

Degradace trichlorethylénu při nízké teplotě a dalších méně příznivých podmínkách

Bc. Lucie Kubanková

Diplomová práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Kubanková**
Osobní číslo: **T22324**
Studijní program: **N0712A030001 Environmentální inženýrství**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Degradace trichloroethenu při nízké teplotě a dalších méně příznivých podmínkách**

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši, zaměřenou na bakteriální kometabolickou degradaci trichloroethenu, ponejvíce za podmínek různých pH a případně v prostředí se zvýšenou koncentrací minerálních solí.

Ověřte schopnosti dříve získaných kultur bakterií rozkládat trichloroethen při 8 – 10°C a za podmínek mírně kyselého pH nebo při zvýšené koncentraci chloridu sodného.

Získané výsledky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v požadovaných formách v řádném termínu.

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

Seznam doporučené literatury:

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

Wu Z. et al.: Recent advances and trends of trichloroethylene biodegradation: A critical review. 2022. Frontiers in Microbiology 13:1053169. doi: 10.3389/fmicb.2022.1053169

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

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

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

Příloha č. 4 – Prohlášení autorky DP

**PROHLÁŠENÍ AUTORKY
DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Principem kometabolické degradace je rozložit cizorodou látku za specifických podmínek, kdy pomocí enzymů, potřebných pro rozklad růstového substrátu, dochází k přeměně nerůstového substrátu. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda jsou dříve získané bakteriální kultury, rostoucí na fenolu při 8 °C a současně při pH 5,2 nebo při zvýšené koncentraci NaCl, schopné degradovat trichlorethylén (TCE). Ověřovací růstové testy bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS byly úspěšné téměř ve všech podmínkách prostředí, tedy při neutrálním i mírně kyselém pH, teplotách 8 °C i 23 °C a také v přítomnosti laktátu i bez něj. Jako poměrně úspěšná se ukázala degradace TCE v koncentraci 1,8 mg/l kulturou 5BZS, rostoucí na fenolu v kombinaci s laktátem, kdy bylo rozloženo při teplotě 8 °C a pH 5,2 téměř 53 % TCE, při teplotě 23 °C pak 62 %. Degradace za stejných podmínek prostředí a při snížené vstupní koncentraci TCE (1,2 mg/l), pH 5,2 a teplotě 8 °C byla úspěšná téměř z 90 %. Degradací testy v přítomnosti 4 % NaCl však příliš úspěšné nebyly. Kultury 10AZS a 8AZS byly i přes svůj dobrý růst schopny rozložit pouze necelých 30 % a 20 % TCE.

Klíčová slova: kometabolická degradace, nízké pH, nízké teploty, obsah soli, trichlorethylén

ABSTRACT

The principle of cometabolic degradation is to break down xenobiotic substances under specific condition, where enzymes responsible for the degradation of the growth substrate concurrently transform non-growth substrates. The aim of this thesis was to determine whether previously obtained bacterial strains, growing on phenol at 8°C and simultaneously at pH 5.2 or with increased NaCl concentration, are capable of degrading trichloroethylene (TCE). Verification growth tests of bacterial strains 1AZS and 5BZS were successful under almost all environmental conditions, including neutral and slightly acidic pH, temperatures of 8°C and 23°C, and in the presence or absence of lactate. Degradation of TCE at a concentration of 1.8 mg/l by strain 5BZS, growing on phenol in combination with lactate, proved relatively successful, with nearly 62% of TCE degraded at a temperature of 8°C and pH 5.2, as well as at 23°C. Degradation under the same environmental conditions and at a

reduced input concentration of TCE (1.2 mg/l), pH 5.2, and temperature of 8°C was successful and nearly 90% of TCE was removed. However, degradation tests under increased NaCl concentration were not very successful. Strains 10AZS and 8AZS, despite their good growth on phenol in the presence of 4% NaCl and TCE, were able to degrade less than 30 % and 20 % of TCE.

Keywords: cometabolic degradation, low pH, low temperature, salt content, trichloroethylene

Tímto bych ráda velmi poděkovala panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph. D. za vedení diplomové práce, jeho cenné rady, doporučení, všestrannou pomoc, trpělivost a věnovaný čas. Poděkování patří také mé rodině, manželovi a dětem. Děkuji jim za jejich podporu i pochopení v průběhu celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	12
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 TRICHLORETHYLÉN	14
1.1 VLASTNOSTI, POUŽITÍ, VÝSKYT A VÝROBA TRICHLORETHYLÉNU	14
1.1.1 Vlastnosti.....	14
1.1.2 Použití	15
1.1.3 Výskyt a výroba	15
1.2 VLIV NA ZDRAVÍ A ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ.....	16
1.3 BIODEGRADACE	18
1.3.1 Biodegradace TCE	20
2 KOMETABOLISMUS	25
2.1 KOMETABOLISMUS TCE	26
2.1.1 Princip	26
2.1.2 Vhodné podmínky aerobní kometabolické degradace TCE.....	27
2.1.3 Nepříznivé podmínky aerobní kometabolické degradace TCE.....	28
2.2 DEGRADAČNÍ BAKTERIÁLNÍ KULTURY	29
2.2.1 Bakteriální kultury schopné degradace TCE.....	29
2.2.2 Degradáční kultury se schopností degradace TCE rostoucí na fenolu.....	32
2.2.3 Degradáční kultura 1AZS	32
2.2.4 Degradáční kultura 5BZS.....	33
2.2.5 Degradáční kultura 10AZS a 8AZS	34
2.3 PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE	34
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
3 METODIKA	37
3.1 MATERIÁLY	37
3.1.1 Roztoky	37
3.1.2 Chemikálie a živná média	39
3.1.3 Bakteriální kultury	39
3.2 PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY	40
3.2.1 Přístroje	40
3.2.2 Laboratorní pomůcky	40
3.3 METODY MĚŘENÍ.....	40
3.3.1 Měření optické hustoty na densilometru	40
3.3.2 Měření koncentrace TCE plynovou chromatografií (GC)	41
4 POSTUPY	44
4.1 OVĚŘENÍ RŮSTU BAKTERIÁLNÍCH KULTUR 1AZS A 5BZS.....	44

4.1.1	Ověření růstu bakteriální kultury 1AZS a 5BZS na různých koncentracích fenolu při teplotě 8 °C a 23 °C.....	44
4.1.2	Ověření růstu bakteriální kultury 1AZS a 5BZS na fenolu při pH 7 a teplotě 8 °C a 23 °C.....	44
4.1.3	Ověření růstu bakteriální kultury 1AZS a 5BZS na fenolu při pH 5,2 a teplotě 8 °C a 23 °C.....	45
4.1.4	Ověření změn pH při růstu bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS na fenolu a na kombinaci fenolu + laktátu sodného, při počátečním pH 5,3.....	45
4.2	DEGRADACE TCE	46
4.2.1	Degradace TCE kulturou 1AZS při teplotě 8 °C a pH 7,2 i 5,2.....	46
4.2.2	Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C a pH 7,2.....	47
4.2.3	Degradace TCE kulturou 1AZS a 5BZS při teplotě 8 °C, 150 mg/l fenolu a pH 5,3	47
4.2.4	Degradace TCE klidovými (nerostoucími) buňkami kultury 1AZS a 5BZS při teplotě 8 °C a 150 mg/l fenolu, při výchozím pH 6	47
4.2.5	Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C, 80 mg/l fenolu a 125 mg/l laktátu sodného a pH 5,3	48
4.2.6	Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 23 °C, 80 mg/l fenolu a 125 mg/l laktátu sodného a pH 5,3	48
4.2.7	Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C, 90 mg/l fenolu a 125 mg/l laktátu sodného a pH 5,2 – degradace při snížené vstupní koncentraci TCE.....	49
4.2.8	Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 10AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl.	50
4.2.9	Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 8AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl.	50
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
5.1	RŮSTOVÉ TESTY BAKTERIÁLNÍCH KULTUR.....	51
5.1.1	Ověření růstu bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS při pH 5,2 a pH 7,2; při koncentraci fenolu 200 mg/l a při teplotách 8 °C a 23 °C.....	51
5.1.2	Ověření růstu bakteriálních kultur při různých koncentracích fenolu:	55
5.2.1	Průběh degradace TCE kulturou 1AZS při nízké teplotě a pH 7,2.....	58
5.2.2	Průběh degradace TCE kulturou 5BZS při nízké teplotě a pH 7,2.....	58
5.2.3	Průběh degradace TCE bakteriálními kulturami při teplotě 8 °C, pH 5,3 a koncentraci fenolu 150 mg/l.....	59
5.2.4	Průběh degradace TCE nerostoucími buňkami při teplotě 8 °C a pH 5,3.....	62
5.2.5	Ověření změn pH při růstu bakteriálních kultur na fenolu v kombinaci s laktátem sodným, při počátečním pH 5,3	64
5.2.6	Průběh degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C a snížené koncentraci fenolu s přidaným laktátem, pH 5,2	65
5.2.7	Průběh degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 23 °C, snížené koncentraci fenolu s laktátem a pH 5,2.....	67
5.2.8	Průběh degradace TCE rostoucími buňkami kultury 10AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl.....	74
5.2.9	Průběh degradace TCE rostoucími buňkami kultury 8AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl.....	76

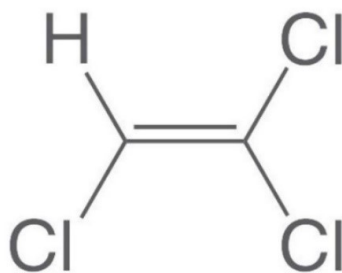
ZÁVĚR	78
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	80
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	86
SEZNAM OBRÁZKŮ	87
SEZNAM TABULEK.....	89
SEZNAM PŘÍLOH.....	90

ÚVOD

V životním prostředí (ŽP) se vyskytuje mnoho látek, které nejsou přirozeného původu a které mohou působit neblaze na veškeré složky životního prostředí. Řada těchto látek je všudypřítomná, jejich setrvání je dlouhodobé a v mnohých případech i beze změny. V dnešní době je kladen velký důraz na kontrolu závadných látek, ovšem v minulosti byl přístup odlišný. Neprobíhalo žádné omezení výroby, distribuce či kontrola jejich používání. To vše vedlo k nekontrolovatelnému znečištění prostředí. V době, kdy se začaly tyto látky testovat, zjišťovat jejich působení na živé organismy, či jejich šíření a akumulaci, došlo k omezení látek s prokázanými negativní dopady na ŽP, a to i přes jejich vynikající vlastnosti, kvůli kterým byly vyráběny a používány. Díky omezení výroby a kontrole používání již v současné době nedochází ke kontaminaci v rámci použití, ale spíše díky neodborné manipulaci při přepravě či skladování. Trichlorethylén (TCE) je vícechlorovaný ethylen se spoustou vynikajících vlastností, ale i s velkým množstvím nebezpečných a škodlivých účinků. V dnešní době je v ČR používán pouze jediným chemickým závodem Spolanou a.s., Neratovice, jako extrakční rozpouštědlo při výrobě kaprolaktamu. Podstatná většina kontaminace tedy pochází ze starých ekologických zátěží a týká se půd, sedimentů i podzemních vod, u kterých je znečištění vážným celosvětovým problémem. Jelikož vykazuje TCE perzistentní vlastnosti, kontaminace v podzemních vodách je místně vysoká. Touto problematikou se zabývala již spousta studií, při kterých byly zjištěny možnosti odstranění TCE z podzemních vod a půd pomocí mikroorganismů. Možností biologických degradací je více, v závislosti na obsahu vzduchu v prostředí a jiných podmínkách. Všechny způsoby biodegradace mají své klady i zápory, ovšem značnou pozornost v současné době vzbuzuje aerobní kometabolická degradace. Tyto procesy se zdají být úspěšné, ovšem byly doposud prokázány při optimálních podmínkách, tedy teplotě okolo 20 - 25 °C, neutrálním pH a nízké salinitě. Jelikož se převážná část kontaminace TCE nachází v podzemních vodách, kde se teploty pohybují v mnohem nižších hodnotách, pH nebývá vždy neutrální, ale někdy je mírně kyselé a občasně je i vyšší salinita, bylo cílem této diplomové práce zjistit, zda je možná aerobní kometabolická degradace TCE bakteriálními kulturami při nízkých teplotách a současně při pH okolo 5 nebo mírně zvýšené salinitě.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TRICHLORETHYLÉN



Obrázek 1 Strukturální vzorec Trichlorethylénu (Bonvallet a kol., 2010)

Trichlorethylén (TCE), jinými názvy Triklone, Neutri, threthylene, 1-chloro- 2,2-dichlorethylene, triad, cecolene, Chlorylen, Triasol, Triol a dalších. Látka antropogenního původu řazená do skupiny chlorovaných uhlovodíků, s chemickým vzorcem C_2HCl_3 . (Bonvallet a kol., 2010, IRZ, 2023)

1.1 Vlastnosti, použití, výskyt a výroba trichlorethylénu

1.1.1 Vlastnosti

Zapáchající bezbarvá kapalina, vyšší hustoty a viskóznějších vlastností. (Mattes a kol., 2010, Dolinová a kol., 2017). Syntetická, perzistentní, toxická organická látka (Zálešák a kol., 2021), patřící mezi vyšší chlorované ethyleny, s teplotou tání – 86 °C a teplotou varu 87 °C. Látka vykazující se vysokou těkavostí, nízkou rozpustností ve vodě a dobrou rozpustností v organických rozpouštědlech. Jeho hustota je 1465 kg/m³. (Mattes a kol., 2010, Dolinová a kol., 2017).

