

Růst vybrané bakteriální kultury na fenolu v přítomnosti trichloroethenu

Ema Štěpánková

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ema Štěpánková**
Osobní číslo: **T21825**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Ochrana životního prostředí**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Růst vybrané bakteriální kultury na fenolu v přítomnosti trichloroethenu**

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši zaměřenou na růst bakteriálních kultur v přítomnosti toxických látek, zvláště fenolu a organických rozpouštědel, a na kultivační možnosti zmírnění toxicity takových látek vůči bakteriálním buňkám.

Experimentálně ověřte možnosti zlepšení růstu vybraného bakteriálního kmene na fenolu, za přítomnosti trichloroethenu.

Získané poznatky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v tištěné i elektronické formě v řádném termínu.

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

Seznam doporučené literatury:

Zhao L. et al., 2020: Biochar as simultaneous shelter, adsorbent, pH buffer, and substrate of *Pseudomonas citronello-
lis* to promote biodegradation of high concentrations of phenol in wastewater. Water Research 172, 115494. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115494>

Mariscal A. et al., 2003: Influence of organic solvents on the sensitivity of a bioluminescence toxicity test with *Vibrio har-
veyi*. Chemosphere 50, 349–354. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00312-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00312-0)

Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science a ScienceDirect.

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

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

Příloha č. 2 – Prohlášení autorky BP

**PROHLÁŠENÍ AUTORKY
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zaměřila na ověření schopnosti kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL růst na fenolu při nízké teplotě 8 °C a současně vysoké koncentraci trichloroethenu (TCE), což má potenciál rozšířit využití této kultury pro bioremediaci podzemních vod znečištěných TCE. V průběhu práce bylo provedeno pět experimentů, které ukázaly, že různé poměry koncentrací fenolu a tryptonu, při zvyšování podílu tryptonu v živném médiu, pozitivně ovlivňují růst kultury při expozici TCE. Pozornost byla věnována i vlivu tenzidu Tween 80, který byl testován v jednom z pokusů a ukázal, že má ochranný a podpůrný účinek na buňky kultury při expozici TCE. Výsledky tak celkově ukázaly, že kultura *Acinetobacter* sp. 1AKL je schopná efektivně růst v médiích s nízkými i vyššími koncentracemi fenolu s přidávkou tryptonu, a dokonce může částečně využívat Tween 80 jako zdroj uhlíku pro růst. Tato zjištění přispívají k lepšímu pochopení možností biologického rozkladu TCE touto kulturou a otevírají cestu pro další výzkum v oblasti bioremediace kontaminovaných podzemních vod.

Klíčová slova: Bakterie, fenol, trichloroethen, růst

ABSTRACT

This bachelor's thesis focused on verifying the growth capability of strain *Acinetobacter* sp. 1AKL on phenol at a low temperature of 8 °C while also in the presence of a high concentration of trichloroethene (TCE), which has the potential to expand the use of this strain for the bioremediation of TCE-contaminated groundwater. Throughout the study, five experiments were conducted that showed that different ratios of phenol and tryptone concentrations in the nutrient medium positively influenced strain's growth under TCE exposure. Attention was also given to the effect of Tween 80, which was tested in one of the experiments and demonstrated to have a protective and supporting effect on the used cells under TCE exposure. The results showed that the *Acinetobacter* sp. 1AKL is capable of efficiently growing in media with both low and higher phenol concentrations with the addition of tryptone, and can partially utilize Tween 80 as a carbon source for growth. These findings contribute to a better understanding of the potential degradation of TCE by the used strain and pave the way for further research in the field of bioremediation of contaminated groundwater.

Keywords: Bacteria, growth, phenol, trichloroethene

Ráda bych vyjádřila velký dík svému vedoucímu práce doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho podporu a odborné vedení během zpracování této bakalářské práce. Jeho ochota pomáhat kdykoliv, cenné rady, podrobné informace a trpělivost byly zásadní pro její úspěšné dokončení a výrazně přesahovaly běžné rámce akademického vedení. Děkuji za všechnu podporu a věnovaný čas, který byl pro mne nesmírně cenný.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 FENOL	12
1.1 VLASTNOSTI.....	12
1.2 VÝROBA FENOLU.....	12
1.4.1 Akutní toxicita.....	14
1.4.2 Chronická toxicita	14
2 TRICHLOROETHEN	15
2.1 VLASTNOSTI.....	15
2.2 VÝROBA.....	15
2.3 POUŽITÍ	15
2.4 TOXICITA	16
2.4.1 Genotoxicita	16
2.4.2 Karcinogenita	17
3 ÚČINEK TĚCHTO LÁTEK VŮČI BAKTERIÍM.....	18
3.1 ÚČINEK TRICHLOROETHENU A TOLUENU VŮČI <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> F1	18
3.2 BAKTERIE TOLERANTNÍ K ORGANICKÝM ROZPOUŠTĚDLŮM.....	21
3.3 VLIV ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDEL NA CITLIVOST BIOLUMINISCENČNÍHO TESTU S <i>VIBRIO HARVEYI</i>	24
4 MOŽNOSTI POTLAČENÍ ÚČINKŮ PROTIBAKTERIÁLNÍCH LÁTEK.....	27
4.1 BIOUHEL JAKO MATERIÁL K PODPOŘE BIOLOGICKÉHO ROZKLADU VYSOKÝCH KONCENTRACÍ FENOLU V ODPADNÍ VODĚ	27
4.2 ZLEPŠENÍ BIODEGRADACE ZA PŮSOBENÍ TWEENU 80	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	32
5 MATERIÁL A METODIKA	33

5.1	OŽIVENÍ KULTURY.....	33
5.2	MATERIÁLY	33
5.2.1	Minerální médium (MM)	33
5.2.2	Roztok stopových prvků	33
5.2.3	Chemikálie	34
5.2.4	Živná média.....	34
5.2.5	Biologický materiál.....	36
5.3	PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY	37
5.3.1	Přístroje	37
5.3.2	Laboratorní pomůcky	37
5.3.3	Metody měření	38
5.4	PŘÍPRAVA POKUSŮ	38
5.4.1	Pokus 1: Ověření přídavku 5 mg/l tryptonu na růst kultury <i>Acinetobacter</i> sp. 1AKL, při 8 °C na 200 mg/l fenolu v přítomnosti 5– 6 mg/l trichloroethenu (TCE).....	38
5.4.2	Pokus 2: Ověření růstu kultury <i>Acinetobacter</i> sp. 1AKL při 8 °C na směsích fenolu s tryptonem, v přítomnosti 5–6 mg/l TCE	39
5.4.3	Pokus 3: Ověření růstu kultury <i>Acinetobacter</i> sp. 1AKL při 8 °C na 150 mg/l fenolu a 50 mg/l tryptonu v přítomnosti 5–6 mg/l trichloroethenu (TCE), s objemem inokula 1 %	40
5.4.4	Pokus 4: Ověření ochranného účinku Tweenu 80 na růst kultury <i>Acinetobacter</i> sp. 1AKL na 175 mg/l fenolu s 25 mg/l tryptonu při 8 °C, v přítomnosti 5–6 mg/l TCE, se standardním objemem inokula 1 %.....	40
5.4.5	Pokus 5: Ověření využívání Tweenu 80 kulturou <i>Acinetobacter</i> sp. 1AKL.....	41
6	VÝSLEDKY	42

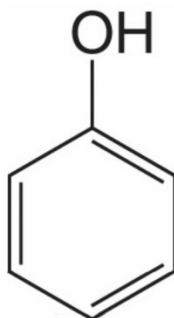
6.1	POKUS 1: OVĚŘENÍ PŘÍDAVKU 5 MG/L TRYPTONU NA RŮST KULTURY <i>ACINETOBACTER</i> SP. 1AKL, PŘI 8 °C NA 200 MG/L FENOLU V PŘÍTOMNOSTI 5–6 MG/L TRICHLOROETHENU (TCE)	42
6.2	POKUS 2: OVĚŘENÍ RŮSTU KULTURY <i>ACINETOBACTER</i> SP. 1AKL PŘI 8 °C NA SMĚSI FENOL + TRYPTON, V PŘÍTOMNOSTI 5–6 MG/L TRICHLOROETHENU (TCE), PŘI VYŠŠÍ KONCENTRACI TRYPTONU A SNÍŽENÉ KONCENTRACI FENOLU	43
6.3	POKUS 3: OVĚŘENÍ RŮSTU KULTURY <i>ACINETOBACTER</i> SP. 1AKL PŘI 8 °C NA 150 MG/L FENOLU A 50 MG/L TRYPTONU V PŘÍTOMNOSTI 5–6 MG/L TRICHLOROETHENU (TCE), S OBJEMEM INOKULA 1 %	45
6.4	POKUS 4: OVĚŘENÍ OCHRANNÉHO ÚČINKU TWEENU 80 NA RŮST KULTURY <i>ACINETOBACTER</i> SP. 1AKL NA 175 MG/L FENOLU S 25 MG/L TRYPTONU PŘI 8 °C, V PŘÍTOMNOSTI 5–6 MG/L TCE, SE STANDARDNÍM OBJEMEM INOKULA 1 %	47
6.5	POKUS 5: OVĚŘENÍ VYUŽÍVÁNÍ TWEENU 80 KULTUROU <i>ACINETOBACTER</i> SP. 1AKL.....	49
	ZÁVĚR	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	60
	SEZNAM TABULEK.....	61
	SEZNAM PŘÍLOH.....	62

ÚVOD

V dnešní době je lidská činnost neoddelitelně spojena s produkcí a vypouštěním různých chemických látek do životního prostředí, což vede k jeho znečištění. Tyto látky mohou mít škodlivý vliv nejen na lidské zdraví, ale mohou negativně ovlivňovat i celé ekosystémy. Existují ovšem mikroorganismy, které mají schopnost odstraňovat některé z těchto kontaminujících látek z prostředí, dokonce je mohou využívat jako zdroj uhlíku. Tato skutečnost je tedy účinný způsob bioremediace. Mezi kontaminanty, které mohou být mikrobiálně degradovány, patří například fenol a trichloroethen (TCE). Tyto látky jsou však v určitých koncentracích toxické pro mikroorganismy, což omezuje jejich schopnost efektivní bioremediace. Trichloroethen, který byl široce používán jako rozpouštědlo v průmyslu, je zvláště problematický kvůli své vysoké toxicitě. Motivací této práce bylo ověřit schopnost kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL, která byla dříve izolována a kultivována na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, růst na fenolu při nízké teplotě 8 °C v přítomnosti zvýšené koncentrace TCE. Cílem bylo najít postupy, které by umožnily eliminovat či výrazně snížit toxicitu TCE vůči této konkrétní kultuře a tím rozšířit možnosti jejího využití pro bioremediaci znečištěného prostředí. Tato práce tak přispívá k pochopení interakcí mezi mikroorganismy a specifickými kontaminanty a hledání nových metod pro efektivní biologickou sanaci životního prostředí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FENOL



Obrázek 1 Strukturální vzorec fenolu

1.1 Vlastnosti

Fenol je organická hydroxysloučenina patřící mezi aromatické látky. Je složený z benzenového jádra, na které je navázána hydroxylová funkční skupina. Čistý fenol je bezbarvá hyroskopická krystalická látka, na vzduchu mění barvu na růžovou až červenou (Břížďala, 2020). Komerčně se prodává jako kapalina. Fenol je látka se zřetelným sladkým dráždivým zápachem (NCBI, 2004). Často se považuje za nepřírodní látku, která se vyskytuje ve fosilních palivech, ale fenol se také vyskytuje v některých živých organismech, například v esenciálním oleji z tabákových listů nebo jehlic borovice lesní a v moči některých savců (Tyman, 1996).

1.2 Výroba fenolu

Fenol byl poprvé objeven roku 1834, kdy byl izolován z černouhelného dehtu. Získávání fenolu z černého uhlí není příliš vhodné, získaný fenol je velmi nečistý a vyžaduje pečlivou frakcionaci (Tyman, 1996). Dnes je produkce fenolu založená především na technologii výroby kumenového fenolu (Schmidt, 2005).

Kumen se vyrábí reakcí benzenu a propenu za použití kyselého katalyzátoru, obvykle zeolitu. Zeolit je vhodný z důvodu větší šetrnosti k životnímu prostředí než jiné kyselé katalyzátory. Poté se kumen oxiduje vzduchem na hydroperoxid. Posledním krokem je smíšení za určitých fyzikálních podmínek hydroperoxidu s kyselinou sírovou, kdy dochází ke vzniku fenolu a propanonu. Produkty se od sebe oddělují destilací (ECI, 2017).

1.3 Použití fenolu

Fenol se používá především jako prekurzor spousty materiálů jako jsou fenolové pryskyřice nebo plasty (Abdollahi et. al., 2014), ty se používají v překližkách, automobilovém průmyslu, stavebnictví a při výrobě spotřebičů. Fenol se dále používá v dezinfekčních prostředcích, lepidlech, impregnačních prostředcích, barvách, lacích, lepidlech, rozpouštědlech, v kosmetice, v lékařských prostředcích, jako jsou kapky do uší a nosu, pastilky na bolest v krku a jako konzervační látka pro injekce v humánní i veterinární medicíně (NCBI, 2004).

1.4 Toxicita fenolu

Expozice fenolu může narušit metabolický systém mikroorganismů, zvířat i člověka. Fenol má také schopnost akumulace v živých organismech. Ve velmi malém množství se fenol také vytváří během katabolismu bílkovin interakcí bakterií uvnitř střeva (Gami a kol., 2014).

Do živého organismu se může fenol dostat třemi cestami a to kožním kontaktem, požitím, a vdechnutím (Gami a kol., 2014).

Fenol i některé jeho deriváty mají schopnost narušit strukturu membrány buňky a její propustnost, a to kaskádovým efektem. Narušuje tak rovnováhu vnitrobuněčného prostředí buňky a její funkce, což může způsobit smrt buňky. Na mikroorganismech bylo zjištěno, že působením fenolu dochází ke změně nasycení u membránových fosfolipidů z cis-mastných kyselin na trans-mastné kyseliny a změně hydrofílních skupin fosfolipidů. Na chemické úrovni je toxicita fenolu dána změnami na aromatickém kruhu, kde samotný benzenový kruh může také podléhat několika chemickým reakcím, jako je polymerace, halogenace, alkylace a nitrifikace. Podle Boyda a kol. (2001) se toxicita zvyšuje např. s množstvím atomů chloru, pokud je fenol tímto prvkem substituován (Gami a kol., 2014).

Ukázalo se, že existují dva mechanismy vysvětlující toxicitu fenolu. Prvním mechanismem je nespecifická toxicita způsobená hydrofobicitou a druhým mechanismem je tvorba fenoxylových radikálů (Hansch a kol., 2000; Gami a kol., 2014).

K expozici fenolu může dojít při výkonu povolání, při kontaminaci vody a potravin, při používání výrobků obsahující fenol a podobně. Pokud dojde k široké distribuci fenolu v těle, může se dostat do mozku, mateřského mléka nebo projít placentou. Fenol se do těla

může dostat inhalací, přímým kožním kontaktem nebo požitím. Nepříznivé účinky po expozici fenolu jsou různé (EPA, 2000).

1.4.1 Akutní toxicita

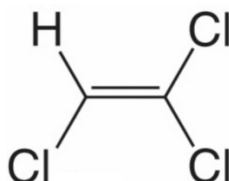
Fenol dráždí kůži a v důsledku jeho leptavých a dráždivých vlastností může způsobit popáleniny, dokonce i nekrózu, také poškozují ledviny, svaly, játra a oči (EPA, 2000; Gami a kol., 2014).

