Využívání fenolických látek bakteriemi při nízké teplotě

Adriana Slivová

Bakalářská práce
2024

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Adriana Slivová**
Osobní číslo:	**T21952**
Studijní program:	**B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace:	**Ochrana životního prostředí**
Forma studia:	**Prezenční**
Téma práce:	**Využívání fenolických látek bakteriemi při nízké teplotě**

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši zaměřenou na růst bakteriálních kultur na fenolu při různých teplotách a také na základní přehled bakterií využívajících k růstu resorcinol.
Experimentálně ověřte růstové vlastnosti dříve získaných bakterií na fenolu a resorcinolu při 8°C.
Pokuste se získat bakteriální kulturu či kultury rostoucí na resorcinolu při teplotě okolo 8°C.
Získané poznatky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v tištěné i elektronické formě v řádném termínu.

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

Seznam doporučené literatury:

Čejková A. a kol.: Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 21, 317–321.
Bergauer Ph. a kol.: Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. Chemosphere, 2005, 59, 909–918.
Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science a ScienceDirect.

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

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORKY
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 pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na ověření výskytu bakterií schopných využívat resorcinol při nízkých teplotách ve vnějším prostředí. Nejprve byl studován bakteriální kmen 10AZS, dříve izolovaný z potoční vody, který byl schopen rozkládat resorcinol jako jediný zdroj uhlíku a energie. Kultura byla charakterizována jako grampozitivní nefermentující bakterie tyčinkovitého tvaru. Dále byly testovány různé koncentrace resorcinolu a fenolu, které byla tato kultura schopna využívat, přičemž nejlepší růst při 8 °C byl zaznamenán při koncentracích resorcinolu 250 a 375 mg/l a při koncentracích fenolu 375, 500 a 750 mg/l. V další části práce se ze 17 vzorků povrchových vod i aktivovaného kalu podařilo získat celkem deset mikrobiálních kmenů se schopností růstu na resorcinolu při 8 °C. Jednalo se o osm gramnegativních bakteriálních kmenů s buňkami kokovitého či tyčinkovitého tvaru a dva kmeny kvasinek. Práce tak ukázala, že výskyt mikroorganismů s uvedenou růstovou schopností není ve vnějším prostředí nijak ojedinělý.

Klíčová slova: resorcinol, bakterie, růst

ABSTRACT

The study aimed to investigate the presence of bacteria capable of utilizing resorcinol at low temperatures in the environment. Firstly, the bacterial strain 10AZS, previously isolated from stream water, was examined. This strain demonstrated the ability to degrade resorcinol as the sole source of carbon and energy. The strain was characterized as gram-positive, non-fermenting, rod-shaped bacteria. The different concentrations of resorcinol and phenol that the culture was able to use were also tested, revealing optimal growth at 8 °C with resorcinol concentrations of 250 and 375 mg/l, and phenol concentrations of 375, 500, and 750 mg/l. In the subsequent phase of the study, ten microbial strains capable of growing on resorcinol at 8 °C were obtained from 17 samples of surface water and activated sludge. These included eight gram-negative bacterial strains with cocci or rod-shaped cells, along with two yeast strains. The study showed that microorganisms with the mentioned growth capability are not uncommon in the external environment.

Keywords: resorcinol, bacteria, growth

Mockrát děkuji vedoucímu mé bakalářské práce, panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, PhD., za trpělivost, veškeré rady při psaní práce, pomoc při provádění pokusů v laboratoři a za získané zkušenosti.

Ráda bych také poděkovala své rodině za všechnu podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD **9**

I TEORETICKÁ ČÁST **10**

1 CHARAKTERISTIKA LÁTEK **11**

1.1 FENOL 11

1.2 RESORCINOL 12

1.2.1 Struktura 12
1.2.2 Fyzikální a chemické vlastnosti 12
1.2.3 Výroba 12
1.2.4 Využití 12
1.2.5 Toxicita 13

2 BIODEGRADACE RESORCINOLU A FENOLU **14**

2.1 BAKTERIE SCHOPNÉ ROZKLADU RESORCINOLU 14

2.2 MIKROORGANISMY SCHOPNÉ ROZKLADU FENOLU 18

3 CÍLE PRÁCE **22**

II PRAKTICKÁ ČÁST **23**

4 METODIKA **24**

4.1 POUŽITÉ KULTURY 24

4.2 POUŽITÉ VZORKY VOD 25

4.3 ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA 26

4.4 PŘÍSTROJE 28

4.5 POSTUPY TESTŮ S DŘÍVE ZÍSKANÝMI KULTURAMI 29

4.5.1 Pokus 1 – ověření schopnosti růstu kultur 1AZS, 5BZS, 8AZS a 10AZS při 8 °C, při využití resorcinolu jako jediného zdroje uhlíku a energie 29
4.5.2 Pokus 2 – ověření růstu kultury 10AZS na různých koncentracích resorcinolu při 8 °C a 23 °C 31
4.5.3 Pokus 3 – ověření růstu kultury 10AZS na různých koncentracích fenolu při 8 °C a 23 °C 32

4.6 POSTUPY TESTŮ S NOVĚ ZÍSKANÝMI KULTURAMI Z POVRCHOVÝCH VOD 34

4.6.1 Pokus 4 – získávání bakterií rostoucích na resorcinolu při 8 °C 34
4.6.2 Gramovo barvení získaných kultur 37
4.6.3 Konzervace získaných kultur 38

5 VÝSLEDKY A DISKUZE **39**

5.1 RŮST DŘÍVE ZÍSKANÝCH KULTUR 1AZS, 5BZS, 8AZS A 10AZS PŘI 8 °C NA RESORCINOLU JAKO JEDINÉM ZDROJI UHLÍKU A ENERGIE (POKUS 1) 39

5.2 RŮST KULTURY 10AZS NA RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH RESORCINOLU PŘI 8 °C A 23 °C (POKUS 2) 41

5.3 RŮST KULTURY 10AZS NA RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH FENOLU PŘI 8 °C A 23 °C (POKUS 3) 43
5.4 ZÍSKÁVÁNÍ BAKTERIÍ ROSTOUCÍCH NA RESORCINOLU PŘI 8 °C (POKUS 4) 46
5.5 GRAMOVO BARVENÍ 52
ZÁVĚR 53
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 55
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 59
SEZNAM OBRÁZKŮ 60
SEZNAM TABULEK 61
SEZNAM PŘÍLOH 62

ÚVOD

Neustále rostoucí lidská aktivita je spojena se vzrůstem nejrůznějších sloučenin, které se do životního prostředí dostávají průmyslovou či jinou antropogenní činností. Některé z těchto sloučenin jsou zcela cizorodé, jiné se blíží nebo jsou identické těm přírodním. Některé z nich představují environmentální hrozby z hlediska jejich toxicity či škodlivosti a mnohé mohou negativně ovlivnit ekosystémy a biodiverzitu. Je tedy nezbytné hledat účinné mechanismy pro odstranění takových látek z prostředí.

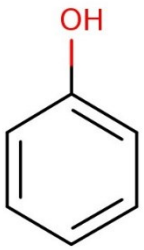
Významným činitelem rozkladu většiny organických látek ve vnějším prostředí jsou mikroorganismy. Poznávání mikroorganismů, které dokáží za nějakých podmínek rozkládat určité lidmi produkované kontaminanty, je pro nás důležité. Porozumění těmto organismům může poskytnout cenné poznatky pro návrh strategií na ochranu přírody a dá se díky tomu odhadnout, v jakých prostředích bude rozklad – a tím i likvidace těchto látek – probíhat.

Mezi takové látky lze zařadit i fenolické sloučeniny, konkrétně resorcinol. Spolu s fenolem se resorcinol řadí mezi toxické sloučeniny. Protože o výskytu mikroorganismů, které by byly schopny v prostředí resorcinol rozkládat, není mnoho známo, rozhodli jsme se tento problém mírně prozkoumat. Cílem práce je zjištění, zda se v běžných povrchových vodách vyskytují bakterie, které jsou schopny využívat jej pro svůj růst za nízkých teplot.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA LÁTEK

1.1 Fenol



Obrázek 1: Molekula fenolu – strukturní vzorec

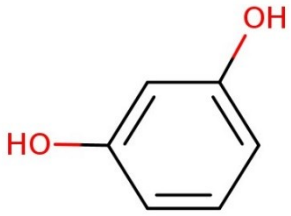
Fenol, dále také benzol, kyselina karbolová, monohydroxybenzen či oxybenzen, je sloučenina obsahující hydroxylovou skupinu na benzenovém jádře. Je to bílá či bezbarvá pevná látka, k dostání je však většinou v kapalném stavu jako roztok. Má charakteristický nasládlý zápach, který může vyvolat podráždění.

Je to slabě těkavá látka běžně se vyskytující v přírodě, jelikož přirozenými producenty jsou živé organismy. Může se také do prostředí dostávat z procesů vlastní výroby a z používání výrobků, které ho obsahují (desinfekční prostředky, léčiva aj.). Z půdy se fenol dostává do povrchových i podzemních vod, pro vodní faunu může být toxický a má dlouhotrvající účinky.

Fenol se uplatňuje v chemickém průmyslu (při výrobě plastů, kaprolaktamu a pesticidů), ve farmacii a lékařství. Jeho nadměrné působení může poškozovat mozek, gastrointestinální trakt i kardiovaskulární systém. Může způsobovat genetické poruchy a je toxický pro vodní organismy, zejména pro ryby. [1, 2, 3]

1.2 Resorcinol

1.2.1 Struktura



Obrázek 2: Molekula resorcinolu – strukturní vzorec

Resorcinol, též resorcin, 1,3-dihydroxybenzen, 1,3-benzendiol, je organická látka obsahující dvě hydroxylové skupiny na benzenovém jádře. Jeho chemický vzorec je $C_6H_6O_2$. [4]

1.2.2 Fyzikální a chemické vlastnosti

Jedná se o pevnou vločkovitou látku bělavé barvy s nepříjemným zápachem podobným fenolu. Je hořlavý, ale není snadno zápalný. Molární hmotnost resorcinolu je 110,11 g/mol. Teplota varu je 277–280 °C, teplota tání 108–110 °C, bod vzplanutí 127 °C a hustota 1,28 g/cm^3. Rozpustnost ve vodě je 717 g/l při 25 °C. Poločas rozpadu v atmosféře je 38,16 minut. [5, 6]

1.2.3 Výroba

Resorcinol se dříve vyráběl sulfonací benzenu. Výsledná kyselina m-benzendisulfonová v tomto případě reaguje s hydroxidem sodným za vzniku resorcinolu a síranu sodného. Tento způsob je však ekonomicky nevýhodný. Druhou metodou je alkylace benzenu propylenem za vzniku 1,3-diisopropylbenzenu a následná oxidace a přeskupení (Hockovým procesem) za vzniku resorcinolu a acetonu. Existuje ještě několik dalších cest pro výrobu resorcinolu, například z pryskyřic. [7]

1.2.4 Využití

Resorcinol se používá v průmyslu (výroba polymerů, chemikálií, pneumatik, dále ve fotografii a kožedělném průmyslu). Může být obsažen v nátěrových hmotách, lepidlech, tmelech, barvivech a pryskyřicích. Používá se také v kosmetice a ve farmacii – je obsažen v barvách na vlasy a v dermatologických lécích k léčbě akné, seborei nebo ekzémů. [5, 8]

1.2.5 Toxicita

Resorcinol je velmi nebezpečný pro životní prostředí. Při dlouhodobém účinku je škodlivý pro vodní organismy. U člověka má vliv na hormonální systém, způsobuje poškození orgánů, vážné poškození očí a může způsobit alergickou kožní reakci.

Biodegradace ve vodě je při nízkých koncentracích snadná.

Předvídatelná koncentrace, která nemá žádný toxický efekt vůči organismům: ve sladké vodě je tato hodnota 17,2 µg/l, ve slané 1,72 µg/l. V čistírnách odpadních vod 790 µg/l, v sedimentu 79,7 µg/kg. [5]

Další údaje o toxicitě resorcinolu jsou uvedeny v tab. 1.

Tabulka 1: Biologické účinky resorcinolu na různé organismy [5, 6]

Krátkodobá letální koncentrace pro ryby	LC50 (4 dny)	26,8–29,5 mg/l
Dlouhodobá letální koncentrace pro ryby	LC50 (60 dní)	320 mg/l
Toxicita pro mikroorganismy (bakterie)	EC50 (3 hodiny)	79 mg/l
Toxicita pro dafnie a jiné vodní bezobratlé	LC50 (48 hodin)	1 mg/l
Krátkodobě působící netoxická koncentrace pro vodní organismy	NOEC (48 hodin)	320 µg/l
Dlouhodobě působící netoxická koncentrace pro vodní organismy	NOEC (21 dní)	172 µg/l

2 BIODEGRADACE RESORCINOLU A FENOLU

Schopnost jednobuněčných organismů využívat přirozeně se vyskytující organické sloučeniny, která se vyvíjela miliony let, je v dnešní době ovlivněna chemikáliemi antropogenního původu vnesenými do životního prostředí. Monoaromatické sloučeniny se staly běžnými kontaminanty životního prostředí. [8]

Odbouratelnost fenolických sloučenin souvisí s jejich strukturou. P-substituované fenoly bývají lépe degradovatelné než m- nebo o-substituované. Resorcinol je pomaleji rozložitelný než fenol. *„I přes toxicitu těchto substrátů mohou některé mikroorganismy tyto látky využívat jako jediný zdroj uhlíku a energie za aerobních podmínek.“* [9] Toto odbourávání vyžaduje specifické vlastnosti mikroorganismů – bakterie či jiné organismy musí být vybaveny příslušnými geny, aby dokázaly vytvářet enzymy potřebné k rozkladu fenolických látek. [10]

2.1 Bakterie schopné rozkladu resorcinolu

Bakteriální rozklad resorcinolu není příliš častým námětem vědeckých prací, přesto lze v odborné literatuře najít několik zdrojů věnujících se této problematice.

Aktivovaný kal

V jedné ze studií byla porovnávána biologická degradace fenolu, resorcinolu a 5-methylresorcinolu s použitím vzorků aktivovaného kalu – biodegradabilita těchto sloučenin byla vyšetřována respirometricky. Analýzy byly provedeny s koncentracemi resorcinolu 0,55 mg/l; 1,10 mg/l; 1,65 mg/l; 2,75 mg/l; 4,40 mg/l a 5,51 mg/l (0.005 mM, 0.01 mM, 0.015 mM, 0.025 mM, 0.04 mM a 0.05 mM). Pokusy probíhaly při 20 °C. Bylo prokázáno, že fenol měl z uvedených tří substrátů nejvyšší hodnoty spotřeby kyslíku a resorcinol spolu s 5-methylresorcinolem byly degradovány pomaleji. Výsledky ukázaly, že fenol byl degradován asi dvakrát rychleji nežli resorcinol. Všechny tři substráty nicméně degradovatelné byly. [10]

V další ze studií byla zkoumána současná biodegradace resorcinolu a fenolu pomocí směsné mikrobiální kultury ve vsádkovém reaktoru. Směsný mikrobiální kal byl odebrán z odpadní vody v čistírně odpadních vod koksárenského průmyslu v Indii. Pro obě látky bylo zvoleno rozmezí koncentrací 100–400 mg/l, degradace probíhala při teplotě 30 °C. Fenol byl pro mikroorganismy mnohem jednodušším zdrojem uhlíku; kultura potřebovala více času k degradaci resorcinolu, nicméně byla schopna oba substráty rozložit. Ve studii

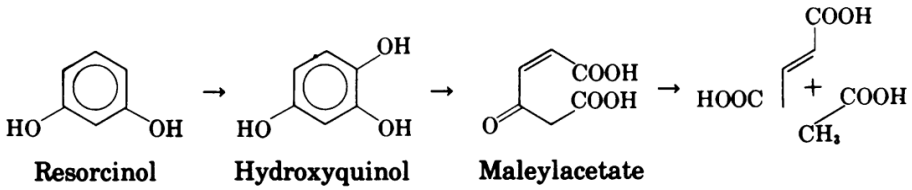
bylo také zjištěno, že specifická rychlost růstu kultury i specifická rychlost rozkladu substrátu byly nižší při použití fenolu a resorcinolu jako dvojího substrátu ve srovnání s jejich přítomností jako substrátů samostatných. Resorcinol a fenol na sebe jako substráty velmi silně působily a vzájemně inhibovaly rychlost degradace, a to jak v nízké, tak ve vysoké koncentraci. [11]

Pseudomonas putida

Bylo zjištěno, že buňky dvou kmenů *Pseudomonas putida* (O1 a ORC), pěstované na substrátu s orcinolem, byly také schopny rozkládat resorcinol. Oba bakteriální kmeny byly izolovány z obohacených kultur s orcinolem.

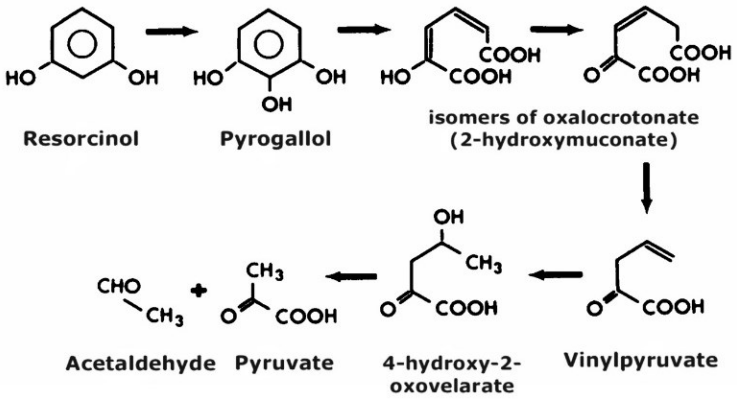
Růst gramnegativních bakterií *P. putida* probíhal v tekutých živných médiích. Kultury byly získány inokulací minerálních médií s hodnotami pH 6,8 až 7,1 a zdrojem uhlíku a energie. Použitými zdroji byly orcinol, sukcinát (jantaran) a resorcinol o koncentraci 0,5–1 g/l (0,05–0,1 %). Kultury byly inkubovány při 30–33 °C po dobu 16 až 20 h.

V práci byl rovněž studován průběh rozkladu resorcinolu z pohledu vzniku meziproduktů, získané údaje byly vyjádřeny graficky a jsou uvedeny na obr. 3. [12]



Obrázek 3: Katabolismus resorcinolu (*Pseudomonas* sp.)

