

Studium bakterií využívajících fenoxxyethanol ke svému růstu

Bc. Daniel Strachota

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. Daniel Strachota
Osobní číslo: T20070
Studijní program: N0712A030001 Environmentální inženýrství
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Studium bakterií využívajících fenoxxyethanol ke svému růstu

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na druhy bakterií využívající fenoxxyethanol, nalezené v rámci předcházející práce na FT UTB. V rešerši popište i základní způsoby rozkladu fenolických látek bakteriemi.
2. Experimentálně ověřte schopnosti dříve získaných bakterií využívat fenoxxyethanol, ethanol a fenol za různých teplot.
3. Experimentálně ověřte schopnosti daných bakterií využívat ethanol a fenol v různých koncentracích.
4. Experimentálně ověřte možnosti použití těchto kultur ke kometabolické degradaci trichloroethenu.
5. Získané poznatky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v tištěné i elektronické formě v řádném termínu.

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

Seznam doporučené literatury:

D. Mara, N. Horan. 2003. The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Microbial degradation of recalcitrant compounds: pp 559 –576. Academic Press.

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

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

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

Datum zadání diplomové práce: **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

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

Tato práce navazuje na mou bakalářskou práci a rozvíjí poznatky o bakteriálních kulturách *Zoogloea resiniphila* P9 a *Hydrogenophaga pseudoflava* P4 a jejich schopnosti biodegradace 2-fenoxyethanolu. U kultur byla zjištěna schopnost kometabolické degradace trichlorethylenu. Test růstu na fenolu ukázal, že kultury nejsou schopny degradovat fenol, což ukázalo, že fenol není metabolitem rozkladu 2-fenoxyethanolu. Kultivace při snížených teplotách ukázala schopnost růstu kultury P9 i při 13 °C. Pomocí extrakce do acetonitrilu byly izolovány metabolity rozkladu 2-fenoxyethanolu, které budou v dalším výzkumu analyzovány plynovou chromatografií a hmotnostní spektroskopií. Za účelem zjištění genu kódující enzym štěpící 2-fenoxyethanol byla provedena PCR a výsledky ukázaly u obou kultur přítomnost modifikovaného genu pro velkou podjednotku fenol hydroxylázy.

Klíčová slova: 2-fenoxyethanol, trichloroethylen, *Hydrogenophaga*, *Zoogloea*, fenol hydroxyláza

ABSTRACT

This work builds on my bachelor thesis and furthers new knowledge about bacterial strains *Zoogloea resiniphila* P9 and *Hydrogenophaga pseudoflava* P4 and their ability to biodegrade 2-phenoxyethanol. The ability of cometabolic biodegradation of trichlorethylene was determined in said cultures. The growth test on phenol showed that both cultures were unable to degrade phenol, indicating that phenol is not a metabolite of 2-phenoxyethanol degradation. Cultivation at reduced temperatures showed the ability of the *Zoogloea resiniphila* P9 to grow even at 13 ° C. Intermediates of 2-phenoxyethanol decomposition were isolated by extraction with acetonitrile; their identification is expected by gas chromatography and mass spectroscopy in future research. PCR was performed to determine the gene encoding 2-phenoxyethanol oxidizing enzyme, and the results showed the presence of modified gene for the large subunit of phenol hydroxylase in both strains.

Keywords: 2-phenoxyethanol, trichloroethylene, *Hydrogenophaga*, *Zoogloea*, phenol hydroxylase

Mé velké díky patří panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho svědomité vedení mé práce a odbornou pomoc a neutuchající trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat laborantce Mgr. V. Kučabové, která mi poskytla odborné vedení a pomoc při laboratorní práci. Stejně tak chci poděkovat rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

„Pokud vesmír jednoho dne exploduje, koho zajímá, jestli je v troubě trochu sajraju? Na ničem nezáleží, pane. Spravedlnost, pravda, kultura, morálka, život, smrt, víra, válka... Všechno je absurdní“.

Android Kryton, Červený trpaslík

„Žít znamená ověřovat.“

Albert Camus

„Existují dvě možnosti. Buď jsme ve vesmíru sami, nebo nejsme. Obě jsou stejně děsivé.“

Arthur C. Clarke

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VÝSLEDKY ZÍSKANÉ BĚHEM BC. PRÁCE.....	12
1.1 VLASTNOSTI ZÍSKANÝCH DRUHŮ A PROVEDENÉ EXPERIMENTY	12
1.2 IDENTIFIKACE DANÝCH DRUHŮ	15
2 VLASTNOSTI DRUHŮ <i>HYDROGENOPHAGA PSEUDOFLAVA</i> A <i>ZOOGLOEA RESINIPHILA</i>	16
2.1 VLASTNOSTI <i>ZOOGLOEA RESINIPHILA</i>	16
2.2 VLASTNOSTI <i>HYDROGENOPHAGA PSEUDOFLAVA</i>	17
3 STUDIUM BIODEGRADACE ZKOUMANÝCH LÁTEK A JEJICH METABOLITŮ	19
4 LÁTKY TESTOVANÉ NA BIODEGRADACI	22
4.1 TRICHLOROETHYLEN (TCE).....	22
4.2 2-FENOXYETHANOL (2FE).....	25
5 FENOL HYDROXYLÁZA	28
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	30
6 CÍL PRÁCE	31
7 METODIKA	32
7.1 OŽIVENÍ KULTUR P4 A P9.....	32
7.2 TEST UTILIZACE FENOLU A ETHANOLU	32
7.3 TEST KOMETABOLICKÉ DEGRADACE TCE	32
7.3.1 Bakteriální kometabolická degradace TCE.....	33
7.3.2 Stanovení koncentrace TCE v kapalně fázi	33
7.4 RŮST KULTUR P4 A P9 NA FENOXYETHANOLU PŘI RŮZNÝCH TEPLOTÁCH PŘÍPRAVA ŽIVNÝCH PŮD.....	34
7.5 RŮST KULTUR P4 A P9 NA FENOXYETHANOLU A SMĚSI FENOXYETHANOL + LAKTÁT, V RŮZNÝCH MINERÁLNÍCH MÉDIÍCH (ŘEŠENÍ POKLESU PH).....	34
7.6 EXTRAKCE METABOLITŮ	36
7.7 METODA EXTRAKCE METABOLITŮ	36
7.8 KOMETABOLICKÁ DEGRADACE TCE KULTUROU P4.....	37
7.9 STANOVENÍ KLÍČOVÉHO ENZYMU.....	38
7.9.1 Izolace DNA.....	38
7.9.2 PCR	40
7.9.3 Elektroforéza	42
7.9.4 Sekvence.....	42
8 VÝSLEKY A DISKUSE	43

8.1	TEST UTILIZACE FENOLU A ETHANOLU	43
8.2	TEST RŮSTU NA FENOXYETHANOLU A KOMETABOLICKÉ DEGRADACE TCE.....	44
8.3	RŮST KULTUR P4 A P9 NA FENOXYETHANOLU PŘI SNÍŽENÝCH TEPLITÁCH.....	45
8.4	RŮST KULTUR P4 A P9 NA FENOXYETHANOLU A SMĚSI FENOXYETHANOL + LAKTÁT A MODIFIKOVANÝCH MINERÁLNÍCH MÉDIÍCH	47
8.5	EXTRAKCE METABOLITŮ	49
8.6	KOMETABOLICKÁ DEGRADACE TCE KULTUROU P4.....	49
8.8	VZOREK P4, PRIMER PHE, FORWARD PRIMER	51
8.8.1	VZOREK P4, PRIMER PHE, reverse primer.....	52
8.8.2	VZOREK P9 PRIMER PHE, forward primer.....	52
8.8.3	VZOREK P9 PRIMER PHE, reverse primer.....	54
8.8.4	VZOREK P4 PRIMER mPH, forward primer.....	54
8.8.5	VZOREK P4 PRIMER mPH, reverse primer	54
8.8.6	VZOREK P9 PRIMER mPH, forward primer	54
8.8.7	VZOREK P9 PRIMER mPH, reverse primer	54
ZÁVĚR		56
SEZNAM POUŽITÉ LIFETERATURY.....		58
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		64
SEZNAM OBRÁZKŮ		65
SEZNAM TABULEK.....		66
SEZNAM PŘÍLOH.....		68

ÚVOD

V rámci mé přechozí bakalářské práce byly ze vzorku aktivovaného čistírenského kalu z ČOV Malenovice izolovány bakteriální druhy schopné rozkladu 2-fenoxyethanolu (2FE).

Pomocí kultivace v tekutém minerálním médiu s přídavkem 2FE byl rozklad pomocí aktivovaného kalu potvrzen růstem mikroorganismů v podobě viditelného zákalu a následně jednoznačným poklesem rozpuštěného organického uhlíku.

Bylo provedeno mnoho testů k určení vlastností a identifikace těchto kultur. Šlo o teplotní rozmezí růstu, pH rozmezí růstu a také byly vypracovány jejich mikroskopické preparáty, kde byly rozlišeny pomocí Gramova barvení. Byly provedeny dva testy na růst při různých koncentracích 2FE ke zjištění průběhu rozkladu a maximální možné koncentrace, při které rozklad probíhá.

V závěru práce byly izolované kultury podrobeny identifikaci dle 16 S RNA genu. Výsledky ukázaly, že se jedná o zástupce druhu *Zoogloea resiniphila* a *Hydrogenophaga pseudoflava*.

Pro zmíněné bakteriální druhy není v odborné literatuře žádný záznam o jejich schopnosti rozkládat 2FE za aerobních podmínek, a proto se jejich studiu věnuje i má diplomová práce. Stále je mnohé, co o těchto dvou druzích není zjištěno, jako například metabolická dráha rozkladu 2FE a také možnosti kometabolického rozkladu ostatních látek jako je například dnes již široce rozšířený polutant trichloroethylen (TCE).

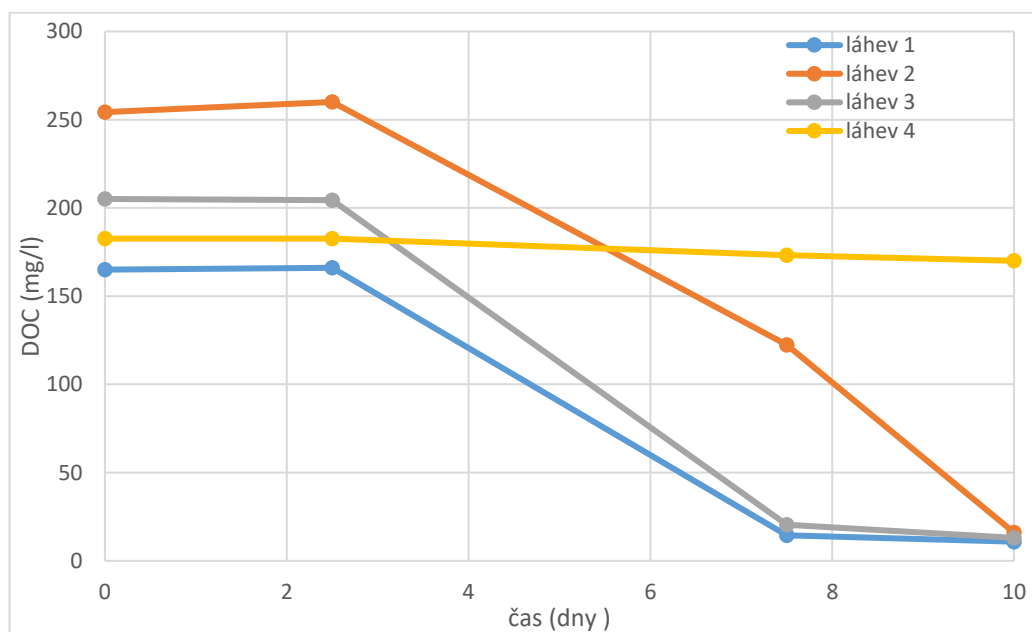
Další experimenty s velkým potencionálním přínosem jsou například použití kultur společně v jednom experimentu za dosažení možného synergického efektu nebo provedení různých variací kultivace lišící se přídavky různých nutrientů či látek ke zjištění optimálních podmínek biodegradace.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VÝSLEDKY ZÍSKANÉ BĚHEM BC. PRÁCE

1.1 Vlastnosti získaných druhů a provedené experimenty

Nejdříve byl zahájen pokus, kdy byl fenoxethanol vystaven působení aktivovaného kalu. Výsledky tohoto experimentu byly ověřeny pomocí měření DOC v průběhu inkubace. Výsledky potvrdily, že 2FE je možné rozložit pomocí bakterií aktivovaného kalu. Následující graf ilustruje pokles koncentrace 2FE během 10 dní.



Obrázek 1 Vývoj poklesu DOC během 10 dní

Na základě tohoto pozitivního zjištění bylo přistoupeno k identifikaci rozkládajících bakterií.

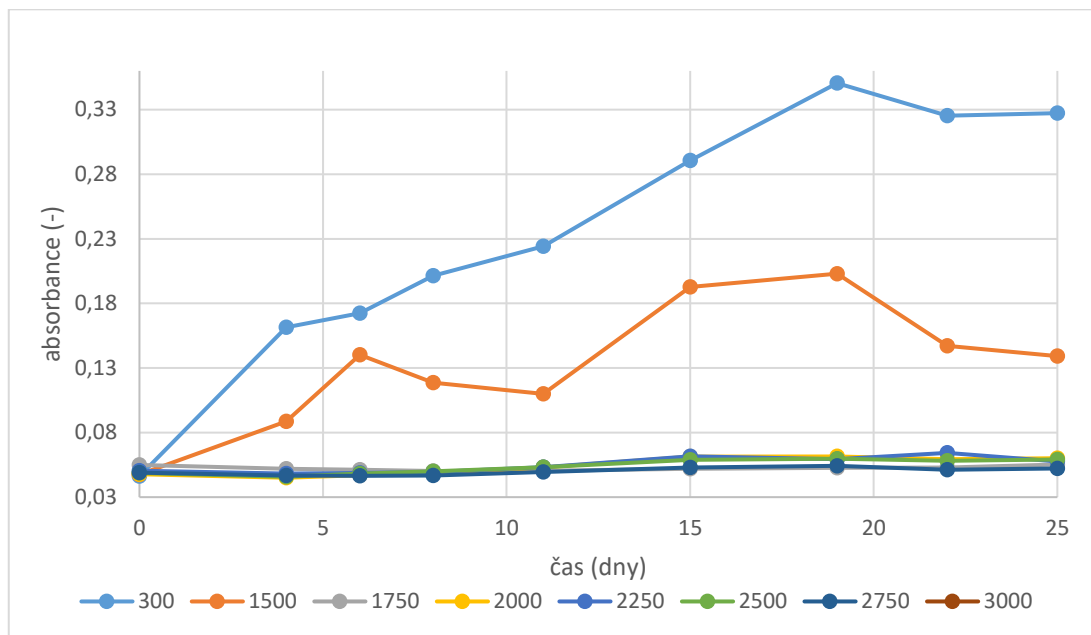
Původní suspenze, kde byl biodegradován 2FE, byla rozočkovaná na živné půdy s přídatkem 2FE a inkubována po šest dní. Růstu na těchto médiích byly schopny 4 druhy bakterií s více či méně se lišícími vlastnostmi.

Z těchto zástupců byly zpracovány mikroskopické preparáty a obarveny dle Grama. Během jednotlivých testů se ukázalo, že jde pouze o dva ty samé druhy. Označeny byli jako P4 a P9. Označení P9 a P4 bylo nadále zachováno i po průběh diplomové práce.

