

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Fylogenetická analýza genů pro velké podjednotky dioxygenas
Rieskeho typu v půdách kontaminovaných leteckým palivem**

**Phylogenetic analysis of Rieske dioxygenases large subunits genes in
soil contaminated with jet fuel**

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.

Školitel: RNDr. Maria Brennerová, CSc.

Praha 2010

Jakub Ptáček

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky RNDr. Marie Brennerové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

.....
Jakub Ptáček

Poděkování

Zde bych rád vyjádřil své veliké díky RNDr. Marii Brennerové CSc. za možnost vypracování této diplomové práce v Laboratoři molekulární genetiky bakterií a za skvělé pracovní prostředí, které nám v laboratoři vytvořila. Dále Věře Reimannové za ochotu a technickou podporu při mých experimentech. Také členům laboratoře - Jiřině Josefiové, Olesye Korotkevych a především Martině Pravečkové, která se o mě starala především v počátcích mé experimentální práce takřka mateřsky.

Také chci poděkovat RNDr. Lucii Bořek-Dohalské Ph.D. za to, že se ujala vedení mé diplomové práce a zvládla ji přečíst v rekordním čase.

A v neposlední řadě své rodině, která mi vždy věřila a podporovala mě ve všech stádiích studia jak materiálně, tak psychicky.

Abstrakt

Lokalita bývalého vojenského letiště Hradčany je jedním z míst s vysokou koncentrací organických polutantů v půdě v rámci České republiky. Hlavním nástrojem sanací probíhajících v této lokalitě v současné době je bioremediace. Jsou při ní využívány organismy přítomné v kontaminované půdě disponující degradačními metabolickými drahami pro dekontaminaci lokality *in situ*. Na rozmanitosti a hojnosti těchto drah, resp. na specifitě a aktivitě enzymů podílejících se na těchto drahách závisí účinnost bioremediace. Proto je hlavním cílem této práce analýza diversity bakterií v půdách kontaminovaných leteckým palivem na základě katabolických genů kódujících toluen/bifenylové dioxygenasy Rieskeho typu. Z půdní DNA byly selektivně získány sekvence kódující tyto geny pomocí hybridizace s oligonukleotidy vázanými na magnetické mikrokuličky. α podjednotky těchto dioxygenas byly amplifikovány, analyzovány klonováním, restriční analýzou a sekvenovány. Evoluční historie byla odvozena pomocí metod neighbor-joining a maximum likelihood. Diversita katabolických genů v půdě HRB z kontaminované a sanované lokality byla porovnána s diversitou ve stejné půdě použité v mesokosmu se simulovanou fytoremediací. Přes 98% sekvencí ze vzorku HRB patří do genové podrodiny toluen dioxygenas, jejíž nejbližší příbuzný gen kóduje enzym TodC1 z *Thauera* sp. kmene DNT-1. Ve vzorku z mesokosmu remediovaného vrbami (HRB-M) byla nalezena další skupina fylogeneticky odlišných sekvencí. Sekvence z této frakce, obsahující 26% všech klonů, kódují velké podjednotky bifenyl dioxygenas z bakterií degradiujících polychlorované bifenyly. Plyne z toho, že v průběhu šest měsíců trvajícíchho vývoje mikrobiální populace v kontaminované půdě v přítomnosti vrb proběhly určité změny ve složení toluen/bifenylové rodiny Rieskeho dioxygenas. Zvýšení výskytu genů pro bifenyl dioxygenasy ovlivňující celkovou půdní mikrobiální aktivitu může být připsáno vlivu metabolismu rhizosféry vrb a také bakteriím asociovaným s těmito kořenovými systémy.

Klíčová slova: bioremediace, aromatické uhlovodíky, dioxygenasy hydroxylující
aromatický kruh

Abstract

The former military air-base Hradcany is among the most contaminated with organic pollutants localities in Czech Republic. Main cleanup strategy in the area is the bioremediation taking advantage on the natural potential of the autochthonous soil microorganisms to evolve catabolic pathways for *in situ* degradation of the pollutant.

The diversity and abundance of the pathways, as well as the specificity and activity of the encoded enzymes are priority biotic factors determining the bioremediation efficiency.

Main task of this work was to analyze the bacterial diversity in jet fuel contaminated soils based on key catabolic genes encoding the Rieske non-haem iron dioxygenases of the toluene/ biphenyl oxygenase branch. High molecular soil DNA was extracted and the sequences encoding catabolic genes were selectively enriched by hybridization to biotinylated oligonucleotides on magnetic microbeads with covalently bound streptavidin. Fragments of the genes for the α -subunits of Rieske non-haem iron oxygenases were amplified and analyzed by restriction analysis, cloning and sequencing. Their evolutionary histories were inferred using the Neighbour-Joining and the maximum likelihood methods. The catabolic genes diversity in the actively bioremediated and highly polluted soil HRB was compared with the diversity in the soil HRB-M sampled from mesocosms which simulated phytoremediation. At least 98% of the analyzed sequences in HRB soil were affiliated with genes belonging to the toluene subgroup and similar to those encoding TodC1 of *Thauera* sp. strain DNT-1. In the plant containing mesocosm soil additional fraction of phylogenetically diverse sequences was observed, comprising 26% of all clones and representing the large subunit of biphenyl dioxygenase genes in polychlorinated biphenyl degrading bacteria. Thus, during the six month development of the microcosm microbial community in presence of willow trees changes inside the toluene/biphenyl family of Rieske non-haem iron dioxygenases were taking place. The increased abundance of biphenyl dioxygenase genes could be ascribed to the influence of willow rhizosphere metabolism and rhizosphere associated bacteria on the overall soil microbial activity.

(In Czech)

Keywords: bioremediation, aromatic hydrocarbons, ring-hydroxylating dioxygenases

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratk	8
1 Úvod.....	10
2 Literární přehled	11
2.1 Znečištění životního prostředí	11
2.1.1 Znečišťující látky	11
2.2 Lokalita Hradčany.....	13
2.3 Bioremediace organických polutantů	14
2.3.1 Dělení bioremediačních postupů	15
2.3.2 Faktory ovlivňující bioremediace	16
2.4 Biodegradace	17
2.4.1 Bakteriální druhy schopné biodegradace aromatických látek	18
2.4.2 Degradace aromatických sloučenin	18
2.4.3 Enzymy účastníci se degradací	23
2.5 Fylogenetická analýza.....	27
2.5.1 Konstrukce fylogenetických stromů	30
3 Cíle práce	34
4 Materiál a metody	35
4.1 Materiál	35
4.1.1 Přístroje	35
4.1.2 Chemikálie	35
4.1.3 Enzymy	36
4.1.4 Roztoky a média	36
4.1.5 Komerční sady	36
4.1.6 Bakteriální kmeny.....	37
4.1.7 Vektory	37
4.1.8 Primery.....	37
4.1.9 Půdní vzorky	37
4.2 Metody	39
4.2.1 Izolace celkové půdní DNA.....	39
4.2.2 Purifikace DNA	39
4.2.3 Izolace a přečištění templátové DNA pro PCR	40
4.2.4 PCR amplifikace s BphA primery	41
4.2.5 Preparace a precipitace DNA z LMP agarosového gelu	41
4.2.6 Ligace DNA fragmentu do plasmidu pGEM-T	42
4.2.7 Transformace kompetentních buněk.....	44
4.2.8 PCR s M13 primery z lyzovaných kolonií.....	44
4.2.9 Analýza amplifikovaných fragmentů pomocí RFLP	45
4.2.10 Přečištění produktu amplifikace s M13 primery.....	45
4.2.11 Sekvence	46
4.2.12 Konstrukce fylogenetických stromů	46
5 Výsledky	48
5.1 Izolace a purifikace celkové půdní DNA.....	48
5.2 Izolace templátové DNA a PCR amplifikace s BphA primery	48
5.3 Preparace z LMP agarosy	50
5.4 Klonování a transformace	50
5.5 PCR s M13 primery z lyzovaných kolonií.....	51

5.6	RFLP.....	51
5.7	Sekvenace	53
5.8	Fylogenetická analýza.....	53
6	Diskuse.....	58
7	Závěr	63
8	Literatura.....	64
9	Přílohy.....	70

Seznam zkratek

BLAST	prohledávací algoritmus (basic local alignment search tool)
BTEX	souhrnně benzen, toluen, ethylbenzen, xylen
BS	roztok usnadňující navázání (binding solution)
CB	chlorobifenyly
DMSO	dimethylsufoxid
EDTA	kyselina ethylendiamitetraoctová
GMO	geneticky modifikované organismy
GuHCl	guanidin hydrochlorid
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
LMP agarosa	agarosa s nízkou teplotou tání (low melting point)
MAE	methylaminoethanol
MEGA	program pro fylogenetickou analýzu (molecular evolutionary genetics analysis)
ML	metoda pro výpočet dendrogramu (maximum likelihood)
MP	metoda pro výpočet dendrogramu (maximum parsimony)
NJ	metoda pro výpočet dendrogramu (neighbor-joining)
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PCR	polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDB	proteinová databáze (protein data bank)
PEG	polyethylenglykol
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RHDO	dioxygenasy hydroxylojící aromatický kruh (ring hydroxylating dioxygenases)
TPH	celkové ropné uhlovodíky (total petroleum hydrocarbons)
SDS	dodecylsulfát sodný
SSU	malá podjednotka (small subunit)

UPGMA	metoda pro výpočet dendrogramu (unweighted pair group method with arithmetic mean)
US EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (U.S. Environmental Protection Agency)
WS	roztok pro oplachování (washing solution)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Úvod

Počátkem 20. století došlo k výraznému rozvoji chemického průmyslu. Byla objevena spousta nových chemických látek s nejrůznějším využitím, což vedlo k jejich masovému využívání jak v zemědělství, tak v průmyslu a to všechno bez větších znalostí jejich vlastností (kromě těch využitelných), toxických případně karcinogenních nebo mutagenních účinků a v neposlední řadě jejich chování v životním prostředí, přenos potravním řetězcem a přetrvávání v přírodě. Životní prostředí bylo soustavně zamořováno také ropnými látkami z paliv. Ve výsledku se do prostředí dostaly kontaminanty jako polychlorované bifenyly, polyaromatické uhlovodíky, benzen, toluen, ethylbenzen, xylen (BTEX) a další. Ve většině případů došlo ke kontaminaci půdy nebo podzemní vody.

Půdní ekosystémy mají schopnost se škodlivých cizorodých látek zbavovat. Za tyto dekontaminační schopnosti jsou odpovědné především půdní bakterie, dále také houby a rostliny. Tato přirozená dekontaminace, která se též nazývá atenuace, má ovšem omezenou kapacitu, adaptace na kontaminanty trvá dlouho a většinou sama o sobě nestačí na úplnou dekontaminaci. Proto jsou dnes čím dál hojněji používány bioremediační technologie založené na těchto procesech. Tyto metody většinou spočívají v podpoře degradujících organismů tak, aby se namnožily a vytvářením příhodných podmínek se zvýšila jejich degradační kapacita.

Hlavní výhodou těchto postupů je šetrnost k přírodě, dekontaminace přímo v místě znečištění a hlavně daleko nižší cena oproti klasickým postupům. Nevýhodou je dlouhá doba potřebná k dekontaminaci. Nutný je také neustálý biomonitoring lokality. Ten spočívá v monitorování úbytku polutantů, ve sledování diversity dekontaminujících organismů a také přítomnosti různých degradačních genů. To je základem pro jakoukoli bioremediaci, má-li být úspěšná. Zároveň lze tento monitoring využít k získání cenných informací o metabolických drahách a enzymech, které někdy disponují novými funkcemi, a které bakterie využívají pro růst na těchto cizorodých látkách.

2 Literární přehled

2.1 Znečištění životního prostředí

Životní prostředí je podle Zákona č. 17/1992 Sb. o životním prostředí definováno takto: „Životním prostředím je vše, co vytváří přirozené podmínky existence organismů včetně člověka a je předpokladem jejich dalšího vývoje. Jeho složkami jsou zejména ovzduší, voda, horniny, půda, organismy, ekosystémy a energie.“ Jako jeho znečištění je podle stejného zákona označováno „vnášení takových fyzikálních, chemických nebo biologických činitelů do životního prostředí v důsledku lidské činnosti, které jsou svou podstatou nebo množstvím cizorodé pro dané prostředí“. Toto vnášení cizorodých činitelů provází lidskou rasu odnepaměti a je spojeno zejména s technologickým pokrokem lidstva.

V dnešní době jsou hlavními zdroji znečištění průmysl a zemědělství, resp. činnosti s nimi spojené a to nejčastěji ve formě chemických látek unikajících do prostředí. Škodlivé jsou tyto látky z mnoha hledisek, jako např. znečištění ovzduší s následnými dopady na kvalitu ovzduší a na klima, znečištění a ovlivnění přirozených ekosystémů, znečištění pitné vody atd. Vážnou hrozbu představují látky, které jsou toxické (případně karcinogenní, mutagenní atd.) již při nízkých koncentracích a také látky perzistentní, které se v přírodě kumulují a vzhledem k vysoké lokální koncentraci a těžké odbouratelnosti představují velký problém.

V této práci se zabývám biodegradací těchto látek půdními bakteriemi, tedy se omezím pouze na lokální znečištění půd a problémy s tím spojené.

2.1.1 Znečišťující látky

Kontaminanty můžeme v zásadě rozdělit na anorganické a organické. Anorganickými se zde zabývat nebudeme, neboť ty jsou prakticky nerozložitelné a nemají tedy význam z hlediska degradací. Mezi organické kontaminanty, které mají relevanci vzhledem k tématu této diplomové práce patří především těžké organické látky, semitěžké organické látky a ropné látky.

Ropné látky patří vzhledem k rozšířenému použití ropy k nejvýznamnějším kontaminantům nejen v ČR, ale i celosvětově. K místům nejčastěji kontaminovaným ropnými látkami nebo produkty, mezi něž řadíme především benzín, naftu, letecký petrolej nebo topný olej, patří letiště, místa údržby letecké techniky, skladovací nádrže, obecně místa kde se manipuluje s těžkou technikou a kde se ropné látky skladují. V České

republice jsou to také bývalé, nyní opuštěné, sovětské základny a letiště, kde je míra kontaminace obzvláště vysoká [1]. Složení ropných produktů nelze jednoduše popsat, neboť jsou to obvykle velmi složité směsi různých uhlovodíků, ať už nasycených nebo nenasyčených, alifatických, cyklických či aromatických.

Jednoduché aromatické látky jsou uhlovodíky, jejichž základem je benzenový kruh. Mezi základní patří benzen, toluen, ethylbenzen a xyleny, běžně označované zkratkou BTEX, dále fenol a mnohé další odvozené látky. Tyto toxické látky se vyskytují především jako kontaminanty podzemních vod v důsledku průsaků nádrží, výtoků z ropných rafinerií a podobně [2]. Obecně se všechny polutanty obsahující aromatický kruh řadí k nejvýznamnějším kontaminantům, a to především kvůli velké termodynamické stabilitě aromatického jádra. Z tohoto důvodu v přírodě perzistují, případně se i kumulují a spolu s jejich vysokou toxicitou (u některých látek karcinogenitou) obsazují horní příčky seznamu polutantů americké agentury pro ochranu životního prostředí (US Environmental Protection Agency – EPA) [3].

Pro polyaromatické uhlovodíky (PAU) platí z hlediska toxicity a nebezpečnosti kontaminace téměř to samé jako pro jednoduché aromatické látky. Do přírody se také dostávají především lidskou činností, zejména úniky paliv, průmyslovými procesy jako zkapalňování nebo zplyňování uhlí, ale také vulkanickou činností nebo lesními požáry [2]. Vzhledem k faktu, že koncentrace PAU je na kontaminovaných místech obvykle vysoká a často se vyskytují společně s BTEX, alifatickými uhlovodíky nebo těžkými kovy, je toto znečištění z hlediska obnovy kontaminovaných míst závažnější [4, 5]. Jak PAU tak jednoduché aromatické uhlovodíky se též vyskytují v alkylovaných formách. Pocházejí především z fosilních paliv a důležité jsou kvůli zvýšené tendenci se kumulovat. Ta je dána zvýšenou hydrofobicitou způsobenou právě alkylovými zbytky [3].

Dále se v důsledku antropogenní činnosti v přírodě kumulují heterocyklické sloučeniny, které lze najít často spolu s PAU a dalšími aromatickými kontaminanty [6]. Jako příklady lze uvést z hlediska toxicity nepříliš prozkoumaný dibezothiofen [3], zástupce dusíkatých heterocyklů karcinogenní a toxický karbazol [7] a z kyslíkatých sloučenin např. dibenzofuran a jeho substituční analogy.

V dobách rozvoje zemědělské a průmyslové chemie se velmi hojně využívalo tehdy nově objevených látek, především chlorovaných aromatických uhlovodíků jako pesticidů, herbicidů, insekticidů, fungicidů a také jako změkčovadel plastů. Z těchto látek lze vyzdvihnout polychlorované bifenyly (PCB) a to především z důvodu jejich extrémní

teplotní, chemické i biologické stability, nízké tenze par a vysoké dielektrické konstanty. Díky těmto vlastnostem byly od roku 1929 široce průmyslově využívány jako chladicí, izolační kapaliny, změkčovadla plastů a přísady do epoxidových barev [8]. Pro stejné vlastnosti se však začaly tyto látky hromadit ve velkém množství v přírodě a i po ukončení jejich výroby v 80. letech z důvodu zjištěné toxicity pro živé organismy byly nalezeny po celém světě ve vodě, v sedimentech i ve tkáních zvířat, především ryb a ptáků a s důsledky jejich používání se potýkáme dodnes [8, 9, 10].

2.2 Lokalita Hradčany

Na pomezí Libereckého a Středočeského kraje se nachází bývalý vojenský výcvikový prostor Ralsko využívaný již od Druhé světové války a to až do roku 1991. Co se devastace přírody týče, rozsah způsobený naší armádou byl vždy ekologicky únosný. Zlom nastal v roce 1968 po příchodu sovětské armády. V prostoru letiště Hradčany se nacházely jedny z největších skladů pohonných hmot, byla zde skladována ohromná množství různých látek, především leteckých paliv, petrolejů a olejů. To vše v nekvalitních nádržích, z čehož pramenily časté a objemné průsaky do okolní půdy, potažmo podzemních vod. Kontaminováno bylo celkem 28 ha půdy ropnými uhlovodíky (Obr.1) o koncentracích v rozsahu 5000 – 55000 mg/kg půdy a koncentrace BTEX až 1000 mg/kg [11].



Obr.1: Mapa znečištění v lokalitě Hradčany. Odstíny růžové barvy jsou označena kontaminovaná místa v závislosti na koncentraci polutantů [11].

Od roku 1993 zde firma AECOM CZ (dříve KAP a poté Earth Tech) provádí intenzivní sanační práce, které jsou největší sanační akcí ministerstva životního prostředí a řadí se k největším remediačním akcím metodami *in situ* i v celosvětovém měřítku. V letech 1993 - 1997 zde byla provedena čištění podzemních vod a instalován venting (o remediačních technikách viz následující kapitola – strana 14). Nyní na této lokalitě jako hlavní sanační technika probíhá bakteriální bioremediace ropných uhlovodíků v půdě podporovaná air spargingem a dávkováním živin [12].

2.3 Bioremediace organických polutantů

Rostoucí míra znečištění životního prostředí po celém světě spolu s většími znalostmi toxických, karcinogenních, mutagenních a podobných účinků těchto látek vede k zájmu o obnovu takto znečištěných míst. Jako technologicky nejjednodušší se nabízí (a dříve se také výlučně používala) dekontaminace znečištěných míst fyzikálními nebo chemickými způsoby. Většinou to zahrnuje vytěžení kontaminovaného materiálu, jeho odvezení na speciální místa (z toho plyne označení takovýchto metod jako „*ex situ*“ metody) a tam odstranění kontaminantu pomocí louhování, spalování nebo chemického vyčištění od kontaminujících látek [13]. Tyto metody, přestože účinné, mají dvě velké nevýhody. Tou první je vysoká cena a tou druhou je znehodnocení takto čištěných půd. Zmíněné důvody vedly k intenzivnějšímu výzkumu mikroorganismů případně rostlin schopných růst v takto zamořených oblastech a kontaminanty využívat ve svých metabolických drahách jako zdroj uhlíku nebo i také jako akceptory elektronů a tím dekontaminovat znečištěnou oblast. Metody využívající tento proces se označují souhrnným termínem jako bioremediace, tedy využití žijících organismů k degradaci kontaminantu v prostředí, ať už přímo na místě znečištění nebo na speciálním místě k tomu určeném [14, 15]. Z uvedeného plyne, že dříve uvedené fyzikálně-chemické metody, ač probírány v této kapitole, mezi bioremediace nepatří.

Je třeba zde také zmínit termín přirozená nebo přírodní atenuace. Jedná se o proces, který probíhá bez přičinění nebo zásahu člověka a při kterém se řadou biologických a fyzikálních procesů (včetně biodegradačních) snižuje množství polutantu v kontaminovaném místě. Do bioremediačních metod tedy technicky vzato nepatří, ale bioremediační techniky z degradačních procesů probíhajících při přirozené atenuaci vycházejí.

2.3.1 Dělení bioremediačních postupů

Bioremediační postupy lze rozdělit do pěti základních uspořádání [16]: nadzemní bioreaktory, postup používající pevnou fázi, kompostování, landfarming a biodegradace *in situ*. První čtyři způsoby zde budou diskutovány pouze krátce, detailněji bude rozebrána bioremediace *in situ*.

Metoda bioreaktorů se používá především pro dekontaminaci vody, znečištěného vzduchu nebo pevné fáze v kašovitých směsích. Typickým a známým příkladem jsou bioreaktory v čističkách odpadních vod.

Při metodách s pevnou fází se obvykle kontaminovaný materiál vytěží a přemístí do jiného systému izolovaného od okolí, kde se kontrolují případně upravují podmínky.

Kompostování je pouze obdoba způsobů s pevnou fází. Rozdílem je to, že se k dekontaminované půdě přidává velké množství organické hmoty, podléjí se na něm jak bakterie tak i houby a aktinomycety a vždy probíhá aerobně.

Landfarming spočívá v tom, že se kontaminovaná půda rozprostře na pole a je normálně zemědělsky obdělávána. Ovšem musí se zamezit sekundární kontaminaci životního prostředí a proto se nejčastěji používá pro snadno degradovatelné látky.

Bioremediace *in situ* je nejvýhodnější z hlediska finančního, neboť při ní není třeba transportovat kontaminovaný materiál na speciální místa k dekontaminaci určená. V roce 1993 byla publikována studie o ekonomické náročnosti dekontaminace půdy [17]. Autoři odhadují náklady na dekontaminaci 1 m³ půdy bioremediací na 52-130 USD. Uložení na úložišti pevného odpadu odhadují na 195-325 USD a spalování půdy při vysoké teplotě by stálo 325-1040 USD. Ačkoli jsou tato data poněkud stará, ekonomika i technologie se vyvíjí a odhady jsou velmi hrubé, tak to velmi dobře demonstruje ekonomickou výhodnost bioremediačních postupů.

