

# Studium psychrofilních bakterií rostoucích na fenolu

Karolína Linhartová

---

Bakalářská práce  
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Karolína Linhartová**  
Osobní číslo: **T22674**  
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**  
Specializace: **Ochrana životního prostředí**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Studium psychrofilních bakterií rostoucích na fenolu**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte rešerši zaměřenou na výskyt fenolických látek v přírodě a na druhy bakterií využívající fenol ke svému růstu.
2. Ověřte základní vlastnosti psychrofilních bakterií rostoucích na fenolu, dříve získané na FT UTB.
3. Experimentálně ověřte schopnosti těchto bakterií využívat fenol za různých teplot a v různých koncentracích.
4. Získané poznatky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v tištěné i elektronické formě v řádném termínu.

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

**Seznam doporučené literatury:**

R. Margesin a kol.: Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 2013, 185-191.

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

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

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

L.S.

---

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

---

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

Ve Zlíně dne 17. února 2023

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Práce se zabývala rozkladem fenolu za pomoci 6 bakteriálních kultur, získaných z různých vodních zdrojů ve zlínském kraji. Pokusy byly prováděny za snížené teploty (8 °C), jelikož zmíněný fenol místy kontaminuje podzemní vody, kde se často teplota pohybuje okolo nebo pod 10 °C. U uvedených bakteriálních kultur byly prováděny růstové testy při koncentracích fenolu 100 až 500 mg/l, a to s různou předinkubací (na R2A agaru či na fenolu). Dvě kultury byly schopny růstu při všech koncentracích fenolu, zbývající jen při koncentracích 300 – 350 mg/l. Na závěr, po provedení biochemických testů, byly kultury předběžně identifikovány jako zástupci bakteriálního rodu *Acinetobacter*.

Klíčová slova: Bakterie, fenol, psychrofilní, růst

## **ABSTRACT**

The thesis dealt with the degradation of phenol by 6 bacterial strains obtained from various water sources in the Zlín region. The experiments were carried out at a low temperature (8 °C), as the phenol may in some cases contaminate groundwater, where the temperature is often around or below 10°C. The mentioned bacterial strains were subjected to growth tests at phenol concentrations of 100 to 500 mg/l, with different type of pre-incubation (on R2A agar or on phenol). Two strains were able to grow at all phenol concentrations, other strains only at concentrations of 300-350 mg/l. Finally, after performing biochemical tests, the strains were tentatively identified as members of bacterial genus *Acinetobacter*.

Keywords: Bacteria, growth, phenol, psychrophilic

### Poděkování:

Za svou finální cestu k branám vzdělaných dlužím obrovské poděkování svému vedoucímu práce panu docentu Růžičkovi. Děkuji, že jste se mnou vydržel ty dlouhé hodiny konzultací a ty nekončící hodiny v laboratořích. Dokázal jste mi se vším poradit a vždy když Vás bylo nejvíce třeba, jste si na mne udělal čas. Ať byla výuka sebedelší, vždy jste došel s milým úsměvem na tváři čelit společnému nepříteli. Dále bych ráda chtěla poděkovat profesorskému sboru technologické fakulty za to, že nám každý předal střípek svého moudra. Na závěr bych také chtěla poděkovat své rodině za podporu a důvěru.

„Pamatuj si, že dokud budeme generálům platit víc než učitelům, nebude na světě mír.“

-Jan Masaryk-

„Když mi bylo 5 let, matka mi neustále říkala, že štěstí je klíčem k životu. Když jsem šel do školy, ptali se mě, co chci být, až vyrostu. Napsal jsem „šťastný“. Řekli mi, že jsem úkol nepochopil, a já jim řekl, že oni nepochopili život.“

-John Lennon-

„Učitel ti může otevřít dveře, ale vstoupit do nich musíš ty sám.“

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

# OBSAH

ÚVOD .....	9
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1 FENOL A FENOLICKÉ LÁTKY .....</b>	<b>11</b>
1.1 FENOL.....	11
1.2 PŘÍRODNÍ FENOLICKÉ LÁTKY .....	13
1.2.1 Aromatické aminokyseliny .....	13
1.2.2 Lignin.....	14
1.2.3 Flavonoidy (anthokyany).....	15
1.2.4 Taniny .....	17
1.2.5 Karotenoidy.....	18
1.2.6 Huminové kyseliny.....	20
<b>2 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE FENOLU ZA NÍZKÝCH TEPLOT .....</b>	<b>23</b>
2.1 DEGRADACE UHLOVODÍKŮ A ENZYMOVÁ AKTIVITA BAKTERIÍ A KVASINEK ADAPTOVANÝCH NA CHLAD .....	23
2.2 BIODEGRADACE FENOLU BAKTERIEMI ODOLNÝMI VŮČI CHLADU IZOLOVANÝMI Z ALPINSKÝCH PŮD POHOŘÍ BINALOUD V ÍRÁNU.....	24
2.3 KINETIKA RŮSTU A BIODEGRADACE FENOLU PSYCHROTROFNÍM KMENEM <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> LY1 .....	25
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>27</b>
<b>3 MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>28</b>
3.1 POKUS I. - KONTROLA ČISTOTY BAKTERIÁLNÍCH KULTUR A POROVNÁNÍ JEJICH RŮSTU NA TYA A R2A AGARU .....	28
3.1.1 Postup.....	28
3.2 POKUS II. - SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTUR PŘI 8 °C, PŘI KONCENTRACÍCH FENOLU 0 – 250 MG/L .....	29
3.2.1 Postup.....	29
3.3 POKUS III. - SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTUR PŘI 8 °C, PŘI KONCENTRACÍCH FENOLU 300 – 500 MG/L .....	31
3.3.1 Postup.....	31
3.4 POKUS IV. - SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTUR PŘI 8 °C, PŘI KONCENTRACÍCH FENOLU 100 – 500 MG/L, PO RŮSTU INOKULA NA FENOLU.....	31
3.4.1 Postup.....	32
3.5 BIOCHEMICKÉ A RŮSTOVÉ VLASTNOSTI KULTUR.....	32
3.5.1 OXItest (MIKROLATEST) .....	32
3.5.2 NEFERMtest 24 (MIKROLATEST).....	33
3.5.3 Růst kultur při různých teplotách na TYA a R2A agaru .....	33
3.6 GRAMOVO BARVENÍ .....	34
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>35</b>

4.1	POKUS I. - KONTROLA ČISTOTY BAKTERIÁLNÍCH KULTUR A POROVNÁNÍ JEJICH RŮSTU NA TYA A R2A AGARU .....	35
4.2	POKUS II. - SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTUR PŘI 8 °C, PŘI KONCENTRACÍCH FENOLU 0 – 250 MG/L .....	37
4.3	POKUS III. - SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTUR PŘI 8 °C, PŘI KONCENTRACÍCH FENOLU 300 – 500 MG/L .....	42
4.4	POKUS IV. - SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTUR PŘI 8 °C, PŘI KONCENTRACÍCH FENOLU 100 – 500 MG/L, PO RŮSTU INOKULA NA FENOLU.....	49
4.5	BIOCHEMICKÉ A RŮSTOVÉ VLASTNOSTI KULTUR.....	60
4.5.1	OXItest (MIKROLATEST) .....	60
4.5.2	NEFERMtest 24 (MIKROLATEST).....	60
4.5.3	Růst kultur při různých teplotách na TYA a R2A agaru .....	61
4.6	GRAMOVO BARVENÍ .....	61
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>62</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>69</b>



## ÚVOD

Téma této bakalářské práce jsem si vybrala, jelikož jsem se chtěla zaměřit na biodegradabilitu chemické látky, která je rozložitelná činností mikrobiálních organismů. Po konzultaci s vedoucím mé bakalářské práce panem Růžičkou jsme dospěli k rozhodnutí, že se budeme soustředit na rozklad chemické látky s aromatickým jádrem, na fenol.

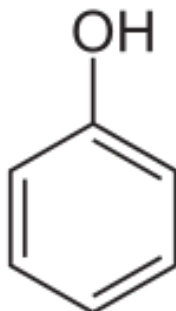
V dnešní době je to látka využívaná v mnoha odvětvích průmyslu a jsou tedy neustále hledány cesty, jak zamezit případné kontaminaci životního prostředí nebo ji za různých podmínek z prostředí odstranit. Kultury psychrofilních bakterií jsme si vybrali z důvodu, že pokud dojde ke kontaminaci fenolem, ten se potenciálně může dostat až do podzemních vod, kde je teplota zpravidla nízká (v Evropě okolo 9,5 °C v hloubce 10 m pod zemským povrchem). My jsme proto většinu pokusů prováděli za teploty 8 °C.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 FENOLA FENOLICKÉ LÁTKY

## 1.1 Fenol

„hydroxybenzen, benzol, kyselina karbolová“



Obrázek 1: Strukturní vzorec molekuly fenolu

### Charakteristické vlastnosti

Jedná se chemickou sloučeninu tvořenou jedním benzenovým jádrem s charakteristickou funkční hydroxylovou skupinou -OH. Běžně se označuje chemickým vzorcem  $C_6H_5OH$ . Vizuálně jde nejčastěji o bílou až bezbarvou krystalickou formou, která je však charakteristická a snadno identifikovatelná díky svému výraznému antiseptickému zápachu (podobný zápachu z nemocnic). Pokud je však látka méně kvalitní, vyskytuje se i v podobě narůžovělých krystalů či ve formě viskózní kapaliny. Látka má aromatický charakter, čili obsahuje šest cyklicky vázaných uhlíků spojených konjugovanými vazbami. Fenol je omezeně rozpustný ve vodě (při teplotě 25 °C dojde k rozpuštění 8,3 g fenolu/100ml vody) a zároveň je i voda rozpustná ve fenolu. Pokud směs vody a fenolu dosáhne kritické rozpouštěcí teploty 68,8 °C, jsou kapaliny vzájemně mísitelné bez ohledu na jejich poměr. Omezeně rozpustný je i v nepolárních organických rozpouštědlech jako je benzen, aceton, ethanol, chloroform. Při požití vysokého množství může působit jako jed. [1]

Tabulka 1: Přehled obecných vlastností fenolu [2]

molární hmotnost	94,11 g/mol
teplota varu	182 °C
teplota tání	41 °C
bod vzplanutí	75 °C
tenze par	48 Pa při 20 °C
hustota	1070 kg/m <sup>3</sup> při 20 °C

### Využití v průmyslu

Skrze své antiseptické účinky byl v minulosti hojně používán ve zdravotnictví pro snížení rizika nákazy infekcí. Od této metody se však upustilo díky riziku poleptání při styku s kůží. Dnes figuruje jen jako přídavná složka několika orálních anestetik. Má však zastání i v oblasti molekulární biologie, kdy je ve směsi s chloroformem užíván k izolaci DNA a RNA od bílkovin.

Fenol je však látka primárně využívaná v chemickém průmyslu pro výrobu pryskyřic, plastů, jejich aditiv a pesticidů. Ze směsi formaldehydu s fenolem byla vyrobena první syntetická pryskyřice bakelit. Díky mikrobicidním účinkům má uplatnění při průmyslovém zpracování kůže a dřeva.

V odvětví plastické chirurgie je využíván k odstraňování mrtvých vrstev kožních buněk. Také je díky němu možná chirurgická procedura k léčbě zarostlých nehtů tzv. fenolizace.

### Vliv na zdraví

Jedná se o velmi agresivní nebezpečnou sloučeninu, která způsobuje mnoho zdravotních obtíží. Je to látka lipofilního charakteru, tudíž je velice dobře absorbovatelná různými cestami do organismu, snadno proniká do buněk. Má leptavé účinky na různé tkáně, velice dobře se vstřebává. V organismu působí toxicky, dokonce může zapříčinit genetické poruchy. Napadá centrální nervovou soustavu, dýchací ústrojí a oběhový systém. Fenol se metabolizuje v ledvinách a játrech.

Nejčastěji se fenol dostane do organismu kontaktem s kůží, požitím nebo inhalací. Závažnost zdravotního poškození závisí na koncentraci polutantu, která do těla pronikne a zdali se jedná o akutní či chronickou expozici. V obou případech mohou nastat vážně zdravotní komplikace.

Mezi symptomy vyvolané intoxikací organismu můžou být bolesti hlavy, zvracení, křeče, teploty, dýchací potíže, pobledlost a mnoho dalších. Ve vážných případech může nastat i smrt.

Pokud dojde ke styku fenolu s kůží nebo okem je první pomocí rychlé vypláchnutí postiženého místa vodou po interval alespoň 10 minut nebo v lepším případě polyethylenglykolem po dobu alespoň půl hodiny. [3]

## 1.2 Přírodní fenolické látky

Slovem fenoly se nesprávně označují chemické látky s jedním aromatickým jádrem a hydroxylovou funkční skupinou, často je myšlena celá třída organických sloučenin. Při biologickém rozkladu mrtvé organické hmoty v přírodě dochází činností mikroorganismů k rozkladu nejen snadno rozložitelných organických sloučenin (bílkoviny, sacharidy, lipidy, heterocyklické látky aj.), ale i k degradaci těchto fenolických látek. Není tedy divu, že výskyt mikroorganismů schopných uskutečňovat rozklad fenolu není nijak vzácný. [4]

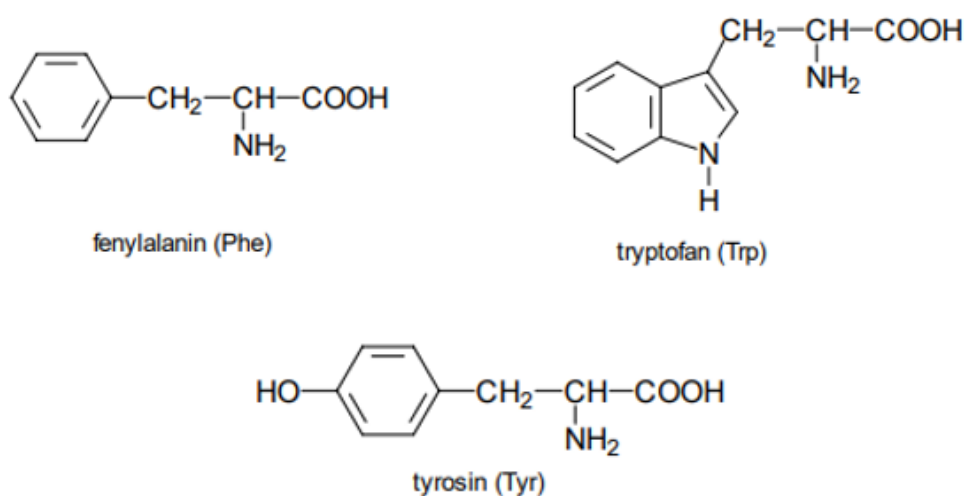
V dalším textu jsou uvedeny příklady některých význačných skupin fenolických látek vyskytujících se v přírodě.

### 1.2.1 Aromatické aminokyseliny

Aminokyseliny jsou látky, které se přirozeně vyskytují v tělech rostlin, živočichů i mikroorganismů. Jde o základní stavební jednotky bílkovin, čili tvoří tělesnou hmotu organismů. Všeobecně je nám známo přes 20 aminokyselin, avšak aromatické jádro obsahují pouze 3 z nich. Konkrétně se jedná o fenylalanin (Phe), tyrosin (Tyr) a tryptofan (Trp). Hrají velmi důležitou roli v biochemii organismů, jsou totiž prekurzory řady významných látek (pigmentů, mediátorů, hormonů).

Rozdělují se podle charakteru jejich postranního řetězce, kde fenylalanin a tryptofan mají řetězec nepolárního charakteru a tyrosin polárního.

Fenylalanin a tryptofan jsou esenciální aminokyseliny, které si lidský organismus nedokáže sám syntetizovat a musí být tedy přijaty v potravě. [5]

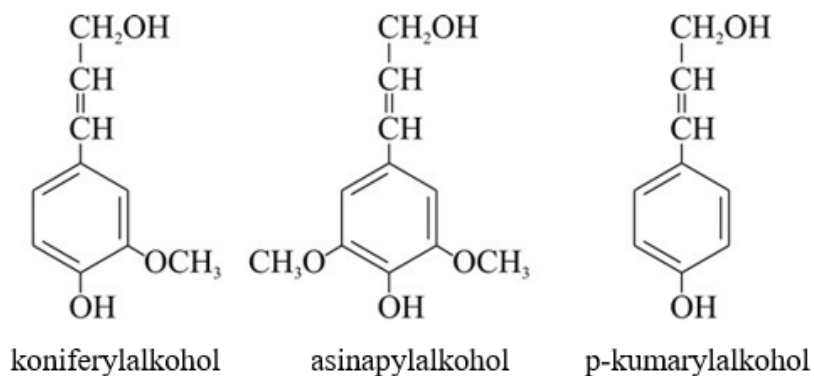


Obrázek 2: Chemické struktury aromatických aminokyselin

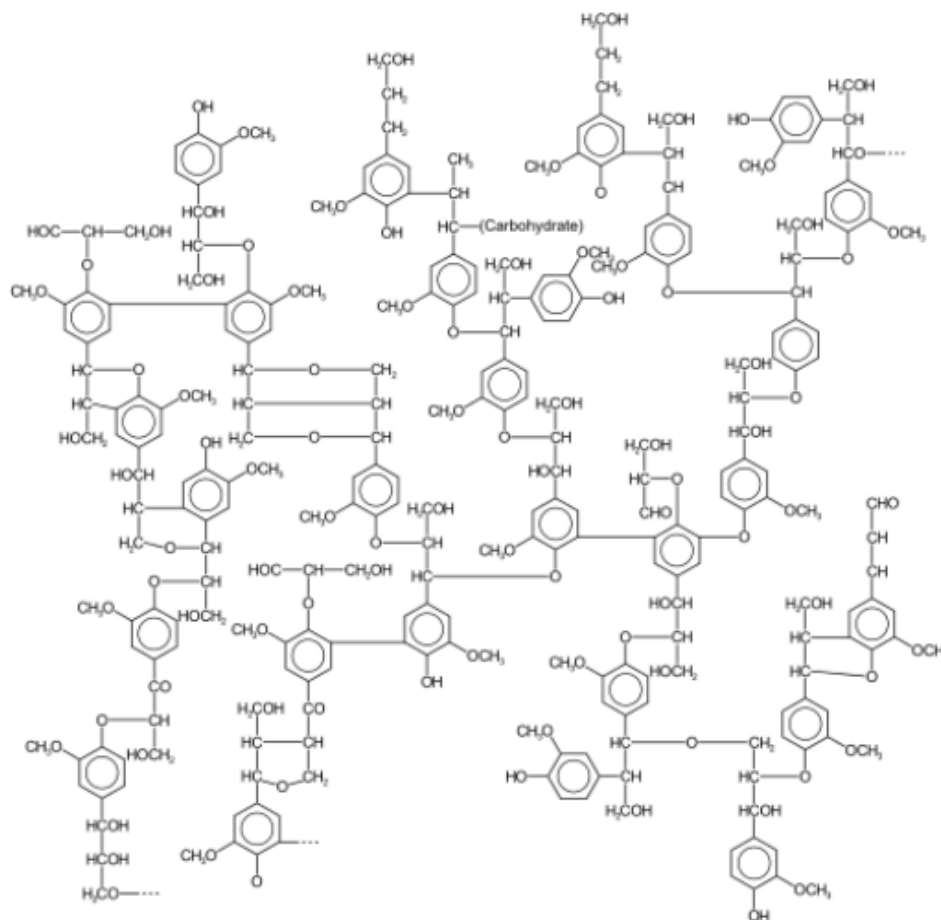
### 1.2.2 Lignin

Jedná se o hydrofobní amorfni makromolekuly nacházející se v pletivech řady vyšších rostlin. Tvoří důležitou část dřeva, která zprostředkovává lignifikaci buněčných stěn (v tlaku dodává pevnost) a zajišťuje zpevnění mezibuněčných vláken. Ve dřevě je lignin pravděpodobně uchycen na polysacharidy a za jeho základní stavební jednotku bývají označovány deriváty fenylpropanu (p-kumarylalkohol, koniferylalkohol asinapylalkohol), které bývají spojeny etherovými můstky. Doposud není známě přesné chemické zobrazení. Lignin tvoří 26-35% hmotnosti dřeva, u jehličnatých stromů je nižší podíl ligninu než u listnatých. S 25 % tvoří druhou největší složku světové biomasy. Lignin je zároveň obsažen z 8 % v obilovinách, například v jejich stoncích a listech.

V papírenském průmyslu je odpadní látkou při chemickém zpracování buničiny. Díky své mnohotvárnosti je chemicky složitě využitelný, dřevo různého původu má rozdílné složení. V energetickém odvětví je však využíván jako palivo. Při spalování dřeva je důležité množství ligninu – čím více, tím větší výhřevnost. Jeho další využití je chemická výroba vanilinu, což je dochucovadlo sladkých potravin nebo chemická výroba lodního paliva. [6]



Obrázek 3: Deriváty fenylpropanu

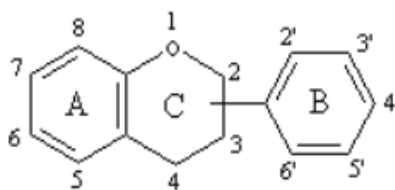


Obrázek 4: Pravděpodobná struktura ligninu

### 1.2.3 Flavonoidy (anthokyany)

Flavonoidy vznikají jako sekundární metabolity rostlin a jsou zodpovědné za jejich zabarvení. Je to skupina polyfenolů, vyskytujících se v zelených potravinách, ovoci, zelenině, semínkách, oříšcích, bylinkách, ve víně a kávě. Také jsou známé pro své antioxidační účinky a označují se jako vitamín P. V lidském organismu jsou velice prospěšné a jsou označovány jako „přírodním výživové biologické stimulatory“. Pozitivně ovlivňují zdraví svým účinkem na regulaci imunitního systému, reakci organismu na vnější stres, snižují vznik nádorových buněk a jsou také prevencí pro vznik kardiovaskulárních onemocnění. Ke dnešnímu dni je známo více než 4000 zástupců této skupiny. [7]

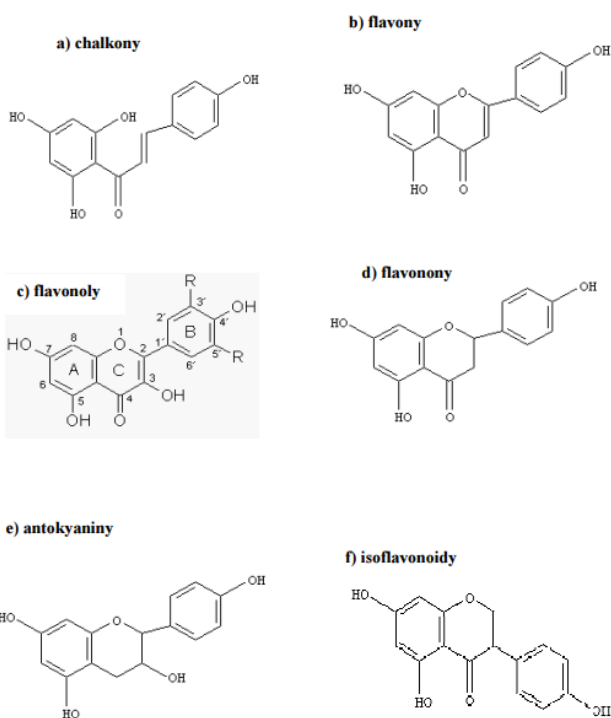
Základní jednotkou je flavan, který je složen ze dvou aromatických jader, jež jsou spojena pyranem. Obsahují cukernou i necukernou část molekuly (aglykom) a nejčastěji se tedy vyskytují ve formě O-glykosidů. Flavonoidy se rozřazují na základě funkčních skupin, které se na flavonový skelet substituují.



