

Výskyt bakterií rostoucích na fenoxylethanolu ve vnějším prostředí

Matěj Novák

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Matěj Novák**
Osobní číslo: **T20469**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Ochrana životního prostředí**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Výskyt bakterií rostoucích na fenoxylethanolu ve vnějším prostředí**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte rešerši zaměřenou na fenoxylethanol a na možnosti bakteriálního rozkladu vybraných fenolických látek.
2. Ověřte výskyt bakterií, využívající fenoxylethanol ke svému růstu, v různých vzorcích vnějšího prostředí.
3. Získané poznatky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v tištěné i elektronické formě v řádném termínu.

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

Seznam doporučené literatury:

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

N. N. Tuan a kol.: Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresource Technology* 102, 2011, 4232–4240.

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

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

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 17. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji 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 bakalářskou práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Práce se zabývala ověřením výskytu bakterií, které využívají fenoxxyethanol ke svému růstu, ve vnějším prostředí. Pro získání bakterií bylo celkem odebráno 27 vzorků vod a půd ve dvou sériích. V každé sérii byly vzorky vod a půd kultivovány při teplotách 8°C a 23°C. Bylo prokázáno, že z uvedených 27 vzorků se v 6 vzorcích nachází kultury bakterií využívající fenoxxyethanol ke svému růstu. Z 6 pozitivních vzorků byly 4 vzorky vod a 2 vzorky půd. Z pozitivních vzorků byla provedena kultivace bakterií, jejichž výsledky ukázaly, že z každého vzorku po pomnožení na fenoxxyethanolu bylo přítomno několik různých bakteriálních kultur. Následné testy s jednotlivými kulturami poté ukázaly, že většina ze získaných kultur není schopna sama na fenoxxyethanolu růst. U vzorků kultivovaných při 8 °C nebyla prokázána přítomnost bakterií rozkládajících fenoxxyethanol.

Klíčová slova: 2-fenoxxyethanol, mikrobiální rozklad, půdy, vody

ABSTRACT

The work was dealing with the verification of the occurrence of bacteria, which use phenoxxyethanol for their growth, in the external environment. A total of 27 water and soil samples were collected in two series to obtain bacteria. In each batch, water and soil samples were cultured at 8°C and 23°C. It was shown that out of these 27 samples, 6 samples contained bacterial cultures using phenoxxyethanol for their growth. Of the 6 positive samples, 4 were water samples and 2 were soil samples. The positive samples were cultured for bacteria and the results showed that several different types of bacteria were present from each sample after multiplication on phenoxxyethanol. Subsequent tests with individual cultures then showed that most of the cultures obtained was able to grow on phenoxxyethanol alone. Samples cultured at 8°C showed no evidence of phenoxxyethanol-degrading bacteria.

Keywords: 2-phenoxxyethanol, microbial decomposition, soil, water

Velmi rád bych poděkoval panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho rady a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Další poděkování patří mojí rodině, která mě v době realizace bakalářské práce podporovala.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 2-FENOXYETHANOL.....	11
1.1 CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI	11
1.2 TOXICITA A POUŽITÍ.....	11
1.3 VÝSKYT V PŘÍRODĚ	11
2 DOSAVADNÍ POZNATKY O BAKTERIÁLNÍM ROZKLADU FENOXYETHANOLU	16
2.1 PŮVODCI BAKTERIÁLNÍHO ROZKLADU FENOXYETHANOLU V AKTIVOVANÉM KALU.....	16
2.2 KOMETABOLICKÝ ROZKLAD TRICHLORETHYLENU POMOCÍ KULTUR <i>HYDROGENOPHAGA PSEUDOFLAVA</i> P4 A <i>ZOOGLOEA</i> <i>RESINIPHILA</i> P9 A METABOLICKÁ DRÁHA ROZKLADU FENOXYETHANOLU	20
2.3 IZOLACE BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ DEGRADUJÍCÍCH 2- BUTOXYETHANOL	21
3 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD FENOLU A STRUKTURNĚ BLÍZKÝCH LÁTEK	25
3.1 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD FENOLU	21
3.2 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD KYSELINY BENZOOVÉ.....	21
3.3 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD NITROBENZENU A ANILINU.....	21
3.4 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD TOLUENU	21
3.5 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD NITROFENOLU.....	21
3.6 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD TYROSINU	30
3.7 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD ALKYLFENOLŮ.....	33
4 CÍLE PRÁCE	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
5 METODIKA	39
5.1 ODBĚR VZORKŮ	39

5.2	OČKOVÁNÍ VZORKŮ.....	40
5.3	SLEDOVÁNÍ RŮSTU BAKTERIÍ	42
5.4	ZÍSKÁNÍ BAKTERIÍ ROSTOUCÍCH NA FENOXYETHANOLU	42
5.5	STUDIUM BAKTERIÍ ROSTOUCÍCH NA FENOXYETHANOLU	43
5.6	DLOUHODOBÉ UCHOVÁNÍ ZÍSKANÝCH KULTUR	43
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
6.1	KULTIVACE VZORKŮ PRVNÍ SÉRIE	45
6.2	ZÍSKÁNÍ BAKTERIÍ ZE VZORKŮ 1 A 7 PRVNÍ SÉRIE A HLEDÁNÍ KLÍČOVÝCH KULTUR.....	47
6.3	KULTIVACE VZORKŮ DRUHÉ SÉRIE	53
6.4	KONZERVACE KULTUR	53
7	ZÁVĚR	60
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	67
	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
	SEZNAM TABULEK	69

ÚVOD

Lidstvo používá v dnešní době dennodenně velké množství průmyslových výrobků obsahujících celou řadu rozmanitých přírodních i syntetických organických sloučenin. Pokud tyto výrobky použijeme nebo nám nechtěně uniknou, mohou se látky obsažené ve výrobcích dostávat do odpadních vod nebo také do jiných sfér životního prostředí.

Osud průmyslových látek ve vnějším prostředí je dán řadou faktorů, mezi něž patří i mikrobiální rozklad, pomocí kterého některé mikroorganismy dokáží určité synteticky vyráběné organické látky využívat ke svému růstu jako substráty. Díky rozkladu látek dochází k jejich odbourávání v prostředí a zamezuje se hromadění nebo případně i akumulaci těchto látek v potravních řetězcích. Z těchto důvodů je důležité znát přítomnost mikroorganismů schopných degradace konkrétních průmyslových látek v nejdůležitějších sférách prostředí, jako jsou půdy a povrchové vody, a umět tak odhadnout možnosti biologického odstraňování těchto látek.

Mezi velmi využívané sloučeniny v několika průmyslových odvětvích patří fenoxylethanol, který se používá jako konzervační látka v kosmetických přípravcích, ale také ve vakcínách, biocidních přípravcích na dezinfekci rukou a při anestezii ryb.

V současné době neexistují téměř žádné dostupné vědecké informace o výskytu mikroorganismů schopných využívat fenoxylethanol jako substrát. Z důvodu velkého využití fenoxylethanolu v průmyslových odvětvích a zároveň neznalosti mikroorganismů schopných jeho rozkladu se stalo studium přítomnosti takových mikroorganismů tématem této bakalářské práce.

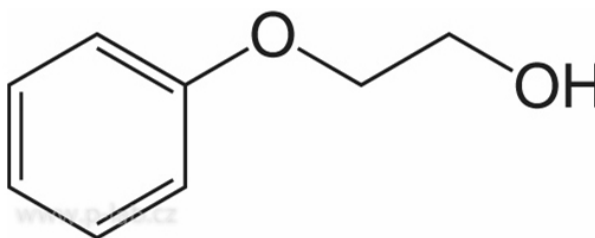
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 2-FENOXYETHANOL

1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

2-fenoxyethanol, ethylenglykolmonofenylether, fenoxytol, 1-hydroxy-2-fenoxyethan a (2-hydroxyethoxy) benzen a fenylglykol jsou synonyma pro éter a aromatický alkohol fenoxylethanol, který je bezbarvou, slabě zapáchající tekutinou. (Carlroth 2022, Sigma-Aldrich, 2022)

Účinkuje na různé gramnegativní, grampozitivní bakterie i kvasinky a má slabý inhibiční účinek na místní kožní flóru. (Puschmann a kol., 2018; Anonym, 1990; Scientific Committee on Consumer Safety, 2016; Wang a kol., 2019). Fenoxylethanol se díky antimikrobiálním účinkům používá jako konzervační látka v kosmetických přípravcích. (Scientific Committee on Consumer Safety, 2016)



Obrázek 1 Chemická struktura 2-fenoxyethanolu (P-LAB, 2022)

Tabulka 1 Chemicko-fyzikální vlastnosti fenoxylethanolu (Carlroth, 2022)

Hustota [g/cm^3 , 20°C]	1,11
Molární hmotnost [g/mol]	138,2
Bod tání [$^\circ\text{C}$, $101,3\text{kPa}$]	9,1
Bod varu [$^\circ\text{C}$]	244,3
Bod vzplanutí [$^\circ\text{C}$, $101,2\text{kPa}$]	126
Teplota samovznícení [$^\circ\text{C}$, $100,1\text{kPa}$]	475
Teplota rozkladu [$^\circ\text{C}$]	> 350
Hodnota pH (10 g/l, 23°C)	7
Rozpustnost ve vodě (g/l, 20°C)	24
Tlak páry [hPa, 20°C]	0,01
Povrchové napětí [Nm^{-1} , $19,9^\circ\text{C}$]	0,0707

1.2 Toxicita a použití

Dermální absorpce fenoxylethanolu u lidí *in vitro* je vysoká a rychlá bez ohledu na jeho koncentraci v testovaném přípravku.

Po 24 hodinách expozice fenoxxyethanolu zůstává v různých vrstvách kůže velmi malé množství a většina fenoxxyethanolu je zachycena v receptorové tekutině, což naznačuje, že se fenoxxyethanol neváže na kůži ani se v ní nehromadí. (Scientific Committee on Consumer Safety, 2016)

Používá se také jako konzervační látka v různých přípravcích, např. vakcínách a biocidních přípravcích na dezinfekci rukou včetně výrobků pro batolata. (ECHA, 2018) Působí antimikrobiálně tím, že odpojuje oxidativní fosforylaci od dýchání a kompetitivně inhibuje malátdehydrogenasu. (Anonym, 1990)

Výzkum antimikrobiálních sloučenin rostlinného původu prokázal, že antimikrobiální kombinaci představovanou eugenolem/ β -pinenem/2-fenoxxyethanolem/sorbátem draselným vedle kyseliny salicylové je vhodné zahrnout do složení krémového základu anti-akné přípravku. (Saviuc a kol., 2017)

Ve studii provedené na třech králících bylo zjištěno, že neředěný fenoxxyethanol vyvolává známky podráždění očí *in vivo* s maximem podráždění 72 hodin po instilaci testované látky. (Scientific Committee on Consumer Safety, 2016)

Ve studiích provedených na králících a morčatech bylo zjištěno, že neředěný fenoxxyethanol vyvolává mírné až střední podráždění kůže. (Scientific Committee on Consumer Safety, 2016; ANSM, 2012)

Fenoxxyethanol nanesený na poraněnou kůži lidí nezpůsobil žádné lokální ani systémové účinky. (Gough a kol., 1994; Lawrence a kol., 1982)

Ve studii provedené u předčasně narozených novorozenců bylo zjištěno, že dezinfekce složená z vodného roztoku 0,1 % oktenidinu a 2 % fenoxxyethanolu nezpůsobuje podráždění kůže. (Bührer a kol., 2002)

Studie provedená u předčasně narozených dětí s extrémně nízkou porodní hmotností v Německu však zjistila, že při použití lokálního antiseptického roztoku, obsahujícího 0,1 % oktenidinu i fenoxxyethanolu, se objevily některé známky podráždění kůže, jako je erytém nebo kožní eroze. Možným problémem studie byl fakt, že oktenidin může způsobovat také podráždění kůže. (Biermann a kol., 2016)

Senzibilizační studie provedené na morčatech neprokázaly žádné senzibilizační reakce po expozici kůže fenoxxyethanolu. Celková frekvence senzibilizačních reakcí provedených u lidí

je velmi nízká (0,1-0,24 %). (Scientific Committee on Consumer Safety, 2016; ANSM, 2012)

Alergické reakce – jako je např. kontaktní kopřivka – jsou způsobeny fenoxxyethanolem jen vzácně, a tudíž jej Evropská agentura pro chemické látky (ECHA) neklasifikuje jako senzi-
bilizátor. (Snuch a kol., 2011; Dréno a kol., 2019)

Při výzkumech na rybě *Solea senegalensis* bylo zjištěno, že 2-fenoxxyethanol působí aneste-
ticky s nejvyšším účinkem ze studovaných látek: 2-fenoxxyethanolu, metomidátu, hřebíčko-
vého oleje a trikain mesylátu na tuto rybu. Nejnižší účinná dávka fenoxxyethanolu v mořské
vodě činila $600 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. (Weber a kol., 2008)

Ženy pracující v rybí líhni, ve které se používá fenoxxyethanol k anestezii ryb, pociťovaly
bolesti hlavy a malátnost. Z této studie, ve které se vyskytly neurologické účinky u žen, se
nedají vyvodit závěry, neboť byl ve studii nízký počet účastníků, nebyla uvedena koncen-
trace fenoxxyethanolu použitá k anestezii ryb, chybělo měření dávky fenoxxyethanolu nebo
jeho metabolitu v krvi nebo moči a chyběl popis neuropsychologického testu použitého k
posouzení kognitivních poruch. (Morton W. a kol., 1990)

2-fenoxxyethanol působí inhibičně na syntézu DNA a RNA. (Anonym, 1990) Pomocí kine-
tických studií *in vivo* s využitím lokální a perorální cesty bylo zjištěno, že fenoxxyethanol se
rychle vstřebává, distribuuje, metabolizuje a vylučuje. (Scientific Committee on Consumer
Safety, 2016; Roper a kol., 1997; Breslin a kol., 1991; Howes a kol., 1988; Kim a kol., 2015)
Je metabolizován v kůži, rychleji však v játrech. Kyselina 2-fenoxxyoctová, která vzniká
dvoustupňovým oxidačním procesem pomocí cytosolické alkoholdehydrogenázy a aldehyd-
dehydrogenázy, je hlavním metabolitem fenoxxyethanolu. (Roper a kol., 1997) Kyselinu 2-
fenoxxyoctovou vylučuje člověk z těla močí. (Howes a kol., 1988; Bühner a kol., 2002)

Při inhalační cestě účinku fenoxxyethanolu na potkany vystavené koncentracím fenoxxyetha-
nolu 0, 40, 200 a $1000 \frac{\text{mg}}{\text{m}^3}$ inhalační cestou po dobu 6 hodin denně a 5 dní v týdnu po dobu
14 dní nevykazoval fenoxxyethanol žádné systémové účinky. Jediným hlášeným účinkem
bylo lokální podráždění dýchacího systému. (Scientific Committee on Consumer Safety,
2016)

Studie provedená na skupině králíků (šest samic v kontrolní skupině a tři samice v každé
exponované skupině), ukázala, že samice vystavené desetidennímu podávání fenoxxyetha-
nolu perorální cestou jevíly známky hematotoxicity při dávkách 100 mg/kg tělesné hmot-
nosti /den a vyšších. (Breslin a kol., 1991)

Systémové účinky, například hematologické a jaterní účinky pozorované na zvířatech, se projeví po perorální expozici vysokým dávkám fenoxoethanolu. (Dréno a kol., 2019)

Ve studii dlouhodobé toxicity provedené na potkanech byly při dávce 510 mg/kg tělesné hmotnosti/den zaznamenány mírné až středně závažné toxické účinky na ledviny u samců. (Scientific Committee on Consumer Safety, 2016)

Podle vědeckých výborů EU pro bezpečnost spotřebitele (VVBS) nemá fenoxoethanol mutagenní potenciál *in vivo* a není genotoxický pro člověka. (Dréno a kol., 2019)

Podle třech výzkumných studií francouzské skupiny Garlantézec a kol. fenoxoethanol není endokrinní disruptor. (Garlantézec a kol., 2013; Warembourg a kol., 2018)

V první studii se neprokázala souvislost mezi metabolitem fenoxoethanolu – kyselinou fenoxoctovou – a sledovanými patologickými stavy označovanými jako kryptorchismus nebo hypospadie. (Garlantézec a kol., 2013)

Další dvě studie neprokázaly předpokládanou souvislost mezi kyselinou fenoxoctovou a změnami v tvorbě sexuálních hormonů vázajících globulin (SHBG), ani změnami v androgenní a estrogenní aktivitě u novorozenců. (Warembourg a kol., 2018)

Závěrem lze říci, že fenoxoethanol lze považovat za bezpečný, pokud se používá jako konzervační látka v kosmetických přípravcích v koncentraci do 1 %. (ANSM, 2012)

1.3 Výskyt v přírodě

K. Dettner a F. Reissenweber (1991) zkoumali chemické složení zadečkových obranných sekretů 24 druhů brouků z čeledi drabčíkovití, podčeledi *Omaliniinae* a *Proteininae*, pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Identifikovali 45 různých sloučenin jako jsou organické kyseliny, aldehydy, ketoaldehydy, ketony, alkoholy, estery, terpeny, aromatické sloučeniny a uhlovodíky. Z identifikovaných složek žláz poprvé zaznamenali 13 esterů, benzonitril, kyanobenzol a také 2-fenoxoethanol. 2-fenoxoethanol byl zjištěn pouze u jediného druhu brouka, a to u *Megarcthrus denticollis*, a to dokonce ve značném množství oproti jiným organickým sloučeninám. (Konrad D. a kol., 1991)

Důkazem výskytu 2-fenoxoethanolu v přírodě je také výzkum, který provedli Husein a kol. (2014). Syntetizovali nové estery reakcí kyseliny benzoové nebo kyselin mono-hydroxybenzoových s 2-fenoxoethanolem, přičemž tyto látky separovali z kopřivy *Urtica pilulifera*.