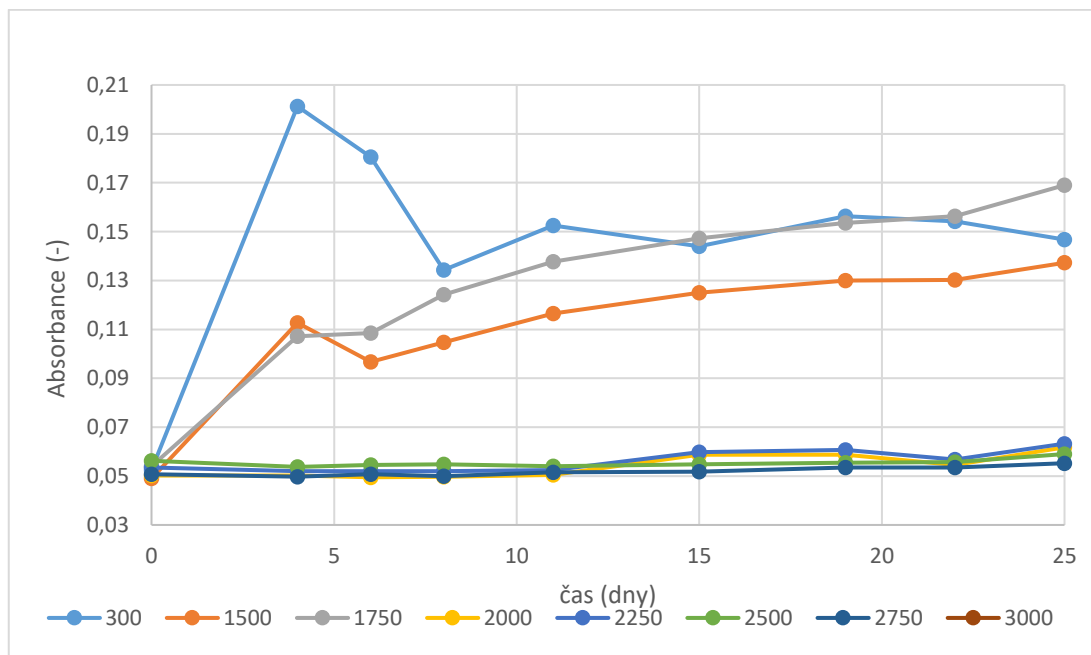
Po izolaci těchto kultur následovala série testů k určení jejich povahy. Počínaje teplotním testem ke zjištění optimální teploty pro jejich růst. Ukázalo se, že jde o bakterie mezofilní.

Dále následoval test schopnosti rozkladu 2FE v různých koncentracích. Koncentrace byly 300 – 3000 mg/l. Tento test ukázal, že maximální rozkladné schopnosti našich kultur leží

někde mezi 1500 a 3000mg/l 2FE. Tak byl analogicky proveden další test s danými koncentracemi. Výsledky testu shrnuje následující dvojice grafů pro kultury P9 a P4.



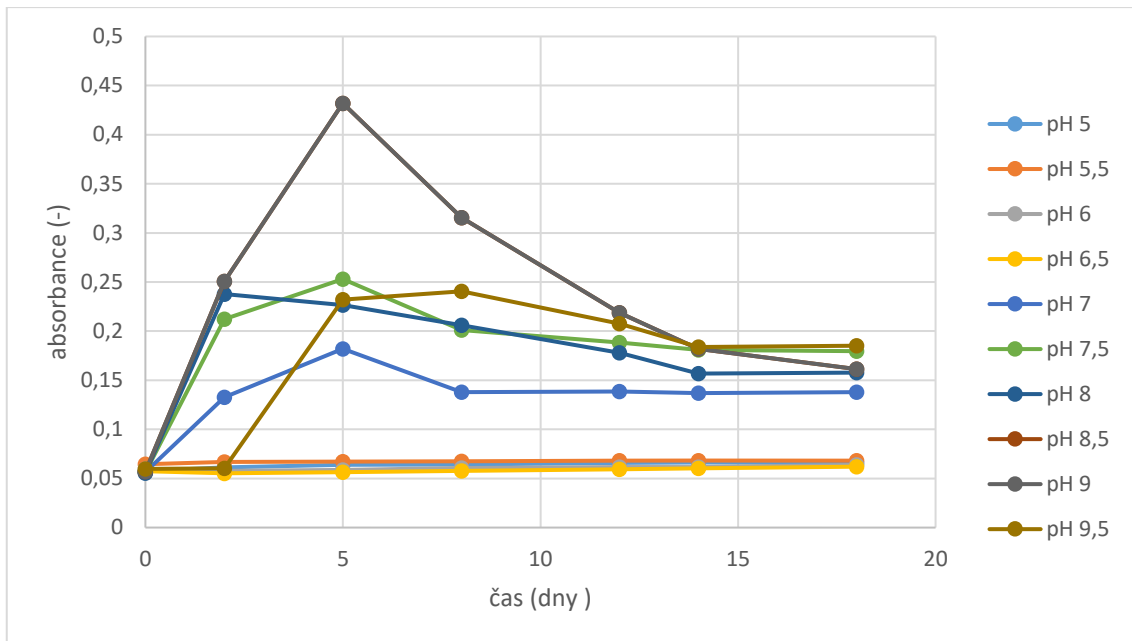
Obrázek 2 Růst kultury P9



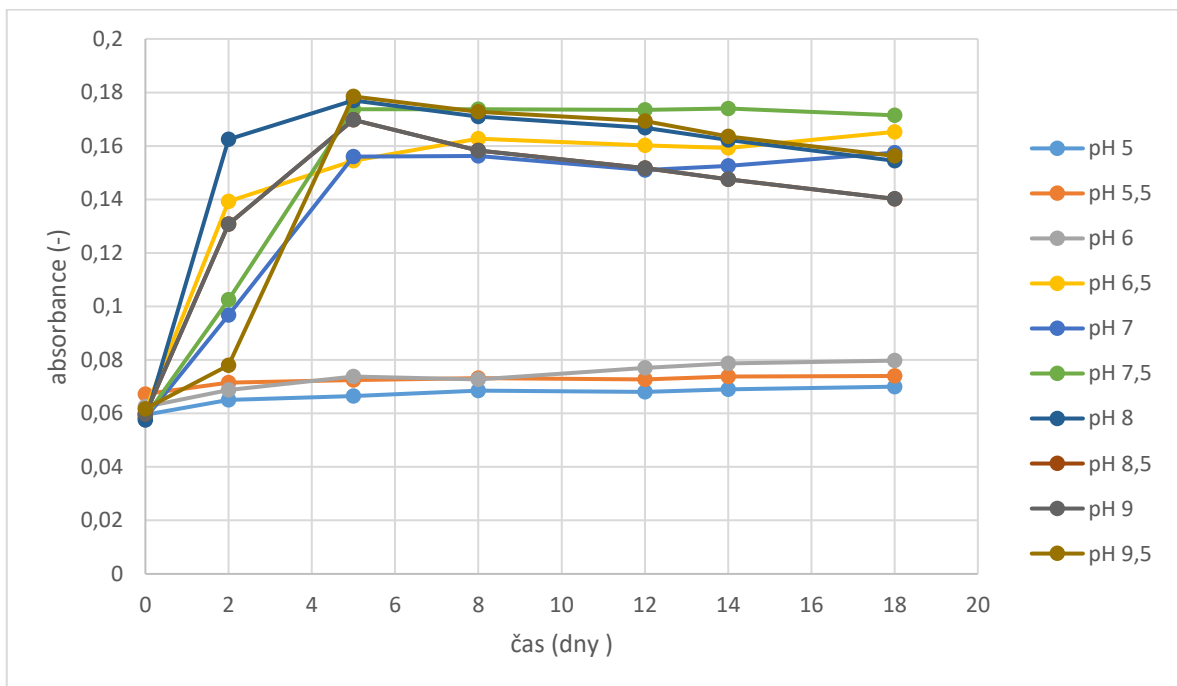
Obrázek 3 Růst kultury P4

Metodika tohoto experimentu spočívala v tom, že testované kultury rostly v suspenzi s 2FE a následný zákal byl měřen spektrofotometricky. Kultury se ukázaly být schopné rozkladu koncentrací maximálně **1500mg/l pro P9 a 1750 pro P4**.

Posledním růstovým testem byl test růstu při různém pH. Následující grafy ukazují výsledky.



Obrázek 4 Průběh růstu kultury P4 při různých pH



Obrázek 4 Průběh růstu kultury P4 při různých pH

Ukázalo se, že izolované kultury jsou mírně alkalifilní.

Výsledky popsanych testů budou dále zutilizovány a rozvíjeny v dalších experimentech v rámci diplomové práce.

1.2 Identifikace daných druhů

Dosavadní testy byly v mnohém vypovídající, avšak stále nebylo jasné, o jaké kultury se jedná, a tak bylo přistoupeno k identifikaci dle genu 16S rDNA.

Výsledky potvrdily, že se jedná o *Hydrogenophaga pseudoflava* v případě P4 se shodou 99,90 % a u P9 se jedná o druh *Zoogloea resiniphila* s 99,90 % jistotou.

2 VLASTNOSTI DRUHŮ *HYDROGENOPHAGA PSEUDOFLAVA* A *ZOOGLOEA RESINIPHILA*

2.1 Vlastnosti *Zoogloea resiniphila*

Jednou z velmi význačných vlastností tohoto druhu je, že se s ní pracuje velmi špatně, a to protože tvoří kolonie, které jsou zabalené v extracelulárním biopolymeru. Tato skutečnost způsobuje, že bakteriální kolonie jsou pevně přilepeny na živnou půdu a tvoří kompaktní útvary, které je velmi obtížné odebrat či z nich vytvořit suspenzi, jelikož řečený biopolymer se zdá být nerozpustný ve vodě. [2]

Tento bakteriální taxon je součástí tzv. vločkotvorných bakterií, které jsou zodpovědné za specifickou strukturu a funkčnost čistírenského kalu. Roku 1937 byla popsána první z této skupiny, a to *Zoogloea ramigera*, která byla tehdejším výzkumem považována za jedinou bakterii zodpovědnou za daný jev.

Daný jev je způsoben mimobuněčnou exkrecí biopolymerů s vysokou adhezí, čímž se následně tvoří agregáty buněk a biopolymerů, známe jako vločky. Díky této vlastnosti je možné čistírenský kal oddělit pomocí odstředivky či pomocí prosté sedimentace, jak je tomu při zahušťování kalu nebo v dosazovacích nádržích v čistírnách odpadních vod za účelem zefektivnění biologické části čistírenského procesu. [2]

Na druhou stranu může dojít k přemnožení a tím se dojde k přílišné produkci biopolymeru, a začnou se tvořit nežádoucí agregáty, a kal se tak stává viskózním. Jde ve většině případu o polysacharid, který se tvoří zejména při nedostatku dusičnanů či jiných zdrojů dusíku.

Bakterie rodu *Zoogloea* tvoří v čistírenském kalu 1,368-11,1 % celkového množství bakterií. Z čistírenského kalu byly doposud izolovány a popsány *Zoogloea ramigera*, *Zoogloea resiniphila* a *Zoogloea caeni*. Vločky aktivovaného kalu jsou tak tvořeny směsí extracelulárních polymerů. [2]

Genetickým rozbohem byl identifikován gen pro tvorbu polymerů u rodu *Zoogloea*. Tvorba takovýchto látek je však silně energeticky a zdrojově náročná. Předpokládá se, že tvorba vloček dává bakteriím schopnost lépe se bránit proti predaci prvoky a vodními bezobratlými. Také je zde možnost, že při několikanásobném obohacování kalu a aerací působí pak vločky jako bio filtr a zadržují velké množství živin. [2]

Bylo zjištěno, že by *Z. resiniphila* mohla využívat aceton jako zdroj uhlíku v přítomnosti acetoindehydrogenázy. Také bylo popsáno, že kmeny *Zoogloea* jsou schopny využívat některé aromatické sloučeniny jako zdroj uhlíku a energie. [50] Genomy *Z. resiniphila* obsahují mnohočetné geny pro monooxygenázy, dioxygenázy a dehydrogenázy, které využívá k aerobní degradaci aromatických sloučenin, jako jsou toluen, benzoát, 2-nitrobenzoát, alkylfenoly s dlouhým řetězcem, kyselina skořicová, kyselina indol-3-octová cyklohexankarboxylát, extradiol a xanthin. [51,52]

Deriváty katecholu, důležitého metabolitu při rozkladu fenolu a některých fenolických látek, mohou být oxidovány meta-štěpením na semialdehyd kyseliny 2-hydroxymukonové pomocí katechol 2,3-dioxygenázy, která byla nalezena v kmenech *Zoogloea*. Degradace přes katechol se také uskutečňuje při rozkladu aromatických uhlovodíků, aminoaromátů a monomerů ligninu; vzniklé produkty jsou dále převáděny na metabolity vstupující do cyklu trikarboxylových kyselin [53].

Genom *Z. resiniphila* kóduje také biosyntézu poly-3-hydroxybutyrátu (PHB), biopolymeru, který souvisí s bakteriálním metabolismem [54]. Je pozoruhodné, že genom *Z. resiniphila* kóduje i cyanophycin syntetázu a cyanophycinásu. To by mohlo znamenat, že cyanophycin, biopolymer sestávající z argininu a kyseliny asparagové, by mohl být použit jako rezerva dusíku a zdroj uhlíku. Naopak, kmeny rodu *Zoogloea* nemají metabolickou dráhu pro syntézu glykogenu, se kterým se můžeme setkat u glykogen-akumulujících organismů, a také postrádají geny pro fixaci CO₂. [49]

Molekulárně genetické analýzy odhalily také genový shluk kódující osm glykosyltransferáz a další proteiny, zapojené do biosyntézy extracelulárních polysacharidů.[49]

2.2 Vlastnosti *Hydrogenophaga pseudoflava*

Jde o Gramnegativní bakterii, popsána byla poprvé roku 1978 z půdních vzorků. Jako zásobní látky si intracelulárně ukládá PHB, glykogen a polyfosfáty. Produkce polymerních povlaků nebyla zaznamenána. Jde o chemoorganotrofní organismus, energii však získává také z oxidace molekulárního vodíku za přítomnosti hydrogenázy. Při růstu na organických substrátech jsou dusičnany velmi rychle přeměňovány na atmosférický dusík. Je známo nejméně 42 různých organických sloučenin, které mohou těmto bakteriím sloužit jako zdroj uhlíku. Jsou jimi mono- a disacharidy, polyalkoholy, aminokyseliny a aromatické

sloučeniny, mezi které patří i 2FE. Optimální růstová teplota se pohybuje okolo 35-38 °C a maximální je 40-41°C. [1]

Vyznačuje se rovnými až mírně zakřivenými tyčinkami o velikosti cca 0,3–0,6 × 0,6–5,5 μm. Setkat se můžeme s jednotlivými buňkami, ale i dvojicemi. Pohybuje se pomocí jednoho nebo ve vzácných případech dvou polárně až subpolárně uložených bičíků. [40]

Kolonie jsou velmi výrazně žluté díky přítomnosti karotenoidních pigmentů. Jejich absorpční maximum v acetonu bylo stanoveno na 405, 425 a 446 nm [41]

Jedná se o fakultativně aerobní bakterii. Je pozitivní na oxidázu a přítomnost katalázy je u *H. pseudoflava* proměnlivá. Všechny zástupci rodu *Hydrogenophaga* jsou fakultativně chemolitoautotrofní, využívají oxidaci vodíku jako zdroje energie. Hydrogenáza je vázána na membránu a neredukuje NAD [42] *H. pseudoflava*, která byla dříve nazývána „*Pseudomonas carboxydoflava*“ je schopna i autotrofního růstu, kdy využívá oxidaci CO nebo vodíku jako zdroje energie. Alternativou u *H. pseudoflava* a *H. taeniospiralis* je schopnost heterotrofní denitrifikace dusičnanů. Plasmidy nebyly zaznamenány u *H. pseudoflava* [43, 44].

Velmi dobrého růstu je dosahováno na médiích obsahujících organické kyseliny, aminokyseliny nebo pepton. Buněčné lipidy obsahují kyselinu 3-hydroxyoktanovou a to buď samostatně nebo společně s kyselinou 3-hydroxydekanovou. 2-hydroxy-substituované mastné kyseliny chybí. Ubichinon Q-8 je hlavním chinonem se kterým se zde setkáváme. Putrescin a 2-hydroxyputrescin jsou přítomny přibližně v ekvimolárních koncentracích jakožto dominantní polyaminy.[48]

Glukóza a fruktóza se odbourávají pomocí Entner–Doudoroffovy dráhy. 6-fosfoglukonát dehydrogenáza však nebyla u této bakterie zaznamenána. [45]

Většina druhů rodu *Hydrogenophaga* může být neutralizována širokým spektrem antibiotik a bakteriocidních činidel [41]

H. pseudoflava byla použita jako modelová kultura společně s *Brevibacterium* [46] pro studie rozkladu bifenyly a polychlorovaného bifenyly (PCB). *H. pseudoflava* podporuje také růst kořenů, vyskytuje se i v rhizosféře hybridů sazenic smrku [47]

3 STUDIUM BIODEGRADACE ZKOUMANÝCH LÁTEK A JEJICH METABOLITŮ

Anaerobní biodegradace trichlorethylenu (TCE) se obecně skládá z řady kroků, kde se v každém z nich postupně setkáváme s méně a méně chlorovanými ethyleny, jako např. s 1,2 dichlorethylenem a jeho izomery, až se dostaneme k ethenu. Tento proces se nazývá mikrobiální reduktivní dechlorace či alternativně biologická reduktivní dehalogenace a chlorované ethyleny vystupují jako akceptory elektronů [3].