Obrázek 5: Chemická struktura Flavanu (A, B-aromatická jádra, C-pyran)

Rozdělení flavonoidů podle Winkel-Shirley [8]

1. Chalkony
2. Flavony
3. Flavonoly
4. Flavonony
5. Anthokyaniny
6. Taniny
7. Aurony
8. Isoflavonoidy
9. Stilbeny



Obrázek 6: Chemické zobrazení některých skupin flavonoidů



#### 1.2.4 Taniny

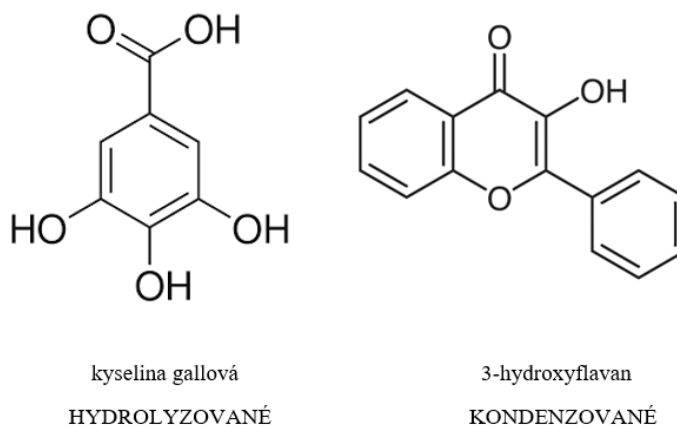
Jedná se o organické sloučeniny spadající do třídy polyfenolů a vznikající rovněž jako sekundární metabolity rostlin. Řadí se mezi polymery, z čehož vyplývá, že mají vysokou relativní molekulovou hmotnost (500-3000 g.mol<sup>-1</sup>). Součástí jejich struktury je velké množství fenolových hydroxylových skupin, které spolu s proteiny tvoří nerozpustné komplexy. V ústech se dají identifikovat dle své trpké až svíravé chuti. Na jejich reakci má značný vliv množství fenolových skupin a primární, sekundární, terciální struktura bílkovin. [9]

Taniny jsou v čisté formě rozpustné ve vodě a vytváří v ní koloidní roztoky. Mezi jejich další známá rozpouštědla se řadí aceton a alkoholy.

Jsou známé také pod označením třísloviny. Toto pojmenování je odvozeno od slova tříslo, což je látka, která má nejčastěji práškovou či vločkovou formu a užívá se k vydělávání (činění) kůží. Tříslo se nejčastěji vyrábí rozdrčením kůry nebo jiných složek rostlin a má podle svého původu nažloutlé nebo nahnědlé zbarvení. [10]

Vyskytují se v různých částech (v jejich listech, kořenech i plodech) dvouděložných rostlin čeledi růžovitých, bobovitých, rdesnovitých, vrbovitých, ale nejvyšší obsah se nachází v kůrách stromů. Svou trpkostí působí jako prevence proti okusu býložravci a hmyzem, dále také jako ochrana proti mikroorganismům.

Taniny dělíme do dvou hlavních skupin. Hydrolyzované taniny jsou tvořeny sacharidy, na kterých je navázáno několik monomerních esterů kyseliny gallové, takzvané polygalloyestery. Kondenzované se naopak skládají z polymerů flavonoidních látek, kde se nejčastěji vyskytuje sloučenina 3-hydroxyflavan. Směs těchto dvou základních skupin se označuje jako komplexní taniny.



Obrázek 7: Struktury monomerních jednotek taninů

Mají široké pole využití v potravinářském průmyslu. Často jsou využívány jako aditiva v pivovarnictví a vinařství, kde zabraňují vzniku bílkovinových zákalů. Dále se v tomto odvětví užívají jako čířidla. V oblasti medicíny se s nimi můžeme potkat díky jejich antiseptickému, protizánětlivému a antioxidačnímu účinku. Jsou také užívána jako léky na odvodnění, k prevenci průjmu nebo při léčbě trávicího traktu. Při otravách sloučeninami těžkých kovů jsou podávány jako antidota, jelikož mají schopnost poutat je do nerozpustných komplexů. V kožedělném průmyslu slouží při vydělávání kůží. [9]

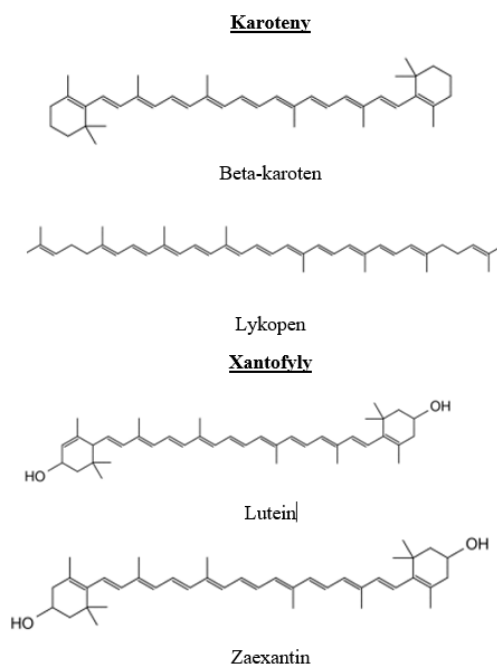
### 1.2.5 Karotenoidy

Jedná se o přírodní organická barviva, které se nacházejí v tělech mnoha živých organismů. Můžeme se s nimi setkat se v hubách, živočiších, rostlinách i mikroorganismech. Mají lipofilní charakter a jsou dobře rozpustné v tucích a nepolárních rozpouštědlech. Řadí se do skupiny tetraterpenoidů a skládají se z osmi zbytků isoprenu (oligomer). Ke dnešnímu dni je známo více než 700 druhů karotenoidů. Jakožto pigmenty dosahují různých odstínů od světle žluté po krvavě červenou.

Některé organismy (např. fotosyntetizující rostliny) jsou schopné si je syntetizovat uvnitř svých těl, zato jiné je musí přijímat v potravě. Většinou je to způsobeno absencí enzymu, který k syntéze karotenoidů napomáhá. [11]

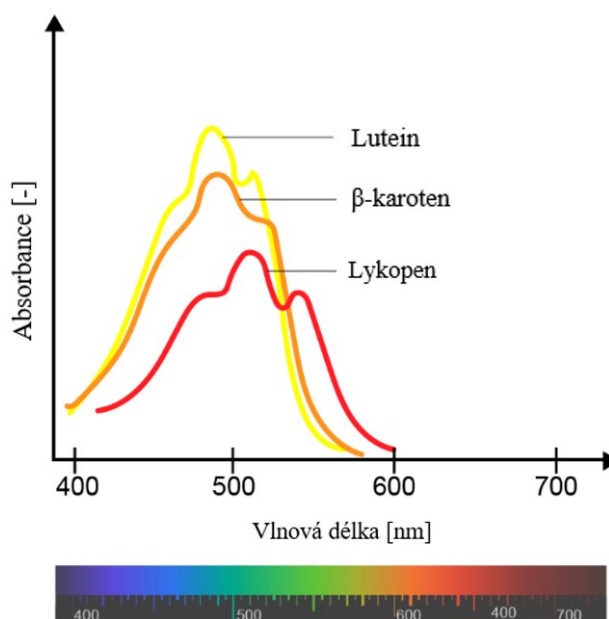
Běžně jsou karotenoidy do dvou skupin, a to na karoteny a xantofyly. Karoteny nejsou substituovány. Jedná se o nepolární uhlovodíky a nejznámější zástupci jsou lykopen a beta-karoten. Beta-karoten má oranžové zbarvení, je znám jako prekurzor vitamínu A a vyskytuje

se v kořenové zelenině (např. mrkvi) a v ovoci. Xantofyly mají ve své struktuře obsažen kyslík a mají naopak polární charakter. Dle typu kyslíkové skupiny se dále dělí na hydroxykarotenoidy, které obsahují hydroxylovou skupinu (alkohol) a oxokarotenoidy, které obsahují karbonylovou skupinu (keton). Kyslíkové karotenoidy nemají provitaminový charakter. [12]



Obrázek 8: Základní chemické struktury nejznámějších karotenoidů

V těle mají antioxidační účinek, kdy chrání buňky před působením volných radikálů ve zrakovém ústrojí a snižují riziko slepoty způsobené věkem. Lutein a zeaxantin napomáhají ostrému vidění. Působí preventivně před onkologickými onemocněními, kdy zamezují růstu rakovinotvorných buněk. Následně zabraňují vzniku kardiovaskulárních onemocnění, kdy lycopene a beta-karoten snižují vznik škodlivého cholesterolu. Ve fotosyntetizujících rostlinách hrají také důležitou roli jako aktivní barviva, kdy pomáhají zachytávat světelnou energii pro využití ve fotosyntéze. [13]



Obrázek 9: Znárodnění absorpance karotenoidů vůči vlnové délce

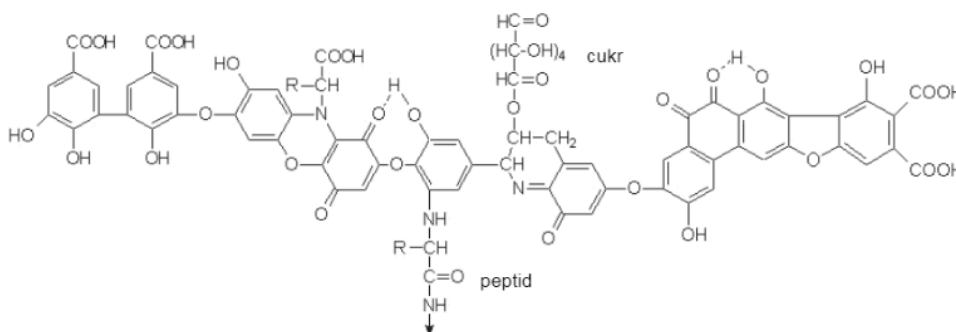
Z grafu lze určit, že výše zmíněné karotenoidy absorbují světelné záření o vlnové délce 400-600 nm, čili primárně modrou až zelenou část spektra. [14]

### 1.2.6 Huminové kyseliny

Jedná se o nejvíce rozšířené přírodní vysokomolekulární organické látky. Vznikají činností mikroorganismů a rozkladem organické hmoty (z velké části biologickým rozkladem odumřelých rostlin a živočichů). Obtížně podléhají dalšímu štěpení – jsou odolné vůči mikrobiální a fotosyntetické degradaci. Jsou obsaženy v zeminách, uhlí, sedimentech, vodách a jsou v hojné míře obsaženy v rašelině (80 % a více). V roztocích s vodou mají světle žluté, tmavě hnědé až černé zbarvení, je tedy možné je identifikovat pouhým okem.

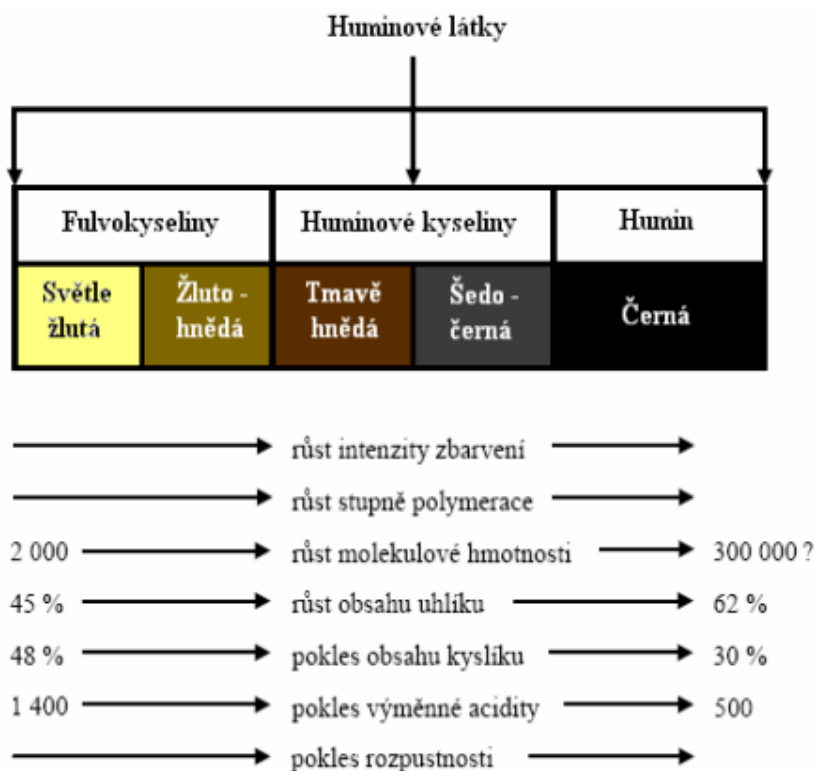
Mají důležitou roli v půdách a jejich obsah úzce závisí na klimatických podmínkách, způsobu zušlechťování půd a přítomnosti společenstev. Množství huminových látek v přírodních matricích se hojně využívá jako ukazatel kvality půd hlavně v zemědělské oblasti, a to nejen vzhledem k úrodnosti půd, ale také nabízí možnost řady dekontaminačních procesů – s hydroxidy a kovovými kationty tvoří stabilní komplexy.

Huminové kyseliny mají složité chemické struktury, které nejsou do dnešního dne zcela popsány. Jsou řazeny mezi komplexní makromolekuly, které obsahují i aromatická jádra. [15]



Obrázek 10: Potencionální chemická struktura huminových kyselin [16]

Dle míry rozpustnosti ve vodných roztocích se dělí do 3 skupin, a to na fulvonové (fulvinové) kyseliny, huminové kyseliny a huminy. Huminové kyseliny jsou rozpustné v zásaditém prostředí (pH vyšší než 7), fulvonové kyseliny jsou rozpustné za všech různých hodnot pH a huminy jsou zcela nerozpustné.



Obrázek 11: Rozdělení a vlastnosti huminových látek [16]

Fulvonové kyseliny mají molekulovou hmotnost 2000–8000 g·mol<sup>-1</sup>. Jsou dobře rozpustné za všech hodnot pH, jelikož ve své struktuře obsahují spoustu karboxylových, karbonylových, fenolických skupin a mají nižší množství aromatických jader. V roztocích s vodou se zbarvují do světle žluté až oranžové barvy.

Huminové kyseliny mají daleko vyšší molekulovou hmotnost než fulvokyseliny. Jsou dobře rozpustné pouze za vysokých hodnot pH v zásaditém prostředí a v kyselém jsou špatně rozpustné. Zbarvují se do tmavších odstínů, konkrétně do hnědé až tmavě šedé barvy.

Huminy dosahují nejvyšších hodnot molekulové hmotnosti a jsou zcela nerozpustné, jelikož obsahují pevné vazby s anorganickými sloučeninami půdy. V roztocích se zbarvují do černa.

[17]

## 2 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE FENOLU ZA NÍZKÝCH TEPLOT

Pro srovnání výsledků jsme se rozhodli zpracovat obdobné pokusy dostupné z Web of Science.

### 2.1 Degradace uhlovodíků a enzymová aktivita bakterií a kvasinek adaptovaných na chlad

V práci Margesinové (2003) byl zkoumán degradační potenciál 89 izolátů mikroorganismů, a to 61 bakterií a 28 kmenů kvasinek, kultivovaných za chladu z nekontaminovaných prostředí (ze vzorků kryokonitu z alpského ledovce a z dalších alpských prostředí), k využití reprezentativních frakcí ropných uhlovodíků (n-alkanů, monoaromatických a polycyklických aromatických uhlovodíků), tedy pro růst a pro produkci různých enzymů při 10°C. Účinnost bakterií a kvasinkových kmenů byla porovnána a bylo zjištěno, že rozsah růstových teplot kvasinek byl výrazně menší než rozsah bakteriálních kmenů (byl zkoumán rozsah 2 – 35°C na R2A agaru). Šedesát procent kvasinek, ale pouze osm procent bakterií, mohlo být klasifikováno jako opravdu psychrofilní, které nevykazují žádný růst nad 20 °C. Ostatní byly klasifikovány jako psychrotolerantní.

13 % bakteriálních kmenů využívalo při 10 °C fenol, fenantren nebo antracen pro růst. Z osmi bakteriálních kmenů, dva kmeny degradovaly až 10 mM fenolu (940 mg/l). Všechny kmeny degradující fenol produkovaly aktivitu katechol 1,2-dioxygenázy.

Rozklad fenolu byl sledován ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách obsahujících 10 ml minerálního média s 2,5 mM (235 mg/l) fenolu. Po inkubační době 7 dní při 10 °C byl zaznamenán růst. Zbytková koncentrace fenolu byla stanovována spektrometricky v UV oblasti při 270 nm a růst buněk byl sledován měřením optické hustoty. Rovněž byl zjišťován vliv teploty na biodegradaci fenolu, a to kultivací kmenů v minerálním médiu obsahujícím fenol při 1, 10 a 20 °C.

Výsledky ukázaly, že patnáct z testovaných 89 kmenů vykazovalo růst (zvýšení optické density při 600 nm > 0,2) při kultivaci s 2,5 mM fenolu. Osm z těchto kmenů byly bakterie. Všechny kmeny degradovaly 2,5 mM fenol během 3–7 dnů při 10 °C. Bakteriální kmeny byly identifikovány jako *Arthrobacter* spp. (dva kmeny) nebo *Pseudomonas* spp. (šest kmenů). U všech kmenů byla stanovena maximální růstová koncentrace fenolu.

Z osmi bakteriálních kmenů šest kmenů (*Pseudomonas* spp.) nedokázalo degradovat koncentrace fenolu vyšší než 2,5 mM (235 mg/l), zatímco dva kmeny (*Arthrobacter* spp.) degradovaly 10 mM fenolu během 7 dnů (tabulka v Příloze II).

Optimální teplota pro degradaci fenolu byla 20 °C pro všech osm bakteriálních kmenů. Tři bakterie (a také jeden kmen kvasinek) ukázaly ještě určitou produkci biomasy při 1 °C (tabulka v Příloze II).

Celkově autoři zjistili, že žádný z bakteriálních kmenů nemohl růst jak s alifatickými, tak s aromatickými uhlovodíky. Zvláštní pozornost byla v této studii věnována degradaci fenolu. Fenolické sloučeniny jsou běžnou složkou odpadních vod z ropného průmyslu.

V době publikace této práce bylo o degradátorech fenolu adaptovaných na chlad jen málo dostupných informací, např. jen Kotturi a kol. (1991) prokázali nízkoteplotní degradaci 10,6 mM fenolu (1 g/l) bakterií *Pseudomonas putida* tolerantní vůči chladu. V uvedené studii Margesinové bakteriální kmeny (*Arthrobacter* spp.) degradovaly až 10 mM. Jako důležité autoři zdůraznili, že kmeny zkoumané v této studii byly izolovány z chladného prostředí, které nebylo kontaminováno uhlovodíky, což ukazuje na všudypřítomnost bakterií a kvasinek degradujících uhlovodíky. [18]

## 2.2 Biodegradace fenolu bakteriemi odolnými vůči chladu izolovanými z alpinských půd pohoří Binaloud v Íránu

V práci Sepeherové (2019) byla zkoumána molekulární charakterizace bakterií degradujících fenol za účelem získání představ o jeho biodegradaci v chladných oblastech. Psychrotolerantní a psychrofilní bakterie byly izolovány z alpinských (horských) půd na severovýchodě Íránu. Tyto kmeny patřily k *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* spp. a *Shinella* spp. Získané kmeny byly schopny úplné degradace fenolu v koncentraci 200 mg/l při 20 °C. Navíc mohly degradovat fenol v koncentraci 400 mg/l a 600 mg/l za delší čas.

Vzorky půdy byly odebrány z nadmořských výšek 1000 a 2000 m v pohoří Binaloud nacházejícím se na severovýchodě Íránu. 10 g vzorku půdy bylo smícháno s 90 ml média minerálních solí a 200 mg/l fenolu jako jediného zdroje uhlíku. Médium bylo inkubováno při teplotě 15 °C a při 150 otáčkách za minutu ve tmě po dobu 7 dnů. Růst byl po celou dobu monitorován vizuálně i sledován optickou hustotou při 600 nm (OD<sub>600</sub>).



Psychrotolerantní bakterie byly rozpoznány při prokázaném růstu při 4 °C a 20 °C, ale ne při 37 °C. Zatímco psychrofilní bakterie byly identifikovány růstem izolátů při 4 °C, ale ne při 20 °C a 37 °C.

Ze 116 psychrotolerantních a psychrofilních izolátů bylo 19 izolátů schopno vyrůst v koncentracích fenolu 200, 400 a 600 mg/l. Nakonec bylo pro experimenty vybráno šest kmenů včetně jednoho psychrofilního (kmen BTR816) a pěti psychrotolerantních kmenů, které dosáhly růstu na maximální koncentraci fenolu v nejkratších časech.

Všech šest kmenů bylo schopno plně degradovat fenol po 168 hodinách, což bylo doprovázeno zvýšenou OD<sub>600</sub> (Graf 1 v Příloze III). Růst bakterií pokračoval při koncentraci 400 mg/l (Graf 2 v Příloze III). Degradace fenolu v koncentraci 600 mg/l byla pro všechny vybrané kmenev obtížnější a u všech kmenů byl při této koncentraci pozorován nižší růst (Graf 3 v Příloze III). *Pseudomonas sp.* ATR208, který byl schopen snížit koncentraci fenolu z 600 na 117 mg/l při 20 °C po 168 h inkubace, byl nejlepším kmenem pro degradaci fenolu v této koncentraci (Graf 4 v Příloze III).

Vzorky půd byly odebrány v období na konci podzimu a začátku zimní sezóny. Během tohoto období byla oblast bohatá na fenolické sloučeniny a polyfenoly v důsledku degradace lignocelulózové biomasy.

