


Získání chladnomilných bakterií rostoucích na fenolu za méně příznivých podmínek

Bc. Zuzana Saňáková

Diplomová 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 DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

| | |
|-------------------|--|
| Jméno a příjmení: | Bc. Zuzana Saňáková |
| Osobní číslo: | T21813 |
| Studijní program: | N0712A030001 Environmentální inženýrství |
| Forma studia: | Kombinovaná |
| Téma práce: | Získání chladnomilných bakterií rostoucích na fenolu za méně příznivých podmínek |

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši popisující bakterie využívající fenol jako růstový substrát při nízkých teplotách a za různých podmínek prostředí (pH, koncentrace soli).

Odeberte sérii vzorků povrchových vod, případně i půd, jako zdrojů mikroorganismů.

Z odebraných vzorků se pokuste izolovat bakteriální kultury rostoucí na fenolu při nízkých teplotách a současně za podmínky slabě kyselé hodnoty pH nebo při vyšších koncentracích NaCl.

Získané výsledky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v požadované formě v řádném termínu.

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

R. Margesin a kol.: Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 2013, 185-191.

R. Margesin a kol.: Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles* 2003, 7:451–458.

Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect a Medline.

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

Datum zadání diplomové práce: 2. ledna 2024
Termín odevzdání diplomové práce: 10. 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 AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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 – diplomovou 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 diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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 diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo získat bakterie rostoucí na fenolu za ztížených podmínek, kde se jednalo konkrétně o adaptaci na chlad a snížené pH nebo zvýšenou salinitu chloridem sodným.

Bakterie byly získány zpracováním deseti vzorků vod a půd z vnějšího prostředí. Z nich byly čtyři vzorky z vod tekoucích a v jednom případě voda stojatá. Dále se jednalo o vzorky půd.

Vzorky byly naočkovány do minerálních médií s fenolem a inkubovány při 8 °C a pH 5, nebo za zvýšené koncentrace chloridu sodného. V případě růstu mikroorganismů byly jednotlivé čisté kultury získány kultivací na pevných živných půdách a byly postupně ověřeny na schopnost růstu na fenolu v čisté kultuře.

Celkově byly nalezeny dvě kultury bakterií rostoucí na fenolu za snížené teploty a pH 5,2 a také dvě kultury rostoucí na fenolu za snížené teploty a zvýšených koncentrací NaCl. Z uvedených čtyř kultur byla jedna gramnegativní a tři grampozitivní; všechny kultury byly dlouhodobě uloženy v laboratoři ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně.

Klíčová slova: bakterie, fenol, pH, salinita, snížená teplota

ABSTRACT

This work aims to obtaining bacteria growing on phenol under low temperature and either reduced pH or increased salinity by sodium chloride.

Bacteria were obtained by processing ten water and soil samples from the external environment; four samples originated from flowing and one from standing water, the rest ones comprised soil samples.

The samples were inoculated into mineral media with phenol and were incubated at 8 °C and pH 5 or under increased sodium chloride concentration. In case of microbial growth, individual pure strains were obtained by cultivation on solid nutrient media and they were gradually verified for the ability to grow on phenol in pure culture.

Overall, two strains of bacteria growing on phenol at 8 °C and pH 5.2 were found, as well as two strains growing on phenol at 8 °C and increased NaCl concentrations. Of these four strains listed, one was Gram-negative and three ones were Gram-positive; all strains were long-term stored in the laboratory of the Institute of Environmental Protection Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín.

Keywords: bacteria, phenol, pH, salinity, reduced temperature

Mé velké poděkování patří zejména panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za profesionální vedení diplomové práce, za jeho ochotu a čas, cenné rady a trpělivost. Dále poděkování patří mému synovi Vilíčkovi, který je pro mě největší motivací, hnacím motorem a podporou, bez které bych se neobešla. A v neposlední řadě děkuji všem, kteří ve mě aspoň trochu věřili.

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

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD..... | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST..... | 11 |
| 1 FENOL | 12 |
| 1.1 CHARAKTERISTIKA..... | 12 |
| 1.2 POUŽITÍ | 13 |
| 1.3 VÝSKYT V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ..... | 14 |
| 1.4 DOPADY NA ZDRAVÍ LIDÍ A ZVÍŘAT | 14 |
| 2 BAKTERIE DEGRADUJÍCÍ FENOL ZA NÍZKÝCH TEPLOT | 15 |
| 2.1 <i>ACINETOBACTER</i> SP. KMEN RTE1.4..... | 15 |
| 2.2 <i>ACINETOBACTER</i> SP. KMEN B9..... | 17 |
| 2.3 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> MTCC 4996 | 17 |
| 2.4 ANTARKTICKÉ BAKTERIE | 18 |
| 2.5 BIODEGRADACE FENOLICKÝCH LÁTEK KULTUROU BAKTERIÍ Z AKTIVOVANÉHO KALU A Z ŘIČNÍ VODY | 19 |
| 2.6 NÍZKOTEPLTNÍ BIODEGRADACE ROPNÝCH UHLOVODÍKŮ ČTYŘMI AKTINOBAKTERIÁLNÍMI KMENY | 20 |
| 2.7 DEGRADACE UHLOVODÍKŮ A ENZYMOVÉ AKTIVITY BAKTERIÍ A KVASINEK ADAPTOVANÝCH NA CHLAD | 23 |
| 2.8 BIODEGRADACE FENOLU V HYPERSALINNÍCH PODMÍNKÁCH POMOCÍ <i>HALOMONAS</i> SP. KMEN PH2-2..... | 25 |
| 2.9 CHARAKTERISTIKA BIODEGRADACE FENOLU V SOLNÝCH ROZTOCÍCH MONOKULTURAMI <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> A <i>PSEUDOMONAS</i> <i>PSEUDOMALLEI</i> | 27 |
| 2.10 MOLEKULÁRNÍ IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE <i>BACILLUS</i> SP. NIGAB-1 PRO DEGRADACI FENOLU PŘI ZVÝŠENÉ SALINITĚ | 28 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 30 |
| 3 METODIKA | 31 |
| 3.1 MATERIÁLY | 31 |
| 3.1.1 Minerální média (MM) | 31 |
| 3.1.2 Roztok stopových prvků | 33 |
| 3.1.3 Chemikálie | 33 |
| 3.1.4 Biologický materiál..... | 34 |
| 3.2 PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY | 35 |
| 3.2.1 Přístroje | 35 |
| 3.2.2 Laboratorní pomůcky | 35 |
| 3.3 POSTUPY | 36 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.3.1 | Postup získávání bakterií rostoucích na fenolu při 8 °C a při pH 5,2 | 36 |
| 3.3.2 | Postup získávání bakterií rostoucích na fenolu při 8 °C a při koncentraci NaCl 3,5%..... | 38 |
| 3.3.3 | Postup získávání bakterií rostoucích na fenolu při 8 °C a při koncentraci NaCl 6,5%..... | 38 |
| 3.3.4 | Konzervace získaných kultur | 38 |
| 3.3.5 | Ověření růstu kultur na fenolu při 8 °C v rozsahu pH 4 – 9 | 38 |
| 3.3.6 | Ověření růstu kultur na fenolu při 8 °C v rozsahu koncentrací NaCl 1 – 5 %..... | 39 |
| 3.3.7 | Gramovo barvení získaných kultur | 39 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 40 |
| 4.1 | ODBĚRY VZORKŮ A PRIMÁRNÍ INKUBACE VZORKŮ V MINERÁLNÍCH MÉDIÍCH S FENOLEM | 40 |
| 4.2 | PASÁŽOVÁNÍ POZITIVNÍCH VZORKŮ | 41 |
| 4.3 | POTVRZENÍ RŮSTU ČISTÝCH KULTUR V PŘÍSLUŠNÝCH MM S FENOLEM..... | 43 |
| 4.4 | GRAMOVO BARVENÍ | 45 |
| 4.5 | TESTOVÁNÍ RŮSTU KULTUR NA FENOLU PŘI RŮZNÝCH HODNOTÁCH PH | 47 |
| 4.6 | TESTOVÁNÍ KULTUR PŘI RŮZNÝCH HODNOTÁCH KONCENTRACE NaCl (0 – 5%) | 50 |
| | ZÁVĚR | 52 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 54 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 57 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 58 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 59 |

ÚVOD

Lidská činnost vnáší do prostředí řadu průmyslových látek, které jsou jak pro životní prostředí, tak i pro lidi samotné nebezpečné, toxické či jinak zdraví škodlivé. Fenol a jeho deriváty se vyskytují běžně v přírodě jako produkty mikroorganismů, rostlin, živočichů nebo mohou být synteticky vyráběny a do životního prostředí se následně dostávají antropogenní cestou. Celosvětová výroba fenolu je masivní a má mnohostranné uplatnění. Ve velkém měřítku se fenol vyrábí pro farmakologický průmysl, chemický průmysl nebo například k využívání v dermatologii či kosmetice, využití nachází při zpracování dřeva, výrobě plastů, pesticidů a mnohé další. Vzhledem k jeho rozsáhlému využití a toxickým vlastnostem a současně degradační obtížnosti je fenol zahrnován mezi nejvíce znečišťující látky pro životní prostředí.

K odstranění těchto škodlivin jsou využívány různé postupy. Mohou to být fyzikální, chemické či biologické metody. Biologické metody se vzhledem k jejich účinnosti a šetrnosti k životnímu prostředí dostávají do popředí. Mikrobiologický rozklad fenolu a studium konkrétních bakterií, které tomu dopomáhají, jsou už dlouho studovány. Rovněž je studována bakteriální degradace za méně příznivých podmínek. My jsme se ovšem zaměřili na rozklad fenolu při nízkých teplotách a současně za dalších ztížených podmínek, jako byla zvýšená salinita vlivem NaCl a nižší hodnota pH.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FENOL

Fenol neboli hydroxybenzen, kyselina karbolová, benzenol, s chemickým vzorcem C_6H_6O je uveden na Obrázek 1.



Obrázek 1 Strukturální vzorce fenolu (IRZ, 2023)

(Enache, Oliveira-Brett, 2011)

1.1 Charakteristika

Fenol je v čisté podobě bezbarvá nebo bílá krystalická pevná látka s charakteristickým silně nasládlým antiseptickým zápachem, který vykazuje dráždivé účinky. Nejčastěji je však k dostání v tekutém skupenství. Jeho mírně znečištěnou formu představují narůžovělé krystaly nebo hustá viskózní kapalina.

Je snadno rozpustitelný ve vodě, jeho rozpustnost činí 84 g/l nebo v organických rozpouštědlech jako je např. benzen, chloroform, aceton, ethanol. Je hořlavý a bod vzplanutí se pohybuje kolem 75 °C. (Příbylová a kol., 2010)

Fenol a jeho deriváty se vyskytují běžně v přírodě jako produkty mikroorganismů, rostlin, živočichů včetně lidí, nebo mohou být synteticky vyráběny. Jsou to právě přirozené deriváty fenolických látek, které dodávají chuť a barvu mnohým poživatinám. Fenol je také složkou černouhelného dehtu a vzniká při přirozeném rozkladu organických materiálů.

Tabulka 1 Chemické a fyzikální vlastnosti fenolu

| Veličina | Jednotka | Symbol | Hodnota |
|--|----------|--------|---------|
| Molární hmotnost | g/mol | M | 94,11 |
| Hustota při 20°C | g/ml | S | 1,07 |
| Rozpustnost ve vodě (20 °C) | g/l | | 84 |
| Bod tání | °C | | 40,5 |
| Bod varu | °C | | 181,7 |
| Tlak páry (20 °C) | hPa | | 0,2 |
| Rozdělovací koeficient oktanol-voda | - | | 1,47 |
| Bod vzplanutí při 1,013 hPa | °C | | 81 |
| Teplota samovznícení při 1,013 hPa | °C | | 715 |

(Roth, 2015)

1.2 Použití

Celosvětová výroba fenolu se pohybuje v extrémně velkých množstvích. Fenol je používán značně ve farmakologickém průmyslu - např. pro výrobu acylpyrinu, kde je zapotřebí kyseliny salicylové, jež je přírodní fenolickou sloučeninou, nebo se vyskytuje ve farmakách používajících se proti bolesti v krku atd. Také je třeba neopomenout značné zastoupení v dermakologii a kosmetickém průmyslu.

Využití fenol nachází i při průmyslové výrobě organických látek jako jsou bisfenol A či kaprolaktam.

Velkého uplatnění našel v chemickém průmyslu, kde se stal hlavním meziproduktem pro výrobu syntetických vláken a fenolových pryskyřic.

Pro své biocidní schopnosti je využíván pro ošetření materiálů, kde je zapotřebí inhibice mikroorganismů, čili je využíván rovněž také jako desinfekční prostředek např. v průmyslových vodních systémech.

Dále nachází uplatnění při výrobě plastů, pesticidů, v kožedělném průmyslu, při zpracovávání dřeva a mnohé další.

1.3 Výskyt v životním prostředí

Biogenní zdroje fenolu a jejich derivátů nepředstavují zásadní problém, vzhledem k jejich nízké produkci.

Antropogenní zdroje fenolu mohou ovšem způsobovat vážné problémy. Životní prostředí může být kontaminované fenolem, případně jeho deriváty, přímo z procesů jeho vlastní výroby nebo z použití desinfekčních výrobků s obsahem této látky. Dále jsou to spalovací procesy, které silně znečišťují životní prostředí, mohou to být špatně zajištěné skládky, emise z nátěrů obsahujících fenol a mnohé další.

Fenol může být následně obsažen ve všech složkách životního prostředí. V atmosféře, půdě i vodě. Závažný dopad pro životní prostředí mají především chlorované deriváty fenolu, jež vykazují vysokou stabilitu a bioakumulativnost, a proto jsou velmi toxické pro suchozemské živočichy a pro vodní organismy vykazují akutní toxicitu.

Značné množství emisí fenolu vstupuje do ovzduší, ze kterého je převážná část odstraňována fotochemickými reakcemi a menší část mokrou depozicí.

Detekován byl rovněž v dešťové vodě, povrchové vodě a podzemní vodě. V půdě je vysoce mobilní. Jeho degradace jak ve vodě, tak i v půdní složce probíhá abiotickými a mikrobiálními reakcemi. Přičemž u mikrobiální degradace závisí na faktorech, jako je koncentrace, aklimatizace mikroorganismů, teplota a přítomnost dalších sloučenin.