Bioremediace *in situ* lze také rozdělit na několik typů, a to především podle stupně zásahu do kontaminované lokality:

Přirozená atenuace

Ta již byla zmíněna a stupeň zásahu do lokality je při ní prakticky nulový. Jediné, co se provádí, je průběžná kontrola lokality a analýza úbytku kontaminujících látek. Přirozená atenuace je děj vždy probíhající v kontaminovaném místě zároveň s bioremediačními postupy. Při vyhodnocování účinnosti bioremediačního postupu je tedy

třeba od zjištěné hodnoty odečíst míru přirozené atenuace, čímž teprve získáme opravdovou míru účinnosti prováděné remediace [18].

Biostimulace

Tato metoda využívá bakteriálních populací již přítomných v půdě. Jak již název napovídá, půda se upravuje přidáváním živin, akceptorů elektronů, provzdušňováním, úpravou pH, zvlhčováním půdy a dále tak, aby byly vytvořeny co nejlepší podmínky pro množení a růst bakterií [19]. Důležité je též udržovat příznivý poměr uhlíku, dusíku a fosforu. Protože jsou v půdě přítomny přirozeně, jsou již tyto mikroorganismy adaptovány na přítomné kontaminanty a mají k tomu uzpůsobené degradační dráhy, které jim umožňují využívat polutantu jako zdroje uhlíku.

Technologie používané v lokalitě Hradčany (viz výše) jsou *bioventing a air sparging*. Jsou to dvě podobné techniky používané pro dekontaminaci těžkých látek, při nichž se systémem aeračních studní vhání vzduch do půdy, poté se odsává zpět a čistí se od organických složek. Dalším efektem těchto metod je zvýšení dostupnosti kyslíku pro bakterie, které se díky tomu výrazně pomnoží a dochází k intenzivnější aerobní degradaci polutantu v půdě [20].

Bioaugmentation

Tento termín zahrnuje přidavek in vitro namnožených bakteriálních kultur do půdy, neboť v některých případech pouhá stimulace přítomných bakterií nemusí stačit a to zejména ze dvou důvodů. Buď je bakterií v kontaminované půdě příliš málo, což bývá způsobeno přílišnou toxicitou polutantu případně nepříhodnými podmínkami v půdě, nebo přítomné bakterie nejsou schopny využít polutant jako zdroj uhlíku, neboť nevyvinuly potřebné degradační dráhy [2, 20]. Současné molekulárně biologické techniky umožňují genetickým inženýrstvím vytvořit bakteriální kmeny s vylepšeným nebo přidaným enzymovým aparátem pro degradaci polutantu. Tento způsob je teoreticky velmi účinný, ale hlavním tématem v tomto směru stále zůstává bezpečnost při vypouštění takovýchto rekombinantních bakterií do přírody, neboť dle současné legislativy nelze vypouštět GMO do přírody [20].

2.3.2 Faktory ovlivňující bioremediace

Tyto faktory lze v zásadě rozdělit na biologické a fyzikálně-chemické. Vždy je ovšem třeba posuzovat faktory dohromady aby se povedlo nastavit podmínky ideální pro bioremediaci [13].

2.3.2.1 Biologické faktory

První faktor je počet mikroorganismů v půdě. Záleží na druhu mikroorganismů přítomných, s čímž souvisí druhý faktor, kterým je genetický potenciál těchto bakterií. Ten je dán přítomností a expresí genů kódujících enzymy podílející se na degradaci kontaminujících látek. Souvislost s tímto má proces zvaný synergie. Při něm se na rozkladu látky podílí více organismů, které samostatně nejsou schopny látku rozložit. Toto probíhá v přírodě přirozeně a při degradacích je tento proces velmi žádoucí. Z toho plyne další důležitý faktor a tím je bakteriální skladba a vztahy (např. predace, kompetice, apod.) mezi různými druhy simultánně přítomnými v kontaminované půdě [13, 21].

2.3.2.2 Fyzikálně-chemické faktory [13, 20, 21]

První oblastí jsou faktory týkající se kontaminantu. Za klíčový můžeme označit biodegradabilitu, tedy jak lehce nebo obtížně lze látku biologicky rozložit. To je dáno především strukturou látky a množstvím a povahou substituentů, které mohou z lehce degradovatelné látky udělat látku velmi odolnou. Se strukturou také souvisí rozpustnost látky a to, jak je látka přístupná pro mikroorganismy. V neposlední řadě je důležitá také koncentrace látky.

Druhou oblastí jsou vlastnosti prostředí. Zde mezi klíčové parametry patří teplota, vlhkost (při vyšší vlhkosti se lépe množí mikroorganismy, ale snižuje se koncentrace kyslíku), salinita (vyšší salinita omezuje až zcela inhibuje degradační procesy [22]) a nakonec množství živin a pH kontaminovaného prostředí.

2.4 Biodegradace

Biodegradace je proces, při němž dochází k rozkladu organických látek za pomoci mikroorganismů. Rozklad může být buď částečný nebo úplný. Při úplném rozkladu kontaminující látky vzniká CO_2 a voda a tento rozklad se nazývá mineralizace. Při částečném rozkladu vznikají buď různé dále nerozložitelné meziprodukty nebo (pro bakterie, resp. pro dekontaminační účely nejvýhodnější) sloučeniny centrálního metabolismu bakterií, což pro ně představuje zdroj uhlíku. Při degradaci se často uvolňuje energie, kterou opět mohou mikroorganismy využít pro svůj růst.

Degradace je v zásadě sled enzymatických reakcí, které nemusí nutně probíhat v jedné buňce, ale meziprodukty se mohou vylučovat do extracelulárního prostoru, odkud je využívají jiné mikroorganismy. Některé degradační kroky (zejména ty počáteční) dokonce mohou probíhat v extracelulárním prostoru za katalýzy enzymů vylučovaných

mikroorganismy z buňky. Toto nastává především u štěpení makromolekul, které nelze transportovat přes buněčnou membránu. Teprve produkty takového štěpení jsou přenášeny do buňky, kde jsou dále oxidovány [20].

Dalším důležitým jevem je kometabolismus. Ten nastává, pokud bakterie disponuje nesespecifickými degradačními enzymy. Tyto enzymy poté mohou oxidovat i normálními degradačními drahami obtížně degradovatelný polutant v reakci, která není primárně určená k získávání energie nebo uhlíku [13].

Biodegradace může probíhat jak za aerobních (což je častější a efektivnější) nebo i za anaerobních podmínek, které umožňují degradaci některých odolných látek, které by nebylo možno štěpit běžnými aerobními kroky [2].

2.4.1 Bakteriální druhy schopné biodegradace aromatických látek

První degradační bakterie byly objeveny již ke konci 19. století a v roce 1969 byly objeveny druhy rozkládající téměř všechny složky ropy. Bakteriálních druhů schopných biodegradace bylo v roce 1991 objeveno přes 200 a tento počet stále stoupá [3, 23].

U mono a polyaromatických látek jsou nejdéle známými a nejvýznamnějšími degradátory rody půdních bakterií *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* a *Rhodococcus*, nověji také *Ralstonia*, *Burkholderia* nebo *Sphingomonas* [18, 24].

Co se polychlorovaných bifenyly týče, tak je situace poněkud složitější. Více chlorované bifenyly je totiž nejprve nutné dechlorovat, což probíhá především anaerobně. Tato část degradace je tedy vykonávána jinými rody bakterií než aerobní část. *Dehalococcoides* [25], *Desulfotobacterium* [26], *Dehalobacter* [27], *Desulfomonile* [28], *Desulfuromonas* [29] a *Sulfospirillum* [30] jsou dnes známé rody schopné reduktivně dehalogenovat chlorované aromatické sloučeniny. Nutno podotknout, že v jejich případě je polutant v roli akceptoru elektronů, nikoli substrátem. Produktem této dehalogenace je buď přímo bifenyl, nebo častěji málo chlorovaný bifenyl. Tyto sloučeniny jsou již daleko lepším substrátem pro aerobní oxidační degradaci, kterou zajišťují především rody *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Rhodococcus* a *Bacillus* [31].

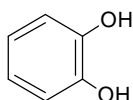
2.4.2 Degradace aromatických sloučenin

Degradační dráhy jsou kaskády reakcí katalyzovaných různými enzymy, které vedou k rozštěpení dané látky na jednodušší sloučeniny. Ty se již mohou začlenit do

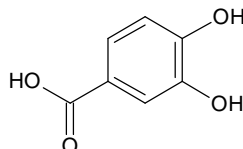
centrálních metabolických drah. Degradčních drah existuje ohromné množství a cesta, kterou bude daný polutant degradován vždy záleží na dostupném enzymovém aparátu [2].

Hlavní meziprodukty

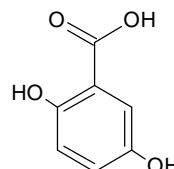
katechol



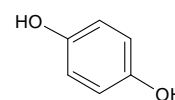
protokatechuát



gentisát

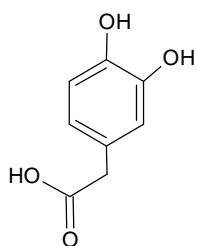


hydrochinon

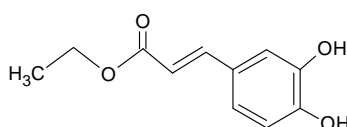


Látky odvozené od hlavních meziproduktů

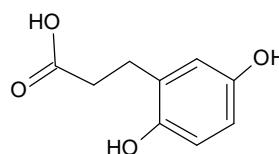
homoprotokatechuát



dihydroxyfenylpropionát

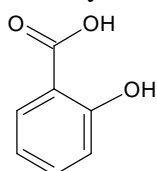


homogentisát

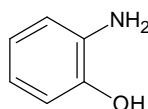


Další meziprodukty

salicylát

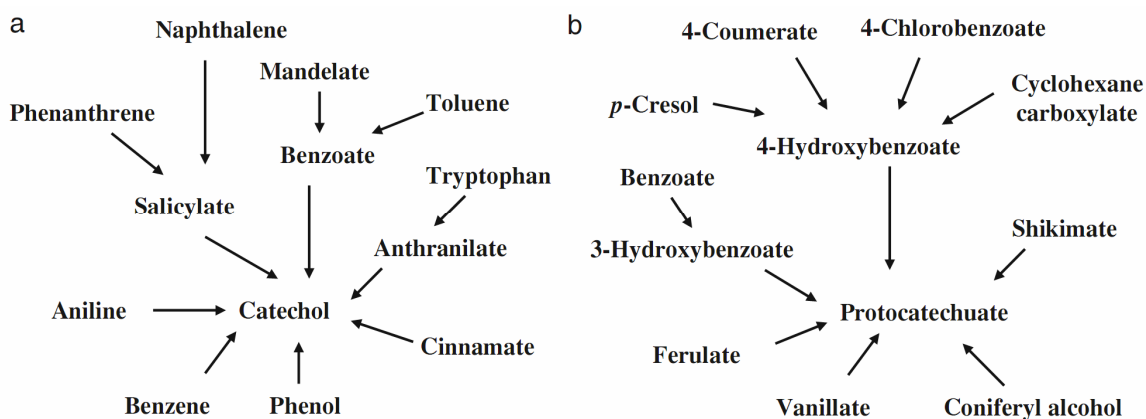


2-aminofenol



Obr.2: Centrální meziprodukty drah degradujících aromatické látky [33]

Degradční dráhy lze obecně rozdělit na horní, nebo také periferní část a dolní, centrální část (upper and lower pathway). V horní části metabolických cest jsou strukturně velmi rozdílné látky transformovány pomocí mnoha a mnoha různých enzymových drah [32] na několik centrálních meziproduktů (Obr.2), které jsou již substrátem pro dolní metabolické dráhy degradujících bakterií (Obr.3, str.20). Tyto dráhy vykazují mezi různými bakteriálními druhy velkou podobnost na rozdíl od drah periferních [2].

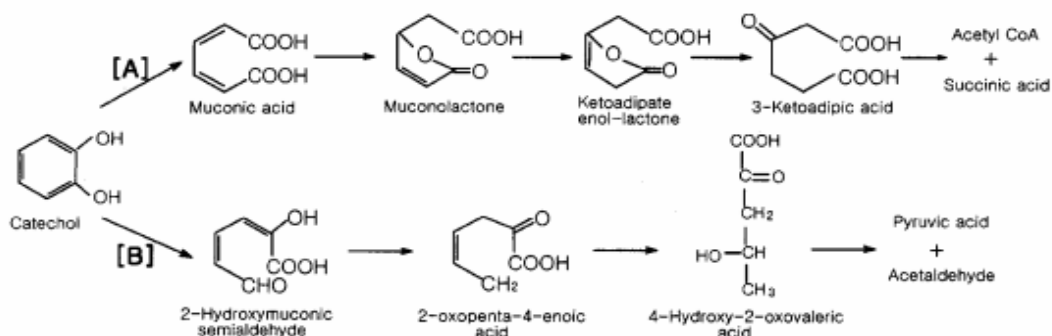


Obr.3: Aromatické látky metabolizované na katechol (a) a protokatechuát (b) [2].

2.4.2.1 Jednoduché aromatické sloučeniny

O degradaci jednoduchých aromátů se zde zmíním především z toho důvodu, že závěrečná fáze degradace všech aromatických látek se velmi podobá degradaci jednoduchých aromátů. Jako hlavní degradovatelné polutanty zde jsou BTEX a fenol, resp. jejich substituované deriváty. Tyto látky jsou degradovány různými způsoby a cestami v závislosti na míře jejich substituovanosti.

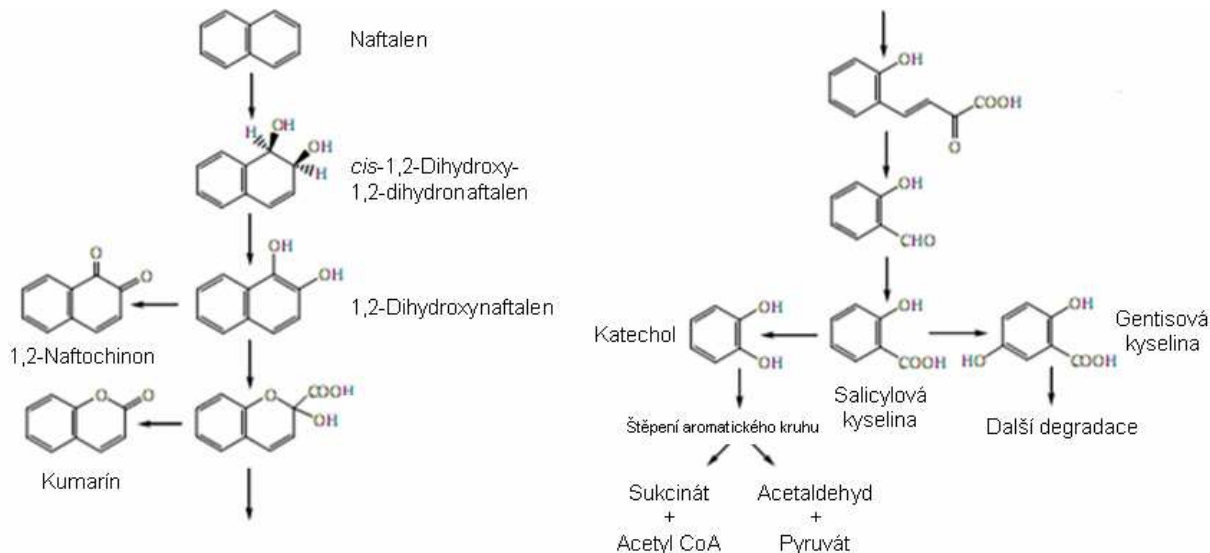
Klíčovým krokem degradace je aktivace aromatického kruhu pomocí oxidace, při které je nejprve aromatický kruh atakován buď dioxygenasami (za vzniku dihydroxylové sloučeniny) nebo monooxygenasami, a to ve dvou následných oxidacích (nejprve za vzniku fenolu [34] a po druhé oxidaci dihydroxy sloučeniny [35]). Vždy zde vzniká arendiol a to v *cis* konformaci [36]. Poté následuje druhý krok oxidace, kdy je tento arendiol štěpen za katalýzy dalších, tentokrát nehydroxytujících, ale štěpících, dioxygenas. Ty se dělí do dvou navzájem odlišných tříd: intradiolové (štěpí mezi hydroxyly, jinak také štěpení v poloze *ortho*) a extradiolové (štěpí vedle hydroxylů, neboli *meta* štěpení) [37]. Tento krok pak následují další katabolické reakce, jejichž finální produkty se začleňují do normálních metabolických drah jako je Krebsův cyklus a jiné. Jako příklad je zde uvedeno štěpení a následná degradace katecholu jako typického a běžného zástupce dihydroxylovaných meziproductů (Obr. 4, str.21). Tyto dva kroky jsou klíčové pro degradaci jakékoli aromatické sloučeniny, neboť právě díky nim je aktivován a rozštěpen termodynamicky jinak velmi stabilní aromatický kruh.



Obr. 4: Degradace katecholu iniciovaná katechol 1,2-dioxygenasou (A) (štěpení v poloze ortho), katechol 2,3-dioxygenasou (B) (štěpení v poloze meta) [38].

2.4.2.2 Polyaromatické uhlovodíky (PAU)

Mnoho bakterií má schopnost degradovat také polyaromatické uhlovodíky. Degradace PAU je obtížnější v tom, že je zde již ve většině případů potřeba spolupráce více bakteriálních druhů. Také biodostupnost PAU je díky jejich velké hydrofobicitě oproti jednoduchým aromátům daleko nižší. V neposlední řadě je problémem to, že nezřídka se degradace zastaví „v mrtvém bodě“ u nějaké perzistentní toxické sloučeniny, kterou přítomné mikrobiální populace nejsou schopny dále degradovat [2].



Obr. 5: Bakteriální katabolické dráhy pro degradaci naftalenu [3].

Základní mechanismus bakteriální degradace PAU je velmi podobný jednoduchým aromatickým sloučeninám. Spočívá v oxidaci substrátu katalyzované dioxygenasami. Několik bakteriálních druhů, jako např. *Mycobacterium* sp. je schopných oxidace pomocí enzymového systému monooxygenas obsahujícího cytochrom P450 jako terminální

oxidasu [39]. Protože většina bakterií schopných degradovat PAU oxiduje naftalen, je pro ukázkou tato dráha znázorněna na Obr.5 na straně 21.

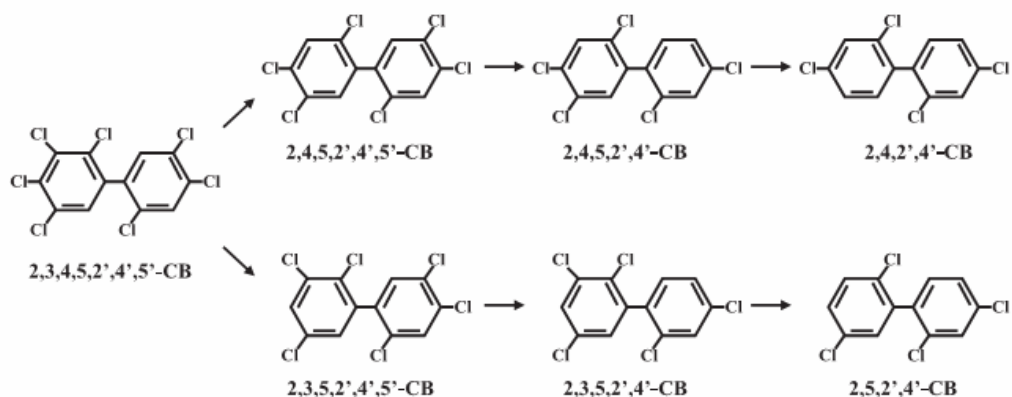
2.4.2.3 Polychlorované bifenyly (PCB)

Bakteriální degradace PCB je ze zmíněných aromatických látek zdaleka nejsložitější. Prvním důvodem je to, že dříve používané průmyslové směsi PCB vždy obsahovaly 20-70 různých kongenerů polychlorovaných bifenyly, což znesnadňuje kompletní odbourání všech složek. Druhým důvodem je nemožnost degradovat mnohonásobně chlorované bifenyly normální aerobní oxidační cestou. Z hlediska bioremediací je problémem velká variabilita degradačních cest a také to, že tyto cesty nejsou ještě zdaleka dostatečně prozkoumány [31]. Degradace PCB lze i přes zmiňovanou komplexnost degradačních drah rozdělit na dvě části.

První částí je anaerobní, nebo také redukční dehalogenace. Tato fáze je velmi důležitá proto, že zmenšuje toxicitu PCB a látky, které vznikají při redukční dehalogenaci, se zároveň stávají lépe aerobně degradovatelné [40]. První bakteriální degradace PCB byly objeveny v roce 1987 v sedimentech řeky Hudson [41, 42] a od té doby bylo zaznamenáno mnoho dalších. Ovšem specifita mikrobiálních dechlorací se vzhledem k velkému množství sloučenin v rámci PCB velmi liší. Protože je tato problematika velmi složitá a zdaleka ne dostatečně objasněná, tak zde zmíním několik obecných rysů dehalogenací.

Při sledování změny složení PCB v kontaminovaných sedimentech (s koncentrací PCB až 700 mg/kg) bylo zjištěno, že došlo k odstranění 53% z celkového chloru, ale pouze z pozic *meta* a *para* (i když jsou známy dechlorace i v poloze *ortho* [43]) a že podíl mono- a dichlorobifenyly se zvýšil z 9% na 88% [44]. Dalším typickým znakem je to, že mono- a dichlorované bifenyly nebývají dále dechlorovány, neboť ty jsou již substrátem pro aerobní oxidaci. Příklad dechlorace PCB, kde lze tyto jevy vidět je na Obr.6 na následující straně.

Existuje nejméně šest různých procesů, které v určitých situacích a podmínkách odstraňují jednotlivé atomy chloru u různých zástupců PCB [45]. To, které procesy budou probíhat, záleží na mnoha faktorech, jež lze shrnout do pěti hlavních bodů: a) na přítomné mikrobiální populaci, b) na pozici chloru (*ortho*, *meta*, *para*) vzhledem k druhému fenylu, c) na konfiguraci okolních chlorů, d) na konfiguraci chlorů na druhém fenylu a e) na inkubačních podmínkách [43, 45].



Obr.6: Postupná dechlorace 2,3,4,5,2',4',5'-heptachlorobifenylu bakteriemi rodu *Dehalococcoides* (zkratka CB na obrázku znamená chlorobifenyl) [40].

Druhá část je již běžná aerobní oxidace bifenyly katalyzovaná dioxygenasami (Obr.7, str.24). Tato cesta je mezi bakteriemi degradujícími bifenyl konzervovaná a katalyzují ji enzymy kódované geny BphA – BphG [46]. Degradace méně chlorovaných bifenyly vzniklých v anaerobní dehalogenaci probíhá kometabolicky s touto degradací bifenyly. Na základě studií biodegradability PCB [47, 48, 49] byla vytvořena pravidla, podle nichž lze odhadnout biodegradabilitu určitého chlorovaného bifenyly [40]: a) biodegradabilita klesá s vyšším počtem chlorů, b) bifenyly s chlory pouze na jednom kruhu jsou degradovány snadněji než bifenyly chlorované na obou aromatických kruzích, c) PCB chlorované dvakrát v poloze *ortho* (2,6- nebo 2,2'-) jsou málo degradovatelné a d) to, který kruh bude rozštěpen i rychlost degradace záleží na druhu degradující bakterie.