Rozklad resorcinolu byl předmětem studií i v dalších pracích, jedna z nich se věnovala degradaci resorcinolu bakterií *Azotobacter vinelandii*, přepokládané vznikající meziprodukty jsou uvedeny na obr. 4. [13]



Obrázek 4: Katabolismus resorcinolu (*A. vinelandii*)

Rhodococcus erythropolis

V další ze studií byl zkoumán potenciál kmene *Rhodococcus erythropolis* (CCM 2595), grampozitivní bakterie, využívat řadu monoaromatických sloučenin jako jediný zdroj uhlíku a energie. Bylo potvrzeno, že tato schopnost závisí na počáteční koncentraci a na konkrétním substrátu. V pokusech při kultivační teplotě 20 °C byl použit fenol, resorcinol, katechol a další látky. V menších koncentracích (0,1 – 0,5 g/l) byla kultura schopna využívat resorcinol jako zdroj pro svůj růst, se zvyšujícími koncentracemi (0,5 – 1,5 g/l) tato schopnost klesala. Resorcinol byl pro tuto bakteriální kulturu lepším živným médiem nežli fenol (kultura dosahovala maxima růstu při vyšších koncentracích substrátu a v případě resorcinolu byla schopna růstu až do koncentrace 2 g/l, u fenolu jen do koncentrace 1 g/l). [8]

Corynebacterium glutamicum

Jedná se o grampozitivní bakterii, která je využívána pro průmyslovou výrobu aminokyselin a vitaminů. Bylo prokázáno, že *C. glutamicum* může využívat různé aromatické sloučeniny (včetně resorcinolu) jako jediný zdroj uhlíku a energie. Pro testování schopnosti růstu na aromatických sloučeninách byla kultura inokulována do média s minerálními solemi, které obsahovaly 4 mmol/l aromatických sloučenin (0,44 g/l pro resocinol). Kultivace probíhala při 30 °C. [14]

Azotobacter vinelandii

V této studii byla zkoumána metabolická dráha mikrobiálního katabolismu resorcinolu, protože se mírně lišila od dvou již známých způsobů rozkladu. Gramnegativní bakterie *A. vinelandii* (ATCC 12837) byla získána z americké sbírky typových kultur (American Type Culture Collection). Zdrojem uhlíku byla glukóza (1 %), aromatické sloučeniny v koncentraci 0,5 g/l (0,05 %) nebo jejich kombinace. Buňky byly kultivovány při 30 °C. Kultura *Azotobacter vinelandii* degradovala resorcinol a následně byla schopna oxidovat i řadu dalších aromatických sloučenin (fenol, p-kresol, pyrogallol). [13]

Rhodococcus opacus

Bakterie (konkrétně kmen RW) schopné degradace resorcinolu byly objeveny také ve střevním traktu termita *Macrotermes michaelseni*. Tento druh bakterií byl také schopen rozkladu fenolu a kyseliny benzoové. Růst bakterií byl sledován pomocí optické denzity a byly použity koncentrace resorcinolu v rozmezí 0,06–0,99 g/l. Inkubace probíhala

po dobu jednoho týdne při teplotě 27 °C. Bakterie byly však schopny růst v rozmezí teplot od 4 do 30 °C. [15]

Degradace v anaerobních podmínkách

Výše uvedené druhy bakterií byly schopny degradace při aerobních podmínkách. Doposud bylo popsáno i několik mikroorganismů, které by byly rozkladu fenolických látek schopny při anaerobních podmínkách; jejich počet postupně vzrůstá.

Německá studie prokázala, že byl resorcinol využíván jako zdroj energie i organického uhlíku za přísně anaerobních podmínek dvěma druhy bakterií redukujících dusičnany. Jednalo se o gramnegativní bakterie, jeden z kmenů (LuBRes1) byl fakultativně anaerobní a byl identifikován jako *Alcaligenes denitrificans*, druhý z kmenů (LuFRes1) nebyl zařazen do žádného existujícího druhu. Koncentrace resorcinolu byla 2 mM (220 mg/l), experiment byl prováděn při teplotě 28 °C, oba kmeny substrát kompletně zoxidovaly na CO_2. Práce byla zaměřena na enzymy, které tyto kmeny využívaly k rozkladu. [16]

Další ze studií se zaměřovala na anaerobní degradaci 1,3-dihydroxybenzenu v buněčných extraktech denitrifikační bakterie *Azoarcus anaerobius*. Studie zkoumala zejména klíčové enzymy specifických reakcí pro tuto degradaci a jejich enzymatickou aktivitu. Výsledná zjištění naznačovala novou strategii anaerobního odbourávání aromatických sloučenin, která byla odlišná od doposud popsaných mechanismů dearomatizace. Bakterie byla schopna anaerobního růstu na resorcinolu jako jediného zdroje uhlíku a energie. [17]

2.2 Mikroorganismy schopné rozkladu fenolu

Degradace fenolu mikroorganismy je předmětem studií již několik desetiletí. Bakterií, které jsou schopny využívat fenol jako substrát pro svůj růst, je známo relativně hodně. Jsou známy bakterie, které dokáží fenol spotřebovávat i při nepříznivých podmínkách (vysoké či nízké pH, nízká teplota, vysoké koncentrace fenolu) a byly popsány také kvasinky schopné tohoto rozkladu.

Kvasinky

V této studii bylo charakterizováno 32 psychrofilních kmenů kvasinek se schopností rozkládat fenol a dalších 18 monoaromatických sloučenin jemu příbuzných. Kvasinky byly izolovány z vysokohorských biotopů a prokázaly schopnost degradace při teplotě 10 °C. Jednalo se o kmeny druhů *Cryptococcus terreus, Cryptococcus terricola, Rhodosporidium lusitaniae, Rhodotorula creatinivora, Rhodotorula ingeniosa, Mastigobasidium* a *Sporobolomyces roseus*. Další z kvasinek byly zařazeny do *Microbotryomycet*.

Vzorky půdy a sedimentů byly odebrány v rakouských Alpách, z průsmyku s průměrnou roční teplotou 2,8–4,3 °C. Většina vzorků byla kultivována v minerálním médiu s fenolem při teplotě 10 °C. Po sedmi dnech byl 1 ml suspenze zaočkován do 20 ml nového média, což bylo pětkrát opakováno. Následně byla provedena identifikace jednotlivých vzorků.

Netěkavé či málo těkavé sloučeniny byly rozkládány v následujícím pořadí: fenol > hydrochinon > resorcinol > benzoát > katechol > salicylát > p-kresol > m-kresol. Fenol byl využíván až 94 % testovaných kmenů, resorcinol potom využívalo 88 % kmenů kvasinek.

Růstově inhibiční účinek se projevil u mnoha testovaných sloučenin při koncentracích nad 100 mg/l (u fenolu, kresolu a katecholu) nebo nad 200 mg/l (u resorcinolu a hydrochinonu). Nejvyšší testovaná koncentrace byla 400 mg/l (u benzoátu). Toxický účinek rostl u fenolu, resorcinolu, hydrochinonu a několika dalších aromatických sloučenin. [18]

Bakterie

Mezi druhy schopné využívat fenol jako zdroj uhlíku patří již zmiňované *Pseudomonas putida* [19] a *Rhodococcus erythropolis* [20]. Dále pak například *Bacillus brevis* [21], *Arthrobacter citreus* [22], *Alcaligenes faecalis* [23], zástupci rodů *Stenotrophomonas* [24], *Sphingomonas* [25] a *Acinetobacter* [26, 27].

Bacillus brevis

Hlavním cílem studie bylo prozkoumání kinetiky biodegradace fenolu při vyšších koncentracích a různých podmínkách prostředí. Maximální koncentrace, při které izolovaný kmen degradoval fenol, byla 1750 mg/l. Doba trvání degradace byla 6 dní, příznivý průběh rozkladu probíhal při teplotě 34 °C, pH 8,0 a při objemu inokula 5 %. [21]

Arthrobacter citreus

Bakterie identifikovaná jako *Arthrobacter citreus* byla izolována z uhlovodíky kontaminovaného území. Při pokusech došlo k úplné asimilaci fenolu za 24 hodin, optimální růst byl pozorován při 25 °C a pH 7,0. Nejvyšší koncentrace fenolu byla 22 mM (asi 2000 mg/l), vyšší hladiny koncentrací působily inhibičně. Kromě fenolu byla kultura schopna rozkládat katechol, naftol a kresoly. [22]

Alcaligenes faecalis

Z aktivovaného kalu bylo izolováno několik kmenů bakterií, jeden z nich (identifikován jako *Alcaligenes faecalis*) měl vysoký potenciál pro degradování fenolu. Byla zkoumána souvislost degradačního potenciálu fenolu s různými fyziologickými fázemi inokula a kinetika tohoto rozkladu. K maximální degradaci došlo v pozdní fázi exponenciálního růstu, kdy byla kultura schopna zcela degradovat 1600 mg/l fenolu během 76 hodin. [23]

***Stenotrophomonas* sp.**

Kmen LA1 byl izolován z aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod v Číně. Kultura byla schopna rozkladu fenolu; byla identifikována jako *Stenotrophomonas* sp.; optimální podmínky rozkladu byly při pH 7 a teplotě 35 °C. [24]

***Sphingomonas* sp. a *Acinetobacter* sp.**

Předmětem další čínské studie bylo zkoumání účinnosti odstraňování fenolu imobilizovanými a neimobilizovanými buňkami. Kmeny byly izolovány z aktivovaného kalu a z půdy kontaminované fenolem. Kmeny použité ve studii (konkrétně XA05 a FG03) byly identifikovány jako *Acinetobacter* sp. a *Sphingomonas* sp. a byly smíchány v poměru 1:1. Jak volně suspendované, tak imobilizované buňky vykazovaly vysoký potenciál rozkladu fenolu. Při počáteční koncentraci 800 mg/l fenolu byla účinnost vyšší než 95 % během 35 hodin rozkladu u obou skupin buněk. [25]

Acinetobacter calcoaceticus

Tento kmen (označený PA) bakterie byl izolován v odpadní vodě z čistírny odpadních vod v Číně. Byl schopen degradovat 91,6 % fenolu během prvních 48 hodin kultivace (při koncentraci 800 mg/l). Optimální růst byl pozorován při teplotě 30 °C a pH 8,0. Zároveň byla zkoumána schopnost růstu inokula při různých koncentracích fenolu (200–2500 mg/l). Nejvyšší koncentrace, jíž se kultura dokázala přizpůsobit, byla 1700 mg/l. [26]

Stejný druh bakterie se podařilo izolovat z průmyslového aktivovaného kalu také o 10 let dříve. Kmen označený EDP3 mohl růst na řadě aromatických sloučenin a byl schopen mineralizace až 1000 mg/l fenolu při pokojové teplotě (25 °C). [27]

Degradace za anaerobních podmínek

První popsanou bakterií, která je schopna degradace fenolu za anaerobních podmínek, byla *Desulfobacterium phenolicum*, jako další potom *Thauera aromatica*. Studie z New Jersey popsala tři další fenol-degradující denitrifikační kmeny, které byly získány z anaerobních sedimentů ze tří různých oblastí Ameriky. Jednalo se o kmeny PH002, FL05 a CR23. Výchozí použitá koncentrace fenolu byla 0,5 mM (47 mg/l) a po jejím vyčerpání byla pravidelně přidávána stejná koncentrace. Při zastavení úbytku fenolu byl přidán dusičnan (10 mM). Kultury byly inkubovány při 30 °C. Nepodařilo se je identifikovat druhově, nicméně všechny tři kmeny byly podobné rodu *Azoarcus*. [28]

2.3 Výsledky dřívějších bakalářských a diplomových prací na ÚIOŽP

2.3.1 Bakteriální kultury rostoucí na fenolu za nízkých teplot a při dalších méně příznivých podmínkách

Diplomová práce Bc. Zuzany Saňákové v akademickém roce 2022/2023 byla věnována získávání bakteriálních kultur rostoucích na fenolu za nízkých teplot (8 °C) a při dalších méně příznivých podmínkách. V rámci této práce byly získány kultury 1AZS, 5BZS, 8AZS a 10AZS. Kultury 1AZS a 5BZS prokázaly růst v chladném prostředí na fenolu při pH 5,2 a kultury 8AZS a 10AZS byly schopny růstu na fenolu při 8 °C a při zvýšené koncentraci NaCl (3,5 – 5 %). Kultury 8AZS, 10AZS a 1AZS byly určeny jako grampozitivní, kultura 5BZS jako gramnegativní bakterie. [29]

2.3.2 Bakteriální kultury rostoucí na fenolu za nízkých teplot při různých koncentracích

V bakalářské práci Bc. Karolíny Linhartové byly studovány dříve získané bakteriální kultury rostoucí na fenolu za nízkých teplot (8 °C) při koncentracích fenolu 100 až 500 mg/l. Výsledky ukázaly, že růst všech kultur byl koncentrací fenolu významně ovlivněn; některé kultury (např. 1A, 5B a 6B) při koncentracích fenolu 400–500 mg/l vůbec nerostly, jiné jen velmi zvolna. Nejrychleji rostly všechny kultury při koncentraci fenolu 100 mg/l. Práce byla kromě toho věnována biochemickým a morfologickým vlastnostem těchto kultur – vlastnosti všech kultur se blížily druhům *Acinetobacter lwoffi* nebo *Acinetobacter junii*. V práci tak bylo prokázáno, že z povrchových vod je možno izolovat bakteriální kultury schopné využívat při nízkých teplotách fenol v různých koncentracích jako svůj růstový substrát. [30]

V paralelně probíhající bakalářské práci Bc. Hany Ryšavé byly stejné bakteriální kultury podrobeny testům využívání resorcinolu při teplotě 8 °C k jejich růstu. I přes dlouhou kultivaci kmenů po dobu 38 dnů v minerálním médiu s resorcinolem v koncentraci 140 mg/l však nebyl růst u žádné z nich zjištěn. [31]

3 CÍLE PRÁCE

První část experimentálních prací se zaměřovala na bakteriální kultury, které byly získány v minulých letech a měly schopnost rozkládat fenol jako růstový substrát a tím ho z vody odstraňovat. U některých z nich jsme ověřovali, zda jsou schopné rozkládat také resorcinol, jelikož je to látka strukturně velmi podobná fenolu. U těchto kultur bylo také zjišťováno, jaké koncentrace resorcinolu a fenolu jsou schopny využívat.

Druhá část experimentů byla zaměřena na získávání vlastních bakterií, které jsou růstu na resorcinolu schopny. Takové bakterie jsme se pokusili získat z aktivovaného kalu a z různých povrchových vod.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 METODIKA

4.1 Použité kultury

Pro práci byly použity jak kultury, které byly získány v rámci dřívějších prací, tak nově získané bakteriální kultury.

Původ dříve získaných kultur:

Kultury byly získány v rámci diplomové práce Bc. Zuzany Saňákové (2024) z těchto zdrojů:

1AZS: říční voda, Dřevnice, Zlín

5BZS: drobný lesní mokřad, Zlín – Lesní čtvrť

8AZS: nivní půda, Zlín

10AZS: potoční voda, Kudlovský potok, Kudlov

Všechny čtyři kultury jsou dlouhodobě uloženy ve sbírce ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně, zakonzervovány při -80 °C v glycerolu.

Další kultury byly získány vlastními silami, původ kultur a postup jejich získání je uveden níže, v dalších částech metodiky.

4.2 Použité vzorky vod

Vzorky pro druhou část práce byly odebírány z povrchových vod ve Zlínském kraji. Při odebírání byla dodržena aseptická práce. Malé množství povrchové vody bylo nabráno do sterilní plastové zkumavky tak, aby ve zkumavce zůstalo dostatečné množství vzduchu, a následně byla zkumavka uzavřena. Při přepravě byly vzorky chráněny před slunečním zářením a následně byly uchovány v chladničce při teplotě okolo 5 °C až do jejich použití v laboratoři. Přehled vzorků je uveden v tab. 2.

Tabulka 2: Vzorky vod a data jejich odběrů

Označení vzorku	Popis vzorku vody + GPS	Datum odběru	Označení vzorku	Popis vzorku vody + GPS	Datum odběru
A	PR Kanada 1 Kněžpole GPS 49.1049719N, 17.4939800E	1. 10. 2023	**J**	Štěrkoviště Napajedla GPS 49.131948N, 17.520209E	21. 10. 2023
B	Konventní rybník Velehrad GPS 49.1024669N, 17.4062261E	1. 10. 2023	**K**	Rybník Smraďavka, Buchlovice GPS 49.078040N, 17.319006E	22. 10. 2023
C	Rybník Rákoš, Velehrad GPS 49.1145981N, 17.3857350E	1. 10. 2023	**L**	Vodní nádrž Sovín, Buchlovice, GPS 49.078543N, 17.329383E	22. 10. 2023
D	Štěrkoviště Topolná GPS 49.1238619N, 17.5247250E	3. 10. 2023	**M**	Rybník Vážany GPS 49.044937N, 17.305574E	22. 10. 2023
E	Rybník Halda, Boršice u Buchlovic GPS 49.0570450N, 17.3618639E	3. 10. 2023	**N**	Popovický rybník 1, Popovice GPS 49.057772N, 17.517322E	22. 10. 2023
F	Řeka Dřevnice, Zlín – Malenovice GPS 49.2133542N, 17.5951208E	2. 10. 2023	**O**	Popovický rybník 2, Popovice, GPS 49.057684N, 17.517333E	22. 10. 2023
G	Aktivovaný kal, ČOV Zlín GPS 49.2107514N, 17.5795478E	25. 9. 2023	**P**	Popovický rybník 3, Popovice, GPS 49.054904N, 17.518363E	22. 10. 2023
H	PR Kanada 2 Kněžpole GPS 49.105912N, 17.493166E	21. 10. 2023	**Q**	Rybník Žabinec, Velehrad GPS 49.102745N, 17.402793E	22. 10. 2023
I	Rybník Hlubočky, Březolupy GPS 49.131691N, 17.590314E	21. 10. 2023			

4.3 Roztoky a živná média

Minerální médium bez substrátu (MM) – 500 ml o pH 7,0 – 7,2:

Roztok $Na_2HPO_4.12H_2O$ (23,9 g/l) ..... 36 ml

Roztok KH_2PO_4 (9,078 g/l) ..... 14 ml

Voda destilovaná ..... 425 ml

Roztok NH_4Cl (30 g/l) ..... 5 ml

Roztok $MgSO_4.7H_2O$ (10 g/l) ..... 5 ml

Roztok $Fe(NH_4)_2.(SO_4)_2.6H_2O$ (3 g/l) ..... 5 ml

Roztok $CaCl_2.2H_2O$ (1 g/l) ..... 5 ml

Roztok NaCl (10 g/l) ..... 5 ml

Roztok stopových prvků ..... 1 ml

Minerální médium s resorcinolem (MMR) – 350 ml, koncentrace resorcinolu 100 mg/l, pH 7,2:

Sterilní MM ..... 350 ml

+ 10 % roztok resorcinolu ..... 350 µl

+ směs MEM vitaminů ..... 350 µl

Minerální médium universální (MM7) – 200 ml o pH 7,3-7,4:

Roztok $Na_2HPO_4.12H_2O$ (23,9 g/l)..... 16 ml

Roztok KH_2PO_4 (9,078 g/l)..... 4 ml

Voda destilovaná..... 170 ml

Roztok NH_4Cl (30 g/l)..... 2 ml

Roztok $MgSO_4.7H_2O$ (10 g/l)…..... 2 ml

Roztok $Fe(NH_4)_2.(SO_4)_2.6H_2O$ (3 g/l)..... 2 ml

Roztok $CaCl_2.2H_2O$ (1 g/l)..... 2 ml

Roztok NaCl (10 g/l)..... 2 ml

Roztok stopových prvků ..... 0,4 ml

+ směs MEM vitaminů (200 µl) – přidáno po sterilizaci

Roztok stopových prvků – v 1000 ml destilované vody rozpuštěno:

$MnSO_4.5H_2O$…… 0,043 g

H_3BO_3……... 0,057 g

$ZnSO_4.7H_2O$……. 0,043 g

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$……... 0,037 g

$Co(NO_3)_2.6H_2O$…… 0,025 g

$CuSO_4.5H_2$…… 0,040 g

Roztok MEM vitaminů (Biosera)

Minimum essential medium; syntetické médium obsahující:

Komponenty	**Koncentrace (mg/l)**
Vitaminy	
Cholinchlorid (vitamin B4)	100
D-pantothenát vápenatý (vitamin B5)	100
Kyselina listová (vitamin B9)	100
Nikotinamid (vitamin B3)	100
Pyridoxin hydrochlorid (vitamin B6)	100
Riboflavin (vitamin B2)	10
Thiamin hydrochlorid (vitamin B1)	100
i-Inositol (vitamin B8)	200
Anorganické soli	
Chlorid sodný	8500

Zásobní roztok resorcinolu (100 g/l)

Navážka resorcinolu 2 g byla rozpuštěna v cca 15 ml destilované vody a po rozpuštění byl roztok doplněn do 20 ml vodou. Sterilizace byla provedena filtrací přes sterilní membránový filtr Ahlstrom ReliaPrep s velikostí pórů 0,2 μm do sterilní zkumavky. Zásobní roztok byl uschován v temnu při 5 °C.