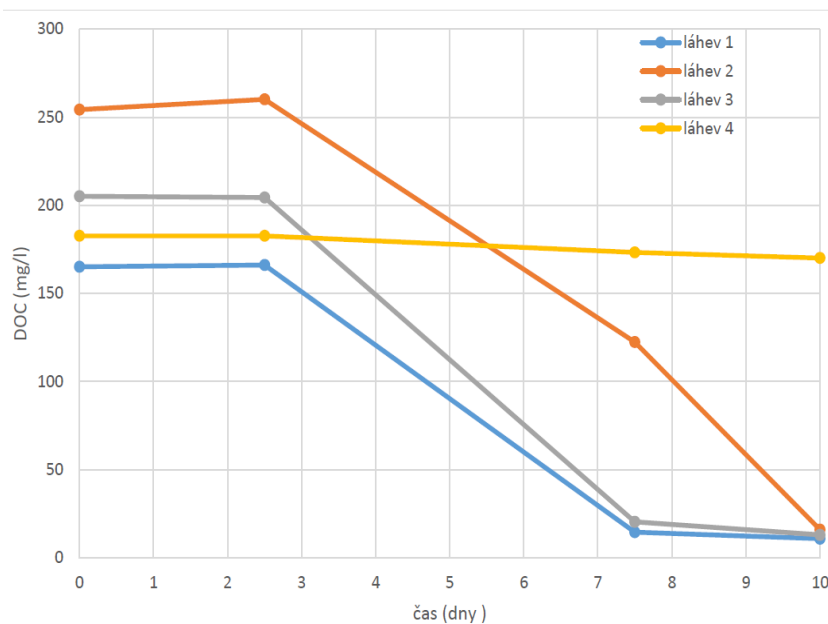
Vzniklé estery charakterizovali a testovali je na možné antioxidační, antimykotické, antimikrobiální a protinádorové účinky. (Husein a kol., 2014) Tato práce tak po zjištění výskytu 2-fenoxyethanolu u brouků druhu *Megarthritis denticollis* jako druhá ukázala na přírodní původ 2-fenoxyethanolu.

2 DOSAVADNÍ POZNATKY O BAKTERIÁLNÍM ROZKLADU FENOXYETHANOLU

2.1 Původci bakteriálního rozkladu fenoxoethanolu v aktivovaném kalu

Ing. Strachota se pokoušel prokázat bakterie rozkládající fenoxoethanol v aktivovaném kalu. Základní pokus byl proveden tak, že do tří lahví o objemu 500 ml bylo přidáno 200 ml minerálního media, 54,5 μl 2-fenoxoethanolu a 200 μl dekantovaného a desintegrovaného aktivovaného kalu, odebraného v čistírně odpadních vod ve Zlíně-Malenovicích. Do čtvrté lahve byl přidán místo aktivovaného kalu pouze sterilní fyziologický roztok, který sloužil jako blank. Lahve byly inkubovány při 25°C a několik dalších dní byly odebírány vzorky a uchovány v mrazáku pro určení koncentrací DOC v průběhu inkubace.

V grafu na obrázku 2 je zaznamenán zjištěný pokles koncentrací rozpuštěného organického uhlíku ve všech zkušebních lahvích, který dokládá přítomnost bakterií využívajících 2-fenoxoethanol jako svůj zdroj energie a uhlíku.



Obrázek 2 Průběh koncentrací DOC během rozkladu fenoxoethanolu aktivovaným kalem (Strachota, 2020)

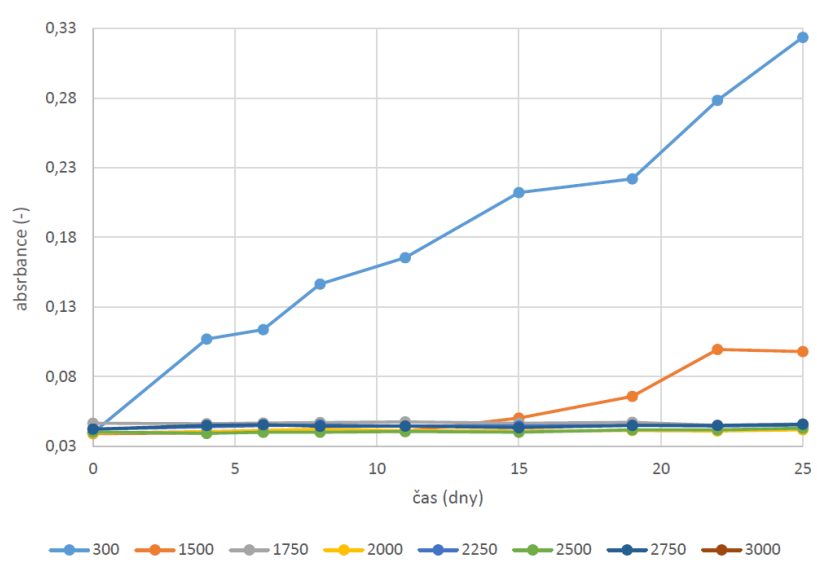
Mikrobiální rozklad byl také potvrzen díky nárůstu vločkovité biomasy ve zkušebních suspenzích i jejich mléčnému zakalení, oproti kontrolnímu vzorku, který zůstal beze změny.

Po potvrzení rozkladu 2-fenoxyethanolu byly izolovány a identifikovány kultury rozkládající fenoxyethanol. Po dokonalém protřepání všech tří lahví bylo z každé odebráno 1 ml inokula, které byly poté smíchány. Do dvou sterilizovaných lahví se 100 ml MM bylo přidáno do každé 27,3 μ l fenoxyethanolu a promícháno. 100 μ l inokula bylo přidáno do jedné z lahví, do druhé bylo přidáno 10 μ l inokula. Po 6 dnech bylo provedeno desintegrování narostlé suspence a po zředění bylo provedeno vyočkování na R2A agary a minerální agary s fenoxyethanolem. Z misek, které byly inkubovány 7 dnů, bylo získáno 7 různých kultur z R2A agarů a 10 kultur z minerálních agarů s fenoxyethanolem.

Další práce ukázaly, že pouze kultury P1, P4, P9 a R5 rostly po naočkování v podobě čistých kultur v tekutém médiu s 2-fenoxyethanolem. Kultura R5 měla podobu malých kompaktních kolonií tvořených velmi krátkými tyčinkovitými buňkami. Rovněž kultura P1 byla tvořena kompaktními středně velkými koloniemi tvořenými krátkými kulatými tyčinkami. Velké žluto-béžové kolonie složené z tyčinek tvořící řetízky tvořily kulturu P4. Kultura P9 byla tvořena středně velkými koloniemi složenými z krátkých kulatých tyčinek. Všechny kultury využívající fenoxyethanol byly gramnegativní.

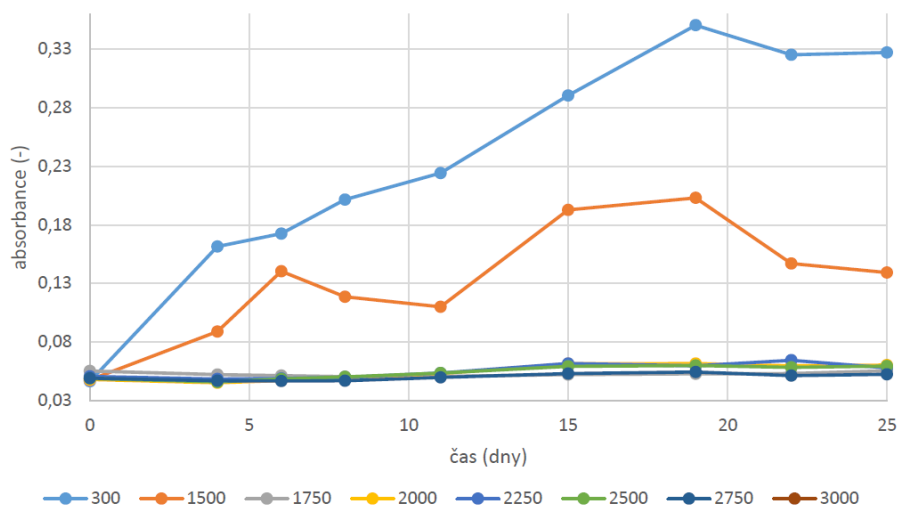
Inkubací kultur na Petriho miskách při různých teplotách bylo zjištěno, že kultury P1, P4 a P9 byly mesofilní a kultura R5 psychrofilní.

Poté byly provedeny dva pokusy s kulturami P1, P4, P9 a R5 v tekutém minerálním médiu s různými koncentracemi fenoxyethanolu, a to od 300 do 1500 a od 1500 do 3000 mg/l. První série ukázala, že všechny kultury rostly při všech koncentracích 300–1500 mg/l. Kultura R5 byla schopna růst jen při těchto koncentracích fenoxyethanolu, i když z grafu na obrázku 3 je možné vidět, že její růst při koncentraci fenoxyethanolu 1500 mg/l byl už jen velmi slabý.



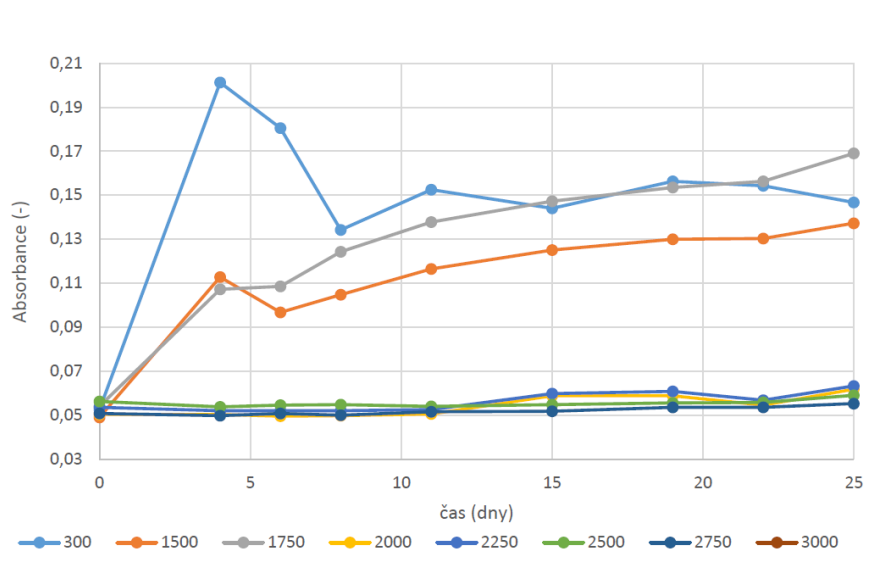
Obrázek 3 Růst kultury R5 při různých koncentracích fenoxýethanolu (Strachota, 2020)

Velmi podobné růstové vlastnosti prokázala i kultura P9; z grafu na obrázku 4 je možné vidět, že byla schopna rozkládat 2-fenoxýethanol také v koncentracích 300 i 1500 mg/l.



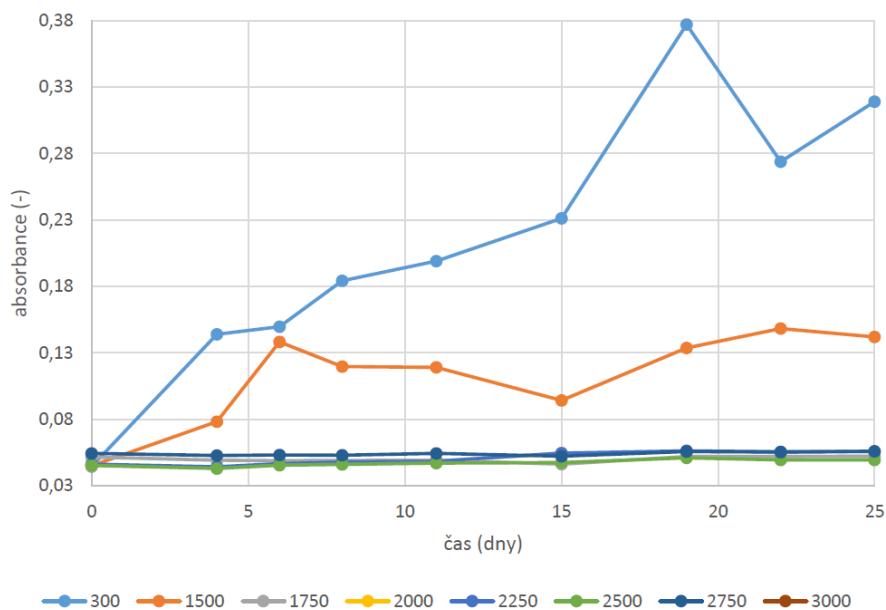
Obrázek 4 Růst kultury P9 při různých koncentracích fenoxýethanolu (Strachota, 2020)

Nejvyšší růstovou koncentraci 2-fenoxýethanolu prokázala kultura P4, jak je patrné z grafu na obrázku 5 – tato kultura P4 byla schopna rozkládat 2-fenoxýethanol při koncentracích 300 mg/l až 1750 mg/l.



Obrázek 5 Růst kultury P4 při různých koncentracích fenoxylethanolu (Strachota, 2020)

Kultura P1 se ukázala velmi podobná kulturám R5 a P9 a byla schopna rozkládat 2-fenoxylethanol při koncentracích 300 až 1500 mg/l (Obr. 6).



Obrázek 6 Růst kultury P1 při různých koncentracích fenoxylethanolu (Strachota, 2020)

Další pokusy ukázaly, že kultury P9 a R5 rostly při pH 6,5-9,5 a kultura P4 při pH 7,0-9,5. Tyto kultury byly neutrofilní až mírně alkalifilní.

Kultury P1 a P9 byly považovány na konci práce za totožné, neboť výsledky těchto kultur byly velmi podobné.

Byl proveden molekulárně biologický postup identifikace, na základě izolace DNA a provedení polymerázové řetězové reakce, elektroforézy, purifikace a sekvenace. Srovnáním sekvencí části genu pro 16S rRNA s údaji v databázi GenBank bylo zjištěno, že kultura P4 je s 99,90% shodou *Hydrogenophaga pseudoflava*. Kultury P9 a R5 patřily s 99,90% a 99,70% shodou do druhu *Zoogloea resiniphila*.

Hydrogenophaga pseudoflava je gramnegativní bakterie tvořící žlutě zbarvené kolonie o velikosti asi 2,5 μm . Jedná se o chemotrofní bakterii, jejíž optimální růstová teplota je okolo 35-38 °C a maximální je 40-41 °C.

Zoogloea resiniphila je gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie, tvořící mléčně zakalené kolonie s vysokou adhezí k živné půdě. Její buňky jsou 1,5- 2,8 μm velké. (Strachota, 2020)

2.2 Kometabolický rozklad trichlorethylenu pomocí kultur *Hydrogenophaga pseudoflava* P4 a *Zoogloea resiniphila* P9 a metabolická dráha rozkladu fenoxxyethanolu

Studiem kultur *Hydrogenophaga pseudoflava* P4 a *Zoogloea resiniphila* P9 se Strachota věnoval i ve své diplomové práci. Zaměřil se na několik vlastností těchto kultur, z nichž z praktického hlediska nejvýznamnější byla schopnost obou kultur rozkládat kometabolicky trichlorethylen (TCE). Tyto pokusy byly prováděny v plynotěsných vialkách, do kterých bylo dávkováno sterilní minerální medium, fenoxxyethanol v koncentraci 200 mg/l, jednotlivé kultury a poté TCE v koncentraci okolo 1,4 mg/l. Inkubace očkovaných vialek i vialek neočkovaných (sloužících jako blanky), probíhala po dobu 14 dní a po této době byly zbytkové koncentrace TCE měřeny pomocí plynové chromatografie na přístroji Hewlett Packard 5890, po zakoncentrování vzorků metodou Purge & Trap na koncentrátoru Tekmar LSC 2000. Bylo zjištěno, že kultura *Hydrogenophaga pseudoflava* P4 dokázala danou koncentraci TCE rozložit 100%-tně, zatímco úbytek TCE po působení kulturou *Zoogloea resiniphila* P9 byl více než 90%-tní.

Další část práce byla věnována zjištění, zda uvedené kultury dokáží růst na fenoxxyethanolu při snížených teplotách 13 °C a 8 °C, pro potenciální aplikaci v chladných podzemních vodách, a to při srovnání s obvyklou teplotou 25 °C. Bylo zjištěno, že *Hydrogenophaga pseu-*

doflava P4 dokázala růst na fenoxoethanolu pouze při teplotě 25 °C, kultura *Zooglea resiniphila* P9 však dokázala růst i při teplotě 13 °C a v jednom ze dvou pokusů dokonce i při 8 °C.

