

Mikrobiální rozklad fenoxxyethanolu ve vodách

Daniel Strachota

Bakalářská práce
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Daniel Strachota**
Osobní číslo: **T17733**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Mikrobiální rozklad fenoxxyethanolu ve vodách**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte rešerši se zaměřením fenoxxyethanol, jeho vlastnosti a použití, a na možnosti jeho mikrobiální degradace.
2. Experimentálně ověřte míru mikrobiálního rozkladu fenoxxyethanolu ve vybraném vodním prostředí.
3. V případě proběhlé biodegradace se pokuste klíčový mikroorganismus nebo konsorcium získat a popsat základní vlastnosti.
4. Získané poznatky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v tištěné i elektronické formě v řádném termínu.

Forma zpracování bakalářské práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. D. Mara, N. Horan. 2003. The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Microbial degradation of recalcitrant compounds: pp 559 ? 576. Academic Press.
2. Speřanza G et al. 2002. Mechanism of anaerobic ether cleavage – Conversion of 2-phenoxyethanol to phenol and acetaldehyde by *Acetobacterium* sp. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14, pp 11684-11690.
3. Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect a Medline.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **3. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Práce se zabývá osudem 2-fenoxyethanolu v prostředí aktivovaného kalu a jeho odstranění pomocí mikrobiologického rozkladu. K nalezení kultur toho schopných byl odebrán vzorek z aktivovaného čistírenského kalu z ČOV Malenovice. Kultivačními metodami byly izolovány čtyři bakteriální kultury, na základě ověření jejich růstu na 2-fenoxyethanolu. Jejich schopnosti rozkladu byly pak blíže sledovány v několika růstových testech a bylo zjištěno, že jsou schopny růst na 2-fenoxyethanolu až do koncentrací kolem 1500 až 1750 mg/l. Získané kultury byly identifikovány jako zástupci rodů *Hydrogenophaga* a *Zoogloea*.

Klíčová slova: aktivovaný kal, biodegradace, 2-fenoxyethanol, koncentrace

ABSTRACT

The work deals with the fate of 2-phenoxyethanol in the environment of activated sludge and studied its removal by microbial decomposition. To find microbial cultures of such activities, a sample was taken from the activated sewage sludge basin from the Malenovice wastewater treatment plant. Four bacterial cultures were isolated by cultivation methods based on the confirmation of their growth on 2-phenoxyethanol. Their degradation properties were then monitored in several growth tests and they were found to be able to grow on 2-phenoxyethanol up to concentrations from 1500 to 1750 mg/l. The obtained cultures were identified as representatives of the genera *Hydrogenophaga* and *Zoogloea*.

Keywords: activated sludge, biodegradation, concentration, 2-phenoxyethanol

Mé velké díky patří panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho svědomité vedení mé práce a odbornou pomoc a neutuchající trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat laborantce Mgr. V. Kučabové, která v době krizového stavu pomohla dotáhnout mou práci do konce. Stejně tak chci poděkovat rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Any sufficiently advanced technology is indistinguishable from magic.

Každá dostatečně pokročilá technologie je nerozlišitelná od magie.

Arthur C. Clarke

Kéž bych ten prsten nedostal. Nic z toho by se nestalo. To chtějí všichni, kdo prožívají trápení. O tom ale oni nerozhodují. My rozhodujeme pouze o tom, co uděláme s časem, jenž nám byl dán.

Čaroděj Gandalf (J. R. R. Tolkien)

„Nic tak nepovzbuzuje pocit žízně jako osvojování si vědomostí.“

Andrzej Sapkowski

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 2-FENOXYETHANOL	11
1.1 VLASTNOSTI.....	11
1.1.2 Toxicita	11
1.1.3 Obecné využití	13
1.1.4 Protimikrobní účinky	14
2 MIKROBIÁLNÍ ROZKLAD	16
2.1 PODSTATA	16
2.2 FUNKCE.....	16
3 TESTY BAKTERIÁLNÍCH KULTUR	18
3.3 GRAMOVO BARVENÍ	19
4 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DLE 16S RDNA	20
5 IDENTIFIKACE POMOCÍ TECHNOLOGIE MALDI	21
6 CÍLE PRÁCE	22
II PRAKTICKÁ ČÁST	23
7 MATERIÁL A METODIKA	24
7.1 POKUS 1 – ROZKLAD 2-FENOXYETHANOLU AKTIVOVANÝM KALEM	24
7.2 POKUS 2 – ZÍSKÁNÍ DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ	25
7.3 POKUS 3 – RŮSTOVÉ VLASTNOSTI DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ; TEPLOTNÍ TESTY	27
7.4 POKUS 4 – DEGRADAČNÍ VLASTNOSTI ZÍSKANÝCH BAKTERIÍ – KONCENTRACE FENOXYETHANOLU	28
7.5 POKUS 5 - DEGRADAČNÍ VLASTNOSTI ZÍSKANÝCH BAKTERIÍ – KONCENTRACE FENOXYETHANOLU 2	28
7.6 POKUS 6 - RŮSTOVÉ VLASTNOSTI ZÍSKANÝCH BAKTERIÍ - PH TEST	30
7.7 POKUS 7 - IDENTIFIKACE BAKTERIÍ	32
8 VÝSLEDKY	34
8.1 POKUS 1 – ROZKLAD FENOXYETHANOLU AKTIVOVANÝM KALEM.....	34
8.2 POKUS 2 – ZÍSKÁNÍ DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ	36
8.3 POKUS 3 – RŮSTOVÉ VLASTNOSTI DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ; TEPLOTNÍ TESTY	40

8.4	POKUS 5 - DEGRADAČNÍ VLASTNOSTI ZÍSKANÝCH BAKTERIÍ – KONCENTRACE FENOXYETHANOLU 2	44
8.5	POKUS 6 - RŮSTOVÉ VLASTNOSTI ZÍSKANÝCH BAKTERIÍ - PH TESTY	47
8.6	POKUS 7 - IDENTIFIKACE BAKTERIÍ	48
8.6.1	dle 16S rDNA.....	48
8.6.2	Pomocí technologie MALDI.....	49
9	ZÁVĚR.....	51
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	56
	SEZNAM TABULEK.....	57
	PŘÍLOHY.....	58

ÚVOD

Člověk svou denní aktivitou produkuje do svého prostředí množství látek. Vystavuje tak své životní prostředí velkému nebezpečí. Znečištění je každým dnem významnějším tématem, neboť jeho úroveň každým dnem stoupá a velmi často jde o látky, o jejichž vlivu na naši biosféru je toho známo velmi málo. Zasaženy jsou velmi výrazně naše vodní toky průmyslovými, ale i domácími vodami a dalšími látkami jako například zemědělská hnojiva a pesticidy.

Těmto denně se zvyšujícím hodnotám přispíváme všichni svou aktivitou a tou je třeba i tak obyčejná záležitost jako je čištění zubů či umývání se. Denně využíváme produkty, o jejichž složení častokrát nemáme ponětí.

Jednou z velmi často využívaných látek v kosmetických výrobcích je 2-fenoxyethanol. Jde o látku, která se jako i spousta dalších fenolických látek nachází volně v přírodě, ale její přednostní využití je hlavně v průmyslu. Používaný je jako konzervační prostředek k zamezení růstu bakterií a plísní. Předmětem této práce bude zjištění bližších informací o této látce v rámci interakcí s bakteriemi a jejího potencionálního mikrobiálního rozkladu.

Tuto tematiku jsem si vybral, abych alespoň částečně vrhnul světlo na svět kosmetických a hygienických aditiv a jejich osud v našich tocích.

Jedním z možností, jak se s touto hrozbou vypořádat je mikrobiologický rozklad. Je to proces, který je v přírodě jedním z nejdůležitějších na světě a který zajišťuje koloběh látek v našem životním prostředí. Půjde o rozklad za přístupu vzdušného kyslíku tedy o aerobní rozklad, o němž je v souvislosti 2-fenoxyethanolem velmi málo známo. Předpokládám jeho úspěšný rozklad na základě faktu, že jde o přírodní sloučeninu a jí příbuzné látky jsou dobře rozložitelné.

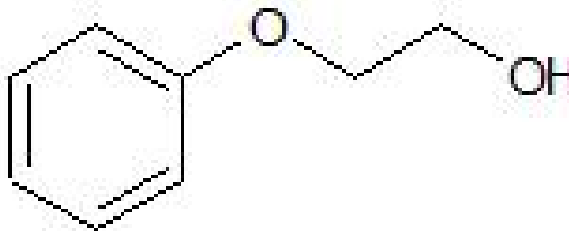
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 2-FENOXYETHANOL

1.1 Vlastnosti

1.1.1 Chemicko – fyzikální vlastnosti 2- fenoxylethanolu

2- fenoxylethanol ($C_8H_{10}O_2$) známý také jako ethylen glykol monofenyl ether či fenyl glykol (dále pouze 2FE) je olejovitou bezbarvou látkou slabého zápachu přirovnatelného k růžím. Jde o glykol ether s bakteriocidními účinky, často používaný v kosmetických výrobcích jako konzervant. Přírodně se vyskytuje v avokádu, čaji či určitých druzích mangovníku. [2]



Obrázek 1: Chemická struktura 2-fenoxylethanolu

Tab.1 Chemicko – fyzikální vlastnosti 2FE [1]

Molární hmotnost (g/mol)	138,16
pH (10g/l , 23 (°C)	7
Bod tání (°C)	12
Bod varu (°C)	245
Bod vzplanutí (°C)	126
Hustota (g/ml)	1,107
Rozpustnost ve vodě (g/l)	28,6
Samovznícení (°C)	475

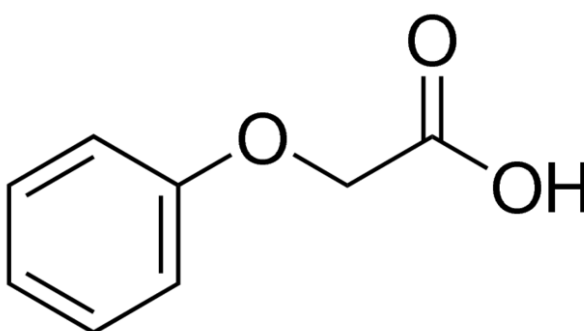
1.1.2 Toxicita

Je používán v kosmetických přípravcích díky jeho schopnosti inhibice růstu bakterií. Napadá oxidativní fosforylaci v dýchacím řetězci buněk a blokuje dehydrogenaci malátu. Přímo také ovlivňuje syntézu DNA a RNA. [2]

Je látkou požívanou již po několik desetiletí a v historii byl používán v koncentracích až po 5%. Jeho toxicita společně s ostatními konzervanty byla předmětem zájmu

v posledních cca. 15 letech z důvodů jeho příbuznosti s ostatními glykol ethery, které jsou endokrinní disruptory a hepatotoxiny již v relativně malých koncentracích. [2]

Na základě výzkumu *in vitro* bylo zjištěno, že 2FE se neakumuluje ani nenavazuje v kůži a velmi rychle se vstřebává (lidskou kůží asi ze 78%). Proběhl rozsáhlý výzkum *in vivo* jak na zvířatech tak i na lidech, kde byla zjištěna vysoká rychlost jeho kinetiky v organismu. Velmi rychle se vstřebával, adsorboval, distribuoval a exkretoval. K metabolizaci dochází hlavně v játrech a částečně v kůži. Metabolitem lidského organismu je kyselina fenoxyoctová vylučovaná z těla močí. [2]



Obrázek 2 Kyselina fenoxyoctová

Inhalační cesta byla prověřena na krysách, orální na myších a krysách a dermatologická na králicích. Inhalačně nebyla prokázána toxicita ani po šesti hodinách denně po pět dní v týdnu a čtrnácti dnech. Orálně byla prokázána hepatotoxicita po deseti dnech podávání (100 mg/kg). Dále byla zaznamenána hemotoxicita, a to ve formě slabé anémie a změně velikosti červených krvinek u krys, kterým byl 2FE podáván po devadesát dní. LOAEL (nejnižší dávka s prokazatelným efektem) je 987mg/kg pro samce a 1000 mg/pro samice. [2]

U myší působil obdobně jako u krys, ale zde byl navíc zaznamenán pokles fosfolipidů a cholesterolu. Mutagenita nebyla prokázána. Stejně tak i karcinogenita a reprotoxická či endokrinní disrupce. Pouze u z rozboru krve pupečních šnůr novorozenců byla zaznamenána jemná odchylka v podobě mírně snížené hladiny určitých hormonů. [2]

Co se neurotoxicity týče, byl zaznamenán případ tří žen pracujících jako dělnice ve zpracovatelském průmyslu ryb, kde je 2FE používán jak anestetikum ryb ke snížení stresu při transportu a usmrcení. Ženy si stěžovaly na bolesti hlavy a vratkost. Tento případ je však zpochybnitelný, jelikož nebylo možné dohledat koncentraci použitého 2FE a potvrdit tak jeho přímé působení na pracovnice. [2]

Prokázané zdravotní problémy však nejsou důvodem k obavám či snad zanedbávání osobní hygieny. Všechny zaznamenané problémy byly prokazatelně zapříčiněny působením 2FE ovšem v dávkách diametrálně odlišných, než by se s nimi běžný uživatel setkal, řádově šlo o 200krát vyšší koncentrace. Toxicita je tedy v tomto směru zanedbatelná. [2]

V čisté formě (100%) působí 2FE podráždění očí a kůže. U člověka byl zaznamenán případ, kdy předčasní novorozenci byli desinfikováni vodným roztokem 0,1% oktenidinu a 2% 2FE před uložením do inkubátoru. Z důvodu velmi citlivé a ne plně vyvinuté kůže předčasných novorozenců došlo ke kožnímu podráždění, tzv. kožnímu výkvětu a zarudnutí kůže. Tento případ však také nemusí být nutně způsoben 2FE, jelikož oktenidin dokáže být také velmi dráždivý. [2]

2012 byl vznesen rizikový odhad francouzskou agenturou ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé). Požadavek navrhoval snížení koncentrace 2FE na 0,4% v kosmetice určené pro děti pod tři roky a úplný zákaz pro materiály určené k užití v plenkových aplikacích. Roku 2015 bylo rozhodnuto Evropskou komisí pro kosmetiku ponechat stávající maximální koncentraci, a to 1% pro všechny produkty. [3]

V závěru je 2FE velmi dobře tolerovaný konzervant, v porovnání s ostatními alternativami (např. parabeny, TCC, TCS) je jeden z nejlépe tolerovaných vůbec. Při použití do 1% je hodnocen jako neškodný pro lidské užívání.