Zásobní roztok fenolu (50 g/l)

Navážka fenolu 0,5 g byla rozpuštěna v cca 7 ml destilované vody a po rozpuštění byl roztok doplněn do 10 ml vodou. Sterilizace byla provedena filtrací přes sterilní membránový filtr Ahlstrom ReliaPrep s velikostí pórů 0,2 μm do sterilní zkumavky. Zásobní roztok byl uschován v temnu při 5 °C.

Použité živné agary:

R2A agar (HIMEDIA)

Destilovaná voda……...100 ml

R2A základ práškový……... 1,812 g

Tryptone Yeast Extract Agar (TYA, HIMEDIA)

Destilovaná voda…….. 100 ml

TYA základ práškový……...2,1 g

Chloramfenicol Yeast Glucose Agar (CHYGA, HIMEDIA)

Destilovaná voda…….. 100 ml

CHYGA základ práškový……. 4,0 g

MLG agar (100 ml):

Minerální medium universální (MM7) ….....100 ml

Mléčnan sodný, roztok 10% …… 0,5 ml

Glycerol ……..... 50 mg

Agar práškový……..……1,8 g

Připravená živná půda byla sterilizována v autoklávu a poté rozlita do petriho misek.

4.4 Přístroje

Densilametr (DENSI-LA-METER II, ERBA-LACHEMA)

Chladnička (Guzzanti GZ 48)

Laboratorní třepačka velkokapacitní (VWR)

Laminární box (Telstar Bio-II-A)

Hlubokomrazící box (Schoeller)

Mikroskop (OLYMPUS CX41)

Spínací hodiny

Laboratorní autoklávy

Laboratorní váhy

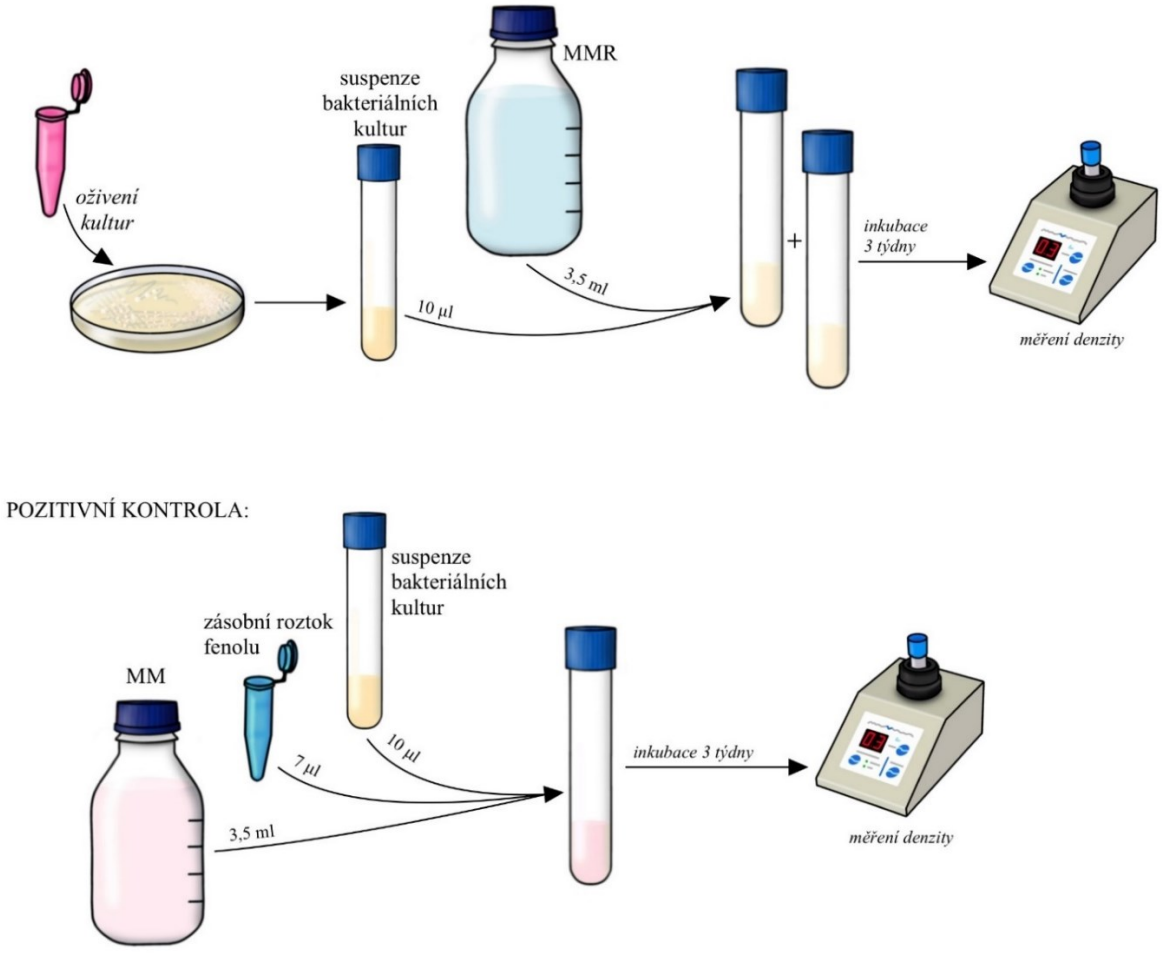
Běžné chladničky

4.5 Postupy testů s dříve získanými kulturami

4.5.1 Pokus 1 – ověření schopnosti růstu kultur 1AZS, 5BZS, 8AZS a 10AZS při 8 °C, při využití resorcinolu jako jediného zdroje uhlíku a energie

Jako první byl proveden pokus s již dříve získanými bakteriálními kulturami, které byly schopné rozkládat při nízkých teplotách fenol. Bylo zjišťováno, zda budou tyto bakterie schopny využívat resorcinol jako jediný zdroj uhlíku a energie při 8 °C.

Sterilní MMR bylo nejprve asepticky rozplněno po 3,5 ml do jednotlivých zkumavek. Ze čtyř oživených bakteriálních kultur byly vytvořeny suspenze a ty zaočkovány jednotlivě po 10 µl do dvojice zkumavek. Inkubace probíhala při teplotě 8 °C po dobu 3 týdnů, postupně byla měřena optická densita na densilametru a zaznamenávány hodnoty. Jelikož byl u těchto kultur prokázán růst na fenolu, paralelně probíhalo také měření růstu na fenolu, které sloužilo jako pozitivní kontrola. Schéma postupu je vyobrazeno na obr. 5.



Obrázek 5: Schéma průběhu pokusu č. 1

U jedné z bakteriálních kultur byly následně provedeny další testy pro její bližší identifikaci.

OF-test

OF-test (oxidation-fermentation test) je jednoduchý test, který zjišťuje, zda se jedná o kulturu schopnou fermentace glukózy. Bakterie, které využívají glukózu aerobně i anaerobně, jsou označovány jako fermentující. Nefermentující bakterie ji využívají jen aerobně nebo ji nevyužívají vůbec.

Test se provádí tak, že se kličkou kultura naočkuje do živného média ve zkumavce a nechá se několik dní kultivovat. Živné médium obsahuje glukózu, která slouží jako zdroj živin. U dna zkumavky není přítomen kyslík – pokud by testovaná bakterie glukózu zkvašovala, projevovalo by se to produkcí organických kyselin, které mění pH. Se změnou pH se změní i barva živného média ze zelené ve žlutou.

Oxidázový test

Oxidázový test (též také test na přítomnost cytochromoxidázy) je okamžitý test, který se používá k dourčení bakterií. Cytochromoxidáza je enzym, který ukončuje respirační řetězec u některých bakterií. Některé skupiny bakterií produkují tento enzym a dávají tak pozitivní výsledek tohoto testu.

Používají se továrně vyráběné diagnostické proužky, na které se nanese malá část biomasy čisté kultury. Proužky jsou napuštěny redoxním činidlem, které je v oxidované formě (v pozitivním případě) do 60 sekund zbarveno do modra a v redukované formě zůstává bezbarvé.

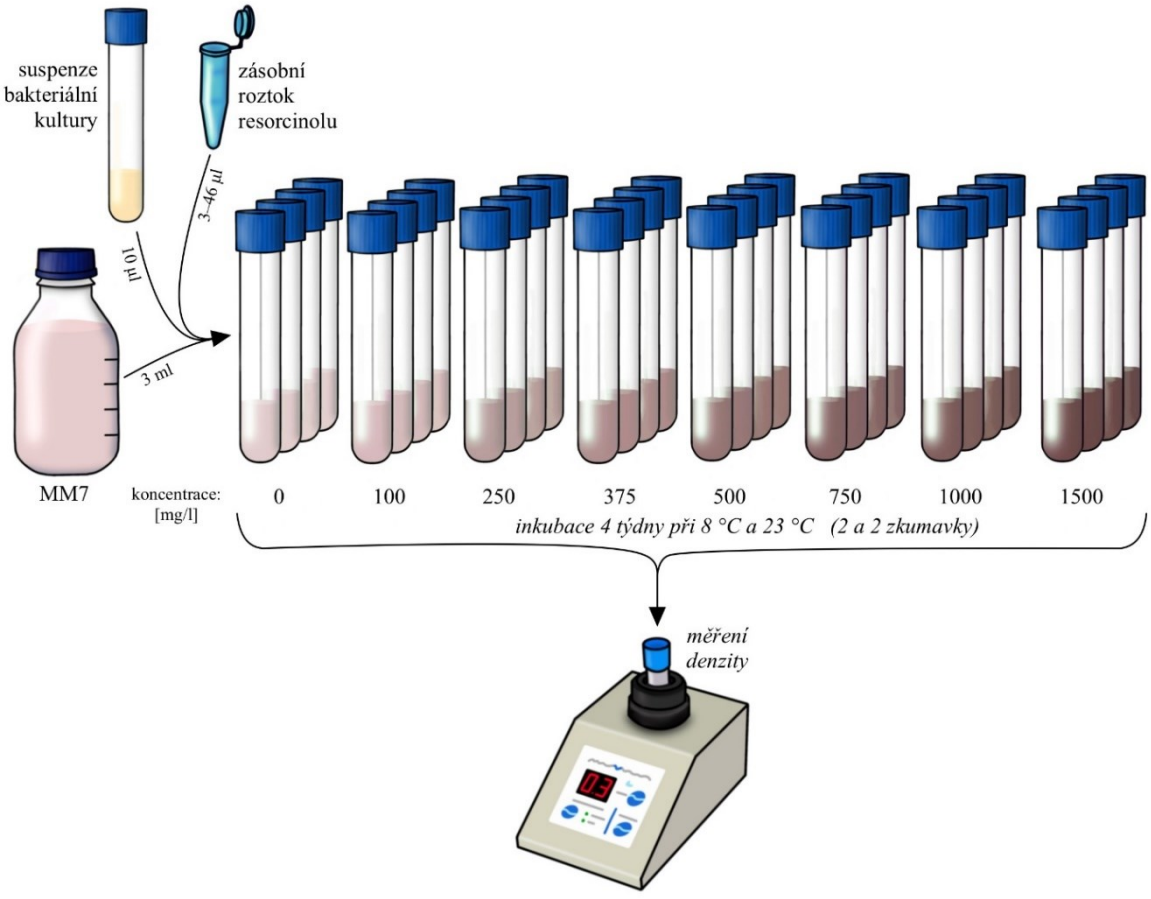
Test na přítomnost katalázy

Jedná se také o okamžitý test, při kterém se malá část bakteriální kultury nanese do kapky čerstvého 3%-tního peroxidu vodíku na podložním sklíčku. Test využívá přítomnosti enzymu katalázy. U bakterií, které katalázu obsahují, se po reakci s peroxidem okamžitě začnou tvořit bublinky kyslíku.

4.5.2 Pokus 2 – ověření růstu kultury 10AZS na různých koncentracích resorcinolu při 8 °C a 23 °C

U kultury 10AZS, u níž byla v prvním pokusu potvrzena schopnost růstu na resorcinolu, bylo zjišťováno, při jakých koncentracích resorcinolu je růstu schopna.

Do 32 zkumavek bylo rozplněno MM7, do každé zkumavky zaočkována suspenze bakteriální kultury 10AZS. Vždy do 4 zkumavek bylo napipetováno určité množství zásobního roztoku resorcinolu tak, aby vznikly koncentrace 0–1500 mg/l (viz tab. 3). Kultivace probíhala při teplotě 8 °C a 23 °C (dvojice zkumavek o stejné koncentraci). Inkubace probíhala po dobu 4 týdnů a v průběhu byly měřeny hodnoty OD zkumavek. Schéma postupu je vyobrazeno na obr. 6.



Obrázek 6: Schéma průběhu pokusu č. 2

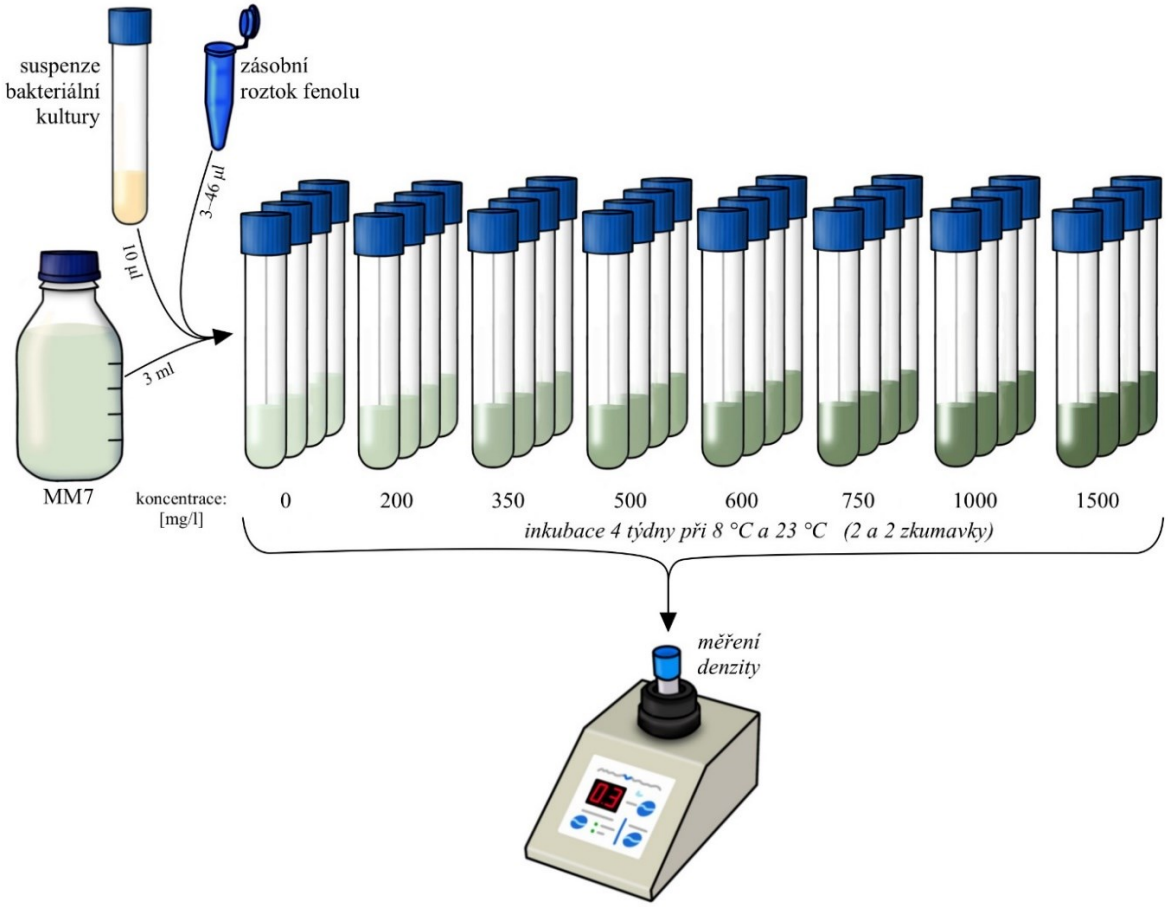
Tabulka 3: Rozpis složek v pokusu 2

	Zkumavky s 3 ml MM7							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Zásobní roztok resorcinolu (µl)	0	3,1	7,7	11,4	15,3	23	30,5	45,9
Suspense kultury (µl)	10	10	10	10	10	10	10	10
Koncentrace resorcinolu (mg/l)	**0**	**100**	**250**	**375**	**500**	**750**	**1000**	**1500**

4.5.3 Pokus 3 – ověření růstu kultury 10AZS na různých koncentracích fenolu při 8 °C a 23 °C

U kultury 10AZS, u níž byla v předchozích pracích potvrzena schopnost růstu na fenolu, bylo zjišťováno, při jakých koncentracích je tohoto růstu schopna. Postup pokusu s fenolem byl téměř totožný jako u resorcinolu.