1.4 Dopady na zdraví lidí a zvířat

Fenol je pro člověka vysoce toxický. Jedinci mohou být kontaminováni fenolem požitím, vdechnutím či kožním kontaktem. Toxické projevy fenolu závisí na množství fenolu, způsobu podání, koncentraci atd. Exponovaní jedinci mohou prokazovat širokou škálu účinků fenolu, jako je poškození ledvin, zažívacího traktu, respirační potíže, neurologické účinky, kóma a v extrémním případě smrt. Fenol zabraňuje transportu kyslíku krví, což může mít za následek bolest hlavy, malátnost, nauzeu, modrání končetin a rtů. Nejnižší zaznamenaná letální dávka u jedince byla 4,8 g při požití. Kromě expozice vzduchem jsou nejdůležitějšími zdroji fenolu a fenolických látek pro běžnou populaci cigaretový kouř a uzené potraviny. (Příbylová a kol., 2010)

2 BAKTERIE DEGRADUJÍCÍ FENOL ZA NÍZKÝCH TEPLOT

Rychlá urbanizace a industrializace vedly k rozsáhlé distribuci řady toxických znečišťujících látek v ekosystému. Dle americké *Environmental Protection Agency* je fenol díky své toxicitě a degradační obtížnosti zahrnován mezi nejvíce znečišťující látky pro životní prostředí.

Tato enormní přítomnost zejména ve všech vodních útvarech je zapříčiněna snadnou rozpustností fenolu ve vodě. Obrovské „zásluhy“ na znečišťování životního prostředí fenolem mají především různá průmyslová odvětví, kde první příčky obsazují ropné rafinérie (6 – 500 mg/l), petrochemický průmysl (2,8 – 1220 mg/l), zpracování uhlí (9 – 6800 mg/l), farmaceutický průmysl (0,1 – 1600 mg/l) a papírenský průmysl.

Široká distribuce fenolu v průmyslových odpadních vodách vyžaduje účinné metody k jeho eliminaci a degradaci. Pro odstranění fenolů je k dispozici řada fyzikálně-chemických metod, ale vzhledem k jejich vysoké ceně a možnosti uvolňování sekundárních znečišťujících látek jsou preferovány biologické metody. Tyto metody jsou upřednostňovány zejména díky jejich ceně a rovněž jsou tyto metody považovány za ekologicky udržitelné, co se týče degradace toxicky znečišťujících látek.

Vzhledem k úplné mineralizaci toxických polutantů na oxid uhličitý a vodu, je biodegradace čili degradace pomocí mikroorganismů z hlediska životního prostředí nejvhodnější. Tato varianta je vhodná pro zpracování fenolických odpadů, ovšem v případech, kdy koncentrace fenolu může přesahovat 1000 mg/l (10,64 mM), může docházet vlivem jeho toxicity k inhibici mikroorganismů a nízké specifické rychlosti konverze. Pro vyhnutí se těmto rizikům jsou využívány různé strategie jako např. imobilizace mikroorganismů na nosiče nebo enkapsulace do vhodných matric (např. gelů), dále aklimatizace mikroorganismů, zajištění přídatného zdroje uhlíku a vhodných zdrojů dusíku a fosforu, používání mikroorganismů degradujících fenol ve formě vícečetných kultur (konsorcií) či používání čistých ušlechtilých kmenů s výjimečnou schopností. (DOKIČ a kol., 2011)

2.1 *Acinetobacter* sp. kmen RTE1.4

Použití nativních mikroorganismů je užitečnou strategií pro bioremediaci prostředí kontaminovaných fenolem. Jedním z těchto mikroorganismů je bakteriální kmen

pojmenovaný RTE1.4, který byl izolován z odpadních vod chemického průmyslu. Kmen byl schopen růst při vysokých koncentracích fenolu a jeho derivátů, jako je guajakol, 2,4-dichlorfenol a pentachlorfenol, rovněž v médiu obsahujícím průmyslové odpadní vody.

Pomocí morfologické, fyziologické, biochemické a 16S rRNA genové analýzy byl tento bakteriální kmen identifikován jako *Acinetobacter* sp. *Acinetobacter* sp. RTE1.4 degradoval fenol v koncentracích 200 až 600 mg/l (2,13 až 6,38 mM) v širokém rozsahu pH 5–9 a v teplotním rozmezí 25–37 °C, což prokazuje vysokou adaptační schopnost na různé podmínky. Vzhledem k prokázané aktivitě katechol 1,2-dioxygenázy, bylo prokázáno, že kmen metabolizoval fenol tzv. *ortho*-cestou štěpení aromatického kruhu.

Schopnost kmene *Acinetobacter* sp. RTE1.4 degradovat fenol ovlivňuje řada faktorů - pH, teplota a počáteční koncentrace fenolu. RTE1.4 byl schopen degradovat fenol 200 mg/l (2,13 mM) v rozmezí pH 5 až 11 při teplotě 28 °C ± 2 °C, přičemž nejvyšší degradace fenolu (100 %) bylo dosaženo za neutrálních podmínek. Při pH 5, 6, 8 a 9 byla degradace stále vysoká (nad 50 %). Ovšem při pH 10 a 11 degradační schopnost fenolu znatelně poklesla a bylo odstraněno pouze 10 mg/l (0,106 mM) znečišťující látky.

Podobně jako u pH, tak i optimální teplota pro odstranění fenolu byla stanovena inkubací bakteriálního kmene při různých teplotách v rozmezí 25–40 °C, při pH 7 s 200 mg/l (2,13 mM) znečišťující látky a byla zde sledována zbytková koncentrace fenolu. Optimální stanovená teplota byla 28 °C, při níž bylo zaznamenáno dosažení 100% odstranění fenolu po 48 hodinách. Rovněž tato teplota vykazovala statisticky významné rozdíly v porovnání s ostatními teplotními hodnotami. Pro srovnání při 25 °C byla degradace fenolu kolem 80 %, při 33 °C nebo 37 °C byla pozorována degradace fenolu již jen 40 % a při 40 °C degradační schopnost klesla na pouhých 5 %. Dle těchto výsledků za optimální podmínky pro odstranění fenolu kmenem *Acinetobacter* sp. RTE1.4 byla zvolena hodnota pH 7 a teplota 28 °C, tyto hodnoty byly zvoleny pro následující experimentální použití.

Pro analýzu, srovnání stupně biodegradace a potřebného času pro úplnou degradaci se počáteční koncentrace fenolu pohybovaly v rozmezí 200 - 700 mg/l (2,13 – 7,45 mM).

Čas potřebný pro degradaci fenolu vzrostl úměrně s počáteční koncentrací fenolu v kultivačním médiu. Celková degradace 200 mg/l (2,13 mM) fenolu nastala po 48 hodinách a byla pozorována krátká lag fáze (6 hodin). Doba degradace byla prodloužena na 7 a 11 dní pro 400 a 600 mg/l fenolu, zatímco u 700 mg/l bylo dosaženo pouze 28% degradace fenolu po 13 dnech. V tomto případě kmen vykazoval lag fázi dlouhou 6 dní pro zahájení růstu a spotřebu fenolu. Kmen byl tedy schopen tolerovat a degradovat vysoké koncentrace

fenolu a zcela odstranit 200 až 600 mg/l tohoto kontaminantu při 28 °C a pH 7, což byly stanoveny jako optimální podmínky. (Paisio a kol., 2013)

2.2 *Acinetobacter* sp. kmen B9

Pro dosažení úspěšné bioremediace prostředí kontaminovaného fenolem je esenciální aplikace mikrobiálních kmenů, které získaly toleranci k fenolu a schopnosti k jeho degradaci.

Tato schopnost byla též prokázána i u izolovaného kmene *Acinetobacter* sp. B9, u něhož byla dosažena vysoká adaptace na zvýšenou koncentraci fenolu postupným navyšováním jeho dávky. U tohoto adaptovaného kmene byla prokázána schopnost růstu na fenolu a jeho úplná degradace s koncentrací až 14 mM (1316 mg/l) za 136 hodin. Degradací rychlost narůstala se zvyšováním koncentrace fenolu z 2,0 na 7,5 mM (ze 188 na 705 mg/l), přičemž bylo prokázáno, že tento kmen preferuje neutrální až alkalické rozmezí pH. Jeho optimum bylo stanoveno na pH 8,0 a optimální teplota pro degradaci fenolu se pohybovala v rozmezí 30–35 °C. Transmisní elektronové mikrofotografie také ukázaly neorganizovanou a spletitou strukturu buněčné membrány buněk, které byly zasaženy fenolem, což je charakteristickým znakem jeho působení. Enzymatické metody a analýza metabolitů pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie ukázaly přítomnost ortho-štěpné dráhy pro degradaci aromatického kruhu fenolu. Účinná degradace fenolu byla pozorována i v přítomnosti pyridinu a těžkých kovů jako ko-toxických látek, což ukazuje potenciál kmene při bioremediaci průmyslových prostředích kontaminovaných různými typy odpadů. Kmen B9 byl při praktickém pokusu aplikován do odpadní vody z koželužny, kde došlo ke 100% odstranění počátečního 0,5 mM (47 mg/l) fenolu během 48 hodin. (Amrik a kol., 2015)

2.3 *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996

Schopnost degradace fenolu vykazoval rovněž kmen MTCC 4996 bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, který byl izolován z místa kontaminovaného průmyslovými odpadními vodami z výroby celulózy. Během 156 hodin došlo k rozkladu fenolu na zbytkovou koncentraci 1,3 mg/l (0,0138 mM). Kompletní degradace byla pozorována při hodnotách pH v rozmezí od 6,0 do 10,0 a teploty od 15 °C až po 45 °C, přičemž optimální pH bylo

stanoveno jako neutrální a teplotní optimum bylo 37 °C. K úplné degradaci docházelo za 66 hodin při optimální rychlosti třepání 100–125 ot/min, v porovnání se statickými podmínkami, při nichž degradace nastávala po 84 hodinách. Glukóza a pepton v nižších koncentracích coby ko-substráty zvýšily míru rozkladu fenolu. Naopak, rychlost rozkladu fenolu byla nejcitlivější na přidanou rtuť. Velmi nízké koncentrace kovů (Fe, Cu, Pb, Zn a Mn) rozklad stimulovaly a zvyšovaly rychlost degradace.

Z výsledků vyplývá, že tento kmen vykazuje pozoruhodný potenciál pro rozklad fenolu v širokém rozmezí teplot, pH a v přítomnosti těžkých kovů. Proto je velmi vhodný pro použití v oblasti životního prostředí, v bioremediaci a čištění odpadních vod, zejména v oblasti detoxikaci fenolových odpadů. (Kotresha, Vidyasagar, 2008)

2.4 Antarktické bakterie

Další studie se zabývala izolací tří fenol-degradujících bakteriálních kmenů z King George Islandu v Antarktidě. Tyto kmeny byly izolovány ze tří antarktických půd v roce 2007. Pomocí předběžného screeningu byly pro podrobnou studii vybrány tři izoláty AQ5-05, AQ5-06 a AQ5-07 schopné kompletně degradovat 0,5 g/l fenolu během 120 hodin při teplotě 10 °C. Na základě sekvencí 16S rRNA byly dva z těchto izolátů identifikovány jako *Arthrobacter* spp. a jeden jako *Rhodococcus* sp. Všechny tyto kmeny byly nepohyblivé, gram pozitivní, oxidáza byla u nich negativní a kataláza pozitivní. Pro optimalizaci podmínek pro degradaci fenolu byla provedena studie účinků parametrů včetně teploty, pH, salinity a zdroje dusíku. Což vedlo k výsledkům, že tyto tři izoláty byly zařazeny k psychrotolerantním bakteriím s optimální teplotou pro degradaci fenolu mezi 10 a 15 °C. Tyto kmeny splňovaly potenciální použití bakterií adaptovaných na chlad pro bioremediaci půd kontaminovaných fenolem v širokém rozsahu nízkých teplot. Tyto bakteriální kultury byly získány tak, že vzorky půdy (5 g) byly suspendovány ve 40 ml studeného sterilního minimálního minerálního média (MSM) obsahujícího 0,5 g/l fenolu a inkubovány na třepacím inkubátoru při 150 otáčkách za minutu po dobu 3 dnů při teplotě 4 °C. Vzorky z této půdní suspenze byly nanášeny na agarové plotny s minerálním médiem doplněné fenolem jako zdrojem uhlíku a inkubovány po dobu 7 dnů. Izoláty vykazující odlišné kolonie byly subkultivovány na agarových plotnách s minerálním médiem, doplněným stejným substrátem, jaký byl použit při původním obohacení, dokud nebyly získány čisté kultury. Jedna kolonie každé z viditelně odlišných výsledných bakteriálních kolonií byla inkubována v MSM obsahujícím 0,5 g/l fenolu na třepacím inkubátoru při 150

otáčkách za minutu a teplotě 10 °C po dobu 120 hodin. Inkubační teplota 10 °C byla zvolena tak, aby reprezentovala maximální letní teplotu na King George Island. Aktivita každé čisté kultury degradující fenol byla monitorována ve 24 hodinových intervalech a bakteriální růst byl stanoven pomocí měření optické hustoty při 600 nm. Pro další studie byly vybrány izoláty dosahující úplné degradace fenolu při počáteční koncentraci 0,5 g/l. V souhrnu byly identifikovány tři na chlad adaptované fenol-degradující bakteriální kmeny izolované z antarktických půd jako schopné degradovat fenol až na 0,5 g/l během 120 hodinové inkubační doby při 10 °C. Optimální růstové teploty u bakteriálních kmenů se pohyboval v rozmezí 10 – 15 °C. U některých kmenů růst pokračoval i nad 20 °C, což potvrdilo jejich psychrotolerantní status. Bylo zjištěno, že optimalizované fyzikálně-chemické parametry, včetně teploty, salinity, pH a zdroje dusíku, silně zvyšují aktivitu kmenů pro degradaci fenolu. Optimální degradace fenolu byla pozorována mezi 10 a 15 °C, což naznačuje, že léto v Antarktidě poskytuje vhodné půdní podmínky pro bioremediaci půd kontaminovaných fenolem těmito kmeny. Studované bakteriální kmeny byly také velmi citlivé na pH, vyžadující téměř neutrální pH pro optimální růst a schopnost degradace fenolu. (Lee a kol., 2018)

2.5 Biodegradace fenolických látek kulturou bakterií z aktivovaného kalu a z říční vody

Fenoly mohou na mikroorganismy působit inhibičně nebo případně vykazovat i letální účinky. Pro zjištění, zda odbouratelnost fenolických látek souvisí s tolerancí mikroorganismů k těmto látkám, byla získána kultura bakterií z aktivovaného kalu se schopností rozkládat 4-chlorfenol a porovnána její schopnost rozkládat fenolické látky po adaptaci na ně. Výsledky ukázaly, že získané bakterie rodů *Mycopiana*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* a *Flavobacterium* byly po adaptaci více tolerantní k derivátům fenolu, v porovnání s bakteriemi, získanými původně z říční vody, a že tyto bakterie adaptované na 4-chlorfenol byly tolerantnější i k jiným toxickým látkám. S uvedenou směsnou kulturou bakterií z kalu pak byly prováděny zkoušky degradace chlorfenolů, dihydroxybenzenů a nitrofenolů.