V případě aerobní degradace mohou některé chloroethyleny vystupovat jako donory elektronů (tedy jako růstové substráty poskytující degradačním bakteriím energii). Tato možnost, kdy je látka využívána jako zdroj energie a uhlíku pro buňku, je mnohem efektivnější při anaerobní dehalogenaci chlorovaných ethylenů ve smyslu rychlosti degradace. Informace o bakteriích schopných takovéto aerobní degradace, zejména TCE, jsou však velmi limitované.

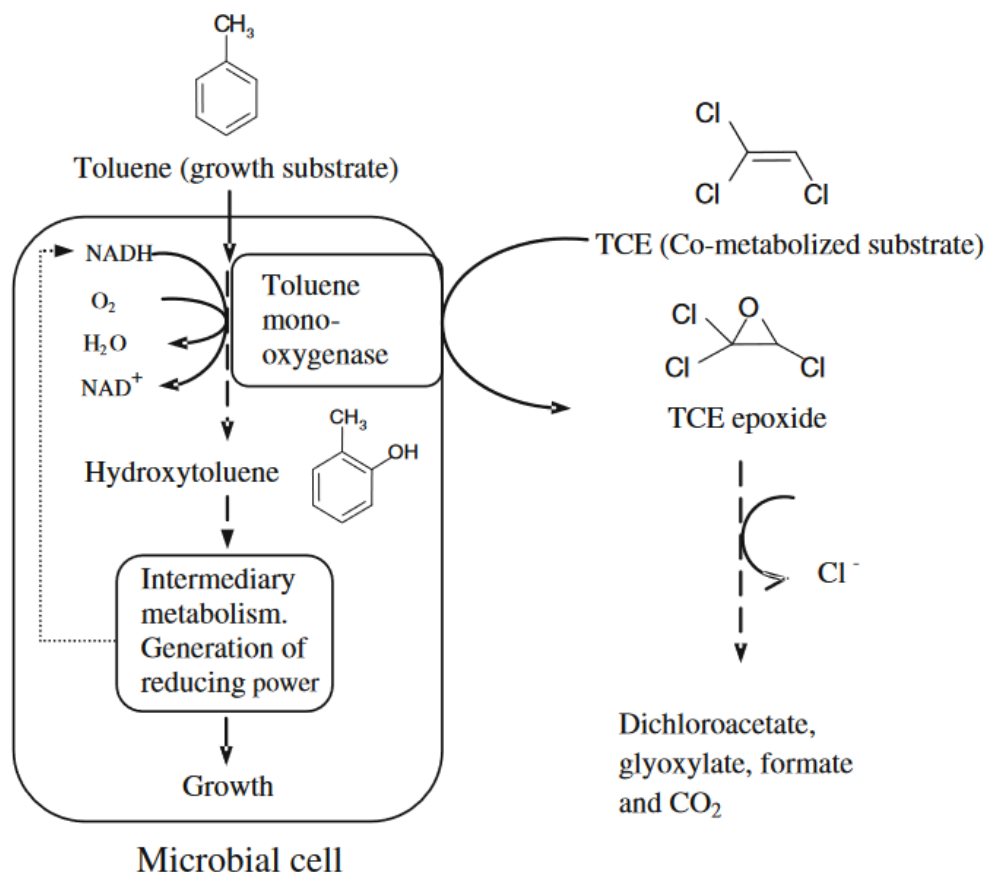
U námi zkoumaných baterií zatím nebyla zdokumentována schopnost rozkladu TCE. Jsou však zdokumentovány specifické enzymy, které jsou vlastními katalyzátory těchto rozkladů a jsou často známy i primery, kterými je možné geny pro tyto enzymy v genomech degradačních bakterií detekovat. V případě kometabolických rozkladů (viz níže) se jedná hlavně o specifické monooxygenázy. Bakterie využívají epoxidaci katalyzovanou zmíněnými monooxygenásami za tvorby chlorovaných epoxidů. Ty jsou však nestabilní a mohou v buňce tvořit agregáty důležitými sloučeninami vedoucí pak k záhubě buňky. V odpovědi na tuto skutečnost buňka vytváří detoxikační enzymy (epoxyalkan koenzym M tranferáza) k potlačení těchto procesů. Přesná metabolická dráha je však nejasná. [3]

Předpokládá se, že při tomto procesu jsou primárně epoxidována dvojná vazby mezi uhlíky za tvorby chlorethenových epoxidů, které jsou dále spontánně ve vodném prostředí hydrolyzovány na CO₂, kyselinu mravenčí a další produkty. [3]

Termín kometabolismus nebo kometabolická degradace byl poprvé popsán roku 1950. Popisuje schopnost mikroorganismů transformovat nerozložitelný substrát (sekundární), obecně v přítomnosti rozložitelného (primárního substrátu) [56].

Primární substrát podporuje růst mikroorganismů, zatímco kometabolizovaný substrát obvykle nevstupuje do katabolických a anabolických drah mikrobiálních buněk. Proto kometabolický substrát nepodporuje mikrobiální růst. Kometabolismus chlorovaných

rozpouštědel produkuje množství sloučenin, z čehož některé z těchto sloučenin jsou pro buňky toxické. Při srovnávání rychlostí kometabolických rozkladů TCE za účasti různých primárních substrátů bylo zjištěno, že rychlost kometabolické degradace TCE [57] pro bakterie degradující methan je srovnatelná s rychlostí využití methanu, zatímco transformace TCE s fenolem a toluenem je pomalejší, než je využití toluenu a fenolu. [61]



Obrázek 6 Příklad kometabolické dráhy TCE s toluenem [58]

Na obrázku bakterie využívá k růstu toluen, zatímco oxiduje TCE na epoxid a později na CO_2 , dichloracetát, glyoxylát a formiát. [58]

Nejslibnější technologie pro čištění půdy a remediace podzemních vod od TCE je kometabolická degradace vzhledem k jejím nízkým nákladům a jejímu potenciálu úplné degradace znečišťujících látek in situ. [56]

Bez introdukce methanu nedošlo k žádné významné degradaci TCE. Proto lze tvrdit, že TCE neslouží jako primární (růstový) substrát pro bakterie při aerobní degradaci. Nejčastějšími

enzymy schopnými kometabolického rozkladu TCE, jsou methan monooxygenáza, fenol-2-monooxygenáza, toluen mono- i dioxygenáza.[56]

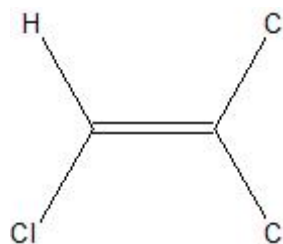
Byla studována aerobní transformace několika halogenovaných alifatických sloučenin včetně TCE s použitím buněčných suspenzí *Nitrosomonas europaea*, bakterie oxidující amoniak (produkuje amonium-monooxygenázu). Autoři zjistili, že většina testovaných sloučenin zmizela do 24 h. Reakce byla navržena tak, aby byla dosažena nejvyšší rychlost katalýzy amonium-monooxygenázou. Míra produkce dusitanů z amoniaku však značně poklesla, když bylo do reakce introdukován TCE, což ukázalo na toxický efekt produktů rozkladu TCE na klíčový enzym. [61]

Toluen a fenol jsou navíc regulované sloučeniny a vzbuzují obavy při aplikaci v prostředí. [60] proto byla testována schopnost rostlinných silic a jejich složek pro jejich schopnosti při indukci TCE degradujících enzymů. Bylo zjištěno, že citronová tráva, kmínový olej a jejich složky jako je kumen, limonen, kmínové aldehydy rovněž indukovaly rozklad TCE jako při degradaci toluenu. Bakterie *Rhodococcus* sp. a *Rhodococcus gordoniae* degradovaly TCE v rozsahu mezi 20–53 % a 85 % vstupního množství TCE. Vzhledem k tomu, že tyto sloučeniny jsou hojné a jsou považovány za netoxické pro člověka a ekosystémy, mohou být použity ke kometabolické degradaci TCE v životním prostředí. [61]

V závěru je nutno podotknout, že tato technika má nějaké mezery, například mechanismus negativních efektů během transformace TCE není dobře pochopen, tj. substrátová kompetitivní inhibice, inaktivace enzymů a cytotoxicita. [61]

4 LÁTKY TESTOVANÉ NA BIODEGRADACI

4.1 Trichloroethylen (TCE)



Obrázek 7 trichloroethylen

Tabulka 1 Fyzikálně chemické vlastnosti TCE

Vzorec	C_2HCl_3
Molekulová hmotnost:	131,39
Vzhled:	Čirá, bezbarvá nebo namodralá tekutina
Zápach:	Éterický, připomínající chloroform
Chuť:	Sladká
Bod varu:	87,2 °C
Bod tání:	-84,7 °C
Korosivita:	Není korosivní
Kritická teplota:	300,2 °C
Kritický tlak:	4,986 MPa
Hustota:	1,4642 při 20 °C / 4 °C
Rozpustnost:	ethanol, diethylether, aceton a chloroform
Rozpustnost ve vodě:	1280 mg/l při 25 °C
Index lomu:	1,4773 20 °C /D
Hustota par:	4,53 (vzduch = 1)
Tlak par:	69 mm Hg při 25 °C
Viskozita:	0,00550 poise při 25 °C
% v nasyceném vzduchu:	10.2 (25 °C)
Práh zjistitelnosti čichem:	28 ppm

Jedná se o látku dlouhodobě využívanou již od roku 1911 kdy byl využíván přednostně jako odmašťovač při obrábění kovu nebo při zpracování textilu. Byl také přidáván také jako aditivum adheziv, mazadel a barev a laků. Bohužel látka byla využívána i jako analgetikum v zubním lékařství to však vedlo ke zjištění její neurotoxicity [8]

Dnes je možné najít tuto látku prakticky všude po světě ve vodě, ovzduší i půdě. Primárně se nachází v ovzduší, a to díky emisím z odmašťovacích operací, ty jsou zodpovědné za 90 % veškerého znečištění [9]. je možné ho nalézt i přírodně však v neporovnatelně menších množstvích je nacházen v mořských řasách. Jeho množství v prostředí je závisle na

prostředí. Jeho koncentrace kolísá v ovzduší mezi 0,03 ppb až po 1,2 ppb v oblastech zdrojů emisí. [9]

Velké množství lidí je tomuto polutantu exponováno profesně. Nejčastěji se lidé dostanou do kontaktu s touto sloučeninou inhalačně, 50 % až 70 % je adsorbováno cévním systémem, z čehož 40 % až 75 % je metabolizováno. Zbylé množství je vydýcháno. Díky lipofilnímu charakteru látky se ukládá především v játrech a v mozku.[10, 11]; Dále také přechází do vaječníků a také může ohrozit plod. [12]

V základu je látka v lidském organismu metabolizována na kyselinu trichloroctovou nebo trichloroethanol, kdy primárním metabolitem je 2,2,2-trichloroethanol (45 %) a trichloroctová kyselina.[13; 14; 15] Z celkové expozice TCE je z 90 % exkretováno z těla močí. [16] Metabolismus TCE může být ovlivněn požitím ethanolu.

Co se způsobených zdravotních potíží týče, tak u 6929 zaměstnanců co pracovali s TCE byla zaznamenána zvýšená mortalita na nemaligní respirační onemocnění. Při vystavení vodě kontaminované TCE bylo zaznamenáno zvýšené riziko astmatu. Byly zaznamenány i případy plicního edému [17, 18] ale to z důvodu, že TCE oxiduje na fosfen. [19]

Při kožní expozici byla všeobecně zaznamenána hlavně vyrážka, a to při kontaktu s koncentrovanou látkou.[20, 21]

V akutní i chronické formě se můžeme setkat i s kardiotoxicitami, avšak mechanismus těch to otrav není znám. [22] Je zde významně zvýšené riziko arteriosklerózy a infarktu myokardu.[23]

Případy naznačující působení na ledviny jsou nejasné. Jednak se u pracovníků vystavených TCE ukázala změna v obsahu bílkovin a enzymů v moči, [24]; [25]

ale také byl zaznamenán případ, kdy po požití několik lžic TCE nebylo zaznamenáno žádné poškození jater ani ledvin.[26] tomto případě páchá větší škody dlouhodobá expozice. Hepatotoxicity je reversibilní a ustává s ukončením expozice. [27]

V minulosti byl TCE užíván jako anestetikum v zubním lékařství, ale tato praxe byla zakázána kvůli prokázané neurotoxicitě a působení na kraniální nerv. [28; 29; 30] může vést až k mentálním komplikacím. [31]

Jedná se také o karcinogenní látku, dále je zde podezření na mutagenitu. Jedná se o regulovanou látku, jejíž použití vyžaduje povolení dle autorizačního seznamu REACH, který

je součástí „REACH annex XVI“. Látka je na seznamu látek čekajících na potvrzení o zahrnutí do seznamu látek vzbuzujících mimořádné obavy. Tato látka je v EU vyráběna a importována jedná se o cca. 10 000 tun ročně. [32]

Co se týče osudu tohoto polutantu v prostředí, tak poločas rozkladu ve vodě je 6,7 měsíce a ve vzduchu jde o 13,3 dní. Poločas hydrolyzy je 1 300 000 let, tedy lze říct, že není hydrolyticky rozložitelný. [32]

V databázi ECHA je uvedeno, že látka není ve vodním prostředí biodegradabilní, což však je mou prací vyvráceno. Látka se vyznačuje bioakumulačním faktorem (BCF) 17.

Toxikologické údaje TCE jsou uvedeny v následující tabulce. [32]

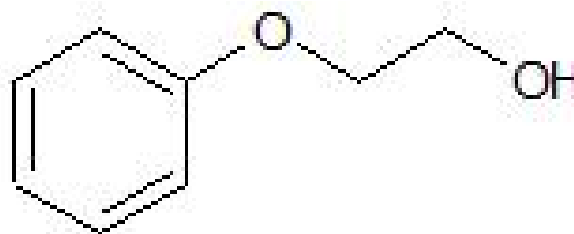
Tabulka 2 Toxikologické parametry TCE [32]

sledovaný parametr	délka expozice	koncentrace
ryby		
LC50 (mg/l)	4 dny	16-28,3
NOEC (mg/l)	10 dní	5,76
bezobratlí		
IC50 (mg/l)	48 hodin	20,8
LC50 (mg/l)	7 dní	17
LC50 (mg/l)	4 dny	14
LC50 (mg/l)	48 hodin	17
řasy a cyanobakterie		
EC50 (mg/l)	72 hodin	36,5
EC10 (mg/l)	72 hodin	12,3
mikroorganismy		
EC50 (mg/l)	3 hodiny	260

4.2 2-fenoxyethanol (2FE)

Tabulka 3 Fyzikálně chemické vlastnosti 2FE

Molární hmotnost (g/mol)	138,16
pH (10g/l , 23 (°C)	7
Bod tání (°C)	12
Bod varu (°C)	245
Bod vzplanutí (°C)	126
Hustota (g/ml)	1,107
Rozpustnost ve vodě (g/l)	28,6
Samovznícení (°C)	475



Obrázek 8 2-fenoxyethanol

S touto látkou bylo intenzivně pracováno v bakalářské práci. Jde o látku, která je označována také jako ethylen glykol monofenyl ether či fenyl glykol. Má bakteriocidní účinky a je široce používána jako kosmetický konzervant. Přírodně je k nalezení v avokádu.

Mechanismus bakteriocidních účinků je založen na narušení oxidativní fosforylace v dýchacím řetězci buněk a blokuje dehydrogenaci malátu. Přímou také ovlivňuje syntézu DNA a RNA. [5]

Na základě výzkumu *in vitro* bylo zjištěno, že 2FE se neakumuluje ani nenavazuje v kůži a velmi rychle se vstřebává (lidskou kůží asi ze 78%). K metabolizaci dochází hlavně v játrech a částečně v kůži. Metabolitem lidského organismu je kyselina fenoxyoctová vylučovaná z těla močí. [5]

Inhalačně nebyla prokázána toxicita ani po šesti hodinách denně po pět dní v týdnu a čtrnácti dnech. Orálně byla prokázána hepatotoxicita po deseti dnech podávání (100 mg/kg).