Vyniká výbornou odmašťovací schopností, nekorozivností a nehořlavostí. (Růžička, 2004, Bonvallet a kol., 2010, IRZ, 2023) Někteří autoři soudí, že se jedná o látku všudypřítomnou v životním prostředí z důvodu nevhodné manipulace, nevhodného skladování či neopatrné likvidace. (Wu a kol., 2022) Výskyt TCE je spolu s perchlorethylénem (PCE) detekován v podzemních vodách a půdách po celém světě (Zálešák a kol., 2017, Wu a kol., 2022) a bývá nejběžnějším kontaminantem podzemních vod v průmyslových a vojenských areálech. (Azizian a kol., 2007)

TCE i jemu blízké látky jako PCE, *cis*-1,2-dichlorethylen (cDCE) a vinylchlorid (VC) vykazují toxické a karcinogenní vlastnosti, díky kterým jsou tyto látky ve Spojených státech uvedeny na prioritním seznamu nebezpečných látek. (Gaza a kol., 2019) Dle nařízení REACH (1907/2006) je TCE uveden na Kandidátní listině látek vzbuzujících obavu a použití podléhá po celé Evropské unii autorizaci. V podzemních vodách i půdách jsou stanoveny limitní hodnoty TCE. Limitní koncentrace v pitné vodě je stanovena na 5 µg/l, limit v půdě je pro kontrolu znečištění 20 mg/kg. (Wu a kol., 2022)

1.1.2 Použití

Trichlorethylén má široké uplatnění a je využíván po celém světě více než půl století. V minulosti byl využíván jako vykuřovací pesticid, extrakční činidlo pro rostlinné oleje, či jako anestetikum v medicíně. Použití nalezl v celé řadě odvětví od průmyslového, chemického, zemědělského, komerčního až po vojenský. (Mattes a kol., 2010, Zálešák a kol., 2017, Dolinová a kol., 2019, Wu a kol., 2022) V současné době je využíván primárně pro čištění kovových dílů. Lze jej nalézt i v některých přípravcích pro běžné použití, či domácnost, kdy bývá součástí například odstraňovačů barev, lepidel a skvrn, a také přípravků na odstraňování chyb při psaní na strojích. Používá se také jako surovina pro výrobu různých halogenovaných sloučenin, například chladiv (CFC, HCFCs a HFC). (Mattes a kol., 2010, Wu a kol., 2022)

1.1.3 Výskyt a výroba

Výskyt PCE a TCE je v nepatrných koncentracích způsoben přirozenou produkcí - biosyntézou mořskými řasami (Dolinová a kol., 2017), ovšem množství takto vzniklého PCE či TCE je zanedbatelné, převážná část kontaminace v životním prostředí je způsobena člověkem. Kontaminace životního prostředí trichlorethylénem je zapříčiněna jeho používáním v předchozích letech, úniky při výrobě, manipulaci, přepravě, či neodborné likvidaci. V současné době jsou nejvýznamnějšími zdroji staré ekologické zátěže. (Bonvallet a kol., 2010)

TCE i PCE, tedy vyšší chlorované ethyleny, jsou primárními kontaminanty, zatímco nižší chlorované ethyleny jako vinylchlorid (VC), *cis*-dichlorethylén (cDCE), *trans*-1,2-dichlorethylen (tDCE) jsou převážně sekundárními kontaminanty, vznikajícími především

při anaerobní mikrobiální degradaci vyšších chlorovaných ethylenů. Část VC může být i primárním kontaminantem při výrobě polyvinylchloridu (PVC). Nepatrná část nižších chlorovaných ethylenů může vznikat i přirozeně, například vznik VC během přirozených abiotických půdních reakcí mezi huminovými kyselinami, železem a chloridy. Chlorethylény s nižším počtem chloridových substituentů vykazují větší toxicitu, než chlorethylény s vyšším počtem chloridových substituentů. (Dolinová a kol., 2017)

Trichlorethylén se vyrábí zahříváním kyseliny dichloroctové (DCA) s Cl_2 a FeCl_3 , chlorací acetylenu či dehydrochlorací kyseliny trichloroctové (TCA). (Bonvallet a kol., 2010, Mattes a kol., 2010, IRZ 2023)

1.2 Vliv na zdraví a životní prostředí

TCE je považován za kontaminant se škodlivými účinky na lidské zdraví i ekosystém. (Wu a kol., 2022) I přesto se díky svým výborným vlastnostem a hojnému využití v minulých letech vyskytuje ve všech složkách životního prostředí. Ve vyšších koncentracích ohrožuje zdraví živočichů i člověka. Zdravotní rizika jsou vážná až při vyšší expozici, avšak hrozí zde riziko rakoviny a mutagenity. (Bonvallet a kol., 2010, IRZ 2023)

Vstup TCE do organismu je především jeho inhalací a ovlivňuje hlavně nervovou soustavu. Délka expozice určuje, jak moc závažné dopady způsobí, a to od lehkých zdravotních komplikací jako je bolest hlavy, zmatenost či závratě, až po těžké zdravotní problémy, které mohou způsobit i smrt. Pro člověka je TCE označován jako mutagen a pravděpodobný lidský karcinogen skupiny 2A, který může zvyšovat rizika rakoviny mnohých orgánů, například ledvin, jater, žlučových cest, jícnu, ale i rakovinu děložního čípku či rakoviny prsu. Mimo to se TCE chová jako endokrinní disruptor a způsobuje poškození kůže, očí s možností nevratného poškození zraku. Způsobuje také halucinace, nevolnost, zvracení, ztrátu paměti, deprese a nevolnost. (Bonvallet a kol., 2010, Wu a kol., 2022, IRZ, 2023)

Při proniknutí TCE do organismu může docházet k jeho rozpadu na chloralhydrát, dichloracetaldehyd a kyseliny dichloroctovou nebo trichloroctovou. Všechny tyto produkty rozpadu jsou toxické pro zvířata a toxicita se předpokládá taktéž u lidí. Při průniku do krve se většina TCE v játrech přemění na jiné látky, které se z těla během jednoho dne dostanou močí, je také snadné jeho vydýchání. Některé zbytky TCE či látek vzniklých jeho rozpadem se mohou usazovat v tělesném tuku, a to po dobu expozice této látky. (Bonvallet a kol., 2010)

Při kontaminaci vod dochází k ohrožení vodních organismů a narušení rovnováhy celého ekosystému. (Bonvallet a kol., 2010, IRZ 2023)

Jelikož se jedná o těkavou látku, vyskytuje se TCE v atmosféře pouze v plynné fázi a jeho rozklad probíhá reakcemi s volnými radikály či působením záření. Reakcemi s volnými radikály dochází ke vzniku formylchloridu a fosgenu. Některé procesy rozkladu mohou přispívat k tvorbě fotochemického smogu. TCE vstupuje do chemické reakce také s atomy chromu za vzniku kyseliny trichloroctové. (Bonvallet a kol., 2010, IRZ, 2023) Vlivem mobility a průsaku dochází k šíření TCE ve vodonosných vrstvách s průnikem až do vrstev pod hladinou podzemní vody. Těkavé vlastnosti následně zajišťují jeho uvolnění do nenasyčené půdní zóny či atmosféry. (Dolinová a kol., 2017) Jeho biodegradace v půdě je velmi pomalá. Trichlorethylén přítomný ve vodách většinou podléhá vytěkání zpět do ovzduší, nebo dochází k jeho rozpadu, jehož rychlost ve vodách povrchových a podzemních se výrazně liší. Pokud nedojde k vytěkání, je silně vázán na pevné částice, kudy se usazováním dostává do sedimentů. Jeho bioakumulační potenciál je označován jako nízký až střední. (Bonvallet a kol., 2010, IRZ 2023)

V kontaminovaných půdách i podzemních vodách dochází k přirozené transformaci TCE a PCE na méně chlorované produkty. Většina těchto procesů probíhá za anaerobních podmínek v přítomnosti degradačních bakterií, mezi které patří rody *Dehalobacter*, *Dehalospirillum* či *Dehalococcoides*. Tyto procesy ovšem vedou ke vzniku méně chlorovaných ethylenů, kdy však se snižujícím se počtem chlorovaných substituentů klesá tendence těchto xenobiotik podléhat další redukční dechloraci. Méně chlorované ethyleny jsou velkým problémem kvůli jejich toxickým vlastnostem, především u vznikajících cDCE, tDCE a 1,1 DCE, ale i dlouhodobému setrvání v podzemních vodách. Tyto sekundární kontaminanty mají tendenci k rozkladu za spíše podmínek aerobních. (Zálešák a kol., 2017) V tabulce 1 je uveden přehled negativních vlastností TCE.

Tabulka 1 Klasifikace nebezpečných vlastností (ECHA, 2023)

Kategorie nebezpečí	Hodnota nebezpečí	H-věty	Účinky
Žíravost/dráždivost pro kůži	2	H315	Dráždí oči a kůži.
Vážné poškození očí /podráždění očí	2	H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
Mutagenita v zárodečných buňkách	2	H341	Podezření na genetické poškození.
Karcinogenita	1B	H350	Může vyvolat rakovinu.
Toxicita pro specifické cílové orgány – jednorázová expozice	3	H336	Může způsobit ospalost nebo závratě.
Nebezpečný pro vodní prostředí	3	H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

1.3 Biodegradace

Biodegradace neboli biologický rozklad lze definovat jako proces, při kterém dochází k přeměně složitých organických sloučenin na jednodušší. Biodegradaci lze tedy zjednodušit strukturu organických látek až na jednoduché organické látky, často s následnou mineralizací za vzniku vody a CO₂. K tomuto procesu dochází vlivem biotických a abiotických faktorů, přičemž důležitější jsou v tomto případě biotické faktory. Přeměna složitých organických látek na jednoduché bývá postupná - biotransformací výchozích látek vzniká celá řada meziproduktů, které jsou následně mineralizovány. (Nzila, 2013, Žihlová, 2013)

Ovlivnění biologického rozkladu je způsobeno zejména strukturou dané organické sloučeniny, kdy určité funkční skupiny mohou rozklad zjednodušit či naopak ztížit. Biologická rozložitelnost je také závislá na rozpustnosti jednotlivých sloučenin, která ovlivňuje jejich chování v prostředí, a také na biologické dostupnosti látek pro organismy. Tato je také ovlivňována řadou faktorů, např. schopnost přenosu látky přes cytoplazmatickou membránu. V půdách či sedimentech záleží biologická dostupnost pro organismy na fyzikálně-chemických procesech. Ztíženou biologickou dostupnost může

způsobovat sorpce organických látek na biomasu či na anorganické částice či tvorba komplexů nebo sraženin. Dalším faktorem ovlivňujícím biodostupnost může být interakce hydrofobního polutantu s ostatními látkami, které ve směsi tvoří nevodnou kapalnou fázi. (Nzila, 2013, Žihlová, 2013)

Významný podíl na biodegradovatelnosti organických látek mají podmínky prostředí. Ve zvodnělých vrstvách dochází často ke koexistenci různých skupin bakterií, ty mají vůči chlorethenům odlišnou metabolickou aktivitu, která je závislá na podmínkách prostředí, tedy zejména jedná-li se o aerobní či anaerobní prostředí. (Dolinová a kol., 2017) Dalším faktorem je přítomnost různých druhů degradačních mikroorganismů a některé fyzikálně-chemické vlastnosti. Zásadním fyzikálním faktorem ovlivňujícím biologickou rozložitelnost je např. teplota, na které závisí rychlost metabolismu. V případě vyšší teploty se většinou zvyšuje i rychlost biodegradace, kdy nejrychlejší bývá při teplotě v mezi 30 - 40 °C, v závislosti na druhu mikroorganismu. Významný faktor je rovněž hodnota pH, kdy zpravidla nejvhodnější bývá neutrální, ovšem vždy záleží na druhu mikroorganismu, jelikož některé preferují spíše kyselé pH, jako například houby. pH prostředí může být také ovlivněno samotnou biodegradací, kdy může docházet k jejímu snížení vlivem vzniku některých kyselin. Kyselé pH prostředí lze upravit neutralizací, např. hydroxidy a naopak ke snížení pH je možné využít slabých kyselin. Ovlivnění biodegradace může nastat také vlivem nepřítomnosti, či omezené koncentrace molekulárního kyslíku, a to v případě, kdy je k degradaci polutantu jeho přítomnost nutná. Problémy s nedostatkem kyslíku bývají většinou v půdách a sedimentech, jelikož je jeho koncentrace závislá na obsahu vody. S příliš vysokým obsahem vody dochází k naplnění většiny půdních pórů vodou, což následně ztěžuje difuzi kyslíku. Pokud však není akceptorem elektronů kyslík, je důležitá přítomnost jiných terminálních akceptorů elektronů (dusičnanů, síranů aj.). V případě kometabolické degradace je nutná přítomnost primárního substrátu, bez kterého by k degradaci polutantu nedošlo. Při aerobní kometabolické biodegradaci je zásadní přítomnost mikroorganismů se schopností rozkládat danou organickou látku. Tyto mikroorganismy musejí obsahovat vhodné enzymy pro rozklad dané organické látky. Pokud by mikroorganismy nebyly těmito enzymy vybaveny, biodegradace by neproběhla. (Nzila, 2013, Žihlová, 2013)

Neméně důležitý faktor při biodegradaci je koncentrace samotné organické látky, která ovlivňuje svou vlastní rozložitelnost; zejména v případě zvýšených či vysokých koncentrací se často uplatňuje toxicita. Rozložitelnost je dále zásadně ovlivňována přítomností některých

anorganických živin, zejména dusíku a fosforu. Pokud dojde k zásobení mikroorganismů těmito živinami, například hnojením, dojde často i ke zlepšení biodegradace. Optimální poměr živin (nejčastěji C : N : P) lze zjistit empiricky, či odhadnout pomocí stechiometrických výpočtů. (Nzila, 2013, Žihlová, 2013)

1.3.1 Biodegradace TCE

Biodegradace chlorovaných alifatických sloučenin, mezi které patří i TCE, bývá většinou zakončena biomineralizací, ovšem není pravidlo, že se daný polutant vždy úplně rozloží. V některých případech může biotransformací dojít ke vzniku meziprojektu, který dále nemohou mikroorganismy degradovat. (Nzila, 2013) Chlorované etheny mají toxickou povahu, jsou perzistentní, ale za určitých podmínek existují možnosti, kdy podléhají mikrobiální degradaci. (Zálešák a kol, 2021) Mikrobiální degradace těchto látek má několik kroků, které na sebe jednotlivě navazují. (Dolinová a kol., 2017)

V dnešní době jsou známy 4 možné způsoby mikrobiální degradace TCE v podzemní vodě a půdě. V aerobním prostředí to je jednak degradace metabolická, kdy je TCE využíván jako donor elektronů (růstový substrát), a jednak degradace kometabolická, vyžadující přítomnost jiného substrátu pro bakteriální růst a indukci enzymů. V anaerobním prostředí pak mohou probíhat jak metabolická, tak kometabolická transformace na nížechlorované ethyleny; při nich dochází k dechloraci TCE coby akceptoru elektronů a bakteriím slouží jako růstový substrát zcela jiné látky. (Dolinová a kol., 2017, Wu a kol., 2022)

Anaerobní redukční dechlorace

Anaerobní redukční dechlorace je reakce v anaerobním prostředí, kdy trichlorethylén vystupuje jako akceptor elektronů a vodík jako donor elektronů spolu s organickým substrátem jako zdrojem uhlíku. Jako donory elektronů je možné využívat jak zmíněný vodík, tak různé jednosložkové či vícenosložkové substráty, které vodík uvolňují. Z jednosložkových substrátů lze pro dehalogenační bakterie použít například acetát, laktát, formiát, benzoát, methanol, ethanol, glukózu či propionát a řadu dalších. Z vícenosložkových je možné využití například emulgovaných rostlinných olejů, melasy, syrovátky, mouky či jiných látek, někdy i s účastí povrchově aktivních látek. Pomocí mikrobiální redukční dechlorace dochází primárně ke vzniku cDCE. (Dolinová a kol., 2017, Wu a kol., 2022)

Jelikož při tomto procesu je jen malé množství bakterií schopno degradovat uhlovodíky s nízkým počtem atomů chloru, v důsledku těchto skutečností často dochází ke kumulaci

nízkochlorovaných ethenů (cDCE a VC) v místech, kde dochází k degradaci TCE pomocí této anaerobní respirace.