Významná část DP byla věnována objasnění metabolické dráhy rozkladu fenoxoethanolu. Nejprve bylo testováno, zda jsou obě kultury schopny využívat strukturní části této látky, a to fenol a ethanol, coby potenciální metabolity. Byly proto připraveny roztoky fenolu o koncentracích 250-1760 mg/l a ethanolu o koncentracích 250 a 500 mg/l a byly zaočkovány suspenzí kultur P4 a P9. Po inkubaci bylo zjištěno, kultury P4 ani P9 nedokáží využívat tuto sloučeninu ke svému růstu, což znamená, že fenol pravděpodobně není součástí metabolické dráhy rozkladu fenoxoethanolu a že tedy degradace 2-fenoxoethanolu nezačíná štěpením etherové vazby. Kultury ale dokázaly růst na ethanolu a je tedy zřejmé, že v případě štěpení etherové vazby v některém z dalších kroků metabolické přeměny 2-fenoxoethanolu mohou uvolněný ethanol k růstu využít.

Bakteriální metabolity rozkladu fenoxoethanolu se autor pokusil extrahovat z kultivačního media do acetonitrilu a v průběhu práce proto byla vypracována metodika extrakce. Získané extrakty byly postoupeny na Ústav chemie FT UTB ve Zlíně, kde byly provedeny pokusy identifikace obsažených sloučenin pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektroskopií (Strachota, 2022).

Touto metodou však metabolity rozkladu fenoxoethanolu zjištěny nebyly (Růžička J., osobní sdělení).

2.3 Izolace bakteriálních kmenů degradujících 2-butoxyethanol

Woiski a kol. (2020) izolovali z lesní půdy, biofiltru na odstraňování těkavých látek, zkrápněného biofiltru a aktivovaného kalu 11 bakteriálních kultur schopných kompletně rozkládat 2-butoxyethanol (2-BE) a tyto kultury identifikovali pomocí sekvenční analýzy genu pro 16S rRNA. 2-BE je široce používanou organickou sloučeninou, která se v přírodě nevyskytuje. Používá se především jako rozpouštědlo v povrchových nátěrech, barvách a lacích, ale také v mazivech, olejích a barvivech. Vyskytuje se v detergentech a čisticích prostředcích, tiskařských barvách, hydrofobizačních kapalinách, dispergátorech ropy, textiliích, barvách na vlasy, kosmetice, farmaceutických výrobcích, zemědělských chemikáliích, herbicidech atd. (OECD, 2004; ECB, 2006). V důsledku toho se 2-BE uvolňoval a stále uvolňuje do

životního prostředí ve velkém množství různými mechanismy. Vzhledem k jeho vysoké rozpustnosti ve vodě, relativně nízkému tlaku par a nízkému adsorpčnímu potenciálu v půdě se vyskytuje převážně ve vodné fázi. (OECD, 2004; ECB, 2006; Gooch, 2007; U.S.EPA, 2010)

Kmeny byly kultivovány v médiu s minerálními solemi (MM), doplněném o zdroj uhlíku, které se skládalo z chemických sloučenin uvedených v tabulce 2.

Tabulka 2 Složení média s minerálními solemi

Chemická sloučenina	Koncentrace [g/l]
KH_2PO_4	1
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05
FeNH ₄ -citrát	0,00001
H_3BO_3	0,0003
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0002
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0001
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,00003
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,00003
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,00002
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,00001

Médium pro získání uvedených bakterií obsahovalo 5 mM 2-butoxyethanolu.

Přibližně 2 g každého vzorku byly přeneseny do 250 ml baněk obsahujících 50 ml média s minerálními solemi a 5 mM 2-BE jako jediným zdrojem uhlíku. Baňky byly inkubovány při 30 °C na rotační třepačce (150 ot. /min.) po dobu jednoho týdne. Asi 5 ml těchto kultur bylo poté přeneseno do baněk s čerstvým médiem a inkubováno za stejných podmínek. Po dalším přenesení byly naředěné kultury nanášeny na pevnou živnou půdu a inkubovány při 30 °C. Jednotlivé kolonie byly přeočkovány na čerstvé Petriho misky pro získání čistých kmenů. Původ kultur a výsledky jejich Gramova barvení jsou uvedeny v Tabulce 3:

Tabulka 3: Původ a charakter izolovaných kultur

Kultura	Gramovo barvení	Původ
<i>Pseudomonas knackmussii</i> BOE1	gramnegativní	lesní půda, Stuttgart (Německo)
<i>Pseudomonas putida</i> BOE2	gramnegativní	lesní půda, Stuttgart (Německo)
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> BOE3	gramnegativní	lesní půda, Stuttgart (Německo)
<i>Pseudomonas umsongensis</i> BOE4	gramnegativní	lesní půda, Stuttgart (Německo)
<i>Gordonia terrae</i> BOE5	grampozitivní	zkrápěný biofiltr Stuttgart (Německo)
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> BOE6	gramnegativní	zkrápěný biofiltr Stuttgart (Německo)
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> BOE7	gramnegativní	aktivovaný kal, Karlsruhe (Německo)
<i>Pseudomonas</i> sp. BOE10	gramnegativní	aktivovaný kal, Karlsruhe (Německo)
<i>Pseudomonas putida</i> BOE100	gramnegativní	biofiltr na odstranění těkavých látek, Rastatt (Německo)
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> BOE200	gramnegativní	biofiltr na odstranění těkavých látek, Rastatt (Německo)
<i>Cupriavidus oxalaticus</i> BOE300	gramnegativní	aktivovaný kal, Stuttgart (Německo)

Autoři dále zkoumali růstové vlastnosti kultur, aby získali informace o substrátové univerzálnosti izolovaných kultur. MM média byla inokulována buňkami příslušných kultur a jako jediný zdroj uhlíku byly přidány 3 mM následujících sloučenin: 2-butoxyoctová kyselina (BAA), kyselina glyoxylová, n-butanol, ethanol, n-hexanol, ethylacetát, isopropanol, aceton, methyl ethyl keton (MEK), diethylether, di-n-butylether, n-butylvinylether, dibenzylether, 2-ethoxyethanol, polyethylen glykol (PEG 200), 2-propoxyethanol, 1-butoxy-2-propanol, 2-fenoxyethanol, hexan, cyklohexan, kyselina benzoová, styren a toluen. Kultury byly inkubovány při 30 °C na rotační třepačce a po jednom týdnu byla změřena optická hustota buněk (OD). Využití substrátů kulturami BOE je shrnuto v tabulce 4.

Tabulka 4: Využití substrátů kulturami BOE, rostoucími na 2-BE

Substrát	1	2	3	4	5	6	7	10	100	200	300
2-BE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-BAA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kyselina glyoxylová	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
n-Butanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
n-Hexanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethyl-acetát	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isopropanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Aceton	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MEK	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
di-Ethylether	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
di-n-Butyl-ether	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
n-Butyl vinyl ether	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
di-Benzylether	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2 – Ethoxy-ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PEG 200	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2 – Propoxy-ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 – Butoxy-2-propanol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2 – Fenoxylethanol	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Hexan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyklohexan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kyselina benzoová	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
Styren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toluen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- zvýšení $OD_{546} < 0,2$ nebo jeho snížení

+ zvýšení $OD_{546} \geq 0,2$

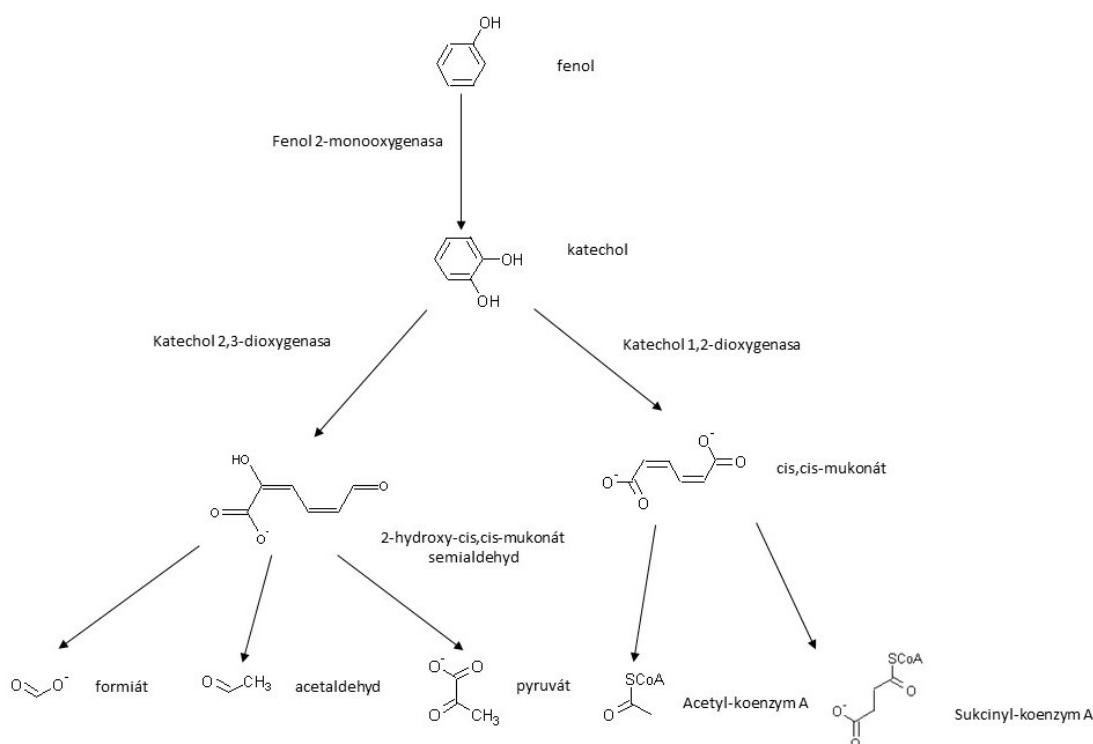
Bylo tedy zjištěno, že kultury BOE2 a BOE4 (*Pseudomonas putida* a *Pseudomonas umsongensis*) využívaly jako růstový substrát i 2-fenoxylethanol. Tyto kultury autoři získali ze vzorků lesní půdy odebraných v blízkosti Stuttgartu. (Woiski a kol., 2020).

3 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD FENOLU A STRUKTURNĚ BLÍZKÝCH LÁTEK

Protože metabolická dráha bakteriálního rozkladu fenoxyethanolu není doposud ani v nejmenším známa, je účelné mít přehled o způsobech bakteriálního rozkladu strukturně podobných látek – ponejvíce fenolu a jeho derivátů.

3.1 Bakteriální rozklad fenolu

Fenol je působením fenol 2-monooxygenasy přeměněn na katechol. (Enroth a kol., 1998) Pokud na katechol působí katechol 2,3-dioxygenasa, vzniká 2-hydroxy-cis,cis-mukonát semialdehyd, z kterého vzniká formiát, acetaldehyd a pyruvát. (Cerdan P. a kol., 1998; Nishino S.F., 1995; LAU a kol., 1994) Působením katechol 1,2-dioxygenasy na katechol vzniká cis,cis-mukonát, z kterého vzniká sukcinyl-koenzym A a acetyl-koenzym A. (Ngai a kol., 1990). Bakteriální rozklad fenolu je zobrazen na obrázku 7.

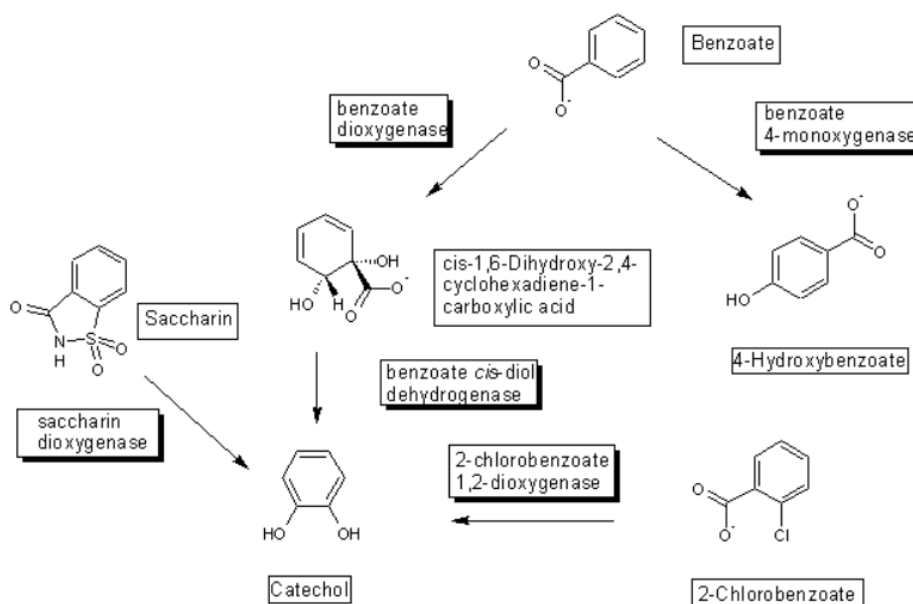


Obrázek 7 Bakteriální rozklad fenolu přes katechol (Gottschalk, 1986)

3.2 Bakteriální rozklad kyseliny benzoové

Aerobní metabolismus benzoátu má dvě větve, kterými jsou dioxygenace za vzniku katecholu, který se vyskytuje u některých bakterií (Harayama a kol., 1991) a monooxidace za

vzniku protokatechátu, který je využíván hlavně houbami (Sahasrabudhe a kol., 1985). Meziproduktem při vzniku protokatechátu je 4-hydroxybenzoát. Některé další bakterie, např. *Azoarcus evansii*, používají třetí větev, ve které je benzoát převeden za pomoci koenzymu A na benzoyl koenzym A a následně dochází k monooxygenaci. Po řadě dalších reakcí jsou výstupem sukcinyl-koenzym A a acetyl-koenzym A. (Rather a kol., 2010). Bakteriální rozklad této sloučeniny je zobrazen na obrázku 8.



Obrázek 8 Bakteriální rozklad kyseliny benzoové přes catechol (Biocatalysis/Biodegradation Database, 1999)

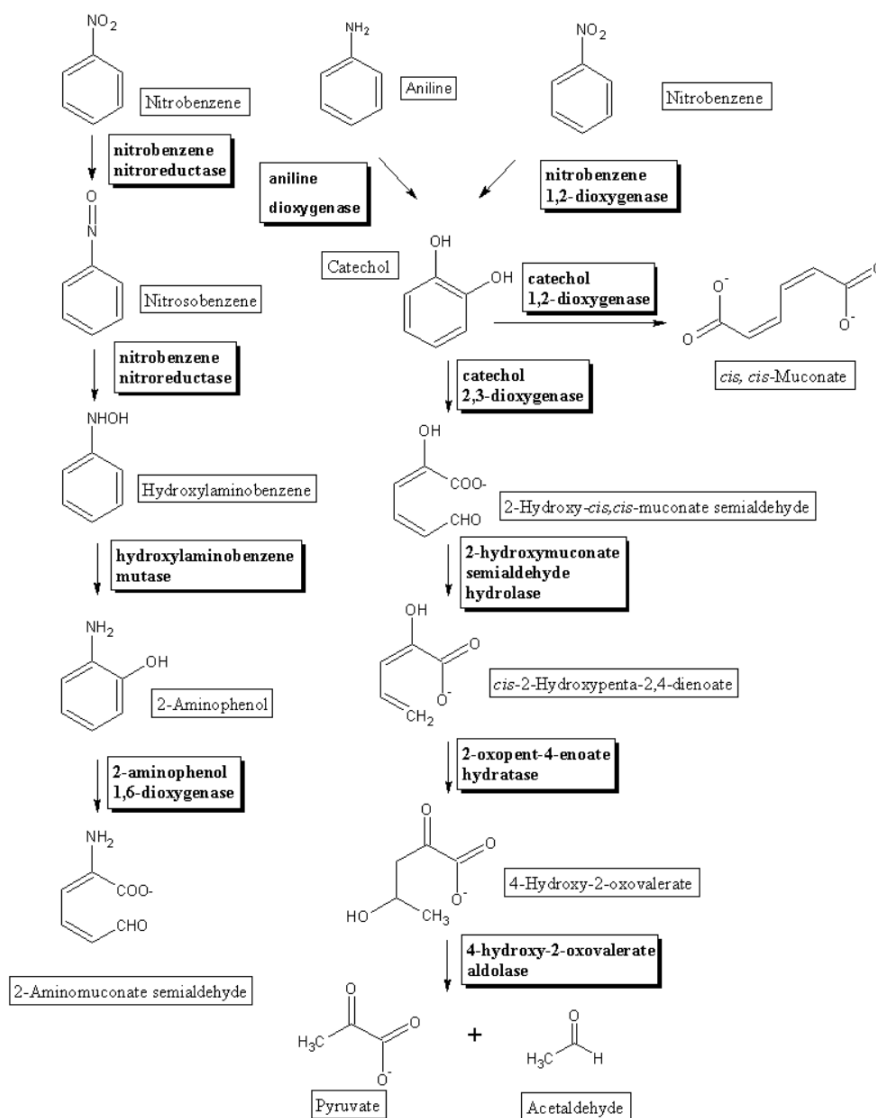
3.3 Bakteriální rozklad nitrobenzenu a anilinu

Pseudomonas pseudoalcaligenes JS45 využívá nitrobenzen jako jediný zdroj uhlíku, dusíku a energie. Tato bakterie nejprve redukuje nitroaromát až na 2-aminofenol, a ten je náchylný k degradaci dioxygenázovou reakcí, kterou dochází k otevření aromatického kruhu. (Nishino a Spain, 1995). Výsledným produktem přeměny je 2-aminomukonový semialdehyd. (Ma a kol., 2007).