Dále byla zaznamenána hemotoxicita, a to ve formě slabé anémie a změně velikosti červených krvinek u krys, kterým byl 2FE podáván po devadesát dní. LOAEL (nejnižší dávka s prokazatelným efektem) je 987mg/kg pro samce a 1000 mg/ pro samice. [5]

Co se neurotoxicity týče, byl zaznamenán případ tří žen pracujících jako dělnice ve zpracovatelském průmyslu ryb, kde je 2FE používán jak anestetikum ryb ke snížení stresu při transportu a usmrcení. Ženy si stěžovaly na bolesti hlavy a vratkost. Tento případ je však zpochybnitelný, jelikož nebylo možné dohledat koncentraci použitého 2FE a potvrdit tak jeho přímé působení na pracovnice [5]

V čisté formě (100 %) působí 2FE podráždění očí a kůže. U člověka byl zaznamenán případ, kdy předčasně narození novorozenci byli desinfikováni vodným roztokem 0,1 % oktenidinu a 2% 2FE před uložením do inkubátoru. Z důvodu velmi citlivé, a ne plně vyvinuté kůže novorozenců došlo ke kožnímu podráždění, tzv. kožnímu výkvětu a zarudnutí kůže [5]

Prokázané zdravotní problémy však nejsou důvodem k obavám či snad k zanedbávání osobní hygieny. Všechny zaznamenané problémy byly prokazatelně zapříčiněny působením 2FE ovšem v dávkách diametrálně odlišných, než by se s nimi běžný uživatel setkal, řádově šlo o 200krát vyšší koncentrace. Toxicita je v porovnání s druhou testovanou látkou zanedbatelná.

Jeho rozšířené využití dokazuje i italská studie z roku 2017, kde bylo zkoumáno 283 kosmetických a hygienických přípravků různých druhů. Šedesát procent výrobků mělo nějakou formu konzervantu, z toho 48% (tedy 93 výrobků z 283) byl konzervantem právě 2FE. [6]

Další japonská studie z roku 2012 zaměřená na degradaci xenobiotik v tocích různými způsoby zaznamenala, že 2FE je odolný vůči fotooxidaci. Jeho biodegradace v říční vodě však byla potvrzena. [7]

Kromě využití jakožto konzervantu v kosmetických výrobcích je 2FE i alternativou k formaldehydu používaného ke konzervaci a balzamování lidských mrtvol k výukovým účelům medicínských škol. [8]

Dle dostupných informací po portálu ECHA nebyla u této látky zaznamenána fotodegradace ve vzduchu nebo ve vodě či samostatná hydrolyza. Biodegradabilita ve vodním prostředí byla potvrzena několika studiemi, které byly prováděny za aerobních podmínek. Testy proběhly dle směrnic OECD 301 A a EPA OPPTS 835.3110 (BASF AG, 2002). Biodegradace byla sledována pomocí DOC, kdy počáteční koncentrace činila 20 mg/L DOC, monitoring probíhal po 15 dní a na konci byl potvrzen 90-100% rozklad. Dále byla provedena studie dle OECD 301F (manometrický a respirační test), kde doba inkubace byla 28 dní a dle spotřebovaného kyslíku bylo rozloženo 90% fenoxxyethanolu. Byly provedeny i doplňující studie se srovnatelnými výsledky. Dle zmíněných testů a také mé bakalářské práce je možno prohlásit 2 fenoxxyethanol za velmi dobře rozložitelný, více než 60 % se rozkládá již před desátým dnem inkubace.

Zmíněné studie jsou součástí směrnic vyvinutých úřadem pro prevenci pesticidů a toxických látek Spojených států amerických (OOPPTS) ve spolupráci s Úřadem pro předcházení znečištění a toxinů (OPPT). Směrnice slouží k minimalizaci rozdílů v testovacích procedur. (P100ID0B) [33]

5 FENOL HYDROXYLÁZA

Byla stanovena molekulová hmotnost enzymu na 148 000 g/mol. Přechištěný enzym je jasně žlutý. Jeho absorpční spektrum má peaky při 276, 375 a 445 nm.

Kromě fenolu reaguje také s třemi izomerními difenoly, s halogenem nebo amino substituovanými fenoly a v menší míře s kresoly.

Všechny tyto enzymy sdílejí vlastnost zakomponovat jeden atomu molekulárního kyslíku do substrátu, zatímco druhý atom kyslíku je redukován na H₂O.

Produktem hydroxylace fenolu je katechol, který může být dále hydroxylován na pyrogallol.

Enzym v nedotčených zmrazených buňkách, skladovaných při -20 °C, byl stabilní po dobu alespoň jednoho roku. Bezbuňčné preparáty o různém stupni čistoty byly také překvapivě stabilní, když byly skladovány zmrazené v pufru fosforečnanu draselného obsahujícím ochranné látky merkptoetanol, EDTA a FAD. Takto konzervované enzymy zachovaly svou původní aktivitu po několik měsíců. Vysoce purifikované přípravky byly méně stabilní. [37]

Jedna jednotka enzymové aktivity je zde definována jako konverze 1 umol fenolu za minutu při 55 °C. Aktivita hydroxylázy byla závislá na fenolu, s naměřenou hodnotou Michaelisovy konstanty K_m 66 μM

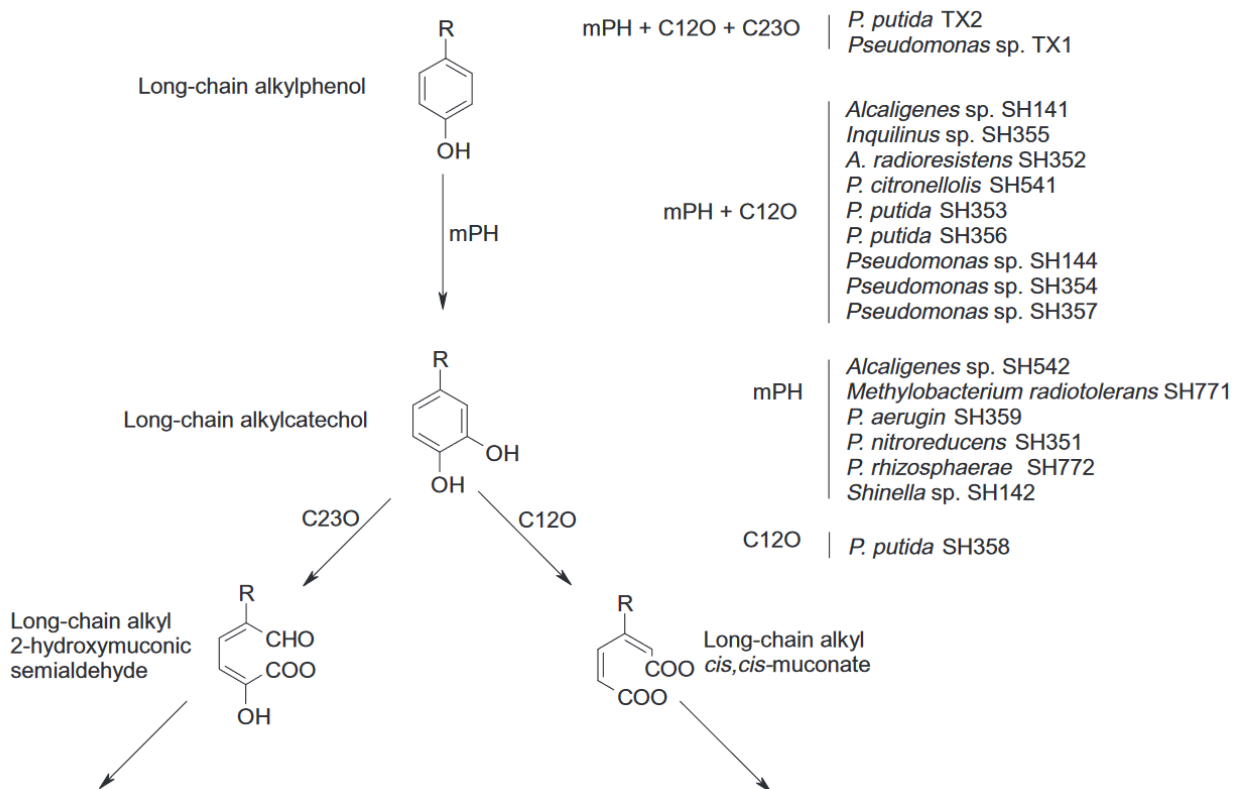
Nebyla rozpoznána žádná inhibice fenolem, a to i do koncentrace 0,5 mM, což je nejvyšší hladina, pro kterou by bylo možné spolehlivě použít test vymizení fenolu. [38]

U dvou kmenů *P. putida* a *Pseudomonas* sp., výsledky ukazují, že alkylfenoly s dlouhým řetězcem jsou zpočátku oxidovány na alkylkatecholy s dlouhým řetězcem, po kterých následuje meta nebo ortho-štěpení aromatických kruhů.

Výsledky také implikují, že je rozdíl mezi metabolickými drahami alkylfenolů s dlouhými a krátkými řetězci, jedná se o tzv. metadráhu pro kratší řetězce a pro dlouhé se metabolizace ubírá po orto-dráze.

Šest z 18 kmenů z dané studie, jmenovitě *Shinella* sp., *Alcaligenes* sp. *P. aeruginosa*, *P. nitroreducens*, *M. radiotolerans* a *P. rhizosphaerae*, u kterých se zdá, že se cesta ubírá prostřednictvím alkylkatecholů přičemž následující krok tato studie neodhalila.

Pro jeden kmen, *P. putida*, lze předvídat, že následovat by mohla degradace alkylkatecholu s dlouhým řetězcem ortho-štěpením aromatického kruhu, ale tento mechanismus je stále nejasný. [39]



Obrázek 9 Metabolická dráha rozkladu alkylfenolů

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo dále rozšířit poznatky o bakteriálních kulturách *Hydrogenophaga pseudoflava* (P4) a *Zoogloea resiniphila* (P9), jejichž izolace byla výsledkem mé předchozí práce. Současně tak i prozkoumat jejich potencionální schopnost rozkládat trichlorethylen na bázi kometabolického rozkladu. Dále také bylo cílem připravit vzorky pro objasnění metabolické dráhy rozkladu fenoxxyethanolu a také pokusit se zjistit, jaký enzym pravděpodobně stojí za úvodní oxygenací fenoxxyethanolu – a tím i za rozkladem TCE – a jak se liší od enzymů jemu podobných.

7 METODIKA

7.1 Oživení kultur P4 a P9

Kultury byly po ukončení bakalářské práce zakonzervovány a uloženy v glycerolu v mrazáku při -80°C . Dne 6. 4. 2021 byly kultury znovu oživeny a naočkovány na živnou půdu R2A, kde po dvou dnech inkubace úspěšně narostly.

7.2 Test utilizace fenolu a ethanolu

Byly připraveny roztoky o různé koncentraci fenolu v rozsahu 250 – 1760 mg/l a stejně tak byly připraveny roztoky ethanolu v rozmezí 250 a 500 mg/l.

Takto připravené roztoky byly rozdávkovány do jednotlivých zkumavek a zaočkovány suspenzí kultur P4 a P9. Inkubace probíhala při 25°C .

7.3 Test kometabolické degradace TCE

Příprava živných půd

Bylo připraveno 100 ml minerálního média (MM), které bylo následně vysterilizováno v autoklávu.

Tabulka 4 Složky základního minerálního média

Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	(23,9 g/l)	8 ml
Roztok KH_2PO_4	(9,078 g/l)	2 ml
Voda destilovaná	-	85 ml
Roztok NH_4Cl	(30 g/l)	1 ml
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(10 g/l)	1 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(3 g/l)	1 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(1 g/l)	1 ml
Roztok NaCl	(10 g/l)	1 ml
Roztok stopových prvků	-	0,1 ml

Do hotového roztoku byly přidány ještě MEM vitamíny.

Byly připraveny suspence kultur P4 a P9 ve sterilních zkumavkách s 3 ml fyziologického roztoku.

Následně byl připraven sterilní zásobní roztok fenoxxyethanolu o koncentraci 10 g/l (sterilizace přes sterilní membránový filtr Ahlstrom s velikostí porů $0,2 \mu\text{m}$).

7.3.1 Bakteriální kometabolická degradace TCE

Byla připravena suspence kultur P4 a P9 ve fyziologickém roztoku. Pro tento experiment bylo připraveno 11 skleněných vialek o objemu 42 ml se silikonovými septy a teflonovým potahem a do každé se dávkovalo po následujících objemech:

Tabulka 5 Dávkování složek pro kometabolickou degradaci

Vialky č. 1 až 5:
10 ml destilované vody (blanky)
Vialky č. 6 až 8:
9,79 ml sterilního MM.
200 µl zásobního roztoku fenoxoethanolu (10 g/l)
10 µl bakteriální suspence P4
Vialky č. 9 až 11:
9,79 ml sterilního MM
200 µl zásobního roztoku fenoxoethanolu (10 g/l)
10 µl bakteriální suspence P9

Do každé vialky bylo přidáno 30 µl zásobního vodného roztoku TCE pomocí plynotěsného dávkovače a vialka byla okamžitě uzavřena, aby bylo zamezeno úniku TCE.

Vialky 1 až 5 sloužily pro stanovení vstupní koncentrace TCE v kapalně fázi. Očkované vialky byly inkubovány po dobu 14 dnů.

Růst byl kontrolován stejně jakou předchozího pokusu pomocí densilometru.

7.3.2 Stanovení koncentrace TCE v kapalně fázi

Koncentrace TCE byla stanovována plynovou chromatografií na přístroji Hewlett Packard 5890 po zakoncentrování vzorku metodou Purge & Trap, na koncentrátoru Tekmar LSC 2000 (sorbent Vocarb 4000 firmy Supelco, teplota desorpce 250°C). Těkavé látky byly rozděleny separací na kapilární koloně Quadrex (Methyl-Phenyl Cyanopropyl Silicone 30 m x 0,53 mm ID, 3 µm film, firmy Quadrex Corporation, USA) a následně detekovány na plamenoionizačním detektoru (FID). Počáteční teplota 35°C, rychlost 4°C/min, finální teplota 150°C, teplota detektoru 250°C. Nosný plyn – dusík, průtok 7 ml/min.

Do koncentrátoru bylo dávkováno buď 5 ml vzorku přímo (při koncentraci TCE do 1 mg/l) nebo 0,5 – 1 ml vzorku společně s 4,0 – 4,5 ml chladné převařené destilované vody (tj. definované naředění vzorků s vyšší koncentrací TCE). Koncentrace TCE byla vypočítávána

z velikosti píku na základě kalibrační přímky. Stejná metoda byla použita i pro další měření TCE v ostatních pokusech.

7.4 Růst kultur P4 a P9 na fenoxylethanolu při různých teplotách

Příprava živných půd

Pro tento experiment bylo připraveno 2 x 100 ml minerálního média (MM), které bylo následně sterilizováno.

Minerální médium bylo připraveno identicky jako v případě 6.3. (viz výše)

Do hotového roztoku byly přidány ještě MEM vitamíny.

Analogicky jako v předchozím experimentu byly připraveny suspenze kultur P4 a P9. Ve sterilních zkumavkách s 3 ml fyziologického roztoku.

Byl použit zásobní roztok fenoxylethanolu (10 g/l).

Do MM s 80 ml vody byl přidán asepticky 5 ml zásobního roztoku fenoxylethanolu (10 g/l).

Pro každou testovanou kulturu bylo připraveno 8 sterilních zkumavek, kdy do dvou z nich bylo asepticky napipetováno 3 ml sterilního MM. Poté do zbylých šesti sterilních zkumavek 3 ml MMs fenoxylethanolem a následně do všech zkumavek suspensi zkoumané kultury (10 µl).

Dvě zkumavky bez 2FE budou sloužit jako blank. Blanky a dvě zkumavky s 2FE byly inkubovány při 25°C a po dvou dalších zkumavkách s 2FE probíhala inkubace při 13°C a při 8°C. Růst byl hodnocen turbidimetricky pomocí densilometru.

7.5 Růst kultur P4 a P9 na fenoxylethanolu a směsi fenoxylethanol + laktát, v různých minerálních médiích (řešení poklesu pH)

Příprava minerálních médií

Připraveny byly 3 druhy minerálního média s rozlišným pH a složením.

