

Degradace trichloroethenu gramnegativními bakteriemi při nízké teplotě

Bc. Klára Paroušková

Diplomová 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 DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Paroušková**
Osobní číslo: **T21502**
Studijní program: **N0712A030001 Environmentální inženýrství**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Degradace trichloroethenu gramnegativními bakteriemi při nízké teplotě**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši popisující bakteriální kometabolickou degradaci trichloroethenu.
2. Ověřte schopnost dříve získaných kultur gramnegativních bakterií rozkládat trichloroethen při 8°C.
3. Proveďte vícedenní testy degradace trichloroethenu vybranou kulturou.
4. Získané výsledky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v požadované formě v řádném termínu.

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

Seznam doporučené literatury:

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

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 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. 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 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 užit 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, 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 diplomovou 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 diplomová práce studovala schopnost kometabolického rozkladu trichloroethenu (TCE) za snížených teplot, a to kulturami získanými na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně, označenými jako 1A, 5A, 6A, 6B a 12A.

Trichloroethen je látka, kterou některé bakterie dokáží rozložit jen po indukci určitého enzymu, a to fenol 2-monooxygenázy, díky přítomnému fenolu, který slouží také uvedeným kulturám jako růstový substrát. Pokusy byly zaměřeny na zkoumání schopnosti jednotlivých bakterií rozkládat TCE při zvýšených koncentracích a postupně bylo zjištěno, že míra rozkladu TCE se u daných kultur mírně liší. Kultury 1A, 5A a 6B byly schopny zcela rozložit cca 2,5 mg TCE /l během třech týdnů inkubace při teplotách okolo 8°C, po růstu na fenolu o koncentraci 200 mg/l. Kultury 6A a 12A za stejných podmínek rozložily jen 83 – 87% TCE. Bylo tak prokázáno, že kultury jsou použitelné pro bioremediaci chladných podzemních vod kontaminovaných TCE.

Klíčová slova: biodegradace, fenol, indukce enzymu, kometabolismus, trichloroethen

ABSTRACT

This diploma thesis dealt with the ability of cometabolic degradation of trichloroethene (TCE) at low temperatures by strains obtained at the Institute of Environmental Protection Engineering FT UTB in Zlín, designated as 1A, 5A, 6A, 6B and 12A.

Trichloroethene is a toxic substance, which may be degraded by some bacteria, but only under a production of certain enzyme, namely phenol 2-monooxygenase. The enzyme is produced by phenol growing bacteria, thanks to the phenol present, which also serves the mentioned cultures as a growth substrate. The experiments were aimed at researching the ability of individual bacterial strains to degrade TCE during its increased concentrations under low temperature and it was found that the rate of TCE decomposition varies slightly between studied strains. The extent of TCE degradation was found to be slightly different among the given cultures. Strains 1A, 5A and 6B were able to degrade approximately 2,5 mg TCE/l in three weeks of incubation at 8 °C, after their growth on 200 mg/l phenol. Strains 6A and 12A degraded only 83–87% of TCE under the same conditions. Thus, it has been

shown that these bacterial strains are capable of bioremediation of cold groundwater contaminated by TCE.

Keywords: degradation, cometabolism, enzyme induction, phenol, trichloroethene

Mé poděkování patří v první řadě panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za profesionální vedení diplomové práce, za jeho ochotu a čas, cenné rady a trpělivost. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině za podporu po dobu celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KOMETABOLICKÉ BIOTRANSFORMACE	12
1.1 MECHANISMUS KOMETABOLISMU	14
1.2 KOMETABOLICKÉ BIOTRANSFORMACE OMP	14
1.2.1 Aerobní podmínky	16
1.2.2 Anoxické podmínky	16
1.2.3 Anaerobní podmínky	17
1.3 BIOTRANSFORMACE CHLOROVANÝCH SLOUČENIN.....	19
1.3.1 Kometabolická bakteriální degradace TCE	19
2 PŮVOD KULTUR POUŽITÝCH V DIPLOMOVÉ PRÁCI	22
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
3 METODIKA	25
3.1 POUŽITÉ ROZTOKY	25
3.1.1 Minerální médium (dále jen MM).....	25
3.1.2 Roztok stopových prvků	25
3.1.3 Fysiologický roztok.....	25
3.1.4 Chemikálie a živné médium.....	26
3.2 POUŽITÝ BIOLOGICKÝ MATERIÁL	26
3.3 POUŽITÉ MĚŘICÍ PŘÍSTROJE	26
3.3.1 Densilometr	26
3.3.2 Koncentrátor TEKMAR LSC 2000	27
3.3.3 Plynový chromatograf HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II.....	28
3.3.4 Integrátor HEWLETT PACKARD 3396 SERIES II.....	29
3.4 PŘÍPRAVA POKUSŮ	30
3.4.1 Degradace TCE při vstupní koncentraci 2,5 mg/l všemi kulturami – příprava vialek.....	30
3.4.2 Degradace TCE při zvýšené vstupní koncentraci kulturami 1A a 6B	30
3.4.3 Degradace TCE kulturami 1A a 6B vyrostlými na fenolu.....	31
3.4.4 Degradace TCE kulturou 1A vyrostlou na fenolu s tryptonem (2 pokusy)	31
3.5 KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO STANOVENÍ TCE.....	33
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	34
4.1 SCHOPNOST KULTUR 1A, 5A, 6B, 6A A 12A ROZKLÁDAT TCE PŘI VSTUPNÍ KONCENTRACI CCA 2,5 MG/L	34
4.2 SCHOPNOST KULTUR 1A A 6B ROZKLÁDAT TCE PŘI VSTUPNÍ KONCENTRACI CCA 3,5 MG/L.....	37

4.3	SCHOPNOST KULTURY 1A ROZKLÁDAT TCE PŘI VSTUPNÍ KONCENTRACI NAD 5 MG/L	40
4.4	SCHOPNOST KULTUR 1A A 6B INDUKOVANÝCH NA FENOLU ROZKLÁDAT TCE PŘI VSTUPNÍ KONCENTRACI CCA 3,5 MG/L	42
4.5	SCHOPNOST KULTURY 1A INDUKOVANÉ NA FENOLU A TRYPTONU ROZKLÁDAT TCE PŘI VSTUPNÍ KONCENTRACI CCA 3,5 MG/L	47
4.6	SCHOPNOST KULTURY 1A INDUKOVANÉ NA FENOLU A TRYPTONU ROZKLÁDAT TCE PŘI VSTUPNÍ KONCENTRACI NAD 5 MG/L	51
ZÁVĚR		55
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		57
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		59
SEZNAM OBRÁZKŮ		60
SEZNAM TABULEK		61

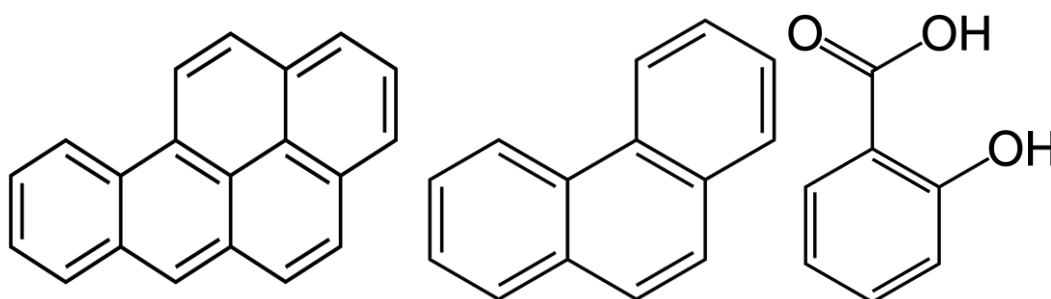
ÚVOD

Přibližně 88 % používané sladké vody v Evropě pochází ze zdrojů řek a podzemních vod. Podzemní vody jsou náchylné ke kontaminaci ze zdrojů, které nemohou ovlivnit povrchové vody, proto je důležité předcházet jejich kontaminaci. Do biosystémů se tyto látky dostávají jak z přírodních zdrojů, tak z antropogenních činností. Jelikož jejich toxický účinek byl objeven až později, spousta toxických látek díky tomu dodnes přetrvává v životním prostředí, protože dříve byly tyto látky neomezeně používány. K odstranění různých škodlivin se používají fyzikální, chemické a biologické metody, ale nejlepší možností stále zůstávají biologické metody, které jsou založeny na biologickém rozkladu, protože jsou velmi účinné a šetrné k životnímu prostředí. Trichloroethen sice není xenobiotikum, protože se přirozeně vyskytuje ve velmi malém množství v prostředí, jeho významné koncentrace ve vnějším prostředí jsou však výsledkem znečištění lidskou činností. Ze zkoušek na zvířatech byla prokázána jeho toxicita a je předpokládána i jeho karcinogenita i mutanogenita u člověka. Dále je nedílnou součástí při tvorbě přízemního ozonu. Kontaminací vod dochází k narušení rovnováhy ekosystému a také k otravě vodních živočichů. Nejzávažnějším dopadem jeho výskytu v podzemních vodách je však znehodnocení zdrojů pitných vod, neboť i v nízkých koncentracích představuje látku krajně nežádoucí. Přesto, že jeho používání bylo omezeno, neustále se vyskytuje v malých koncentracích v podzemních vodách. V 80. letech minulého století bylo předpokládáno, že se jedná o málo rozšířené reakce typu kometabolické biotransformace trichloroethenu. Schopnost bakterií rozkládat trichloroethen byla v dřívějších dobách popsána při teplotách okolo 25 °C. Dnes už víme, že rozklad trichloroethenu pomocí některých bakterií je možný i při teplotě cca 8 °C, která se vyskytuje v podzemních vodách.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOMETABOLICKÉ BIOTRANSFORMACE

Způsobů čištění životního prostředí je mnoho za použití fyzikálních, chemických a biologických metod. Ovšem použití biologických metod na bázi biologického rozkladu, tedy proces biodegradace, zůstává z hlediska efektivnosti a šetrnosti nejlepší možností. Biodegradace zahrnuje použití mikroorganismů, které mohou asimilovat znečišťující látky jako své růstové substráty, což vede následně k jejich odstranění. Bohužel mnoho znečišťujících látek, jako jsou vysokomolekulární plasty a polymery, některé alifatické i aromatické polychlorované polutanty, některé pesticidy či syntetická barviva nelze využít jako růstové substráty mikroorganismů, a z toho důvodu tyto látky nelze odstranit pomocí biodegradace. Jejich biodegradaci mohou provádět pouze některé mikroorganismy, které je budou degradovat jako nerůstové substráty. Jelikož takové substráty neposkytují zdroj energie a/nebo uhlíku (nebo je poskytují jen v nepatrných koncentracích), nejsou pro mikroorganismy výhodné a jejich biodegradace je výsledkem náhodné přeměny. Tento proces, známý jako kometabolismus, byl definovaný na počátku 80. let Daltonem a Stirlingem jako „transformace nerůstového substrátu v povinné přítomnosti růstového substrátu nebo jiné transformovatelné sloučeniny“. Důkazy dnes poukazují na širokou škálu mikroorganismů, schopných degradace různých chemických sloučenin nebo xenobiotik pomocí kometabolismu (Nzila, 2013). Příkladem je benzo[a]pyren, který může být biomineralizován na CO₂ bakterií *Pseudomonas saccharophila* v přítomnosti substrátu fenantrenu nebo salicylátu (Chen and Aitken, 1999). Dalším příkladem je *Sphingomonas paucimobilis* v přítomnosti glukózy nebo kvasičného extraktu (Ye et al., 1996) a *Stenotrophomonas maltophilia* v přítomnosti pyrenu (Juhász and Naidu, 2000).



Obrázek 1 Strukturní vzorec benzo[a]pyrenu (vlevo), fenantrenu (uprostřed) a kyseliny salicylové (vpravo)

(upraveno dle Fabiánová, 2010)

Zpočátku, po objevení kometabolických reakcí, se zdálo, že jde o nepočtené procesy. V letech po roce 2000 však byl tento termín používán stále častěji k popsání celé řady různých degradačních procesů. Nejlepší definicí tohoto pojmu je „mikrobiální degradace sloučeniny v přítomnosti jiné, důležité sloučeniny“. Proces kometabolické degradace spočívá v tom, že je přítomna pouze mikrobiální kultura, která je schopná rozložit danou látku v přítomnosti jiných sloučenin, a to substrátů, které mohou být v některých případech specifické, ale v jiných případech mohou být i nespecifické. Specifické substráty jsou vyžadovány v procesu, který se nazývá analogové obohacování – zde se ve stejnou dobu, na stejném místě nachází špatně rozložitelná sloučenina a specifický substrát, které jsou strukturně příbuzné, a kde specifický substrát má za úkol indukovat produkci některých, (nebo také všech enzymů), které jsou potřebné k degradaci oné špatně rozložitelné sloučeniny, která sama o sobě neumí působit jako induktor; a to pouze tehdy, pokud tyto enzymy jsou nespecifické vůči jiným přítomným látkám. Výsledkem je úplná nebo částečná mikrobiální degradace cílové látky. Příkladem je přidavek bifenyly podporujícího biodegradaci polychlorovaných bifenyly. Nespecifickou kometabolickou degradaci můžeme ve většině případů najít tehdy, pokud degradující organismy nemají zjevný prospěch z biodegradace odolné sloučeniny, jelikož nemohou využívat energii ani výsledný uhlík, na kterém by mohly růst. Tyto procesy někdy označujeme jako degradaci zdarma, nebo také náhodnou degradaci. Občas je uváděn nesprávný příklad biodegradačního procesu v souvislosti s tím, že mikroorganismy schopné degradace požadují pouze malé množství růstových faktorů (např. vitamín nebo aminokyselinu) (Kennes-Veiga et al., 2022).

Mikroorganismy schopné kometabolické biotransformace umí obvykle degradovat nerůstové substráty, po svém růstu na primárním substrátu, jako jediném zdroji energie a živin. Tento primární substrát je většinou přítomen ve vyšších koncentracích a jeho úkolem je poskytovat mikroorganismům elektrony pro respirační procesy i organický uhlík pro růst buněk a udržovat tak mikrobiální populaci v určité hustotě. Primární substrát však kromě toho navozuje (indukuje) produkci enzymů a případně i kofaktorů, které pak katalyzují následnou biotransformaci určitého organického polutantu či mikropolutantu (OMP), a to díky své vícestranné katalytické aktivitě. Protože enzymové systémy bakterií mají většinou výrazně vyšší afinitu ke svým primárním substrátům (které jsou jejich přirozenými zdroji uhlíku a energie) než k substrátům nerůstovým, za přítomnosti primárních substrátů probíhá kometabolická degradace polutantů jen velmi malou rychlostí či vůbec a výraznější rozklad

nerůstových polutantů tak nastává až po spotřebování primárních substrátů a bývá časově omezen (Kennes-Veiga et al., 2022).

1.1 Mechanismus kometabolismu

Častými katalyzátory kometabolických reakcí jsou mikrobiální enzymy označované jako oxygenázy, např. methan-mono-oxygenáza, toluen-mono-oxygenáza a dioxygenáza, amonium mono-oxygenáza, bifenyloxygenáza a řada dalších (Furukawa, 2000; Gibson and Parales, 2000; Hazen, 2010). Bylo prokázáno, že i některé houby obsahují dva typy enzymů s širokým spektrem specifčnosti – lakkázy a v menší míře i mangan-peroxidázy, u nichž však rozklad TCE nebyl doposud prokázán. Za přirozených podmínek bakteriální oxygenázy katalyzují procesy přeměn aromatických či alifatických uhlovodíků na hydroxylované, dihydroxy-aromatické meziproducty nebo – u alifatických sloučenin - na alkoholy. Prvním krokem biodegradace mono a diaromatických sloučenin je tak většinou vznik katecholu, protokatechuátu nebo gentisátu, které jsou pak štěpeny a transformovány na jednoduché organické produkty, které mohou vstupovat do Krebsova cyklu (Nzila, 2013).