Nejsnáze degradován byl 4-chlorfenol, konečná míra odstranění sloučenin byla více než 50 % v případě, že byla do vzorků vody přidána smíšená adaptovaná bakteriální kultura.

Rychlost degradace stejných cílových látek původními mikroorganismy, získanými z přírodní vody, byla přitom velmi nízká.

Bylo tedy prokázáno, že v důsledku inokulace adaptované bakteriální kultury do říční vody se rychlost biologického rozkladu pro většinu sloučenin zvýší. Z čehož vyplývá, že díky synergickým účinkům bakteriálních kultur je různorodá mikroflóra často účinnější než pouze čistá kultura při degradaci toxických a perzistentních kontaminantů.

Po přidání adaptované bakteriální kultury míra odstranění 5 mg/l 4-chlorfenolu nebo 2-chlorfenolu dosáhla 100 % v průběhu 72 hodin. V případě současné přítomnosti 4-chlorfenolu a 2-chlorfenolu v říčních vodách potřebují mikroorganismy delší dobu aklimatizace pro produkci dostatečného množství enzymů k metabolizaci cílových sloučenin, tudíž rychlost degradace klesá a poločas obou těchto sloučenin je prodloužen. Vlivem adaptované bakteriální kultury je biodegradace 4-chlorfenolu podstatně urychlena. 80 % 4-chlorfenolu se spotřebuje za 48 hodin, 2-chlorfenol byl po prodlevě 48 h rychle degradován. K úplné degradaci těchto dvou složek pak dochází po 60 hodinách.

Závěrem lze říci, že bakteriální kultury, izolované z aktivovaného kalu a adaptované na 4-chlorfenol, jsou tolerantnější k fenolickým derivátům než bakterie z řeky. Bakteriální kultury tak mohou být adaptovány na to, aby využívaly chlorfenoly, dihydroxybenzeny a nitrofenoly jako jediný zdroj uhlíku a energie. Tyto kultury pak mají vyšší metabolickou účinnost vůči těmto chemikáliím než říční bakterie. Rychlost odstraňování chemikálií ve vodě tak může být zvýšena nejméně o 55 %, když se do vzorků říční vody přidají adaptované bakteriální kultury získané z aktivovaného kalu. (Guang-Hua Lu a kol., 2009)

2.6 Nízkoteplotní biodegradace ropných uhlovodíků čtyřmi aktinobakteriálními kmeny

Fenol a fenolické sloučeniny jsou široce rozšířeny v přírodě jako látky znečišťující životní prostředí. Jsou běžnou složkou mnoha průmyslových odpadních vod, ať jsou to vody produkované z rafinerií ropy či zplyňovacích zařízení uhlí. Vzhledem ke své toxicitě vůči mikroorganismům mohou fenolické sloučeniny často způsobit poruchu čistíren odpadních vod inhibicí mikrobiálního růstu, a to i při relativně nízkých koncentracích, jako jsou 2 mM.

V následující studii byla proto hodnocena schopnost čtyř bakteriálních kmenů, adaptovaných na chlad, degradovat n-alkany, aromatické uhlovodíky (z nichž byl zvolen

fenol) a polyaromatické uhlovodíky (anthracen a pyren) při nízkých teplotách. Všechny čtyři kmeny patřily do kmene Actinobacteria a byly identifikovány jako *Rhodococcus erythropolis* (kmen BZ4), *Rhodococcus cercidiphyllus* (kmen BZ22), *Arthrobacter sulfureus* (kmen BZ73) a *Pimelobacter simplex* (kmen BZ91). Kmeny byly schopné růst v teplotním rozsahu 1 až 30 °C a vykazovaly aktivitu katechol-1,2-dioxygenázy.

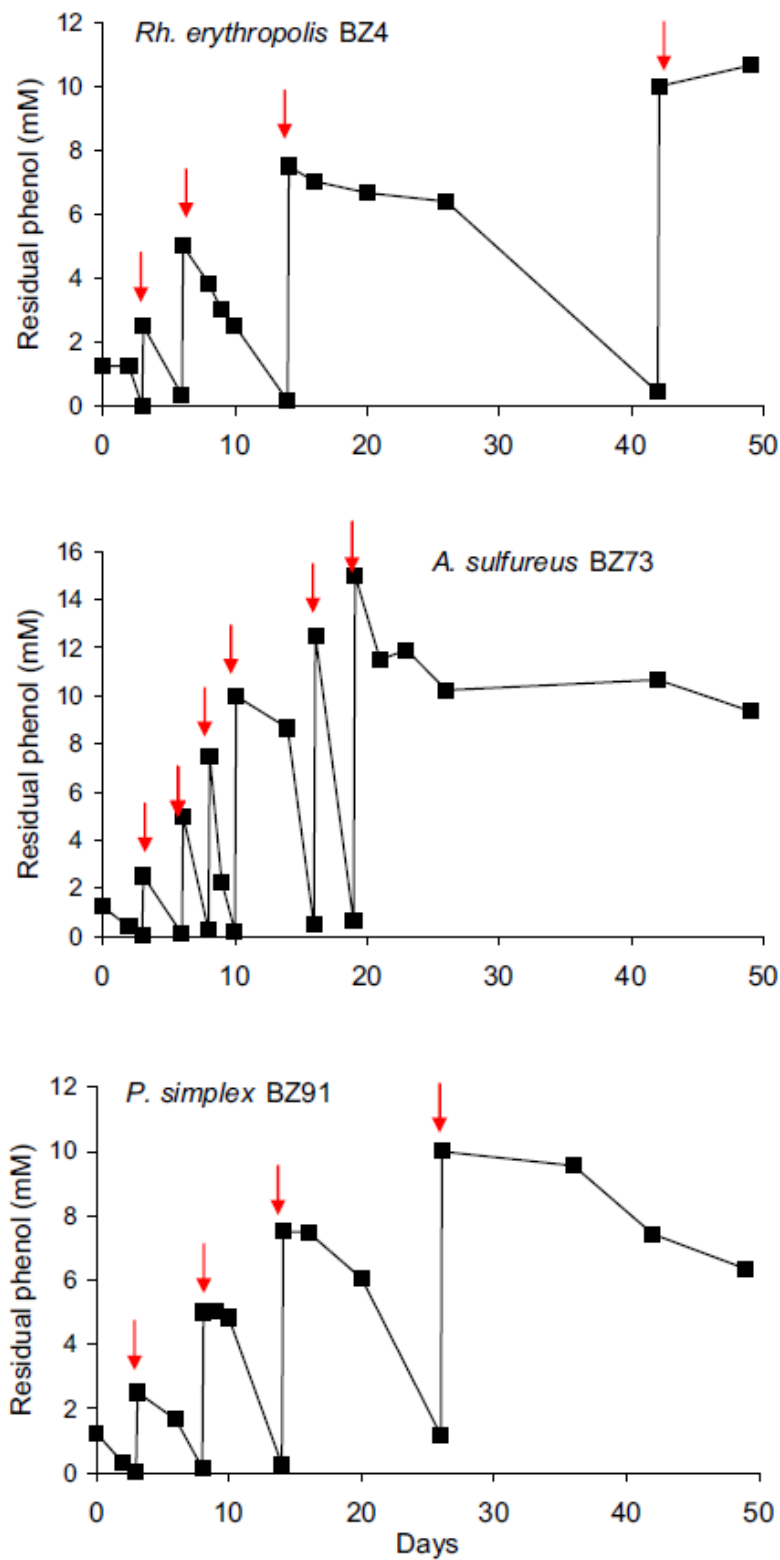
Rhodococcus erythropolis BZ4 degradoval všechny testované sloučeniny, využíval n-alkany a vysoká množství fenolu (7,5 mM), antracenu a pyrenu (50 mg/l) při 15 °C. *Pimelobacter simplex* BZ91 degradoval n-alkany a také až 7,5 mM (705 mg/l) fenolu při 1 až 30 °C. *Rhodococcus cercidiphyllus* BZ22 plně degradoval n-alkan C12 při 1 - 20 °C, zatímco degradace C16 a C20 byla opožděná a nižší ve srovnání s degradací C12. *Arthrobacter sulfureus* BZ73 nejlépe odbourával fenol a využíval až 12,5 mM (1175 mg/l) fenolu v teplotním rozsahu 1 až 25 °C. Tyto kmeny jsou tedy slibnými kandidáty pro nízkoteplotní čištění průmyslových odpadních vod kontaminovaných uhlovodíky.

Výše zmíněné bakteriální kmeny byly izolovány z půdy kontaminované ropnými uhlovodíky, získané z bývalé průmyslové čtvrti v Bozenu v Itálii. Hlavním důvodem kontaminace byly úniky ze skladovacích nádrží ropného oleje. V době odběru vzorků byla průměrná teplota půdy v oblasti odběru 8 - 10 °C. Půda obsahovala 13 300 mg uhlovodíků/kg suché půdy, přičemž 40 % a 60 % této kontaminace tvořily uhlovodíky C10 - C20 a C20 - C40, což ukazuje na vysoký obsah těžkých olejů.

Izolace bakteriálních kmenů byla provedena na minerálním agaru obsahujícím motorovou naftu. Bakteriální kmeny BZ4, BZ22, BZ73 a BZ91 byly vybrány na základě jejich schopnosti dobře růst v přítomnosti ropných uhlovodíků.

Kultivace kmenů v bioreaktoru se zvyšující se koncentrací fenolu byla použita pro stanovení nejvyšší koncentrace fenolu, kterou bylo možné testovanými kmeny odbourat (obr. 3). Kmeny byly pěstovány při 15 °C. Po vymizení fenolu byla stejná kultura znovu obohacena zvyšujícími se koncentracemi fenolu (2,5, 5,0, 7,5, 10, 12,5 a 15 mM fenolu). Výsledky stanovení maximální růstové koncentrace fenolu jsou uvedeny na Obr. 3.

Po stanovení vlivu teploty na degradaci fenolu bylo zjištěno, že nejúčinnějšími degradátory fenolu kmeny BZ73 a BZ91, které byly kultivovány při 1, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 °C při 150 otáčkách za minutu za přítomnosti 10 mM fenolu. Pro hodnocení účinku míchání byla kultivace kmenů BZ73 a BZ91 také provedena při 15 °C bez míchání, stejně jako na rotační třepače při 150 ot./min a 250 ot./min.



Obrázek 2 Degradace fenolu při 15 °C ve vsádkových kulturách tří aktinobakteriálních kmenů. Šipky označují přidávky fenolu. Data jsou průměrné hodnoty ze tří replikátů.

Jeden ze čtyř kmenů, *R. cercidiphyllus* BZ22, nebyl schopen fenol využít. Protože u sterilních kontrol nedošlo k žádné abiotické ztrátě fenolu, vymizení fenolu lze připsat jediné biodegradaci. *R. erythropolis* BZ4 i *P. simplex* BZ91 plně degradovaly fenol až do koncentrace 7,5 mM během 42 a 26 dnů při 15 °C, zatímco *A. sulfureus* BZ73 dokonce plně degradoval 12,5 mM fenol při 15 °C během 19 dnů, 15 mM fenolu však bylo využito pouze částečně (obr. 3).

A. sulfureus BZ73 plně degradoval 10 mM fenolu v teplotním rozsahu 1 - 25 °C. Fenol zcela vymizel po 2 a 3 dnech při 25 °C a 20 °C, zatímco k degradaci 10 mM fenolu při 15 a 10 °C bylo zapotřebí 5 a 9 dnů. Biodegradace byla tedy značně zpožděna při nižších teplotách, nicméně 10 mM (940 mg/l) fenolu bylo plně degradováno po 26 dnech při 5 °C a po 39 dnech při 1 °C. Se snižující se teplotou byla tedy biodegradace fenolu nižší a při teplotě 1 až 5 °C byl růst značně opožděn. Tvorba biomasy (z hlediska hustoty buněk) však byla vyšší v rozsahu nízkých teplot 1 - 10 °C než při 15 - 25 °C (obr. 4), což demonstruje chladovou adaptaci kmene.

Téměř stejný vzor byl pozorován u *P. simplex* BZ91. Tento kmen degradoval 5 mM fenolu v celém rozsahu růstových teplot 1 až 30 °C. Úplná degradace byla zaznamenána po 1 dni (30 °C), 3 - 5 dnech (25 - 15 °C), 11 dnech (10 °C), 35 dnech (5 °C) a 39 dnech (1 °C).

Byla rovněž pozorována zrychlená degradace fenolu, když kmeny byly smíchány.

Závěrem autoři porovnávali toxicitu aromatických látek vůči bakteriím adaptovaným na chlad a bakteriím mezofilním; zjistili, že toxicita aromatických sloučenin se ukázala být významně nižší pro bakterie adaptované na chlad při 10 °C ve srovnání s 25 °C, zatímco mezofilní bakteriální kmeny vykazovaly nižší náchylnost k vysokým množstvím aromatických sloučenin při pěstování při 25 °C ve srovnání s 10 °C. (Margesin a kol., 2013)

2.7 Degradace uhlovodíků a enzymové aktivity bakterií a kvasinek adaptovaných na chlad

V následující studii byl pozorován růst a produkce enzymů při 10 °C u 89 kultivovatelných izolátů adaptovaných na chlad, které byly získány z nekontaminovaných stanovišť; z oněch 89 izolátů bylo 61 bakteriálních a 28 kvasinkových kmenů. Byla porovnána účinnost bakteriálních a kvasinkových kmenů. Teplotní rozsah růstu kvasinkových kmenů byl významně menší než u bakteriálních kmenů. Šedesát procent kvasinek, ale pouze 8 %

bakterií bylo možné klasifikovat jako skutečné psychrofilny, protože nevykazovaly schopnost růstu nad 20 °C.

Biodegradace fenolu byla zkoumána v tekutých kulturách při 10 °C. Tři kmeny kvasinek degradovaly koncentrace fenolu až 10 mM (jeden kmen) nebo 12,5 mM (dva kmeny). Z osmi bakteriálních kmenů dva kmeny degradovaly až 10 mM fenolu.