Složení 200 ml minerálního média (MM):

Složení minerálního média bylo identické jako v 6.3 (viz. více) poze byly zdvojnásobeny objemy jednotlivých složek.

Tabulka 6 Složení 200 ml minerálního média o pH 8 (MM8):

Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	(23,9 g/l)	20 ml
Voda destilovaná	-	166 ml
Roztok NH_4Cl	(30 g/l)	2 ml
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(10 g/l)	2 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(3 g/l)	2 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(1 g/l)	2 ml
Roztok NaCl	(10 g/l)	2 ml
Roztok stopových prvků	-	0,3 ml

Tabulka 7 Složení 200 ml minerálního média s dusičnanem draselným (MMD):

Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	(23,9 g/l)	16 ml
Roztok KH_2PO_4	(9,078 g/l)	4 ml
Voda destilovaná	-	166 ml
Roztok KNO_3	(50 g/l)	2 ml
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(10 g/l)	2 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(3 g/l)	2 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(1 g/l).	2 ml
Roztok NaCl	(10 g/l).	2 ml
Roztok stopových prvků		0,3 ml

Po přípravě médií bylo změřeno jejich pH

Připraveno bylo 50 ml roztoku laktátu sodného 10 g/l (LAN).

Připravená média byla po 14,7 ml rozdělena do lahví o objemu 100 ml dle následujícího způsobu:

Tabulka 8 Rozdělení experimentálních médií

MM:	13 lahví
MM8:	9 lahví
MMD:	9 lahví

Po sterilizaci bylo přidáno 15 μl MEM vitamínů.

Jednotlivá upravená minerální media byla rozdělena do:

Tabulka 9 Dávkování složek pro různé druhy minerálních médií

MM (4 láhve)
300 µl sterilní roztok FE (10 g/l)
300 µl sterilní roztok LAN (10 g/l)
150 µl sterilní roztok FE
150 µl sterilní roztok LAN
MM8 (4 láhve)
300 µl sterilní roztok FE (10 g/l)
150 µl sterilní roztok FE a 150 sterilní roztok LAN
MMD (4 láhve)
300 µl sterilní roztoku FE (10 g/l)
150 µl sterilního roztoku FE
150 µl sterilní roztok LAN

Po sterilizaci bylo změřeno pH. Byly připraveny suspenze kultur P4 a P9 v cca 3 ml fyziologického roztoku, načež byly vždy dvě láhve z dané čtveřice zaočkovány suspenzí kultury P9 nebo P4. Inkubace probíhala při 25 °C po dobu 6 dní.

7.6 Extrakce metabolitů

Analogicky jako v předchozích pokusech bylo připraveno minerální médium.

Příprava **500 ml** minerálního média (MM)

Složení MM na 100 ml:

Složení identické jako u **6.3** (viz. výše)

Do připraveného MM byl přidán zásobní roztok fenoxxyethanolu (50 g/l), kdy finální koncentrace v MM byla 800 mg/l. MM bylo rozděleno do zkumavek a zaočkováno kulturou P4 (50 µl suspence ve fyz. roztoku)

7.7 metoda extrakce metabolitů

Bylo nutné ověřit metodu extrakce bakteriálních metabolitů z kultivačního média do rozpouštědla, které bude následně možné použít jako mobilní fázi v plynovém chromatografu. Nejprve bylo uvažováno, že bude použit dichlormethan, avšak práce s touto látkou se ukázala být příliš nepraktická a po konzultaci s odborníky na danou problematiku byl zvolen acetonitril. Extrakce byla prováděna ve skleněných vialkách s plynotěsným uzávěrem, oproti tradičtější metodě pomocí děličky z důvodu menších objemů.

Průběh extrakce:

7 ml buněčné suspenze P4 (72 hodin růstu v MM s FE) bylo přefiltrováno pomocí Ahlstrom mikrofiltru o velikosti pórů 0,2 mikrometru. Filtrát suspenze byl následně smíchán se 7 ml acetonitrilu a vytřepáván 15 minut v ruce.

Pak následoval přídavek NaCl v množství 1,8 g za účelem oddělení vodné a organické fáze pomocí rozpuštěním soli ve vodě a zvýšení hustoty vody. Po několikaminutovém třepání (cca. 5-8 minut) byl jasně zřetelný fázový přechod s organickou fází nad vodnou. Vialka byla ponechána stát, aby se fáze dokonale oddělily. Mezivrstva byla tenká a organická fáze se jevila velmi mírně zakalená.

Z organické fáze se postupně s maximální opatrností odebrala organická fáze za použití mikropipety. Odběr byl proveden 5x po 1 ml a každý odběr byl převeden do samostatné eppendorfky. Následně bylo přistoupeno k centrifugaci v předchlazené odstředivce při 800 g, 4°C, po dobu 5 minut. Z každé eppendorfky poté odebrán objem 0,6 ml organické fáze a opět byly převedeny do jedné nové vialky.

Posledním krokem byl přídavek bezvodého síranu sodného (1 x na špičku lžičky) aby bylo možné s jistotou konstatovat, že v roztoku se nenachází jakékoliv množství vody, které by ovlivňovalo výsledky na plynovém chromatografu. V takovém případě by síran sodný přestal být sypký a „spekl“ by se do jednotné homogenní hmoty při styku s vodou a za vzniku hydrátu. K tomuto jevu však nedošlo a roztok organické fáze byl připraven k analýze.

Kvalita organické fáze byla kontrolována mikroskopicky (fáz. kontrast, 400 x), kdy byla zjištěna přítomnost jakýchsi jasně ohraničených kapek tmavé barvy neznámého původu. Tyto kapky byly pozorovány v případě, že suspenze bakteriální kultury nebyla filtrována a rovnou smíchána a protřepána s acetonitrem. Identická extrakce byla provedena znovu, ale s filtrací, jak je popsáno výše. V tomto případě byly popsané kapky nalezeny znova, avšak v neporovnatelně menším množstvím a velikosti. Proto byla ve finále použita filtrace.

7.8 Kometabolická degradace TCE kulturou P4

Bylo připraveno minerální medium s pH 8 analogicky jako v případě pokusu [7.5](#)

Po sterilizaci jako vždy byly přidány MEM vitamíny.

Připraveny byly suspenze kultury P4 ve 3 ml fyziologického roztoku a zásobní roztok fenoxethanolu (10 g/l) a laktátu sodného (10 g/l).

Do čtrnácti zkumavek byly dávkovány následující objemy:

Tabulka 10 Dávkování složek pro kometabolickou degradaci kulturou P4

Zkumavky 1 až 6 (blanky)
9,8 ml MM
100 µl zásobního roztoku fenoxxyethanolu (10 g/l)
100 µl zásobního roztoku a laktátu sodného.
Zkumavky 7 až 10
9,79 ml sterilního MM
100 µl zásobního roztoku fenoxxyethanolu (10 g/l)
100 µl zásobního roztoku laktátu sodného (10 g/l)
10 µl bakteriální suspence P4.
Zkumavky 11 až 14
9,79 ml sterilního MM
100 µl zásobního roztoku fenoxxyethanolu (10 g/l)
100 µl zásobního roztoku laktátu sodného (10 g/l)
10 µl bakteriální suspence P4

Následně byl nadávkován zásobní roztok trichlorethylenu (TCE) pomocí plynotěsného dávkovače. Dávkování bylo provedeno vstříkovací jehlou, po každém nadávkování byla zkumavka neprodleně uzavřena. TCE byl nadávkován následovně:

Tabulka 11 Dávkování TCE pro kometabolickou degradaci kulturou P4

Zkumavky 1 – 3 a 7 – 10
30 µl zásobního vodného roztoku TCE
Zkumavky 4 – 6 a 11 – 14
40 µl zásobního vodného roztoku TCE

(Zkumavky 4 až 6 a 1 až 3 slouží pro stanovení vstupní koncentrace TCE v kapalně fázi.)

Očkované zkumavky byly inkubovány po dobu 14 dnů. Zákal byl kontrolován pouze vizuálně a koncentrace TCE na konci inkubační doby byly stanoveny pomocí plynového chromatografu.

7.9 Stanovení klíčového enzymu

7.9.1 Izolace DNA

Nejprve byla připravena suspenze obou kultur podobným způsobem, jako tomu bylo u v přechozích pokusech. K izolaci DNA byl použit předpřipravený kit určený k izolaci

bakteriální DNA. Šlo o High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE). Izolována byla DNA obou kultur zároveň a postup izolace byl identický. Postup izolace byl následující:

1,5 ml mikrobiální suspenze bylo přidáno do mikrozkušavky a centrifugováno po 5 minut při 13 000 g. Supernatant byl z mikrozkušavky vylit a místo něj bylo přidáno 200 µl PBS, v němž byl biologický materiál opět dispergován.

Dále bylo přidáno µl lysozymu (10 mg/ml v 10mM Tris-HCl, Sigma-Aldrich) a mikrozkušavka byla ponechána inkubovat po 15 minut při 37°C.

Po inkubaci bylo přidáno 200 µl Binding Buffer a 40 µl proteinázy, obsah mikrozkušavky byl následně pečlivě promíchán a inkubován při 70 °C po dalších 10 minut. Poté bylo přidáno 100 µl isopropanolu a obsah byl opět dobře promíchán.

Mikrozkušavka byla následně centrifugována po 1 minutu při 8000 g. Tímto bylo dosaženo vazby mezi DNA a membránou kolonky, která byla následně umístěna do nové mikrozkušavky, kde bylo přidáno 500 µl Inhi-bitor Removal Buffer.

Vzorky byly pak zase centrifugovány při 8000g po 1 minutu. Předchozí kroky byly ještě jednou opakovány. Kolonka byla opět přemístěna do nové mikrozkušavky a bylo přidáno 30 µl roztoku Elution Buffer.

Následovala další inkubace, a to při 70 °C po dobu 15 minut potom byla mikrozkušavka naposledy centrifugována při 8000g po 1 minutu za účelem uvolnění DNA z kolonky do supernatantu.

Dalším krokem byla kontrola DNA na čistotu a koncentraci. Kontrola proběhla spektrofotometricky pomocí přístroje TECAN INFINITE 200 PRO. Zvolená vlnová délka byla 260 – 280 nm.

Do destičky spektrofotometru bylo napipetováno 2 µl blanku a proběhlo měření, které následně bylo nastaveno jako baseline. Po důsledném vyčištění destičky byly aplikovány vzorky izolované DNA a bylo spuštěno měření. [55]

Tabulka 12 Čistota koncentrace izolovaného DNA

kultura	koncentrace DNA	čistota
P4	20,8	1,94
P9	18,5	1,93

7.9.2 PCR

Ke zjištění přítomnosti genu, u kterého předpokládáme jeho přítomnost je potřeba provést PCR. Pro tento účel byly objednány primery, které byly na zakázku složeny dle našich požadavků. Primery byly objednány od firmy East Port Praha s.r.o. Jednalo se následující primery.

Tabulka 13 Primery

Primery pro fenol monooxygenázu [34]	
PHE – F	5'-GTGCTGACSAAYCTGYTGTTTC-3'
PHE-R	5'-CGCCAGAACCAYTTRTC-3'
Primery pro Solubilní di-iron monooxygenázu (SDIMO) [35]	
NVC65:	5'-CARATGYTNGAYGARGTNCGNCA-3'
NVC58:	5'-CGDATRTRCRTC DATNGTCCA-3'
Primery pro Multikomponentní fenol hydroxylázu (α -subunit) [36]	
mPH_F	5'-GCGCGGAATTCGARTAYGTGYTGACCAA-3'
mPH_R	5'-GATCTCGAGCCGCGCCAGAACCAYTTRTC-3'

PCR bylo provedeno ve standartním objemu 20 μ l, použit byl GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega) skládající se z DNA polymerázy, deoxynukleotidů (dNTP), MgCl₂ a reakčního pufru. Dávkované objemy reakčních směsí jsou uvedeny níže. [55]

Tabulka 14 Složení PCR směsi [55]

složka	objem	koncentrace
GoTaq® Hot Start Green Master Mix	10	2x koncentrovaný
Sterilní PCR voda	7	
FD1 primer	1	20 μ M
FD2 primer	1	21 μ M
DNA	1	10x ředěno

Pro každou dvojici primerů byl nutný jiný cyklus PCR. Tato data byla získána ze studií, které s danými primery pracovaly. Následující tabulky popisují nastavení termocyklieru pro jednotlivé dvojice primerů.

Tabulka 15 Nastavení termocykleru pro PHE [34]

	teplota (°C)	čas (min)	počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10	1
Denaturace	95	1	30
Annealing	49	1	
Elongace	72	1	
Závěrečná elongace	72	10	

Tabulka 16 Nastavení termocykleru pro NCV [35]

	teplota (°C)	čas (min)	počet cyklů
Počáteční denaturace	94	5	1
Denaturace	94	0,5	35
Annealing	55	0,5	
Elongace	72	1	
Závěrečná elongace	72	5	1

Pro primery pro Multikomponentní fenol hydroxylázu byla nastavena metoda „touchdown“, jedná se specifickou metodu, kdy se denaturace, annealing a elongace opakují v několika setech cyklů, přičemž teplota annealingu se s každým setem snižuje.

Tabulka 17 Nastavení termocykleru pro mPH [36]

	teplota (°C)	čas (min)	počet cyklů
Počáteční denaturace	94	5	1
Denaturace	95	1	10
Annealing	60	1	
Elongace	72	1	
Denaturace	95	1	15
Annealing	55	1	
Elongace	72	1	
Denaturace	95	1	15
Annealing	50	1	
Elongace	72	1	
Závěrečná elongace	72	5	1

7.9.3 Elektroforéza

Čistota, úspěšnost a množství PCR produktu bylo měřeno elektroforeticky. Proces probíhal v 1%tním agarosovém gelu. Nejdříve byl připraven gel. Vypočtené množství agarosy bylo naváženo a rozpuštěno za pomoci mikrovlnné trouby v 1x koncentrovaném TAE pufre (50 x TAE: 2 M Tris, 0,05 M EDTA Na₂, 1 M kyselina octová).

Po dokonalém rozpuštění agarosy byla baňka s roztokem ponechána po 15 minut zchladnout a byl přidán ethidium-bromid který je podstatný pro vizualizaci DNA pod UV světlem, Jedná se o interkalační činidlo. Následně byla s opatrností vylita do formy s hřebínkem tak, aby bylo zamezeno vzniku bublin.

Po ztuhnutí gelu byl hřebínek odstraněn a forma byla rozebrána. Gel byl s uložen do elektroforézní lázně s TAE pufrem a do jednotlivých prohlubní po odstranění hřebínku bylo napipetováno 5 µl PCR produktu a 5 µl DNA markeru (100 bp DNA Ladder, Biolabs).

Elektroforézní lázeň byla uzavřena a byly připojeny elektrody a zdroj byl nastaven na 90 V.

Po ukončení separace byl gel přemístěn do transiluminátoru, kde byl prosvícen Uv zářením a zaznamenané fotografie byly zpracovány programem GeneSnap.

Čištění produktu PCR proběhlo pomocí komerčně dostupného kitu NGS Clean-up and Size Select, MACHEREY-NAGEL. Čištění proběhlo dle návodu v kitu. [55]

7.9.4 Sekvenace

Přečištěný produkt byl odeslán firmě SEQme s.r.o Dobříš k sekvenaci.

8 VÝSLEKY A DISKUSE

8.1 Test utilizace fenolu a ethanolu

Jelikož jedním z cílů práce bylo odhalit metabolickou dráhu rozkladu 2FE, byl tento experiment zaměřen především na určité potvrzení hypotézy, jak by mohl proběhnout první krok v rozkladu, zda štěpením etherové vazby nebo oxygenací aromatického kruhu. Zvolené látky jsou potencionální metabolity, které by v podstatě mohly vzniknout při rozštěpení molekuly 2FE v místě etherové vazby.

Následující tabulky ukazují proces růstu v tekutých médiích, obohacených o uvedený substrát, během dvoutýdenní inkubační doby.