Do 32 zkumavek bylo rozplněno MM7, do každé zkumavky zaočkována suspenze bakteriální kultury 10AZS. Vždy do 4 zkumavek bylo napipetováno určité množství zásobního roztoku fenolu tak, aby vznikly koncentrace 0–1500 mg/l (viz tab. 4). Kultivace probíhala při teplotě 8 °C a 23 °C (dvojice zkumavek o stejné koncentraci). Inkubace probíhala po dobu 4 týdnů a v průběhu byly měřeny hodnoty OD zkumavek. Schéma postupu je vyobrazeno na obr. 7.



Obrázek 7: Schéma průběhu pokusu č. 3

Tabulka 4: Rozpis složek v pokusu 3

	Zkumavky s 3 ml MMU							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Zásobní roztok fenolu (µl)	**0**	**12,0**	**21,2**	**30,4**	**36,5**	**45,7**	**61,3**	**92,8**
Suspense kultury (µl)	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Koncentrace fenolu (mg/l)	0	200	350	500	600	750	1000	1500

4.6 Postupy testů s nově získanými kulturami z povrchových vod

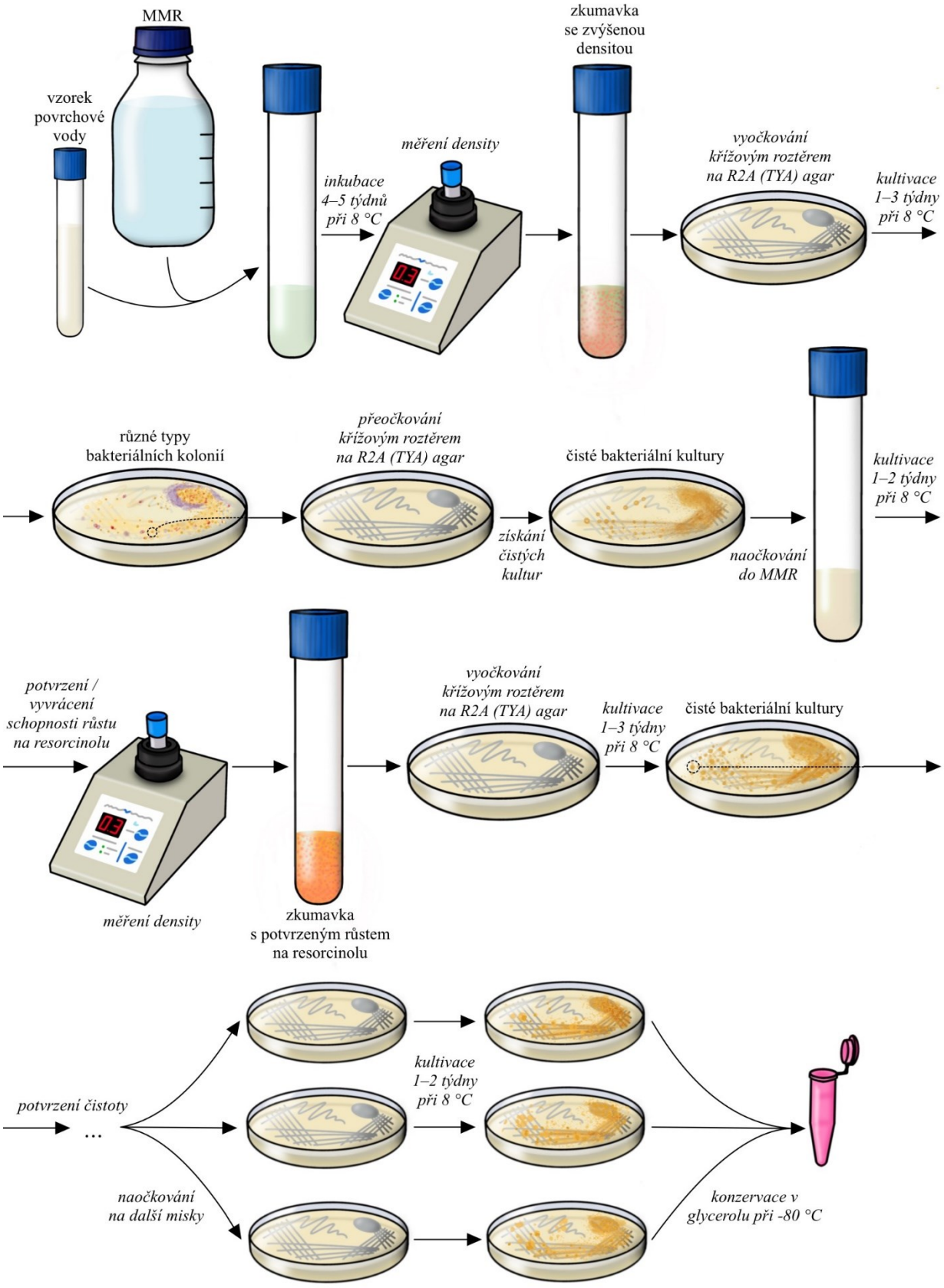
4.6.1 Pokus 4 – získávání bakterií rostoucích na resorcinolu při 8 °C

Hlavní částí práce bylo získávání bakterií, které by byly schopny využívat resorcinol jako růstový substrát při nízkých teplotách. Pro tento pokus byly odebírány vzorky stojatých vod.

Každý vzorek povrchové vody byl zaočkován do minerálního média s resorcinolem ve zkumavce. Objemy inokul byly voleny dle charakteru vzorků (podle předpokládaného obsahu mikroorganismů). Zaočkované zkumavky byly inkubovány při 8 °C po dobu 4–5 týdnů, během nichž bylo postupně prováděno měření optické density na densilametru. U zkumavek, ve kterých došlo k výraznému nárůstu density (rozdíl více než 0,3), byl proveden křížový roztěr na R2A (případně TYA agar) a tyto misky byly kultivovány při 8 °C. Po kultivaci trvající 1–3 týdny byly všechny jednotlivé zjištěné typy kolonií přeočkovány na čisté misky s R2A (TYA) agary a případně byly dále přeočkovány, aby byly získané kultury čisté. Jakmile byly vyčištěny, čisté byly naočkovány opět do MMR a kultivovány při 8 °C po dobu 1–2 týdnů pro potvrzení či vyvrácení schopnosti kultur využívat resorcinol. Po ukončení této kultivace byly případné narostené kultury vyočkovány pro potvrzení jejich čistoty. V případě, že byly kultury čisté, byly naočkovány na několik misek a po další kultivaci zakonzervovány v glycerolu (viz níže).

Schéma postupu je vyobrazeno na obr. 8.

Označení vzorků spolu s místy a daty jejich odběrů, včetně očkovaných objemů jednotlivých inokul, jsou uvedeny v tab. 5.



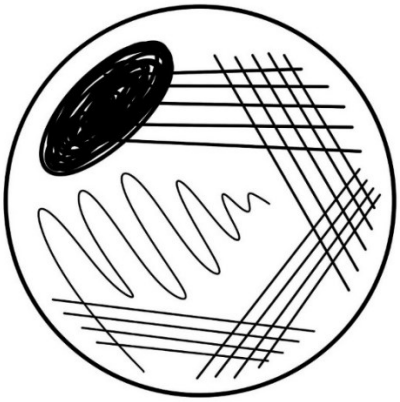
Obrázek 8: Schéma průběhu pokusu č. 4

Tabulka 5: Přehled vzorků

Označení vzorku	**Popis vzorku vody**	**Datum odběru**	**Začátek testu**	**Objem inokula (µl)**
A	PR Kanada 1 Kněžpole	1. 10. 2023	4. 10. 2023	50
B	Konventní rybník Velehrad	1. 10. 2023	4. 10. 2023	50
C	Rybník Rákoš Velehrad	1. 10. 2023	4. 10. 2023	50
D_{50}	Štěrkoviště Topolná	3. 10. 2023	4. 10. 2023	50
D_{100}	Štěrkoviště Topolná	3. 10. 2023	4. 10. 2023	100
E	Rybník Halda Boršice u Buchlovic	3. 10. 2023	4. 10. 2023	50
F_{50}	Řeka Dřevnice Zlín – Malenovice	2. 10. 2023	4. 10. 2023	50
F_{100}	Řeka Dřevnice Zlín – Malenovice	2. 10. 2023	4. 10. 2023	100
G_1	Aktivovaný kal ČOV Zlín	25. 9. 2023	4. 10. 2023	1
G_{10}	Aktivovaný kal ČOV Zlín	25. 9. 2023	4. 10. 2023	10
H	PR Kanada 2 Kněžpole	21. 10. 2023	1. 11. 2023	50
I	Rybník Hlubočky Březolupy	21. 10. 2023	1. 11. 2023	50
J	Štěrkoviště Napajedla	21. 10. 2023	1. 11. 2023	50
K	Rybník Smraďavka Buchlovice	22. 10. 2023	1. 11. 2023	50
L	Vodní nádrž Sovín Buchlovice	22. 10. 2023	1. 11. 2023	50
M	Rybník Vážany	22. 10. 2023	1. 11. 2023	50
N	Popovický rybník 1 Popovice	22. 10. 2023	1. 11. 2023	50
O	Popovický rybník 2 Popovice	22. 10. 2023	1. 11. 2023	50
P	Popovický rybník 3 Popovice	22. 10. 2023	1. 11. 2023	50
Q	Rybník Žabinec Velehrad	22. 10. 2023	1. 11. 2023	50

Provedení křížového roztěru:

Do očka sterilní kličky byla nabrána suspenze vzorku či přímo kultura (v případě ověřování její čistoty) a byla rozetřena u okraje pevné živné půdy ve tvaru oválné pecky. Novou sterilní kličkou bylo vytvořeno několik čar, které rozetřely pecku po obvodu misky. Příští sterilní kličkou byly vytvořeny další čáry protínající ty první do kříže. Následnou kličkou byla provedena třetí série čar protínající do kříže ty předchozí, tímto způsobem se postupovalo až do doby, kdy byl povrch živné půdy téměř zaplněn. Z poslední série čar byla vytvořena klikatá čára ve formě hádku pro zaplnění zbývajícího místa na misce. Provedení roztěru je vyobrazeno na obr. 9.

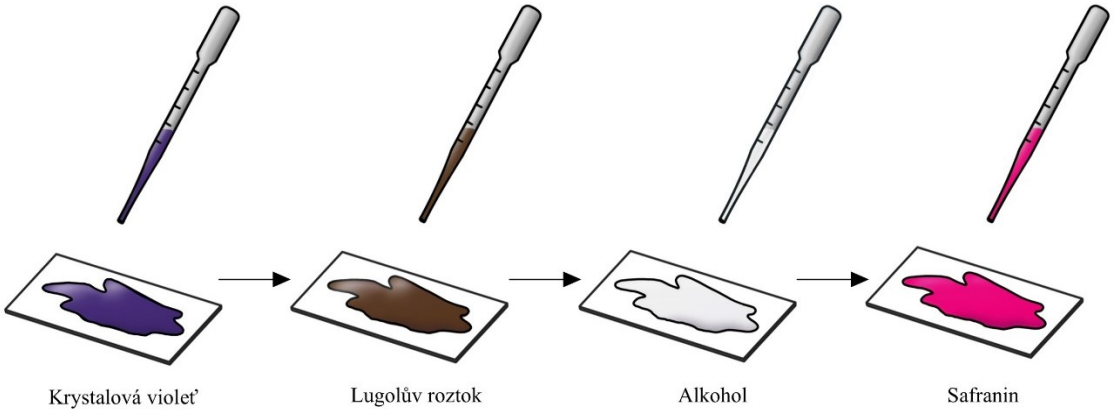


Obrázek 9: Schéma provedení křížového roztěru

4.6.2 Gramovo barvení získaných kultur

Barvení podle Grama je prvním krokem při identifikaci bakterií. Umožňuje jejich rozdělení na grampozitivní a gramnegativní. Toto dělení je možné díky odlišné stavbě buněčné stěny. Grampozitivní bakterie mají v buněčné stěně tlustou vrstvu peptidoglykanu, který zachytí barvivo a tyto bakterie se barví modře. U gramnegativních bakterií je vrstva peptidoglykanu tenká, a navíc překrytá vnější membránou, takže dojde k jejímu odbarvení a ve výsledku je zbarvena červeně.

Postup: V prvním kroku se zafixovaná suspenze biomasy nanesená na podložním sklíčku zakápla krystalovou violetí a následně Lugolovým roztokem. Každý z jednotlivých roztoků se nechal působit 1 minutu a opláchl se destilovanou vodou. Potom se roztěr odbarvoval acetonem po dobu 20 sekund. U grampozitivních bakterií nedocházelo k vymytí krystalové violeti a jodu z buňky, gramnegativní bakterie se acetonem odbarvily. Preparát se opět důkladně opláchl vodou. V posledním kroku se bakterie dobarvily 1 minutu safraninem, který obarvil gramnegativní buňky do červených odstínů. Schéma postupu je vyobrazeno na obr. 10.



Obrázek 10: Schéma postupu Gramova barvení

KOH test

Tento test se provádí pro potvrzení grampozitivity u kultur, které se nebarví jednoznačně Gramovým barvením. Do kapky 3% KOH na podložním sklíčku byla nanesena plná klička biomasy zkoumané kultury. Při rozmíchávání biomasy kličkou v KOH dochází u gramnegativních bakterií k rozpouštění buněčné stěny a uvolňování obsahu buněk do kapaliny, projevující se tvorbou viskosního vlákna mezi kličkou a sklíčkem, když je klička zvedána cca 1 cm nad sklíčko. U grampozitivních kultur k rozpouštění buněčných stěn nedochází a buněčný obsah se do KOH nevylévá.

4.6.3 Konzervace získaných kultur

Postup:

U kultur byla potvrzena jejich čistota provedením křížových roztěrů (na TYA agar a R2A agar). Byly připraveny sterilní mikrozkumavky, které byly označeny názvem kultury a v aseptickém boxu byla vyžíhána kovová kopisť. Co největší množství narostené biomasy bylo opatrně seškrábnuto z povrchu živné půdy tak, aby půda nebyla narušena. Potom byla biomasa opatrně umístěna na dno mikrozkumavky, bylo přikápnuto několik kapek sterilního glycerolu (množství glycerolu záleželo na množství biomasy v mikrozkumavce) a pomocí kopisti byl glycerol s biomasou dokonale promíchán. Mikrozkumavka byla uzavřena a odložena stranou, kopisť setřena gázou a několikrát po sobě vydesinfikována ethanolem, vyžíhána v plameni a ponechána vychladnout před další prací. Mikrozkumavka s kulturou byla uložena do boxu, ve kterém je -80 °C, uložení bylo zaznamenáno do seznamu kultur. Bakteriální kultury, které byly tímto postupem zakonzervované, mohou být v boxu uchovávány po dlouhou dobu a následně oživeny pro další práci.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

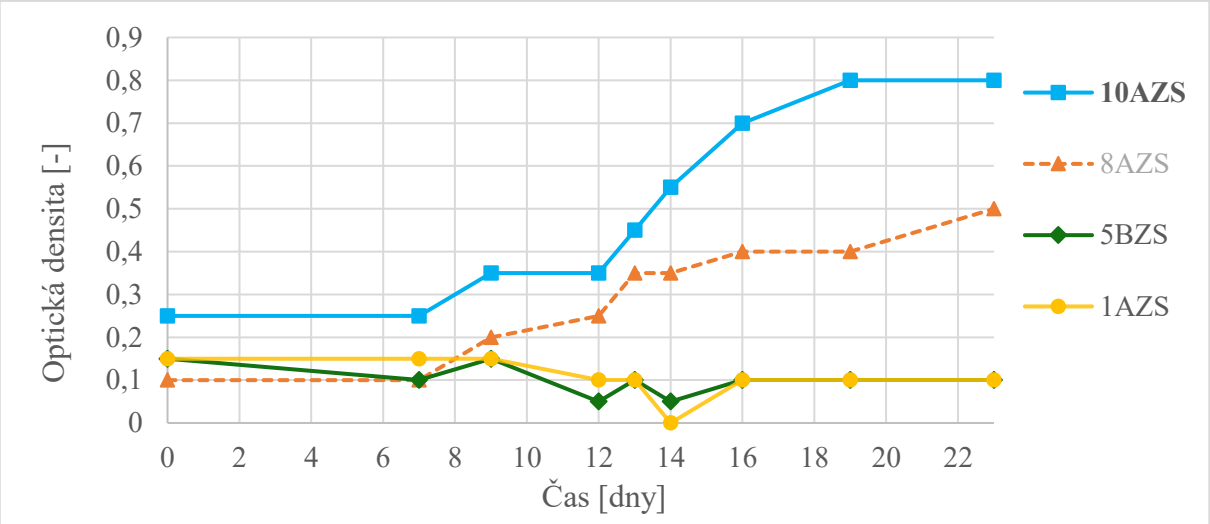
5.1 Růst dříve získaných kultur 1AZS, 5BZS, 8AZS a 10AZS při 8 °C na resorcinolu jako jediném zdroji uhlíku a energie (Pokus 1)

Cílem prvního pokusu bylo zjistit, zda kultury 1AZS, 5BZS, 8AZS a 10AZS (u kterých byla dříve prokázána schopnost růst na fenolu – Saňáková, 2024) budou moci využívat jako růstový substrát i resorcinol (a tím ho spotřebovávat). Uvedené kultury byly naočkovány do minerálního média s resorcinolem a inkubovány; růst byl sledován prostřednictvím měření optické density (OD). Paralelně byly kultury naočkovány do minerálního média s fenolem, pro potvrzení životaschopnosti. Jako slepý pokus bylo proměřováno i sterilní MMR, jehož OD se však v průběhu 23 dnů trvajícího pokusu nezměnilo (OD = 0,1). Výsledky zkoumaných kultur jsou uvedeny v tab. 6 a v grafu na obr. 11.