1.1.3 Obecné využití

Vysoká míra využití je dobře znázorněna studií z roku 2014 v japonských řekách společně s dalšími 4 konzervanty. Bylo zvoleno 13 odběrových míst. 2FE byl nalezen na všech místech, a to až v koncentraci 14 $\mu\text{g/l}$. Objemově tvořil až 90% nálezů. Byl nalezen i na místech s minimální kontaminací průmyslovou nebo domácí odpadní vodou a v koncentracích ne menších než 10 $\mu\text{g/l}$. [4]

Jeho rozšířené využití dokazuje i italská studie z roku 2017, kde bylo zkoumáno 283 kosmetických a hygienických přípravků různých druhů. 60% výrobku mělo nějakou formu konzervantu, z toho 48% (tedy 93 výrobků z 283) byl konzervantem právě 2FE. Nalezen byl ve sprchových gelech, šampónech, tělových krémech, zubních pastách, opalovacích krémech, rtěnkách a lacích na nehty. V různých kategoriích produktů s konzervanty byl obsažen hlavně ve výrobcích k ponechání na pleti (70,1 %), k smytí (25,9%) a z (58,6%) v make-upech. [8]

Další japonská studie z roku 2012 zaměřená na degradaci xenobiotik v tocích různými způsoby zaznamenala, že 2FE je odolný vůči fotooxidaci. Jeho biodegradace v říční vodě však byla potvrzena. [5]

Kromě využití jakožto konzervantu v kosmetických výrobcích je 2FE i alternativou k formaldehydu používaného ke konzervaci a balzamování lidských mrtvol k výukovým účelům medicínských škol. Využíván v koncentraci 7–1,5 % v konzervačním roztoku. Poskytuje dobře zachovalou pevnou tkáň s menší barevnou změnou, než by bylo dosaženo s formaldehydem nebo ethanolem. Procedura je nenáročná, efektivní a není třeba vysoce školeného personálu k jejímu provedení. [7]

Dalším využitím 2FE je anestezie ryb, využívaná pro transport ryb či při jejich usmrcování a následném zpracování, ale také v akvaristice ke snížení stresu. Na využití 2FE neexistují regulace o jeho dávkování, jeho přítomnost či přítomnost metabolitů v mase je možná. [6]

1.1.4 Protimikrobní účinky

U 2-FE byly určeny inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace vůči modelovým bakteriálním kulturám. [9]

Tabulka č.2 Působení 2FE na různé kultury (dle [9] modifikováno)

Kultura	Fenoxyethanol	
	MIC [g.l-1]	MBC [g.l-1]
Grampozitivní		
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	6	7,5
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	7,5	15
<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6	7	>13,0
<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216	7,5	7,5
Gramnegativní		
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	4,5	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4416	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	4,5	7,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<u>6</u>	<u>≥7,0</u>

Dané výsledky nám vypovídají, že grampozitivní kultury byly proti 2FE odolnější. V případě působení 2FE vůči aktivovanému kalu bylo zjištěno, že už slabé koncentrace jako 0,2 g.l⁻¹ způsobuje silný inhibiční účinek (snížení až o 44% v rychlosti respirace) a vyšší

koncentrace jako $10,0 - 20,0 \text{ g.l}^{-1}$ zapříčiní skoro 100%ní zastavení respirace v aktivovaném kalu. [9]

2 MIKROBIÁLNÍ ROZKLAD

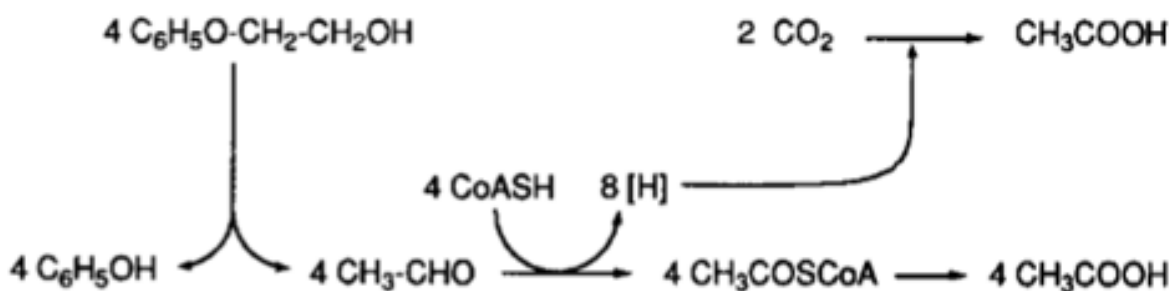
2.1 Podstata

Jde o využití přírodních činitelů, přednostně pak mikroorganismů, k odstranění nežádoucích látek z určitého prostředí. Úspěšným výsledkem procesu je, když je xenobiotikum plně rozloženo na anorganické sloučeniny činností bakterií, které danou látku využily jako zdroj uhlíku a energie pro svůj růst. Tato úplná biodegradace je také známa pod pojmem mineralizace. Úspěšnost tohoto procesu závisí na fyzikálně chemických podmínkách biodegradace, na struktuře dané látky a na přístupu kyslíku. V přítomnosti kyslíku dochází obvykle k rozkladu na oxid uhličitý a vodu, v jeho nepřítomnosti je pak ve smíšených společenstvech mikroorganismů dalším produktem metan. V každém případě je rozklad organických látek podmíněn přítomností vhodných degradačních enzymů, často uspořádaných do metabolických drah. [10]

2.2 Funkce

Mikrobiální rozklad 2FE byl potvrzen už v devadesátých letech. Bakterie izolovaná také z čistírenského kalu byla striktně anaerobní *Acidobacterium* sp. LuPhet1. Kultura úspěšně rozložila 2FE za produkce dvou metabolitů → fenolu a acetátu. Zkoumán byl mechanismus reakce a vyšlo najevo, že jde o štěpení etherové vazby posunem hydroxylové skupiny na subterminální C za vzniku nestabilního hemiacetalu, který následně degraduje na fenol a acetaldehyd. Vzniklý acetaldehyd je dále převáděn na kyselinu octovou (octan). Protože etherové vazby jsou relativně pevné a stabilní a pro mikrobiální rozklad představují náročnou úlohu, věnovali se autoři přesnému průběhu degradace etherové vazby i v další práci, ve které navíc uvádějí, že daná kultura je schopna 2FE využít jako jediný zdroj uhlíku a energie v minerálním médiu s vitamíny [11].

Průběh klíčového kroku degradační dráhy je uveden na obr. 3.



Obrázek 3 Proces štěpení etherové vazby 2FE [11]

Schéma znázorňuje zásadní postup mikrobiální degradace 2FE. Acetaldehyd vznikající ze etherového štěpení oxiduje na acetát pomocí oxidoreduktázy. [11]

2.3 Čistírenský aerobní kal

Směsná mikrobiální kultura obsahující bakterie, houby, prvoky i mnohobuněčné organismy, které se vyvíjí v provzdušňované (aktivované) nádrži čistíren odpadních vod komunálního či průmyslového charakteru.

3 TESTY BAKTERIÁLNÍCH KULTUR

Vliv prostředí je pro život bakterií a rozmnožování zásadní. Závisí na mnoha faktorech. Těmi jsou hlavně přístup k živinám a vodě, přístup ke kyslíku, úroveň pH, osmotický tlak, záření a v neposlední řadě vliv ostatních organismů.

Tyto faktory definují organismy v nich žijící. Některé z těchto vlastností prostředí mohou být i zdánlivě život neumožňující, avšak jsou jisté druhy bakterií, co se v nich vyskytují. Často jsou bakterie schopné růstu okolo bodu mrazu, jisté vláknité plísně i extrémně acidofilní *Archea* jsou schopny růstu při pH mezi 2-1. Vysoce halofilní *Archea* žijí zase v prostředích s vysokými koncentracemi solí. Osmofilní kvasinky se zase množí i v koncentrovaných cukernatých roztocích. Hypertermofilní bakterie a *Archea* žijí a množí se v přírodě kolem horkých pramenů, kde teploty dosahují bodu varu.

Laboratorně jsou tyto vlastnosti často testovány společně s ostatními faktory za účelem charakterizace a zařazení kultur. Růstové vlastnosti mohou být testovány na Petriho miskách či v tekutých médiích, ale nejspornějším řešením jsou mikrotitrační destičky, které šetří prostor, chemikálie, čas a práci. Vyžadují však precizní manipulaci a dávkování. [14]

3.1 Teplota

Teplota okolí je klíčovým faktorem v existenci buňky, jejím metabolismu a jejím rozmnožováním. Rozlišujeme 3 základní úrovně teploty:

minimální teplotu - nejnižší možná teplota kdy je organismus schopný se stále rozmnožovat nejnižší detekovatelnou rychlostí růstu.

Optimální teplotu - nastává zde nejrychlejší růst

Maximální teplota - organismus je stále schopen vykonávat základní životní funkce

Mikroorganismy samotné pak můžeme rozdělit do následujících skupin:

Psychofilní – optimální teplota jejich růstu se pohybuje okolo 20°C, avšak růstu jsou schopni i kolem 0°C. Některé bakterie a plísně i pod bodem mrazu a to až po -10°C.

Ochotně zvládají i vyšší teploty než jejich optimální.

Mezofilní – Jejich optimální teploty se pohybují v rozmezí 20°C až 40°C, patří mezi ně valná většina saprofytických a parazitických (včetně lidských a zvířecích patogenních druhů) mikroorganismů.

Termofilní - organismy preferují teploty nad 45°C, ale často až 50-60°C. Striktně termofilní organismy v teplotách pod 30°C ani nerostou. Extrémní termofilové jsou některé *Archea* žijící v teplotách 100+°C.

Teplota je výborným nástrojem pro boj proti bakteriím, zvláště pak v kombinaci s ostatními činiteli. Teplo totiž zapříčiňuje denaturaci bílkovin a tím blokuje enzymatickou aktivitu. Takováto ireverzibilní změna způsobí úhyn organismu.

Nejnámějšími využitím tepla ke sterilizaci potravin či nástrojů je pasterace a používání vlhkého tepla, kde je navíc přítomna nasycená pára. Tepelná účinnost sterilizace je navyšována v kyselém prostředí a naopak v zásaditém se snižuje. [14]

3.2 pH

Růst mikroorganismů je také podmíněn koncentrací vodíkových iontů. Hodnota pH koresponduje přímo se správnou enzymatickou funkcí. Obecně se optimální hodnoty pH pro většinu mikroorganismů pohybují kolem 4-10. Změna v rámci 0,5 jednotky pH nebývá pro organismus nijak kritická, při dlouhodobé změně záleží na její schopnosti udržovat vnitřní pH. V rámci vztahu mikroorganismů k pH prostředí je možné je rozdělit do několika následujících kategorií: Acidofilní: Jejich růstové optimální hodnoty pH jsou kyselé. Často *Archea*, kde je tato vlastnost často kombinována s jejich termofilitou.

Alkalifilní: Rostou při hodnotách pH okolo 8 a nad ní.

Acidotolerantní: Dobře rostou i při snížených hodnotách, jde hlavně o kvasinky. [14]

3.3 Gramovo barvení

Gramovo barvení je jedním ze zásadních rozdělovacích kritérií pro prokaryotické buňky. Rozděluje je na dvě skupiny a to na tzv. Gram pozitivní a Gram negativní. Toto dělení funguje na základě struktury buněčné stěny daného mikroorganismu, přesněji řečeno na obsah peptidoglykanu v ní. Během barvení jsou buňky vystaveny působení krystalové violeti a Lugolova roztoku a tento vzniklý komplex je následně vázán na peptidoglykan v buněčné stěně. Pokud tento komplex jde z buněk vymýt pomocí ethanolu či acetonu jedná se pak o bakterie G-, tedy gramnegativní. Pokud si však buňky ponechají modravé zbarvení, tak jsou pak označovány jako G+, tedy grampozitivní. Gramnegativní bakterie, co jsou pak dobarvovány červenými barvivy k lepšímu rozlišení. Jsou jimi například karbolfuchsin nebo safranin. [14]

4 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DLE 16S rDNA

DNA obecně, ale zvláště gen pro 16S rRNA, je v mikrobiologii obecně používán pro identifikační účely u neznámých kultur. Jde o 1542 nukleotidů dlouhou RNA, která tvoří složku menší 30S podjednotky ribosomu prokaryot. Obsahuje části, které jsou pro každý druh velmi zachovalé a neměnicí se. Pro jeho stanovení je nutné využít čisté chromosomální DNA z čisté izolované bakteriální kultury.

Izolace DNA je prováděna především s ohledem na charakter buněčných stěn. Jde hlavně o rozrušení stěny a lýze buněk. To se provádí mechanicky, enzymatickou či alkalickou hydrolyzou, pomocí detergentů či osmotickým šokem. Často jsou využívány v kombinaci. Tyto izolace se v dnešní době standartně provádějí za pomoci předpřipravených souprav (kitů).

Po pročištění vyextrahované DNA od kontaminantů jako jsou proteiny či polysacharidy a RNA, buď precipitací, gradientovou centrifugací nebo chromatografií následuje tzv. amplifikace genu pro 16S rRNA pomocí polymerázové řetězové reakce – PCR. Kdy je žádaný úsek DNA „zmnožen“ pomocí mnohonásobně opakované reakci katalyzované termostabilní DNA polymerázou. Výběr úseku DNA je proveden pomocí primerů, což jsou krátké nukleotidové sekvence komplementární k dané oblasti DNA.

Správný průběh PCR je po ukončení obvykle kontrolován elektroforézou v agarózovém gelu, a posléze po další purifikaci jsou výsledné amplikony sekvenovány vhodnou technikou, obvykle na specifickém pracovišti. Výsledky sekvenace jsou poté srovnávány pomocí určených softwarů s daty vybrané databáze – nejčastěji je používán k těmto účelům program BLAST a databáze NCBI GenBank. [16]

5 IDENTIFIKACE POMOCÍ TECHNOLOGIE MALDI

MALDI-TOF

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem.

MALDI-TOF je technika využívaná hlavně pro stanovení struktury bílkovin, sacharidů a oligonukleotidů. Používá se i pro identifikaci různých mikroorganismů jako v případě této práce.

Jde o ionizační techniku, při které nedochází k fragmentaci molekul. Ionizace je zprostředkována pomocí matrice (α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina či 2,5-dihydroxybenzoová kyselina), která zajišťuje optimální kontakt laseru (dusíkový UV laser, 337 nm, 4 ns) s analytem. Nejdříve je excitována matrice, která následně ionizuje daný vzorek za vzniku pseudomolekulového iontu. Tyto ionty jsou následně urychleny elektromagnetickým polem a vstupují do hmotnostního analyzátoru doby letu, kde jsou identifikovány na základě doby, za kterou dosáhnou detektoru. Výsledky jsou převedeny na poměr molekulové hmotnosti a náboje.

Míra shody s databází je charakterizována pomocí tzv. Score v rozmezí 1-3, kdy 3 je 100% shoda. Vzniklá hmotnostní spektra jsou specifická pro každý mikroorganismus a mohou být tedy následně porovnány s údaji v databázích. Vyhodnocení je prováděno pomocí softwaru MALDI Biotyper [15]

6 CÍLE PRÁCE

- Primárním cílem je zjistit možnost a míru mikrobiálního rozkladu 2FE v aktivovaném kalu.
- Za pozitivního výsledku biodegradace přikročit k izolaci daného mikroorganismu a zjištění jeho vlastností růstovými testy jako je test kultivace při různých teplotách, test kultivace při různém pH, ale také maximálně otestovat jejich rozkladné schopnosti zvyšujícími se koncentracemi 2FE.
- Nakonec pak provést identifikaci dle 16S rDNA a pomocí technologie MALDI.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 MATERIÁL A METODIKA

7.1 Pokus 1 – rozklad 2-fenoxyethanolu aktivovaným kalem

Práce započala dne 10. září 2019 ve 12,00 hodin, a to přípravou 3 láhví s minerálním médiem (dále pouze MM) po 200 ml v 500 ml nádobách, 54,5 μ l 2-Fenoxyethanolu a 200 μ l dekantovaného a desintegrovaného aktivovaného kalu. Kal byl původem z čistírny odpadních vod v Malenovicích. Do jedné láhve byl místo aktivovaného kalu přidán pouze sterilní fyziologický roztok. Láhev sloužila jako kontrola k ostatním, jinými slovy jako tzv. „blank“.