Rychlost dehalogenační respirace TCE lze proto v podzemních vodách ovlivnit přidáním donoru elektronů - dojde tím však někdy také ke stimulaci aktivity konkurenčních mikroorganismů. Např. boj o vodík mezi populacemi anaerobních mikroorganismů probíhá různě, v důsledku jeho různých koncentrací. Při vysokých koncentracích jej mohou methanogeny využít k metanogenezi, naopak při jeho nízkých koncentracích mají dechlorující bakterie větší afinitu k vodíku a mohou tak methanogenům konkurovat. Pomalým uvolňováním vodíku z komplexnějších zdrojů tedy dochází k podpoře dechlorujících bakterií. (Dolinová a kol., 2017)

Podobně může dle Pantazidou et al. (2012) docházet ke zpomalení dechlorace chlorovaných ethylenů vlivem případné souběžné redukce síranů; důvodem je nejspíše akumulace sulfidů, což prokázal i Berggeren et al. (2013). Naopak, při studii v mikrokosmu bylo dle Harkness et al. (2012) prokázáno, že přidání síranů vede k větší účinnosti dechlorace. Podle Robinson et al. mohly být tyto výsledky ovlivněny zvýšením pH během redukce síranů do mírně zásaditého pH, které je pro dechlorující bakterie oproti kyselému pH příznivé. (Dolinová a kol., 2017)

Mezi různými bakteriálními kulturami, které degradují chlorované ethyleny, může nastat kompetitivní inhibice, která ovlivňuje celkovou degradaci. Například vícechlorované etheny ovlivňují rychlost redukční dechlorace méně chlorovaných, naopak méně chlorované etheny minimálně ovlivňují redukční dechloraci více chlorovaných. To znamená, že například PCE ovlivňuje dechloraci TCE, TCE ovlivňuje dechloraci cDCE a VC a cDCE ovlivňuje dechloraci VC. Ovšem dle DiStefana (1999) bylo prokázáno, že dechlorace VC se v přítomnosti vyšších chlorovaných ethenů zpomalí, protože v průběhu času docházelo ke snížení dechlorace VC, ale přidáním PCE se účinnost opět zvýšila. (Dolinová a kol., 2017)

Redukční dechloraci mohou ovlivňovat také různé biologické aspekty, fyzikálně-chemické faktory či koexistující polutanty. Důležité fyzikálně-chemické faktory mající vliv na růst mikroorganismů, jejich metabolismus, enzymatickou aktivitu; další vliv na rychlost anaerobní degradace mají pH, teplota či obsah kyslíku. Ve vícero studiích bylo také prokázáno, že koexistující polutanty mohou biodegradaci TCE inhibovat. (Wu a kol., 2022)

Anaerobní dehalogenace TCE je možná při teplotách v rozmezí 7 – 27 °C. Optimální teplotou anaerobní dechlorace je dle studie Gazy a kol. (2019) 22 °C. Při ostatních teplotách

probíhala degradace pomaleji. Při teplotě 5 °C a 29 °C již k degradaci nedocházelo. (Gaza a kol., 2019)

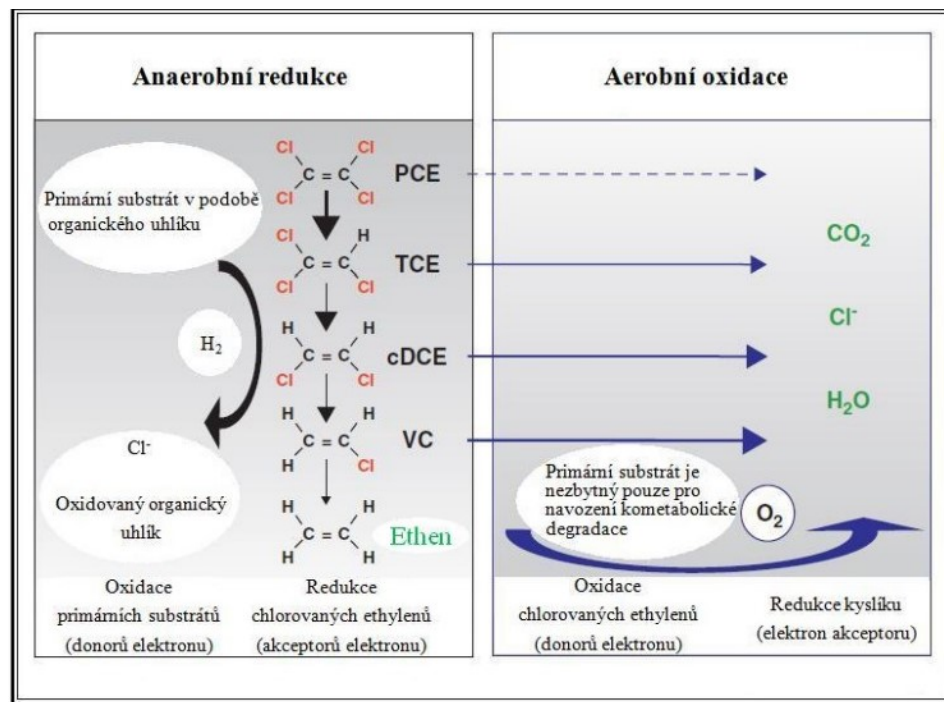
Při studii Friise a kol. (2007) byla studována teplotní závislost anaerobní dechlorace TCE při teplotách mezi 4 – 60 °C. Z výsledků studie bylo patrné, že maximální teplota dechlorace je do 40 °C, při vyšších teplotách již dechlorace neproběhla. Mezi 10 – 30 °C byla pozorována dechlorace TCE až na ethen s nutným zásobováním laktátem či propionátem. Při 4 °C byla dehalogenace TCE zastavena na cDCE. (Friis a kol., 2007)

Nedostatek zdrojů energie (donorů elektronů) či dechloračních mikroorganismů bývá důvod nízké degradace v podzemních prostředích. Úplná dechlorace pomocí MO je závislá na teplotě a výskytu MO. Ze studií Ellis a kol. (2000) a Major a kol. (2002) je prokázána úplná dechlorace chlorethenů v podzemních vodách s teplotou 4 °C – 30 °C. Při studii He a kol. (2003) byla optimální teplota dechlorace ve smíšených i čistých kulturách pozorována při 22 °C. K úplné dechloraci na ethen došlo při maximální teplotě 30 °C a minimální teplotě 10 °C, kdy byla kultura zásobována laktátem. K částečné dechloraci na cDCE došlo při maximální teplotě 40 °C a při minimální teplotě 10 °C s kulturou zásobovanou laktátem, při 4 °C již došlo k zastavení dechlorace. Rychlost dechlorace byla nejvyšší při 30 °C, stejně jako maximální rychlost růstu mikroorganismů. Dechlorace cDCE na ethen vykazuje větší teplotní rozsah, kdy probíhá dechlorace nejvyšší rychlostí při teplotách mezi 15 – 30 °C, stejně jako růst biomasy. Výsledky této práce ukázaly vhodnost úplné anaerobní dechlorace při teplotách v rozmezí 15 – 30 °C. (Friis a kol., 2007)

Aerobní přímá oxidace

Další možností biodegradace trichlorethylénu je přímá aerobní oxidace, která je založena na možnosti některých aerobních bakterií využívat TCE jako zdroj uhlíku a energie. Produkty oxidace jsou voda a oxid uhličitý, což jsou látky, které nikterak neohrožují ani nepůsobí neblaze na ostatní mikroorganismy, které jsou přítomné ve vodě. Při přímé oxidaci je degradací TCE mikroorganismy získáván organický uhlík a energie a jelikož nevyžaduje žádný pomocný substrát a kyslík je přímo využíván k biodegradaci, je tato degradace považována za slibnou biotechnologii. (Wu, a kol., 2022) K této degradaci dochází i při velmi malých koncentracích kyslíku a bakterie vykazují schopnost přežít v anoxickém prostředí i po dobu delší než 1 rok. (Dolinová a kol., 2017). Zatímní slabinou jsou nedostatečné znalosti o těchto mikroorganismech.

Účinnost oxidační degradace je vyšší u jednotlivých chlorethenů (např. TCE), u směsi účinnost i rychlost degradace TCE klesá v přítomnosti jiného chlorethenu. (Dolinová a kol., 2017). Protože kromě TCE podléhají přímé aerobní oxidaci i nížechlorované ethylény, existuje možnost kombinované anaerobní – aerobní degradace obou výšechlorovaných ethylenů - PCE i TCE (viz obr. 2)



Obrázek 2 Anaerobní redukce a aerobní oxidace chlorovaných ethylenů (Tiehm a kol., 2011)

Ve srovnání s redukční dechlorací, či kometabolickou degradací není nutné při aerobní metabolické degradaci dodávat mikroorganismům růstový substrát, a veškerý kyslík je tedy využit čistě pro biodegradaci TCE. Z doposud provedených studií je patrné, že aerobní metabolická degradace TCE by mohla být stabilní v dlouhodobém měřítku a je možná za různých podmínek, kdy jako optimální se jeví teplota 23 °C, pH 7 a přítomnost kyslíku o koncentraci alespoň 0,5 mg/l. (Gaza a kol., 2019)

Anaerobní kometabolická degradace

Biodegradace trichlorethylénu je možná také za pomoci anaerobní kometabolické redukční dechlorace. Takto je možné kometabolizovat TCE za přítomnosti jiných akceptorů elektronů. Tato dechlorace byla poprvé objevena v methanogenních kulturách, které za anaerobních podmínek dechlorují trichlorethylén za přítomnosti pro ně běžných akceptorů

elektronů (CO_2). (Wu a kol., 2022). U jiných chlorovaných ethylenů byla anaerobní oxidace zjištěna Bradleym a kol. u DCE, a to pomocí bakterií za podmínek redukce Mn (IV), a také Bradleym a Chapellem byla zjištěna oxidace VC za podmínek redukce Fe (III). Bradleym a kol. byla rovněž pozorována oxidace VC a DCE v přítomnosti huminových kyselin a redukce Fe (III), sulfátů, a také za podmínek vhodných pro methanogenezi. Bakterie, které by byly schopné anaerobní oxidace VC a DCE, však nebyly doposud izolovány. (Dolinová a kol., 2017)

Aerobní kometabolická degradace

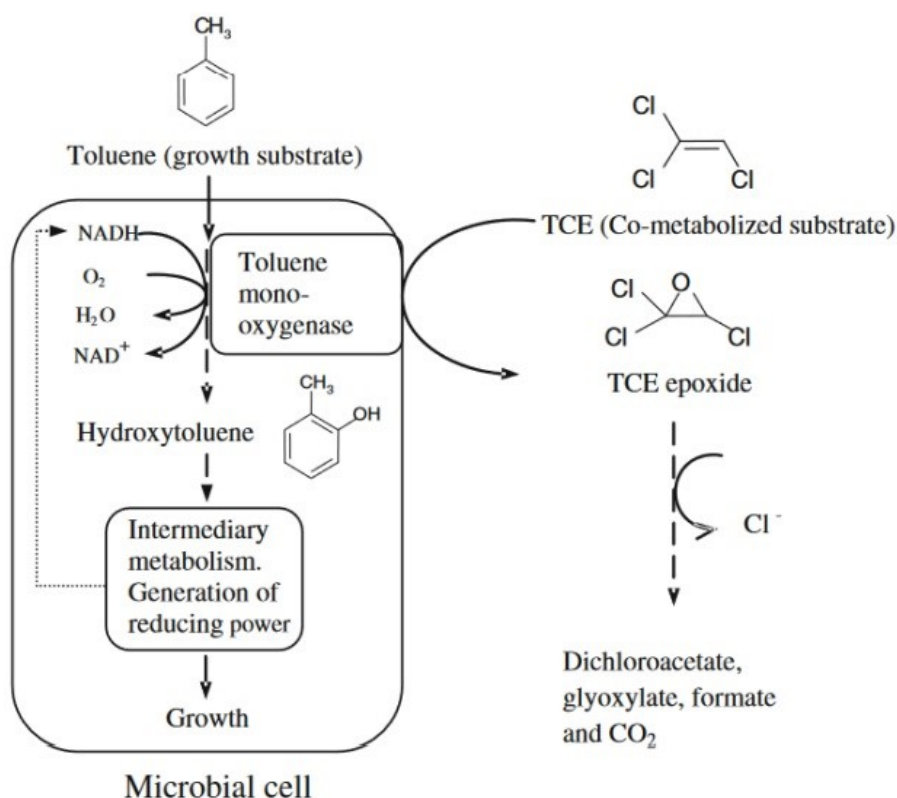
Aerobní kometabolická degradace, tedy čtvrtá možnost bakteriální degradace TCE, při které je zapotřebí kyslík, nepřináší žádné benefity pro příslušné bakterie (nebo jen nepatrné). Kometabolismus je proces, který je v zájmu mnoha studií. Poprvé byl tento proces popsán Wilsonem a Wilsonem, kdy byla prokázána biodegradace TCE na oxid uhličitý. Při této reakci je nutné přidat určitý substrát, jako hlavní zdroj uhlíku pro odpovědné bakterie. (Wu a kol., 2022) Degradace je katalyzována enzymem, který je indukován růstovým substrátem. Jako nejúčinnější substrát je často označován toluen, další možnostmi však jsou amoniak, alifatické sloučeniny jako např. propan, jiné aromatické látky jako fenol či kumen. Dle Tiehna a kol. (2008) je možné použít i VC jako pomocný substrát při degradaci cDCE. (Gaza a kol., 2019, Wu a kol., 2022)

Je prokázáno, že aerobní kometabolismus je ovlivňován mnoha faktory, mezi nejdůležitější patří salinita, koncentrace substrátu, teplota, pH, povrchově aktivní látky, koncentrace kovových iontů. Při zvýšení salinity se okamžitě snižuje rychlost degradace TCE kulturami, které oxidují toluen. (Wu a kol., 2022)

2 KOMETABOLISMUS

Kometabolismus je jeden ze způsobů mikrobiologické degradace. Do podvědomí se dostal v 50. letech 20. století. Princip spočívá ve schopnosti určité skupiny mikroorganismů přeměnit nerůstový substrát v přítomnosti růstového substrátu. Jelikož kometabolizovaný substrát nevstupuje do biosyntetických metabolických drah (nebo vstupuje jen nepatrně), nedochází při jeho rozkladu k výraznému mikrobiálnímu růstu. (Suttinun a kol., 2013)

Četné studie prokázaly potenciál některých mikroorganismů transformovat TCE a jiné nižší chlorované etheny pomocí aerobního kometabolismu. Výsledky prokázaly schopnost různých substrátů stimulovat kometabolismus chlorovaných alifatických uhlovodíků za aerobních podmínek, přičemž aromatické substráty mohou podnítit aerobní kometabolismus trichlorethylénu, DCE, t-DCE a VC. (Azizian a kol., 2007) Příklad je uveden na obr. 3.