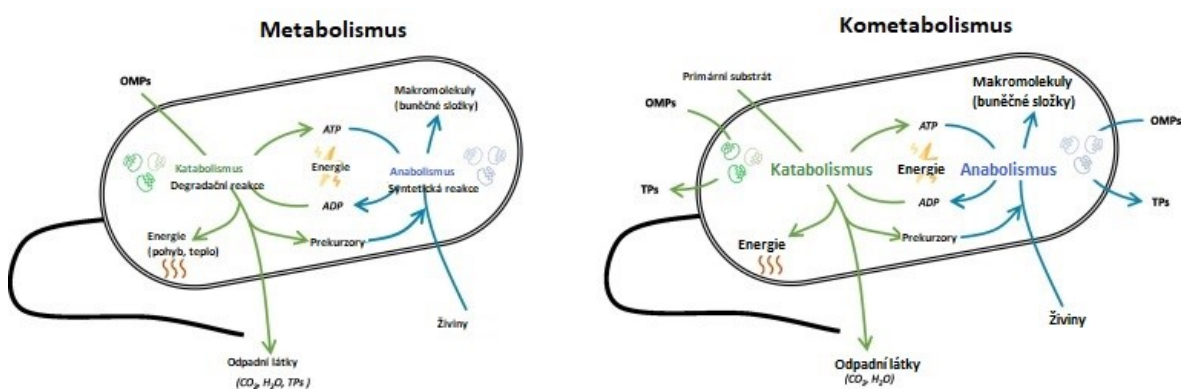
1.2 Kometabolické biotransformace OMP

Organické mikropolutanty pokrývají širokou škálu látek celosvětově produkovaných, včetně léčiv, hormonů, produktů osobní hygieny a průmyslových látek. Přestože jsou přítomny v nízkých koncentracích, řádově v ng až µg na litr či kg, mají potenciál škodit životnímu prostředí, díky jejich perzistenci, bioakumulaci a dále mohou podporovat toxicitu a mutagenitu a způsobovat poruchy hormonálního, nervového a reprodukčního systému. Biotransformace těchto stopových organických mikropolutantů (OMP) komplexními mikrobiálními komunitami v zařízeních na čištění odpadních vod je klíčovým procesem pro jejich detoxikaci a snížení dopadu na životní prostředí. Proto, pochopení mikrobiálních metabolických aktivit a mechanismů, které přispívají k biotransformaci OMP, je zásadní při vývoji postupů, jejichž cílem je minimalizovat jejich vypouštění do okolí. Bylo prokázáno předchozími studiemi, že řada organických mikropolutantů může být biotransformována metabolicky nebo právě kometabolicky, v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech a podmínkách prostředí. Při jejich rozlišování je důležité porozumět mechanismům, které zahrnují biotransformaci OMP, avšak je zcela taky možné, že tyto metabolické a kometabolické kroky mohou být vzájemně propojeny. V případě organických mikropolutantů je kometabolismus v současné době považován za jeden z hlavních biotransformačních mechanismů v reálných podmínkách prostředí. Je skutečností, že

kometabolický rozklad může vést k neúplné mineralizaci OMP, kdy OMP jsou biotransformovány jako vedlejší proces, čímž může docházet k přeměně na transformační produkty (TP), které mohou mít ještě větší negativní účinky na lidské zdraví a vodní ekosystémy než výchozí látky (Kennes-Veiga et al., 2022).

Obecně je zřejmé, že k biotransformaci organických látek dochází díky katabolickým enzymům. Poměr koncentrace počátečního růstového a nerůstového substrátu je při kometabolických rozkladech důležitý z hlediska vysokých hodnot, které mohou pomoci mikroorganismům odolávat toxicitě OMP a TP. Vyšší kometabolické biotransformační účinnosti pak může být dosaženo se zvýšenými rychlostmi odbourávání primárního substrátu. Kinetická účinnost nebo konstantní poměr specifčnosti růstových a nerůstových substrátů mikrobiální kultury je však také důležitá, jelikož může dojít ke kompetici o aktivní místo enzymu(ů), což vede k zábraně biotransformací OMP v důsledku vyšších koncentrací přítomných růstových substrátů (Kennes-Veiga et al., 2022).

Ačkoliv řada kometabolických přeměn probíhá díky oxygenázám jen za aerobních podmínek, byly taktéž prokázány doklady o kometabolismu za heterotrofních bezkyslíkatých podmínek; např. Polesel et al. (2017) je popsali pro několik léčiv v denitrifikačních reaktorech a pro více sloučenin dokonce i během anaerobní digesce; Alvarino et al. (2014) rovněž pozorovali lineární vztah mezi rychlostí biotransformace sulfamethoxazolu, trimethoprimu a naproxenu na methanogenní aktivitě v anaerobním kalovém reaktoru. Proto je vždy potřeba důkladné analýzy osudu a transformačních reakcí OMP v biologických jednotkách ČOV, a to zejména pro posouzení dopadů na životní prostředí (Men et al., 2017).



Obrázek 2 Znárodnění metabolické a kometabolické biotransformace OMP

(upraveno ze Kennes-Veiga et al., 2022)

Právě metabolické schopnosti a enzymatická síť mikroorganismů přítomná v ČOV určují jejich biotransformační potenciál. Kometabolická biotransformace se skládá ze široké sekvence dílčích reakcí, přičemž to má za následek spoustu různých strategií odstranění OMP, což může vést k obrovskému množství enzymatických aktivit, které se podílí na biotransformaci díky své vysoké metabolické všestrannosti (Kennes-Veiga et al., 2022).

1.2.1 Aerobní podmínky

Nejběžnějším biologickým čištěním v ČOV je systém aktivovaného kalu, ve kterém jsou autotrofní nitrifikátoři a heterotrofové. Přesto, že představují nejvýznamnější mikrobiální populace v tomto systému, jejich příspěvek k biotransformaci OMP je zatím nejasný, i když v posledních letech četné studie prokázaly klíčovou roli nitrifikačních enzymů během biotransformace. Příkladem je amonium-monooxygenáza (EC 1.14.99.39), která je považována za odpovědnou za biotransformaci několika sloučenin, často prostřednictvím inkorporace kyslíku do molekuly polutantu, vedoucí k hydroxylačním reakcím. Dále jde o oxidoreduktázy (EC 1.-), které jsou nejrozšířenějšími enzymy v biotransformaci OMP. Skutečnost je dále taková, že může docházet k biotransformaci určitých sloučenin v nitrifikačních reaktorech s aktivovaným kalem pomocí pomalu rostoucích heterotrofů. V tomto smyslu se má za to, že vysoké retenční časy (vysoká doba zdržení kalu) zlepšují biotransformaci OMP díky širší mikrobiální a funkční rozmanitosti a větší síti enzymatických aktivit produkovaných přítomností pomalu rostoucích mikroorganismů. Schopnost heterotrofních kultur transformovat OMP byla v minulosti prokázána jako významná, protože jejich biotransformační potenciál pochází z jejich schopnosti vytvářet obrovské množství různých enzymů, díky široké škále zdrojů uhlíku, které mohou asimilovat (Kennes-Veiga et al., 2022).

1.2.2 Anoxické podmínky

V anoxických prostředích bývá účinnost odstraňování OMP nižší než v aerobních podmínkách, možná díky vyššímu oxidačnímu potenciálu vzhledem k přítomnému kyslíku v již zmíněných aerobních podmínkách. Potenciál anoxických enzymů odstraňovat špatně rozložitelné látky je doposud pořád studován, přičemž je důležité vědět, jaké enzymy jsou exprimovány a dále je důležité znát schopnost těchto enzymů biotransformovat OMP. V nedávných studiích bylo předpokládáno, že nejen methan-monooxygenáza (EC 1.14.18.3), ale i methanoldehydrogenáza (EC 1.1.2.7) by se mohla podílet na odstraňování OMP. Dalším nedávným výzkumem se také potvrdilo, že střídání oxických a anoxických podmínek

během určitých období čištění odpadní vody může stimulovat vhodné enzymy a zvýšit tak odstranění OMP (Kennes-Veiga et al., 2022).

1.2.3 Anaerobní podmínky

Anaerobní digesce je prováděna širokou škálou symbiotických mikroorganismů, jejichž působení lze rozdělit do čtyř kroků, a to na hydrolýzu, acidogenezi, acetogenezi a methanogenezi. Dle předchozí studie fermentační bakterie, které provádějí acidogenezi, a zejména mikrobiální acetogeni a methanogeni jsou hlavními přispěvateli k anaerobní biotransformaci OMP, nezávisle na hlavní metabolické aktivitě a dominantních mikrobiálních populacích. Zdá se, že bakteriální hydrolytické populace zde hrají vedlejší roli, proto biotransformace většiny OMP není spojena s hlavní metabolickou aktivitou (hydrolýzou), ale s malými mikrobiálními skupinami přítomnými ve všech anaerobních prostředích. Bylo např. zjištěno, že enzym acetátkináza, který kometabolicky transformuje sloučeniny s karboxylovou nebo hydroxylovou skupinou a mírnou sterickou zábranou (tj. naproxen, nonylfenol, oktylfenol, ibuprofen, diklofenak a triclosan) je přítomen ve fermentačních bakteriích. Dále bylo prokázáno, že některé OMP mohou být biotransformované několika anaerobními mikroorganismy různými cestami, např. sulfamethoxazol, který může být biotransformován methanogeny, bakteriemi redukující sírany, mikroorganismy redukující železo nebo fermentujícími bakteriemi. Bylo tak prokázáno, že do anaerobní biotransformace OMP je zapojena většina tříd enzymů, tj. oxidoreduktázy (např. karbonylreduktázy), transferázy (např. kinázy, methyltransferázy a acetyltransferázy), hydrolázy (např. proteázy a amidázy), lyázy (např. dekarboxylázy) a ligázy (např. LCFA-CoA ligáza) (Kennes-Veiga et al., 2022).

Tabulka 1 Příklady enzymů, které se podílí na aerobní, anoxické a anaerobní kometabolické biotransformaci několika OMP (Kennes-Veiga et al., 2022)

Prostředí	OMP	Mechanismus	Enzym/Enzymatická třída
aerobní	acetaminofen	hydrolýza	aryl-acylamidáza (EC 3.5.1.13)
aerobní	atenolol	hydrolýza	endopeptidázy (EC 3.4.-)
aerobní	isoproturon	hydrolýza	protozoální hydrolázy (EC 3.-)
aerobní	propachlor	konjugace	gluta-S-transferáza (EC 2.5.1.18)
aerobní	trimethoprim	demethylace	monooxygenázy (EC 1.13.- //EC 1.14.-)
anoxické	atrazin	oxidace	oxidoreduktáza (ligninperoxidáza) (EC 1.11.1.14)
anoxické	erythromycin, trimethoprim	redukce	nitrátreduktáza, nitritreduktáza, oxid dusný reduktáza (EC 1.7.-)
anoxické	ibuprofen, naproxen	oxidace	oxidoreduktáza (EC 1.11.1.7.)
anaerobní	acetaminofen	deacetylace	arylamino N-acetyltransferáza (EC 2.3.1.5)
anaerobní	atenolol	amidhydrolýza	serinová proteáza (EC 3.4.21)
anaerobní	ibuprofen, naproxen	fosforylace	acetákináza (EC 2.7.2.1)
anaerobní	trimethoprim	O- demethylace	O-methyltransferáza (EC 2.1.1.-)

1.3 BIOTRANSFORMACE CHLOROVANÝCH SLOUČENIN

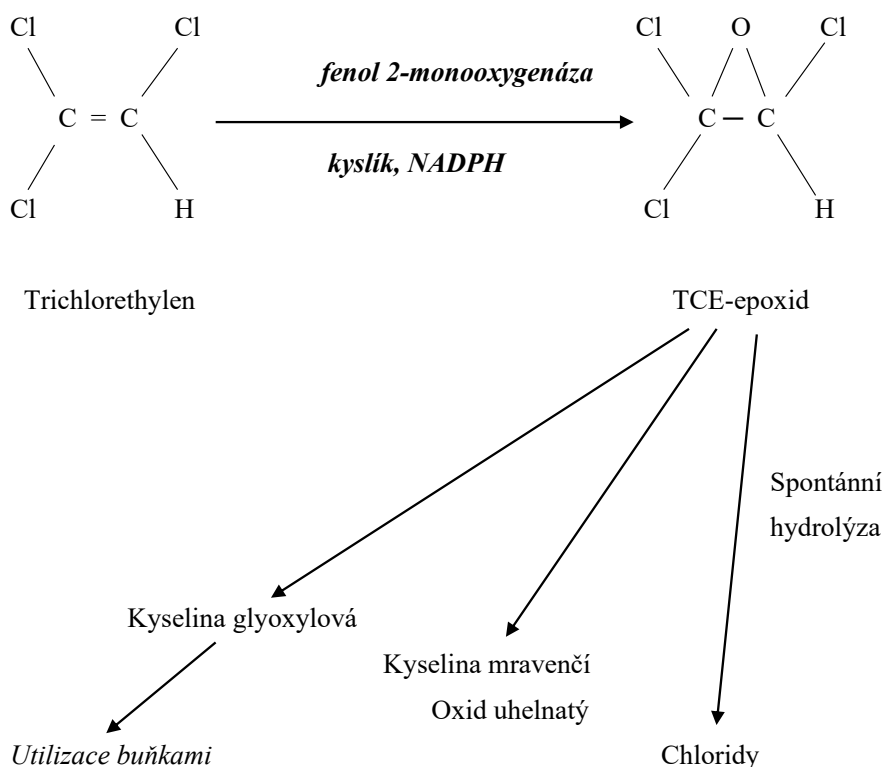
Proces zapojení mono- a dioxygenázových enzymů je stejný i u chlorovaných sloučenin, avšak obecně mají tyto enzymy nízkou specifitu vůči chlorovaným derivátům, proto musí být nízká specifita kompenzována zvýšením hladin enzymů (= hustotou mikroorganismů produkujících daný enzym). Platí, že molekuly s nízkým počtem atomů chloru (méně než pět) jsou přístupnější působení těchto enzymů a molekuly s více než pěti atomy chloru jsou odolné vůči tomuto typu oxidace. Mikrobiální degradace chlorovaných alifatických i aromatických látek, jako je např. trichloroethen (TCE), dichlorethyleny (DCEs), vinylchlorid (VC) vede k významné mineralizaci těchto znečišťujících látek, ke kompletní biodegradaci však obvykle nedochází (Nzila, 2013). U jiných sloučenin je však prokázáno, že některé mikroorganismy mohou kometabolismem znečišťující látku úplně rozložit. Široké použití těchto chlorovaných molekul vedlo a vede k tomu, že samy o sobě nebo produkty jejich částečného rozkladu znečišťují různé sféry životního prostředí (půdy, vody), čímž představují zdravotní riziko pro lidi i zvířata (Nzila, 2013).

1.3.1 Kometabolická bakteriální degradace TCE

První zmínky použití této chemické látky začaly ve 20. letech minulého století. Od té doby se TCE využívá v mnoha odvětvích, jehož důsledkem je především kontaminace půd a podzemních vod. Tuto kontaminaci lze z prostředí odbourat mikrobiálním kometabolismem za přístupu kyslíku nebo anaerobně redukční dechlorací (Chen et al. 2008).

Bylo zjištěno poprvé Wilsonem a Wilsonem (1985), že některé mikroorganismy jsou schopné aerobní degradace halogenovaných uhlovodíků, jako je TCE. Tato studie se potvrdila při experimentálních podmínkách TCE o koncentraci 150 $\mu\text{g/l}$, kdy došlo k odstranění 99 % TCE pomocí methanotrofních bakterií za vzniku oxidu uhličitého. Studií Arcangeliho a Arvina (1997) se potvrdilo, že *Pseudomonas cepacia* G4 je mnohem účinnější než ostatní příbuzné druhy při rozkladu TCE, jelikož tento druh vykazoval silnou afinitu k TCE o koncentraci 0-2,5 mg/l , s průměrnou schopností rozkladu 0,038 $\text{g TCE/g biomasy/den}$. Dalším důkazem rozkladu TCE pomocí bakterií byl výzkum Shimomury et al. (1997), kdy methanotrofní bakteriální kultura *Methylocystis* sp. M prokázala vysokou účinnost rozkladu TCE o koncentraci 0,9-1,6 mg/l a dosáhla jeho 90% odstranění (Shukla et al. 2012). Významnou studií se stala práce Ishidy a Nakamury (2000), zabývající se kmenem *Ralstonia* sp. KN1-10A. Při tomto pokusu kmen bakterií byl kultivován při 30 $^{\circ}\text{C}$

s modelovou podzemní vodou s TCE. Z předešlých studií bylo již známo, že TCE je rozkládán za přítomnosti fenol 2-monooxygenázy na TCE-epoxid nebo chloral, jejichž další rychlost přeměn je závislá na experimentálních podmínkách. Zjistili, že chloral a jeho produkty oxidace nebyly produkty degradace TCE kmenem *Ralstonia* sp. KN1-10A. Tyto produkty však byly prokázány při rozkladu TCE kulturou *Methylocystis* sp. M. Jelikož kyselina trichloroctová i chloral způsobují potenciální zdravotní rizika, jejich absence během degradace TCE bakteriemi *Ralstonia* sp. KN1-10A je více než vhodná. Osud TCE epoxidu spočívá ve spontánní hydrolyze ve vodném prostředí, jejímiž produkty jsou chloridy, kyselina glyoxylová, kyselina mravenčí a oxid uhelnatý, Produkce oxidu uhelnatého se předpokládá na cca 7,0 mol % z TCE a zbytek – více jak 90 % uhlíku z rozpadu TCE - přechází do kyseliny glyoxylové. Proto je výhodné použití tohoto bakteriálního kmenu s fenol 2-monooxygenázou z toho důvodu, že přeměna TCE jde hlavně na glyoxylát, z něhož kmen dostává živiny v podobě uhlíku a energie, tudíž se mikroorganismus může během degradace TCE částečně regenerovat (Ishida a Nakamura, 2000).