Všechny kmeny degraduující fenol produkovaly katechol 1,2 dioxygenázu coby enzym zabezpečující štěpení aromatického jádra.

Jednotlivé kmeny byly izolovány na komplexním médiu, a to ze tří vzorků kryokonitu z alpského ledovce a ze vzorků z různých alpských, sibiřských a antarktických chladných prostředí. Následně byly tyto kmeny rutinně kultivovány na R2A agarových plotnách při teplotách 2, 10, 15, 20, 25, 30 a 35 °C.

Schopnost využívat různé uhlovodíky pro růst byla testována za použití pH-neutrálního, fosfátem pufrovaného minerálního média. Screening byl proveden ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách obsahujících 10 ml minerálního média. Médium bylo obohaceno 2,5 mM (235 mg/l) fenolu. Po inkubaci při 10 °C byl stanoven růst. Zbytková koncentrace fenolu byla stanovena podle Bastose měřením absorbance při 270 nm v supernatantech kultury pomocí kalibrační křivky (0–1,4 mM fenolu, připraveného v minerálním médiu).

Pozitivní kmeny degraduující fenol byly poté kultivovány při 10 °C a 180 otáčkách za minutu ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách, obsahujících 10 ml minerálního média, které bylo obohaceno fenolem. Po 7 dnech kultivace a po vymizení fenolu byla stejná kultura znovu obohacena zvyšujícími se koncentracemi fenolu v rozmezí od 2,5 do 15 mM fenolu. Kmeny degraduující fenol byly poté kultivovány v minerálním médiu obsahujícím fenol, při 1, 10 a 20 °C.

Výsledky ukázaly, že patnáct z testovaných 89 kmenů vykazovalo růst (nárůst OD > 0,2 během inkubace) při kultivaci s 2,5 mM fenolem. Osm z těchto kmenů byly bakterie. Všechny kmeny byly schopné degradace 2,5 mM fenolu během 3–7 dnů při teplotě 10 °C. Dva z těchto bakteriálních kmenů byly identifikovány jako *Arthrobacter* spp. a šest z nich jako *Pseudomonas* spp.

15 kmenů využívajících fenol pro růst bylo vybráno ke studiu vlivu koncentrace fenolu na biodegradaci pomocí vsádkové kultivace. Jakmile došlo k úplné biodegradaci fenolu z předchozí úpravy, byla stejná kultura znovu obohacena zvyšujícími se koncentracemi fenolu. Stejný vzorec byl pozorován u všech kmenů: růst se zvyšoval, dokud byl fenol

degradován, ale v případě že se koncentrace fenolu stala toxickou, došlo k rapidnímu poklesu.

Z osmi bakteriálních kmenů šest kmenů *Pseudomonas* spp. nemohly degradovat koncentrace fenolu vyšší než 2,5 mM, zatímco dva kmeny *Arthrobacter* spp. degradovaly 10 mM fenol během 7 dnů. Přičemž optimální teplota pro degradaci fenolu byla 20 °C pro všech osm bakteriálních kmenů. Tři bakterie a jeden kmen kvasinek vykazovaly určitou produkci biomasy i při teplotě 1 °C.

Žádný z bakteriálních kmenů nebyl schopen růstu s alifatickými ani aromatickými uhlovodíky jinými než fenol.

O degradátorech fenolu adaptovaných na chlad není nasbíráno příliš informací. Kotturi a spol. prokázali nízkoteplotní degradaci 10,6 mM fenolu (1 g/l) bakterií *Pseudomonas putida*, která byla tolerantní vůči chladu. Bakteriální kmeny *Arthrobacter* spp. degradovaly až 10 mM fenol.

Zajímavostí je, že tyto zkoumané kmeny navzdory tomu, že byly izolovány z chladného prostředí, které nebylo kontaminováno uhlovodíky, byly schopné jejich degradace. (Margesin a kol., 2003)

2.8 Biodegradace fenolu v hypersalinních podmínkách pomocí

Halomonas sp. kmen PH2-2

Fenolické sloučeniny jsou nebezpečné znečišťující látky, o kterých je známo, že jsou toxické už při nízké koncentraci. Odstraňování fenolů z toků průmyslových odpadních vod před jejich vypouštěním do recipientů je v některých zemích povinné. Bylo popsáno mnoho nehalofilních bakteriálních izolátů degradujících fenol, ale podrobné informace týkající se degradace fenolu halofily jsou spíše skoupé. Halofilní bakterie by přitom mohly degradovat organické sloučeniny z průmyslových odpadních vod s vysokou salinitou, bez nutnosti snižování koncentrací soli.

Probíhá několik výzkumů v aplikování halofilních bakterií k degradaci aromatických uhlovodíků (Erdogmus, et al., 2013), formaldehydu (Azachi et al., 1995) a fenantrenu (Gao et al., 2013), ale většina aktuálních informací týkajících se halofilní degradace průmyslových polutantů se zaměřuje na fenol (Woolard a Irvine, 1994). Fenol má obecně baktericidní účinek, ale značná část mikroorganismů si vyvinulo mechanismy ochrany a fenol mohou využívat jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Nově popsaná halofilní bakterie degradující fenol, izolovaná z hypersalinní půdy poblíž teheránské rafinérie, byla identifikována jako *Halomonas* sp. kmen PH2-2.

Kmen PH2-2 byl izolován víceúrovňovými obohacovacími a screeningovými technikami na minerálním médiu obsahujícím 100 mg/l fenolu jako jediný zdroj uhlíku. Kmen byl schopen využít fenol a také *p*-kresol jako jediný zdroj uhlíku a energie. Bakterie *Halomonas* sp. PH2-2 byla schopna odbourat až 1100 mg/l fenolu, při vyšších koncentracích fenolu byl růst buněk inhibován. Kmen byl schopen odstranit fenol v médiu obsahujícím 18 % NaCl, v porovnání s médiem obsahujícím 7 % NaCl ale účinnost odstranění klesla z 95 % na 64 %. Výsledky ukázaly, že potenciální použití kmene PH2-2 pro čištění průmyslových odpadních vod obsahujících fenol v hypersalinních podmínkách jako účinné.

Halomonas sp. kmen PH2-2 byl schopen degradovat fenol až do koncentrace 1100 mg/l a růst při koncentracích NaCl v rozmezí 50 až 250 g/l. Po 68 hodinách při kultivaci v médiu obsahujícím 400 mg/l fenolu schopnost kmenu odstranit fenol dosáhla 18, 46, 72 a 126 mg/l zbytkových koncentrací při 7, 12, 15 a 18 % NaCl. Tyto výsledky ukazují, že tento kmen může účinně odstranit více než 95 % fenolu při optimální koncentraci NaCl 7 % a 88 % fenolu při 12 % NaCl. Zvýšením salinity až na 15 % NaCl se účinnost odstraňování fenolu mírně snížila, kde 82 % původního fenolu bylo odstraněno po 68 hodinách inkubace. Další zvýšení koncentrace NaCl na 18 % vedlo k dalšímu snížení degradace fenolu a po stejné inkubační době bylo odstraněno pouze 68 % fenolu. Srovnání růstu buněk během degradace fenolu v přítomnosti různých koncentrací NaCl v rozmezí od 7 do 18 % také ukazuje na evidentní pokles koncentrace biomasy zvýšením salinity.

Halomonas sp. kmen PH2-2 tedy kompletně degradoval 1100 mg/l fenolu za 7 dní, ale vyšší počáteční koncentrace fenolu měly inhibiční účinek na růst bakterie. PH2-2 byl také schopen degradovat *m*-kresol a *p*-kresol, ale neměl schopnost degradovat nitro- a chlorfenoly. Srovnání odolnosti vůči solím a degradačních vlastností fenolu u *Halomonas* sp. kmen PH2-2 s dříve popsanými halofilními degradátory fenolů prokázal svou lepší schopnost degradovat vyšší koncentrace fenolu, toto je tedy první zpráva o účinném odstranění fenolu z kapalných médií obsahujících více než 15 % NaCl. Výsledkem studie je tedy fakt, že *Halomonas* sp. kmen PH2-2 může být efektivní pro čištění hypersalinních fenolických odpadních vod. (Haddadi, Shavandi, 2013)

2.9 Charakteristika biodegradace fenolu v solných roztocích monokulturami *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas pseudomallei*

Bylo odebráno pět reprezentativních vzorků odpadních vod z hlavního výstupu farmaceutického průmyslu v Pákistánu v 7 denních intervalech po dobu 35 dnů. U jednotlivých vzorků byla koncentrace fenolu, CHSK, BSK, kationtů sodíku a draslíku a chloridových a síranových aniontů stanovena podle standardních metod. Z těchto vod byly následně izolovány dva bakteriální kmeny schopné využívat fenol jako jediný zdroj uhlíku. Na základě morfologických a biochemických charakteristik byly kmeny identifikovány jako *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas pseudomallei*. Oba tyto kmeny byly velmi účinné pro degradaci fenolu. *P. pseudomallei* degradoval fenol v maximální koncentraci 1500 mg/l během sedmi dnů se specifickou rychlostí růstu $0,013 \text{ h}^{-1}$ a rychlostí degradace fenolu 13,85 mg/l.h. Maximální počáteční koncentrace fenolu využívaného *P. aeruginosa* byla 2600 mg/l se specifickou rychlostí růstu $0,016 \text{ h}^{-1}$ a rychlostí degradace fenolu 26,16 mg/l.h. Dále byl studován vliv různých solí, tj. NaCl, KCl, Na₂SO₄ a K₂SO₄ na růst těchto kmenů a rychlost degradace fenolu při 1000 mg/l. V přítomnosti těchto solí vykazovala *P. aeruginosa* až 1,53x rychlejší rychlost degradace fenolu a specifickou rychlost růstu 1,34x ve srovnání s *P. pseudomallei*. Kromě toho *P. aeruginosa* vykazovala vyšší míru snížení chemické spotřeby kyslíku a biochemické spotřeby kyslíku ve srovnání s kmenem *P. pseudomallei*.

Protože průmyslové odpadní vody obsahují mnoho aniontů a kationtů ve vysokých koncentracích, byly v laboratorním měřítku provedeny studie biologického rozkladu fenolu také v přítomnosti solí obsahujících tyto ionty. Do média byly přidány různé soli, aby se získala přibližně stejná koncentrace iontů, jaká byla nalezena ve vzorcích odpadních vod odebraných z farmaceutického průmyslu. Koncentrace fenolu 1000 mg/l pro tento experiment byla udržována velmi blízko koncentraci v průmyslové odpadní vodě $1053 \pm 162 \text{ mg/l}$. *P. aeruginosa* kompletně degradovala 1000 mg/l fenolu během 48 h s 8 hodinovou lag fází v přítomnosti 2,5 g/l NaCl. Tyto výsledky byly srovnatelné s kontrolami, kde nebyla přidána žádná sůl. Při růstu v přítomnosti NaCl a Na₂SO₄ *P. aeruginosa* měla vyšší účinnost při degradaci fenolu, vykazovala rychlejší růst a kratší lag periodu než *P. pseudomallei*. Podobná pozorování byla zaznamenána s přidáním KCl a K₂SO₄. V přítomnosti solí měla *P. aeruginosa* vyšší specifickou rychlost růstu ve srovnání s *P. pseudomallei*.

Mikrobiální přežití a růst v přítomnosti všech vybraných solí mohou být způsobeny tím, že v této studii byly použity nízké koncentrace solí. Také tyto bakteriální kmeny mohly přežívat při těchto koncentracích solí v kalech odpadních vod farmaceutického průmyslu po dlouhou dobu. Obecněji výsledky naznačují, že *P. aeruginosa* se může ukázat jako užitečná pro zpracování fenolických odpadních vod obsahujících vysoké koncentrace solí. (Afzal a kol., 2007)

2.10 Molekulární identifikace a charakterizace *Bacillus* sp. NIGAB-1 pro degradaci fenolu při zvýšené salinitě

Úloha halofilních bakterií při degradaci fenolu je velmi důležitá, proto v této studii byly izolovány a charakterizovány bakteriální kmeny schopné degradovat fenol v podmínkách zvýšené salinity. Vzorky sedimentu byly odebrány z jezera Rawal v Pákistánu. Vzorek 30 ml kalu byl obohacen médiem minerálních solí (MSM) obsahujícím 5 % NaCl a 150 mg/l fenolu jako jediného zdroje uhlíku a energie v baňce a umístěn na třepače po dobu šesti dnů. Po šesti dnech bylo 50 µl vzorku nanášeno na MSM misky obsahující 200 mg/l fenolu s 5 % NaCl a ty inkubovány při 28 °C.

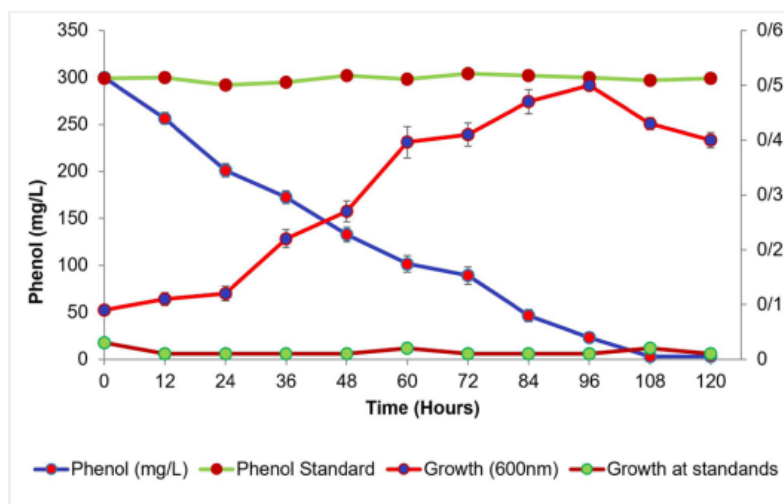
Následně byly získané kmeny konzervovány v 70 % glycerolu a udržovány při -80 °C. Na základě sekvenačních analýz genu pro 16S rRNA byl kmen NIGAB-1 identifikován jako člen rodu *Bacillus*, který sdílí 99,71 % identitu s *Bacillus marisflavi* (AF483624), a který byl schopný odbourat 300 mg/l fenolu při 4 % NaCl za 120 hodin s průměrnou rychlostí degradace 2,63 mg/l.h.