V závěru studie autoři konstatovali, že ze šesti vybraných kmenů, které byly schopny degradovat různé koncentrace fenolu při 20 °C, byla nejlepší kulturou *Pseudomonas sp.* ATR208, která byla schopna degradovat fenol při všech testovaných teplotách; i pro ni však byla nejlepší teplotou pro degradaci fenolu teplota mezi 20 °C a 25 °C. Protože i u ostatních pěti kmenů byl optimální růst mezi 15 a 20 °C, byly zkoumané bakterie označeny jako psychrotolerantní a ne psychrofilní. [19]

### 2.3 Kinetika růstu a biodegradace fenolu psychrotrofním kmenem

#### *Pseudomonas putida* LY1

Tato studie od Yi Li (2010) zkoumala kinetiku růstu psychrotrofní bakterie *Pseudomonas putida* LY1 na fenolu jako jediném zdroji uhlíku a energie. Tato bakterie dokázala kompletně biodegradovat 200 mg/l fenolu v teplotním rozsahu od 2,5 do 35 °C, s optimální teplotou 25 °C. Vysoké počáteční koncentrace fenolu (800 mg/l a více) však byly pro růst bakterie inhibiční.

*P. putida* LY1 byla izolována z říčního sedimentu, naočkováním vzorku do plastové nádoby obsahující říční vodu s přidavkem minerálních solí a fenolem jako jediným zdrojem uhlíku (20 mg/l).

Biodegradace fenolu izolovaným kmenem byla zpočátku studována při různých teplotách (2,5, 5, 15, 25, 35, 45 °C) s 200 mg/l přidaného fenolu, aby se určila optimální teplota degradace fenolu. Každá 250 ml baňka obsahovala 200 ml minerálního média o pH 7,1–7,3, obsahujícího  $10^7$  buněk/ml. Podobné experimenty byly poté provedeny při 25 °C, s použitím různých počátečních koncentrací fenolu (20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 110, 200, 310, 380, 800 mg/l). Bylo zjištěno, že optimální teplota růstu *P. putida* LY1 byla kolem 25 °C při použití fenolu jako jediného substrátu. K úplné inhibici růstu *P. putida* však došlo při 45 °C (Graf 1 v Příloze IV).

Nejvyšší specifická rychlost růstu a rychlost biodegradace fenolu byla pozorována při 25 °C, kdy byly inokulované bakterie schopny degradace fenolu v rozmezí koncentrací 20–380 mg/l. Výsledky (koncentrace fenolu a buněčná biomasa) testů degradace fenolu pro počáteční koncentrace fenolu 200 a 310 mg/l jsou uvedeny na grafu 2 (Graf 2 v Příloze IV). Bakteriální růst byl zcela inhibován při koncentraci fenolu nad 800 mg/l, kdy tak nebyla pozorována žádná biodegradace. Bylo také vyzorováno, že se lagová fáze prodlužovala a nejvyšší koncentrace buněk zvyšovala se zvýšením počáteční koncentrace fenolu (Tabulka 1 v Příloze IV).

Celkově výsledky ukázaly, že psychrotrofní bakteriální kmen *P. putida* LY1 roste a dobře přežívá v širokém rozmezí teplot. Při růstu na 200 mg/l fenolu jako jediném zdroji uhlíku a energie se jeho optimální růstová teplota pohybovala kolem 25 °C, byl však schopen pomalého růstu a degradace fenolu i při teplotách 2,5 a 5 °C. [20]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 MATERIÁL A METODIKA

#### Původ použitých kultur

V období let 2020 – 2021 bylo na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí (ÚIOŽP) FT UTB ve Zlíně získáno několik bakteriálních kultur rostoucích na fenolu při teplotách kolem 8°C. Tyto kmeny byly předběžně pojmenovány 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A a pocházely z vodných vzorků běžného vnějšího prostředí (z tekoucích i stojatých vod). Kultury byly a jsou na ÚIOŽP dlouhodobě zakonzervovány v glycerolu při -80 °C a před zahájením prací v rámci této bakalářské práce byly oživeny na vhodných agarových živných půdách (R2A agar, viz níže). Kromě uvedené schopnosti využívat při nízké teplotě fenol jako jediný zdroj uhlíku a energie (tedy jako růstový substrát) a také rozkládat trichloroethylen nebyly před zahájením této kvalifikační práce žádné další vlastnosti těchto kultur známy.

Tabulka 2: Tabulka původu bakteriálních kultur

Kmen	Původ	Vzhled na minerálním agaru s fenolem	Degradace TCE 1,4 mg/l (%)
1A	řeka Dřevnice, Zlín	Malá bělavá	99–100
5A	řeka Štávnice, Luhačovice	Drobná bělavá	100
5B	řeka Štávnice, Luhačovice	Větší bělavá	100
6A	kaluž bahnitá Březůvky	Malá bělavá	100
6B	kaluž bahnitá Březůvky	Větší plošší	100
12A	lesní potok Provodov	Drobná bezbarvá	100

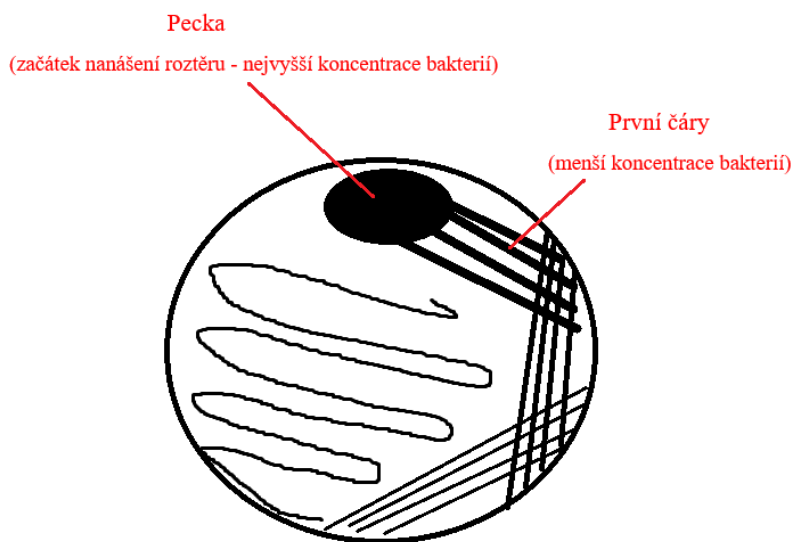
#### 3.1 Pokus I. - Kontrola čistoty bakteriálních kultur a porovnání jejich růstu na TYA a R2A agaru

Jako první pokus jsme pro jistotu zvolili kontrolu čistoty bakteriálních kultur na dvou rozdílných agarech. Také jsme chtěli mít jasno, že bakteriální kultury nebyly konzervací v glycerolu nikterak znehodnocené.

##### 3.1.1 Postup

Byly připraveny dva agary, tryptický agar s kvasničným extraktem (TYA) a R2A agar, dle postupu výrobce (HIMEDIA). Každý agar byl rozplněn do 6 petriho misek, aby byla pro jednotlivé bakteriální kmeny jedna miska s R2A agarem a druhá s TYA agarem. Takto

připravené misky se nechaly vychladnout. Poté bylo provedeno oživení bakteriálních kmenů 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A. Po vytažení z mrazicího boxu byla každá bakteriální kultura jednotlivě nanášena křížovým roztěrem na 2 petriho misky (každá různého agaru). Následně se všech 12 misek umístilo do ledničky za konstantní teploty 8°C. Pokus jsme kontrolovali celkem 4x. První odečet výsledků proběhl po 1.dni, další po 2. dni, následně po 5. dni a poslední po 7.dni. Výsledky pozorování jsme zaznamenali do tabulek.



Obrázek 12: Schéma křížového roztěru

### 3.2 Pokus II. - Sledování růstu kultur při 8 °C, při koncentracích fenolu 0 – 250 mg/l

#### 3.2.1 Postup

Nejprve bylo připraveno minerální médium (MM) v objemu 300 ml, a to dle složení:

Destilovaná voda.....	255 ml
Roztok A (9,07 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /l).....	6 ml
Roztok B (23,90 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O/l).....	24 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (10 g/l).....	3 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O (3 g/l).....	3 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (1 g/l).....	3 ml
NH <sub>4</sub> Cl (30 g/l).....	3 ml
NaCl (10 g/l).....	3 ml

Roztok stopových prvků..... 0,6 ml

Roztok stopových prvků na 1000 ml destilované vody:

0,043 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,057 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$

0,043 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,037 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0,025 g  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,040 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Po přípravě bylo změřeno pH minerálního média a MM bylo rozděleno po 50 ml do 6 lahví. Láhve byly posléze sterilizovány. Po sterilizaci a zchladnutí se přidal asepticky zásobní roztok fenolu (50 g/l) tak, aby vznikly tyto koncentrace fenolu: 0, 100, 150, 200 a 250 mg/l:

- 0: bez přídavku
- konc. 100: + 101  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku fenolu
- konc. 150: + 152  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku fenolu
- konc. 200: + 203  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku fenolu
- konc. 250: + 254  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku fenolu

Každé MM se s fenolem asepticky rozplnilo do 12 zkumavek, po 3 ml. Následně se dalo zchladit na 8°C. Dále se jednotlivě připravily suspence zkoumaných bakterií v cca 2 ml sterilního fyziologického roztoku a také se uložily zchladit na 8 °C (byly použity bakteriální kultury z R2A agaru). Každá kultura byla naočkována v objemu 10  $\mu\text{l}$  do 2 zkumavek každé koncentrace. Změřila se absorbance zkumavek densilametrem (DENSITY-METER II, ERBA-LACHEMA). Hodnoty, které přístroj udává, jsou ekvivalentní zákalu bakteriálních suspenzí dle McFarlandovy stupnice. Před měřením byla každá zkumavka promíchána a byly odstraněny případné bubliny. Nakonec se daly všechny zkumavky inkubovat při 8 °C a byly pravidelně měřeny stejným způsobem.

### **3.3 Pokus III. - Sledování růstu kultur při 8 °C, při koncentracích fenolu 300 – 500 mg/l**

#### **3.3.1 Postup**

Bylo připraveno 300 ml MM (dle složení jako u pokusu 3.2), které se po kontrole pH rozdělilo po 50 ml do 5 lahví. Následovala sterilizace. Po sterilizaci a zchlazení byl asepticky přidán zásobní roztok fenolu (50 g/l) tak, aby vznikly tyto koncentrace fenolu: 0, 300, 350, 450 a 500 mg/l:

- 0: bez přídavku
- konc. 300: + 303 µl zásobního roztoku fenolu
- konc. 350: + 354 µl zásobního roztoku fenolu
- konc. 400: + 404 µl zásobního roztoku fenolu
- konc. 450: + 455 µl zásobního roztoku fenolu
- konc. 500: + 505 µl zásobního roztoku fenolu

Každé MM s fenolem bylo asepticky rozplněno do 12 zkumavek (po 3 ml) a následně se dalo chladit za konstantní teploty 8°C. Z kultur z R2A agarů byly připraveny jednotlivé suspence zkoumaných bakterií v cca 2 ml sterilního fyziologického roztoku a po zchlazení na teplotu 8 °C byly každou kulturou naočkovány 2 zkumavky každé koncentrace množstvím 15 µl. U všech zkumavek byla změřena optická densita densilametrem. Zkumavky se daly inkubovat za konstantní teploty 8 °C a densita byla pravidelně měřena stejným způsobem, 2 - 3 x týdně.

### **3.4 Pokus IV. - Sledování růstu kultur při 8 °C, při koncentracích fenolu 100 – 500 mg/l, po růstu inokula na fenolu**

V tomto pokusu byly do růstových testů použity kultury předinkubované na fenolu, a to v MM s fenolem o koncentraci 100 mg/l. Opět jsme sledovali růst kultur stejným způsobem jako v předchozích pokusech, a zaznamenávali jsme délku lagových fází a dosažení maximálních hodnot růstu. V tomto pokusu jsme sledovali růst pouze 5 kultur a to 1A, 5A, 6A, 6B a 12A. V průběhu prací se totiž ukázalo, že je velmi pravděpodobné, že kultury 5A a 5B jsou identické a bylo by tedy zbytečné pracovat dále s oběma.

### 3.4.1 Postup

Nejprve bylo připraveno 400ml minerálního média.

Následně po kontrole pH (7,4 – 7,6) jsme rozdělili MM po 50 ml do 8 láhví. Láhve se daly sterilizovat a po zchladnutí byl přidán asepticky zásobní roztok fenolu (50 g/l) tak, aby vznikly tyto koncentrace fenolu: 0, 100, 200, 300, 350, 400 a 500 mg/l:

- 0: bez přídavku
- konc. 100: + 101 µl zásobního roztoku fenolu
- konc. 200: + 203 µl zásobního roztoku fenolu
- konc. 300: + 303 µl zásobního roztoku fenolu
- konc. 350: + 354 µl zásobního roztoku fenolu
- konc. 400: + 404 µl zásobního roztoku fenolu
- konc. 500: + 505 µl zásobního roztoku fenolu

Každé MM s fenolem bylo rozplněno do potřebného počtu zkumavek. Následně jsme všechny zkumavky dali zchladit na 8 °C. Použili jsme kultury z R2A agarů (ne starší než 1 týden), a postupně jsme připravovali suspence zkoumaných bakterií v cca 2 ml sterilního fyziologického roztoku. Každá kultura byla nejprve naočkována v objemu 15 µl do 1 chladné zkumavky s MM a koncentrací fenolu 100 mg/l a inkubována při 8 °C takto: kultura 5A po dobu 5 dní, 12A 3 dny a ostatní kultury 4 dny. Po této předinkubaci na fenolu jsme zaočkovali každou kulturou MM bez fenolu a média s koncentracemi fenolu 100–400 mg/l; MM s 500 mg/l bylo zaočkováno jen kulturami 6A a 12A. Očkování bylo provedeno objemem 15 µl, ze zkumavek s fenolem. Následně byla změřena absorbance všech zkumavek densilametrem a zkumavky byly inkubovány při 8 °C; pravidelné měření bylo prováděno stejným způsobem, první týden denně, další týdny dle průběhu, min. 3 x týdně.

## 3.5 Biochemické a růstové vlastnosti kultur

### 3.5.1 OXItest (MIKROLATEST)

#### Princip:

Tento test funguje na principu detekce přítomnosti respiračního enzymu cytochromoxidázy. Pokud je tento enzym v kultuře detekován pomocí reakce N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu



s  $\alpha$ -naftolem, výsledek je pozitivní a do 0,5 - 1 minuty test zmodrá. Pokud bychom odečetli výsledek později, tak může dojít ke vzniku falešné pozitivní reakce.

**Postup:**

Před zahájením testu jsme na zónu testovacího proužku nanесли 10  $\mu$ l činidla pro zvýšení citlivosti reakce. Z TYA agarů jsme očkovací plastovou kličkou odebrali z každé bakteriální kultury bakteriální masu, kterou jsme následně nanесли na impregnovanou zónu proužku. Výsledek barevné reakce jsme odečetli po 0,5 – 1 minutě.

**3.5.2 NEFERMtest 24 (MIKROLATEST)****Princip:**

Tato souprava umožňuje identifikovat gramnegativní nefermentující bakterie díky dvacetičtyř biochemických testů, je možné určit 40 bakteriálních kmenů. V mikrotitrační destičce se v jamkách nachází dílčí testy. Pro určení jednoho kmene jsou vždy brány v potaz tři řady po 8 jamkách.

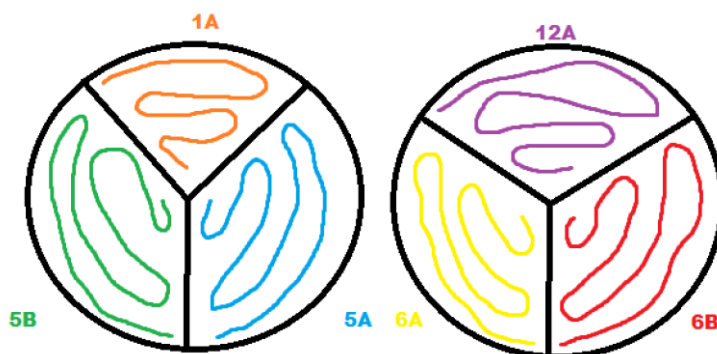
**Postup:** bylo postupováno podle příbalového letáku výrobce MIKROLATEST

**3.5.3 Růst kultur při různých teplotách na TYA a R2A agaru**

U všech 6 kultur jsme se rozhodli také vyzkoušet jejich růst v různých teplotách, konkrétně 7, 13, 23, 30 a 37 °C.

**Postup:**

Pokus jsme prováděli na 10 petriho miskách s TYA agarem a dalších 10 na miskách s R2A agarem. Každou jsme rozdělili na třetiny a na každou jsme nanесли 3 bakteriální kultury. Vždy dvě misky s TYA a dvě s R2A se všemi kulturami jsme dali inkubovat za uvedených konstantních teplot.



Obrázek 13: Roztěry 6 bakteriálních kultur na 2 petriho miskách

### 3.6 Gramovo barvení

Bylo připraveno MM s koncentrací fenolu 100 mg/l, kde byly kultury kultivovány při 8 °C po dobu 7 dní. Poté se na podložní sklíčko nanasla suspence bakteriální kultury. Byla provedena fixace plamenem a barvení preparátu podle Grama:

Nejprve byl roztěr převrstven roztokem krystalové violeti, který jsme nechali působit po dobu 60 vteřin. Následně jsme barvu slili pomocí několika mililitry Lugolova roztoku a převrstvili roztěr opět Lugolovým roztokem a převrstvili roztěr Lugolovým roztokem, jež jsme nechali působit po stejnou dobu. Dále jsme opět barvu slili, opláchli destilovanou vodou a odbarvovali acetonem, dokud barvivo odtékalo, a to vše v šikmé poloze po dobu ne déle než 25 vteřin. Následně jsme roztěr opět opláchli destilovanou vodou. Takto upravený roztěr jsme ke konci dobarvovali safraninem po dobu 60 vteřin. Následoval opět oplach destilovanou vodou a preparát jsme usušili opatrně nad plamenem. Mikroskopovali jsme pomocí imerzního objektivu 100x zvětšujícího za použití 10x zvětšujících okulárů.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Pokus I. - Kontrola čistoty bakteriálních kultur a porovnání jejich růstu na TYA a R2A agaru

Bylo provedeno vyočkování kultur 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A z hlubokomrazacího boxu na R2A agar a TYA agar a kultivace za konstantní teploty 8°C. Slovní popis jejich růstu je uveden v tabulkách 3 - 6.

Tabulka 3: Výsledky růstu bakteriálních kultur po 1. dni při 8 °C

Kultura	TYA agar	R2A agar
1A	Roste v pecce	Roste v pecce
5A	Roste v pecce	Roste v pecce, víc než u TYA
5B	Roste v pecce	Roste v pecce
6A	Roste silně v pecce i v 1. čarách	Roste v pecce
6B	Roste slabě v pecce	Roste slabě v pecce, méně než na TYA
12A	Roste v pecce, silně	Roste v pecce, silně

Již po prvním dni došlo k nárůstu všech mikrobiálních kultur v pečkách (místo, kde se nacházelo největší množství bakterií) na obou agarech. Pouze v případě 5A se jednalo o vyšší nárůst na R2A agaru než u TYA agaru, u kultury 6B tomu bylo naopak. U kultury 6A došlo k nárůstu bakterií na TYA agaru i v místě prvních čar.

Tabulka 4: Výsledky růstu bakteriálních kultur po 2. dni při 8 °C

Kultura	TYA agar	R2A agar
1A	Roste více než 1. den	Roste více než 1. den
5A	Roste více než 1. den, slabá růžová pigmentace	Roste více než 1. den, lépe než na TYA, slabá růž. pigmentace
5B	Roste více než 1. den a lépe než na R2A, slabá růžová pigmentace	Roste více než 1. den, slabá růžová pigmentace
6A	Roste více než 1. den	Roste více než 1. den
6B	Roste méně než ostatní kultury, na TYA lépe než na R2A	Roste méně než ostatní kultury
12A	Roste více než 1. den	Roste více než 1. den

Další den se bakteriální kultury začaly více rozrůstat v případě obou agarů. U kultur 5A a 5B se na obou agarech objevilo i slabé růžové zbarvení. Jediná kultura 6B na R2A agaru rostla méně než ostatní.

Tabulka 5: Výsledky růstu bakteriálních kultur po 5. dni při 8 °C

Kultura	TYA agar	R2A agar
1A	Roste celý roztěr, kultura je čistá	Roste celý roztěr, čistá, mukósnější než na TYA
5A	Roste celý roztěr, kultura je čistá, růžový pigment	Roste celý roztěr, čistá, růžový pigment, roste lépe než na TYA
5B	Roste celý roztěr, kultura je čistá, růžový pigment	Roste celý roztěr, čistá, růžový pigment, lépe než na TYA
6A	Roste celý roztěr, kultura je čistá + ojedinělé mikrokolonie	Roste celý roztěr, + ojedinělé mikrokolonie
6B	Roste celý roztěr, kultura je čistá	Roste celý roztěr, čistá
12A	Roste celý roztěr, kultura je čistá	Roste celý roztěr, čistá

Po 5. dni byly kultury narostlé natolik, že bylo možné hodnotit jejich čistotu; bylo konstatováno, že všechny kultury jsou čisté.

Tabulka 6: Výsledky růstu bakteriálních kultur po 7. dni při 8 °C

Kultura	TYA agar	R2A agar
1A	Roste celý roztěr, čistá	Roste celý roztěr, čistá
5A	Roste celý roztěr, čistá, růžový pigment	Roste celý roztěr, čistá, růžový pigment
5B	Roste celý roztěr, čistá, růžový pigment	Roste celý roztěr, čistá, růžový pigment
6A	Roste celý roztěr, čistá	Roste celý roztěr, čistá
6B	Roste celý roztěr, čistá	Roste celý roztěr, čistá
12A	Roste celý roztěr, čistá	Roste celý roztěr, čistá

Z tabulek 3–6 je zřejmé, že bakteriální kultury nebyly konzervací v glycerolu při teplotě -80 °C nikterak ovlivněny. Dle růstu a vzhledu kultur bylo možno usoudit, že jsou všechny čisté a konzervaci snášejí bez větších problémů. Při porovnání jednotlivých agarů nebyly pozorovány významnější rozdíly a výsledky byly až na pár drobných odchylek velice podobné. Na základě porovnání kultur 5A a 5B bylo možné usoudit, že se jedná o podobné, ne-li identické kultury, jelikož růst na obou agarech probíhal prakticky stejně. V obou případech byly kolonie a jejich okolí také lehce narůžovělé. Obě kultury byly získány ze stejné řeky Šťávnice v Luhačovicích.