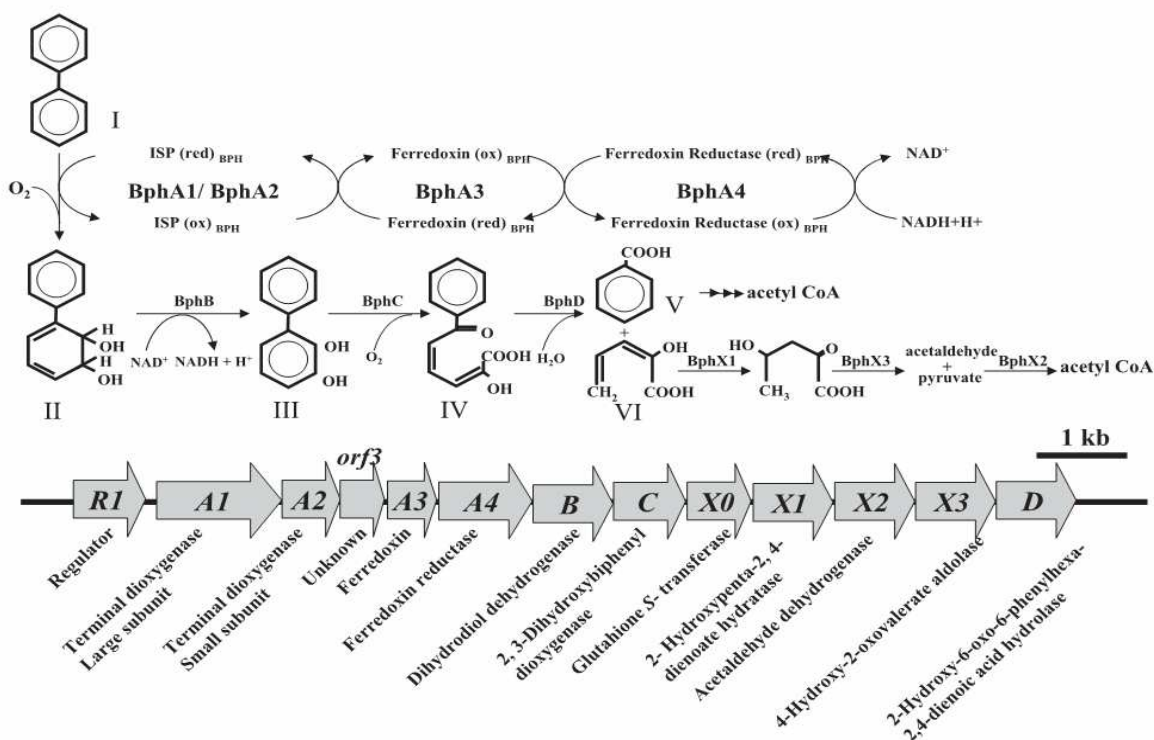
2.4.3 Enzymy účastníci se degradací

Enzymů účastnících se degradací aromatických uhlovodíků je ohromné množství a neustále jsou objevovány nové. Z toho důvodu zde budou probrány pouze enzymy, které mají v rámci degradace aromátů výsadní a univerzální postavení. Těmi jsou, jak již bylo řečeno dříve, hydroxylující a štěpící dioxygenasy.

Bakteriální dioxygenasy hydroxylující aromatický kruh (RHDO z angl. ring hydroxylating dioxygenases) katalyzují tvorbu *cis*-dihydrodiolů [50], které jsou poté dehydrogenovány na aromatický diol. Pro funkci RHDO je nezbytná přítomnost železnatých iontů, které hrají zásadní roli v přenosu elektronů, dále redukované pyridinové nukleotidy pro katalýzu a samozřejmě kyslík [36]. Strukturně se RHDO skládají ze dvou až tří proteinů, jedná se tedy o vícesložkový enzymový systém. Hlavní složkou je

oligomerní terminální oxygenasová část. Skládá se buď ze stejných (α)_n nebo různých ($\alpha\beta$)_n podjednotek. α podjednotka obsahuje zmiňovaný ion železa, dále Rieskeho [2Fe-2S] centrum a také aktivní místo vázající substrát [51].

Druhým typem dioxygenas jsou štěpící. Podle toho, jestli štěpí aromatický diol vedle hydroxylů nebo mezi nimi (Obr.4, str.21), se tyto enzymy nazývají extradiolové nebo intradiolové [52]. Přestože katalyzují velmi podobné reakce, jedná se o dvě odlišné třídy enzymů, které mají rozdílné struktury a štěpení probíhá různými mechanismy [33].



Obr.7: Degradční dráha bifenyly a organizace *bph* genového klastru v *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707[40]. Sloučeniny: I = bifenyl, II = 2,3-dihydroxy-4-fenylhexa-4,6-dien, III = 2,3-dihydroxybifenyl, IV = 2-hydroxy-6-oxo-6-fenylhexa-2,4-dienoát, V = kys. benzoová, VI = 2-hydroxypenta-2,4-dienoát, VII = 4-hydroxy-2-oxovalerát. Enzymy: BphA = bifenyl dioxygenasa, názvy ostatních enzymů jsou uvedeny u mapy genů *bph* klastru. Enzym BphX1 se také značí BphE, BphX2 = BphG a BphX3 = BphF. BphR1 je transkripční regulátor ovlivňující expresi BphR1 a BphX0X1X2X3D. Funkce *orf3* není známa[40].

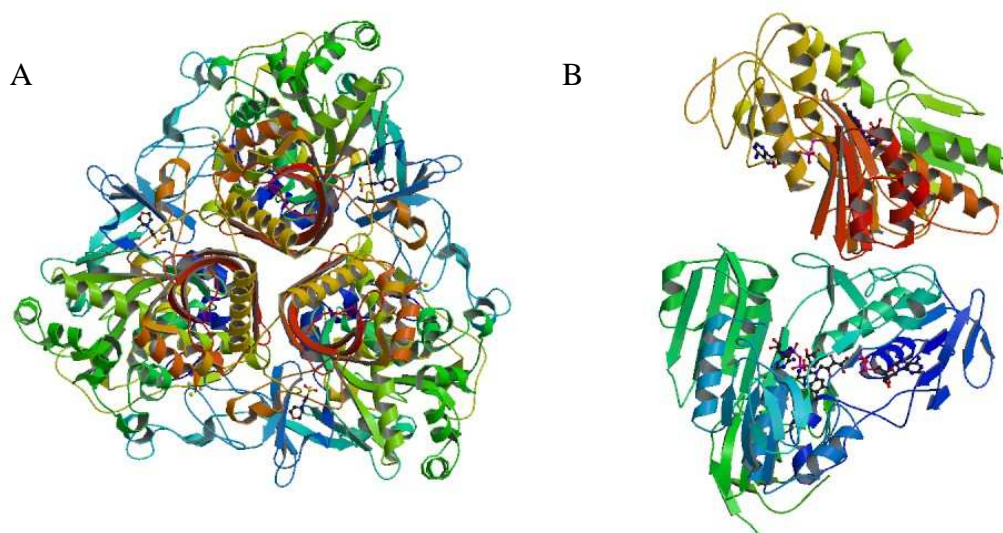
Extradiolové dioxygenasy ke štěpení využívají nehemový dvojmocný ion železa (někdy též mangan [54, 55]), zatímco intradiolové mají železo trojmocné. Obecně lze říci, že extradiolové dioxygenasy jsou daleko všestrannější a to jak z hlediska substrátové specifity, tak reakcí, které katalyzují. Důkazem budiž to, že jsou schopny štěpit jak katecholické sloučeniny obsahující vicinální hydroxyly, tak ostatní meziproducty dekontaminace: gentisát, hydrochinon, salicylát i 2-aminofenol. Dokonce se účastní některých biosyntetických drah a degradací nearomatických sloučenin [56]. Naproti tomu

intradiolové dioxygenasy štěpí striktně sloučeniny s vicinálními hydroxyly (katechol, protokatechuát, 2-hydroxychinol) [33]. Z hlediska zaměření této práce není bez zajímavosti, že určité extradiolové dioxygenasy jsou schopné štěpit některé chlorované substráty [57, 58], což je významné při degradaci PCB.

Dioxygenasy hydroxylující aromatický kruh

V této práci se zabývám analýzou genů kódujících dioxygenasy hydroxylující aromatický kruh, proto zde tyto enzymy budou rozebrány detailněji. Typickým zástupcem této rodiny je bifenyl dioxygenasa. Sestává ze tří komponent, kterými jsou terminální dioxygenasová část, ferredoxin a ferredoxin reduktasa (Obr.7, str.24) [59].

Oxygenasová část se skládá z velké α podjednotky (BphA1) a malé β podjednotky (BphA2). Ty jsou uspořádány jako heterohexamer $\alpha_3\beta_3$ [60] (Obr.8A). Velká podjednotka o velikosti přibližně 50 kDa obsahuje motiv Cys-X-His-X₁₇-Cys-X₂-His, který koordinuje centrum Rieskeho typu [2Fe-2S] [40, 53]. Toto centrum přenáší elektrony z ferredoxinu na katalytické nehemové železo Fe^{II} taktéž umístěné v α podjednotce. Toto železo je odpovědné za samotnou aktivaci molekulárního kyslíku a za jeho vnášení na aromatický kruh substrátu [61]. α podjednotka obsahuje také vazné místo pro substrát [62], které udává substrátovou specifitu enzymu [36]. β podjednotka je velká zhruba 20 kDa a do katalytické reakce pravděpodobně nezasahuje. Nový systém klasifikace RHDO [63] je založen právě na homologii α podjednotky a odráží substrátovou specifitu enzymu.



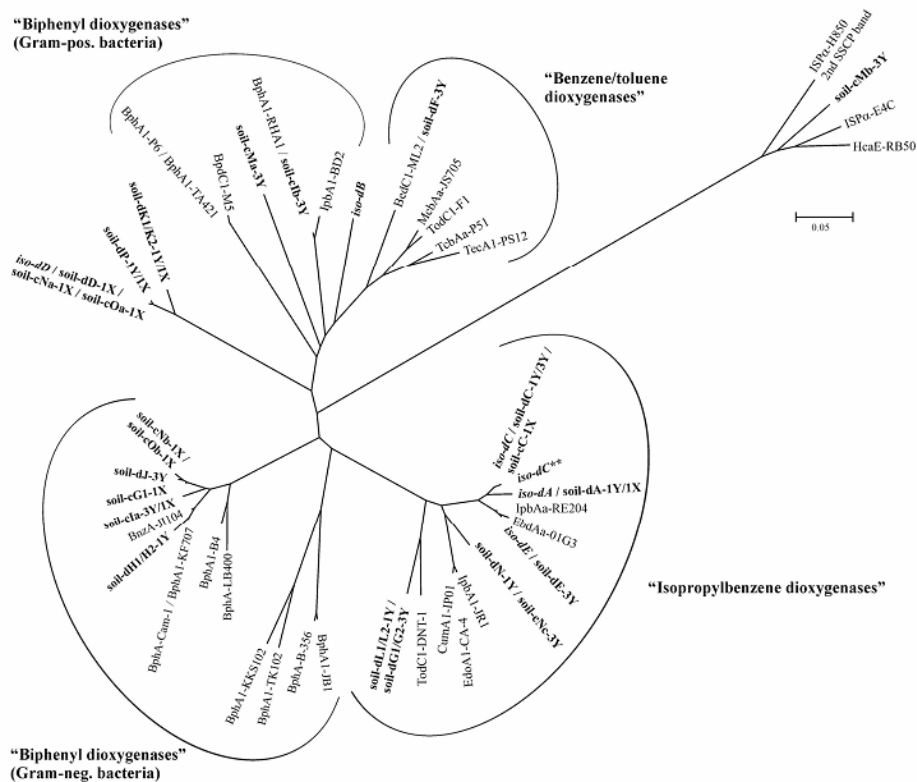
Obr.8: Krystalová struktura A) bifenyl dioxygenasy z *Comamonas testosteroni* Sp. B-356, heterohexamer $\alpha_3\beta_3$, PDB ID - 3GZY, B) komplexu ferredoxin-ferredoxin reduktasa (BphA3-BphA4), BphA3 nahoře [64].

Ferredoxin (BphA3) a ferredoxin reduktasa (BphA4) (Obr.8B, str.25) fungují jako elektron-transportní systém. Reduktasa obsahující flavinové redoxní centrum oxiduje NADH a přenáší dva elektrony na ferredoxin. Ten stejně jako terminální dioxygenasa obsahuje Rieskeho centrum a elektrony přes něj putují taktéž na Rieskeho centrum terminální dioxygenasové části, ze které jsou již katalytickým iontem železa využity k aktivaci kyslíku [51, 61]. Putování elektronu je také znázorněno na Obr.7 na straně 24.

Na základě kinetických a mechanistických studií [65] byl navržen pravděpodobný mechanismus samotné oxygenační reakce. V tomto schématu redukce enzymu dvěma elektrony způsobí vazbu substrátu. Tuto vazbu následuje již samotná reakce kyslíku vyúsťující v hydroxylaci substrátu a oxidaci Rieskeho i Fe^{II} centra. Cyklus se uzavírá redukcí enzymu dvěma elektrony předanými reduktasovým systémem [61].

Dřívější klasifikační systém rozdělval RHDO do tří skupin a to na základě složení enzymů z podjednotek a redoxních center [66]. Fylogenetické analýzy ovšem ukázaly, že je zde rozpor mezi dřívější klasifikací [66] a fylogenetickou příbuzností α podjednotek [63]. Starý systém byl tedy nahrazen novým, který je založen čistě na homologii α podjednotek [63]. V praktické rovině tento systém klasifikace velmi dobře koreluje se substrátovou specifitou enzymů [36]. Dioxygenasy můžeme podle této klasifikace rozdělit do tří rodin. Toluen/bifenylovo dioxygenasová rodina katalyzuje hydroxylaci toluenu, benzenu, isopropylbenzenu, chlorbenzenu a bifenylo. Specifita naftalenové rodiny zahrnuje naftalen a fenanthren, ale také nitrobenzen a nitritoluen. Poslední rodinou je benzoátová, která degraduje především aromatické kyseliny jako benzoát, toluát, anthranilát nebo isopropylbenzoát.

Právě toluen/bifenylové rodiny se týká tato diplomová práce. Witzig et al. ve své práci [67] analyzovali půdy kontaminované BTEX, resp. geny pro Rieskeho dioxygenasy z rodiny toluen/bifenylo v těchto půdách přítomné, a to na základě sekvencí genů pro α podjednotky. Výsledný fylogenetický strom (Obr.9 na následující straně) je vhodnou ilustrací diversity a také vzájemné příbuznosti těchto dioxygenas.



Obr.9: *Fylogenetický strom založený na příbuznosti genů kódujících a podjednotky Rieskeho dioxygenas toluen/bifenylové rodiny. Tučně jsou označeny environmentální vzorky a ostatní geny jsou referenční získané z databází [67].*

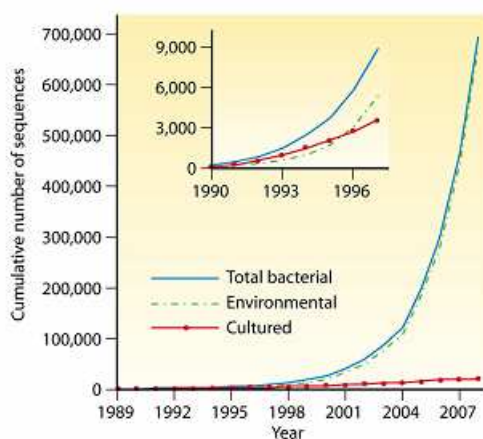
2.5 Fylogenetická analýza

Fylogenetika je věda zabývající se odhadováním nebo zjišťováním evoluční minulosti. Pokud se nebudeme zabývat klasickou fylogenetikou (která byla v minulosti založena především na porovnávání fenotypu jednotlivých druhů), ale pouze molekulární, tak je tato evoluční spřízněnost odhadována na základě porovnávání sekvencí DNA nebo proteinů. Klasickým výstupem takových studií jsou fylogenetické stromy. Snaha zakreslit evoluční příbuznost, resp. biologickou podobnost do struktury podobné stromu, se datuje zhruba do poloviny 19. století, do časů Charlese Darwina [68]. To mělo ovšem velmi daleko k dnešní podobě, kdy jsou stromy počítány numericky na základě kvantitativních metod [69]. Dnes, v době, kdy sekvenace je stále rychlejší a dostupnější, přichází molekulární genetika čím dál víc ke slovu jako hlavní nástroj, s jehož pomocí se lze orientovat a dát smysl ohromným množstvím sekvenčních dat, které jsou dnes dostupné [70].

Fylogenetický strom je grafická reprezentace příbuznosti, resp. vztahu mezi různými organismy nebo molekulami. Molekulárně-fylogenetická analýza je založena na

porovnávání orthologních genů (jejich sekvencí) z různých organismů. Zde se ovšem dostáváme k rozdílu mezi příbuzností genů (molekul) a celých organismů. Fylogenetický strom na základě porovnání sekvencí genů totiž vypovídá pouze o příbuznosti těchto genů, ale už nám nic neříká o příbuznosti organismů tyto geny nesoucí. Nabízelo by se tedy srovnání genomů organismů pro určení jejich příbuznosti. Organismy se však od sebe navzájem liší nejenom sekvencí genů, ale také jejich skladbou. Geny dále podléhají laterálnímu přenosu a dalším změnám, což všechno společně způsobuje, že genomy různých, i relativně blízkých organismů není možné porovnávat, neboť mají různou skladbu, resp. nejsou orthologní [71].

I přes zmíněná fakta existují snahy o vytvoření celkového „stromu života“, nebo pokud slevíme z ambic, tak alespoň určit druhovou skladbu určitých organismů v určitém ekosystému. Příkladem typickým a blízkým tématu této práce je určení bakteriální skladby v environmentálním vzorku. Vzhledem k výše zmíněným omezením existuje jedna možnost a to najít vhodný gen. Požadavky na vlastnosti tohoto genu jsou zřejmé. Gen musí být přítomný ve všech druzích organismů, nesmí podléhat laterálnímu přenosu a musí být extrémně konzervovaný (to je důležité proto, aby porovnání sekvencí genů co nejvíce odpovídalo reálné míře evoluce). Takovýmto se ukázal být gen pro malou podjednotku (SSU) rRNA [72]. Splňuje všechny požadavky a jeho konzervovanost je taková, že eukaryotní a prokaryotní SSU rRNA geny vykazují až 50% identitu. To má ovšem za následek to, že pomocí tohoto genu nelze zkoumat příbuznost blízkých druhů. V takových případech ovšem lze vždy najít jiný gen, pomocí něhož lze zkoumané organismy (vzorky) porovnat.



Obr.10: Množství sekvencí rRNA z kultivovaných a environmentálních vzorků bakterií ve veřejných databázích [73]. Obrázek převzat z [71].

Gen pro 16S rRNA se dnes rutinně využívá v mikrobiologii jak ke sledování diversity bakterií tak k určování druhu neznámého mikroorganismu, neboť v databázích je ohromné množství publikovaných sekvencí tohoto genu (v řádu statisíců). Dříve byly veškeré analýzy bakteriálních společenstev prováděny na základě kultivačních metod. Různé druhy jsou však kultivovatelné pouze ve specifických podmínkách (a nebo vůbec) a proto je takto možné identifikovat pouze méně než jedno procento všech druhů přítomných v daném vzorku. Dnes jsou čím dál častěji používány metody na kultivaci nezávislé. Díky automatizaci a zrychlení sekvenčních technik proto došlo v posledních 15-ti letech k ohromnému nárůstu osekvenovaných genů pro 16S rRNA (Obr.10, str.28) u environmentálních (tedy nekultivovaných) vzorků. Toto množství sekvencí není samoučelné, ale nové sekvence neznámých druhů samy o sobě vypovídají o daném bakteriálním druhu. Za prvé nám to dává informaci o fylogenetické příbuznosti. Z té lze často usuzovat na některé fenotypové vlastnosti. Také hojnost sekvence ve vzorku částečně ukazuje na hojnost organismu v ekosystému a na jeho významnost pro společenství. U sekvencí vzdálenějších od známých druhů již příliš významnou informaci nezískáme, ale ukáže na potenciální cíl (nový druh) dalšího výzkumu [71].

Z mnoha důvodů se fylogenetické analýzy nejčastěji provádějí z půdních vzorků. Půdy díky své heterogenitě, vícefázové povaze (vzduch, voda i pevná fáze) a biologickým i chemickým vlastnostem obsahují ohromně diversifikovaná bakteriální společenství [74]. Například 1 gram lesní půdy obsahuje odhadem 4×10^7 prokaryotických buněk [75] a u polí nebo pastvin je to až 2×10^9 buněk [76]. Počet různých genomů v 1 gramu půdy se podle odhadů pohybuje od 2 do 18-ti tisíc [77, 78, 79]. Bakteriální skladba samozřejmě není v čase konstantní, neboť půda prochází změnami jako jsou například cyklické změny v obsahu vody, změna teploty, pH, obsahu kyslíku atd. Další takovou změnou může být objevení se nějaké cizorodé látky v prostředí, pokud se budeme držet tématu této práce, tak únik organických polutantů.

Výzkumy ukázaly, že po kontaminaci prostředí polutanty se bakteriální skladba výrazně mění a společenství se na kontaminanty adaptuje [80]. Zkoumáním těchto změn bychom mohli získat informace o důležitosti a roli jednotlivých druhů při biodegradaci [81]. Tím se dostáváme k tomu, že fylogenetická analýza nemusí dávat informaci pouze o skladbě druhů, ale také o funkční diversitě degradačních genů. To je důležité proto, že některé funkční geny, například katabolické, jsou často lokalizovány na mobilních genetických elementech jako například plasmidy, které podléhají horizontálnímu přenosu a

také rychlým mutacím [82]. Z toho důvodu část metabolických aktivit nemusí být postihnutelná pomocí taxonomické příslušnosti bakterií ani druhovou skladbou společenství mikroorganismů.

Především laboratorní studie s izolovanými mikrobiálními druhy nebo komunitami stojí za naší znalostí degradací v přírodě. Při dalších studiích klíčových degradačních genů (např. enzymů hydroxylujících nebo štěpících aromatický kruh) bylo pomocí metod nezávislých na kultivaci ukázáno, že existuje spousta odlišných a početných funkčních genů (do té doby neznámých) jak v přirozeném prostředí, tak v prostředí zasaženém kontaminanty. Srovnáním je zřejmé, že kultivační metody ani zdaleka nejsou schopny pokrýt diversitu funkčních genů v přírodě [83].

Kromě kultivačního přístupu lze diversitu, resp. nové katabolické geny zkoumat dvěma přístupy. První je založen na existenci konzervovaných nukleotidových sekvencí, které jsou využity pro návrh univerzálních primerů. Tyto primery jsou poté využity pro testování přítomnosti, hojnosti a diversity genů (potažmo organismů tyto geny nesoucí) kódujících určitou katabolicky významnou funkci. To má ale slabinu v tom, že znalost těchto skupin genů je většinou založena na kultivačních metodách, tedy těžko lze touto metodou objevit nějaký nový gen. Druhý přístup spočívá v konstrukci metagenomových knihoven (genomová knihovna vytvořena z celkové DNA izolované z daného prostředí – obsahuje tedy geny všech přítomných mikroorganismů) a jejich funkčním prohledáváním. Cílem tohoto je najít všechny geny kódující určitou požadovanou funkci. Tímto přístupem byly objeveny např. nové geny kódující rezistenci na antibiotika [84], ester- a glykosylhydrolasy [85] a mnoho dalších. Také díky metagenomickému přístupu mohly být popsány hlavní skupiny biodegradačních genů v lokalitách kontaminovaných leteckým palivem [86].