Obrázek 3 Příklad kometabolické degradace TCE s toluenem jako růstovým substrátem (Rehm a kol., 2000)

2.1 Kometabolismus TCE

Při aerobním kometabolismu chlorovaných rozpouštědel dochází ke vzniku nových produktů ve formě určitých sloučenin, přičemž v závislosti na složení mohou být pro buňky nevyužitelné, někdy toxické a jen občasně prospěšné. Vzniklé produkty však mohou být v některých případech mineralizovány jinými přítomnými organismy. (Suttinun a kol., 2013)

Schopnost kometabolické degradace bez uhlíkového či energetického přínosu má mnoho metanotrofních bakterií, či bakterií schopných degradace toluenu, fenolu, kumenu, amoniaku, methanu, propanu, ethanu, ethenu, isoprenu či kyseliny 2,4-difenoxyoctové. (Dolinová a kol., 2017)

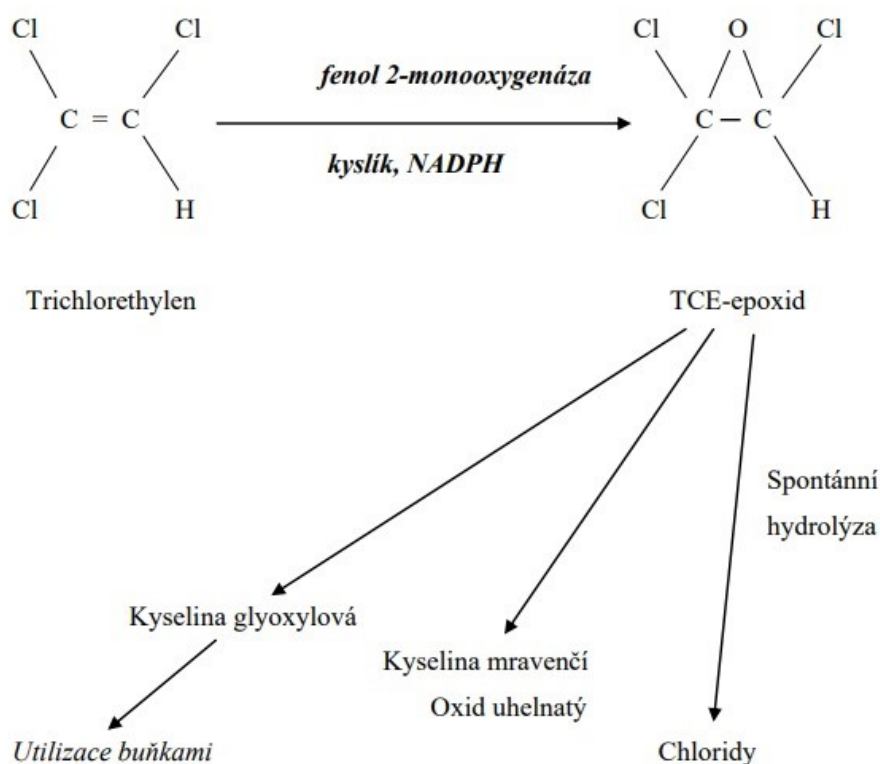
Rychlost kometabolické degradace je nižší ve srovnání s metabolismem růstových substrátů, což znamená, že vyčerpáním substrátu dochází po určité době k zastavení procesu degradace. Rychlost degradace chlorethylenů je ovlivňována typem chlorethenů, jejich koncentrací, či kombinací více a méně chlorovaných ethenů a celý proces degradace je závislý na procesu pěstování bakteriální kultury určené k degradaci chlorethenů. (Dolinová a kol., 2017)

2.1.1 Princip

Prvním krokem aerobní kometabolické degradace je primární bakteriální epoxidace dvojně vazby uhlík-uhlík, která je zahájena mono a dioxygenázami, za tvorby TCE-epoxidu. Ten je velmi reaktivní a může mít řadu škodlivých účinků v buňkách, ale také podléhá hydrolyze až na CO₂, chlorid, kyselinu mravenčí, dichloroaceticovou a někdy i další produkty. Při kometabolické degradaci TCE tak je nutno produkci tohoto toxického metabolitu očekávat, protože může vést k poškození degradační kultury a ovlivnění aktivity enzymů s následným poklesem degradační účinnosti. (Dolinová a kol., 2017)

K zahájení aerobní kometabolické degradace TCE dochází pomocí enzymů ze skupiny monooxygenáz a dioxygenáz. Tyto oxygenázy však nebývají v bakteriálních organismech produkovány trvale. Jejich produkce je zahájena přítomností induktoru, kterým jsou velmi často konkrétní růstové substráty, uvedené výše v textu (isopren, toluen, propan, fenol, amoniak, propan, metan, kumen aj.). (Suttinun a kol., 2013, Zwineng a kol., 2022)

Rychlost přeměny TCE je individuální u jednotlivých bakterií v závislosti na konkrétním enzymu a na odolnosti vůči vznikajícímu TCE-epoxidu. Dle Aziziana a kol. (2007) mívají zpravidla nejvyšší rychlost degradace TCE bakterie s enzymy ortho-monoxygenázami.



Obrázek 4 Příklad degradace TCE bakteriemi *Ralstonia* sp. KN2-10A (upraveno dle Ishida a Nakamura, 2000)

2.1.2 Vhodné podmínky aerobní kometabolické degradace TCE

Je prokázáno, že aerobní kometabolismus je ovlivňován mnoha faktory. Mezi nejdůležitější patří teplota, pH, salinita, koncentrace substrátu, povrchově aktivních látek, koncentrace kovových iontů.. Bylo také prokázáno, že salinita výrazně ovlivňuje rychlost degradace TCE kulturami oxidující toluen. (Zwineng a kol., 2022) Optimální teploty aerobní kometabolické degradace se pohybují okolo 23 °C. (Schmidt a kol., 2010, Coleman a kol., 2002) Optimální pH bývá ve většině případů neutrální. (Saeki a kol., 1991, Liang a kol., 2007)

2.1.3 Nepříznivé podmínky aerobní kometabolické degradace TCE

Hodnota pH

Dle Saeki a kol. (1991) je za optimální pH při kometabolické degradaci TCE pomocí methanotrofních bakterií označováno pH v rozmezí 6 - 7. Gaza a kol. (2019) také provedli testy degradace TCE při pH od 5 – 7, kdy nejvyšší účinnost byla zaznamenána při pH 7 a se snižujícím se pH klesala. Dle studie Zhang a kol. (2015) ovlivňuje pH specifčnost přítomných bakterií a jejich dominanci. Tito autoři rovněž zjistili, že mírně kyselé pH, nižší jak 7, ovlivňuje degradaci TCE nepříznivě.

Studie provedena Shao a kol. (2019) ukazuje možnost degradace TCE a jiných chlorovaných uhlovodíků v kyselém prostředí podzemních vod prostřednictvím methanotrofních bakterií. Byly provedeny úspěšné izolace různých methanotrofních bakterií obývajících rašeliniště s hodnotou pH 3,5 – 5. Schopnost těchto bakterií degradovat TCE aerobní kometabolickou degradací se předpokládá kvůli jejich schopnosti produkovat methan-monooxygenázu. Prvními objevenými zástupci jsou *Methylosinus*, *Methylovaldum* a *Methylomonas paludis*. pH mikrokosmu při studii Shao a kol. (2019) bylo na počátku 3,4, na konci studie bylo nižší než 4. Spotřeba methanu byla podobná v přítomnosti, i nepřítomnosti TCE. Studie prokázala možnost degradace methanu i trichlorethylénu při počátečním pH s průměrnou hodnotou 3,4. Z výsledků bylo patrné, že průběžné přidávání methanu pro růst biomasy zpomalilo rychlost degradace, jelikož methan působí jako inhibitor při biologické degradaci TCE s pomocí methan-monooxygenázy. (Shao a kol., 2019)

I další autoři potvrdili, že rychlost degradace TCE je ovlivňována pH prostředí, kdy při neutrálním pH je rychlost degradace největší, ke snížení rychlosti dochází vlivem snížení, či zvýšení pH. Větší snížení rychlosti nastává u nižších hodnot pH. (Liang a kol., 2007)

Teplota

Teplota ovlivňuje rychlost všech biochemických reakcí a není tedy divu, že tomu tak je v případě mikrobiální degradace TCE či dalších chlorovaných ethylénů. (Liang a kol. 2007) Např. aerobní degradace cDCE je dle Schmidta a kol. (2010) možná při teplotách v rozmezí 4 – 23 °C, kdy za optimální teplotu byla označena teplota 23°C. Zvýšená teplota, při které již k degradaci nedochází, byla 30 °C (Coleman a kol., 2002).

Salinita

Salinita obecně snižuje kometabolickou degradaci TCE, jelikož sůl omezuje rozložitelnost substrátu a zároveň snižuje aktivitu mikroorganismů. Studie Leeho a kol. (2006) zkoumala vliv salinity na biologický rozklad TCE v přítomnosti toluenu pomocí smíšených kultur. Salinita měla vliv při aerobní kometabolické degradaci TCE, jelikož zvýšená slanost působí na bakteriální kulturu zvýšeným osmotickým tlakem. Z jejich výsledků je patrné, že přechodná salinita ovlivňuje schopnost využití substrátu, rychlost biodegradace trichlorethylénu a množství biomasy. Dlouhodobé působení soli způsobilo fyziologické změny u bakteriální kultury, čímž schopnost této kultury degradovat TCE klesla. (Lee a kol., 2006)

Lee a kol. (2005) rovněž prováděli experimenty aerobní kometabolické degradace TCE čtyřmi bakteriálními kulturami, mj. při různých koncentracích NaCl, v přítomnosti fenolu. U kultury označené LHPO-3 se jako optimální ukázala koncentrace NaCl 1,64 %, zatímco jako nejméně vhodná se ukázala 3,28 % koncentrace NaCl. U kultury LHPO-6 to bylo 0,98 % NaCl. U obou kultur došlo k podstatnému snížení transformační kapacity pro TCE při vzrůstu koncentrace soli na hodnotu 3,28 %. Autoři tedy došli k závěru, že dodání aktivní halo-tolerantní bakteriální kultury oxidující fenol je při odstraňování TCE ve slanejším prostředí velmi žádoucí.

2.2 Degradální bakteriální kultury

Proběhlo již mnoho studií a výzkumů za účelem zlepšení současných bioremediačních procesů, během nichž byla zkoumána i bakteriální diverzita, její růst a specifické aktivity jednotlivých skupin bakterií. Těmito kroky bylo izolováno mnoho bakteriálních kmenů se schopností degradace různých cizorodých látek, včetně chlorethenů. (Dolinová a kol., 2017)

2.2.1 Bakteriální kultury schopné degradace TCE

K aerobní kometabolické degradaci TCE dochází pomocí některých druhů bakterií. Již před značnou dobou autoři uváděli, že mnoho bakterií schopných oxidovat toluen má předpoklady k degradaci TCE a že výskyt těchto bakterií je poměrně rozšířen (Wackett a Gibson, 1988). Že jsou tyto vlastnosti některých bakterií prakticky využitelné, potvrdil pokusy McCartyho a kol. (1998), když s použitím systému recirkulačních studní ke vstřikování toluenu ke stimulaci aerobního kometabolismu TCE v kontaminované podzemní vodě dosáhli odstranění cca 98 % TCE v reálných podzemních vodách. Jako nejčastější

degradační bakterie jsou označovány gramnegativní rody *Pseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Methylosinus* a *Burkholderia*. Méně časté jsou grampozitivní bakterie schopné degradace TCE. Kultur s touto schopností je méně, řadíme zde rody *Rhodococcus*, *Mycobacterium* či *Nocardioides*. (Suttinun, a kol, 2013) Pomocí kometabolické degradace je možné degradovat celou řadu chlorethenů s výjimkou PCE, který je za aerobních podmínek biologicky nerozložitelný. (Zálešák a kol., 2021)

Studie provedená Zálešákem a kol. (2021) prokázala vysoce účinnou aerobní kometabolickou degradaci směsi chlorovaných ethenů s obsahem TCE, všech tří isomerů DCE a VC konsorciem složených z kultur *Comamonas testosteroni* RF2 a *Mycobacterium aurum* L1, pěstovaných na fenolu a laktátu sodném. Z výsledků vyplývá vhodnost konsorcia složeného z *Comamonas testosteroni* RF2 a *Mycobacterium aurum* L1 k degradaci chlorethenů ze směsných vzorků, kdy úplné odstranění VC ze sloučeniny trvalo celkem 21 dní, přičemž degradace VC byla zpočátku velmi rychlá. Ostatní chloretheny byly odstraněny během 2 - 6 dnů. Pro srovnání byla paralelně provedena degradace TCE a všech DCE jen pomocí *Comamonas testosteroni* RF2, kdy došlo k odstranění všech sloučenin o den dříve; bylo tak ukázáno, že VC mírně rychlost kometabolické degradace TCE a DCE snižuje. (Zálešák a kol., 2021). V použitém konsorciu *Comamonas testosteroni* RF2 primárně degradovala TCE a isomery DCE, zatímco L1 degradovala VC. K odstranění všech chlorethenů bylo dosaženo kombinací aerobního kometabolismu TCE a isomerů DCE s metabolickou degradací VC. (Zálešák a kol., 2021)

Co se týká anaerobní dehalogenace, dle Dolinové (2017) je bakterií schopných této transformace obecně méně, jelikož většina známých kultur je schopna pouze částečné redukční dechlorace PCE a TCE na cDCE nebo VC. (Dolinová a kol., 2017) (Azizian a kol., 2007) Kompletní redukční dechlorace PCE až na ethen je schopen např. kmen *Dehalococcoides mccartyi* 195, přestože je v jeho případě dechlorace VC považována za kometabolickou. (Dolinová a kol., 2017) Při studii Changa a kol. (2011) byly prokázány dvě kultury schopné degradace PCE a TCE bez produkce toxických vedlejších produktů. Tyto dvě kultury, odlišné od rodu *Dehalococcoides*, u kterých je prokázána degradace PCE a cDCE na ethen za anaerobních podmínek, byly identifikovány jako *Propionibacterium* sp. HK-1 a *Propionibacterium acnes* HK-3. (Dolinová a kol, 2017) Zástupci rodu *Dehalococcoides* jsou nejznámějšími bakteriemi schopnými degradace pouze za anaerobních podmínek, většina jeho kultur je však schopna jen částečné degradace

chlorthenů, ale ke kompletní degradaci PCE a TCE je nutností přítomnost více bakteriálních populací než jedné. (Dolinová a kol., 2017)

Tabulka 2 Bakterie schopné degradace TCE (Suttin a kol., 2013)

Gram-negativní bakterie	Gram-pozitivní bakterie
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2
<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. L4
<i>Burkholderia cepacia</i> G4	<i>Rhodococcus gordoniae</i> P3
<i>Pseudomonas putida</i> F1	<i>Rhodococcus corallinus</i>
<i>Pseudomonas butanovora</i> <i>Pseudomonas</i> sp. kmen JR1	<i>Mycobacterium vaccae</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Nocardioides</i> sp. CF8

Tabulka 3 Bakterie schopné kometabolické degradace TCE (Dolinová a kol., 2017)

Bakteriální druh	Reference
<i>Alcaligenes eutrophus</i> kmen JMP	Harker a Kim 1990
<i>Bacillus</i> sp. kmen 2479	Dey a Roy 2009 ; Kim a kol. 2010
<i>Bordetella</i> sp. kmen KP22	Hanada a kol. 1998
<i>Burkholderia cepacia</i> kmen KP24	Hanada a kol. 1998
<i>Burkholderia cepacia</i> kmen G4	Nelson a kol. 1986 , 1987
<i>Burkholderia</i> sp. E1	Futamata a kol. 2001b
<i>Comamonas testosteroni</i> kmen R5, E6, R2, R5	Futamata a kol. 2001a , 2001b
<i>Methylobacter</i> sp. kmen BB5.1	Smith a kol. 1997
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Stirling a Dalton 1979
<i>Methylocystis</i> sp. kmen M	Uchiyama a kol. 1989
<i>Methylomonas methanica</i> kmeny KSWIII, KSPIII a KSPII	Hanada a kol. 1998 ; Shigematsu a kol. 1999
Kmen <i>Methylomonas methanica</i> 68–1	Koh a kol. 1993
Kmen <i>Methylosinus sporium</i> 27	Tsien a Hanson 1992
<i>Methylosinus trichosporium</i> kmen OB3b	Oldenhuis a kol. 1989 ; Tsien a kol. 1989
<i>Mycobacterium vaccae</i> kmen JOB5	Wackett a kol. 1989
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Arciero a kol. 1989
<i>Nocardioides</i> sp. kmen CF8	Hamamura a kol. 1997
<i>Pseudomonas</i> sp. kmeny CF600, PsF WAS2	Futamata a kol. 2001b
<i>Pseudomonas</i> sp. kmen JR1	Dabrock a kol. 1992
<i>Pseudomonas</i> sp. kmen ENVPC5	McClay a kol. 1995
Kmeny <i>Pseudomonas butanovora</i> Rev. WT, F321Y, L279F, G113N	Halsey a kol. 2007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Li a kol. 2014a , 2014b
<i>Pseudomonas jessenii</i>	Futamata a kol. 2001b
<i>Pseudomonas mendocina</i> kmen KR-1	Winter a spol. 1992
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Li a kol. 2014a , 2014b
<i>Pseudomonas putida</i>	Heald a Jenkins 1994
<i>Pseudomonas putida</i> kmen P-2, P-5, P-6, P8, P35X, BP a ATCC 17484	Futamata a kol. 2001b