Comamonas sp. JS765 také využívá nitrobenzen jako jediný zdroj uhlíku, dusíku a energie. Redukcí nitrobenzenu však vzniká catechol. *Delftia* sp. AN3 podobným způsobem degraduje anilin pomocí anilin dioxygenázy. (Liu a kol., 2002). Této reakce se účastní také *Rhodococcus erythropolis* AN-13, *Pseudomonas putida* mt-2, *Moraxella* sp. kmen G a *Hydrogenophaga palleronii* S5 (Takenaka a kol., 2003).

V obou případech se vzniklý katechol řadou reakcí přeměňuje na pyruvát a acetaldehyd.

Bakteriální rozklad těchto sloučenin je zobrazen na obrázku 9.

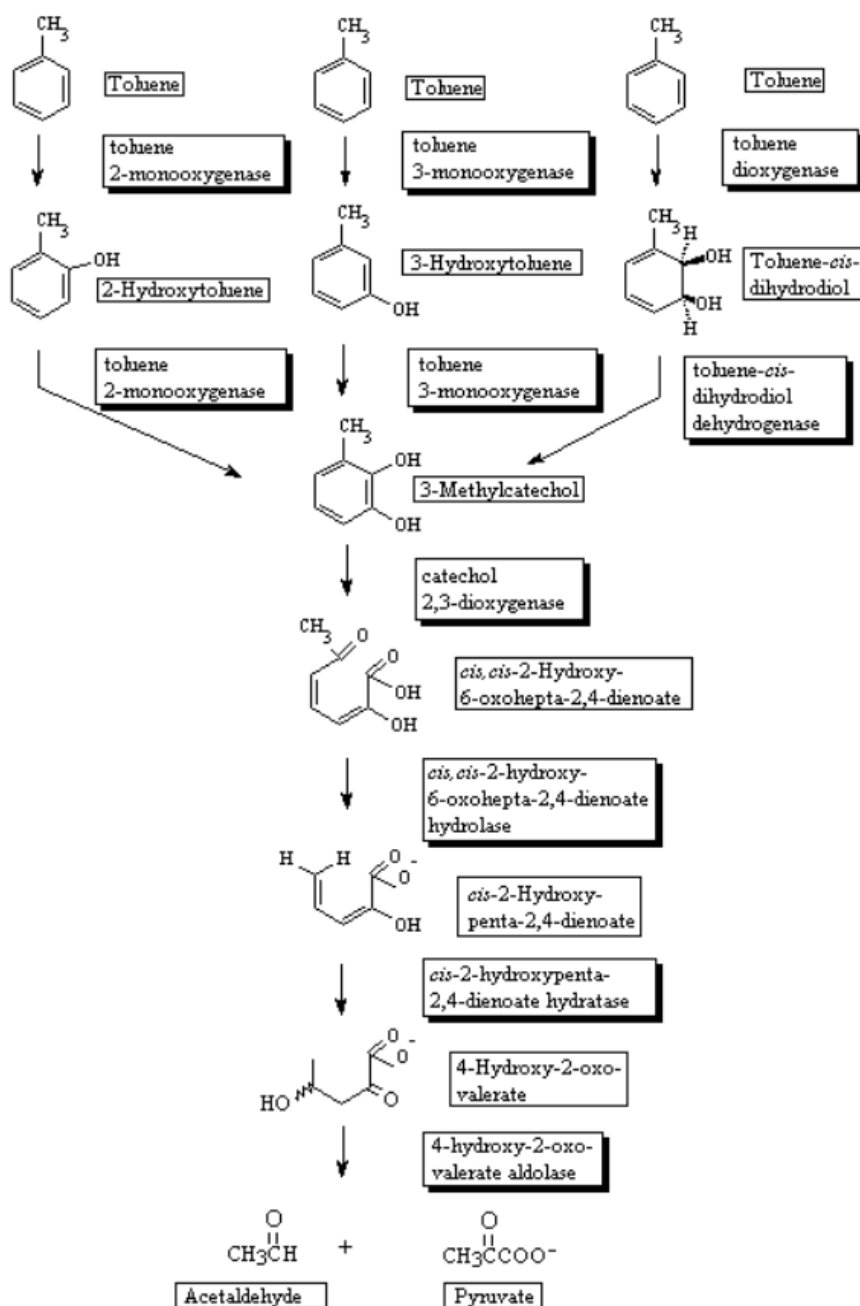


Obrázek 9 Bakteriální rozklad nitrobenzenu a anilinu (Biocatalysis/Biodegradation Database, 1997)

3.4 Bakteriální rozklad toluenu

Rozklad toluenu může být iniciován oxidací methylové skupiny (Shaw a Harayama, 1992), nebo monooxidací kruhu v polohách 2,3,4 (Shields a kol., 1995, Olsen a kol., 1994; Yen a kol., 1991) nebo 2,3-dioxidací kruhu. (Wackett a kol., 1988). V případě, že rozklad toluenu probíhá jedním z posledních dvou jmenovaných způsobů, tak probíhá rozklad přes deriváty

katecholu. Působením toluen 2-monooxygenasy na toluen vzniká 2-hydroxytoluen, který se přeměňuje dalším působením tohoto enzymu na 3-methylcatechol. Stejná chemická sloučenina vzniká působením toluen 3-monooxygenasy na toluen. Meziproduktem této reakce je 3-hydroxytoluen. 3-methylcatechol vzniká také působením toluen dioxygenasy na toluen. Vzniklý meziprodukt toluen-cis-dihydrodiol je přeměňován toluen-cis-dihydrodiol dehydrogenasou na 3-methylcatechol. Ten je řadou dalších reakcí přeměněn na pyruvát a acetaldehyd. Bakteriální rozklad této sloučeniny je zobrazen na obrázku 10.

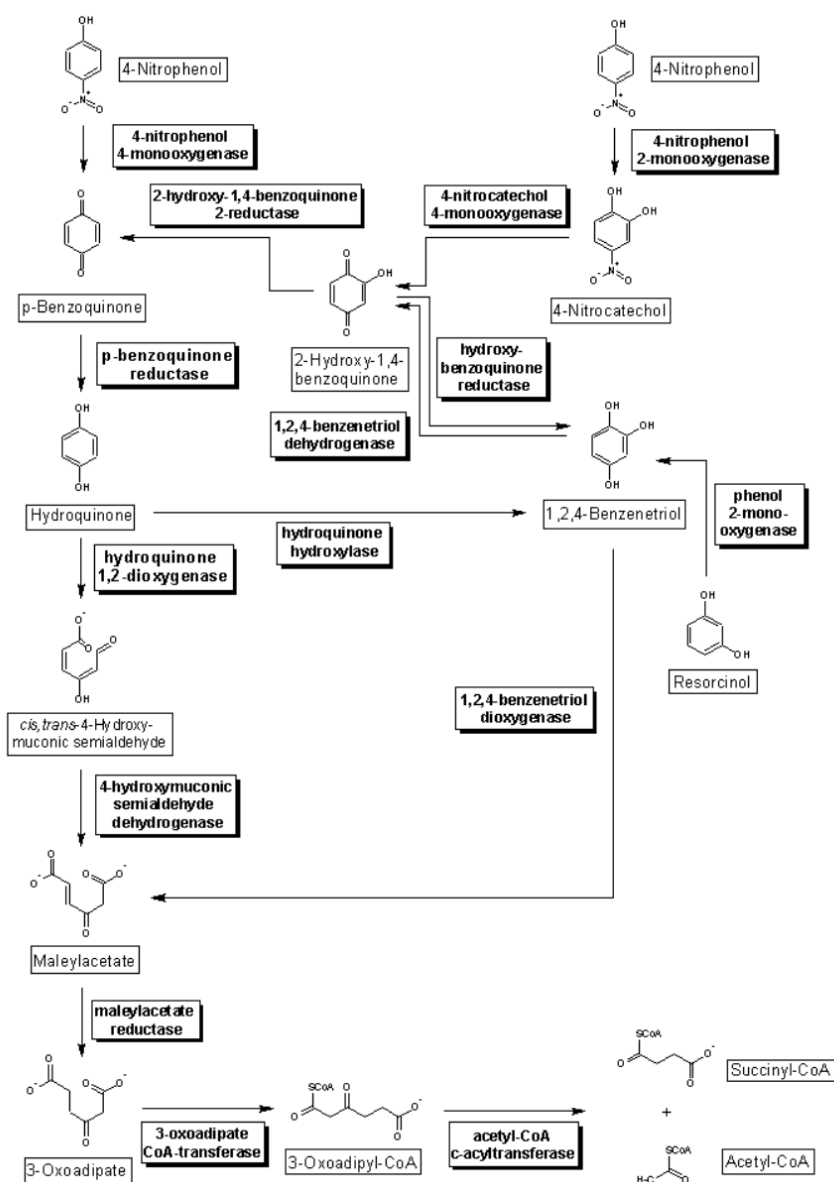


Obrázek 10 Bakteriální rozklad toluenu (Biocatalysis/Biodegradation database, 1997)

3.5 Bakteriální rozklad nitrofenolu

Ze 4-nitrofenolu je pomocí 4-nitrofenol 4-monooxygenasy *Moraxella* sp. eliminována nitroskupina. (Spain, J.C., Gibson, D.T., 1991). Kmeny *Arthrobacter* sp. JS443 a *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 odstraňují nitroskupinu ze 4-nitrofenolu nebo 4-nitrokatecholu. (Jain a kol., 1994; Chauhan a kol., 2000). Společným produktem těchto dvou metabolických drah je maleylacetát, který se řadou reakcí přeměňuje na sukcinyl-koenzym A a acetyl-koenzym A.

Bakteriální rozklad 4-nitrofenolu je zobrazen na obrázku 11.

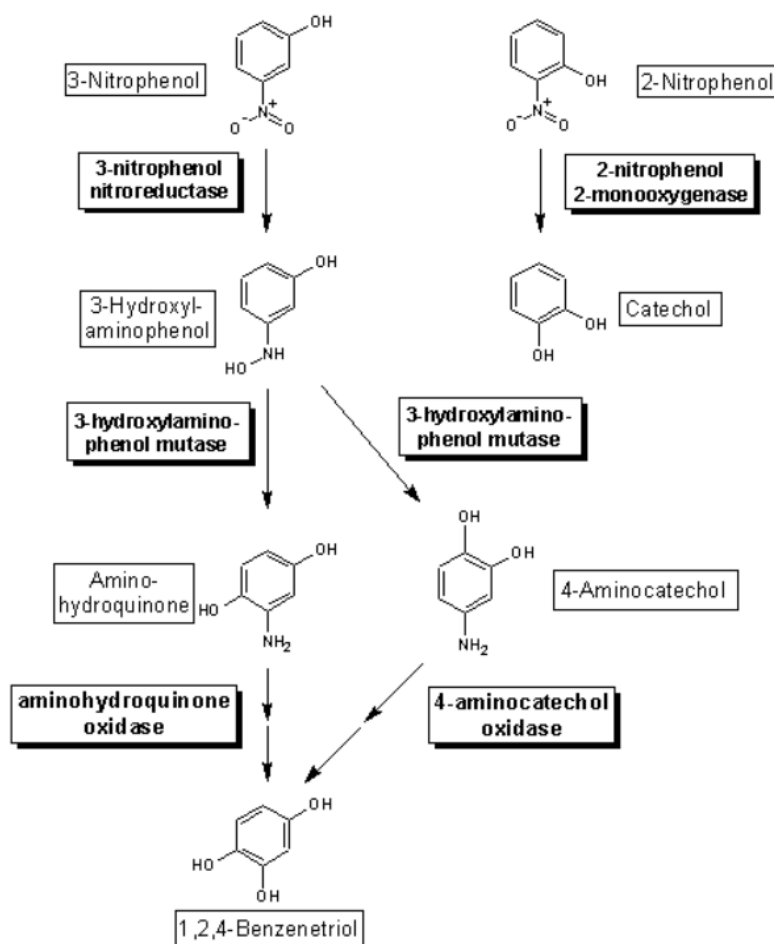


Obrázek 11 Bakteriální rozklad 4-nitrofenolu (Biocatalysis/Biodegradation database, 2008)

Nitroskupina může být odstraňována z 2-nitrofenolu za vzniku katecholu pomocí kmenů *Pseudomonas putida* B2 a *Alcaligenes* sp. NyZ215. (Zeyer a kol., 1986; Xiao a kol., 2007).

Ralstonia eutropha JMP 134 a *Pseudomonas putida* B2 zpočátku redukují za anaerobních podmínek nitroskupinu 3-nitrofenolu za vzniku 3-hydroxylaminofenolu. Při mutázové reakci dochází k přeměně 3-hydroxylaminofenolu na aminohydrochinon (Schenzle a kol., 1999) nebo 4-aminokatechol (Zhao a kol., 2000). 1,2,4-benzenetriol vzniká oxidací monooxygenázového typu a eliminací amoniaku. (Meulenber a kol., 1996) Resorcinol se přeměňuje na 1,2,4-benzentriol pomocí fenol 2-monooxygenasy.

Bakteriální rozklad 3-nitrofenolu a 2-nitrofenolu je zobrazen na obrázku 12.



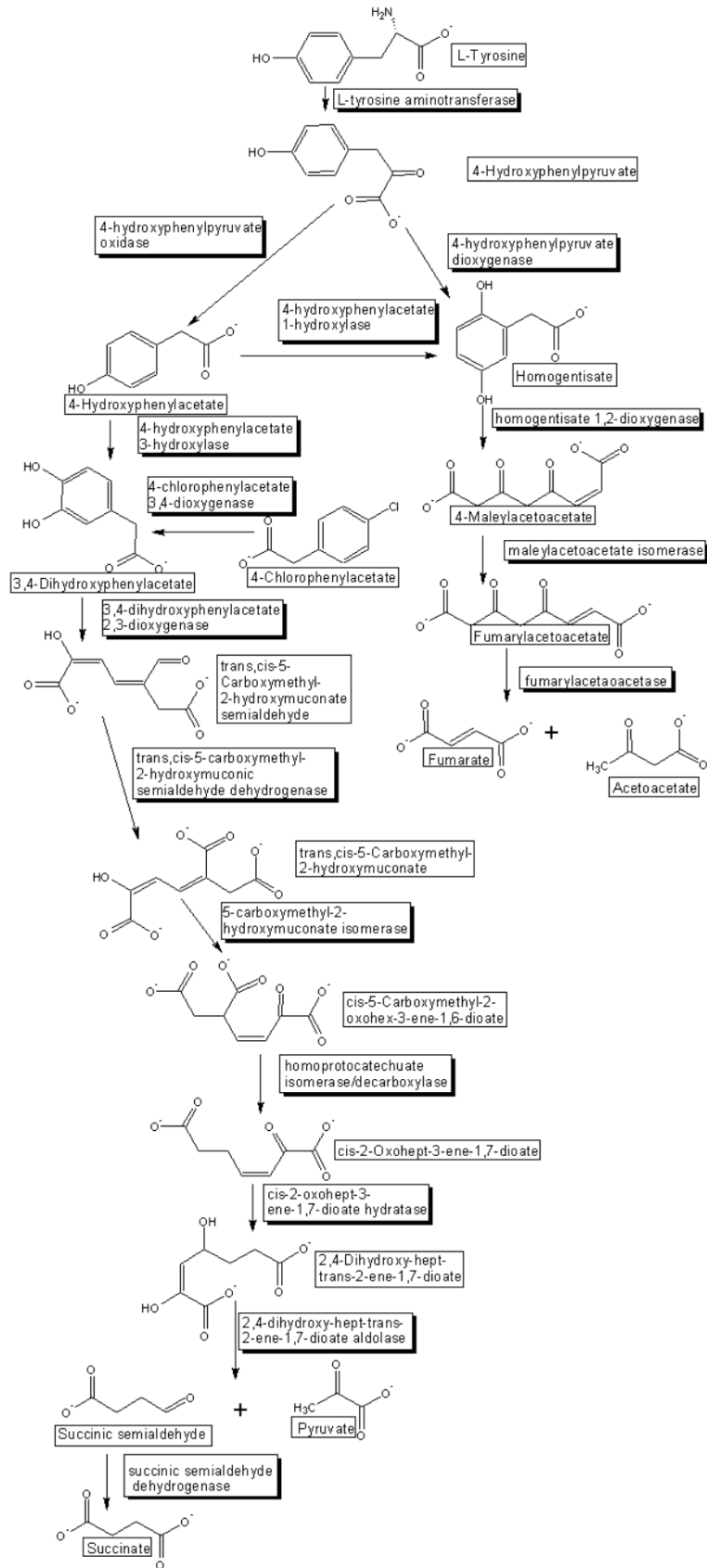
Obrázek 12 Bakteriální rozklad 3-nitrofenolu a 2-nitrofenolu (Biocatalysis/Biodegradation database, 2008)

3.6 Bakteriální rozklad tyrosinu

Působením L-tyrosin aminotransferasy na L-Tyrosin dochází k deaminaci, čímž vzniká 4-hydroxyfenylpyruvát, na který působí enzym 4-hydroxyfenylpyruvát oxidasa za vzniku 4-

hydroxyfenylacetátu. 3,4-dihydroxyfenylacetát vzniká působením 4-hydroxyfenylacetát 3-hydroxylasy na 4-hydroxyfenylacetát. Řadou dalších reakcí vzniká pyruvát a sukcinát.