Obrázek 3 Degradace TCE bakteriemi *Ralstonia* sp. KN2-10A
(upraveno z Ishida a Nakamura, 2000)

Další práce, která se zabývala schopností bakterií degradovat TCE, byla diplomová práce Krajčířikové (2022), jež se zabývala kometabolismem pomocí bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 za chladných teplot. Prvním výzkumem bylo nutné zjistit minimální teplotu, za které bude tato kultura schopná růst na fenolu a tvořit tak klíčový enzym pro degradaci TCE. Nejvyšší růst na fenolu vykazovala kultura při teplotě 25 °C, při teplotě 13°C v tekutém minerálním médiu s koncentrací fenolu 250 mg/l však rostla až po delší lagové fázi a při 8°C na samotném fenolu v koncentraci 250 mg/l nerostla vůbec. Dalšími zkouškami však bylo jistěno, že za přítomnosti dalších podpůrných substrátů, jako např. tryptonu, kvasničného extraktu nebo mléčnanu sodného, dochází při teplotě 13 °C ke zkrácení lagové fáze a kultura RF2 je tak schopna na fenolu vyrůst rychleji. Navíc bylo prokázáno, že při snížení koncentrace fenolu na 100 mg/l je kultura RF2 schopna – v přítomnosti podpůrného mléčnanu sodného – přece jenom fenol spotřebovat i při 8 °C. Tyto výsledky pak umožnily provedení testů degradace TCE uvedenou kulturou při teplotách jak 13°C, tak i 8 °C. Při experimentech, prováděných za teploty 13 °C, proběhla při vstupních koncentracích TCE ve vodné fázi 1,6 a 3,2 mg/l úplná degradace za 7 a 11 dní; lagová fáze trvala v obou pokusech přibližně 4 dny. V pokusech při 8 °C, se vstupní koncentrací TCE ve vodné fázi 1,8 mg/l, již byla zaznamenána podstatně delší doba lagové fáze – cca 17 dnů. Po ní však již následovala fáze několikadenní degradace TCE, takže po 26 dnech pokusu došlo k jeho úplné degradaci (Krajčířiková, 2022).

2 PŮVOD KULTUR POUŽITÝCH V DIPLOMOVÉ PRÁCI

Výzkum bakteriálních degradací TCE za nízkých teplot probíhal v posledních letech v určité míře i na Ústavu inženýrství ochrany ŽP FT UTB ve Zlíně a vedl k získání několika čistých kultur. Kultury, pracovníě označené jako 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A, byly získány v průběhu nedokončené diplomové práce M. Pekárka v letech 2020 – 2021. Spolu s dalšími bakteriálními kulturami byly získány z různých vzorků tekoucích i stojatých vod, a to kultivací v minerálním médiu s fenolem o koncentraci 250 mg/l, při teplotě cca 8 °C, s následnou izolací na pevných živných agarech. Celkem bylo tehdy izolováno 14 bakteriálních kmenů, z nichž 12 bylo postupně testováno na schopnost rozkládat trichloroethen (TCE) kometabolickou degradací při 8 °C, po růstu na směsi fenol + mléčnan sodný (100 + 100 mg/l). Při těchto pokusech byla použita vstupní koncentrace TCE ve vodné fázi 1,2 – 1,4 mg/l a výše uvedené kultury 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A prokázaly schopnost TCE v této koncentraci zcela odstranit. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2 (Růžička, J., 2022, osobní sdělení)

Tabulka 2 Přehled kultur získaných v nedokončené diplomové práci M. Pekárka a účinnost jejich kometabolického rozkladu TCE při vstupní koncentraci 1,2 – 1,4 mg/l

Kultura	Původ	Doba růstu kultury na fenolu 250 mg/l (dny)	Míra degradace TCE (%)
1A	Řeka Dřevnice, Zlín	5 až 6	100
1C	Řeka Dřevnice, Zlín	6	98
5A	Říčka Štávnice, Luhačovice	6	100
5B	Říčka Štávnice, Luhačovice	9	100
6A	Potok bezejmenný, Březůvky	5 až 6	100
6B	Potok bezejmenný, Březůvky	6	100
7A	Luční mokřad, Veselí n. Mor.	5	44,7
7B	Luční mokřad, Veselí n. Mor.	9 až 10	46,1
8A	Mokřad, Veselí n. Mor.	12 až 14	Netestováno
8C	Mokřad, Veselí n. Mor.	7 až 8	64,5
9A	Pramen, Brumov	12 až 14	Netestováno
11A	Sírný pramen, Provodov	8 až 9	80,2
12A	Lesní potok, Provodov	6 až 7	100
14A	Nádrž, Provodov	7 až 9	51,4

Kultury 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A byly po pokusech degradace TCE zakonzervovány při teplotě -80°C v glycerolu a uschovány pro další studia v mikrobiologické laboratoři Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 METODIKA

Pro praktickou část diplomové práce bylo použito minerální médium, zásobní roztok TCE, zásobní roztok fenolu, fyziologický roztok a kultury 1A, 5A, 6A, 6B a 12A. Kultura 5B se v průběhu dvou souběžných bakalářských prací, probíhajících na ÚIOŽP, ukázala jako totožná s kulturou 5A.

3.1 Použité roztoky

3.1.1 Minerální médium (dále jen MM)

Celkový objem 500 ml a pH média 7,4 – 7,5.

Voda destilovaná.....	425 ml
23,90 g/L Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	40 ml
9,078 g/L KH ₂ PO ₄	10 ml
30,00 g/L NH ₄ Cl.....	5 ml
10,00 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O.....	5 ml
3,00 g/L Fe(NH ₄) ₂ .(SO ₄) ₂ .6H ₂ O.....	5 ml
1,00 g/L CaCl ₂ .2H ₂ O.....	5 ml
10,00 g/L NaCl.....	5 ml
Roztok stopových prvků.....	1 ml

3.1.2 Roztok stopových prvků

MnSO ₄ .5 H ₂ O	0,043 g
H ₃ BO ₃	0,057 g
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,043 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .6 H ₂ O	0,037 g
Co(NO ₃) ₂ .6 H ₂ O	0,025 g
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,040 g

Všechny látky byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

3.1.3 Fyziologický roztok

8,50 g NaCl v 1000 ml destilované vody

3.1.4 Chemikálie a živné médium

- Trichloroethen (Sigma-Aldrich), zásobní roztok o koncentraci cca 1 g/l

Do plynotěsné lahvičky s plynotěsným septem bylo nadávkováno 1,5 ml destilované vody a poté přidáno cirká 50 μ l trichloroethenu. Celá směs byla dokonale promíchána, a to po dobu 15 minut a následně byl TCE ponechán během 24 hod sedimentaci, kdy se na dně nádoby vytvořila malá kapička trichloroethynu. Nad ní byl přítomen nasycený roztok TCE.

- Fenol (Sigma-Aldrich), zásobní vodný roztok o koncentraci 50 g/l, sterilizovaný filtrací přes sterilní ultrafiltr Ahlstrom ReliaPrep s velikostí pórů 0,2 μ m.
- Živný agar pro kultivaci kultur: byl používán Tryptone yeast extract agar (TYA agar) firmy HIMEDIA a byl připravován dle předpisu výrobce; po sterilizaci byl rozlíván do sterilních petriho misek

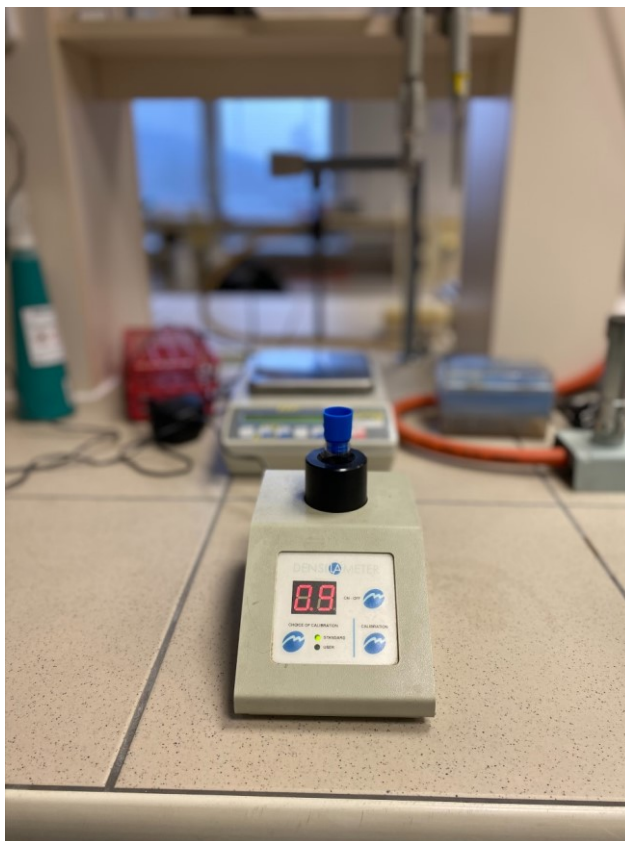
3.2 Použitý biologický materiál

K pokusu byly použity kultury označené 1A, 5A, 6A, 6B a 12A. Všechny kultury byly oživeny z mrazáku -80 °C vyočkováním na TYA agary a kultivací při 8 °C. Předkultivace kultur před pokusy byla prováděna buď na TYA agarech (5 – 7 dní při 8°C) nebo v MM s fenolem (200 mg/l), rovněž po dobu 5 – 7 dní při 8°C nebo v MM s fenolem (200 mg/l) a tryptonem (100 mg/l).

3.3 Použité měřicí přístroje

3.3.1 Densilametr

Densilametr je přístroj, který měří optickou hustotu bakteriální suspenze (OD), tedy její zákal. Změřené hodnoty jsou přístrojem převedeny do jednotek dle McFarlanda, jehož rozsah měření se pohybuje od 0 – 15 jednotek McF a doba měření trvá cca 2 vteřiny ve zkumavkách o objemu 15 ml. Přístroj byl používán k nastavení hustoty suspenzí kultur před pokusy a také k měření hustoty buněk v průběhu některých pokusů.



Obrázek 4 Densilometr

(vlastní zdroj)

3.3.2 Koncentrátor TEKMAR LSC 2000

Koncentrátor prochází automatický jednotlivé kroky popsané níže a je řízen mikroprocesorem. Inertní plyn, což je dusík, je současně plynem stripovacím i nosným. S kolonou plynového chromatografu je propojen vyhřívanou trubicí. Objem vzorků, dávkovaných do koncentrátoru, byl vždy 5 ml; v případě vzorků s TCE bylo většinou provedeno ředění vzorků tak, že do nádoby koncentrátoru byl nejprve nadávkován objem převařené chladné destilované vody (4 nebo 4,5 ml) a poté byl přidán vlastní vzorek o objemu 1 nebo 1,5 ml. K zakoncentrování námi sledované látky (TCE) byla použita metoda Purge and Trap, kdy extrakce látky byla provedena stripováním inertním dusíkem, který reagoval s matricí nesoucí těkavou látku. Uvolněná těkavá látka byla sorbována na trubici se sorbentem (trap). Po zahřátí trubice (proces desorpce) se látka uvolnila ze sorbentu, následně látka proudila do plynového chromatografu k detekci.

Předvolené kroky operačního systému koncentrátoru:

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

PURGE READY – podmínky ustáleny, dávkování vzorku

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

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

DESORB READY – vzorek je připraven k poslání do GC

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

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

INJECT

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

3.3.3 Plynový chromatograf HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II

Plynový chromatograf Hewlett Packard HP 5890 Series II je přístroj určený k analýze plyných a těkavých chemických složek komplexních vzorků v průmyslu, toxikologii, screeningu léků, bezpečnosti potravin a forenzní i obecné chemické analýze. Tento přístroj využívá průtočnou trubici známou jako kolona, kterou procházejí chemické složky vzorku v proudu plynu. Tyto složky se pohybují různou rychlostí v závislosti na jejich chemických a fyzikálních vlastnostech a také interakci se specifickou náplní kolony, kterou nazýváme stacionární fáze. Výsledkem analýzy je chromatogram, který představuje píky, jejichž výšky by měly být ideálně závislé na koncentraci konkrétní složky ve vzorku.

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

Nastavené parametry: OVEN TEMP 35 °C; INIT VALUE 35 °C; INIT TIME 10 min; RATE 4 DEG/min; FINAL TEMP 150 °C, FINAL VALUE 150; FINAL TIME 5,00; INJ A TEMP

OFF; INJ B TEMP OFF; DET A TEMP ON 230 °C; DET B TEMP OFF; DET A (FID) ON;
DET B (ECD) OFF.

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

3.3.4 Integrátor HEWLETT PACKARD 3396 SERIES II

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

Nastavené parametry:

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



Obrázek 5 Koncentrátor (vlevo), plynový chromatograf (uprostřed) a integrátor se zapisovačem (vpravo)

(vlastní zdroj)

3.4 Příprava pokusů

Všechny pokusy degradace TCE byly prováděny ve sterilních skleněných vzorkovnicích (vialkách) pro práci s těkavými látkami; vialky byly opatřeny silikonovými septy s teflonovým potahem a šroubovými uzávěry. Před jednotlivými pokusy byly vialky sterilizovány v horkovzdušné sušárně při 180 °C po dobu 4 hodin a uzávěry se septy byly sterilizovány UV zářením pro dobu min. 3 hodin. Byly použity vialky o celkovém objemu 40 ml, v nichž při pokusech tvořila vodná fáze objem 10 ml.

3.4.1 Degradace TCE při vstupní koncentraci 2,5 mg/l všemi kulturami – příprava vialek

Předinkubace všech kultur byla provedena na TYA agarech. Pro pokusy byly postupně připraveny suspenze kultur ve sterilním fyziologickém roztoku (OD = 1,0). Každá kultura byla dávkována do 5 ks vialek, do kterých bylo předtím nutné ještě nadávkovat sterilní MM, a zásobní roztok fenolu; roztok TCE byl přidáván poslední a každá vialka byla poté okamžitě uzavřena.

Dávkování bylo následující:

Pro každou kulturu bylo připraveno 5 ks vialek s 10 ml MM, bez fenolu, a s roztokem TCE (45 µl do 1 vialky) – tyto vialky představovaly blanky. Dále bylo pro každou kulturu připraveno 5 ks vialek s 9,95 ml MM, 40 µl zásobního roztoku fenolu (tj. s výslednou koncentrací 200 mg/l) a 10 µl příslušné bakteriální suspenze.

Poté bylo do vialek s kulturami přidáno **45 µl zásobního vodného roztoku TCE** pomocí plynotěsného dávkovače (výsledná koncentrace TCE 2,5 mg/l). Vialky byly inkubovány po dobu 18 dní při 8 °C u kultur 6A a 12A, u kultur 1A a 6B 21 dní a u kultury 5A 31 dní; konečné koncentrace TCE byly změřeny plynovou chromatografií vždy až na konci pokusů.

3.4.2 Degradace TCE při zvýšené vstupní koncentraci kulturami 1A a 6B

Předinkubace kultur na TYA agarech. Pro druhou přípravu pokusu bylo nutné opět připravit suspenze kultur 1A a 6B ve sterilním fyziologickém roztoku. Tyto kultury byly dávkovány do 16 ks vialek z celkového počtu 24 ks, do kterých bylo nutné ještě nadávkovat sterilní MM, zásobní roztok fenolu a TCE.

Dávkování bylo následující:

Pro každou kulturu byly připraveny 4 ks vialek s 10 ml MM, bez fenolu, a s roztokem TCE (60 µl do 1 vialky) – tyto vialky představovaly blanky. Dále bylo pro každou kulturu

připraveno 8 ks vialek s 9,95 ml MM, 40 μ l zásobního roztoku fenolu (tj. s koncentrací 200 mg/l) a 10 μ l příslušné bakteriální suspenze.

Poté bylo do 4 vialek s kulturou 1A a do 4 vialek s kulturou 6B přidáno **60 μ l zásobního vodného roztoku TCE** pomocí plynotěsného dávkovače (s předpokládanou výslednou koncentrací 3,5 mg/l TCE). Vialky byly inkubovány po dobu 22 a 26 dní při 8 °C a konečné koncentrace TCE byly změřeny plynovou chromatografií. Do dalších 4 vialek s kulturou 1A bylo nadávkováno **100 μ l zásobního vodného roztoku TCE** (s předpokládanou výslednou koncentrací nad 5 mg/l TCE) také pomocí plynotěsného dávkovače. Vialky byly inkubovány po dobu 61 dní při 8 °C a konečné koncentrace TCE byly změřeny plynovou chromatografií.