Tolerance k fenolu je velmi individuální, udává se, že smrt může způsobit už 1 g této látky, ale je zjištěno, že člověk může přežít i po podání 30 g fenolu. Projevy akutní otravy jsou suchost v ústech a hrdle, tmavě zbarvená moč, silné podráždění sliznic (Michałowicz a Duda, 2007).

1.4.2 Chronická toxicita

Mezi chronické účinky působení fenolu patří anorexie, postupný úbytek hmotnosti, průjem, slinění, závratě a tmavé zbarvení moči (EPA, 2000). Při chronickém účinku fenolu na kůži může dojít k ochrónóze, podráždění kůže a vyrážkám (Gami a kol., 2014; PHE, 2016). Studie u zvířat prokázala, že chronická inhalační expozice fenolu způsobuje poškození centrální nervové soustavy, ledvin a jater, respirační a kardiovaskulární účinky (EPA, 2000).

2 TRICHLOROETHEN



Obrázek 2 Strukturální vzorec trichloroethenu

2.1 Vlastnosti

Trichloroethen (TCE) patří do třídy chlorethenů. Je to ethen, který je substituovaný atomy chloru v pozicích 1, 1 a 2 (NCBI, 2023). Při pokojové teplotě to je bezbarvá nehořlavá kapalina s nasládlým zápachem podobným chloroformu a sladkou pálivou chutí (NCBI, 2023; ECHA, 2023). Má vyšší hustotu než voda a ve vodě je mírně rozpustný. Dále je rozpustný v acetonu, tetrachlormethanu, chloroformu a je mísitelný s ethanolem. Je možné s ním rozpouštět většinu pevných a těkavých olejů (NCBI, 2023).

Za standardních podmínek je teplota tání TCE $-84,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota varu $86,55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hustota při teplotě $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ je $1,465\text{ g/mol}$ (ECHA, 2023).

2.2 Výroba

Trichloroethen byl poprvé připraven Emilem Fischerem roku 1864. Komerčně se TCE začal vyrábět v Německu roku 1920 a v USA v roce 1925. Původně se TCE vyráběl z acetyleny, v současné době je vyráběn z ethylenu (IARC, 2014).

2.3 Použití

Trichloroethen se používal především jako rozpouštědlo na odmašťování kovů a jiných typů výrobků. Odmašťování je fyzikální metodou, která odstraňuje mastnotu, vosk a nečistoty z povrchu různých výrobků. TCE se dále používá k čištění plastů, jako je polymethylmetakrylát, polytetrafluorethylen, methakrylátbutadien a další (NCBI, 2023; Bakke a kol., 2007).

Menší část používaného TCE připadá na použití v různých průmyslových odvětvích. Kromě toho se používá jako složka do tiskařských barev a nátěrů, rozpouštědlo lepidel a laků nebo pro odstraňování skvrn v chemických čistírnách. TCE se používal i v průmyslu potravinářském k výrobě aromatických extraktů a k odstraňování kofeinu z kávy, dokonce

i v porodnictví a při drobných chirurgických zákrocích jako anestetikum a analgetikum (Bakke, 2007; NTP, 2023).

Ke snížení používání došlo v 70. letech 20. století (Bakke a kol., 2007). V posledních letech je jeho používání významně omezeno (Modrá zpráva 2011, 2012).

2.4 Toxicita

Trichloroethen se stal, stejně jako mnoho dalších chlorovaných uhlovodíků, významnou látkou znečišťující životní prostředí. Je kontaminantem půdy, ovzduší a vody (Tabrez a Ahmad, 2009).

Metabolismus TCE probíhá dvěma hlavními cestami. První cesta je oxidace závislá na cytochromu P450, druhá cesta je konjugace s glutathioninem. Hlavní metabolity odvozené od cytochromu P450 jsou spojeny především s játry a plícemi. Patří sem především chloralhydrát, trichloroacetát, a dichloroacetát. Naopak metabolity odvozené od konjugátu s glutathionem jsou spojeny s ledvinami jako cílovým orgánem (Tabrez a Ahmad, 2009).

Nefrotoxicita TCE byla zaznamenána u lidí, kteří požili 70 ml TCE. Při pokusech na potkanech, kteří byli ošetřeni trichloroethanolem, který je u nich hlavním metabolitem TCE, došlo k poškození ledvin, které se projevovalo zvýšenou aktivitou N-acetyl-beta-D-glukosaminidázy v moči, vylučováním bílkovin, zvýšenou bazofilií, akumulací bílkovin a tubulárním poškozením. Byla prokázána mírná toxicita v ledvinových buňkách samců potkanů, ale u samic potkanů prokázána nebyla (Tabrez a Ahmad, 2009).

2.4.1 Genotoxicita

Kvůli přítomnosti nečistot nebo mutagenních stabilizátorů ve zkušebním materiálu je genotoxický potenciál trichloroethenu velmi rozporuplný. Informace z prvních studií o tomto tématu nemusí být dostatečné pro zhodnocení (Tabrez a Ahmad, 2009).

Studie mutagenity trichloroethenu byly provedeny na několika živých systémech včetně bakterií, hub, kvasinek, a kultivovaných savčích buněk. V bakteriálním testu mutagenity s použitím *Salmonella typhimurium* nebyl TCE mutagenní, avšak chloralhydrát, předpokládaný produkt rozkladu epoxidu TCE, byl v bakteriálním testu mutagenity s použitím *Salmonella typhimurium* přímo mutagenní (Tabrez a Ahmad, 2009).

2.4.2 Karcinogenita

Trichloroethen se považuje za karcinogenní pro člověka. Podle epidemiologické studie byla prokázána souvislost mezi expozicí TCE a rizikem rakoviny ledvin, jater, lymfatického systému a v menší míře také rakoviny děložního čípku a prostaty. Některé přehledy ještě více podpořily souvislost expozice TCE s rakovinou ledvin, jater a nehodgkinským lymfomem. Taktéž byla zaznamenána možná souvislost mezi expozicí TCE s rakovinou prostaty, hrtanu a tlustého střeva (Tabrez a Ahmad, 2009).

Uvádí se, že údaje o TCE jsou klíčové pro dokázání shodnosti místa výskytu nádoru u pokusných zvířat a u lidí. U pokusných zvířat byly pozorovány vzácné druhy rakoviny při absenci obvyklých nádorů (IARC, 2014).

Je pravděpodobné, že TCE potřebuje metabolickou aktivaci, aby se projevil jeho karcinogenní účinek (Bakke a kol., 2007).

3 ÚČINEK TĚCHTO LÁTEK VŮČI BAKTERIÍM

Některé kapalně látky v nevodné fázi jsou z důvodu pomalého rozpouštění a dobré přilnavosti k půdním částicím dlouhodobými zdroji znečištění podzemních vod. Konvenční čištění je v odstraňování těchto látek neúčinné (Singh a Olson, 2010).

Různé mikroorganismy, které žijí v půdě, dokáží rozkládat mnoho perzistentních znečišťujících látek v podzemních vodách a využívat je pro svůj prospěch jako zdroj uhlíku a energie. Tato záležitost by mohla být vhodnou strategií pro sanaci zbytkové kontaminace podzemních vod. Při této bioremediaci in situ je ale potřeba optimalizovat mikrobiální metabolismus těchto substrátů a je nutné znát přesné prostorové a časové rozložení životaschopných mikroorganismů s ohledem na kontaminanty v podzemní vodě (Singh a Olson, 2010).

Bioremediace se ukázala jako slibná a ekologicky šetrná metoda úpravy organických kontaminantů v půdě a ve vodě. Aplikace bioremediace je ale do značné míry omezena tím, že mikroorganismy obvykle nevykazují uspokojivou schopnost přežití a aktivitu, jelikož čelí závažnému šoku ve velice heterogenním prostředí (Zhao a kol., 2020).

Mnoho kontaminantů podzemních vod, které mohou být degradovány půdními bakteriemi, jsou zároveň pro tyto bakterie při překročení určitých prahových koncentrací toxické. Dlouhodobé vystavení vyšším koncentracím těchto kontaminantů může způsobit bakteriální buňce značný stres, který může mít za následek dočasné poškození bakterií, trvalou ztrátu schopnosti rozkládat specifické kontaminanty nebo dokonce úplnou ztrátu životaschopnosti (Singh a Olson, 2010). Příkladem takových látek mohou být hydrofobní organická rozpouštědla jako je toluen. Pro živé organismy jsou toxické, protože se akumulují v buněčných membránách a narušují jejich funkce (Isken a Bont, 1998).

3.1 Účinek trichloroethenu a toluenu vůči *Pseudomonas putida* F1

Toxické účinky těžkých organických kontaminantů na bakterie se často hodnotí inhibicí růstu. Kim a kol. (2005) zaznamenali inhibici růstu u několika druhů rodu *Pseudomonas* při koncentracích benzenu nižších, než je jeho rozpustnost ve vodě. Wackett a Householder (1989) pozorovali toxicitu TCE pro *Pseudomonas putida* F1, když byly bakterie vystaveny působení par TCE (Singh a Olson, 2010).

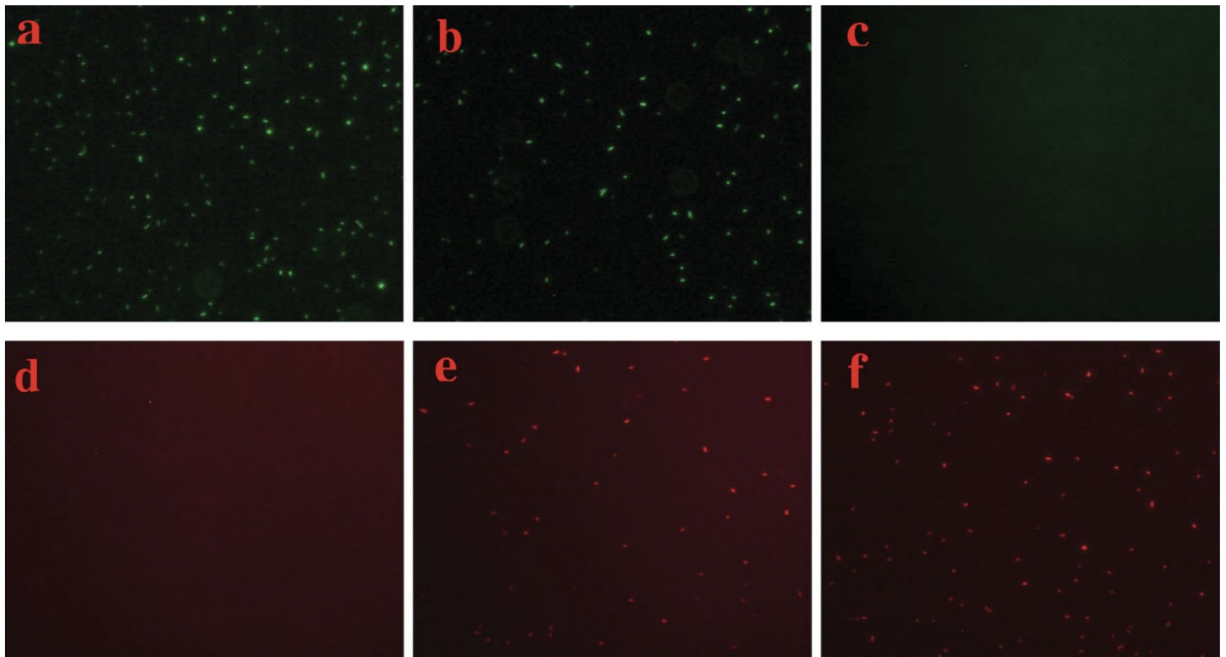
Kultura *Pseudomonas putida* F1 rozkládá toluen metabolicky a TCE kometabolicky. Buňky *Pseudomonas putida* F1 vykazovaly chemotaxi vůči toluenu i TCE. Jejich růst je možný na toluenu, ale není možný výhradně na TCE (Singh a Olson, 2010).

V tomto výzkumu bylo provedeno pět opakovaných testů toxicity jak pro TCE, tak i toluen. Dvě série vzorků bakteriální suspenze byly připraveny ve dvou sériích vialek o objemu 2 ml se zanedbatelným prostorem plynné fáze. Do jedné série bylo vpraveno 10 μ l TCE (0,5 % v/v), tyto vialky představovaly buňky v podmínkách zátěže TCE. Druhá série vialek sloužila jako slepý vzorek, nebyl tam tedy žádný TCE přidán. V intervalech 30 minut byl mikroskopicky vyhodnocen poměr mrtvých a živých buněk v obou sériích (Singh a Olson, 2010).

Aby bylo podpořeno pozorování vlivu toxicity TCE na fyziologický stav buněk *Pseudomonas putida* F1, byly dále provedeny testy schopnosti rozmnožování bakterií vystavených působení TCE po různou dobu (Singh a Olson, 2010).

Suspenze z vialek, které byly vystaveny působení TCE, byly po určitých časech expozice TCE naočkovány do tekutého živného média (Singh a Olson, 2010).

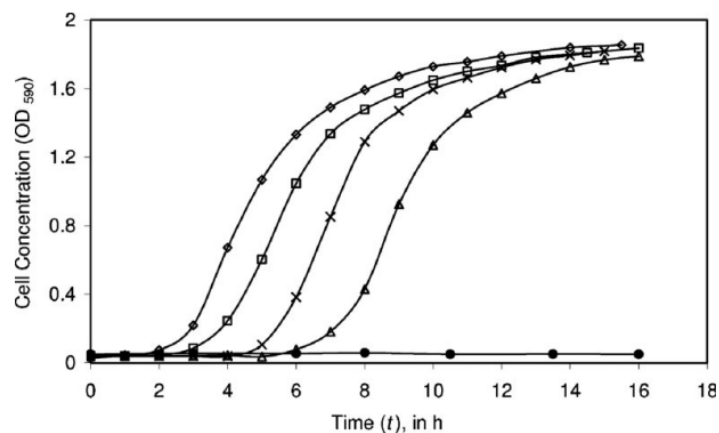
Na obrázku 3 lze vidět snímky obarvených buněk *Pseudomona putida* F1 v průběhu testu toxicity při různých časových intervalech. Po vnesení TCE do vzorku docházelo k postupnému snížení podílu živých buněk a k odpovídajícímu navýšení koncentrace buněk mrtvých nebo poškozených. Nejdříve ve vzorku nebyly pozorovány téměř žádné mrtvé buňky, ale po 2,5 hodinách už téměř žádné živé buňky vidět nebyly (Singh a Olson, 2010).



Obrázek 3 Zelené buňky (živé buňky) – a: čas 0 h, b: čas 1 h, c: čas 2,5 h a červené buňky (mrtvé buňky) – d: čas 0 h, e: čas 1 h, f: čas 2,5

(Singh a Olson, 2010)

Vliv expozice TCE na pozdější růst přeživších buněk *Pseudomonas putida* F1 za příznivých podmínek byl posouzen tak, že buňky vystavené působení TCE po dobu 1 hodiny a 2,5 hodiny vykazovaly zpoždění růstu v rozmezí od 2 do 4 hodin v porovnání s kontrolním vzorkem. Vliv rozdílné doby expozice TCE na růstové křivky *Pseudomonas putida* F1 je znázorněn níže na grafu, který ukazuje růst bakterií v čase po různé expozici TCE (Singh a Olson, 2010).



Obrázek 4 Růst kultury F1 po expozici TCE. Křížky: kultura vystavená TCE po dobu jedné hodiny; trojúhelníky: kultura vystavená TCE po dobu 2,5 hodiny

(Singh a Olson, 2010)

Zjištění ukazují, že expozice TCE způsobuje zpomalení růstu buněk *Pseudomonas putida* F1, přičemž delší doba expozice má výraznější dopad. Tento efekt lze vysvětlit několika faktory. Jedním z nich je, že vzorky vystavené působení TCE po delší dobu obsahovaly méně živých buněk, což vedlo k prodloužené době, než se kultury dostaly do exponenciální fáze růstu, tedy k delší lag fázi. Dále může být pozdržení růstu *Pseudomonas putida* F1 způsobeno dočasnými změnami ve fyziologii živých buněk, které jsou důsledkem toxicity TCE (Singh a Olson, 2010).

3.2 Bakterie tolerantní k organickým rozpouštědlům

Toxicita těchto látek je úzce spojena s logaritmem jejich rozdělovacího koeficientu mezi oktánem a vodou označovaným jako $\log K_{ow}$. Obecně platí, že látky s $\log K_{ow}$ hodnotou od 1 do 5 jsou toxické pro buňky (Isken a Bont, 1998).

Různé bakteriální kmeny, které se adaptovaly na život v prostředí s organickými rozpouštědly, dokonce i v podmínkách považovaných za smrtelné, byly úspěšně izolovány a popsány. Tyto kmeny si vyvinuly různé adaptační mechanismy, umožňující jim tolerovat přítomnost rozpouštědel. To zahrnuje adaptace ve složení cytoplazmatických a vnějších membrán, které chrání membrány před destabilizací rozpouštědly nebo omezují jejich pronikání do buněk. Byly také zaznamenány změny ve tvorbě fosfolipidů, což přispívá k rychlejší opravě poškození způsobeného rozpouštědly. K těmto adaptačním strategiím, které mírní toxické účinky rozpouštědel, patří i mechanismy, které aktivně snižují množství těchto látek uvnitř buňky, včetně specifických vylučovacích systémů. Rozpouštědla v přírodě se obvykle vyskytují v nízkých koncentracích (Isken a Bont, 1998).

Jedním z hlavních problémů, který nastává při využívání mikrobiálních mineralizačních procesů pro čištění odpadních vod, odpadních plynů nebo v procesech bioremediace, je nízká stabilita požadovaných aktivit. Tato nestabilita je výsledkem inaktivace mikrobiálních buněk kvůli toxickým efektům, které byly zaznamenány u mnoha polutantů. Tyto toxické vlivy pak způsobují pokles efektivity procesu mineralizace (Isken a Bont, 1998).

Mikroorganismy schopné adaptace a přežití v prostředí s přítomnými organickými rozpouštědly jsou velmi zajímavé. Isken a Bont (1998) se ve své rešerši soustředili na prozkoumání toxických vlivů organických rozpouštědel na specifické bakteriální kmeny, které jsou odolné vůči těmto rozpouštědlům (Isken a Bont, 1998).

Efekt organických rozpouštědel na mikroorganismy

Organická rozpouštědla jako alkoholy, aromatické sloučeniny nebo fenoly, jsou klasickými antimikrobiálními činidly. Antimikrobiální účinek rozpouštědla souvisí s hydrofobicitou látky vyjádřenou logaritmem rozdělovacího koeficientu sloučeniny ve směsi n-oktanolu a vody ($\log K_{ow}$). Organická rozpouštědla s hodnotami $\log K_{ow}$ mezi 1 a 5, jako je toluen, jsou vysoce toxická pro mikroorganismy. Tyto výsledky ukazují, že membrána, ve které se rozpouštědla hromadí, je hlavním cílem toxického účinku (Isken a Bont, 1998).

U rozpouštědla jako je toluen lze prokázat unikání makromolekul, včetně RNA, fosfolipidů a proteinů, z buňky. Tento jev (permeabilizace) je důsledkem značného poškození cytoplazmatické membrány, zatímco vnější membrána zůstává nedotčena. Druhý mechanismus, kterým organická rozpouštědla ovlivňují membránu, spočívá ve snížení energetického stavu buňky. Vzhledem ke snížení protonmotivní síly tak může dojít k poruchám v syntéze ATP (Woldringh, 1973; Isken a Bont, 1998).

Navzdory obecné toxicitě organických rozpouštědel existují mikrobiální kmeny, které jsou schopné tolerovat vysoké koncentrace látek, jako je toluen. Toto překvapivé pozorování, bylo poprvé učiněno Inouem a Horikoshi (1989) u kmenu *Pseudomonas putida* IH-2000, který roste v přítomnosti kapalně fáze toluenu, ovšem není ho schopný metabolizovat. Toto původní pozorování následně potvrdili i další vědci. Tyto kmeny byly izolovány také na xylenu a styrenu, ale benzen jako druhá fáze tolerován nebyl. Všechny tyto kmeny *Pseudomonas putida* byly izolovány z normálního půdního prostředí. Obdobně byly izolovány i další druhy, které jsou tolerantní k rozpouštědlům, včetně *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas mendoncina*. Bylo také zjištěno, že i bakterie rodu *Flavobacterium* roste v přítomnosti druhé fáze 5% benzenu. Kmen z rodu *Rhodococcus*, který je tolerantní k benzenu, byl izolován z kontaminovaného místa v Austrálii na benzenu jako růstovém substrátu (Isken a Bont, 1998).

Jiným způsobem, jak získat kmeny tolerantní k rozpouštědlům, je zvýšení odolnosti netolerantních kmenů mutacemi. Tímto způsobem byly získány mutantní kmeny s vyšší tolerancí k rozpouštědlům u *Pseudomonas putida* PpG1 a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1161. Přehled těchto odolných kmenů je uveden v tabulce (Isken a Bont, 1998).

Tabulka 1 Kmeny tolerantní k organickým rozpouštědlům (Isken a Bont, 1998).

Organism	Several solvents tolerated	Isolation source	Isolation solvent	Reference
<i>P. putida</i> IH-2000	Heptanol, toluene	Soil	Toluene	Inoue and Horikoshi 1989
<i>P. putida</i> Idaho	Dimethylphthalate Toluene		Xylene	Cruden et al. 1992
<i>P. aeruginosa</i> ST-001	Heptanol, toluene	Soil	Xylene	Aono et al. 1992
<i>P. putida</i> S12	Dimethylphthalate Toluene	Soil	Styrene	Weber et al. 1993
<i>Flavobacterium</i> DS-711	Benzene, toluene	Deep sea	Benzene	Moriya and Horikoshi 1993b
<i>Bacillus</i> DS-994	Benzene, toluene	Deep sea	Benzene	Moriya and Horikoshi 1993b
<i>P. aeruginosa</i> LST-03	Toluene	Soil	Cyclohexane	Ogino et al. 1994
<i>P. putida</i> DOT-T1	Toluene	Water	Toluene	Ramos et al. 1995
<i>Pseudomonas</i> LF-3	Toluene	Soil	Styrene	Yoshida et al. 1997
<i>P. mendocina</i> LF-1	Dimethylphthalate	Soil	Styrene	Ikura et al. 1997
<i>P. mendocina</i> K08-1	Toluene			
<i>Rhodococcus</i> strain 33	Benzene	Soil	Benzene	Paje et al. 1997

P., *Pseudomonas*.

Protože membrána je hlavním cílem toxického účinku působení rozpouštědel, předpokládá se, že změny ve složení membrány hrají klíčovou roli v mechanismech přispívajících k toleranci rozpouštědel. Bylo pozorováno několik adaptačních změn ve struktuře membrány jako reakce na akumulaci organických rozpouštědel v membránách mikroorganismů (Isken a Bont, 1998).

Adaptace na úrovni cytoplazmatické membrány

Existuje několik mechanismů, které se mohou lišit napříč různými kmeny bakterií. Tyto mechanismy zahrnují míru nasycení mastných kyselin, *cis/trans* izomerie nenasycených mastných kyselin a kompozice skupin vázaných na kyselinu fosfatidovou (Isken a Bont, 1998).

Adaptace na úrovni vnější membrány

Gram-negativní bakterie jsou odolnější vůči rozpouštědlům než bakterie gram-pozitivní díky přítomnosti vnější membrány, která není u gram-pozitivních bakterií. Tato dodatečná vnější membrána přispívá k vyšší toleranci k rozpouštědlům. Odolnost kmenů *Pseudomonas*, které tolerují toluen, je zvýšena díky iontům jako jsou Mg^{2+} nebo Ca^{2+} , které pomáhají stabilizovat strukturu vnější membrány. Bylo zjištěno, že snížená hydrofobicita buněčné stěny souvisí se změnami v obsahu lipopolysacharidů. U kmene *Pseudomonas putida* Idaho, který je odolný vůči rozpouštědlům, dochází ke změnám ve složení lipopolysacharidů po expozici rozpouštědla (Isken a de Bont, 1998).

Adaptace na úrovni buněčné stěny

Bakterie s hydrofobními buněčnými stěnami mají vyšší afinitu k hydrofobním látkám. Proto modifikace v těchto stěnách, které by snížily jejich hydrofobní charakter, by mohly zlepšit odolnost bakterií vůči rozpouštědlům. (Isken a Bont, 1998).

Adaptace způsobená transformací rozpouštědel

Vzhledem k tomu, že mnohá toxická rozpouštědla jsou mikroorganismy schopny rozložit, dosažení tolerance může být umožněno právě touto schopností degradace. To by mohlo nastávat u kmene rodu *Rhodococcus*, který je odolný proti benzenu a je znám jako efektivní degradátor benzenu. Tento proces však nemůže být hlavním mechanismem, který by umožnil toleranci širokého spektra rozpouštědel (Isken a Bont, 1998).

Zajímavým zjištěním je, že když se kmen *Pseudomonas putida* S12, známý svou odolností vůči rozpouštědlům, adaptuje na prostředí s toluenem, zvyšuje se jeho odolnost i proti různým antibiotikům, která nemají s toluenem chemickou či strukturní podobnost. Mezi tyto antibiotika se řadí například tetracyklin, chloramfenikol, pnigericin, polymyxin B a piperacilin. Existuje několik možných vysvětlení tohoto jevu. Jedním z nich je, že zvýšená odolnost k antibiotikům může pocházet z aktivního mechanismu, který tyto látky odstraňuje z buňky. Alternativní vysvětlení naznačuje, že adaptace na toluen mohla aktivovat další obranné strategie buňky (Isken a Bont, 1998).

I přes to, že kmen *Pseudomonas putida* S12 není schopen metabolizovat toluen, udržuje si nízké vnitřní koncentrace toluenu díky aktivnímu transportnímu systému, který z buňky odstraňuje toluen. Tento mechanismus aktivního transportu, přispívající k odolnosti vůči rozpouštědlům, byl pozorován i u dalšího kmene *Pseudomonas putida*, odolného proti rozpouštědlům (Isken a Bont, 1998).

Větší počet adaptačních mechanismů naznačuje, že tolerance vůči rozpouštědlům není zprostředkována pouze jedním mechanismem (Isken a Bont, 1998).

3.3 Vliv organických rozpouštědel na citlivost bioluminiscenčního testu s *Vibrio harveyi*

Expozice bioluminiscenčních bakterií toxickým látkám způsobuje snížení jejich světelné emise, což je v přímé korelaci s mírou toxicity zkoumané chemikálie. Existuje řada vysoce citlivých testů zjišťování toxicity, které využívají bioluminiscenční mikroorganismy včetně

druhů *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* nebo specificky selektovaných kmenů *Escherichia coli* (Mariscal a kol., 2003).

V určitých bioluminiscenčních testech bylo pozorováno, že přidání organických rozpouštědel může zlepšit rozpustnost různých chemikálií, což vedlo ke zvýšení nebo změně citlivosti bioluminiscenčních bakterií na některé toxické látky. Tímto způsobem se podařilo zvýšit citlivost těchto testů na určité toxikanty díky využití konkrétních organických rozpouštědel (Mariscal a kol., 2003).

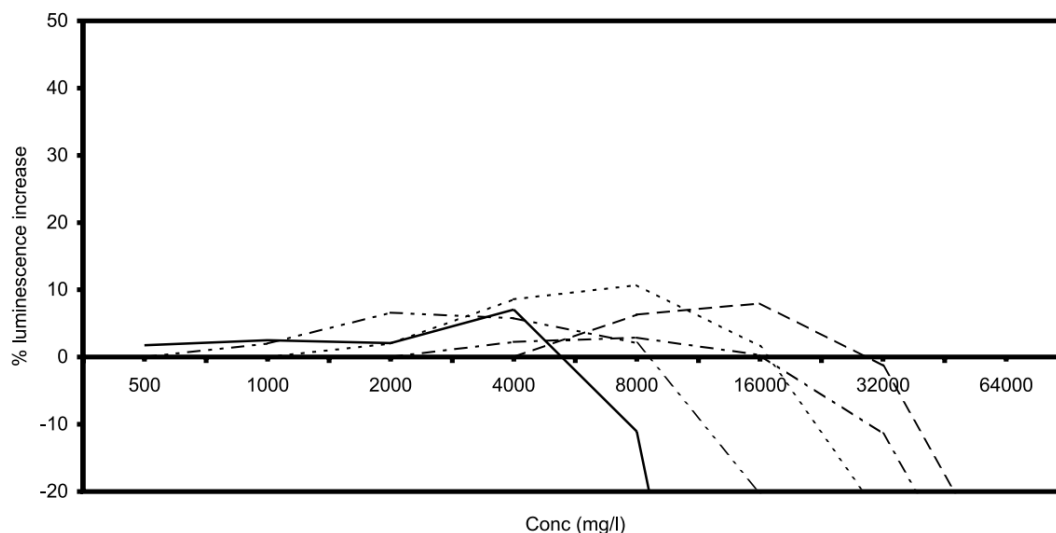
Studie Mariscal a kol. (2003) se zaměřovala na posouzení vlivu vybraných organických rozpouštědel s nízkou mírou toxicity, která jsou známa pro jejich schopnost permeabilizovat membrány, na intenzitu bioluminiscence v testech toxicity s využitím bakterie *V. harveyi*. Cílem bylo zjistit, zda použití těchto rozpouštědel může zvýšit citlivost bakterie na toxikanty bioluminiscenčními metodami, za účelem detekce (Mariscal a kol., 2003).

Bylo testováno pět organických rozpouštědel s nízkou mírou toxicity: acetonitril, dimethylsulfoxid (DMSO), ethanol, methanol a 2-propanol a také tři anorganické látky známé pro jejich toxicitu: chlorid kademnatý hemipentahydrát, chlorid rtuťnatý a chlorid zinečnatý (Mariscal a kol., 2003).

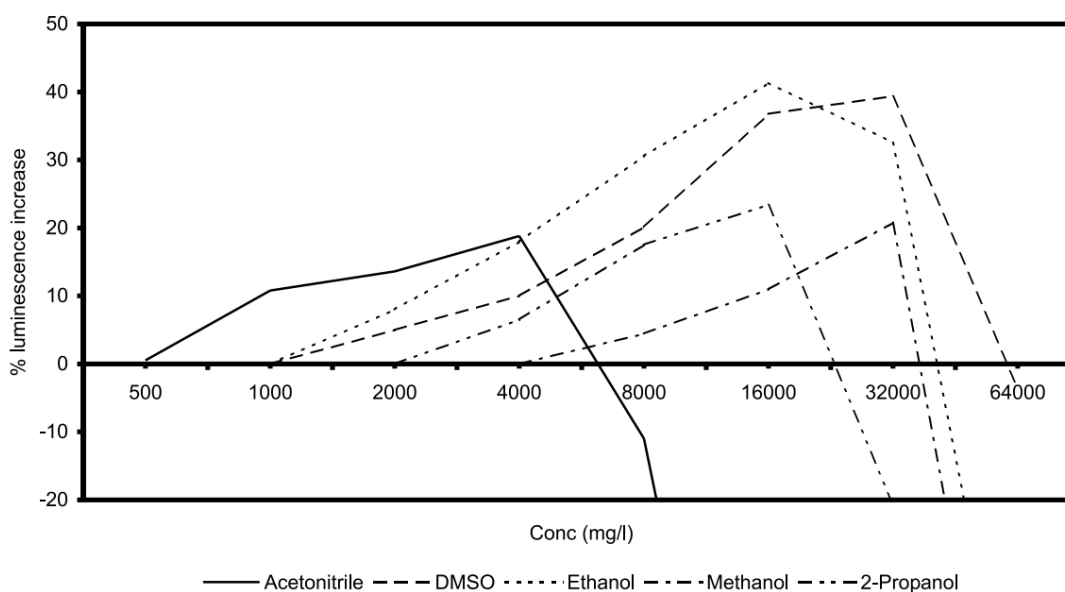
Vliv chemikálií na bioluminiscenci byl hodnocen regresní analýzou. Pro stanovení míry inhibice bioluminiscence byla využita metodika dle normy ISO 11384 pro akutní testy s bakterií *V. fischeri*, kde byla inhibice bioluminiscence porovnána s kontrolními vzorky a procento inhibice bylo spočítáno v závislosti na logaritmu koncentrace testované látky. Pro určení hodnot nejnižšího neúčinného ředění pro zkoumaná organická rozpouštědla a anorganické sloučeniny byla použita výše uvedená metodika. Koncentrace mikroorganismů byla na počátku a konci každého experimentu kvantifikována jako kolonie tvořící jednotky (CFU) pomocí standardního počítání kolonií na agarových plotnách s mořskou vodou (Mariscal a kol., 2003).

Všechna testovaná rozpouštědla měla vliv na zvýšení bioluminiscence s tím, že nejvíce výrazný nárůst o 40 % ve srovnání s kontrolními vzorky byl zaznamenán při použití ethanolu a DMSO při nejvyšším množství bakteriálního inokula. Při použití menšího množství bakterií byl vliv rozpouštědel na zvýšení bioluminiscence méně výrazný s výjimkou ethanolu, který zaznamenal mírný nárůst bioluminiscence přesahující 10 % (Mariscal a kol., 2003).

Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v počtu mikroorganismů (CFU/ml) mezi vzorky se zvýšenou bioluminiscencí a kontrolami. Testování také ukázalo, že při vyšších koncentracích rozpouštědel, při kterých došlo k inhibici bioluminiscence *V. harveyi*, došlo k poklesu počtu mikroorganismů ve srovnání s kontrolami (Mariscal a kol., 2003).



Obrázek 5 Vliv netoxických koncentrací organických rozpouštědel na bioluminiscenci *V. harveyi* při inokulu 10^4 CFU/ml (Mariscal a kol., 2003)



Obrázek 6 Vliv netoxických koncentrací organických rozpouštědel na bioluminiscenci *V. harveyi* při inokulu 10^8 CFU/ml (Mariscal a kol., 2003)

4 MOŽNOSTI POTLAČENÍ ÚČINKŮ PROTIBAKTERIÁLNÍCH LÁTEK

4.1 Biouhel jako materiál k podpoře biologického rozkladu vysokých koncentrací fenolu v odpadní vodě

Fenolové kontaminace v průmyslových odpadních vodách jsou závažným toxickým znečištěním, které může negativně ovlivňovat bakteriální populace, čímž komplikuje využití biologických metod pro jejich odstranění. Studie Shi a kol. (2019) ukázala, že po přidání biouhlu, získaného z rýžové slámy při pyrolýze 600 °C, došlo k nárůstu počtu bakterií rodů *Comamonas* a *Cupriavidus*, avšak vyšší dávky biouhlu měly inhibiční účinek na bakterie rodu *Thauera*. V další studii Massalha a kol. (2010) zkoumali biodegradaci fenolu v různých koncentracích mikroorganismy imobilizovanými na aktivním uhlí a jílu. Ačkoliv tyto materiály vykazaly podpurný účinek, biodegradční rychlost při vyšších koncentracích fenolu (>260 mg/l) byla nižší než u nižších koncentrací. Dále bylo zjištěno, že biouhel může zvýšit efektivitu odstraňování polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) bakteriemi *Pseudomonas putida* tím, že předkoncentruje PAU a zkracuje tak vzdálenost pro kontakt mezi znečištěním a degradujícími mikroorganismy. Při výzkumu degradace 4-monobromdifenyloxyethanu bakterií *Sphingomonas* sp. DZ3 bylo po přidavku biouhlu dosaženo účinnosti 93 %, zatímco kontrolní vzorky vykazaly účinnost pouze 10 %. Tato studie tedy naznačuje, že biouhel může zlepšit toleranci mikroorganismů k vysokým koncentracím 4-monobromdifenyloxyethanu. Studie rovněž naznačují, že biouhel může podporovat také redukci tetrabrombisfenolu A a usnadňovat výměnu živin mezi různými druhy ve smíšených kulturách, což naznačuje jeho potenciální využití v bioremediaci. Nicméně biouhel může mít i potenciálně negativní vlivy na odstraňování organických kontaminantů. Jeho vysoká afinita k těmto látkám může omezovat jejich biologickou dostupnost pro mikroorganismy (Zhao a kol., 2020).

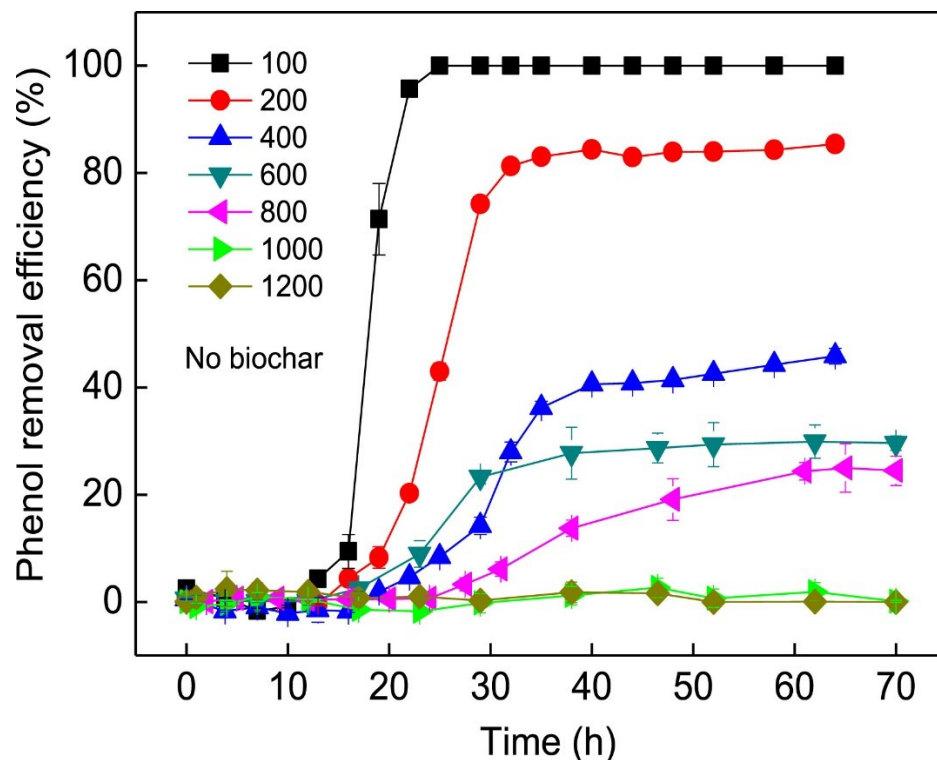
Výzkum Zhao a kol. (2020) se zaměřil na využití biouhlu z arašídových skořápek, který byl vyroben při různých teplotách, pro podporu biodegradace fenolu v odpadních vodách s využitím bakterie *Pseudomonas citronellolis*. Biouhel byl získán pyrolýzou odpadní biomasy za podmínek omezeného přístupu kyslíku, což mu dodává polykondenzovanou strukturu s různými kyslík obsahujícími funkčními skupinami, četné mikropóry a zásadité vlastnosti. Tento materiál prokázal efektivitu v odstraňování organických znečišťujících

látek díky kombinaci fyzikálních a mikrobiálních procesů, má schopnost sekvestrovat uhlík a přispívá k lepší úrodnosti půdy (Zhao a kol., 2020).

Materiál byl vybrán pro svojí strukturu zesíťovaných vláken a byl upravován při pyrolýzních teplotách 350 °C, 550 °C a 750 °C. Pro srovnání bylo použito aktivní uhlí v prášku s podobnou velikostí částic. Pro biodegradaci byla použita gramnegativní aerobní bakterie *Pseudomonas citronellolis*, která může využívat fenol jako jediný zdroj uhlíku a energie. Kmeny byly imobilizovány na částicích biouhlu za vzniku malých černých pelet a jejich schopnost degradovat fenol byla testována ve vodném roztoku s vysokými koncentracemi fenolu 600, 800, 1000 a 1200 mg/l. Biodegradace fenolu byla provedena 4% (w/v) inokulací *Pseudomonas citronellois*. Bylo zkoumáno, jak biouhel může ukládat a uvolňovat fenol, což ovlivňuje rovnováhu mezi toxicitou a biologickou dostupností fenolu pro bakterie. Pro odlišení adsorbovaného fenolu od degradovaného byl měřen zbytkový fenol ve vodné fázi a extrahovaný fenol z biouhlu. Jako extrakční činidlo byl zvolen systém acetonitril-voda. U aktivního uhlí byla pozorována více než 100% desorpce fenolu při nízkých koncentracích, což bylo způsobeno malým množstvím fenolu již přítomným v aktivním uhlí. Byl zjištěn lineární vztah mezi účinností regenerace a počáteční koncentrací fenolu (Zhao a kol., 2020).

Bylo zjištěno, že alkalita biouhlu může ovlivnit mikrobiální růst. Zároveň bylo porovnáváno působení demineralizovaného biouhlu a biouhlu získaného pyrolýzou při 550 °C, aby se zkoumal vliv minerálů v biouhlu na vyrovnávání pH a mikrobiální růst. Poté byla měřena koncentrace fenolu, pH a koncentrace Ca^{2+} a Mg^{2+} . Následně byly biouhly smíchány s anorganickým médiem a poté filtrovány a sterilizovány. Rozpustné organické látky extrahované z biouhlů byly použity pro kultivaci bakterií. Pro sledování degradačního procesu byly pravidelně odebírány vzorky pro měření koncentrace fenolu, pH a organických látek pomocí plynové chromatografie-hmotnostní spektrometrie. (Zhao a kol., 2020).

Uspokojivé odstraňování fenolu bez použití biouhlu se podařilo dosáhnout při nízkých koncentracích fenolu 100 a 200 mg/l, při kterých byla účinnost odstranění 100 % a 80 %. Ale u relativně vysokých koncentrací fenolu 400 a 800 mg/l byly hodnoty pouze 20-40 %. Vysoké koncentrace fenolu 1000 a 1200 mg/l dokonce bakterie nebyly schopné přežít. Zvyšující se koncentrace fenolu způsobovala zpoždění v počáteční fázi degradace. I když fenol může sloužit jako zdroj uhlíku pro mikroorganismy, vysoké koncentrace mají toxický účinek a inhibují jejich metabolickou aktivitu. (Zhao a kol., 2020).



Obrázek 7 Účinnost odstraňování fenolu při různých počátečních koncentracích od 100 mg/l do 1200 mg/l se 4% inkulací *Pseudomonas citronellolis* bez biouhlu

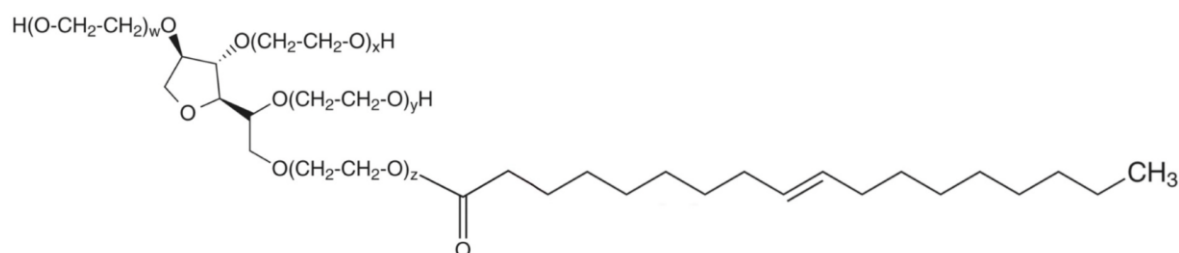
(Zhao a kol., 2020)

Použití biouhlu v experimentech vedlo k výraznému zvýšení účinnosti odstranění fenolu za všech testovaných podmínek. Zpočátku byly porovnávány účinky biouhlů připravených při různých teplotách. První série experimentů s biouhlem ukázala rychlé snížení koncentrace fenolu, což bylo důsledkem jeho adsorpce na biouhel. Nejúčinnější byl biouhel vzniklý pyrolýzou při 550 °C, který během 20 hodin výrazně snížil koncentraci fenolu ve srovnání s kontrolními vzorky. Biouhel pyrolyzovaný při 350 °C také dosáhl dobrých výsledků, avšak s deseti hodinovým zpožděním ve srovnání s biouhlem vzniklým pyrolýzou při 550 °C. Naproti tomu biouhel pyrolyzovaný při 750 °C měl omezený účinek, jelikož bylo adsorbováno pouze 25 % fenolu a bakterie nebyly schopné úspěšně se adaptovat, pravděpodobně kvůli vysoké alkalitě materiálu, která ovlivnila toleranci kmenů na vysoké koncentrace fenolu. Mezi specifickým povrchem biouhlu a množstvím adsorbovaného fenolu nebyla zjištěna jednoznačná korelace (Zhao a kol., 2020).

Studie také hodnotila vliv různých dávek biouhlu a teplot pyrolýzy na degradaci fenolu, přičemž byly použity již adaptované kmeny z předchozích experimentů. Výsledky ukázaly, že vyšší množství biouhlu zvětšuje počáteční snížení koncentrace fenolu díky adsorpci, zatímco konečná efektivita degradace závisí na přežití mikroorganismů. V situacích

s fenolovými koncentracemi 600, 800 a 1200 mg/l bylo pozorováno výrazné zlepšení odstranění fenolu díky přidanému biouhlu. Pro zvýšení účinnosti odstranění fenolu při vyšších koncentracích byly mikrobiální kmeny imobilizovány na biouhlu pomocí alginátu vápenatého, což vedlo k výraznému zlepšení účinnosti degradace fenolu (Zhao a kol., 2020).

4.2 Zlepšení biodegradace za působení Tweenu 80



Obrázek 8 Strukturální vzorec Tweenu 80

(P-LAB a.s., 2024)

Při experimentech s bioremediací půdy intenzifikované přidávkem povrchově aktivní látky Tween 80 došlo ke změnám vlastností povrchu bakteriálních buněk. Bylo prokázáno, že účinek Tweenu 80 na biodegradaci bakteriemi je spojen s hydrofobicitou povrchu buněk. Pro biodegradaci je velmi důležitý kontakt buněk s molekulami hydrofobních organických sloučenin. Povrch bakteriálních buněk je ale také kritickým faktorem, ovlivňujícím vychytávání hydrofobních organických sloučenin s následným transmembránovým transportem, což je zásadní krok pro biodegradaci probíhající uvnitř bakteriálních buněk. Vyšší koncentrace Tweenu 80 ovšem vždy neodpovídala vyšší hydrofobicitě povrchu buněk. Jedno z možných vysvětlení tohoto jevu je, že adsorpce molekul povrchově aktivní látky nebo micel na buněčný povrch tuto hydrofobicitu povrchu buněk snižují (Cheng a kol., 2017).

Při studiu dvou neiontových povrchově aktivních látek (Brij-35 a Tween 80) a beta-cyklodextrinu (β -CD) na hydrofobicitu povrchu buněk *Bacillus licheniformis* B1 a degradaci beta-cypermethrinu (β -CY) bylo zjištěno, že nejúčinnější činidlo pro podporu biodegradace β -CY byl Brij-35 i přes to, že Tween 80 měl vyšší vliv na změnu hydrofobicity buněčného povrchu a rozpustnosti β -CY (Zhao a kol., 2015; Cheng a kol., 2017). Tento jev byl podle Cheng a kol. (2017) způsobem dvěma mechanismy a to tím, že Tween 80 je bakterií *Bacillus licheniformis* využíván přednostně jako substrát a tím se snižuje využití β -CY.

Druhým mechanismem je snižování kontaktu mezi buňkami a β -CY, když koncentrace Tweenu 80 v systému klesala (Cheng a kol., 2017).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL A METODIKA

Pro praktickou část bakalářské práce bylo použito minerální médium, zásobní roztok fenolu, zásobní roztok TCE, trypton a kultura 1 AKL.

5.1 Oživení kultury

Kultura byla uchovávána při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a oživena byla vyočkováním na agarové médium R2A (HIMEDIA) a následně inkubována při teplotě $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Příprava kultury pro experimentální účely vždy zahrnovala její předkultivaci v minerálním médiu s fenolem 200 mg/l .

5.2 Materiály

5.2.1 Minerální médium (MM)

Voda destilovaná	510 ml
Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (23,9 g/l)	48 ml
Roztok KH_2PO_4 (9,078 g/l)	12 ml
Roztok NH_4Cl (30 g/l)	6 ml
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l)	6 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l)	6 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l)	6 ml
Roztok NaCl (10 g/l)	6 ml
Roztok stopových prvků	1 ml

5.2.2 Roztok stopových prvků

Voda destilovaná	1000 ml
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	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

CuSO₄·5H₂O.....0,040 g

5.2.3 Chemikálie

Roztok fenolu 50 g/l (Sigma-Aldrich), sterilizovaný filtrací přes sterilní membránový filtr Ahlstrom Relia Prep s velikostí pórů 0,2 μm do sterilní zkumavky.

Trichloroethen (Sigma-Aldrich)

Trypton (Himedia)

Tween 80 (Fluka)

5.2.4 Živná média

Pokus 1

Živné médium A

MM

Fenol..... 200 mg/l

Trypton5 mg/l

Trichloroethen 5–6 mg/l

Živné médium B

MM

Trypton 5 mg/l

Trichloroethen 5–6 mg/l

Živné médium C

MM

Fenol 200 mg/l

Trichloroethen 5–6 mg/l

Živné médium P (porovnávací, bez TCE)

MM

Fenol 200 mg/l

Pokus 2**Živné médium A**

MM

Fenol..... 175 mg/l

Trypton 25 mg/l

Trichloroethen 5–6 mg/l

Živné médium B

MM

Fenol 150 mg/l

Trypton 50 mg/l

Trichloroethen 5–6 mg/l

Živné médium P (porovnávací, bez TCE)

Stejné médium jako v pokusu 1

Pokus 3 (pokus s inokulem 1%)**Živné médium A**

MM

Fenol 150 mg/l

Trypton 50 mg/l

Trichloroethen 5–6 mg/l

Živné médium P (porovnávací, bez TCE)

Stejné médium jako v pokusu 1

Pokus 4**Živné médium A**

MM

Fenol 175 mg/l

Trypton 25 mg/l

Trichloroethen 5–6 mg/l

Tween 80 200 mg/l

Živné médium P (porovnávací, bez TCE)

Stejné médium jako v pokusu 1

Pokus 5**Živné médium A**

MM

Trypton 25 mg/l

Tween 80 200 mg/l

Živné médium B

MM

Trypton 25 mg/l

Živné médium P2 (porovnávací, bez TCE)

MM

Trypton 25 mg/l

Fenol 175 mg/l

5.2.5 Biologický materiál

Kultura 1AKL

Pro upřesnění identity byla využita molekulárně biologická metoda zahrnující izolaci DNA kultury, amplifikaci klíčové části genu pro 16S rRNA, sekvenaci získaného fragmentu

a následné porovnání jeho sekvence s daty v databázi GenBank. Shoda s daty v databázi GenBank byla zjištěna pomocí programu BLAST (Růžička J., 2023).

Výsledkem bylo, že v rámci standardních databází byly nejbližší příbuzné *Acinetobacter* sp. A12 (z roku 2011) z Baltského moře s 99,32% shodou a *Acinetobacter* sp. A22 z roku 2011 rovněž z Baltského moře se shodou 99,39 %. Co se týče specifických druhů, shoda s *Acinetobacter haemolyticus* (z roku 2001) dosáhla 99,39 % a 99,16 % s čínským *Acinetobacter johnsonii* (z roku 2021) (Růžička J., 2023).

Při hledání v databázích rRNA/ITS byl nejbližším zástupcem *Acinetobacter bouvetii* s 98,63% shodou, poté *Acinetobacter johnsonii* se shodou 98,3 až 98,4 %. Shoda s *Acinetobacter lwoffii* byla pouze 96,66 %, je tedy nepravděpodobné, že by šlo o tento druh (Růžička J., 2023).

Tyto práce byly provedeny pracovníky ÚIOŽP.

5.3 Přístroje a laboratorní pomůcky

5.3.1 Přístroje

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

Chladnička s mrazákem (Ardo, ČR)

Lednička GZ 48 (GUZZANTI, Itálie)

Laboratorní velkokapacitní třepačka VWR

Sterilizátory

Hlubokomrazicí box –80 °C

5.3.2 Laboratorní pomůcky

Mikrodávkovače - různé velikosti

Plynotěsný dávkovač Hamilton 100 µl

Vzorkovnice Sample Vials 40 ml (EPA vial, sterilizace v horkovzdušné sušárně při 180°C, 4 hodiny)

Uzávěry k EPA vialkám s teflonovým potahem (sterilizace UV zářením 2 hodiny)

Běžné laboratorní vybavení

5.3.3 Metody měření

Měření optické density

Měření optické density (OD) pomocí Densi-la-metru II umožňuje rychle zjistit hustotu mikrobiální suspenze. Přístroj pracuje na principu měření optické absorbance a hodnoty jsou zobrazovány přímo v jednotkách McFarlanda (Erba Lachema s.r.o., 2024). McFarlandova stupnice je řada standardizovaných suspenzí síranu barnatého, které se připravují smícháním specifických objemů 1% roztoku chloridu barnatého a 1% roztoku kyseliny sírové. Například první stupeň McFarlandovy stupnice se vytvoří smícháním 0,1 ml chloridu barnatého s 9,9 ml kyseliny sírové. Druhý stupeň se připraví smícháním 0,2 ml chloridu barnatého s 9,8 ml kyseliny sírové, a tak dále. Tyto stupně odpovídají přibližným počtům buněk v suspenzi podle specifikovaných podmínek (P-LAB a.s., 2024).

Tabulka 2 Stupně McFarlanda odpovídající přibližným počtům bakteriálních buněk v suspenzi:

Stupeň McF	0,5	1	2	3	4	5	6	8	10
Stupeň McF	$1,5 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^9$

Před samotným měřením je nutné vzorek pečlivě promíchat a převést do měřicí zkumavky, přičemž je nutné zkontrolovat, že vzorek neobsahuje bublinky, pěnu, sediment nebo vločky a zkumavka není orosená. Dále je třeba, aby byl přístroj správně kalibrován. Následně se měřicí zkumavka se vzorkem umístí do přístroje Densi-La-Meter II, který zobrazí OD vzorku (Erba Lachema s.r.o., 2024).

5.4 Příprava pokusů

5.4.1 Pokus 1: Ověření přídavku 5 mg/l tryptonu na růst kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL, při 8 °C na 200 mg/l fenolu v přítomnosti 5–6 mg/l trichloroethenu (TCE)

Nejprve byla předkultivována kultura 1AKL. Bylo připraveno 600 ml MM, které bylo následně rozděleno do jedné láhve se 100 ml a tří lahví po 160 ml, které byly označeny A, B, C. Do lahví A a B byl přidán trypton (výsledná koncentrace 5 mg/l) a následně byly všechny láhve sterilizovány. Po sterilizaci byl do lahví A a C přidán zásobní roztok fenolu

do koncentrace 200 mg/l. Z láhve se 100 ml byly připraveny dvě zkumavky, každá s objemem 3,5 ml a tyto zkumavky byly doplněny fenolem do koncentrace 200 mg/l a zaočkovány 10 μ l inokula kultury 1AKL z R2A agaru. Zkumavky byly inkubovány 1 týden při 8°C a po vyrostení byla pak kultura, pomnožená na fenolu, použita pro zaočkování testu.

Láhve A, B a C byly zaočkovány vyrostlou kulturou 1AKL (inokulem 1 μ l/ml, tj. 1 ‰), předkultivovanou 1 týden v MM s fenolem při 8 °C.

Přehled dávkování: do láhve A a B bylo přidáno před sterilizací 0,8 mg tryptonu (5 mg/l). Po sterilizaci bylo do lahví A a C přidáno 0,64 ml zásobního roztoku fenolu (200 mg/l).

Z každé z lahví A, B, C bylo připraveno 13 vialek s 10 ml suspenze a následně byl pomocí plynotěsného dávkovače přidán zásobní roztok TCE (1 g/l) v objemu 100 μ l. Další 2 vialky byly připraveny s 10 ml nepoužitého MM jako vizuální blanky pro srovnání zákalu.

Suspenze zbývající v lahvi C byla označena jako porovnávací (P) a byla bez přídavku TCE inkubována jako kontrola růstu kultury bez přítomnosti TCE.

Všechny vialky i porovnávací láhev P byly inkubovány aerobně při 8 °C na třepače 25 dní a byly proměřovány na hustotu buněk pomocí měření OD, po promíchání a převedení objemu do měřicí zkumavky. Každá vialka byla použita jen jednou.

5.4.2 Pokus 2: Ověření růstu kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL při 8 °C na směsích fenolu s tryptonem, v přítomnosti 5–6 mg/l TCE

Nejdříve byla 1 týden předkultivována kultura 1AKL v MM s fenolem (200 mg/l) při 8°C, stejně jako v prvním pokusu.

Bylo připraveno 600 ml MM a rozděleno do tří lahví po 200 ml, které byly označeny A, B, P. Do lahví A a B byly přidány různé hmotnosti tryptonu a následně byly sterilizovány. Poté byly všechny tři láhve obohaceny fenolem a zaočkovány suspenzí předkultivované kultury 1AKL (po 200 μ l).

Přehled dávkování: do láhve A bylo nadávkováno 5 mg tryptonu (25 mg/l) a 0,7 ml roztoku fenolu (175 mg/l), do láhve B 10 mg tryptonu (50 mg/l) a 0,6 ml roztoku fenolu (150 mg/l) a do láhve P 0,8 ml roztoku fenolu (200 mg/l).

Z lahví A a B byly připraveny vialky, do kterých byl následně pomocí plynotěsného dávkovače přidán zásobní roztok TCE (1 g/l) v objemu 100 μ l. Láhev P zůstala pouze

s fenolem a byla inkubována společně s vialkami jako kontrola růstu kultury. Hodnocení růstu bylo provedeno stejně jako v pokusu 1.

Všechny vialky i láhev P byly inkubovány aerobně při 8 °C na třepačce 12 dní.

5.4.3 Pokus 3: Ověření růstu kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL při 8 °C na 150 mg/l fenolu a 50 mg/l tryptonu v přítomnosti 5–6 mg/l trichloroethenu (TCE), s objemem inokula 1 %

K pokusu byla využita opětovně předkultivovaná kultura 1AKL na fenolu za stejných podmínek jako v předchozích experimentech.

Bylo připraveno 250 ml MM, které bylo promícháno a rozděleno do dvou lahví v objemech 200 ml (láhev A) a 50 ml (láhev P). Do láhve A byl přidán trypton. Obě láhve byly následně sterilizovány a poté zaočkovány předkultivovanou suspenzí 1 AKL.

Přehled dávkování: do láhve A bylo nadávkováno 10 mg tryptonu (konečná koncentrace 50 mg/l), po sterilizaci 0,6 ml zásobního roztoku fenolu (konečná koncentrace 150 mg/l) a 2 ml suspenze kultury 1AKL - objem inokula tak byl 1 %. Do láhve P s 50 ml MM bylo přidáno 0,2 ml zásobního roztoku fenolu (konečná koncentrace 200 mg/l jako v pokusech 1 a 2) a 50 µl suspenze kultury 1AKL (standardní inokulum 1 ‰).

Z láhve A bylo připraveno 18 vialek s 10 ml suspenze, do kterých byl pomocí plynotěsného dávkovače nadávkován zásobní roztok TCE v objemu 100 µl. 2 vialky byly připraveny s 10 ml nepoužitého MM jako vizuální blanky pro srovnání zákalu. Hodnocení růstu bylo provedeno stejně jako v předchozích pokusech.

Všechny vialky i láhev P byly inkubovány aerobně při 8 °C na třepačce 10 dní.

5.4.4 Pokus 4: Ověření ochranného účinku Tweenu 80 na růst kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL na 175 mg/l fenolu s 25 mg/l tryptonu při 8 °C, v přítomnosti 5–6 mg/l TCE, se standardním objemem inokula 1 ‰

K pokusu byla využita opětovně předkultivovaná kultura 1AKL na fenolu za stejných podmínek jako v předchozích experimentech.

Nejprve bylo připraveno 300 ml MM, které bylo rozděleno do lahví v objemech 250 a 50 ml. Do dávky 250 ml (A) byl přidán trypton a Tween 80. Obě láhve byly následně sterilizovány. Po sterilizaci byly po obohacení fenolem obě láhve zaočkovány

předkultivovanou suspenzí kultury 1AKL v objemu 1 ‰. Z láhve A s 250 ml MM byly připraveny vialky, do kterých byl přidán TCE.

Přehled dávkování: do láhve A bylo přidáno 6,25 mg tryptonu a 50 mg Tweenu 80. Po sterilizaci bylo do láhve A přidáno 0,88 ml zásobního roztoku fenolu a 250 µl suspenze kultury 1AKL. Do láhve s 50 ml (P) bylo přidáno 0,2 ml zásobního roztoku fenolu a 50 µl suspenze kultury 1AKL.

Z láhve A bylo připraveno 24 vialek, do kterých byl pomocí plynotěsného dávkovače nadávkován zásobní roztok TCE v objemu 100 µl. Všechny vialky a láhev P byly inkubovány aerobně při 8 °C na třepače 11 dní.

5.4.5 Pokus 5: Ověření využívání Tweenu 80 kulturou *Acinetobacter* sp. 1AKL

Předinkubace kultury 1AKL byla provedena obdobným způsobem jako v předchozích pokusech, trvala však z časových důvodů jen tři dny.

Nejprve bylo připraveno 300 ml MM, které bylo po sterilizaci rozděleno do tří lahví v objemech 100 ml – A, B a P2. Do všech lahví byl přidán trypton a do láhve A ještě Tween 80. Všechny láhve byly následně sterilizovány. Po sterilizaci byl do láhve C přidán zásobní roztok fenolu. Všechny láhve byly po zaočkování inokulem o objemu 1 ‰ inkubovány aerobně při 8 °C za stálého třepání.

Přehled dávkování: do všech lahví bylo nadávkováno 2,5 mg tryptonu. Poté bylo do láhve A přidáno 20 mg Tweenu 80. Po sterilizaci bylo do láhve P2 přidáno 0,351 ml zásobního roztoku fenolu a všechny láhve byly zaočkovány 100 µl suspenze. Během inkubace při 8 °C na třepače za aerobních podmínek byl růst kultury sledován obvyklým způsobem pomocí densilometru, po promíchání obsahu jednotlivých lahví a převedení do měřicí zkumavky. Inkubace trvala 15 dní.

6 VÝSLEDKY

6.1 Pokus 1: Ověření přídavku 5 mg/l tryptonu na růst kultury

Acinetobacter sp. 1AKL, při 8 °C na 200 mg/l fenolu v přítomnosti 5–6 mg/l trichloroethenu (TCE)

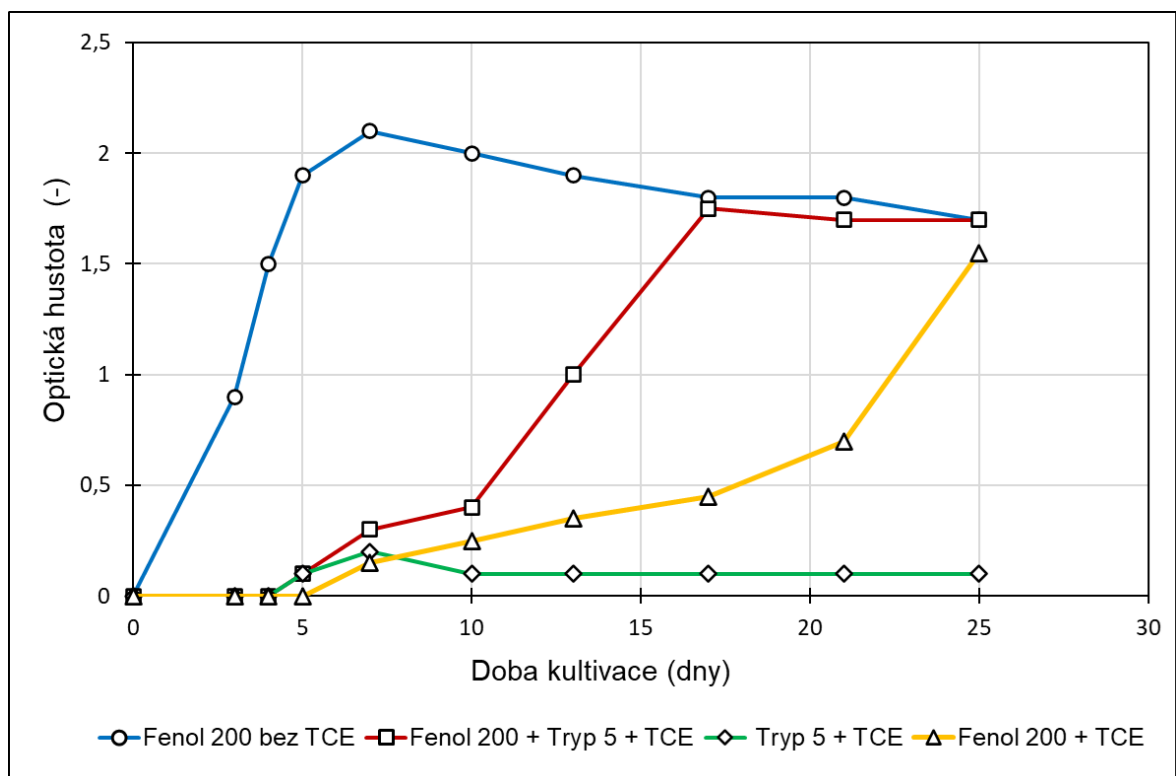
Cílem tohoto pokusu bylo sledování růstu kultury v přítomnosti 5–6 mg/l TCE a zhodnocení vlivu přídavku 5 mg tryptonu / l. Růst bakterií byl monitorován měřením densilametrem. Před každým měřením byla vialka opatrně protřepána. Pokus byl prováděn 25 dní. Výsledky experimentu jsou prezentovány v tabulce 3 a na obrázku 9.

Tabulka 3 Průměry optické density suspenzí ve vialkách s TCE i bez TCE:

Doba kultivace (dny)	Fenol 200 bez TCE	Fenol 200 + Tryp 5 + TCE		Tryp 5 + TCE		Fenol 200 + TCE	
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	1,9	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0
7	2,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1
10	2	0,4	0,4	0,1	0,1	0,2	0,3
13	1,9	0,9	1,1	0,1	0,1	0,3	0,4
17	1,8	1,7	1,8	0,1	0,1	0,4	0,5
21	1,8	1,7		0,1	0,1	0,7	
25	1,7	1,7	1,7	0,1	0,1	1,5	1,6

V porovnávacím médiu bez TCE byl růst kultury na fenolu zaznamenán již 3. den kultivace a maxima dosáhla kultura 7. den.

V médiu s fenolem (200 mg/l) a tryptonem (5 mg/l) bylo za přítomnosti TCE největšího růstu dosaženo 17. den, zatímco v médiu pouze s fenolem a TCE došlo k nejvyššímu nárůstu optické density až 25. den po zahájení kultivace. Toto zpoždění lze přičíst toxickým účinkům TCE. Naproti tomu médium se samotným tryptonem a TCE, které neobsahovalo fenol jako zdroj uhlíku pro kulturu, projevilo pouze mírný nárůst optické density bez následného trvalého růstu, což naznačuje omezenou schopnost kultury adaptovat se a růst v prostředí s přítomností pouze TCE bez nutriční podpory fenolu.



Obrázek 9 Růst kultury v médiu s fenolem, tryptonem v různých koncentracích (mg/l) v přítomnosti TCE (5–6 mg/l) ve srovnání s kontrolou

Z grafu lze vyvodit, že v médiích obsahujících TCE bylo zaznamenáno výrazně pozdější nastartování růstu kultury v porovnání s kontrolním médiem bez TCE (modrá křivka). Přítomnost tryptonu však způsobila, že kultura v médiu s fenolem, tryptonem a TCE (červená křivka) rostla rychleji ve srovnání s kulturou v médiu bez něj (žlutá křivka). Kultura, která rostla v médiu (zelená křivka), které obsahovalo pouze trypton a TCE a neobsahovalo fenol jako zdroj uhlíku pro kulturu, projevila pouze krátkodobý nepatrný růst, odpovídající velmi malému zastoupení živin, a následně se její optická hustota snížila. Výsledky tedy ukazují na rychlejší růst na fenolu v přítomnosti TCE při přidavku tryptonu 5 mg/l.

6.2 Pokus 2: Ověření růstu kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL při 8 °C na směsi fenol + trypton, v přítomnosti 5–6 mg/l trichloroethenu (TCE), při vyšší koncentraci tryptonu a snížené koncentraci fenolu

Z předchozího experimentu vyplynulo, že přidavek 5 mg/l tryptonu pozitivně ovlivňuje růst kultury na fenolu v přítomnosti TCE. Na základě tohoto zjištění byl realizován další pokus,

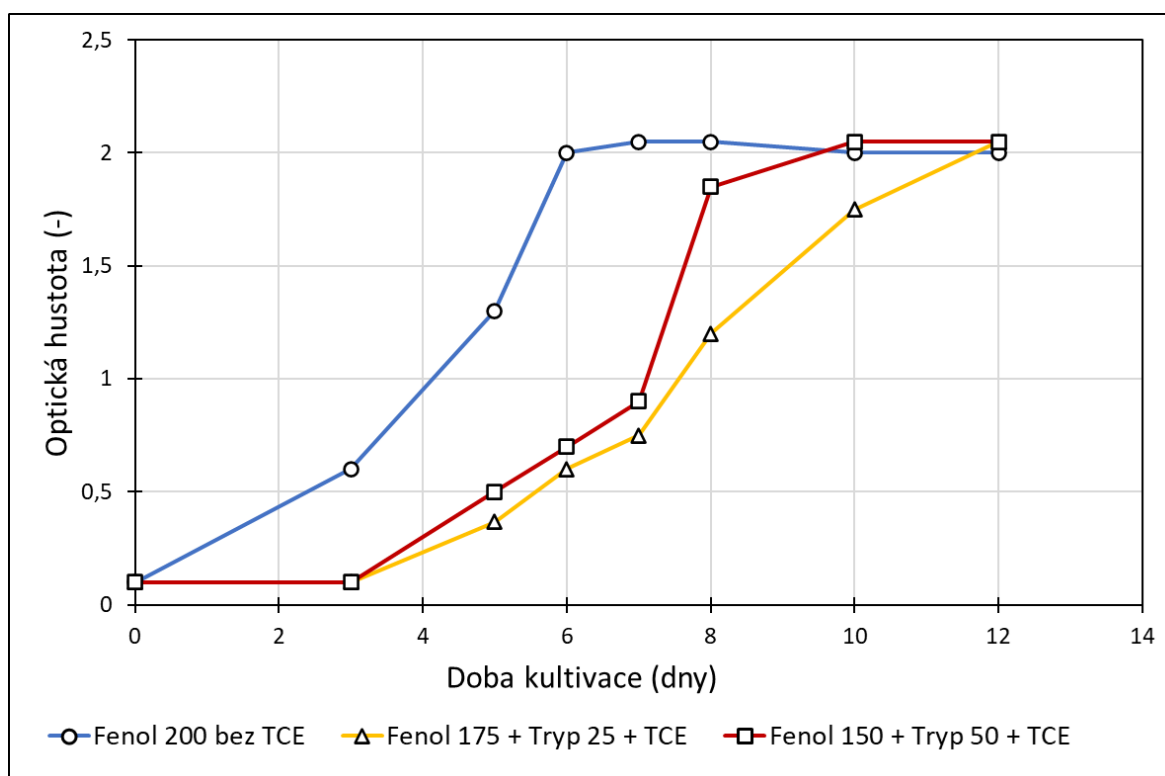
který testoval vliv dvou různých zvýšených koncentrací tryptonu (25 a 50 mg/l) v živném médiu na růst kultury; současně byly odpovídajícím způsobem sníženy koncentrace fenolu.

Tabulka 4 Optické density suspenzí ve vialkách s TCE a v kontrole bez TCE:

Doba kultivace (dny)	Fenol 200 bez TCE		Fenol 175 + Tryp 25 + TCE		Fenol 150 + Tryp 50 + TCE	
0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
3	0,6	0,6	0,1		0,1	
5	1,3	1,3	0,3 ^B	0,4 ^B	0,5 ^B	0,5 ^B
6	2,0	2,0	0,5 ^B	0,7 ^B	0,7 ^B	0,7 ^B
7	2,1	2,0	0,8 ^B	0,7 ^B	0,7 ^B	1,1 ^B
8	2,1	2,0	1,2 ^B	1,2 ^B	1,8 ^B	1,9 ^B
10	2,0	2,0	1,8	1,7	2,0	2,1
12	2,0	2,0	2,0	2,1	2,0	2,1

^B biofilm na stěně vialek

Kontrolní růst na fenolu bez TCE proběhl v souladu s předpoklady, stejně jako v prvním experimentu a kultura plně vyrostla během 6–7 dnů. V médiu s fenolem (175 mg/l) a tryptonem (25 mg/l) a TCE byl vrchol růstu zaznamenán 12. den po inokulaci, zatímco v médiu s fenolem (150 mg/l) a tryptonem (50 mg/l) a TCE již 10. den. V pátém až osmém dni pokusu byl také ve vialkách s fenolem, tryptonem a TCE pozorován vznik biofilmu, takže před každým měřením optické density bylo nutné vzorky důkladně protřepat k převedení buněk z biofilmu do suspenze. Lze předpokládat, že k výraznější tvorbě biofilmu dané kultury přispěly použité zvýšené koncentrace tryptonu. Experiment byl ukončen dvanáctý den, protože na základě výsledků předchozího pokusu nebyl očekáván další nárůst optické density.



Obrázek 10 Růst kultury v médiu s fenolem a tryptonem v různých koncentracích v přítomnosti TCE (5–6 mg/l), ve srovnání s kontrolou bez TCE

Z grafu vyplývá, že kultura s vyšší koncentrací tryptonu (50 mg/l, červená křivka) ukázala rychlejší růst ve srovnání s kulturou při nižší koncentraci tryptonu (25 mg/l, žlutá křivka), přičemž nejvýraznější rozdíl byl zaznamenán osmý den kultivace. Přesto však ani při kombinaci fenolu a tryptonu (150 + 50 mg/l) nerostla kultura tak dobře jako kontrolní vzorek na samotném fenolu bez TCE, který se vyvíjel v souladu s výsledky prvního pokusu.

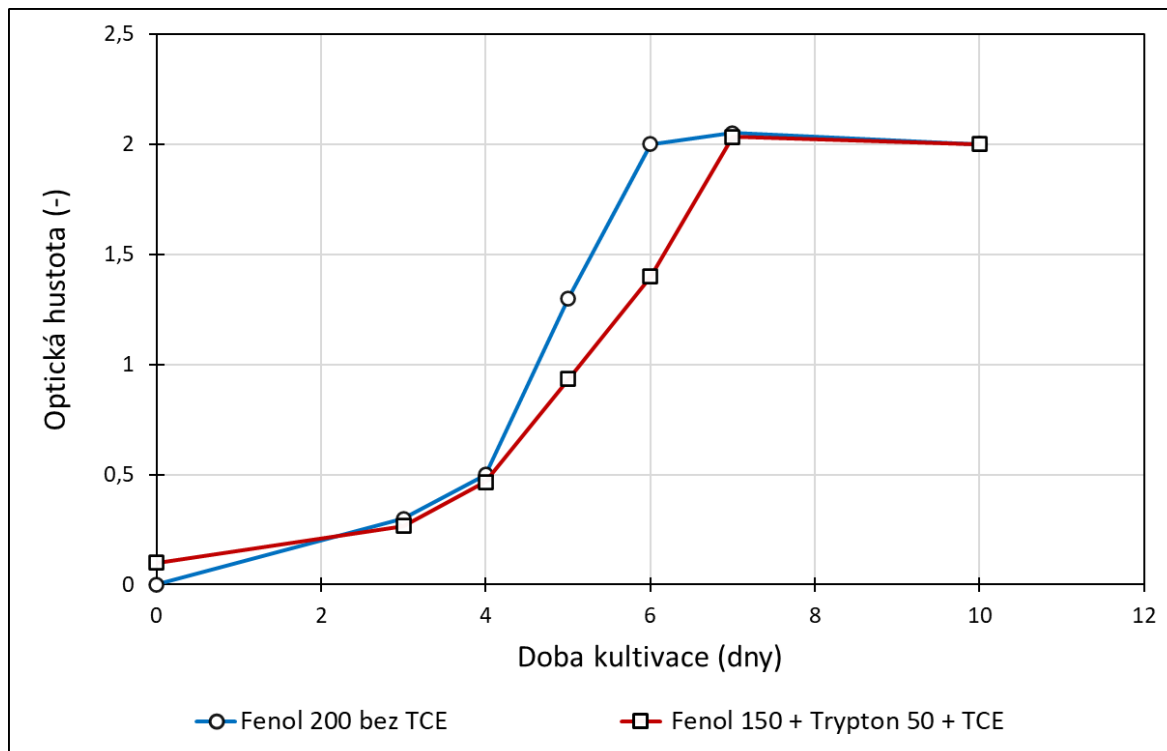
6.3 Pokus 3: ověření růstu kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL při 8 °C na 150 mg/l fenolu a 50 mg/l tryptonu v přítomnosti 5–6 mg/l trichloroethenu (TCE), s objemem inokula 1 %

Vzhledem k výsledkům pokusu č. 2, který prokázal přínos kombinace 150 mg/l fenolu a 50 mg/l tryptonu, byla tato kombinace použita znovu. Na rozdíl od předchozích experimentů bylo však tentokrát použito desetinásobně větší inokulum, jehož objem činil 1 %. Výsledky měření růstu kultury za těchto podmínek, v porovnání s růstem na fenolu bez TCE, jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Optické density suspenzí ve vialkách s TCE a v kontrole bez TCE:

Doba kultivace (dny)	Fenol 200 bez TCE		Fenol 150 + Tryp 50 + TCE		
	Inokulum 1 ‰		Inokulum 1 ‰		
0	0,0	0,0	0,1		0,1
3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
4	0,5	0,5	0,4 ^B	0,4 ^B	0,5 ^B
5	1,3	1,3	0,9 ^B	0,9 ^B	1,0 ^B
6	2,0	2,0	1,3 ^B	1,3 ^B	1,6 ^B
7	2,0	2,1	2,1 ^B	2,0 ^B	2,0 ^B
10	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

V experimentu s 1% objemem inokula v médiu obsahujícím kombinaci fenolu a tryptonu a TCE bylo zjištěno, že maximum optické density bylo dosaženo již 7. den po zahájení kultivace, což ukazuje na rychlejší růst kultury v porovnání s předchozím experimentem, kde byla použita nižší koncentrace inokula (1 ‰). Ve stejném médiu byl mezi 4. a 7. dnem znovu zaznamenán biofilm, což opět vyžadovalo důkladné protřepání vialek před měřením OD densilametrem, aby byl biofilm rozptýlen do suspenze. Kontrolní vzorek se choval v souladu s očekáváním a výsledky předchozích pokusů. Graficky je růst kultury vyjádřen na následujícím grafu.



Obrázek 11 Růst kultury v médiu s fenolem (150 mg/l), tryptonem (50 mg/l) a TCE (5–6 mg/l) ve srovnání s kontrolou

Graf ukazuje, že zvýšení koncentrace inokula v médiu s fenolem (150 mg/l), tryptonem (50 mg/l) a TCE vede k rychlejšímu nárůstu kultury ve srovnání s oběma předchozími experimenty a že se zahájení růstu kultury i průběh kultivace velmi přiblížily růstu kultury na fenolu bez přítomnosti TCE. Jinými slovy, toxicita TCE byla použitím této kombinace fenolu a tryptonu velmi významně potlačena.

6.4 Pokus 4: ověření ochranného účinku Tweenu 80 na růst kultury

***Acinetobacter* sp. 1AKL na 175 mg/l fenolu s 25 mg/l tryptonu při 8 °C, v přítomnosti 5–6 mg/l TCE, se standardním objemem inokula 1 %**

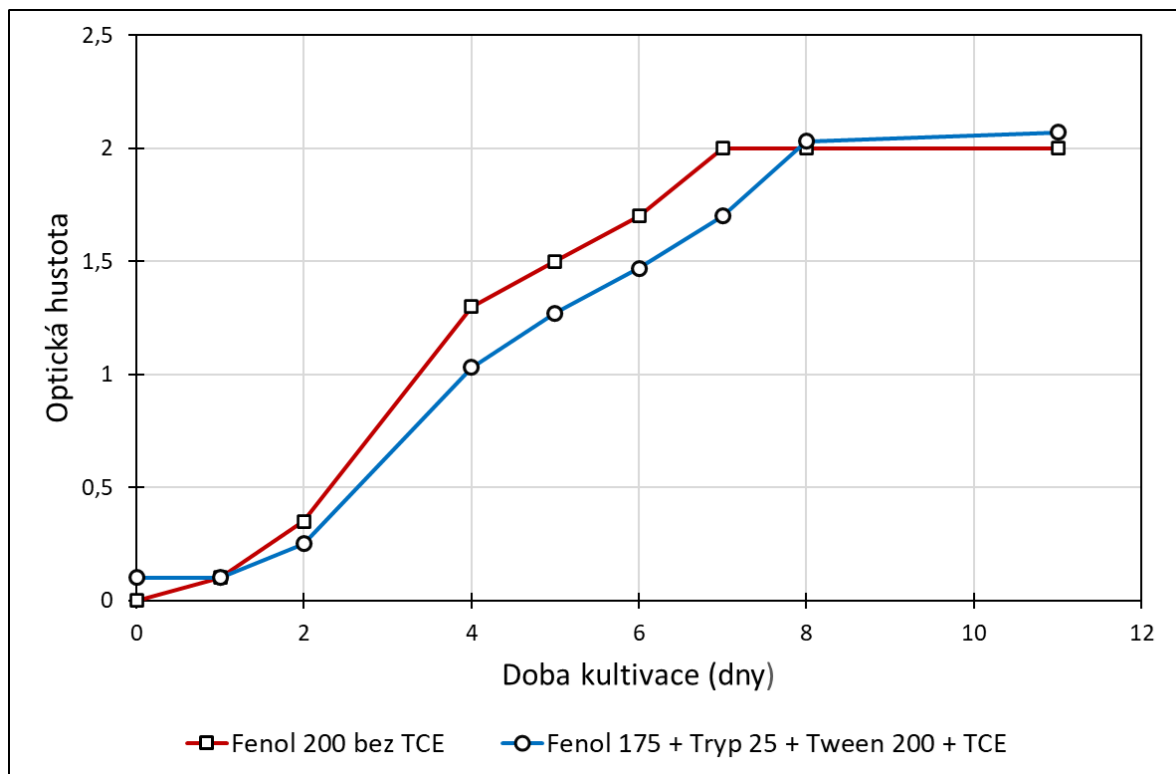
V tomto experimentu byl testován ochranný efekt neionogenního surfaktantu Tween 80 v koncentraci 0,2 g/l proti toxickému působení TCE na bakteriální kmen *Acinetobacter* sp. 1AKL při nižší koncentraci tryptonu (25 mg/l) a standardním objemu inokula (1 %). Přestože předchozí pokus 3 ukázal pozitivní vliv vyšší koncentrace tryptonu a většího objemu inokula na růst kultury, z praktického hlediska není vždy možné používat velké

množství inokula. Tween 80 je známý svou schopností neutralizovat negativní efekty některých konzervantů při mikrobiologických testech, a proto byl v tomto kontextu v této práci zkoumán jako možná alternativa pro ochranu bakteriálních buněk před škodlivým vlivem TCE. Výsledky růstu kultury jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Optické density suspenzí ve vialkách s TCE a v kontrole bez TCE:

Doba kultivace (dny)	Fenol 175 + Tryp 25 + Tween 200 + TCE			Fenol 200 bez TCE	
0	0,1			0	
1	0,1		0,1	0,1	0,1
2	0,2		0,3	0,3	0,4
4	1,0	1,1	1,0	1,3	1,3
5	1,3 ^B	1,2 ^B	1,3 ^B	1,5	1,5
6	1,5 ^B	1,4 ^B	1,5 ^B	1,7	1,7
7	1,7 ^B	1,6 ^B	1,8 ^B	2,0	2,0
8	2,0 ^B	2,1 ^B	2,0 ^B	2,0	2,0
11	2,0 ^B	2,1 ^B	2,1 ^B	2,0	2,0

Z tabulkových dat vyplývá, že v médiu s fenolem, tryptonem, Tweenem 80 a TCE a s použitím 1 ‰ inokula byla dosažena maximální optická densita 8. den kultivace, což se víceméně shoduje s výsledky předcházejícího experimentu, kde byla použita vyšší koncentrace inokula. Ve stejném médiu se od čtvrtého dne experimentu také objevil biofilm, proto bylo potřeba vialky před měřením OD důkladně protřepat, aby byl biofilm rozptýlen do suspenze. Růst kultury se tedy za přítomnosti Tweenu 80 i přes obsah TCE velmi blížil růstu v porovnávacím médiu s fenolem bez TCE, kde se kultura chovala konzistentně s výsledky získanými v dřívějších pokusech.



Obrázek 12 Růst kultury v médiu s fenolem (175mg/l), tryptonem (25 mg/l), Tweenem 80 (200 mg/l) a TCE (5–6 mg/l) ve srovnání s kontrolou

Z grafu lze vyčíst, že růst kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL v médiu s fenolem, tryptonem, Tweenem 80 a TCE při standardním objemu inokula 1 ‰ měl zlepšený průběh vůči pokusu č. 3. Z toho vyplývá, že Tween 80 měl na růst použité kultury stabilizační vliv, což naznačuje jeho potenciální protektivní účinek v prostředích s přítomností toxických koncentrací TCE.

6.5 Pokus 5: ověření využívání Tweenu 80 kulturou *Acinetobacter* sp.

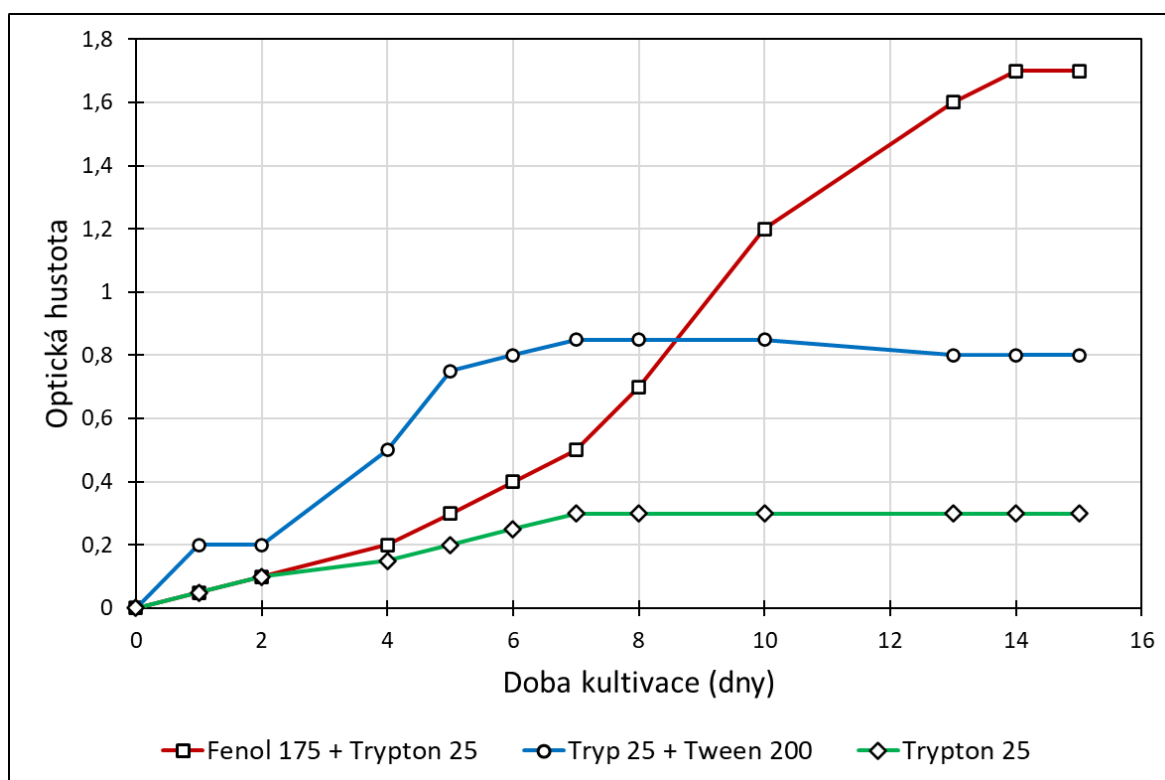
1AKL

Tento experiment zkoumal možnost využití Tweenu 80 (koncentrace 0,2 g/l) jako živného substrátu pro růst kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL, aby se zjistilo, zda jeho pozitivní efekty, pozorované v předchozím experimentu č. 4, vyplývají jen z ochrany buněk, nebo zda přímo podporuje jejich růst a reprodukci. Výsledky růstu kultury ve třech médiích jsou uvedeny v tabulce 7 a na obrázku 13.

Tabulka 7 Optické density suspenzí v kultivačních lahvích bez TCE

Doba kultivace (dny)	Trypton 25 mg/l + Tween 200 mg/l		Trypton 25 mg/l		Trypton 25 mg/l + Fenol 175 mg/l	
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0
2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
4	0,5	0,5	0,1	0,2	0,2	0,2
5	0,7	0,8	0,2	0,2	0,3	0,3
6	0,8	0,8	0,2	0,3	0,4	0,4
7	0,8	0,9	0,3	0,3	0,5	0,5
8	0,8	0,9	0,3	0,3	0,7	0,7
10	0,8	0,9	0,3	0,3	1,2	1,2
13	0,8	0,8	0,3	0,3	1,6	1,6
14	0,8	0,8	0,3	0,3	1,7	1,7
15	0,8	0,8	0,3	0,3	1,7	1,7

Z dat v tabulce vyplývá, že kultura v médiu s Tweenem 80 a tryptonem při použití 1 ‰ inokula dosáhla vrcholu optické density 7. den, a hodnota 0,8–0,9 byla zřetelně vyšší než v médiu se samotným tryptonem. Tyto výsledky tak ukázaly, že kultura *Acinetobacter* sp. 1AKL Tween 80 alespoň částečně využívá jako substrát. Médium s fenolem a tryptonem vykázalo nejvyšší optickou densitu sice až 14. den, ale hodnoty byly výrazně vyšší než u média s Tweenem 80. V médiu s pouhým tryptonem dosáhla optická densita maxima již 7. den, ale byla výrazně nižší ve srovnání s ostatními médii. Je zajímavé, že při kultivaci v médiu s Tweenem 80 bylo i na konci experimentu (15. den) pozorováno silné pění suspenze, což naznačuje, že Tween 80 nebyl kulturou úplně rozložen a vzniklý metabolit stále vykazoval vlastnosti tenzidu.



Obrázek 13 Srovnání růstu kultury v médiu s Tweenem 80 (200 mg/l) a Tryptonem (25 mg/l) s růstem na médiích z předchozích experimentů bez TCE

Z grafu je zřejmé, že kultura *Acinetobacter* sp. 1AKL vykazovala nejlepší růst v ověřeném médiu obsahujícím fenol (175 mg/l) a trypton (25 mg/l). Růstová rychlost v tomto médiu však mírně klesla ve srovnání s předchozími pokusy, což mohlo být důsledkem nedostatečné adaptace kultury na fenol před začátkem experimentu (předkultivace byla oproti předchozím pokusům poněkud zkrácena), což vedlo k počátečnímu zpomalení růstu.

Dále výsledky ukázaly, že kultura je schopna růst v médiu s Tweenem 80, což potvrzuje, že tento kmen může tento substrát využívat.

V bakalářské práci Hany Ryšavé (2023) bylo zjištěno, že kultura *Acinetobacter* sp. 1AKL je za určitých podmínek schopna růstu na hexadekanu a tetradekanu, které jsou alifatickými uhlovodíky. Vzhledem k tomu, že Tween 80 obsahuje alifatický uhlovodíkový řetězec, připojený k hydrofilní části molekuly, lze se domnívat, že kultura spíše využívá právě tuto hydrofobní část této molekuly. Tento závěr podporuje i skutečnost, že OD kultury dosáhla pouze hodnoty 0,8. Po dosažení této hodnoty se růst zastavil, což naznačuje neúplné využití molekuly Tweenu 80. Navíc i po ukončení růstu bylo zaznamenáno intenzivní pění suspenze v MM s Tweenem 80, což svědčí o přítomnosti látky s detergentními vlastnostmi, která nebyla plně metabolizována.

6.6 Výsledky stanovení koncentrace TCE plynovou chromatografií

V průběhu prací bylo také připraveno několik vialek s 10 ml minerálního média a s přídavkem 100 µl zásobního roztoku TCE, tedy objemově identicky jako v pokusech 1 až 4. V takto připravených vialkách byla po třech dnech umístění při 8 °C (doba nutná k rozdělení TCE do obou fází) změřena pracovníky ÚIOŽP koncentrace TCE plynovou chromatografií v kapalně fázi ve vialkách, aby bylo ověřeno, že po dosažení rovnováhy mezi plynnou a kapalnou fází dosáhla počáteční koncentrace TCE v pokusech ve vialkách skutečně hodnoty vyšší než 5 mg/l.

Tabulka 8 Výsledky stanovení koncentrací TCE plynovou chromatografií:

Vialky s 10 ml MM + 100 µl roztoku TCE			
	1	2	3
Koncentrace TCE v kapalně fázi (mg/l)	5,351	5,415	5,617
Průměr (mg/l)	5,461		

ZÁVĚR

Hlavním cílem bakalářské práce bylo ověřit schopnost růstu kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL na fenolu při teplotě 8 °C a při vysoké koncentraci TCE, s cílem rozšířit využití této kultury pro bioremediaci podzemních vod znečištěných TCE. Tato kultura byla dříve izolována a kultivována na ÚIOŽP.

Během práce bylo realizováno pět experimentů zaměřených na schopnosti kultury 1AKL růst v přítomnosti TCE, přičemž první čtyři experimenty se zabývaly schopností růstu na fenolu a poslední z experimentů zkoumal schopnost kultury využívat Tween 80 jako růstový substrát.

První experiment testoval růst kultury na fenolu (200 mg/l) za přítomnosti TCE (5–6 mg/l) a s přidavkem tryptonu (5 mg/l), který dle výsledků skutečně zlepšil růst kultury v porovnání s prostředím bez tryptonu.

Druhý experiment se zaměřil na optimalizaci poměru koncentrací tryptonu a fenolu v živném médiu pro růst kultury v přítomnosti TCE. Srovnávány byly dvě varianty médií: první se 175 mg/l fenolu a 25 mg/l tryptonu a druhé se 150 mg/l fenolu a 50 mg/l tryptonu. Výsledky ukázaly, že médium s vyšším obsahem tryptonu vedlo k lepšímu růstu kultury a výraznějšímu potlačení toxických účinků TCE.

Na základě výsledků z druhého pokusu bylo ve třetím experimentu opět použito médium se 150 mg/l fenolu a 50 mg/l tryptonu. V tomto případě však byl použit zvýšený objem inokula 1 % a médium bylo vystaveno působení TCE. Růst kultury byl opět rychlejší než v předchozích experimentech a jeho rychlost se již značně přiblížila kontrole, která obsahovala 200 mg/l fenolu bez přítomnosti TCE.

Jelikož v praxi není použití takto velkého inokula vhodné, ve čtvrtém experimentu bylo zkoumáno, zda Tween 80 poskytuje ochranu buňkám *Acinetobacter* sp. 1AKL při expozici TCE. V tomto pokusu bylo do média se 175 mg/l fenolu a 25 mg/l tryptonu přidáno 200 mg/l Tweenu 80 se standardním inokulem 1 ‰. Růst kultury byl podobný jako ve třetím pokusu, lze tedy konstatovat, že Tween 80 měl ochranný či podpurný účinek na bakteriální buňky.

Jelikož čtvrtý pokus ukázal velmi dobré výsledky, bylo v posledním pokusu zkoumáno, zda může kultura *Acinetobacter* sp. 1AKL ke svému růstu využívat samotný detergent Tween 80. Bylo použito médium obsahující 200 mg/l Tweenu 80 a 25 mg/l tryptonu. Výsledky prokázaly, že kultura je skutečně schopná využívat Tween 80 ke svému růstu.

Vzhledem k tomu, že optická densita buněk po ukončení růstu dosahovala nižších hodnot než v médiu s fenolem a zároveň médium stále pěnilo, je pravděpodobné, že *Acinetobacter* sp. 1AKL dokáže ke svému růstu využít pouze část molekuly Tweenu 80.

Tato bakalářská práce ověřila schopnost růstu kultury *Acinetobacter* sp. 1AKL na fenolu za současné expozice 5–6 mg/l TCE za nízké teploty kolem 8 °C. Zároveň přispěla k hledání optimálních podmínek pro růst této kultury při expozici TCE a prokázala schopnost kultury využívat Tween 80 jako substrát pro svůj růst.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- BAKKE, Berit, Patricia A. STEWART a Martha A. WATERS, 2007. Uses of and Exposure to Trichloroethylene in U.S. Industry: A Systematic Literature Review. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* [online]. 2007-03-26, 4(5), 375-390 [cit. 2023-12-26]. ISSN 1545-9624. Dostupné z: doi:10.1080/15459620701301763
- BOYD, E, K KILLHAM a A MEHARG, 2001. Toxicity of mono-, di-, and tri-chlorophenols to flux marked terrestrial bacteria *Burkholderia* sp. Rasc. C2 and *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* [online]. 157-166 [cit. 2023-12-27].
- BŘÍŽĎALA, Jan, 2020. Organická chemie pro gymnázia. In: *Organická chemie pro gymnázia* [online]. Třebíč: Jan Břížd'ala, s. 69 [cit. 2023-10-14]. ISBN ISBN 978-80-270-8161-5. Dostupné z: http://e-chembook.eu/Brizdala_Organicka-chemie-pro-gymnazia.pdf
- CHENG, Min, Guangming ZENG, Danlian HUANG, Chunping YANG, Cui LAI, Chen ZHANG a Yang LIU, 2017. Tween 80 surfactant-enhanced bioremediation: toward a solution to the soil contamination by hydrophobic organic compounds. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2017-04-12, 38(1), 17-30 [cit. 2024-03-26]. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.1080/07388551.2017.1311296
- ECHA. *Trichloroethylene: Scientific properties* [online]. [cit. 2023-12-26]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/brief-profile/-/briefprofile/100.001.062>
- ECI, 2017. *Phenol* [online]. THE ESSENCIAL CHEMICAL INDUSTRY. [cit. 2023-11-18]. Dostupné z: <https://www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/phenol.html>
- EPA. *Phenol: Hazard Summary* [online]. [cit. 2023-12-25]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/phenol.pdf>
- ERBA LACHEMA S.R.O. DENSI-LA-METER II. *Erba Lachema* [online]. [cit. 2024-03-27]. Dostupné z: <https://www.erbalachema.com/produkty-a-reseni/mikrobiologie/densi-la-meter-ii/>
- GAMI, Afilah Abd, M. Y SHUKOR, Khalilah Abdul KHALIL, Farrah Aini DAHALAN, Ariff KHALID a Siti Aqllima AHMAD, 2014. *Phenol and its toxicity* [online]. (2), 11-23 [cit. 2023-12-25]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.54987/jemat.v2i1.89>
- HANSCH, Corwin, Susan C. MCKARNS, Carr J. SMITH a David DOOLITTLE, 2000. *Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity*

[online]. (127), 61-72 [cit. 2023-12-25]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00171-X)

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2014. Trichloroethylene, Tetrachloroethylene, and Some Other Chlorinated Agents. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* [online]. 106. s. 31-49 [cit. 2023-12-26]. ISBN 978-92-832-0144-1. Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Trichloroethylene-Tetrachloroethylene-And-Some-Other-Chlorinated-Agents-2014>

INOUE, Akira a Koki HORIKOSHI, 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* [online]. **338**(6212), 264-266 [cit. 2024-03-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/338264a0

ISKEN, Sonja a Jan A. M. DE BONT, 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles* [online]. 1998-8-20, **2**(3), 229-238 [cit. 2024-01-29]. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s007920050065

KIM, D.-J., J.-W. CHOI, N.-C. CHOI, B. MAHENDRAN a C.-E. LEE, 2005. Modeling of growth kinetics for *Pseudomonas* spp. during benzene degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **69**(4), 456-462 [cit. 2024-03-05]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-005-1997-z

MARISCAL, Alberto, María Teresa PEINADO, Manuel CARNERO-VARO a Joaquín FERNÁNDEZ-CREHUET, 2003. Influence of organic solvents on the sensitivity of a bioluminescence toxicity test with *Vibrio harveyi*. *Chemosphere* [online]. **50**(3), 349-354 [cit. 2024-02-03]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/S0045-6535(02)00312-0

MASSALHA, Nedal, Abraham SHAVIV a Isam SABBAH, 2010. Modeling the effect of immobilization of microorganisms on the rate of biodegradation of phenol under inhibitory conditions. *Water Research* [online]. **44**(18), 5252-5259 [cit. 2024-05-10]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2010.06.042

MICHAŁOWICZ, J. a W. DUDA, 2007. Phenol - Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies* [online]. **16**(3), 347-362 [cit. 2023-12-27].

Modrá zpráva 2011 [online], 2012. Praha: MS Polygrafie s r.o [cit. 2024-05-11]. ISBN ISBN 978-80-7434-038-3. Dostupné z: https://eagri.cz/public/portal/-q264957---LHH3QD6M/modra-zprava-2011?_linka=a247073

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2004. PubChem Compound Summary for CID 996, Phenol. *National Library of Medicine* [online]. [cit. 2023-11-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 6575, Trichloroethylene. *National Library of Medicine* [online]. [cit. 2023-12-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6575>

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. *Report of Carcinogens Profile: Trichloroethylene* [online]. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. [cit. 2023-12-26]. Dostupné z: <https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/ntp/roc/content/profiles/trichloroethylene.pdf>

P - LAB A.S. Standardy turbidity (McFarland). *P-LAB* [online]. [cit. 2024-04-30]. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/standardy-turbidity-mcfarland>

SHI, Shengnan et al., 2019. Effects of biochar on the phenol treatment performance and microbial communities shift in sequencing batch reactors. *Water Research* [online]. **161**, 1-10 [cit. 2024-05-10]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2019.05.097

P-LAB A.S. TWEEN® 80. *P-LAB* [online]. [cit. 2024-05-01]. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/tweensupsup-80>

PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2016. *Compendium of Chemical Hazards: Phenol* [online]. [cit. 2023-12-25]. Dostupné z: https://assets.publishing.service.gov.uk/media/5a81a1ceed915d74e62334f0/Phenol_PHE_TO_120216.pdf

RŮŽIČKA, J., 2023. *Osobní sdělení*.

RYŠAVÁ, H., 2023. *Možnosti degradace polutantů psychrofilními bakteriemi rostoucími na fenolu*. Zlín. Bakalářská práce. FT UTB.

SINGH, Rajveer a Mira Stone OLSON, 2010. Kinetics of trichloroethylene and toluene toxicity to *Pseudomonas putida* F1. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. **29**(1), 56-63 [cit. 2024-01-29]. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.14

TABREZ, Shams a Masood AHMAD, 2009. Toxicity, Biomarkers, Genotoxicity, and Carcinogenicity of Trichloroethylene and Its Metabolites: A Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* [online]. **27**(3), 178-196 [cit. 2023-12-26]. ISSN 1059-0501. Dostupné z: doi:10.1080/10590500903091340

TYMAN, J. H. P., 1996. Chapter 1 Historical aspects and industrial syntheses of monohydric and dihydric phenols. In: *Studies in Organic Chemistry* [online]. 52. s. 1-22 [cit. 2023-12-25]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0165-3253\(96\)80028-9](https://doi.org/10.1016/S0165-3253(96)80028-9)

WACKETT, Lawrence P. a Steven R. HOUSEHOLDER, 1989. Toxicity of Trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 Is Mediated by Toluene Dioxygenase. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **55**(10), 2723-2725 [cit. 2024-03-01]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.55.10.2723-2725.1989

WOLDRINGH, C. L., 1973. Effects of Toluene and Phenethyl Alcohol on the Ultrastructure of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* [online]. **114**(3), 1359-1361 [cit. 2024-05-10]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.114.3.1359-1361.1973

ZHAO, Jiayuan, Yuanlong CHI, Fangfang LIU, Dongying JIA a Kai YAO, 2015. Effects of Two Surfactants and Beta-Cyclodextrin on Beta-Cypermethrin Degradation by *Bacillus licheniformis* B-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015-12-23, **63**(50), 10729-10735 [cit. 2024-03-26]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.5b04485

ZHAO, Ling, Donglin XIAO, Yang LIU, Huacheng XU, Hongyan NAN, Deping LI, Yue KAN a Xinde CAO, 2020. Biochar as simultaneous shelter, adsorbent, pH buffer, and substrate of *Pseudomonas citronellolis* to promote biodegradation of high concentrations of phenol in wastewater. *Water Research* [online]. **172** [cit. 2024-02-03]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2020.115494

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1AKL	Označení bakteriálního kmenu
ATP	Adenosintrifosfát
CFU	Kolonie tvořící jednotky
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
MM	Minerální médium
OD	Optická denzita
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
R2A	Nutričně redukované médium
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribosomální ribonukleová kyselina
TCE	Trichloroethen
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
β-CD	Beta-cypermethrin
β-CD	Beta-cyklodextrin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Strukturní vzorec fenolu.....	12
Obrázek 2	Strukturní vzorec trichloroethenu.....	15
Obrázek 3	Zelené buňky (živé buňky) – a: čas 0 h, b: čas 1 h, c: čas 2,5 h a červené buňky (mrtvé buňky) – d: čas 0 h, e: čas 1 h, f: čas 2,5 (Singh a Olson, 2010)	20
Obrázek 4	Růst kultury F1 po expozici TCE. Křížky: kultura vystavená TCE po dobu jedné hodiny; trojúhelníky: kultura vystavená TCE po dobu 2,5 hodiny (Singh a Olson, 2010)..	20
Obrázek 5	Vliv netoxických koncentrací organických rozpouštědel na bioluminiscenci <i>V. harveyi</i> při inokulu 10^4 CFU/ml (Mariscal a kol., 2003)	26
Obrázek 6	Vliv netoxických koncentrací organických rozpouštědel na bioluminiscenci <i>V. harveyi</i> při inokulu 10^8 CFU/ml (Mariscal a kol., 2003)	26
Obrázek 7	Účinnost odstraňování fenolu při různých počátečních koncentracích od 100 mg/l do 1200 mg/l se 4% inokulací <i>Pseudomonas citronellolis</i> bez biouhlu (Zhao a kol., 2020)	29
Obrázek 8	Strukturní vzorec Tweenu 80 (P-LAB a.s., 2024).....	30
Obrázek 9	Růst kultury v médiu s fenolem, tryptonem v různých koncentracích (mg/l) v přítomnosti TCE (5–6 mg/l) ve srovnání s kontrolou.....	43
Obrázek 10	Růst kultury v médiu s fenolem a tryptonem v různých koncentracích v přítomnosti TCE (5–6 mg/l), ve srovnání s kontrolou bez TCE.....	45
Obrázek 11	Růst kultury v médiu s fenolem (150 mg/l), tryptonem (50 mg/l) a TCE (5–6 mg/l) ve srovnání s kontrolou	47
Obrázek 12	Růst kultury v médiu s fenolem (175mg/l), tryptonem (25 mg/l), Tweenem 80 (200 mg/l) a TCE (5–6 mg/l) ve srovnání s kontrolou	49
Obrázek 13	Srovnání růstu kultury v médiu s Tweenem 80 (200 mg/l) a Tryptonem (25 mg/l) s růstem na médiích z předchozích experimentů	51

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Kmeny tolerantní k organickým rozpouštědlům (Isken a Bont, 1998).	23
Tabulka 2 Stupně McFarlanda odpovídající přibližným počtům buněk v suspenzi.....	38
Tabulka 3 Průměry optické density suspenzí ve vialkách s TCE i bez TCE.....	42
Tabulka 4 Optické density suspenzí ve vialkách s TCE a v kontrole bez TCE.....	44
Tabulka 5 Optické density suspenzí ve vialkách s TCE a v kontrole bez TCE.....	46
Tabulka 6 Optické density suspenzí ve vialkách s TCE a v kontrole bez TCE.....	48
Tabulka 7 Optické density suspenzí v kultivačních lahvích bez TCE.....	50
Tabulka 8 Výsledky stanovení koncentrací TCE plynovou chromatografií.....	52

SEZNAM PŘÍLOH