Tabulka 18 Růst na fenolu

Růst během inkubace (dny)						
Kultura	1	2	3	6	10	14
P4	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	-	-	-	-

Tabulka 19 Růst na ethanolu

Růst během inkubace (dny)						
Kultura	1	2	3	6	10	14
P4	-	-	+	++	+++	+++
P9	-+	++	++	++	+++	+++

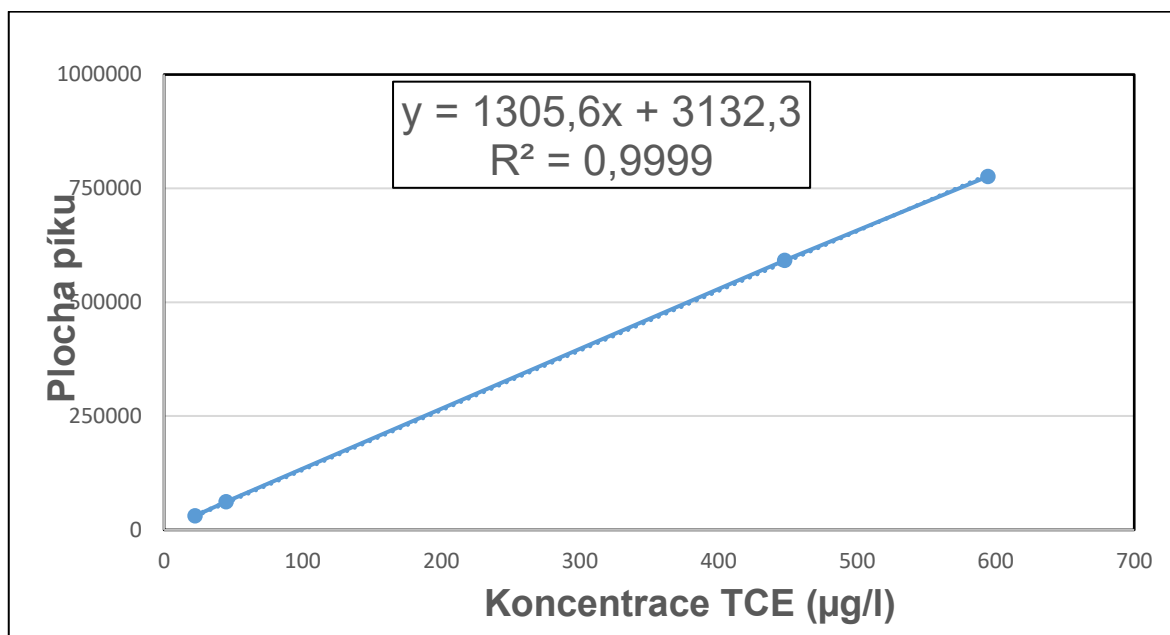
Tabulka 20 Legenda tabulky 19

Legenda:
- bez růstu
-+ náznak růstu
+ zřetelný růst
++ výrazný růst

Dle výsledků testu je možné usoudit, že primární přeměna molekuly fenoxyethanolu pravděpodobně neprobíhá v místě etherové vazby, jak jsme se původně domnívali. Fakt, že na fenolu nebyl zaznamenán jakýkoliv růst, byl velmi překvapující a naznačoval, že fenol není součástí metabolické dráhy rozkladu fenoxyethanolu. Růst na ethanolu dále ukázal, že zkoumané kultury jsou pravděpodobně schopné štěpení etherové vazby a využití uvolněného ethanolu.

8.2 Test růstu na fenoxoethanolu a kometabolické degradace TCE

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit potenciální schopnost zkoumaných kultur rozkládat TCE po kultivaci na fenoxoethanolu. Následující tabulka 22 ukazuje koncentrace TCE po uplynutí inkubační doby v jednotlivých vialkách. Současně je v tabulce také i přepočítaný procentuální úbytek TCE. Koncentrace byly z ploch píků vypočteny pomocí kalibrační křivky zhotovené v diplomové práci Bc. Sabiny Krajčířikové „*Degradace trichlorethylenu bakterií Comamonas testosteroni za snížených teplot*“



Obrázek 10 Kalibrační křivka pro vyhodnocení měření TCE

Tabulka 21 Data pro kalibrační křivku (obrázek 8)

Koncentrace TCE (µg/l) v 5 ml standardu	Plocha píku
22,39	30948,5
44,78	61981,5
447,8	591890
594,5	776277

Tabulka 22 Koncentrace TCE
připravených vzorcích blanků i kultur rostoucích na fenoxoethanolu

Kultura	Objem vzorku	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$)	pH konečné	Úbytek TCE (% u kultur)
Blank26.5.	1	290,5	-	Průměr blanků
Blank26.5.	1	291,6	-	1455,4
P9 26.5.	1	13,6	6,75	95,3
P9 26.5.	1	8,3	6,77	97,1
P9X 26.5.	1	28,8	6,85	90,1
Blank28.5.	1	281,6	-	Průměr blanků
Blank28.5.	1	273,8	-	1388,7
P4 28.5.	1	0	6,78	100
P4 28.5.	1	0	6,77	100
P4 28.5.	1	0	6,77	100

Jak vidno v tabulce 9, experiment byl velmi úspěšný. TCE byl v případě kultury P9 rozložen vždy z více než 90 % a pomocí kultury P4 bylo dosaženo vždy 100% rozkladu. Takovéto výsledky by mohly být využity i prakticky, zvláště pro použití při biologických sanacích podzemních vod kontaminovaných TCE, kde by mohl být 2FE použit jako primární substrát pro injektované bakterie. Výhoda oproti jiným primárním substrátům spočívá v tom, že 2FE je velmi dobře rozpustný ve vodě (mnohonásobně více než methan či propan) a má neporovnatelně menší toxicitu oproti jiným v dnešní době používaným látkám jako jsou fenol či toluen.

8.3 Růst kultur P4 a P9 na fenoxoethanolu při snížených teplotách

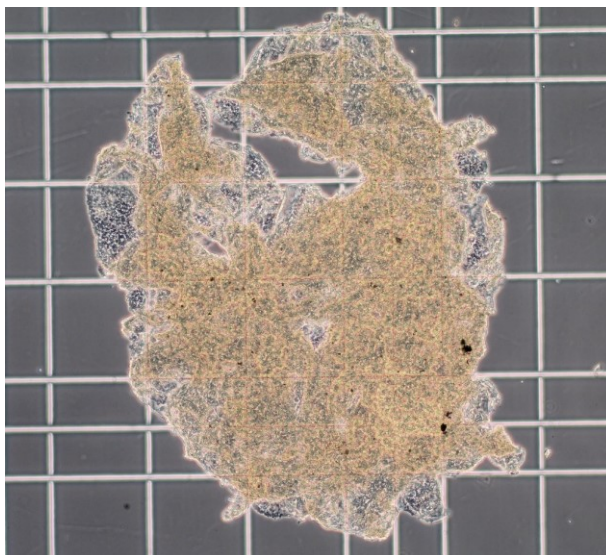
Tento experiment navazoval na testování růstu kultur při různých teplotách z bakalářské práce. Tentokrát ale byly teploty nastaveny tak, aby byla otestována spodní hranice teploty, kdy jsou bakterie schopny růstu na fenoxoethanolu (nikoliv na universálních živných půdách). Jako kontrola byl sledován i růst při 25°C. Motivací testu bylo zjistit, zda jsou kultury schopné růstu na fenoxoethanolu za teplot panujících často v podzemních vodách.

Tabulka 23 Růst kultur na fenoxylethanolu při snížených teplotách (1)

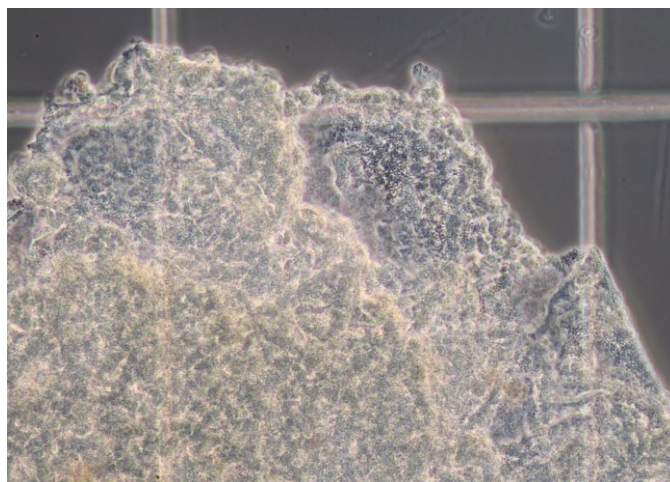
Doba kultivace (d)	Kultura P4			Kultura P9		
	25°C	13°C	8°C	25°C	13°C	8°C
0	- -	- -	- -	- -	- -	- -
2	+ +	- -	- -	+ +	- -	- -
3	++ ++	- -	- -	+ +	- -	- -
7	0,7 + 1,0	0,1 + 0,0	0,0 + 0,0	1,6 + 1,0	0,1 + 0,0	0,0 + 0,0
10	0,6 + 0,8*	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0	1,6 + 1,2	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0
14	0,6 + 0,8*	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0	1,5 + 1,1	0,0 + 0,0	*
17	-	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0	-	0,0 + 0,0	**
28	-	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0	-	1,1 + 1,3	1,3 + 1,0

* - vločky

* * - značný počet vloček



Obrázek 11 Vložka kultury P9



Obrázek 12 Vložka kultury P9 detail

Výsledky jsou v porovnání s výsledky z bakalářské práce překvapující. Kultura P9 narostla i při 8 °C, ale až po velmi dlouhé době, a to ve formě vloček, jak je pro *Zooglea resiniphila* typické, a proto i výsledky densilometrického měření jsou nepřesné. A stejně tak bylo dosaženo růstu i při 13 °C, což byla při testech z bakalářské práce hraniční hodnota. Kultura P4 oproti tomu nerostla už ani při 13 °C. Což je překvapující, jelikož při testech z BP rostla i při 5 °C. Je pravděpodobné, že příčinou tohoto rozdílu může být fakt že při testech v BP byly kultury kultivovány na živné půdě oproti tomuto testu, který se odehrával v tekutém médiu s fenoxyletanolem. Test byl pro ujasnění proveden identicky ještě jednou.

Tabulka 24 Růst při snížených teplotách (2)

Doba kultivace (d)	Blank	Kultura P4			Kultura P9		
		25°C	13°C	8°C	25°C	13°C	8°C
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 + 0,0
1		-	-	-	-	-	-
2		-	-	-	-	-	-
3	0,0+0,0	0,1 + 0,2	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0	0,8+1,3*	0,1 + 0,0	0,0 + 0,0
4	0,0+0,1	0,4 + 0,4	0,0 + 0,1	0,0 + 0,0	1,9+1,7*	0,1 + 0,0	0,0 + 0,0
6	0,0+0,1	0,5 + 0,5	0,0 + 0,1	0,0 + 0,0	1,7+1,7*	0,1 + 0,0	0,0 + 0,0
9	0,1+0,1	0,6 + 0,6	0,0 + 0,1	0,0 + 0,0	1,6+1,7*	0,1+0,2*	0,0 + 0,0
11	0,0+0,1	0,5 + 0,6	0,0 + 0,1	0,0 + 0,1	1,6+1,7*	0,4+0,8*	0,0 + 0,1
13	0,1+0,1	0,5 + 0,6	0,0 + 0,1	0,0 + 0,1	1,6+1,7*	0,6+0,8 [§]	0,0 + 0,1
16	0,0+0,1	0,5 + 0,6	0,0 + 0,1	0,0 + 0,0	1,6+1,7*	1,4+1,5*	0,0 + 0,1
35	0,1+0,1		0,0 + 0,1	0,0 + 0,0			0,0 + 0,1

V tabulce 10 je opakovaný pokus se sníženými teplotami, který byl opakován z důvodu nejasností způsobených kvůli tvorbě vloček u kultury P9. V tomto případě však k růstu P9 nedošlo při 8 °C ani po více než měsíční inkubační době. V praxi získaná data znamenají, že kultura P9 by byla použitelná při remediaci podzemních vod kontaminovaných TCE, jelikož teploty podzemních vod se často pohybují kolem nebo i pod 15 °C.

8.4 Růst kultur P4 a P9 na fenoxyletanolu a směsi fenoxyletanol + laktát a modifikovaných minerálních médiích

Cílem experimentu bylo zjistit optimální podmínky a možnosti kultivace daných kultur v různých minerálních médiích. Bylo otestováno použití laktátu sodného a také změna výchozího pH na 8. Motivací těchto pokusů byla snaha o dosažení vyššího pH na konci

kultivace, než jaké bylo dosaženo za podmínek prvních testů degradace TCE; pH okolo 6,8 by nemuselo být zejména pro kulturu P4 úplně optimální.

Tabulka 22 pH experimentálních médií před sterilizací

MM:	7,47
MM8:	8,03
MMD:	7,45

Tabulka 25 pH experimentálních médií po sterilizaci a s přidavkem MEM vitaminů

MM:	7,41
MM8:	7,63
MMD:	7,57

Tabulka 26 Růst kultur po 3 dnech

Médium + substrát mg/l	Kultura P4	Kultura P9
MM + FE 200	++	++ vločky i zákal
MM + LAN 200	++	++ vločky a čirá kapalina
MM + FE+LAN 2x 100	++	++ vločky i slabší zákal
MM8 + FE 200	+ a ++	++ vločky a čirá kapalina
MM8 + FE+LAN 2x 100	+ a ++	++ vločky a čirá kapalina
MMD + FE 200	++	++ vločky i zákal
MMD + FE+LAN 2x 100	++	++ vločky a čirá kapalina

Tabulka 27 Růst kultur po 7 dnech

Médium + substrát mg/l	Kultura P4	Kultura P9
MM + FE 200	+++	+++ vločky i zákal
MM + LAN 200	+++ trochu vloček	+++ vločky a čirá kapalina
MM + FE+LAN 2x 100	+++ trochu vloček	+++ vločky a čirá kapalina
MM8 + FE 200	+++ méně vloček	+++ vločky a čirá kapalina
MM8 + FE+LAN 2x 100	+++ trochu vloček	+++ vločky a čirá kapalina
MMD + FE 200	+++	+++ vločky i slabý zákal
MMD + FE+LAN 2x 100	+++ trochu vloček	+++ vločky a čirá kapalina

Tabulka 28 Konečné pH po 7 dnech růstu

Médium + substrát mg/l	Kultura P4	Kultura P9
MM + FE 200	7,04 + 7,05	7,04 + 7,18
MM + LAN 200	7,29 + 7,24	7,28 + 7,52
MM + FE+LAN 2x 100	7,43 + 7,03	7,34 + 7,09
MM8 + FE 200	7,17 + 7,17	6,90 + 6,80
MM8 + FE+LAN 2x 100	7,84 + 7,41	7,12 + 7,16
MMD + FE 200	7,14 + 7,40	6,99 + 7,56
MMD + FE+LAN 2x 100	7,87 + 7,70	7,75 + 7,31

Tabulky 11, 12 a 13 ukazují výsledky kultivace s různými MM a různými kombinacemi fenoxylethanolu a laktátu. Ve výsledku je možno konstatovat, že obě kultury využily laktát sodný jako zdroj energie a uhlíku a tato skutečnost vedla ke vyššímu konečnému pH, než jak tomu bylo u růstu na samotném fenoxylethanolu.

Použití média s vyšší výchozí hodnotou pH (MM8) a média s dusičnanem jako zdrojem dusíku (MMD) mělo mírný pozitivní efekt, a však pouze na kulturu P4. Použití kombinace FE + LAN vedlo k vyššímu pH u všech MM.

8.5 Extrakce metabolitů

pH MM bylo 7,45

Roztoky s extrahovanými metabolity byly předány k vyhodnocení na ústavu chemie pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektroskopie. Práce vedla k získání zkušeností v oblasti získávání a extrakce bakteriálních metabolitů. Metoda rozdělení fází pomocí rozpuštění soli se ukázala být velmi efektivní a rychlá.