<i>Pseudomonas putida</i> kmeny B5 a PpF1	Nelson a kol. 1988
<i>Pseudomonas putida</i> kmen F1	Wackett a Gibson 1988
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Futamata a kol. 2001b
<i>Ralstonia</i> sp. kmen P-10	Futamata a kol. 2001b
<i>Ralstonia eutropha</i>	Hanada a kol. 1998
<i>Ralstonia eutropha</i> kmen KT-1	Futamata a kol. 2001b
<i>Rhodococcus</i> sp. kmen L4	Suttinun a kol. 2009
<i>Rhodococcus corallinus</i> kmen B-276	Saeki a kol. 1999
<i>Rhodococcus erythropolis</i> kmen BD1	Dabrock a kol. 1992
<i>Rhodococcus gordoniae</i> kmen P3	Suttinun a kol. 2004
<i>Variovorax</i> sp. kmeny c24, YN08, HAB-24, HAB-30	Futamata a kol. 2005
<i>Variovorax</i> sp. kmen WFF52	Futamata a kol. 2001b
<i>Xanthobacter</i> sp. kmen Py2	Praporčík a spol. 1992 ; Reij a kol. 1995

2.2.2 Degradální kultury se schopností degradace TCE rostoucí na fenolu

V předešlých studiích na ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně byla zjištěna schopnost degradace TCE bakteriální kulturou *Comomonas testosteroni* RF2 v přítomnosti růstových substrátů v podobě fenolu a laktátu sodného. Tato kombinace byla účinná také při degradaci cDCE, tDCE a 1,1-DCE, kdy byly degradace prováděny pro jednotlivé DCE, ale i v kombinaci všech DCE s TCE. Bylo zjištěno, že kmen RF2 má schopnost degradovat uváděné dichlorethlyeny s podmínkou jejich určité počáteční koncentrace. K významnému, 100 %-tnímu odstranění došlo u cDCE při počáteční koncentraci 6,01 mg/l cDCE, neboť tento DCE je nejčastějším produktem anaerobní dechlorace TCE či PCE. (Zálešák a kol., 2017)

2.2.3 Degradální kultura 1AZS

Rhodococcus erythropolis, zástupce rodu *Rhodococcus*, jsou aerobní grampozitivní bakterie vynikající silnou adaptativní schopností a velkým potenciálem v biokatalýze, bioremediacích, a také při biosyntéze některých organických látek. Jejich výskyt je široký, od půd, hornin, podzemních vod, mořských sedimentů až po polární oblasti či vnitřní prostředí hmyzu, byla zaznamenána i přítomnost ve zvířecích výkalech. Vynikají schopností degradovat celou řadu organických látek, které většinou patří mezi toxické a obtížně rozložitelné. Kultury rhodokoků jsou tak schopné degradace organických polutantů, jako např. aromatických sloučenin, PAHů, chlorovaných uhlovodíků a nitroaromatických uhlovodíků. (Liang a kol., 2021, Ma a kol., 2023) Schopnost degradovat škodlivé polutanty

vychází z jejich vysokého obsahu různých enzymů, které dokáží degradovat či detoxikovat tyto látky. (Pátek a kol., 2021)

Jelikož se některé kmeny rodu *Rhodococcus* umí přizpůsobit i extrémním podmínkám, degradace je možná i za podmínek kyselého či zásaditého pH, nízkých teplot či vysoké mineralizace. (Liang a kol., 2021, Ma a kol., 2023)

2.2.4 Degradální kultura 5BZS

Tato bakteriální kultura je zástupcem rodu *Pseudomonas*, všudypřítomného bakteriálního rodu se 140 identifikovanými druhy. (Sanow a kol., 2023) Vyskytuje se v ovzduší, vodě i půdě, na povrchu rostlin, v aerobních a někdy i anaerobních sedimentech a kolonizuje řadu organických materiálů. (Medić a kol., 2022, Chauhan a kol., 2023)

Určité kmeny rodu *Pseudomonas* jsou velmi nadějně a vhodné pro biotechnologie, neboť jsou často růstově nenáročné. (Korshunova a kol., 2021) Tento rod bakterií je např. přítomný téměř ve všech oblastech, které jsou kontaminovány uhlovodíky. (Medić a kol., 2022) U některých kultur rodu *Pseudomonas* byla také prokázána vysoká odolnost k organickým rozpouštědlům. (Yang a kol., 2019) Dokáží degradovat fenolické sloučeniny, další aromatické a alifatické uhlovodíky, některé chlorované organické polutanty, které využívají jako zdroj energie, a díky tomu mají důležitou funkci při degradaci xenobiotik. Při biodegradaci xenobiotik hrají u nich hlavní roli oxygenázy, které vkládají jeden nebo dva atomy kyslíku do molekul substrátů, a tím je oxidují a zpřístupňují dalším katabolickým enzymům. (Medić a kol., 2022) Oxygenázy se často vyznačují širokou substrátovou specificitou. (Korshunova a kol., 2021)

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou schopné přizpůsobení se nepříznivým podmínkám prostředí, např. širokému rozmezí teplot, obsahu kyslíku, vlhkosti nebo nedostatku živin. Díky těmto schopnostem je výskyt tohoto rodu bakterií velmi častý i v chladných oblastech. Navíc, bakterie adaptované na chlad, jsou schopny i přizpůsobení k různým rozmezím pH. (Chauhan a kol., 2023)

Kmeny rodu *Pseudomonas* jsou častými bakteriálními kulturami využívanými k dekontaminaci prostředí od ropných uhlovodíků. (Ivanova a kol., 2022) Prokázána byla také aerobní kometabolická degradace TCE, např. pomocí kmene *Pseudomonas putida* F1.

První důkazy o areobní kometabolické degradaci TCE a toluenu bakterií *Pseudomonas putida* F1 přinesli Wacket a Gibson. (Yang a kol., 2019)

2.2.5 Degradční kultura 10AZS a 8AZS

Bakteriální kultury 10AZS a 8AZS jsou prozatím neurčeny. Byly nalezeny při práci Zuzany Saňákové a z její Diplomové práce je známo, že jde o grampozitivní tyčinky snadno se odbarvující při Gramově zbarvení. K růstu při 8 °C a koncentracích NaCl od 0 - 5 % využívají jako růstový substrát fenol.

2.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie patří mezi účinné a nejčastěji používané separační metody, především k analýze plynných a kapalných těkavých látek. Plynovou chromatografii lze dělit na rozdělovací plynovou (GLC) či adsorpční plynovou (GSC). GLC metoda umožňuje dělení látek na základě jejich odlišné rozpustnosti v systému plyn-kapalina. GSC metoda umožňuje dělení látek na základě jejich rozdílné adsorpci v systému plyn – pevná látka. (Literák, 2008, Ševčík, 2008) Principem separace látek je jejich rozdělení mezi stacionární a mobilní fázi, které probíhá na základě jejich vzájemném působení se stacionární fází. Mobilní fázi nebo-li hnací silou je inertní nebo-li permanentní plyn, například vodík, dusík, hélium a argon. Stacionární fázi je kolona (kapilární nebo náplňová), sorbentem kolony mohou být různé formy uhlíku, silikagel, zeolitová molekulová síta, či různé polymery nebo látky na bázi oxidu hlinitého. Na konci kolony je umístěn detektor, který vyhodnocuje signál, který je úměrný množství analytu. Detektory lze u plynové chromatografie použít plamenově-ionizační (FID), detektor elektronového záchytu (ECD), tepelně-vodivostní (TCD) či hmotnostní (MC) nebo infračervený spektrometr (IČ). (Štulík, 2004, Wojtowicz, 2009) Plynová chromatografie vyniká výbornou separační a detekční schopností. Ovšem má také určité nevýhody, které ovlivňují a snižují citlivost, přesnost, selektivitu a reprodukovatelnost analýzy. Metodou nelze provádět přímou analýzu látek s nízkou těkavostí, či látek termolabilních. Takové látky je nutné upravit derivatizací, což je metoda, která vede ke změně fyzikálních a chemických vlastností analytů. Principem derivatizace je nahradit atomy vodíku ve funkčních skupinách organických látek jinou skupinou (silylací, acylací, esterifikací, alkylací, cyklizací či zavedením halogenu nebo kombinací více metod).

Nevýhodou derivatizace je primárně prodloužená délka analýzy, vyšší náklady, ale i vyšší pravděpodobnost chybovosti. (Štulík, 2004, Wojtowicz, 2009)

Dále například polární látky obsahující funkční hydroxylové skupiny, karboxylové kyseliny, aminy nebo thioly způsobují asymetrické píky, jelikož na sebe vzájemně působí se sloučeninami s obsahem křemíku, které jsou součástí stacionární fáze. Takové vzorky se častěji stanovují pomocí kapalinové chromatografie. (Atapattu a kol., 2003)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 METODIKA

3.1 Materiály

Při této diplomové práci byly použity různé roztoky, minerální média, chemikálie a testované bakteriální kultury.

3.1.1 Roztoky

Stopové prvky

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

Všechny látky byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

Minerální médium neutrální (MM1) o pH 7,2

Roztok Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (23,9 g/l).....	8 ml
Roztok KH ₂ PO ₄ (9,078 g/l).....	2 ml
Voda destilovaná.....	85 ml
Roztok NH ₄ Cl (30 g/l).....	1 ml
Roztok MgSO ₄ .7 H ₂ O (10 g/l).....	1 ml
Roztok Fe(NH ₄) ₂ .(SO ₄) ₂ .6 H ₂ O (3 g/l).....	1 ml
Roztok CaCl ₂ .2 H ₂ O (1 g/l).....	1 ml
Roztok stopových prvků	0,1 ml

Minerální médium kyselé (MMK) o pH 5,2

Roztok Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O (23,9 g/l).....	1,1 ml
Roztok KH ₂ PO ₄ (9,078 g/l).....	38,9 ml
Voda destilovaná.....	340 ml
Roztok NH ₄ Cl (30 g/l).....	4 ml
Roztok MgSO ₄ .7 H ₂ O (10 g/l).....	4 ml
Roztok Fe(NH ₄) ₂ .(SO ₄) ₂ .6 H ₂ O (3 g/l).....	4 ml
Roztok CaCl ₂ .2 H ₂ O (1 g/l).....	4 ml
Roztok NaCl (10 g/l).....	4 ml
Roztok stopových prvků	0,8 ml

Minerální médium o pH 6 (MM6)

Roztok Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O (23,9 g/l).....	5,0 ml
Roztok KH ₂ PO ₄ (9,078 g/l).....	35,0 ml
Voda destilovaná.....	340 ml
Roztok NH ₄ Cl (30 g/l).....	4 ml
Roztok MgSO ₄ .7 H ₂ O (10 g/l).....	4 ml
Roztok Fe(NH ₄) ₂ .(SO ₄) ₂ .6 H ₂ O (3 g/l).....	4 ml
Roztok CaCl ₂ .2 H ₂ O (1 g/l).....	4 ml
Roztok NaCl (10 g/l).....	4 ml
Roztok stopových prvků	0,8 ml

Minerální médium s obsahem 4 % NaCl (MM4)

Roztok Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O (23,9 g/l).....	24,0 ml
Roztok KH ₂ PO ₄ (9,078 g/l).....	6,0 ml
Voda destilovaná.....	255 ml
Roztok NH ₄ Cl (30 g/l).....	3 ml
Roztok MgSO ₄ ·7 H ₂ O (10 g/l).....	3 ml
Roztok Fe(NH ₄) ₂ ·(SO ₄) ₂ ·6 H ₂ O (3 g/l).....	3 ml
Roztok CaCl ₂ ·2 H ₂ O (1 g/l).....	3 ml
NaCl	12 g
Roztok stopových prvků	0,6 ml

3.1.2 Chemikálie a živná média

Fenol (Sigma-Aldrich), čistota p.a., sterilní zásobní roztok 50 g/l

MEM vitamíny (Biosera)

Laktát sodný (LN, Sigma-Aldrich), čistota p.a., sterilní zásobní roztok 10%tní

Trichlorethylén (Sigma-Aldrich), čistota p.a.

Živná média: Trypton yeast extract agar (TYA), Masopeptonový agar (MPA), R2A agar (vše HIMEDIA).

3.1.3 Bakteriální kultury

Bakteriální kultury 1AZS, 5BZS, 8AZS a 10AZS používané k degradaci TCE v této diplomové práci byly izolovány v předchozí diplomové práci Zuzany Saňákové (2024). Kultury byly zamražené při -80 °C v glycerolu, byly naočkovány na TYA a MPA agary, následně kultivovány při teplotě 7 - 8 °C po dobu 10 dnů. Identifikace kultur 1AZS a 5BZS byla provedena kolektivem ÚIOŽP, a to izolací jejich DNA, amplifikací genu pro 16S rRNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a následnou sekvencí významné části tohoto genu. Srovnání kultur bylo provedeno s databázovými údaji GenBank v programu BLAST.

3.2 Přístroje a laboratorní pomůcky

3.2.1 Přístroje

Plynový chromatogram HEWLETT PACKARD 5890 (USA)

Integrátor HEWLETT PACKARD 3396 (USA)

Koncentrátor TEKMAR LSC 2000 (USA)

Mikrovlnný sterilizátor / autoclave MIKROJET (Francie)

Chlazená centrifuga Mr 23i (Jouan, Francie)

Aseptický laminární box BIO-II-A (Telstar, Španělsko)

Měřič zákalu Densilameter-II, typ Densi-2 (EMO, ČR)

Lednička GZ 48 (GUZZANTI, Itálie)

pH metr inoLab 720 + skleněná elektroda (WTW, SRN)

Třepačka VWR (USA)

3.2.2 Laboratorní pomůcky

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

Mikrodávkoč (Hamilton, USA)

Zkumavky (Gama, ČR)

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

Laboratorní váhy

3.3 Metody měření

3.3.1 Měření optické hustoty na densilametri

K měření hustoty buněk v inokulech a v některých testech bylo využito měření optické hustoty (OD); byl použit densilametr, který měří optickou densitu suspenzí. V použitém přístroji jsou výsledné hodnoty uváděny přímo v jednotkách McFarlanda (McF). Rozsah měření přístroje je 0 - 15 McF. Měření je prováděno ve zkumavkách s průměrem 15 - 18 mm a je velmi rychlé.

3.3.2 Měření koncentrace TCE plynovou chromatografií (GC)

Stanovení koncentrace TCE bylo provedeno pomocí plynové chromatografie na vzájemně propojeném koncentrátoru, plynovém chromatografu a integrátoru. Zařízením, použitým ke vstupu vzorku, je koncentrátor TEKMAR LSC 2000, ten je propojen vyhřívanou trubicí s plynovým chromatografem HEWLETT PACKARD 5890, ten je propojen s integrátorem HEWLETT PACKARD 3396, kde probíhá vyhodnocení a tisknutí chromatogramu.