Tabulka 6: Hodnoty OD dříve získaných bakteriálních kultur při růstu na fenolu a resorcinolu

Čas (dny)	1AZS			5BZS			8AZS			10AZS		
	Fen	Res	Res	Fen	Res	Res	Fen	Res	Res	Fen	Res	Res
0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2
7	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2
9	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3
12	0,4	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3
13	0,8	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,7	0,4	0,3	0,7	0,5	0,4
14	0,8	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,8	0,4	0,3	0,7	0,6	0,5
16	1,1	0,1	0,1	0,7	0,1	0,1	0,9	0,4	0,4	0,7	0,7	0,7
19	1,0	0,1	0,1	1,2	0,1	0,1	1,0	0,4	0,4	0,7	0,8	0,8
23	1,0	0,1	0,1	1,1	0,1	0,1	1,0	0,5	0,5	0,7	0,8	0,8

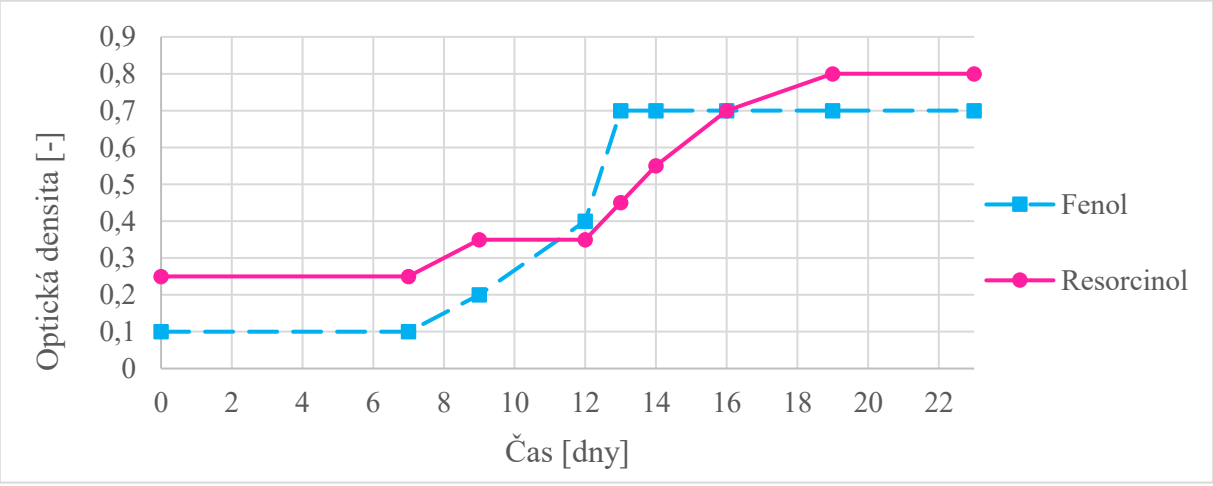
Zeleně jsou zaznačena maxima růstu. Kultura 8AZS: zkumavky s resorcinolem slabě zabarveny do růžova, ale nebyly zakaleny – zaznačeno šedě.



Obrázek 11: Měření OD v průběhu kultivace dříve získaných kultur při využití resorcinolu

Růst byl jednoznačně zaznamenán u kultury 10AZS, u kultur 5BZS a 1AZS nebyl prokázán. U kultury 8AZS bylo sice viditelné značné růžové zabarvení, avšak o zakalení, způsobené množením buněk, se nejednalo. Filtrací zabarvených suspenzí přes membránový filtr s velikostí pórů 0,2 µm a opětovným změřením (OD se prakticky nezměnila) bylo pak dokázáno, že tato kultura na resorcinolu skutečně nerostla. Zabarvení bylo pravděpodobně zapříčiněno tvorbou určitého metabolitu, který však již kulturou nebyl dále využíván.

U kultury 10AZS, která měla schopnost degradovat jak fenol, tak resorcinol, je průběh růstu u těchto dvou substrátů porovnán v grafu na obr. 12.



Obrázek 12: Porovnání růstu kultury 10AZS při využití fenolu a resorcinolu (koncentrace 100 mg/l)

Nárůst na fenolu nastal u kultury dříve než při využití resorcinolu; na resorcinolu byl nárůst poněkud pozvolnější.

U kultury 10AZS byly prováděny další pokusy (OF-test, test na přítomnost cytochromoxidasy a test na přítomnost katalasy).

OF-test: kultura 10AZS barvu živného média nezměnila, kultura tedy glukózu nevyužívá (jedná se o nefermentující bakterii).

OXITEST vyšel negativně – cytochromoxidázu kultura 10AZS neobsahuje.

Test na přítomnost katalasy vyšel pozitivně – u kultury 10AZS proběhla rychlá reakce.

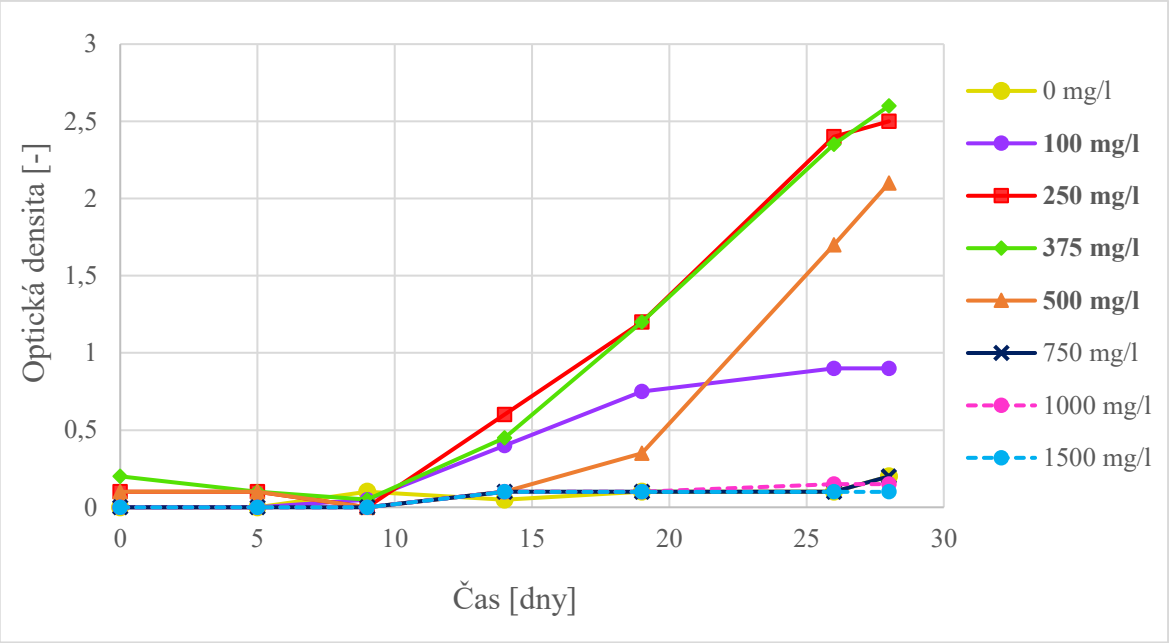
5.2 Růst kultury 10AZS na různých koncentracích resorcinolu při 8 °C a 23 °C (Pokus 2)

Cílem druhého pokusu bylo ověření růstu kultury 10AZS na různých koncentracích resorcinolu při 8 °C a 23 °C. Uvedená kultura byla naočkována do minerálního média s různými koncentracemi resorcinolu (0, 100, 250, 375, 500, 750, 1000 a 1500 mg/l) a inkubována; růst byl sledován prostřednictvím měření optické density (OD). Hodnoty naměřených denzit jsou uvedeny v tab. 7, výsledky jsou vyobrazeny v grafech na obr. 13 a 14.

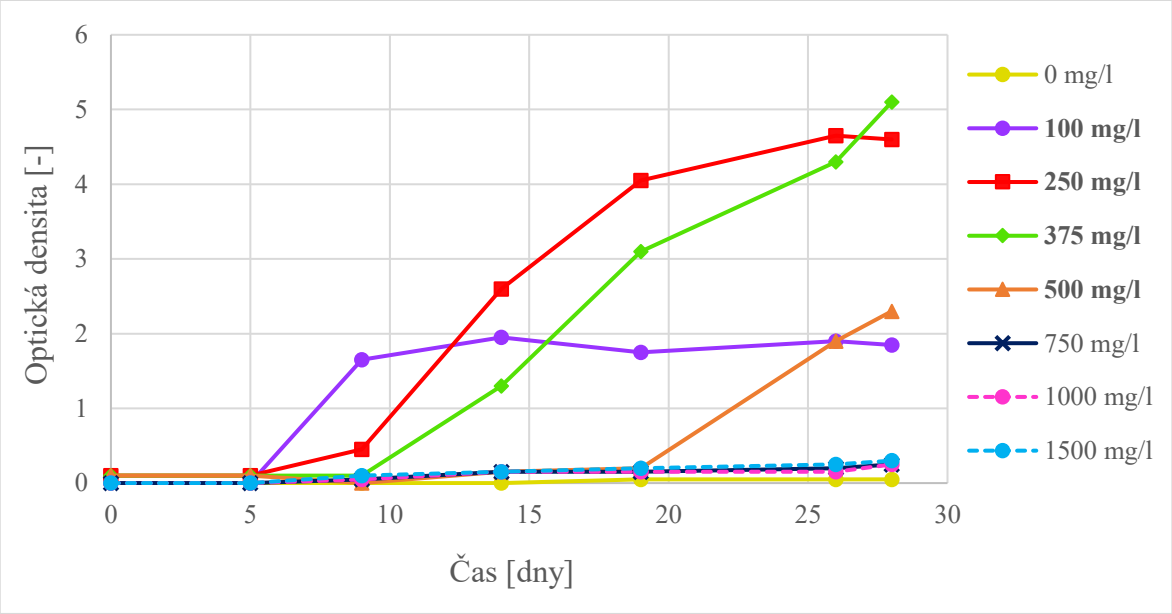
Tabulka 7: Hodnoty průměru OD vzorků v průběhu kultivace kultury 10AZS při 8 °C a 23 °C na různých koncentracích resorcinolu

Doba (dny)	**Teplota (°C)**	**Koncentrace resorcinolu (mg/l)**							
		0	**100**	**250**	**375**	**500**	**750**	**1000**	**1500**
0	8	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0	0	0,0
	23	0	0	0,1	0,1	0,1	0	0	0,0
5	8	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0	0,0
	23	0	0	0,1	0,1	0,1	0	0	0,0
9	8	0,1	0,05	0	0,05	0,0	0,05	0,1	0,0
	23	0,0	1,65*	0,45*	0,1	0,05	0,05	0,05	0,1
14	8	0,05	0,4	0,6	0,45	0,1	0,1	0,1	0,1
	23	0	1,95*	2,6*	1,3*	0,15	0,15	0,15	0,15
19	8	0,1	0,75	1,2*	1,2*	0,35	0,1	0,1	0,1
	23	0,05	1,75*	4,05*	3,1*	0,2	0,15	0,15	0,2
26	8	0,1	0,9	2,4*	2,35*	1,7*	0,1	0,15	0,1
	23	0,05	1,9*	4,65*	4,3*	1,9*	0,2	0,15	0,25
28	8	0,2	0,9	2,5*	2,6*	2,1*	0,2	0,15	0,1
	23	0,05	1,85*	4,6*	5,1*	2,3*	0,25	0,25	0,3

Zeleně zaznačena maxima růstu, * zaznamenáno hnědé zabarvení vzorku.



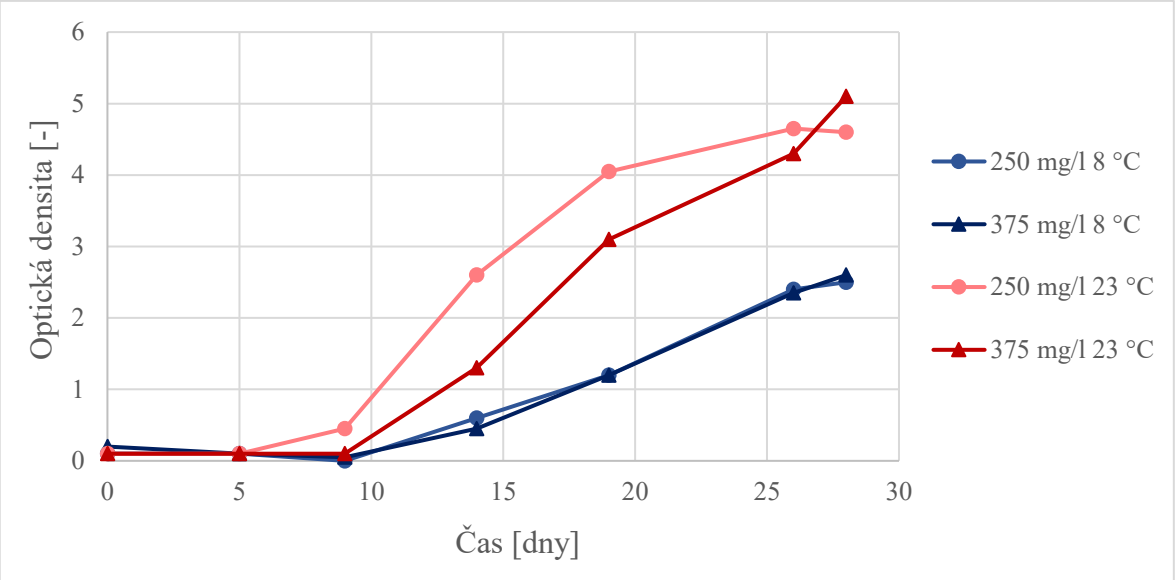
Obrázek 13: Růst kultury 10AZS na různých koncentracích resorcinolu při 8 °C



Obrázek 14: Růst kultury 10AZS na různých koncentracích resorcinolu při 23 °C

Růst kultury byl zaznamenán při koncentracích resorcinolu 100–500 mg/l. Při vyšších koncentracích resorcinolu kultura nerostla nebo dosáhla jen velmi nízkých hodnot navýšení OD. Nejvyšších hodnot růstu dosahovala kultura při koncentracích resorcinolu 250 a 375 mg/l, a to při obou teplotách. Při vyšší teplotě dosahovaly hodnoty OD přibližně dvakrát vyšších hodnot.

Porovnání koncentrací 250 mg/l a 375 mg/l při 8 °C a 23 °C je vyobrazeno v grafu na obr. 15.



Obrázek 15: Porovnání růstu kultury 10AZS na koncentracích resorcinolu 250 a 375 mg/l při teplotách 8 °C a 23 °C

Nárůst při teplotě 8 °C byl mnohem pozvolnější než při teplotě 23 °C – vhodnější teplotou je pro kulturu 23 °C, nicméně dokáže substrát slibně degradovat i při teplotě 8 °C.

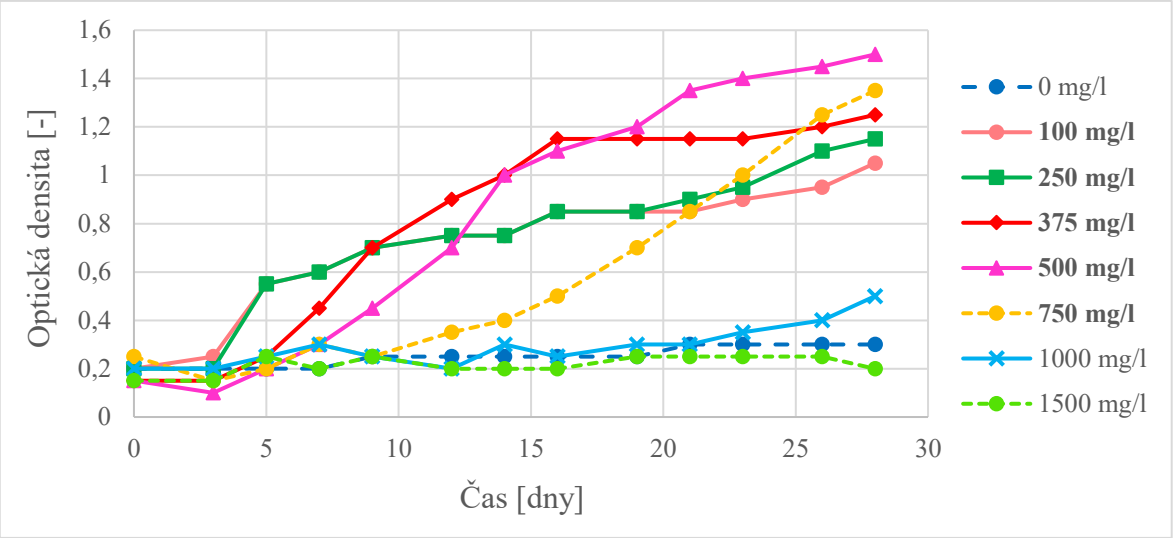
5.3 Růst kultury 10AZS na různých koncentracích fenolu při 8 °C a 23 °C (Pokus 3)

Cílem třetího pokusu bylo ověření růstu kultury 10AZS na různých koncentracích fenolu při 8 °C a 23 °C. Uvedená kultura byla naočkována do minerálního média s různými koncentracemi fenolu (0, 200, 350, 500, 600, 750, 1000 a 1500 mg/l) a inkubována; růst byl sledován prostřednictvím měření optické density (OD). Hodnoty naměřených denzit jsou uvedeny v tab. 8, výsledky jsou vyobrazeny v grafech na obr. 14 a 15.