3.4.3 Degradace TCE kulturami 1A a 6B vyrostlými na fenolu

Pro přípravu třetího pokusu byly použity kultury 1A a 6B, předinkubované v MM s fenolem (200 mg/l) 6 dní před pokusem, při teplotě 8 °C. Optická hustota těchto kultur byla po této předinkubaci 0,9 a 1,0. Tyto kultury byly dávkovány do 24 ks vialek z celkového počtu 30 ks. Bylo připraveno 320 ml sterilního MM, ze kterého bylo připraveno 6 vialek blanků s 10 ml MM (označené Blank 1 – Blank 6). Do zbývajících 260 ml MM byl přidán fenol o koncentraci 200 mg/l (tj. 1,05 ml zásobního roztoku o koncentraci 50 g/l). MM bylo rozděleno půl na půl (tj. 2x 130 ml) a každá dávka MM s fenolem byla zaočkována jednou kulturou (130 μ l). Poté bylo každé naočkované médium rozpipetováno po 10 ml do 12 ks vialek.

Dávkování bylo následující:

Pro každou kulturu bylo připraveno 6 ks vialek s 10 ml MM, bez fenolu, a s roztokem TCE (60 μ l do 1 vialky) – tyto vialky představovaly blanky. Dále bylo pro každou kulturu připraveno 12 ks vialek s 9,95 ml MM, **60 μ l zásobního vodného roztoku TCE** (tj. s předpokládanou výslednou koncentrací 3,5 mg/l) a 10 μ l příslušné bakteriální suspenze vyrostené na fenolu. Vialky byly inkubovány po dobu 21 dní při 8 °C a konečné koncentrace TCE byly stanovovány postupně plynovou chromatografií, kdy se začalo 48 hodin od zahájení pokusu (2 dny inkubace).

3.4.4 Degradace TCE kulturou 1A vyrostenou na fenolu s tryptonem (2 pokusy)

Pro čtvrtou přípravu byla použita předinkubovaná kultura 1A v MM s fenolem (200 mg/l) a tryptonem (100 mg/l), 7 dní před pokusem, při teplotě 8 °C. Optická hustota (OD) této kultury byla po předinkubaci 2,0. Kultura 1A byla dávkována do 21 ks vialek, kdy bylo připraveno 225 ml sterilního MM. Dále bylo připraveno 6 vialek blanků s 10 ml MM

(označené Blank 1 – Blank 6). Do 225 ml sterilního MM byl přidán fenol o koncentraci 200 mg/l (tj. 1,09 ml zásobního roztoku o koncentraci 50 g/l). MM bylo promícháno a naočkováno 230 μ l indukované kultury 1A, bylo pipetováno po 10 ml do 21 vialek.

Dávkování bylo následující:

Bylo připraveno 6 ks vialek s 10 ml MM, bez fenolu a bez tryptonu, s roztokem TCE (60 μ l do 1 vialky) do vodné fáze – tyto vialky představovaly blanky. Dále bylo připraveno 21 ks vialek s MM s obsahem kultury 1A, fenolu, kdy do vodné fáze bylo dávkováno dávkováno **60 μ l zásobního vodného roztoku TCE** (tj. s výslednou koncentrací cca 3,5 mg/l). Vialky byly inkubovány po dobu 24 dní při 8 °C a konečné koncentrace byly stanoveny postupně plynovou chromatografií, kdy se začalo 72 hodin od zahájení pokusu (3 dny inkubace).

Pátá a poslední příprava zahrnovala předinkubovanou kulturu 1A v MM s fenolem (200 mg/l) a tryptonem (100 mg/l) 7 dní před pokusem, při teplotě 8 °C. Optická hustota této kultury byla těsně po inkubaci 2,0. Kultura 1A byla dávkována do 20 ks vialek, kdy bylo připraveno 275 ml sterilního MM. Dále bylo připraveno 7 vialek blanků s 10 ml MM (z jiné lahve) (označené Blank 31 – Blank 37). Do 275 ml sterilního MM byl přidán fenol o koncentraci 200 mg/l (tj. 1,1 ml zásobního roztoku o koncentraci 50 g/l). MM bylo promícháno a naočkováno 275 μ l indukované kultury 1A a následně bylo pipetováno po 10 ml do 20 vialek.

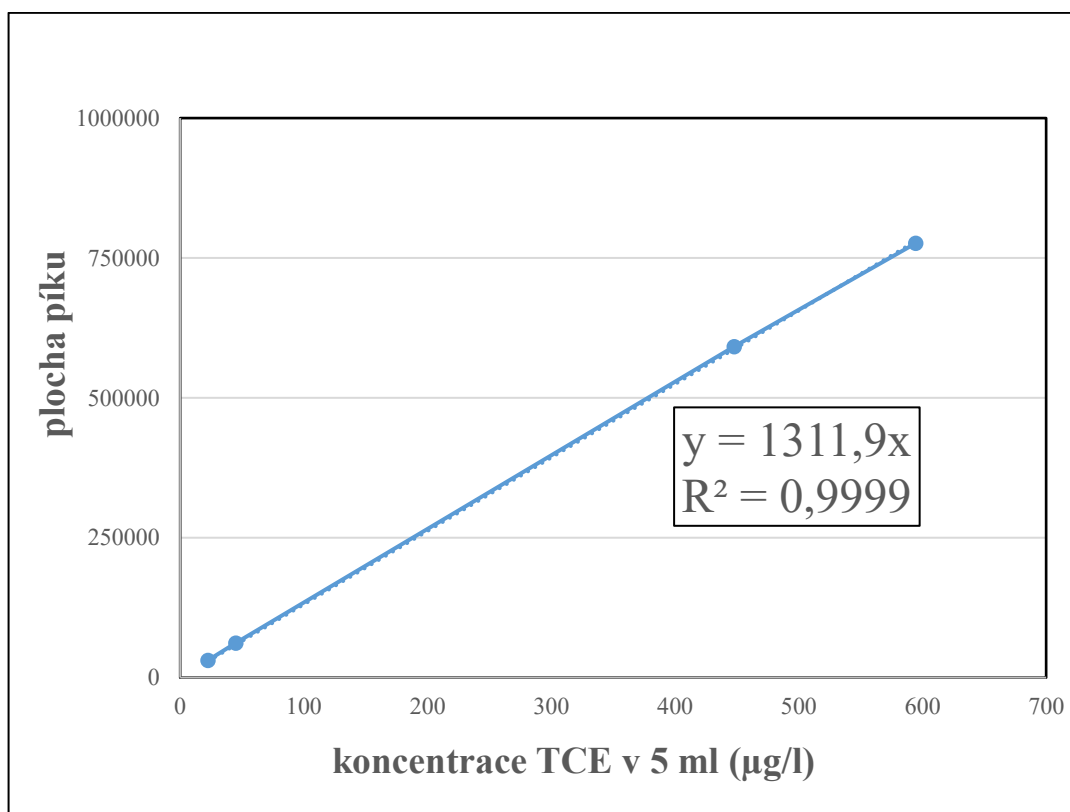
Dávkování bylo následující:

Bylo připraveno 7 ks vialek s 10 ml MM, bez fenolu a bez tryptonu, s roztokem TCE (100 μ l do 1 vialky) do vodné fáze – tyto vialky představovaly blanky. Dále bylo připraveno 20 ks vialek s MM s obsahem kultury 1A, fenolu, kdy do vodné fáze bylo dávkováno **100 μ l zásobního vodného roztoku TCE** (tj. s výslednou koncentrací nad 5 mg/l).

Vialky byly inkubovány po dobu 49 dní při 8 °C a konečné koncentrace byly stanoveny postupně plynovou chromatografií, kdy se začalo 96 hodin od zahájení pokusu (4 dny inkubace).

3.5 Kalibrační křivka pro stanovení TCE

Byly připraveny tři standardy TCE o koncentraci 223,9; 2239 a 5945 mg/l. Každá koncentrace byla dávkována do Tekmaru v množství 1 a 0,5 μ l stříkačkou Hamilton do objemu 5 ml demineralizované vody. Koncentrace dávkovaných objemů roztoků činila 22,39; 44,78; 223,9; 447,8; 594,5; 1189 μ g/l TCE. Každá koncentrace byla měřena dvakrát vedle sebe. Na základě sestavené kalibrační křivky byly odečítány skutečné koncentrace TCE ve vzorcích.



Obrázek 6 Kalibrační křivka pro stanovení TCE

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Schopnost kultur 1A, 5A, 6B, 6A a 12A rozkládat TCE při vstupní koncentraci cca 2,5 mg/l

Pro odhad délky pokusů byly použity výsledky dle BcP Karolíny Linhartové (2023).

Při plánování pokusů bylo předpokládáno, že doba kultivace při 8 °C bude alespoň 1 týden po ukončení růstu na fenolu.

1A: začátek růstu cca 4. den, maximální růst 10. až 12. den (Linhartová, 2023); doba pokusu by tedy měla být minimálně 19 – 20 dní.

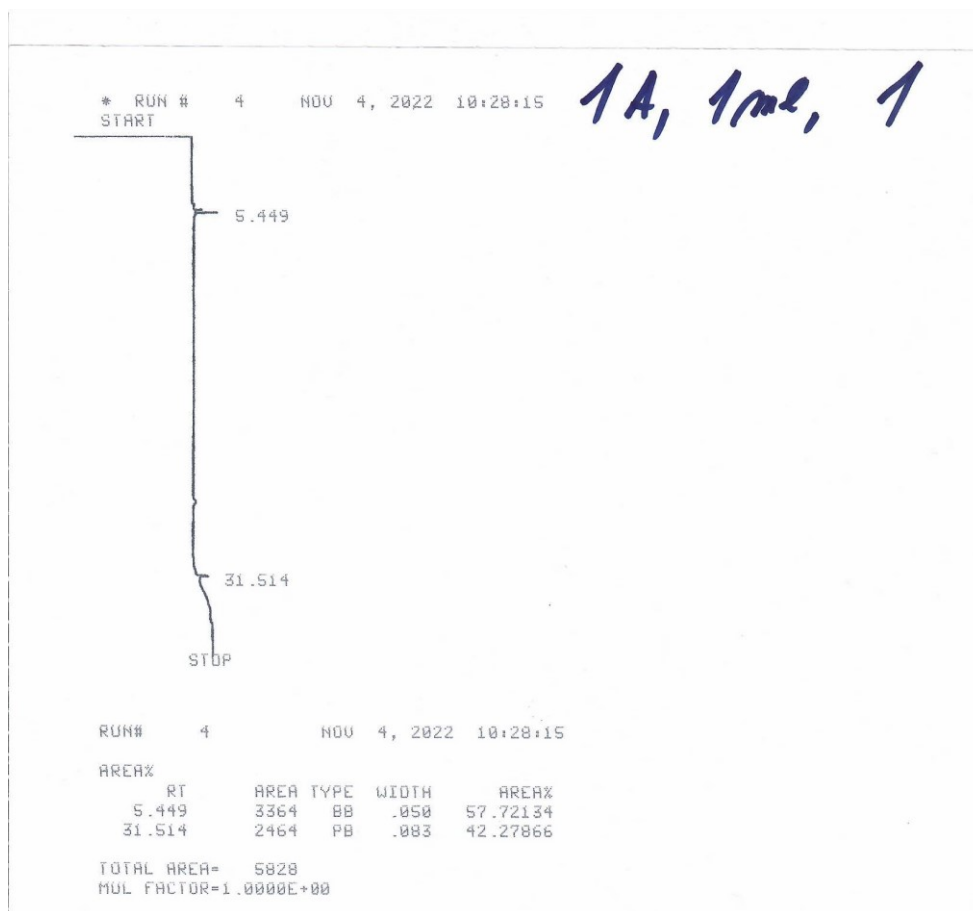
5A: začátek růstu cca 5. – 6. den, maximální růst 17. – 18. den (Linhartová, 2023); doba pokusu by měla být min. 25 dní.

6B: začátek růstu cca 3. až 4. den, maximální růst 10. až 12. den (Linhartová, 2023); doba pokusu by měla být minimálně 19 – 20 dní.

Tabulka 3 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultur 1A, 5A a 6B

Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE (µg/l)	Koncentrace TCE (µg/l) (přepočet)	Průměr TCE (µg/l)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
Blank 1	600 723	458	2289,5	2421,3	122,2
Blank 2	603 754	460	2301,1		
Blank 3	670 066	511	2553,8		
Blank 4	661 506	504	2521,2		
Blank 5	640 427	488	2440,8		
Kultura 1A					
21 dní	0	0	0,0	0,0	0,0
21 dní	0	0	0,0		
21 dní	0	0	0,0		
21 dní	0	0	0,0		

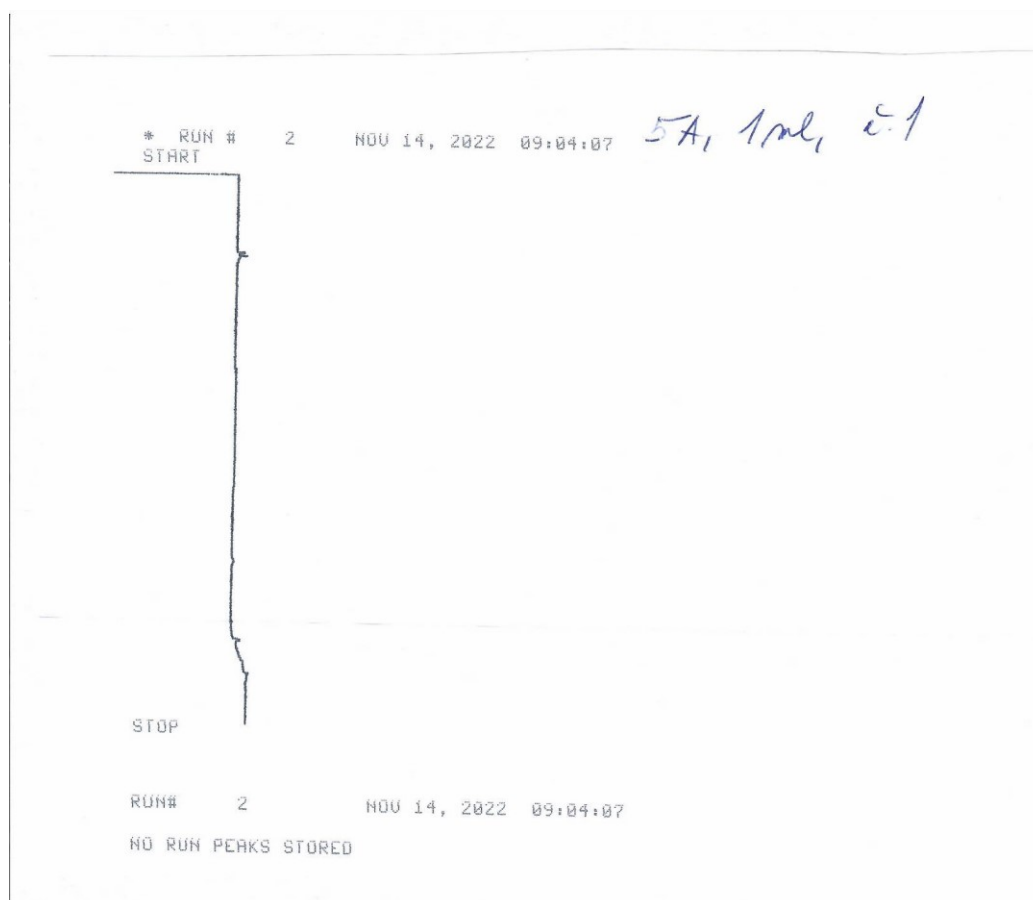
Na chromatogramu z plamenoionizačního detektoru (FID) jsou zaznamenané informace o čase, kdy byla daná látka detekována a její pík o dané ploše. Píky TCE byly zaznamenány cca v 10. minutě chromatografického záznamu.



Obrázek 7 Chromatogram kultury 1A po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE 2,5 mg/l

Pokračování tabulky 3 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultur 1A, 5A a 6B

Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE (µg/l)	Koncentrace TCE (µg/l) (přepočet)	Průměr TCE (µg/l)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
Kultura 5A					
31 dní	0	0	0,0	0,0	0,0
31 dní	0	0	0,0		
31 dní	0	0	0,0		
31 dní	0	0	0,0		
Kultura 6B					
21 dní	0	0	0,0	0,0	0,0
21 dní	0	0	0,0		
21 dní	0	0	0,0		
21 dní	0	0	0,0		



Obrázek 8 Chromatogram kultury 5A po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE 2,5 mg/l

Tabulka 4 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultur 6A a 12A

Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$)	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$) (přepočet)	Průměr TCE ($\mu\text{g/l}$)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
Blank 1	732 642	558	2792,3	2758,9	64,6
Blank 2	738 165	563	2813,3		
Blank 3	724 930	553	2762,9		
Blank 4	699 819	533	2667,2		
Kultura 6A					
18 dní	99 416	76	378,9	380,7	32,7
18 dní	109 623	84	417,8		
18 dní	88 803	68	338,5		
18 dní	101 741	78	387,8		
Kultura 12A					
18 dní	224 747	171	856,6	766,5	81,2
18 dní	195 143	149	743,7		
18 dní	183 417	140	699,1		

Výsledky uvedené v tabulkách 3 a 4 ukazují, že kultury 1A, 5A a 6B dokázaly rozložit 100% TCE z jeho výchozí koncentrace okolo 2,5 mg/l, zatímco kultury 6A a 12A rozložily jen 86 a 72%. Do dalších pokusů byly tedy vzaty jen kultury 1A a 6B, a to díky poněkud rychlejšímu růstu na fenolu oproti kultuře 5A. Uvedené kultury tedy byly dále testovány na rozklad TCE při zvýšené koncentraci, a to kolem 3,5 mg/l.