8.6 Kometabolická degradace TCE kulturou P4

Pro další pokusy degradací TCE byla vybrána kultura, která v prvotním testu prokázala schopnost rozkladu veškerého použitého TCE (viz Tab. 22). Pro kometabolickou degradaci bylo na základě předchozího testu použito minerální médium se vstupní hodnotou pH 8 a kombinace substrátů laktát + fenoxylethanolu (každý 100 mg/l). Výsledky stanovení koncentrací TCE po 2 týdnech kultivace jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 29 Hodnocení kontroly po 7 dnech

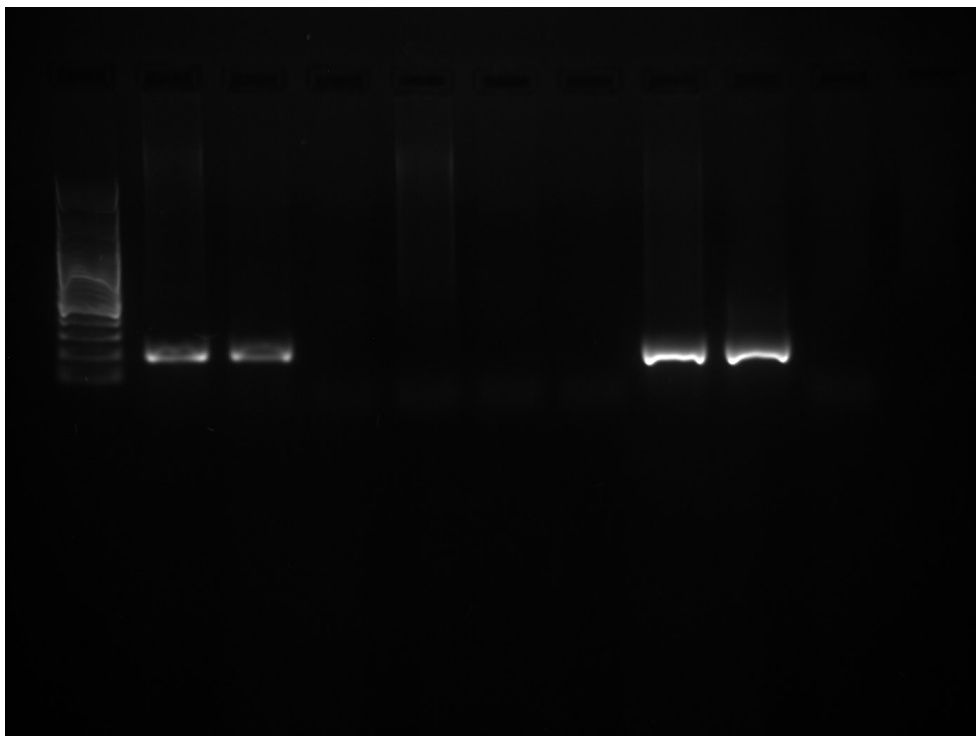
	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$)	Průměr TCE ($\mu\text{g/l}$)
blank 30	1218,2	1207,7
blank 30	1197,2	
blank 40	1522,2	1542,0
blank 40	1561,9	
pokus 30	12,0	0
pokus 30	12,0	
pokus 30	12,0	
pokus 40	12,0	0
pokus 40	12,0	

Experiment ukázal a potvrdil možnost kometabolické degradace TCE kulturou P4, a to i při vyšších koncentracích TCE.

8.7 Stanovení pravděpodobného genu kódujícího enzym štěpící fenoxxyethanol

8.7.1 Výsledky elektroforézy

Z obou kultur, P4 i P9, byla izolována DNA a tato byla podrobena PCR reakcím se třemi sadami primerů. Po provedení elektroforéza potvrdila úspěšné získání PCR produktu u dvou testovaných sad primerů, a to primerů PHE [34] a mPH [36].



Obrázek 13 Výsledky elektroforézy

Na fotografii je vidět (zleva) nejdříve marker udávající velikost produktu. Následně pak produkt PCR pro primery PHE jednak pro P4 a pro P9. Dále pak je volné místo, kde by byl PCR produkt primerů NVC, ale zde žádný PCR produkt nevzniknul. Vpravo jsou PCR produkty pro mPH pro P4 a P9. Produkty, které se ukázaly na fotografii, byly přečištěny a poslány na sekvenaci.

Po obdržení výsledků ze sekvenace byly v daných sekvencích (příloha P1) ručně upraveny dle sekvenačního záznamu některé pozice. Po opravě byly sekvence importovány do online nástroje BLAST. Zde byly porovnány získané sekvence se sekvencemi v databázi. Výsledky byly následující.

8.8 Vzorek P4, primer PHE, forward primer

PO vložení sekvence do systému se ukázalo několik možností s podobnou procentuální shodou. S 97,55% shodou se ukázal být záznam „Uncultured bacterium partial LmPH gene for phenol hydroxylase large subunit, clone WGND7“.

Uncultured bacterium partial LmPH gene for phenol hydroxylase large subunit, clone WGND7

Sequence ID: [LT604168.1](#) Length: 621 Number of Matches: 1

Range 1: 410 to 572 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previo

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
278 bits(150)	2e-70	159/163(98%)	1/163(0%)	Plus/Minus
Query 9		CGTTGT-CGGGTCCTGCTCCAGCAGGAACCTTGATGCACTCGATGCC		
Sbjct 572		CGTTGTCCGGGTCCTGCTCCAGCAGGAACCTTGATGCACTCGATGCC		
Query 68		GGCTCTCGTCGCTCTGCGCCGAGAAGCCGAAGGTCACGGTGGACATC		
Sbjct 512		GGCTCTCGTCGCTCTGCGCCGAGAAGCCGAAGGTCACGGTGGACATC		
Query 128		CCGCGCCGCTCATGAAGGGCAGCAACAACAGATTAGTCAGCAC 1:		
Sbjct 452		CCGCGCCGCTCATGAAGGGCAGCAACAGCAGTTGGTCAGCAC 4:		

Obrázek 14 Výstřižek vyhodnocení ze systému BLAST (1)

Jedná se tedy o část genu kódujícího velkou podjednotku fenol hydroxylázy. V porovnání sekvence kultury P4 (Query) se srovnávanou sekvencí (Sbjct) je vidět na jednom místě absence báze (7. pozice od začátku) a ke konci na třech místech záměna bází.

Tento odkaz však nebyl jediný, se stejnou shodou byl nabídnut i nepojmenovaný plazmid kultury *Achromobacter pestifer*, ale i většina dalších nalezených shod odkazovala na podjednotku fenol hydroxylázy u dalších bakterií.

8.8.1 VZOREK P4, PRIMER PHE, reverse primer

Vzorek reverzního primeru měl v podstatě identické výsledky jako u přechozího případu.

8.8.2 VZOREK P9 PRIMER PHE, forward primer

Zde opět dostáváme podobné výsledky odkazující se na velkou podjednotku fenol hydroxylázy.

Marinobacter sp. LmPH gene for multicomponent phenol hydroxylase large subunit, partial cds, strain: KU17F4

Sequence ID: [AB985593.1](#) Length: 551 Number of Matches: 1

Range 1: 359 to 500 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
207 bits(112)	2e-49	132/142(93%)	0/142(0%)	Plus/Minus
Query 27	AGGATGAACTTGATCACCTCCAGCCCCAGCGTCATGTGACGCGCCTC			
Sbjct 500	AGGATGAACTTGATCACTTCCAGGCCAGGGTCATGTGACGGGCCTC			
Query 87	GAGAAGCCGAAGGTCACGGTGGCCATGTCGCCGTTGTAGCGGCACG			
Sbjct 440	GAGAACC CGAAGGTCACGGTGGCCATGTCGCCGTTGTAGCGGC GCGC			
Query 147	ACGAACAACAGATTGGTCAGCA 168			
Sbjct 380	ACGAACAACAGTTGGTCAGCA 359			

Obrázek 15 Výstřížek vyhodnocení ze systému BLAST (2)

Tentokrát byla zjištěna menší shoda genomu s příslušnými úseky u druhů jako je *Marinobacter* sp. (obr. 9) nebo význačného druhu *Pseudomonas putida*. Je tedy patrné, že zkoumaná část genu kultury P9 se odlišuje od genů jiných kultur významně více než je tomu v případě kultury P4.

Pseudomonas putida strain TX2 multicomponent phenol hydroxylase largest subunit (mph) gene, partial cds

Sequence ID: [HM192774.1](#) Length: 231 Number of Matches: 1

Range 1: 18 to 166 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
215 bits(116)	1e-51	138/149(93%)	0/149(0%)	Plus/Minus
Query 20	CTGCTCGAGGATGAACTTGATCACCTCCAGCCCCAGCGTCATGTGAC			
Sbjct 166	CTGCTCCAGCAGGAACCTTGATCACTTCCAGGCCAGGGTCATGTGCC			
Query 80	CTGGGCCGAGAAGCCGAAGGTCACGGTGGCCATGTCGCCGTTGTAGC			
Sbjct 106	CTGCGCCGAGAAGCCGAAGGTGACGGTGGCCATGTCGCCGTTGTAGC			
Query 140	GAAGGGCACGAACAACAGATTGGTCAGCA 168			
Sbjct 46	GAAGGGTACGAACAACAGTTGGTCAGCA 18			

Obrázek 16 Výstřížek vyhodnocení ze systému BLAST (3)

8.8.3 VZOREK P9 PRIMER PHE, reverse primer

Zde byl výsledek v podstatě totožný s předchozím.

Následující výsledky jsou pro primery mPH.

8.8.4 VZOREK P4 PRIMER mPH, forward primer

Výsledek stejný jako u Vzorek P4 primer PHE forward primer.

8.8.5 VZOREK P4 PRIMER mPH, reverse primer

Stejné výsledky jsou výše zmíněné u 7.7.6.

8.8.6 VZOREK P9 PRIMER mPH, forward primer

Pro kulturu P9 byla nalezena podobnost 91,94 % s částí genu kultury *Acinetobacter* sp. kódujícího opět tvorbu velké podjednotky fenol hydroxylázy. Takováto shoda však není příliš vysoká.

Acinetobacter sp. WX-19 phenol hydroxylase gene, partial cds

Sequence ID: [JF730215.1](#) Length: 684 Number of Matches: 1

Range 1: 499 to 684 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previ](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
257 bits(139)	3e-64	171/186(92%)	4/186(2%)	Plus/Plus
Query 4	GTTTCGTG-C-TTCATGTCCGGTGGC-CCTAC-ACGGCGACATGGCC			
Sbjct 499	GTTTCGTGCCGTTTCATGTCCGGTGGCGCCTACAACGGCGACATGGCC			
Query 60	CTTCTCGGCCAGTCCGACGAGGCGCGTCACATGACCCTGGGGCTG			
Sbjct 559	CTTCTCGGCCAGTCCGACGAGGCGCGGCACATGACCCTGGGCCTT			
Query 120	CATGCTCGAGCAGGACCCGGACAACCTGCCCATCGTGCAGAATTGG			
Sbjct 619	CATGCTCGAGCAGGACCCGGACAACCTGCCCATCGTGCAGGCCTGG			
Query 180	CTGGCG 185			
Sbjct 679	CTGGCG 684			

Obrázek 17 Výstřižek vyhodnocení ze systému BLAST (4)

8.8.7 VZOREK P9 PRIMER mPH, reverse primer

Výsledky v podstatě stejné jako u přechozího.

Výsledky sekvenace a srovnání sekvencí se záznamy v databázi GenBank všechny ukazují na určitou podobnost získaných sekvencí s částí genů pro velkou podjednotku fenol hydroxylázy. Nejde však nikdy o 100 % shodu. Tyto výsledky tak lze interpretovat dvojným možným způsobem. Buď mají kultury modifikovaný gen pro fenol hydroxylázu a díky tomu nejsou schopny využívat fenol, ale získaly schopnost využívat fenoxylethanol, nebo získané sekvence jen ukazují na nefunkční gen získaných kultur pro fenol hydroxylázu, ale pro rozklad fenoxylethanolu mají obě kultury geny jiné. V případě, že nalezené sekvence skutečně ukazují části genů kódujících prvotní oxygenaci fenoxylethanolu, je málo pravděpodobné, že by se kultury na 2FE cíleně adaptovaly, jde spíše o náhodné mutace mezi miliony dalších, kde právě tyto mutace pozměnily příslušnou část jejich genů pro fenol hydroxylázu tak, že tyto enzymy získaly schopnost oxygenovat fenoxylethanol. Experiment tak zahájil osvětlení podstaty biodegradace fenoxylethanolu, na této tématice však bude muset být dále pracováno.

ZÁVĚR

Hlavním cílem práce bylo přinést nové poznatky o kulturách *Zoogloea resiniphila* P9 a *Hydrogenophaga pseudoflava* P4. Kultury byly podrobeny dalším růstovým testům nejen na 2-fenoxyetanolu (2FE) a dalších substrátech, ale také testů degradace trichlorethylenu (TCE). Byla zkoumána schopnost rozkladu této látky pomocí kometabolické degradace. Provedené pokusy přinesly velmi pozitivní výsledky. *Zoogloea resiniphila* P4 dokázala rozložit až 97,1 % TCE a *Hydrogenophaga pseudoflava* P9 byla schopna degradovat až 100 % TCE při jeho vstupních koncentracích 1,2 – 1,5 mg/l. Dalším zásadním testem byl růst kultur při snížených teplotách (13 °C a 8 °C). Tento test ukázal, že *H. pseudoflava* není schopna růstu při takto nízkých teplotách, za to *Z. resiniphila* rostla i při 13 °C. Tyto dva testy ukázaly, že by bylo možné využití kultur v praxi. Jednalo by se o remediace podzemních vod kontaminovaných TCE. Obě kultury jsou schopné rozkládat TCE a P9 efektivně roste i při teplotách, jaké panují ve spodních vodách. Výhody takovéto metody jsou hned dvě, a to rychlost rozkladu v rámci jednoho až dvou týdnů, a také to, že 2FE je látka, která má nízkou toxicitu a je lépe rozpustná ve vodě, než jiné dnes používané alternativy jako jsou methan či toluen.

Dalším důležitým cílem bylo prozkoumat metabolickou dráhu. Byl proveden test růstu na fenolu, aby se zjistilo, zdali je prvotním krokem v biodegradaci 2FE štěpení etherové vazby. To bylo u obou kultur překvapivě vyvráceno, jelikož k rozkladu fenolu kulturami nedošlo. Za cílem objasnit metabolickou dráhu byla provedena extrakce metabolitů pomocí acetonitrilu a produkty této extrakce byly předány k analýze na plynové chromatografii a hmotnostní spektroskopii. Dalším cílem bylo také pokusit se zjistit, jaký enzym je zodpovědný za primární rozklad 2FE a degradaci TCE. Byly objednány tři sady primerů pro různé typy fenol-hydroxyláz, neboť se předpokládalo, že kultury mají příslušnou oxygenázu odvozenou od tohoto enzymu. Byly provedeny PCR a jednotlivé produkty byly zkontrolovány pomocí elektroforézy. Pozitivní se ukázaly být dvě sady primerů ze tří, a to u obou kultur. PCR produkty byly odeslány k sekvenaci. Výsledné sekvence byly vyhodnoceny systémem BLAST a výsledky ukázaly na přítomnost velké podjednotky fenol hydroxylázy. Shoda však nikdy nebyla stoprocentní, příslušná část genu zkoumaných kultur je tedy jistým způsobem pozměněná. Tyto výsledky mohou vést k několika závěrům. Daný enzym je buď v jisté pozměněné formě zodpovědný za rozklad 2FE anebo také je možné, že jde pouze o to, že gen je nefunkční a primární biodegradace 2FE probíhá jiným způsobem. Pokud by biodegradace probíhala skrze použití modifikované fenol hydroxylázy, je možno

předpokládat, že jedním z prvních metabolitů rozkladu bude určitý derivát katecholu. Tématika vlastností zkoumaných kultur vyžaduje další práci. Zejména pak otestovat, zda je fenol hydroxyláza doopravdy zodpovědná za rozklad 2FE, a to pomocí genetické úpravy za účelem zablokování tohoto enzymu a kultivaci na 2FE. Je také potřeba další práce k odhalení metabolitů rozkladu 2FE pomocí extrakčních metod. Práce přinesla výsledky, které vnesly do problematiky velké množství nových poznatků, ale také přinesly nové otázky, na které se mohou soustředit nové studie.