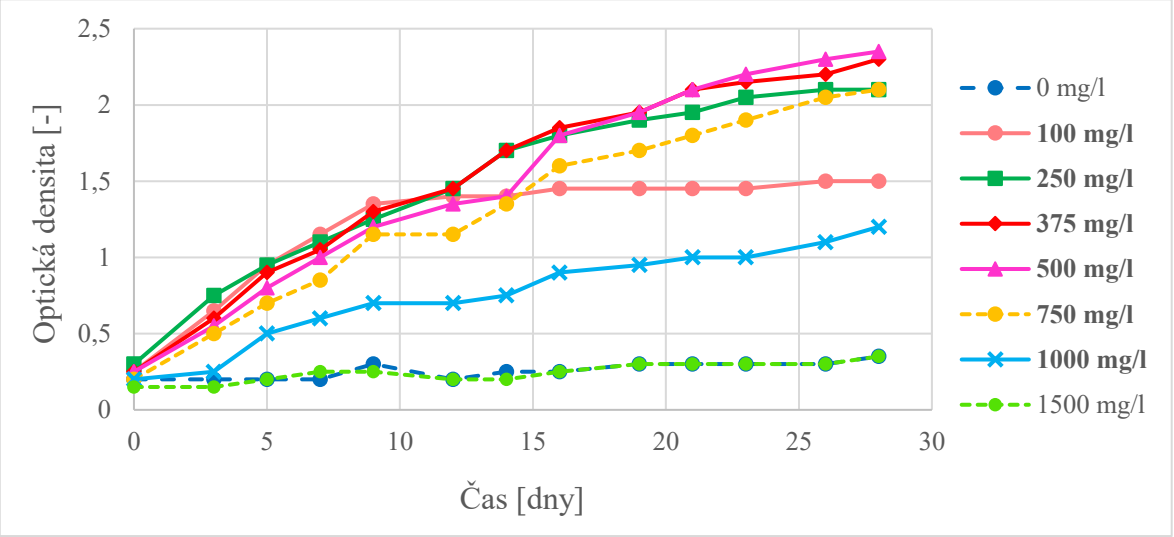
Tabulka 8: Hodnoty průměru OD vzorků v průběhu kultivace kultury 10AZS při 8 °C a 23 °C

Doba (dny)	**Teplota (°C)**	**Koncentrace fenolu (mg/l)**							
		0	**200**	**350**	**500**	**600**	**750**	**1000**	**1500**
0	8	0,2	0,2	0,2	0,15	0,15	0,25	0,2	0,15
	23	0,2	0,25	0,3	0,25	0,25	0,2	0,2	0,15
3	8	0,2	0,25	0,2	0,15	0,1	0,15	0,2	0,15
	23	0,2	0,65	0,75	0,6	0,55	0,5	0,25	0,15
5	8	0,2	0,55	0,55	0,25	0,2	0,2	0,25	0,25
	23	0,2	0,95	0,95	0,9	0,8	0,7	0,5	0,2
7	8	0,2	0,6	0,6	0,45	0,3	0,3	0,3	0,2
	23	0,2	1,15	1,1	1,05	1	0,85	0,6	0,25
9	8	0,25	0,7	0,7	0,7	0,45	0,25	0,25	0,25
	23	0,3	1,35	1,25	1,3	1,2	1,15	0,7	0,25
12	8	0,25	0,75	0,75	0,9	0,7	0,35	0,2	0,2
	23	0,2	1,4	1,45	1,45	1,35	1,15	0,7	0,2
14	8	0,25	0,75	0,75	1	1	0,4	0,3	0,2
	23	0,25	1,4	1,7	1,7	1,4	1,35	0,75	0,2
16	8	0,25	0,85	0,85	1,15	1,1	0,5	0,25	0,2
	23	0,25	1,45	1,8	1,85	1,8	1,6	0,9	0,25
19	8	0,25	0,85	0,85	1,15	1,2	0,7	0,3	0,25
	23	0,3	1,45	1,9	1,95	1,95	1,7	0,95	0,3
21	8	0,3	0,85	0,9	1,15	1,35	0,85	0,3	0,25
	23	0,3	1,45	1,95	2,1	2,1	1,8	1	0,3
23	8	0,3	0,9	0,95	1,15	1,4	1	0,35	0,25
	23	0,3	1,45	2,05	2,15	2,2	1,9	1	0,3
26	8	0,3	0,95	1,1	1,2	1,45	1,25	0,4	0,25
	23	0,3	1,5	2,1	2,2	2,3	2,05	1,1	0,3
28	8	0,3	1,05	1,15	1,25	1,5	1,35	0,5	0,2
	23	0,35	1,5	2,1	2,3	2,35	2,1	1,2	0,35

Zeleně zaznačena maxima růstu.



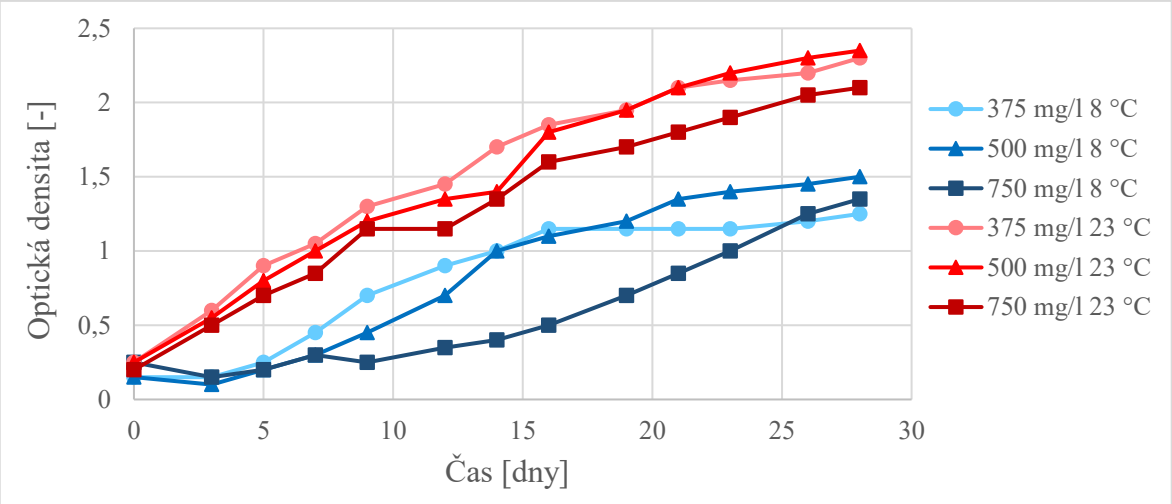
Obrázek 14: Růst kultury 10AZS na různých koncentracích fenolu při 8 °C



Obrázek 15: Růst kultury 10AZS na různých koncentracích fenolu při 23 °C

Růst kultury byl zaznamenán při koncentracích fenolu 100–750 mg/l při 8 °C a 100–1000 mg/l při 23 °C. Při koncentraci fenolu 1500 mg/l kultura nerostla.

Nejvyšších hodnot růstu dosahovala kultura při koncentracích fenolu 250–750 mg/l při obou teplotách. Porovnání koncentrací 375, 500 a 750 mg/l při 8 °C a 23 °C je vyobrazeno v grafu na obr. 16.



Obrázek 16: Porovnání růstu kultury 10AZS na koncentracích fenolu 375, 500 a 750 mg/l při teplotách 8 °C a 23 °C

Nárůst při teplotě 8 °C byl pozvolnější než při teplotě 23 °C – znovu bylo potvrzeno, že vhodnější teplotou je pro kulturu 23 °C, nicméně dokáže substrát slibně degradovat i při teplotě nižší. Rozdíl optické denzity při různých teplotách byl méně výrazný než v předchozím pokusu.

5.4 Získávání bakterií rostoucích na resorcinolu při 8 °C (Pokus 4)

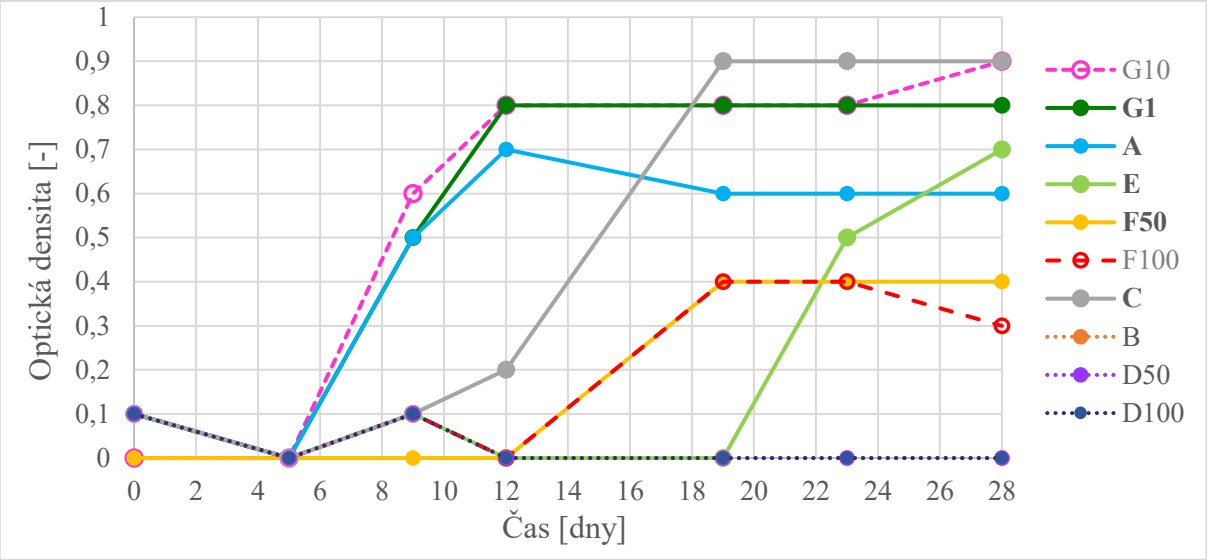
Cílem dlouhodobého čtvrtého pokusu bylo získat bakterie, které jsou schopny využívat resorcinol jako růstový substrát při nízkých teplotách, a ověřit tak jejich výskyt v běžných povrchových vodách. Ve dvou sériích byly odebrány vzorky povrchových vod (A–G; H–Q), zaočkovány do minerálního média s resorcinolem a inkubovány; růst byl sledován prostřednictvím měření optické density (OD), změřené hodnoty jsou zaznamenány v tabulkách 8 a 11. Výsledky jsou vyobrazeny v grafech na obr. 17 a 18.

Série první:

Tabulka 8: Růst mikroorganismů, vyjádřený hodnotami OD, ve vzorcích vod A–G v průběhu kultivace v minerálním médiu s resorcinolem při 8 °C

Doba (dny)	MMR (blank)	A	B	C	D_{50}	D_{100}	E	F_{50}	F_{100}	G_1	G_{10}
0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,5	0,6
12	0,0	0,7	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,8
19	0,0	0,6	0,0	0,9*	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,8	0,8
23	0,0	0,6	0,0	0,9*	0,0	0,0	0,5	0,4	0,4	0,8	0,8
28	0,0	0,6	0,0	0,9*	0,0	0,0	0,7	0,4	0,3	0,8	0,9

* zaznamenáno růžové až červené zbarvení; zeleně zaznačena maxima růstu.



Obrázek 17: Růst mikroorganismů vzorků A–G při využití resorcinolu při 8 °C

Vzorky první série se vzájemně velmi lišily. Růst byl zaznamenán u vzorků A, C, E, F a G. U vzorků B a D se optická denzita v průběhu pokusu nezměnila. U vzorků D, F, G, které byly očkovány ve dvou inokulech, byly výsledky obou inokul prakticky stejné (dále se pokračovalo vždy jen s jedním z nich).

Nárůst denzity u vzorků A a G nastal již po několika málo dnech, optická denzita byla u těchto dvou vzorků nejvyšší. U vzorku C byl nárůst pozvolnější, nicméně se později hodnoty dostaly stejně vysoko. U vzorku F byla denzita v porovnání s ostatními vzorky s pozitivním růstem nejnižší, navíc byl vzrůst hodnot viditelný později než u ostatních. Stejně tomu bylo i u vzorku E, který vykazoval strmý nárůst až ke konci pokusu.

Z pomnožených vzorků A, C, E, F_{50} a G_1 bylo provedeno vyočkování křížovými roztěry na R2A a po jejich inkubaci a vyčištění kultur byly získány tyto kmeny:

Vzorek A: získána jediná čistá kultura, označena A_I.

Vzorek G_1: získány dvě čisté kultury, označeny G_I a G_{II}.

Vzorek C: získány dvě čisté kultury, označeny C_I a C_{II}.

Vzorek E: získány dvě čisté kultury, označeny E_I a E_{II}.

Vzorek F_{50}: získány tři čisté kultury, označeny F_I, F_{II} a F_{III}.

U všech těchto kultur bylo provedeno potvrzení jejich schopnosti růstu na resorcinolu jejich opětovným naočkováním jednotlivě do MMR. U kultur získaných ze stejného vzorku byly také naočkovány zkumavky s MMR kombinacemi kultur. Jako slepý pokus bylo proměřováno i sterilní MMR. Výsledky zkoumaných kultur jsou uvedeny v tab. 9 a 10.

Kultury ze vzorků A a G:

Získávání čistých kultur:

Kultury A_I, G_I a G_{II}: čisté.

Potvrzení růstu na resorcinolu:

Tabulka 9: Hodnoty OD u kultur A_I, G_I, G_{II} v průběhu kultivace v MMR při 8 °C

doba kultivace [dny]	OD MMR kultura			
	A_I	G_I	G_{II}	G_{I+II}
0	0,0	0,0	0,1	0,1
5	0,7	0,0	0,7	0,7
7	0,7	0,0	0,7	0,6

Zeleně zaznačena maxima růstu.

Po ukončení těchto testů byly kultury A_I a G_{II} vyočkovány na R2A agary pro potvrzení čistoty, s těmito výsledky:

Kultura A_I: čistá, charakter kolonií odpovídající první kultivaci.

Kultura G_{II}: čistá, charakter kolonií odpovídající první kultivaci.

Kultury ze vzorků C, E a F:

Získávání čistých kultur:

Kultury C_I, C_{II}, E_I, E_{II}, F_I, F_{II} a F_{III}: čisté.

Potvrzení růstu na resorcinolu:

Tabulka 10: Hodnoty OD u kultur C_I, C_{II}, E_I, E_{II}, F_I, F_{II}, F_{III} a jejich kombinací v průběhu kultivace v MMR při 8 °C

doba kultivace [dny]	OD MMR kultura												
	C_I	C_{II}	C_{I+II}	E_I	E_{II}	E_{I+II}	F_I	F_{II}	F_{III}	F_{I+II}	F_{I+III}	F_{II+III}	$F_{I+II+III}$
0	0,1	0,1	0	0,2	0,1	0,0	0,1	0	0,1	0,0	0,1	0	0,0
7	1,0*	0,2	1,0*	0,7	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1	0,6	0,6	0	0,5
14	1,1*	0,2	1,1*	0,9*	0,1	0,9*	0,6	0,1	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5

* zaznačeno růžové až červené zabarvení; zeleně zaznačena maxima růstu.

Po ukončení těchto testů byly kultury C_I, E_I, F_I a F_{III} vyočkovány na R2A agary pro potvrzení čistoty, s těmito výsledky:

Kultura C_I: čistá, charakter kolonií odpovídající první kultivaci.

Kultura E_I: čistá, charakter kolonií odpovídající první kultivaci.

Kultura F_I: čistá, charakter kolonií odpovídající první kultivaci.

Kultura F_{III}: čistá, charakter kolonií odpovídající první kultivaci.

Z každého pozitivního vzorku z první série (tj. A, G, C, E, F) se podařilo získat minimálně jednu čistou kulturu se schopností růstu na resorcinolu. Testováním kombinací kultur ze stejného vzorku bylo zjištěno, že kombinace nevedou ke zlepšení růstu a že tak degradační kultury nepotřebují účast mikrobiálního partnera. Kultury s negativními výsledky v tab. 9 a 10 tak lze považovat za zcela balastní.

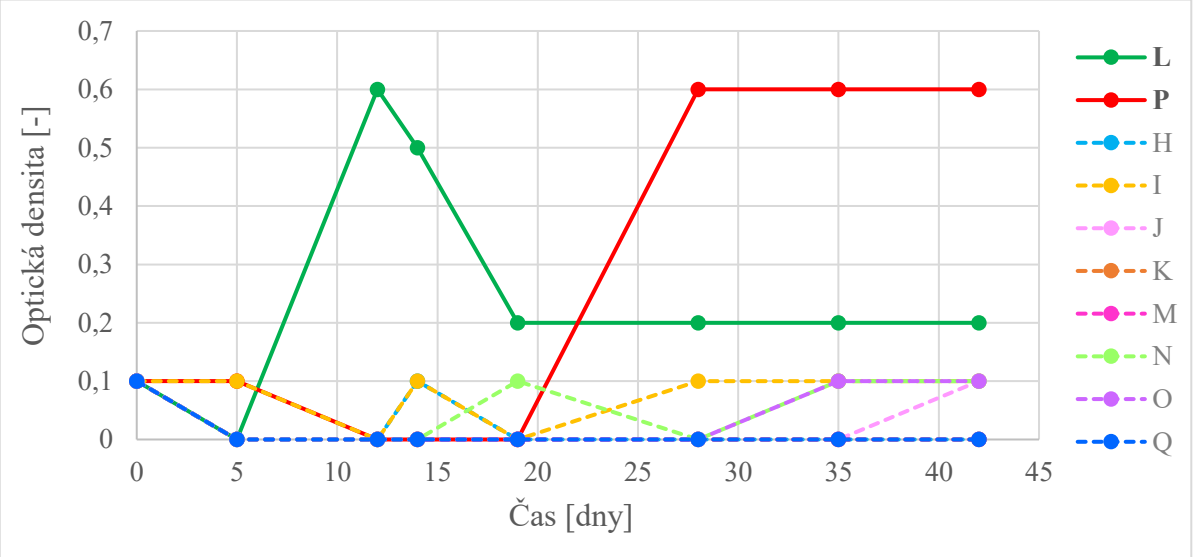
Získané čisté kultury s potvrzenou schopností využívání resorcinolu byly zakonzervovány v glycerolu při -80 °C.

Série druhá:

Tabulka 11: Růst mikroorganismů, vyjádřený hodnotami OD, ve vzorcích vod H–Q v průběhu kultivace v minerálním médiu s resorcinolem při 8 °C

Doba (dny)	MMR (blank)	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
5	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
12	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
28	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0
35	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,6	0,0
42	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,6	0,0

Zeleně zaznačena maxima růstu, podtrženě tvorba vloček.



Obrázek 18: Růst mikroorganismů vzorků H–Q při využití resorcinolu při 8 °C

Vzorky se opět vzájemně lišily. Růst byl zaznamenán jen u vzorků L a P, u ostatních vzorků se optická denzita v průběhu pokusu nezměnila nebo vzrostla o nevýznamnou hodnotu 0,1.

Nárůst denzity u vzorku L nastal již po několika málo dnech, optická denzita strmě stoupla a následně zase klesala. U vzorku P nastal růst až v druhé části měření, nicméně se hodnoty dostaly stejně vysoko.

Z pomnožených vzorků L a P bylo provedeno vyočkování křížovými roztěry na R2A a po jejich inkubaci a vyčištění narostených bakterií byly získány tyto kultury:

Vzorek L: získány tři čisté kultury, označeny L_I, L_{II} a L_{III}.

Vzorek P: získáno osm čistých kultur, označeny P_I, P_{II}, $P_{III(V)}$, $P_{III(S)}$, P_{IV}, $P_{V(B)}$, $P_{V(Ž)}$ a P_{VI}.

U těchto čistých kultur bylo provedeno testování jejich schopnosti růstu na resorcinolu jejich opětovným naočkováním do MMR. Testování kombinací kultur ze stejného vzorku nebylo provedeno. Jako slepý pokus bylo proměřováno i sterilní MMR a po ukončení testů byla čistota jednotlivých kultur opět překontrolována vyočkováním. Výsledky zkoumaných kultur jsou uvedeny v tab. 12 a 13.

Kultury ze vzorku L:

Získávání čistých kultur:

Kultury L_I, L_{II} a L_{III}: čisté.

Kultury si byly dosti podobné, neměli jsme však jistotu, zda jsou či nejsou totožné.

Potvrzení růstu na resorcinolu:

Tabulka 12: Hodnoty OD u kultur L_I, L_{II}, L_{III} v průběhu kultivace v MMR při 8 °C

	OD MMR		
doba kultivace [dny]	**kultura**		
	L_I	**L_{II}**	**L_{III}**
0	0,0	0,2	0
7	0,6	0,6	0,1
16	0,6	0,5	0,6

Zeleně zaznačena maxima růstu.

Po ukončení těchto testů byly kultury L_I, L_{II} a L_{III} vyočkovány na R2A agary pro potvrzení čistoty, s těmito výsledky:

Kultura L_I: čistá, charakter kolonií odpovídající první kultivaci.