## 4.2 Pokus II. - Sledování růstu kultur při 8 °C, při koncentracích fenolu 0 – 250 mg/l

Cílem tohoto pokusu bylo porovnat růst zkoumaných kultur při koncentracích fenolu 0–250 mg/l. Růst bakterií byl sledován měřením optické hustoty – optickým densilametrem (před každým měřením musel být případný biofilm na dně zkumavky roztřepán). Pokus byl prováděn po dobu 21 dní a výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 7 – 11 a dále v grafech (obrázcích) č. 11 – 14.

### Kontrolní vzorky:

Tabulka 7: Hodnoty zákalu dle densilometru kontrolních zkumavek (bez fenolu)

Doba kult. dny (hod.)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1 (20)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
2 (44)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3 (68)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
3 (76)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
4 (94)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
5 (117)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
6 (141)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
7 (165)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
8 (198)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
10 (237)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
12 (285)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
14 (336)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
17 (408)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
21 (504)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

Slepý pokus proběhl dle očekávání. V žádné z pozorovaných zkumavek nedošlo k růstu bakteriálních kultur – tímto jsme si zkontrolovali, že příprava MM proběhla v pořádku a že žádná kultura není schopna v něm růst bez organického substrátu.

### Koncentrace 100 mg/l

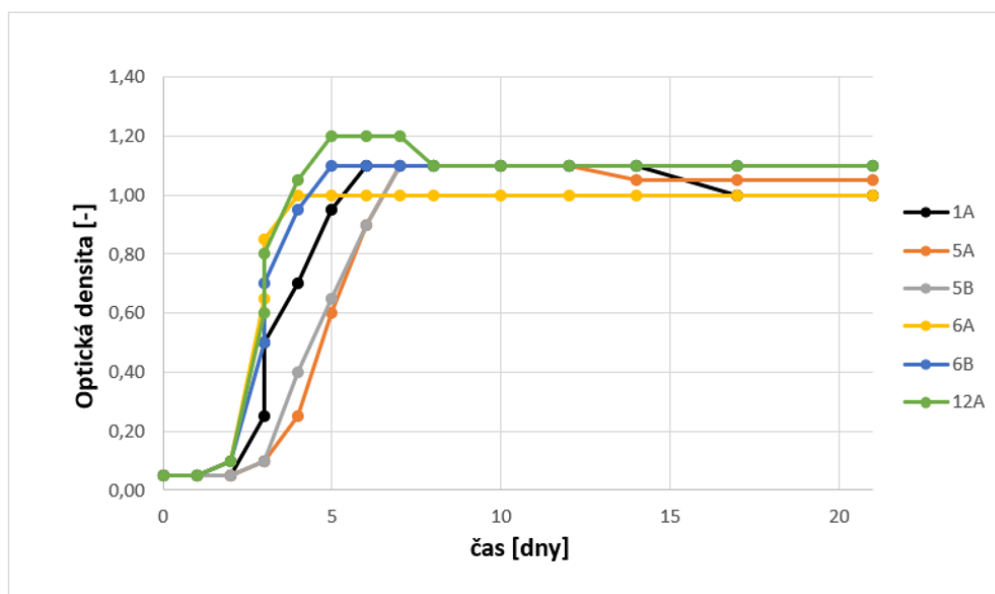
Tabulka 8: Růst kultur na fenolu při koncentraci 100 mg/l (densita dle densilometru)

Doba kult. dny (hod.)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1 (20)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
2 (44)	0,05	0,05	0,05	0,10	0,10	0,10
3 (68)	0,25	0,10	0,10	0,65	0,50	0,60
3 (76)	0,50	0,10	0,10	0,85	0,70	0,80
4 (94)	0,70	0,25	0,40	1,00	0,95	1,05

5 (117)	0,95	0,60	0,65	1,00	1,10	1,20
6 (141)	1,10	0,90	0,90	1,00	1,10	1,20
7 (165)	1,10	1,10	1,10	1,00	1,10	1,20
8 (198)	1,10	1,10	1,10	1,00	1,10	1,10
10 (237)	1,10	1,10	1,10	1,00	1,10	1,10
12 (285)	1,10	1,10	1,10	1,00	1,10	1,10
14 (336)	1,10	1,05	1,10	1,00	1,10	1,10
17 (408)	1,00	1,05	1,10	1,00	1,10	1,10
21 (504)	1,00	1,05	1,10	1,00	1,10	1,10

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Nejrychleji jsme mohli pozorovat růst kultury 12A a 6A, densilometr jejich maxima růstu zaznamenal již 4. den od začátku experimentu. Následně 5. den kultura 6B, 6. den kultura 1A a jako poslední 7. den současně kultury 5A a 5B. Hodnoty vzrostly na 1,00 - 1,10 ve dny jejich maxim růstu a vyšších hodnot nedosahovaly. Po dosažení maxima začaly jejich optické hustoty spíše klesat. Nejvyšší optické hustoty 1,20 dosáhla kultura 12A a to 5. den.



Obrázek 14: Růst kultur na fenolu při koncentraci 100 mg/l

Z grafu je jasně patrné, že k nejvýraznějšímu růstu došlo u kultury 12A (zelená křivka). Po dosažení maxima došlo k několikadennímu setrvání hodnot a následně hodnoty optické hustoty klesly na 1,10 a takto zůstaly až do ukončení experimentu.

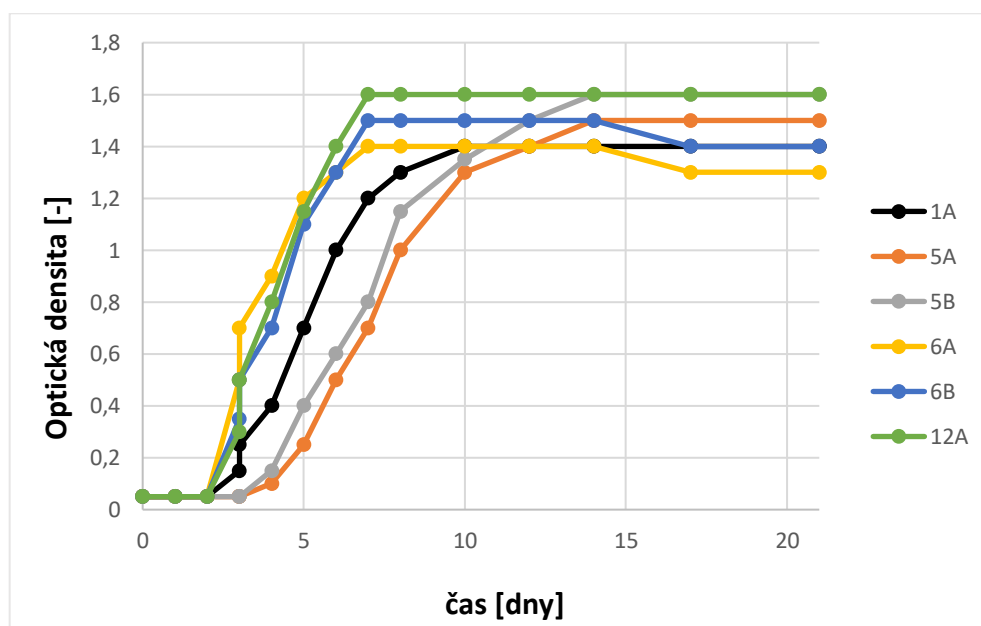
## Koncentrace 150 mg/l

Tabulka 9: Růst kultur na fenolu při koncentraci 150 mg/l (densita dle densilometru)

Doba kult. dny (hod.)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1 (20)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
2 (44)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3 (68)	0,15	0,05	0,05	0,50	0,35	0,30
3 (76)	0,25	0,05	0,05	0,70	0,50	0,50
4 (94)	0,40	0,10	0,15	0,90	0,70	0,80
5 (117)	0,70	0,25	0,40	1,20	1,10	1,15
6 (141)	1,00	0,50	0,60	1,30	1,30	1,40
7 (165)	1,20	0,70	0,80	1,40	1,50	1,60
8 (198)	1,30	1,00	1,15	1,40	1,50	1,60
10 (237)	1,40	1,30	1,35	1,40	1,50	1,60
12 (285)	1,40	1,40	1,50	1,40	1,50	1,60
14 (336)	1,40	1,50	1,60	1,40	1,50	1,60
17 (408)	1,40	1,50	1,60	1,30	1,40	1,60
21 (504)	1,40	1,50	1,60	1,30	1,40	1,60

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Při vyšší koncentraci fenolu dosáhly všechny kultury maxima za delší dobu než v případě koncentrace 100 mg/l. První maxima jsme mohli zaznamenat až 7. den, a to u kultur 6A, 6B a 12A. Sice nejvyšších hodnot 1,40-1,60 dosáhly za delší dobu, avšak jedná se o skoro polovinu vyšší hodnoty než v případě koncentrace 100 mg/l. Další jsme zaznamenali maximum 10. den u kultury 1A a nakonec 14. den u kultur 5A a 5B.



Obrázek 15: Růst kultur na fenolu při koncentraci 150 mg/l

Kultury 12A a 5B dosáhly nejvyšších optických densit 1,60 a na této hodnotě zůstaly až do konce experimentu. Jejich křivky se v grafu protínají. Nejprudší nárůst můžeme pozorovat u hodnoty 12A.

### Koncentrace 200 mg/l

Tabulka 10: Růst kultur na fenolu při koncentraci 200 mg/l (densita dle densilometru)

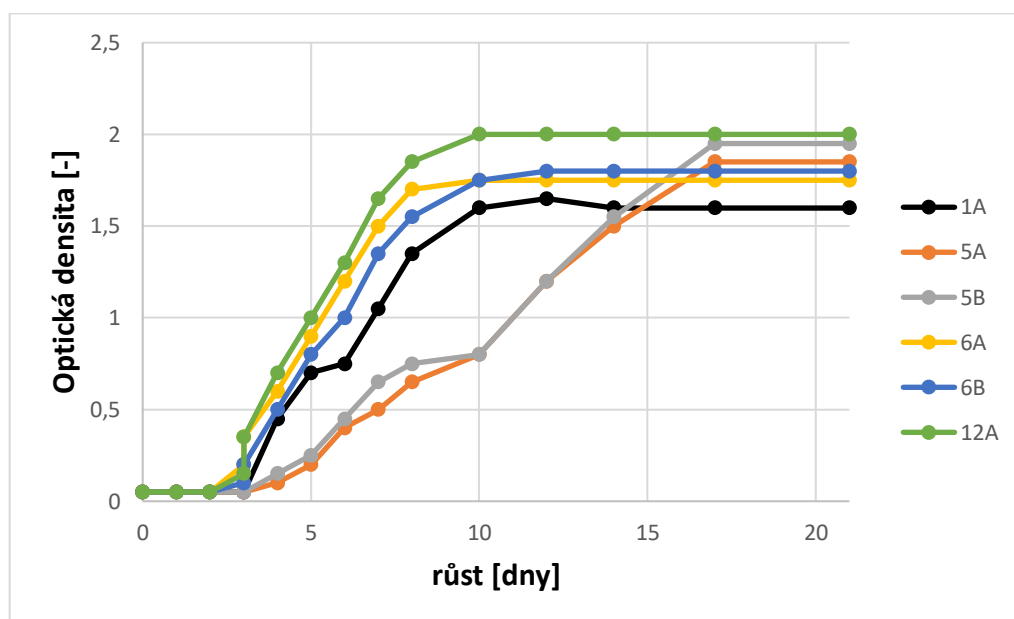
Doba kult. dny (hod.)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1 (20)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
2 (44)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3 (68)	0,05	0,05	0,05	0,20	0,10	0,15
3 (76)	0,05	0,05	0,05	0,35	0,20	0,35
4 (94)	0,45	0,10	0,15	0,60	0,50	0,70
5 (117)	0,70	0,20	0,25	0,90	0,80	1,00
6 (141)	0,75	0,40	0,45	1,20	1,00	1,30
7 (165)	1,05	0,50	0,65	1,50	1,35	1,65
8 (198)	1,35	0,65	0,75	1,70	1,55	1,85
10 (237)	1,60	0,80	0,80	1,75	1,75	2,00
12 (285)	1,65	1,20	1,20	1,75	1,80	2,00
14 (336)	1,60	1,50	1,55	1,75	1,80	2,00
17 (408)	1,60	1,85	1,95	1,75	1,80	2,00
21 (504)	1,60	1,85	1,95	1,75	1,80	2,00

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Kromě kultury 1A (opět dosáhla maxima 10. den jako v případě koncentrace 150 mg/l) došlo k prodloužení lagové fáze u zbylých kultur. Všechny kultury dosáhly vyšších maximálních hodnot optických densit. První maximum jsme mohli pozorovat 8. den u kultury 6A, dále



10. den u třech kultur 1A, 6B a 12A. Poslední maxima jsme zaznamenali až 17. den u dvou kultur 5A a 5B.



Obrázek 16: Růst kultur na fenolu při koncentraci 200 mg/l

V grafu opět dominuje kultura 12A, která má nejprudší nárůst a opět dosahuje nejvyšších hodnot (2,00), které se si drží až do konce experimentu.

### Koncentrace 250 mg/l

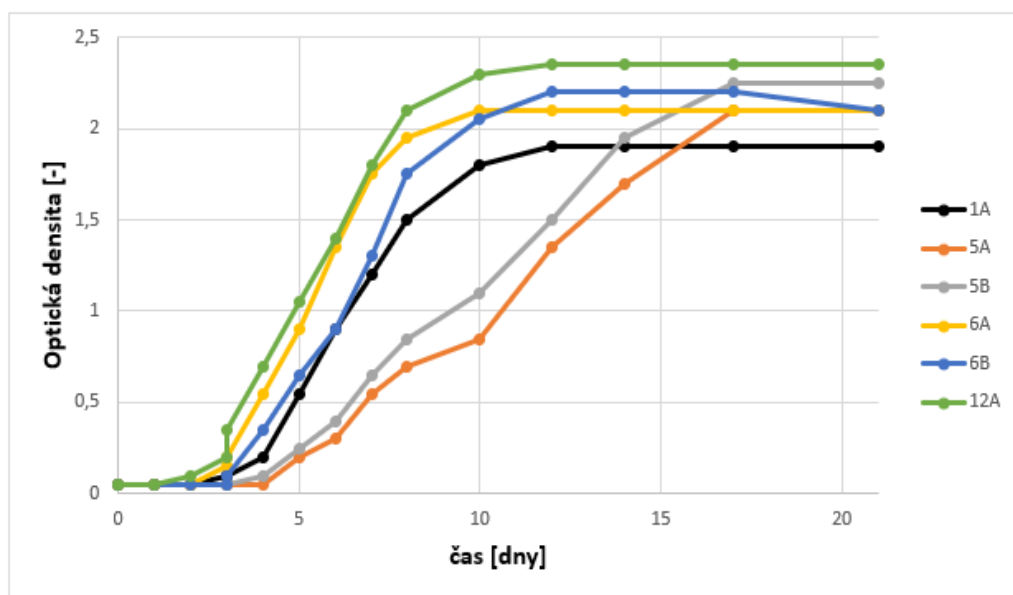
Tabulka 11: Růst kultur na fenolu při koncentraci 250 mg/l (densita dle densilometru)

Doba kult. dny (hod.)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1 (20)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
2 (44)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10
3 (68)	0,10	0,05	0,05	0,15	0,05	0,20
3 (76)	0,10	0,05	0,05	0,20	0,10	0,35
4 (94)	0,20	0,05	0,10	0,55	0,35	0,70
5 (117)	0,55	0,20	0,25	0,90	0,65	1,05
6 (141)	0,90	0,30	0,40	1,35	0,90	1,40
7 (165)	1,20	0,55	0,65	1,75	1,30	1,80
8 (198)	1,50	0,70	0,85	1,95	1,75	2,10
10 (237)	1,80	0,85	1,10	2,10	2,05	2,30
12 (285)	1,90	1,35	1,50	2,10	2,20	2,35
14 (336)	1,90	1,70	1,95	2,10	2,20	2,35
17 (408)	1,90	2,10	2,25	2,10	2,20	2,35
21 (504)	1,90	2,10	2,25	2,10	2,10	2,35

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Jako u předchozích koncentrací můžeme pozorovat prodloužení lagové fáze a také vyšší hodnoty maximálních optických densit. První maximum jsme mohli pozorovat u kultury

6A a to 10. den, dále 12. den kultury 1A, 6B a 12A. Poslední maxima jsme zaznamenali u dvou kultur až 17. den.



Obrázek 17: Růst kultur na fenolu při koncentraci 250 mg/l

Opět nejvýraznější křivkou v grafu je křivka kultury 12A a nejvyšší pozorovanou hodnotou je 2,35.

### 4.3 Pokus III. - Sledování růstu kultur při 8 °C, při koncentracích fenolu 300 – 500 mg/l

Kultury byly v předchozím pokusu úspěšné při růstu v médiích s vyšší koncentrací fenolu, proto jsme se rozhodli provést navazující pokus. Opět jsme pracovali se všemi 6 kulturami a sledovali jsme jejich růst v ještě vyšších koncentracích fenolu. Dále jsme se zabývali otázkou, zdali jsou kultury 5A a 5B totožné. Pokus byl u každé koncentrace zastaven v momentě, kdy nebyl pozorován další růst kultur. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 12 - 16 a na obrázcích 17 - 21.

#### Koncentrace 300 mg/l

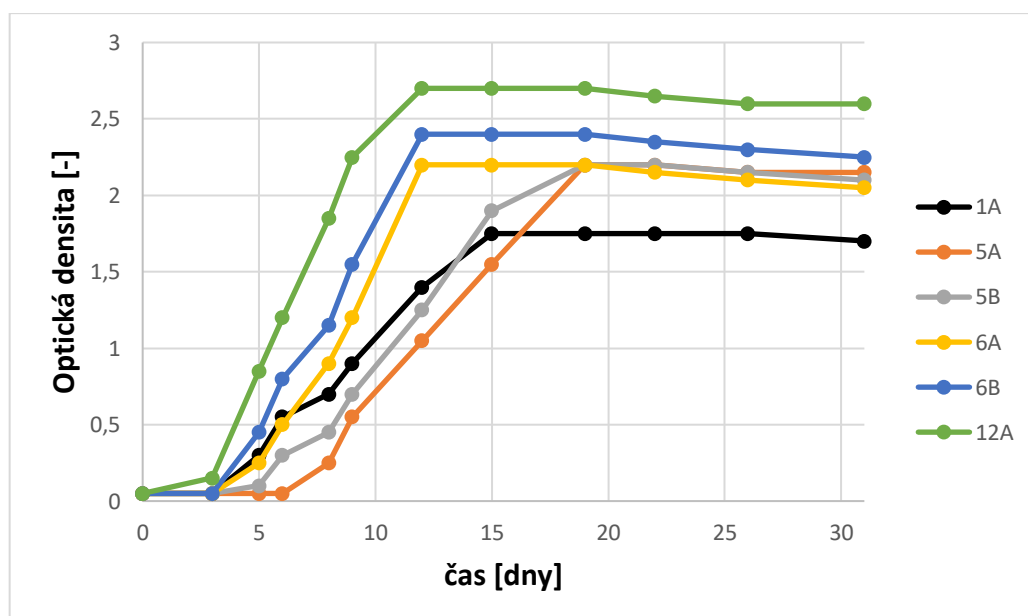
Tabulka 12: Růst kultur na fenolu při koncentraci 300 mg/l (densita dle densilometru)

Doba kult. dny	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,15
5	0,30	0,05	0,10	0,25	0,45	0,85
6	0,55	0,05	0,30	0,50	0,80	1,20
8	0,70	0,25	0,45	0,90	1,15	1,85

9	0,90	0,55	0,70	1,20	1,55	2,25
12	1,40	1,05	1,25	2,20	2,40	2,70
15	1,75	1,55	1,90	2,20	2,40	2,70
19	1,75	2,20	2,20	2,20	2,40	2,70
22	1,75	2,20	2,20	2,15	2,35	2,65
26	1,75	2,15	2,15	2,10	2,30	2,60
31	1,70	2,15	2,10	2,05	2,25	2,60
Ukončeno – kultury již dále nerostou						

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

První maxima jsme mohli pozorovat 12. den od nasazení pokusu, nejvyšší hodnoty 2,70 dosáhla kultura 12A, následně hodnoty 2,40 kultura 6B a hodnoty 2,20 kultura 6A. Jako další začala 15. den růst kultura 1A (dosáhla nejnižší hodnoty 1,75). Dále 19. den jsme mohli zaznamenat totožné nejvyšší hodnoty 2,20 u dvou kultur a to 5A a 5B. Tato část byla ukončena po 31 dnech a byla zároveň nejkratším měřením v této sérii pokusů.



Obrázek 18: Růst kultur na fenolu při koncentraci 300 mg/l

Z grafu je jasně patrné, že kultura 12A je jako u předešlého pokusu nejvýraznější křivkou a zároveň u ní můžeme pozorovat dosažení nejvyšších hodnot, které si drží až do ukončení pokusu. Druhá nejvýraznější je kultura 6B, která však po hodnotě maxima začne výrazněji klesat. U pravděpodobně stejných kultur 5A a 5B můžeme pozorovat nepatrné rozdíly. Ačkoliv kultura 5B roste rychleji, dosáhne spolu s 5A stejné hodnoty 2,20 a následně po jejich dosažení jsou křivky takřka identické.