V druhé větvi bakteriálního rozkladu tyrosinu působí na L-tyrosin aminotransferasa za vzniku 4-hydroxyfenylpyruvátu. 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenasa působí na tuto chemickou sloučeninu za vzniku homogentisátu. Tato chemická sloučenina může také vznikat působením 4-hydroxyfenylacetát 1-hydroxylasy na 4-hydroxyfenylacetát. Působením homogentisát 1,2-dioxygenasy na homogentisát dochází k rozštěpení aromatického kruhu za vzniku 4-maleylacetoacetátu. Konečnými produkty jsou fumarát a acetoacetát. Bakteriální rozklad této sloučeniny je zobrazen na obrázku 13.



Obrázek 13 Bakteriální rozklad tyrosinu (Biocatalysis/Biodegradation database, 1997)

3.7 Bakteriální rozklad alkylfenolů

Tuan a kol. (2011) se pokoušeli získat bakterie rozkládající 4-*t*-oktylfenol. Celkem autoři získali 18 kultur. 5 bakterií rozkládající oktylfenol (SH352, TX1, SH141, SH142 a SH144) bylo izolováno ze vzorků z rýžových polí na Tchaj-wanu (z půdy a sedimentu z drenáže), která byla znečištěna povrchově aktivními látkami (alkylfenolpolyethoxyláty). Další dvě kultury, SH771 a SH772, byly izolovány z lahví s oktylfenolovým činidlem od společností Merck a Aldrich. Zbývající kmeny SH542, SH355, SH359, SH541, SH351, SH353, SH356, SH358, TX2, SH354 a SH357 byly izolovány z laboratorního půdního mikrokosmu, který byl inkubován 93 dní. Mikrokosmos se skládal ze skleněné baňky obsahující 600 g půdy (s 50 %-ním obsahem vody), odebrané z rýžového pole znečištěného alkylfenolpolyethoxyláty.

Ze vzorků z vnějšího prostředí či z mikrokosmu bylo vždy odebráno 0,5 g vzorku a přidáno do 10 ml minerálního média, které obsahovalo 0,005 % oktylfenolu. Směs byla inkubována ve tmě na třepačce. Jakmile došlo k pomnožení kultur, desetina objemu kultury byla přenesena do čerstvého minerálního média, ve kterém byla koncentrace oktylfenolu zdvojnásobena. Celkem bylo uděláno 10 pasáží a následně bylo provedeno naočkování na agarové živné půdy. Vyrostlé kolonie byly separovány a vyčištěny. Byla provedena identifikace kultur dle sekvence genu pro 16S rRNA a také bylo zkoumáno, zda jsou kultury schopny rozkladu fenolu a oktylkatecholu. Základní údaje o kulturách jsou uvedeny v tabulce 5 a jejich rozkladné schopnosti v tabulce 6.

Tabulka 5 Charakteristika bakterií degradujících oktylfenol

Zdroj	Morfologie	Identifikace
Půda z rýžového pole	gramnegativní, tyčinky	<i>Alcaligenes</i> sp. SH141
		<i>Shinella</i> sp. SH142
		<i>Pseudomonas</i> sp. SH144
Sedimenty z drenáže	gramnegativní, tyčinky	<i>Pseudomonas</i> sp. TX1
		<i>A. radioresistens</i> SH352
Mikrokosmos	gramnegativní, tyčinky	<i>Alcaligenes</i> sp. SH542
		<i>Inquilinus</i> sp. SH355
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH359
		<i>Pseudomonas citronellolis</i> SH541
		<i>Pseudomonas nitroreducens</i> SH351
		<i>Pseudomonas putida</i> SH353
		<i>Pseudomonas putida</i> SH356
		<i>Pseudomonas putida</i> SH358
		<i>Pseudomonas putida</i> TX2
		<i>Pseudomonas</i> sp. SH354
<i>Pseudomonas</i> sp. SH357		
Lahvička s 4-t-oktylfenolem	gramnegativní, krátké tyčinky	<i>M. radiotolerans</i> SH771
		<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> SH772

Tabulka 6 Aerobní růst na třech různých zdrojích uhlíku

Bakterie	Růstový zdroj uhlíku		
	Fenol (páry)	<i>t</i> -oktylfenol (0,005 %)	<i>t</i> -oktylkatechol (0,005 %)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	++	++	++
<i>Pseudomonas</i> sp. SH144	++	++	++
<i>Pseudomonas</i> sp. SH354	++	++	++
<i>Pseudomonas</i> sp. SH357	++	++	++
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> SH772	++	++	++
<i>Pseudomonas putida</i> TX2	+	++	++
<i>Pseudomonas</i> sp. TX1	+	++	++
<i>Alcaligenes</i> sp. SH141	+	++	++
<i>Alcaligenes</i> sp. SH542	+	++	++
<i>Shinella</i> sp. SH142	+	+	++
<i>Pseudomonas putida</i> SH353	-	++	++
<i>Pseudomonas putida</i> SH356	-	++	++
<i>Inquilinus</i> sp. SH355	-	++	++
<i>Pseudomonas citronellolis</i> SH541	-	++	++
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> SH771	-	++	++
<i>Pseudomonas nitroreducens</i> SH351	-	++	++
<i>Pseudomonas putida</i> SH358	-	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SH359	-	++	++

- bez růstu
- + růst během 4–5 dnů
- ++ růst během 2 dnů

Výsledky růstu všech získaných kultur na oktylkatecholu tak naznačily, že rozklad oktylfenolu se odehrává cestou jeho oxygenace na oktylkatechol, s následným rozkladem na využitelné produkty.

Výsledky ukázaly, že všechny bakterie rozkládající oktylfenol jsou gramnegativní.

Průběhy rozkladů fenolických látek a mikrobiální metabolické dráhy jsou velmi rozmanité, často je stejná látka rozkládána dvěma či více způsoby.

Prvním krokem mikrobiálního rozkladu některých fenolických sloučenin (fenol) je rozštěpení aromatického jádra a poté v následujících krocích dochází k reakcím na postranním řetězci. U druhé skupiny fenolických sloučenin (nitrobenzen) dochází nejprve k reakcím na postranním řetězci a poté je rozštěpeno aromatické jádro.

4 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo ověřit výskyt bakterií, které využívají fenoxylethanol ke svému růstu, ve vnějším prostředí, a to v půdách a povrchových vodách.

Dalším cílem bylo ověřit postup záchytu takových bakterií ze vzorků vod a půd.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

5.1 Odběr vzorků

Do sterilních zkumavek byly sbírány vzorky vod a půd z různých míst jihovýchodní Moravy. Každá ze zkumavek obsahovala cca 5 ml vody nebo 5-10 g půdy. Odběr vzorků probíhal ve dvou větších sériích. Konkrétní odběrová místa první série jsou uvedena v tabulce 7 a druhé série v tabulce 8.

Tabulka 7 Přehled vzorků - série 1

Číslo vz.	Popis vzorku	GPS místa odběru	Datum odběru	Začátek testu
1	Voda Dřevnice, Zlín	N 49°12'48.075" E 17°35'42.435"	7.8.22	9.8.22
2	Půda Bílé Karpaty, luční	N 48°55'46.553" E 17°50'46.532"	6.8.22	9.8.22
3	Půda Bílé Karpaty, lesní	N 48°55'55.878" E 17°50'26.95"	6.8.22	9.8.22
4	Půda Zlín, zahradní	N 49°11'54.942" E 17°34'29.236"	7.8.22	9.8.22
5	Voda stojatá, Zlín	N 49°13'0.357" E 17°41'33.449"	3.8.22	9.8.22
6	Půda luční, Zlín	N 49°12'54.315" E 17°42'5.261"	3.8.22	9.8.22
7	Voda Dřevnice, Zlín	N 49°12'54.492" E 17°36'46.615"	4.8.22	9.8.22
8	Půda nivní	N 49°13'7.659" E 17°37'29.463"	4.8.22	9.8.22
9	Půda Zlín-Kudlov, lesní	N 49°12'43.674" E 17°40'31.149"	5.8.22	9.8.22
10	Voda Kudlovský potok	N 49°12'33.354" E 17°40'31.062"	5.8.22	9.8.22
11	Půda Bílé Karpaty, luční	N 48°56'33.662" E 17°51'0.197"	14.8.22	16.8.22
12	Voda Bílé Karpaty, potok	N 48°56'25.315" E 17°51'21.054"	14.8.22	16.8.22

Tabulka 8 Přehled vzorků - série 2

Číslo vz.	Popis vzorku	GPS místa odběru	Datum odběru	Začátek testu
21	Půda Zlín-Lesní čtvrť, lesní, s kopřivami	N 49°13'5.255" E17°41'19.163"	7.10.22	31.10.22
22	Půda Zlín-Kudlov, luční	N 49°12'23.74" E17°41'20.008"	7.10.22	31.10.22
23	Voda Jaroslavického potoka	N 49°12'9.002" E 17°41'28.066"	7.10.22	31.10.22
24	Půda nivní u Moravy u kopřiv, Otrokovice	N 49°12'41.772" E17°30'21.39"	8.10.22	31.10.22
25	Voda Morava, Otrokovice	N 49°12'41.201" E 17°30'18.445"	8.10.22	31.10.22
26	Voda Chlumské rybníky, Zlín	N 49°13'33.606" E17°36'47.01"	8.10.22	31.10.22
27	Půda lesní, Kaňovice 1	N 49°6'54.08" E17°42'20.357"	1.10.22	31.10.22
28	Půda lesní, Kaňovice 2	N 49°6'40.731" E17°42'27.464"	1.10.22	31.10.22
29	Půda lesní, Doubravy, pod křemenáčem	N 49°8'51.143" E17°38'37.111"	2.10.22	31.10.22
30	Půda nivní, Nedachlebice 1, pod kopřivami	N 49°5'43.861" E17°37'4.028"	9.10.22	31.10.22
31	Půda nivní, Nedachlebice 2, pod kopřivami	N 49°5'47.199" E17°37'0.938"	9.10.22	31.10.22
32	Půda luční, Nedachlebice 3, pod kopřivami	N 49°5'49.633" E17°36'58.157"	9.10.22	31.10.22
33	Půda luční, Pozlovice, pod mateřídouškami	N 49°8'47.644" E17°45'35.677"	29.10.22	31.10.22
34	Voda, lesní mokřad, Pozlovice	N 49°8'45.319" E17°45'31.506"	29.10.22	31.10.22
35	Voda, potok Hrubár, Březová	N 48°55'48.8" E17°44'33.928"	30.10.22	31.10.22

5.2 Očkování vzorků

Příprava kultivačního média

Bylo připraveno sterilní minerální médium (MM) o objemu 500 ml, se složením uvedeným v tabulce 9.

Tabulka 9 Složení minerálního média

Složka	Objem [ml]
Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (23,9 g/l)	40
Roztok KH_2PO_4 (9,078 g/l)	10
Voda destilovaná	425
Roztok NH_4Cl (30 g/l)	5
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l)	5
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l)	5
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l)	5
Roztok NaCl (50 g/l)	5
Roztok stopových prvků	0,8

Roztok stopových prvků:

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

Všechny látky byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

Po přípravě bylo ověřeno pH minerálního média, které činilo 7,45, poté byla provedena sterilizace, která způsobila pokles pH na hodnotu 7,3.

Dále byl připraven zásobní roztok fenoxxyethanolu o koncentraci 10 g/l, který byl sterilizován filtrací přes sterilní ultrafiltr ReliaPrep (Ahlstrom) s porositou 0,2 μm , do sterilní nádoby.

Do 180 ml sterilního MM bylo asepticky přidáno 180 μl roztoku MEM vitamínů a poté 2,9 ml sterilního zásobního roztoku fenoxxyethanolu, čímž vzniklo minerální médium s fenoxxyethanolem (MMFE), s koncentrací fenoxxyethanolu 159 mg/l. Vše bylo dobře promícháno a rozplněno asepticky po 3 ml do sterilních zkumavek, které byly skladovány ve tmě a chladu.

Vlastní očkování a kultivace

Každý vzorek vody z vnějšího prostředí byl asepticky napipetován dle charakteru vzorku v objemu 100 μl do 2 zkumavek s MMFE. Jedna ze zkumavek byla inkubována při teplotě 23°C, druhá při 8°C.

Každý vzorek půdy byl nejprve protřepán 10 minut se sterilním fyziologickým roztokem (8,5 g NaCl/l) v poměru 1:5 a poté po krátké sedimentaci hrubých částic bylo odebráno 25 – 50 μ l do 2 zkumavek s MMFE. Jedna ze zkumavek byla inkubována při teplotě 23 °C, druhá při 8 °C.

Pokud byly zkumavky po přidavku vody či půdní suspenze vizuálně odlišné od nenaočkovaných zkumavek, byla změřena optická hustota (densita) za použití densilometru.

Při kultivaci byly 1-2 zkumavky ponechány jako blank.

Během kultivace byly porovnávány naočkované zkumavky s blanky vizuálně či densilametriky 1-2 krát za týden (obvykle densilametriky).

5.3 Sledování růstu bakterií

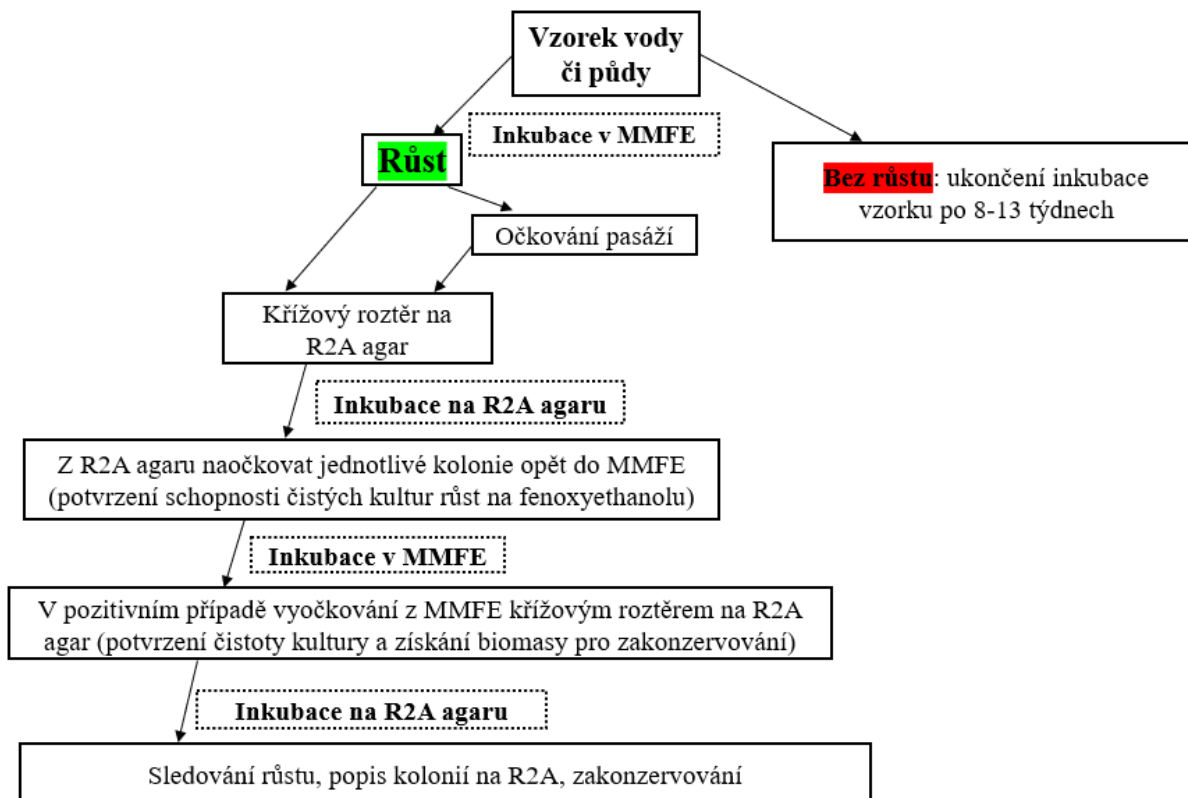
Růst mikroorganismů byl sledován měřením optické hustoty (optické density – OD) přímo ve zkumavkách v určitých časových intervalech v průběhu kultivace, za pomoci densilometru DENSI-LA-METER II (Erba Lachema, Brno). Před měřením OD bylo nutné zkumavky promíchat, odstranit bubliny vzduchu a u zkumavek kultivovaných při 8 °C bylo setřeno případné orosení.