2.5.1 Konstrukce fylogenetických stromů

Konstrukce fylogenetických stromů je relativně komplikovaná záležitost, pokud chceme, aby skutečně vypovídaly o evoluční příbuznosti. Vzhledem k tomu, že existuje mnoho způsobů tvorby stromů a programů toto umožňujících, zde chci poukázat na dvě práce, které začínajícímu uživateli značně usnadní orientaci v problematice a pomocí kterých jsem sepsal metodiku konstrukce dendrogramů [87, 70].

2.5.1.1 Úprava sekvenčních dat

Sekvence je vždy nutno upravit, abychom dále pracovali pouze s čistými a shodně orientovanými sekvencemi požadovaného genu. Z nich je poté třeba vytvořit textový soubor vhodný jako vstupní data pro programy vytvářející mnohočetné přiřazení. Tento soubor sestává z jednotlivých pojmenovaných sekvencí ve FASTA formátu, seřazených za sebou (vzorový formát je na Obr.11).

```
>HRB-13
cactagttctagagtttagctactagggtttggctattgcgagcgcatactgaatattcgcttcatgtgttcc
aggaaggcggctt
>HRB-28
aagcttgtttttaattctaacaagagcatcttgaaggagagtataggatcatgagttcaataataaataaagaa
gtgcaggaa
>BphA1-TK102
gcagaccaggatctgtacgagaatgggaatacattcggaacgcgaagtgcaagccgtgccgctgacggttcaag
cgtcgctggacg
>EdoA1-CA-4
aagcttgttttttattctaacaagagcatcttgaaggagagtataggatcatgagttcaataataaataaagaa
gtgcaggaagcc
```

Obr.11: Ukázka vstupního formátu sekvencí pro mnohočetné přiřazení (FASTA formát).

2.5.1.2 Mnohočetné přiřazení

Mnohočetné přiřazení je základ tvorby dendrogramu (fylogenetického stromu). Dnes se téměř vždy provádí metodou tzv. „progresivního přiřazení“ [88]. Tato metoda přiřazuje nejprve sekvence vzájemně nejvíce podobné a k nim postupně další. Takto vytvoří jakýsi pomocný strom, na jehož základě sekvence již řádně seřadí a přiřadí. Při progresivním přiřazení je klíčovou částí vkládání mezer. Při každém kroku, kdy algoritmus srovnává sekvence, pokud je míra podobnosti příliš malá, program do přiřazované sekvence vloží mezeru tak, aby byly přiřazené sekvence co nejpodobnější. Z toho plynou dva základní problémy: kam mezeru vložit a jak ji udělat velkou. Tyto různě dlouhé mezery jsou ovšem dvousečné, neboť mohou jak vylepšit výsledné přiřazení, tak do něj mohou vnášet artefakty.

Nejstarším a nejpoužívanějším algoritmem pro vytváření mnohočetného přiřazení je Clustal [89, 90]. Samozřejmě Clustal není jediným dostupným a použitelným algoritmem. Za zmínku stojí např. algoritmus T-Coffee [91], který má podobné využití jako Clustal, ale poskytuje rozumné výsledky i při vzdálenějších, méně podobných sekvencích (kolem 30% identických pozic), což jsou již sekvence pro Clustal problematické. Dalším algoritmem co se využití týče tak podobným T-Coffee je MUSCLE [92]. Ten poskytuje podobné výsledky jako T-Coffee, ale je výrazně méně náročný na výpočetní kapacitu a

čas. Algoritmus MUSCA [93] byl vyvinut především pro konstrukci přiřazení vzdáleně příbuzných sekvencí a jeho hlavní výhodou je citlivost na konzervované roztroušené aminokyseliny.

2.5.1.3 Tvorba dendrogramu

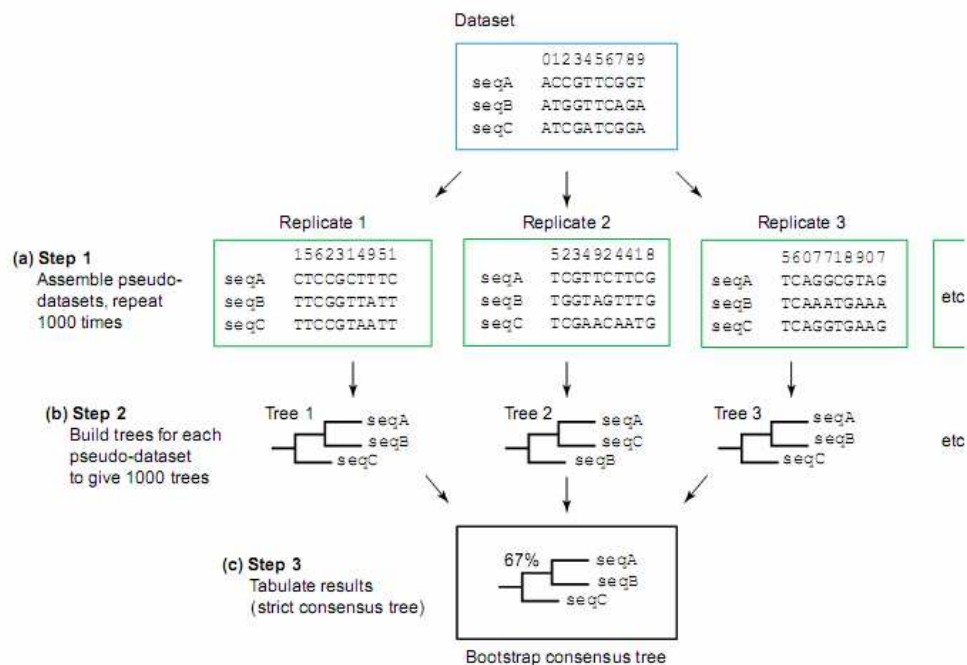
U dendrogramů platí více než jindy fakt, že dendrogram nemůže být nikdy lepší než data, na kterých je založen (zcela dle anglického „*rubbish in, rubbish out*“). Proto nestačí použít samotné, i když sebelepší, mnohočetné přiřazení bez předešlé úpravy. Při konstrukci stromu totiž předpokládáme, že se sekvence vyvíjely pouze prostřednictvím bodových mutací, jinými slovy, že každá pozice v každé sekvenci se vyvinula ze společného předka - sekvence bez jakýchkoli insercí nebo delecí. Z těchto důvodů je třeba prohlédnout přiřazení a ručně odstranit všechny pozice (sloupce), které buď nejsou přiřazené, nebo obsahují mezery, případně i místa podezřele přiřazená (samozřejmě s ohledem na to, aby zbyl dostatek pozic pro analýzu). Toto můžeme udělat ze dvou důvodů: a) nemůžeme vědět, zda jsou tato místa dobře přiřazená (pokud nejsou, tak by nám zanesla do analýzy chyby), b) i když je mezera vložena správně, tak ve výsledné analýze to může negativně ovlivnit výsledek, neboť čím větší mezera, tím větší vliv má na výsledek. To ale odporuje základnímu evolučnímu předpokladu, že mezera (jakkoli velká) je jedna evoluční událost ekvivalentní jedné bodové mutaci.

Pro samotnou tvorbu dendrogramu se používají dva druhy přístupů. Prvním jsou vzdálenostní, nebo také klastrovací, případně algoritmické metody. Ty se snaží pomocí nějakého algoritmu sestavit jediný co nejlepší strom. Sem patří například UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), ME (minimal evolution) a především NJ (neighbor-joining), což je nejčastěji používaná metoda. Ta v principu probíhá tak, že jsou spočítány vzdálenosti (podobnosti) všech dvojic sekvencí a na základě těchto vzdáleností se sestaví strom. Algoritmus NJ vychází z nerozlišeného hvězdčovitého stromu. Poté spojí dvě nejpodobnější větve (sekvence) a nahradí je společným hypotetickým předkem, což sníží počet větví o jedna. Takto se postupuje tak dlouho, až zůstane strom pouze s bifurkacemi (v každém uzlu se větví do dvou větví). Druhým typem jsou metody vyhledávací, kdy je sestrojeno velké množství potenciálních stromů a mezi nimi se hledá kandidát nejlépe odpovídající datům a evolučním předpokladům. Sem patří MP (maximum parsimony) a asi nejspolehlivější z metod ML (maximum likelihood). Metoda ML [94] prohledává všechny možné stromy a stanovuje u nich pravděpodobnost

s jakou strom odpovídá vstupním datům. Spolehlivost této metody je ovšem vykoupena její velkou výpočetní náročností.

2.5.1.4 Testování věrohodnosti dendrogramu

Určit, zda je strom vytvořený správně není možné, ale lze ověřit robustnost jednotlivých větví vůči změně vstupních dat. Nejběžnější metodou, která se dnes již standardně používá při konstrukci dendrogramů, je tzv. bootstrapping [95]. V zásadě tato metoda testuje, zda je výsledný strom podporován celou sadou dat, nebo je pouze jakýmsi vítězem mezi spoustou téměř ekvivalentních variant. Prakticky se to provádí tak, že ve výchozím mnohočetném přiřazení program náhodně promíchá sloupce (ty ale zůstanou zachovány, tedy přiřazení dané pozice se nemění) a to tak, že některé se mohou opakovat, některé chybět, ale celkový počet sloupců je stejný. Takovýchto přiřazení (vzorků) vytvoří velké množství, alespoň několik set, nejlépe 1000. Z každého vzorku sestrojí zvoleným algoritmem dendrogram a pro každé rozvětvení spočítá, v kolika procentech stromů dané větvení oddělovalo tytéž dvě skupiny sekvencí. Pro názornost je tento postup ukázán na Obr.12. Výsledky by však neměly být interpretovány jako pravděpodobnost správnosti dané větve, ale spíše jako odolnost větve vůči změně vstupních dat. Obvykle se však udává, že pokud je bootstrapová podpora dané větve větší než 70%, mělo by být toto větvení správné [96].



Obr.12: Schéma způsobu, jakým je testován dendrogram pomocí bootstrappingu a vypočítávána bootstrapová podpora [70].

3 Cíle práce

- ◆ Z půdních vzorků z lokality Hradčany kontaminovaných leteckým palivem izolovat celkovou DNA a tu přečistit pro použití v dalších experimentech.
- ◆ Amplifikovat fragmenty DNA kódující α podjednotku dioxygenas Rieskeho typu z rodiny toluen/bifenyl pomocí degenerovaných primerů.
- ◆ Pomocí restriční analýzy (RFLP) odhadnout diversitu a četnost různých genů pro RHDO ve vzorku.
- ◆ Optimalizovat způsob tvorby dendrogramů porovnáním různých přístupů k výpočtu evolučních vzdáleností.
- ◆ Sekvenováním jednotlivých klonů a pomocí dendrogramů sestrojených na základě těchto sekvencí určit diversitu studovaných genů.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Přístroje

autokláv MAC-235EX
automatické pipety
centrifuga 5408R
centrifuga stolní MIKRO 20
dynal magnet
fotoaparát Kodak EDAS290
hybridizér HB-1D
in-flow box
inkubátor
lednice
ledovač
mikrovlnná trouba
mrazicí box -20 °C
mrazicí box -80 °C
pH-metr Orion 290A
předvážky XL 410
souprava pro agarosovou elektroforesu:
 Horizon 58
 Owl B1 EasyCast Mini Gel
 Owl A5 Large Gel
spektrofotometr NanoDrop ND-1000
thermocykler Mastercycler
thermomixer
UV transiluminátor UVT-20M
vortex
zdroj deionizované vody Milli Q
zdroj pro elektroforesu Owl OSP-250L

Sanyo, USA
Eppendorf, Německo
Eppendorf, Německo
Hettich, Německo
Invitrogen, USA
Kodak
Techne, USA
Clean Air Techniek , Nizozemsko
Memmert, Německo
Liebherr, Německo
Zanussi
Daewoo, Korea
Liebherr, Německo
Sanyo, USA
Orion Research Inc., USA
Denver Instrument, USA

Life Technologies, USA
Thermo Scientific, USA
Thermo Scientific, USA
NanoDrop Technologies, USA
Eppendorf, Německo
Eppendorf, Německo
Herolab, Německo
IKA Labortechnik, Německo
Millipore, USA
Thermo Scientific, USA

4.1.2 Chemikálie

agar
agarosa
agarosa LMP
ampicilin
DNA marker pBR322/AluI
DMSO
dNTP mix
ethanol
ethidium bromid
glycerol
hydrogenfosforečnan sodný
hydroxid sodný
chlorid hořečnatý
chlorid sodný

Oxoid, UK
Lonza, USA
Promega, USA
Sigma-Aldrich, USA
Fermentas, Kanada
Sigma-Aldrich, USA
Fermentas, Kanada
Lachema, ČR
Sigma-Aldrich, USA
Serva, Německo
Lachema, ČR
Lachema, ČR
Promega, USA
Lachema, ČR

chlorid draselný	Lachema, ČR
IPTG	Fermentas, Kanada
isopropanol	Lachema, ČR
kvasničný extrakt	Oxoid, UK
orange G	Sigma-Aldrich, USA
PEG 6000	CalbioChem, USA
SDS	Scharlau, Španělsko
triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
trypton	Oxoid, UK
Tween	Sigma-Aldrich, USA
voda destilovaná bez nukleas	5 Prime, Německo
X-Gal	Serva, USA

4.1.3 Enzymy

β -agarasa I	New England BioLabs, USA
<i>Msp</i> I	Fermentas, Kanada
proteinasa K	Mecherey-Nagel, Německo
RNasa	Mecherey-Nagel, Německo
Taq polymerasa	Promega, USA

4.1.4 Roztoky a média

G4 pufr	0,3M GuHCl, 20% (v/v) Tween 20, pH 5,5
β -agarasový reakční pufr	10 mM Bis Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 6,5
LB agar	1,5% agar v LB médiu
LB médium	1% trypton; 0,5% kvasničný extrakt; 1% NaCl; pH 7 (upraveno pomocí NaOH)
N2 pufr	0,1 M Tris, 15% (v/v) ethanol, 6,7% KCl, 0,15% (v/v) Triton X-100, pH 6,3 (pomocí H ₃ PO ₄)
nanášecí barva pro elfo	0,5% Orange G, 1 mM EDTA, 70% glycerol
SOC médium	2 % trypton; 0,5 % kvasničný extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM glukosa
TAE pufr	40 mM Tris; 20 mM CH ₃ COOH; 1 mM EDTA
TE pufr	10 mM TrisCl, pH 7,5; 0,5 mM EDTA

4.1.5 Komerční sady

NucleoBond® AXG 100	Macherey-Nagel, Německo
Dynabeads® kilobaseBINDER™ Kit	Invitrogen, USA
klonovací sada pGEM-T	Promega, USA
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, USA

4.1.6 Bakteriální kmeny

kompetentní buňky *E.coli* DH5α

4.1.7 Vektory

pGEM-T

Promega, USA

4.1.8 Primery

4.1.8.1 BphA [67]

BphA F: 5' - GTT CCG TGT AAC TGG AAR TWY GC-3'

BphA R: 5' - CCA GTT CTC GCC RTC RTC YTG HTC-3'

Nomenklatura basí v degenerovaných primerech je znázorněna na Obr.13.

	T	C	A	G
R			•	•
Y	•	•		
M		•	•	
K	•			•
S		•		•
W	•		•	
H	•	•	•	
B	•	•		•
V		•	•	•
D	•		•	•
N	•	•	•	•

Obr.13: Nomenklatura smíšených basí podle IUPAC [97]. Převzato z [98].

Kromě těchto standardních primerů byly použity biotinylované BphA primery při izolaci DNA pomocí kitu Dynabeads® kilobaseBINDER™.

4.1.8.2 M13

M13 F: 5' - GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'

M13 R: 5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

Oba primery byly syntetizovány firmou Metabion z Německa.

4.1.9 Půdní vzorky

V této práci byly pro sledování diversity použity dva vzorky.

První vzorek byla půda z kontaminované lokality Hradčany. Ta byla analyzována podle postupu popsaného v metodické části. Veškeré výsledky získané analýzou této půdy jsou v této práci označeny jako HRB.

Druhým vzorkem byla DNA získaná z půdy z mesokosmu studovaného v naší laboratoři již dříve v rámci studia fytoremediace [99]. Mesokosmy byly vytvořeny

z kontejnerů obsahujících půdu získanou z kontaminovaných míst v lokalitě Hradčany. V této půdě byly pěstovány vrby (*Salix sp.*), které taktéž pocházely z kontaminované oblasti. Vzorek půdy, ze které pocházela mnou studovaná DNA byl odebrán z tohoto mesokosmu po šesti měsících trvání experimentu a v této práci je označen jako HRB-M.

4.2 Metody

4.2.1 Izolace celkové půdní DNA

Do sterilní 50 ml falkonky bylo naváženo 10 g půdy, do ní přidáno 27 ml 0,12 M Na₂HPO₄ o pH 8,0, 60 µl 10% Tween 20 a 3 ml 10% SDS. Falkonka byla třepána 30 min při 70 °C a 300 rpm na thermomixeru. Bylo do ní přidáno 6 µl RNasy A o koncentraci 100 mg/ml (výsledná konc. 20 µg/ml) a falkonka se inkubovala dalších 30 min při 37 °C a 300 rpm. Po inkubaci do ní bylo přidáno 150 µl proteinasy K o koncentraci 20 mg/ml (výsledná konc. 100 µg/ml) a falkonka byla třepána 30 min při 65 °C a 300 rpm. Následovala centrifugace 15 min při 10 °C a 8000 g. Do nové sterilní falkonky byl přelit supernatant a na ledu inkubován 1,5 hodiny. Poté následovala centrifugace po dobu 30 min při 4 °C a 15500 g. Supernatant byl opět přepipetován do nové falkonky. Přidán k němu byl 0,1 násobek objemu 5 M NaCl a 0,4 násobek objemu 50% PEG 6000 a poté následovala inkubace přes noc při 4 °C. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při 2 °C a 15500 g po dobu 30 min. Supernatant byl odstraněn a peleta opatrně resuspendována v 5 ml TE pufru o pH 8,0. Následovala 10-ti minutová inkubace bez třepání při 50 °C. Poté bylo do falkonky přidáno 1,5 ml G4 pufru a falkonka inkubována bez třepání 30 min při 50 °C. Po inkubaci byla centrifugována 10 min při 20 °C a 8000 g. Supernatant obsahující DNA byl odlit do nové zkumavky.

4.2.2 Purifikace DNA

Purifikace DNA po izolaci byla provedena pomocí komerčně dostupné sady NucleoBond® AXG 100 od firmy Macherey-Nagel. Je založena na principu iontové výměnné chromatografie. Skupinou odpovědnou za výměnu aniontů vázanou na pevnou fázi kolonky je methylaminoethanol (MAE). Na aminoskupinu MAE se váže fosfátový kyslík DNA za nízkého pH. Poté jsou vymyty kontaminanty a DNA je eluována pufrům o vysokém pH. Soli jsou z roztoku odstraněny alkoholovou precipitací DNA.

Kolonka byla ekvilibrována 2 ml pufru N2. Roztok DNA byl smíšen v poměru 1:1 s pufrům N2 a nanesen na kolonku. Po protečení roztoku, při kterém se DNA adsorbuje na kolonku, byla kolonka promyta 3 x 4 ml pufru N3. Postupně bylo kolonkou prolito 8 x 850 µl pufru N5 a každá frakce jímána zvlášť do 1,5 ml mikrozkušavky. Z každé frakce byla provedena agarosová elektroforéza v 0,7% gelu. Ke každé frakci byl přidán

0,7 násobek objemu (tedy cca 600 μ l) isopropanolu a vše bylo poté inkubováno přes noc při -20 °C. Precipitovaná DNA byla centrifugována 30 min při laboratorní teplotě a 8000 g. Supernatant byl odstraněn, peleta opláchnuta ethanolem a usušena při laboratorní teplotě. Peleta DNA byla poté rozpuštěna ve 30 μ l TE pufru a její koncentrace změřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

4.2.3 Izolace a přečištění templátové DNA pro PCR

K izolaci DNA byl použit Dynabeads® kilobaseBINDER™ Kit od firmy Invitrogen. Kit obsahuje především Dynabeads® M-280 Streptavidin, což je roztok obsahující uniformní, supramagnetické, polymerní mikrokuličky (o průměru 2,8 μ m), na jejichž hydrofobní povrch je kovalentně navázán streptavidin. Dále je pro izolaci potřeba biotinylovaná sonda (v této práci biotinylovaný primer BphA), která se inkubuje se suspenzí kuliček Dynabeads. Izolace pomocí tohoto kitu je založena na silné ($K_D = 10^{-15}$ M) a specifické interakci mezi biotinem a streptavidinem, kdy se sonda naváže na kuličky Dynabeads. Na takto připravené kuličky je možné prostřednictvím navázané sondy ze směsi DNA selektivně vázat molekuly DNA obsahující sekvenci komplementární k sekvenci sondy. Pomocí Dynal magnetu jsou poté kuličky přitáhnuty ke stěně mikrozkuřavky a supernatant obsahující vše kromě požadované DNA může být odstraněn.

Lahvička se suspenzí kuliček Dynabeads byla resuspendována na vortexu. 10 μ l roztoku kuliček byla přeneseno do 1,5 ml mikrozkuřavky a umístěno na 2 min do stojánku s magnetem. Z mikrozkuřavky ve stojánku byl poté supernatant opatrně odpipetován. Mikrozkuřavka byla z magnetu přemístěna a usazené kuličky Dynabeads opatrně resuspendovány ve 20 μ l Binding Solution (BS). Opět byla na dvě minuty mikrozkuřavka umístěna na magnet, odpipetován supernatant a mimo magnet přidáno 60 μ l BS a po 1,5 μ l biotinylovaných Forward a Reverse BphA primerů o koncentraci 150 pmol/ μ l a resuspendováno. Mikrozkuřavka byla poté inkubována v hybridizéru za stálého otáčení při laboratorní teplotě 3 hodiny. Mikrozkuřavka byla poté umístěna na 2 minuty na magnet a odstraněn supernatant. Kuličky byly opláchnuty (tzn. přidat, resuspendovat, na 2 min umístit na magnet, odsát supernatant a odstranit z magnetu) 3 x 40 μ l Washing Solution (WS), 1 x 40 μ l destilované vody a 1 x 20 μ l BS. Do takto připravené zkuřavky obsahující kuličky s navázanými BphA primery byl přidán roztok DNA a 20 μ l BS. Následovala inkubace v roleru při 58 °C přes noc. Druhý den byla

mikrozkumavka umístěna znovu na 2 min na magnet, odstraněn supernatant a kuličky Dynabeads opláchnuty (stejný postup jako dříve) 3 x 40 µl WS a 1 x 40 µl destilované vody. Supernatant byl odstraněn a takto připravené kuličky je možno buď použít do reakce nebo skladovat při 5 °C.

4.2.4 PCR amplifikace s BphA primery

PCR byla provedena se sadou degenerovaných primerů cílených na Rieskeho dioxygenasy toluen/bifenylové rodiny. Původně publikované primery [83] byly v práci R. Witziga et al. [67] upraveny tak, aby nasedaly právě na geny pro α podjednotku této rodiny enzymů. Sekvence těchto BphA primerů je uvedena v materiálech.

DNA navázaná na kuličky Dynabeads byla resuspendována ve 20 µl destilované vody. PCR reakce proběhla v následujícím složení a podle termálního profilu uvedeného v Tab.1.