Po následujících několik dní byly odebírány vzorky a uchovávány v mrazáku k následnému určení rozpuštěného organického uhlíku.

Příprava 100 ml MM proběhla dle následujících poměrů, které byly stejné i pro další přípravy.

Složení MM na 100 ml:

Destilovaná voda.....	85 ml
Roztok A (9,07 g KH_2PO_4 /l).....	2 ml
Roztok B (23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /l).....	8 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g.l-1).....	1 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,2 g.l-1).....	1 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g.l-1).....	1 ml
NH_4Cl (30 g.l-1).....	1 ml
NaCl (10 g.l-1).....	1 ml

Roztok stopových prvků:

0,043 g $\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$;

0,057 g H_3BO_3 ;

0,043 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

0,037 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$;

0,025 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$;

0,040 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Po přípravě bylo kontrolováno pH, které nemělo být menší než 7,4 a ne vyšší než 7,6. Měření ukázalo upokojivých 7,47. Po navážení byly látky rozpuštěny v 1000 ml destilované vody. Po přípravě roztoků bylo zkontrolováno pH

Dekantace a desintegrace aktivovaného kalu:

Aktivovaný kal by nemohl být ve svém surovém stavu použit pro laboratorní účely a musel být desintegrovan, tj. částice biomasy byly mechanicky narušeny třepáním po 10 minut. Následně byla směs ponechána k dekantaci (tedy usazování). Třepání proběhlo několikrát a po každém protřepání byl původní supernatant odlit a nahrazen sterilním MM.

7.2 Pokus 2 – získání degradačních bakterií

(pondělí 23.9.2019)

Rozklad 2FE byl potvrzen, a tedy mohlo být přistoupeno k dalšímu kroku práce, a to k izolaci a identifikaci kultur za tento děj zodpovědných. Bylo připraveno 200 ml sterilního minerálního média.

Všechny tři láhve z předchozího pokusu byly dokonale protřepány a z každé bylo odebráno 1ml inokula, které byly následně smíchány.

Po sterilizaci dvou lahví se 100 ml MM bylo přidáno do každé 27,3 μl phenoxyethanolu (300 mg/l) a promícháno. Do jedné z lahví bylo přidáno 100 μl inokula, do druhé jen 10 μl . Láhve byly inkubovány při 25°C a jejich aktivita byla během dalších šesti dnů kontrolována.

Provedeno vyočkování na R2A agar a minerální, agar používaný v kombinaci s organickou látkou (v mém případě 2FE) přímo na izolaci rozkladačů dané látky. Dále byly přidány MEM vitamíny a 2FE (300 mg/l).

Suspense zaočkovaná inokulem 10 μl / 100 ml byla roztřepána a zředěna 1000x (10^{-3}) a z této zředěné suspenze vyočkováno 100 a 10 μl na oba agary (= ředění 10^{-4} a 10^{-5}). Inkubace 5–10 dnů při 25°C.

Příprava agarů

200 ml MA s 2FE a MEM:

Navážka 2FEka byla dle návodu zalita destilovanou vodou a sterilizována v autoklávu, po vychladnutí bylo přidáno 200 µl sterilního roztoku MEM vitamínů a 60 µl 2-FE. Následně byl agar rozdávkován do jednotlivých Petriho misek.

Složení R2A agaru:	g/l
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	0,250
Peptický hydrolyzát živočišných tkání	0,250
Hydrolyzát kaseinu	0,500
Výtažek z kvasnic	0,500
Glukóza	0,500
Rozpustný škrob	0,500
Fosforečnan draselný	0,030
Síran hořečnatý heptahydrát	0,500
Pyruvát sodný	0,030
Agar	15,000

Výrobce agaru R2A: HiMedia

Složení minerálního agaru:	
K_2HPO_4	0,1 g
NH_4Cl	0,11 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001 g
$CaCl_2$	0,001 g
Roztok stopových prvků	0,1 ml
Agar	2,0 g
Voda destilovaná	100,0 ml
+ zvolený substrát	

Složení MEM vitamínů:	mg/l
Cholin chlorid	100.000

Hemikalcum -D-Ca-pantothenát	100.000
Kyselina listová	100.000
Niacinamid	100.000
Pyridoxin hydrochlorid	100.000
Riboflavin	10.000
Thiamin hydrochlorid	100.000
i-Inositol	200.000

Výrobce vitamínů: HiMedia

Následovala příprava 2 x 100 ml MM, které bylo sterilizováno. Pak přídavek MEM vitamínů (100 µl do každé lahve), dále do každé lahve 27,3 µl phenoxyethanolu (= 300 mg/l) a promícháno.

Roztok byl rozplněn po 5 ml do 20 sterilních vialek. Každá vialka byla zaočkována jednou kulturou (nepatrné množství biomasy nanesené kličkou).

Následovala kultivace při 25°C po 10 dní. Již po 3 dnech hned několik bakteriálních kultur rostlo.

V pondělí 21.10.2019 byly všechny kultury, co projevovaly známky úspěšného růstu a rozmnožování, vyočkovány křížovým roztěrem na R2A agary a byly kultivovány při 25°C.

Po 3 dnech byly všechny kultury vyrostlé a byla provedena kontrola a srovnání kolonií. Na základě společných rysů a odlišností jednotlivých kultur byly určeny 4 kultury, které vykazovaly odlišné rysy.

7.3 Pokus 3 – růstové vlastnosti degradačních bakterií; teplotní testy

Pro zjištění teplotního rozpětí růstu jednotlivých kultur bylo připraveno 12 R2A agarů. Očkování proběhlo kličkou, na půlce misky. A následně byly po dvojicích kultivovány při různých teplotách po dobu 2 týdnů. Růst kultur byl hodnocen vizuálně.

7.4 Pokus 4 – degradační vlastnosti získaných bakterií – koncentrace fenoxxyethanolu

Pro další experiment byla zvolena mikrotitrační destička k určení schopnosti kultur rozkládat různé koncentrace 2-FE. Tato metoda je velmi výhodná z důvodu nízkých nákladů, přehlednosti a jednoduchého a rychlého měření.

Bylo připraveno 100 ml MM a po sterilizaci byly přidány MEM vitamíny (100 µl).

Pro tento test byly připraveny roztoky s různou koncentrací fenoxxyethanolu.

Postupným ředěním byly vytvořeny následující koncentrace 2-FE (300 – 1500 mg/l).

2,5 ml MM3000 + 2,5 ml MM	⇒ 5 ml MM1500
5 ml MM3000 + 10 ml MM	⇒ 15 ml MM1000
2,5 ml MM3000 + 10 ml MM	⇒ 12,5 ml MM600
2,5 ml MM3000 + 12,5 ml MM	⇒ 15 ml MM500
0,5 ml MM3000 + 4,5 ml MM	⇒ 5 ml MM300
8 ml <u>MM1000</u> + 2 ml MM	⇒ 10 ml MM800
4 ml <u>MM800</u> + 4 ml MM	⇒ 8 ml MM400

Byly namíchány od každé kultury bakteriální suspenze. Na kličku bylo nabráno jen velmi malé množství biomasy a společně s 3ml fyziologického roztoku rozmícháno, až do zakalení podle prvního stupně McFarlandovy stupnice a společně s roztokem 2FE a sterilním fyziologickým roztokem byly napipetovány do jamek destiček.

Průběh experimentu byl průběžně měřen spektrofotometricky při 600 nm na TECANu. Inkubace probíhala při 25 °C.

7.5 pokus 5 - Degradační vlastnosti získaných bakterií – koncentrace fenoxxyethanolu 2

Následující test byl proveden za účelem zjištění přesnějších údajů o rozkladných vlastnostech daných kultur. Bylo postupováno obdobným způsobem jako v předešlém experimentu.

Bylo připraveno 100 ml MM a následně bylo sterilizováno. Po jeho úplném vychladnutí byly přidány MEM vitamíny.

Následně bylo přikročeno k přípravě minerálního média s různou koncentrací fenoxylethanolu a to 300, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750 a 3000 mg/l.

Nejdříve byl připraven roztok o nejvyšší koncentraci a to navážením 120 mg 2FE a přidáním 36ml minerálního média, čímž bylo dosaženo koncentrace 3000 mg/l. Vzniklý roztok byl dále ředěn pro získání dalších koncentrací.

Dle následujících poměrů byly připraveny jednotlivé koncentrace.

0,5 ml MM3000 + 4,5 ml MM \Rightarrow 5 ml **MM300**

5,0 ml MM3000 + 5,0 ml MM \Rightarrow 10 ml **MM1500**

10 ml MM3000 + 5,0 ml MM \Rightarrow 15 ml **MM2000**

2,5 ml MM3000 + 2,5 ml MM1500 \Rightarrow 5 ml **MM2250**

5,0 ml MM3000 + 5,0 ml MM2000 \Rightarrow 10 ml **MM2500**

2,5 ml MM3000 + 2,5 ml MM2500 \Rightarrow 5 ml **MM2750**

2,5 ml MM1500 + 2,5 ml MM2000 \Rightarrow 5 ml **MM1750**

Po úspěšném vytvoření série roztoků se stoupající koncentrací byly namíchány od každé kultury bakteriální suspenze. Na kličku bylo nabráno jen velmi malé množství biomasy a společně s 3 ml fyziologického roztoku rozmícháno až do zakalení podle prvního stupně McFarlandovy stupnice.

Do čtyř mikrotitračních destiček (1 pro každou kulturu) bylo pipetováno po 180 μ l připravených roztoků o různých koncentracích dle schématu níže. K nim bylo přidáno po 20 μ l suspenze jedné kultury. Po zkušenosti s předchozím pokusem byla do krajních jamek destiček napipetována destilovaná voda (200 μ l), k předcházení vysychání. Zkompletované destičky byly periodicky měřeny na absorbanci při OD₆₀₀ na přístroji TECAN. Inkubovány byly při 25°C po 15 dní.

Roztoky byly rozmístěny následovně, vždy paralelně po čtyřech jamkách.

Tabulka č. 3 Rozmístění na mikrotitrační destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O				H ₂ O			H ₂ O				H ₂ O
B												
C			300	1500	1750	2000	2250	2500	2750	3000		
D	H ₂ O		300	1500	1750	2000	2250	2500	2750	3000		H ₂ O
E			300	1500	1750	2000	2250	2500	2750	3000		
F			300	1500	1750	2000	2250	2500	2750	3000		
G												
H	H ₂ O				H ₂ O			H ₂ O				H ₂ O

7.6 pokus 6 - Růstové vlastnosti získaných bakterií - pH test

Cílem tohoto experimentu bylo zjištění, jak reagují dané kultury na různé úrovně pH. A následně se rozhodnout, zda jsou acidofilní či jiné.

Test byl proveden stejně tak jako předchozí pomocí kultivace na mikrotitrační destičce s různými úrovněmi pH a růst kultur byl hodnocen dle absorbance při 600 nm.

Jako medium bylo použito poupravené MM stejné jako v předchozích experimentech. Zde však byl zvýšen či snížen obsah KH₂PO₄ nebo Na₂HPO₄·12H₂O, aby bylo dosaženo požadovaného pH, přičemž aby byly získány hodnoty vyšší či nižší, musely být některé doplněny o NaOH nebo HCl. Tímto byly získány pufrční roztoky, ke kterým pak byly přidávány další komponenty.

Jednotlivé pufrční roztoky byly připraveny dle následující tabulky:

Tabulka č. 4 poměry roztoků KH_2PO_4 a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

pH	A KH_2PO_4 [ml/50ml]	B $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ [ml/50ml]
5**	5	0
5,5	4,75	0,25
6	4,25	0,75
6,5	3,45	1,55
7	1,7	3,3
7,5	0,8	4,2
8	0,2	4,8
8,5*	0	5
9*	0	5
9,5*	0	5

* pH upraveno pomocí HCl

** pH upraveno pomocí NaOH

Následně bylo ještě připraveno 250 ml níže uvedeného MM.

Destilovaná voda.....	225 ml
Roztok stopových prvků.....	1 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g.l ⁻¹).....	5 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,2 g.l ⁻¹).....	5 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g.l ⁻¹).....	5 ml
NH_4Cl (30 g.l ⁻¹).....	5 ml
NaCl (10 g.l ⁻¹).....	5 ml

Vše bylo sterilizováno v autoklávu a po dostatečném zchlazení byly k MM přidány MEM vitamíny (500 μl) a 287 μl fenoxoethanolu jakožto zdroj uhlíku, čímž bylo dosaženo koncentrace o 1260 mg/l. Takto připravený roztok byl nadávkován po 25 ml do každé lahvičky s příslušným pH, kde došlo ke snížení koncentrace na 630 mg/l a tím bylo získáno živné medium o různých pH. To bylo dále pipetováno do šesti mikrotitračních destiček po 190 μl .

Byla připravena suspenze daných kultur, avšak s tím rozdílem, že na základě předchozích testů a vizuální podobnosti byly kultury P1 a P9 brány jako jedna pod názvem P9. Do každé jamky bylo napipetováno této suspenze 10 μ l.

Mikrotitračních destiček bylo zpracováno 3x2. Pro každou kulturu 2 s deseti hodnotami pH.

Tabulka č.5 Rozmístění pH testů na mikrotitračních destičkách pro 1 kulturu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C		pH 5		pH 5,5		pH 6		pH 6,5		pH 7		
D		pH 5		pH 5,5		pH 6		pH 6,5		pH 7		
E		pH 5		pH 5,5		pH 6		pH 6,5		pH 7		
F		pH 5		pH 5,5		pH 6		pH 6,5		pH 7		
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C		pH 7,5		pH 8		pH 8,5		pH 9		pH 9,5		
D		pH 7,5		pH 8		pH 8,5		pH 9		pH 9,5		
E		pH 7,5		pH 8		pH 8,5		pH 9		pH 9,5		
F		pH 7,5		pH 8		pH 8,5		pH 9		pH 9,5		
G												
H												

Okrajové jamky všech řádků a sloupců byly vyplněny destilovanou vodou (200 μ l). Kultivace probíhala při 25 °C po 18 dní.

7.7 pokus 7 - Identifikace bakterií

Jakožto finální experiment byla provedena identifikace kultur. A to pomocí dvou technologií. Nejdříve pomocí metody MALDI a následně pomocí identifikace dle sekvence genu pro 16S rRNA.