5.4 Získání bakterií rostoucích na fenoxxyethanolu

U vzorků, u kterých byl zaznamenán růst OD v průběhu kultivace, bylo buď provedeno vyočkování narostlé suspenze na R2A agar formou křížového roztěru nebo bylo provedeno pasážování vzorku, tj. 1 či 10 μ l narostlé suspenze bylo přeneseno do nové zkumavky se sterilním MMFE a ta byla následně inkubována za stejných podmínek, včetně sledování růstu bakterií jako u prvotních vzorků. Pasážování pozitivních vzorků bylo poté vícekrát opakováno a po provedení dvou až čtyř pasáží bylo provedeno vyočkování narostlé suspenze na R2A agar formou křížového roztěru.

Naočkované R2A agary byly kultivovány při 23 °C po dobu min. 10 dnů a vyrostlé kolonie byly přeočkovávány na nové misky s R2A agary pro získání čistých kultur.

Celý postup prací je schematicky uveden na obrázku č. 14:



Obrázek 14 Postup prací pro získání bakterií rostoucích na fenoxylethanolu

5.5 Studium bakterií rostoucích na fenoxylethanolu

Byly provedeny testy v MMFE s čistými a definovaně smíšenými kulturami získanými z pozitivních vzorků. Nejprve byly připraveny suspenze jednotlivých kultur ve sterilním fyziologickém roztoku. Poté byly připraveny zkumavky s MMFE, do nichž byly jednotlivě naočkovány čisté kultury (10 μ l suspenze), a také do dalších zkumavek s MMFE byly naočkovány dvojčlenné, tříčlenné nebo čtyřčlenné kombinace kultur, získaných z jednotlivých vzorků. Kultivace zkumavek probíhala při teplotě 23 °C. Měřením optických densit jednotlivých zkumavek s kulturami byl sledován růst kultur na fenoxylethanolu, jak čistých, tak smíšených.

5.6 Dlouhodobé uchování získaných kultur

Pro dlouhodobější uchování kultur a možnost jejich dalšího zkoumání byla provedena jejich konzervace v boxu při -80 °C .

Práce byla prováděna v aseptickém boxu. Nejprve byla označena sterilní mikrozkuhavka (ependorfka) popisem kultury, poté byla biomasa čerstvě narostené bakteriální kultury opatrně nabrána z povrchu agarové živné půdy vyžíhanou a zchladlou lancetou (kopistí) a umístěna do označené ependorfky na dno. Lanceta byla odložena do boxu a do ependorfky byly přikápnuty 1-2 kapky sterilního glycerolu (dle množství bakteriální biomasy). Glycerol s biomasou byl pomocí použité lancety promíchán a ependorfka byla uložena do boxu s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lanceta byla po tomto úkonu dokonale setřena papírovou gázou namočenou v 90% -ním ethanolu a vyžíhána v plameni do zčervenání. Lancetu bylo možné použít na další kulturu až po jejím dokonalém vychladnutí v aseptickém boxu. Uložení kultur bylo zapsáno papírově i elektronicky do seznamu kultur.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Kultivace vzorků první série

V rámci první série hledání bakterií rostoucích na fenoxyletanolu bylo z prostředí odebráno 12 vzorků vod a půd, z nichž 7 vzorků tvořily půdy a 5 vody. Tyto vzorky byly inkubovány v minerálním médiu s fenoxyletanolem při teplotách 8 °C a 23 °C. Kultivace vzorků 1-10 probíhala od 9. 8. 2022 a vzorků 11 a 12 od 16. 8. 2022. Růst mikroorganismů v průběhu pokusu je uveden v tabulkách 10 a 11.

Tabulka 10 Růst mikroorganismů v médiu s fenoxyletanolem při teplotě 23 °C, první série

Číslo vz.	Optická densita																
	Zač.	3 dny	10 dnů	13 dnů	15 dnů	17 dnů	20 dnů	23 dnů	28 dnů	31 dnů	35 dnů	38 dnů	42 dnů	45 dnů	49 dnů	56 dnů	63 dnů
Blank	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
1	0,0	0,1	0,25	0,3	0,4	0,5	0,7	0,7	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
2	1,1	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1
3	3,1	2,9	2,9	2,9	2,8	2,8	2,7	2,8	2,8	2,7	2,7	2,8	2,8	2,8	2,8	2,9	2,9
4	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
5	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
6	1,2	0,9	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1
7	0,0	0,0	0,0	0,5	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,2
8	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2
9	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7
10	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Zač.	3 dny	6 dnů	8 dnů	11 dnů	14 dnů	19 dnů	22 dnů	26 dnů	29 dnů	33 dnů	36 dnů	40 dnů	47 dnů	56 dnů	-	-
11	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	-
12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	-	-

Z tabulky 10 je zřejmé, že pouze u vzorků 1 a 7 došlo k růstu mikroorganismů, což dokládá vzrůst optické density u těchto vzorků.

Tabulka 11 Růst mikroorganismů v médiu s fenoxyletanolem při teplotě 8 °C první série

Číslo vz.	Optická densita													
	Začátek	3 dny	10 dnů	13 dnů	15 dnů	17 dnů	20 dnů	23 dnů	28 dnů	31 dnů	35 dnů	42 dnů	49 dnů	63 dnů
Blank	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0
3	3,5	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,6
4	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
6	1,2	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1
7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2
8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
9	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7
10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Začátek	3 dny	6 dnů	8 dnů	11 dnů	14 dnů	19 dnů	22 dnů	26 dnů	33 dnů	40 dnů	56 dnů	-	-
11	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-

V žádném ze vzorku kultivovaném při 8 °C nedošlo k výraznému vzrůstu optické density, a tudíž bylo možné uzavřít, že se v těchto vzorcích nevyskytovaly mikroorganismy rozkládající fenoxyletanol při takto nízké teplotě. Jedinou výjimkou byl vzorek 3, u kterého došlo ke konci inkubačního období k velmi mírnému zvýšení density o 0,3 jednotky. Pro objasnění byly proto ze vzorku 3, kultivovaného při 8 °C i 23 °C, naočkovány první pasáže, které byly dále 2 měsíce inkubovány při obou teplotách. Protože však v těchto pasážích nedošlo k růstu mikroorganismů (vzrůstu optické density), bylo možné i zde uzavřít, že se ve vzorku 3 bakteriální kultury využívající fenoxyletanol nenacházely.

6.2 Získání bakterií ze vzorků 1 a 7 první série a hledání klíčových kultur

Nejprve byly vyočkovány pomnožené vzorky č. 1 a 7 na R2A agary a z každého bylo získáno několik bakteriálních kultur, které byly jednotlivě naočkovány do zkumavek s MMFE a inkubovány. Navíc byly všechny kultury vzorku 7 naočkovány do MMFE současně. Výsledky těchto testů jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 Vývoj optických densit prvních kultur získaných ze vzorků 1 a 7 a smíšené kultury vzorku 7

Kultura	Optická densita								
	Začátek	5 dnů	8 dnů	12 dnů	15 dnů	19 dnů	22 dnů	26 dnů	37 dnů
Blank	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	-
1A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-
1B	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	-	-	-
7B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
7D	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
	Začátek	3 dny	7 dnů	10 dnů	14 dnů	17 dnů	21 dnů	31 dnů	
1C1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	-	-	-	
7A1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	
7A2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
7C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	
	Začátek	3 dny	17 dnů	21 dnů	28 dnů	35 dnů			
Směs 7	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1			

Z výsledků uvedených v tabulce 12 je patrné, že žádná z čistých kultur nebyla schopna růst v minerálním médiu s fenoxylethanolem, to ani po cca měsíční kultivaci. Dokonce ani směs všech kultur vzorku 7 dohromady nevykázala ani náznak růstu po 35 dnech. Tyto výsledky tak ukázaly, že pravděpodobně se nepodařilo z pomnožených prvotních vzorků 1 a 7 získat určité klíčové kultury, potřebné pro rozklad fenoxylethanolu. Proto byla inkokula z pomnožených vzorků 1 a 7 naočkována do nových zkumavek s MMFE a inkubována, a tento postup byl několikrát opakován (tj. vzorky byly pasážovány). Snahou pasážování bylo více pomnožit předpokládané klíčové kultury a snížit výskyt balastních mikroorganismů. Celkem byly naočkovány čtyři pasáže vzorku 1 a pět pasáží vzorku 7, kultivace všech pasáží probíhala při 23 °C. Vývoj optických densit u jednotlivých pasáží vzorků 1 a 7 je v tabulce 13. Jednotlivé pasáže jsou označeny římskými číslicemi.

Tabulka 13 Vývoj optických densit u pasáží vzorku 1 a 7

Pa-sáž	Optická densita																
	Zač.	3 dny	5 dnů	7 dnů	9 dnů	10 dnů	14 dnů	17 dnů	21 dnů	23 dnů	24 dnů	28 dnů	31 dnů	35 dnů	44 dnů	48 dnů	69 dnů
1/II	0,0	0,0	-	0,2	-	0,2	0,3	0,4	0,5	-	0,6	0,7	-	0,7	-	-	-
1/III	0,0	0,1	-	0,3	-	0,3	0,6	0,7	0,9	-	0,8	-	0,7	-	-	-	-
1/IV	0,0	-	0,4	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-
1/V	0,0	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-
7/II	0,1	0,2	-	0,2	-	0,3	0,6	0,6	0,6	-	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-
7/III	0,1	0,1	-	0,4	-	0,6	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	-	-	-	-	-	-
7/IV	0,0	0,0	-	0,3	-	-	1,0	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	0,9
7/V	0,0	-	0,3	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7/VI	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-

Po provedení všech pasážích vzorků 1 a 7 bylo možné konstatovat, že se v nich bakterie schopné využívat fenoxylethanol ke svému růstu vyskytují, neboť vždy došlo během kultivace k růstu optické density u těchto pasáží. Z pasáže 1/IV byly rozočkováním na R2A agary získány nové bakteriální kultury, které byly označeny 1AA, 1BB, 1CC a z pasáže 7/V bakteriální kultury S, T, U, V. Jednotlivé bakteriální kultury byly poté opětovně naočkovány do MMFE jednotlivě, a také kultury ze stejného vzorku po dvojicích a trojicích, v případě kultur ze vzorku 7 i ve čtveřici. Vývoj optických densit v průběhu kultivace jednotlivých kultur je uveden v tabulkách 14 a 15.

Tabulka 14 Vývoj optických densit kultur získaných ze 4. pasáže vzorku 7

Kultura	Optická densita						
	Začátek	4 dny	11 dnů	18 dnů	25 dnů	32 dnů	53 dnů
S	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
T	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
U	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2
V	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2

Tabulka 15 Vývoj optických densit kultur získaných z 3. pasáže vzorku 1

Kultura	Optická densita										
	Začátek	4 dny	11 dnů	18 dnů	26 dnů	33 dnů	37 dnů	44 dnů	51 dnů	58 dnů	65 dnů
Blank	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	-	0,0
1AA	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	-
1BB	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	-
1CC	0,0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	-

Je patrné, že žádná z bakteriálních kultur, získaných z uvedených pasáží vzorků 1 a 7, nebyla schopna růst v minerálním médiu s fenoxoethanolem v podobě čisté kultury.

Dále jsou uvedeny výsledky růstu kombinací kultur, a to v tabulkách 16 a 17.

Tabulka 16 Vývoj optických densit u kombinací kultur získaných z 3. pasáže vzorku 1

Kombinace kultur	Optická densita								
	Začátek	7 dnů	14 dnů	21 dnů	28 dnů	49 dnů	58 dnů	67 dnů	80 dnů
blank	-	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1
AA+BB	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
AA+CC	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
BB+CC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	-	-
AA+BB+CC	0,0	0,1	0,2	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6

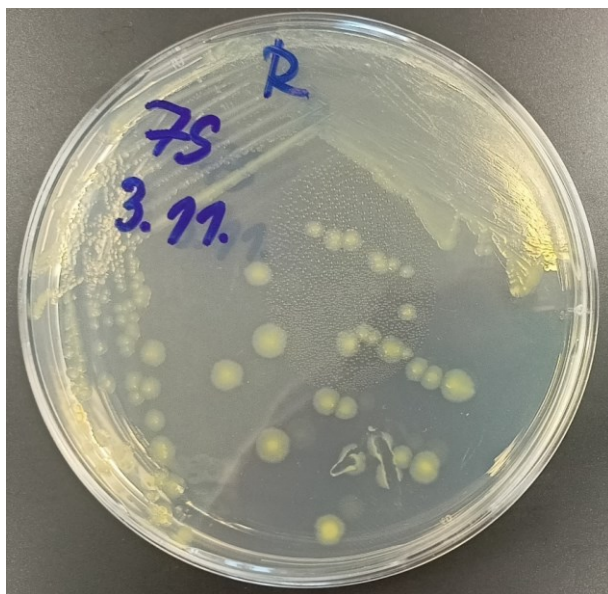
Tabulka 17 Vývoj optických densit u kombinací kultur získaných ze 4. pasáže vzorku 7

Kombinace kultur	Optická densita						
	Začátek	8 dnů	15 dnů	21 dnů	30 dnů	39 dnů	52 dnů
blank	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
S+T+U+V	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,9	0,9
T+U+V	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
U+V+S	0,1	0,1	0,4	0,5	0,5	0,9	0,9
S+T+V	0,1	0,1	0,5	0,6	0,8	0,9	0,9
S+T+U	0,1	0,1	0,5	0,6	0,8	1,0	1,0
U+V	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2
T+V	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
S+V	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5	0,8	0,9
S+T	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,8
T+U	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
S+U	0,1	0,1	0,4	0,6	0,8	0,9	0,9

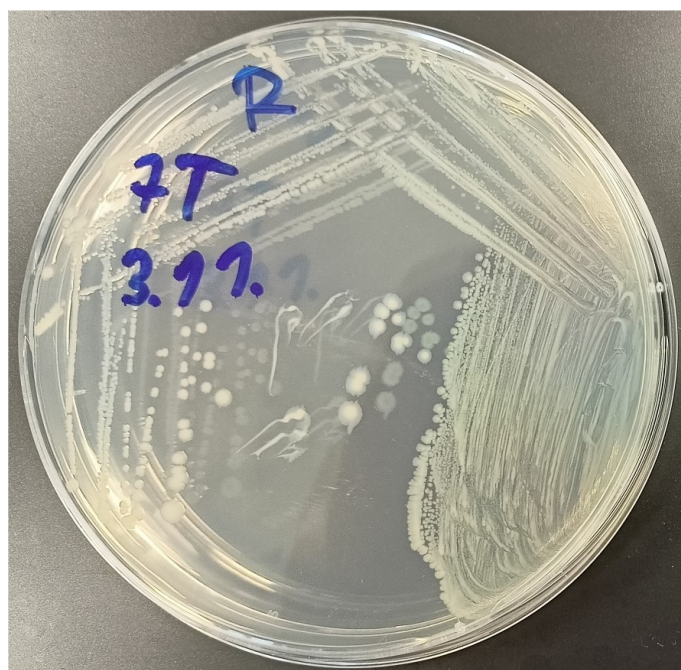
Výsledky uvedené v tabulkách 16 a 17 jednoznačně dokládají, že v případě kultur získaných ze vzorku 1 je k růstu na fenoxoethanolu potřebná účast všech tří bakteriálních kultur (AA i BB i CC), a že absence byť jediné z nich neumožňuje zbývajícím dvěma na uvedeném substrátu růst.

Co se týká kultur získaných ze vzorku 7, z výsledků je zřejmé, že růst na fenoxoethanolu vykazují jen ty dvojice a trojice kultur, které obsahují kulturu S. Pokud byla tato kultura doplněna v použitém konsorciu kulturou U, případně kulturou V, dosáhla intenzita růstu konsorcia nejvyšší hodnoty, zatímco kombinace kultur S + T poněkud slabší. V případě kultur ze vzorku 7 je tak možné za klíčovou označit kulturu S, která však k rozkladu fenoxoethanolu vyžaduje přítomnost jiné bakteriální kultury.

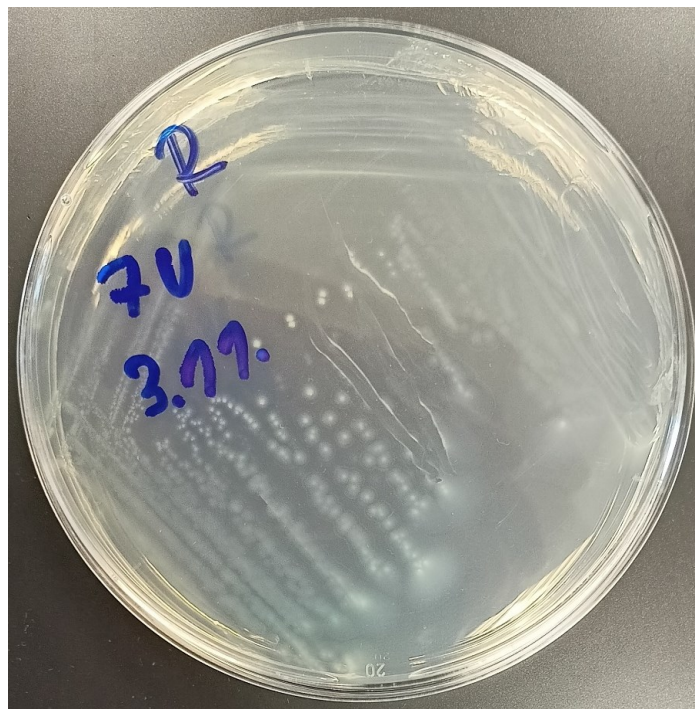
Na obrázcích 15, 16, 17 a 18 jsou zobrazeny bakteriální kultury S, T, U a V, získané ze 4. pasáže vzorku 7.