Růstové parametry *Bacillus* sp. NIGAB-1 byly pozorovány při různých koncentracích fenolu a při 5 % NaCl. Schopnost růstu byla zaznamenána při 50-550 mg/l fenolu, zatímco při 600-750 mg/l fenolu byl pozorován zanedbatelný nebo žádný růst. Optimální koncentrace fenolu pro NIGAB-1 byla stanovena na 300 mg/l, kde optická hustota dosáhla 0,405. Téměř stejný růst byl však pozorován při 350 mg/l fenolu.

Pro stanovení potenciálu degradace fenolu byl zvolený kmen *Bacillus* sp. NIGAB-1 naočkován do MSM bujónu obsahujícího 50 mg/l fenolu a 5 % NaCl. Ve všech provedených experimentech byl jako jediný zdroj uhlíku a energie použit fenol. Po dvou dnech byla pozorována kultura jako zakalená a použita jako inokulant pro MSM bujón obsahující 300 mg/l fenolu a 10 % NaCl. Avšak při této koncentraci soli nebyl pozorován žádný růst bakterií. Koncentrace NaCl byla poté snížena na 8 %, 6 % a 4 % a koncentrace

fenolu byla udržována stejná. Žádný růst nebyl pozorován při 8 % NaCl a zanedbatelný růst byl zaznamenán při 6 % NaCl v přítomnosti 300 mg/l fenolu. Nicméně při 4 % NaCl byl pozorován enormní růst. Paralelně probíhaly dva typy kontrol. Jednou kontrolou byl MSM bujón s inokulem a bez fenolu a druhou kontrolou byl MSM bujón obsahující 300 mg/l fenolu bez inokula. U kontrol nebyl pozorován žádný růst.

Je pozoruhodné, že *Bacillus* sp. NIGAB-1 kompletně degradoval 300 mg/l fenolu za 108 hodin s průměrnou rychlostí degradace 2,63 mg/l.h. Rychlost degradace nebyla konstantní a dosáhla vrcholu za 24 hodin (Obrázek 3). Po 12 hodinách inkubace byla pozorována 12,5 % degradace fenolu, kde OD dosahovala jen hodnoty 0,11. Nejvyšší růst byl zaznamenán po 96 hodinách inkubace (OD 0,47), kdy byla pozorována 96,26 % degradace fenolu.



Obrázek 3 Degradace fenolu *Bacillus* sp. NIGAB-1 v médiu obsahujícím 4 % NaCl a 300 mg/l fenolu.

Růst *Bacillus* sp. NIGAB-1 byl dále testován při různých pH, koncentracích NaCl a při různých teplotách. Maximálního růstu tato bakterie dosahovala v rozmezí pH 5-9, při čemž jako optimální pH byla zaznamenána hodnota 7. Ačkoliv schopnost růstu kmene byla zaznamenána v teplotním rozmezí 10-45 °C, optimální teplota byla při 30 °C. Schopen růstu byl tento kmen při 0,0 – 24 % NaCl, přičemž maximální růst byl zaznamenán při koncentraci 8-10,0 % NaCl. Bakteriální kmen *B. marisflavi* rostl dobře při pH 6-8, teplotě 30-37 °C a NaCl 0-5 % a jeho optimální účinnost byla pozorována jako degradace 300 mg/l fenolu za 108 hodin. *Bacillus* sp. NIGAB-1 je možné proto zařadit mezi mikroorganismy, které jsou užitečné při degradaci odpadních vod obsahujících fenol, kde je vysoká koncentrace soli. (Nazir a kol., 2020)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 METODIKA

3.1 Materiály

V této diplomové práci bylo použito řady roztoků, biologického materiálu, chemikálií a živných médií.

3.1.1 Minerální média (MM)

Minerální médium s pH 5,2 – 5,3 (M5)

Složení na 100 ml:

| | |
|--|--------|
| Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (23,9 g/l)..... | 0,3 ml |
| Roztok KH_2PO_4 (9,078 g/l)..... | 9,7 ml |
| Voda destilovaná..... | 85 ml |
| Roztok NH_4Cl (30 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok NaCl (10 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok stopových prvků | 0,2 ml |
| Cycloheximide (Actidion)..... | 6 mg |
| pH media před sterilizací 5,35 (po sterilizaci 5,30) | |

Minerální média s pH 4,25; 4,75; 5,25 a MM o pH 6, 7, 8 a 9

Složení na 100 ml:

Příprava těchto minerálních médií měla totožné složení jako M5 s výjimkou roztoků fosforečnanů a tato média také již neobsahovala cycloheximid.

Příprava MMs:

Složení na 200 ml:

pH 6:

| | |
|---|---------|
| Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (23,9 g/l)..... | 2,5 ml |
| Roztok KH_2PO_4 (9,078 g/l)..... | 17,5 ml |

pH 7:

| | |
|---|---------|
| Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (23,9 g/l)..... | 13,8 ml |
| Roztok KH_2PO_4 (9,078 g/l)..... | 6,2 ml |

pH 8:

| | |
|---|---------|
| Roztok Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (23,9 g/l)..... | 19,0 ml |
| Roztok KH ₂ PO ₄ (9,078 g/l)..... | 1,0 ml |

pH 9:

| | |
|---|---------------|
| Roztok Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (23,9 g/l)..... | 20,0 ml |
| Roztok KH ₂ PO ₄ (9,078 g/l)..... | 0,0 ml |

Minerální médium s pH 4,25:

Složení na 200 ml:

| | |
|---|---------|
| Roztok Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (23,9 g/l)..... | 0,1 ml |
| Roztok KH ₂ PO ₄ (9,078 g/l)..... | 19,9 ml |

Minerální médium 4,75:

MM 4,75 vzniklo smícháním sterilních MM5 a MM s pH 4,25 v poměru 1 : 1.

Minerální médium s 3,5% NaCl (M3)

Složení na 100 ml:

| | |
|---|--------|
| Roztok Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (23,9 g/l)..... | 8 ml |
| Roztok KH ₂ PO ₄ (9,078 g/l)..... | 2 ml |
| Voda destilovaná..... | 85 ml |
| Roztok NH ₄ Cl (30 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok MgSO ₄ ·7H ₂ O (10 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok Fe(NH ₄) ₂ ·(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O (3 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok CaCl ₂ ·2H ₂ O (1 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok stopových prvků | 0,2 ml |
| NaCl | 3,5 g |

pH media před sterilizací 6,65; úprava na 7,5 (NaOH), (po sterilizaci 7,3)

Minerální médium s 6,5 % NaCl (M6)

Složení na 100 ml:

| | |
|---|-------|
| Roztok Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (23,9 g/l)..... | 8 ml |
| Roztok KH ₂ PO ₄ (9,078 g/l)..... | 2 ml |
| Voda destilovaná..... | 85 ml |
| Roztok NH ₄ Cl (30 g/l)..... | 1 ml |

| | |
|--|--------|
| Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l)..... | 1 ml |
| Roztok stopových prvků | 0,2 ml |
| NaCl | 6,5 g |

pH media před sterilizací 6,45; úprava na 7,45 (pomocí 1M NaOH), (po sterilizaci 7,2)

Příprava minerálního média s koncentrací chloridu sodného 1 – 5 % měla stejné složení jako předchozí médium, jen se lišila v přídávku NaCl.

3.1.2 Roztok stopových prvků

| | |
|---|---------|
| $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,043 g |
| H_3BO_3 | 0,057 g |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,043 g |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,037 g |
| $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 g |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,040 g |

Všechny látky byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

Minerální média s fenolem

Do 100 ml sterilního minerálního média bylo vždy aplikováno asepticky 100 μl roztoku MEM vitamínů a následně 320 μl sterilního zásobního roztoku fenolu o koncentraci 50 g/l. Směs byla důkladně promíchána a asepticky rozplněna po 3 ml do sterilních zkumavek, které byly skladovány ve tmě a v chladu. Koncentrace fenolu ve zkumavkách tak byla cca 159 mg/l.

3.1.3 Chemikálie

Fenol (Sigma-Aldrich)

Trypton (T, Himedia)

MEM vitamíny (Biosera)

Ethanol (Penta)

Cycloheximid (Merck)

Běžně dostupné minerální soli

3.1.4 Biologický materiál

Jednotlivé kultury byly izolovány ze vzorků vod a půd. Odběr půd i vod v různých prostředích byl proveden asepticky pomocí sterilních zkumavek (vzorky vod) nebo pomocí sterilních plastických sáčků, do nichž byla nabrána zemina. Objem jednotlivých vzorků byl cca 3 - 4 ml v případě vod, u půd bylo odebíráno 10 – 20 g. Lokalizace a data odběrů jsou uvedeny v přehledu v následující Tabulce 2.

Tabulka 2 Lokalizace a data odběrů vzorků

| Čís.vz. | Vzorek, očkovaný objem, GPS | Datum odběru |
|---------|--|--------------|
| 1 | Voda Dřevnice, Zlín, 100 μ l GPS N 49°12.80125', E 17°35.70725' | 7.8.22 |
| 2 | Půda Lemberk, lesní, 10 μ l GPS N 50°30.18243', E 15°4.62635' | 20.8.22 |
| 3 | Půda Bílé Karpaty, lesní, 10 μ l GPS N 48°55.93130', E 17°50.44917' | 6.8.22 |
| 4 | Půda Mostek, luční, 10 μ l GPS N 50°29.80422', E 15°41.76730' | 6.8.22 |
| 5 | Voda stojatá, Zlín, 100 μ l GPS N 49°13.00595', E 17°41.55748' | 3.8.22 |
| 6 | Půda luční, Zlín, 10 μ l GPS N 49°12.90525' E 17°42.08768' | 3.8.22 |
| | | |
| 8 | Půda nivní, Zlín 10 μ l GPS N 49°13.12765' E 17°37.49105' | 4.8.22 |
| | | |
| 10 | Voda Kudlovský potok, 100 μ l GPS N 49°12.5559' E 17°40.5177' | 5.8.22 |
| 11 | Půda Bílé Karpaty, luční, 10 μ l GPS 48.9426839N, 17.8500547E | 14.8.22 |
| 12 | Voda Bílé Karpaty, potok, 100 μ l GPS 48.9403653N, 17.8558483E | 14.8.22 |

3.2 Přístroje a laboratorní pomůcky

3.2.1 Přístroje

Třepačka VWR (USA)

Chladnička s mrazákem (Ardo, ČR)

Lednička GZ 48 (GUZZANTI, Itálie)

Inkubátor MY TEMP Mini (Benchmark, Německo)

Chlazená centrifuga Mr 23i (Jouan, Francie)

Měřič zákalu Densilameter-II, typ Densi-2 (EMO, ČR)

pH metr inoLab 720 + skleněná elektroda (WTW, SRN)

Aseptický laminární box BIO-II-A (Telstar, Španělsko)

Mikroskop Olympus CX41

Hlubokomrazicí box (-80 °C) pro konzervaci kultur

Laboratorní autoklávy

3.2.2 Laboratorní pomůcky

Mikrodávkoč - 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l, 1-5 ml, 5-10 ml (Biohit, Finsko)

Mikrodávkoč (Hamilton, USA)

Zkumavky (Gama, ČR)

Mikrozkumavky (eppendorfy)

Filtry Ahlstrom ReliaPrep sterilní – velikost pórů 0,2 μ m (Ahlstrom, Německo)

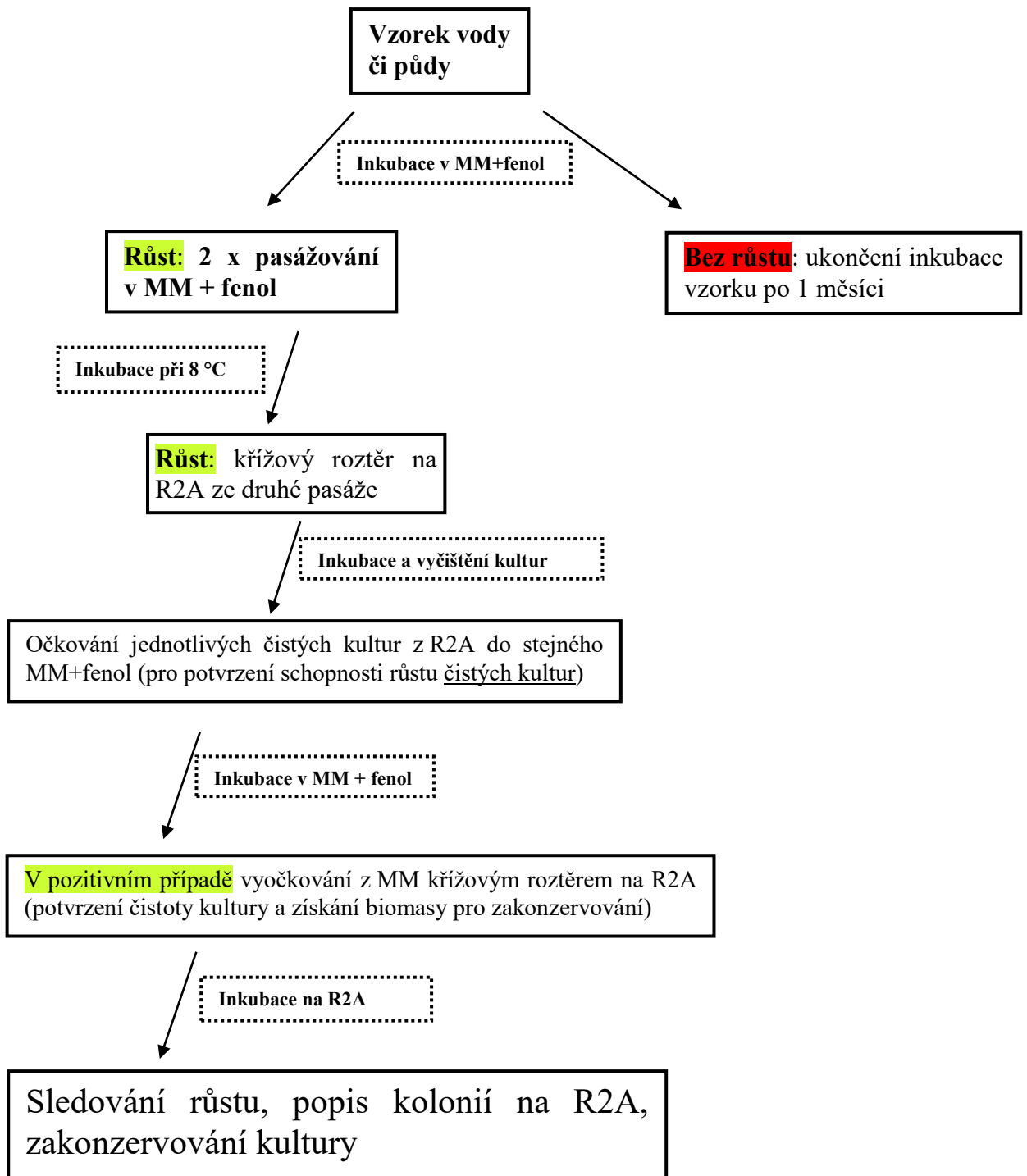
3.3 Postupy

3.3.1 Postup získávání bakterií rostoucích na fenolu při 8 °C a při pH 5,2

Vzorek každé vody v objemu 100 μ l byl naočkován do zkumavky s minerálním médiem M5 a fenolem a zkumavky byly inkubovány při teplotě 8 °C po dobu 4 týdnů. V průběhu inkubace byla sledována optická denzita ve zkumavkách pomocí densilometru a v případě zvýšené optické denzity (OD, minimálně o 0,3) bylo provedeno přeočkování 10 μ l do zkumavky se stejným médiem a zkumavka byla inkubována při 8°C po dobu potřebnou k namnožení kultury; tento postup byl pak ještě jednou opakován (= tzv. pasážování). Při kultivaci byly použity i nenačkované zkumavky jako blank.