Složení PCR směsi: 10 x koncentrovaný PCR pufr	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
BphA Fw primer (10 mM)	1,0 µl
BphA Rev primer (10 mM)	1,0 µl
DNA	1,5 µl
Taq polymerasa (5 U/µl)	0,13 µl
H ₂ O	do 25 µl

Tab.1: Termální profil pro PCR amplifikaci s BphA primery

Krok č.	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	95 °C	5 min	1
2	94 °C	45 s	32
	58 °C	45 s	
	72 °C	1 min	
3	72 °C	8 min	1
4	4 °C	-	1

Výsledek reakce byl ověřen elektroforesou v 1,5% agarosovém gelu s ethidium bromidem (výsledná koncentrace v gelu 0,5 µg/ml).

4.2.5 Preparace a precipitace DNA z LMP agarosového gelu

LMP agarosa (agarosa s nízkou teplotou tání, z angl. low-melting point) se používá k selekci PCR fragmentů o požadované délce. Po elektroforese lze z gelu vyříznout oblasti obsahující fragmenty o určité délce, poté gel rozpustit, rozštěpit a izolovat DNA, čímž ji

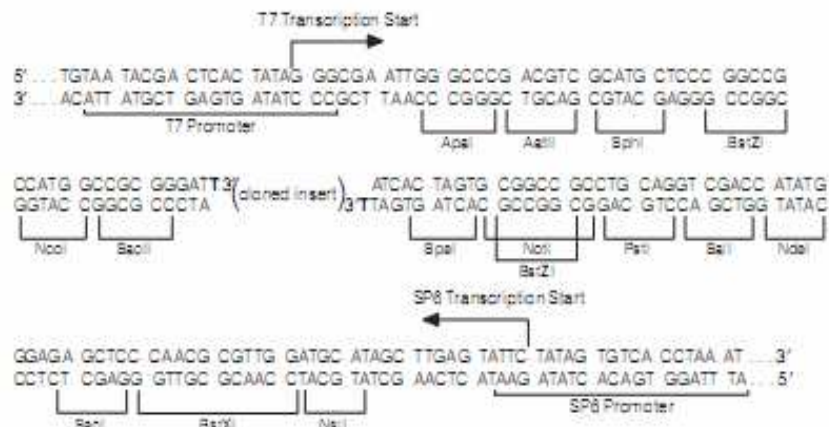
„přečistíme“ od různých nespecifických produktů PCR, od primerů atd. LMP agarosa se pro přečištění používá proto, že taje při relativně nízkých teplotách (méně než 65,5 °C) a DNA tedy při rozpouštění gelu nedegraduje.

Do jednotlivých drah 1,5% gelu z LMP agarosy s ethidium bromidem byl nanesen veškerý získaný PCR produkt. Elektroforesa probíhala při napětí pouze 50 V, protože DNA prochází LMP agarosovým gelem rychleji než běžným gelem. Oblasti gelu obsahující DNA o požadované velikosti byly vyříznuty pod UV lampou a opatrně přesunuty do předem zvážených mikrozkušavek a gel zvážen. Kousky gelu ve zkumavce byly omyty 2 x β -agarosovým pufrům (pokaždé 1,5 μ l pufru na 1 mg gelu) a pufr odpipetován dosucha. Mikrozkušavka s gelem byla inkubována 10 min při 70 °C a poté 10 min při 45 °C. K rozpuštěnému gelu byla přidána β -agarosa, množství podle vzorce 1 U na 300 mg 1% gelu a inkubována 1 h při 45 °C. Následná inaktivace enzymu probíhala při 70 °C po dobu 10 min. Následovala 10-ti minutová inkubace na ledu a centrifugace při 2000 g po dobu 5 min. Supernatant byl precipitován přes noc při -20 °C s přidávkem 1/10 objemu supernatantu octanu sodného (pH 7, 3M) a 2,5 násobku objemu 100% ethanolu.

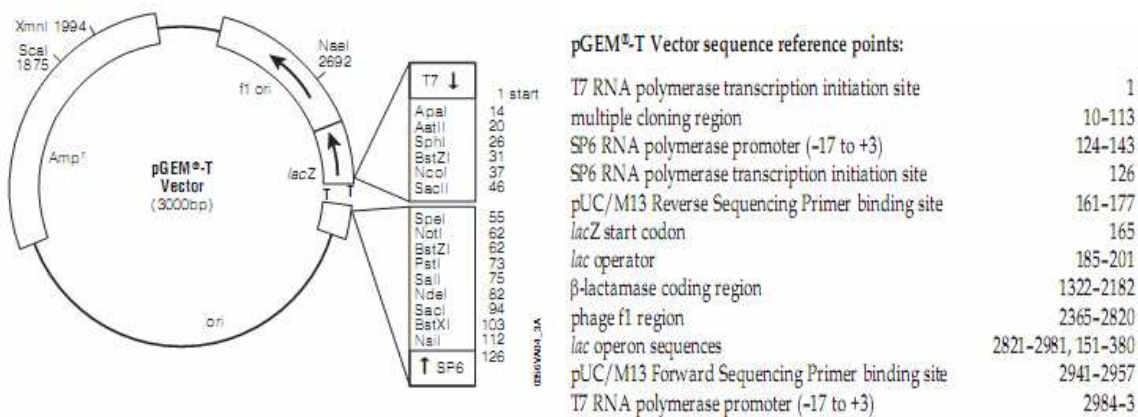
Precipitovaná DNA byla centrifugována po dobu 30 min při 13000 g. Získaná peleta byla 3 x opláchnuta 75% ethanolem, usušena při laboratorní teplotě a peleta resuspendována v 15 μ l TE pufru. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

4.2.6 Ligace DNA fragmentu do plasmidu pGEM-T

K ligaci PCR fragmentu do klonovacího vektoru byl použit kit od firmy Promega pGEM®-T Vector System. Plasmid (mapa na Obr.15, str.43) obsahuje v místě pro ligaci insertu 3'-terminální přesahující thymidylový nukleotid. To má dvě výhody: a) brání to plasmidu v uzavírání se do sebe bez insertu a b) zvyšuje efektivitu ligace spárováním s adenylovým zbytkem na konci insertu nespecificky vnášeným většinou termostabilních polymeras. Dále obsahuje gen pro rezistenci na ampicilin pro selekci úspěšně transformovaných klonů, gen pro β -galaktosidasu pro selekci klonů obsahujících plasmid s insertem, polyklonovací místo (Obr.14, str.43) a další místa nutná pro správnou funkci plasmidu. Také obsahují místa pro nasedání primerů M13.



Obr.14: Sekvence polyklonovacího místa ve vektoru pGEM®-T [100].



Obr.15: Mapa vektoru pGEM®-T [100].

Vlastní postup probíhal tak, že byla namíchána ligační směs v tomto složení:

DNA	cca 20 ng
2 x koncentrovaný ligační pufr	2,5 µl
plasmid (50 ng/µl)	0,5 µl
ligasa (3 U/µl)	0,5 µl
dest. voda	doplnit do 5 µl (pokud bylo DNA méně než 1,5 µl)

Ligační reakce probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě a poté přes noc při 4 °C.

4.2.7 Transformace kompetentních buněk

Transformace byla provedena metodou teplotního šoku, která spočívá v tom, že směs kompetentních buněk a vektoru, kterým mají být transformovány jsou inkubovány na ledu a následně na krátkou dobu vystaveny teplotě 42 °C. To způsobí větší fluiditu membrány bakterie a snazší průnik plasmidů do buněk. Úspěšnost této transformace byla poté ověřena výsevem na agarové plotny s ampicilinem. Přítomnost insertu v plasmidu byla zjištěna tzv. „blue-white selekcí“, kdy bílé kolonie značí přítomnost insertu v plasmidu. Bílá barva je způsobena tím, že je přerušen gen pro β -galaktosidasu a bakterie neštěpí X-Gal na modrou sloučeninu a zůstávají bílé.

Kompetentní buňky *E.coli* DH5 α byly rozmrazeny na ledu. Směs 50 μ l buněk a 2 μ l ligační směsi byla inkubována 20 min na ledu. Po inkubaci následoval teplotní šok při 42 °C po dobu 45 s a poté okamžité zchlazení na ledu po dobu 2 min. K buňkám bylo přidáno 950 μ l SOC média a experiment pokračoval inkubací 1,5 hodiny při 37 °C třepáním na thermomixeru při 300 rpm. Na misky s LB agarem s ampicilinem (výsledná koncentrace ampicilinu v LB je 100 μ g/ml) bylo rozetřeno 100 μ l 0,1 M IPTG a 20 μ l roztoku X-Gal (X-Gal rozpuštěný v DMSO o koncentraci 50 mg/ml). Po skončení inkubace buněk bylo na celkem 7 misek rozetřeno po 150 μ l buněčné kultury a misky inkubovány přes noc při 37 °C.

4.2.8 PCR s M13 primery z lyzovaných kolonií

Do připravených mikrozkušavek s 50 μ l destilované vody byly sterilními jednorázovými očkovacími kličkami přeneseny jednotlivé bílé kolonie z narostlých misek a bakterie v ní resuspendovány. Po 10 minutové inkubaci při 90 °C byly centrifugovány po dobu 15 min při 13000 g. 3 μ l supernatantu byly použity pro PCR reakci s tímto složením:

10 x koncentrovaný PCR pufr	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	5 μ l
dNTP (10 mM)	1 μ l
M13 Fw primer (10 mM)	1 μ l
M13 Rev primer (10 mM)	1 μ l
Taq polymerasa (5 U/ μ l)	0,25 μ l
supernatant z buněk	3 μ l
H ₂ O	do 50 μ l

PCR proběhla s teplotním profilem, který je uveden v Tab. 2 na následující straně.

Tab.2: Termální profil pro amplifikaci s M13 primery

Krok č.	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	95 °C	3 min	1
2	95 °C	1 min	9
	51 °C	30 s	
	72 °C	40 s	
3	95 °C	1 min	21
	49 °C	30 s	
	72 °C	40 s	
4	72 °C	4 min	1
5	4 °C	-	1

Výsledek reakce jsem ověřil elektroforesou v 1,5% agarosovém gelu.

4.2.9 Analýza amplifikovaných fragmentů pomocí RFLP

RFLP (z angl. restriction fragment length polymorphism) je přístup zkoumající geny na základě jejich sekvence bez její znalosti. Studované geny jsou naštípány pomocí vhodné restriční endonukleasy, případně směsi více endonukleas, a vzniklé směsi různě dlouhých fragmentů jsou elektroforeticky vizualizovány. Na základě profilů lze geny roztřídit do skupin, určit stejné geny, případně odhadovat diversitu v environmentálním vzorku. Pro štěpení je zásadní volba endonukleasy, neboť na ní závisí informační hodnota získaných profilů. V této práci byl použit enzym *MspI*, který se v naší laboratoři již dříve osvědčil při studiu genových rodin dioxigenas Rieskeho typu.

Pro štěpení DNA fragmentu restriční endonukleasou *MspI* byla namíchána reakční směs v tomto složení:

H ₂ O	5 μl
DNA	3 μl
10x pufr Tango	1 μl
<i>MspI</i> (10 U/μl)	1 μl

Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C a výsledná směs rozštěpených fragmentů byla analyzována elektroforeticky v 3% agarosovém gelu.

4.2.10 Přečištění produktu amplifikace s M13 primery

Přečištění bylo provedeno pomocí komerčně dostupné sady Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System od firmy Promega. Na kolonku vloženou do mikrozkušavky byl nanese veškerý PCR produkt smíchaný s Membrane Binding Solution z kitu v poměru 1:1

a nechán 1 min odstát. Následovala centrifugace po dobu 1 min při 13000 g. Na kolonku bylo nanášeno 700 μ l Membrane Washing Solution (MWS) a opět následovala minutová centrifugace. Obsah mikrokumavky byl odstraněn a kolonka do ní vložena zpět. Na ní bylo nanášeno 500 μ l MWS a následovala centrifugace 5 min při 13000 g. Poté, co byla kolonka nechána vyschnout, na ni bylo v nové mikrokumavce nanášeno 50 μ l 10 mM Tris pufru. Po centrifugaci při 13000 g, která trvala 1 minutu, byla spektrofotometricky změřena koncentrace DNA.

4.2.11 Sekvence

Přečištěné vzorky naředěné na koncentraci přibližně 50 ng/ μ l byly odeslány na sekvenaci do firmy Macrogen v Koreji. Tam proběhla sekvenace Sangerovou dideoxynukleotidovou metodou na automatickém sekvenátoru 3730xl s primery M13. Výsledky firma zasílá ve formě několika typů souborů (např. .ab1, .pdf, .txt a další). Tato data byla dále zpracována v programu Kodon (viz následující kapitola).

4.2.12 Konstrukce fylogenetických stromů

Konstrukce fylogenetických stromů ze sekvencí α podjednotek Rieskeho dioxygenas zahrnuje několik kroků, které budou popsány níže. Kromě samotných dvou sad environmentálních sekvencí jsem ve všech krocích (mnohočetné přiřazení, konstrukce a testování dendrogramu – viz níže) společně s nimi používal referenční sadu sekvencí. Tato sada, která je pro geny toluen/bifenylové dioxygenasové rodiny v naší laboratoři běžně používána, je získána z databází. Obsahuje sekvence genů kódujících tyto enzymy obsažené v genomu kultivovaných známých druhů bakterií. Principiálně je tato sada podobná té, podle které byly navrhovány primery pro amplifikace této genové rodiny [67]. Sekvence z této sady jsou začleněny do dendrogramu a podle nich se v něm lze orientovat a studovat příbuzenské vztahy. Všechny tyto referenční klony jsou shrnuty v tabulce v příloze.

4.2.12.1 Úprava sekvenčních dat

K primární úpravě sekvencí byl použit program Kodon od firmy Applied Maths. Soubory s koncovkou .ab1 obsahující sekvenční informaci byly načteny do Kodonu a ze sekvence byly odstraněny zbytky sekvencí pocházejících z plasmidu pGEM-T, které tam zbyly po amplifikaci s M13 primery. Pomocí programu BLAST a databáze GenBank byly sekvence otočeny tak, aby byly všechny zapsány ve stejném směru. Ze sekvencí byl následně vytvořen textový soubor ve FASTA formátu vhodný jako vstupní data pro

programy vytvářející mnohočetné přiřazení. Všechny zde popsané postupy lze aplikovat i na sekvence aminokyselinové (s použitím jednopísmenných zkratek).

4.2.12.2 Mnohočetné přiřazení

Ke konstrukci mnohočetného přiřazení byl v této práci použit softwarový balíček s grafickým rozhraním pro Windows ClustalX [101, 102] s originálním nastavením parametrů. Kvůli srovnání byl použit také algoritmus MUSCLE [92] diskutovaný v teoretické části, rovněž s originálním nastavením. Výsledné přiřazení bylo nakonec upraveno v programu GeneDoc [103] tak, že byly odstraněny všechny pozice (sloupce v přiřazení), ve kterých se vyskytovaly mezery.

4.2.12.3 Tvorba dendrogramu

Ke konstrukci dendrogramů byl v této práci používán program MEGA [104, 105]. Upravené mnohočetné přiřazení již slouží jako vstupní data pro tento program. Pouze je třeba převést výstupní formát Clustalu .aln na vstupní formát pro konstrukci dendrogramů .meg, což bylo také provedeno v programu MEGA.

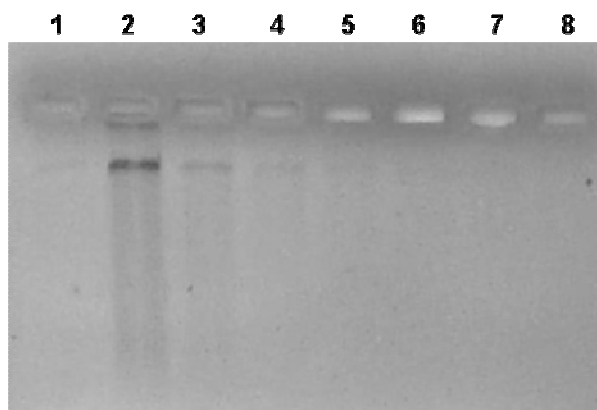
4.2.12.4 Testování věrohodnosti dendrogramu

Pro testování kvality fylogenetických stromů byla použita bootstrapová analýza. Ta je též součástí programu MEGA. Analýza byla provedena s 1000 bootstrapovými vzorky při použití algoritmu neighbor-joining a 500 vzorky v případě algoritmu maximum likelihood. Menší množství u metody ML bylo zvoleno kvůli velké výpočetní náročnosti této metody.

5 Výsledky

5.1 Izolace a purifikace celkové půdní DNA

Z půdního vzorku HRB byla izolována DNA postupem popsaným v metodické části. Izolovaná DNA byla kolonkami přečištěna a jednotlivé frakce analyzovány elektroforeticky (Obr.16).



Obr.16: Elektroforetická analýza (v 0,7% agarosovém gelu) jednotlivých frakcí roztoku DNA při její izolaci z půdy. V osmi drahách je 8 jímáných frakcí po průchodu kolonkou AXG-100. Vzorky byly smíchány s nanášecím barvivem (orange G s EDTA v 70% glycerolu) a poté separovány.

Jak je vidět z fotografie gelu, pouze ve frakcích 2, 3 a 4 bylo dostatečné množství DNA pro další analýzu. V těchto frakcích byla změřena koncentrace a čistota DNA (Tab.3).

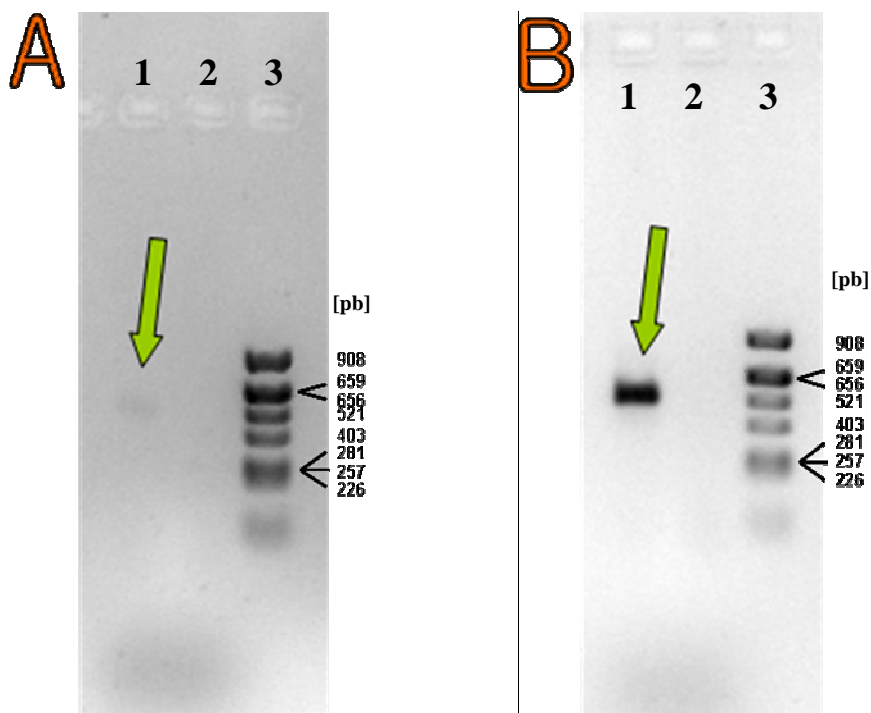
Tab.3: Koncentrace a poměr A_{260}/A_{280} u vybraných frakcí DNA. Koncentrace byla měřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

frakce	konc. DNA [ng/μl]	A_{260}/A_{280}
2	31,5	1,72
3	22,7	1,57
4	6,9	1,41

5.2 Izolace templátové DNA a PCR amplifikace s BphA primery

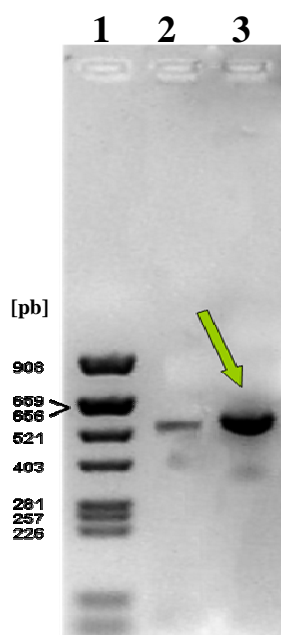
Na kuličky Dynabeads® M-280 Streptavidin byly podle postupu popsaného v metodické části navázány biotinylované primery BphA. Na samotnou izolaci bylo použito přibližně 250 ng DNA z frakce 2. Jako templát pro následnou PCR amplifikaci

byly nejprve použity 2 μ l Dynabeads resuspendovaných v konečném objemu 20 μ l sterilní vody. Výsledek PCR je na Obr.17-A, na kterém lze vidět, že amplifikace sice proběhla, ale velmi málo. Pro další PCR byly tedy použity 4 μ l kuliček, ale tentokrát resuspendovaných pouze v 10 μ l, tedy koncentrace templátové DNA byla 4x vyšší. Výsledek je na Obr.17-B, kde je již na elektroforeogramu vidět zřetelný pás o požadované velikosti, která je 535 párů basí.



Obr.17: PCR amplifikace s *BphA* primery. A) jako templát použity 2 μ l kuliček Dynabeads s navázanou DNA resuspendovaných ve 20 μ l vody, B) templát byly 4 μ l kuliček Dynabeads resuspendovaných v 10 μ l vody. Fragment o požadované velikosti (535 párů basí) je označen šipkou. Amplifikace byla analyzována elektroforeticky v 1,5% agarosovém gelu s ethidium bromidem. Jako DNA marker (třetí dráha) byla v obou případech použita DNA pBR322/AluI.

Elektroforeogram amplifikace téhož genu ze vzorku HRB-M je na Obr.18.



Obr.18: Analýza PCR s *BphA* primery ze vzorku HRB-M. Fragment o požadované velikosti (535 párů basí) je označen šipkou. Na obrázku je elektroforetická separace v 1,5% agarosovém gelu s pBR322DNA/*AluI* ve třetí dráze jako marker.

5.3 Preparace z LMP agarosy

Veškerý produkt předchozích amplifikací byl nanesen na LMP agarosový gel. Po separaci byly na UV transiluminátoru vyříznuty oblasti s PCR fragmentem – v případě vzorku HRB to bylo cca 170 mg gelu, u vzorku HRB-M cca 340 mg. Po izolacích byla změřena koncentrace získané DNA (Tab.4).

Tab.4: Koncentrace a poměr A_{260}/A_{280} u DNA izolované z LMP agarosového gelu.