4.2 Schopnost kultur 1A a 6B rozkládat TCE při vstupní koncentraci cca 3,5 mg/l

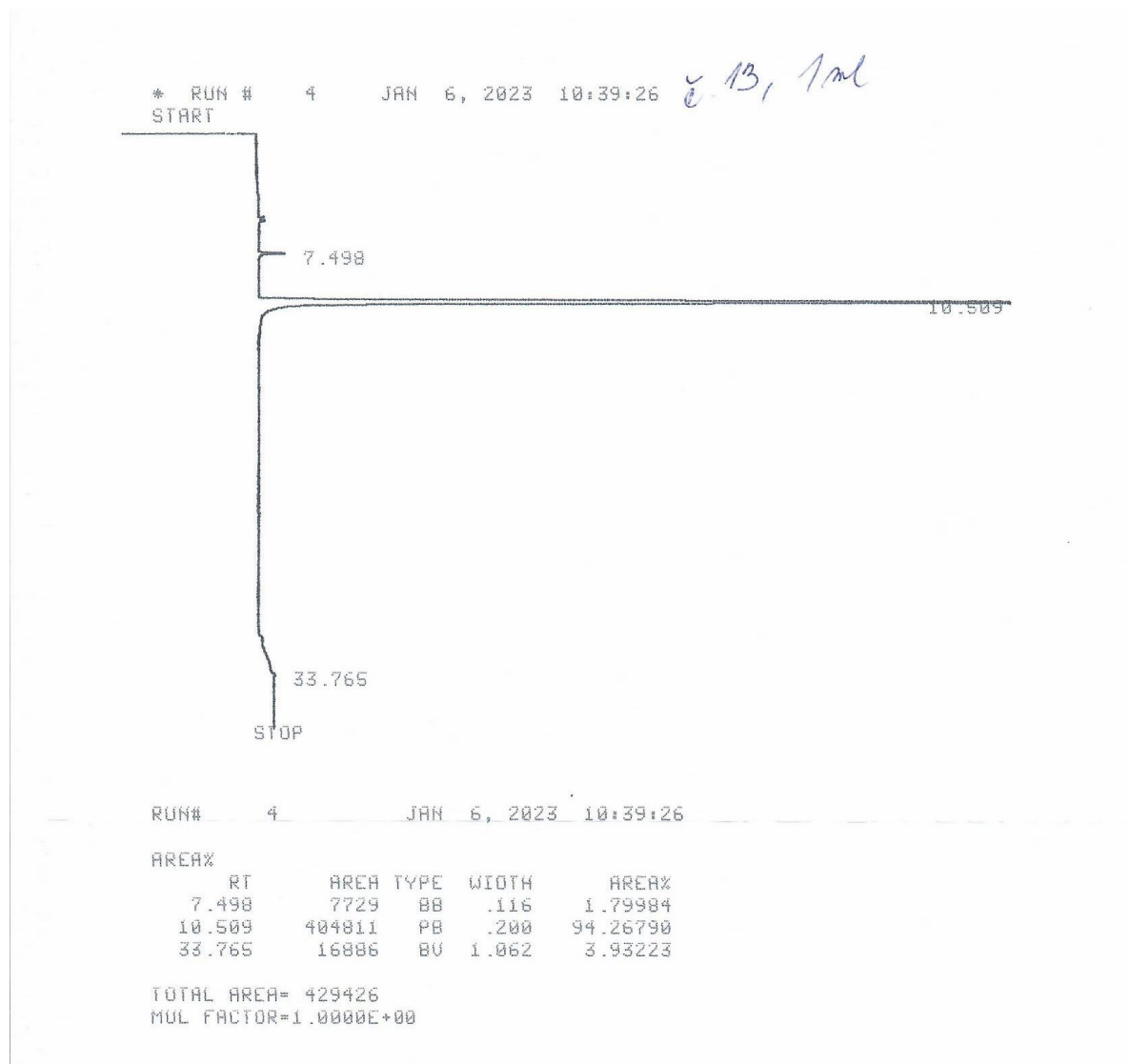
Na základě příznivých výsledků byl připraven další pokus, a to při použití ještě více zvýšené koncentrace TCE. Při dávkování zásobního roztoku TCE do připravených vialek s MM, fenolem a jednotlivými kulturami (1A a 6B) byl použit objem 60 μl . Bylo vyzorováno, že u dávky 60 μl TCE roste po zahájení pokusu poměrně dobře kultura 1A, kdy po 12 dnech byla vizuálně ve vialkách narostená, naopak kultura 6B rostla trochu pomaleji, ta byla narostená až po 18 dnech inkubace. U tohoto pokusu byla zbytková koncentrace TCE měřena jednak po 22. dni a také po 26. dni inkubace při 8 °C.

Tabulka 5 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultury 1A

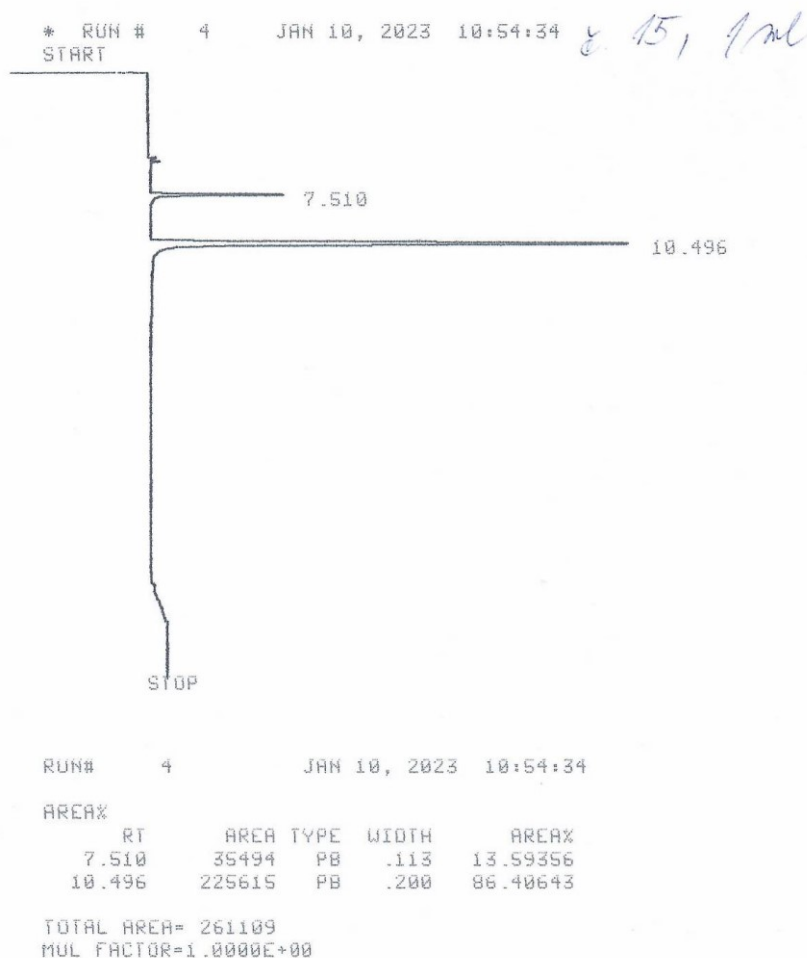
Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE (µg/l)	Koncentrace TCE (µg/l) (přepočet)	Průměr TCE (µg/l)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
Blank 1	966 484	737	3683,5	3729,3	178,4
Blank 2	923 491	704	3519,7		
Blank 3	987 910	753	3765,2		
Blank 4	1 036 101	790	3948,9		
Kultura 1A					
22 dní	107 872	82	411,1	629,3	308,5
22 dní	222 353	169	847,4		
26 dní	11 600	9	44,2	22,1	31,3
26 dní	0	0	0,0		

Tabulka 6 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultury 6B

Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE (µg/l)	Koncentrace TCE (µg/l) (přepočet)	Průměr TCE (µg/l)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
Blank 1	966 484	737	3683,5	3729,3	178,4
Blank 2	923 491	704	3519,7		
Blank 3	987 910	753	3765,2		
Blank 4	1 036 101	790	3948,9		
Kultura 6B					
22 dní	404 811	309	1542,8	1417,4	177,4
22 dní	338 973	258	1291,9		
26 dní	225 615	172	859,9	658,8	284,3
26 dní	120 108	92	457,8		



Obrázek 9 Chromatogram kultury 6B po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE 3,5 mg/l
(doba degradace 22 dní)



Obrázek 10 Chromatogram kultury 6B po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE 3,5 mg/l (doba degradace 26 dní)

Výsledky uvedené v tabulkách 5 a 6 ukazují, že kultura 1A rozložila po 22 dnech 83,1 % TCE a po 26 dnech to bylo 99,4 % odstranění TCE. Kultura 6B dokázala rozložit po 22 dnech 62 % a po 26 dnech 82,3 %. Je sice tedy možné, že pokud by kultura 6B dostala k dispozici ještě několik dalších dní v tomto pokusu, mohla by rozložit více TCE než původně rozložila, ale protože kultura 1A prokázala rychlejší růst v přítomnosti TCE a významně lepší degradační schopnosti, bylo v dalších pokusech pracováno převážně s ní.

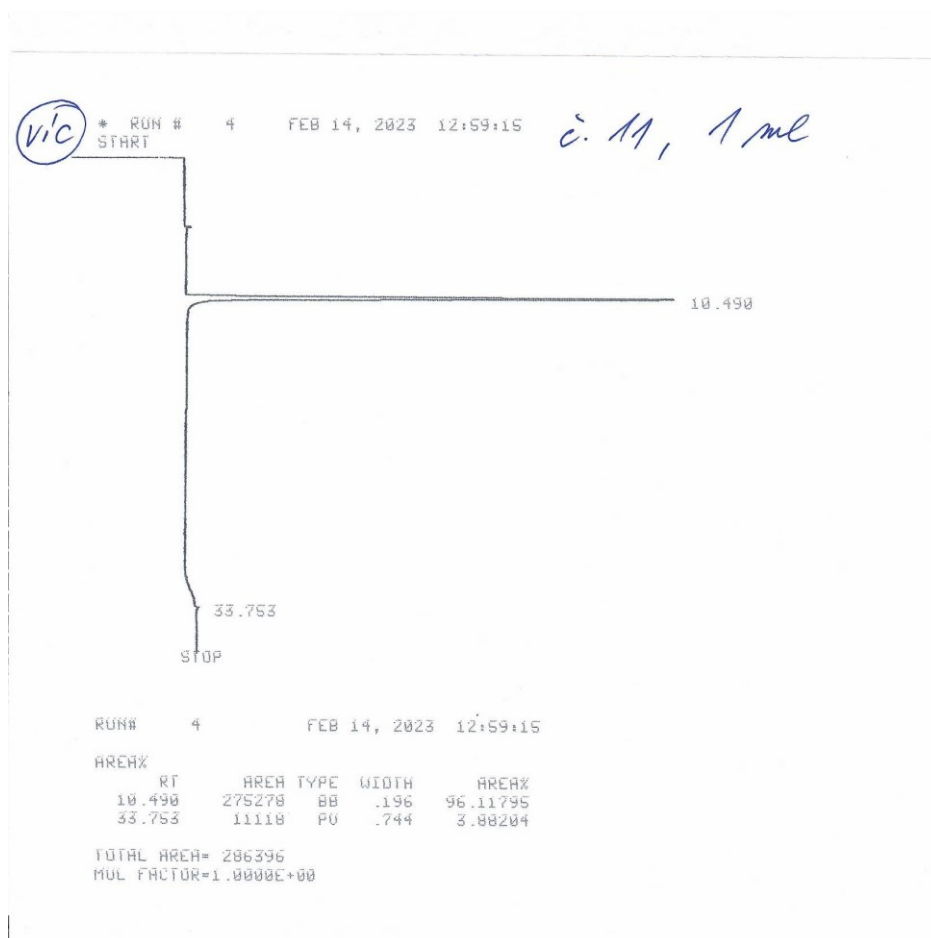
4.3 Schopnost kultury 1A rozkládat TCE při vstupní koncentraci nad 5 mg/l

Po nasazení pokusu a sledování růstu kultury v připravených vialkách bylo z vizuálního pozorování zřejmé, že takto vysoká koncentrace TCE je již pro kulturu 1A více či méně

toxická, nebo zasahuje do procesu indukce enzymu(ů), neboť po 25 dnech inkubace kultura vyrostla jen v jediné vialce. Ve všech vialkách byl růst zaznamenán až 32. den inkubace.

Tabulka 7 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultury 1A

Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE (µg/l)	Koncentrace TCE (µg/l) (přepočet)	Průměr TCE (µg/l)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
Blank 1	1 351 642	1030	5151,5	5250,4	8,9
Blank 2	1 403 548	1070	5349,3		
Kultura 1A					
61 dní	449 935	343	1714,8	1152,0	519,0
61 dní	181 610	138	692,2		
61 dní	275 278	210	1049,2		



Obrázek 11 Chromatogram kultury 1A po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE nad 5 mg/l (doba degradace 61 dní)

Výsledky uvedené v tabulce 7 poukazují na to, že kultura 1A rozložila po 61 dnech 78,1 % TCE z jeho výchozí koncentrace nad 5 mg/l. Kultura 1A však měla dlouhou lagovou fázi, proto bylo v dalších pokusech pracováno s touto kulturou předinkubovanou na fenolu.

4.4 Schopnost kultur 1A a 6B, indukovaných na fenolu, rozkládat TCE při vstupní koncentraci cca 3,5 mg/l

Jelikož měla kultura 1A při vysoké dávce TCE (nad 5 mg/l) dlouhou lagovou fázi, byl navrhnout další pokus s kulturami, které byly předinkubované na fenolu. Díky této předinkubaci mohou mít kultury již vytvořeny enzymy, které bez kontaktu s fenolem nemají, tudíž bylo předpokládáno, že předinkubace na fenolu může zrychlit růst kultur po naočkování do testů s TCE (a fenolem), a tím i degradaci TCE. U těchto pokusů byla připravena rozsáhlejší řada pokusných vialek tak, aby degradace TCE mohla být sledována v různých časových intervalech a byla tak sestavena degrační křivka. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách a také v grafu na obr. 12. Současně byl pomocí optické density sledován růst obou kultur po naočkování do vialek s fenolem a TCE, a to tak, že zbytek degračních suspenzí po stanovení TCE byl přelit do plastových zkumavek a byla změřena hodnota OD densilametrem. Tyto výsledky jsou pak uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 8 Koncentrace TCE blanků s fenolem

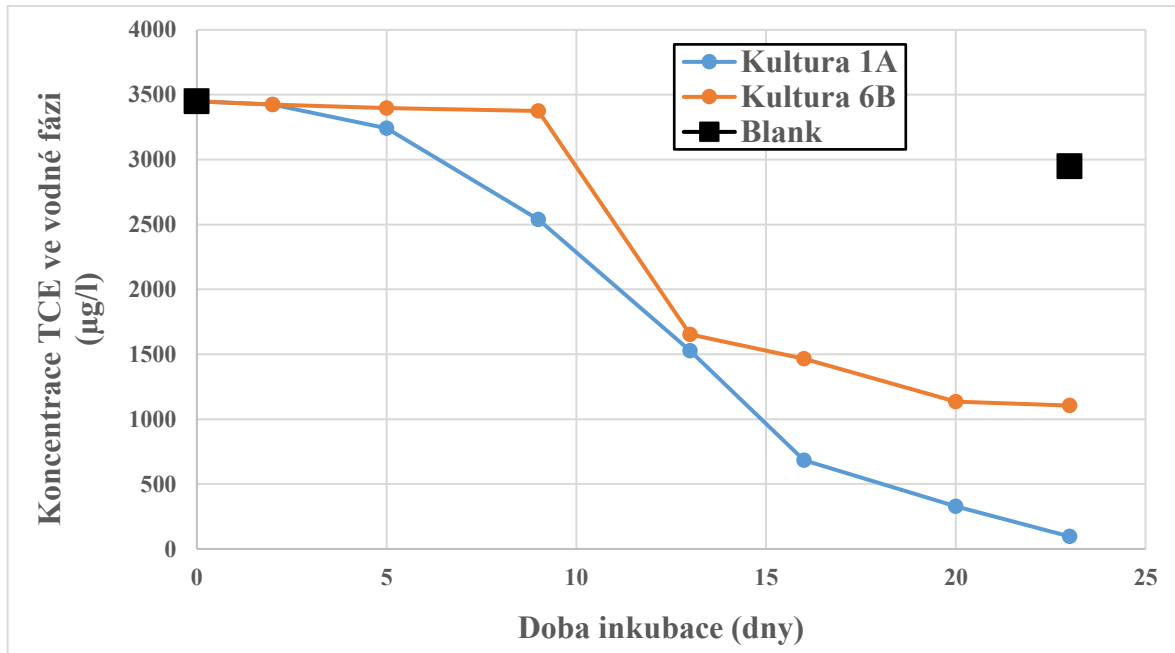
Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE (µg/l)	Koncentrace TCE (µg/l) (přepočet)	Průměr TCE (µg/l)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
2 dny	872 136	665	3323,9	3449,7	177,9
2 dny	938 132	715	3575,5		
26 dní	808 165	616	3080,1	2949,7	184,5
26 dní	739 695	564	2819,2		