U vzorků půdy byl nejprve každý vzorek protřepán 10 minut se sterilním fyziologickým roztokem (8,5 g NaCl/l) v poměru 1:5 a poté, po krátké sedimentaci hrubých částic, odebrán objem 10 μ l a naočkován do 1 zkumavky s M5 s fenolem a následně inkubován při teplotě 8 °C po dobu 4 týdnů. Další postup byl identický jako v případě vzorků vod.

U vzorků, kde došlo k růstu mikroorganismů během primární inkubace i po dvojitým přeočkování (pasážování), byly mikrobiální suspenze vyočkovány křížovým roztěrem na R2A agary a inkubovány při 8 °C, což znázorňuje Obr. 4. Po narostení kolonií byly jednotlivé typy kolonií individuálně přeočkovány na povrch čerstvých R2A agarů k získání čistých kultur a inkubovány za stejných podmínek. Po tomto vyčištění jednotlivých mikrobiálních kultur byly čisté kultury naočkovány do nových zkumavek s M5 s fenolem a inkubovány při 8 °C, pro potvrzení jejich schopnosti růst v M5 s fenolem v podobě čisté kultury. V pozitivních případech byly takové kultury vyočkovány z potvrzovacích zkumavek na R2A agary (pro kontrolu čistoty) a po narostení biomasy byly takové pozitivní kultury zakonzervovány.



Obrázek 4 Postup zpracování vzorků a práce s kulturami

3.3.2 Postup získávání bakterií rostoucích na fenolu při 8 °C a při koncentraci NaCl 3,5%

Postup získávání bakterií rostoucích na fenolu při 8 °C a při koncentraci NaCl 3,5% byl identický postupu získávání bakterií s pH 5,2 s rozdílem použití minerálního média, zde bylo použito namísto M5 minerální médium M3.

3.3.3 Postup získávání bakterií rostoucích na fenolu při 8 °C a při koncentraci NaCl 6,5%

Postup získávání bakterií rostoucích na fenolu při 8 °C a při koncentraci NaCl 6,5% byl identický postupu získávání bakterií s pH 5,2 s rozdílem použití minerálního média, zde bylo použito namísto M5 minerální médium M6.

3.3.4 Konzervace získaných kultur

Biomasa byla sebrána sterilní lancetou do sterilních plastových mikrozkušavek a dokonale promíchána s dvěma kapkami sterilního glycerolu, mikrozkušavky byly uloženy při -80 °C.

3.3.5 Ověření růstu kultur na fenolu při 8 °C v rozsahu pH 4 – 9

Po přípravě jednotlivých MM bylo změřeno jejich pH, každé médium bylo rozděleno 2x po 100 ml (nebo 200 ml) a vše sterilizováno v mikrovlnném přístroji. Přes noc bylo vše zchlazeno v ledničce. Poté bylo asepticky přidáno 100 µl roztoku MEM vitamínů a zásobní roztok fenolu (50 g/l) v objemu 0,3 (0,6) ml do každé lahve a vždy v jedné bylo přeměřeno pH.

Po definitivní přípravě MM a dokonalém promíchání byla MM asepticky rozplněna po 3,5 ml do 18 sterilních zkumavek. Zkumavky byly skladovány ve tmě v chladu. Koncentrace fenolu ve zkumavkách činila 150 mg/l.

Každá kultura byla suspendována ve fyziologickém roztoku a naočkována do dvou zkumavek každého média. Poté proběhla inkubace při 8 °C včetně blanků a sledování růstu kultur pomocí měření optické density.

3.3.6 Ověření růstu kultur na fenolu při 8 °C v rozsahu koncentrací NaCl 1 – 5 %

Po definitivní přípravě jednotlivých MM s odstupňovanými koncentracemi NaCl a dokonalém promíchání byla MM doplněna fenolem a asepticky rozplněna po 3,5 ml, každé MM do 18 sterilních zkumavek, a ty skladovány ve tmě v chladu. Koncentrace fenolu ve zkumavkách byla 150 mg/l.

Každá kultura byla suspendována ve fyziologickém roztoku a naočkována do dvou zkumavek každého média. Poté proběhla inkubace při 8 °C a sledování růstu kultur pomocí měření optické density.

3.3.7 Gramovo barvení získaných kultur

Kultura byla promíchána na podložním sklíčku ve sterilním fyziologickém roztoku, osušena několik minut a fixována plamenem. Následovalo barvení krystalovou violetí 1 minutu, oplach Lugolovým roztokem a následně působení 1 minutu Lugolovým roztokem, s oplachem destilovanou vodou. Preparát byl poté 20 sekund smýván acetonem, opět opláchnut vodou a barven safraninem po dobu 1 minuty.

Preparáty byly pozorovány imerzním objektivem při celkovém zvětšení 1000x.

Pro kontrolu grampozitivních kultur byl proveden KOH test. Test byl proveden v kapce 3% KOH na podložním sklíčku, do které byla nanesena klička biomasy zkoumané kultury. V případě přítomnosti gramnegativních bakterií dochází při rozmíchávání biomasy v KOH k rozpouštění buněčné stěny a uvolňování cytoplazmy a DNA buněk do kapaliny, což se projeví jako viskosní vlákno mezi kličkou a sklíčkem, při oddalování kličky přibližně 1 cm od sklíčka. U grampozitivních kultur k takovému jevu nedochází a obsah buněk s DNA se do KOH nevytláčí.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Odběry vzorků a primární inkubace vzorků v minerálních médiích s fenolem

Začátek práce spočíval v odběru vod a půd z různých míst a různého prostředí, což lze vyčíst z Tabulky 2, viz Biologický materiál. Dle postupu v metodice byly vzorky naočkovány do tří různých MM s fenolem a inkubovány při 8 °C buď při pH 5,2 (v M5) nebo za zvýšených koncentrací NaCl (v M3 a M6). Růst mikroorganismů byl sledován prostřednictvím optické density v průběhu primární kultivace vzorků, což je zaznamenáno v Tabulce 3.

Tabulka 3 Měření optické density v průběhu kultivace při 8 °C

| | | Optická densita v průběhu kultivace při 8 °C | | | | | | | | |
|--------------|-------|--|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Číslo vzorku | Média | Začátek | 6 dní | 8 dní | 11 dní | 14 dní | 18 dní | 21 dní | 25 dní | 29 dní |
| Blanky | | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 1 | M3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 1 | M5 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,7 |
| 1 | M6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | M3 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | M5 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,8 | 1,1 | 1,0 | 1,0 |
| 2 | M6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3 | M3 | 1,2* | 1,2* | 1,2* | 1,2* | 1,2* | 1,2* | 1,2* | 1,2* | 1,2* |
| 3 | M5 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 3 | M6 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 4 | M3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | M5 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,4 |
| 4 | M6 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5 | M3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5 | M5 | 0,1 | 0,2 | 0,7 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 1,0 |
| 5 | M6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6 | M3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 6 | M5 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 1,0 | 1,0 |
| 6 | M6 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 8 | M3 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,4 |
| 8 | M5 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 8 | M6 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 |
| 10 | M3 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,6 | 1,1 | 1,5 | 1,5 |
| 10 | M5 | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,9 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,5 | 1,6 |
| 10 | M6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 11 | M3 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 |

| | | | | | | | | | | |
|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 11 | M5 | 0,4 | 0,6 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,7 | 0,7 |
| 11 | M6 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| 12 | M3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 12 | M5 | 0,0 | 0,5 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| 12 | M6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Modře zaznačené vzorky jsou vzorky vody. Žlutá barva značí počátek růstu a zelená barva nárůst mikroorganismů.

* velké množství půdních částic

4.2 Pasážování pozitivních vzorků

Následně proběhla z pomnožených vzorků dvě pasážování do zkumavek se stejným minerálním médiem a stejnou koncentrací fenolu. Drtivá většina vzorků dříve či později vyrostla, s výjimkou vzorku číslo 6, u kterého není jasná příčina, proč nevyrostl, proto s tímto vzorkem nebylo dále pokračováno. Výsledky růstu pasážovaných vzorků jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 Měření optické density v průběhu kultivace při 8 °C při pasážování pozitivních vzorků

| Číslo vzorku | Médium | Optická densita v průběhu kultivace při 8 °C | | | | | | | | |
|-----------------|--------|--|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Začátek | 4 dny | 5 dnů | 7 dnů | 11 dnů | 15 dnů | 18 dnů | 21 dnů | 25 dnů |
| Blank | | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 1. pasáž | | Začátek | 4 dny | 5 dnů | 7 dnů | 11 dnů | 15 dnů | 18 dnů | 21 dnů | 25 dnů |
| 5 | M5 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,6 | 0,9 | 1,0 |
| 6 | M5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 10 | M5 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,7 | 0,9 | 1,2 | 1,3 | 1,3 |
| 11 | M5 | 0,0 | 0,1 | 0,4 | 0,6 | 1,0 | 1,3 | 1,4 | 1,5 | 1,6 |
| 1. pasáž | | Začátek | 2 dny | 6 dnů | 10 dnů | 13 dnů | 16 dnů | 20 dnů | | |
| 2 | M5 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 1,2 | 1,5 | 1,5 | 1,3 | | |
| 3 | M5 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,9 | 1,0 | 1,2 | 1,1 | | |
| 10 | M3 | 0,0 | 0,0 | 0,25 | 0,7 | 1,1 | 1,5 | 1,5 | | |
| 1. pasáž | | Začátek | 4 dny | 7 dnů | 10 dnů | 14 dnů | | | | |
| 8 | M3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,6 | | | | |
| 1 | M5 | 0,1 | 0,0 | 0,3 | 0,6 | 0,7 | | | | |

| 2. pasáž | | Začátek | 4 dny | 7 dnů | 10 dnů | 14 dnů |
|-----------------|----|----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| 10 | M5 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,9 | 0,9 |
| 11 | M5 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,6 | 0,6 |

| 2. pasáž | | Začátek | 3 dny | 6 dnů | 10 dnů |
|----------|----|---------|-------|--------|--------|
| 2 | M5 | 0,1 | 0,2 | 0,9 | 1,2 |
| 3 | M5 | 0,0 | 0,1 | 0,7 | 0,9 |
| 10 | M3 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,7 |
| 2. pasáž | | Začátek | 4 dny | 18 dnů | 21 dnů |
| 1 | M5 | 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,7 |
| 5 | M5 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 1,0 |

Jedinou výjimkou byl prvotní pomnožený vzorek č. 12, který vyrostl nejrychleji a byl přímo očkovan na R2A agary a nebyl pasážován.

U všech ostatních vzorků bylo následně provedeno vyočkování z pomnožených zkumavek druhé pasáže, a to formou křížového rozřeru na R2A agary (inkubace při 8 °C). Vyrostlé kolonie byly přeočkovány na další čerstvé agary pro získání čistých kultur.

Výsledkem těchto prací bylo získání těchto kultur, viz Tabulka 5:

Tabulka 5 Přehled získaných čistých kultur

| Čís. vz. | Vzorek, očkovaný objem, GPS | Získané čisté kultury |
|----------|---|--|
| 1 | Voda Dřevnice, Zlín, 100 µl GPS N 49°12.80125', E 17°35.70725' | Kultura 1A ZS (M5) |
| 2 | Půda Lemberk, lesní, 10 µl GPS N 50°30.18243', E 15°4.62635' | Kultura 2A ZS (M5) Kultura 2B ZS (M5) |
| 3 | Půda Bílé Karpaty, lesní, 10 µl GPS N 48°55.93130', E 17°50.44917' | Kultura 3A ZS (M5) Kultura 3B ZS (M5) |
| 4 | Půda Mostek, luční, 10 µl GPS N 50°29.80422', E 15°41.76730' | --- vzorek nevyrostl |
| 5 | Voda stojatá, Zlín, 100 µl GPS N 49°13.00595', E 17°41.55748' | Kultura 5A ZS (M5) Kultura 5B ZS (M5) |
| 6 | Půda luční, Zlín, 10 µl GPS N 49°12.90525' E 17°42.08768' | --- nevyrostla 1. pasáž |
| 8 | Půda nivní, Zlín 10 µl GPS N 49°13.12765' E 17°37.49105' | Kultura 8A ZS (M3) |
| 10 | Voda Kudlovský potok, 100 µl GPS N 49°12.5559' E 17°40.5177' | Kultura 10A ZS (M3) Kultura 10B ZS (M5) |
| 11 | Půda Bílé Karpaty, luční, 10 µl GPS 48.9426839N, 17.8500547E | Kultura 11A ZS (M5) Kultura 11B ZS (M5) |
| 12 | Voda Bílé Karpaty, potok, 100 µl GPS 48.9403653N, 17.8558483E | Kultura 12A ZS (M5) Kultura 12B ZS (M5) |

Všech těchto získaných 14 čistých kultur bylo individuálně testováno na schopnost růstu na fenolu v příslušných minerálních médiích (M5, M3, M6) a výsledky z tohoto testování jsou uvedeny v Tabulce 6. Tyto testy byly dělány postupně, jak byly jednotlivé čisté kultury v průběhu prací získávány.