Koncentrátor TEKMAR LSC 2000

K měření koncentrace těkavých látek vystripovaných ze vzorku byl použit koncentrátor TEKMAR LSC 2000. Při stripování VOC byl jako nosný i stripovací plyn použit dusík (inertní plyn). Zakoncentrování trichlorethylénu bylo provedeno metodou Purge and Trap. Koncentrátor je tvořen plynotěsným dávkovačem, kterým byl vzorek dávkován dávkovačem Hamilton o objemu 4 ml destilované vody a 1 ml vzorku. Vzorek byl nadávkován do trubice a bylo spuštěno stripování dusíkem po dobu 11 minut. Stripováním došlo k uvolnění těkavých látek, které byly vedeny na pevný sorbent (trap), na který byly navázány nepolární látky ze vzorku. Následně bylo provedeno krátké sušení sorbentu studeným vzduchem. Po sušení byl trap zahřát na teplotu 250 °C, došlo k tepelné desorpci těkavých látek, které pokračovaly vyhřívanou trubicí na kapilární kolonu plynového chromatografu k následné separaci a detekci detektorem FID. Všechny tyto kroky jsou prováděny automatizovaně.

Postup fází po sobě následujících: STANDBY, PURGE READY, PURGE, DRY PURGE, DESORB READY, DESORB PREHEAT, DESORB a INJECT BAKE.

STANDBY - fáze stabilizace počátečních podmínek při 35 °C

PURGE READY – podmínky stabilizovány, nadávkování vzorku

PURGE – 11 minut trvající fáze uvolňování těkavých látek inertním dusíkem ze vzorku. Stripovací trubice s přívodem inertního plynu (dusíku), který probublává vzorek. Následuje uvolnění VOC ze vzorku a jejich zachycení a zakoncentrování na sorbentu z aktivního uhlí. Dochází k zachycení nepolárních látek ze vzorku, pro které musí být sorbent vhodný. Do GC prochází nosný plyn přes šesticečný ventil koncentrátoru.

DRY PURGE – 3 - 4 minuty trvající fáze krátkého sušení sorbentu studeným vzduchem.

DESORB READY – fáze přípravy vzorku k odeslání do plynového chromatografu.

DESORB PREHEAT – fáze přehřátí trapu před tepelnou desorpcí, koncentrátor čeká na signál z GC

DESORB – 4 minuty trvající fáze tepelné desorpce při teplotě 250 °C, kdy dochází k uvolnění VOC, které jsou následně vedeny vyhřívanou hadicí do kapilární kolony plynového chromatografu.

INJECT BAKE – 5 minut trvající fáze vypékání trapu při teplotě 260 °C. Tepelné zajištěné odstranění přebytečné vody či zbytků organických látek prouděním inertního plynu.

Plynový chromatograf HEWLETT PACKART 5890 SERIES II

Plynový chromatograf obsahuje kapilární kolonu QUADREX o délce 30 m, vnitřním průměru 530 μm a tloušťky filmu 3 μ. m. Stacionární fázi kolony je Methy Phenyl Cyanopropyl Silicone. Plynový chromatograf obsahuje dva typy detektorů – EDC (detektor elektronového záchytu) A FID (plamenově ionizační detektor).

Plynový chromatograf byl nastaven v souladu s normami ČSN EN ISO 15680 a ČSN EN ISO 10301.

Integrátor HEWLET PACKARD 3396 SERIES II

Signál z detektoru plynového chromatografu je vyhodnocen pomocí integrátoru. Výstupem integrátoru je chromatogram vytištěný na papírovém nosiči. Chromatogram obsahuje píky, které patří sledovaným těkavým látkám, dle jejich retenčních časů. Plocha píku zaznamenaného na chromatografu značí množství sledované látky.

Chromatogram

Chromatogram obsahuje údaje o čase detekce sledované látky a pík sledované látky s danou plochou.

Kalibrační křivka

Pro stanovení kalibrační křivky byly připraveny tři standardy s koncentracemi 223,9; 2239 a 5945 mg/l TCE. Každý standard byl dávkován do koncentrátoru stříkačkou Hamilton v objemech 1 a 0,5 μl do 5 ml demineralizované vody. Stanovení koncentrace bylo provedeno 2x vedle sebe pro každý vzorek. Stanovené koncentrace TCE roztoků odpovídající objemům dávkování 22,39; 44,78; 223,9; 447,8; 594,5; 1189 μg/l.

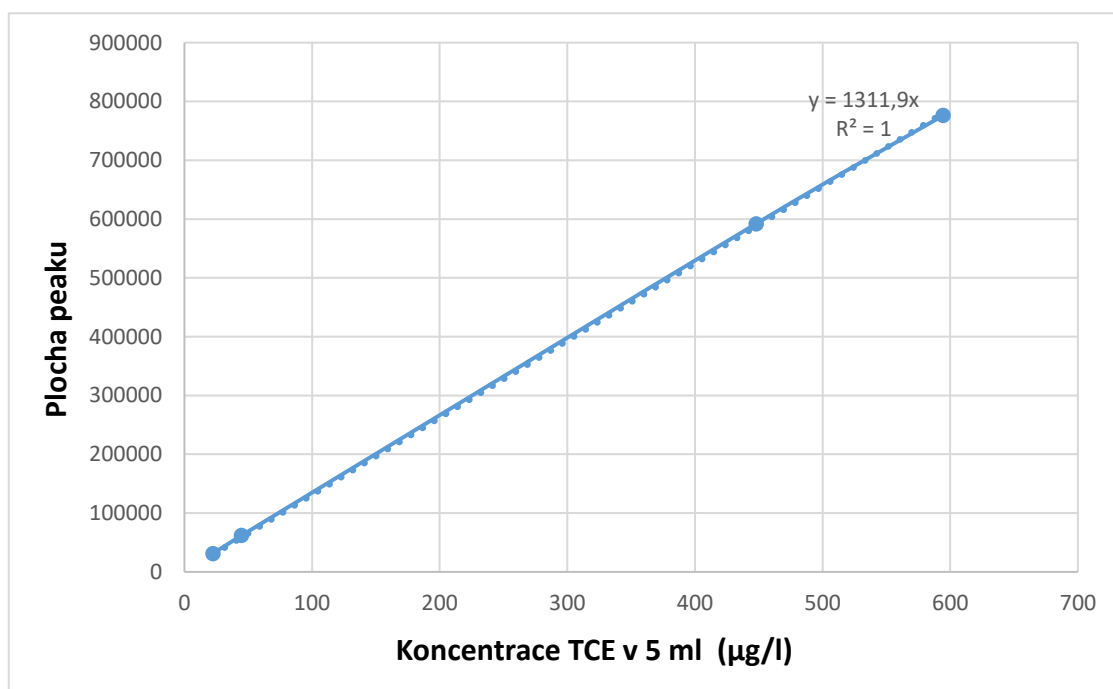
Skutečné koncentrace TCE ve vzorcích byly odečítány ze sestrojené kalibrační křivky.

Sestrojení kalibrační křivky

Bylo provedeno sestavení kalibrační křivky. Koncentrace TCE v měřených standardech jsou uvedeny v tabulce č.4. Z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka viz obrázek č. 5.

Tabulka 4 Naměřené hodnoty kalibrace

Kalibrace	
Koncentrace TCE ($\mu\text{g/l}$) v 5 ml standardu	Plocha píku
22,39	30948,5
44,78	61981,5
447,8	591890
594,5	776277



Obrázek 5 Kalibrační křivka TCE (FID)

4 POSTUPY

4.1 Ověření růstu bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS

Bylo provedeno ověření růstu bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS při různých podmínkách prostředí. Cílem bylo ověřit, jaký vliv má na růst kultur teplota, pH, ale i koncentrace fenolu.

Bylo připraveno 100 ml minerálního média MM1 o pH 7,2 a 100 ml minerálního média MMK o pH 5,2. Připravená média byla sterilizována v autoklávu. Zkumavky použité k ověření růstu bakteriálních kultur byly taktéž sterilizovány.

4.1.1 Ověření růstu bakteriální kultury 1AZS a 5BZS na různých koncentracích fenolu při teplotě 8 °C a 23 °C

Ověření růstu bakteriálních kultur na fenolu a při teplotě 8 °C bylo provedeno v 6 sterilních zkumavkách pro každou kulturu, kdy do každé zkumavky bylo nadávkováno 3 ml minerálního média MM1, 15 µl bakteriální kultury a zásobní roztok fenolu v objemech 0, 12, 21, 31, 37 a 47 µl. Pro každou kulturu tak bylo provedeno ověření růstu při různých koncentracích fenolu uvedených v tabulce č. 5.

Tabulka 5 Dávkování zásobního roztoku fenolu a výsledné koncentrace fenolu

Objem zásobního roztoku fenolu (µl)	Koncentrace fenolu (mg/l)
0	0
12	200
21	350
31	500
37	600
47	750

Zkumavky byly inkubovány při teplotě 8 °C po dobu 14 dní. Ověření růstu bakteriálních kultur bylo provedeno změřením jejich optické hustoty na densilometru po skončení kultivace.

4.1.2 Ověření růstu bakteriální kultury 1AZS a 5BZS na fenolu při pH 7 a teplotě 8 °C a 23 °C

Bylo provedeno ověření růstu bakteriálních kultur na fenolu při neutrálním pH a při teplotě 8 °C a 23 °C. Pokus byl proveden ve 4 sterilních zkumavkách pro každou kulturu, kdy do každé zkumavky bylo nadávkováno 3 ml minerálního média MM1 o pH 7,2, 15 µl

bakteriální kultury a 12 µl zásobního roztoku fenolu (výsledná c = 200 mg/l). Poté byly od každé kultury 2 zkumavky kultivovány při teplotě 23 °C a 2 zkumavky při teplotě 8 °C. Ověřování růstu bakteriálních kultur probíhalo průběžným měřením jejich optické hustoty na densilometru po 3, 4, 6, 7, 11, 14, 18 a 21 dnech kultivace.

4.1.3 Ověření růstu bakteriální kultury 1AZS a 5BZS na fenolu při pH 5,2 a teplotě 8 °C a 23 °C

Stejný pokus byl proveden pro ověření růstu bakteriálních kultur na fenolu při sníženém pH a při teplotě 8 °C a 23 °C. Postup byl stejný jako při neutrálním pH, pouze místo minerálního média MM1 bylo použito kyselé minerální médium MMK. Pro každou kulturu byly použity 4 zkumavky, kdy do každé zkumavky byly nadávkovány 3 ml MMK, 15 µl bakteriální kultury a 12 µl zásobního roztoku fenolu (výsledná c = 200 mg/l). Kultivace probíhala totožně jako při předchozím pokusu za neutrálního pH, včetně časových intervalů měření OD pro sledování a ověření růstu bakteriálních kultur.

4.1.4 Ověření změn pH při růstu bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS na fenolu a na kombinaci fenolu + laktátu sodného, při počátečním pH 5,3

Bylo připraveno 400 ml minerálního média MMK a změřena jeho hodnota pH. Připravené MMK bylo rozděleno na dvě dávky po 200 ml. Následně byla provedena jejich sterilizace a poté byly do každé dávky přidány vitamíny MEM (200 µl). Následovalo měření pH, které bylo 5,2.

Suspenze bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS byly připraveny ve sterilním fyziologickém roztoku o optické hustotě OD = 1,0. Obě dávky MMK byly zaočkovány bakteriálními kulturami, 1 dávka 190µl 1AZS a 2 dávka 190µl 5BZS.

Pro každou kulturu bylo připraveno 16 ks sterilních vialek o objemu 40 ml s plynotěsnými víčky, do nichž bylo dávkováno MMK s obsahem vitamínů MEM, zásobního roztoku fenolu o koncentraci 50 g/l a laktátu sodného o koncentraci 10 g/l v množstvích, viz tabulka č. 6. Kultivace probíhala po dobu 26 dní při teplotě 8°C. Na konci kultivace bylo opětovně provedeno měření OD a pH.

Tabulka 6 Dávkování jednotlivých komponent

Vialky	MM + MEM (ml)	Roztok fenolu (μl)	Roztok laktátu (μl)	Koncentrace fenolu (mg/l)	Koncentrace laktátu (mg/l)
1-4	9,970	30	-	150	-
5-8	9,860	15	125	75	125
9-12	9,835	15	150	75	150
13-16	9,84	10	150	50	150

4.2 Degradace TCE

4.2.1 Degradace TCE kulturou 1AZS při teplotě 8 °C a pH 7,2 i 5,2

Bylo připraveno 150 ml minerálního média MM1 o pH 7,2 a 150 ml minerálního média MMK o pH 5,2. Poté byla provedena sterilizace obou minerálních médií a plynotěsných vialek.

Následně bylo nadávkováno příslušné množství MMK, MM1, zásobního roztoku fenolu s výslednou koncentrací 200 mg/l, bakteriální suspenze 1AZS a vodného roztoku TCE o koncentraci 1g/l do sterilních vialek o objemu 40 ml s plynotěsnými uzávěry. Jednotlivé dávkování komponent je uvedeno v tabulce č. 7.

Tabulka 7 Dávkování jednotlivých komponent

Vialky	MMK (ml)	MM1 (ml)	Zásobní roztok fenolu 50g/l (μl)	Bakteriální suspenze 1AZS (μl)	Vodný roztok TCE (μl)
1 - 2	10	-	40	60	40
3 - 4	9,90	-	40	60	40
5 - 6	-	9,90	40	60	40

Vialky byly kultivovány při teplotě 8 °C po dobu 21 dnů. Měření koncentrace TCE bylo provedeno po 21 dnech pomocí plynového chromatografu.

4.2.2 Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C a pH 7,2

Postup ověření degradace TCE bakteriální kulturou 5BZS byl stejný, jako u kultury 1AZS. Dávkování jednotlivých komponent do sterilních vialek o objemu 40 ml s plynotěsnými uzávěry bylo totožné jako při ověření degradace bakteriální kultury 1AZS, viz. tabulka č. 7. Vialky byly rovněž kultivovány při teplotě 8 °C po dobu 21 dnů. Měření koncentrace TCE bylo provedeno po 21 dnech pomocí plynového chromatografu.

4.2.3 Degradace TCE kulturou 1AZS a 5BZS při teplotě 8 °C, 150 mg/l fenolu a pH 5,3

Bylo připraveno 400 ml minerálního média MMK o pH 5,5, po přípravě bylo přeměřeno jeho pH a následně provedena sterilizace.

Po sterilizaci bylo MMK rozděleno do dvou lahví po 170 ml, do každé byl nadávkován přírůstek vitamínů MEM a sterilního roztoku fenolu o výsledné koncentraci 150 mg/l. Následovala kontrola pH, které bylo 5,32. Takto připravené MMK bylo zaočkováno jednotlivými bakteriálními kulturami s OD cca 1,0.

Pro obě bakteriální kultury bylo zaočkované MMK po 10 ml dávkováno do sterilních vialek, a poté bylo do každé vialky přidáno 30 µl roztoku TCE. Od každé bakteriální kultury byly připraveny rovněž vialky bez přidání TCE, pro možné srovnání růstu.

Vialky byly kultivovány při teplotě 8 °C po dobu 30 dní a průběžně byl vizuálně sledován nárůst kultur v přítomnosti TCE i ve srovnávacích vialkách. Koncentrace TCE byla měřena po 7, 23 a 30 dnech kultivace. Po 23 a 30 dnech bylo provedeno změření pH. Pokus byl ukončen po 30 dnech.

4.2.4 Degradace TCE klidovými (nerostoucími) buňkami kultury 1AZS a 5BZS při teplotě 8 °C a 150 mg/l fenolu, při výchozím pH 6

Bylo připraveno 400 ml minerálního média MM6 pro kultivaci kultur při pH 6 a 400 ml minerálního média MMK pro degradaci o pH 5,2. Bylo provedeno měření pH minerálních médií před jejich sterilizací, které u MM6 mělo hodnotu 6,18 a u MMK bylo 5,30. Poté byla obě minerální média sterilizována.