SEZNAM POUŽITÉ LIFETERATURY

- 1) AULING, G., et al. *Pseudomonas pseudoflava*, a new species of hydrogen-oxidizing bacteria: Its differentiation from *Pseudomonas flava* and other yellow-pigmented, gram-negative, hydrogen-oxidizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1978, 28.1: 82-95.
- 2) MOHN, William W., et al. Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. *Systematic and applied microbiology*, 1999, 22.1: 68-78.
- 3) DOLINOVÁ, Iva, et al. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24.15: 13262-13283.
- 4) AN, Weixing, et al. Comparative genomics analyses on EPS biosynthesis genes required for floc formation of *Zoogloea resiniphila* and other activated sludge bacteria. *Water Research*, 2016, 102: 494-504.
- 5) DRÉNO, B., et al. Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2019, 33: 15-24. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jdv.15944>
- 6) PANICO, A., et al. Skin safety and health prevention: an overview of chemicals in cosmetic products. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 2019, 60.1: E50.7)
- 7) TAMURA, I., et al. Biodegradation and photodegradation of selected antimicrobial/antifungal agents in the environment and their sorption onto sediments. *J. Environ. Chem*, 2012, 22: 113-119.
- 8) HEWER, C. L. Trichlorethylene. *Anaesthesia*, 1975, 30.4: 483-487.
- 9) ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- 10) MÜLLER, G, et al. Metabolism of trichloroethylene in man. *Archives of Toxicology*, 1975, 33.3: 173-189.
- 11) KILBUM, Kaye H Effects on neurobehavioral performance of chronic exposure to chemically contaminated well water. *Toxicology and Industrial Health*, 1993, 9.3: 391-404.
- 12) MANSON, J. M., et al. Effects of oral exposure to trichloroethylene on female reproductive function. *Toxicology*, 1984, 32.3: 229-242

- 13) FLANAGAN, R. J., et al. An introduction to the clinical toxicology of volatile substances. *Drug Safety*, 1990, 5.5: 359-383.
- 14) TOFTGÅRD, Rune; et al. Biotransformation of organic solvents: a review. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 1980, 1-18.
- 15) BASELT, Randall Clint; et al. *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. Davis, CA: Biomedical publications, 1982.
- 16) GREEN, T et al. Species differences in response to trichloroethylene: II. Biotransformation in rats and mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 1985, 79.3: 401-411.
- 17) SEAGE, A. J et al. Pulmonary oedema following exposure to trichloroethylene. 1971.
- 18) WALDER, B. K. Do solvents cause scleroderma?. *International Journal of Dermatology*, 1983, 22.3: 157-158.
- 19) WODKA, Richard M.; et al. Myocardial injury following the intentional inhalation of typewriter correction fluid. *Military medicine*, 1991, 156.4: 204-205.
- 20) KILBURN, Kaye H.; et al. Prevalence of symptoms of systemic lupus erythematosus (SLE) and of fluorescent antinuclear antibodies associated with chronic exposure to trichloroethylene and other chemicals in well water. *Environmental Research*, 1992, 57.1: 1-9.
- 21) BYERS, V. S., et al. Association between clinical symptoms and lymphocyte abnormalities in a population with chronic domestic exposure to industrial solvent-contaminated domestic water supply and a high incidence of leukaemia. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 1988, 27.1: 77-81.
- 22) TSE, Susanna YH, et al. Chlorinated aliphatic hydrocarbons promote lipid peroxidation in vascular cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 1990, 31.3: 217-226.
- 23) MORREALE, S. A. A case of acute trichloroethylene poisoning with myocardial infarction. *Med. Lav*, 1976, 67: 176-182.
- 24) BROGREN, C.-H.; et al. Occupational exposure to chlorinated organic solvents and its effect on the renal excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. In: *Toxic Interfaces of Neurones, Smoke and Genes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1986. p. 460-464.

- 25) NAGAYA, Teruo; et al. Urinary total protein and β -2-microglobulin in workers exposed to trichloroethylene. *Environmental research*, 1989, 50.1: 86-92.
- 26) LAGAKOS, Steven W.; et al., Marvin. An analysis of contaminated well water and health effects in Woburn, Massachusetts. *Journal of the American Statistical Association*, 1986, 81.395: 583-596.
- 27) DAVIDSON, Ivan WF; et al.. Consideration of the target organ toxicity of trichloroethylene in terms of metabolite toxicity and pharmacokinetics. *Drug metabolism reviews*, 1991, 23.5-6: 493-599.
- 28) JACKSON, D. E.; HERZBERG, Mortimer. A Study of Analgesia and Anesthesia, with Special Reference to Such Substances as Trichlorethylene and Vinesthene (Divinyl Ether), Together with Apparatus For Their Administration. *Anesthesia & Analgesia*, 1934, 13.5: 198-204.
- 29) HEWER, C. Langton. Further observations on trichlorethylene. 1943.
- 30) HUMPHREY, J. H.; et al. Margaret. Cranial-nerve palsies with herpes following general anaesthesia. *British Medical Journal*, 1944, 1.4339: 315
- 31) GRANDJEAN, E., et al. Investigations into the effects of exposure to trichlorethylene in mechanical engineering. *British journal of industrial medicine*, 1955, 12.2: 131.
- 32) Trichloroethylene: Scientific properties. *ECHA* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/brief-profile/-/briefprofile/100.001.062>
- 33) 2-phenoxyethanol: Scientific properties. *ECHA* [online]. [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/brief-profile/-/briefprofile/100.004.173>
- 34) BALDWIN, Brett R.; et al. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69.6: 3350-3358.
- 35) COLEMAN, Nicholas V.; et al. Soluble di-iron monooxygenase gene diversity in soils, sediments and ethene enrichments. *Environmental Microbiology*, 2006, 8.7: 1228-1239.
- 36) TUAN, Nguyen Ngoc, et al. Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresource technology*, 2011, 102.5: 4232-4240.

- 37) NEUJAHN, Halina Y.; et al., Phenol hydroxylase from yeast: purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *European journal of biochemistry*, 1973, 35.2: 386-400.
- 38) GURUJEYALAKSHMI, G.; et al. Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Applied and environmental microbiology*, 1989, 55.2: 500-502.
- 39) TUAN, Nguyen Ngoc, et al. Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresource technology*, 2011, 102.5: 4232-4240.
- 40) ARAGNO, M., et al. Micromorphology of Gram-negative hydrogen bacteria. *Archives of Microbiology*, 1977, 114.2: 93-100.
- 41) AULING, G., et al. *Pseudomonas pseudoflava*, a new species of hydrogen-oxidizing bacteria: Its differentiation from *Pseudomonas flava* and other yellow-pigmented, gram-negative, hydrogen-oxidizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1978, 28.1: 82-95.
- 42) ARAGNO, M.; et al.. Mesophilic Hydrogen-oxidizing (Knallgas) Bacteria. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. 1992.
- 43) GERSTENBERG, Christine; et al. Physical evidence for plasmids in autotrophic, especially hydrogen-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology*, 1982, 133.2: 90-96.
- 44) JENNI, Bernard; et al. Nitrogen fixation by new strains of *Pseudomonas pseudoflava* and related bacteria. *Microbiology*, 1989, 135.2: 461-467.
- 45) LEE, Chi Mei; et al.. Physiological characterization of *Pseudomonas pseudoflava* GA3. *Current Microbiology*, 1981, 5.6: 333-337.
- 46) NEDWELL, et al.. Influence of temperature on growth rate and competition between two psychrotolerant Antarctic bacteria: low temperature diminishes affinity for substrate uptake. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60.6: 1984-1992
- 47) CHANWAY, C. P.; et al. First year field performance of spruce seedlings inoculated with plant growth promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1993, 39.11: 1084-1088.

- 48) WILLEMS, Anne; et al. Hydrogenophaga. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2015, 1-15
- 49) AN, Weixing, et al. Comparative genomics analyses on EPS biosynthesis genes required for floc formation of *Zoogloea resiniphila* and other activated sludge bacteria. *Water Research*, 2016, 102: 494-504.
- 50) UNZ, Richard F.; et al. Use of aromatic compounds for growth and isolation of *Zoogloea*. *Applied Microbiology*, 1972, 23.3: 524-530.
- 51) MOHN, William W., et al. Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. *Systematic and applied microbiology*, 1999, 22.1: 68-78.
- 52) LEVEAU, Johan HJ; et al. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71.5: 2365-2371
- 53) HARWOOD, Caroline S.; et al. The β -keto adipate pathway and the biology of self-identity. *Annual review of microbiology*, 1996, 50.1: 553-590.
- 54) FUKUI, Tetsuya, et al. Enzymatic synthesis of poly- β -hydroxybutyrate in *Zoogloea ramigera*. *Archives of Microbiology*, 1976, 110.2: 149-156.
- 55) KUČABOVÁ, Veronika. Využití moderních metod při sledování diverzity mikroflóry u fermentovaného masného výrobku. 2019.
- 56) ARP, Daniel J.; et al.. Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation*, 2001, 12.2: 81-103.
- 57) SEMPRINI, Lewis. Strategies for the aerobic co-metabolism of chlorinated solvents. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8.3: 296-308.
- 58) FRITSCHÉ, Wolfgang; et al. Aerobic Degradation by Microorganisms: Biotechnology. HJ Rehm, and G. Reed, 2008, 145-155.
- 59) VANNELLI, G. B., et al. Insulin-like growth factor-I receptors in nonfunctioning thyroid nodules. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1990, 71.5: 1175-1182.
- 60) ATASHGAHI, Siavash, et al. Microbial synthesis and transformation of inorganic and organic chlorine compounds. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 3079.

61) SUTTINUN, Oramas, et al. Cometabolism of trichloroethylene: concepts, limitations and available strategies for sustained biodegradation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2013, 12.1: 99-114.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2FE	2-fenoxyethanol
TCE	trichlorethilen
P9	<i>Zoogloea resiniphila</i>
P4	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>
PHE	Primery pro fenol monooxygenázu
NVC	Primery pro Solubilní di-iron monooxygenázu
mPH	Primery pro Multikomponentní fenol hydroxylázu (α -subunit)
MM	tekuté minerální médium
ECHA	Evropská agentura pro chemické látky
FAD	Flavinadenindinukleotid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
PCR	Polymerázová řetězová reakce

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 2 Vývoj poklesu DOC během 10 dní

Obrázek 2 Růst kultury P9

Obrázek 3 Růst kultury P4

Obrázek 4 Průběh růstu kultury P4 při různých pH

Obrázek 4 Průběh růstu kultury P4 při různých pH

Obrázek 6 Příklad kometabolické dráhy TCE s toluenem [58]

Obrázek 7 trichloroethylen

Obrázek 8 2-fenoxyethanol

Obrázek 9 Metabolická dráha rozkladu alkylfenolů

Obrázek 10 Kalibrační křivka pro vyhodnocení měření TCE

Obrázek 11 Vločka kultury P9

Obrázek 12 Vločka kultury P9 detail

Obrázek 13 Výsledky elektroforézy

Obrázek 14 Výstřižek vyhodnocení ze systému BLAST (1)

Obrázek 15 Výstřižek vyhodnocení ze systému BLAST (2)

Obrázek 16 Výstřižek vyhodnocení ze systému BLAST (3)

Obrázek 17 Výstřižek vyhodnocení ze systému BLAST (4)

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Fyzikálně chemické vlastnosti TCE

Tabulka 2 Toxikologické parametry TCE [32]

Tabulka 3 Fyzikálně chemické vlastnosti 2FE

Tabulka 4 Složky základního minerálního média

Tabulka 5 Dávkování složek pro kometabolickou degradaci

Tabulka 6 Složení 200 ml minerálního média o pH 8 (MM8):

Tabulka 7 Složení 200 ml minerálního média s dusičnanem draselným (MMD):

Tabulka 8 Rozdělení experimentálních médií

Tabulka 9 Dávkování složek pro různé druhy minerálních médií

Tabulka 10 Dávkování složek pro kometabolickou degradaci kulturou P4

Tabulka 11 Dávkování TCE pro kometabolickou degradaci kulturou P4

Tabulka 12 Čistota koncentrace izolovaného DNA

Tabulka 13 Primery

Tabulka 14 Složení PCR směsi

Tabulka 15 Nastavení termocykleru pro PHE [34]

Tabulka 16 Nastavení termocykleru pro NCV [35]

Tabulka 17 Nastavení termocykleru pro mPH [36]

Tabulka 18 Růst na fenolu

Tabulka 19 Růst na ethanolu

Tabulka 20 Legenda tabulky 19

Tabulka 21 Data pro kalibrační křivku (obrázek 8)

Tabulka 21 Koncentrace TCE připravených vzorcích blanků i kultur rostoucích na fenoxyethanolu

Tabulka 22 pH experimentálních médií před sterilizací

Tabulka 23 Růst kultur na fenoxyethanolu při snížených teplotách (1)

Tabulka 24 Růst při snížených teplotách (2)

Tabulka 25 pH experimentálních médií po sterilizaci a s přidavkem MEM vitaminů

Tabulka 26 Výsledky kontroly po 3 dnech

Tabulka 27 Výsledky kontroly po 7 dnech

Tabulka 28 Hodnocení kontroly po 7 dnech (densilometr výsledky)

Tabulka 29 Hodnocení kontroly po 7 dnech

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P1 sekvence

PŘÍLOHA P I SEKVENCE**PHE****1) VZOREK P4 PRIMER PHE F**

GGAAGGGGCGTTGTCGGGTCCTGCTCCAGCAGGAACTTGATGCACTCGATGCC
CAGCGTCATGTGGCGGCTCTCGTCGCTCTGCGCCGAGAAGCCGAAGGTCACGG
TGGACATGTCGCCGTTGTGCGCCGCGCCGCTCATGAAGGGCACGAACAACAGA
TTAGTCAGCAC

2) VZOREK P4 PRIMER PHE R

GCGACGCGCGGGCGCCACGGCGACATGTCCACCGTGACCTTCGGCTTCTCGGCG
CAGAGCGACGAGAGCCGCCACATGACGCTGGGCATCGAGTGCATCAAGTTCCT
GCTGGAGCAGGACCCGGACAACGTGCCATCGTGCAGCGCTGGATCGACAAG
TGGTTCTGGCG

3) VZOREK P9 PRIMER PHE F

GCAAGGGCAGTGTCGGGTCCTGCTCGAGGATGAACTTGATCACCTCCAGCCCC
AGCGTCATGTGACGCGCCTCGTCGGACTGGGCCGAGAAGCCGAAGGTCACGGT
GGCCATGTCGCCGTTGTAGGCGGCACCCGGACATGAAGGGCACGAACAACAGA
TTGGTCAGCA

4) VZOREK P9 PRIMER PHE R

GCTGTCAAGCGCTACACGGCGACATGGCCACCGTGACCTTCGGCTTCTCGGCC
CAGTCCGACGAGGCGCGTACATGACGCTGGGGCTGGAGGTGATCAAGTTCAT
CCTCGAGCAGGACCCGGACAACCTGCCATCGTCCAGAATTGGATCGACAAGT
GGTTCTGGCG

mPH**5) VZOREK P4 PRIMER mPH F**

CTTCCTTCGTGCCTTCATGAGCGGCGCGGCACAAACGGCGACATGTCCACCG
TGACCTTCGGCTTCTCGGCGCAGAGCGACGAGAGCCGCCACATGACGCTGGGC
ATCGAGTGCATCAAGTTCCTGCTGGAGCAGGACCCGGACAACGTGCCATCGT
GCAGCGCTGGATCGACAAATGGTTCTGGCGCGGCTCGAGATCA

6) VZOREK P4 PRIMER mPH R

GGATAGCGGCTGCCGATGGGCACGTTGTCCGGGTCCTGCTCCAGCAGGAACTT
GATGCACTCGATGCCAGCGTCATGTGGCGGCTCTCGTCGCTCTGCGCCGAGA
AGCCGAAGGTCACGGTGGACATGTCGCCGTTGTGCGCCGCGCCGCTCATGAAG
GGCACGAACAGCAGGTTGGTCAACACATACTCGAATTCCGCGCA

7) VZOREK P9 PRIMER mPH F

AGCGTTCGTGCTTCATGTCCGGTGCCTACACGGCGACATGGCCGCCGTGAC
CTTCGGCTTCTCGGCCAGTCCGACGAGGCGCGTCACATGACCCTGGGGCTGG
AGGGGATCAAGTTCATGCTCGAGCAGGACCCGGACAACCTGCCATCGTGCAG
AATTGGATCGATAAATGGTTCTGGCGCGGCTCGAGATC

8) VZOREK P9 PRIMER mPH R

GGACTAGTGCTGCCGATGGGCAGGTTGTCCGGGTCCTGCTCGAGGATGAACTT
GATGACCTCCAGGCCAGGGTCATGTGACGCGCCTCGTCGGACTGGGCCGAGA
AGCCGAAGGTCACGGTGGCCATGTCGCCGTTGTAGGCGGCACCCGGACATGAAG
GGCACGAACAGCAGGTTGGTCAACACATACTCGAATTCCGCGCA