Pro identifikaci dle 16S rDNA bylo nejdříve nutné extrahovat DNA z kultur. Stejně jako v předchozím experimentu byly kultury P9 a P1 označovány jako P9 za předpokladu, že se jedná o stejnou kulturu.

Práce tedy započala 5. 3. 2020. K extrakci byla použita zakoupená souprava: DNA Power Soil KIT (výrobce QIAGEN) a bylo postupováno podle návodu výrobce.

Jakmile byl proces dokončen, byly roztoky s DNA změřeny na spektrofotometru ke zjištění úspěšnosti a čistoty DNA.

Provedení PCR:

Každá PCR reakce obsahovala:

12.5 μ L master mixu (Roche) (obsahuje potřebnou směs jednotlivých nukleotidů, pufr, termostabilní DNA polymerázu a hořčičnaté ionty.)

1 μ L každého roztoku primerů FD1 a RD1 (12.5 pmol)

9.5 μ L vody pro molekulární biologii

1 μ L vzorku DNA

Amplifikace byla provedena na přístroji Piko Thermal Cycler (Finnzymes).

(Následující části pak byly provedeny pracovníky ÚIOŽP FT, z důvodu vypuknutí krizového stavu.)

Purifikace produktů PCR

Kontrola PCR byla provedena elektroforézou v 2% agarosovém gelu (Mgr. V. Kučabovou)

Purifikace provedena rovněž Mgr. V. Kučabovou, pomocí soupravy NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Produkty PCR zaslány k sekvenaci: do firmy SEQme s.r.o., Dobříš, ČR

Vyhodnocení získaných sekvencí bylo uskutečněno pomocí programu BLAST, z databáze Genbank.

Identifikace pomocí technologie MALDI byla provedena na externím pracovišti na Slovenské Polnohospodárske univerzitě v Nitre (SR).

8 VÝSLEDKY

8.1 Pokus 1 – rozklad fenoxoethanolu aktivovaným kalem

První test byl zaměřen na zjištění rozkladu 2FE aktivovaným kalem a byl sledován pomocí koncentrací DOC v minerálním médiu s 2FE v průběhu inkubace.

Odběr 1 – zahájení pokusu

10. září 2019 ve 12,00 hodin. Z každé lahve bylo odebráno 11 ml a tento objem byl přefiltrován přes filtr s velikostí pórů 0,45 μm . Filtráty uchovány v mrazáku

Odběr 2

Čtvrtek 12. září v 10,00 hodin. Vzhled suspenzí víceméně stejný jako na začátku pokusu. Odebrány vzorky jen ze zaočkovaných lahví.

Odběr 3

Pondělí 16. září v 14,00 hodin. Odebrány vzorky ze všech lahví. Vzhled suspenzí byl zásadně odlišný. Zaočkované suspenze silně zakalené, s vločkovitou biomasou.

Odběr 4

Pátek 20. září v 10,00 hodin. Odebrány vzorky ze všech lahví.

Bohužel při posledních odběrech došlo ke kontaminaci kontrolní láhve č.4.

Následně bylo přistoupeno k měření DOC, tedy určení rozpuštěného organického uhlíku v roztoku.

Pro popis vzorků platí následovně:

Římské číslo: číslo lahve

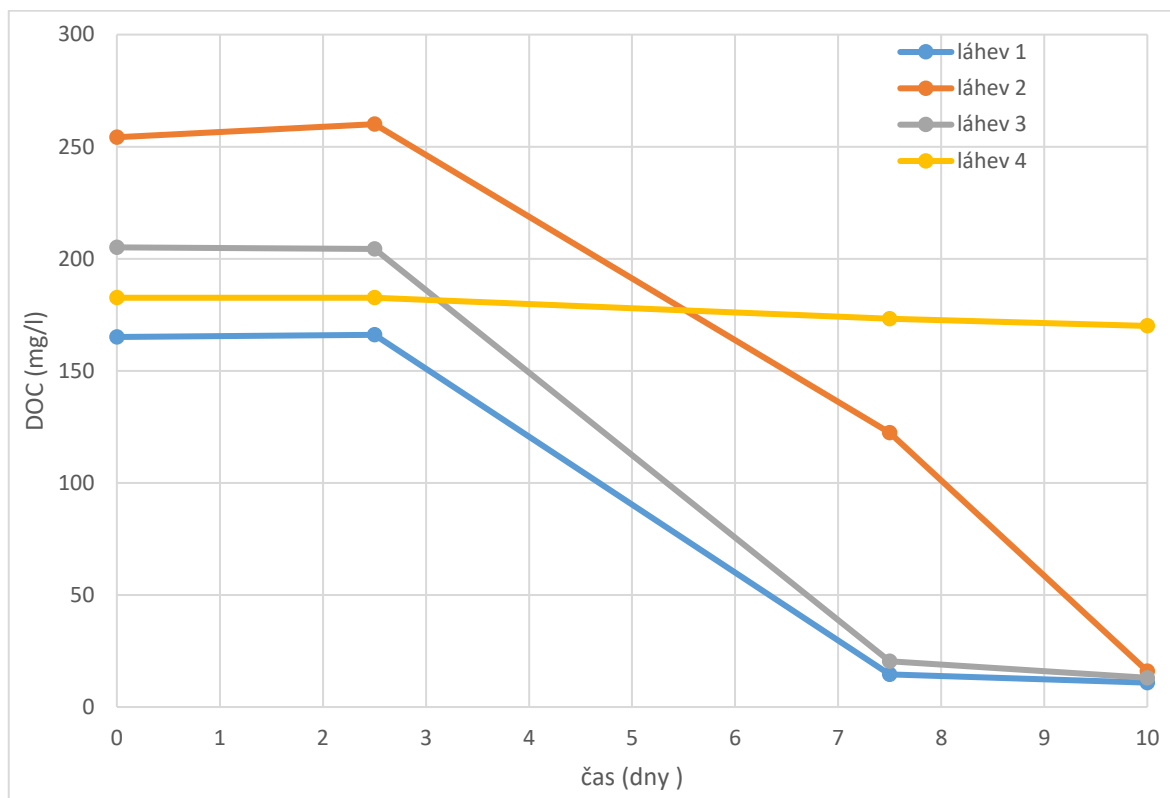
Arabské číslo: číslo odběru.

Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce a zpracovány v grafu na obr. 4.

Tabulka č.6 Stanovení rozpuštěného organického C

1 → láhev 1, 2 → láhev 2, 3 → láhev 3, 4 → láhev 4 „blank“ (kontrolní)

Vialka	Vzorek	Ředění	Stanovení	Výsledek	Přepočet	DOC (mg/l)
TOC		(v ml)		(mg/l)	dle ředění	(po odečtu IC)
1	I / 1	2,5:5 (3x)	TC	55,43	166,29	165,12
2	II / 1	2,5:5 (3x)	TC	85,1	255,3	254,2
3	III / 1	2,5:5 (3x)	TC	68,74	206,22	205,07
4	IV / 1 blank	2,5:5 (3x)	TC	61,25	183,75	182,6
5	I / 2	2,5:5 (3x)	TC	56,1	168,3	166,06
6	II / 2	2,5:5 (3x)	TC	87,19	261,57	260,03
7	III / 2	2,5:5 (3x)	TC	68,53	205,59	204,4
8	I / 3	2,5:5 (3x)	TC	12,02	36,06	14,49
9	II / 3	2,5:5 (3x)	TC	45,5	136,5	122,4
10	III / 3	2,5:5 (3x)	TC	18,27	54,81	20,46
11	IV / 3 blank	2,5:5 (3x)	TC	58,9	176,7	173,28
12	I / 4	2,5:5 (3x)	TC	12,97	38,91	10,87
13	II / 4	2,5:5 (3x)	TC	17,49	52,47	16,02
14	III / 4	2,5:5 (3x)	TC	15,49	46,47	13,04
15	IV / 4 blank	2,5:5 (3x)	TC	57,8	173,4	170,02
16	Destilka	žádné	TC	0,812		
17	I / 1	žádné	IC	1,167	1,17	---
18	II / 1	žádné	IC	1,1	1,1	---
19	III / 1	žádné	IC	1,148	1,15	---
20	IV / 1 blank	žádné	IC	1,15	1,15	---
21	I / 2	žádné	IC	2,24	2,24	---
22	II / 2	žádné	IC	1,544	1,54	---
23	III / 2	žádné	IC	1,194	1,19	---
24	I / 3	žádné	IC	21,57	21,57	---
25	II / 3	žádné	IC	14,1	14,1	---
26	III / 3	žádné	IC	34,35	34,35	---
27	IV / 3 blank	žádné	IC	3,418	3,42	---
28	I / 4	žádné	IC	28,04	28,04	---
29	II / 4	žádné	IC	36,45	36,45	---
30	III / 4	žádné	IC	33,43	33,43	---
31	IV / 4 blank	žádné	IC	3,379	3,38	---
32	Destilka	žádné	IC	0,321	---	---



Obrázek 4 Vývoj poklesu DOC během 10 dní

Uvedená data dokazují jasný pokles koncentrace rozpuštěného organického C, a tedy aktivitu bakterií, které 2-FE využívají jako svůj zdroj energie a uhlíku. Během 10 dní došlo tedy k mikrobiálnímu rozkladu, který byl určen vizuálně (mléčné zakalení, vločkovitá biomasa v suspenzi) a také instrumentálně (měření DOC).

(u třetí láhve je počáteční koncentrace 2FE vyšší, tuto skutečnost si vysvětlují nepřesností při dávkování 2FE)

Na základě úspěšného rozkladu 2FE bylo přistoupeno k pokusům o izolaci degradačních bakterií.

8.2 Pokus 2 – získání degradačních bakterií

Suspenze z prvního pokusu byla opětovně pomnožena v MM s 2FE, aby byl zvýšen počet bakterií využívající 2FE jako růstový substrát. Po šesti dnech inkubace byla získaná nová suspenze šetrně desintegrována a po zředění vyočkována jednak na R2A agary a jednak na MA s 2FE. Po další inkubaci všech misek po dobu sedmi dnů bylo získáno 7 různých

kultur z R2A agarů a 10 kultur z MA s 2FE. Tyto kultury byly přeočkovány na čisté misky. Po 3 dnech kultivace všechny kultury vyrostly.

Všechny čerstvé kultury byly jednotlivě naočkovány do tekutého MM s 2FE a po inkubaci se ukázalo, že v podobě čistých kultur rostou kultury R5 (získána z R2A agaru) a kultury P1, P4 a P9 získané z minerálního agaru s 2FE.

Práce s danými kulturami byla poměrně náročná, protože P1, P9 a R5 tvořily velice kompaktní kolonie s velmi vysokou adhezí k podkladu (agaru). Mikroskopické snímky ukázaly, že všechny kultury jsou gramnegativní. Zvětšení daných fotografií je 1000x.

Základní popis kultur:

R5 – malé kolonie (cca 0,5-1 mm), transparentní až slabý mléčný zákal, kompaktní

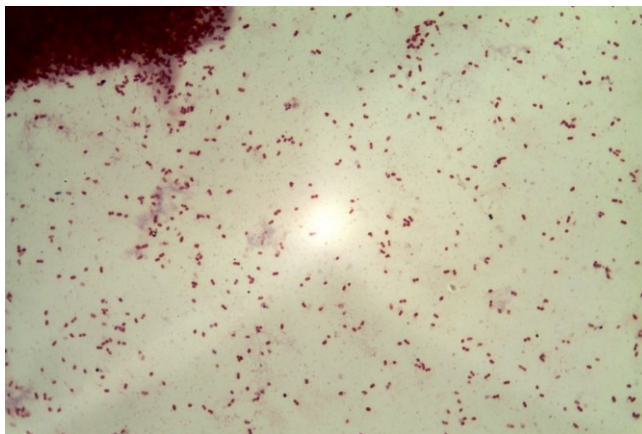
P1 – Středně velké kolonie (cca. 1-2 mm), transparentní, kompaktní; krátké kulaté tyčinky

P4 – žluto-béžové zbarvení, velké kolonie (cca. 2-3 mm), krémové; tyčinky tvořící řetízky

P9 – Středně velké kolonie, transparentní, kompaktní; krátké kulaté tyčinky

Kultury byly nabarveny Gramovým barvením

Následně byly také vypracovány mikroskopické preparáty.

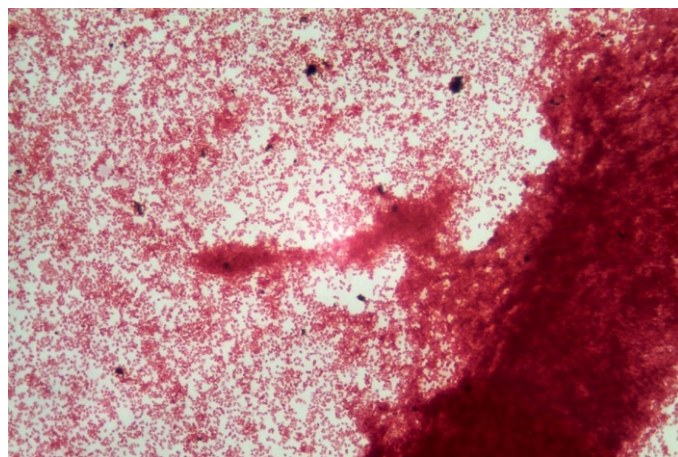


Obrázek 5 Kultura R5, barvení dle Grama

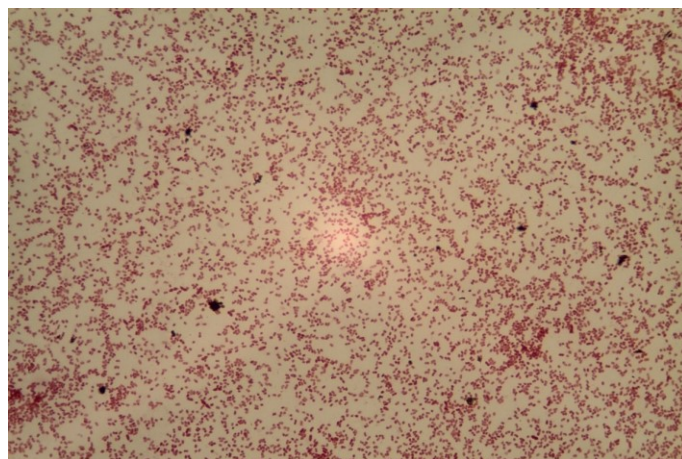


Obrázek 6 R5 shluk, barvení dle Grama

Snímky kultury R5 ukazují, že se jedná o velmi krátké tyčinkovité buňky. Buňky mají tendenci tvořit velmi těsná upořádání, jak je k vidění na obrázku č. 6, což může být důvodem konzistence kolonií a jejich ztížené manipulace.