### Koncentrace 350 mg/l

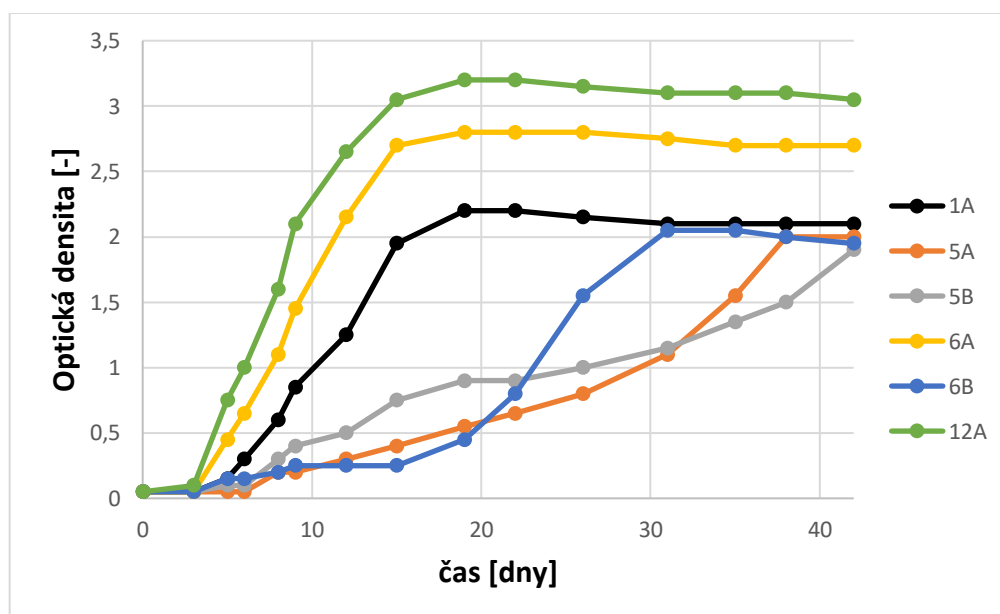
Tabulka 13: Růst kultur na fenolu při koncentraci 350 mg/l (densita dle densilometru)

Doba kult. dny	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10
5	0,15	0,05	0,10	0,45	0,15	0,75
6	0,30	0,05	0,10	0,65	0,15	1,00
8	0,60	0,20	0,30	1,10	0,20	1,60
9	0,85	0,20	0,40	1,45	0,25	2,10
12	1,25	0,30	0,50	2,15	0,25	2,65
15	1,95	0,40	0,75	2,70	0,25	3,05
19	2,20	0,55	0,90	2,80	0,45	3,20
22	2,20	0,65	0,90	2,80	0,80	3,20
26	2,15	0,80	1,00	2,80	1,55	3,15
31	2,10	1,10	1,15	2,75	2,05	3,10
35	2,10	1,55	1,35	2,70	2,05	3,10
38	2,10	2,00	1,50	2,70	2,00	3,10
42	2,10	2,00	1,90	2,70	1,95	3,05

Ukončeno – kultury již dále nerostou

Zeleně jsou značena maxima růstu

Při růstu kultur při koncentraci fenolu 350 mg/l došlo k markantnímu prodloužení lagových fází u všech kultur. Také však můžeme pozorovat dosažení vyšších hodnot růstu u všech kultur. Jako první maxima jsme mohli zaznamenat až 19. den, a to konkrétně u třech kultur 1A, 6A a 12A. Následně jsme mohli zaznamenat 31. den hodnotu maxima kultury 6B. Opět jako poslední vyrostly kultury 5B a 5A a to 38. a 42. den. Nejvyšší hodnoty 3,2 dosáhla kultura 12A a nejnižší hodnoty 1,9 kultura 5B. Tuto část pokusu jsme měřili 42 dní.



Obrázek 19: Růst kultur na fenolu při koncentraci 350 mg/l

Opět je dominantou grafu křivka kultury 12A. Dosahuje nejvyšších hodnot, od 5. dne u ní můžeme pozorovat téměř konstantní růst, ale po dosažení maxima začne trochu klesat. Dále je opět výrazná kultura 6B, která dosahuje nižších hodnot. Při porovnání kultur 5A a 5B můžeme pozorovat mírné rozdíly. Kultura 5A tentokrát dosáhne své nejvyšší hodnoty dříve než 5B, avšak kultura 5B začíná růst rychleji.

### Koncentrace 400 mg/l

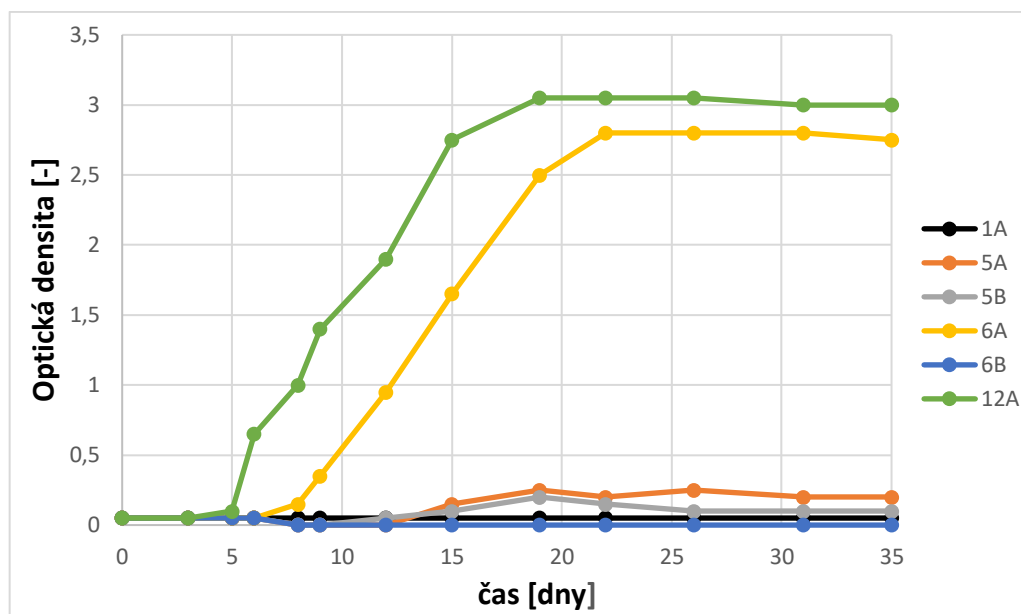
Tabulka 14: Růst kultur na fenolu při koncentraci 400 mg/l (densita dle densilometru)

Doba kult. dny	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
5	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10
6	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,65
8	0,05	0,00	0,00	0,15	0,00	1,00
9	0,05	0,00	0,00	0,35	0,00	1,40
12	0,05	0,00	0,05	0,95	0,00	1,90
15	0,05	0,15	0,10	1,65	0,00	2,75
19	0,05	0,25	0,20	2,50	0,00	3,05
22	0,05	0,20	0,15	2,80	0,00	3,05
26	0,05	0,25	0,10	2,80	0,00	3,05
31	0,05	0,20	0,10	2,80	0,00	3,00
35	0,05	0,20	0,10	2,75	0,00	3,00
Ukončeno – kultury již dále nerostou						

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

U další části pokusu začaly růst a dosáhly určitých maxim pouze 2 kultury, a to 12A a 6A. Kultura 12A dosáhla svého maxima stejný den (19.) jako u předchozí koncentrace ale s tím rozdílem, že maximální hodnota byla nižší než u koncentrace 350 mg/l. U kultury 6A naopak došlo k prodloužení lagové fáze o 3 dny (až 22. den), ale maximum bylo stejné (2,80).

Ostatní 4 kultury v průběhu celé části nezačaly růst, jen nepatrně začaly zvyšovat optickou hustotu. Kultura 5A s hodnotou 0,25 kolem dvacátého dne inkubace, ovšem v dalších fázích pokusu růst nijak nepokračoval a nedosáhl tedy významnější hodnoty. Tímto můžeme konstatovat, že kultury 1A, 5A, 5B a 6B nejsou při vyšších koncentracích fenolu růstu schopny. Tuto část pokusu jsme pozorovali 35 dní a následně byl pokus ukončen, neboť i zbylé 2 kultury přestaly růst.



Obrázek 20: Růst kultur na fenolu při koncentraci 400 mg/l

V grafu můžeme pozorovat pouze 2 křivky kultur 12A a 6A, které byly schopné se v roztoku o vyšší koncentraci fenolu růst. Vyšších hodnot opět dosahuje kultura 12A. Zbylé 4 kultury se drží u nulových hodnot, překrývají se.

### Koncentrace 450 mg/l

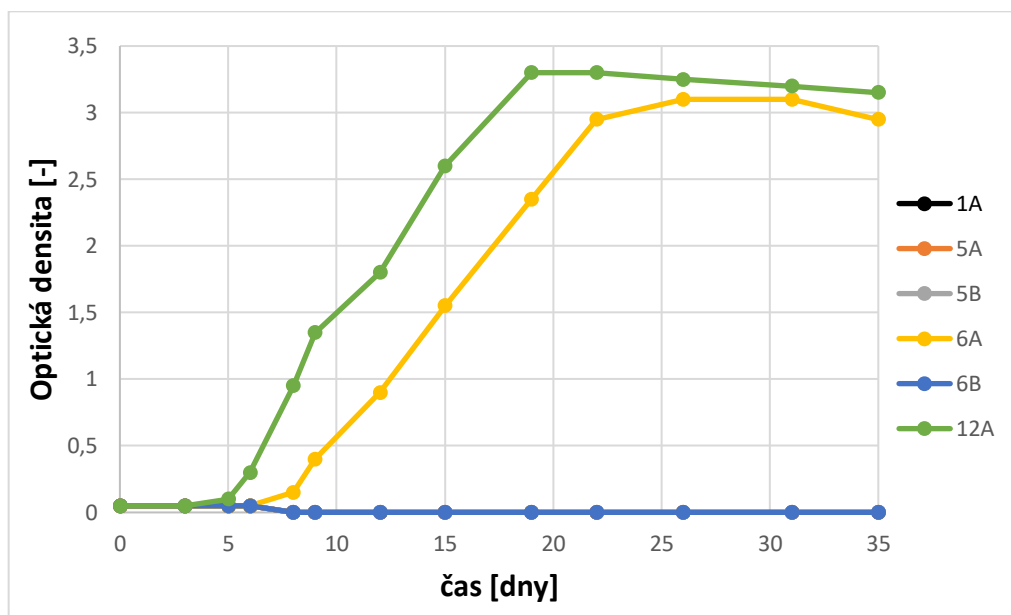
Tabulka 15: Růst kultur na fenolu při koncentraci 450 mg/l (densita dle densilometru)

Doba kult. dny	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
5	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10
6	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,30
8	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,95
9	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	1,35
12	0,00	0,00	0,00	0,90	0,00	1,80
15	0,00	0,00	0,00	1,55	0,00	2,60
19	0,00	0,00	0,00	2,35	0,00	3,30
22	0,00	0,00	0,00	2,95	0,00	3,30
26	0,00	0,00	0,00	3,10	0,00	3,25
31	0,00	0,00	0,00	3,10	0,00	3,20
35	0,00	0,00	0,00	2,95	0,00	3,15
	Ukončeno – kultury již dále nerostou					

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

V tabulce jsou rostoucí pouze 2 kultury, a to 12A a 6A. Kultura 12A dosáhla svého maxima 19. den od zahájení pokusu, nedošlo k prodloužení lagové fáze a v této koncentraci dosáhla vůbec své nejvyšší hodnoty 3,30. Kultura 6A opět 22. den a také dosáhla o něco vyšší hodnoty než u předchozí koncentrace. Zbylé 4 kultury 1A, 5A, 5B a 6B dosahovaly nejvýše

hodnoty densit 0,05 do 6. dne a ani posléze nezačaly růst. Tento pokus jsme ukončili 35. den.



Obrázek 21: Růst kultur na fenolu při koncentraci 450 mg/l

V grafu můžeme pozorovat opět pouze 2 křivky. Po dosažení nejvyššího hodnoty začaly obě křivky mírně klesat. Růst křivek již není tak příkře stoupající. Zbylé 4 kultury se překrývají a drží se u nuly.

### Koncentrace 500 mg/l

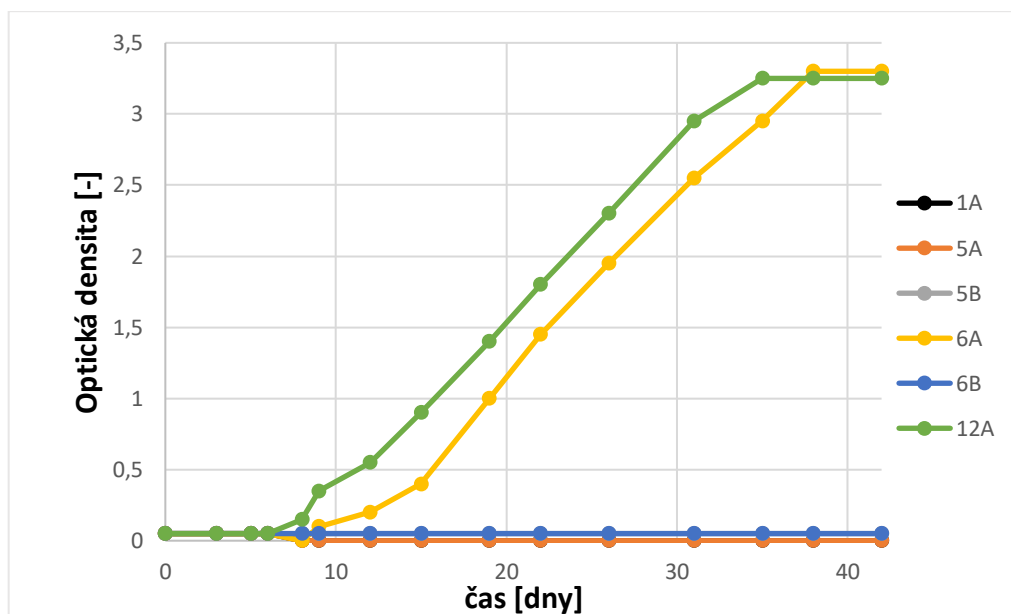
Tabulka 16: Růst kultur na fenolu při koncentraci 500 mg/l (densita dle densilometru)

Doba kult. dny	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
5	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
6	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
8	0,00	0,00	0,05	0,00	0,05	0,15
9	0,00	0,00	0,05	0,10	0,05	0,35
12	0,00	0,00	0,05	0,20	0,05	0,55
15	0,00	0,00	0,05	0,40	0,05	0,90
19	0,00	0,00	0,05	1,00	0,05	1,40
22	0,00	0,00	0,05	1,45	0,05	1,80
26	0,00	0,00	0,05	1,95	0,05	4,70
31	0,00	0,00	0,05	2,55	0,05	2,95
35	0,00	0,00	0,05	2,95	0,05	3,25
38	0,00	0,00	0,05	3,30	0,05	3,25
42	0,00	0,00	0,05	3,30	0,05	3,25

Ukončeno – kultury již dále nerostou

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Poslední část pokusu byla ukončena po 42 dnech, ačkoliv zde rostly opět jen 2 kultury 12A a 6A. Došlo k výraznému prodloužení lagových fází v obou případech, první dosáhla maxima 35. den pokusu kultura 12A a 38. den kultura 6A. Poprvé zde kultura 6A dosáhla vyšší hodnoty maxima než kultura 12A, i když jen nepatrně o 0,05. Také dosáhla své nejvyšší hodnoty ze všech dostupných koncentrací. Ostatní 4 kultury dosahovaly opět pouze hodnoty 0,05 a nevykázaly tedy v průběhu pokusu žádný růst až do ukončení.



Obrázek 22: Růst kultur na fenolu při koncentraci 500 mg/l

V grafu můžeme opět pozorovat změny, obě rostoucí kultury 12A a 6A dosáhly svého maxima až velice pozdě a nárůst křivek je tím pádem velice mírný. Značně rychleji roste kultura 12A, ale nejvyšší hodnoty zde dosáhla kultura 6A. Zbylé křivky kultur se překrývají a drží se u nuly. Při této vysoké koncentraci fenolu nerostou.

### **Srovnání růstu kultur na fenolu při 8 °C, při inokulaci testů z R2A agarů**

Ke srovnání všech kultur je níže uvedena tabulka 17, která uvádí jednak doby lagových fází jednotlivých kultur při různých koncentracích fenolu, a jednak doby kultivací, kdy byla dosažena jejich maxima růstu.



Tabulka 17: Srovnání délky lagových fází (LAG) a maximálního růstu (MAX) u všech kultur (dny) při 8 °C, po inokulaci MM s fenolem kulturami z R2A agarů

Koncentrace fenolu (mg/l)	Délka lagové fáze (dny) a doba dosažení MAXima růstu (dny) u kultur											
	1A		5A		5B		6A		6B		12A	
	LAG	MAX	LAG	MAX	LAG	MAX	LAG	MAX	LAG	MAX	LAG	MAX
100	2	6	3	7	3	7	2	4	2	5	2	5
150	2-3	10	4	14	4	14	2	7	2	7	2	7
200	3	10	4	17	4	17	2*	8	3	10	3	10
250	3	12	4	17	4	17	2-3	10	3	12	2-3	12
300	4-5	15	4	19	4	19	3-4	12	3-4	12	3-4	12
350	5	19	6	38	6	42	3-4	19	6	31	3-4	19
400	-	-	-	-	-	-	6-7	22	-	-	5	19
450	-	-	-	-	-	-	7-8	26	-	-	5	19
500	-	-	-	-	-	-	9	38	-	-	7-8	35

Při koncentracích 100–250 mg/l roste nejrychleji kultura 6A, pak 12A a 6B, a o něco pomaleji 1A. Při koncentracích 300–350 mg/l rostou nejrychleji 6A a 12A, pak 1A. Při 350 mg/l se značně zpomaluje růst 6B. Při koncentracích 400 – 500 mg/l rostou jen kultury 12A (ta nejlépe) a 6A (o něco pomaleji). Ostatní kultury již nerostou. Kultury 5A a 5B rostou při všech koncentracích fenolu nejpomaleji ze všech. Rozdíl mezi 5A a 5B byl zjištěn jen u koncentrace 350 mg/l a je zcela nepodstatný.

#### 4.4 Pokus IV. - Sledování růstu kultur při 8 °C, při koncentracích fenolu 100 – 500 mg/l, po růstu inokula na fenolu

Tento pokus byl motivován snahou zjistit, zda předinkubace jednotlivých kultur na fenolu přinese jejich zrychlený růst při různých koncentracích fenolu. Kultury byly proto nejprve pomnoženy na 100 mg fenolu a takto získaná inokula byla naočkována do testů. Výsledky jsou uvedeny níže v tabulkách 18 až 24.

##### Kontrolní vzorky:

Tabulka 18: Růst kultur na fenolu při koncentraci 0 mg/l

Doba inkubace		Kultura				
Hodiny	Dny	1A	5A	6A	6B	12A
0	0,0	0,10	0,00	0,10	0,20	0,10
21	0,9	0,00	0,10	0,10	0,10	0,10
27	1,1	0,00	0,00	0,00	0,20	0,10
45	1,9	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00

51	2,1	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00
69	2,9	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10
77	3,2	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10
93	3,9	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10
101	4,2	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10
142	5,9	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10
166	6,9	0,00	0,10	0,10	0,10	0,10
173	7,2	0,00	0,10	0,10	0,10	0,10
195	8,1	0,10	0,00	0,10	0,10	0,00
219	9,1	0,00	0,10	0,10	0,10	0,10
243	10,1	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00
262	10,9	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
334	13,9	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
413	17,2	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
436	18,2	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
503	21,0	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
580	24,2	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
672	28,0	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
744	31,0	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
840	35,0	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
912	38,0	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
1008	42,0	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
1080	45,0	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00

Při pozorování slepého pokusu při koncentraci 0 mg/l fenolu nám žádná z kultur nezačala růst. Jedná se o důkaz, že jsme v přípravě neudělali chybu.

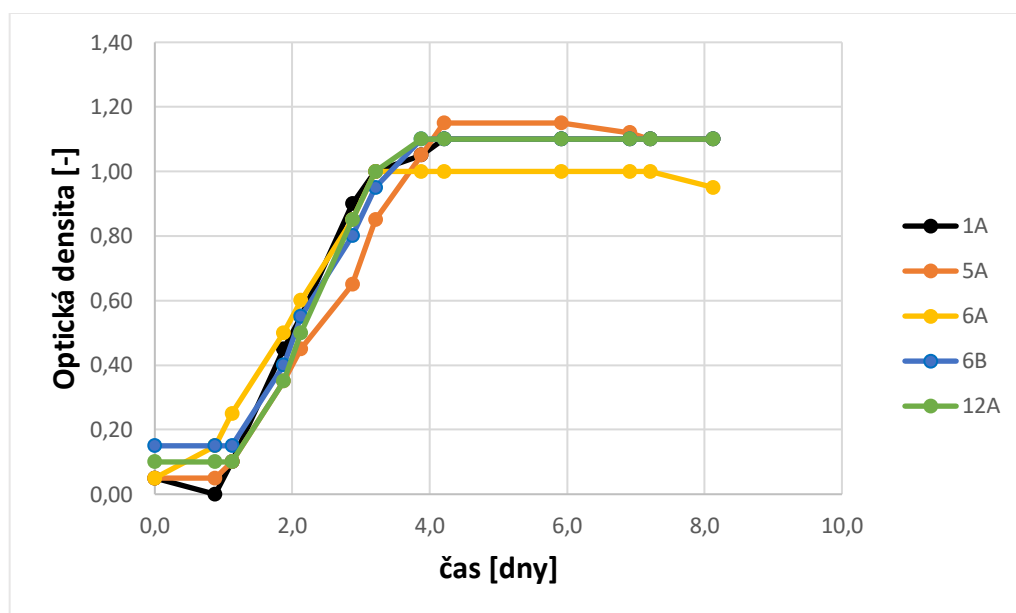
### Koncentrace 100 mg/l

Tabulka 19: Růst kultur na fenolu při koncentraci 100 mg/l

Doba inkubace		Kultura				
Hodiny	Dny	1A	5A	6A	6B	12A
0	0,0	0,05	0,05	0,05	0,15	0,10
21	0,9	0,00	0,05	0,15	0,15	0,10
27	1,1	0,10	0,10	0,25	0,15	0,10
45	1,9	0,45	0,35	0,50	0,40	0,35
51	2,1	0,55	0,45	0,60	0,55	0,50
69	2,9	0,90	0,65	0,85	0,80	0,85
77	3,2	1,00	0,85	1,00	0,95	1,00
93	3,9	1,05	1,05	1,00	1,10	1,10
101	4,2	1,10	1,15	1,00	1,10	1,10
142	5,9	1,10	1,15	1,00	1,10	1,10
166	6,9	1,10	1,12	1,00	1,10	1,10
173	7,2	1,10	1,10	1,00	1,10	1,10
195	8,1	1,10	1,10	0,95	1,10	1,10

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Jako první můžeme pozorovat dosažení maxima u kultury 6A a to již třetí den od začátku pokusu. Densilometr naměřil hodnotu 1. Dalšího dne dosáhly svých maxim kultur 6B a 12A, a to stejné hodnoty 1,1. Jako poslední, ale nejvyššího maxima, dosáhla kultura 5A, a to hodnoty 1,15. Toto měření bylo ukončeno 8. den, protože kultury přestaly růst.