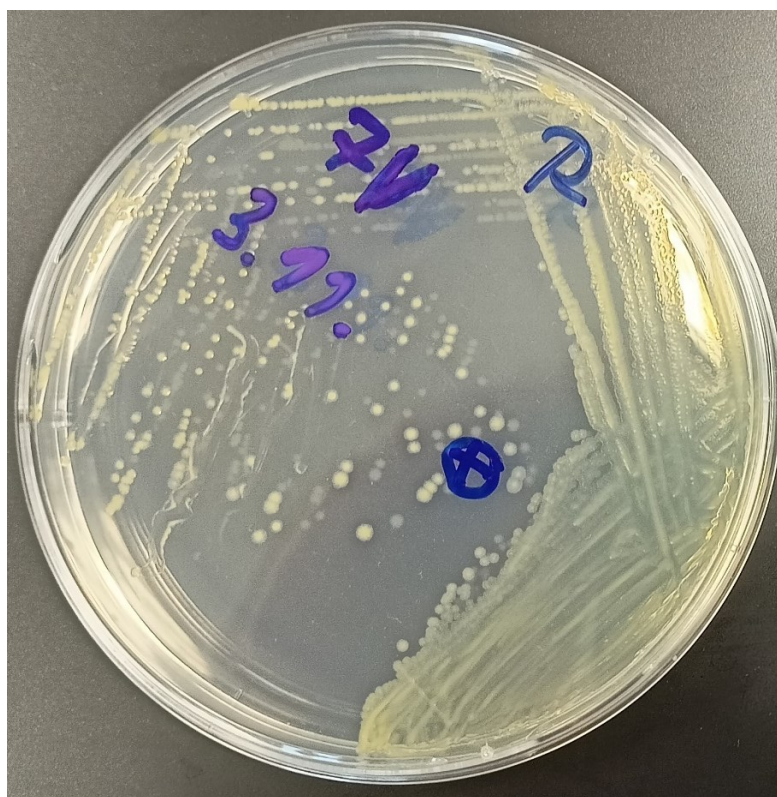
Obrázek 15 Bakteriální kultura S



Obrázek 16 Bakteriální kultura T



Obrázek 17 Bakteriální kultura U



Obrázek 18 Bakteriální kultura V

6.3 Kultivace vzorků druhé série

V rámci druhé série hledání bakterií rostoucích na fenoxxyethanolu bylo z prostředí odebráno 15 vzorků vod a půd, z nichž 10 vzorků tvořily půdy a 5 vody. V tabulce 18 je zobrazen vývoj optických densit vzorků inkubovaných v minerálním médiu s fenoxxyethanolem při teplotě 8 °C a v tabulce 19 vzorků inkubovaných při 23 °C.

Tabulka 18 Růst mikroorganismů v mediu s fenoxxyethanolem při teplotě 8 °C, druhá série

Číslo vz.	Optická densita									
	Zač.	7 dnů	14 dnů	21 dnů	28 dnů	35 dnů	42 dnů	63 dnů	94 dnů	128 dnů
blank	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	-
21	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	-
22	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
23	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	-
24	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,3	-
25	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	-
26	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	-
27	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,2	-
28	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-
29	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	-
30	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	-
31	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-
32	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	-
33	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	-
34	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
35	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1

Tabulka 19 Růst mikroorganismů v mediu s fenoxylethanolem při teplotě 23 °C, druhá série

Číslo vz.	Optická densita									
	Zač.	7 dnů	14 dnů	21 dnů	28 dnů	35 dnů	42 dnů	63 dnů	72 dnů	81 dnů
21	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	0,9	0,8	0,7	-
22	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	-
23	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	-
24	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	-
25	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,6	0,4	-
26	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	-
27	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	-
28	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	-
29	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,9	1,1	1,0	1,0	-
30	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	-
31	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
32	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	-
33	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,4	0,3	-
34	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	-
35	0,1	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4

Tabulka 18 ukazuje, že ani ve vzorcích druhé série nedošlo v žádném případě k růstu mikroorganismů při teplotě 8 °C, jen u vzorku 35 bylo přechodně zaznamenáno velmi mírné zvýšení density; proto byla z tohoto vzorku naočkována pasáž do čerstvého MMFE a inkubována. Tato následná kultivace však neukázala žádný mikrobiální růst a pokusy při teplotě 8 °C byly tak ukončeny.

Naopak u vzorků 21, 25, 29 a 35, kultivovaných při 23 °C, došlo k významnému vzrůstu optické density, a tudíž u těchto vzorků byly naočkovány první pasáže. Vývoj optických densit jednotlivých pasáží zobrazuje tabulka 20.

Tabulka 20 Vývoj optických densit u pasáží vzorků 21, 25, 29 a 35

Číslo pasáže	Optická densita						
	Začátek	7 dnů	28 dnů	37 dnů	46 dnů	59 dnů	71 dnů
blank	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
21/II	0,2	0,2	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6
29/II	0,2	0,2	0,6	0,9	0,8	0,8	0,8
35/II	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
25/II	-	0,2	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4

Protože u vzorku 35 byl v první pasáži zaznamenán jen malý nárůst mikroorganismů, byla naočkována opakovaná první pasáž vzorku 35, u které došlo po cca 3 týdnech k tvorbě vločkovité bakteriální suspenze. Vývoj optických densit této pasáže a 2. pasáží vzorků 21, 25 a 29 kultivovaných při 23 °C zobrazuje tabulka 21.

Tabulka 21 Vývoj optických densit u opakované první pasáže vzorku 35 a druhých pasáží vzorků 21, 25 a 29 kultivovaných při 23 °C

Číslo pasáže	Optická densita							
	Začátek	9 dnů	22 dnů	34 dnů	78 dnů	84 dnů	91 dnů	106 dnů
35/II	0,0	0,0	0,4+	0,4+	0,4+	0,4+	0,4+	0,4+
21/III	0,2	0,2	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7
25/III	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4+	0,4+	0,3+
29/III	0,2	0,2	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

+ vločkovitá bakteriální suspenze

Vývoj optických densit 2. pasáže vzorku 35 a 3. pasáží vzorků 21, 25 a 29 zobrazuje tabulka 22.

Vývoj optických densit smíšených kultur získaných z 2. pasáže vzorku 35 a 3. pasáže vzorku 29 je zobrazen v tabulce 24.

Tabulka 24 Vývoj optických densit smíšených kultur získaných z 2. pasáže vzorku 35 a 3. pasáže vzorku 29

Kombinace kultur	Optická densita									
	Začátek	6 dnů	13 dnů	20 dnů	28 dnů	34 dnů	41 dnů	48 dnů	56 dnů	62 dnů
29/A/C/D/E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
29/A/C/E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
29/A/C/D	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
29/C/D/E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
29/A/D/E	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
29/C/D	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
29/A/E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
29/A/C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
29/A/D	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
29/C/E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
29/D/E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
35/A/B/C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4
35/A/B	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,3
35/A/C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,4
35/B/C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1

Výsledky pokusů naznačují, že kultura 29/D získaná z 3. pasáže vzorku 29 by mohla být důležitá pro rozklad fenoxxyethanolu, neboť u některých konsorcií obsahující tuto kulturu došlo k pomalému růstu po dlouhé době od počátku inkubace. Výsledky nicméně nejsou jednoznačné a bylo by potřeba pro objasnění tyto pokusy zopakovat, případně ještě rozšířit.

U 2. pasáže vzorku 35 by mohla být důležitá pro rozklad fenoxxyethanolu kultura 35/A, která avšak k rozkladu fenoxxyethanolu vyžaduje přítomnost jiné bakteriální kultury.

Vývoj optických densit posledních pasáží vzorků 21, 25, 29 a 35 je zobrazen v tabulce 25.

Tabulka 25 Vývoj optických densit 4. pasáží vzorků 21, 25 a 29 a 3. pasáže vzorku 35

Číslo pasáže	Optická densita							
	Začátek	7 dnů	14 dnů	21 dnů	29 dnů	35 dnů	42 dnů	57 dnů
35/IV	0,0	0,2	0,4	0,4	0,5	0,5++	0,5++	0,5++
29/V	0,0	0,1	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
25/V	0,0	0,1	0,6	0,7	0,6	0,6	0,5	0,5
21/V	0,0	0,0	0,3	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6

++ vločkovitá bakteriální suspenze

Ze 4. pasáží vzorků 21 a 25 bylo získáno 6 resp. 5 bakteriálních kultur. Jednotlivé kultury z posledních pasáží vzorků 21, 25 a 35 byly naočkovány jednotlivě i ve skupinách do růstových testů.

Vývoj optických densit bakteriálních kultur, získaných ze 4. pasáží vzorků 21 a 25 je zobrazen v tabulce 26.

Tabulka 26 Vývoj optických densit bakteriálních kultur a jejich směsí získaných ze 4. pasáží vzorků 21 a 25

(smíšená)kultura	Optická densita					
	Začátek	6 dnů	13 dnů	20 dnů	28 dnů	34 dnů
blank	-	-	0,1	0,2	0,1	0,1
21/1	0,0	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4
21/2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
21/3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
21/4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
21/5	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
21/7	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
21/1/2/3/4/5/7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
25/1	0,2	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5
25/2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
25/3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25/4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
25/5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25/1/2/3/4/5	0,0	0,0	0,5	0,7	0,7	0,7

Z bakteriálních kultur, získaných ze 4. pasáže vzorku 21, došlo k růstu na fenoxxyethanolu v případě kultury 21/1, u směsi kultur 21/1/2/3/4/5/7 však k růstu na fenoxxyethanolu nedošlo. Tento jev mohl být způsoben inhibičním působením některé jiné kultury na kulturu

21/1. V každém případě byla kultura 21/1 v této práci prvním izolátem s prokázaným růstem na fenoxxyethanolu v čisté kultuře.

U kultur získaných ze 4. pasáže vzorku 25 rostla mírně na fenoxxyethanolu kultura 25/1 a velmi dobře směs kultur 25/1/2/3/4/5. Dá se tedy předpokládat, že důležitým rozkladačem fenoxxyethanolu je tedy uvedená kultura 25/1 a některá z dalších získaných bakterií ji určitým způsobem podporuje nebo k rozkladu přispívá.

6.4 Konzervace kultur

Konzervací v glycerolu byly při -80°C zakonzervovány kultury 21/1, 25/1, 35/A, 35/B, 35/C a ze vzorku 29 celé konsorcium z poslední pasáže. Všechny tyto kultury jsou uloženy v mikrobiologické laboratoři ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně.

7 ZÁVĚR

V bakalářské práci byl ověřen výskyt bakterií, využívajících fenoxxyethanol ke svému růstu, ve vnějším prostředí. Vzorky vod a půd byly odebrány ve dvou větších sériích, přičemž jejich kultivace v minerálním médiu s fenoxxyethanolem probíhala při teplotách 8°C a 23°C. Případný růst bakterií byl sledován měřením optické density médií a v pozitivních případech práce pokračovaly pasážováním a vyočkováním pomnožených médií na R2A agary, s cílem získání klíčových bakteriálních kultur.

Z 27 odebraných vzorků se výskyt hledaných bakterií podařilo prokázat v 6 vzorcích kultivovaných při 23°C, přičemž čtyři vzorky byly povrchové tekoucí vody: dva odebrané v různých úsecích řeky Dřevnice, jeden z řeky Moravy a jeden vzorek byla potoční voda z potoku Hrubár v Bílých Karpatech. Ostatní dva vzorky byly lesní půdy odebrané ve Zlíně na Lesní Čtvrti a v blízkosti obce Doubravy.

U žádného ze vzorků, kultivovaných při 8°C, se nepodařilo výskyt bakterií rostoucích na fenoxxyethanolu prokázat.

Zkoumání jednotlivých bakteriálních kmenů, izolovaných z pozitivních vzorků, ukázalo, že ve vzorku 1 z řeky Dřevnice byl fenoxxyethanol využíván jako substrát pouze při synergickém působení kultur AA, BB a CC, nikoliv čistými kulturami či jejich dvojicemi. Ze vzorku 7, rovněž z řeky Dřevnice, byla klíčová pro růst na fenoxxyethanolu kultura S, která však rostla jen v přítomnosti některé z dalších kultur T, U nebo V. Z kultur získaných ze vzorku 21 (lesní půda) se podařilo prokázat růst na fenoxxyethanolu u čisté kultury 21/1 a pomalý růst byl zaznamenán u kultury 25/1 (pocházející z řeky Moravy), i když v jejím případě byl výraznější růst podmíněn přítomností jiného získaného kmene. Kultury 21/1 a 25/1 však potvrdily, že i ve vnějším prostředí se vyskytují bakteriální kmene, schopné využívat fenoxxyethanol jako jediný zdroj uhlíku a energie. U kultur izolovaných ze vzorků 29 a 35 nebyla schopnost samostatného růstu prokázána, avšak kultura 29/D byla pravděpodobně společně s některou další kulturou zodpovědná za růst sestavených konsorcií na fenoxxyethanolu, a rovněž kultura 35/A rostla na fenoxxyethanolu jen v přítomnosti dalšího získaného kmene.

Ze získaných poznatků je tak možné konstatovat, bakterie rostoucí na fenoxxyethanolu se ve vnějším prostředí vyskytují, avšak jen nepravidelně, a nejsou aktivní při 8°C. Ve formě čistých kultur roste na fenoxxyethanolu při 23°C jen menší část z nich a častěji je růst na tomto substrátu vázán na synergické působení několika bakteriálních zástupců.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Anonym, Cosmetic Ingredient Review, 1990. Final report on the safety assessment ANSM (French National Agency for the Safety of Medicines and Health), ANSM, 2012. Evaluation du risque lie a l'utilisation du phenoxyethanol dans les
- BÜHRER C., BAHR S., SIEBERT J., WETTSTEIN R., GEFFERS C., OBLADEN M., 2002. Use of 2% 2-phenoxyethanol and 0.1% octenidine as antiseptic in premature newborn infants of 23-26 weeks gestation. *Journal of Hospital Infection* ; 51: 305–307. DOI:10.1053/jhin.2002.1249
- Bezpečnostní list firmy Carlroth, 2022 Dostupné také z: <https://www.carlroth.com/media/SDB-NE12-CZ-CS.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YX-NoZWV0c3wyNjcxMzR8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YX-NoZWV0cy9oNmIvaDQyLzkwNDYzNTk0NDE0MzgucGRmfDYxMDk4YWF-mYzc4Mzk0MTJjM2U1NGM3ODJlODgxMWEwMzZk-ZTU3NDkwMmJhM2Y2MmRlYjZmMjRmZDYxMzYxZGI>
- BIERMANN C.D., KRIBS A., ROTH B., TANTCHEVA-POOR I., 2016. Use and cutaneous side effects of skin antiseptics in extremely low birth weight infants - a retrospective survey of the German NICUs. *Klinische Pädiatrie*; 228: 208–212. DOI:10.1055/s-0042104122
- BRESLIN W.J., PHILLIPS J.E., LOMAX L.G., BARTELS M.J., DITTENBER D.A., CALHOUN L.L., MILLER R.R., 1991. Hemolytic activity of ethylene glycol phenyl ether (EGPE) in rabbits. *Fundamental and Applied Toxicology* ; 17: 466–481. DOI: 10.1016/0272-0590(91)90198-D
- CERDAN, P., WASSERFALLEN A., REKIK M., TIMMIS K.N. a HARAYAMA S., 1994. Substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenase encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* and its relationship to cell growth. *Journal of Bacteriology*. **176**(19), 6074-6081. DOI: 10.1128/jb.176.19.6074-6081.
- DETTNER K., REISSENWEBER F., 1991. The defensive Secretion of Omaliinae and Proteininae (Coleoptera: Staphylinidae): Its Chemistry, Biological and Taxonomic Significance, *Biochemical Systematics and Ecology*. 19(4), 291-303. DOI:10.1016/0305-1978(91)90017-T
- Dostupné také z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/sds/SIAL/PHR1121>
- DRÉNO B, ZUBERBIER T., GELMETTI C., GONTIJO G., MARINOVICH M., 2019. Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. *Journal of the*