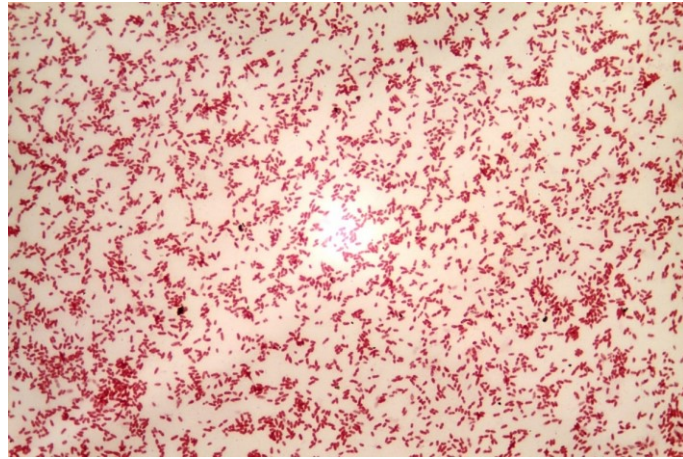


Obrázek 7 Kultura P9, barvení dle Grama



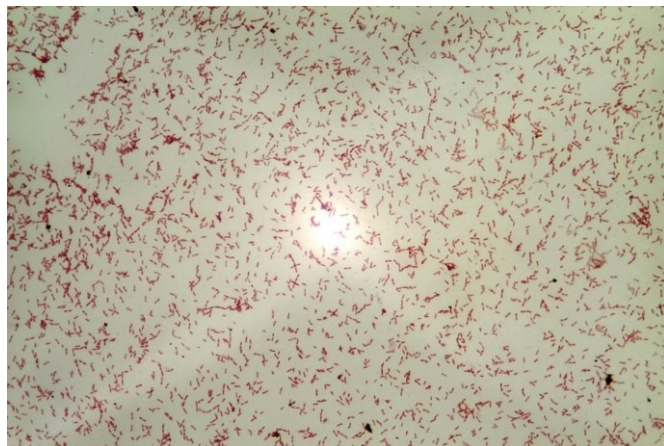
Obrázek 8 Kultura P9, barvení dle Grama

U kultury P9 se opět ukázalo, že jde o krátké tyčinkovité buňky. Stejně tak jako u přechozí kultury R5 byly nalezeny útvary tvořené buňkami v těsném upořádání.

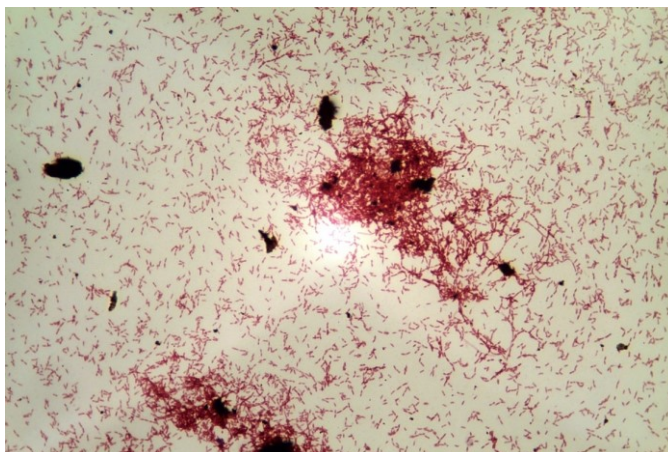


Obrázek 9 Kultura P, barvení dle Grama

Kultura P1 se ukázala být krátkou kulatou tyčinkou jako předchozí, zde však nebyly nalezeny žádné shluky či útvary, ačkoliv jejich kolonie vykazovaly stejné vlastnosti jako P9 a R5.



Obrázek 10 Kultura P4, barvení dle Grama



Obrázek 11 Kultura P4, barvení dle Grama

Kultura P4 se od ostatních 3 lišila již žluto-běžovým zabarvením kolonií. Potvrzení její odlišnosti přinesly i dané snímky. P4 tvořila dlouhé tyčinkovité buňky, co společně tvořily krátké řetízky o 2-5 bakteriích. Obrázek č. 11 ukazuje jisté shlukování, ale ani zdaleka ne takového upřádání jako u R5 či P9. Tomu odpovídá i dobrá manipulovatelnost s jejími koloniemi, které byly mnohem měkčí a měly krémovitou konzistenci.

8.3 Pokus 3 – růstové vlastnosti degradačních bakterií; teplotní testy

Test byl velmi jednoduchý a spočíval v inkubaci všech kultur na petriho miskách při různých teplotách. Růst bakterií byl hodnocen vizuálně a výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka č.7 test teplotního rozmezí růstu

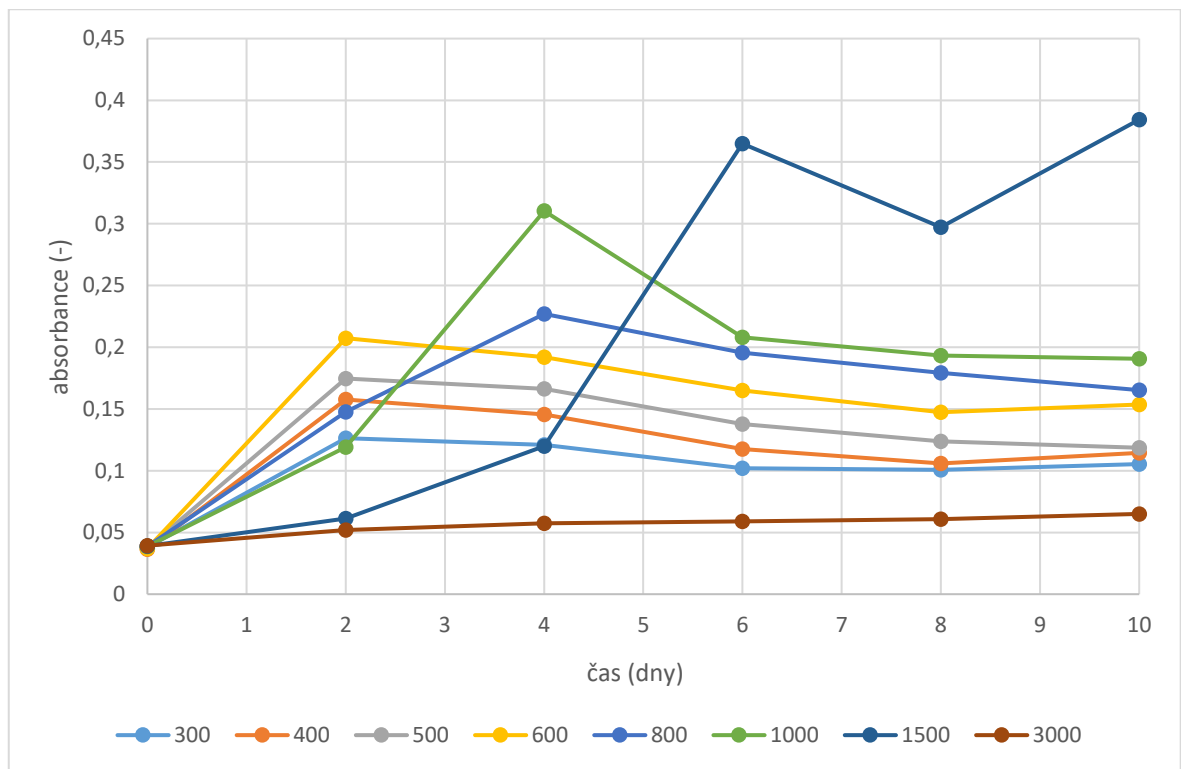
test teplotního rozpětí				
teplota	kultury			
	P1	P9	P4	R5
5–6 °C	-	-	+	-
10–11 °C	+	+	+	+
25 °C	+	+	+	+
30 °C	+	+	+	-
37 °C	+	+	+	-
43 °C	-	-	+	-

Výsledky ukazují, že v případě P1, P9 a P4 se jedná o kultury **mesofilní** a R5 je **psychrofilní** bakterie

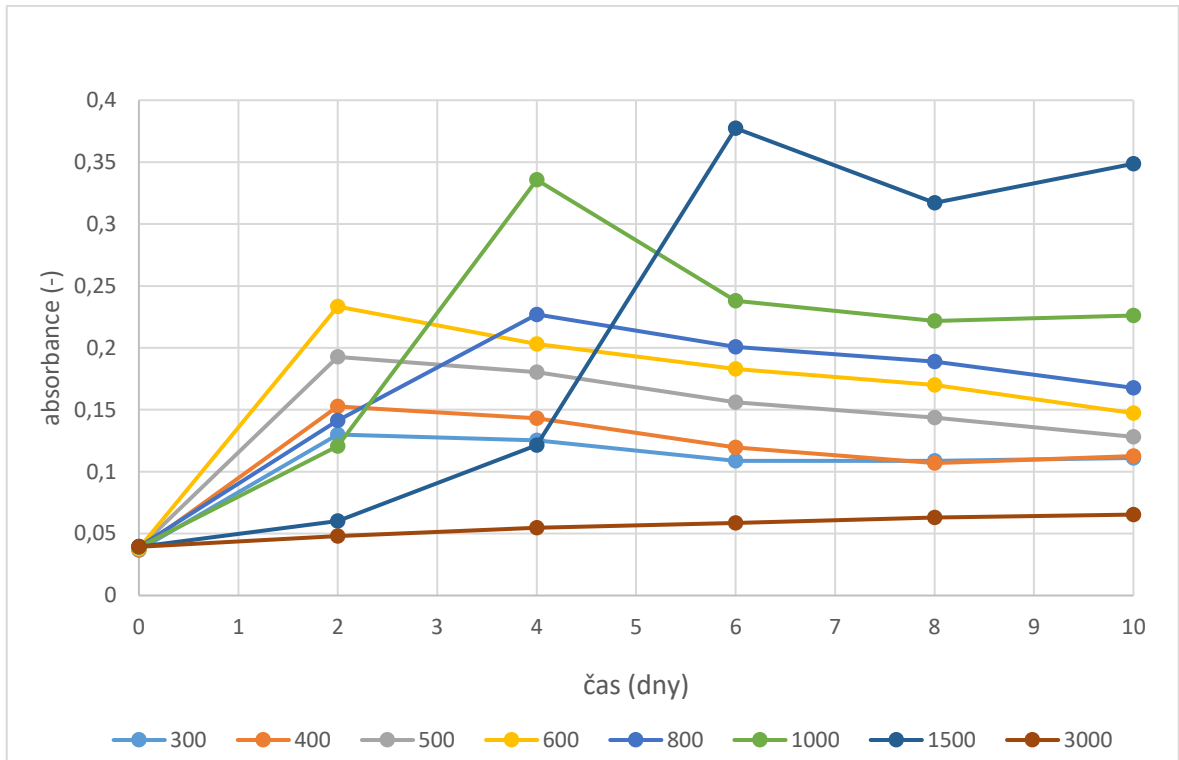
Pokus 4 – degradační vlastnosti získaných bakterií – koncentrace 2-fenoxyethanolu

V rámci tohoto pokusu byl sledován růst uvedených kultur v tekutém médiu (MM + 2FE), v rozsahu koncentrací 300 – 1500 mg/l, a s předpokládanou toxickou koncentrací 3000 mg/l.

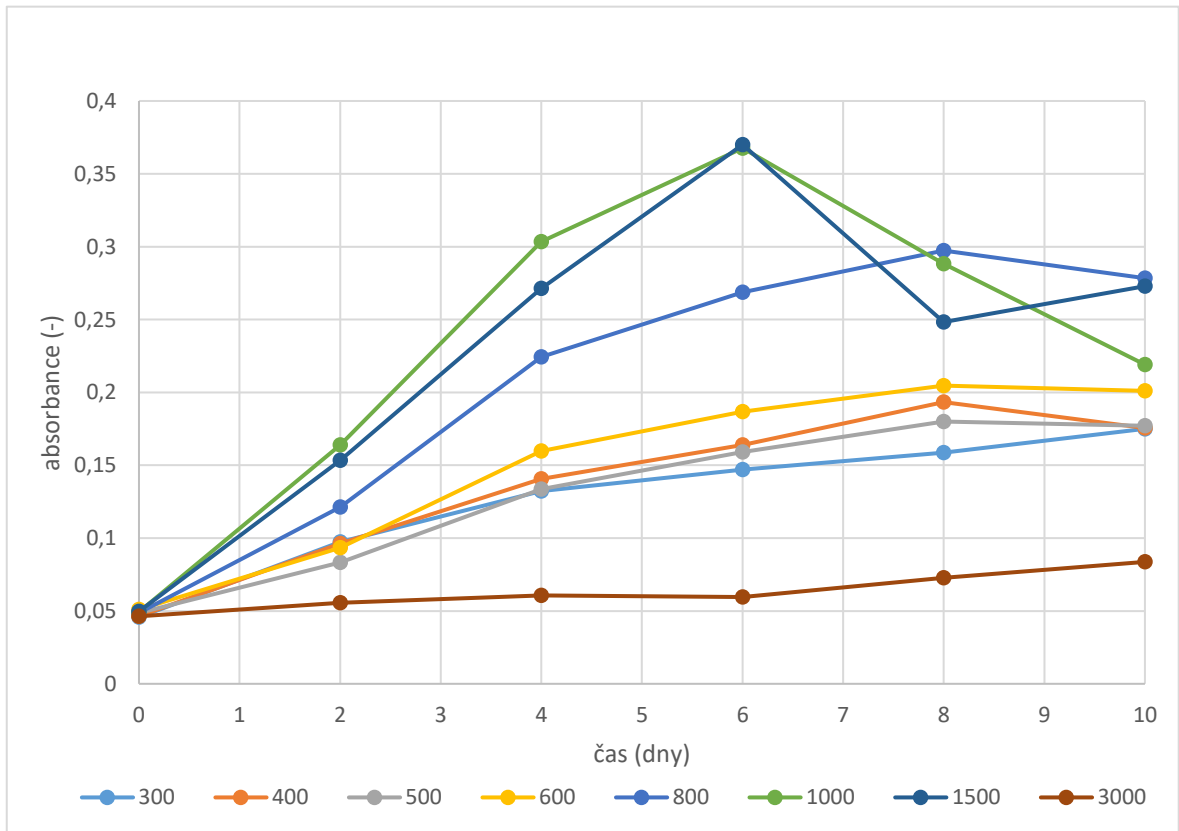
Následující grafy znázorňují vývoj růstu kultur v závislosti na koncentraci 2FE v časovém rozmezí 10 dní, během kterého bylo provedeno 6 měření.