Obrázek 23: Růst kultur na fenolu při koncentraci 100 mg/l po růstu inokula na fenolu

### Koncentrace 200 mg/l

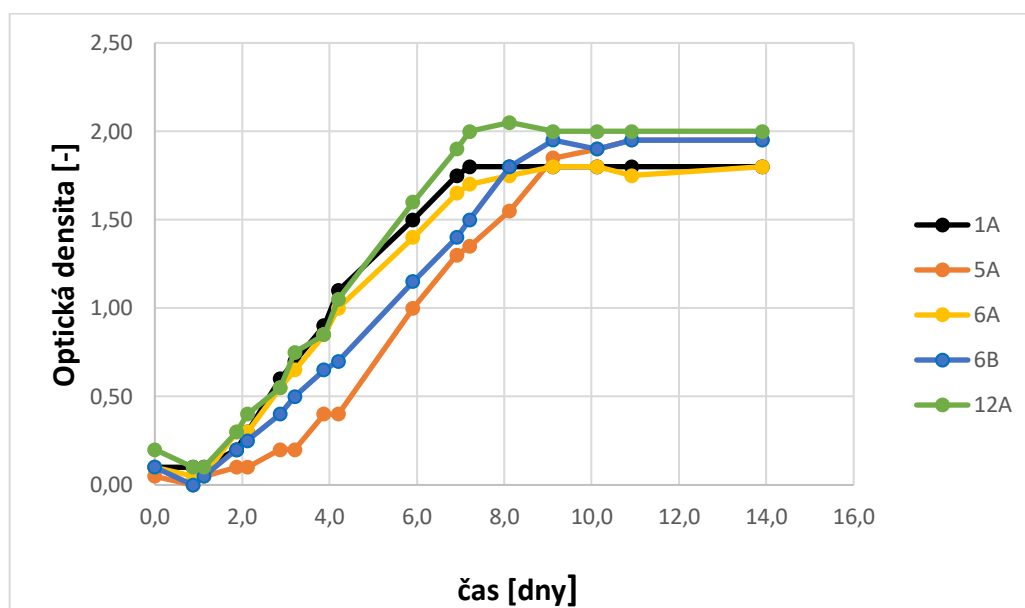
Tabulka 20: Růst kultur na fenolu při koncentraci 200 mg/l

Doba inkubace		Kultura				
Hodiny	Dny	1A	5A	6A	6B	12A
0	0,0	0,10	0,05	0,10	0,10	0,20
21	0,9	0,10	0,00	0,05	0,00	0,10
27	1,1	0,10	0,05	0,05	0,05	0,10
45	1,9	0,20	0,10	0,30	0,20	0,30
51	2,1	0,30	0,10	0,30	0,25	0,40
69	2,9	0,60	0,20	0,55	0,40	0,55
77	3,2	0,70	0,20	0,65	0,50	0,75
93	3,9	0,90	0,40	0,85	0,65	0,85
101	4,2	1,10	0,40	1,00	0,70	1,05
142	5,9	1,50	1,00	1,40	1,15	1,60
166	6,9	1,75	1,30	1,65	1,40	1,90
173	7,2	1,80	1,35	1,70	1,50	2,00
195	8,1	1,80	1,55	1,75	1,80	2,05
219	9,1	1,80	1,85	1,80	1,95	2,00
243	10,1	1,80	1,90	1,80	1,90	2,00
262	10,9	1,80	1,95	1,75	1,95	2,00

334	13,9	1,80	1,95	1,80	1,95	2,00
-----	------	------	------	------	------	------

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

V tomto případě dosáhla první svého maxima opět kultura 1A, a to 7. den, s hodnotou 1,8. Další den dosáhla svého maxima kultura 12A s nejvyšší hodnotou 2,05. Po 9 dnech dosáhly svých maxim kultur 6A a 6B. Vyššího maxima však dosáhla hodnota 6B 1,95 a 6A pouze 1,8. Poslední maximum bylo dosaženo 11.den pokusu kulturou 5A 1,95. Tento dílčí test byl ukončen po 14 dnech, po dosažení maxim.



Obrázek 24: Růst kultur na fenolu při koncentraci 200 mg/l po růstu inokula na fenolu

### Koncentrace 300 mg/l

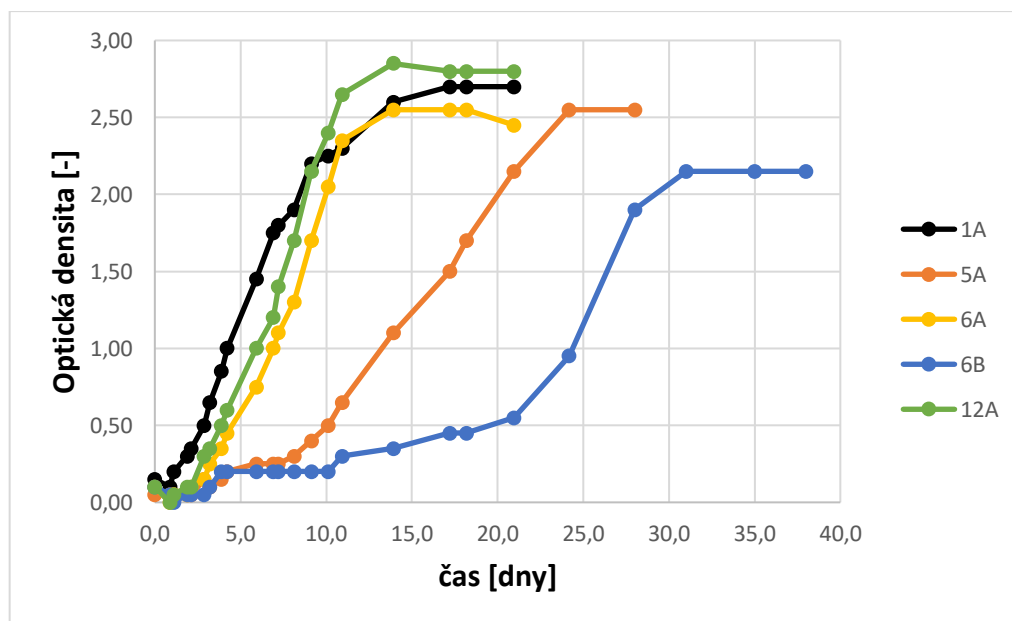
Tabulka 21: Růst kultur na fenolu při koncentraci 300 mg/l

Doba inkubace		Kultura				
Hodiny	Dny	1A	5A	6A	6B	12A
0	0,0	0,15	0,05	0,10	0,10	0,10
21	0,9	0,10	0,05	0,00	0,05	0,00
27	1,1	0,20	0,05	0,05	0,00	0,05
45	1,9	0,30	0,05	0,05	0,05	0,10
51	2,1	0,35	0,05	0,10	0,05	0,10
69	2,9	0,50	0,15	0,15	0,05	0,30
77	3,2	0,65	0,10	0,25	0,10	0,35
93	3,9	0,85	0,15	0,35	0,20	0,50
101	4,2	1,00	0,20	0,45	0,20	0,60
142	5,9	1,45	0,25	0,75	0,20	1,00
166	6,9	1,75	0,25	1,00	0,20	1,20
173	7,2	1,80	0,25	1,10	0,20	1,40
195	8,1	1,90	0,30	1,30	0,20	1,70
219	9,1	2,20	0,40	1,70	0,20	2,15

243	10,1	2,25	0,50	2,05	0,20	2,40
262	10,9	2,30	0,65	2,35	0,30	2,65
334	13,9	2,60	1,10	2,55	0,35	2,85
413	17,2	2,70	1,50	2,55	0,45	2,80
436	18,2	2,70	1,70	2,55	0,45	2,80
503	21,0	2,70	2,15	2,45	0,55	2,80
580	24,2	KONEC	2,55	KONEC	0,95	KONEC
672	28,0		2,55		1,90	
744	31,0		KONEC		2,15	
840	35,0				2,15	
912	38,0				2,15	
1008	42,0				KONEC	

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Vzhledem k tomu, že se jedná už o poměrně vysokou koncentraci, tak každá kultura situaci zvládala jinak. Jako v předchozích pokusech můžeme pozorovat prodloužení lagových fází, zato však kultury dosahují vyšších maxim. Po 14 dnech od začátku pokusu dosáhly svých maxim kultury 6A a 12A, s hodnotami 2,55 a 2,85. Následně svého maxima dosáhla opět kultura 1A - 17. den s hodnotou 2,7. Všechny tyto kultury byly sledovány 21 dní. Po 24 dnech dosáhla svého maxima kultura 5A s hodnotou 2,55 a její měření bylo ukončeno po 28 dnech. Poslední dosáhla svého maxima kultura 6B s nejnižší hodnotou 2,15 a její sledování bylo přerušeno až 38. den. Nejvyššího maxima v tomto případě dosáhla kultura 12A.



Obrázek 25: Růst kultur na fenolu při koncentraci 300 mg/l po růstu inokula na fenolu

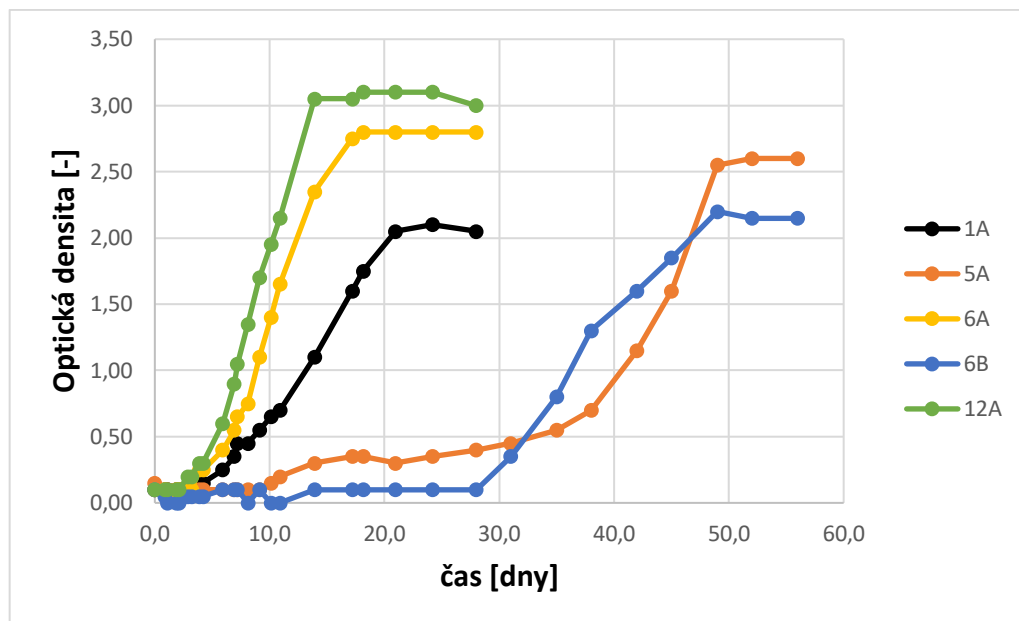
**Koncentrace 350 mg/l**

Tabulka 22: Růst kultur na fenolu při koncentraci 350 mg/l

Doba inkubace		Kultura				
Hodiny	Dny	1A	5A	6A	6B	12A
0	0,0	0,10	0,15	0,10	0,10	0,10
21	0,9	0,10	0,10	0,10	0,05	0,10
27	1,1	0,10	0,10	0,05	0,00	0,10
45	1,9	0,10	0,10	0,10	0,00	0,10
51	2,1	0,10	0,10	0,10	0,00	0,10
69	2,9	0,10	0,10	0,10	0,05	0,20
77	3,2	0,10	0,10	0,10	0,05	0,20
93	3,9	0,15	0,10	0,25	0,05	0,30
101	4,2	0,15	0,10	0,25	0,05	0,30
142	5,9	0,25	0,10	0,40	0,10	0,60
166	6,9	0,35	0,10	0,55	0,10	0,90
173	7,2	0,45	0,10	0,65	0,10	1,05
195	8,1	0,45	0,10	0,75	0,00	1,35
219	9,1	0,55	0,10	1,10	0,10	1,70
243	10,1	0,65	0,15	1,40	0,00	1,95
262	10,9	0,70	0,20	1,65	0,00	2,15
334	13,9	1,10	0,30	2,35	0,10	3,05
413	17,2	1,60	0,35	2,75	0,10	3,05
436	18,2	1,75	0,35	2,80	0,10	3,10
503	21,0	2,05	0,30	2,80	0,10	3,10
580	24,2	2,10	0,35	2,80	0,10	3,10
672	28,0	2,05	0,40	2,80	0,10	3,00
744	31,0	KONEC	0,45	KONEC	0,35	KONEC
840	35,0		0,55		0,80	
912	38,0		0,70		1,30	
1008	42,0		1,15		1,60	
1080	45,0		1,60		1,85	
1176	49,0		2,55		2,20	
1248	52,0		2,60		2,15	
1344	56,0		2,60		2,15	
			KONEC		KONEC	

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Při koncentraci 350 mg/l první dosáhly svého maxima kultury 6A a 12A 18. den od začátku pokusu a dosáhly hodnot 2,8 a 3,1. Následně dosáhla maxima 24. den kultura 1A hodnoty 2,1. V těchto případech bylo měření ukončeno po 28 dnech. U zbylých kultur bylo dosaženo maxima po razantně delší době, a to až 49. den v případě 6B (2,2), a 52. den (2,6) u kultury 5A. Při této koncentraci si můžeme opět všimnout, že všechny kultury opět dosáhly vyšších hodnot než v případě nižších koncentrací a ve všech případech také došlo k prodloužení lagových fází. V této části pokusu nejvyšší hodnoty dosáhla kultura 12A a nejnižší 1A.



Obrázek 26: Růst kultur na fenolu při koncentraci 350 mg/l po růstu inokula na fenolu

### Koncentrace 400 mg/l

Tabulka 23: Růst kultur na fenolu při koncentraci 400 mg/l

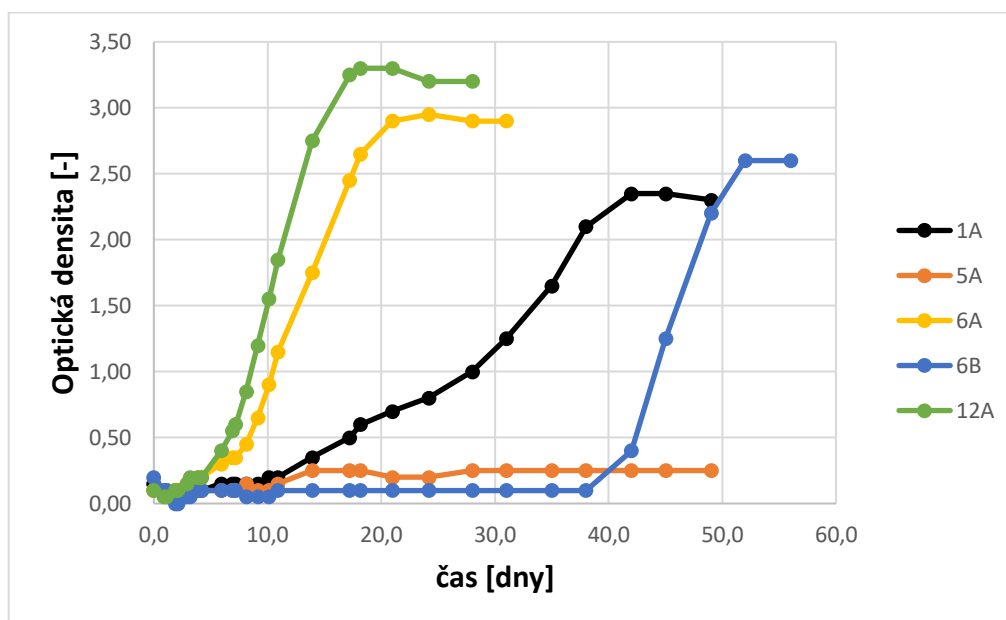
Doba inkubace		Kultura				
Hodiny	Dny	1A	5A	6A	6B	12A
0	0,0	0,15	0,10	0,10	0,20	0,10
21	0,9	0,10	0,10	0,10	0,10	0,05
27	1,1	0,10	0,05	0,10	0,10	0,05
45	1,9	0,10	0,10	0,10	0,00	0,10
51	2,1	0,10	0,10	0,10	0,00	0,10
69	2,9	0,10	0,10	0,15	0,05	0,15
77	3,2	0,10	0,10	0,15	0,05	0,20
93	3,9	0,10	0,10	0,20	0,10	0,20
101	4,2	0,10	0,10	0,20	0,10	0,20
142	5,9	0,15	0,10	0,30	0,10	0,40
166	6,9	0,15	0,10	0,35	0,10	0,55
173	7,2	0,15	0,10	0,35	0,10	0,60
195	8,1	0,15	0,15	0,45	0,05	0,85
219	9,1	0,15	0,10	0,65	0,05	1,20
243	10,1	0,20	0,10	0,90	0,05	1,55
262	10,9	0,20	0,15	1,15	0,10	1,85
334	13,9	0,35	0,25	1,75	0,10	2,75
413	17,2	0,50	0,25	2,45	0,10	3,25
436	18,2	0,60	0,25	2,65	0,10	3,30
503	21,0	0,70	0,20	2,90	0,10	3,30
580	24,2	0,80	0,20	2,95	0,10	3,20
672	28,0	1,00	0,25	2,90	0,10	3,20
744	31,0	1,25	0,25	2,90	0,10	KONEC
840	35,0	1,65	0,25	KONEC	0,10	
912	38,0	2,10	0,25		0,10	

1008	42,0	2,35	0,25		0,40	
1080	45,0	2,35	0,25		1,25	
1176	49,0	2,30	0,25		2,20	
1248	52,0	KONEC	KONEC		2,60	
1344	56,0				2,60	
					KONEC	

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Při této koncentraci rostly pouze 4 kultury z 5. Kultura 5A zde dosáhla maximální hodnoty 14. den pouze 0,25, což je velice málo vzhledem k faktu, že při koncentraci 350 mg/l dosáhla hodnoty 2,6. Nejrychlejší kultura 12A nabyla maximální hodnoty 3,3 již 18. den, následně kultura 6A 24. den dospěla k hodnotě 2,95. Kultura 1A dosáhla 42. den hodnoty 2,35 a jako poslední po 52 dnech kultura 6B hodnoty 2,6. Nejvyšších hodnot jako v předešlé sérii dosáhla kultura 12A a nejnižších 5A. Všechny kultury kromě 5A dosáhly vyšších maximálních hodnot než v předchozích případech.

Je ale velice zajímavé, že 4 kultury rostly i při tak vysoké koncentraci. To můžeme připsat adaptaci kultur na fenol před zahájením testu; v předchozím pokusu III, kdy inokula nebyla na fenol adaptována, 4 kultury z 6 nebyly při koncentraci 350 mg/l fenolu růstu schopny. V pokusu IV nenastal výrazný růst pouze u 1 kultury z 5. Můžeme tak konstatovat, že kultura 5A není schopná rozkladu fenolu při této koncentraci.



Obrázek 27: Růst kultur na fenolu při koncentraci 400 mg/l po růstu inokula na fenolu



**Koncentrace 500 mg/l**

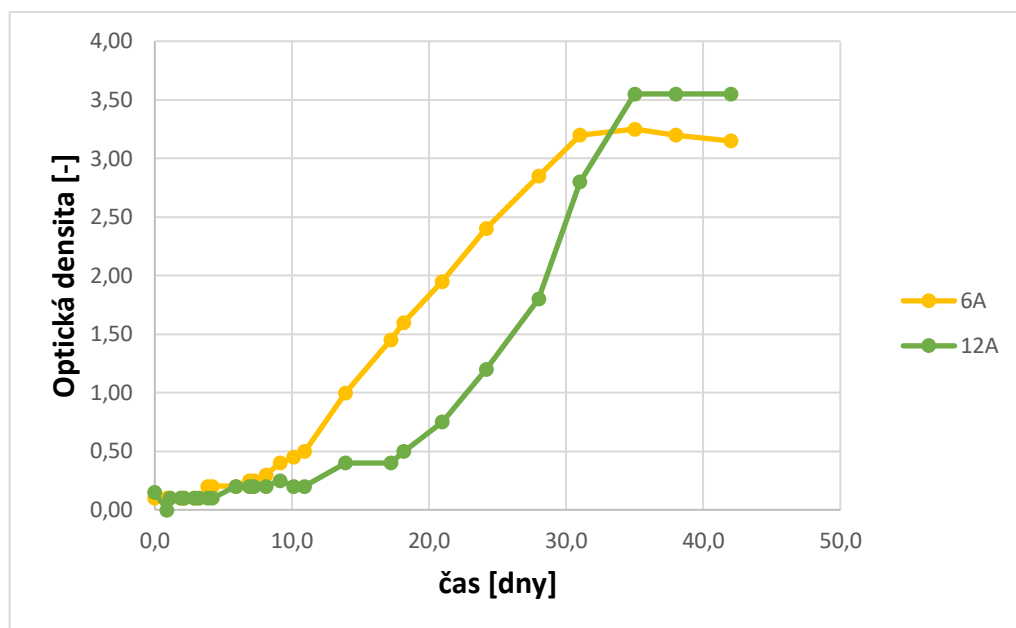
Tabulka 24: Růst kultur na fenolu při koncentraci 500 mg/l

Doba inkubace		Kultura				
Hodiny	Dny	1A	5A	6A	6B	12A
0	0,0	-	-	0,10	-	0,15
21	0,9	-	-	0,10	-	0,00
27	1,1	-	-	0,10	-	0,10
45	1,9	-	-	0,10	-	0,10
51	2,1	-	-	0,10	-	0,10
69	2,9	-	-	0,10	-	0,10
77	3,2	-	-	0,10	-	0,10
93	3,9	-	-	0,20	-	0,10
101	4,2	-	-	0,20	-	0,10
142	5,9	-	-	0,20	-	0,20
166	6,9	-	-	0,25	-	0,20
173	7,2	-	-	0,25	-	0,20
195	8,1	-	-	0,30	-	0,20
219	9,1	-	-	0,40	-	0,25
243	10,1	-	-	0,45	-	0,20
262	10,9	-	-	0,50	-	0,20
334	13,9	-	-	1,00	-	0,40
413	17,2	-	-	1,45	-	0,40
436	18,2	-	-	1,60	-	0,50
503	21,0	-	-	1,95	-	0,75
580	24,2	-	-	2,40	-	1,20
672	28,0	-	-	2,85	-	1,80
744	31,0	-	-	3,20	-	2,80
840	35,0	-	-	3,25	-	3,55
912	38,0	-	-	3,20	-	3,55
1008	42,0	-	-	3,15	-	3,55
1080	45,0	-	-	KONEC	-	KONEC

Zeleně jsou zaznačena maxima růstu

Při nejvyšší koncentraci jsme sledovali pouze růst 2 kultur, a to u 6A a 12A. Dle výsledků pokusu III jsme vybrali tyto dvě kultury, které jako jediné rostly i při vstupní koncentraci 500 mg/l při naočkování z R2A agaru.

V pokusu IV dosáhly obě kultury svých maxim 35. den, a to kultura 6A hodnoty 3,25 a kultura 12A hodnoty 3,55. V obou případech bylo měření ukončeno po 45 dnech. Opět obě kultury dosáhly vyšších maximálních hodnot než u nižších koncentrací a také došlo k prodloužení lagových fází.