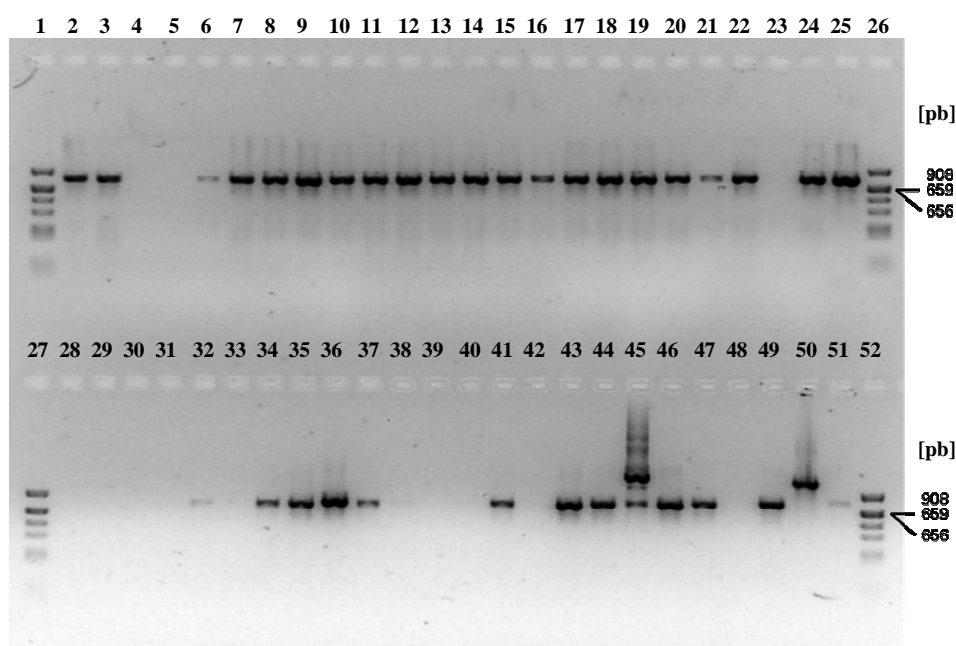
vzorek	konc. DNA [ng/ μ l]	A_{260}/A_{280}
HRB	79,6	1,65
HRB-M	14,3	1,54

5.4 Klonování a transformace

Ligace do plasmidového vektoru pGEM-T proběhla podle popsaného postupu (viz kapitola 4.2.6) a poté byla provedena transformace kompetentních buněk tímto konstruktem. Pro další analýzy bylo v případě vzorku HRB vybráno celkem 120 bílých narostlých kolonií a u vzorku HRB-M jich bylo možné odebrat 94.

5.5 PCR s M13 primery z lyzovaných kolonií

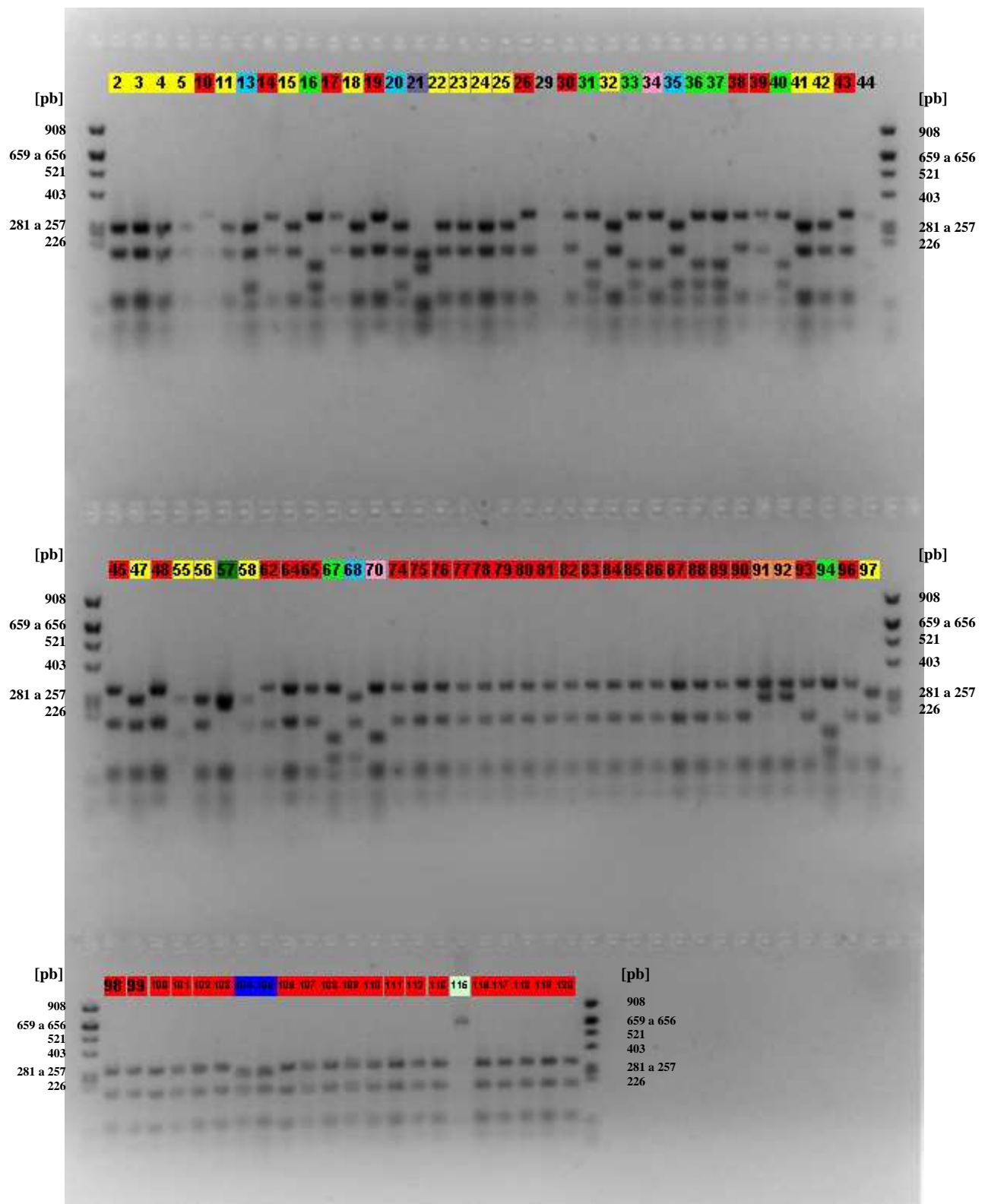
Tato PCR využívá primery M13 komplementární k sekvencím přítomným na vektoru pGEM-T a s jejich pomocí bylo ověřeno, zda má insert v plasmidu správnou velikost. Toto je finální kontrola insertu a zároveň bylo tímto způsobem amplifikován zkoumaný DNA fragment pro sekvenaci (případně pro restrikční analýzu). Gel na Obr.19 je zde jako ukázka této amplifikace, neboť na prezentování všech gelů (celkem přes 200 drah) zde není místo a ani to není nezbytné. U vzorku HRB bylo ze 120 zkoumaných klonů 94 pozitivních a u vzorku HRB-M bylo detekováno 93 pozitivních klonů z celkem odebraných 94.



Obr.19: Elektroforesa v 1,5% agarosovém gelu. Výsledek PCR amplifikace s M13 primery – první sada ze vzorku HRB. Větší velikost fragmentů - přibližně kolem osmi set oproti obvyklým 535 pb při amplifikaci s BphA primery - je způsobena přesahy z vektoru pGEM-T (viz mapa plasmidu Obr.14 a 15, str.43). Jako marker byla použita DNA pBR322/AluI - dráhy 1, 26, 27 a 52.

5.6 RFLP

Všechny pozitivní klony ze vzorku HRB byly podrobeny restrikční analýze (RFLP) s restrikční endonukleasou *MspI*. Restrikční profily jsou patrné na fotografii gelu (Obr.20, str.52), kde v jednotlivých drahách jsou bakteriální klony. Jak je z obrázku patrné, celkem bylo identifikováno 10 různých restrikčních profilů, ovšem se značně rozdílnou četností. Četnosti jednotlivých profilů jsou uvedeny v Tab.5, str.53.



Obr.20: Profily po štěpení restriční endonukleasou *MspI* vzorků HRB. Štěpeny byly všechny PCR fragmenty se správnou délkou po amplifikaci s M13 primery. Barevně jsou odlišeny jednotlivé restriční profily, viz text a Tab.6. Jako marker molekulové velikosti (vždy v krajních drahách) byla použita DNA pBR322/*AluI*.

Tab.5: Četnosti jednotlivých restričních profilů. Klony 29 a 44 nejsou zahrnuty, neboť u nich žádný profil nebyl viditelný. Barevně jsou rozlišeny podle Obr.20 na předchozí straně.

Profil č.	četnost [%]	Profil č.	četnost [%]
1	20,6	6	2,2
2	56,5	7	1,1
3	1,1	8	2,2
4	8,7	9	2,2
5	4,3	10	1,1

Takto zjištěná diversita neodpovídala diversitě stanovené na základě fylogenetického stromu. Proto u druhé sady nebyla RFLP analýza provedena a vzorky byly rovnou odeslány na sekvenaci.

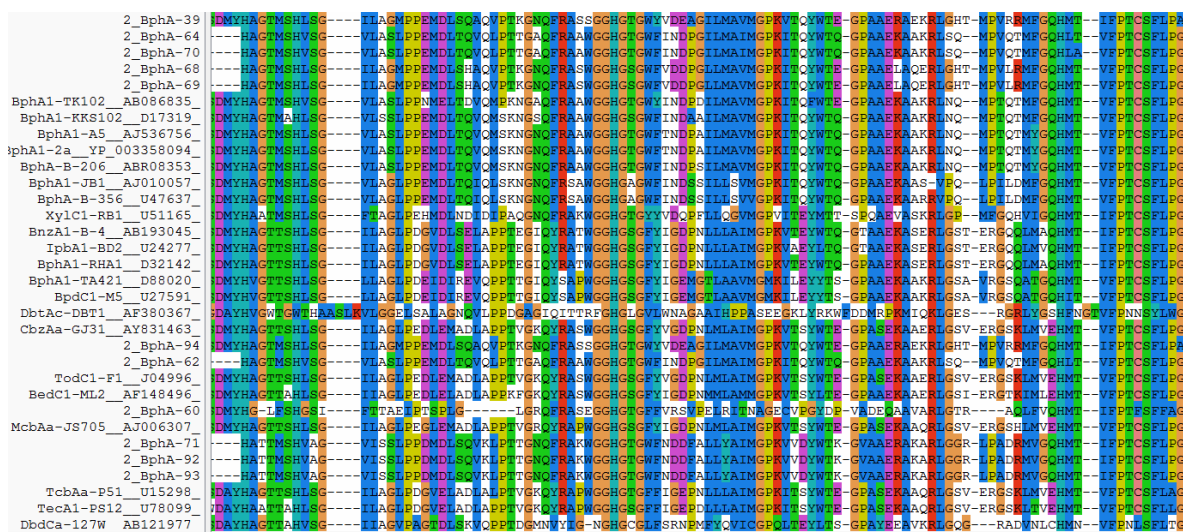
5.7 Sekvence

Všechny vzorky byly před odesláním na sekvenaci přečištěny kolonkami Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System firmy Promega podle postupu popsaného v metodice (kap. 4.2.10). Sekvence proběhla na automatickém sekvenátoru 3730xl v korejské pobočce firmy Macrogen. Sekvenováno bylo nejprve deset PCR produktů ze vzorku HRB vybraných tak, aby byl zastoupen každý restriční profil (Tab.5 a Obr.20 na straně 52). Poté, co bylo zjištěno, že profily nenesou dostatečnou informaci o rozdílnosti sekvencí, bylo na sekvenaci odesláno zbylých 80 PCR produktů, takže ve výsledku bylo sekvenováno 90 klonů (všechny kromě klonů 29, 44, 55 a 58). Ze vzorku HRB-M bylo sekvenováno všech 93 klonů. Některé sekvenované klony byly pravděpodobně nekvalitní nebo znečištěné nebo jinak poškozené a nebylo možné z nich získat dostatečně kvalitní sekvenci. Výsledný počet sekvencí použitelných pro fylogenetickou analýzu byl tedy 86 u půdy HRB a 87 u vzorku HRB-M.

5.8 Fylogenetická analýza

Mnohočetné přiřazení sekvencí bylo provedeno pomocí programu ClustalX. Ukázka části takového přiřazení je na Obr.21 na následující straně. Jsou na něm dobře patrné mezery, které program vkládá mezi jednotlivé base z důvodu optimalizace přiřazení a které je třeba před další analýzou odstranit. Pro konstrukci přiřazení byl rovněž vyzkoušen algoritmus MUSCLE, zmíněný v teoretické části. Pro tuto sadu sekvencí poskytoval velmi podobné výsledky, neboť jeho hlavní výhoda je, jak již bylo řečeno, u

sad divergentních sekvencí. Proto byla data zpracována pomocí nejrozšířenějšího algoritmu Clustal.



Obr.21: Část mnohočetného přiřazení aminokyselinových sekvencí v programu ClustalX.

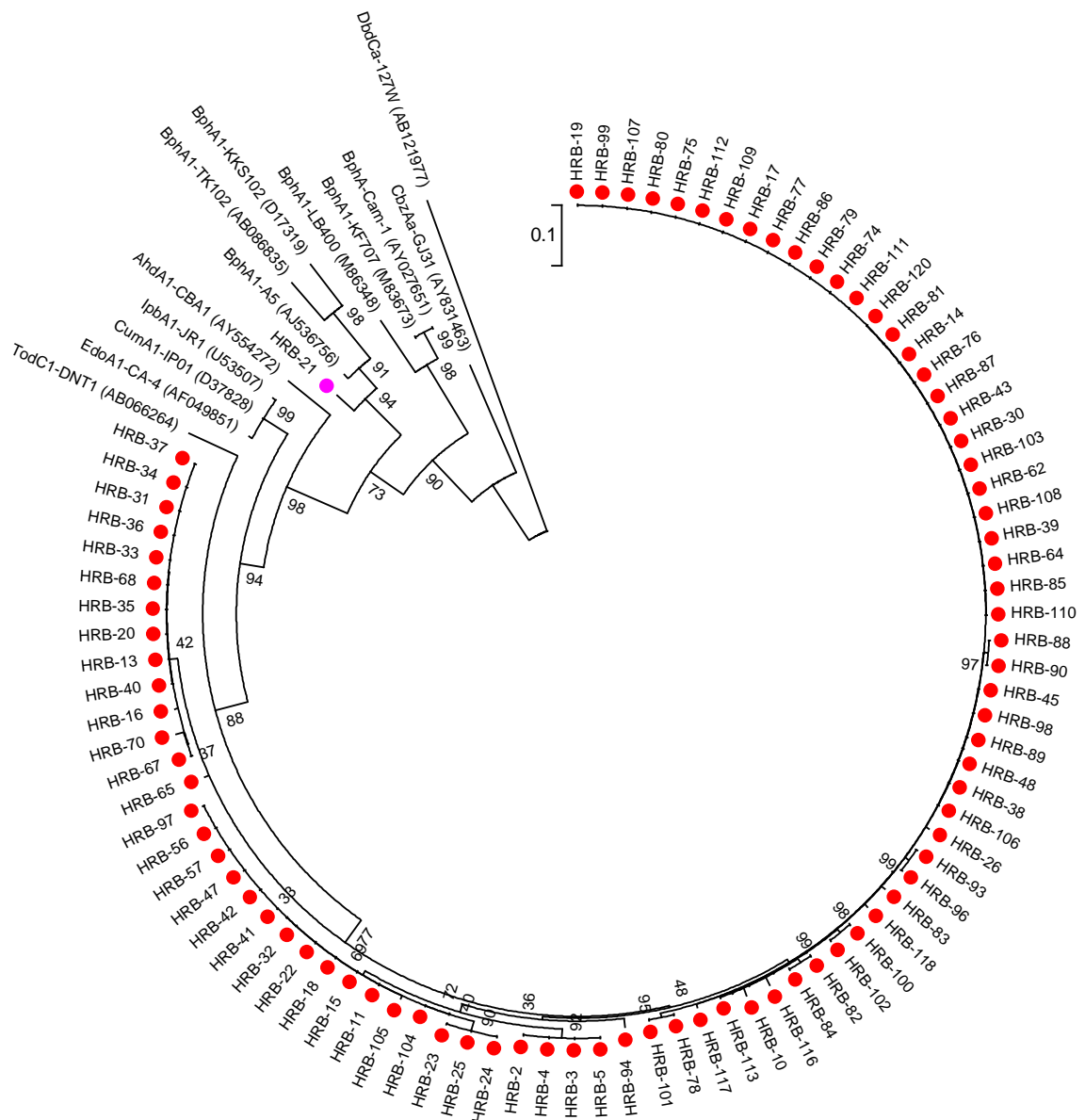
Na tomto obrázku je vidět úsek přiřazení některých sekvencí ze vzorku HRB-M spolu s referenčními sekvencemi.

Dříve, než bylo přistoupeno k samotnému vyhodnocování dendrogramů a určování diversity v půdě, byl optimalizován postup tvorby dendrogramů srovnáním různých přístupů. Tyto různé přístupy byly již zmíněny v metodické části a zde je souhrn provedených srovnání:

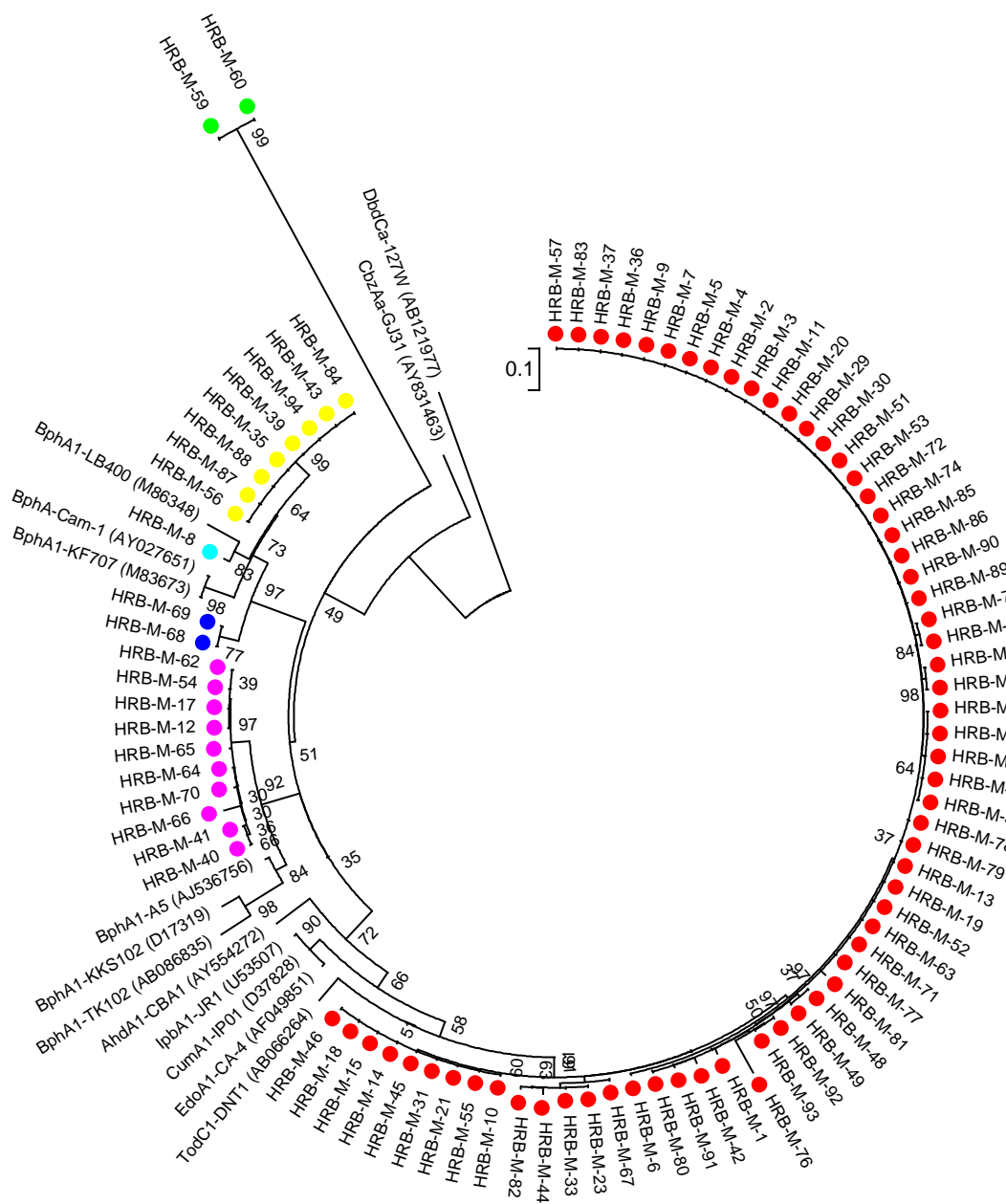
- srovnání dendrogramů vytvořených na základě aminokyselinových a nukleotidových sekvencí
- srovnání dendrogramů spočítaných metodou neighbor-joining s metodou maximum likelihood

Výsledek porovnání, které je pro vybrané dvojice dendrogramů uvedeno v přílohách, je takový, že jako nejlepší a nejméně náchylný k artefaktům se jeví způsob tvoření stromů z aminokyselinových sekvencí metodou maximum likelihood. Tento způsob byl použit pro finální analýzu environmentálních vzorků, pouze s tím rozdílem, že u dendrogramů určených k porovnávání byla používána celá sada referenčních sekvencí (je uvedena v příloze), kdežto u výsledných stromů byly pro přehlednost ponechány pouze příbuzné sekvence.

Z dendrogramu vytvořeného ze vzorku HRB (Obr.22) je patrné, že prakticky veškeré sekvence patří do jedné skupiny, jejímž nejbližším známým příbuzným genem je gen kódující toluen dioxygenasu TodC1-DNT1 z denitrifikující bakterie *Thauera* sp. DNT-1 [BAC05504]. Pouze jedna sekvence (č. 21, označena fialovou tečkou) nepatří do této skupiny, ale má největší podobnost k bifenylyl 2,3-dioxygenase z *Cupriavidus oxalaticus* [CAD61140] BphA1-A5. Tyto příbuzné kmeny byly nalezeny pomocí programu BLAST v databázi GenBank.



Obr.22: Dendrogram sestavený na základě aminokyselinových sekvencí ze vzorku HRB. Evoluční příbuznost byla odvozena metodou maximum likelihood. Strom byl testován pomocí bootstrapového testu s 500 vzorky. Délky větví odpovídají míře evoluce.



Obr.23: Dendrogram sestavený na základě aminokyselinových sekvencí ze vzorku HRB-M. Evoluční příbuznost byla odvozena metodou maximum likelihood. Strom byl testován pomocí bootstrapového testu s 500 vzorky. Délky větví odpovídají míře evoluce.

Dendrogram sestavený ze sekvenčních dat ze vzorku HRB-M (Obr.23) ukazuje, že v tomto vzorku je bakteriální diversity o poznání větší. Existuje zde pět více či méně početných skupin, jimž opět dominuje skupina příbuzná TodC1-DNT1 (klony označeny červenými tečkami). Druhou největší skupinou (10 izolovaných klonů) jsou opět klony příbuzné BphA1-A5 (klony označeny fialovými tečkami). Dále se zde objevila skupina

obsahující 9 sekvencí, která pravděpodobně náleží ke genu kódujícímu bifenyldioxygenasu BphA1-LB400 z *Burkholderia xenovorans* (klony označené žlutými tečkami). Přestože jsou evolučně vzdálenější, tak mezi ně patří i světle modrou tečkou označený klon HRB-M-8 a modrými tečkami označené klony příbuzné genům pro bifenyldioxygenasu BphA-Cam-1 z *Pseudomonas* sp. kmene Cam-1. Nakonec se zde vyskytuje divergentní dvoučlenná skupinka nejbližší příbuzná genu kódujícímu chlorbenzen dioxygenasu CbzAa-GJ31 z *Pseudomonas putida* (klony označené zelenými tečkami).