- European Academy of Dermatology and Venereology. 33(S7), 15-24. DOI :10.1111/jdv.15944
- ECHA (European Chemicals Agency), 2018. Opinion on the application for approval of the active substance: 2-Phenoxyethanol, Product type: 1. Helsinki, Finland. Report No.:ECHA/BPC/190/2018. Dostupné také z: <https://echa.europa.eu/documents/10162/13ad12c5-feeac686-2e0c-84722c8d287d>
- ENROTH, C., NEUJAHN H., GUNTER S., LINDQVIST Y., 1998. The crystal structure of phenol hydroxylase in complex with FAD and phenol provides evidence for a concerted conformational change in the enzyme and its cofactor during catalysis. *Structure*. 6(5), 605-617. DOI:10.1016/S0969-2126(98)00062-8
- European Chemicals Bureau, 2006. 2-Butoxyethanol (EGBE): Part I-environment. In: European Union Risk Assessment Report, vol 68, 13-20.
- GARLANTEZEC R., WAREMBOURG C., MONFORT C., LABAT, L., PULKKINEN, J., BONVALLOT, N., MULTIGNER, L., CHEVRIER, C., CORDIER, S., 2013. Urinary glycol ether metabolites in women and time to pregnancy: the PELAGIE cohort. *Environ Health Perspect*. 121: 1167–1173. DOI:10.1289/ehp.1206103
- GOOCH J.W., 2007. *Encyclopedic dictionary of polymers*. Springer, New York
- GOUGH J., BERRY H., STILL B., 1994. Phenoxetol in the treatment of Pyocyanea infections. *Lancet*, 2: 196–198.
- HARAYAMA, S, REKIK M., BAIROCH A., NEIDLE E.L., ORNSTON L.N., 1991. Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal benABC and *Pseudomonas putida* TOL pWW0 plasmid xylXYZ, genes encoding benzoate dioxygenases. *Journal of Bacteriology*. 173(23), 7540-7548. DOI: 10.1128/jb.173.23.7540-7548.1991
- HOWES D., 1988. Absorption and metabolism of 2-phenoxyethanol in rat and man. *Cosmetics & Toiletries* ; 103: 75.
- HUSEIN AHMAD I., JONDI WAHEED J., ZATAR NIDAL A., ALI-SHTAYED MOHAMMED S., 2014. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Mono Acid Esters Derived from the Constituents of *Urtica pilulifera*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 13(4), 1173-1181.
- CHAUHAN A., CHAKRABORTI A.K. a JAIN R.K.,2000. Plasmid-Encoded Degradation of p-Nitrophenol and 4 – Nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 270(3), 733-740. DOI:10.1006/bbrc.2000.2500

- JAIN, R.K., DREISBACH J.H. a SPAIN J.C., 1994. Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(8), 3030-3032. DOI:10.1128/aem.60.8.3030-3032
- KIM T.H., KIM M.G., KIM M.G., SHIN B.S., KIM K.B., LEE J.B., PAIK S.H., YOO S.D., 2015. Simultaneous determination of phenoxyethanol and its major metabolite, phenoxyacetic acid, in rat biological matrices by LC-MS/MS with polarity switching: application to ADME studies. *Talanta*; 144: 29–38. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.05.075
- LAU, P.C.K., BERGERON H., LABBÉ D., WANG Y., BROUSSEAU R., GIBSON D.T., 1994. Sequence and expression of the todGIH genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene*. 146(1), 7-13. ISSN 03781119. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90827-3
- LAWRENCE J.C., CASON J.S., KIDSON A., 1982. Evaluation of phenoxetol-chlorhexidine cream as a prophylactic antibacterial agent in burns. *Lancet*; 319: 1037–1040
- MA, Y.-F., WU J.-F., WANG S.-Y., JIANG CH.-Y., ZHANG Y., QI S.-W., LIU L., ZHAO G.-P., LIU S.-J., 2007. Nucleotide Sequence of Plasmid pCNB1 from *Comamonas* Strain CNB-1 Reveals Novel Genetic Organization and Evolution for 4 – Chloronitrobenzene Degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(14), 4477-4483. DOI: 10.1128/AEM.00616-07
- MORTON W., 1990. Occupational phenoxyethanol neurotoxicity: a report of three cases. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*; 32: 42–45. DOI:10.1097/00043764-199001000-00012
- NGAI, K.-L., NEIDLE E.L., NICHOLAS ORNSTON L., 1990. Catechol and chlorocatechol 1,2-Dioxygenases. In: *Hydrocarbons and Methylotrophy*. Elsevier, 122-126. *Methods in Enzymology*. DOI: 10.1016/0076-6879(90)88022-3
- NISHINO, S. F. a SPAIN J.C., 1995. Oxidative Pathway for the Biodegradation of Nitrobenzene by *Comamonas* sp. Strain JS765. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(6), 2308-2313. DOI: 10.1128/aem.61.6.2308-2313.1995
- NISHINO, S. F., SPAIN J.C., 1993. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(8), 2520-2525. DOI: 10.1128/aem.59.8.2520-2525.1993
- OECD, 2004. SIDS Initial Assessment Report for SIAM 19, Monoethylene Glycol Ethers Category. Organization for Economic Cooperation and Development, Screening Information Data Set. s.6.
- of phenoxyethanol. *Journal of the American College of Toxicology*. Volume 9, Number 2.

- OLSEN, R. H., KUKOR J.J. a KAPHAMMER B., 1994. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *Journal of Bacteriology*. 176(12), 3749-3756. DOI :10.1128/jb.176.12.3749-3756.1994
- Products), 2012. Concentration of phenoxyethanol in cosmetic products –Information statement. Dostupné také z: <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Concentration-dephenoxyethanol-dans-les-produits-cosmetiques-Point-d-infomation>
- produits cosmetiques. Dostupné také z: https://ansm.sa.nte.fr/var/ansm_site/storage/original/application/58033db1a0bd86f6df50cf80b03e1839.pdf
- PUSCHMANN J., HERBIG M.E., MULLER-GOYMANN CC., 2018. Correlation of antimicrobial effects of phenoxyethanol with its free concentration in the water phase of o/w-emulsion gels. *Eur J Pharm Biopharm* ; 131: 152–161. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.08.007
- RATHER, L. J., KNAPP B., HAEHNEL W., FUCHS G., 2010. Coenzyme A-dependent Aerobic Metabolism of Benzoate via Epoxide Formation. *Journal of Biological Chemistry*. 285(27), 20615-20624. DOI: 10.1074/jbc.M110.124156
- ROPER CS., HOWES D., BLAIN PG., WILLIAMS FM., 1997. Percutaneous penetration of 2-phenoxyethanol through rat and human skin. *Food and Chemical Toxicology*; 35: 1009–1016. DOI: 10.1016/S0278-6915(97)00109-9
- SAFETY DATA SHEET, Sigma-Aldrich, 2022
- SAHASRABUDHE S.R., MODI V.V., 1989. Hydroxylation of benzoate and its chlorinated derivatives in *Aspergillus niger*. 10(4): 525-529.
- SAVIUC C., CIUBUCĂ B., DINCĂ G., BLEOTU C., DRUMEA V., CHIFIRIUC M.-C., POPA M., PIRCALABIORU G., MARUTESCU L., LAZĂR V., 2017. Development and Sequential Analysis of a New Multi-Agent, Anti-Acne Formulation Based on Plant-Derived Antimicrobial and Anti-Inflammatory Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(1). DOI:10.3390/ijms18010175
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), 2016. Opinion on Phenoxyethanol, final version of 6 October 2016. Dostupné také z: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_195.pdf
- SHAW, J. P. a HARAYAMA S., 1992. Purification and characterisation of the NADH: acceptor reductase component of xylene monooxygenase encoded by the TOL plasmid pWWO of *Pseudomonas putida* mt-2. *European Journal of Biochemistry*. 209(1), 51-61. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17260.x

- SHIELDS, M. S., REAGIN M.J., GERGER R.R., CAMPBELL R., SOMERVILLE C., 1995. TOM, a new aromatic degradative plasmid from Burkholderia (Pseudomonas) cepacia G4. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(4), 1352-1356. ISSN 0099-2240. DOI :10.1128/aem.61.4.1352-1356.1995
- SCHENZLE A., LENKE H., SPAIN J.C. a KNACKMUSS H.-J., 1999. 3 – Hydroxylaminophenol Mutase from Ralstonia eutropha JMP134 Catalyzes a Bamberger Rearrangement. *Journal of Bacteriology*. 181(5), 1444-1450. DOI:10.1128/JB.181.5.1444-1450.1999
- SCHNUCH A., LESSMANN H., GEIER J., UTER W., 2011. Contact allergy to preservatives. Analysis of IVDK data 1996-2009. *British Journal of dermatology* ; 164: 1316–1325.
- SPAIN, J. C., GIBSON D. T., 1991. Pathway for Biodegradation of p – Nitrophenol in a Moraxella sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(3), 812-819. DOI: 10.1128/aem.57.3.812-819
- STRACHOTA, D., 2020. *Mikrobiální rozklad fenoxxyethanolu ve vodách*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 58 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/48545>.
- STRACHOTA, D., 2022. *Studium bakterií využívajících fenoxxyethanol ke svému růstu*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 69 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/50959>.
- TAKENAKA, S., OKUGAWA S., KADOWAKI M., MURAKAMI S. a AOKI K., 2003. The Metabolic Pathway of 4 – Aminophenol in Burkholderia sp. Strain AK-5 Differs from That of Aniline and Aniline with C-4 Substituents. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(9), 5410-5413. DOI:10.1128/AEM.69.9.5410-5413.2003
- TUAN N.N., HSIEH H.CH., LIN Y.W., HUANG S.-L., 2011. Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenolhydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresource Technology*. Vol. 102, 4232–4240. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.12.067
- U.S. EPA, 2010. Toxicological review of ethylene glycol monobutyl ether (EGBE) (CAS No. 111-76-2). In: Support of summary information on the integrated risk information system (IRIS), Washington, DC.17s. Dostupné také z: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/recordisplay.cfm?deid=237120
- WACKETT, L. P., KWART L.D. a GIBSON D.T., 1988. Benzylic monooxygenation catalyzed by toluene dioxygenase from Pseudomonas putida. *Biochemistry*. 27(4), 1360-1367. DOI: 10.1021/bi00404a041

- WANG, Q., CUI S., ZHOU L., HE K., SONG L., LIANG H., HE C., 2019. Effect of cosmetic chemical preservatives on resident flora isolated from healthy facial skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*. **18**(2), 652-658. DOI:10.1111/jocd.12822
- WAREMBOURG C., BINTER A.-C., GITON F., FIET, J., LABAT, L., MONFORT, C., CHEVRIER, C., MULTIGNER, L., CORDIER S., GARLANTEZEC, R., 2018. Prenatal exposure to glycol ethers and sex steroid hormones at birth. *Environ Int*. 113: 66–73. DOI: 10.1016/j.envint.2018.01.013
- WAREMBOURG C., BOTTON J., LELONG N., ROUGET, F., KHOSHNOOD, B., LE GLEAU, F., MONFORT, C. LABAT, L., PIERRE, F., HEUDE, B., SLAMA, R., MULTIGNER, L. CHARLES, M.A., CORDIER, S. GARLANTEZEC, R., 2018. Prenatal exposure to glycol ethers and cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Occup Environ Med*. 75: 59–65. DOI: 10.1136/oemed-2017-104391
- WEBER R.A., PELETEIRO J.B., GARCÍA M., ALDEGUNDE M., 2009. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture*. 288(1-2), 147-150. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.11.024
- XIAO, Yi, ZHANG J.-J., LIU H. a ZHOU N.-Y., 2007. Molecular Characterization of a Novel ortho – Nitrophenol Catabolic Gene Cluster in *Alcaligenes* sp. Strain NyZ215. *Journal of Bacteriology*. 189(18), 6587-6593. DOI: 10.1128/JB.00654-07
- YEN, K.M., Karl M.R., Blatt L.M., Simon M.J., Winter R.B., Fausset P.R., Lu H.S., Harcourt A.A., Chen K.K., 1991. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *Journal of Bacteriology* . **173**(17), 5315-5327. DOI: 10.1128/jb.173.17.5315-5327.
- ZEYER J., KOCHER H.P., TIMMIS K.N., 1986. Influence of para-substituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(2), 334-339. DOI: 10.1128/aem.52.2.334-339.1986
- ZHAO, J.-S., SINGH A., HUANG X.-D., WARD O.P., 2000. Biotransformation of Hydroxylaminobenzene and Aminophenol by *Pseudomonas putida* 2NP8 Cells Grown in the Presence of 3 – Nitrophenol. *Applied and Environmental Microbiology* . 66(6), 2336-2342. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2336-2342.2000

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ECHA Evropská agentura pro chemické látky

VVBS vědecké výbory EU pro bezpečnost spotřebitele

SHBG sexuální hormony vázající globulin

DOC rozpuštěný organický uhlík

MM minerální medium

TCE trichlorethylen

2-BE 2-butoxyethanol

OECD Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj

U.S.EPA Agentura pro ochranu životního prostředí ve Spojených státech amerických

BAA butoxyoctová kyselina

MEK methylethylketon

PEG polyethylenglykol

OD optická densita

MMFE minerální medium s fenoxylethanolem

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chemická struktura 2-fenoxyethanolu	11
Obrázek 2 Průběh koncentrací DOC během rozkladu fenoxyethanolu aktivovaným kalem	16
Obrázek 3 Růst kultury R5 při různých koncentracích fenoxyethanolu	18
Obrázek 4 Růst kultury P9 při různých koncentracích fenoxyethanolu.....	18
Obrázek 5 Růst kultury P4 při různých koncentracích fenoxyethanolu.....	19
Obrázek 6 Růst kultury P1 při různých koncentracích fenoxyethanolu.....	19
Obrázek 7 Bakteriální rozklad fenolu přes katechol.....	25
Obrázek 8 Bakteriální rozklad kyseliny benzoové přes katechol	26
Obrázek 9 Bakteriální rozklad nitrobenzenu a anilinu	27
Obrázek 10 Bakteriální rozklad toluenu	28
Obrázek 11 Bakteriální rozklad 4-nitrofenolu.....	29
Obrázek 12 Bakteriální rozklad 3-nitrofenolu a 2-nitrofenolu.....	30
Obrázek 13 Bakteriální rozklad tyrosinu.....	32
Obrázek 14 Postup prací pro získání bakterií rostoucích na fenoxyethanolu	43
Obrázek 15 Bakteriální kultura 7S.....	51
Obrázek 16 Bakteriální kultura 7T.....	51
Obrázek 17 Bakteriální kultura 7U	52
Obrázek 18 Bakteriální kultura 7V.....	52

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Chemicko-fyzikální vlastnosti fenoxylethanolu.....	11
Tabulka 2 Složení média s minerálními solemi.....	22
Tabulka 3 Původ a charakter izolovaných kultur.....	23
Tabulka 4 Využití substrátů kulturami BOE, rostoucími na 2-BE.....	24
Tabulka 5 Charakteristika bakterií degradujících oktylfenol.....	34
Tabulka 6 Aerobní růst kultur na třech různých zdrojích uhlíku.....	35
Tabulka 7 Přehled vzorků-série 1.....	39
Tabulka 8 Přehled vzorků - série 2.....	40
Tabulka 9 Složení minerálního média.....	41
Tabulka 10 Růst mikroorganismů v médiu s fenoxylethanolem při teplotě 23 °C, první série..	45
Tabulka 11 Růst mikroorganismů v médiu s fenoxylethanolem při teplotě 8 °C první série....	46
Tabulka 12 Vývoj optických densit prvních kultur získaných ze vzorků 1 a 7 a smíšené kultury vzorku 7.....	47
Tabulka 13 Vývoj optických densit u pasáží vzorku 1 a 7.....	48
Tabulka 14 Vývoj optických densit kultur získaných ze 4. pasáže vzorku 7.....	48
Tabulka 15 Vývoj optických densit kultur získaných z 3. pasáže vzorku 1.....	49
Tabulka 16 Vývoj optických densit u kombinací kultur získaných z 3. pasáže vzorku 1.....	49
Tabulka 17 Vývoj optických densit u kombinací kultur získaných ze 4. pasáže vzorku 7.....	50
Tabulka 18 Růst mikroorganismů v mediu s fenoxylethanolem při teplotě 8 °C, druhá série....	53
Tabulka 19 Růst mikroorganismů v mediu s fenoxylethanolem při teplotě 23 °C, druhá série.	54
Tabulka 20 Vývoj optických densit u pasáží vzorků 21, 25, 29 a 35.....	55
Tabulka 21 Vývoj optických densit u opakované první pasáže vzorku 35 a druhých pasáží vzorků 21, 25 a 29 kultivovaných při 23 °C	55
Tabulka 22 Vývoj optických densit druhé pasáže vzorku 35 a 3. pasáží vzorků 21, 25 a 29..	56
Tabulka 23 Vývoj optických densit jednotlivých kultur získaných z 2. pasáže vzorku 35 a 3. pasáže vzorku 29.....	56
Tabulka 24 Vývoj optických densit smíšených kultur získaných z 2. pasáže vzorku 35 a 3. pasáže vzorku 29.....	57
Tabulka 25 Vývoj optických densit 4. pasáží vzorků 21, 25 a 29 a 3. pasáže vzorku 35.....	58
Tabulka 26 Vývoj optických densit bakteriálních kultur a jejich směsí získaných z 4. pasáže vzorků 21 a 25	58