland, and Marine Sediments by Using Millions of Illumina Tags. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8264-8271
- Welc, M., Bünemann, E.K., Fließbach, A., Frossard, E., Jansa, J. (2012):** Soil bacterial and fungal communities along a soil chronosequence assessed by fatty acid profiling. *Soil Biology & Biochemistry*, 49, 184-192
- Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., Goedkoop, W. (2008):** Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes – responses at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution*, 152, 576-584
- Wu, B., Tian, J., Bai, C., Xiang, M., Sun, J., Liu, X. (2013):** The biogeography of fungal communities in wetland sediments along the Changjiang River and other sites in China. *The ISME Journal*, 7, 1299-1309
- Wu, S., Zhang, L., Chen, J. (2012):** Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 875-884
- Xia, N., Xia, X., Liu, T., Hu, L., Zhu, B., Zhang, X., Dong, J. (2014):** Characteristics of bacterial community in the water and surface sediment of the Yellow River, China, the largest turbid river in the world. *J Soils Sediments*, 14, 1894-1904
- Xiong, J.-Q., Kim, S.-J., Kurade, M. B., Govindwar, S., Abou-Shanab, R. A. I., Kim, J.-R., Roh, H.-S., Khan, M. A., Jeon, B.-H. (2019):** Combined effects of sulfamethazine and sulfamethoxazole on a freshwater microalga, *Scenedesmus obliquus*: toxicity, biodegradation, and metabolic fate. *Journal of Hazardous Materials*, 370, 138-146
- Yang, C.-W., Hsiao, W.-C., Chang, B.-V. (2016):** Biodegradation of sulfonamide antibiotics in sludge. *Chemosphere*, 150, 559-565
- Yarza, P., Yilmaz, P., Panzer, K., Glöckner, F.O., Reich, M. (2017):** A phylogenetic framework for the kingdom Fungi based on 18S rRNA gene sequences. *Marine Genomics*, 36, 33-39
- Zelles, L. (1997):** Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere*, 35, 275-294

- Zhang, Y., Dong, S., Gao, Q., Liu, S., Ganjurjav, H., Wang, X., Su, X., Wu, X. (2017):** Soil bacterial and fungal diversity differently correlated with soil biochemistry in alpine grassland ecosystems in response to environmental changes. *Scientific Reports*, 7
- Zhang, J., Yang, Y., Zhao, L., Li, Y., Xie, S., Liu, Y. (2015):** Distribution of sediment bacterial and archeal communities in plateau freshwater lakes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, 3291-3302
- Zhou, J., Broodbank, N. (2014):** Sediment-water interactions of pharmaceutical residues in the river environment. *Water Research*, 48, 61-70
- Zhou, Q., Li, K., Jun, X., Bo, L. (2009):** Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresource Technology*, 100, 3780-3786
- Zothanpuia, A.K.P., Leo, V.V., Chandra, P., Kumar, B., Nayak, C., Hashem, A., Allah, E.F.A., Alqarawi, A.A., Singh, B.P. (2018):** Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. *Microbial Cell Factories*, 17, 1-14
- Żur, J., Piński, A., Marchlewicz, A., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszńska, D., Guzik, U. (2018):** Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen – toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 21498-21524