6 Diskuse

Lokalita bývalé letecké základny Hradčany je jedním z nejvíce kontaminovaných míst v ČR. Hlavními polutanty zde jsou látky BTEX a dále také PAU a PCB. Posledních 13 let zde probíhají komplexní *in situ* remediaci zahrnující především bakteriální bioremediaci s podporou air spargingu. Tato sanace je svým rozsahem největší v České republice. Z těchto důvodů je tato lokalita z vědeckého hlediska velmi cenná jak pro základní, tak pro aplikovaný výzkum. Tato práce je zaměřena na monitoring diversity bakterií, resp. genů pro degradaci aromatických látek - Rieskeho dioxygenas hydroxylojící aromatický kruh z rodiny toluen/bifenylových dioxygenas.

Použití magnetických mikrokuliček je zajímavý a velmi výhodný postup při práci s půdní DNA. Vzhledem k tomu, že celková DNA izolovaná z půdních vzorků obsahuje genetickou informaci jak ze zbytků rostlin, tak z hub a bakterií a také bývá velmi znečištěná například huminovými kyselinami, které mohou zapříčinit inhibici polymerasy v PCR nebo inhibovat ligační reakci, je využití kuliček DynaBeads vhodnou volbou. Kromě již uvedeného lze tímto postupem zvýšit procentuální množství kopií analyzovaného genu, což značně usnadňuje následnou amplifikaci. U té je jediným problémem optimalizace množství DNA vstupující do PCR, neboť nelze spektrofotometricky měřit koncentraci DNA navázané na polymerních kuličkách.

Co se samotné analýzy týče, u první sady (HRB) byla provedena restriční analýza amplifikovaných DNA fragmentů. Z výsledku bylo možno odhadovat (na základě Obr.20 a Tab.5 na stranách 52 a 53), že zde bude velká převaha klonu odpovídajícího profilu č. 2 a dále č. 1, které se již podle výsledku viditelného na agarosovém gelu zdály podobné. Dále byla očekávána určitá, přestože méně početná diversita odpovídající ostatním profilům. Ta se ovšem nepotvrdila, neboť v dendrogramu (Obr.22, str. 55) jsou všechny sekvence až na jedinou (číslo 21) sdruženy do jedné skupiny příbuzných klonů, které se od sebe liší velmi málo. Jinak řečeno, existují zde drobné rozdíly v sekvencích, které měly za následek to, že restriční endonukleasa *MspI* štěpila DNA na rozdílných místech a výsledné profily byly tedy odlišné. Přesto však jsou tyto rozdíly evolučně natolik malé nebo nevýznamné, že to nemá vliv na fylogenetickou příslušnost genu. Je to dáno tím, že již mutace v jediném nukleotidu z palindromové sekvence rozeznávané enzymem *MspI* má za následek odlišný profil.

Nabízela by se možnost pokusit se vytvořit dendrogram na základě restričních profilů, abychom při analýzách dalších vzorků nemuseli sekvenovat takto velké množství klonů. To ovšem předpokládá dostatečnou délku sekvence a také aby vhodná endonukleasa štěpila tyto sekvence na vyhovující množství vzájemně odlišitelných fragmentů. Což se zpětně ukázalo být obtížné, neboť *MspI*, přestože je to asi nejvhodnější enzym pro tuto rodinu genů, štěpí zkoumanou sadu sekvencí na fragmenty, které jsou si velikostně velmi podobné. To je problém, neboť i při optimalizovaných elektroforetických podmínkách ve vysokorozlišovacím gelu nelze odlišit fragmenty velikostně odlišné o méně než 5 párů basí [106]. Toto se částečně projevilo i u provedeného štěpení. Virtuálním „*in-silico*“ štěpením sady sekvencí tímto enzymem byl na základě znalosti sekvence (pomocí genetického softwaru) určen počet štěpících míst pro daný enzym a velikosti úseků, na které tato místa PCR fragment rozdělují. Takto bylo zjištěno, že ve skutečnosti existuje mnohem více fragmentů vytvořených při štěpení, než kolik jich bylo detekováno při RFLP analýze. V praxi jsou však tyto fragmenty buď mezi jednotlivými sekvencemi nerozlišitelné nebo v rámci jedné sekvence splývají. K tomu přispívá i relativně krátká sekvence amplifikovaného genu, neboť s rostoucí délkou sekvence roste rozlišovací schopnost této metody a také se zvyšuje vypovídací hodnota (z hlediska evoluční příbuznosti) jednotlivých profilů.

Z důvodů uvedených výše nebyla u sekvencí z druhého vzorku (HRB-M) tato analýza provedena a k sekvenaci byly odeslány všechny sekvence.

Před samotnou tvorbou a vyhodnocením výsledných dendrogramů byly testovány různé přístupy při tvorbě fylogentických stromů jak je popsáno ve výsledkové části. Srovnání různých způsobů tvorby stromů jsou v příloze.

Co se týče srovnání jednotlivých metod konstrukce dendrogramů, nejprve bylo třeba zjistit, zda je vhodnější provádět analýzu z nukleotidových nebo z přeložených aminokyselinových sekvencí. Na první pohled by se zdálo, že nukleotidové sekvence jsou vhodnější z toho důvodu, že nesou daleko více informací, neboť u nich lze pozorovat různé bodové mutace tj. evoluční změny, které se po přeložení do proteinové sekvence kvůli degenerovanému genetickému kódu ztratí. Na druhou stranu vzhledem k tomu, že se jedná o analýzu genů kódujících funkční proteiny, mohou tyto mutace do výsledku fylogenetické analýzy zanášet zavádějící evoluční události, neboť těchto mutací může být mnoho a přesto nemusí mít významnější vliv na kódovaný protein. Toto se nakonec ukázalo jako zásadní, neboť v dendrogramech sestrojených z aminokyselinových sekvencí se nevyskytovaly

nesmyslné evoluční vztahy a tedy byly kvalitnější. Jako příklad srovnání těchto dvou přístupů dobře poslouží stromy sestrojené ze sekvencí ze vzorku HRB-M spočítané pomocí algoritmu maximum likelihood. V příloze 1 je dendrogram sestrojený z nukleotidových sekvencí a příloha 2 ukazuje aminokyselinový dendrogram. Klony označené červeně patří k majoritní skupině genů zmíněné ve výsledkové části. Právě na této části je vidět, že u prvního dendrogramu byl referenční klon XylC1-RB1 zařazen mezi tyto červené klony, přičemž pouze gen pro toluen dioxygenasu TodC1-DNT1 (*Thauera* sp.) tam opravdu patří (určeno pomocí programu BLAST a databáze GenBank). Kromě toho díky bodovým mutacím, které se nepromítly do aminokyselinové sekvence, byla pro tento klon a pro klon BphA1-BP3 stanovena příliš velká evoluční vzdálenost od ostatních klonů. Druhý dendrogram sestrojený z aminokyselinových sekvencí již tyto chyby neobsahuje.

Druhým rozhodnutím bylo určit, který algoritmus je vhodnější, zda neighbor-joining nebo maximum likelihood. Toto srovnání je vhodné vzhledem k tomu, že každá metoda využívá jiný přístup k výpočtům. Zde lze již na základě znalosti těchto přístupů odhadovat, že algoritmus ML by měl poskytovat stejné nebo lepší výsledky než NJ. Tyto odhady se většinou vyplnily i když vzhledem k relativně malé divergenci sekvencí nebyly mezi výsledky obou metod rozdíly nijak zásadní. Rozdíly se obvykle objevují u vzdálenějších sekvencí, kdy je metoda NJ náchylnější k vytváření tzv. artefaktů vzájemného přitahování dlouhých větví (long branch attraction). I přes velkou míru příbuznosti sad zkoumaných sekvencí se tento efekt projevil u vzorku HRB-M. Dendrogramy vytvořené z nukleotidových sekvencí jak NJ, tak ML metodou jsou v přílohách 3 a 4. Přitahování dlouhých větví je zjevné u NJ dendrogramu, kde jsou seskupeny 4 divergentní sekvence (HRB-M-59/60, DbdCa-127W, XylC1-RB1, BphA1 BP3), zatímco u ML dendrogramu jsou stejné sekvence na různých místech stromu a lépe tak odpovídají skutečné příslušnosti genů do různých podrodin.

Po tomto testování různých přístupů k tvorbě dendrogramu již mohly být vytvořeny finální fylogenetické stromy z obou půdních vzorků za použití aminokyselinových sekvencí metodou ML. Výstupy této analýzy jsou znázorněny na Obr.22 a 23 na stranách 55 a 56. Na obou lze pozorovat velkou dominantní skupinu genů patřící do podrodiny toluen dioxygenas, jejichž nejbližším příbuzným genem je TodC1-DNT1 z *Thauera* sp. Dále se již stromy liší, neboť ve vzorku HRB prakticky žádné další geny z rodiny toluen/bifenyl dioxygenas nejsou, na rozdíl od vzorku HRB-M, kde se vyskytuje dalších několik skupin genů. V dendrogramu na obrázku 23 můžeme rozlišit skupinu (označenou

fialovými tečkami) evolučně příbuznou se známými degradátory jako *Pseudomonas* sp. KKS102, *Comamonas testosteroni* TK102 (oba degradují PCB) a *Cupriavidus oxalaticus* A5 (degraduje 4-chlorbifenyl). Dále skupinu označenou žlutými tečkami, do které patří i evolučně vzdálenější klony označené modrými tečkami, příbuznou s dobře prozkoumanou bakterií *Burkholderia xenovorans* LB400 a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. Tedy z celkových 87 klonů je 21 (24,1%) evolučně blízkých k RHDO z PCB degradujících bakterií a patří do podrodiny bifenyl dioxygenas. Zbývající dominantní skupinou (75,9%) jsou již zmíněné dioxygenasy hydroxyylující monoaromatické substráty. V této skupině se kromě velmi homogenní skupiny sekvencí blízkých TodC1-DNT1 vyskytují pouze 2 divergentní klony vzdáleně příbuzné s *Pseudomonas putida* GJ31 degradující chlorbenzen.

Sekvence HRB byly získány amplifikací DNA pocházející přímo z kontaminované půdy z lokality Hradčany, zatímco sekvence HRB-M pocházejí ze stejné půdy, avšak takové, která byla použita při mesokosmových studiích. Jejich součástí byl i půl roku trvající bioremediační experiment s podporou fytoremediace. Jak je patrné ze srovnání obou stromů, toto půlroční vystavení půdy odlišným podmínkám mělo zásadní vliv na diversitu genů pro toluen/bifenylové dioxygenasy, resp. bakterií tyto geny obsahujících. Ve vzorku HRB je diversita pravděpodobně nejvíce ovlivněna (omezena) tím, že vzorek pochází z relativně velké hloubky (5,3 metrů), kde již bývá koncentrace kyslíku daleko menší a podmínky jsou celkově odlišné. V takovém prostředí rostou a množí se především bakteriální druhy, které jsou adaptabilní a nenáročné (což neznamená, že se zde jiné druhy nevyskytují, pouze jsou méně hojné). Oproti tomu v mesokosmu s podporou fytoremediace (vzorek HRB-M) jsou podmínky daleko příznivější, a to především díky kořenovým systémům rostlin, které bakteriím poskytují živiny a potřebné látky podporující růst. Tím usnadňují růst a adaptaci mikroorganismů na podmínky v kontaminované půdě a pozitivně ovlivňují jejich diversitu. Dále tato půlroční podpora půdního ekosystému kořenovými systémy vedla k výskytu odlišných degradačních genů, konkrétně genů pro bifenyl dioxygenasy, které se v této půdě dříve nevyskytovaly. To je významný jev především vzhledem ke kontaminovaným lokalitám, kde by vysazení nových rostlin prostřednictvím jejich kořenových systémů nejenom podpořilo přítomné bakteriální populace, ale také zvýšilo degradační potenciál v těchto lokalitách.

Na základě získaných výsledků lze tedy vyvodit, že diversita degradujících genů i bakterií je velmi závislá na podmínkách v dané lokalitě. To velmi dobře koreluje se známou skutečností, že v povrchových vrstvách půdy je množství a rozmanitost

mikroorganismů obecně nejvyšší a to díky podmínkám v půdě a přítomnosti kořenových systémů rostlin. Zásadní vliv na účinnost bioremediace má ovšem hojnost a diversita degradačních genů, která je těmito faktory rovněž ovlivňována.

7 Závěr

Tato práce se zabývá fylogenetickou analýzou jednoho z klíčových enzymů pro degradace aromatických látek - dioxygenas Rieskeho typu. Jejich detekce probíhala ve vzorcích z kontaminovaných půd lokality Hradčany pomocí metod nezávislých na kultivaci.

Z kontaminované půdy byla izolována celková DNA a byla přečištěna tak, aby ji bylo možno použít pro následující PCR amplifikaci. Ta byla provedena s degenerovanými primery cílenými na velkou podjednotku bifenyl dioxygenas z rodiny toluen/bifenyl. Získané fragmenty byly klonovány a byly vybrány klony transformovaných buněk *E.coli* obsahující tento fragment v plasmidu.

U vzorku HRB byla pomocí RFLP analýzy s restriční endonukleasou *MspI* odhadnuta diversita genů, resp. bakterií přítomných v této půdě. Ta se ovšem srovnáním s fylogenetickým stromem vytvořeným ze stejných, ale sekvenovaných klonů nepotvrdila.

Byly sekvenovány vybrané klony z obou vzorků. Nejprve byly sestrojeny dendrogramy různými způsoby a poté byly porovnány. Bylo zjištěno, že nejméně dva výsledky poskytují dendrogramy sestrojené z aminokyselinových sekvencí proteinů metodou maximum likelihood.

Porovnáním těchto dvou zkonstruovaných fylogenetických stromů bylo zjištěno, že v půdě vystavené odlišným podmínkám a s podporou fytoremediace (vzorek HRB-M) je diversita genů pro Rieskeho bifenyl dioxygenasy mnohem větší a vyskytla se zde také další skupina degradačních genů - geny pro bifenyl dioxygenasy. Podmínky v půdě a také přítomnost kořenových systémů rostlin tedy pozitivně ovlivňují růst a diversitu degradujících bakterií v kontaminované půdě a jejich degradační potenciál.

8 Literatura

1. Kubal M., Burkhard J., Březina M.: Dekontaminační technologie, skriptum VŠCHT Praha (2001)
2. Cao, B., Nagarajan, K., Loh, K.C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 207-228 (2009)
3. Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Li, Q.X.: *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 278- 309 (2009)
4. Bamforth, S.M., Singleton, I.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 723-736 (2005)
5. Meckenstock, R.U., Safinowski, M., Griebler, C.: Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Fems Microbiol. Ecol.* 49, 27-36 (2004)
6. Max Nestler, F.H.: *Anal. Chem.* 46, 46-53 (1974)
7. Tsuda, H., Hagiwara, A., Shibata, M., Ito, N.: *J. Nat. Cancer Ins.* 69, 1389-1393 (1982)
8. Manahan, E.S.: *Environmental chemistry*, 8th ed. CRC Press, Florida (2005)
9. Jones, G.R.N.: *Lancet* 2, 791-794 (1989)
10. National Research Council Committee on the Assessment of Polychlorinated Biphenyls in the Environment: *Polychlorinated biphenyls in the environment*. National Academy of Sciences, Washington, D.C. 1979
11. Macháčková, J., Wittlingerová, Z., Vlk, K., Zima, J., Linka, A.: *Water Air Soil Pollut.* 187, 181-194 (2008)
12. Masák, J., Macháčková, J., Siglová, M., Čejková, A., Jirku, V.: *J. Environ. Sci. Heal.* 38, 2447-2452 (2003)
13. Alexander, M.: *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press. Inc., San Diego, (1999)
14. Dua, M., Sethunathan, N., Johri, A. K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 143-152 (2002)
15. Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J.: *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 17, 6-15 (2004)
16. Litchfield, C.D.: Practices, potential and pitfall in the application of biotechnology to environmental problem, v knize *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*, (Sayler, G. et al. eds.), Plenum Press, New York, str. 147-157 (1991)
17. Levin, M.A., Gealt, M.A.: *Biotreatment of Industrial and Hazardous Waste*. McGraw-Hill, New York (1993)
18. Leahy, J. G., Colwell, R.R.: *Microbiol. Rev.* 54, 305-315 (1990)

19. Madsen, E. L.: *Environ. Sci. Technol.* 25, 1663-1673 (1991)
20. Novotný, Č.: *Biodegradace a Biotechnologie*. skriptum Ostravská univerzita (2005)
21. Horáková, D.: *Bioremediace*. skriptum Vysoká škola chemicko-technologická, Praha (2000)
22. Ward, D. M., Brock, T.D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 353-359 (1978)
23. Havlík, T.: *Vývoj biodegradačních metod. Biologické metody zneškodňování odpadů a asanace*. BIJO, Praha, str. 107 (1994)
24. Stapleton, R.D., Bright, N.G., Sayler, G.S.: *Microbial Ecol.* 39, 211-221 (2000)
25. Maymo-Gatell, X., Anguish, T., Zinder, S.H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3108-3113 (1999)
26. Sanford, R.A., Cole, J.R., Loffler, F.E., Tiedje, J.N.: *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3800-3808 (1996)
27. Holliger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Schumacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N., Zehnder, A.J.B.: *Arch. Microbiol.*; 169, 313-321 (1998)
28. de Weerd, K.A., Suflita, J.M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2999-3005 (1990)
29. Krumholz, L.R.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1262-1263 (1997)
30. Boyle, A.W., Phelps, C.D., Young, L.Y.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1133-1140 (1999)
31. Pieper, D.H., Seeger, M.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 121-138 (2008)
32. Whiteley, C.G., Lee, D.J.: *Enz. Microb. Technol.* 38, 291-316 (2006)
33. Vaillancourt, F. H., Bolin, J.T., Eltis, L.D.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 241-267 (2006)
34. Mitchell, K., Studts, J., Fox, B.: *Biochemistry* 41, 3176-3188 (2002)
35. Tao, Y., Fishman, A., Bentley, W., Wood, T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3814-3820 (2004)
36. Gibson, D.T., Parales, R.E.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 236-243 (2000)
37. Harayama, S., Rekik, M.: *J. Biol. Chem.* 264, 15328-15333 (1989)
38. Karegoudar, T.B., Kim, Ch.-K.: *J. Microbiol.* 38, 53-61 (2000)
39. Kelley, I., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E.: *Biodegradation* 1, 283-290 (1990)

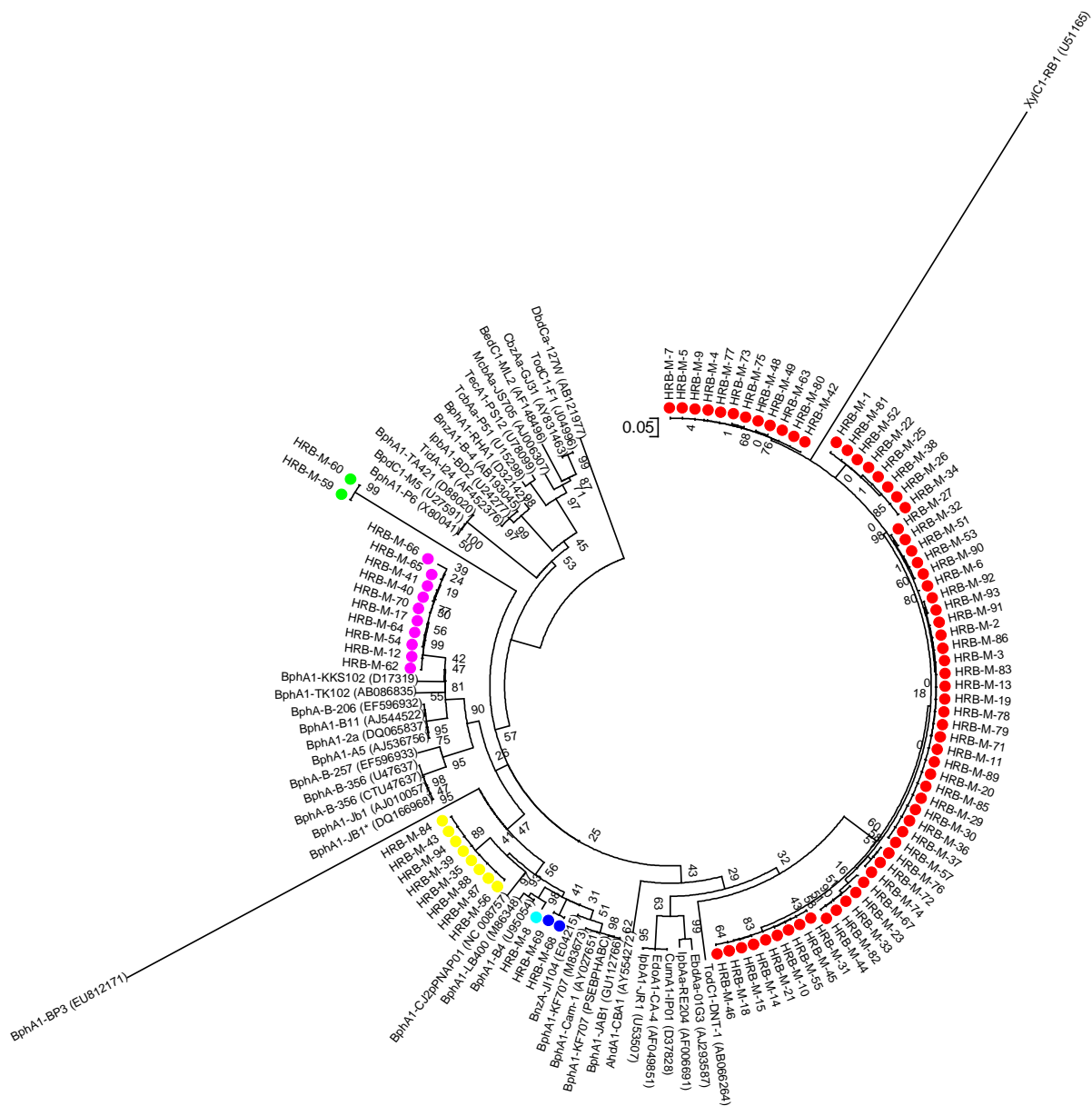
40. Furukawa, K., Fujihara, H.: *J. Biosci. Bioeng.* 105, 433-449 (2008)
41. Brown, M.B., Bush, B., Rhee, G.Y., Shane, L.: *Science* 240, 1674-1676 (1988)
42. Brown, J.F. Jr., Bedard, D.L., Brennan, M.J., Carnahan, J.C., Feng, H., Wagner, R.E.: *Science* 238, 709-712 (1987)
43. Wiegel, J. and Wu, Q.: *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 1-15 (2000)
44. Quensen, J.F., Tiedje, J.M., Boyd, S.A.: *Science* 242, 752-754 (1988)
45. Bedard, D.L., Quensen, J.F.: Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls, v knize *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals* (Yong, L.Y., Cerniglia, C.E. ed.), Wiley-Liss, New York, str. 127–216 (1995)
46. Yoshiyuki, O., Toshiaki, K., Masataka, T., Yuji, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 250-258 (2004)
47. Furukawa, K., Tomizuka, N., and Kamibayashi, A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 301-310 (1979)
48. Arnett, C.M., Parales, J. V., Haddock, J.D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2928-2933 (2000)
49. Billingsley, K.A., Backus, S.M., Juneson, C., Ward, O.P.: *Can. J. Microbiol.* 43, 1172-1179 (1997)
50. Gibson, D.T., Cardini, G.E., Maseles, F.C. and Kallio, R.E.: *Biochemistry.* 9, 1631-1635 (1970)
51. Mason, J.R., Cammack, R.: *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 277-305 (1992)
52. Harayama, S., Rekik, M.: *J. Biol. Chem.* 264, 15328-15333 (1989)
53. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. Jr., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. Listy* 98, 876-890 (2004)
54. Boldt, Y.R., Sadowsky, M.J., Ellis, L.B., Que, L. Jr., Wackett, L.P.: *J. Bacteriol.* 177, 1225-1232 (1995)
55. Que, L. Jr., Reynolds, M.F.: *Met. Ions Biol. Syst.* 37, 505-525 (2000)
56. Novotná, J., Honzátko, A., Bednář, P., Kopecký, J., Janata, J., Spížek, J.: *Eur. J. Biochem.* 271, 3678-3683 (2004)
57. Mars, A.E., Kasberg, T., Kaschabek, S.R., van Agteren, M.H., Janssen, D.B., Reineke, W.: *J. Bacteriol.* 179, 4530-4537 (1997)