Tabulka 6 Testování růstu na fenolu všech získaných čistých kultur

| Č. vz. | MM | Optická densita v průběhu kultivace při 8 °C | | | | | |
|---------------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| Čistá kultura | | Začátek | 4 dny | 18 dnů | 21 dnů | 25 dnů | |
| 10A | M3 | 0,0 | 0,1 | 1,3 | 1,5 | 1,5 | |
| Čistá kultura | | Začátek | 11 dnů | 14 dnů | 18 dnů | 22 dnů | 26 dnů |
| 2A | M5 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 3B | M5 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 8A | M3 | 0,0 | 1,0 | 1,5 | 1,5 | - | - |
| 10B | M5 | 0,0 | 0,9 | 0,9 | 1,0 | - | - |
| 11A | M5 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | - | - |
| Čistá kultura | | Začátek | 3 dny | 7 dnů | 11 dnů | | |
| 2B | M5 | 0,1 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | | |
| Čistá kultura | | Začátek | 4 dny | 8 dnů | | - | |
| 5A | M5 | 0,1 | 0,8 | 0,8 | | - | |
| 5B | M5 | 0,2 | 0,9 | 1,1 | | - | |

| Čistá kultura | | Začátek | 4 dny | 8 dnů | 14 dnů | 21 dnů | |
|---------------|----|---------|-------|-------|--------|----------|----------|
| 1A | M5 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,7 | |
| 11A | M5 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | ukončeno |
| 11B | M5 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | ukončeno |
| 3A | M5 | 0,1 | 0,6 | 0,8 | 0,9 | - | |
| 12A | M5 | 0,2 | 0,7 | 0,8 | - | ukončeno | |
| 12B | M5 | 0,2 | 0,7 | 0,8 | - | ukončeno | |

4.3 Potvrzení růstu čistých kultur v příslušných MM s fenolem

Z Tabulky 7 níže, která shrnuje všechny pozitivní kultury, lze vyčíst, že kultury 8A a 10A v minerálním médiu M3 (tedy s 3,5% NaCl) a kultury 1A, 2B, 3A, 5A, 5B, 10B, 12A a 12B v minerálním médiu M5 (výchozí pH 5,2) potvrdily růst v identickém médiu s fenolem, které bylo použito na prvotní kultivaci vzorků. Celkově se tedy podařilo získat 10 čistých kultur ze vzorků půd i vod. Tyto pozitivní kultury byly zakonzervovány při teplotě -80 °C v glycerolu.

V průběhu celé práce nebyl zaznamenán absolutně žádný růst mikroorganismů v minerálním médiu s fenolem a s výrazněji zvýšenou salinitou, tj. se 6,5 % NaCl.

Tabulka 7 Přehled získaných čistých kultur v médiích s fenolem a jejich maximální hodnota nárůstu při 8 °C, vyjádřená optickou densitou

| Médium | Kultura | Typ vzorku | Max. optická densita při 8 °C |
|-----------|---------|---------------------------------|-------------------------------|
| M3 | 8A ZS | Půda nivní, Zlín | 1,5 |
| M3 | 10A ZS | Voda Kudlovský potok | 1,5 |
| M5 | 1A ZS | Voda Dřevnice, Zlín | 0,7 |
| M5 | 2B ZS | Půda Lemberk, lesní | 0,6 |
| M5 | 3A ZS | Půda Bílé Karpaty, lesní | 0,9 |
| M5 | 5A ZS | Voda stojatá, Zlín | 0,8 |
| M5 | 5B ZS | | 1,1 |
| M5 | 10B ZS | Voda Kudlovský potok | 1,0 |
| M5 | 12A ZS | Voda Bílé Karpaty, potok | 0,8 |
| M5 | 12B ZS | | 0,8 |

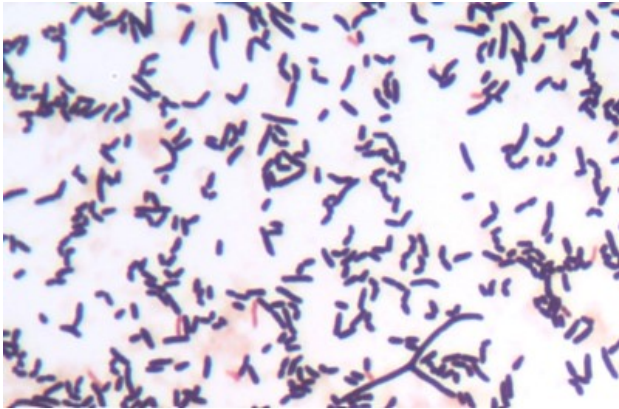
Celkově tedy ze 14 testovaných čistých kultur jich 10 prokázalo schopnost růstu v daných médiích s fenolem. Kultury se značně různily v dosažené hustotě buněk, což je dobře patrné z maximálních hodnot jejich densit při ukončení inkubace. Bylo takto získáno 8 kultur, které rostly v médiu s fenolem a cycloheximidem při vstupní hodnotě pH 5,2 a pouze dvě kultury byly získány za využití M3 s fenolem a se zvýšeným obsahem NaCl.

4.4 Gramovo barvení

Tabulka 8 reprezentuje výsledky Gramova barvení získaných mikrobiálních kultur. Princip barvení viz Postupy.

Tabulka 8 Gramovo barvení a získání mikrobiálních kultur

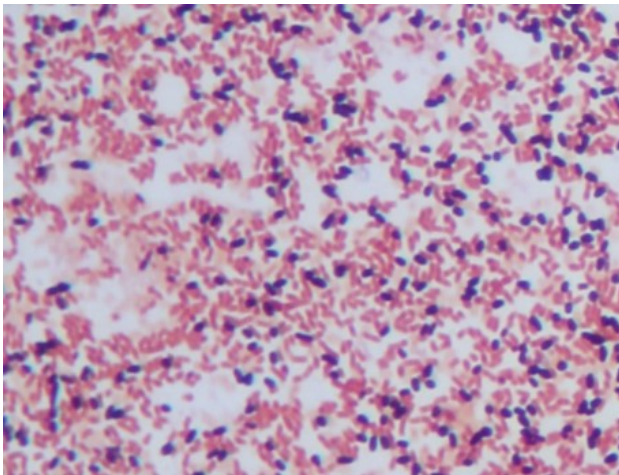
| Č. | Vzorek | Získané kultury | Gramovo barvení |
|----|-------------------------|---------------------|--|
| 1 | Voda Dřevnice Zlín | Kultura 1A ZS (M5) | G+ tyčky se zaoblenými konci, různé délky, ojediněle vláknité buňky; delší buňky mírně prohnuté; jednotlivě |
| 2 | Půda lesní Lemberk | Kultura 2B ZS (M5) | G- rovné tyčinky , konce zaoblené; většinou jednotlivě |
| 3 | Půda lesní Bílé Karpaty | Kultura 3A ZS (M5) | G- mírně oválné kratší tyčinky , konce zaoblené; většinou ve shlucích |
| 5 | Voda stojatá Zlín | Kultura 5A ZS (M5) | G- rovné nebo nepatrně prohnuté tyčinky , konce zaoblené; jednotlivě nebo ve dvojicích |
| | | Kultura 5B ZS (M5) | G- mírně oválné tyčinky , zaoblené; spíše jednotlivě |
| 8 | Půda nivní Zlín | Kultura 8A ZS (M3) | G+ tyčky i G- tyčky , kratší, mírně oválné; jednotlivě nebo v párech |
| 10 | Voda Kudlovský potok | Kultura 10A ZS (M3) | G+ tyčky i G- tyčky , kratší, mírně oválné; jednotlivě nebo v párech |
| | | Kultura 10B ZS (M5) | G- kratší tyčinky , konce zaoblené; většinou jednotlivě |
| 12 | Voda potok Bílé Karpaty | Kultura 12A ZS (M5) | G- většinou přímé tyčinky , konce zaoblené; jednotlivě nebo v párech |
| | | Kultura 12B ZS (M5) | G- krátké zaoblené tyčinky až kokotyčinky ; většinou jednotlivě nebo v malých shlucích; slaběji barvitelné |



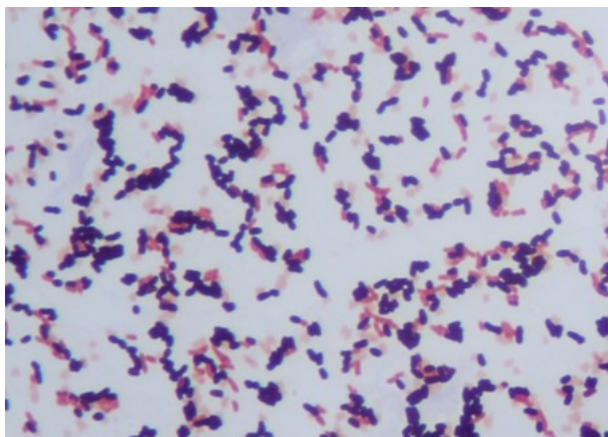
Obrázek 5 Kultura 1A, Gram+ tyčinky



Obrázek 6 Kultura 2B, Gram- tyčinky



Obrázek 7 Kultura 8A, Gram+ i Gram-



Obrázek 8 Kultura 10A, Gram+ i Gram–

Některé kultury se ukázaly jako gramnegativní a některé byly grampozitivní. Z důvodu odbarvení některých buněk u kultur 8A ZS a 10A ZS, viz obrázek 7 a 8, byl proveden KOH test. Vzhledem k tomu, že nedocházelo k žádnému rozpouštění buněk a uvolňování buněčného obsahu, test prokázal grampozitivitu obou těchto bakterií.

4.5 Testování růstu kultur na fenolu při různých hodnotách pH

První série byla prováděna se všemi kulturami, které byly získány ze vzorků vod a půd za pomoci M5 s fenolem a cycloheximidem a tyto kultury byly nejprve testovány na schopnost jejich růstu na fenolu při výrazněji snížených hodnotách pH, a to 4,25; 4,75 a kontrolně i při 5,25. Protože v těchto pokusech již bylo pracováno s čistými kulturami, kultivační média již neobsahovala cycloheximid. Výsledky testování jsou uvedeny v následujících třech tabulkách 9 – 11. Všem kulturám byla také do jejich označení přidána zkratka „ZS“ – důvodem bylo vyloučení záměn s jinými kulturami studovanými ve stejné době v mikrobiologických laboratořích ÚIOŽP.

Tabulka 9 Testování kultur při pH 4,25 – hodnoty optické density během pokusu

| pH 4,25 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
| Doba inkubace | Blank | 1A ZS | | 2B ZS | | 3A ZS | | 5A ZS | | 5B ZS | | 10B ZS | | 12A ZS | | 12B ZS | |
| 0 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |
| 4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |
| 7 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |
| 8 | 0,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |
| 11 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| 15 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 |
| 18 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| 22 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |
| 29 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |

Tabulka 10 Testování kultur při pH 4,75 – hodnoty optické density během pokusu

| pH 4,75 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
| Doba inkubace | Blank | 1A ZS | | 2B ZS | | 3A ZS | | 5A ZS | | 5B ZS | | 10B ZS | | 12A ZS | | 12B ZS | |
| 0 | 0 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 |
| 4 | 0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 |
| 7 | 0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| 8 | 0,1 | 0 | 0 | 0,2 | 0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0 | 0,1 | 0 | 0,1 |
| 11 | 0 | 0 | 0,1 | 0,4 | 0,5 | 0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 15 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,6 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,6 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 18 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,6 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| 22 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,5 | 0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,6 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| 29 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,5 | 0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,6 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |

Tabulka 11 Testování kultur při pH 5,25 – hodnoty optické density během pokusu

| pH 5,25 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------|-------|-----|-------|-----|-------|---|-------|---|-------|-----|--------|---|--------|-----|--------|-----|
| Doba inkubace | Blank | 1A ZS | | 2B ZS | | 3A ZS | | 5A ZS | | 5B ZS | | 10B ZS | | 12A ZS | | 12B ZS | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0,1 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 0,1 | 0 | 0,1 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | 0,3 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,3 | 0,4 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0,1 | 0,1 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,6 | 0,7 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0,4 | 0,5 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,7 | 0,7 | 0 | 0 | 0,2 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0,6 | 0,6 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,8 | 0,8 | 0 | 0 | 0,2 | 0,1 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 0,6 | 0,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,8 | 0,8 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | 0 | 0,6 | 0,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,8 | 0,8 | 0 | 0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 |

Při pH 4,25 neprokázala růst žádná kultura, při pH 4,75 a 5,25 překvapivě pouze dvě kultury z osmi testovaných (1A ZS a 5B ZS). Lze vyslovit domněnku, že ostatní kultury v předchozích částech práce rostly díky přítomnosti cycloheximidu, nikoliv fenolu, a proto v testech, kde cycloheximid chyběl, nevyrostly.

Kultury 1A ZS a 5B ZS byly dále testovány z hlediska růstu na fenolu při dalších hodnotách pH, a to pH 6; 7; 8 a 9. Výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 12 – 15.

Tabulka 12 Ověření růstu kultur 1A ZS a 5B ZS při pH 6

| pH 6 | | | |
|---------------|-------|-------|-------|
| Doba inkubace | Blank | 1A ZS | 5B ZS |
| 0 | 0 | 0,05 | 0,05 |
| 7 | 0 | 0,05 | 0,05 |
| 14 | 0 | 0,5 | 1,2 |
| 21 | 0 | 1,45 | 1,2 |
| 28 | 0 | 1,5 | 1,2 |

Tabulka 13 Ověření růstu kultur 1A ZS a 5B ZS při pH 7

| pH 7 | | | |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| Doba inkubace | Blank | 1A ZS | 5B ZS |
| 0 | 0 | 0,05 | 0 |
| 7 | 0 | 0,05 | 0 |
| 14 | 0 | 0,55 | 1,2 |
| 21 | 0 | 1,5 | 1,2 |
| 28 | 0 | 1,4 | 1,2 |

Tabulka 14 Ověření růstu kultur 1A ZS a 5B ZS při pH 8

| pH 8 | | | |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| Doba inkubace | Blank | 1A ZS | 5B ZS |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0,25 | 0 |
| 21 | 0 | 1,4 | 0,1 |
| 28 | 0 | 1,3 | 0,1 |

Tabulka 15 Ověření růstu kultur 1A a 5B při pH 9

| pH 9 | | | |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| Doba inkubace | Blank | 1A ZS | 5B ZS |
| 0 | 0 | 0 | 0,1 |
| 7 | 0 | 0 | 0,1 |
| 14 | 0 | 0,15 | 0 |
| 21 | 0 | 1,15 | 0 |
| 28 | 0 | 1,35 | 0 |

Z výsledků je vidět, že kultura 1A ZS prokázala širší schopnost růstu, neboť rostla při pH 4,75 – 9, kdežto kultura 5B rostla jen v rozmezí pH 4,75 – 7.