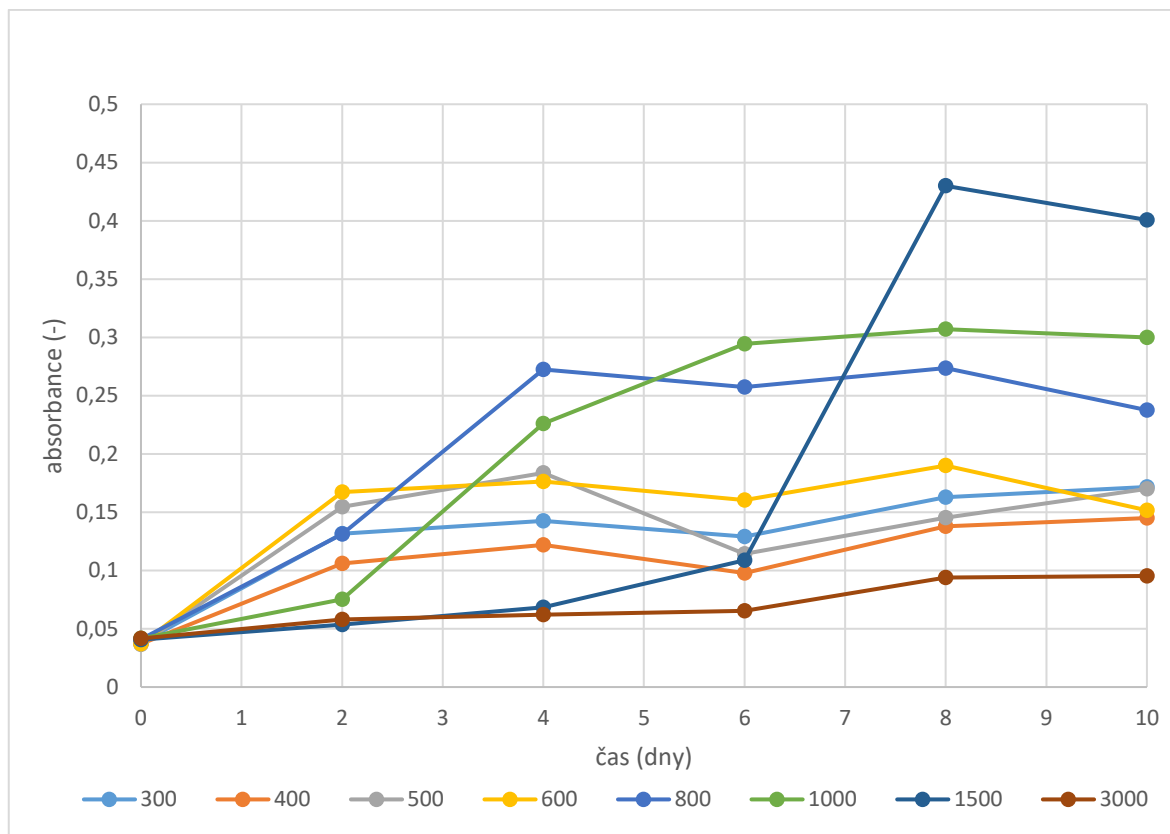
Obrázek 12 Růst kultury P1



Obrázek 13 Růst kultury P9



Obrázek 14 Růst kultury P4



Obrázek 15 Růst kultury R5

Výsledné grafy ukazují, že růst probíhá při nižších koncentracích rychle, či s 1 až 4denní prodlevou u vyšších koncentrací jako 1000–1500 mg/l. Ani jedna z kultur nerostla na 2FE v koncentraci 3000 mg/l.

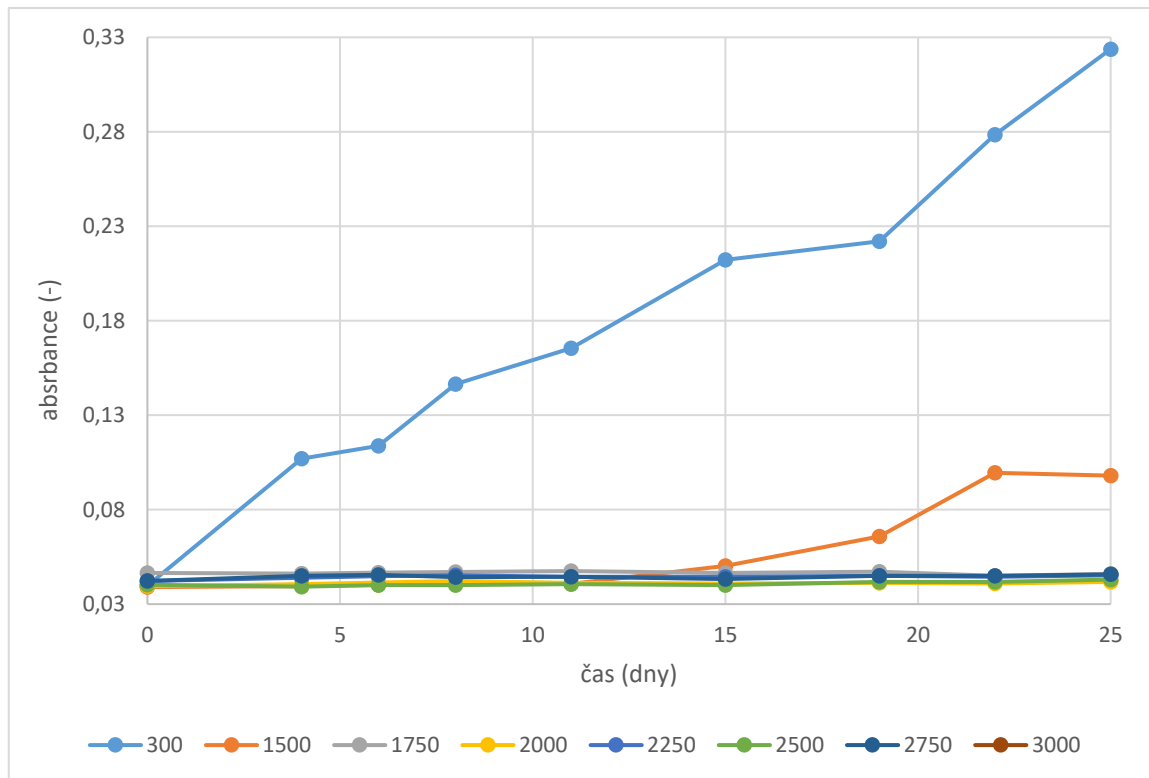
U P1 byl zaznamenán rychlý vzestup v absorbanci již během prvního dne, značící růst a degradaci 2FE, ale během dalších dnů malý pokles a stagnaci po další dny, což značí, že došlo k rychlému zpracování 2FE a po jeho vyčerpání byl růst zastaven. Takto to bylo zaznamenáno u koncentrací 300-600 mg/l. U koncentrací vyšších, tedy 800 až 1500, je k vidění pomalejší nárůst, z důvodu mírné toxicity.

Podobná situace se odehrává u kultury P9 s o něco vyššími hodnotami absorbance. U P4 měla odlišnější způsob růstu, již od začátku je její růst lineárnější bez období pomalého nebo žádného růstu.

Kultura R5 dosahovala menších absorbancí a její průběh se blížil P9 a P1, je tedy možno usuzovat, že dané bakterie budou příbuzné či stejné (i vzhledem k některým dalším velmi podobným vlastnostem).

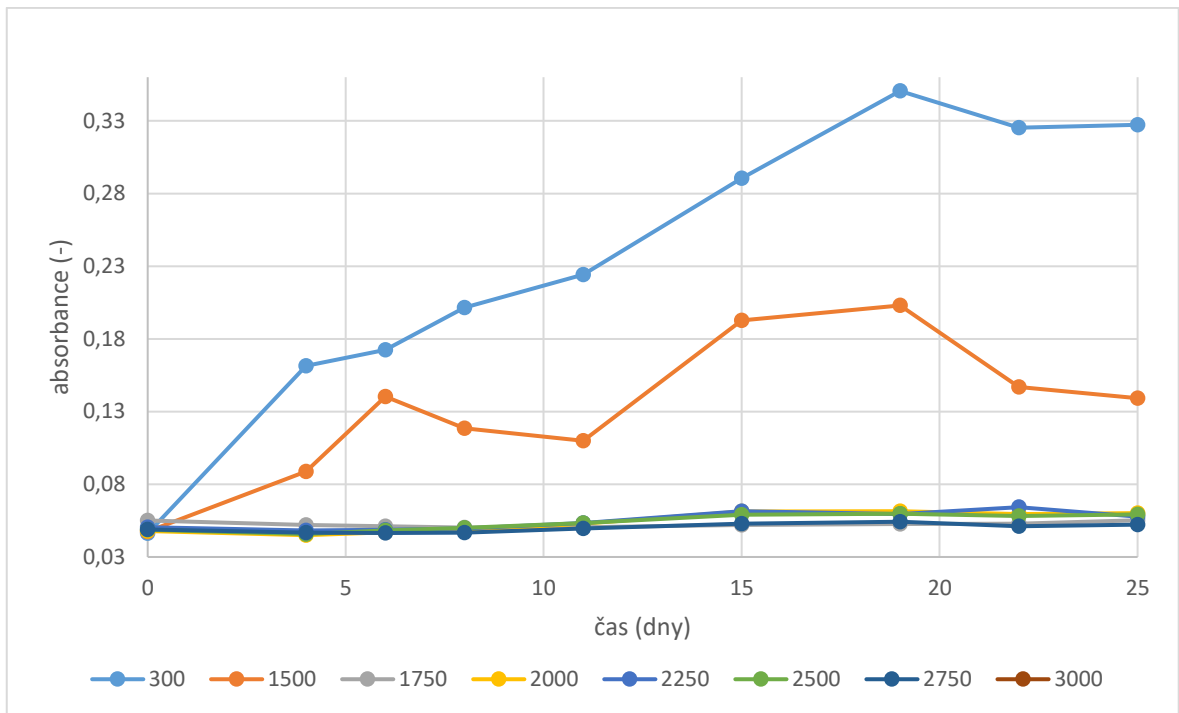
8.4 pokus 5 - Degradční vlastnosti získaných bakterií – koncentrace fenoxxyethanolu 2

Na základě předcházejícího pokusu byl nasazen pokus další, se zvýšenými koncentracemi 2FE, mezi 1500 – 3000 mg/l. Výsledky jsou uvedeny v následujících grafech.



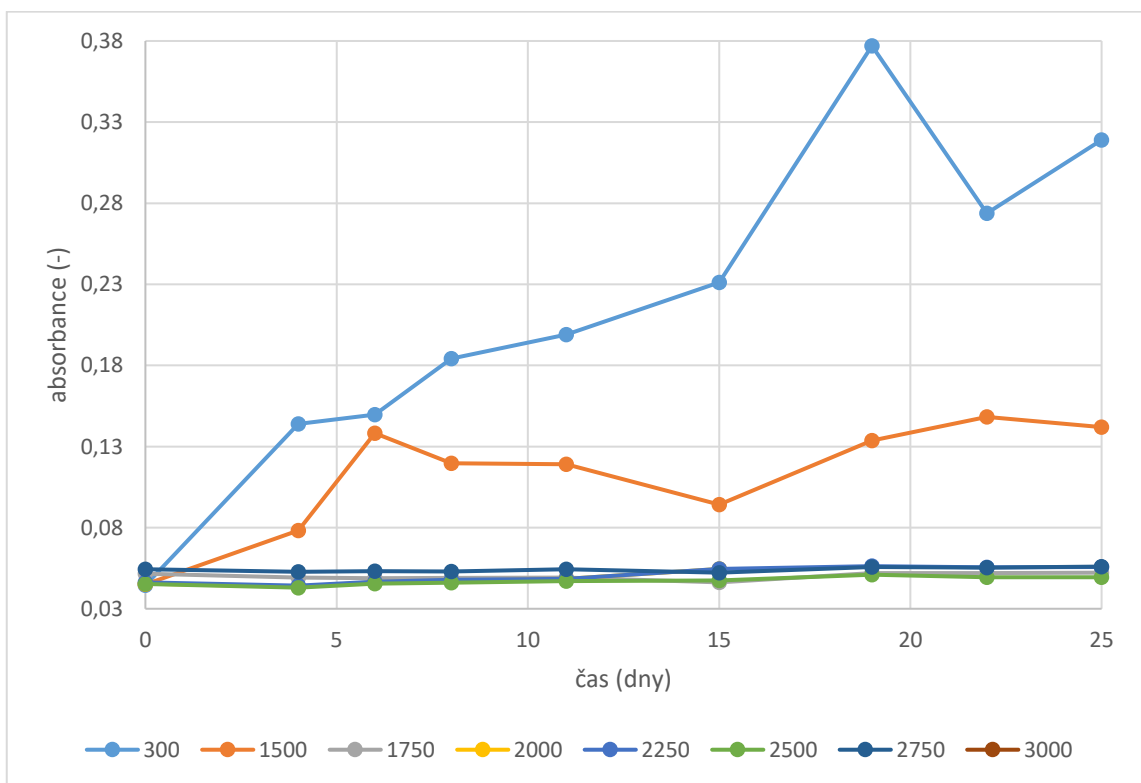
Obrázek 16 Růst kultury R5

Jak je vidět kultura R5 v rámci 15 dní byla schopná růst na 2FE pouze v koncentraci 300 a slabě při 1500 mg/l.



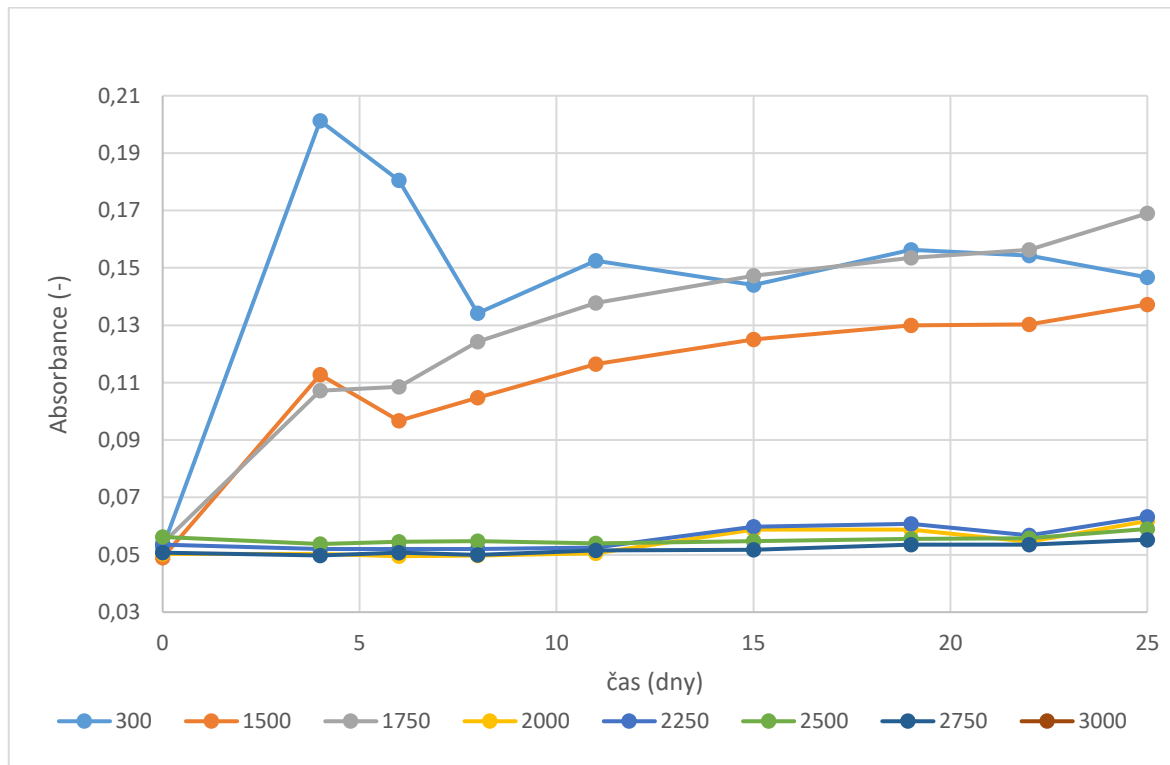
Obrázek 17 Růst kultury P9

P9 vykazala schopnost rozkládat 2FE i při koncentraci 1500 mg/l. Při vyšších koncentracích však neroste.