Kultura L_{II}: čistá, charakter kolonií odpovídající první kultivaci.

Kultura L_{III}: smíšená, kultura L_{III} byla dominantní a zjevně se pomnožila, ale ojediněle se vyskytovala i další kultura, výrazně se podobající kultuře L_{II}. S touto kulturou tak nebylo dále pracováno, protože byla pokládána za identickou s kulturou L_{II}.

Kultury ze vzorku P:

Získávání čistých kultur:

Kultury P_I, P_{II}, P_{VI}, $P_{III(V)}$, P_{IV}, $P_{V(B)}$, $P_{III(S)}$ a $P_{V(Ž)}$: čisté.

Potvrzení růstu na resorcinolu:

Tabulka 13: Hodnoty OD u kultur P_I, P_{II}, P_{VI}, $P_{III(V)}$, P_{IV}, $P_{V(B)}$, $P_{III(S)}$ a $P_{V(Ž)}$ v průběhu kultivace v MMR při 8 °C

	OD MMR				**OD MMR**				**OD MMR**	
doba kultivace [dny]	**kultura**			**doba kultivace [dny]**	**kultura**			**doba kultivace [dny]**	**kultura**	
	P_I	**P_{II}**	**P_{VI}**		**P_{IV}**	**$P_{III(V)}$**	**$P_{V(B)}$**		**$P_{III(S)}$**	**$P_{V(Ž)}$**
0	0,1	0,1	0,0	**0**	0,1	0,2	0,0	**0**	0,3	0,2
4	0,0	0,1	0,1	**7**	0,0	0,2	0,0	**5**	0,2	0,1
11	0,1	0,3	0,1	**14**	0,0	0,1	0,0	**7**	0,2	0,1
18	0,1	0,3	0,1	**16**	0,0	0,1	0,0	**12**	0,2	0,2
20	0,1	0,4	0,1	**21**	0,0	0,1	0,0	**14**	0,2	0,2
25	0,0	0,3	0,1	**23**	0,0	0,1	0,1	**17**	0,2	0,1
27	0,0	0,3	0,1	**28**	0,1	0,1	0,1	**20**	0,4	0,2
32	0,1	0,4	0,1	**30**	0,0	0,1	0,1	**24**	0,3	0,2
34	0,1	0,4	0,1	**40**	0,1	0,2	0,1	**27**	0,3	0,2
44	0,1	0,4	0,1					**30**	0,4	0,2

Zeleně zaznačeno maximum růstu.

Po ukončení těchto testů byla kultura P_{II} vyočkována na R2A agar pro potvrzení čistoty, s těmito výsledky:

Kultura P_{II}: čistá, charakter kolonií odpovídající první kultivaci.

Z tabulky 13 je patrné, že kultura P_{II} narostla v čisté kultuře méně než směsná kultura původního vzorku P, což může naznačovat, že v původním vzorku P jí pomáhala jiná z kultur v růstu. Z časových důvodů a vzhledem k vysokému počtu kultur však už testy potřebné k potvrzení této domněnky nebyly provedeny.

Z každého pozitivního vzorku ze druhé série (tj. L a P) se podařilo získat minimálně jednu čistou kulturu se schopností růstu na resorcinolu. Testování kombinací kultur ze stejného vzorku nebylo provedeno.

Získané čisté kultury s potvrzenou schopností využívání resorcinolu byly zakonzervovány v glycerolu při -80 °C.

Schopnost růstu na resorcinolu byla potvrzena u kultur A_I, G_{II}, C_I, E_I, F_I, F_{III}, L_I, L_{II}, L_{III} a P_{II}. Získané čisté kultury byly uloženy do sbírky ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně.

5.5 Gramovo barvení

Barvením podle Grama bylo zjištěno, že z deseti pozitivních mikrobiálních kultur schopných růstu na resorcinolu při 8 °C, je osm gramnegativních bakterií a dvě kultury kvasinek. Příslušnost těchto dvou kultur ke kvasinkám byla následně potvrzena i jejich výborným růstem na živné půdě CHYGA s chloramfenikolem. Výsledkem barvení jsou fotografie, které jsou součástí Přílohy I. Buňky některých kmenů měly kulovitý tvar – jednalo se o koky (kultury A_I, G_{II}, L_{II}); u jiných se jednalo o diplokoky (L_I, L_{III}) či tyčinky (F_I, F_{III}, P_{II}). Kultury si byly navzájem velmi podobné. Na fotografiích kvasinek (C_I, E_I) je na několika místech vidět pučení; buňky kmene C_I měly elipsoidní tvar a průměr asi 5 μm, buňky kmene E_I byly tvaru kulovitého s průměrem okolo 2 μm. U kmene E_I jsme pomocí imerzního objektivu vyfotografovali také celou kolonii. Bakteriální kultura 10AZS, se kterou jsme pracovali v prvních částech práce, se barvila variabilně – některé buňky byly grampozitivní, jiné gramnegativní, avšak byly stejného tyčkovitého tvaru i velikosti. O smíšenou kulturu tedy nešlo, snadná odbarvitelnost je u některých rodů grampozitivních bakterií známa. [32]

Po provedení Gramova barvení byl u kultury 10AZS proveden i KOH test, který prokázal grampozitivitu – buňky se nerozpouštěly.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit, zda se v běžných povrchových vodách vyskytují bakterie, které jsou schopny při nízkých teplotách využívat resorcinol jako jediný zdroj uhlíku a energie.

V první části práce byly ověřovány čtyři dříve získané bakteriální kultury, které byly schopné při teplotě 8 °C rozkládat fenol, a to kultury 1AZS, 5BZS, 8AZS a 10AZS. Růst byl sledován pomocí optické density; kultura 10AZS byla jako jediná schopna resorcinol využívat. Tato kultura byla dále více zkoumána, jedná se o nefermentující grampozitivní bakterii tyčinkovitého tvaru.

Dále byly zjišťovány koncentrace resorcinolu, na kterých byla kultura 10AZS schopna růstu – předmětem zkoumání byly koncentrace 0–1500 mg/l. Růst byl zaznamenán při koncentracích resorcinolu 100–500 mg/l, při koncentracích vyšších kultura buď vůbec nerostla, nebo dosáhla pouze nízkých hodnot navýšení optické density. Nejvyšších hodnot dosahovala při koncentracích 250 a 375 mg/l, při obou testovaných teplotách 8 °C i 23 °C, přičemž vhodnější teplotou pro ni byla jednoznačně ta vyšší.

Obdobným postupem byly zjišťovány koncentrace fenolu, které by byla kultura schopna využívat jako růstový substrát. Růst kultury byl zaznamenán při koncentracích fenolu od 100 do 750 mg/l při teplotě 8 °C a od 100 do 1000 mg/l při teplotě 23°C. Nejvyšších hodnot dosahovala při koncentracích 250 až 750 mg/l, vhodnější teplotou bylo opět 23 °C.

Kultura 10AZS tedy dokázala slibně růst jak na fenolu, tak na resorcinolu, a to i při nízké teplotě.

V druhé, dlouhodobé části práce, bylo pracováno s nově odebranými vzorky vod. Cílem pokusu bylo získání bakterií, které by byly schopny využívat resorcinol jako jediný zdroj uhlíku a energie při teplotě 8 °C, a tak ověření jejich výskytu v běžných povrchových vodách. Z původních sedmnácti odebraných vzorků jich bylo osm pozitivních, z nichž byly dále klíčové mikroorganismy izolovány a testovány. Vzorky se vzájemně velmi lišily a každý z pozitivních začal resorcinol využívat po jinak dlouhé době.

Celkem bylo získáno 22 čistých mikrobiálních kultur; růst na resorcinolu byl následně potvrzen u deseti z nich, konkrétně u kultur pracovně označených A_I, G_{II}, C_I, E_I, F_I, F_{III}, L_I, L_{II}, L_{III} a P_{II}. Barvením podle Grama bylo zjištěno, že všech 8 námi získaných bakteriálních kmenů jsou gramnegativní. Kromě toho jsme zjistili, že u dalších

dvou kultur se nejednalo o bakterie, ale o kvasinky. Tvary bakteriálních buněk byly kokovité nebo tyčinkovité.

Kultury byly uloženy ve sbírce ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně a mohou být využity k dalším výzkumným pracím (např. ke zjištění maximálních růstových koncentrací resorcinolu, k jejich identifikaci, ke zjištění povahy neznámého červenavého metabolitu, ke zkoumání metabolických cest, kterými byl resorcinol degradován) a po těchto ověřeních potenciálně také pro použití k dekontaminaci resorcinolem znečištěných chladných vod či jiných vnějších prostředí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] *Fenoly*. Online. PŘIBYLOVÁ, Jarmila; KLEGER, Ladislav a VÁLEK, Petr. Databáze látek. 2010. Dostupné z: https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/fenoly. [cit. 2023-09-30].

[2] *Fenol*. Online. PENTA. Bezpečnostní list. 2010. Dostupné z: https://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Fenol.pdf. [cit. 2023-09-30].

[3] *Phenol*. Online. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. 2007, 09/11/2023. Dostupné z: https://echa.europa.eu/cs/brief-profile/-/briefprofile/100.003.303. [cit. 2023-09-30].

[4] *108-46-3 Resorcinol*. Online. Global Chemical Network. 2001. Dostupné z: https://www.chemnet.com/cas/cz/108-46-3/Resorcinol.html. [cit. 2023-10-16].

[5] *Resorcinol*. Online. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. 2007, 19/09/2023. Dostupné z: https://echa.europa.eu/cs/brief-profile/-/briefprofile/100.003.260. [cit. 2023-11-12]

[6] *Resorcinol*. Online. ROTH. Bezpečnostní list. 2019. Dostupné z: https://www.carlroth.com/medias/SDB-5727-CZ-CS.pdf?context=bWFzdGVyfHNlY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMzc2ODN8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGg4OS9oZDgvOTE0NTkzNTU5MzUwMi9TREJfNTcyN19DWl9DUy5wZGZ8NzUwNTMxMjY0ODFlMzU3NzZjNmI0Mjc5N2Q5OTJjODNlN2Q5MzI4YTI5MDI5MDlhNTUxNTg1YzFiMTJmMWVhOQ. [cit. 2023-10-16].

[7] *Resorcinol*. Online. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. 2004. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5054. [cit. 2023-11-11].

[8] ČEJKOVÁ, Alena; MASÁK, Jan; JIRKŮ, Vladimír; VESELÝ, Martin; PÁTEK, Miroslav et al. Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2005, roč. 21, s. 317–321.

[9] STRAUBE, G. Phenol hydroxylase from *Rhodococcus sp*. *Journal of Basic Microbiology*. Roč. 1987, č. 27, s. 229–232.

[10] LEPIK, R. a TENNO, T. BIODEGRADABILITY OF PHENOL, RESORCINOL AND 5-METHYLRESORCINOL AS SINGLE AND MIXED SUBSTRATES BY ACTIVATED SLUDGE. *Oil Shale*. 2010, roč. 28, č. 3, s. 426-446. ISSN 0208-189X.

[11] DEY, Sudipta a MUKHERJEE, Somnath. Biodegradation kinetics of Bi-substrate solution of phenol and resorcinol in an aerobic batch reactor. Online. *Journal of Civil Engineering*. 2013, roč. 17, č. 7, s. 1587-1595. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12205-013-0196-1. [cit. 2024-03-31].

[12] CHAPMAN, PETER J. a RIBBONS, DOUGLAS W. Metabolism of Resorcinylic Compounds by Bacteria: Alternative Pathways for Resorcinol Catabolism in *Pseudomonas putida*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1976, roč. 125, č. 3, s. 985-998. ISSN 1098-5530.

[13] GROSECLOSE, EDYE E. a RIBBONS, DOUGLAS W. Metabolism of Resorcinylic Compounds by Bacteria: New Pathway for Resorcinol Catabolism in *Azotobacter vinelandii*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1981, roč. 146, č. 2, s. 460-466.

[14] SHEN, Xi-Hui; HUANG, Yan a LIU, Shuang-Jiang. Genomic Analysis and Identification of Catabolic Pathways for Aromatic Compounds in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbes and Environments*. 3n. l., roč. 2005, č. 20, s. 160-167. ISSN 1347-4405.

[15] NGUGI, David Kamanda; TSANUO, Muniru Khamis a BOGA, Hamadi Iddi. *Rhodococcus opacus* strain RW, a resorcinol degrading bacterium from the gut of *Macrotermes michaelseni*. *African Journal of Biotechnology*. 2005, roč. 4, č. 7, s. 639-645. ISSN 1684–5315.

[16] GORNY, Norbert; WAHL, Günther; BRUNE, Andreas a SCHINK, Bernhard. A strictly anaerobic nitrate-reducing bacterium growing with resorcinol and other aromatic compounds. *Archives of Microbiology*. 1992, roč. 158, s. 48-53.

[17] PHILIPP, Bodo a SCHINK, Bernhard. Evidence of Two Oxidative Reaction Steps Initiating Anaerobic Degradation of Resorcinol (1,3-Dihydroxybenzene) by the Denitrifying Bacterium *Azoarcus anaerobius*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1998, roč. 180, č. 14, s. 3644-3649.

[18] BERGAUER, Philipp; FONTEYNE, Pierre-Alain; NOLARD, Nicole; SCHINNER, Franz a MARGESIN, Rosa. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere*. 2005, roč. 59, s. 909-918.

[19] MÜLLER, C; PETRUSCHKA, L; CUYPERS, H; BURCHHARDT, G a HERRMANN, H. Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas*

putida is mediated by the inhibition of the activator protein PhlR. Online. *Journal of bacteriology*. 1996, roč. 178, č. 7, s. 2030-2036. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8606180/. [cit. 2024-03-31].

[20] BEGOÑA PRIETO, M; HIDALGO, Aurelio; SERRA, Juan L a LLAMA, María J. Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite® in a packed-bed reactor. Online. *Journal of Biotechnology*. 2002, roč. 97, č. 1, s. 1-11. ISSN 0168-1656. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165602000226. [cit. 2024-03-03].

[21] ARUTCHELVAN, V; KANAKASABAI, V; ELANGOVAN, R; NAGARAJAN, S a MURALIKRISHNAN, V. Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*. Online. *Journal of Hazardous Materials*. 2006, roč. 129, č. 1-3, s. 216-222. ISSN 0304-3894. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030438940500525X?via%3Dihub. [cit. 2024-03-03].

[22] KARIGAR, C; MAHESH, A a NAGENAHALLI, M. Phenol Degradation by Immobilized Cells of *Arthrobacter citreus*. Online. *Biodegradation*. 2006, roč. 17, s. 47-55. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007/s10532-005-3048-y#citeas. [cit. 2024-03-03].

[23] JIANG, Yan; WEN, Jianping; BAI, Jing a HU, Zongding. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. Online. *Journal of Hazardous Materials*. 2007, roč. 147, č. 1-2, s. 672-676. ISSN 0304-3894. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389407007492. [cit. 2024-03-02].

[24] CHEN, Shuo a SUN, Lihui. Screening of Efficient Phenol-Degrading Bacteria and Analysis of Their Degradation Characteristics. *Sustainability*. 2023, roč. 15, č. 6788, s. 1-15.

[25] LIU, Y J; ZHANG, A N a WANG, X C. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. Online. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, roč. 44, č. 2-3, s. 187-192. ISSN 1369-703X. Dostupné

z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X08003860. [cit. 2024-03-02].

[26] ZHENGHUI, Liu; WENYU, Xie; DEHAO, Li; YANG, Peng a LI, Zesheng. Biodegradation of Phenol by Bacteria Strain *Acinetobacter Calcoaceticus* PA Isolated from Phenolic Wastewater. *International journal of environmental research and public health*. 2016, roč. 13, č. 300, s. 1-8.

[27] GENG, A; SOH, A E W a LIM, C J. Isolation and characterization of a phenol-degrading bacterium from an industrial activated sludge. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, roč. 71, s. 728-735. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-005-0199-z#citeas. [cit. 2024-03-03].

[28] SCHIE, Paula M. a YOUNG, L. Y. Isolation and Characterization of Phenol-Degrading Denitrifying Bacteria. *Environmental Microbiology*. 1998, roč. 64, č. 7, s. 2432-2438.

[29] SAŇÁKOVÁ, Zuzana. *Získání chladnomilných bakterií rostoucích na fenolu za méně příznivých podmínek*. Diplomová práce. Zlín: FT UTB, 2024.

[30] LINHARTOVÁ, Karolína. *Studium psychrofilních bakterií rostoucích na fenolu*. Bakalářská práce. Zlín: FT UTB, 2023.

[31] RYŠAVÁ, Hana. *Možnosti degradace polutantů psychrofilními bakteriemi rostoucími na fenolu*. Bakalářská práce. Zlín: FT UTB, 2023.