Obrázek 28: Růst kultur na fenolu při koncentraci 500 mg/l po růstu inokula na fenolu

### **Srovnání růstu jednotlivých kultur na různých koncentracích fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu**

Výsledky posledního pokusu umožnily srovnat růstové schopnosti pěti bakteriálních kultur na fenolu, při dvou odlišných způsobech předinkubace. Srovnání lagových fází, doby maximálního růstu i hodnot maximálního růstu kultur při různých vstupních koncentracích fenolu je provedeno v následujících tabulkách 25 – 29.

Tabulka 25: Růst kultury 1A na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu

Koncentrace fenolu (mg/l)	Lagová fáze (dny)		Doba MAXIMA (dny)		Hodnota MAXIMA růstu (OD)	
	R2A	Fenol	R2A	Fenol	R2A	Fenol
100	2	2	6	4	1,10	1,10
200	3	2	10	7	1,60	1,80
300	4-5	2	15	17	1,75	2,70
350	5	6	19	24	2,20	2,10
400	-	11-12	-	42	-	2,35
500	-	-	-	-	-	-

Tabulka 26: Růst kultury 5A na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu

Koncentrace fenolu (mg/l)	Lagová fáze (dny)		Doba MAXIMA (dny)		Hodnota MAXIMA růstu (OD)	
	R2A	Fenol	R2A	Fenol	R2A	Fenol
100	3	1	7	6	1,1	1,15

200	4	2	17	11	1,85	1,95
300	6	3	19	24	2,2	2,55
350	8	10	38	52	2	2,6
400	-	11	-	14	-	0,25
500	-	-	-	-	-	-

Tabulka 27: Růst kultury 6A na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu

Koncentrace fenolu (mg/l)	Lagová fáze (dny)		Doba MAXIMA (dny)		Hodnota MAXIMA růstu (OD)	
	R2A	Fenol	R2A	Fenol	R2A	Fenol
100	2	1	4	3	1	1
200	3	2	8	9	1,7	1,8
300	5	2	12	14	2,2	2,55
350	5	4	19	18	2,8	2,8
400	8	4	22	24	2,8	2,95
500	9	4	38	35	3,3	3,25

Tabulka 28: Růst kultury 6B na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu

Koncentrace fenolu (mg/l)	Lagová fáze (dny)		Doba MAXIMA (dny)		Hodnota MAXIMA růstu (OD)	
	R2A	Fenol	R2A	Fenol	R2A	Fenol
100	2	1	5	4	1,1	1,1
200	3	2	10	9	1,75	1,95
300	5	3	12	31	2,4	2,15
350	5	31	31	49	2,05	2,2
400	-	42	-	52	-	2,6
500	-	-	-	-	-	-

Tabulka 29: Růst kultury 12A na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu

Koncentrace fenolu (mg/l)	Lagová fáze (dny)		Doba MAXIMA (dny)		Hodnota MAXIMA růstu (OD)	
	R2A	Fenol	R2A	Fenol	R2A	Fenol
100	2	1	4	4	1,05	1,1
200	3	1	10	8	2	2,05
300	03	2	12	14	2,7	2,85
350	3	3	19	18	3,2	3,1
400	5	4	19	18	3,05	3,3
500	8	6	35	35	3,25	3,55

Srovnání pokusů II, III a IV u 5 kultur 1A, 5A, 6A, 6B a 12A při vstupních koncentracích fenolu 100, 200, 300, 350, 400 a 500 mg/l ukázalo, že růstové vlastnosti kultur se při dvou způsobech předinkubace lišily. Jasně můžeme lze vidět, že po růstu předinkubaci inokula na

fenolu se 4 z 5 kultur dokázaly adaptovat na rozklad fenolu. Můžeme to pozorovat tím, že kultury většinou začaly růst dříve než při předinkubaci na R2A agaru, dosahovaly daleko vyšších maximálních hodnot a že byly schopné růstu i za koncentrace 400 mg/l. Pouze kultura 5A tohoto nebyla schopna, jelikož účinek toxicity fenolu snáší každá kultura jinak. V některých případech však bylo zaznamenáno, že při zvýšených koncentracích fenolu rostly kultury předinkubované na fenolu pomaleji (dosáhly maxima po delší době inkubace) – např. kultura 1A při 350 mg/l a kultury 5A i 6B při 300 - 350 mg/l.

## 4.5 Biochemické a růstové vlastnosti kultur

### 4.5.1 OXItest (MIKROLATEST)

Tabulka 30: Výsledky OXItestu

Kultura	Výsledek
1A	-
5A	-
6A	-
6B	-
12A	-

U všech našich testovaných kultur vyšel tento test negativně, čili žádná kultura nevytváří enzym cytochromoxidázu.

### 4.5.2 NEFERMtest 24 (MIKROLATEST)

Z formuláře pro záznam výsledků jsme dle příbalového letáku (podle tabulky Interpretace reakcí) hodnotili barevné změny. Pouze u testu arginin a fosfatáza byly zaznamenány pozitivní reakce. Všechny zbylé testy vyšly negativně. Test argininu u kultur 1A, 5A a 5B vyšel slabě pozitivně, ale u kultur 6A, 6B a 12A vyšel jasně pozitivní (fialové/modré zbarvení). Test fosfatázy vyšel jasně pozitivně (žluté zbarvení) u všech kultur. Dle identifikační tabulky z příbalového letáku, i na základě negativní cytochromoxidázy, se můžeme domnívat, že se jedná ve všech případech o kultury *Acinetobacter lwoffii* nebo *A. junii*.

### 4.5.3 Růst kultur při různých teplotách na TYA a R2A agaru

Při teplotách 7, 13, 23 a 30 °C všechny kultury rostly velice dobře na obou agarech, většinou jsme mohli pozorovat růst už za jediný den. Při teplotě 7 °C byl růst nepatrně pomalejší, kultury narostly až 2. den. Při teplotách 37 a 43 °C nerostla žádná z kultur ani na jednom agaru.

## 4.6 Gramovo barvení

Výsledkem tohoto barvení jsou fotografie pořízené pomocí imerzního objektivu, které jsou uvedené na závěr mé práce v Příloze I. Na fotografiích je možné vidět gramnegativní bakterie, které mají nejčastěji kulatý tvar, tzv. koky, nebo výjimečně krátký oválný tvar, tzv. kokotyčky. Kultury jsou si v tomto zvětšení velice podobné. Buňky tohoto tvaru jsou obvyklé pro zástupce rodu *Acinetobacter* a dobře tedy korespondují s výsledky biochemických testů. [21]

## ZÁVĚR

V práci byly studovány bakteriální kultury 1A, 5A, 6A, 6B a 12A rostoucí na fenolu při 8 °C, a to jednak v růstových testech při koncentracích fenolu 100 až 500 mg/l a s různou předinkubací (na R2A agaru či na fenolu), a jednak z pohledu jejich biochemických a morfologických vlastností. První pokusy lze shrnout s tím, že z hlediska rychlosti růstu na fenolu je nejrychlejší kulturou kultura 12A. To lze podložit všemi 4 provedenými dílčími testy při koncentracích 100, 150, 200 i 250 mg/l.

Po druhém pokusu lze konstatovat, že kultury rostoucí na fenolu ve vyšších koncentracích (450 – 500 mg/l) jsou pouze dvě, a to kultury 12A a 6A. Od koncentrace 350 mg/l však můžeme pozorovat značné zpomalení i jejich růstu v obou případech. Zbylé 4 kultury nebyly schopné růstu při koncentracích fenolu vyšších než 400 mg/l.

Pro růst kultur na fenolu se jako výhodnější předinkubace ukázala ta, která byla provedena na 100 mg fenolu/l než na R2A agaru, neboť ve většině případů docházelo k rychlejšímu růstu kultur a v některých případech bylo dosaženo i vyšší hustoty buněk. Výjimku z tohoto pravidla však ukázaly kultury 1A, 5A a 6B při koncentracích fenolu 300 – 350 mg/l, kdy k dosažení maxima růstu bylo zapotřebí o něco delší kultivace než při předinkubaci na R2A agaru.

Po provedení růstových testů na fenolu byly všechny kultury předběžně identifikovány - u všech zmíněných kultur byl výsledek OXItestu negativní, čili žádná z nich není schopná vytvářet enzym cytochromoxidázu. Po provedení mikrotestů NEFERMtest 24 bylo zjištěno, že biochemické i morfologické vlastnosti všech kultur odpovídají zástupcům druhů *Acinetobacter lwoffii* nebo *A. junii*. Přesnější určení nebylo na základě provedených prací možné.

Práce tak celkově ukázala, že z běžných zdrojů povrchových vod je možné získat bakteriální kultury, schopné poměrně rychle využívat fenol při teplotě 8 °C pro svůj růst, a tím i tuto látku v určitých koncentracích eliminovat za chladných podmínek z vodního prostředí.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Kleger L., Příbylová J., Válek P., 2010: Fenoly, [online] [cit. 3.12.2022] dostupné z <https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/fenoly>
- [2] 2010: Bezpečnostní list, Fenol, [online] [cit. 6.12.2022] dostupné z <https://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Fenol.pdf>
- [3] Julinová M., 2016: Výskyt a vlastnosti polutantů, Univerzita Tomáše Bati Zlín: Fakulta technologická, s.59
- [4] Koutný M., Růžička J., Chlachula J., 2003: Screening for phenol-degrading bacteria in the pristine soils of south Siberia. *Applied Soil Ecology* Vol. 23, s. 79 - 83
- [5] Dastych M., 2021: Profil aminokyselin v séru a moči u pacientů s dlouhodobou domácí parenterální výživou a jeho optimalizace, STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST, Brno, s. 9 - 18
- [6] Cullmann F., Becker H., 1999: Lignans from the liverwort *Lepicolea ochroleuca*. *Phytochemistry*, s.1651–1656
- [7] Lapčík O., Hampl R., 1996: Jíte rádi flavonoidy, *Vesmír*, s.125 - 127
- [8] Winkel, Shirley, 2001: Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology
- [9] Velíšek J., Hajšlová J., 2009: *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS
- [10] Floriánová O., 2005: *Kůže: zpracování a výrobky*. 1. vyd. Praha: Grada, Řemesla, tradice, technika
- [11] Chew B., 1993: Role of Carotenoids in the Immune-Response, *Journal of Dairy Science*
- [12] Davies B. H., 1985: Carotenoid Metabolism in Animals, *Biochemists View. Pure and Applied Chemistry* 57: 679-684
- [13] Kudláčková E., 2009: *Strava a význam potravinových doplňků v léčbě a prevenci věkem podmíněné makulární degenerace*, MU Brno, [online] [cit. 8.5.2023]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/hy90vx/>
- [14] Anonym: Plant pigments, [online] [cit. 14.3.2022] dostupné z <https://letstalkscience.ca/educational-resources/backgrounders/plant-pigments>

- [15] Veselá L., Kubal M., Kozler J., Innemanová P., 2005: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*, 2005, roč. 99, s. 711-717
- [16] Mlčoch T., 2008: Fluorescence huminových kyselin 3D excitační emisní metodou, Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno
- [17] Skybová, M., Humínové kyseliny – prínos pre environmentálny výzkum, *Acta Montanistica Slovaca*, 2006, vol. 11, s. 362-366
- [18] Margesin, R., Gander, S., Zacke G., 2003: Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles* 7, 451–458.
- [19] Sepehr Sh., Shahnavaaz B., Asoodeh A., 2019: Biodegradation of phenol by cold-tolerant bacteria isolated from alpine soils of Binaloud Mountains in Iran, *Journal of Environmental Science and Health*
- [20] Li Y., Li J., Wang Ch., Wang P., 2010: Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1, *Bioresource Technology*, Elsevier
- [21] Sedláček I., 2007: Taxonomie baktérií. Masarykova univerzita, Brno



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

TYA Trypton yeast extract agar - tryptický agar s kvasničným extraktem

R2A nutričně redukované médium pro růst mikroorganismů

1A, 5A, 5B, 6A, 6B, 12A označení bakteriálních kultur

MM minerální médium

OD optická densita

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obrázek 1: Strukturní vzorec molekuly fenolu.....</i>	11
<i>Obrázek 2: Chemické struktury aromatických aminokyselin .....</i>	13
<i>Obrázek 3: Deriváty fenyylpropanu.....</i>	14
<i>Obrázek 4: Pravděpodobná struktura ligninu .....</i>	15
<i>Obrázek 5: Chemická struktura Flavanu (A, B-aromatická jádra, C-pyran) .....</i>	16
<i>Obrázek 6: Chemické zobrazení některých skupin flavonoidů .....</i>	16
<i>Obrázek 7: Struktury monomerních jednotek taninů .....</i>	18
<i>Obrázek 8: Základní chemické struktury nejznámějších karotenoidů .....</i>	19
<i>Obrázek 9: Zázornění absorpance karotenoidů vůči vlnové délce .....</i>	20
<i>Obrázek 10: Potencionální chemická struktura huminových kyselin [16].....</i>	21
<i>Obrázek 11: Rozdělení a vlastnosti huminových látek [16] .....</i>	21
<i>Obrázek 12: Schéma křížového roztěru.....</i>	29
<i>Obrázek 13: Roztěry 6 bakteriálních kultur na 2 petriho miskách .....</i>	33
<i>Obrázek 14: Růst kultur na fenolu při koncentraci 100 mg/l .....</i>	38
<i>Obrázek 15: Růst kultur na fenolu při koncentraci 150 mg/l .....</i>	39
<i>Obrázek 16: Růst kultur na fenolu při koncentraci 200 mg/l .....</i>	41
<i>Obrázek 17: Růst kultur na fenolu při koncentraci 250 mg/l .....</i>	42
<i>Obrázek 18: Růst kultur na fenolu při koncentraci 300 mg/l .....</i>	43
<i>Obrázek 19: Růst kultur na fenolu při koncentraci 350 mg/l .....</i>	44
<i>Obrázek 20: Růst kultur na fenolu při koncentraci 400 mg/l .....</i>	46
<i>Obrázek 21: Růst kultur na fenolu při koncentraci 450 mg/l .....</i>	47
<i>Obrázek 22: Růst kultur na fenolu při koncentraci 500 mg/l .....</i>	48
<i>Obrázek 23: Růst kultur na fenolu při koncentraci 100 mg/l po růstu inokula na fenolu... </i>	51
<i>Obrázek 24: Růst kultur na fenolu při koncentraci 200 mg/l po růstu inokula na fenolu... </i>	52
<i>Obrázek 25: Růst kultur na fenolu při koncentraci 300 mg/l po růstu inokula na fenolu... </i>	53
<i>Obrázek 26: Růst kultur na fenolu při koncentraci 350 mg/l po růstu inokula na fenolu... </i>	55
<i>Obrázek 27: Růst kultur na fenolu při koncentraci 400 mg/l po růstu inokula na fenolu... </i>	56
<i>Obrázek 28: Růst kultur na fenolu při koncentraci 500 mg/l po růstu inokula na fenolu... </i>	58

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Přehled obecných vlastností fenolu [2].....	11
Tabulka 2: Tabulka původu bakteriálních kultur.....	28
Tabulka 3: Výsledky růstu bakteriálních kultur po 1. dni při 8 °C.....	35
Tabulka 4: Výsledky růstu bakteriálních kultur po 2. dni při 8 °C.....	35
Tabulka 5: Výsledky růstu bakteriálních kultur po 5. dni při 8 °C.....	36
Tabulka 6: Výsledky růstu bakteriálních kultur po 7. dni při 8 °C.....	36
Tabulka 7: Hodnoty zákalu dle densilometru kontrolních zkumavek (bez fenolu) .....	37
Tabulka 8: Růst kultur na fenolu při koncentraci 100 mg/l (densita dle densilometru).....	37
Tabulka 9: Růst kultur na fenolu při koncentraci 150 mg/l (densita dle densilometru).....	39
Tabulka 10: Růst kultur na fenolu při koncentraci 200 mg/l (densita dle densilometru)....	40
Tabulka 11: Růst kultur na fenolu při koncentraci 250 mg/l (densita dle densilometru)....	41
Tabulka 12: Růst kultur na fenolu při koncentraci 300 mg/l (densita dle densilometru)....	42
Tabulka 13: Růst kultur na fenolu při koncentraci 350 mg/l (densita dle densilometru)....	43
Tabulka 14: Růst kultur na fenolu při koncentraci 400 mg/l (densita dle densilometru)....	45
Tabulka 15: Růst kultur na fenolu při koncentraci 450 mg/l (densita dle densilometru)....	46
Tabulka 16: Růst kultur na fenolu při koncentraci 500 mg/l (densita dle densilometru)....	47
Tabulka 17: Srovnání délky lagových fází (LAG) a maximálního růstu (MAX) u všech kultur (dny) při 8 °C, po inokulaci MM s fenolem kulturami z R2A agarů .....	49
Tabulka 18: Růst kultur na fenolu při koncentraci 0 mg/l.....	49
Tabulka 19: Růst kultur na fenolu při koncentraci 100 mg/l.....	50
Tabulka 20: Růst kultur na fenolu při koncentraci 200 mg/l.....	51
Tabulka 21: Růst kultur na fenolu při koncentraci 300 mg/l.....	52
Tabulka 22: Růst kultur na fenolu při koncentraci 350 mg/l.....	54
Tabulka 23: Růst kultur na fenolu při koncentraci 400 mg/l.....	55
Tabulka 24: Růst kultur na fenolu při koncentraci 500 mg/l.....	57
Tabulka 25: Růst kultury 1A na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu.....	58
Tabulka 26: Růst kultury 5A na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu.....	58
Tabulka 27: Růst kultury 6A na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu.....	59
Tabulka 28: Růst kultury 6B na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu.....	59
Tabulka 29: Růst kultury 12A na fenolu po předinkubaci na R2A agaru a po předinkubaci na fenolu .....	59

---

Tabulka 30: Výsledky OXItestu ..... 60

## SEZNAM PŘÍLOH

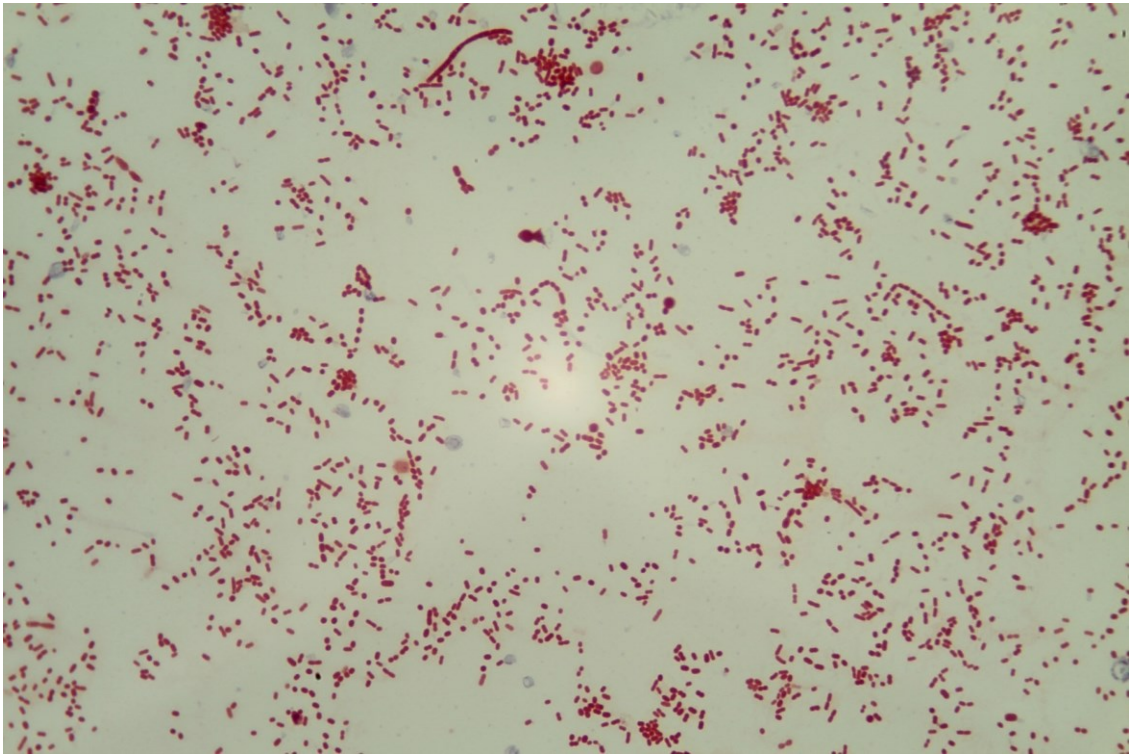
PŘÍLOHA I: GRAMOVO BARVENÍ

PŘÍLOHA II: TABULKA KVASINEK A BAKTERIÍ ROZKLÁDAJÍCÍ FENOL ZA NÍZKÝCH TEPLOT [18]

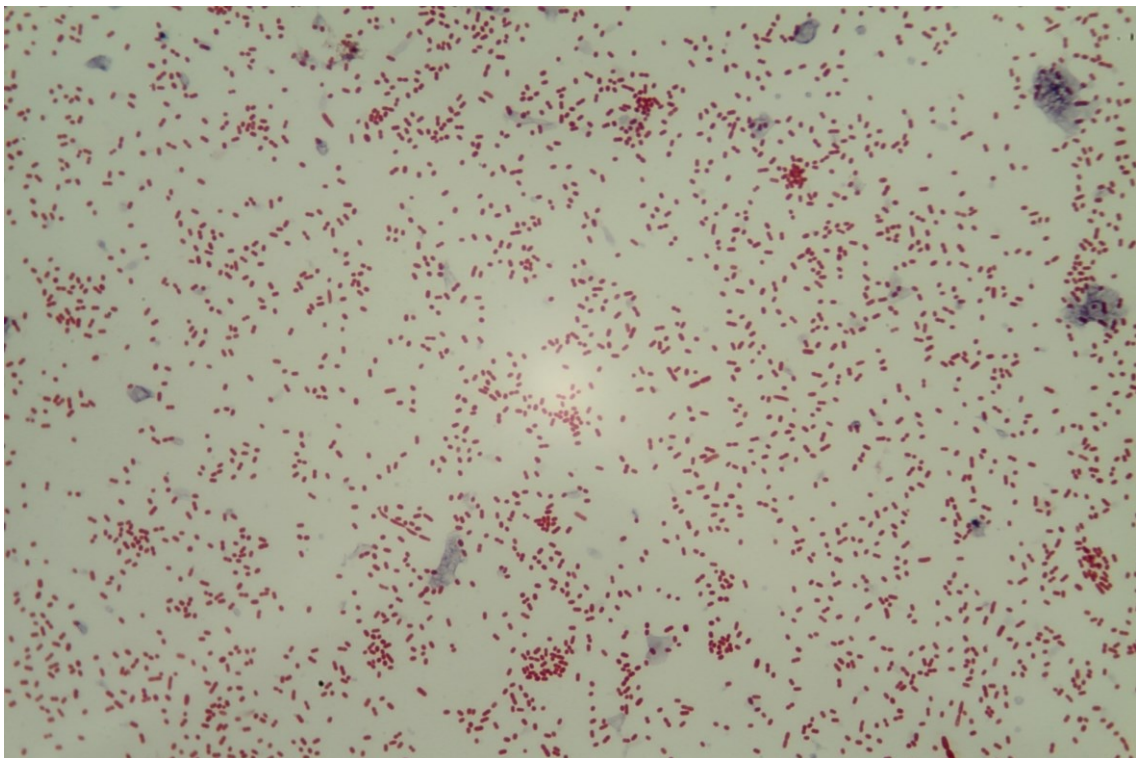
PŘÍLOHA III: RŮSTOVÉ KŘIVKY PRO BAKTERIÁLNÍ KMENY V MÉDIU MSM [19]