Obrázek 18 Růst kultury P1

P1 vykazuje velmi podobné chování jako P9, je tedy možné že jde o kulturu stejnou nebo příbuznou.



Obrázek 19 Růst kultury P4

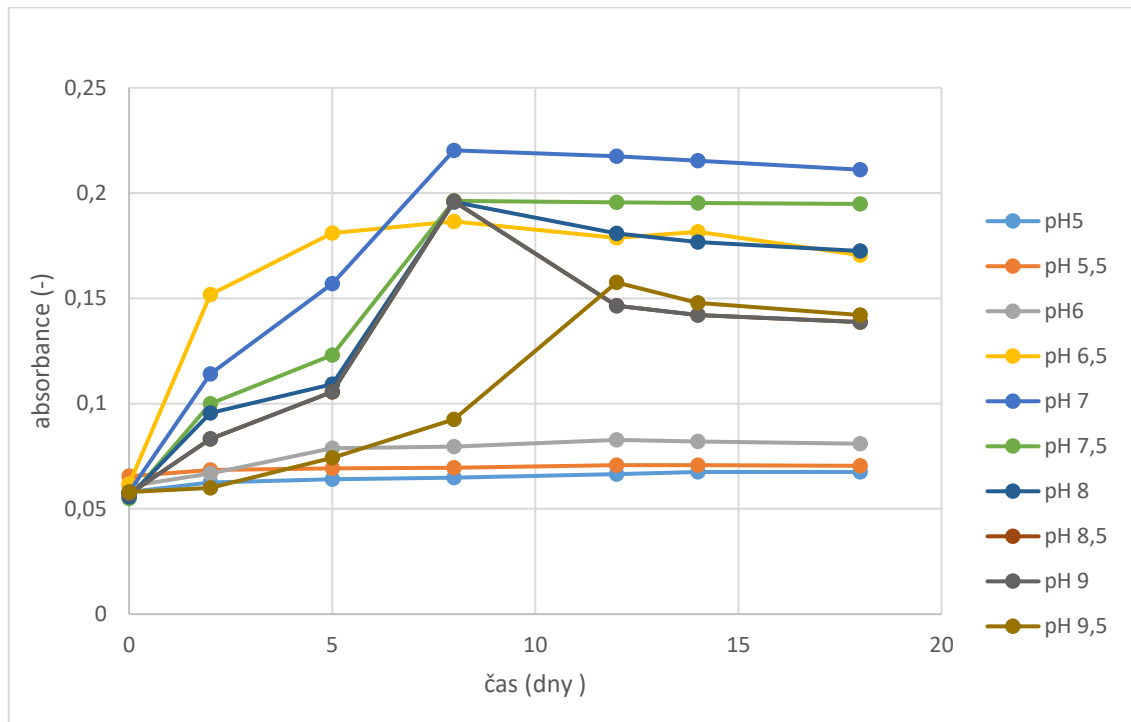
P4 se ukázala jako nejschopnější rozkladač, kdy byla schopná využívat 2FE i při koncentraci 1750 mg/l.

Nižší absorbance u druhého testu koncentrací fenoxethanolu je možno vysvětlit tím, že ačkoliv k rozkladu dochází, dané koncentrace se blíží hraničním 2000 mg/l, která už je zcela inhibiční, čili růst je pomalejší a nedosahuje takových hodnot absorbance jako při nižších koncentracích.

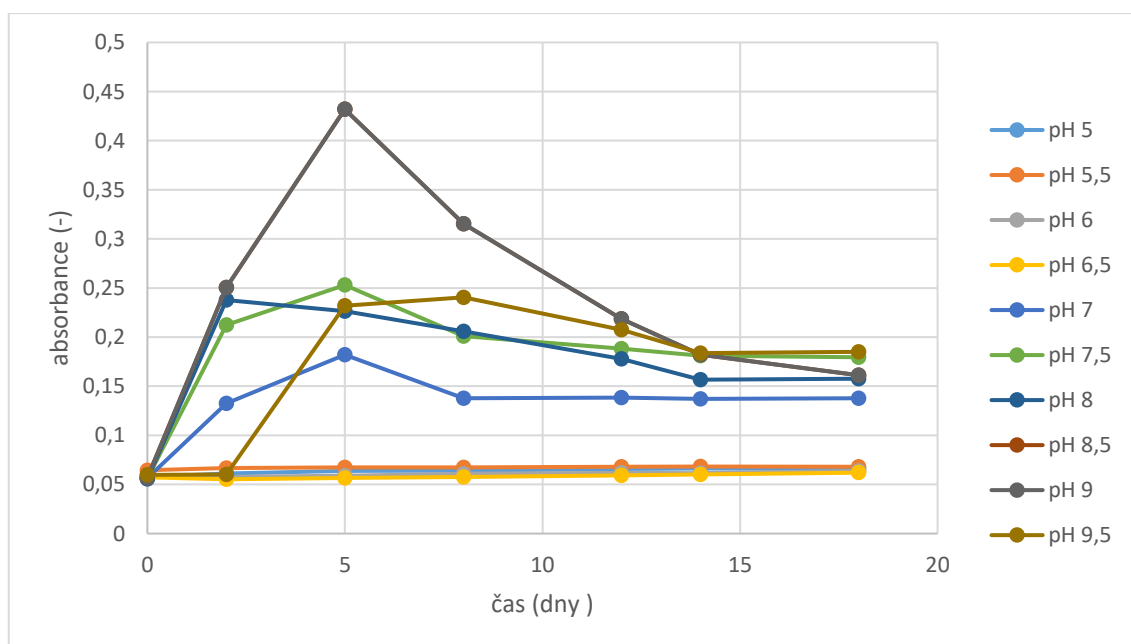
Nutno také podotknout, že po dosažení vrcholu růstu, tedy absorbance, docházelo u P1, P9 a R5 k vytvoření nepravidelného sedimentu, jenž mohl částečně ovlivnit měření. U P4 k této sedimentaci nedocházelo a tvořil se pouze zákal.

8.5 pokus 6 - Růstové vlastnosti získaných bakterií - pH testy

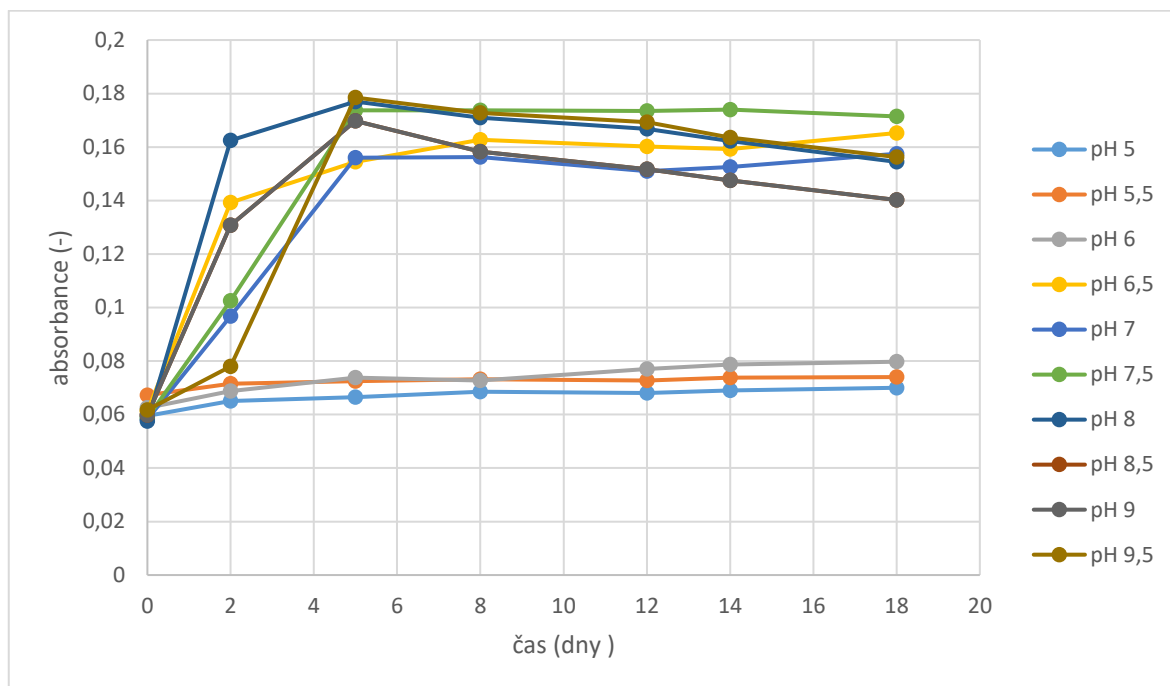
V rámci tohoto pokusu byl sledován růst uvedených kultur v tekutých médiích (MM + 2FE), v rozsahu pH 5,0 – 9,5. Výsledky jsou opět zpracovány formou jednotlivých grafů.



Obrázek 20 Průběh růstu kultury R5 při různých pH



Obrázek 21 Průběh růstu kultury P4 při různých pH



Obrázek 22 Průběh růstu kultury P9 při různých pH

Dané grafy ukazují, že kultury P9 a R5 rostly v rozmezí 6,5 - 9,5 a kultura P4 v rozsahu pH 7,0 – 9,5; tím mohou být označeny za neutrofilní až mírně alkalifilní.

8.6 pokus 7 - Identifikace bakterií

8.6.1 dle 16S rDNA

Bylo postupováno dle postupu uvedeného v metodické části práce. Koncentrace DNA po provedení její izolace z biomasy jednotlivých kultur:

P9: 78,9 ng/μl

R5: 41,4 ng/μl

P4: 57,7 ng/μl

Čistota všech získaných DNA činila 1,96, jde o poměr absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm. Tato hodnota byla pro další použití vyhovující, ideálně by se měla pohybovat v rozmezí od 1,7 do 2,1.

Po provedení všech částí celého postupu (PCR, elektroforéza, purifikace, sekvenace) byly výsledné sekvence překontrolovány a nejasné báze upřesněny. Úseky s chybami byly vyřazeny (bylo jich však málo).

Výsledné sekvence jsou uvedeny v příloze PŘÍLOHA P I: sekvence části genu pro 16S rRNA. Srovnání sekvencí s údaji v databázi GenBank ukázalo, že kultura P4 je se 99,90 % shodou *Hydrogenophaga pseudoflava*. Překvapující však byla skutečnost, že kultury P9 a R5 byly ve výsledku druhově stejné. Jedná se o druh *Zoogloea resiniphila* (P9 – 99,90%, R5 – 99,70%) .

8.6.2 Pomocí technologie MALDI

Jelikož databáze MALDI nebyla pro naše účely plně vhodná, byla uspokojivě identifikována pouze jedna kultura a to P4. Potvrdilo se, že se jedná o zástupce druhu *Hydrogenophaga pseudoflava*. Score bylo 2,335 což je spolehlivý výsledek.

S výsledky identifikace je také možné se domnívat, čím byla způsobena neobyčejná konzistence kultur P9 a R5. Zástupci rodu *Zoogloea* jsou známi vytvářením tzv. kapsulárních polysacharidů, tedy si tvoří na povrchu buněčné stěny silně hydratovaný slizovitý obal. U některých druhů je složen z polysacharidů známých jako algináty, které mají silně gelovitou konzistenci. Takto tvoří tyto bakterie kompaktní kolonie. [13]

Hydrogenophaga pseudoflava

Jde o G- bakterii, popsána poprvé roku 1978 z půdy a bahna. Je oválného tvaru dorůstající asi 2,5 μm . Ve fázi růstu se vyskytují po dvojicích. V tekutém médiu tvoří vločkovitý zákal. Jako zásobní látky si intracelulárně ukládá PHB, glykogen a polyfosfáty. Kolonie jsou žlutého zabarvení. Pigment způsobující toto zabarvení má absorpční maximum při 423-446 nm při rozpuštění v acetonu, jeho přesné složení není známo. Produkce slizovitých povlaků nebyla zaznamenána. Jde o chemoorganotrofní organismus, energii získává také z oxidace molekulárního vodíku za přítomnosti hydrogenázy. Na organických substrátech jsou dusičnany velmi rychle přeměňovány na atmosferický dusík. Je známo nejméně 42 různých organických sloučenin, které mohou této kultuře sloužit jako zdroj uhlíku. Jsou jimi mono- a disacharidy, polyalkoholy, aminokyseliny a aromatické sloučeniny, mezi které patří i 2FE jehož rozklad byl této práci potvrzen. Optimální růstová teplota se pohybuje okolo 35-38°C a maximální je 40-41°C. [12]

Zoogloea resiniphila

Jde o G- bakterii. Netvoří spory. Test na katalázu je negativní, avšak na oxidázu pozitivní. Je fakultativně anaerobní. Je schopna využívat nitráty, není však fermentativní. Patří mezi mezofilní kultury. Buňky dorůstají 1,5-2,8 μm . Tvoří shluky poutané k sobě biopolymerem. Kultury jsou mléčně zakalené a s vysokou adhezí k živné půdě. Jako zdroj uhlíku je schopna využívat palmitovou, benzoovou, octovou, a pyrohroznovou kyselinu, ale stejně tak i D-xylózu, fenol, ethanol, a jak zjištěno v této práci, tak i 2FE. [13]

9 ZÁVĚR

Má bakalářská práce byla zaměřena na studium rozkladu 2-fenoxyethanolu (2FE) pomocí bakterií z aktivovaného kalu. Laboratorní práce probíhaly po cca. 7 měsících.

Pomocí kultivace v tekutém minerálním médiu s přídavkem 2FE byl rozklad pomocí aktivovaného kalu potvrzen růstem mikroorganismů v podobě viditelného zákalu a následně jednoznačným poklesem rozpuštěného organického uhlíku.

Dalším krokem byla izolace a identifikace bakteriálních kultur, zodpovědných za tento rozklad. Pomocí kultivačních metod na dvou druzích živných půd byly na základě vizuálních odlišností kolonií ověřeny a vybrány 4 kultury, a pojmenovány P1, P9, P4 a R5. Tyto bakterie byly podrobeny testům na teplotní rozmezí růstu, pH rozmezí růstu a také byly vypracovány jejich mikroskopické preparáty, kde byly také rozlišeny pomocí Gramova barvení. Také byly provedeny dva testy na růst při různých koncentracích 2FE, ke zjištění průběhu rozkladu a maximální možné koncentrace při které rozklad probíhá.

Z důvodů častých shod a celkové podobnosti výsledků testů kultur P9 a P1 byly na závěr prací tyto považovány za totožné.

Test teplotního rozmezí růstu projevil, že v případě P1, P9, P4 se jednalo o mesofilní bakterie, kdežto R5 se ukázala být psychrofilní.