Tabulka 9 Koncentrace TCE po kultivaci kultury 1A indukované na fenolu

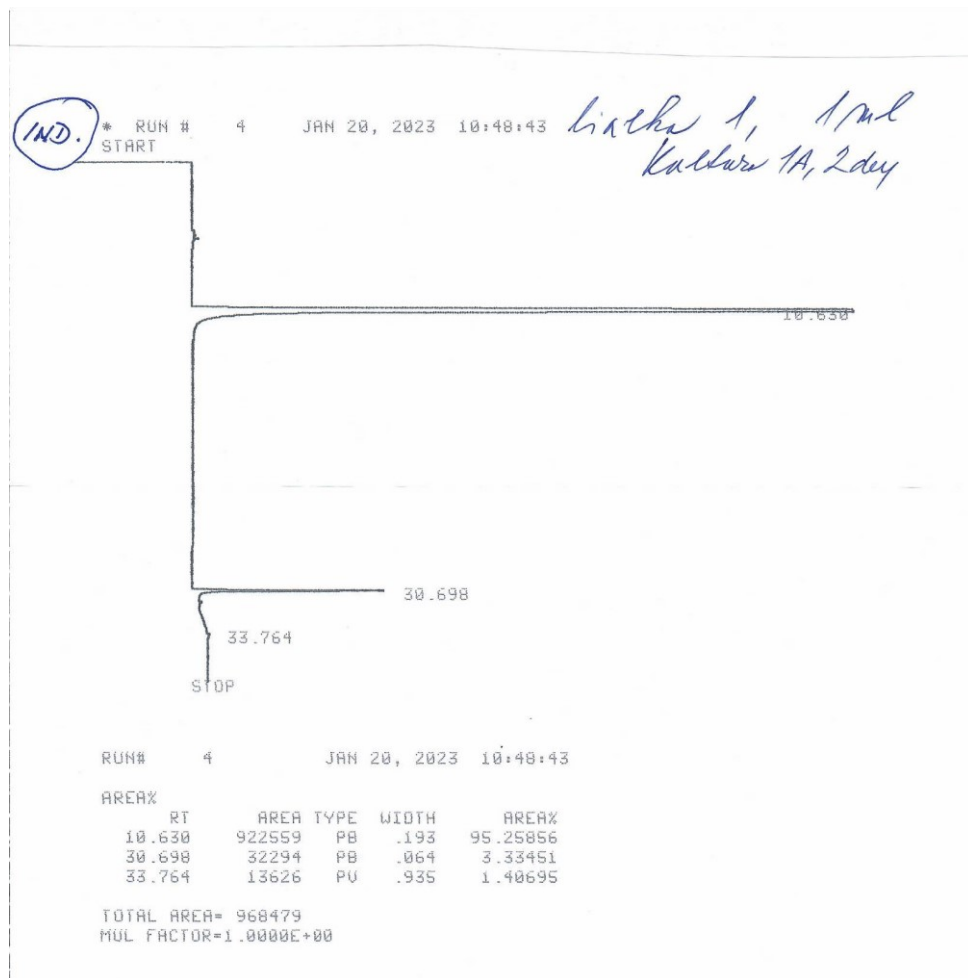
Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$)	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$) (přepočet)	Průměr TCE ($\mu\text{g/l}$)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
2 dny	922 559	703	3516,1	3516,1	-
5 dní	823 330	628	3137,9	3241,7	146,8
5 dní	877 804	669	3345,5		
9 dní	792 491	604	3020,4	2539,2	680,4
9 dní	540 003	412	2058,1		
13 dní	511 393	390	1949,1	1526,7	597,3
13 dní	289 744	221	1104,3		
16 dní	140 329	107	534,8	684,7	211,9
16 dní	218 956	167	834,5		
20 dní	85 922	65	327,5	327,5	-
23 dní	32 372	25	123,4	96,0	38,7
23 dní	18 003	14	68,6		

Tabulka 10 Koncentrace TCE po kultivaci kultury 6B indukované na fenolu

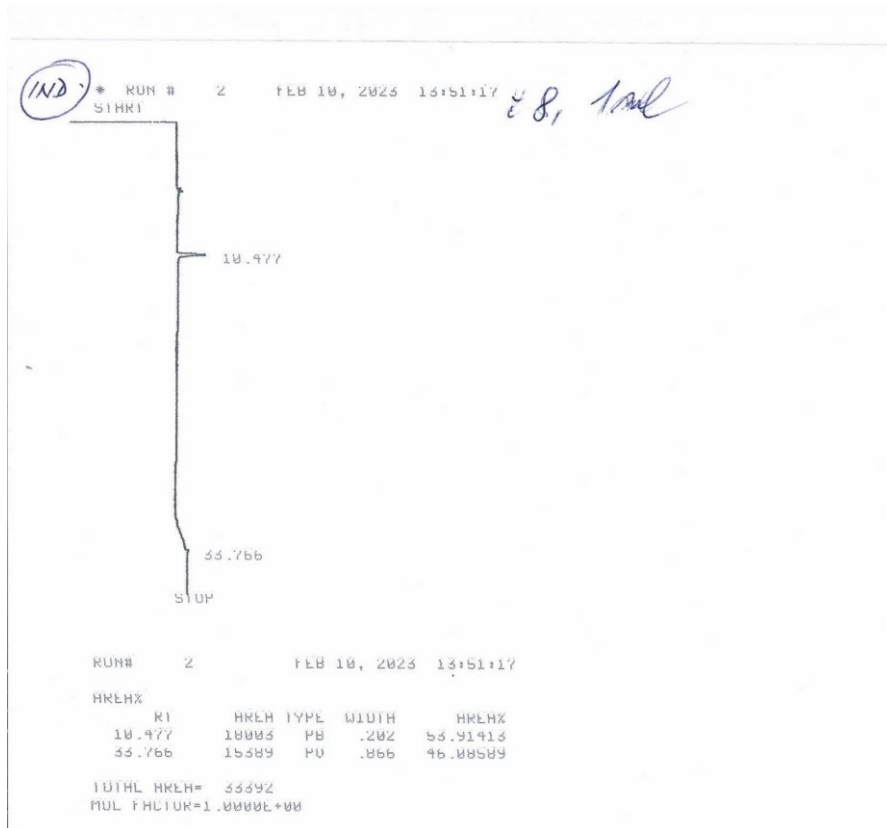
Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$)	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$) (přepočet)	Průměr TCE ($\mu\text{g/l}$)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
2 dny	874 826	667	3334,2	3334,2	-
5 dní	973 779	742	3711,3	3711,3	-
9 dní	907 045	691	3457,0	3374,5	116,7
9 dní	863 755	658	3292,0		
13 dní	459 414	350	1750,9	1652,5	139,2
13 dní	407 769	311	1554,1		
16 dní	397 759	303	1516,0	1464,6	72,7
16 dní	370 795	283	1413,2		
20 dní	280 363	214	1068,5	1134,8	93,7
20 dní	315 115	240	1201,0		
23 dní	282 152	215	1075,4	1104,9	41,8
23 dní	297 670	227	1134,5		



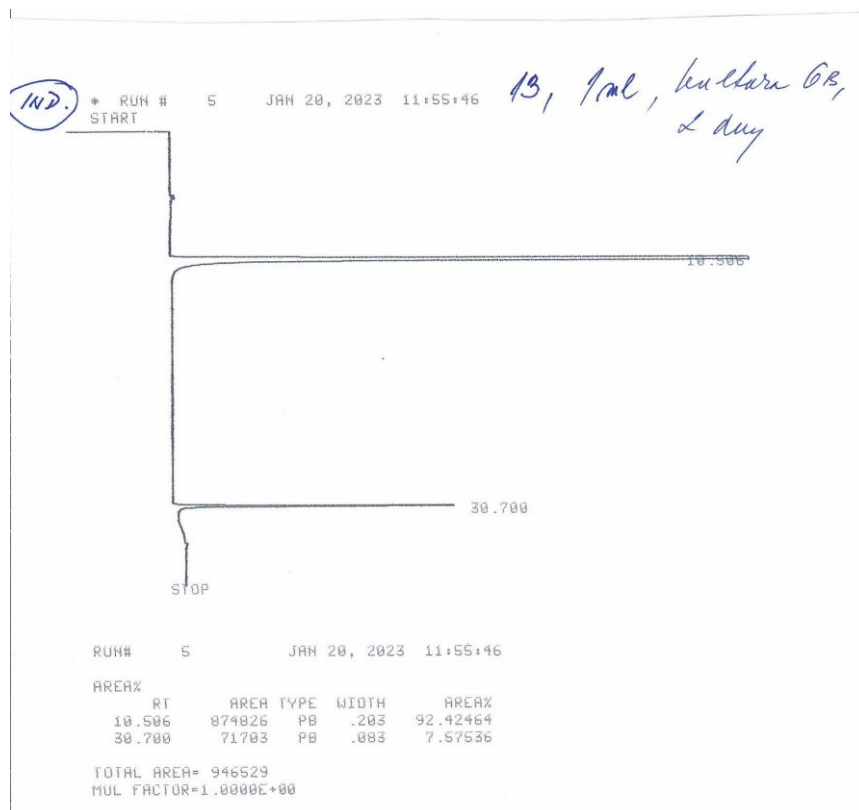
Obrázek 12 Průběh koncentrací TCE v pokusu s indukovanými kulturami 1A a 6B



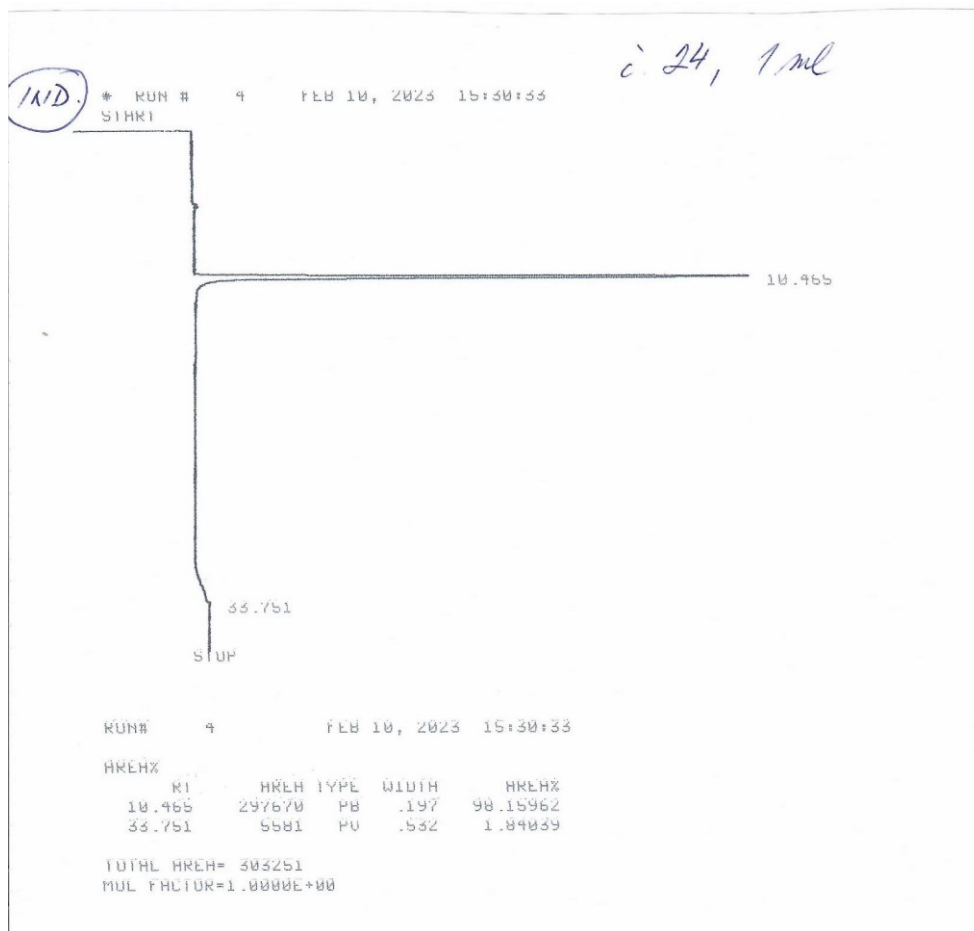
Obrázek 13 Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu (doba degradace 2 dny)



Obrázek 14 Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu (doba degradace 23 dní)



Obrázek 15 Chromatogram kultury 6B indukované na fenolu (doba degradace 2 dny)



Obrázek 16 Chromatogram kultury 6B indukované na fenolu (doba degradace 23 dní)

Tabulka 11 Průběh optických densit suspenzí (OD) v den měření TCE (vždy ve 2 vialkách)

Datum měření	Doba pokusu (dny)	Blanky	Kultura 1A	Kultura 6B
20.1.2023	2	0,1 + 0,1	0,1 + 0,1	0,1 + 0,1
23.1.2023	5	-	0,25 + 0,5*	0,1*
27.1.2023	9	-	1,7 + 1,7	1,1 + 0,1
31.1.2023	13	-	1,6 + 1,7	1,4 + 1,4
3.2.2023	16	-	1,6 + 1,7	1,4 + 1,5
7.2.2023	20	-	1,6 + 1,7	1,4 + 1,4
10.2.2023	23	0,1 + 0,1	1,6 + 1,6	1,4 + 1,4

U kultury 1A byla malá míra degradace TCE zaznamenána již 5. den a pokračovala určitou rychlostí do 16. dne, kdy degradace mírně zpomalila. Přesto rozklad TCE probíhal i dále a 23. den pokusu byl takřka veškerý TCE rozložen (odstranění 97,3%). Měření optických densit ukázala, že maxima růstu dosáhla kultura 1A již 9. den pokusu (density 1,7) a že tedy

ke spotřebování fenolu ve vialkách došlo u ní mezi 5. a 9. dnem inkubace. Tyto údaje tedy naznačují, že enzym potřebný k rozkladu TCE (fenol 2-monooxygenáza) zůstává aktivní i po spotřebování primárního substrátu v buňkách kultury ještě řadu dní. Kultura 6B měla zpočátku dlouhou lagovou fází, téměř 10 dní, poté byla zaznamenána výraznější degradace do 13. dne, následně však tato degradace do konce pokusu probíhala již jen zvolna.

Vizuálně i měřením densit bylo také patrné, že v počátečních fázích pokusu (zejména 5. den od nasazení pokusu) byl růst kultur v jednotlivých vialkách poněkud různý, u kultury 6B většinou slabší, kdy některé vialky (*) byly na úrovni zakalení blanků. Celkově je z tabulky 11 také patrné, že kultura 6B dosáhla nižších hodnot densit než kultura 1A.