MMK bylo obohaceno o přírůstek vitamínů MEM a následně přeměřeno pH, které mělo hodnotu 5,19.

Minerální médium MM6 bylo rozděleno do dvou lahví po 200 ml. Do obou lahví s MM6 byl následně přidán přídatek vitamínů MEM a bylo provedeno přeměření pH, které mělo hodnotu 6,05. Následně byl do obou lahví s MM6 přidán roztok fenolu do koncentrace 150 mg/l a obě lahve byly zaočkovány bakteriální kulturou. Následovala kultivace na třepače při 8 °C po dobu 18 dní.

Po kultivaci byla provedena centrifugace ve sterilních kyvetách po dobu 12 minut při 4° C a rychlosti 5 000 g. Po centrifugaci byly bakteriální buňky resuspendovány do sterilního minerálního média MMK s obsahem vitamínů MEM. Zaočkované MMK bylo dávkováno po 10 ml do sterilních plynotěsných vialek a poté bylo do každé přidáno 30 µl TCE.. Blanky byly provedeny stejným způsobem, pouze místo MMK bylo dávkováno 10 ml demineralizované vody. Kultivace byla provedena po dobu 7 dní při 8 °C a bylo provedeno průběžné měření koncentrace TCE a pH po 3, 5 a 7 dnech, kdy byl pokus ukončen.

4.2.5 Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C, 80 mg/l fenolu a 125 mg/l laktátu sodného a pH 5,3

Z předchozího pokusu bylo použito MMK s obsahem vitamínů MEM o objemu 140 ml. Do MMK byl přidán přídatek zásobního roztoku laktátu (LaNa) do koncentrace 125 mg/l a zásobního roztoku fenolu, s výslednou koncentrací 80 mg/l.

Následně bylo připravené MMK zaočkováno bakteriální suspenzí 5BZS a rozděleno po 10 ml do sterilních vialek s plynotěsnými uzávěry. Souběžně byly připraveny blanky, u kterých byla místo MMK použita demineralizovaná voda o stejném objemu. Do všech vialek bylo následně dávkováno 30 µl zásobního roztoku TCE o koncentraci 1 g/l.

Takto připravené vialky byly kultivovány po dobu 25 dní při teplotě 8 °C. V průběhu kultivace bylo prováděno měření koncentrace TCE. V průběhu kultivace bylo provedeno přeměření pH.

4.2.6 Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 23 °C, 80 mg/l fenolu a 125 mg/l laktátu sodného a pH 5,3

Byl proveden ověřovací pokus degradace TCE s rostoucími buňkami kultury 5BZS s přídatkem fenolu a laktátu při teplotě 23 °C. Bylo připraveno 250 ml MMK, které mělo po sterilizaci hodnotu pH 5,2. Připravené MMK bylo rozděleno do dvou lahví v objemu 90 ml pro blanky a 160 ml pro vzorky.

Do obou lahví byly přidány vitamíny MEM, zásobní roztok LaNa a zásobní roztok fenolu, s následně vzniklými koncentracemi LaNa 125 mg/l a fenolu 80 mg/l. Takto připravené MMK s větším objemem bylo zaočkováno bakteriální kulturou 5BZS. Zaočkované MMK bylo dávkováno do sterilních plynotěsných vialek po 10 ml a do každé vialky bylo poté přidáno 30 µl zásobního roztoku TCE o koncentraci 1g/l.

Blanky byly připraveny obdobně s použitím MMK bez obsahu bakteriální kultury.

Všechny připravené vialky byly kultivovány při 23 °C po dobu 40 dní. V průběhu kultivace byla měřena koncentrace přítomného TCE a to 3, 10, 17 a 40 den od zahájení kultivace. Po změření koncentrace TCE byla zbylá suspenze využita na měření pH.

4.2.7 Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C, 90 mg/l fenolu a 125 mg/l laktátu sodného a pH 5,2 – degradace při snížené vstupní koncentraci TCE

Bylo připraveno 400 ml minerálního média MMK pro kultivaci kultur při sníženém pH a snížené koncentraci TCE. MMK bylo rozděleno do dvou dávek o objemu 300 ml a 100 ml a byla provedena jeho sterilizace. Poté byl do každé dávky přidán přírůstek vitamínů MEM, zásobního roztoku laktátu a zásobního roztoku fenolu.

Připravené médium o větším objemu bylo zaočkováno suspenzí bakteriální kultury 5BZS z TYA agaru. Do sterilních vialek o objemu 40 ml s plynotěsnými víčky bylo do každé dávkováno 10 ml zaočkovaného MMK a poté bylo do všech vialek přidáno 20 µl roztoku TCE o koncentraci 1g/l. Mimo zkušební vialky s kulturou bylo připraveno i 9 ks vialek s obsahem 10 ml MMK bez obsahu bakteriální kultury a 20 µl roztoku TCE.

Zbytek MMK s laktátem, fenolem a kulturou 5BZS bylo kultivováno v lahvi při 8 °C bez TCE, aby byla kontrola růstu kultury bez TCE. Optická densita této kultury v den nasazení pokusu bylo 0,1.

Kultivace byla provedena po dobu 32 dní při 8 °C a bylo provedeno měření koncentrace TCE. Ze zbylé suspenze po stanovení koncentrace TCE ve vzorcích bylo změřeno pH a to v intervalech po 4, 11, 18, 25 a 32 dnech, kdy byl pokus ukončen.

4.2.8 Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 10AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl.

Bylo připraveno 300 ml MM4. Následně bylo změřeno pH média, které mělo hodnotu 6,95. Pomocí KOH bylo pH upraveno na hodnotu 7,4 a byla provedena jeho sterilizace. Po sterilizaci bylo do MM4 přidáno 1,1 ml zásobního roztoku fenolu a 300 µl MEM vitamínů, poté bylo pH opět přeměřeno a jeho hodnota byla 7,2. Z připraveného média bylo 10 ml použito na předinkubaci kultury 10AZS ve zkumavkách při teplotě 8 °C, po dobu 1 týdne.

Zbylých 290 ml MM4 s fenolem bylo zaočkováno 290 µl předinkubované suspenze 10AZS a bylo provedeno dokonalé promíchání. Následně bylo dávkováno 10 ml MM4 se suspenzí 10AZS do sterilních vialek a do každé vialky bylo přidáno 30 µl zásobního roztoku TCE.

Souběžně byly připraveny i slepé pokusy s použitím 10 ml demineralizované vody a 30 µl zásobního roztoku TCE do každé vialky.

Všechny vialky byly kultivovány po dobu 19 dní při teplotě 8 °C. Průběžně byla měřena koncentrace TCE ve zkušebních vialkách a zbylá suspenze byla použita na přeměření OD.

4.2.9 Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 8AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl.

Byl proveden totožný pokus degradace TCE v přítomnosti 4 % NaCl, pouze s použitím bakteriální kultury 8AZS. Postup přípravy MM4, úpravy pH, přidavků komponent, postup předinkubace bakteriální kultury i množství dávkování MM4 a TCE do zkušebních vialek i demineralizované vody do slepých pokusů byl stejný.

Všechny vialky byly kultivovány po dobu 28 dní při teplotě 8 °C. Průběžně byla měřena koncentrace TCE ve zkušebních vialkách a zbylá suspenze byla použita na přeměření OD.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

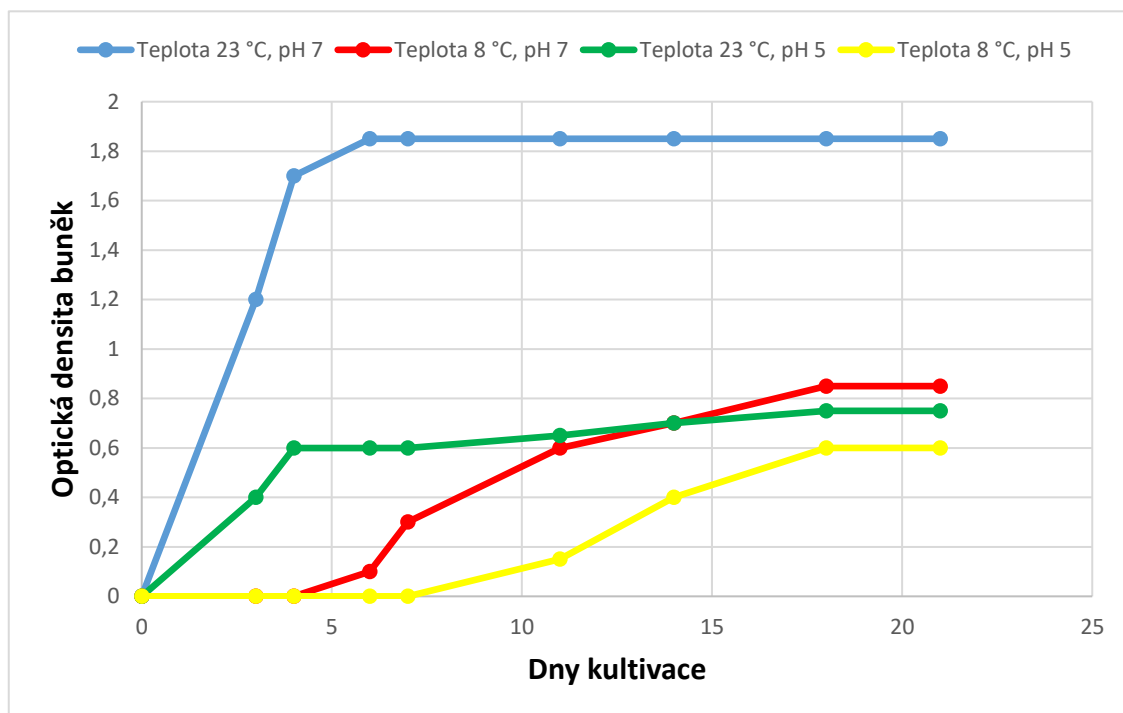
5.1 Růstové testy bakteriálních kultur

5.1.1 Ověření růstu bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS při pH 5,2 a pH 7,2; při koncentraci fenolu 200 mg/l a při teplotách 8 °C a 23 °C

Nejprve bylo provedeno ověření růstu bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS na fenolu o koncentraci 200 mg/l v minerálních médiích MM1 o pH 7,2 a MMK o pH 5,2. Do sterilních zkumavek pro každou kulturu bylo nadávkováno MM1 a fenol s výslednou koncentrací 200 mg/l, zkumavky byly zaočkovány bakteriální suspenzí a kultivovány po dobu 14 dní při teplotách 8 °C a 23 °C. Stejný postup se opakoval pro ověření růstu bakteriálních kultur při pH 5,2. Ověření růstu obou bakteriálních kultur 1AZS i 5BZS při neutrálním pH a pH 5,2 bylo úspěšné jak při teplotě 23 °C, tak při teplotě 8 °C. Bakteriální kultura 1AZS vykazovala při teplotě 23 °C a neutrálním pH růst již třetí den kultivace, při stejné teplotě, ale pH 5,2 byl tento růst zaznamenán již také třetí den, ovšem byl jen mírný. Konečná OD byla při pH 5,2 mnohem nižší, ve srovnání s neutrálním pH. Při nižších teplotách začal mírný růst kultury při pH 7,2 šestý den a při pH 5,2 až 11. den kultivace. Konečná OD při obou teplotách se při pH 5,2 lišila jen mírně. Výsledky naznačují, že bakteriální kultura 1AZS roste mnohem lépe při vyšší teplotě, ovšem vliv na růst má také pH, které způsobilo za stejnou dobu kultivace mnohem nižší bakteriální hustotu při pH 5,2 ve srovnání s pH 7,2. Konečné výsledky růstu bakteriální kultury 1AZS jsou uvedeny v tabulce č. 8 a graficky znázorněny na obrázku číslo 6.

Tabulka 8 Výsledky růstu kultury 1AZS na fenolu při teplotách 23 a 8 °C a pH 7 a 5

Kultura 1AZS				
Dny kultivace	pH 7		pH 5	
	23 °C	8 °C	23 °C	8 °C
0	0	0	0	0
3	1,2	0	0,4	0
4	1,7	0	0,6	0
6	1,85	0,1	0,6	0
7	1,85	0,3	0,6	0
11	1,85	0,6	0,65	0,15
14	1,85	0,7	0,7	0,4
18	1,85	0,85	0,75	0,6
21	1,85	0,85	0,75	0,6
	Konec	Konec	Konec	Konec

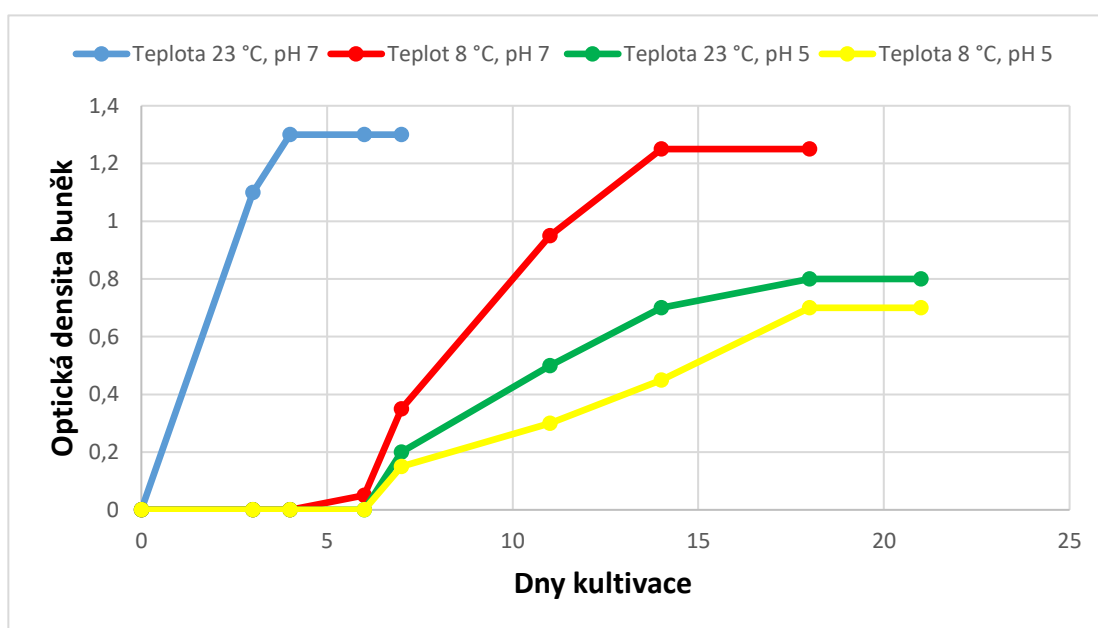


Obrázek 6 Růst kultury 1AZS na fenolu při pH 7 a 5 a teplotách 23 °C a 8 °C

Kultura 5BZS byla rovněž schopna růstu při pH neutrálním i kyselém. Při neutrálním pH 7 došlo k nárůstu při teplotě 23 °C již po 3 dnech kultivace. Nárůst kultury při teplotě 8 °C byl pomalejší, první mírný nárůst byl pozorován po 6 dnech, avšak konečné výsledky schopnosti růstu byly srovnatelné s teplotou 23 °C. Při pH prostředí 5 byl nárůst kultury mírný a byl prvně zpozorován až po 7 dnech kultivace, a to při teplotě 23 °C i 8 °C. Vyšší hustotu buněk vykazovaly vzorky kultivované při teplotě 23 °C. Konečné výsledky růstu bakteriální kultury 5BZS jsou uvedeny v tabulce č. 9 a graficky znázorněny na obrázku číslo 7 a jsou téměř srovnatelné při obou teplotách.