58. Riegert, U., Heiss, G., Fischer, P., Stolz, A.: *J. Bacteriol.* 180, 2849-2853 (1998)
59. Furukawa, K., Suenaga, H., Goto, M.: *J. Bacteriol.* 186, 5189-5196 (2004)
60. Haddock, J.D. and Gibson, D.T.: *J. Bacteriol.* 177, 5834-5839 (1995)
61. Bertini, I., Siegel, A., Siegel, H.: *Handbook on Metalloproteins*. CRC Press, New York (2001)
62. Butler, C.S., Mason, J.: *Adv. Microb. Physiol.* 38, 47-84 (1997)
63. Nam, J.-W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H., Omori, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 254-263 (2001)
64. Senda, T., Senda, M.: *J. Mol. Biol.* 373, 382-400 (2007)
65. Ballou, D., Batie, C.: *Prog. Clin. Biol. Res.* 274, 211-226 (1988)
66. Batie, C.J., Ballou, D.P. and Correll, C.C.: Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases, v knize *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, (Müller, F. ed.) CRC Press, Boca Raton, Fla., str. 543-556 (1991)
67. Witzig, R., Junca, H., Hecht, H.J., Pieper, D.H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3504-3514 (2006)
68. Sapp, J.: *The new foundations of evolution*. Oxford University Press, New York, NY (2009)
69. Sneath, P.H.A., Sokal, R.R.: *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco (1973)
70. Baldauf, S.L.: *Trends Genet.* 19, 345-351 (2003)
71. Pace, N.R.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 565-576 (2009)
72. Woese, C.R.: *Microbiol. Rev.* 51, 221-271 (1987)
73. Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O.: *Nuc. Acids Res.* 35, 7188-7196 (2007)
74. Daniel, R.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 470-478 (2005)
75. Richter, D.D., Markewitz, D.: *Bioscience* 45, 600-609 (1995)
76. Paul, E.A., Clark, F.E.: *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, San Diego, (1989)
77. Torsvik, V., Øvreås, L.: *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240-245 (2002)

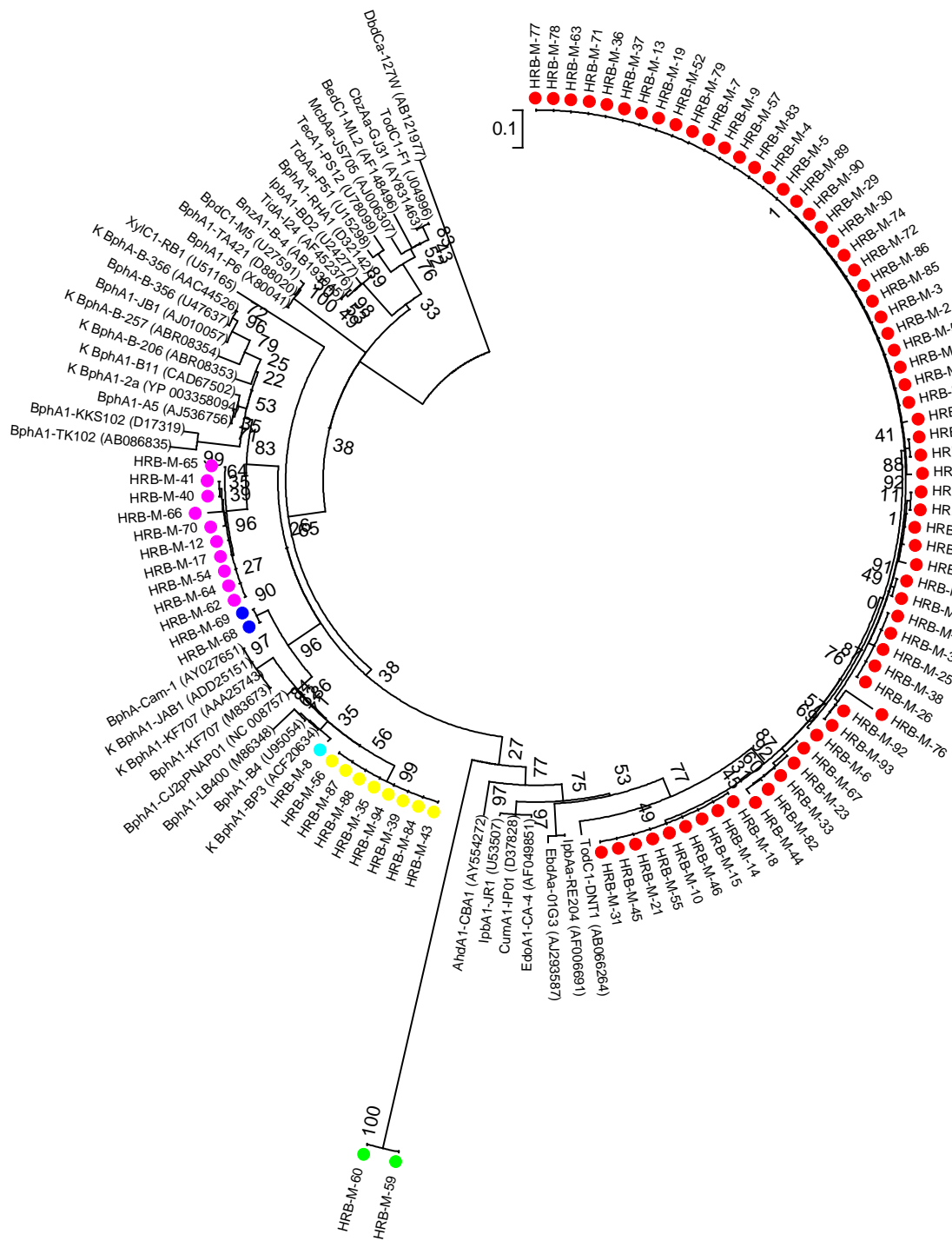
78. Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.-A. Øvreås, L.: *J. Biotech.* 64, 53-62 (1998)
79. Torsvik, V., Sorheim, R., Goksoyr, J.: *J. Ind. Microbiol.* 17, 170-178 (1996)
80. MacNaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J., White, D.C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3566-3574 (1999)
81. Bordenave, S., Goñi-Urriza, M., Vilette, C., Blanchard, S., Caumette, P., Duran, R.: *Environ. Microbiol.* 10, 3201-3211 (2008)
82. Lawrence, J.G.: *Theor. Popul. Biol.* 61, 449-460 (2002)
83. Yeates, C., Holmes, A.J., Gillings, M.R.: *Environ. Microbiol.* 2, 644-653 (2000)
84. Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M., Handelsman, J.: *Environ. Microbiol.* 6, 981-989 (2004)
85. Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Khachane, A.N., Reyes-Duarte, D., Santos, V.A., et al.: *Environ. Microbiol.* 7, 1996-2010 (2005)
86. Brennerova, M.V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D.H., Junca, H.: *Environ. Microbiol.* 11, 2216-2227 (2009)
87. Cvrčková, F.: *Úvod do praktické bioinformatiky.* Academia, Praha (2006)
88. Feng, D.F., Doolittle, R.F.: *J. Mol. Evol.* 25, 351-360 (1987)
89. Higgins, D.G., Sharp, P.M.: *CABIOS* 5, 151-153 (1989)
90. Higgins, D.G., Sharp, P.M.: *Gene* 73, 237-244 (1988)
91. Notredame, C., Higgins, D., Heringa, J.: *J. Mol. Biol.* 302, 205-217 (2000)
92. Edgar, R.C.: *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797 (2004)
93. Parida, L.A., Floratos, A., Rigoustos, I.: *J. Combin. Optim.* 3, 247-275 (1999)
94. Felsenstein, J.: *J. Mol. Evol.* 17, 368-376 (1981)
95. Felsenstein, J.: *Evolution* 39, 783-791 (1985)
96. Hillis, D.M., Bull, J.J.: *Syst. Biol.* 42, 182-192 (1993)
97. Cornish-Bowden, A.: *Nucleic. Acids. Res.* 13, 3021-3030 (1985)
98. Najafabadi, H.S., Torabi, N., Chamankhah, M.: *BMC Bioinformatics* 9:55 (2008)

99. Pravečková, M.: Monitorování rozmanitosti a degradačního potenciálu mikrobiálních komunit v oblastech České republiky znečištěných leteckým petrolejem: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra genetiky a mikrobiologie (2007)
100. Promega Corporation: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vektor System: Technical manual (2009)
101. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G.: *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882 (1997)
102. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G.: *Bioinformatics* 23, 2947-2948 (2007)
103. Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., Deerfield, D.W.: *Embnew. News* 4, 14 (1997)
104. Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K.: *Brief. Bioinform.* 9, 299-306 (2008)
105. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.: *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599 (2007)
106. Junca, H., Pieper, D.H.: *J. Microbiol. Meth.* 55, 697-708 (2003)

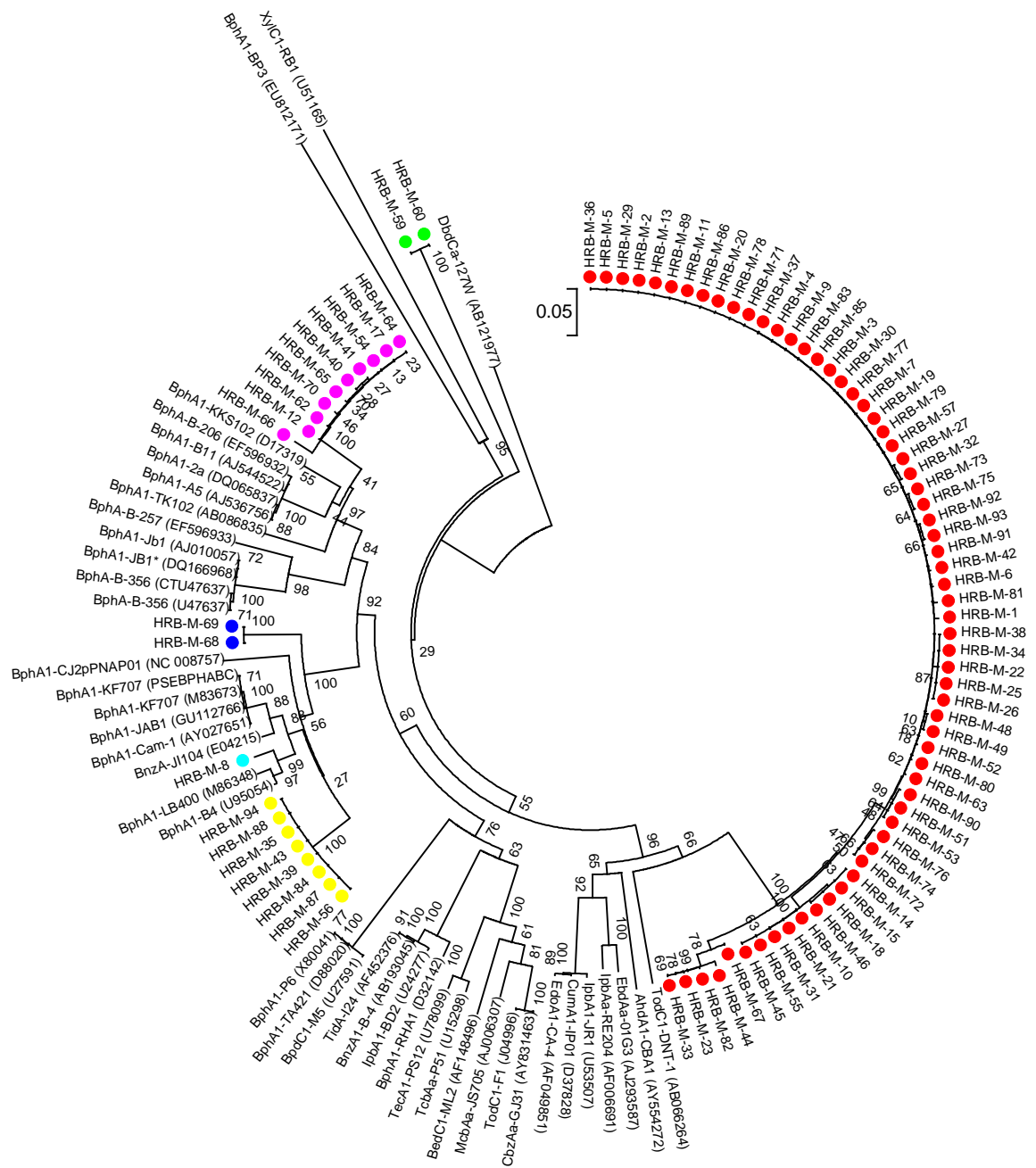
9 Přílohy



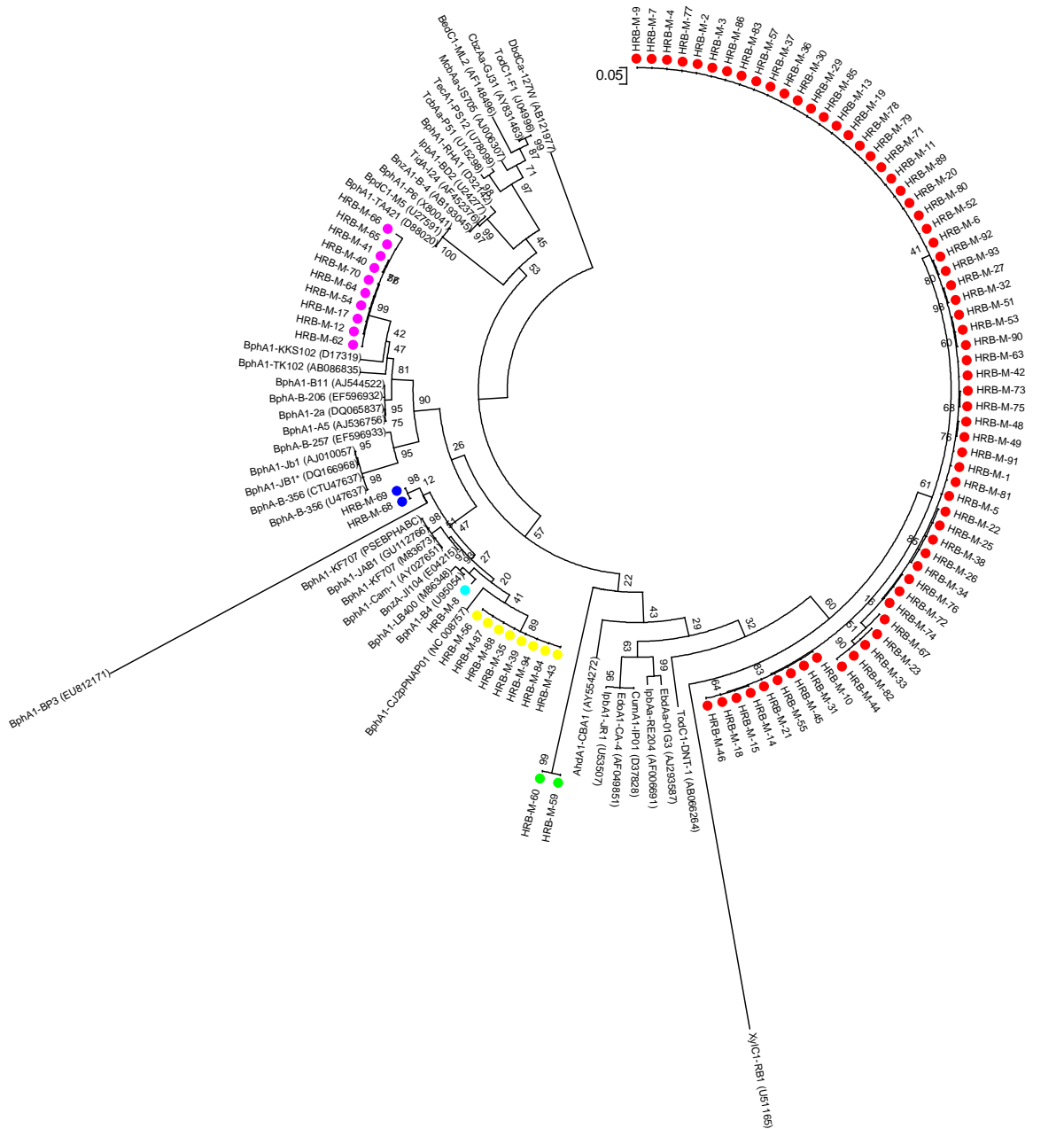
Příloha 1: Dendrogram sestavený ze sady nukleotidových sekvencí ze vzorku HRB-M. Evoluční příbuznost byla odvozena metodou maximum likelihood. Strom byl testován pomocí bootstrapového testu s 500 vzorky. Délky větví odpovídají míře evoluce. Barevnými tečkami jsou označeny skupiny vzájemně příbuzných genů.



Příloha 2: Dendrogram sestavený ze sady aminokyselinových sekvencí ze vzorku HRB-M. Evoluční příbuznost byla odvozena metodou maximum likelihood. Strom byl testován pomocí bootstrapového testu s 500 vzorky. Délky větví odpovídají míře evoluce. Barevnými tečkami jsou označeny skupiny vzájemně příbuzných genů.



Příloha 3: Dendrogram sestavený ze sady nukleotidových sekvencí ze vzorku HRB-M. Evoluční příbuznost byla odvozena metodou neighbor-joining. Strom byl testován pomocí bootstrapového testu s 1000 vzorky. Délky větví odpovídají míře evoluce. Barevnými tečkami jsou označeny skupiny vzájemně příbuzných genů.



Příloha 4: Dendrogram sestavený ze sady nukleotidových sekvencí ze vzorku HRB-M. Evoluční příbuznost byla odvozena metodou maximum likelihood. Strom byl testován pomocí bootstrapového testu s 500 vzorky. Délky větví odpovídají míře evoluce. Barevnými tečkami jsou označeny skupiny vzájemně příbuzných genů.

Příloha 5: Tabulka referenčních klonů získaných z databází EMBL/GenBank/DBBJ používaných při tvorbě dendrogramů.

označení genu	databázové číslo	bakteriální druh	substrát enzymu
AhdA1-CBA1	AY554272	<i>Acidovorax avenae</i> CBA1	chlorbenzene
BedC1-ML2	AF148496	<i>Pseudomonas putina</i> ML2	benzene
BnzA1-B-4	AB193045	<i>Rhodococcus opacus</i> B-4	benzene
BpdC1-M5	U27591	<i>Rhodococcus sp.</i> M5	biphenyl/chlorobiphenyl
BphA1-A5	AJ536756	<i>Cupriavidus oxalaticus</i> A5	biphenyl/4-chlorobiphenyl
BphA1-B4	U95054	<i>Pseudomonas sp.</i> B4	biphenyl
BphA1-CJ2pPNAP01	NC_008757	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	PAU
BphA1-JB1	AJ010057	<i>Burkholderia sp.</i> JB1	chlorobiphenyl
BphA1-KF707	M83673	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707	PCB
BphA1-KKS102	D17319	<i>Pseudomonas sp.</i> KKS102	PCB
BphA1-LB400	M86348	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	PCB
BphA1-P6	X80041	<i>Rhodococcus globerulus</i> P6	PCB
BphA1-RHA1	D32142	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	PCB, nitriles
BphA1-TA421	D88020	<i>Rhodococcus erythropolis</i> TA421	PCB
BphA1-TK102	AB086835	<i>Comamonas testosteroni</i> TK102	PCB
BphA-B-356	U47637	<i>Pandorea pnomenusa</i> B-356	biphenyl
BphA-Cam-1	AY027651	<i>Pseudomonas sp.</i> Cam-1	PCB
CbzAa-GJ31	AY831463	<i>Pseudomonas putida</i> GJ31	chlorobenzene
CumA1-IP01	D37828	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IP01	cumene, isopropylbenzene
DbdCa-127W	AB121977	<i>Xanthobacter polyaromaticivorans</i> 127W	dibenzothiophene, PAU
DbtAc-DBT1	AF380367	<i>Burkholderia sp.</i> DBT1	dibenzothiophene
EbdAa-01G3	AJ293587	<i>Pseudomonas putida</i> 01G3	alkylbenzene
EdoA1-CA-4	AF049851	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CA-4	ethylbenzene
IpbA1-BD2	U24277	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2	isopropylbenzene
IpbA1-JR1	U53507	<i>Pseudomonas sp.</i> JR1	isopropylbenzene
IpbAa-RE204	AF006691	<i>Pseudomonas putida</i> RE204	isopropylbenzene
BphA1-2a	YP_003358094	<i>Burkholderia cepacia</i> 2a	2,4-dichlorophenoxyacetate
BphA1-A5	CAD61140	<i>Cupriavidus oxalaticus</i> A5	biphenyl, 4-chlorobiphenyl
BphA1-B11	CAD67502	<i>Ralstonia sp.</i> B11	biphenyl
BphA1-BP3	ACF20634	<i>Achromobacter sp.</i> BP3	biphenyl
BphA1-JAB1	ADD25151	<i>Pseudomonas sp.</i> JAB1	biphenyl
BphA1-JB1*	AAZ95274	<i>Pandorea sp.</i> JB1	benzene
BphA1-KF707	AAA25743	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707	PCB
BphA-B-206	ABR08353	<i>Acidovorax sp.</i> B-206	biphenyl
BphA-B-257	ABR08354	<i>Paenibacillus sp.</i> B-257	biphenyl
BphA-B-356	AAC44526	<i>Pandorea pnomenusa</i> B-356	biphenyl
RHSD-IOP40-10	EDT02834	<i>Burkholderia amfibaria</i> IOP40-10	-
McbAa-JS705	AJ006307	<i>Ralstonia sp.</i> JS705	chlorobenzene
PhnAc-RP007	AF061751	<i>Burkholderia sp.</i> RP007	naphthalene, phenanthrene
TbuA1-PKO1	AY541701	<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	toluene
TcbAa-P51	U15298	<i>Pseudomonas sp.</i> P51	chlorinated benzenes
TecA1-PS12	U78099	<i>Burkholderia sp.</i> PS12	chlorotoluenes, chlorobenzenes
TidA-I24	AF452376	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> I24	PCB
TodC1-DNT1	AB066264	<i>Thauera sp.</i> DNT1	toluen
TodC1-F1	J04996	<i>Pseudomonas putida</i> F1	toluen
XylC1-RB1	U51165	<i>Cycloclasticus oligotrophus</i> RB1	xylene

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka