

# Degradace trichloroethenu bakterií *Comamonas testosteroni* za snížených teplot

Bc. Sabina Krajčířiková

---

Diplomová práce  
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Sabina Krajčířiková  
Osobní číslo: T19464  
Studijní program: N0712A030001 Environmentální inženýrství  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Degradace trichloroethenu bakterií *Comamonas testosteroni* za snížených teplot

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na bakteriální druh *Comamonas testosteroni* a na degradaci trichloroethenu za snížených teplot.
2. Ověřte růst kultury *Comamonas testosteroni* RF2 při snížených teplotách a zjistěte možnosti této kultury rozkládat fenol při teplotách pod 15°C.
3. Proveďte testy degradace trichloroethenu kulturou *Comamonas testosteroni* RF2 za takto snížených teplot.
4. Získané výsledky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v požadované formě v řádném termínu.

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

**Seznam doporučené literatury:**

Zálešák et al.: Cometabolic degradation of dichloroethenes by Comamonas testosteroni RF2. Chemosphere, 2017, pp. 919-927.

Růžička et al.: Trichloroethylene Degradation by Two Phenol Utilizing Strains of Comamonas testosteroni. Asian Journal of Chemistry, 2011, pp. 4255-4259.

Mattes et al.: Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. 2010, FEMS Microbiol. Rev. 34, pp. 445-475.

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: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

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

Ve Zlíně dne 17. února 2022

## **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 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

Trichlorethylen je možné rozložit bakterií *Comamonas testosteroni* a to kometabolicky, kdy je v buňce indukován enzym, v tomto případě fenol 2-monooxygenáza, která je indukována fenolem. Dosavadní výzkumy ukázaly, že tato reakce probíhá za laboratorních teplot. V životním prostředí, zejména v podzemních vodách, se však vyskytují teploty výrazně nižší.

Tato diplomová práce studovala schopnost bakteriální degradace trichlorethylenu kulturou *Comamonas testosteroni* RF2 za snížených teplot, tedy při 13 a 8 °C. Pro indukci enzymu a růst kmene na fenolu při nižších teplotách bylo potřeba použít podpůrný substrát, kterým byl laktát sodný. Ve směsi minerálního media, fenolu o koncentraci 100 mg/l a laktátu sodného o koncentraci 100 mg/l proběhla degradace trichlorethylenu úspěšně při každé z výše zmíněných teplot. Při teplotě 13 °C došlo k úplnému odstranění 1,6 mg/l trichlorethylenu za 7 dní kultivace, 3,2 mg/l trichlorethylenu při stejné teplotě byly degradovány za 11 dní a při teplotě 8 °C k úplnému rozkladu 1,8 mg/l trichlorethylenu došlo po 27 dnech kultivace.

Klíčová slova: Degradace, trichlorethylen, kometabolismus, nízké teploty, fenol

## ABSTRACT

Bacterium *Comamonas testosteroni* is capable to disintegrate trichloroethylene cometabolically when key, in this case phenol 2-monooxygenase, enzyme is induced in the cells by phenol. The latest research showed that this reaction is successful at laboratory temperatures. However, in the environment, especially in many types of groundwater, the temperatures are significantly lower.

This study examined the ability of bacterial degradation of trichloroethylene by strain *Comamonas testosteroni* RF2 at temperature as low as 13 and 8°C. For the enzyme induction and strain growth on phenol at low temperature it was necessary to use a supporting substrate such as sodium lactate. In mineral medium amended with phenol at a concentration of 100 mg/l and sodium lactate at a concentration of 100 mg/l trichloroethylene was degraded successfully at both temperatures mentioned above. At 13 °C 1.5 mg/l of trichloroethylene was completely removed within 7 days of cultivation and 3.2 mg/l was degraded within

11 days. At the 8 °C entire disintegration of 1.8 mg/l of trichloroethylene occurred after 27 days of cultivation.

Keywords: Degradation, trichloroethylene, cometabolism, low temperatures, phenol

Mé poděkování patří panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za vedení diplomové práce, za jeho čas, cenné rady, trpělivost a vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marii Dvořáčkové, Ph.D. za pomoc při práci s plynovým chromatografem a její rady.

V neposlední řadě poděkování patří rodičům za podporu podobu celého studia a také Barči za rady a pravé přátelství.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 TRICHTLORETHYLEN</b> .....	<b>13</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA .....	13
1.2 NEBEZPEČNOST TCE .....	14
1.3 POUŽITÍ .....	14
1.4 VLIV NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ A ZDRAVÍ ČLOVĚKA .....	14
1.5 BIODEGRADACE TCE .....	15
<b>2 MECHANISMUS KOMETABOLISMU TCE</b> .....	<b>18</b>
<b>3 DEGRADAČNÍ KULTURY</b> .....	<b>22</b>
3.1 DEGRADAČNÍ KULTURY ROSTOUCÍ NA FENOLU .....	23
3.2 DEGRADAČNÍ KULTURY AKTIVNÍ ZA SNÍŽENÝCH TEPLOT .....	25
<b>4 SOUHRN SOUČASNÝCH SMĚRŮ (TRENDŮ) V BIODEGRADACI TCE</b> .....	<b>28</b>
<b>5 DEGRADAČNÍ KULTURA RF2</b> .....	<b>30</b>
5.1 DEGRADAČNÍ TESTY .....	30
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
<b>6 METODIKA</b> .....	<b>34</b>
6.1 MATERIÁLY .....	34
6.1.1 Roztoky .....	34
6.1.2 Živná média .....	35
6.1.3 Chemikálie .....	35
6.1.4 Biologický materiál .....	36
6.2 PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY .....	36
6.2.1 Přístroje .....	36
6.2.2 Laboratorní pomůcky .....	37
6.3 METODY MĚŘENÍ .....	37
6.3.1 Měření optické hustoty na densilometru .....	37
6.3.2 Měření obsahu fenolu na UV-VIS spektrofotometru UNICAM UV 500 .....	37
6.3.2.1 Kalibrační křivka pro stanovení fenolu .....	38
6.3.3 Měření obsahu TCE pomocí plynové chromatografie (GC) .....	38
6.3.3.1 Koncentrátor TEKMAR LSC 2000 .....	39
6.3.3.2 Plynový chromatograf HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II .....	40
6.3.3.3 Integrátor HEWLETT PACKARD 3396 SERIES II .....	40
6.3.3.4 Chromatogram .....	41
6.3.3.5 Kalibrační křivka .....	41



6.4	POSTUPY.....	42
6.4.1	Ověření růstu <i>Comamonas testosteroni</i> RF2 na fenolu za různých teplot .....	42
6.4.2	Ověření růstu RF2 na pevných živných půdách.....	43
6.4.3	Ověření růstu RF2 v tekutých médiích.....	43
6.4.4	Urychlení adaptace na fenol při nízkých teplotách .....	44
6.4.5	Růst kultury <i>Comamonas testosteroni</i> RF2 v přítomnosti TCE za teploty 13 °C (podíl fenolu s laktátem 150 + 50 mg/l).....	45
6.4.6	Růst kultury <i>Comamonas testosteroni</i> RF2 při snížených koncentracích fenolu, při teplotě 8-9 °C.....	46
6.4.7	Růst kultury <i>Comamonas testosteroni</i> RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 8 °C a různých inokulech.....	47
6.4.8	Růst kultury <i>Comamonas testosteroni</i> RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 13 °C a 8 °C .....	48
6.4.9	Degradace TCE kulturou <i>Comamonas testosteroni</i> RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 13 °C.....	49
6.4.10	Degradace zvýšené koncentrace TCE kulturou <i>Comamonas testosteroni</i> RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 13 °C.....	49
6.4.11	Degradace TCE kulturou <i>Comamonas testosteroni</i> RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 8 °C (2 pokusy) .....	49
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>51</b>
7.1	OVĚŘENÍ RŮSTU <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> RF2 NA FENOLU ZA RŮZNÝCH TEPLIT .....	51
7.2	OVĚŘENÍ RŮSTU RF2 NA PEVNÝCH ŽIVNÝCH PŮDÁCH ZA SNÍŽENÝCH TEPLIT.....	53
7.3	OVĚŘENÍ RŮSTU RF2 V TEKUTÝCH MÉDIÍCH.....	54
7.4	URYCHLENÍ ADAPTACE NA FENOL PŘI NÍZKÝCH TEPLITÁCH .....	58
7.5	RŮST KULTURY <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> RF2 V PŘÍTOMNOSTI TCE ZA TEPLITY 13 °C (PODÍL FENOLU S LAKTÁTEM 150 + 50 MG/L) .....	61
7.6	RŮST KULTURY <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> RF2 PŘI SNÍŽENÝCH KONCENTRACÍCH FENOLU, PŘI TEPLITĚ 8 °C.....	64
7.7	RŮST KULTURY <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> RF2 PŘI 100 MG/L FENOLU A 100 MG/L LAKTÁTU, PŘI TEPLITĚ 8 °C A RŮZNÝCH INOKULECH .....	65
7.8	RŮST KULTURY <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> RF2 PŘI 100 MG/L FENOLU A 100 MG/L LAKTÁTU, PŘI TEPLITĚ 13 °C A 8 °C.....	68
7.9	DEGRADACE TCE KULTUROU <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> RF2 PŘI 100 MG/L FENOLU A 100 MG/L LAKTÁTU, PŘI TEPLITĚ 13 °C.....	71
7.10	DEGRADACE ZVÝŠENÉ KONCENTRACE TCE KULTUROU <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> RF2 PŘI 100 MG/L FENOLU A 100 MG/L LAKTÁTU, PŘI TEPLITĚ 13 °C.....	73
7.11	DEGRADACE TCE KULTUROU <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> RF2 PŘI 100 MG/L FENOLU A 100 MG/L LAKTÁTU, PŘI TEPLITĚ 8 °C (2 POKUSY) .....	74
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>79</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>81</b>

<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>89</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>91</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>92</b>

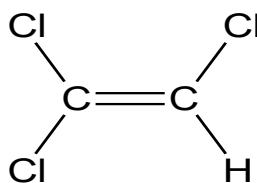
## ÚVOD

Drtivá většina chemických látek, používaná člověkem, přetrvává dlouhou dobu v životním prostředí beze změny. Do životního prostředí se tyto látky dostávaly při výrobě, používání a neodborné likvidaci. V minulosti se často chemické látky začínaly používat, aniž by byly známy účinky na lidský organismus, který je vystaven jejímu působení v různých podobách a taktéž nebyly známy osudy těchto látek ve složkách životního prostředí. Kvůli tomu byly látky dlouhodobě používány a likvidovány bez jakýchkoliv omezení až do doby, kdy byly zjištěny negativní účinky na lidský organismus a akumulace v životním prostředí. Poté bylo jejich používání omezeno i navzdory jejich výborným vlastnostem, pro které se začaly využívat. Zdrojem dnešní kontaminace životního prostředí těmito látkami je tedy stará ekologická zátěž. Výjimkou není ani trichlorethylen, chlorovaný uhlovodík, kterým se zabývá tato diplomová práce. Po zjištění škodlivých účinků, bylo jeho používání omezeno, i tak se však v životním prostředí stále vyskytuje ve významném množství, a to nejčastěji v podzemních vodách. Při snaze odstranit trichlorethylen z prostředí, respektive z podzemních vod, bylo zjištěno, že podléhá kometabolické degradaci pomocí kultury *Comamonas testosteroni*. Ta je schopna trichlorethylen zcela rozložit za laboratorních podmínek, tedy při teplotě 25 °C. Tato teplota se však nevyskytuje v podzemních vodách. Proto v této diplomové práci proběhly pokusy degradace trichlorethylenu za snížených teplot, jaké se vyskytují v podzemních vodách, a to při 13 a 8 °C.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 TRICHLORETHYLEN

Trichlorethylen je také známý pod dalšími názvy jako jsou: trichloroethen, 1,1,2-trichlorethen, Triklone. Jeho chemický vzorec je  $C_2HCl_3$  (IRZ, 2021).



Obrázek 1 Strukturální vzorec trichlorethylenu

### 1.1 Charakteristika

Trichlorethylen je bezbarvá viskóznější těkavá kapalina se sladkou vůní podobnou jako u chloroformu. Jeho samozápalná teplota je  $410\text{ }^{\circ}\text{C}$ . TCE je málo rozpustný ve vodě, a proto se běžně kategorizuje jako hydrofobní sloučenina. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech (ether, chloroform, aceton) (IRZ, 2021; Todd a kol, 2019). Tabulka 1 uvádí několik jeho důležitých fyzikálně-chemických parametrů, významných i z pohledu jeho biodegradace.

Tabulka 1 Chemické a fyzické vlastnosti TCE (Pant a Pant, 2010)

Veličina	Jednotka	Symbol	Hodnota
Molární hmotnost	g/mol	M	131,39
Hustota při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	g/ml	$\rho$	1,46
Rozpustnost ve vodě	mg/l	S	1000
Bod tání	$^{\circ}\text{C}$	$T_m$	$-86,5$
Bod varu	$^{\circ}\text{C}$	$T_b$	87,3
Tlak páry	Pa	p	9700
Rozdělovací koeficient oktanol-voda	-	$K_{ow}$	320
Sorpční koeficient	-	$K_{oc}$	2,42
Henryho konstanta	$\text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$	H	890

## 1.2 Nebezpečnost TCE

U TCE byla prokázána karcinogenita ze zkoušek na zvířatech, tím se řadí do kategorie 1B a je předpokládána karcinogenita i u člověka. Dále je také podezřelý mutagen. K poškození jater, ledvin, imunitního systému a nervového systému může dojít při dlouhodobém vystavení vysokým dávkám v pitné vodě. Pro vodní organismy je škodlivý s dlouhodobými účinky (ECHA, 2021; environmentalpollutioncenters, 2021).

## 1.3 Použití

Trichlorethylen (TCE) je látka, která se v malém množství přirozeně vyskytuje v přírodě, a to díky jeho produkci některými druhy mořských řas. Z větší části je jeho výskyt ovlivněn využitím v průmyslu. Spolu s tetrachlorethylenem (PCE) je TCE nejvíce využívaným nenasyceným chlorovaným uhlovodíkem. Za své hojné využití TCE vděčí svým výborným vlastnostem coby rozpouštědlo a čisticí prostředek s odmašťovacími schopnostmi. Další vlastnosti, kterou se vyznačuje před jinými rozpouštědly, je nehořlavost. Využíval se snad ve všech odvětvích průmyslu (kovoprůmysl, elektrotechnika, chemický průmysl, automobilový, textilní i obuvnický průmysl). TCE byl obsažen v tiskových průmyslových barvách a pesticidech. V potravinářství se TCE používal jako vykuřovací prostředek a extrakční činidlo pro rostlinné oleje a odstraňování kofeinu z kávy. Také se TCE využíval pro odstranění vody při výrobě 100% ethanolu (Doherty, 2000; IRZ 2021; Todd a kol., 2019).

## 1.4 Vliv na životní prostředí a zdraví člověka

Na TCE je však nutno pohlížet jako na xenobiotikum. I když se v prostředí vyskytuje v nepatrných koncentracích přirozeně díky produkcí mořskými řasami, tak ve vyšších koncentracích, vyskytujících se ve vodách, půdách, a dokonce i v pitných vodách se stává nebezpečím. Při kontaminaci vod dochází k ohrožení vodních organismů a narušení rovnováhy celého ekosystému. Z povrchových vod se TCE docela rychle odpaří do ovzduší, tedy významná část TCE se nachází v ovzduší, zde může reagovat s dalšími sloučeninami za tvorby přízemního ozonu (Abrahamsson a kol., 1995; IRZ, 2021; Todd a kol., 2019).

K uvolnění TCE do prostředí dochází při jeho výrobě a používání v různých technologiích, kdy se odpařováním dostane do ovzduší. Do půd a podzemních vod TCE může pronikat v důsledku nesprávného zacházení. A právě tyto antropogenní děje jsou nejvýznamnějšími

zdroji úniku TCE do prostředí, ale i na výše zmíněnou skutečnost tvorby mořskými řasami nelze zapomenout. Výsledkem je kontaminace řady oblastí půd a podzemních vod zejména v průmyslových a vojenských zónách. Problematika kontaminace prostředí TCE je aktuální i v některých vyspělých zemích jako je Japonsko a USA. V USA je přítomnost TCE detekovaná i ve zdrojích pitné vody a více než 400 000 osob je jeho působení vystaveno v zaměstnání (Williams-Johnson a kol., 1997; Todd a kol., 2019).

K poškození organismu dochází při dýchání vzduchu s obsahem TCE nebo při požití znečištěné vody. TCE působí zejména na centrální nervovou soustavu. Mimo dráždění očních a nosních sliznic může TCE navodit ospalost či závratě nebo způsobit nevolnost. V krajních případech se může jednat dokonce i o smrt. Několik studií potvrdilo souvislost mezi přítomností TCE v pitných vodách a výskytem vývojových vad narozených dětí. S největší pravděpodobností za taková poškození jsou zodpovědné metabolity TCE, například kyselina trichloroctová, která vzniká při přeměně TCE v organismu. Na základě toxikologických testů na zvířatech byla objevena schopnost TCE škodlivě působit na játra, ledviny a krev, kdy může dojít k vytvoření tumorů a vývoji leukemie (Todd a kol., 2019).

I v prostředí je TCE schopen vytvářet svým rozkladem nebezpečnější látky. V anaerobním prostředí, jako například v podzemních vodách, pomocí mikrobiální degradace dochází k jeho dehalogenaci za vzniku dichlorethylenů a následně vinylchloridu, který je karcinogenní, takže nejen samotná toxicita a perzistence činí TCE nebezpečným pro organismy a motivuje snahy o jeho odstranění z prostředí (Todd a kol., 2019).

## 1.5 Biodegradace TCE

První pokusy o biodegradaci TCE byly popsány v polovině 80. let 20. století, do té doby byl považován za biologicky nerozložitelnou látku. Jednalo se o rozklad na základě kometabolismu. Posléze byla schopnost pro kometabolickou degradaci objevena u mnoha bakteriálních druhů. Pro degradaci TCE se ukázaly být vhodné methanotrofní bakterie a dále bakterie využívající pro svůj růst aromatické uhlovodíky (fenol, toluen, kresol, o-xylen, isopropylbenzen), ale také bakterie využívající propan, propylen nebo dimethylsulfid a některé nitrifikační bakterie, které oxidují amoniak (Todd a kol., 2019). Vybrané bakteriální kultury degradující TCE jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Bakteriální kultury schopné kometabolicky degradovat TCE

Bakteriální kultura	Primární substrát	Enzym	Literatura
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	methan	methan monoxygenáza	(Naizabekov a Lee, 2020; Hatzinger a kol., 2017)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	toluen	toluen dioxygenáza	(Yang a kol., 2019)
<i>Azoarcus</i> sp.	toluen, propan	toluen monoxygenáza	(Deng a kol., 2020; Fries a kol., 1997)
<i>Comamonas testosteroni</i>	fenol	fenol 2-monoxygenáza	(Zálešák a kol., 2017)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	propan, 1-butanol	více oxygenáz	(Hand a kol., 2015)
<i>Rhodococcus</i> sp. L4	Kmínový olej	-	(Suttinun a kol., 2009)
<i>Acinetobacter</i> sp. 20B	dimethylsulfid	DMS monoxygenáza	(Takami a kol., 1999)
<i>Escherichia coli</i> JM 109	dimethylsulfid	DMS monoxygenáza	(Takami a kol., 1999)

Pro samotnou biodegradaci TCE není důležitá jen bakteriální kultura, která disponuje touto schopností, ale také substráty, uvedené v tabulce, které jsou klíčové pro indukci katabolických enzymů (oxygenáz). Enzymy jsou bílkoviny s katalytickou aktivitou schopné řídit většinu biochemických procesů v organismu. Trichlorethylen sám není schopen spustit tvorbu daného enzymu v bakteriálních buňkách, takže jako induktor nepůsobí. Transformace substrátu (jak primárních substrátů, tak i TCE) se zahájí katalýzou pomocí oxygenáz, a to tak, že enzym do molekuly substrátu vloží jeden nebo dva atomy kyslíku za přítomnosti NADH nebo NADPH (Todd a kol., 2019). Toto se podařilo doložit v pozdějších letech po objevu degradace TCE několika studiemi, kde se uvádí, že mutanti, kterým chybí toluen dioxygenáza, ztrácí schopnost přeměnit TCE (Wackett a Gibson, 1988; Nelson a kol., 1988; Shields a kol., 1991). V roce 1996 Shih a kol. tuto skutečnost potvrdili také pro směsné



kultury. Zjistili, že bakterie ztrácí degradační schopnost po vyčerpání fenolu a také tehdy, když je fenol nahrazen katecholem coby jediným zdrojem uhlíku a energie.

Širší substrátová specifita mono- i dioxygenáz umožňuje kometabolický rozklad TCE a to tak, že tyto enzymy zcela náhodně interagují i s látkami, které nejsou jejich přirozeným substrátem, a mají schopnost je přeměňovat. Například fenol 2-monooxygenáza může místo fenolu oxygenovat i jiné látky jako resorcinol, kresol, chlorfenoly a aminofenoly, orcinol, pyrogallol (Růžička, 2004).

Ovšem tím, že primární substrát indukuje tvorbu enzymu, tak se v určitých koncentracích zároveň stává inhibitorem přeměny TCE. Oxygenázy totiž v první řadě atakují přirozený substrát. Dokonce sledováním konstant poloviční saturace ( $K_s$ ) bylo zjištěno, že u 13 kmenů využívající fenol, jsou tyto konstanty o 1–2 řady vyšší pro trichlorethylen než pro fenol. (Futamata a kol., 2001) To znamená, že v přítomnosti dostatečně vysoké koncentrace primárního substrátu je nemožné, aby současně docházelo k degradaci TCE. Degradace TCE nastupuje až při postupném vyčerpávání primárního substrátu. Jenže po úplném spotřebování induktoru v buňce nastupují regulační procesy a začíná se blokovat další biosyntéza oxygenáz. Schopnost buněk rozkládat TCE je proto nejúčinnější těsně po využití induktoru a později klesá, protože nedochází k tvorbě potřebných enzymů. Životnost enzymu a doba utilizace cizorodých látek je krátkodobá, ale lze jí obnovit znovu přidáním induktoru (Růžička a kol., 2011).

Překonání výše zmíněných problémů s kometabolickým odstraňováním xenobiotik se zabývalo několik studií. Jedním z řešení nevýhod kometabolismu se stala dlouhodobá kultivace směsných bakteriálních kultur, čisté kultury bylo pro tento účel využíváno méně často. Šlo o spojení kontinuální nebo semikontinuální kultivace a průběžné, sekvenční nebo oddělené degradace TCE (Coyle a kol., 1993; Segar a kol., 1995; Shurtliff a kol., 1996; Shih a kol., 1996). V laboratorních podmínkách byly tyto experimenty úspěšné, to však nutně neznamená, že se stejnou lehkostí pobeží i v přirozených podmínkách. Pro vyřešení problému s inhibicí degradace TCE je možnost využít i geneticky modifikovaných bakterií tak, aby produkce enzymu nezávisela na přítomnosti induktoru. Díky znalosti enzymů, zodpovědných za degradaci, se podařilo vytvořit několik upravených kultur. Jde zejména o tyto kultury *B. cepacia* G4 PR1 (Shields a Reagin, 1992), *Pseudomonas fluorescens* 2-79TOM (Yee a kol., 1998), *Escherichia coli* JM109 (Takami a kol., 2000), *Ralstonia eutropha* AEK301 (Ayoubi a Harker, 1998) nebo *Ralstonia* sp. KN-10A (Ishida a Nakamura, 2000).

## 2 MECHANISMUS KOMETABOLISMU TCE

Mechanismem kometabolického odstranění xenobiotik se poprvé ve své práci zabývali Leadbetter a Foster (1958), kdy pro oxidaci ethanu využili bakterie využívající methan (Shukla a kol., 2012). V dnešní době se kometabolismus ve velké míře aplikuje na enviromentální systémy pro degradaci biologicky odolných sloučenin, jako jsou chlorované aromatické uhlovodíky, chlorované alifatické uhlovodíky, trihalomethany, herbicidy, methyl terc-butylether.

Mezi látky běžně odstraňované kometabolismem patří TCE. TCE je chemická látka, která dost zajímá vědce, protože se široce využívá v mnoha průmyslových odvětvích a stala se tak běžným kontaminantem půd a podzemních vod. Koncentrace TCE v kontaminovaných podzemních vodách se obecně pohybuje od 0,01 do 2 mg/l. Obecně je nutno dodat, že trichlorethylen lze nyní z prostředí odbourávat nejen za přístupu kyslíku právě kometabolismem, ale také redukční dechlorací za anaerobních podmínek (Chen a kol., 2008).

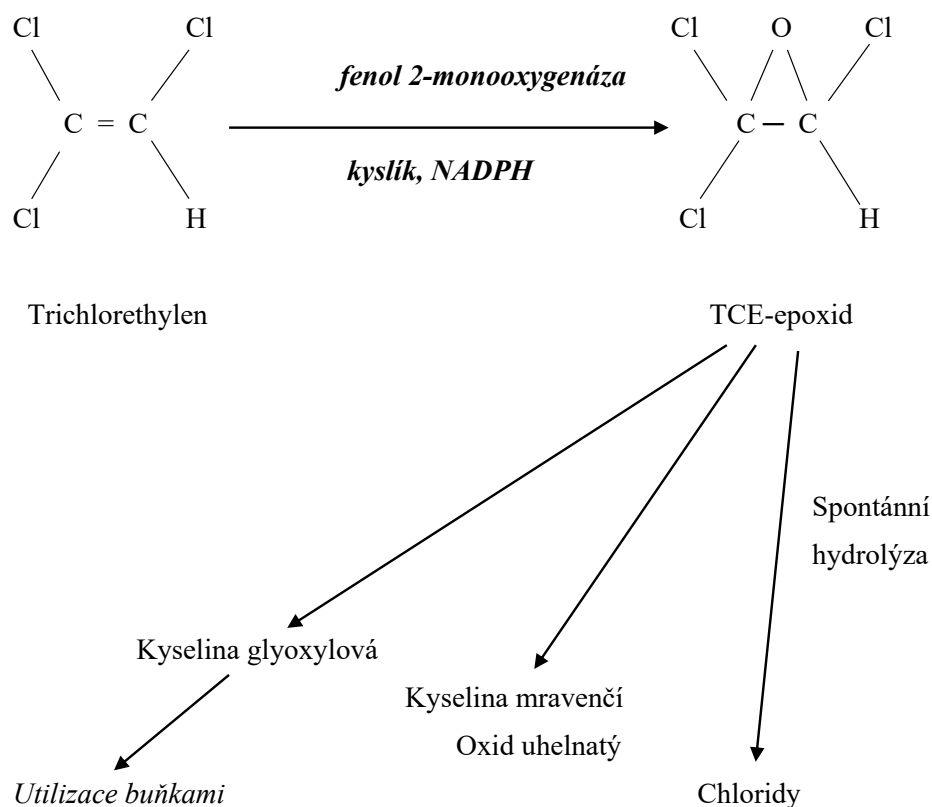
Již v roce 1985 Wilson a Wilson zjistili, že TCE je možné degradovat v aerobním prostředí pomocí methanotrofních bakterií za vzniku oxidu uhličitého (Shukla a kol., 2012). Místo methanu lze využít celou řadu jiných látek. Z alifatických látek je to ethan a propan, propen, butan, isopren, dále aromatické sloučeniny jako toluen, kresol a fenol. Fenol se ukázal jako nejlepší substrát pro bioremediaci hned z několika důvodů; je dobře rozpustný ve vodě a má menší toxicitu a vyšší účinnost (Chen a kol., 2008).

Kometabolickou reakci vyvolává enzym, který je v buňce tvořen na základě indukce danou látkou, kterou bakteriální buňky poté spotřebovávají (fenol, toluen, ...). Významnou prací v této oblasti se stala práce Ishidy a Nakamury, (2000), popisující situaci u kmene *Ralstonia sp.* KN1-10A. Fenol v blízkosti této bakterie indukuje tvorbu dané oxygenázy (fenol 2-monooxygenázy). Po spotřebě induktoru je oxygenáza díky své široké substrátové specifitě schopna působit i na svůj nepřírozený substrát (TCE) a degraduje jej. Účinnost degradace je největší těsně po spotřebě induktoru a v čase klesá. Přeměna TCE oxygenázou spočívá ve vložení jednoho atomu kyslíku do molekuly TCE a tím vznikne TCE-epoxid, který dále podléhá spontánní hydrolyze. V tomto případě vznikne kyselina glyoxylová nebo kyselina mravenčí a oxid uhelnatý. Tabulka 3 znázorňuje tvorbu produktu během degradace TCE bakterií *Ralstonia sp.* KN1-10A.

Tabulka 3 Tvorba produktu během degradace TCE Ralstonia sp. KNI-1OA  
(Ishidy a Nakamury, 2000)

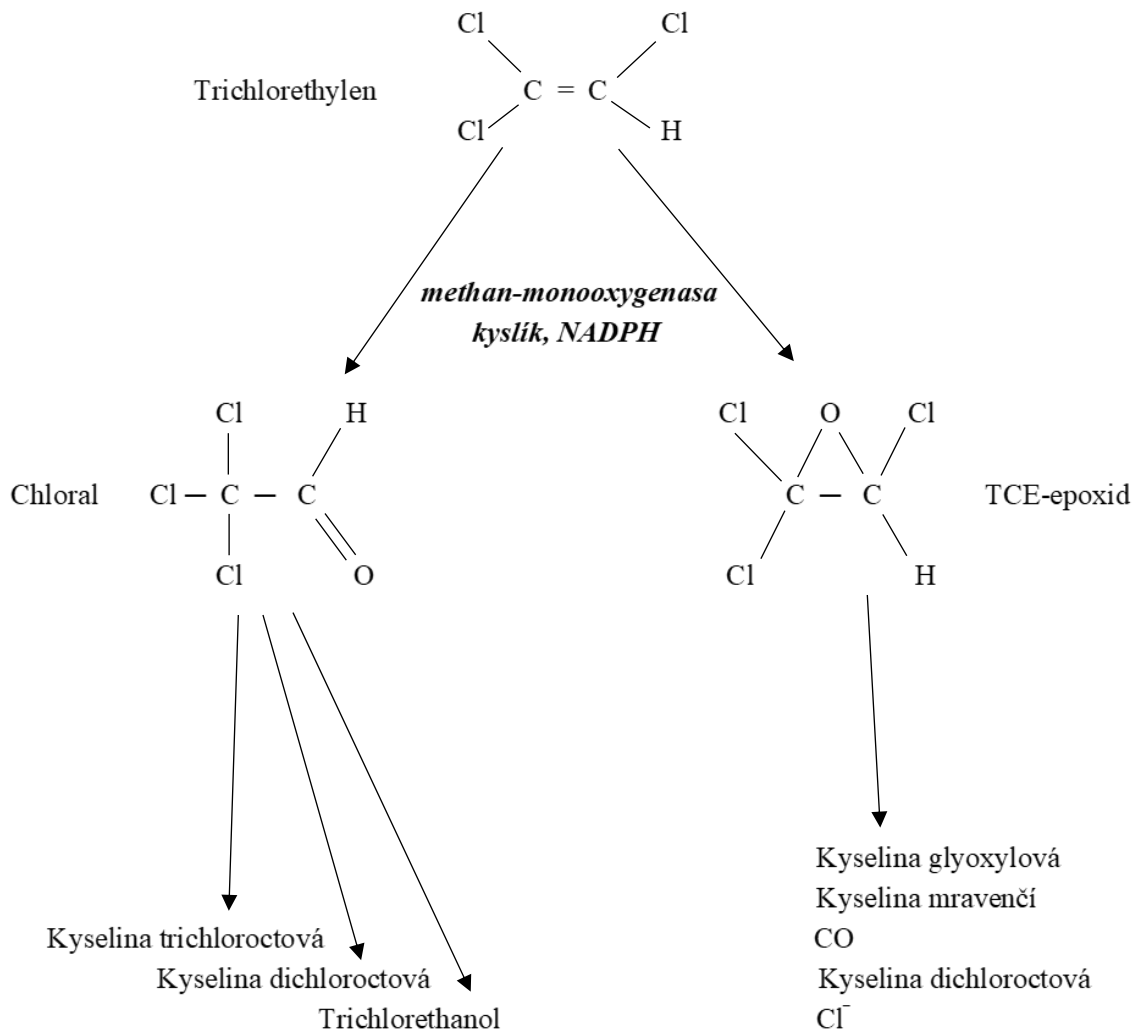
<b>Produkt</b>	<b>mol % degradovaného TCE</b>
<b>Oxid uhelnatý</b>	7,0
<b>Formiát</b>	<6,0
<b>Glyoxalát</b>	<5,3
<b>Kyselina dichloroctová</b>	<0,3
<b>Kyselina trichloroctová</b>	<0,03
<b>Chloral</b>	<0,03
<b>2,2-Trichlorethanol</b>	<0,12

Velmi důležité je to, že touto cestou degradace nedochází ke tvorbě chlorovaných organických látek jako konečných produktů degradace. Atomy chlóru, který představuje nejproblémovější část molekuly TCE, jsou v průběhu degradace uvolňovány ve formě chloridu (až 95 mol%) (Ishida a Nakamura, 2000). Schéma průběhu degradace je na obrázku 1.



Obrázek 2 Schéma degradace TCE bakteriemi *Ralstonia* sp. KNI-10A  
(upraveno z Ishida a Nakamura, 2000)

Již dříve byly objeveny kometabolické dráhy a jejich produkty přeměny TCE bakterií *Methylocystis* sp. M. Degradace byla v tomto případě zajištěna pomocí solubilní methan monooxygenázy. Při této degradaci se TCE v prvním kroku přeměnil z větší části na TCE-epoxid a dále na chloral (2,2,2-trichloracetaldehyd). TCE-epoxid je nestabilní látka a tak se ve vodném prostředí spontánně rozkládá na oxid uhelnatý a mravenčan, kyselinu glyoxylovou a kyselinu dichloroctovou, zatímco z chloralu se redukčně oxidačními reakcemi vytvořily tři chlorované produkty. V první řadě kyselina trichloroctová, v menším množství kyselina dichloroctová a ve velmi nízké koncentraci 2,2,2-trichloroethanol. Produkce hlavního produktu (kyselina trichloroctová) byla závislá na pH, při jakém degradace probíhala. Při pH 6–8 představovala kyselina trichloroctová přibližně 2–8 mol% degradovaného TCE a kyselina dichloroctová pouze 1–2,5 mol% (Saeki a kol., 1999). Schéma teoretických drah přeměny TCE znázorňuje obrázek 2.



Obrázek 3 Schéma degradace TCE bakterií *Methylocystis* sp. M

(upraveno ze Saeki a kol., 1999)

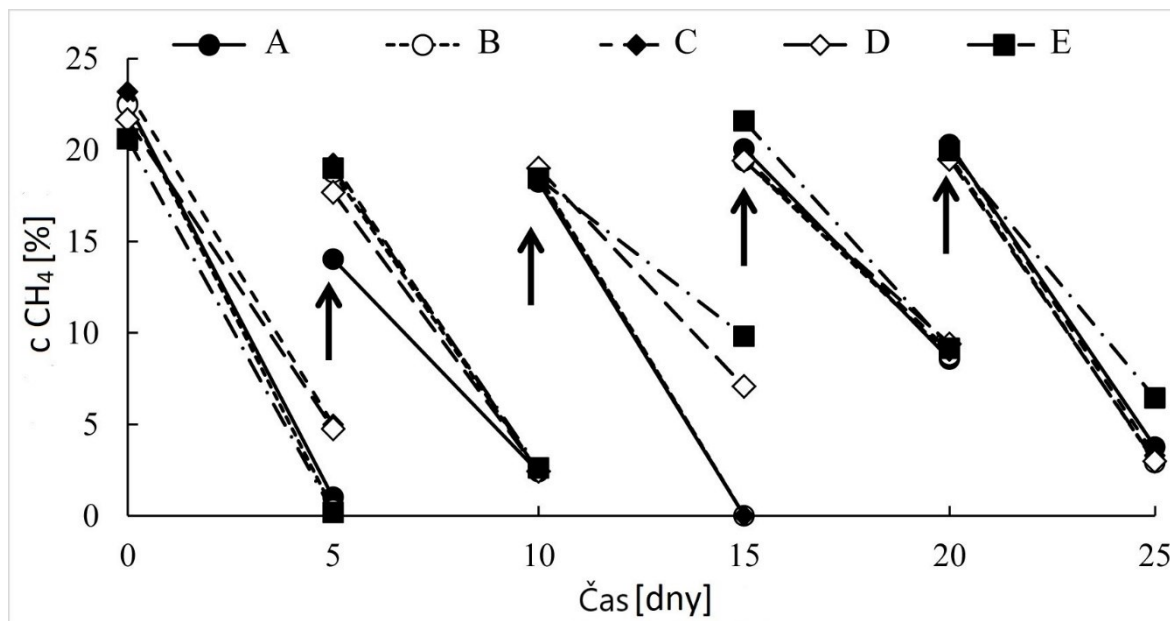
### 3 DEGRADAČNÍ KULTURY

Jak už bylo uvedeno výše v tabulce 2, existuje mnoho substrátů a degradačních kultur. Drtivá většina studií se však zabývá bakteriemi rostoucími na methanu, fenolu nebo toluenu, tedy bakteriemi, které jako degradační enzym vytvářejí methan monooxygenázu, toluen ortho-monooxygenázu, toluen dioxygenázu nebo fenol 2-monooxygenázu. Použití methanu jako substrátu má výhodu v tom, že methan je nejdovatý, ale má i nevýhodu a ta spočívá v jeho plynném skupenství. Naproti tomu fenol je dobře rozpustný a biologicky rozložitelný v nízkých koncentracích, ale při zvýšení koncentrace působí toxicky (Růžička, 2004).

V roce 1995 Speitel a Segar ve své práci popsali pokus, který odhalil, že kultury rostoucí na fenolu rostou oproti methanotrofům rychleji, jsou odolnější proti vlivům prostředí, jak toxických metabolitů, tak jiných chemikálií a snadněji se také váží na případný nosič.

K zajímavým závěrům došli v tomtéž roce Chang a Alvarez-Cohen, kteří měřili transformační kapacitu u čtyř směsných kultur rostoucích na methanu, propanu, toluenu a fenolu. Transformační kapacita označuje celkové množství TCE, vztažené na sušinu buněk, jaké zvládly kultury odbourat po jedné indukci enzymu. Za nerůstových podmínek měla nejvyšší transformační kapacitu methanotrofní kultura a to 50 mg TCE/g sušiny buněk, druhou nejvyšší transformační kapacitu vykazovala kultura rostoucí na fenolu s hodnotou 31 mg TCE/g sušiny buněk. U kultur rostoucích na toluenu a propanu byly hodnoty transformační kapacity o řád nižší, avšak transformační kapacita se dá zvýšit přidáním určitého množství substrátu při vlastní degradaci. Autoři zjistili, že u methanotrofních bakterií je přídavek 20 mM mravenčanu schopen transformační kapacitu dvojnásobně zvýšit a pro bakterie pěstované na fenolu je přídavek 0,1 mM fenolu schopen zvýšit transformační kapacitu jen o 10 %. Vyšší koncentrace fenolu už způsobuje inhibici.

Methanotrofní bakterie byly v podobě směsných kultur (konsorcií) využity pro bioremediaci podzemních vod na Tchaj-wanu. Methanotrofní konsorcia byla izolovaná z podzemních vod, kontaminovaných chlorethy. V plánu bylo ověření úspěšnosti strategie aerobního kometabolismu právě bakteriemi oxidujícími methan, které byly namnoženy na plynném methanu v koncentraci 20 %. Testu bylo podrobena 5 konsorcií (A, B, C, D a E). Využití methanu konsorcií A, B, C se pohybovala od cca 80–100 %. U konsorcií D a E bylo využití methanu o něco nižší. 60–80 % methanu bylo spotřebováno konsorciem D a konsorcium E bylo schopno využít od 40 % až do 90 % metanu. Methan byl opakovaně dávkován v pěti denních rozestupech (Wang a kol., 2019).



Obrázek 4 Využití methanu různými methanotrofními konsorciemi během aklimatizace  
(upraveno z Wang a kol., 2019)

Šipka indikovala přenos mikrobiální kultury a výměnu média.

Pro další experimenty byla vybrána konsorcia A a C. Schopnost odstraňovat TCE byla pro konsorcia analogická s využitím methanu. Úspěšnost degradace TCE konsorciem A byla 70–90 %, což bylo lepší než u konsorcia C, kde se úspěšnost pohybovala mezi 60 a 70 %. U konsorcia C s rostoucí koncentrací TCE klesala účinnost využití methanu, což poukazovalo na skutečnost, že konsorcium A bylo odolnější vůči koncentracím TCE nižším než 3 mg/l. Pro bioremediaci kontaminovaných míst na Tchaj-wanu bylo možné použít metodu kometabolismu. Je však nutné podotknout, že teplota podzemní vody v monitorovaných vrtech dosahovala až 30 °C (Wang a kol., 2019).

### 3.1 Degradální kultury rostoucí na fenolu

Shih a kol. (1996) izolovali ze 4 reaktorů 47 kmenů bakterií, které jsou schopny růst na fenolu. Z těchto kultur však pouze 13 rostlo na fenolu jako čistá kultura a z toho pouze 10 bylo schopno rozkládat TCE. Výraznou degradační schopností pro TCE disponovaly pouze 3 kultury v daném experimentálním prostředí (vstupní koncentrace TCE 1 mg/l, doba degradace 10 dnů, přítomnost 100 mg/l fenolu). Zbylé kultury rozkládaly TCE jen mírně nebo dokonce vůbec.

Friesovi, Forneyovi a Tiedjovi (1997) se podařilo z podzemní vody kontaminované TCE izolovat dokonce 348 bakteriálních kmenů. Schopnost růstu na fenolu nebo na toluenu vykazovalo 273 kmenů, které byly odlišeny metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a zjistilo se, že jde o 63 různých kmenů. Až 60 rostlo na fenolu a z toho 36 dokázalo z 80-100 % rozložit TCE. U ostatních kmenů byla účinnost degradace TCE velmi proměnlivá, pohybující se od 0 až do 60 %.

Tento jev vysvětlil Futamata a kol. (1998), kteří testovali vztah mezi aminokyselinovou sekvencí fenol hydroxylas a schopností odbourávat TCE u 12 kmenů bakterií. Výsledkem bylo rozdělení kultur do tří skupin. První skupina obsahovala kmene s vysokou mírou odbourávání TCE, druhá skupina kmene se střední mírou a třetí s nízkou. Kmene patřící do první skupiny se dále vyznačovaly nízkými hodnotami saturační konstanty  $K_s$  (11-35  $\mu\text{M}$ ) oproti tomu skupina s nízkou mírou odbourávání TCE dosahovala hodnoty saturační konstanty  $K_s$  přes 550  $\mu\text{M}$ . I podle stanovení sekvence aminokyselin v  $\alpha$ -podjednotce fenol monooxygenázy došlo k rozdělení kmenů do tří skupin.

V následující práci Futamaty, Harayamy a Watanabeho (2001) byla měřena rychlostní konstanta degradace  $k_1$  pro koncentraci TCE nejčastěji se vyskytující v podzemních vodách a to 0,5 mg/l. Testům bylo podrobena 13 kmenů a znovu došlo na základě naměřených hodnot rychlostní konstanty  $k_1$  k rozdělení do tří skupin. Skupina s nízkými, středními a vysokými hodnotami rychlostních konstant  $k_1$ . Ve skupině s vysokými hodnotami rychlostní konstanty se nacházely čtyři kultury. Tři byly identifikovány jako *Comamonas testosteroni* a jedna *Burkholderia sp.* Zástupcem skupiny s nízkými hodnotami konstanty  $K_s$  byl kmen *C. testosteroni* R5, který při výše uvedené koncentraci byl schopen TCE úplně rozložit. Naopak, kmen *Pseudomonas putida* P-8, který měl vysokou hodnotu  $K_s$ , TCE nedegradoval vůbec. Závěrem této práce bylo, že pro účinnou bioremediaci je vhodné používat kmene s nízkými hodnotami saturační konstanty tedy kmene, jejichž fenol monooxygenáza má vysokou afinitu k TCE.

Polivtseva a kol. (2020) izolovali nové bakteriální kmene, které jsou schopny využívat fenol. Kmene byly izolovány z nekontaminovaných půd, ale i z půd kontaminovaných polycyklickými aromatickými uhlovodíky (Rusko, Kazachstán). Z těchto půd byly izolovány i kmene schopné růstu na benzoátu, protože tato sloučenina je méně toxická než fenol, a destrukce benzoátu a fenolu zahrnuje tvorbu katecholu v první fázi, jejíž další transformace se provádí pomocí enzymů se stejnou funkcí. Tímto způsobem bylo vybráno cca 80 kmenů. Vybrané kmene byly následně zkoumány na schopnost využívat fenol jako



jediný zdroj uhlíku s jeho obsahem v médiu od 100 do 500 mg/l. Kmeny izolované z různých kontaminovaných a nekontaminovaných půd byly rozděleny opět do tří skupin.

První skupinu tvořilo osm kmenů izolovaných z rhizosféry rostlin pěstovaných v nekontaminované půdě; tyto kmeny byly označeny Fch 1–8. Ty rozložily fenol v koncentraci 100 mg/l. Všechny kmeny této skupiny byly následně kultivovány v minerálním médiu se zvýšenou koncentrací fenolu, až do 300 mg/l. Kmeny (č. Fch 4–8) schopné degradovat fenol v koncentraci 300 mg/l byly dále kultivovány v minerálním médiu obsahující fenol v koncentraci 500 mg/l. Z nich byly nejaktivnější tři kmeny: Fch 5, 7 a 8 (Polivtseva a kol., 2020).

Z kmenů izolovaných z rhizosféry rostlin pěstovaných v kontaminované půdě byl vybrán jeden kmen Fg1 schopný rozkladu fenolu v koncentraci 500 mg/l (Polivtseva a kol., 2020).

Třetí skupina mikroorganismů zahrnovala 17 kmenů izolovaných z kontaminované půdy. Z této skupiny byly pěstovány tři kmeny (8BN, 7B, 13BN) v kapalném médiu obsahujícím 500 mg/l fenolu (Polivtseva a kol., 2020).

Sedm z 81 izolovaných kmenů tedy dokázalo rozložit fenol v koncentraci 500 mg/l (Polivtseva a kol., 2020).

Kmeny byly identifikovány na základě analýzy genu pro 16S rRNA. Ukázalo se, že vybrané kultury lze připsat následujícím fylogenetickým skupinám: kmen 7B, rod *Rhodococcus*; kmen 13BN, rod *Pseudomonas*; kmeny Fch 5, 7 a 8, rod *Stenotrophomonas*; kmen Fg1, rod *Lysinibacillus* sp.; a kmen 8BN, rod *Isoptericola* (Polivtseva a kol., 2020).

Téměř všechny studované kmeny využívaly několik organických sloučenin. Práce tak ukázala na značné zastoupení bakterií využívající fenol ve vnějším prostředí.

### 3.2 Degradální kultury aktivní za snížených teplot

Mikroorganismy adaptované na chlad hrají významnou roli v biodegradaci uhlovodíků i perzistentních organických polutantů (POP) *in situ* (Bajaj a Singh, 2015; Margesin a kol., 2003). Aerobní biodegradace mnoha uhlovodíků, jako jsou n-alkany, aromatické a polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), byla zaznamenána v arktickém, vysokohorském i antarktickém prostředí (Margesin a kol., 2003). Široká škála bakterií, hub a řas má schopnost metabolizovat alifatické a aromatické uhlovodíky a POPs (Bajaj a Singh, 2015; Margesin a kol., 2003). Bylo identifikováno velké množství

degradabilních bakterií odolných vůči chladu. Mezi ně patří zástupci heterotrofních aerobních grampozitivních a gramnegativních rodů (Margesin a kol., 2003)

Mikroorganismy adaptované na chlad se stávají potencionálním zdrojem enzymů aktivních i za nízkých teplot (Gerday a kol., 2000; Bajaj a Singh, 2015).

Při testování 61 bakteriálních kmenů bylo osm kmenů schopných degradovat 2,5 mM fenol během 3–7 dnů při teplotě 10 °C, 10 mM fenol byl zdegradován za 7 dnů a pro degradaci 12,5 mM fenolu bylo potřeba 14–18 dnů. Bakteriální kmeny byly identifikované jako *Arthrobacter* spp. (dva kmeny) a *Pseudomonas* spp. (šest kmenů) (Margesin a kol., 2003).

Co se týče perzistentních organických polutantů, ty jsou sice od 70. let 20. století v mnoha zemích zakázány, ale jejich rozsáhlé používání a nesprávné nakládání v minulosti, vedlo k znečištění značné části životního prostředí. Jejich těkavost přispívá k šíření po celém světě, což představuje globální hrozbu. POPs byly detekovány ve všech geografických oblastech Země i takových lokalitách, kde se nevyskytují žádné významné průmyslové zdroje (Bajaj a Singh, 2015). Zejména POPs v chladném prostředí mohou představovat problém. Vlivem nízké teploty dochází obecně ke snížení rychlosti biologického rozkladu prostřednictvím změn fyzikálních vlastností, jako je zvýšená viskozita, snížená těkavost a snížená biologická dostupnost (Margesin a kol., 2007). Nízká teplota také ovlivňuje mikrobiální aktivitu a snižuje reakční rychlost enzymů (Feller, 2010).

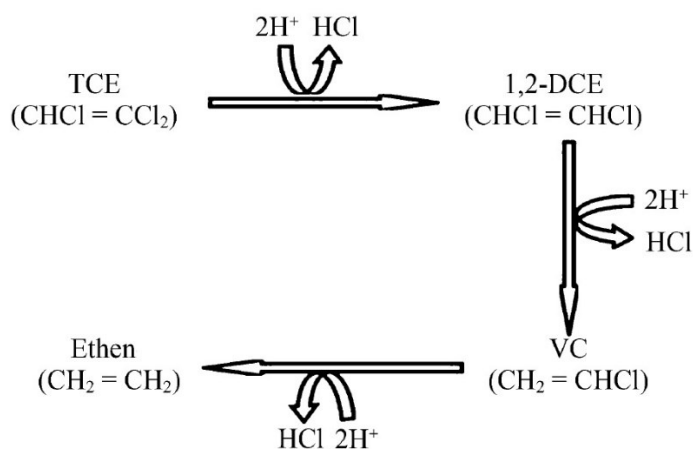
V rešeršní studii byly shrnuty poznatky o několika bakteriálních kmenech adaptovaných na chlad, které byly schopny degradovat některé POPs a jejich metabolity (Bajaj a Singh, 2015). U tří kmenů *Sphingobium* byla prokázána účinná degradace při teplotě 4 °C (Zheng a kol., 2011). Schopnost kometabolizmu polychlorovaných bifenyli (PCB) byla prokázána u *Hydrogenophaga taenospiralis* IA3 -A (Lambo a kol., 2006). Kmen, izolovaný z půdy v mírném klimatu, identifikovaný jako *Pseudomonas* sp. C3211 využíval dibenzofuran (DBF) jako jediný zdroj uhlíku. DBF byl degradován při všech studovaných teplotách (4 °C, 10 °C, 22 °C a 25 °C) (Jensen a kol., 2003).

Ze sedimentu řeky Wei-he byla izolována bakterie rezistentní vůči chladu (kmen QL), která je schopna degradovat 2,2', 3,3', 4,4', 5,5', 6,6'-dekachlorbifenyli (PCB209). Kmen QL byl identifikován jako tyčinkovitý gramnegativní bakteriální kmen, který byl určen jako *Comamonas testosteroni*. *C. testosteroni* nikdy nebyla považovaná za kulturu schopnou degradovat PCB209 při nízkých teplotách. V této studii se ukázalo, že kmen QL může růst v přítomnosti PCB209 jako jediného zdroje uhlíku při nízkých teplotách (10 ± 0,5 °C).

Významnější je, že kmen QL byl ve vysokém inokulu (40 % objemu média) schopen úplně degradovat PCB209 za 140 hodin (počáteční koncentrace PCB209 byla 100–500  $\mu\text{g/l}$  při  $10 \pm 0,5$  ° C a pH 7–8). Proces degradace probíhal s kinetikou reakce nultého řádu. Kromě toho jak laboratorní simulace, tak reálné polní experimenty prokázaly, že kmen QL byl účinný při praktických aplikacích biodegradace PCB209 v kontaminované půdě (Qiu a kol., 2015).

## 4 SOUHRN SOUČASNÝCH SMĚRŮ (TRENDŮ) V BIODEGRADACI TCE

Rešeršní článek Shukla a kol., (2014) shrnuje výsledky mnoha prací, ve kterých byly použité různé mikroorganismy. Autoři se věnovali dvěma hlavním degradačním mechanismům – reduktivní dechloraci a aerobnímu kometabolismu. Reduktivní dechlorace je anaerobní proces, při kterém jsou jako akceptory elektronů využívány chlorované etheny. Za reduktivní dechloraci TCE jsou zodpovědné hlavně tyto kultury: *Clostridium sp.* DC-1, KYT-1, *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, *Desulfuromonas*, *Desulfitobacterium*, *Propionibacterium sp.* HK-1, a *Sulfurospirillum*. V aerobních podmínkách byla zkoumána účinnost degradace TCE kultur následujících rodů: *Nitrosomonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* a *Xanthobacter*. Kromě toho i některé houby (*Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ME-446) a aktinomycety byly použity pro aerobní degradaci TCE. Bioremediace TCE za anaerobních podmínek má vysoký potenciál pro aplikaci *in situ*. K tomu však bude potřebné ještě sebrat data prostřednictvím studií *in situ* a na jejich základě vyvinout ekonomicky příznivý proces bioremediace. Taktéž bude nezbytně nutné poznat stupeň produkce toxických vedlejších produktů. Naproti tomu aerobní kometabolismus se jeví jako levnější a účinnější proces bez toxických meziproductů nebo konečných produktů. Autoři dospěli po rozsáhlém zhodnocení k závěru, že pro zlepšení účinnosti degradace TCE mikroorganismy je třeba využít metabolického inženýrství a molekulárně biologických nástrojů, aby došlo ke zlepšení odolnosti degradačních kultur a bylo možné detailněji posoudit jejich rozmanitost.



Obrázek 5 Mechanismus reduktivní dechlorace (upraveno z Pant a Pant, 2010)

Ve svém přehledu Pant a Pant (2010) uvádí vedle redukční dechlorace a kometabolické degradace ještě třetí způsob sanace TCE, a to přímou oxidaci. Přímá oxidace je proces, kdy jsou chlorované etheny přímo využívány jako donory elektronů, tedy jako primární substrát pro některé bakterie. Několik studií ukázalo, že méně chlorované produkty reduktivní dechlorace, např. vinylchlorid (VC), mohou sloužit jako primární substrát a jisté mikroorganismy jsou schopny během procesu přímé oxidace získávat z chlorovaných ethenů energii a organický uhlík. Stejným způsobem je možné degradovat cis-DCE i trans-DCE. Mezi mikroorganismy, které jsou schopny chlorované etheny využívat jako jediný zdroj uhlíku, patří *Pseudomonas aeruginosa* JI104, který je potencionálním mikrobem pro využití přímo TCE jako jediného zdroje uhlíku.

## 5 DEGRADAČNÍ KULTURA RF2

Kultura RF2 byla izolována z aerobního bioreaktoru v diplomové práci Víta (2001) křížovým roztěrem smíšeného inokula. Identifikace kmene byla provedena pomocí několika testů. Ověření růstu na fenolu se potvrdilo úspěšnou kultivací na fenolovém agaru. Dále bylo provedeno Gramovo barvení, zkoušky na oxidázu a katalázu a také oxidačně-fermentační test. Testy odhalily, že se jedná o gramnegativní aerobní tyčinky obsahující oxidázu i katalázu. Určení kmene proběhlo na základě výsledku mikrotestu NEFERMtest 24 a později pomocí spektra mastných kyselin, stanoveném na pracovišti Krajské hygienické stanice v Ostravě. Podle získaných výsledků byl kmen RF2 vyhodnocen jako *Comamonas testosteroni*, druh dříve známý jako *Pseudomonas testosteroni*.

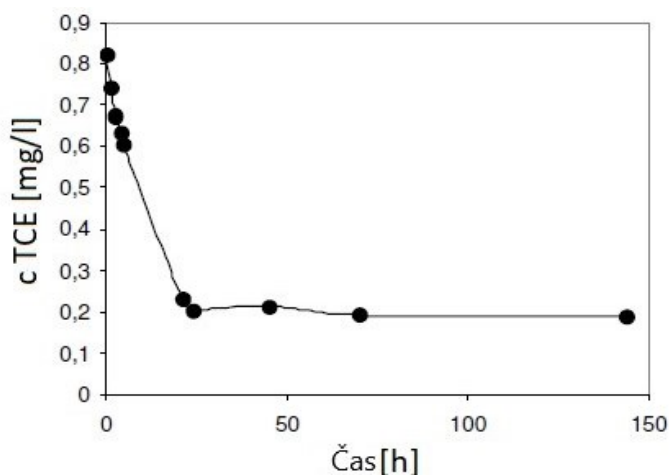
Kultura byla uchovávána na šikmém agaru pod sterilním parafinovým olejem při teplotě 4 °C. Dále byla přeočkována na Petriho misky s masopeptonovým agarem (MPA). Před zahájením nového testu byla přeočkována na nové misky. Kultura je trvale uchovávána v České sbírce mikroorganismů v Brně, pod katalogovým číslem CCM 7350.

### 5.1 Degradáční testy

Z dřívějších studií vyplynulo, že *Comamonas testosteroni* RF2 je schopná za laboratorních podmínek kometabolicky rozkládat TCE. Práce Zálešáka a kol. (2017) se zaměřila na degradaci všech izomerů dichlorethylenu (DCE). Degradáční testy byly provedeny jak pro jednotlivé izomery DCE, tak i pro směs DCE a TCE, která se podobala kontaminované podzemní vodě. Výsledky ukázaly, že kultura dokáže účinně odstranit všechny izomery DCE (nejlépe *c*DCE) i směs všech DCE s TCE, tedy kultura vykazuje potenciál v sanaci podzemních vod kontaminovaných i méně chlorovanými ethyleny.

V roce 2011 se podařilo chemickou mutagenezí *Comamonas testoteroni* RF2 získat kmen VM, který je schopen růst při vyšších koncentracích fenolu. Oba kmeny ve stavu klidových buněk byly schopny degradovat TCE během 22–24 hodin. Degradace obou kmenů vedla k 95 % mineralizaci chloru, ale při degradaci kulturou VM byla zaznamenána mnohem vyšší produkce kyseliny trichloroctové (3,4 mol %) než u kmene RF2 (0,15 mol %). Kvůli pomalému růstu kultury RF2 při koncentraci fenolu 200 mg/l byl pro rychlejší namnožení použit citronan sodný. Poté byl stanoven časový průběh degradace buňkami v klidovém stavu (Růžička a kol., 2011). Klidové buňky jsou takové buňky, u kterých neprobíhá dělení a endogenní dýchání je omezeno. Klidové buňky jsou morfologicky odlišné od buněk

rostoucích nebo vegetativních a ve většině případů jsou buňky klidové odolnější vůči nepříznivým podmínkám než buňky vegetativní (Sudo a Dworkin, 1973). Výsledky jsou graficky znázorněny na Obr. 5. Rozklad proběhl za 22–24 hodin.



Obrázek 6 Průběh degradace trichlorethylenu klidovými buňkami *Comamonas testosteroni* RF2 (upraveno z Růžička a kol., 2011)

Časový průběh degradace kmenem VM vykazoval podobné schéma jako u kmene RF2.

Pro aplikaci buněk přímo do kontaminované podzemní vody je důležitým předpokladem schopnost množení buněk za přítomnosti TCE, tedy degradace TCE za růstových podmínek. Růst kmenů RF2 a VM byl testován na směsi fenolu a laktátu za přítomnosti různých koncentrací TCE (0,8 – 50 mg/l) (Růžička a kol., 2011). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4 Degradace TCE pomocí RF2 a VM po růstu na laktátu a fenolu za přítomnosti TCE (Růžička a kol., 2011)

c TCE [mg/l]	Růst kultur		Množství odstraněného TCE [%]	
	RF2	VM	RF2	VM
<b>0,76 ± 0,02</b>	++	++	100	100
<b>1,5 ± 0,03</b>	++	++	100	100
<b>5,05 ± 0,14</b>	++	++	54,6 ± 2,2	73,8 ± 1,6
<b>10,0 ± 0,26</b>	++	++	28,7 ± 1,4	39,7 ± 2,1
<b>25,2 ± 1,1</b>	++	++	N	10,0 ± 0,8
<b>49,8 ± 1,7</b>	+	++	N	0

+: růst po 72 h, ++: růst po 24 h, N: netestováno

U obou kultur se prokázala schopnost růstu za přítomnosti TCE. Růst kultury RF2 při koncentraci 50 mg/l TCE byl pomalejší a nedošlo k úplné degradaci, růst kmene VM na stejné koncentraci byl rychlejší, ale i tak bakterie nebyly schopny TCE zcela rozložit.

Z důvodu velkého významu konečných produktu biodegradace TCE bylo stanoveno množství vznikajících chloridu a kyseliny trichloroctové u obou kmenů. Hladiny chloridu a kyseliny trichloroctové jsou uvedeny v tabulce 5 (Růžička a kol., 2011)

Tabulka 5 Tvorba kyseliny trichloroctové a chloridů po degradaci TCE u obou kmenů (Růžička a kol., 2011)

Produkce chloridů		Produkce kyseliny trichloroctové	
[mol %]		[mol % degradovaného TCE]	
RF2	VM	RF2	VM
97,8	95,3	0,15	3,4

*Comamonas testosteroni* RF2, pokud je pěstována na fenolu a laktátu, je tedy schopná s vysokou účinností kometabolizovat TCE i všechny izomery DCE. *C. testosteroni* RF2 může také tvořit konsorcia s kmeny degradujícími vinylchlorid (VC) jako je *Mycobacterium aurum* L1. Konkrétně toto konsorcium se ukázalo jako vhodné pro odstranění *c*DCE a VC z binární směsi a stejně tak pro degradaci směsi TCE, všech izomerů DCE a VC. Účinnost degradace pro všechny sloučeniny byla téměř 100 % (Zálešák a kol., 2021).



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 METODIKA

### 6.1 Materiály

Pro tuto diplomovou práci byla použita řada roztoků, živných médií, chemikálií a biologického materiálu.

#### 6.1.1 Roztoky

##### *Fyziologický roztok (FR)*

8,5 g NaCl v 1000 ml destilované vody.

##### *Roztok A*

9,07 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 1000 ml destilované vody.

##### *Roztok B*

23,90 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  v 1000 ml destilované vody.

##### *Roztok stopových prvků*

$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,043 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	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 médium (MM) – 100 ml*

Roztok B .....	8 ml
Roztok A .....	2 ml
Destilovaná voda .....	86 ml
Roztok $\text{NH}_4\text{Cl}$ (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 NaCl (50 g/l) .....	1 ml
Roztok stopových prvků .....	0,15 ml
pH média v rozmezí 7,4–7,5	

### 6.1.2 Živná média

Tryptone Yeast extract Agar (TYA) (Himedia)

Minerální agar s fenolem (250 mg/l) a tryptonem (50 mg/l) – MAFt agar

Složení MAFt (na 100 ml):

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	0,1 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	0,11 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,02 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,001 g
$\text{CaCl}_2$ .....	0,001 g
Roztok stopových prvků.....	0,1 ml
Agar.....	2,0 g
Trypton.....	0,005 g
Voda destilovaná.....	100,0 ml

Po sterilizaci a zchladnutí pod 60 °C bylo přidáno 0,5 ml zásobní roztok fenolu (50 g/l), do koncentrace 250 mg/l, směs byla promíchána a rozlévána do misek.

### 6.1.3 Chemikálie

Fenol (Sigma-Aldrich)

Laktát sodný (LN, Sigma-Aldrich)

Trypton (T, Himedia)

Kvasniční extrakt (KE, Himedia)

MEM vitamíny (Biosera)

Methanol (Penta)

Trichlorethylen (Sigma-Aldrich)

Příprava vodného roztoku trichlorethylenu:

Do plynotěsné lahvičky s ventilkem mininert ON/OFF s plynotěsným septem bylo nadávkováno 1,5 ml destilované vody a následně přidáno cca 50  $\mu$ l trichlorethylenu. Poté byla směs dokonale míchána po dobu minimálně 15 minut, pak ponechán trichlorethylen sedimentovat minimálně 24 hodin.

#### **6.1.4 Biologický materiál**

Kultura RF2 byla izolována z aerobního bioreaktoru v diplomové práci Daniela Víta (2001). Testy odhalily, že se jedná o gramnegativní aerobní tyčinku. Bakterie byla určena jako *Comamonas testosteroni*. Kultura je uložena v České sbírce mikroorganismů v Brně, pod číslem CCM 7350.

## **6.2 Přístroje a laboratorní pomůcky**

### **6.2.1 Přístroje**

Plynový chromatogram HEWLETT PACKARD 5890 (USA)

Integrátor HEWLETT PACKARD 3396 (USA)

Koncentrátor TEKMAR LSC 2000 (USA)

UV-VIS spektrofotometr UNICAM UV 500 (Thermo Spectronic, USA)

Třepačka VWR (USA)

Chladnička s mrazákem (Ardo, ČR)

Lednička GZ 48 (GUZZANTI, Itálie)

Inkubátor MY TEMP Mini (Benchmark, Německo)

Laboratorní autokláv (Sanoclav, St-MCS-203, 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)

### 6.2.2 Laboratorní pomůcky

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

Mikrodávkoč (Hamilton, USA)

Zkumavky (Gama, ČR)

Vzorkovnice Sample Vials – 40 ml uzavřené silikonovými septy s teflonovou folií a šroubovými polypropylenovými uzávěry (Supelco, USA)

Mikrozkumavky (eppendorfy)

Filtr Ahlstrom ReliaPrep - 0,2  $\mu$ m (Ahlstrom, Německo)

## 6.3 Metody měření

### 6.3.1 Měření optické hustoty na densilametri

Densilametr je přístroj, který je určen pro stanovení hustoty bakteriální suspenze (zákal). Přístroj měří optickou absorbanci a naměřené hodnoty jsou přímo přístrojem převedeny do jednotek dle McFarlanda. Rozsah měření přístroje se pohybuje od 0–15 McF. Měření trvá cca 1 vteřinu. Měření probíhá ve zkumavkách o průměru 15–18 mm, standardně o průměru 16 mm a objemu 15 ml z polystyrenu.

### 6.3.2 Měření obsahu fenolu na UV-VIS spektrofotometru UNICAM UV 500

UV-VIS spektrofotometr UNICAMUV 500 je dvoupraskový spektrofotometr s pevnou šířkou štěrbiny 1,5 nm a rozsahu vlnových délek ( $\lambda$ ) 190–900 nm. Přístroj se skládá ze čtyř částí. Zdroj záření (emisní systém) je pro UV (ultrafialové) záření deuteriová výbojka ( $\lambda=180–360$  nm) a pro VIS (viditelná) oblast je to wolframová žárovka ( $\lambda=360–3000$  nm). Monochromátor, tedy disperzní systém je tvořen vstupní a výstupní štěrbinou, zrcadlovou soustavou a rozkladným prvkem (reflexní mřížka). Absorpčním prostředím jsou kyvety s měřeným a srovnávacím roztokem. Pro UV oblast se používají kyvety křemenné a pro VIS

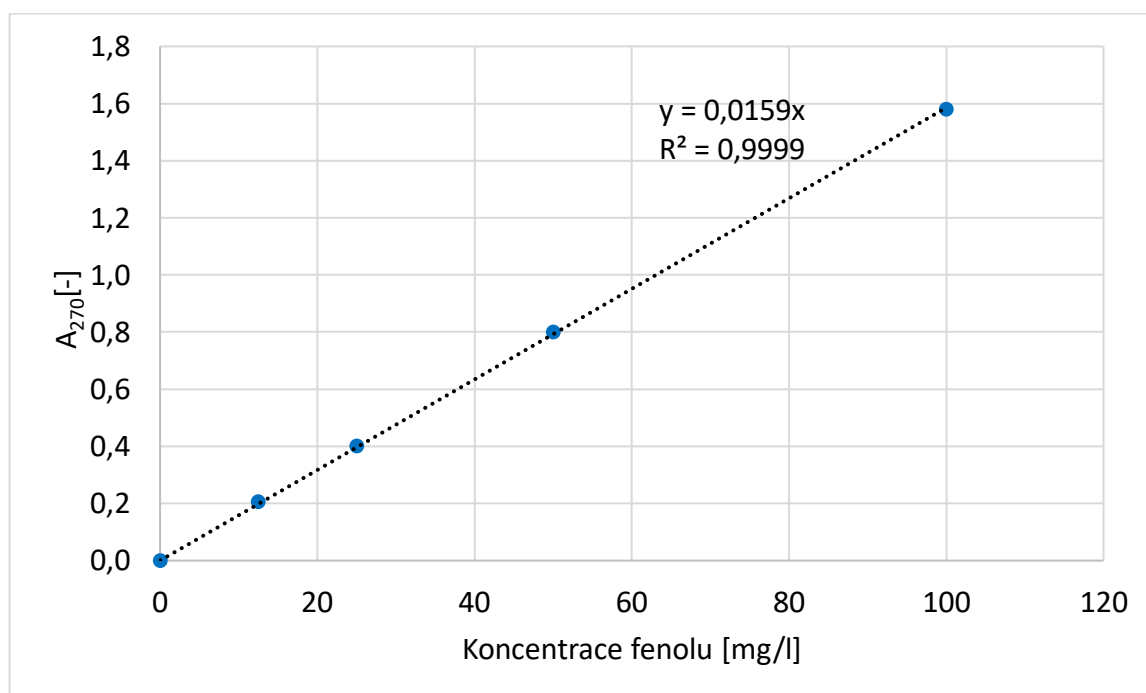
oblast skleněné nebo plastové. Detektorem v tomto zařízení je fotonásobič. Pro zpracování odezvy je používáno elektronické zařízení.

### 6.3.2.1 Kalibrační křivka pro stanovení fenolu

Byly připraveny roztoky fenolu v destilované vodě o koncentracích 100; 50; 25; 12,5 a 0 mg/l. U roztoku byla měřena absorbance při vlnové délce 270 nm ( $A_{270}$ ).

Tabulka 6 Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku pro stanovení fenolu

Koncentrace [mg/l]	$A_{270}$ [-]	Průměr
0	0	0,000
12,5	0,205	0,206
25	0,400	0,400
50	0,799	0,800
100	1,58	1,58



Obrázek 7 Kalibrační křivka pro stanovení fenolu

### 6.3.3 Měření obsahu TCE pomocí plynové chromatografie (GC)

Analýza vzorku probíhala na třech propojených zařízeních. Prvním přístrojem, do kterého vstupuje analyzovaný vzorek, je koncentrátor TEKMAR LSC 2000. Dále vzorek postupuje

do plynového chromatografu HEWLETT PACKARD 5890. Vyhodnocení a vyištění chromatogramu probíhá v integrátoru HEWLETT PACKARD 3396.

### **6.3.3.1 Koncentrátor TEKMAR LSC 2000**

Koncentrátor prochází automatický jednotlivé kroky popsané níže a je řízen mikroprocesorem. Inertní plyn (dusík) je současně plynem stripovacím i nosným. S kolonou plynového chromatografu je propojen vyhřívanou trubicí.

Do koncentrátoru byl vzorek dávkován dávkovačem Hamilton o objemu 5 nebo 1 ml. K zakoncentrování sledované látky, tedy TCE, byla použita metoda Purge and Trap. K extrakci látky došlo stripováním inertním plynem (dusík). Inertní plyn reagoval s matricí nesoucí těkavou látku (VOC). Uvolněná těkavá látka se sorbovala na trap (trubice se sorbentem). Po zahřátí trapu se látka uvolnila ze sorbentu a pokračovala do plynového chromatografu k detekci.

Předvolené kroky operačního systému koncentrátoru:

STANDBY (35 °C) – klidová poloha, ustalování počátečních podmínek

PURGE READY – podmínky ustáleny, dávkování vzorku

PURGE (11 minut) – dochází k uvolnění těkavých látek z matrice vzorku pomocí inertního plynu (dusík). Do stripovací nádoby se vzorkem je přiveden inertní plyn. Dochází k uvolnění těkavé látky ze vzorku. VOC je následně zachycena na sorbent v trapu, tím se koncentruje a inertní plyn prochází zařízením bez zadržení. Nosný plyn prochází šesticestným ventilem koncentrátoru do GC.

DRY PURGE (3-4 minuty) – sušení, odstranění zkondenzované vody pomocí inertního plynu, který prochází trapem.

DESORB READY – vzorek je připraven k poslání do GC

DESORB PREHEAT (245 °C) – předehřátí trapu, před desorpcí, na teplotu o několik stupňů nižší, než je teplota desorpce, dochází k uvolnění VOC z absorbentu.

DESORB (4 minuty; 250 °C) – vyhřátí trapu na teplotu 250 °C, vzorek je vypuzen do GC. Vzorek je vypuzen z trapu opačným směrem, než na něj byl zachycen, a to pomocí otočení směru proudění inertního plynu šesticestným ventilem.

INJECT

BAKE (5 minuty; 260 °C) – vypékání trapu zajistí odstranění případných zbytků předchozího vzorku a vody. Opětovným prouděním inertního plynu jako v kroku RURGE, jsou odváděny zbytky organických látek.

### **6.3.3.2 Plynový chromatograf HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II**

Součástí plynového chromatografu je kapilární kolona QUADREX se stacionární fází - Methy Phenyl Cyanopropyl Silicone, o délce 30 m, s vnitřním průměrem 530 µm a tloušťkou filmu 3 µm. GC obsahuje dva detektory. Detektor elektronového záchytu (ECD) a plamenoionizační detektor (FID).

Nastavené parametry: OVEN TEMP 35 °C; INIT VALUE 35 °C; INIT TIME 10 min; RATE 4 DEG/min; FINAL TEMP 150 °C, FINAL VALUE 150; FINAL TIME 5,00; INJ A TEMP OFF; INJ B TEMP OFF; DET A TEMP ON 230 °C; DET B TEMP OFF; DET A (FID) ON; DET B (ECD) OFF.

Nastavení plynového chromatografu proběhlo v souladu s normami ČSN EN ISO 15680 a ČSN EN ISO 10301.

### **6.3.3.3 Integrátor HEWLETT PACKARD 3396 SERIES II**

Integrátor vyhodnocuje signál z detektoru FID (ECD). Výstupem je chromatografický záznam na papírovém nosiči. Na chromatogramu jsou zaznamenané píky patřící sledovaným VOC podle jejich retenčních časů. Součástí chromatogramu je zápis o množství sledované látky (plocha píku).

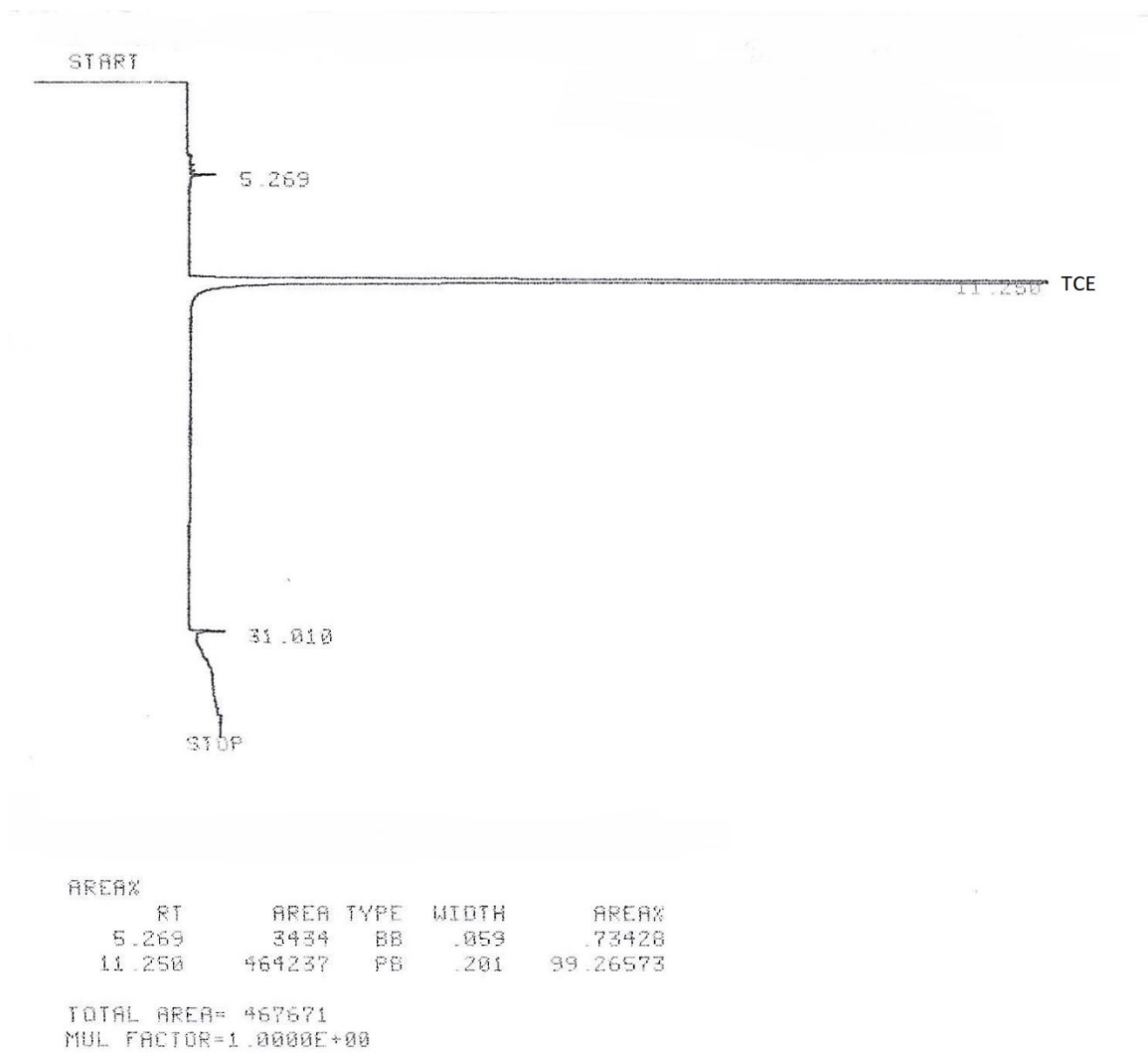
Nastavené parametry:

[ZERO]	5 – nastavení pozice chromatografické základní linie na papíru
[ATT 2]	2 – nastavení citlivosti
[CHT SP]	0,3 – definuje rychlost papíru pro zapisovač
[AR REJ]	0 – definuje minimální plochy pro záznam píků
[THRSH]	2 – definuje minimální šířky pro detekci píků
[PK WD]	0,04 – nastavení očekávané šířky píků na hodnotu optimální pro kvantifikaci



### 6.3.3.4 Chromatogram

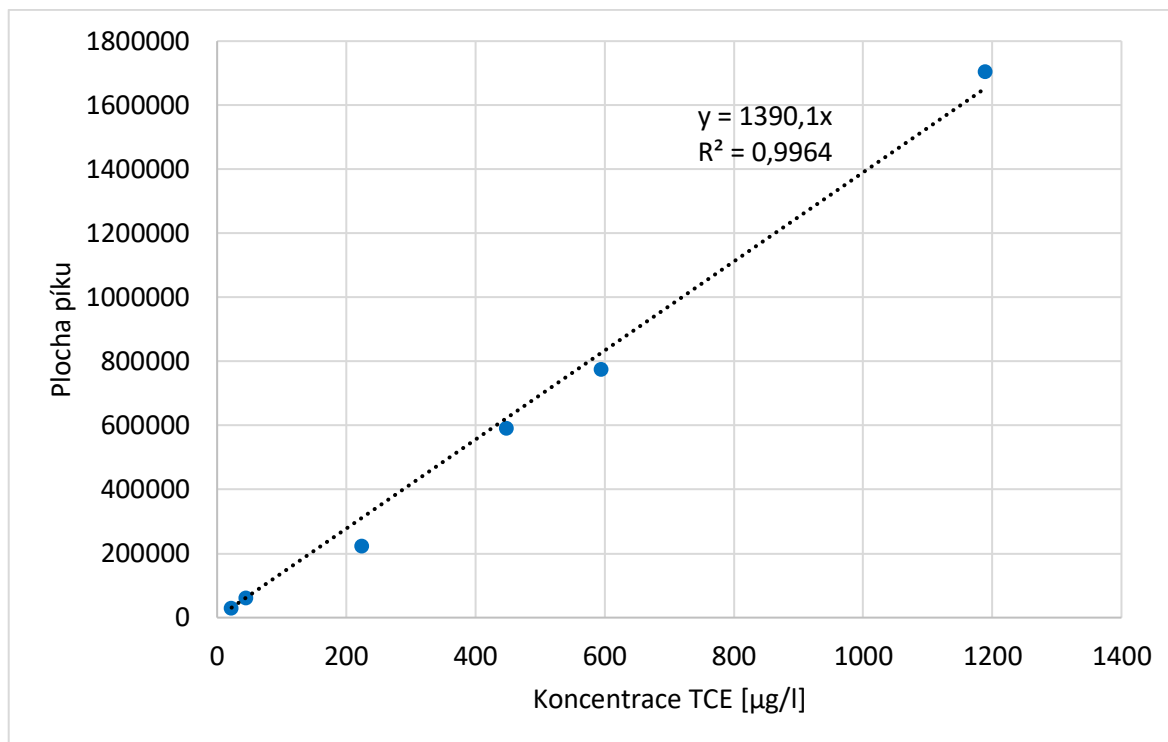
Na chromatogramu z detektoru FID jsou informace o čase, kdy byla látka detekována a pík měřené látky s danou plochou. Kvantitativní informace jsou uvedeny pod chromatogramem ve formě reportu viz obrázek 6.



Obrázek 8 Chromatogram vzorku obsahující TCE z detektoru FID

### 6.3.3.5 Kalibrační křivka

Byly připraveny tři standardy TCE o koncentraci 223,9; 2239 a 5945 mg/l. Každá koncentrace byla dávkována do Tekmaru v množství 1 a 0,5  $\mu$ l stříkačkou Hamilton o objemu 1  $\mu$ l do objemu 5 ml demineralizované vody. Koncentrace odpovídající dávkovaným objemům roztoků činila (22,39; 44,78; 223,9; 447,8; 594,5; 1189  $\mu$ g/l) TCE. Každá koncentrace byla proměřená dva krát vedle sebe. Na základě sestavené kalibrační křivky byly odečítány skutečné koncentrace TCE ve vzorcích.



Obrázek 9 Kalibrační křivka pro stanovení TCE z detektoru FID

## 6.4 Postupy

### 6.4.1 Ověření růstu *Comamonas testosteroni* RF2 na fenolu za různých teplot

Pro pokus bylo připraveno 300 ml MM s pH 7,4. MM bylo rozděleno po 100 ml do 3 láhví a vše následně sterilizováno v autoklávu. Dalším krokem bylo připravit zásobní roztok (ZR) fenolu (50 g/l). Bylo naváženo 2,5 g fenolu a rozpuštěno ve 45 ml destilované vody, poté doplněno do 50 ml. Sterilizace byla zajištěna filtrací přes sterilní ultra filtr s porozitou 0,2 µm. ZR byl uchováván ve tmě. Příprava minerálního média s fenolem (MMF) byla následující: do 100 ml sterilního MM bylo asepticky přidáno 0,4 ml sterilního ZR fenolu. MMF bylo důkladně promícháno a rozplněno po 4 ml do 15 sterilních zkumavek. Koncentrace fenolu byla 200 mg/l.

Z 15 zkumavek s MMF bylo 8 zaočkováno 10 µl suspenze kultury RF2 (1. stupeň McFarlandovy stupnice). Následně byla změřena optická hustota (OD) na densilometru. 4 zkumavky byly inkubovány při 25 °C a další 4 při 15 °C. Čtyři zkumavky s MMF nebyly očkované. Také u nich byla změřena OD na densilometru. Dvě zkumavky byly inkubovány při 25 °C a dvě při 15 °C spolu s naočkovanými (kontrola A). Do čtyřech zkumavek bylo dávkováno 4 ml MM a byly zaočkované 10 µl suspenze kultury RF2, opět byla změřena OD

a po dvou byly inkubovány při každé výše zmíněné teplotě spolu se zbylými zkumavkami (kontrola B). Hodnoty zákalu u všech kontrol by měly být v rozmezí 0,0–0,1.

Inkubace probíhala za stejných podmínek s výjimkou teplot. Před hodnocením byly zkumavky důkladně, ale opatrně promíchány, aby nevznikly bublinky, jelikož pro měření na densilometru je tento jev nežádoucí. Měření probíhalo po celou dobu inkubace, tedy 14 dní a každý den kromě víkendových dnů.

#### **6.4.2 Ověření růstu RF2 na pevných živných půdách**

Kultivace na pevných živných půdách:

Vyočkována byla kultura RF2 ze zkumavek A a C, inkubovaných při 15 °C, z předchozího pokusu, na TYA agary. Dále byly připraveny 3 typy živných půd: TYA agar, TYA agar s fenolem 200 mg/l, po sterilizaci byl přidán sterilní ZR fenolu a minerální agar s fenolem (250 mg/l) a tryptonem (50 mg/l) (MAFt). Kultura RF2 z dříve použitých TYA agarů inkubovaných při 15 °C, byla přeočkována na TYA agary a na MAFt agary a inkubována při 15 °C i při 9 °C. Pro další pokus byla použita kultura RF2, která byla vyočkována na TYA agar z -80 °C. Tato kultura byla následně naočkována na TYA agar a na MAFt agar a kultivována při 9 °C. Dále byl připraven TYA agar s koncentrací fenolu (200 mg/l) (TYA+F).

#### **6.4.3 Ověření růstu RF2 v tekutých médiích**

Pro pokus bylo připraveno MM o objemu 600 ml a sterilizováno po 300 ml v autoklávu. Do sterilní dávky 300 ml MM bylo asepticky přidáno 1,5 ml sterilního ZR fenolu a dobře promícháno. Vzniklo MMF o koncentraci 250 mg/l fenolu. MMF bylo rozplněné po 3 ml do sterilních zkumavek, ty byly uchovávány ve tmě a chladu. Dvě zkumavky s MMF byly naočkovány kulturou z TYA agaru a další dvě zkumavky byly naočkovány kulturou rostoucí na MAFt agaru kultivována při 9 °C (kultura vyočkována z -80 °C). Z každé dvojice jedná zkumavka byla inkubována v klidu při 9 °C a na třepačce při 13 °C.

Ze zkumavky s MMF naočkováná kulturou RF2 z MAFt agaru a kultivována při 13 °C (použitá výše), byly zaočkovány další 4 zkumavky 10 µl a dvě byly kultivovány při 13 °C a dvě při 8 °C

Dále byla připravena suspenze kultury RF2 rostoucí na TYA+F o hustotě 1,2 McF. Suspenzi o objemu 30, 300 a 600 µl bylo zaočkováno 5 zkumavek s 3 ml MMF a inkubovány při 9 °C a 13 °C

#### 6.4.4 Urychlení adaptace na fenol při nízkých teplotách

Bylo připraveno 100 ml sterilního MM, které bylo smícháno s 0,5 ml ZR fenolu (50 g/l). vzniklo MMF s koncentrací fenolu 250 mg/l. Směs byla asepticky rozplněna po 3,2 ml do 30 zkumavek. Další 100 ml sterilního MM bylo smícháno s 0,5 ml sterilní destilované vody a rovněž asepticky rozplněno po 3,2 ml do 26 zkumavek. Dále byly připraveny ZR tryptonu (T), kvasničného extraktu (KE) a laktátu sodného (LN) o koncentraci 250 mg/l. Navážka pro T a KE byla 25 mg. Toto množství bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody a následně sterilizováno v autoklávu. Pro LN (60% roztok) navážka činila 42 mg. Navážené množství bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody a také sterilizováno v autoklávu. Suspenze kultury RF2 byla připravená z kultury kultivované na TYA agar s fenolem (1. stupeň McFarlandovy stupnice).

Dávkování:

4 zkumavky s MMF byly asepticky doplněny jen 0,8 ml sterilní destilované vody.

4 zkumavky s MMF byly doplněny 0,8 ml sterilního ZR tryptonu.

4 zkumavky s MMF byly doplněny 0,8 ml sterilního ZR KE.

4 zkumavky s MMF byly doplněny 0,4 ml roztoku KE a 0,4 ml roztoku tryptonu.

4 zkumavky s MMF byly doplněny 20 µl sterilního roztoku MEM vitamínů a 720 µl sterilní destilované vody.

4 zkumavky s MMF byly doplněny 0,8 ml sterilního ZR LN.

4 zkumavky s MM byly asepticky doplněny jen 0,8 ml sterilní destilované vody.

4 zkumavky s MM byly doplněny 0,8 ml sterilního ZR tryptonu.

4 zkumavky s MM byly doplněny 0,8 ml sterilního ZR KE.

4 zkumavky s MM byly doplněny 0,4 ml roztoku KE a 0,4 ml roztoku tryptonu.

4 zkumavky s MM byly doplněny 20 µl sterilního roztoku MEM vitamínů a 720 µl sterilní destilované vody.

4 zkumavky s MMF byly doplněny 0,8 ml sterilního ZR LN.

Každá zkumavka byla naočkována 15 µl suspenze RF2 (bez vyfukování) a následně byly zkumavky dobře promíchány a změřeny na densilometru.

Z každé čtveřice byly dvě zkumavky inkubovány při 13 °C v inkubátoru na třepačce a další dvě v chladničce na třepačce při 9 °C. OD byla měřená každý den po dobu 15 dnů.

#### 6.4.5 Růst kultury *Comamonas testosteroni* RF2 v přítomnosti TCE za teploty 13 °C (podíl fenolu s laktátem 150 + 50 mg/l)

Bylo připraveno 300 ml MM, ke kterému bylo přidáno 60 ml ZR LN za vzniku minerálního média s laktátem sodným (MML). Dále byl připravený vodný ZR TCE (1,1 g/l) a methanolický ZR TCE (50 g/l). Pro suspenzi byla použita kultura RF2 kultivovaná při 25 °C a 13 °C a sterilní FR.

Do 300 ml MML bylo přidáno 0,9 ml ZR fenolu (50 g/l) a rozplněno po 10 ml do 20 sterilních plynotěsných vialek o objemu 40 ml. 10 z nich bylo na 45 minut vloženo do chladničky a zchlazeno, následně byly tyto vialky zaočkovány 15 µl suspenze kultury rostoucí při 13 °C. Do zbylých 10 vialek bylo přidáno 15 µl suspenze kultury rostoucí při 25 °C. Pak do každé vialky bylo přidáno množství TCE uvedené v tabulce 7 a okamžitě uzavřeno septem a uzávěrem.

Tabulka 7 Přídavek TCE do vialek

Vialky	Přídavek TCE [µl]	Typ roztoku	Koncentrace TCE ve vodné fázi [mg/l]
1+2	-	-	0,0
3+4	30	vodný	1,5
5+6	100	vodný	5,0
7+8	4	methanolický	10
9+10	10	methanolický	25

Vialky byly kultivovány při 25 a 13 °C po dobu 7 dnů. Růst kultur byl vizuálně porovnáván se standardy dle McFarlanda. Pět standardů bylo připraveno podle rozpisu v tabulce 8 v nesterilních vialkách.

Tabulka 8 Příprava standardů dle McFarlanda

Standard	Roztok 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [ml]	Roztok 1% BaCl <sub>2</sub> [μl]
0,3	9,97	30
0,6	9,94	60
0,9	9,91	90
1,2	9,88	120
1,5	9,85	150

#### 6.4.6 Růst kultury *Comamonas testosteroni* RF2 při snížených koncentracích fenolu, při teplotě 8-9 °C

Bylo připraveno 300 ml MM a následně rozděleno po 100 ml na 3 části. Jedna sterilní dávka zůstala bez substrátu. Do druhé sterilní dávky MM bylo asepticky přidáno 0,4 ml ZR fenolu (50 g/l) a vzniklo MMF s koncentrací fenolu 200 mg/l. Do nesterilní dávky MM bylo přidáno 34 mg sirupu LN a následně bylo sterilizováno. Vzniklo MML s koncentrací LN 200 mg/l. Všechny média byla před dalším použitím zchlazená v chladničce. Suspenze RF2 byla připravená z kultury kultivované při 13 °C.

Bylo sterilizováno 22 plynotěsných vialek o objemu 40 ml. Do nich byly asepticky pipetovány objemy sterilních médií dle tabulky 9. Pak byly všechny vialky zaočkovány 15 μl suspenze RF2. Kultivace probíhala při 8-9 °C na třepačce. Zákal byl odečítán obden po dobu 22 dnů podle standardů připravených v předchozím pokusu a poslední den byly vialky intenzivně protřepány, přelity do zkumavek a OD změřeno na densilometru.

Tabulka 9 Množství použitého média

Vialky	Substrát [mg/l]	MMF [ml]	MML [ml]	MM [ml]
1+2	žádný	-	-	10
3+4	fenol 75	3,75	-	6,25
5+6	fenol 100	5,0	-	5,0
7+8	fenol 150	7,5	-	2,5
9+10	fenol 200	10	-	-
11+12	laktát 150	-	7,5	2,5
13+14	laktát 100	-	5,0	5,0
15+16	laktát 75	-	3,75	6,25
17+18	fenol 75 + laktát 75	3,75	3,75	2,5
19+20	fenol 100 + laktát 100	5,0	5,0	-
21+22	fenol 150 + laktát 50	7,5	2,5	-

#### 6.4.7 Růst kultury *Comamonas testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 8 °C a různých inokulech

Pro tento pokus bylo připraveno 900 ml MM a následně přidáno 150 mg LN. Vzniklo MML o koncentraci LN 100 mg/l. Tento objem byl rozdělen na 12 dávek po 60 ml do láhví o objemu 250 ml. Všechny láhve i zbylých 180 ml bylo sterilizováno. Šest láhví (7-12, série B) bylo uchováno na později. Šest láhví (1-6, série A) i zbytek MML bylo schlazeno v chladničce na 8 °C. Dále bylo připraveno 12 ml suspenze RF2 v chladném MML do hodnoty 2. stupně McFarlandovy stupnice. Do chladných láhví série A bylo asepticky přidáno 140 µl ZR fenolu a následně definovaný objem chladného sterilního MML dle tabulky 10 a nakonec objemy inokul. Výsledný objem v každé láhvi byl 70 ml.

Tabulka 10 Objemy minerálního média s laktátem, fenolu a inokula

Lahve	MML [ml]	Fenol 50 g/l [ml]	MML [ml]	Inokulum v MML [ml]	Koncentrace inokula
1+2 (7+8)	60	0,14	9,8	0,07 (70 µl)	1 ‰
3+4 (9+10)	60	0,14	9,15	0,7 (700 µl)	1 ‰
5+6 (11+12)	60	0,14	6,35	3,5	5 ‰

Obsah láhvi série A byl velmi dobře promíchán a po cca 10 minutách bylo asepticky odebráno z každé láhve 4 ml vzorku do plastových zkumavek. Následně byla změřena OD na densilometru a poté byl obsah zkumavek přelit do dvou paralelních mikrozkušavek (eppendorfek). Mikrozkušavky byly centrifugovány 10 minut při 10000 g, při 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant opatrně slit do čistých zkumavek. V supernatantu byla změřena absorbance při 270 nm na UV-VIS spektrofotometru UNICAM. Koncentrace fenolu byla odečtena z kalibrační křivky. Láhve byly inkubovány v chladničce při 7–9 °C, na třepačce. Toto vzorkování, měření DO a koncentrace bylo prováděno denně. Pro vzorkování víkendových dnů byla o něco později nasazeny lahve série B.

#### 6.4.8 Růst kultury *Comamonas testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 13 °C a 8 °C

Bylo připraveno 300 ml MM a přidáno 50 mg LN za vzniku MML. MML bylo rozděleno na dvě dávky po 200 a 100 ml a obě dávky sterilizovat. Do dávky 200 ml bylo asepticky přidáno 0,4 ml ZR fenolu (50 g/l) a vzniklé MMLF rozplnit po 10 ml do 19 sterilních plynotěsných vialek o objemu 40 ml. Dávku 100 ml MML asepticky rozplnit po 10 ml do sterilních plynotěsných vialek o objemu 40 ml. Poté byly vialky zchlazeny na 8 °C. V den očkování bylo ve zbytku MMLF stanoveno množství fenolu. Všechny připravené vialky byly naočkovány 10 µl chladné suspenze RF2. Vialky byly inkubovány následovně: 10 vialek s MMLF a 3 vialky s MML při teplotě 13 °C a 9 vialek s MMLF a 3 vialky s MML při 8 °C.

Růst kultury RF2 byla sledována obden visuálním srovnáním zákalu vialek s MMLF a MML. Až po zjištění výraznějšího růstu ve vialkách s MMLF byl po centrifugaci stanoven fenol.



#### **6.4.9 Degradace TCE kulturou *Comamonas testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 13 °C**

Bylo připraveno 200 ml MM a následně přidáno 34 mg sirupu LN za vzniku MML. Po sterilizaci bylo k MML přidáno 0,4 ml ZR fenolu (50 g/l) a zchlazeno. Dále bylo sterilizováno 30 kusů plynotěsných vialek o objemu 40 ml. Sterilní zchlazené MMLF bylo rozplněno do 18 chladných vialek po 10 ml. Do 8 vialek bylo napipetováno 10 ml sterilní destilované vody (blank) a vychlazeno. Patnáct chladných vialek bylo zaočkováno dne 8. 4. 2021 10 µl chladné suspenze RF2 a následně bylo přidáno 40 µl roztoku TCE (1,1 g/l) hamiltonkou. Předpokládaná koncentrace TCE v kapalně fázi byla cca 2 mg TCE/l. Dne 9. 4. 2021 byly zaočkovány 3 chladné vialky stejně jako 8. 4. 2021.

Všechny vialky byly inkubovány při 13 °C naležato za mírného pohybu v termostatu.

Vzorky byly měřeny plynovou chromatografií 12. 4. 2021 (3. a 4. den kultivace) a dále každý den až do 7. dne a pak 10. den kultivace. Do Tekmaru bylo dávkováno 0,5 ml vzorku.

#### **6.4.10 Degradace zvýšené koncentrace TCE kulturou *Comamonas testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 13 °C**

Bylo připraveno 400 ml MM a následně přidáno 68 mg sirupu LN za vzniku MML. Po sterilizaci bylo k MML přidáno 0,8 ml ZR fenolu (50 g/l) a zchlazeno. Dále bylo sterilizováno 50 kusů plynotěsných vialek o objemu 40 ml. Sterilní zchlazené MMLF bylo rozplněno do 18 chladných vialek po 10 ml. Do 6 vialek bylo napipetováno 10 ml sterilní destilované vody (blank) a vychlazeno. Osmnáct chladných vialek bylo zaočkováno 10 µl chladné suspenze RF2 a následně bylo přidáno 80 µl roztoku TCE (1,1 g/l) hamiltonkou. Koncentrace TCE v kapalně fázi byla cca 4 mg TCE/l. Do šesti vialek (blank) bylo přidáno místo inokula 10 µl destilované vody a přidáno 80 µl roztoku TCE hamiltonkou.

Všechny vialky byly inkubovány při 13 °C naležato za mírného pohybu v termostatu.

Vzorky byly měřeny plynovou chromatografií (4. den kultivace) a dále každý den až do 8. dne a pak 11. den kultivace. Do Tekmaru bylo dávkováno 0,5 ml vzorku.

#### **6.4.11 Degradace TCE kulturou *Comamonas testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 8 °C (2 pokusy)**

Pro tento pokus bylo použito MMLF z předchozího pokusu. Sterilní chladné MMLF bylo rozplněno po 10 ml do osmnácti chladných sterilních plynotěsných vialek a do šesti vialek

bylo napipetováno 10 ml sterilní destilované vody (blank) a všechny vialky byly zchlazeny. Osmnáct chladných vialek bylo zaočkováno 10  $\mu$ l chladné suspenze RF2 a následně bylo přidáno 40  $\mu$ l roztoku TCE (1,1 g/l) hamiltonkou. Předpokládaná koncentrace TCE v kapalně fázi byla cca 2 mg TCE/l. Do šesti vialek (blank) bylo přidáno místo inokula 10  $\mu$ l destilované vody a přidáno 40  $\mu$ l roztoku TCE hamiltonkou.

Všechny vialky byly inkubovány při 8 °C naležato za mírného pohybu v chladničce.

Vzorky byly měřeny plynovou chromatografií (14. den kultivace) a také byl stanoven obsah fenolu, dále vzorky byly měřeny každý druhý den až do 21.–24. dne kultivace. Do Tekmaru bylo dávkováno 0,5–1,0 ml vzorku.

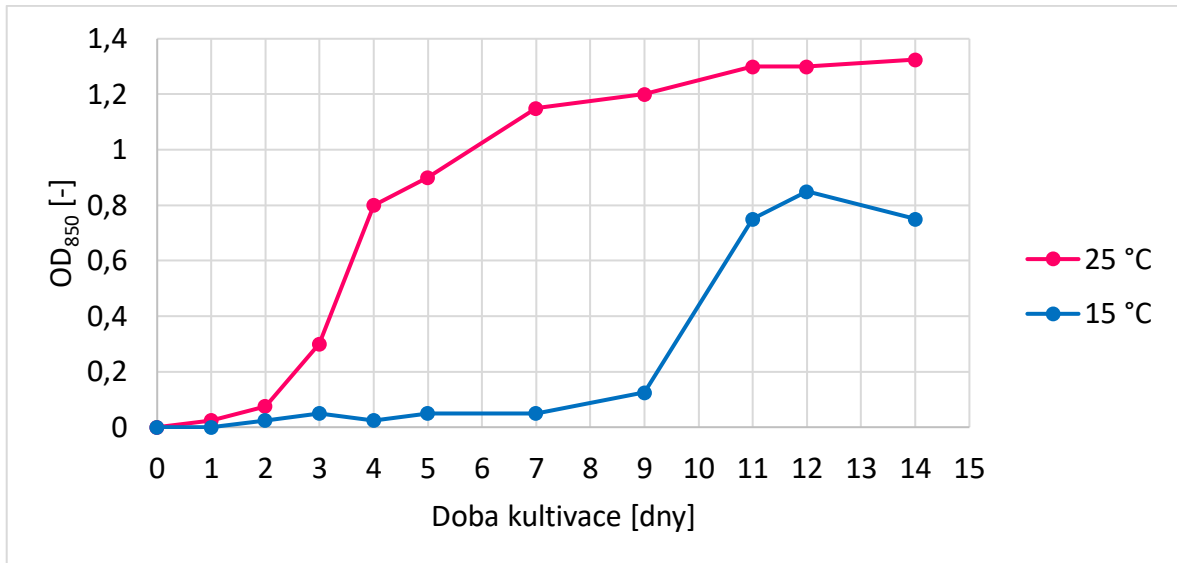
## 7 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 7.1 Ověření růstu *Comamonas testosteroni* RF2 na fenolu za různých teplot

Byl ověřen růst kultury RF2 na fenolu (200 mg/l) při teplotě 25 °C a 15 °C. Fenol byl jediným zdrojem uhlíku pro RF2. Pokus probíhal v MM s fenolem. Vzorky byly zaočkovány 10 µl suspenze RF2. Kontrola A představovala neočkované MMF a kontrola B bylo naočkované MM stejným objemem inokula jako vzorky. Vzorky (V) a kontroly byly kultivovány při 25 °C a 15 °C po dobu 14 dnů a denně byl a měřena optická hustota.

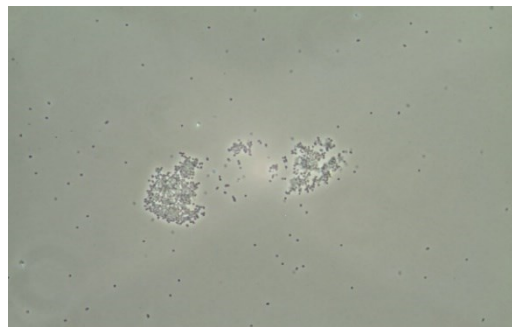
Tabulka 11 Naměřené hodnoty optické hustoty vzorků a kontrol při teplotě 25 °C a 15 °C

Doba kultivace [dny]	OD [-]					
	25 °C			15 °C		
	V	A	B	V	A	B
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,025	0,05	0,05	0,0	0,05	0,05
2	0,075	0,05	0,05	0,025	0,05	0,05
3	0,3	0,05	0,05	0,05	0,1	0,05
4	0,8	0,1	0,05	0,05	0,1	0,1
5	0,9	0,1	0,05	0,05	0,1	0,1
7	1,15	0,1	0,05	0,05	0,1	0,1
9	1,2	0,1	0,1	0,125	0,1	0,1
11	1,3	0,1	0,1	0,75	0,1	0,1
12	1,3	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1
14	1,325	0,1	0,1	0,75	0,1	0,1



Obrázek 10 Růst kultury RF2 na fenolu při různých teplotách

Z obrázku 10 je patrné, že kultura RF2 roste lépe při teplotě 25 °C. Při teplotě 15 °C je delší lagová fáze, a i po nastartování růstu byla optická hustota nižší než u vzorku, který byl inkubován při 25 °C. Po ukončení inkubace byly ze vzorků připraveny mikroskopické preparáty a pozorovány při zvětšení 1000x ve fázovém kontrastu. Ve vzorku kultivovaném při 15 °C byly nalezeny mikrovločky (viz obrázek 11), což způsobilo, že při měření byla hustota buněk zdánlivě nižší. Na obrázku 12 je vzorek kultivovaný při 25 °C, kde buňky netvořily mikrovločky a hodnota hustoty buněk tak byla vyšší.



Obrázek 11 Mikrovločky při 15 °C



Obrázek 12 Vločky při 25 °C

## 7.2 Ověření růstu RF2 na pevných živných půdách za snížených teplot

Pro ověření růstu na pevných živných půdách byl použit TYA agar a minerální agar s fenolem a tryptonem (MAFt). Agary byly začkovány kulturou rostoucí na TYA agaru při 15 °C aisky byly kultivovány při 15 °C (od 13. dne kultivace při 13 °C) a při 8 °C.

Tabulka 12 Schopnost růstu kultury RF2 na agarech při 15, 13 a 8 °C

Doba kultivace (dny)	15/13 °C		8 °C	
	TYA agar	MAFt agar	TYA agar	MAFt agar
2	++	-	+	-
4	+++	+ -	++	-
6	+++	+	++	+ -
7	+++	+	++	+ -
9	+++	+	++	+ -
11	+++	++	+++	+
13	UKONČENO	++ *	UKONČENO	+
15		++ *		+
18		++ *		+
20		++ *		+
22		++ *		+
24		++ *		+
27		++ *		+

\* teplota klesla na 13 °C

- nepatrný náznak růstu, nepoužitelná pro pokusy, +-nepatrný růst, +slabý růst, ++mírný růst, použitelná pro pokusy, +++dobrý růst, použitelná pro pokusy

Kultura RF2 velmi dobře rostla na TYA agaru při všech uvedených teplotách. Při teplotě 8 °C růst začal kolem 4. dne kultivace. Na MAFt agaru kultura při 15 °C (13 °C) rostla až po 11 dnech kultivace a při teplotě 8 °C byl růst velmi slabý, nejspíše se jednalo o růst na velmi malém množství tryptonu. Byla sledovaná změna pH indikátorem (bromthymolová

modř). Žádná změna nebyla zaznamenána, velmi pravděpodobně tedy nedošlo k rozkladu fenolu.

V následující tabulce 13 jsou výsledky růstu kultury RF2, která byla uložena v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tato kultura byla nejprve vyočkována na TYA agar a uchována v chladničce po dobu 25 dnů. Poté byla naočkována na TYA agar a MAFt agar a kultivována při teplotě  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tabulka 13 Růst kultury RF2 na agarech při  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$

<b>Doba kultivace [dny]</b>	<b>TYA</b>	<b>MAFt</b>
<b>2</b>	+ -	-
<b>4</b>	+	+ -
<b>6</b>	++	+ -
<b>8</b>	++	+ -
<b>11</b>	+++	+ -
<b>13</b>	+++	+ -
<b>15</b>	+++	+ -
<b>17</b>	+++	+ -
<b>20</b>	+++	+

- bez růstu, +-nepatrný růst, +růst zřetelný, ++dobrý růst, použitelná pro pokusy, +++výborný růst, použitelná pro pokusy

Kultura RF2 byla také naočkována na TYA agar s obsahem fenolu ( $200\text{ mg/l}$ ) a kultivována při  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kultura RF2 na TYA+F po týdnu kultivace vykazovala dobrý růst a mohla být použita pro další pokusy.

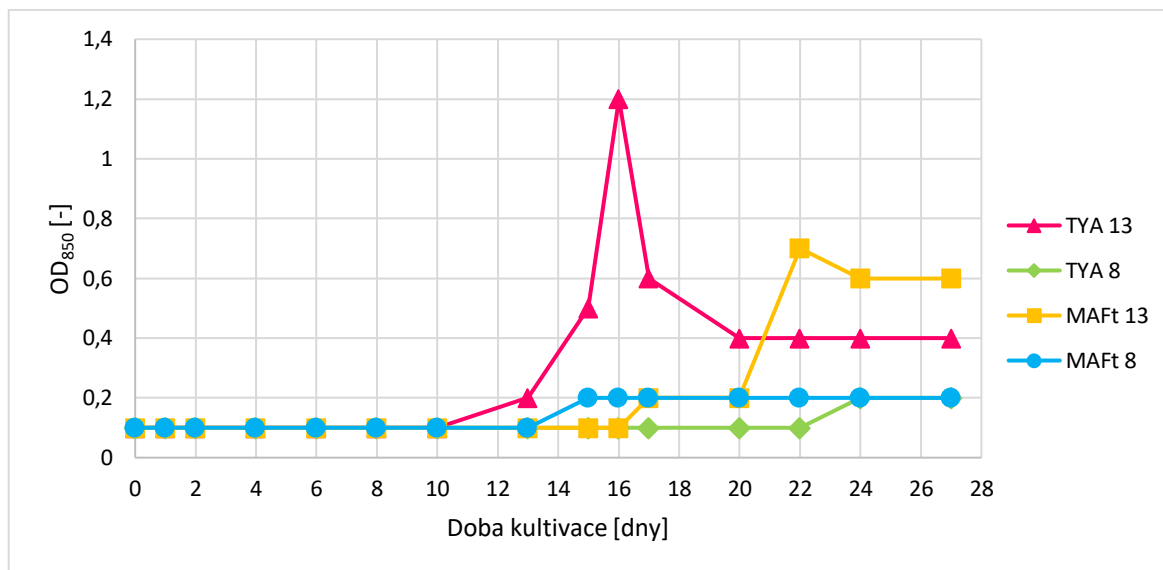
### 7.3 Ověření růstu RF2 v tekutých médiích

Pro ověření růstu v tekutých médiích a fenolem ( $250\text{ mg/l}$ ) byly použity kultury rostoucí na pevných půdách popsaných výše. Pro pokus uvedený v tabulce 14 byla použita kultura vyočkována z  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a dále kultivována na TYA a MAFt agaru při  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tabulka 14 Růst kultury RF2 v MMF za různých teplot, předkultivované na TYA a MAft agaru rostoucí při 8 °C

Doba kultivace [dny]	OD [-]			
	13°C	8°C	13°C	8°C
	z TYA agaru		z MAft agaru	
0	0,1	0,1	0,1	0,1
1	0,1	0,1	0,1	0,1
2	0,1	0,1	0,1	0,1
4	0,1	0,1	0,1	0,1
6	0,1	0,1	0,1	0,1
8	0,1	0,1	0,1	0,1
10	0,1	0,1	0,1	0,1
13	<b>0,2</b> vločky	0,1	0,1	0,1
15	<b>0,5</b> *	0,1	0,1	0,2
16	<b>1,2</b>	0,1	0,1	0,2
17	<b>0,6</b>	0,1	0,2 vločky	0,2
20	<b>0,4</b>	0,1	0,2 vločky	0,2
22	<b>0,4</b>	0,1	<b>0,7</b> prstence - mnoho	0,2
24	<b>0,4</b>	0,2	<b>0,6</b> prstence - mnoho	0,2
27	<b>0,4</b>	0,2	<b>0,6</b> prstence - mnoho	0,2

\* vločky a vytvořen slabý prsteneček na zkumavce (biofilm)



Obrázek 13 Růst kultury v MMF za různých teplot, předkultivované na TYA a MAft agaru

V tekutém mediu s fenolem prokázala výrazný růst kultura předkultivovaná na TYA agaru a v MMF kultivovaná při 13 °C. Lagová fáze činila 13 dní. Kultura předkultivovaná na MAft a kultivovaná v médiu s fenolem také rostla při 13 °C, měla delší lagovou fázi, a to o 7 dní. Samotný růst této kultury nebyl příliš výrazný, ale byl zjevně pozitivní oproti kultivaci při 8 °C.

Ze zkumavky s MMF (naočkované kulturou RF2 z MAft agaru a kultivované při 13 °C, viz výše), byly objemem 10 µl zaočkovány další 4 zkumavky a dvě byly kultivovány při 13 °C a dvě při 8 °C, aby bylo zjištěno, zda kultura RF2, narostlá na fenolu při 13 °C si svou schopnost růstu poněchá. Výsledky jsou znázorněny v tabulce 15.



Tabulka 15 Růst RF2, vyočkované z MMF, za různých teplot

Doba inkubace [dny]	OD [-]	
	8 °C	13 °C
0	0,1	0,1
1	0,1	0,1
2	0,1	0,15
3	0,1	0,15
4	0,15	0,15
7	0,15	0,15
8	0,15	0,15
9	0,2	0,2
11	0,25	0,25
14	0,25	0,25
18	0,2	0,25
23	0,2	0,2

U všech zkoumaných případů byl růst nepatrný, což ukázalo, že problém růstu kultury RF2 při nízkých teplotách se týká růstu na fenolu, nikoliv obecného růstu. Proto bylo v dalším pokusu odzkoušeno použití velkého inokula RF2.

Kultura rostoucí na TYA+F byla suspendována ve fyziologickém roztoku a byla v různém množství (30, 300 a 600  $\mu$ l) nadávkována do 3 ml MMF o koncentraci 250 mg/l. Vzorky byly kultivovány při 8 °C a 13 °C po dobu 21 dní.

Tabulka 16 Růst RF2 v MMF předkultivované na TYA+F při různých teplotách a množství inokula

Doba kultivace [dny]	OD [-]				
	9 °C			13 °C	
	30 µl	300 µl	600 µl	30 µl	300 µl
0	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
6	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
7	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
12	0,2	0,2 *	0,8 **	0,2	0,8 *
21	0,2	0,2 *	0,8 **	-	-

\* koncentrace fenolu 227 mg/l , \*\* koncentrace fenolu 208 mg/l

Výsledky testu naznačily, že velký objem inokula (spolu se snížením vstupní koncentrace fenolu, viz níže) může mít určitý potenciál růstu RF2 na fenolu při nižších teplotách, avšak při delší době kultivace. Dávkování 300 µl znamenalo pokles koncentrace fenolu z 250 mg/l na 227 mg/l a při dávkování 600 µl byla koncentrace snížena z 250 mg/l na 208 mg/l.

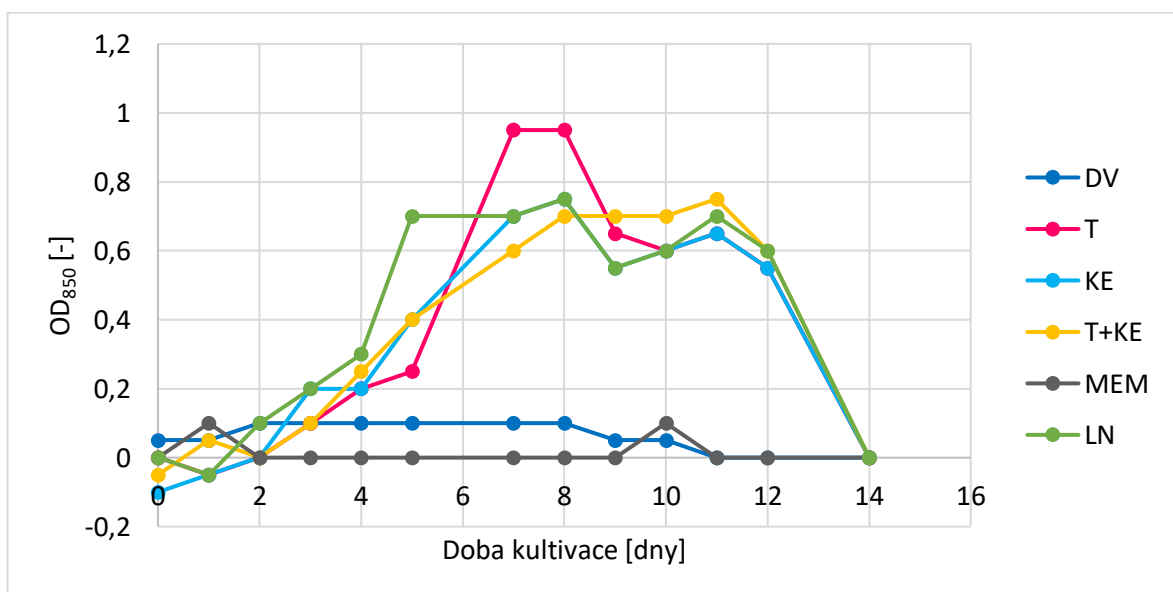
#### 7.4 Urychlení adaptace na fenol při nízkých teplotách

Pro urychlení adaptace kultury RF2 na 200 mg/l fenolu při nízkých teplotách byly jako podpůrné substráty použity trypton (T), kvasniční extrakt (KE), MEM vitamíny, a laktát sodný (LN). Podpůrné substráty byly dávkovány podle rozpisu uvedeného v postupech. Výsledná koncentrace tryptonu, kvasničního extraktu a laktátu sodného v MMF činila 50 mg/l. Pro pokus byla použita kultura předkultivovaná na TYA+F. Zkumavky byly zaočkovány 15 µl suspenze této kultury. Sady byly kultivovány při 13 °C a 8 °C. Při 13 °C byly zkumavky kultivovány 14 dnů a při 8 °C 21 dnů.

Tabulka 17 Růst RF2 v MMF za přítomnosti podpurných substrátů při teplotě 13 °C

Doba kultivace [dny]	OD [-]					
	DV	T	KE	T+KE	MEM	LN
0	0,05	0	-0,1	-0,05	0	0
1	0,05	-0,05	-0,05	0,05	0,1	-0,05
2	0,1	0	0	0	0	0,1
3	0,1	0,1	0,2	0,1	0	0,2
4	0,1	0,2	0,2	0,25	0	0,3
5	0,1	0,25	0,4	0,4	0	<b>0,7</b>
7	0,1	<b>0,95</b>	<b>0,7</b>	0,6	0	0,7
8	0,1	0,95	0,75	<b>0,7</b>	0	0,75
9	0,05	0,65	0,55	0,7	0	0,55
10	0,05	0,6	0,6	0,7	0,1	0,6
11	0	0,65	0,65	0,75	0	0,7
14	0	0,55*	0,55*	0,6*	0	0,6*

\* vločky

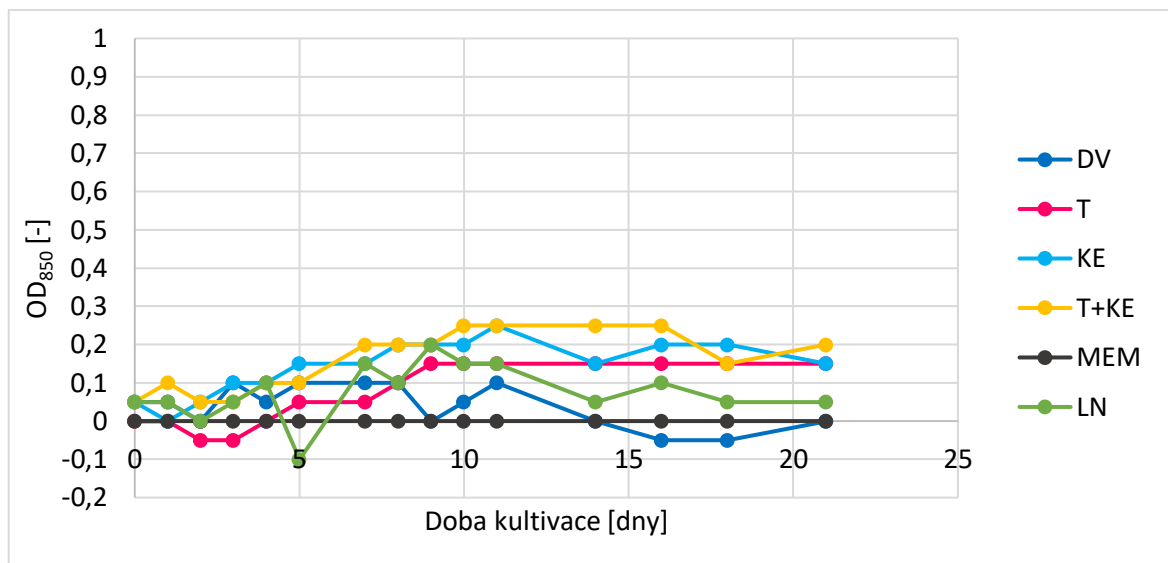


Obrázek 14 Růst RF2 v MMF za přítomnosti podpurných substrátů při teplotě 13 °C

Při 13°C podporovaly růst kultury RF2 na fenolu jak laktát sodný, tak i trypton a kvasničný extrakt a jejich kombinace. Oproti tomu MEM vitamíny neúčinkují. Všechny podpůrné substráty výrazně zkrátily lagovou fázi.

Tabulka 18 Růst RF2 v MMF za přítomnosti podpůrných substrátů při teplotě 8 °C

Doba kultivace [dny]	OD [-]					
	DV	T	KE	T+KE	MEM	LN
<b>0</b>	0,05	0	0,05	0,05	0	0,05
<b>1</b>	0,05	0	0	0,1	0	0,05
<b>2</b>	0	-0,05	0,05	0,05	0	0
<b>3</b>	0,1	-0,05	0,1	0,05	0	0,05
<b>4</b>	0,05	0	0,1	0,1	0	0,1
<b>5</b>	0,1	0,05	<b>0,15</b>	0,1	0	-0,1
<b>7</b>	0,1	0,05	0,15	<b>0,2</b>	0	<b>0,15</b>
<b>8</b>	0,1	0,1	0,2	0,2	0	0,1
<b>9</b>	0	<b>0,15</b>	0,2	0,2	0	0,2
<b>10</b>	0,05	0,15	0,2	0,25	0	0,15
<b>11</b>	0,1	0,15	0,25	0,25	0	0,15
<b>14</b>	0	0,15	0,15	0,25	0	0,05
<b>16</b>	-0,05	0,15	0,2	0,25	0	0,1
<b>18</b>	-0,05	0,15	0,2	0,15	0	0,05
<b>21</b>	0	0,15	0,15	0,2	0	0,05



Obrázek 15 Růst RF2 v MMF za přítomnosti podpůrných substrátů při teplotě 8 °C

Při 8 °C byla podpora růstu kultury RF2 na 200 mg/l fenolu dosti neprůkazná. Relativně největší růst byl zaznamenán při použití kombinace tryptonu a kvasničného extraktu, ale pouze 0,25 McF, což bylo v porovnání s růstem při 13 °C poměrně zanedbatelné.

Pro další pokusy byl jako podpůrný substrát vybrán laktát sodný a také byly použity snížené koncentrace fenolu. Laktát sodný je méně finančně náročný než trypton a jeho výsledky byly srovnatelné z působením tryptonu.

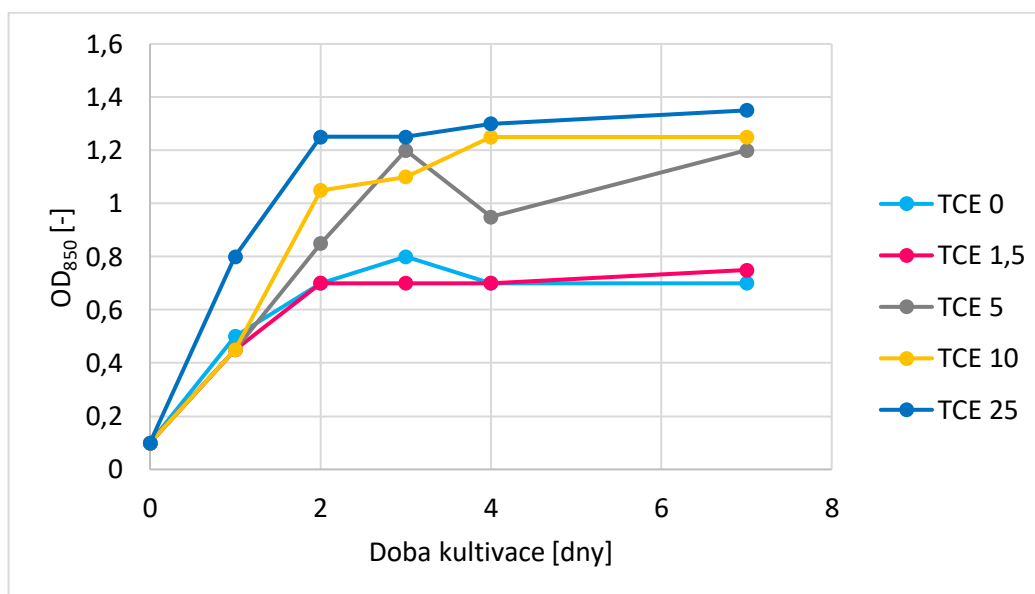
### 7.5 Růst kultury *Comamonas testosteroni* RF2 v přítomnosti TCE za teploty 13 °C (podíl fenolu s laktátem 150 + 50 mg/l)

Pro pokus byla snížena koncentrace fenolu na 150 mg/l a byl přidán laktát sodný (50 mg/l). K médiu s laktátem a fenolem byl podle rozpisu v postupech přidán roztok TCE. Pokus probíhal v plynotěsných vialkách. Vialky s MMLF a TCE byly zaočkovány 15 µl suspenze kultury RF2, která byla poté kultivována při 25 °C a 13 °C po dobu 7 dnů.

Tabulka 19 Růst RF2 v přítomnosti různých přísadků TCE při teplotě 25 °C

Doba kultivace [dny]	OD [-]										
	c TCE 0		c TCE 1,5		c TCE 5		c TCE 10		c TCE 25		
	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	
0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
1	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,8*	0,8*	
2	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	1,1	1,1	1,0	1,2	1,3	
3	0,8	0,7*	0,7*	0,7	0,7*	1,2	1,2	1,0	1,2	1,3	
4	0,7	0,7*	0,7*	0,7	0,8	1,1	1,3	1,2	1,3	1,3	
7	0,7*	0,7*	0,7*	0,8*	0,8*	1,2	1,3	1,2	1,4	1,3	

\* vločky



Obrázek 16 Růst RF2 v přítomnosti různých přísadků TCE při teplotě 25 °C

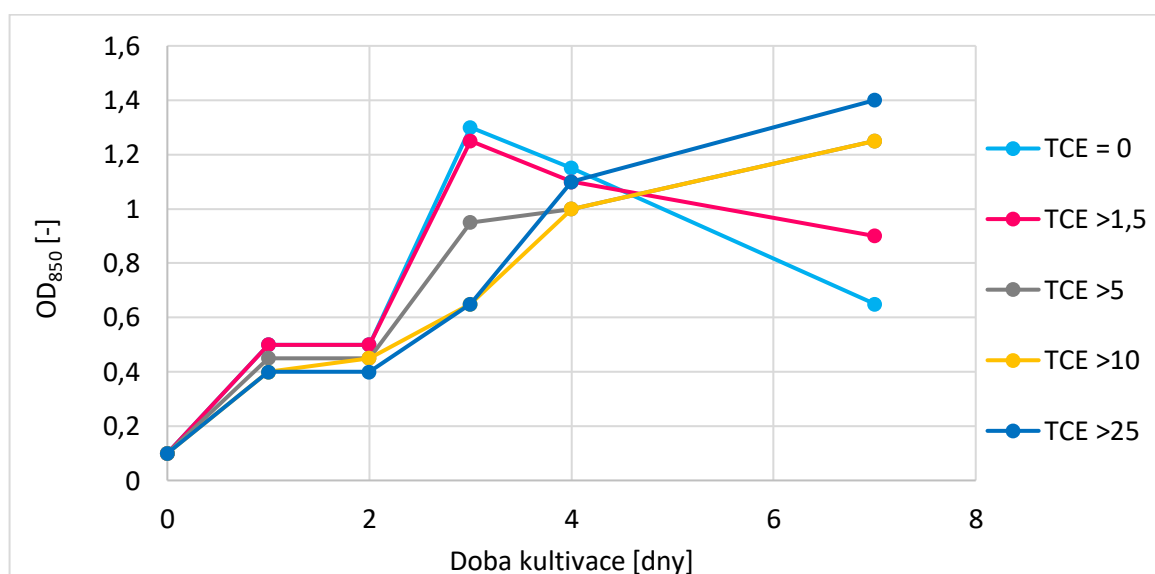
Při teplotě 25 °C kultura RF2 nemá problém růst na fenolu s laktátem i při vyšších koncentracích TCE (10 a víc mg/l).

Tabulka 20 Růst RF2 v přítomnosti různých přídavků TCE při teplotě 13 °C

Doba kultivace [dny]	OD [-]										
	c TCE =0		c TCE >1,5		c TCE >5		c TCE >10		c TCE >25		
	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	
0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4
3	<b>1,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	0,6*	0,6*	0,7	0,7	0,7	0,6*
4	1,1	1,2	1,1	1,1	1,2	0,8*	1,0	1,0	1,2	1,2	1,0
7	0,6*	0,7*	0,9*	0,9*	1,2	<b>1,3*</b>	<b>1,3*</b>	<b>1,2*</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>

\* vločky

Uvedená koncentrace TCE v kapalně fázi při 13°C byla vyšší a to díky menšímu tlaku par.



Obrázek 17 Růst RF2 v přítomnosti různých přídavků TCE při teplotě 13 °C

Vysoké koncentrace TCE (10 a víc mg/l) při 13°C sice zpomalily růst RF2 o čtyři dny ve srovnání s růstem při 25 °C, ale nezastavily jej. Bylo možné konstatovat, že koncentrace 10 a víc mg/l nejsou pro kulturu RF2 při snížených teplotách toxické.

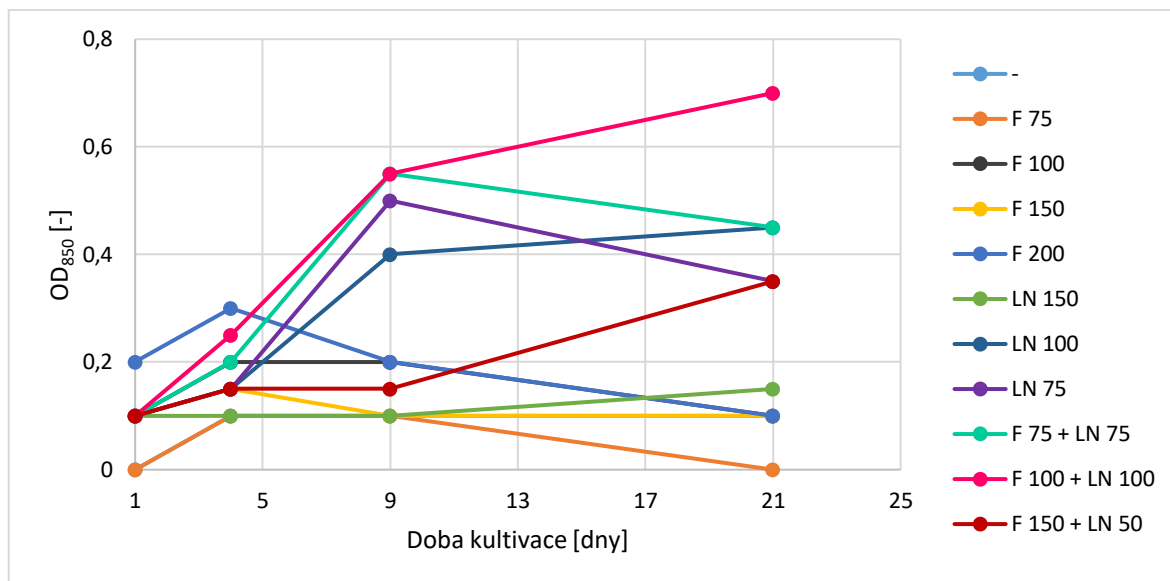
## 7.6 Růst kultury *Comamonas testosteroni* RF2 při snížených koncentracích fenolu, při teplotě 8 °C

Pro pokus byly použity různé koncentrace fenolu, laktátu sodného a jejich kombinace, aby mohla být určena nejvhodnější kombinace těchto látek pro pokusy vlastní degradace TCE. Připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 8 °C po dobu 21 dní.

Tabulka 21 Růst RF2 za přítomností různých koncentrací fenolu a laktátu

Substrát	Koncentrace substrátu [mg/l]	Doba kultivace [dny]			
		1.	4.	9.	21.
		OD [-]			
<b>Žádný</b>	-	0	0,1	0,1	0,1
<b>Fenol</b>	75	0	0,1	0,1	0
<b>Fenol</b>	100	0,1	0,2	0,2	0,1
<b>Fenol</b>	150	0,1	0,15	0,1	0,1
<b>Fenol</b>	200	0,2	0,3	0,2	0,1
<b>Laktát</b>	150	0,1	0,1	0,1	0,15
<b>Laktát</b>	100	0,1	0,15	<b>0,4</b>	<b>0,45</b>
<b>Laktát</b>	75	0,1	0,15	<b>0,5</b>	<b>0,35</b>
<b>Fenol + laktát</b>	75 + 75	0,1	0,2	<b>0,55</b>	<b>0,45</b>
<b>Fenol + laktát</b>	100 + 100	0,1	0,25	<b>0,55</b>	<b>0,7</b>
<b>Fenol + laktát</b>	150 + 50	0,1	0,15	0,15	0,35





Obrázek 18 Růst RF2 za přítomností různých koncentrací fenolu a laktátu

Největší růst byl zaznamenán při koncentraci 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu sodného a tato kombinace byla použita pro další pokusy. Při použití různých koncentrací fenolu a 150 mg/l laktátu sodného byl překvapivě růst zanedbatelný. Při zbylých dvou koncentracích laktátu sodného (100 a 75 mg/l) byl růst jednoznačně lepší než s použitím jen fenolu, avšak substrát byl rychle spotřebován. Stejný problém byl u koncentrace 75 mg/l fenolu a 75 mg/l laktátu. A u koncentrace 150 mg/l fenolu a 50 mg/l laktátu byla pozorována dlouhá lagová fáze, a i poté růst nebyl moc výrazný.

Z celé provedené série růstových pokusů však bylo celkově zřejmé, že je nutné spotřebovávání fenolu kulturou RF2 za nízkých teplot doložit jeho analytickým sledováním v průběhu kultivace, nikoliv jen růstem kultury.

### 7.7 Růst kultury *Comamonas testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 8 °C a různých inokulech

V tomto pokusu již bylo prováděno sledování koncentrace fenolu v médiích s různými koncentracemi inokula v průběhu kultivace. Pokus byl původně připraven se dvěma sériemi kultivačních lahví s posunutými začátky kultivace (A, B), aby mohly být sledovány všechny dny kultivace (včetně dnů, které by v sérii A připadaly na víkendy).

Tabulka 22 Naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při teplotě 8 °C a různých inokulech kultury RF2 (série A)

Doba kultivace [dny]	0,1 %		1 %		5%	
	A <sub>270</sub> [-]	c [mg/l]	A <sub>270</sub> [-]	c [mg/l]	A <sub>270</sub> [-]	c [mg/l]
<b>0</b>	1,50	94,34	1,48	93,08	1,605	95,91
<b>1</b>	1,495	94,03	1,455	91,51	1,62	96,86
<b>2</b>	1,525	95,91	1,555	97,80	1,695	101,57
<b>3</b>	1,505	94,65	1,465	92,14	1,51	89,94
<b>7</b>	1,40	88,05	1,455	86,48	0,762	84,28
<b>8</b>	1,325	83,33	1,43	84,91	0,725	83,02
<b>9</b>	1,26	79,25	1,405	83,33	0,71	81,13
<b>10</b>	1,235	77,67	1,425	84,59	1,37	81,13
<b>14</b>	1,16	72,96	1,38	81,76	1,28	75,47
<b>15</b>	1,105	69,50	1,38	81,76	1,28	75,47
<b>16</b>	1,055	66,35	1,345	79,56	1,24	72,96
<b>23</b>	0,537	33,77	1,09	63,52	0,99	57,23

Ukázka výpočtu koncentrace fenolu z rovnice kalibrační křivky

- Rovnice kalibrační křivky

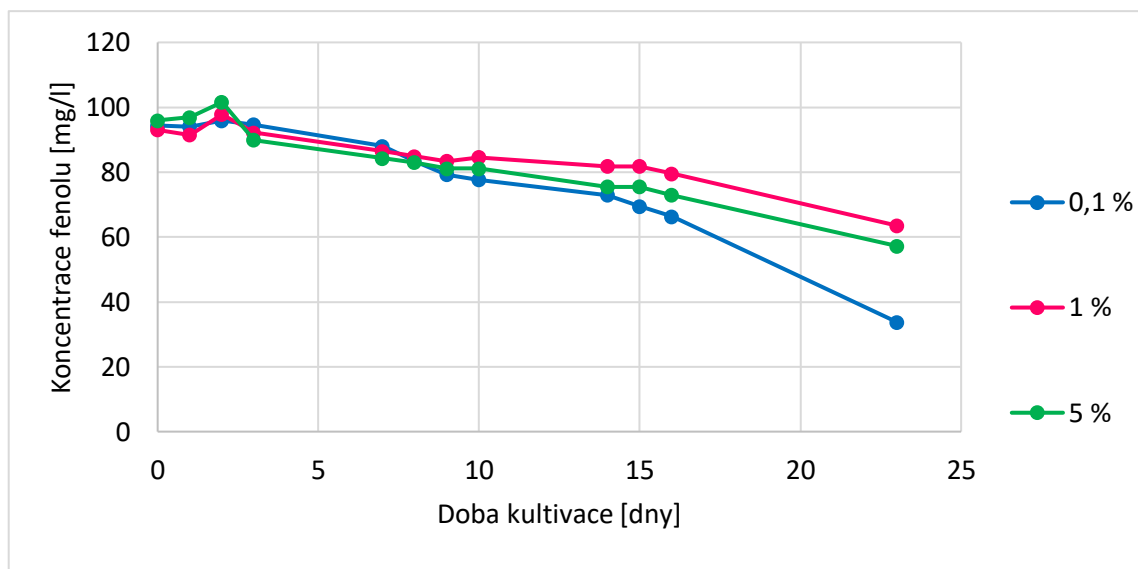
$$A_{270} = 0,0159 * c \text{ fenol}$$

- Výpočet koncentrace fenolu

$$c \text{ fenol} = \frac{A_{270}}{0,0159}$$

$$c \text{ fenol} = \frac{1,50}{0,0159}$$

$$c \text{ fenol} = 94,34 \text{ mg/l}$$



Obrázek 19 Úbytek fenolu při teplotě 8 °C a různých inokulech (série A)

Tabulka 23 Naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při teplotě 8 °C a různých inokulech kultury RF2 (série B)

Doba kultivace [dny]	0,1 %		1 %		5 %	
	A <sub>270</sub> [-]	c [mg/l]	A <sub>270</sub> [-]	c [mg/l]	A <sub>270</sub> [-]	c [mg/l]
4	1,5	94,34	1,51	94,97	1,53	96,23
5	1,5	94,34	1,49	93,71	1,515	95,28
6	1,5	94,34	1,495	94,03	1,525	95,91
11	1,53	96,23	1,515	95,28	1,54	96,86
12	1,56	98,11	1,525	95,91	1,55	97,48
13	1,54	96,86	1,54	96,86	1,65	103,77
20	1,44	90,57	1,39	87,42	1,46	91,82

Podle naměřených hodnot je patrné, že kultura RF2 je principiálně schopna fenol za nízkých teplot odbourávat. Avšak, výsledky byly značně nelogické a neprokázal se vliv velikosti inokula. Pro jistotu byl z jedné láhve se sníženou koncentrací fenolu proveden křížový roztěr z odebraného biofilmu na TYA agar pro kontrolu čistoty kultury RF2. Kultivace probíhala při 8 °C i 25 °C. Po dvou dnech kultivace při 25 °C byla na TYA agaru narostena čistá kultura RF2, což potvrdilo výše uvedený závěr.

Nelogičnost výsledku mohla být zapříčiněna poklesem teploty v chladničce z nastavených 8 °C na 5-6 °C, což bylo zjištěno během pokusu. K poklesu mohlo pravděpodobně dojít kvůli umístění některých láhví před výdech chladného vzduchu v chladničce nebo velkým naplněním objemu chladničky.

### 7.8 Růst kultury *Comamonas testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 13 °C a 8 °C

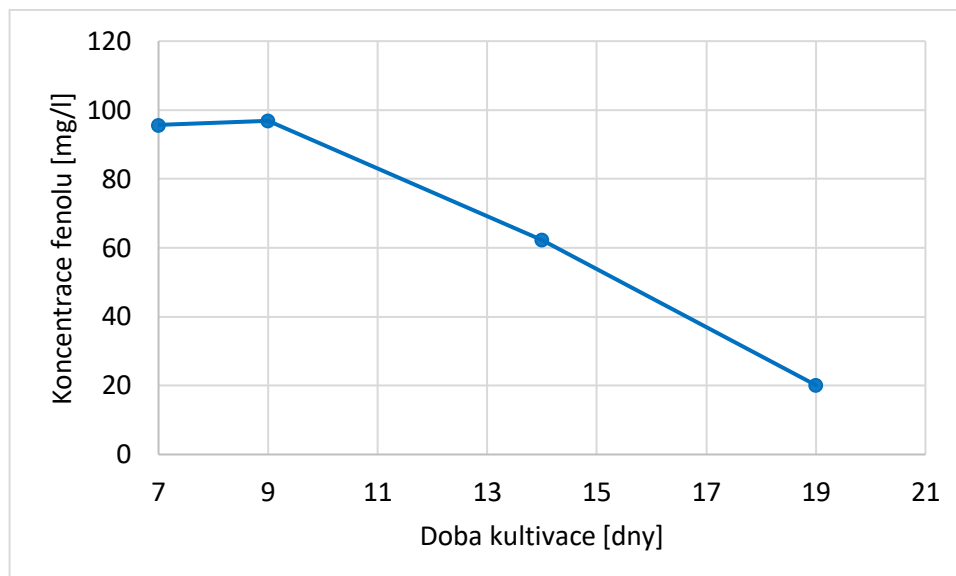
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit přibližnou dobu, za jakou kultura RF2 je schopna spotřebovat fenol ve směsi s laktátem sodným při teplotě 13 °C i 8 °C. Byly připraveny dvě

sady vialek s MMLF a zaočkovány 10  $\mu$ l suspenze RF2 a dvě sady vialek s MML rovněž zaočkovány 10  $\mu$ l suspenze RF2. Jedna sada vialek s MMLF a MML byla inkubována při 13 °C a druhá při 8 °C a během inkubace byla ve stanovených intervalech měřena absorbance pro stanovení fenolu a také byl sledován vzhled vialek s MMLF v porovnání s vialkami s obsahem MML.

Tabulka 24 Vzhled vialek se vzorkem a naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při teplotě 8 °C

<b>Doba kultivace [dny]</b>	<b>Vzhled</b>	<b>A<sub>270</sub> [-]</b>	<b>c<sub>fenol</sub> [mg/l]</b>
2	Zcela nepatrný růst	N	N
5	Slabší růst oproti vialkám ve 13°C. Růst je stejný v MMLF jako v MML.	N	N
7	Slabší růst oproti vialkám ve 13°C. Růst v MMLF se zdá výraznější než v MML. Biofilm všude.	1,52	95,60
9	4 vialky lepší růst v MMLF než v MML 3 vialky stejný růst v MMLF jako v MML	1,54	96,86
14	Stejný v MMLF jak v MML	0,99	62,26
19	Stejný v MMLF jak v MML	0,32	20,13

N – nestanovováno



Obrázek 20 Spotřeba fenolu kulturou RF2 při teplotě 8 °C  
(průměry ze dvou až tří hodnot)

Tabulka 25 Vzhled vialek se vzorkem a naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při teplotě 13 °C

Doba kultivace [dny]	Vzhled	A <sub>270</sub> [-]	c <sub>fenol</sub> [mg/l]
2	Zřetelný růst, stejný v MMLF i MML	N	N
5	Růst ve vialkách MMLF zjevně výraznější než v MML. Biofilm silně všude.	0,043	2,7
7	Růst ve vialkách MMLF zjevně výraznější než v MML. Biofilm silně všude.	0,041	2,6
9	UKONČENO	-	-

N – nestanovováno

Při inkubaci vzorku při teplotě 13 °C bylo 100 mg/l fenolu spotřebováno během 5 dnů. Při teplotě 8 °C byl mírný pokles koncentrace fenolu zaznamenán až 14. den kultivace a 19. den kultivace fenol stále nebyl zcela spotřebován. Devátý den kultivace byl stejnou spektrofotometrickou metodou stanoven obsah fenolu ve vialkách s MML a hodnota fenolu byla 2,9 mg/l; zde se však spíše jednalo o metabolity kultury než skutečný fenol. Tyto

hodnoty představovaly pozadí. Pokus prokázal, že kultura RF2 je schopna při podpoře laktátu sodného fenol za nízkých teplot spotřebovat. Byly tak vytvořeny předpoklady pro pokusy rozkladu TCE.

### 7.9 Degradace TCE kulturou *Comamonas testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 13 °C

Pokud byl nasazen z důvodu ověření schopnosti kultury RF2 degradovat TCE při teplotě 13 °C. Pokus byl prováděn v MM s fenolem o koncentraci 100 mg/l a laktátem sodným o koncentraci 100 mg/l. MMLF bylo zaočkováno 10 µl suspenze RF2 a doplněno 40 µl roztoku TCE, tedy koncentrace TCE v médiu byla okolo 1,6 mg/l. Měření na GC bylo zahájeno 3. den kultivace.

Tabulka 26 Naměřené plochy píků pro vzorky a vypočtené koncentrace TCE ve vodné fázi

Doba kultivace [dny]	Plocha píku [-]			Plocha píku <sub>průměr</sub> [-]	c TCE [µg/l]	Ředění [-]	Cskutečná TCE [µg/l]
0	226923	229072	-	227997,5	164,02	10	1640,15
3	228296	217058	226002	223785,3	160,99	10	1609,85
4	207731	224914	-	216322,5	155,62	10	1556,17
5	100163	94690	91119	95324	68,57	10	685,73
6	28714	83887	45138	52579,67	37,82	5	189,12
7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5	0,00

Tabulka 27 Naměřené plochy píků pro blanky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi

Doba kultivace [dny]	Plocha píku [-]		Plocha píku <sub>průměr</sub> [-]	c TCE [µg/l]	Ředění [-]	Cskutečná TCE [µg/l]
0	226923	229072	227997,5	164,02	10	1640,15
3	226923	229072	227997,5	164,02	10	1640,15
7	217474	183966	200720	144,39	10	1443,92

Ukázka výpočtu koncentrace TCE z rovnice kalibrační křivky

- Rovnice kalibrační křivky

$$\text{plocha píku} = 1390,1 * c \text{ TCE}$$

- Výpočet koncentrace TCE

$$c \text{ TCE} = \frac{\text{plocha peaku}}{1390,1}$$

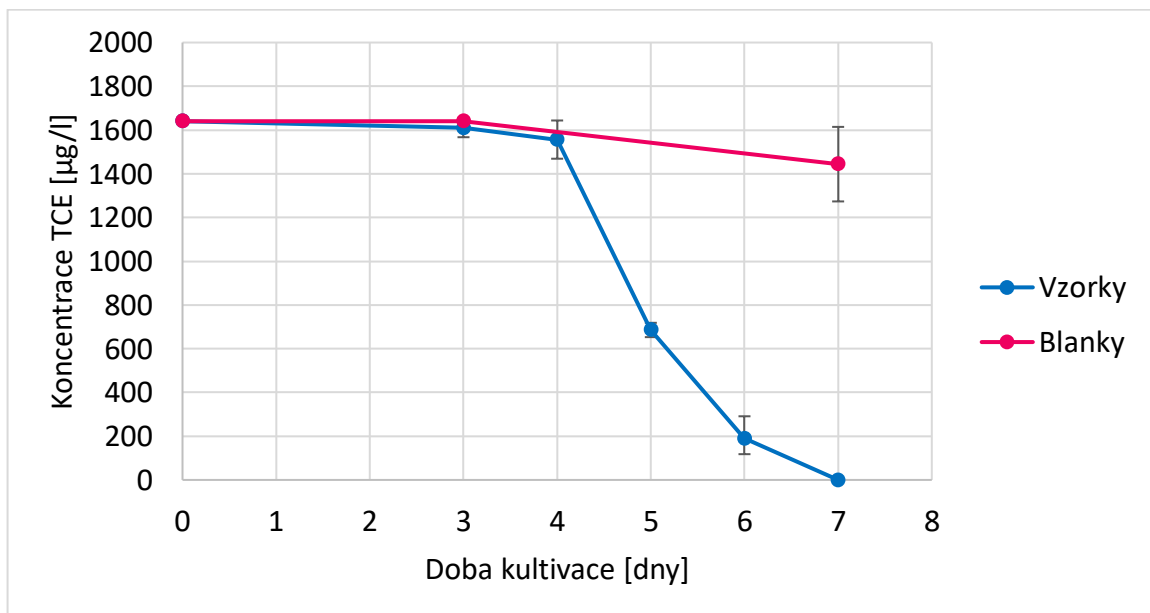
$$c \text{ TCE} = \frac{227997,5}{1390,1}$$

$$c \text{ TCE} = 164,02 \text{ } \mu\text{g/l}$$

$$c_{\text{skutečná TCE}} = c \text{ TCE} * \text{ředění}$$

$$c_{\text{skutečná TCE}} = 164,02 * 10$$

$$c_{\text{skutečná TCE}} = 1640,15 \text{ } \mu\text{g/l}$$



Obrázek 21 Degradace 1,6 mg/l TCE kulturou RF2 při teplotě 13 °C

Degradace TCE byla zahájena 5. den kultivace a 7. kultivace byl TCE zcela rozložen.



## 7.10 Degradace zvýšené koncentrace TCE kulturou *Comamonas*

### *testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 13 °C

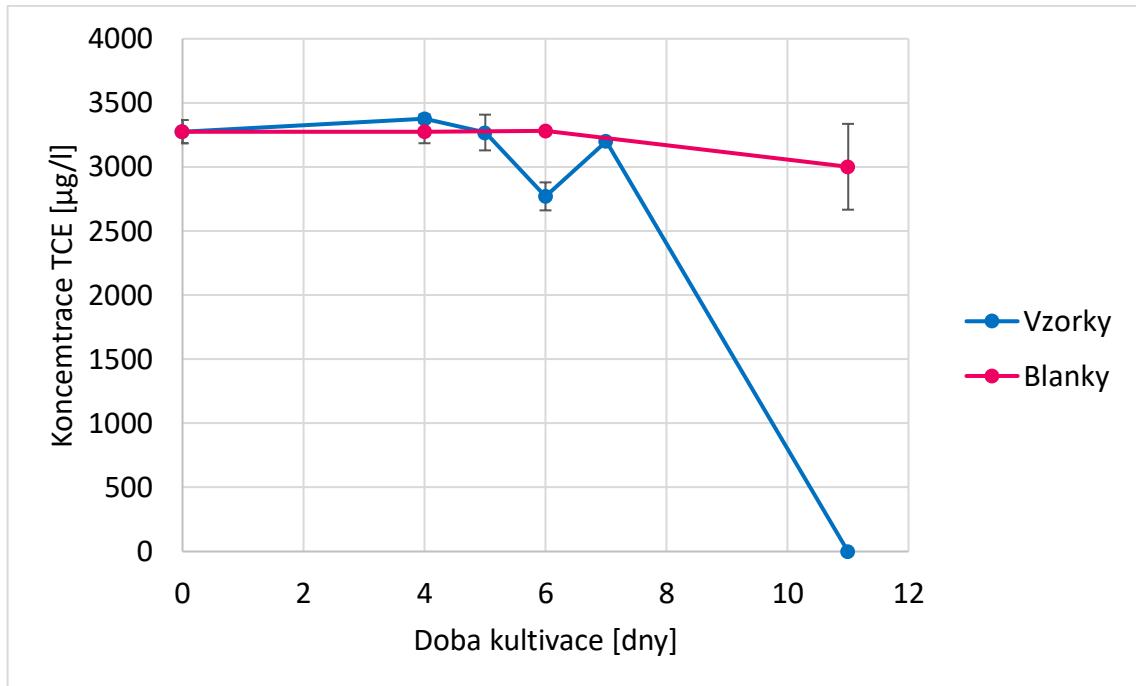
Degradace 1,6 mg/l TCE při teplotě 13 °C proběhla velmi rychle a dalším pokusem byla proto ověřena schopnost kultury RF2 degradovat i vyšší koncentrace TCE. Do 10 ml MMLF ve vialkách bylo přidáno místo 40 µl roztoku TCE, 80 µl roztoku a koncentrace TCE tak byla okolo 3,2 mg/l. Měření na GC bylo zahájeno 4. den kultivace.

Tabulka 28 Naměřené plochy píků pro vzorky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi

Doba kultivace [dny]	Plocha píku [-]		Plocha píku <sub>průměr</sub> [-]	c TCE [µg/l]	Ředění [-]	c <sub>skutečná</sub> TCE [µg/l]
0	446428	464237	455332,5	327,55	10	3275,54
4	465957	472667	469312	337,61	10	3376,10
5	440674	468069	454371,5	326,86	10	3268,62
6	374395	395847	385121	277,05	10	2770,46
7	445815	443783	444799	319,98	10	3199,76
11	0,0	0,0	0,0	0,00	10	0,00

Tabulka 29 Naměřené plochy píků pro blanky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi

Doba kultivace [dny]	Plocha píku [-]		Plocha píku <sub>průměr</sub> [-]	c TCE [µg/l]	Ředění [-]	c <sub>skutečná</sub> TCE [µg/l]
0	446428	464237	455332,5	327,55	10	3275,54
4	446428	464237	455332,5	327,55	10	3275,54
6	455698	456631	456164,5	328,15	10	3281,52
11	384310	450127	417218,5	300,14	10	3001,36



Obrázek 22 Degradace 3,2 mg/l TCE kulturou RF2 při teplotě 13 °C

Degradace TCE byla zahájena 6. den kultivace a 11. kultivace byl TCE zcela rozložen. Doba degradace se u vyšší koncentrace TCE prodloužila, ale i tak kultura RF2 byla schopná TCE degradovat.

### 7.11 Degradace TCE kulturou *Comamonas testosteroni* RF2 při 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu, při teplotě 8 °C (2 pokusy)

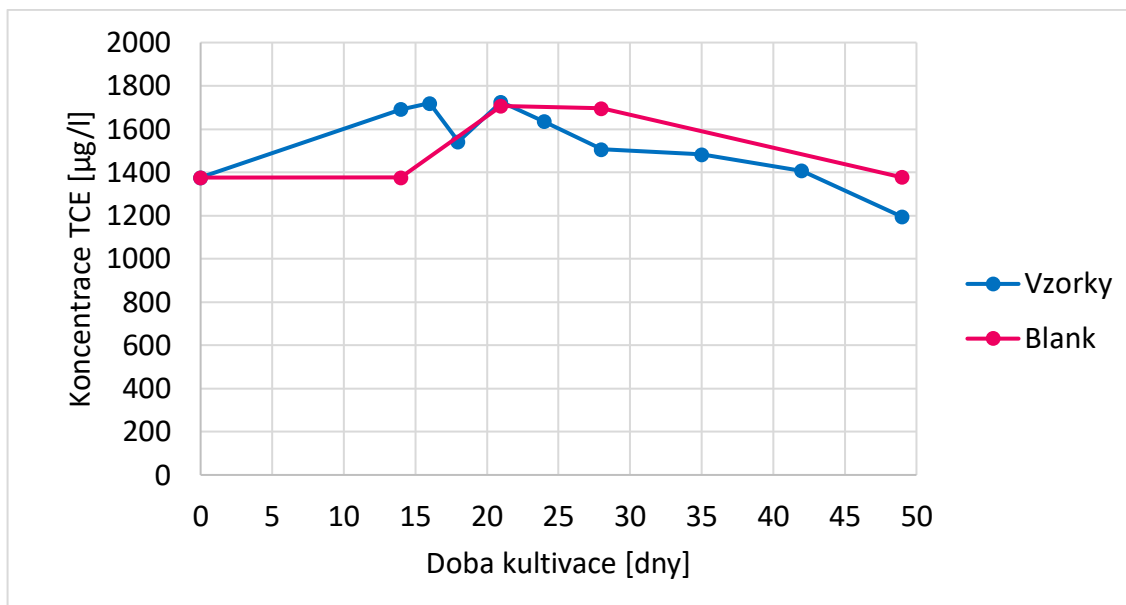
Při pokusech byla použita koncentrace okolo 1,5 mg/l TCE, tedy do vialek bylo dávkováno 40 µl roztoku TCE. Vialky byly kultivovány při 8 °C. Pokus měl ověřit schopnost kultury RF2 degradovat TCE i při nižší teplotě. Měření na GC bylo zahájeno po 14 dnech kultivace, kdy RF2 měla spotřebovat fenol a začít rozkládat TCE.

Tabulka 30 Naměřené plochy píků pro vzorky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi

<b>Doba kultivace [dny]</b>	<b>Plocha píku [-]</b>		<b>Plocha píku<sub>průměr</sub> [-]</b>	<b>c TCE [μg/l]</b>	<b>Ředění [-]</b>	<b>Čskutečná TCE [μg/l]</b>
<b>0</b>	191224	-	191223	137,56	10	1375,61
<b>14</b>	222234	247924	235079	169,11	10	1691,09
<b>16</b>	239136	238742	238939	171,89	10	1718,86
<b>18</b>	208262	220508	214385	154,22	10	1542,23
<b>21</b>	254421	225274	239847,5	172,54	10	1725,40
<b>24</b>	232412	221899	227155,5	163,41	10	1634,09
<b>28</b>	202677	215912	209294,5	150,56	10	1505,61
<b>35</b>	197021	215179	206100	148,26	10	1482,63
<b>42</b>	180799	210263	195531	140,66	10	1406,60
<b>49</b>	172768	159205	165986,5	119,41	10	1194,06

Tabulka 31 Naměřené plochy píků pro blanky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi

<b>Doba kultivace [dny]</b>	<b>Plocha píku [-]</b>	<b>c TCE [μg/l]</b>	<b>Ředění [-]</b>	<b>Čskutečná TCE [μg/l]</b>
<b>0</b>	191224	137,56	10	1375,61
<b>14</b>	191224	137,56	10	1375,61
<b>21</b>	237253	170,67	10	1706,73
<b>28</b>	235627	169,50	10	1695,04
<b>49</b>	191540	137,79	10	1377,89



Obrázek 23 Degradace 1,5 mg/l TCE kulturou RF2 při teplotě 8 °C

Z vypočtených hodnot koncentrace TCE v tomto případě TCE degradován nebyl ani po dlouhé době kultivace. Paralelně s měřením obsahu TCE ve vzorcích byl stanovován i fenol. Koncentrace fenolu ve vialkách však byla cca 145 mg/l místo předpokládaných 100 mg/l. Kultura RF2 tak nebyla schopna tuto koncentraci fenolu využít, a tudíž nemohla začít s degradací TCE.

Tabulka 32 Naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při degradaci TCE za teploty 8 °C

Doba kultivace [dny]	$A_{270}$ [-]	$c_{\text{fenol}}$ [mg/l]
14	2,29	144,03
16	2,22	139,62
18	2,35	147,80
21	2,24	140,88
24	2,28	143,40
28	2,34	147,17
35	2,34	147,17
42	2,29	144,03
49	2,07	130,19

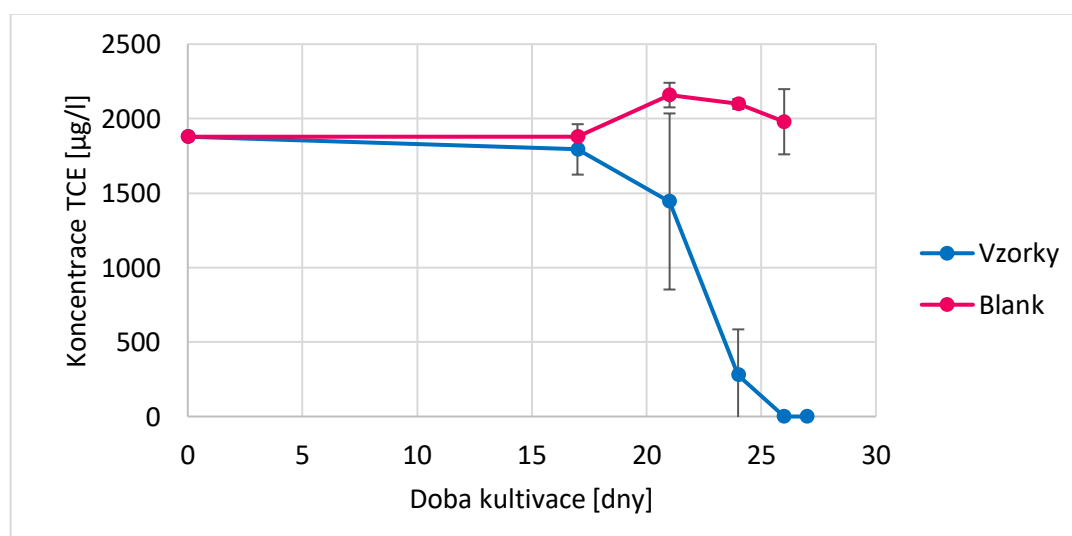
Tento pokus byl proto nasazen ještě jednou, stejným postupem jako u pokusu popsaného výše, avšak koncentrace fenolu v médiu již byla skutečně 100 mg/l. Měření na GC bylo zahájeno po 17 dnech kultivace.

Tabulka 33 Naměřené plochy píků pro vzorky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi

Doba kultivace [dny]	Plocha píku [-]			Plocha píku <sub>průměr</sub> [-]	c TCE [μg/l]	Ředění [-]	Čskutečná TCE [μg/l]
0	516633	527816	-	522224,5	375,67	5	1878,37
17	465222	531830	-	498526	358,63	5	1793,13
21	253942	371496	578567	401335	288,71	5	1443,55
24	12373	173976	45264	77204,3	55,54	5	277,69
26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5	0,00
27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5	0,00

Tabulka 34 Naměřené plochy píků pro blanky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi

Doba kultivace [dny]	Plocha píku [-]		Plocha píku <sub>průměr</sub> [-]	c TCE [μg/l]	Ředění [-]	Čskutečná TCE [μg/l]
0	516633	527816	522224,5	375,67	5	1878,37
17	516633	527816	522224,5	375,67	5	1878,37
21	576999	622863	599931	431,57	5	2157,87
24	592663	573958	583310,5	419,62	5	2098,09
26	489284	611018	550151	395,76	5	1978,82



Obrázek 24 Degradace 1,8 mg/l TCE kulturou RF2 při teplotě 8 °C

Úbytek TCE byl patrný až po cca třech týdnech kultivace, po 27 dnech kultivace byl TCE ze vzorku zcela zdegradován. Lagová fáze je tedy při teplotě 8 °C cca o 14 dní delší než při

degradaci probíhající za teploty 13 °C. Samotná degradace probíhala po dobu několika dní, což je také delší čas než u degradace při 13 °C. Degradace TCE kulturou RF2 však byla schopná probíhat i při teplotě 8 °C.

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo ověřit schopnost bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 degradovat trichlorethylen při teplotách nižších než 25 °C, které se častěji vyskytují v podzemních vodách.

V první části práce byla provedena série pokusů růstu kultury RF2 na fenolu za teplot 13 a 8 °C, aby byly zjištěny podmínky, za kterých je kultura schopna tvořit klíčový enzym pro degradaci trichlorethylenu. Kultura RF2 prokázala rychlý růst v minerálním médiu s fenolem při teplotě 25 °C, jak bylo zjištěno v dřívějších výzkumech. Při teplotě 15 °C byla v této práci zaznamenána delší lagová fáze a následný růst nedosahoval stejných hodnot jako u vyšší teploty. Nižší hodnoty optické hustoty však mohly být zapříčiněny přítomností mikrovláček ve zkumavkách inkubovaných při 15 °C. Pro předkultivaci RF2 byl nejvhodnější TYA agar, jak následně potvrdil test v tekutém minerálním médiu s fenolem o koncentraci 250 mg/l; kultura předkultivovaná na TYA agaru pak při 13 °C v tekutém minerálním médiu s fenolem vykazovala největší růst. Použití vyššího množství inokula při teplotě 13 a 8 °C nemělo vliv na růst kultury v tekutém minerálním médiu s fenolem. Ve snaze zkrátit lagovou fázi růstu RF2 při nižších teplotách byla RF2 kultivována ve směsi minerálního média s fenolem a podpůrnými substráty. Jako podpůrné substráty byly testovány trypton, kvasničný extrakt, jejich kombinace, MEM vitamíny a laktát sodný. Největší růst na fenolu při teplotě 13 °C byl zaznamenán při podpoře růstu tryptonem, ale lagová fáze byla delší než při použití laktátu sodného, kdy růst kultury na fenolu s tímto podpůrným substrátem byl také výrazný. V dalších pokusech byl proto používán právě tento podpůrný substrát. Dále byla kultura RF2 podrobená růstu na fenolu za přítomnosti různých koncentrací trichlorethylenu (1,5; 5; 10; 25 mg/l). Při teplotě 25 °C byla kultura RF2 schopna bezproblémově růst při každé koncentraci TCE. Kultivace při teplotě 13 °C ukázaly, že koncentrace trichlorethylenu 10 mg/l a vyšší růst RF2 jen zpomalily, takže bylo možné konstatovat, že tyto koncentrace nejsou pro RF2 při snížených teplotách výrazně toxické. Následně byl zjištěn správný poměr fenolu a laktátu sodného v minerálním médiu. Kultura RF2 vykazovala největší růst za přítomnosti 100 mg/l fenolu a 100 mg/l laktátu sodného. Vliv množství inokula na využití fenolu nebyl potvrzen. Přibližná doba, za jakou byl fenol spotřebován, byla při teplotě 13 °C 5 dnů a při teplotě 8 °C 19 dnů při podpoře laktátem sodným.

Určitým nečekaným zjištěným jevem během těchto prací byla schopnost kultury RF2 tvořit výrazný biofilm na stěnách skleněných vialek při růstu za nízkých teplot; tento jev nebyl v práci dále studován, mohlo by se však stát námětem dalšího výzkumu.

Vlastní degradace trichlorethylenu byly provedeny při teplotě 13 °C, s koncentrací trichlorethylenu 1,6 mg/l a 3,2 mg/l, a při teplotě 8 °C s koncentrací trichlorethylenu 1,8 mg/l. Koncentrace trichlorethylenu 1,6 mg/l byla při teplotě 13 °C odstraněna za sedm dnů, s lagovou fází 4 dny. Koncentrace 3,2 mg/l trichlorethylenu byla degradována při 13 °C za 11 dní. První pokus degradace TCE při teplotě 8 °C neproběhl dle předpokladů, jelikož byla ve vzorcích přítomná vyšší koncentrace fenolu, a to cca 150 mg/l. Kultivace trvala 49 dní a pokles fenolu ani trichlorethylenu nebyl zaznamenán. Poté byl tento pokus zopakován, tentokrát za přítomnosti 100 mg/l fenolu. Po delší lagové fázi (17 dní) byla koncentrace 1,8 mg/l trichlorethylenu zcela odstraněna za 27 dní kultivace.

Kultura RF2 je tedy schopna degradovat trichlorethylen i za teplot vyskytujících se v podzemních vodách a mohla by být použita pro jejich sanaci.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- ABRAHAMSSON, K., A. EKDAHL, J. COLLÉN a M. PEDERSÉN, 1995. Marine algae-a source of trichloroethylene and perchloroethylene. *Limnology and Oceanography*. 40(7), 1321-1326. ISSN 00243590. Dostupné z: doi:10.4319/lo.1995.40.7.1321
- AYOUBI, Patricia J. a Alan R. HARKER, 1998. Whole-Cell Kinetics of Trichloroethylene Degradation by Phenol Hydroxylase in a *Ralstonia eutropha* JMP134 Derivative. *Applied and Environmental Microbiology*., 64(11), 4353-4356. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.64.11.4353-4356.1998
- BAJAJ, Swati a Dileep K. SINGH, 2015. Biodegradation of persistent organic pollutants in soil, water and pristine sites by cold-adapted microorganisms: Mini review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 100, 98-105. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2015.02.023
- COYLE, Charles G., Gene F. PARKIN a David T. GIBSON, 1993. Aerobic, phenol-induced TCE degradation in completely mixed, continuous-culture reactors. *Biodegradation*., 4(1), 59-69. ISSN 0923-9820. Dostupné z: doi:10.1007/BF00701455
- DENG, Daiyong, Dung Ngoc PHAM, Fei LI, Mengyan LI a Robert M. KELLY, 2020. Discovery of an Inducible Toluene Monooxygenase That Cooxidizes 1,4-Dioxane and 1,1-Dichloroethylene in Propanotrophic *Azoarcus* sp. Strain DD4. *Applied and Environmental Microbiology*. 86(17), e01163-20. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01163-20
- DENG, Daiyong, Fei LI a Mengyan LI, 2018. A Novel Propane Monooxygenase Initiating Degradation of 1,4-Dioxane by *Mycobacterium dioxanotrophicus* PH-06. *Environmental Science & Technology Letters*. 5(2), 86-91. ISSN 2328-8930. Dostupné z: doi:10.1021/acs.estlett.7b00504
- DOHERTY, Richard E., 2000. Historie výroby a použití tetrachlormethanu, tetrachloretylenu, trichloretylenu a 1,1,1-trichlorethanu ve Spojených státech: 2. část – trichlorethylen a 1,1,1-trichlorethan. *Environmentální kriminalistika*. 1 (2), 83-93. ISSN 1527-5922. Dostupné z: doi:10.1006/enfo.2000.0011

- ECHA, 2021. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. Substance Infocard. Echa.europa.eu [online]. [cit. 2021-05-23]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/substanceinformation/-/substanceinfo/100.001.062>
- ENVIRONMENTAL POLLUTION CENTERS, 2021. TCE Pollution. Environmentalpollutioncenters.org [online]. [cit. 2021-05-23]. Dostupné z: <https://www.environmentalpollutioncenters.org/trichloroethylene/>
- FELLER, Georges, 2010. Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 22(32). ISSN 0953-8984. Dostupné z: doi:10.1088/0953-8984/22/32/323101
- FRIES, M R, G D HOPKINS, P L MCCARTY, L J FORNEY a J M TIEDJE., 1997. Microbial Succession during a Field Evaluation of Phenol and Toluene as the Primary Substrates for Trichloroethene Cometabolism. *Applied and environmental microbiology*. 63(4), 1515-1522. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.63.4.1515-1522.1997
- GERDAY, Charles, Mohamed AITTALEB, Mostafa BENTAHIR, et al, 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 18(3), 103-107. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(99)01413-4
- HAND, Steven, Baixin WANG a Kung-Hui CHU, 2015. Biodegradation of 1,4-dioxane: Effects of enzyme inducers and trichloroethylene. *Science of The Total Environment*. 520, 154-159. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.031
- HATZINGER, Paul B., Rahul BANERJEE, Rachael REZES, Sheryl H. STREGER, Kevin MCCLAY a Charles E. SCHAEFER, 2017. Potential for cometabolic biodegradation of 1,4-dioxane in aquifers with methane or ethane as primary substrates. *Biodegradation*. 28(5-6), 453-468. ISSN 0923-9820. Dostupné z: doi:10.1007/s10532-017-9808-7
- CHEN, Yan-Min, Tsair-Fuh LIN, Chih HUANG a Jui-Che LIN, 2008. Cometabolic degradation kinetics of TCE and phenol by *Pseudomonas putida*. *Chemosphere*. 72(11), 1671-1680. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2008.05.035

- IRZ, 2021. INTEGROVANÝ REGISTR ZNEČIŠŤOVÁNÍ. Ministerstvo životního prostředí České republiky. irz.cz [online]. [cit. 2021-11-31]. Dostupné z: [https://www.irz.cz/sites/default/files/latky/Trichlorethylen\\_Karta\\_latky\\_11012019.pdf](https://www.irz.cz/sites/default/files/latky/Trichlorethylen_Karta_latky_11012019.pdf)
- ISHIDA, Hiroaki a Kanji NAKAMURA, 2000. Trichloroethylene degradation by *Ralstonia* sp. KN1-10A constitutively expressing phenol hydroxylase: Transformation products, NADH limitation, and product toxicity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 89(5), 438-445. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S13891723(00)89093-3
- JENSEN, Anne-Mette, Kai Waldemar FINSTER a Ulrich KARLSON, 2003. Degradation of carbazole, dibenzothiophene, and dibenzofuran at low temperature by *Pseudomonas* sp. strain C3211. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22(4), 730-735. ISSN 07307268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.5620220408
- LAMBO, Adewale J. a Thakor R. PATEL, 2006. Cometabolic Degradation of Polychlorinated Biphenyls at Low Temperature by Psychrotolerant Bacterium *Hydrogenophaga* sp. IA3-A. *Current Microbiology*. 53(1), 48-52. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-005-0194-8
- LEE, Eun-Hee, Jaisoo KIM, Kyung-Suk CHO, Yun Gyong AHN a Geum-Sook HWANG, 2010. Degradation of hexane and other recalcitrant hydrocarbons by a novel isolate, *Rhodococcus* sp. EH831. *Environmental Science and Pollution Research*. 17(1), 64-77. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-009-0238-x
- LI, Jing, Feng LUO, Dian CHU, Huanling XUAN a Xianzhu DAI, 2017. Complete degradation of dimethyl phthalate by a *Comamonas testosteroni* strain. *Journal of Basic Microbiology*. 57(11), 941-949. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.201700296
- MARGESIN, Rosa, Silvia GANDER, Gabriele ZACKE, Anne Monique GOUNOT a Franz SCHINNER, 2003. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles*. 7(6), 451-458. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s00792-003-0347-2

- MARGESIN, R., G. NEUNER a K. B. STOREY, 2007. Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*. 94(2), 77-99. ISSN 0028-1042. Dostupné z: doi:10.1007/s00114-006-0162-6
- NAIZABEKOV, Sanzhar a Eun Yeol LEE, 2020. Genome-Scale Metabolic Model Reconstruction and in Silico Investigations of Methane Metabolism in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microorganisms*. 8(3). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8030437
- NELSON, M J, S O MONTGOMERY a P H PRITCHARD, 1988. Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(2), 604-606. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.54.2.604-606.1988
- PANT, Prabhakar a Sudhakar PANT, 2010. A review: Advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). *Journal of Environmental Sciences*. 22(1), 116-126. ISSN 10010742. Dostupné z: doi:10.1016/S1001-0742(09)60082-6
- POLIVTSEVA, V. N., T. O. ANOKHINA, L. R. IMINOVA, O. V. BORZOVA, T. Z. ESIKOVA a I. P. SOLYANIKOVA, 2020. Evaluation of the Biotechnological Potential of New Bacterial Strains Capable of Phenol Degradation. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 56(3), 298-305. ISSN 0003-6838. Dostupné z: doi:10.1134/S0003683820030096
- QIU, Liping, Hu WANG a Xuntao WANG, 2015. Isolation and characterization of a cold-resistant PCB209-degrading bacterial strain from river sediment and its application in bioremediation of contaminated soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 51(3), 204-212. ISSN 1093-4529. Dostupné z: doi:10.1080/10934529.2015.1094324
- RŮŽIČKA, Jan. Biodegradace trichlorethylenu imobilizovanými bakteriálními kulturami. Brno: Masarykova universita v Brně, 2004
- RUZICKA, Jan, Marie DVORACKOVA a Marek KOUTNY, 2011. Trichloroethylene Degradation by Two Phenol Utilizing Strains of *Comamonas testosteroni*. *Asian Journal of Chemistry*. 23(10), 4255-4259. ISSN 0975-427X. Dostupné z: [https://asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=23\\_10\\_3](https://asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=23_10_3)

- SEGAR R.L., SHELLEY L.W., SPEITEL G.E., 1995. Sustained trichloroethylene cometabolism by phenol-degrading bacteria in sequencing biofilm reactors. *Water Environ.* 67(5), 764-774. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/25044616>
- SHIH, C, M E DAVEY, J ZHOU, J M TIEDJE a C S CRIDDLE, 1996. Effects of phenol feeding pattern on microbial community structure and cometabolism of trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology.* 62(8), 2953-2960. ISSN 0099-2240. Dostupné z: [doi:10.1128/aem.62.8.2953-2960.1996](https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2953-2960.1996)
- SHIELDS, M S, S O MONTGOMERY, S M CUSKEY, P J CHAPMAN a P H PRITCHARD, 1991. Mutants of *Pseudomonas cepacia* G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology.* 57(7), 1935-1941. ISSN 0099-2240. Dostupné z: [doi:10.1128/aem.57.7.1935-1941.1991](https://doi.org/10.1128/aem.57.7.1935-1941.1991)
- SHIELDS, M S a M J REAGIN, 1992. Selection of a *Pseudomonas cepacia* strain constitutive for the degradation of trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology.* 58(12), 3977-3983. ISSN 0099-2240. Dostupné z: [doi:10.1128/aem.58.12.3977-3983.1992](https://doi.org/10.1128/aem.58.12.3977-3983.1992)
- SHUKLA, Awadhesh Kumar, Siddh Nath UPADHYAY a Suresh Kumar DUBEY, 2012. Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. *Critical Reviews in Biotechnology.* 34(2), 101-114. ISSN 0738-8551. Dostupné z: [doi:10.3109/07388551.2012.727080](https://doi.org/10.3109/07388551.2012.727080)
- SHURTLIFF, Mathew M., Gene F. PARKIN, Lenly J. WEATHERS a David T. GIBSON, 1996. Biotransformation of Trichloroethylene by a Phenol-Induced Mixed Culture. *Journal of Environmental Engineering.* 122(7), 581-589. ISSN 0733-9372. Dostupné z: [doi:10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1996\)122:7\(581\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1996)122:7(581))
- SIGGINS, Alma, Anne-Marie ENRIGHT a Vincent O'FLAHERTY, 2011. Methanogenic community development in anaerobic granular bioreactors treating trichloroethylene (TCE)-contaminated wastewater at 37 °C and 15 °C. *Water Research.* 45(8), 2452-2462. ISSN 00431354. Dostupné z: [doi:10.1016/j.watres.2011.01.030](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.030)

- SUDO, S.Z. a M. DWORKIN, 1973. Comparative Biology of Prokaryotic Resting Cells. Advances in Microbial Physiology Volume 9. Elsevier, 153-224. Advances in Microbial Physiology. ISBN 9780120277094. Dostupné z: doi:10.1016/S00652911(08)60378-1
- SUTTINUN, Oramas, Rudolf MÜLLER a Ekawan LUEPROMCHAI, 2009. Trichloroethylene cometabolic degradation by Rhodococcus sp. L4 induced with plant essential oils. Biodegradation. 20(2), 281-291. ISSN 0923-9820. Dostupné z: doi:10.1007/s10532-008-9220-4
- TAKAMI, Wako, Msae HORINOUCI, Hideaki NOJIRI, Hisakazu YAMANE a Toshio OMORI, 1999. Evaluation of trichloroethylene degradation by E-coli transformed with dimethyl sulfide monooxygenase genes and/or cumene dioxygenase genes. Biotechnology Letters. 21(3), 259-264. ISSN 01415492. Dostupné z: doi:10.1023/A:1005404931086
- TODD G. D. a kol., 2019. Toxicological profile for trichloroethylene, Agency for toxic substances and disease registry, Division of Toxicology and Human Health Sciences, Atlanta, GA, U.S., [online]. [cit. 2021-06-16]. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp19.pdf>
- TUPA, Peter Robert a Hisako MASUDA, 2019. Comparative Proteomic Analysis of Propane Metabolism in *biMycobacterium/i/b* sp. Strain ENV421 and *biRhodococcus/i/b* sp. Strain ENV425. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 28(3), 107-115. ISSN 1464-1801. Dostupné z: doi:10.1159/000490494
- VÍT, Daniel. Biodegradace trichlorethylenu definovanými kulturami mikroorganismů. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2001, 80 s. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.
- WACKETT, L. P. a D. T. GIBSON, 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. Applied and Environmental Microbiology. 54(7), 1703-1708. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.54.7.1703-1708.1988

- WALD, Jiri, Miluse HROUDOVA, Jan JANSKA, Blanka VRCHOTOVA, Tomas MACEK a Ondrej UHLIK, 2015. Pseudomonads Rule Degradation of Polyaromatic Hydrocarbons in Aerated Sediment. *Frontiers in Microbiology*. 6. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.01268
- WANG, Chun-Chin, Chen-Huei LI a Chu-Fang YANG, 2019. Acclimated methanotrophic consortia for aerobic co-metabolism of trichloroethene with methane. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 142, 52-57. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2019.05.002
- WILLIAMS-JOHNSON, M. a kol., 1997. Toxicological profile for trichloroethylene. Agency for toxic substances and disease registry, Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA, U.S., [online]. [cit. 2021-05-23]. Dostupné z: [https://clu.in.org/download/contaminantfocus/dnapl/chemistry\\_and\\_behavior/tox\\_profile\\_tce.pdf](https://clu.in.org/download/contaminantfocus/dnapl/chemistry_and_behavior/tox_profile_tce.pdf)
- YANG, Jun Won, Wooyoun CHO, Yejee LIM, Sungyoon PARK, Dayoung LEE, Hyun-A JANG a Han S. KIM, 2019. Evaluation of aromatic hydrocarbon decomposition catalyzed by the dioxygenase system and substitution of ferredoxin and ferredoxin reductase. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(33), 34047-34057. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-018-3200-y
- YEE, Dennis C., Jennifer A. MAYNARD a Thomas K. WOOD, 1998. Rhizoremediation of Trichloroethylene by a Recombinant, Root-Colonizing *Pseudomonas fluorescens* Strain Expressing Toluene ortho -Monooxygenase Constitutively. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(1), 112-118. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.64.1.112-118.1998
- ZALESK, Michal, Jan RUZICKA, Robert VICHA a Marie DVORACKOVA, 2017. Cometabolic degradation of dichloroethenes by *Comamonas testosteroni* RF2. *Chemosphere*. 186, 919-927. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.07.156
- ZALESK, Michal, Jan RUZICKA, Robert VICHA a Marie DVORACKOVA, 2021. Examining aerobic degradation of chloroethenes mixture in consortium composed of *Comamonas testosteroni* RF2 and *Mycobacterium aurum* L1. *Chemosphere*. 269. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128770

ZHENG, Guanyu, Ammaiappan SELVAM a Jonathan W.C. WONG, 2011. Rapid degradation of lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) at low temperature by *Sphingobium* strains. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65(4), 612-618. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2011.03.005



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

A <sub>270</sub>	Absorbance při vlnové délce 270 nm
cDCE	cis-1,2-dichlorethylen
cis-DCE	cis-1,2-dichlorethylen
DCE	Dichlorethylen
DV	Destilovaná voda
ECD	Detektor elektronového záchytu
FID	Plamenoionizační detektor
FR	Fyziologický roztok
GC	Plynová chromatografie
KE	Kvasničný extrakt
LN	Laktát sodný
MAFt	Minerální agar s fenolem a tryptonem
MM	Minerální médium
MML	Minerální médium s laktátem sodným
MMLF	Minerální médium s laktátem sodným a fenolem
MPA	Masopeptonový agar
OD	Optická hustota
PAH	Polyaromatické uhlovodíky
PCB	Polychlorované bifenyly
PCE	Tetrachlorethylen
PCR	Polymerázová řetězová reakce
POP	Perzistentní organické polutanty
T	Trypton
T+KE	Trypton a kvasničný extrakt

---

TCE	Trichlorethylen
trans-DCE	trans-1,2-dichlorethylen
TYA	Trypton Yeast Extract Agar
TYA+F	Trypton Yeast Extract Agar s fenolem
UV	Ultrafialové záření
V	Vzorek
VC	Vinylchlorid
VIS	Viditelné záření
VOC	Tekavé organické látky
ZR	Zásobní roztok

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1	Strukturní vzorec trichlorethylenu .....	13
Obrázek 2	Schéma degradace TCE bakteriemi <i>Ralstonia</i> sp. KNI-10A (upraveno z Ishida a Nakamura, 2000) .....	20
Obrázek 3	Schéma degradace TCE bakterií <i>Methylocystis</i> sp. M (upraveno ze Saeki a kol., 1999).....	21
Obrázek 4	Využití methanu různými methanotrofními konsorcií během aklimatizace (upraveno z Wang a kol., 2019).....	23
Obrázek 5	Mechanismus reduktivní dechlorace (upraveno z Pant a Pant, 2010).....	28
Obrázek 6	Průběh degradace trichlorethylenu klidovými buňkami <i>Comamonas</i> <i>testosteroni</i> RF2 (upraveno z Růžička a kol., 2011).....	31
Obrázek 7	Kalibrační křivka pro stanovení fenolu .....	38
Obrázek 8	Chromatogram vzorku obsahující TCE z detektoru FID.....	41
Obrázek 9	Kalibrační křivka pro stanovení TCE z detektoru FID .....	42
Obrázek 10	Růst kultury RF2 na fenolu při různých teplotách .....	52
Obrázek 11	Mikrovločky při 15 °C.....	52
Obrázek 12	Vločky při 25 °C .....	52
Obrázek 13	Růst kultury v MMF za různých teplot, předkultivované na TYA a MA Ft agaru.....	56
Obrázek 14	Růst RF2 v MMF za přítomností podpůrných substrátů při teplotě 13 °C .....	59
Obrázek 15	Růst RF2 v MMF za přítomností podpůrných substrátů při teplotě 8 °C .....	61
Obrázek 16	Růst RF2 v přítomnosti různých přísad TCE při teplotě 25 °C.....	62
Obrázek 17	Růst RF2 v přítomnosti různých přísad TCE při teplotě 13 °C.....	63
Obrázek 18	Růst RF2 za přítomnosti různých koncentrací fenolu a laktátu.....	65
Obrázek 19	Úbytek fenolu při teplotě 8 °C a různých inokulech (série A) .....	67
Obrázek 20	Spotřeba fenolu kulturou RF2 při teplotě 8 °C (průměry ze dvou až tří hodnot).....	70
Obrázek 21	Degradace 1,6 mg/l TCE kulturou RF2 při teplotě 13 °C .....	72
Obrázek 22	Degradace 3,2 mg/l TCE kulturou RF2 při teplotě 13 °C .....	74
Obrázek 23	Degradace 1,5 mg/l TCE kulturou RF2 při teplotě 8 °C .....	76
Obrázek 24	Degradace 1,8 mg/l TCE kulturou RF2 při teplotě 8 °C .....	77

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Chemické a fyzické vlastnosti TCE (Pant a Pant, 2010).....	13
Tabulka 2 Bakteriální kultury schopné kometabolicky degradovat TCE.....	16
Tabulka 3 Tvorba produktu během degradace TCE <i>Ralstonia</i> sp. KNI-10A (Ishidy a Nakamury, 2000).....	19
Tabulka 4 Degradace TCE pomocí RF2 a VM po růstu na laktátu a fenolu za přítomnosti TCE (Růžička a kol., 2011).....	31
Tabulka 5 Tvorba kyseliny trichloroctové a chloridů po degradaci TCE u obou kmenů (Růžička a kol., 2011).....	32
Tabulka 6 Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku pro stanovení fenolu.....	38
Tabulka 7 Přídavek TCE do vialek.....	45
Tabulka 8 Příprava standardů dle McFarlanda.....	46
Tabulka 9 Množství použitého média.....	47
Tabulka 10 Objemy minerálního média s laktátem, fenolu a inokula.....	48
Tabulka 11 Naměřené hodnoty optické hustoty vzorků a kontrol při teplotě 25 °C a 15 °C.....	51
Tabulka 12 Schopnost růstu kultury RF2 na agarech při 15, 13 a 8 °C.....	53
Tabulka 13 Růst kultury RF2 na agarech při 8 °C.....	54
Tabulka 14 Růst kultury RF2 v MMF za různých teplot, předkultivované na TYA a MAft agaru rostoucí při 8 °C.....	55
Tabulka 15 Růst RF2, vyočkované z MMF, za různých teplot.....	57
Tabulka 16 Růst RF2 v MMF předkultivované na TYA+F při různých teplotách a množství inokula.....	58
Tabulka 17 Růst RF2 v MMF za přítomností podpůrných substrátů při teplotě 13 °C...	59
Tabulka 18 Růst RF2 v MMF za přítomností podpůrných substrátů při teplotě 8 °C.....	60
Tabulka 19 Růst RF2 v přítomnosti různých přísadků TCE při teplotě 25 °C.....	62
Tabulka 20 Růst RF2 v přítomnosti různých přísadků TCE při teplotě 13 °C.....	63
Tabulka 21 Růst RF2 za přítomností různých koncentrací fenolu a laktátu.....	64
Tabulka 22 Naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při teplotě 8 °C a různých inokulech kultury RF2 (série A).....	66
Tabulka 23 Naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při teplotě 8 °C a různých inokulech kultury RF2 (série B).....	68
Tabulka 24 Vzhled vialek se vzorkem a naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při teplotě 8 °C.....	69

Tabulka 25 Vzhled vialek se vzorkem a naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při teplotě 13 °C .....	70
Tabulka 26 Naměřené plochy píků pro vzorky a vypočtené koncentrace TCE ve vodné fázi .....	71
Tabulka 27 Naměřené plochy píků pro blanky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi .....	71
Tabulka 28 Naměřené plochy píků pro vzorky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi .....	73
Tabulka 29 Naměřené plochy píků pro blanky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi .....	73
Tabulka 30 Naměřené plochy píků pro vzorky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi .....	75
Tabulka 31 Naměřené plochy píků pro blanky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi .....	75
Tabulka 32 Naměřené hodnoty absorbance a stanovená koncentrace fenolu při degradaci TCE za teploty 8 °C .....	76
Tabulka 33 Naměřené plochy píků pro vzorky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi .....	77
Tabulka 34 Naměřené plochy píků pro blanky a vypočtená koncentrace TCE ve vodné fázi .....	77