PŘÍLOHA IV: KINETIKA RŮSTU A BIODEGRADACE FENOLU PSYCHROFILNÍ *PSEUDOMONAS PUTIDA* LY1 [20]

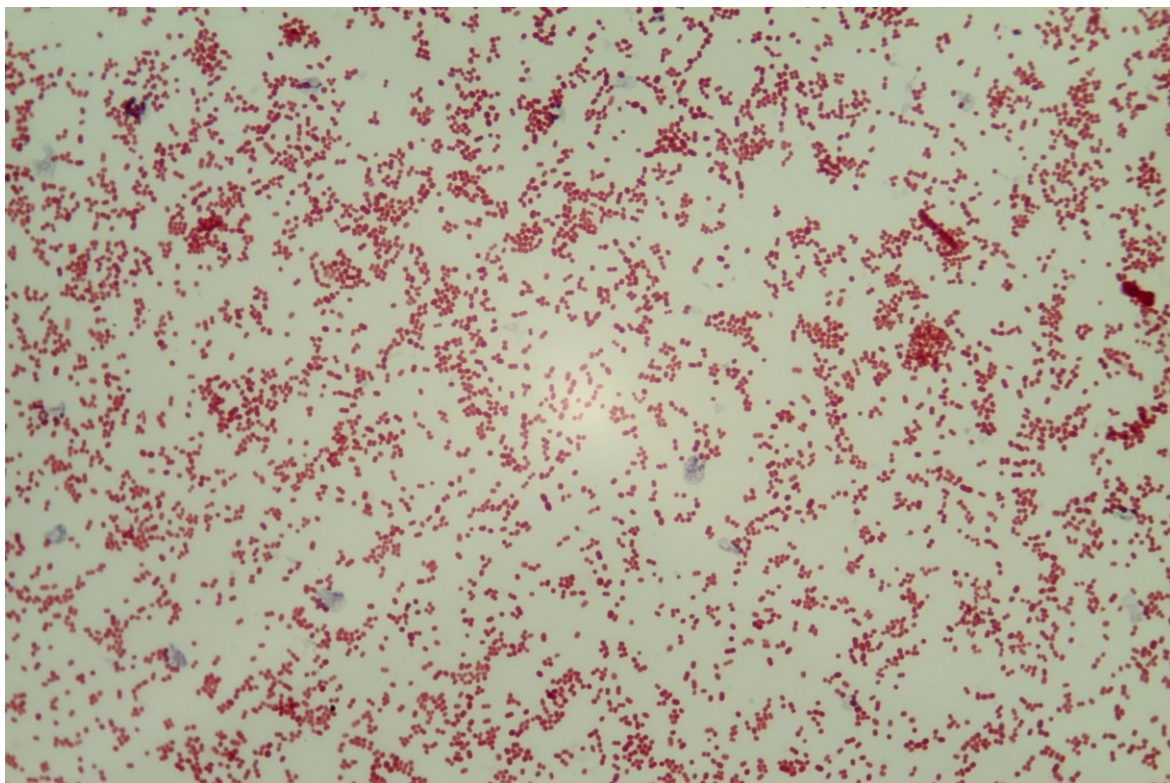
## PŘÍLOHA I: GRAMOVO BARVENÍ



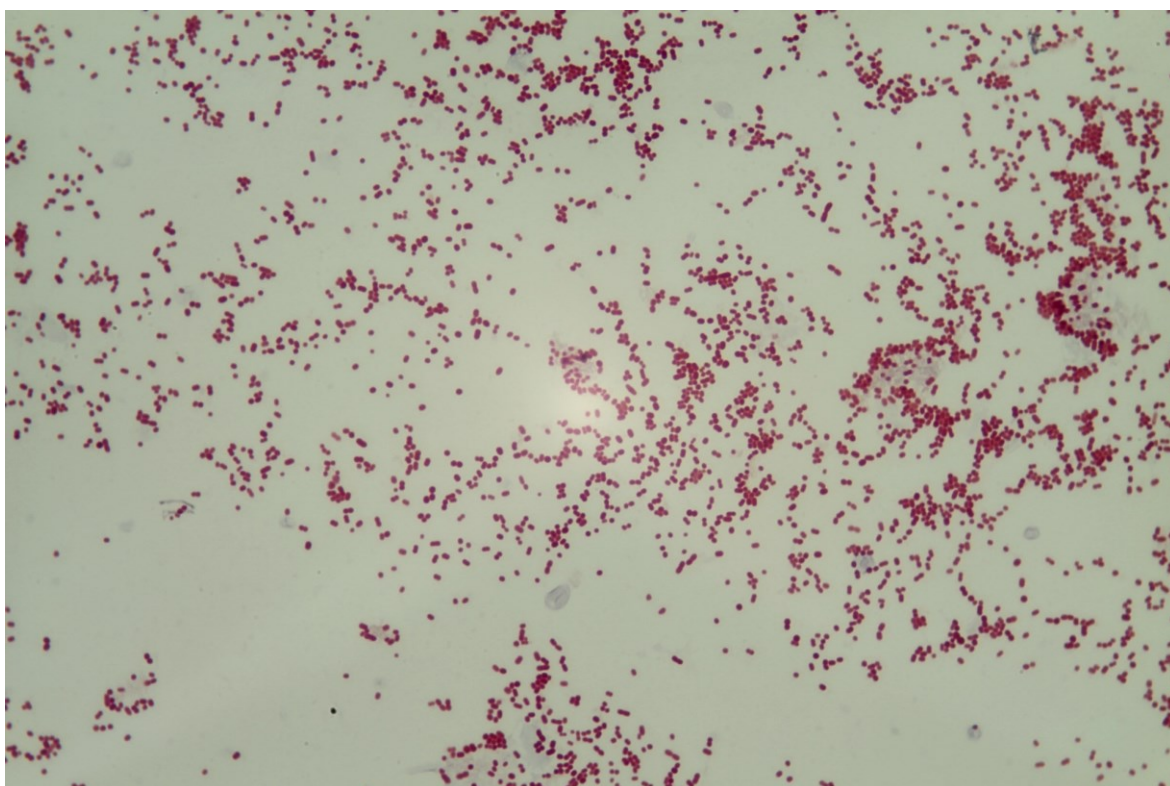
**Kultura 1A (1000x zvětšena)**



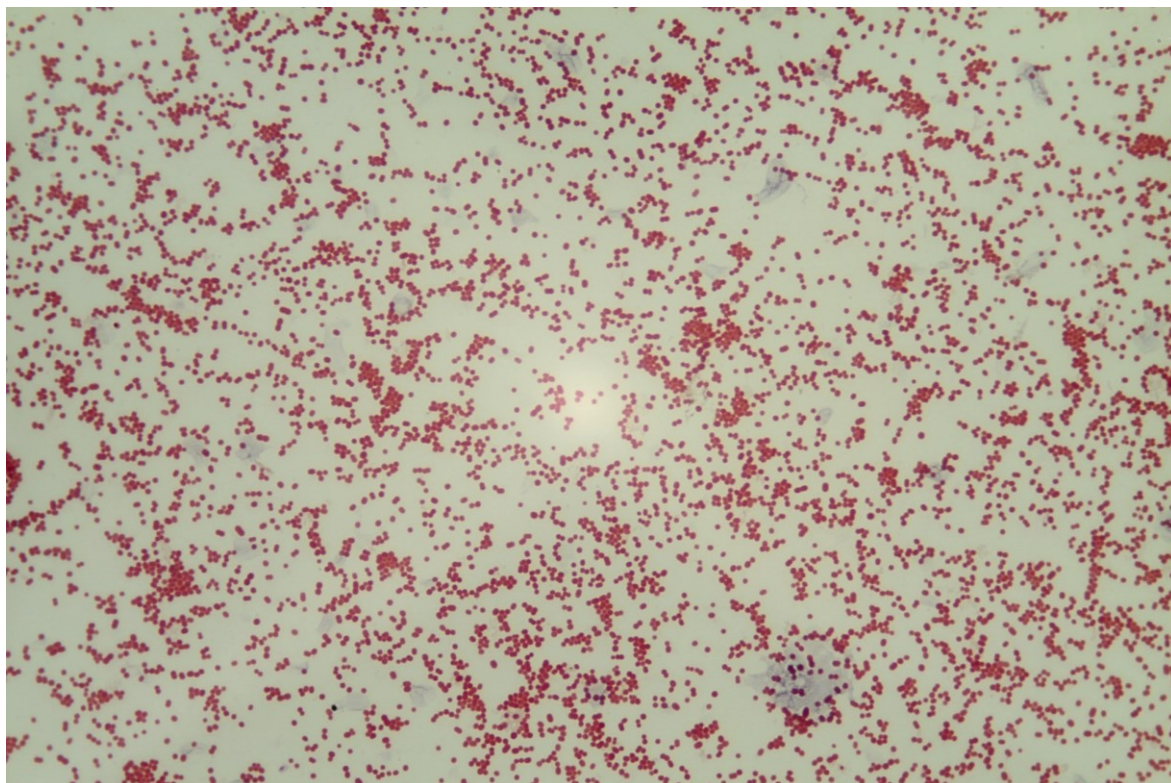
**Kultura 5A (1000x zvětšena)**



**Kultura 6A (1000x zvětšena)**



**Kultura 6B (1000x zvětšena)**



**Kultura 12A (1000x zvětšena)**

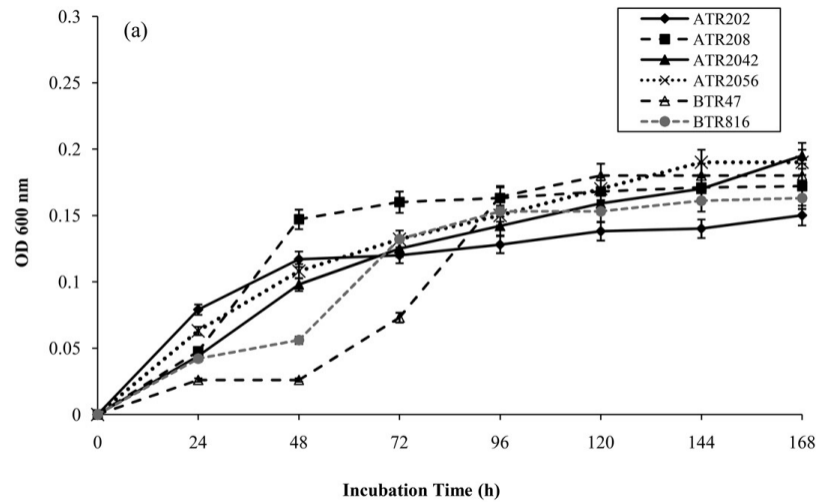


## PŘÍLOHA II: TABULKA KVASINEK A BAKTERIÍ ROZKLÁDAJÍCÍ FENOL ZA NÍZKÝCH TEPLŮT [18]

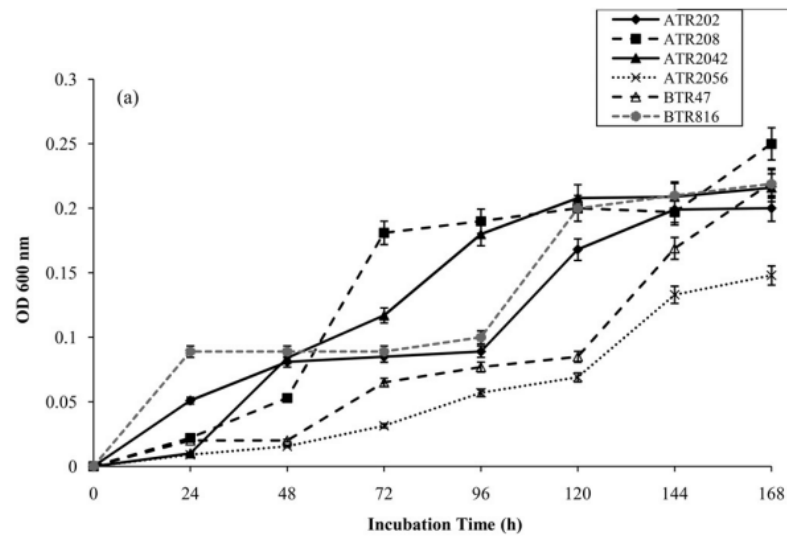
**Table 3** Characterization of phenol-degrading cold-adapted yeasts and bacteria ( $T_{max}$ : maximum temperature at which growth in R2A medium occurred; C1,2D: presence of catechol 1,2 dioxygenase; C2,3D: presence of catechol 2,3 dioxygenase; +: positive reaction; (-): weak reaction; - negative reaction; *Phenol<sub>max</sub>*: highest phenol concentration degraded at 10°C)

Strain	Isolated from	Identification	$T_{max}$ for growth (°C)	Effect of temperature (°C) on phenol degradation	Effect of temperature on biomass formation (OD)	C1,2D	C2,3D	[Phenol <sub>max</sub> ] (mM)
<b>Yeasts</b>								
AG 15	Alpine ice cave (A)	<i>Cryptococcus</i> sp.	20	20 > 10 > 1	10 > 1 > 20	+	-	12.5
AG 21	Alpine glacier foot (mud in the thawing zone; F)	<i>Cryptococcus</i> sp.	20	10 > 1 > 20	10 > 20 = 1	+	-	12.5
<b>Bacteria</b>								
AG 17	Alpine ice cave (A)	Heterobasidiomycete	15	10 > 1 > > 15	10 > 1 > 15	+	-	10
A 10	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Rhodotorula</i> sp.	20	10 > 1 > 20	10 > 20 = 1	+	-	5
A 11	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Rhodotorula</i> sp.	20	10 > 1 > > 20	10 > 1 > > 20	+	-	5
A 19	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Candida</i> sp.	20	1 = 10 > > 20	1 > 10 > 20	+	-	5
A 43	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Rhodotorula</i> sp.	20	20 > 10 > 1	10 > 20 > 1	+	+	5
<b>Bacteria</b>								
AG 30	Alpine ice cave (A)	<i>Arthrobacter</i> sp.	25	20 > 10 > 1	1 > 10 > 20	+	+	10
AG 31	Alpine ice cave (A)	<i>Arthrobacter</i> sp.	25	20 > 10 > 1	1 > 10 > 20	+	+	10
B41	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Pseudomonas</i> sp.	25	20 > 10 > 1	10 > 1 = 20	+	(+)	2.5
B 48	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Pseudomonas</i> sp.	30	20 > 10 > 1	10 > 1 = 20	(+)	-	2.5
C 16	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Pseudomonas</i> sp.	25	20 > 10 > 1	1 > 10 > 20	+	(+)	2.5
C 31	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Pseudomonas</i> sp.	25	20 > 10 > > 1	10 > 20 > 1	+	(+)	2.5
C 32	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Pseudomonas</i> sp.	25	20 > 10 > 1	10 > 1 > 20	+	(+)	2.5
C 34	Alpine glacier cryoconite (A)	<i>Pseudomonas</i> sp.	25	20 > 10 > 1	10 > 1 > 20	+	(+)	2.5

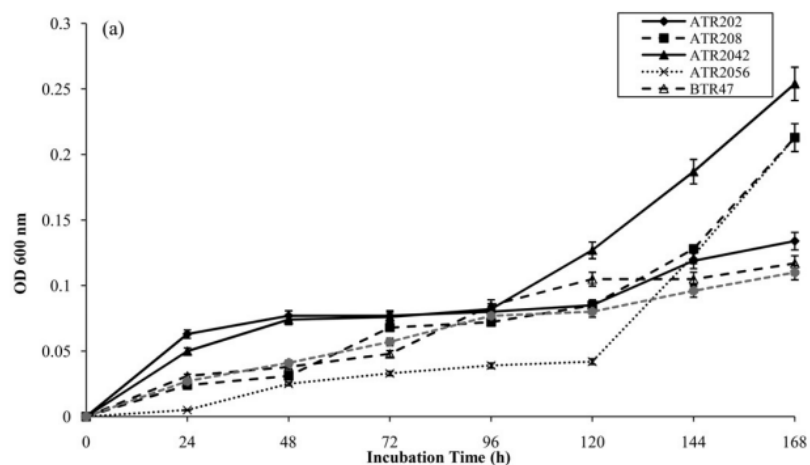
# PŘÍLOHA III: RŮSTOVÉ KŘIVKY PRO BAKTERIÁLNÍ KMENY V MÉDIU MSM [19]



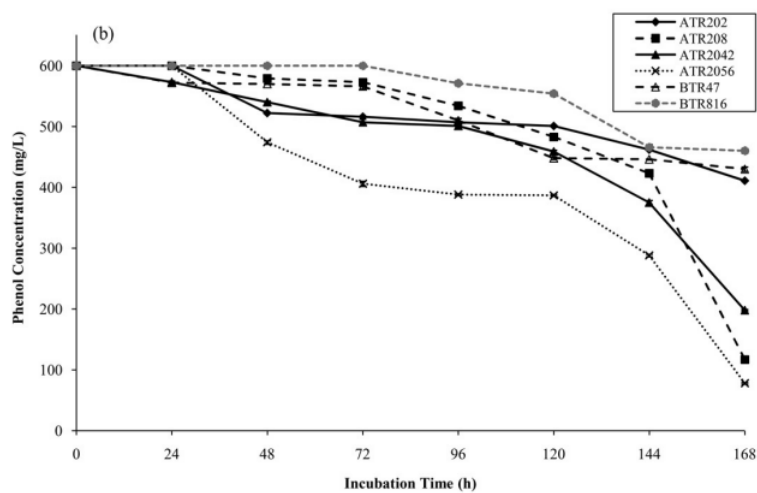
Graf 1. Růstové křivky pro bakteriální kmeny v médiu MSM doplněném 200 mg/l fenolu (a)



Graf 2. Růstové křivky pro bakteriální kmeny v médiu MSM doplněném 400 mg/l fenolu (a)

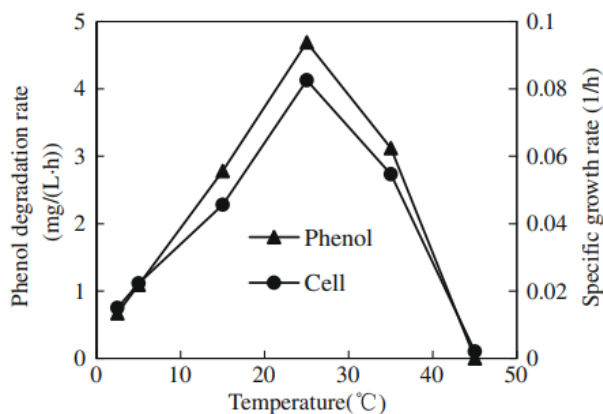


Graf 3. Růstové křivky pro bakteriální kmeny v médiu MSM doplněném 600 mg/l fenolu (a)

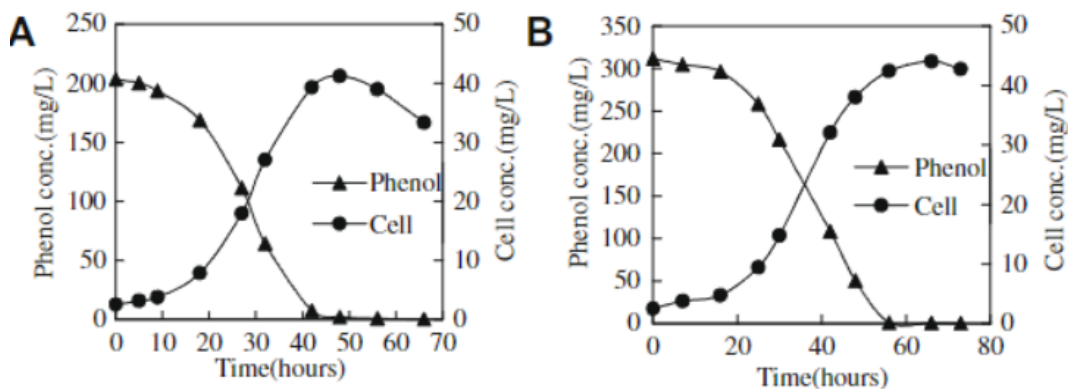


Graf 4. Křivky zbytkové koncentrace fenolu (b) při 600 mg/l fenolu

**PŘÍLOHA IV: KINETIKA RŮSTU A BIODEGRADACE FENOLU PSYCHROFILNÍ *PSEUDOMONAS PUTIDA* LY1 [20]**



**Graf 1** Vliv teploty na růst buněk *Pseudomonas putida* LY1 a degradaci fenolu



**Graf 2** Vliv počáteční koncentrace fenolu na rychlost degradace substrátu u *Pseudomonas putida* LY1 (počáteční koncentrace fenolu: (A) 200 mg/l a (B) 310 mg/l)

**Tab1.** Výpočty degradace fenolu a buněčného růstu u *Pseudomonas putida* LY1

Initial phenol concentration (mg/L)	Lag phase (h)	The highest cell conc. (mg/L)	Phenol degradation rate (mg/(L·h))	$\mu_{max}$ (1/h)	Growth yield, Y (mg cell / mg phenol)
20	0	13.2	1.26	0.090	0.474
30	0	19.5	1.70	0.112	0.556
40	0	23.9	1.51	0.117	0.695
50	0	25.8	1.87	0.122	0.765
60	0	28.9	2.15	0.117	0.462
70	0	33.0	2.43	0.103	0.437
90	0	34.6	2.08	0.101	0.348
110	10	38.1	2.52	0.098	0.226
200	10	41.2	4.19	0.089	0.190
310	16	44.0	5.55	0.067	0.139
380	25	52.8	4.27	0.040	0.136
800	-	-	-	-	-
The mean growth yield value (mg cell /mg phenol)					0.4025