Gramovo barvení a pořízení mikroskopických snímků ukázalo, že se ve všech případech jedná o gramnegativní bakterie. P1, P9 a R5 si byly velmi vzhledově podobné, šlo o krátké oblé tyčinkovité buňky a v případě P9 a R5 tvořily shluky buněk v těsném uspořádání. Kultura P4 měla tyčinkovité buňky tvořící řetízky.

Testy růstu při různých koncentracích potvrdily předchozí výzkum Bc. Salače [9], kde byl zjištěn inhibiční účinek koncentrace 2FE 2000 mg/l. Nejvyšší možná koncentrace, u které byl zaznamenán aktivní růst získaných kultur, byla 1750 mg/l pro kulturu P4 a 1500 mg/l pro P1, P9 a R5.

Test na růst při různém pH prostředí ukázal, že všechny kultury rostou dobře při neutrálním a mírně alkalickém pH, jelikož růst probíhal v rozmezí 6,5-9,5, resp. 7,0-9,5.

V závěru práce byly kultury R5, P9, P4 identifikovány a bylo zjištěno, že kultury P9 a R5 patří do druhu *Zoogloea resiniphila*, zatímco kultura P4 je příslušníkem druhu *Hydrogenophaga pseudoflava*.

Celkově tedy bakalářská práce ukázala, že rozklad 2FE v aktivovaném kalu probíhá relativně rychle a účastní se na něm více druhů bakterií, při čemž každá taková bakterie je schopna sama růst na 2FE jako jediném zdroji uhlíku a energie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) 2-Phenoxyethanol SAFETY DATA SHEET– SDS, Sigma-Aldrich- 77699
- 2) DRÉNO, B., T. ZUBERBIER, C. GELMETTI, G. GONTIJO a M. MARINOVICH. Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2019, **33**(S7), 15-24. DOI: 10.1111/jdv.15944. ISSN 0926-9959. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jdv.15944>
- 3) LILIENBLUM, Werner, T. ZUBERBIER, C. GELMETTI, G. GONTIJO, M. MARINOVICH a LILIENBLUM. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) – Final version of the opinion on Phenoxyethanol in cosmetic products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2016, **82**(S7), 15-24. DOI: 10.1016/j.yrtph.2016.11.007. ISSN 02732300. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230016303282>
- 4) KIMURA, K., Y. KAMEDA, H. YAMAMOTO, N. NAKADA, I. TAMURA, M. MIYAZAKI a S. MASUNAGA. Occurrence of preservatives and antimicrobials in Japanese rivers. *Chemosphere*. 2014, **107**(S7), 393-399. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.008. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653514000472>
- 5) TAMURA, I. a H. YAMAMOTO. Biodegradation and Photodegradation of Selected Antimicrobial/ Antifungal Agents in the Aquatic Environment and Their Sorption onto Sediments. *Journal of Environmental Chemistry*. 2012, **22**(3), 113-119. DOI: 10.5985/jec.22.113. ISSN 0917-2408.
- 6) ABREU, D. C. P., B. M. C. BOTREL, M. J. F. BAZANA, P. V. E ROSA, P. F. SALES, M. da S. MARQUES a A. A. SACZK. Development and comparative analysis of single-drop and solid-phase microextraction techniques in the residual determination of 2-phenoxyethanol in fish. *Food Chemistry*. 2019, **270**, 487-493. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.07.136. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618312822>
- 7) CROSADO, B., S. LÖFFLER, B. ONDRUSCHKA, .ing ZHANG, J. ZWIRNER a N. HAMMER. Phenoxyethanol-Based Embalming for Anatomy Teaching: An 18 Years' Experience with Crosado Embalming at the University of Otago in New Zealand. *Anatomical Sciences Education*. 2020. DOI: 10.1002/ase.1933. ISSN 1935-9772. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ase.1933>
- 8) PANICO, A., SERIO, F., BAGORDO, F., GRASSI, T., IDOLO, A., DE GIORGI, M., GUIDO, M., CONGEDO, M., & DE DONNO, A. (2019). Skin safety and health prevention: an overview of chemicals in cosmetic products. *Journal of preventive medicine and hygiene*, **60**(1), E50–E57. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2019.60.1.1080>
- 9) J. SALAČ, *Protibakteriální účinky fenoxetylolu a 1-oktyl-2-pyrrolidonu*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015, 107s. (120 988 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/33529>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.

10) VARMUŽOVÁ, T. *Biodegradace s využitím termofilních mikroorganismů*. 2009. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA.

11)

SPERANZA, G., B. MUELLER, M. ORLANDI, C. F. MORELLI, P. MANITTO a B. SCHINK. Mechanism of Anaerobic Ether Cleavage. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(14), 11684-11690. DOI: 10.1074/jbc.M111059200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111059200>

12) AULING, G., M. REH, C. M. LEE a H. G. SCHLEGEL. *Pseudomonas pseudoflava*, a New Species of Hydrogen- Oxidizing Bacteria: Its Differentiation from *Pseudomonas flaua* and Other Yellow-Pigmented, Gram-Negative, Hydrogen-Oxidizing Species. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*. U.S.A, 1978, **28**, No. **1**, 82-95.

13) MOHN, W. W., A. E. WILSON, P. BICHO a E. R. B. MOORE. Physiological and Phylogenetic Diversity of Bacteria Growing on Resin Acids. *Systematic and Applied Microbiology*. Urban & Fischer Verlag, 1999, (22), 68-78.

14) M. NĚMEC D. MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.

15) *MALDI–TOF MS* [online]. VŠCHT UMTK, 2016 [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/maldi-tof-ms/>

16) *Identifikace mikroorganismů pomocí sekvence jejich genu pro 16S rRNA* [online]. VŠCHT PRAHA [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/13102969-Identifikace-mikroorganismu-pomoci-sekvence-jejich-genu-pro-16s-rrna.html>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2FE	2-Fenoxyethanol
MM	Minerální médium
P1, P4, P9, R5	Označení zkoumaných kultur

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura 2-fenoxyethanolu	11
Obrázek 2 Kyselina fenoxyoctová	12
Obrázek 3 Proces štěpení etherové vazby 2FE [11]	16
Obrázek 4 Vývoj poklesu DOC během 10 dní	36
Obrázek 5 Kultura R5, barvení dle Grama	37
Obrázek 6 R5 shluk, barvení dle Grama	38
Obrázek 7 Kultura P9, barvení dle Grama.....	38
Obrázek 8 Kultura P9, barvení dle Grama.....	38
Obrázek 9 Kultura P, barvení dle Grama.....	39
Obrázek 10 Kultura P4, barvení dle Grama.....	39
Obrázek 11 Kultura P4, barvení dle Grama.....	40
Obrázek 12 Růst kultury P1	41
Obrázek 13 Růst kultury P9	42
Obrázek 14 Růst kultury P4.....	42
Obrázek 15 Růst kultury R5	43
Obrázek 16 Růst kultury R5	44
Obrázek 17 Růst kultury P9.....	45
Obrázek 18 Růst kultury P1.....	45
Obrázek 19 Růst kultury P4.....	46
Obrázek 20 Průběh růstu kultury R5 při různých pH	47
Obrázek 21 Průběh růstu kultury P4 při různých pH.....	47
Obrázek 22 Průběh růstu kultury P9 při různých pH.....	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka č.1 Chemicko – fyzikální vlastnosti 2FE	11
Tabulka č.2 Působení 2FE na různé kultury (dle [9] modifikováno).....	14
Tabulka č.3 Rozmístění na mikrotitrační destičce.....	30
Tabulka č.4 poměry KH_2PO_4 a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	31
Tabulka č.5 Rozmístění pH testů na mikrotitračních destičkách.....	32
Tabulka č.6 Určení rozpuštěného organického C.....	35
Tabulka č.7 test teplotního rozmezí růstu.....	40

PŘÍLOHY

PŘÍLOHA P I: sekvence části genu pro 16S rRNA

Kultura P9

Forward primer

984 bázi

TGCAAGTTCGAACGGCAGCACGGGCTTCCGGCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATG
CATCGGAACGTACCGTGTAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATAACGCC
CCGAGGGGGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCACGCTATATGAGCGGCCGATGTCGGATTAGC
TAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAA
TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCTCTT
TCAGACGGAAAGAAATCTCTTGGGTTAATACCTGGGAGGATGACGGTACCGTAAGAAGAAGC
ACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTGATGTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCGTTTGTGACTGCATCACTCGAGTACGGCAGAGGGAGGTGGAATTCGCGTGTAGCAGT
GAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGCCAGTACTGACG
CTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACG
ATGTCAACTAGTTGTTTCGGTGAGGAGACTCATTGAGTAACGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAGAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG
GATGATGTGGATTAATTCTATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCAGGAACTT
ACCAGAGATGGTTTGGTGCTCTAAAAAGAGCCTG

Zoogloea resiniphila strain DhA-35 16S ribosomal RNA, partial sequence 1777 1777
100% 0.0 **99.29%** NR_027188.1

Kultura P9

Reverse primer

1033 bázi

CCCAGTCATGAAGCTCACCGTGGTAAGCGCCCTCCTTGCGGTTAAGCTACCTACTTCTGGTAAA
CCCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCATGC
TGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTAC
GATCGGCTTTCTGGGATTGGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTATGA
CGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTG
TCACCGGCAGTCTCGCTAAAGTGCCCAACTTAATGATGGCAATTAACGACAAGGGTTGCGCTCG
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCCA
GGCTCTTTTCGAGCACAAACCATCTCTGGTAAGTTCCTGGCATGTCAAGGGTAGGTAAGGTT
TTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTG
AGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTGCGTTACTCAATG
AGTCTCCTCACCGAACAAC TAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACTGGCCAGGAGGCTGCCTTCGCCATCG
GTGTTCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCCACCTCCCTCTGCCGTA
CGAGTGATGCAGTCACAAACGCAGTTCCAGGTTGAGCCCCGGGATTTACATCTGTCTTACAT
CACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCTACGTATTACCGC
GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTTACGGTACCGTCATCCTCCAGGGTATTAAC
CCAA

Zoogloea resiniphila strain DhA-35 16S ribosomal RNA, partial sequence 1905 1905
100% 0.0 **99.90%** NR_027188.1

Zoogloea caeni strain EMB43

16S ribosomal RNA, partial sequence 1847 1847

99% 0.0 **99.03%**

NR_043795.1

Kultura R5**Forward primer****1018 bází**

ATTGCAAGTYCGAACGGCAGCACGGGCTTTCGGCCTGGTGGCGAAGTGGCGAACGGGTGAGTA
 ATGCATCGGAACGTACCGTGTAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGTAATACCGCATA
 GCCCTGAGGGGAAAGTGGGGGACCGTAAGGCCTCACGCTATATGAGCGGCCGATGTCGGATT
 AGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATC
 CGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGA
 CAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGC
 TCTTTCAGACGGAAAGAAATCTCTCAGGATAATACCTTGGGAGGATGACGGTACCGTAAGAAG
 AAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAA
 TTA CTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTGATGTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC
 CTGGGAACTGCGTTTGTGACTGCATCACTCGAGTACGGCAGAGGGAGGTGGAATTCGCGTGTA
 GCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGCCAGTAC
 TGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
 AAACGATGTCAACTAGTTGTTTCGGTGAGGAGACTCATTGAGTAACGCAGCTAACGCGTGAAGTT
 GACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
 CGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCAGG
 AACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCTCGAAAGAGAGCCTGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTG
 CAGCTC

Zoogloea resiniphila strain DhA-35 16S ribosomal RNA, partial sequence 1823 1823
 99% 0.0 **99.11%** NR_027188.1

Kultura R5**Reverse primer****1031 bází**

ACTTACCCAGTCATGAAGCTCACCGTGGTAAGCGCCCTCCTTGCGGTTAAGCTACCTACTTCT
 GGTA AACCCCACTCCCATTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGC
 AGCATGCTGATCGGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCC
 GGACTACGATCGGCTTTCTGGGATTGGTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCA
 TTGTATGACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCT
 CCGTTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAAAGTGCCCAACTTAATGATGGCAATTAACGACAAGGGT
 TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACC
 TGTGTCCAGGCTCTCTTTCGAGCACCAAACCATCTCTGGTAAGTTTCTGGCATGTCAAGGGTAG
 GTAAGGTTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTC
 AACCTTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTGCGTT
 ACTCAATGAGTCTCCTCACCGAACA ACTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTAT
 CTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACTGGCCCAGGAGGCTGCCTTC
 GCCATCGGTGTTCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCCACCTCCCTCTG
 CCGTACTCGAGTGATGCAGTCACAAACGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCTGT
 CTTACATCACCGCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTAT
 TACCGCGGCTGCTGGCACGTATTTAGCCGGTGCTTCTTCTTACGGTACCGTCATCCTCCCAAGGA
 T

Zoogloea resiniphila strain DhA-35 16S ribosomal RNA, partial sequence 1886 1886
 99% 0.0 **99.71%** NR_027188.1

Zoogloea caeni strain EMB43

16S ribosomal RNA, partial sequence 1840 1840

98% 0.0 **99.31%**

NR_043795.1

Kultura P4**Reverse primer****1047 bází**

CCCCAGTCACGAACCCCGCCGTGGTAATCGCCCTCCTTGCGGTTAGGCTAACTACTTCTGGCGA
GACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTGACATG
CTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTA
CGACCGGCTTTATGGGATTGGCTCCCCCTTGCGGGTTGGCTGCCCTTTGTACCGGCCATTGTATG
ACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTT
GTCACCGGCAGTCCCATTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAATGGCAAGGGTTGCGCTCGTTGC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGCAGGTT
CTCTTTCGAGCACGAATCCATCTCTGGAAACTTCTGCCATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCG
CGTTGCATCGAATTAACCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT
CAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGAAAGTA
AATTCCCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGC
TCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTGCAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTT
CTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCATCCGCCTCTGCCGCACTCCAGCC
TTGCAGTCACAAGCGCAATTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACGCCTGTCTTACAAAACCGC
CTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATTAGTCCAGGGTATTAACCCAGAC
CGTTTCGTTCCGTACAAA

***Hydrogenophaga pseudoflava* strain NBRC 102511 16S ribosomal RNA, partial sequence**
1929 1929 100% 0.0 **99.90%** NR_114130.1

***Hydrogenophaga pseudoflava* strain DSM 1034 16S ribosomal RNA, partial sequence**
1917 1917 100% 0.0 **99.71%** NR_114857.1

***Hydrogenophaga bisanensis* strain K102 16S ribosomal RNA, partial sequence**
1912 1912 100% 0.0 **99.62%** NR_044268.1

***Hydrogenophaga pseudoflava* strain GA3 16S ribosomal RNA, partial sequence**
1912 1912 100% 0.0 **99.62%** NR_028717.1

***Hydrogenophaga flava* strain NBRC 102514 16S ribosomal RNA, partial sequence**
1906 1906 100% 0.0 **99.52%** NR_114133.1

***Hydrogenophaga flava* strain 2 16S ribosomal RNA, partial sequence**
1895 1895 100% 0.0 **99.33%** NR_028718.1

***Hydrogenophaga flava* strain DSM 619 16S ribosomal RNA, partial sequence**
1884 1884 100% 0.0 **99.14%** NR_114858.1