4.5 Schopnost kultury 1A, indukované na fenolu s tryptonem, rozkládat TCE při vstupní koncentraci cca 3,5 mg/l

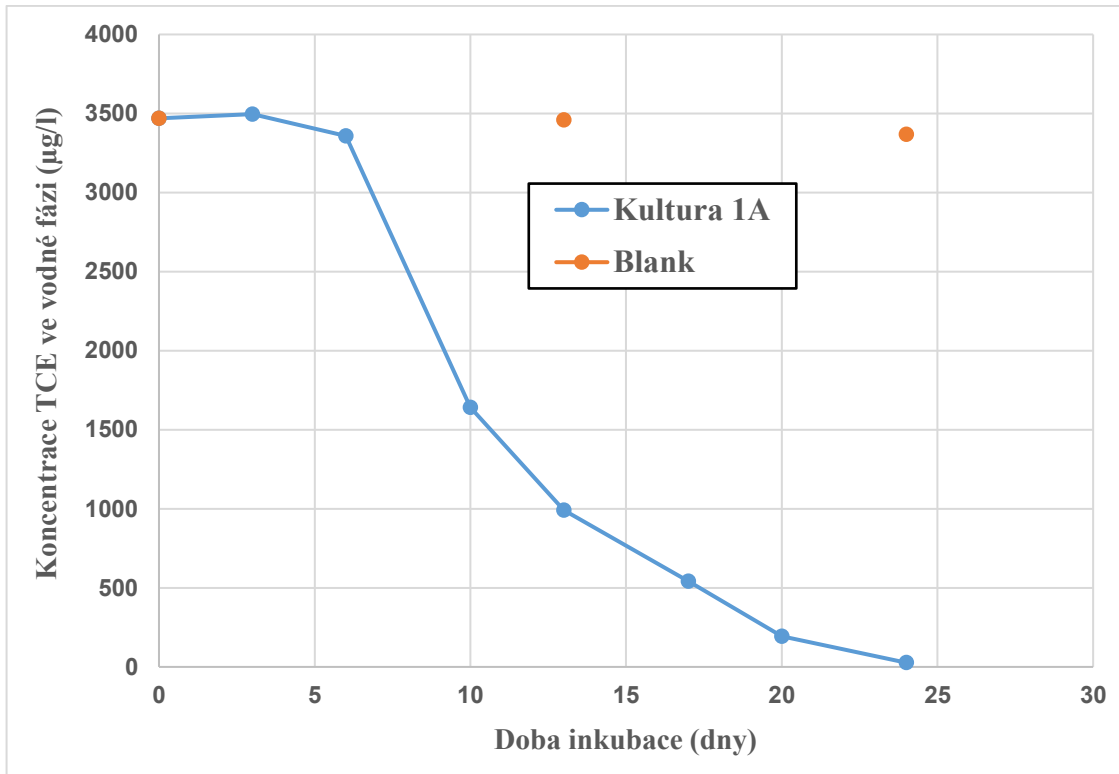
Dalším návrhem byl pokus již pouze s kulturou 1A, které se jevila v předešlých pokusech jako nejúčinnější. Tato kultura byla nejprve předinkubovaná na směsi fenolu (200 mg/l) a tryptonu (100 mg/l), který jí měl sloužit jako zdroj aminokyselin pro zlepšení odolnosti vůči toxickému TCE, a poté byla nasazena do pokusu degradace TCE ve vialkách s MM a fenolem. Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny v následujících tabulkách 12 a 13 a grafu na obr. 17. Zde byl také pomocí optické density sledován růst kultury po naočkování do vialek s fenolem a TCE. Tyto výsledky jsou pak uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 12 Koncentrace TCE blanků

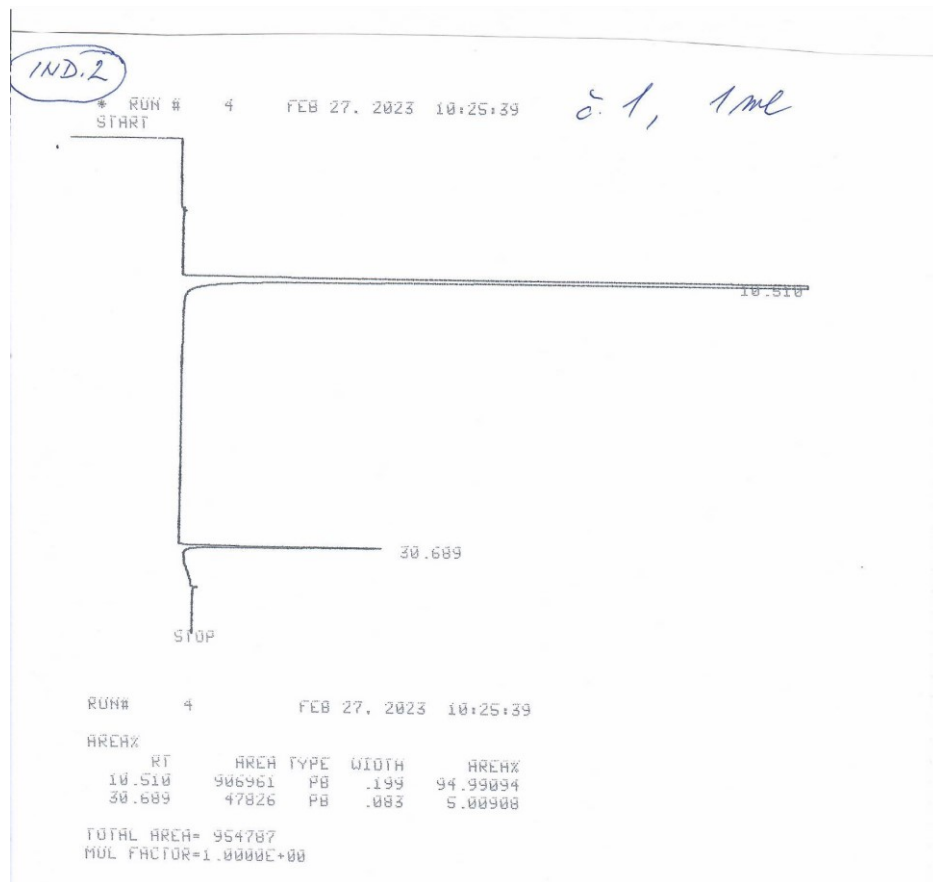
Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE (µg/l)	Koncentrace TCE (µg/l) (přepočet)	Průměr TCE (µg/l)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
3 dny	843 882	643	3216,3	3304,0	124,0
3 dny	889 902	678	3391,7		
13 dní	918 697	700	3501,4	3459,8	58,8
13 dní	896 862	684	3418,2		
24 dní	poškozené víčko			3367,6	-
24 dní	883 593	674	3367,6		

Tabulka 13 Koncentrace TCE po kultivaci kultury 1A, indukované na fenolu s tryptonem

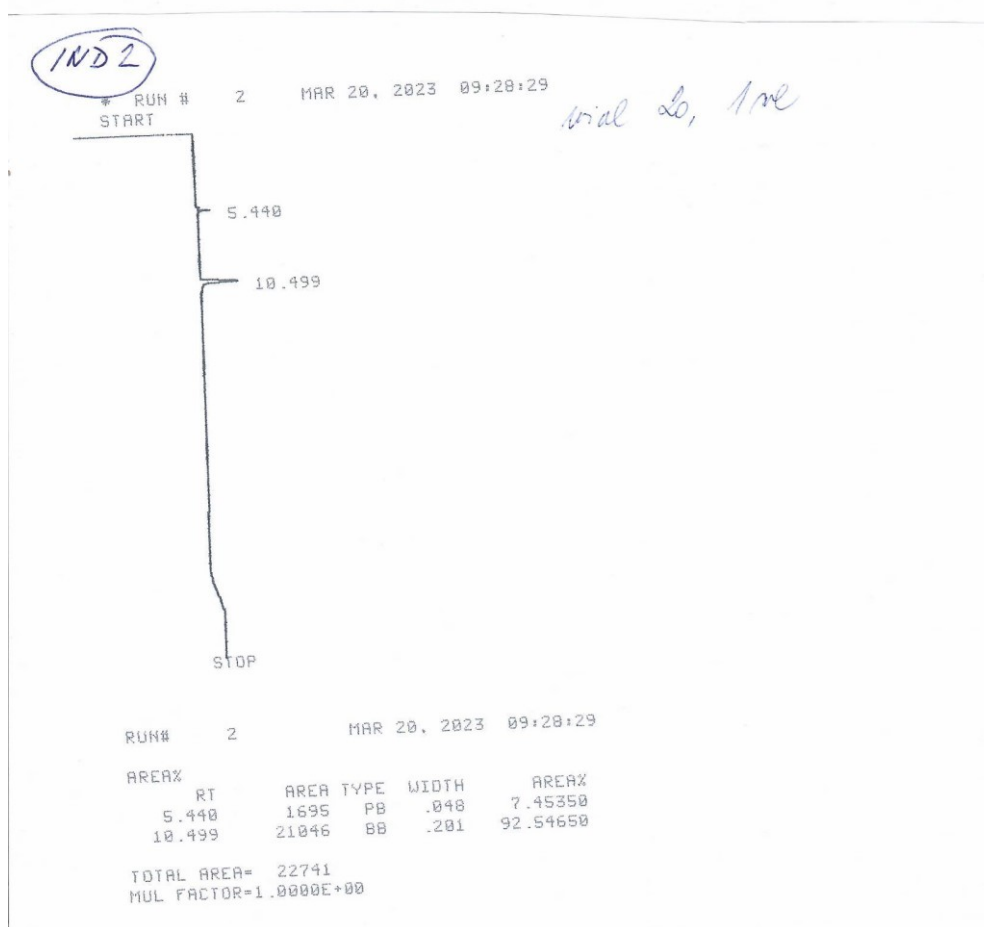
Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$)	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$)	Průměr TCE ($\mu\text{g/l}$)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
3 dny	906 961	691	3456,7	3496,2	37,4
3 dny	918 542	700	3500,8		
3 dny	926 494	706	3531,1		
6 dní	880 000	671	3353,9	3358,3	12,4
6 dní	884 812	674	3372,3		
6 dní	878 643	670	3348,7		
10 dní	538 589	411	2052,7	1642,3	444,7
10 dní	447 185	341	1704,3		
10 dní	306 947	234	1169,9		
13 dní	281 515	215	1072,9	991,0	279,0
13 dní	320 070	244	1219,9		
13 dní	178 491	136	680,3		
17 dní	220 435	168	840,1	542,0	284,8
17 dní	71 550	55	272,7		
17 dní	134 614	103	513,0		
20 dní	7 724	6	29,4	193,5	310,1
20 dní	144 610	110	551,1		
20 dní	0	0	0,0		
24 dní	0	0	0,0	26,7	46,3
24 dní	21 046	16	80,2		
24 dní	0	0	0,0		



Obrázek 17 Průběh koncentrací TCE v pokusu s indukovanou kulturou 1A



Obrázek 18 Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu s tryptonem (doba degradace 3 dny)



Obrázek 19 Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu s tryptonem (doba degradace 24 dní)

Tabulka 14 Průběh optických densit suspenzí (OD) v den měření TCE (vždy ve 3 vialkách)

Datum měření	Doba pokusu (dny)	Blanky	Kultura 1A
27.2.2023	3	0,0 + 0,0	0,2 + 0,3 + 0,2
2.3.2023	6	-	0,6 + 0,5 + 0,6
6.3.2023	10	-	2,0 + 2,0 + 2,0
9.3.2023	13	0,0 + 0,0	1,9 + 2,0 + 1,9
13.3.2023	17	-	1,9 + 1,9 + 1,9
16.3.2023	20	-	1,9 + 1,9 + 1,8
20.3.2023	24	0,0 + 0,0	1,9 + 1,8 + 1,9

Výsledky uvedené v tabulce 13 poukazují na to, že kultura 1A rozložila po 24 dnech 99,2 % TCE z jeho výchozí koncentrace kolem 3,5 mg/l, tudíž odstranění TCE s kulturou 1A předinkubovanou na fenolu s tryptonem se prokázalo jako účinné. Velmi slabá degradace byla zaznamenána již 6. den a pokračovala zvolna až do 24. dne. Jak je vidět v tabulce 14, hodnoty optických densit se zvyšují do 10. dne pokusu, následně zůstávají do konce pokusu téměř stejné.

4.6 Schopnost kultury 1A, předinkubované na fenolu s tryptonem, rozložit TCE při vstupní koncentraci TCE nad 5 mg/l

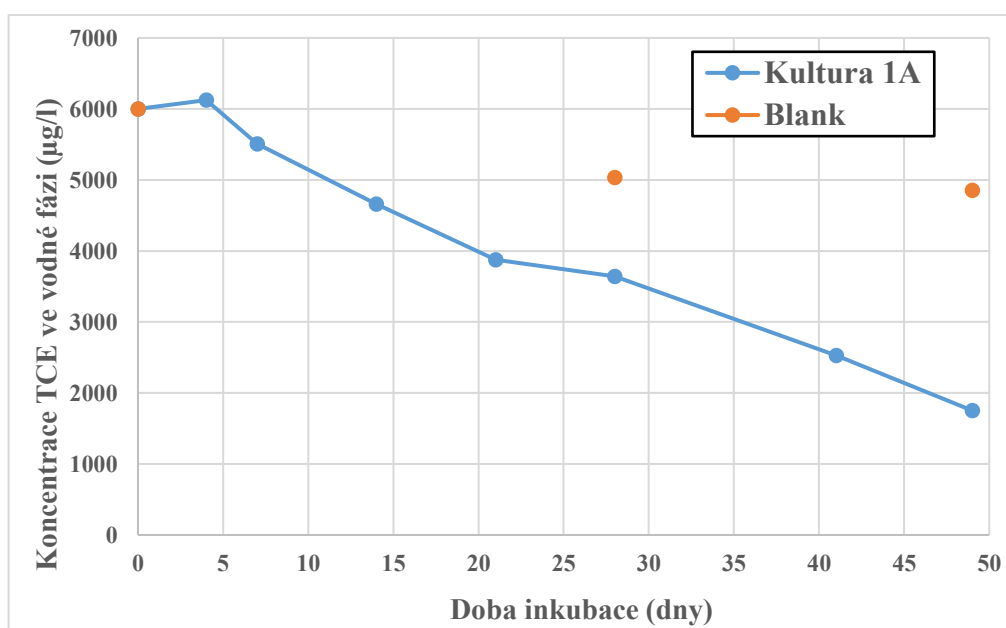
V tomto závěrečném pokusu byla použita kultura 1A opět předinkubovaná na fenolu (200 mg/l) s tryptonem (100 mg/l). U tohoto pokusu byla také připravena rozsáhlejší řada pokusných vialek tak, aby degradace TCE mohla být sledována v různých časových intervalech a na základě toho byla sestavena degradační křivka. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách a také v grafu na obr. 20. Optická hustota inokula činila hodnoty 2,0.

Tabulka 15 Koncentrace TCE blanků

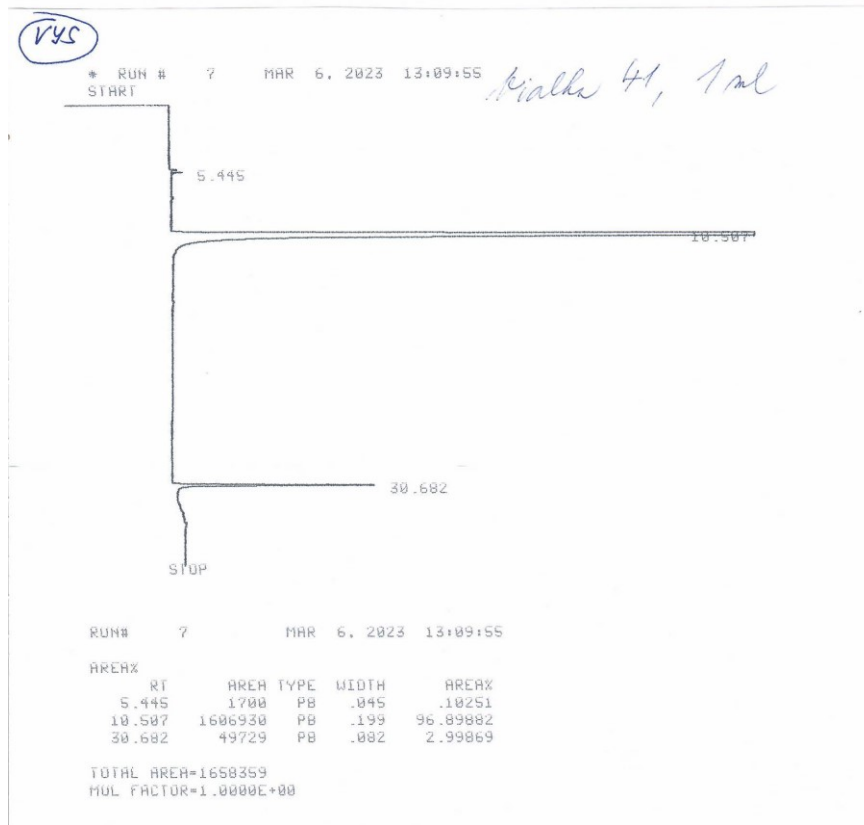
Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE (µg/l)	Koncentrace TCE (µg/l) (přepočet)	Průměr TCE (µg/l)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
4 dny	1 537 986	1 172	5861,7	5938,8	109,1
4 dny	1 578 465	1 203	6016,0		
28 dní	1 311 710	1 000	4999,3	5035,3	50,9
28 dní	1 330 607	1 014	5071,3		
49 dní	1 144 061	872	4360,3	4854,5	724,8
49 dní	1 492 041	1 137	5686,6		
49 dní	1 185 056	903	4516,6		

Tabulka 16 Koncentrace TCE po kultivaci kultury 1A, indukované na fenolu s tryptonem