4.6 Testování kultur při různých hodnotách koncentrace NaCl (0 – 5%)

Kultury 8A ZS a 10A ZS vzhledem k tomu, že byly schopné růstu při koncentraci NaCl 3,5 %, byly dále testovány na schopnost růstu na fenolu při koncentracích chloridu sodného v rozpětí 0 – 5 % NaCl, výsledky jsou znázorněné v Tabulkách 16 a 17.

Tabulka 16 Testování kultury 8A ZS při různých koncentracích NaCl

| Kultura 8A ZS | | | | | |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Doba inkubace | NaCl 0 % | NaCl 1 % | NaCl 2 % | NaCl 4 % | NaCl 5 % |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0,15 | 0,05 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0,85 | 0,95 | 0,5 | 0 | 0 |
| 7 | 1,1 | 1,25 | 0,9 | 0,1 | 0 |
| 9 | 1,45 | 1,55 | 1,4 | 0,3 | 0 |
| 10 | 1,5 | 1,55 | 1,7 | 0,5 | 0,15 |
| 14 | 1,45 | 1,45 | 1,7 | 1,25 | 0,4 |
| 17 | 1,45 | 1,45 | 1,7 | 1,8 | 0,8 |
| 21 | 1,3 | 1,4 | 1,6 | 1,6 | 1,1 |
| 24 | KONEC | | | | 1,3 |
| 28 | | | | | 1,3 |
| | | | | | KONEC |

Tabulka 17 Testování kultury 10A ZS při různých koncentracích NaCl

| Kultura 10A ZS | | | | | |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Doba inkubace | NaCl 0 % | NaCl 1 % | NaCl 2 % | NaCl 4 % | NaCl 5 % |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0,2 | 0,15 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0,6 | 0,65 | 0,5 | 0 | 0 |
| 7 | 0,8 | 0,9 | 0,8 | 0,1 | 0 |
| 9 | 0,95 | 1,4 | 1,4 | 0,45 | 0 |
| 10 | 1,1 | 1,45 | 1,6 | 0,75 | 0,05 |
| 14 | 1,1 | 1,45 | 1,6 | 1,5 | 0,65 |
| 17 | 1,1 | 1,45 | 1,6 | 1,7 | 1,35 |
| 21 | 1 | 1,45 | 1,55 | 1,6 | 1,3 |
| 24 | KONEC | | | | |

Obě kultury prokázaly schopnost růstu i v 5 % NaCl, což je více než průměrná salinita v mořské vodě (cca 3,5 %), ačkoliv při zvyšování koncentrace NaCl se růst zpomaloval a lagová fáze byla delší. Kultury vzhledem k tomu, že byly schopné růstu v minerálním médiu i bez přídavku NaCl lze proto označit jako halotolerantní, nikoliv jako halofilní.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo získat bakteriální kultury schopné růstu na fenolu při teplotě 8 °C za ztížených podmínek, jimiž bylo snížené pH nebo zvýšená salinita.

Celá práce byla zahájena odběrem 10 vzorků vod a půd z různého prostředí. Vzorky byly naočkovány do tří typů minerálních médií s fenolem - do mírně kyselého média s pH 5,2, do média s 3,5 % NaCl a do média s přídatkem 6,5 % NaCl - a růst mikroorganismů byl detekován prostřednictvím optické denzity v průběhu kultivace. Žádný z těchto vzorků neprokázal schopnost růstu v minerálním médiu se salinitou 6,5 % NaCl. Naopak největšího bakteriálního růstu vykazovalo minerální médium s pH 5, kde pozitivitu růstu vykazalo 8 vzorků, v médiu s 3,5 % NaCl to už byly pouze dva vzorky. Z pomnožených vzorků následovala dvě pasážování (přeočkování) do nových zkumavek se stejným médiem a stejnou koncentrací fenolu. Drtivá většina pasážovaných vzorků při následné inkubaci při 8 °C vyrostla, s výjimkou vzorku číslo 6, u kterého není jasná příčina, proč nevyrostl, proto s tímto vzorkem nebylo dále pracováno. Poté už proběhlo vyočkování druhých pasáží na R2A agary a vyrostlé kolonie byly přeočkovány na další čerstvé agary pro získání čistých kultur.

Ze 14 takto získaných čistých kultur jich následně 10 prokázalo schopnost růstu ve stejných médiích s fenolem v podobě čisté kultury. Jednotlivé kultury se značně různily v dosažené hustotě buněk. Bylo takto získáno 8 kultur, které rostly v minerálním médiu s fenolem a cycloheximidem při vstupní hodnotě pH 5,2 a pouze dvě kultury byly získány za využití média s obsahem NaCl 3,5 %. Pozitivní kultury byly zakonzervovány při teplotě -80 °C v glycerolu.

Dále byly kultury pomocí Gramova barvení rozděleny na grampozitivní a gramnegativní. Sedm kultur bylo gramnegativních a tři grampozitivní; u dvou z nich však bylo zapotřebí potvrdit grampozitivitu KOH testem.

Následně byly kultury získané ze vzorků půd a vod otestovány na schopnost růstu na fenolu při nižších hodnotách pH, a to 4,25; 4,75 a 5,25. Při pH 4,25 neprokázala růst žádná kultura, při pH 4,75 a 5,25 překvapivě pouze dvě kultury z osmi testovaných – a to kultury pracovně označované jako 1A ZS a 5B ZS. Zbývající kultury pravděpodobně rostly v předchozích částech práce jen díky přítomnosti cycloheximidu, který byl obsažen v minerálním

médiu s pH 5 při prvotních kultivacích vzorků a při získávání čistých kultur.

Kultury 1A ZS a 5B ZS byly poté dále testovány z hlediska růstu na fenolu při dalších hodnotách pH 6, 7, 8 a 9. Nejširší schopnost růstu prokázala kultura 1A ZS, neboť rostla v rozmezí pH 4,75 – 9, kdežto kultura 5B ZS rostla pouze v rozmezí pH 4,75 – 7.

Kultury 8A ZS a 10A ZS byly testovány následně při různých koncentracích NaCl, a to v rozpětí 0 – 5 %. Obě tyto kultury prokázaly schopnost růstu na fenolu při každé jednotlivé koncentraci NaCl, ačkoliv při zvyšování koncentrace NaCl se jejich růst zpomaloval a lagová fáze byla delší. Vzhledem k tomu, že bakterie vykazovaly růst i v médiu bez obsahu NaCl, lze tyto bakterie označit jako halotolerantní.

Výsledkem práce tak byly získány 4 bakteriální kmeny, schopné využívat fenol k růstu za ztížených podmínek při teplotě 8 °C, které jsou již nyní využívány pro další práce v laboratoři ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně. Rovněž potenciál jejich využití je možný v praxi při biodegradaci fenolu z mírně kyselých podzemních vod nebo z výrazněji mineralizovaných podzemních vod.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AFZAL, Muhammad; IQBAL, Samina; RAUF, Sakandar a KHALID, Zafar M., 2007. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. Online. *Journal of Hazardous Materials*. Roč. 149, č. 1, s. 60-66. ISSN 03043894. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.03.046>. [cit. 2024-03-28].

BHATTACHARYA, Amrik; GUPTA, Anshu; KAUR, Amarjeet a MALIK, Darshan, 2015. Assessment of phenol-degrading ability of *Acinetobacter* sp. B9 for its application in bioremediation of phenol-contaminated industrial effluents. Online. *Chemistry and Ecology*. 2015-09-28, roč. 31, č. 7, s. 607-621. ISSN 0275-7540. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1075517>. [cit. 2024-03-28].

BHATTACHARYA, Amrik; GUPTA, Anshu; KAUR, Amarjeet a MALIK, Darshan, 2015. Assessment of phenol-degrading ability of *Acinetobacter* sp. B9 for its application in bioremediation of phenol-contaminated industrial effluents. Online. *Chemistry and Ecology*. 2015-09-28, roč. 31, č. 7, s. 607-621. ISSN 0275-7540. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1075517>. [cit. 2024-03-28].

PAISIO, Cintia E.; TALANO, Melina A.; GONZÁLEZ, Paola S.; PAJUELO-DOMÍNGUEZ, Eloisa a AGOSTINI, Elizabeth, 2013. Characterization of a phenol-degrading bacterium isolated from an industrial effluent and its potential application for bioremediation. Online. *Environmental Technology*. Roč. 34, č. 4, s. 485-493. ISSN 0959-3330. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.701238>. [cit. 2024-04-28].

ĐOKIĆ, LIDIJA, TANJA NARANČIĆ, JASMINA NIKODINOVIĆ-RUNIĆ, SANJA BAJKIĆ a BRANKA VASILJEVIĆ, 2011. *FOUR BACILLUS SP. SOIL ISOLATES CAPABLE OF DEGRADING PHENOL, TOLUENE, BIPHENYL, NAPHTHALENE AND OTHER AROMATIC COMPOUNDS EXHIBIT DIFFERENT AROMATIC CATABOLIC POTENTIALS*. 1 Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, 11010 Belgrade, Serbia, 1-12.

ENACHE, Teodor Adrian a OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria, 2011. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. Online. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Roč. 655, č. 1, s. 9-16. ISSN 15726657. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.02.022>. [cit. 2024-03-31].

GUANG-HUA LU; CHAO WANG a ZHE SUN, 2008. Biodegradation of Complex Bacteria on Phenolic Derivatives in River Water1. *BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES*. Vol. 2009, no. 22, s. 6.

HADDADI, Azam a SHAVANDI, Mahmoud, 2013. Biodegradation of phenol in hypersaline conditions by Halomonas sp. strain PH2-2 isolated from saline soil. Online. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Roč. 85, s. 29-34. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.005>. [cit. 2024-03-28].

KOTRESHA, D. a VIDYASAGAR, G. M., 2008. Isolation and characterisation of phenol-degrading Pseudomonas aeruginosa MTCC 4996. Online. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Roč. 24, č. 4, s. 541-547. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9508-2>. [cit. 2024-03-28].

LEE, Gillian Li Yin; AHMAD, Siti Aqlima; YASID, Nur Adeela; ZULKHARNAIN, Azham; CONVEY, Peter et al., 2018. Biodegradation of phenol by cold-adapted bacteria from Antarctic soils. Online. *Polar Biology*. Roč. 41, č. 3, s. 553-562. ISSN 0722-4060. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2216-y>. [cit. 2024-03-28].

MARGESIN, Rosa; GANDER, Silvia; ZACKE, Gabriele; GOUNOT, Anne Monique a SCHINNER, Franz, 2003. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. Online. *Extremophiles*. 2003-12-1, roč. 7, č. 6, s. 451-458. ISSN 1431-0651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0347-2>. [cit. 2024-03-28].

MARGESIN, Rosa; MOERTELMAIER, Christoph a MAIR, Johannes, 2013. Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. Online. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Roč. 84, s. 185-191. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.004>. [cit. 2024-03-28].

Nazir Ahmad; Muhammad Ramzan Khan, Ghulam Muhammad Ali, January 2020. Molecular Identification and Characterization of Bacillus sp. NIGAB-1 for Phenol Degradation Under Saline Conditions. *Iranian J Biotech*. Vol. 2020, no. e2275, s. 18. ISSN 10.30498/IJB.2020.133622.2275.

ROTH, Carl, 2015. *Bezpečnostní list: Fenol*. Online. Carl Roth. 11.08.2015, 8.8.2022. Dostupné z: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-3215-CZ-CS.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzNzgxMzZ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNjgvaDUyLzkwODM0NTc>

[zMDY2NTQucGRmfDhhOTdkNTQzYzA3ZmI3ZDU4Njc2OGJhNTcyMzE3ZjljYzJjOTRiZTBiYzZkNzllM2E0ZGU0MmJjMWEwMzQ4YTE](https://doi.org/10.2478/2787-1722-2023-0001). [cit. 2024-03-31].

Toxické látky, 2010. Online. PŘIBYLOVÁ, Jarmila; KLEGER, Ladislav a VÁLEK, Petr. Arnika. 29. 11. 2010, 31. 08. 2022. Dostupné z: <https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/fenoly>. [cit. 2024-03-31].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MM Minerální médium

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | | |
|-----------|--|----|
| Obrázek 1 | Strukturní vzorce fenolu..... | 12 |
| Obrázek 2 | Degradace fenolu při 15 °C ve vsádkových kulturách tří aktinobakteriálních kmenů. Šipky označují přídavky fenolu. Data jsou průměrné hodnoty ze tří replikátů..... | 22 |
| Obrázek 3 | Degradace fenolu <i>Bacillus</i> sp. NIGAB-1 v médiu obsahující 4 % NaCl a 300 mg/l fenolu | 29 |
| Obrázek 4 | Postup zpracování vzorků a práce s kulturami..... | 37 |
| Obrázek 5 | 1A, Gram + tyčinky..... | 46 |
| Obrázek 6 | 2B, Gram – tyčinky..... | 46 |
| Obrázek 7 | 8A, Gram + i Gram -..... | 46 |
| Obrázek 8 | 10A, Gram + i Gram - | 47 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Chemické a fyzikální vlastnosti fenolu | 13 |
| Tabulka 2 Lokalizace a data odběrů vzorků..... | 34 |
| Tabulka 3 Měření optické density v průběhu kultivace při 8 °C..... | 40 |
| Tabulka 4 Měření optické density v průběhu kultivace při 8 °C a následné pasážování jednotlivých vzorků..... | 41 |
| Tabulka 5 Přehled získaných čistých kultur..... | 42 |
| Tabulka 6 Testování růstu na fenolu všech získaných čistých kultur | 43 |
| Tabulka 7 Potvrzení růstu kultur v čistém médiu a měření optické density při 8 °C..... | 44 |
| Tabulka 8 Gramovo barvení a získání mikrobiálních kultur..... | 45 |
| Tabulka 9 Testování kultur při pH 4,25..... | 48 |
| Tabulka 10 Testování kultur při pH 4,75..... | 48 |
| Tabulka 11 Testování kultur při pH 5,25..... | 49 |
| Tabulka 12 Ověření růstu kultur 1A a 5B při pH 6..... | 49 |
| Tabulka 13 Ověření růstu kultur 1A a 5B při pH 7..... | 50 |
| Tabulka 14 Ověření růstu kultur 1A a 5B při pH 8..... | 50 |
| Tabulka 15 Ověření růstu kultur 1A a 5B při pH 9..... | 50 |
| Tabulka 16 Testování kultury 8A ZS při různých koncentracích..... | 51 |
| Tabulka 17 Testování kultury 10A ZS při různých koncentracích NaCl..... | 51 |