[32] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1AZS, 5BZS, 8AZS, 10AZS

označení bakteriálních kultur

A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q

označení jednotlivých vzorků vod

OD	optická denzita
MM	minerální médium
MMR	minerální médium s resorcinolem
MEM	(Minimum Essential Medium), syntetické medium s vitaminy
MM7	univerzální minerální médium
R2A	(Reasoner's 2A agar) typ agarového média
TYA	(Tryptone Yeast Extract Agar) tryptický agar
CHYGA	(Chloramphenicol Yeast Glucose Agar) agar s chloramfenikolem
MLG	agar s laktátem (=mléčnanem sodným) a glycerolem
OF-test	oxidation-fermentation test
OXITEST	oxidázový test

A_I, G_I, G_{II}, C_I a C_{II}, E_I a E_{II}, F_I, F_{II}, F_{III}, L_I, L_{II}, L_{III}, P_I, P_{II}, $P_{III(V)}$, $P_{III(S)}$, P_{IV}, $P_{V(B)}$, $P_{V(Ž)}$, P_{VI}

označení bakteriálních kultur získaných ze vzorků

ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
FT	Fakulta technologická
UTB	Univerzita Tomáše Bati

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Molekula fenolu – strukturní vzorec 11
Obrázek 2: Molekula resorcinolu – strukturní vzorec 12
Obrázek 3: Katabolismus resorcinolu (*Pseudomonas* sp.) 15
Obrázek 4: Katabolismus resorcinolu (*A. vinelandii*) 15
Obrázek 5: Schéma průběhu pokusu č. 1 29
Obrázek 6: Schéma průběhu pokusu č. 2 31
Obrázek 7: Schéma průběhu pokusu č. 3 33
Obrázek 8: Schéma průběhu pokusu č. 4 35
Obrázek 9: Schéma provedení křížového roztěru 37
Obrázek 10: Schéma postupu Gramova barvení 38
Obrázek 11: Měření OD v průběhu kultivace dříve získaných kultur při využití resorcinolu 40
Obrázek 12: Porovnání růstu kultury 10AZS při využití fenolu a resorcinolu (koncentrace 100 mg/l) 40
Obrázek 13: Růst kultury 10AZS na různých koncentracích resorcinolu při 8 °C 42
Obrázek 14: Růst kultury 10AZS na různých koncentracích resorcinolu při 23 °C 42
Obrázek 15: Porovnání růstu kultury 10AZS na koncentracích resorcinolu 250 a 375 mg/l při teplotách 8 °C a 23 °C 43
Obrázek 16: Porovnání růstu kultury 10AZS na koncentracích fenolu 375, 500 a 750 mg/l při teplotách 8 °C a 23 °C 46
Obrázek 17: Růst mikroorganismů vzorků A–G při využití resorcinolu při 8 °C 47
Obrázek 18: Růst mikroorganismů vzorků H–Q při využití resorcinolu při 8 °C 49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Biologické účinky resorcinolu na různé organismy [5, 6] 13

Tabulka 2: Vzorky vod a data jejich odběrů 25

Tabulka 3: Rozpis složek v pokusu 2 32

Tabulka 4: Rozpis složek v pokusu 3 33

Tabulka 5: Přehled vzorků 36

Tabulka 6: Hodnoty OD dříve získaných bakteriálních kultur při růstu na fenolu a resorcinolu 39

Tabulka 7: Hodnoty průměru OD vzorků v průběhu kultivace kultury 10AZS při 8 °C a 23 °C na různých koncentracích resorcinolu 41

Tabulka 8: Růst mikroorganismů, vyjádřený hodnotami OD, ve vzorcích vod A–G v průběhu kultivace v minerálním médiu s resorcinolem při 8 °C 46

Tabulka 9: Hodnoty OD u kultur A_I, G_I, G_{II} v průběhu kultivace v MMR při 8 °C 48

Tabulka 10: Hodnoty OD u kultur C_I, C_{II}, E_I, E_{II}, F_I, F_{II}, F_{III} a jejich kombinací v průběhu kultivace v MMR při 8 °C 48

Tabulka 11: Růst mikroorganismů, vyjádřený hodnotami OD, ve vzorcích vod H–Q v průběhu kultivace v minerálním médiu s resorcinolem při 8 °C 49

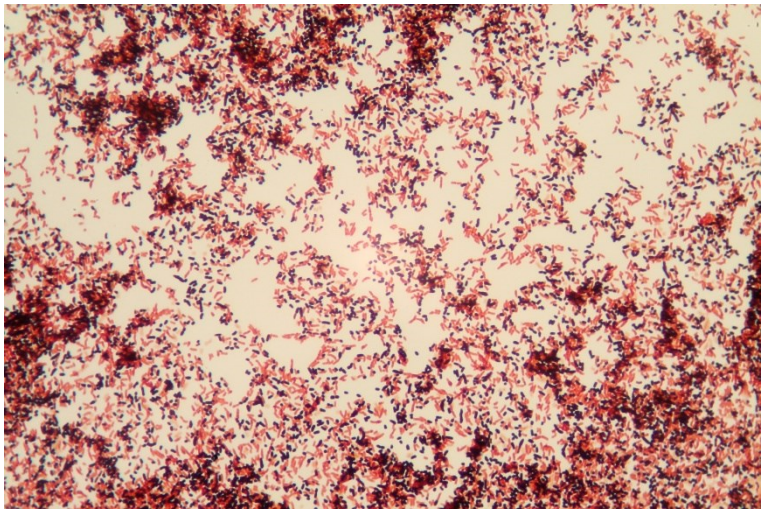
Tabulka 12: Hodnoty OD u kultur L_I, L_{II}, L_{III} v průběhu kultivace v MMR při 8 °C 50

Tabulka 13: Hodnoty OD u kultur P_I, P_{II}, P_{VI}, $P_{III(V)}$, P_{IV}, $P_{V(B)}$, $P_{III(S)}$ a $P_{V(Ž)}$ v průběhu kultivace v MMR při 8 °C 51

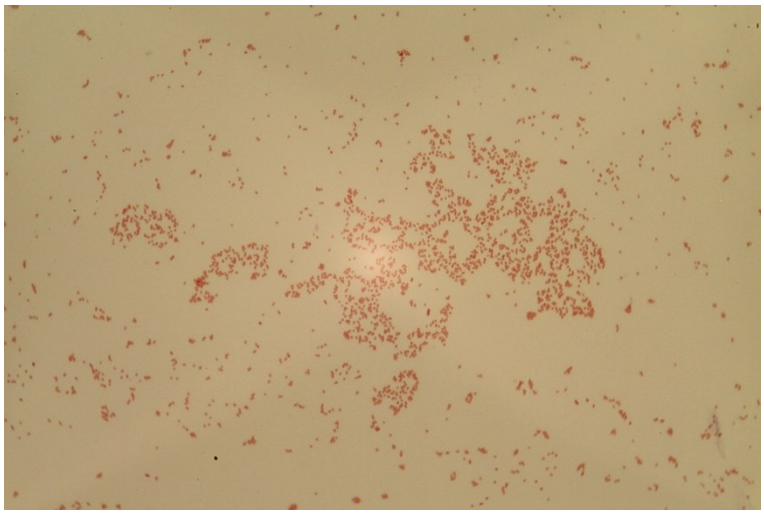
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Gramovo barvení

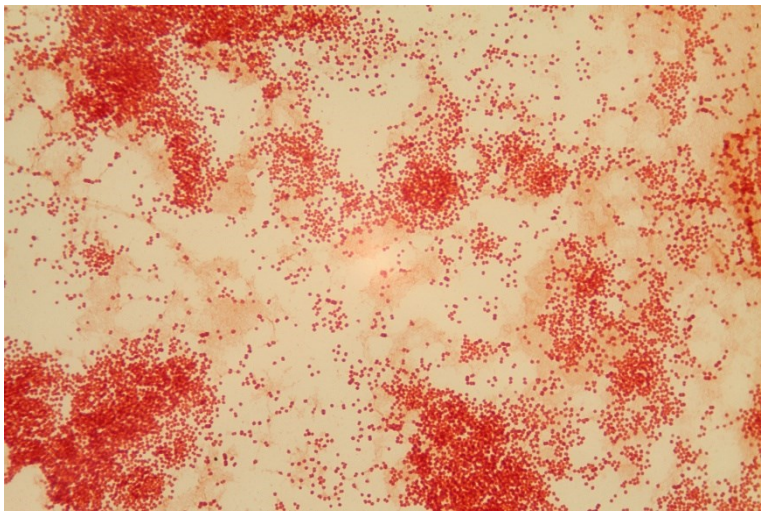
PŘÍLOHA I: GRAMOVO BARVENÍ



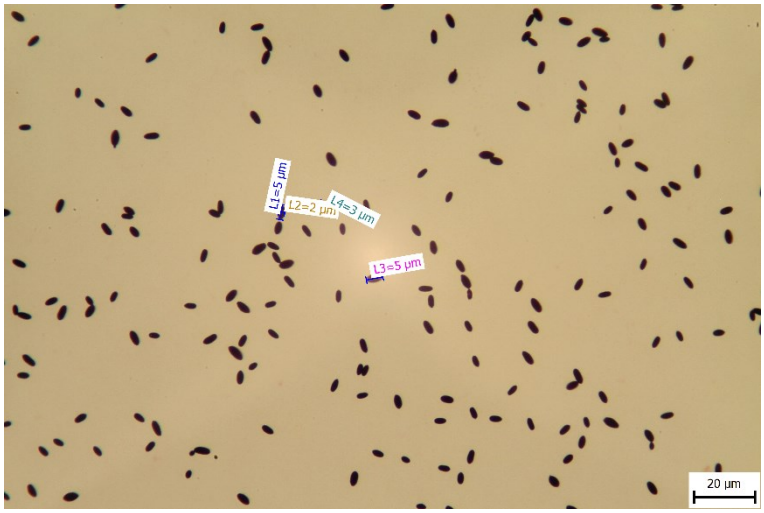
Kultura 10AZS (zvětšení 1000x)



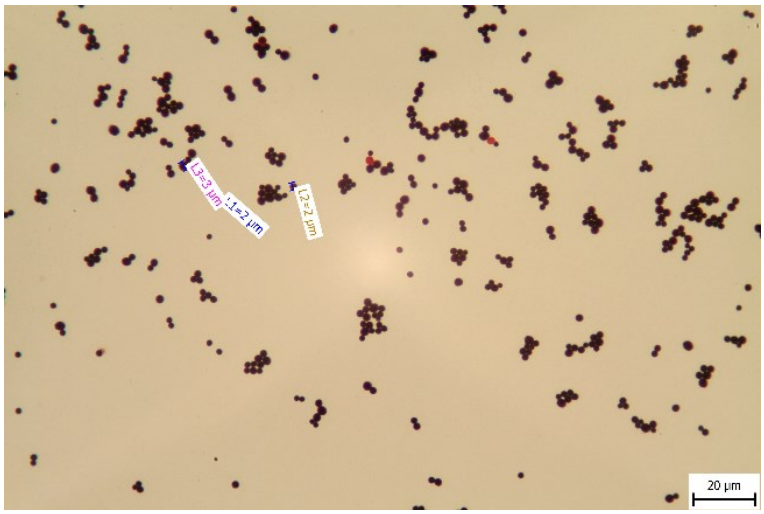
Kultura A_I (zvětšení 1000x)



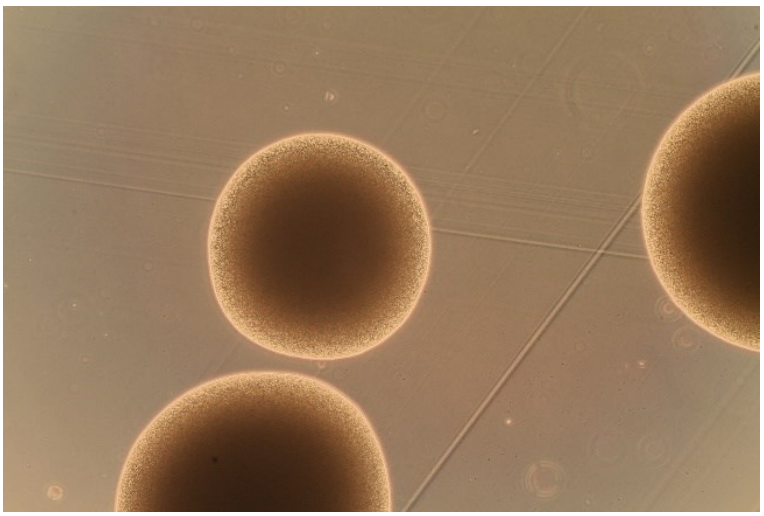
Kultura G_{II} (zvětšení 1000x)



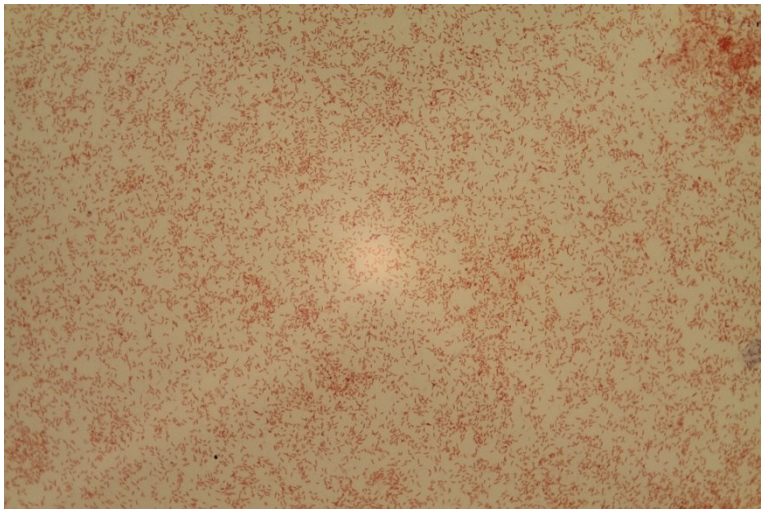
Kmen C_I (zvětšení 1000x)



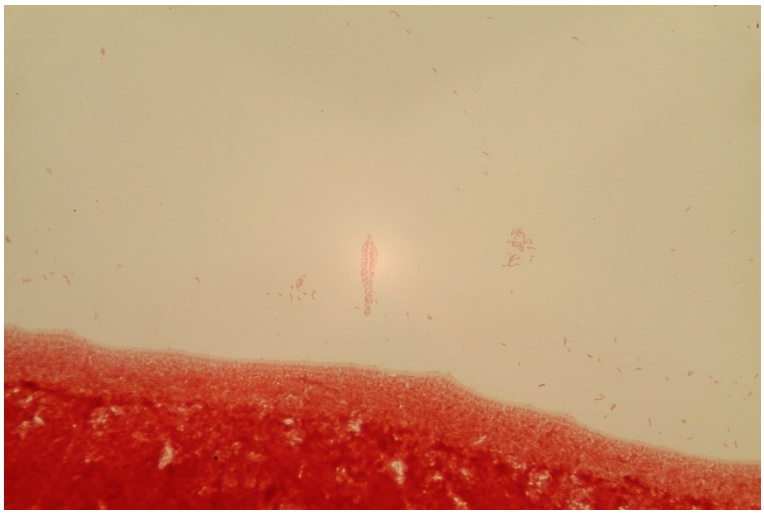
Kmen E_I (zvětšení 1000x)



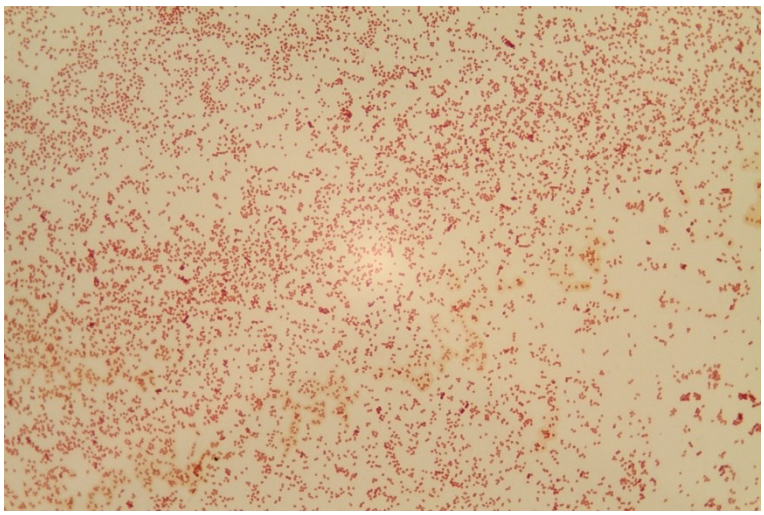
Kmen E_I, kolonie



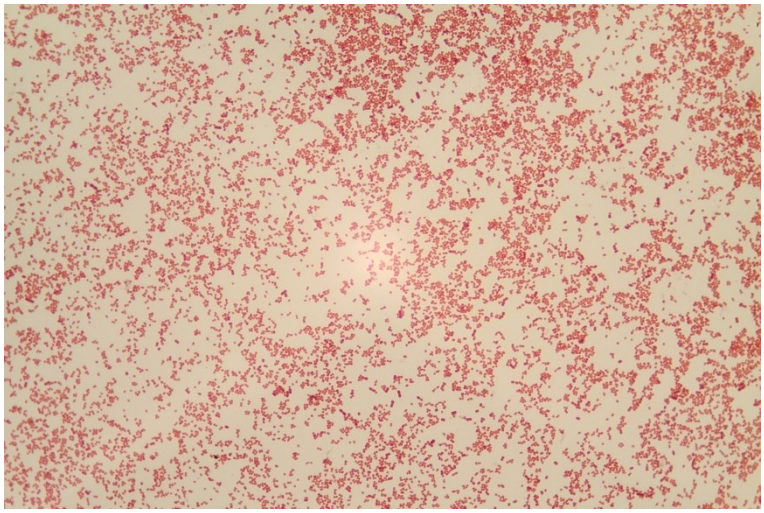
Kultura F_I (zvětšení 1000x)



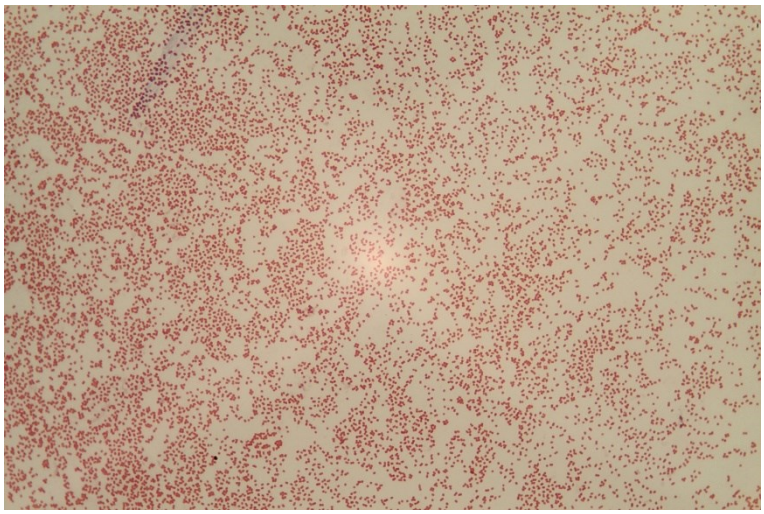
Kultura F_{III} (zvětšení 1000x)



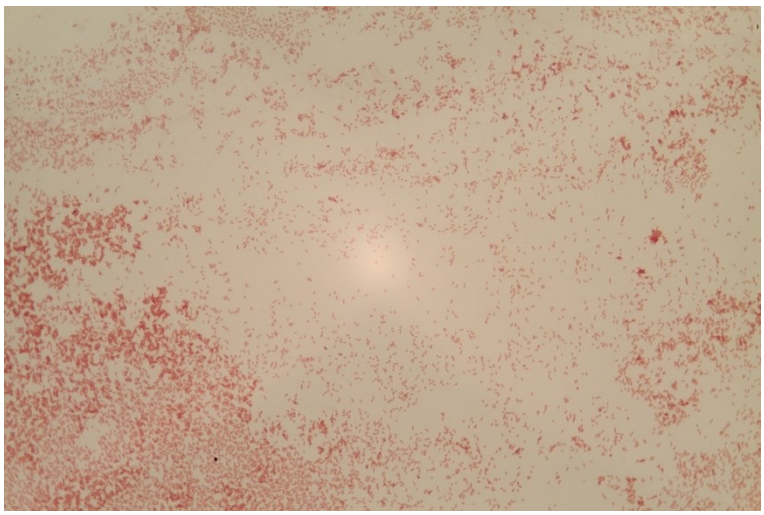
Kultura L_I (zvětšení 1000x)



Kultura L_{II} (zvětšení 1000x)



Kultura L_{III} (zvětšení 1000x)



Kultura P_{II} (zvětšení 1000x)