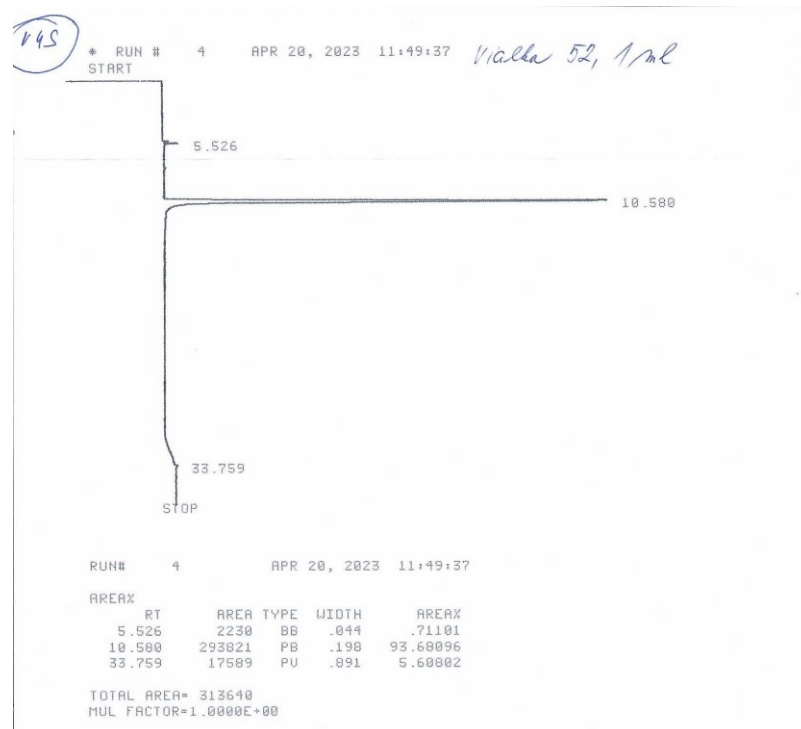
Doba pokusu	Plocha píku TCE	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$)	Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$)	Průměr TCE ($\mu\text{g/l}$)	Směrodatná odchylka
	Objem vzorku 1 ml		Objem vzorku 5 ml		
4 dny	1 606 930	1 225	6124,4	6124,4	-
7 dní	1 440 362	1 098	5489,6	5508,4	26,5
7 dní	1 450 204	1 105	5527,1		
14 dní	1 264 660	964	4820,0	4661,5	931,8
14 dní	960 503	732	3660,7		
14 dní	1 444 119	1 101	5503,9		
21 dní	534 751	408	2038,1	3877,9	1601,5
21 dní	1 301 265	992	4959,5		
21 dní	1 216 418	927	4636,1		
28 dní	242 006	184	922,3	3642,1	2377,7
28 dní	1 227 236	935	4677,3		
28 dní	1 397 631	1 065	5326,7		
41 dní	448 178	342	1708,1	2527,1	1158,1
41 dní	877 920	669	3346,0		
49 dní	616 612	470	2350,1	1752,2	615,8
49 dní	468 767	357	1786,6		
49 dní	293 821	224	1119,8		



Obrázek 20 Průběh koncentrací TCE v pokusu s předindukovanou kulturou 1A



Obrázek 21 Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu s tryptonem (doba degradace 4 dny)



Obrázek 22 Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu s tryptonem (doba degradace 49 dní)

Tabulka 17 Průběh optických densit suspenzí (OD) v den měření TCE

Datum měření	Doba pokusu (dny)	Blanky	Kultura 1A
6.3.2023	4	0,0 + 0,0	0,0
9.3.2023	7	-	0,5 + 0,4
16.3.2023	14	-	0,4 + 0,7 + 1,7
23.3.2023	21	-	1,7 + 0,4 + 0,3
30.3.2023	28	0,0 + 0,0	1,6 + 0,9 + 0,3
12.4.2023	41	-	1,3 + 1,1
20.4.2023	49	0,0 + 0,0 + 0,0	1,2 + 1,3 + 1,4

Z tabulky 15 je zřejmé, že v průběhu pokusu docházelo k částečnému abiotickému úniku těkavého TCE z vialek a že tedy bude potřebné věnovat tomuto jevu při případných pokusech v budoucnu určitou pozornost.

Pozorování růstu kultur ve vialkách v průběhu pokusu, a také výsledky uvedené v tabulkách 16 i 17, však ukázaly, že se kultura 1A inkubovaná na fenolu s tryptonem chovala při vysoké koncentraci TCE (nad 5 mg/l) velmi zvláště – růst kultury probíhal v jednotlivých vialkách velmi odlišně, v některých byl růst patrný již 7. nebo 14. den pokusu, v jiných však k růstu došlo až po 28 dnech. Tuto skutečnost lze také vyčíst z tabulky 17, kdy je patrné, že hustota buněk kultury dosáhla ve stejných časech v různých vialkách různé hodnoty. Důvod odlišné rychlosti růstu kultury v jednotlivých vialkách nebylo možné z tohoto pokusu a z provedených měření vyvodit, lze však vyslovit domněnku, že souvisí s toxicitou TCE ve vysoké koncentraci a v drobných rozdílech při přípravě vialek. Pokus však dokázal, že kultura 1A je principiálně schopna i vysoké koncentrace TCE významně snížit.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo ověřit schopnost gramnegativních bakterií degradovat trichloroethen při nízké teplotě 8°C, která se vyskytuje v podzemních vodách, jelikož se trichloroethen neustále vyskytuje v malých koncentracích v podzemních vodách a jeho působení má toxické až mutagenní účinky na organismus.

Byla provedena série šesti pokusů, kdy první tři pokusy se zabývaly schopností dříve vybraných kultur degradovat trichloroethen při jeho postupně se zvyšujících koncentrací. První pokus studoval schopnost kultur 1A, 5A, 6B, 6A a 12A degradovat trichloroethen při vstupní koncentraci 2,5 mg/l. Kultury 1A, 5A a 6B dokázaly rozložit 100% TCE z jeho výchozí koncentrace, zatímco kultury 6A a 12A rozložily jen 86 % a 72 %. Do dalších pokusů byly použity jen kultury 1A a 6B, jelikož měly oproti kultuře 5A rychlejší růst na fenolu. Uvedené kultury byly dále testovány v druhém pokusu na rozklad TCE při zvýšené koncentraci, a to kolem 3,5 mg/l. Zde došlo kulturou 1A po 26 dnech k 99,4% odstranění TCE. Kultura 1A prokázala tak významně lepší degradační schopnosti oproti kultuře 6B. Třetí pokus ze série zahrnoval kulturu 1A, testovanou při dále zvýšené koncentraci TCE nad 5 mg/l. Bylo prokázáno, že kultura rozložila po 61 dnech 78,1 % TCE z jeho výchozí koncentrace. Tato kultura však měla dlouhou lagovou fázi, proto bylo navrženo pracovat v dalších pokusech s kulturami 1A a 6B, předinkubovanými buď na fenolu, nebo následně na fenolu s tryptonem; také byla připravena rozsáhlejší řada pokusných vialek tak, aby degradace TCE mohla být sledována v různých časových intervalech a byly tak sestaveny degradační křivky. Současně byl v těchto pokusech pomocí optické density sledován růst obou kultur po naočkování do vialek s fenolem (200 mg/l) a TCE. Čtvrtý pokus se zabýval schopností kultur 1A a 6B indukovaných na fenolu degradovat TCE při vstupní koncentraci TCE okolo 3,5 mg/l. U kultury 1A byla slabá degradace zaznamenána již 5. den a pak rychleji pokračovala až do 16. dne, následně degradace zpomalila; vedla ke snížení koncentrace TCE o 97,3 % během 23 dnů. Kultura 6B měla zpočátku dlouhou lagovou fázi, téměř 10 dní, poté však byla zaznamenána rychlá degradace do 13. dne, následně tato degradace do konce pokusu probíhala již zvolna.

Ve zbývajících pokusech již bylo pracováno jen s kulturou 1A, která se jevila jako nejúčinnější při rozkladu TCE. Pátý pokus probíhal tak, že byla kultura 1A předinkubovaná na směsi fenolu (200 mg/l) a tryptonu (100 mg/l). Výsledkem bylo, že kultura 1A poté ve vlastním pokusu, při růstu na fenolu, rozložila po 24 dnech 99,2 % TCE z jeho výchozí koncentrace kolem 3,5 mg/l. Degradace byla zaznamenána již 6. den inkubace a pokračovala

zvolna až do 24. dne. Hodnoty ukazující růst kultury (optické density) se zvyšovaly do 10. dne pokusu, následně zůstávaly do konce pokusu téměř stejné. Tento pokus se prokázal jako účinný, proto bylo v závěrečném pokusu pracováno se zvýšenou koncentrací TCE nad 5 mg/l - v něm byla použita kultura 1A opět předinkubovaná na fenolu s tryptonem. Zde však bylo zjištěno, že růst kultury probíhal při této vysoké koncentraci TCE v různých vialkách značně různou rychlostí. Důvod, proč se tomu tak dělo, nebyl zjištěn, a proto by bylo vhodné tuto problematiku prověřit hlubším testováním v budoucnu. Přes uvedenou skutečnost prokázala kultura 1A schopnost za 49 dní snížit i tuto vysokou koncentraci TCE.

Celkově tato diplomová práce prokázala vysokou účinnost bakteriální kultury 1A odstraňovat kometabolicky trichloroethen při 8°C, po růstu na fenolu, a to při koncentracích TCE až 3,5 mg/l.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALVARINO, T., S. SUAREZ, J.M. LEMA a F. OMIL. Understanding the removal mechanisms of PPCPs and the influence of main technological parameters in anaerobic UASB and aerobic CAS reactors. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2014, **278**, 506-513 [cit. 2022-10-27]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2014.06.031

FABIÁNOVÁ, Tereza. *Biodegradace polycyklických aromatických uhlovodíků ve dřevě ošetřeném kreozotovým olejem* [online]. Praha, 2010 [cit. 2023-02-23]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/31317/120011542.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.

FURUKAWA, K., Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants. 2000. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 244e249

GIBSON, D.T., R.E. PARALES. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. 2000. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 236e243

HAN, Ping, Yaochun YU, Lijun ZHOU, et al. Specific Micropollutant Biotransformation Pattern by the Comammox Bacterium *Nitrospira inopinata*. *Environmental Science & Technology* [online]. 2019, **53**(15), 8695-8705 [cit. 2022-10-27]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.9b01037

HAZEN, Cometabolic bioremediation. In: Timmis, K.N. (Ed.) 2010, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer-Verlag, Heidelberg

CHEN, S.H., M.D. AITKEN, Salicylate stimulates the degradation of highmolecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. 1999. *Environmental Science & Technology* 33, 435e439

CHEN, Yan-Min, Tsair-Fuh LIN, Chih HUANG a Jui-Che LIN. Cometabolic degradation kinetics of TCE and phenol by *Pseudomonas putida*. *Chemosphere* [online]. 2008, **72**(11), 1671-1680 [cit. 2022-11-07]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2008.05.035

ISHIDA, Hiroaki a Kanji NAKAMURA. Trichloroethylene degradation by *Ralstonia* sp. KN1-10A constitutively expressing phenol hydroxylase: Transformation products, NADH limitation, and product toxicity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2000, **89**(5), 438-445 [cit. 2022-11-07]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(00)89093-3

JUHASZ A.L., R. NAIDU, Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a] pyrene. 2000. *International Biodeterioration & Biodegradation* 45, 57e88

KENNES-VEIGA, David M., Lorena GÓNZALEZ-GIL, Marta CARBALLA a Juan M. LEMA. Enzymatic cometabolic biotransformation of organic micropollutants in wastewater treatment plants: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2022, **344** [cit. 2022-10-27]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.126291

KRAJČÍŘIKOVÁ, Sabina. *Degradace trichloroethenu bakterií Comamonas testosteroni za snížených teplot*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2022, 93 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/51241>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.

LINHARTOVÁ, Karolína. *Studium psychrofilních bakterií rostoucích na fenolu*. Zlín, 2023. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

MEN, Yujie, Stefan ACHERMANN, Damian E. HELBLING, David R. JOHNSON a Kathrin FENNER. Relative contribution of ammonia oxidizing bacteria and other members of nitrifying activated sludge communities to micropollutant biotransformation. *Water Research* [online]. 2017, **109**, 217-226 [cit. 2022-10-27]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2016.11.048

NZILA, Alexis. Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environmental Pollution* [online]. 2013, **178**, 474-482 [cit. 2022-10-27]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2013.03.042

POLESEL, Fabio, Elena TORRESI, Luca LOREGGIAN, Mònica Escolà CASAS, Magnus CHRISTENSSON, Kai BESTER a Benedek Gy. PLÓSZ. Removal of pharmaceuticals in pre-denitrifying MBBR – Influence of organic substrate availability in single- and three-stage configurations. *Water Research* [online]. 2017, **123**, 408-419 [cit. 2022-10-27]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2017.06.068

SHUKLA, Awadhesh Kumar, Siddh Nath UPADHYAY a Suresh Kumar DUBEY. Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2012, **34**(2), 101-114 [cit. 2022-11-07]. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.3109/07388551.2012.727080

YE D., M.A. SIDDIQI, A.E. MACCUBIN, S. KUMAR, H.C. SIKKA, Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucomobilis*. 1996. *Environmental Science & Technology* 30, 136e14

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BcP	Bakalářská práce
CO	Oxid uhelnatý
CO ₂	Oxid uhličitý
ČOV	Čistírny odpadních vod
DCE	Dichlorethylen
ECD	Detektor elektronového záchytu
FID	Plamenoionizační detektor
MM	Minerální médium
OD	Optická hustota
OMP	Organické mikropolutanty
PAH	Polyaromatické uhlovodíky
TCE	Trichloroethen
TP	Transformační produkty
TYA	Trypton Yeast Extract Agar
UV	Ultrafialové záření
VC	Vinylchlorid
VOC	Těkavé organické látky

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Strukturní vzorec benzo[a]pyrenu (vlevo), fenantrenu (uprostřed) a kyseliny salicylové (vpravo).....	12
Obrázek 2	Znázornění metabolické a kometabolické biontransformace OMP.....	15
Obrázek 3	Degradace TCE bakteriemi <i>Ralstonia</i> sp. KN2-10A.....	20
Obrázek 4	Densilometr.....	27
Obrázek 5	Koncentrátor (vlevo, plynový chromatograf (uprostřed) a integrátor se zapisovačem (vpravo).....	29
Obrázek 6	Kalibrační křivka pro stanovení TCE.....	33
Obrázek 7	Chromatogram kultury 1A po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE 2,5 mg/l	35
Obrázek 8	Chromatogram kultury 5A po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE 2,5 mg/l	36
Obrázek 9	Chromatogram kultury 6B po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE 3,5 mg/l (doba degradace 22 dní).....	39
Obrázek 10	Chromatogram kultury 6B po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE 3,5 mg/l (doba degradace 26 dní).....	40
Obrázek 11	Chromatogram kultury 1A po inkubaci, při vstupní koncentraci TCE nad 5 mg/l (doba degradace 61 dní).....	42
Obrázek 12	Průběh koncentrací TCE v pokusu s indukovanými kulturami 1A a 6B.....	44
Obrázek 13	Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu (doba degradace 2 dny).....	44
Obrázek 14	Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu (doba degradace 23 dní).....	45
Obrázek 15	Chromatogram kultury 6B indukované na fenolu (doba degradace 2 dny).....	45
Obrázek 16	Chromatogram kultury 6B indukované na fenolu (doba degradace 23 dní).....	46
Obrázek 17	Průběh koncentrací TCE v pokusu s indukovanou kulturou 1A.....	49
Obrázek 18	Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu s tryptonem (doba degradace 3 dny).....	49
Obrázek 19	Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu s tryptonem (doba degradace 24 dní).....	50

Obrázek 20 Průběh koncentrací TCE v pokusu s indukovanou kulturou 1A.....	52
Obrázek 21 Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu s tryptonem (doba degradace 4 dny).....	53
Obrázek 22 Chromatogram kultury 1A indukované na fenolu s tryptonem (doba degradace 49 dní).....	53

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Příklady enzymů, které se podílí na aerobní, anoxické a anaerobní kometabolické biotransformaci několika OMP	18
Tabulka 2 Přehled kultur získaných v nedokončené diplomové práci M.Pekárka a účinnost jejich kometabolického rozkladu TCE při vstupní koncentraci 1,2 – 1,4 mg/l	23
Tabulka 3 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultur 1A, 5A a 6B.....	34
Tabulka 4 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultur 6A a 12A	37
Tabulka 5 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultury 1A.....	38
Tabulka 6 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultury 6B	38
Tabulka 7 Koncentrace TCE blanků a TCE po kultivaci kultury 1A	41
Tabulka 8 Koncentrace TCE blanků s fenolem	42
Tabulka 9 Koncentrace TCE po kultivaci kultury 1A indukované na fenolu	43
Tabulka 10 Koncentrace TCE po kultivaci kultury 6B indukované na fenolu.....	43
Tabulka 11 Průběh optických densit suspenzí (OD) v den měření TCE (vždy ve 2 vialkách).....	46
Tabulka 12 Koncentrace TCE blanků.....	47
Tabulka 13 Koncentrace TCE po kultivaci kultury 1A, indukované na fenolu s tryptonem	48
Tabulka 14 Průběh optických densit suspenzí (OD) v den měření TCE (vždy ve 3 vialkách)	50
Tabulka 15 Koncentrace TCE blanků.....	51
Tabulka 16 Koncentrace TCE po kultivaci kultury 1A, indukované na fenolu s tryptonem	52
Tabulka 17 Průběh optických densit suspenzí (OD) v den měření TCE	54