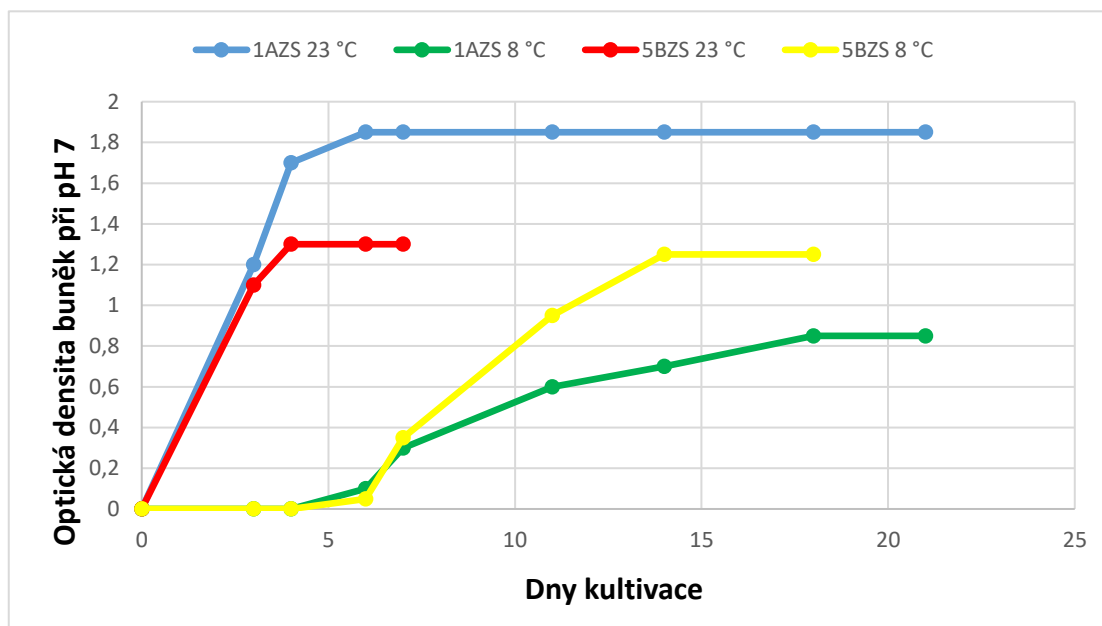
Tabulka 9 Výsledky růstu kultury 5BZS na fenolu při teplotách 23 a 8 °C a pH 7 a 5

Kultura 5BZS				
Dny kultivace	pH 7		pH 5	
	23 °C	8 °C	23 °C	8 °C
0	0	0	0	0
3	1,1	0	0	0
4	1,3	0	0	0
6	1,3	0,05	0	0
7	1,3	0,35	0,2	0,15
11	Konec	0,95	0,5	0,3
14	-	1,25	0,7	0,45
18	-	1,25	0,8	0,7
21	-	Konec	0,8	0,7
-	-	-	Konec	Konec



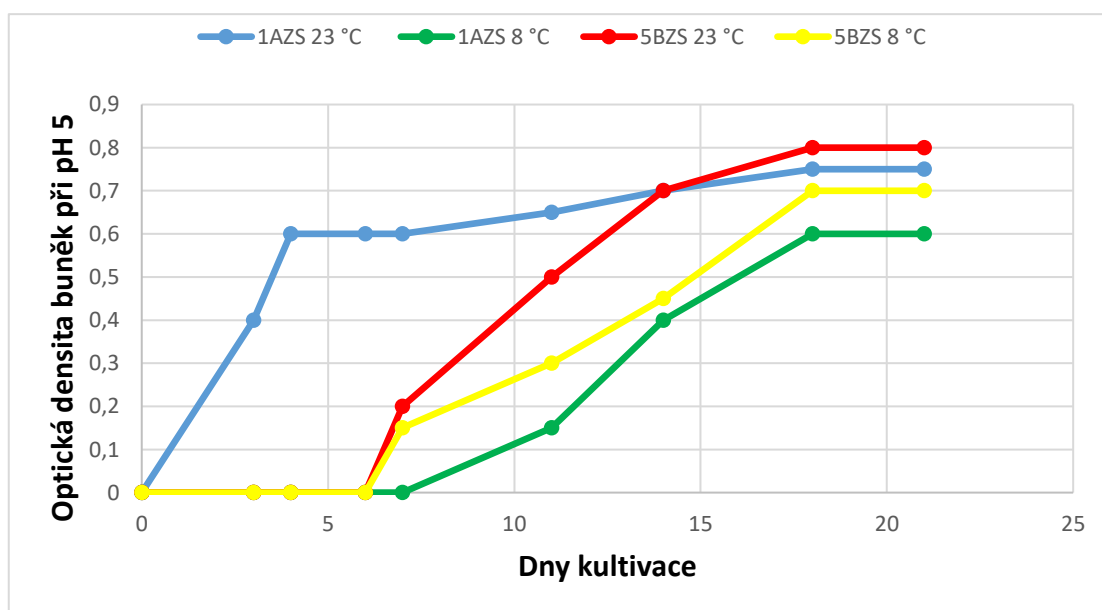
Obrázek 7 Růst kultury 5BZS na fenolu při pH 7 a 5 a teplotách 23 °C a 8 °C

Srovnání růstu obou bakteriálních kultur při pH 7 je znázorněno na obrázku č. 8. Na obrázku lze vidět, že obě bakteriální kultury rostly rychleji při teplotě 23 °C. Rychlost růstu při nižší teplotě byla nejen pomalejší, ale i konečná hustota bakteriálních suspenzí byla nižší.



Obrázek 8 Růst bakteriálních kultur na fenolu při pH 7 a teplotách 23 °C a 8 °C

Srovnání růstu obou bakteriálních kultur při pH 5 je znázorněno na obrázku č. 9 a lze z něj vyčíst, že růst kultury 1AZS při teplotě 23 °C je oproti kultuře 5BZS rychlejší, ovšem konečná hustota buněk je naopak vyšší u kultury 5BZS. Při nižších teplotách jsou výsledky obou kultur velmi podobné jak v rychlosti růstu, tak i v konečné hustotě buněk.



Obrázek 9 Růst bakteriálních kultur na fenolu při pH 5 a teplotách 23 °C a 8 °C

5.1.2 Ověření růstu bakteriálních kultur při různých koncentracích fenolu:

Bylo provedeno ověření růstu kultur 1AZS a 5BZS při různých koncentracích fenolu, neutrálním pH a nízké teplotě.

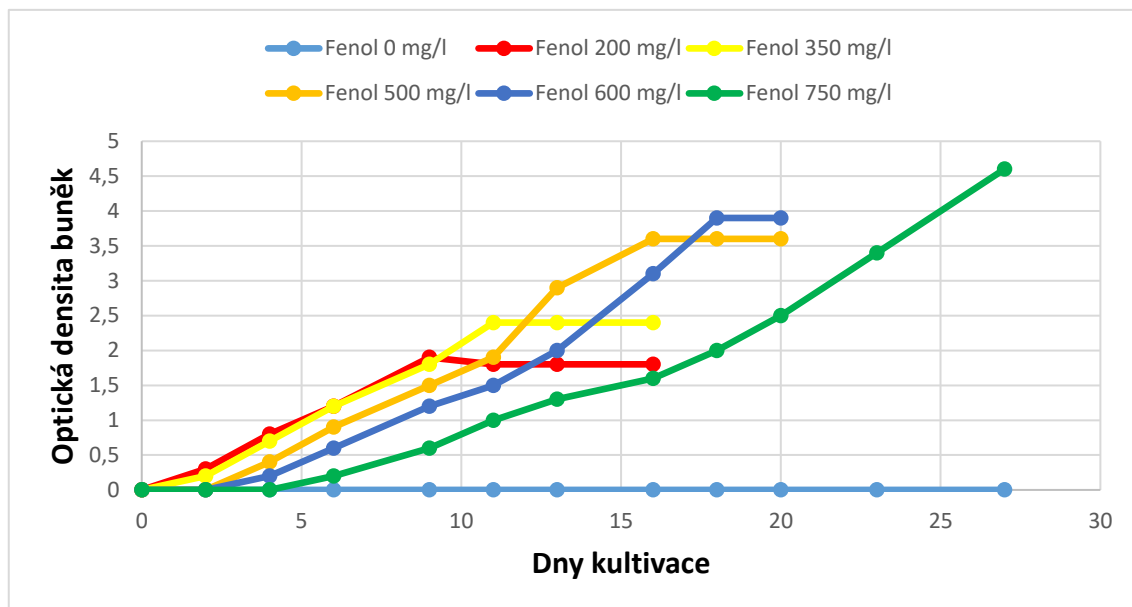
Růst bakteriální kultury 1AZS při různých koncentracích fenolu

V rámci práce byl proveden pokus růstu bakteriálních kultur na různých koncentracích fenolu v rozmezí od 200 do 750 mg/l za účelem zjištění optimálních koncentrací fenolu pro růst bakterií. Pokus byl proveden ve sterilních zkumavkách s minerálním médiem MM1 o pH 7, různých koncentracích fenolu a inkubaci při teplotě 8 °C po dobu 27 dní. Průběžně byla měřena optická densita buněk ve všech zkušebních zkumavkách. Bylo zjištěno, že kultura 1AZS je schopna růstu při koncentracích fenolu při hodnotách od 200 do 750 mg/l, přičemž mnohem větší densita buněk byla zaznamenána při koncentraci fenolu 750 mg/l a se snižující se koncentrací fenolu klesala. Výsledky naznačují, že vyšší koncentrace fenolu je pro růst bakteriální kultury 1AZS příznivá. Počátek růstu kultury je ovšem proti nižším koncentracím pomalejší, za to však konečná hustota buněk je několikanásobně vyšší. Naopak při nižších koncentracích fenolu je růst kultury zaznamenán již 2. den kultivace, ovšem od 11. dne již nedocházelo ke zvýšení OD. Koncentrace fenolu, dny kultivace a průběžná densita buněk při inkubaci jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka 10 Densita buněk 1AZS při různých koncentracích fenolu při 8 °C

Kultivace (dny)	Kultura 1A ZS (densita buněk dle McFarlandovy stupnice)					
	Koncentrace fenolu (mg/l)					
	0	200	350	500	600	750
0	0	0	0	0	0	0
2	0	0,3	0,2	0	0	0
4	0	0,8	0,7	0,4	0,2	0
6	0	1,2	1,2	0,9	0,6	0,2
9	0	1,9	1,8	1,5	1,2	0,6
11	0	1,8	2,4	1,9	1,5	1
13	0	1,8	2,4	2,9	2	1,3
16	0	1,8	2,4	3,6	3,1	1,6
18	0	Konec	Konec	3,6	3,9	2
20	0	-	-	3,6	3,9	2,5
23	0	-	-	Konec	Konec	3,4
27	0	-	-	-	-	4,6

Grafické znázornění růstu bakteriální kultury 1AZS při různých koncentracích fenolu a teplotě 8 °C je uvedeno na obrázku č. 10. V grafu lze vidět, že kultura roste při všech uvedených koncentracích fenolu. Růst je se zvyšující se koncentrací pomalejší, ovšem nejvyšší optické hustoty dosáhla kultura naopak při nejvyšší testované koncentraci, tedy 750 mg/l.



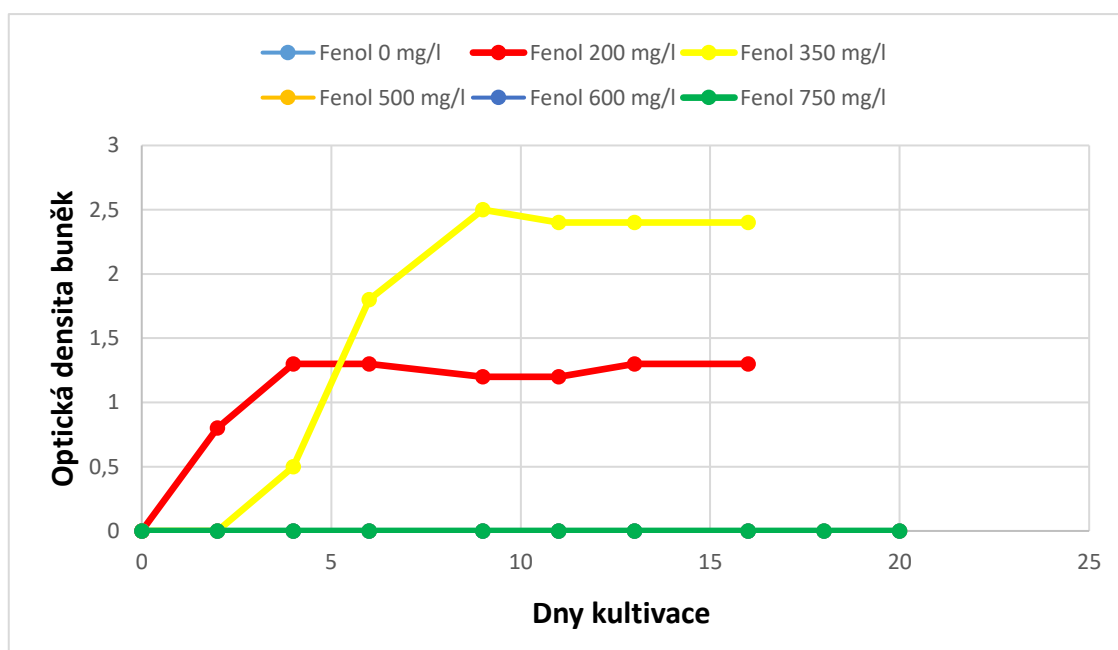
Obrázek 10 Grafické znázornění density buněk kultury 1AZS při různých koncentracích fenolu

Růst kultury 5BZS při různých koncentracích fenolu

Totožné ověření růstu bakterií při různých koncentracích fenolu bylo provedeno i s bakteriální kulturou 5BZS. Tato kultura vykazovala nejvyšší nárůst buněk při koncentraci fenolu 350 mg/l, ovšem za delší čas oproti nižší koncentraci s hodnotou 200 mg/l, při které byl taktéž zaznamenán mírný nárůst buněk. Při koncentracích fenolu 500 mg/l a více již kultura nebyla schopná růstu. Koncentrace fenolu, dny kultivace a průběžná densita buněk v průběhu kultivace jsou uvedeny v tabulce č. 11, grafické znázornění růstu kultury je uvedeno na obrázku č. 11. V grafu lze vidět, že růst kultury je rychlejší při nejnižší koncentraci fenolu, ovšem vyšší optické hustoty dosáhla kultura při vyšší koncentraci fenolu, konkrétně při 350 mg/l. Při ostatních koncentracích bylo ověření růstu neúspěšné.

Tabulka 11 Densita buněk 5BZS při různých koncentracích fenolu při 8 °C

Kultivace (dny)	Kultura 5B ZS (densita buněk dle McFarlandovy stupnice)					
	Koncentrace fenolu (mg/l)					
	0	200	350	500	600	750
0	0	0	0	0	0	0
2	0	0,8	0	0	0	0
4	0	1,3	0,5	0	0	0
6	0	1,3	1,8	0	0	0
9	0	1,2	2,5	0	0	0
11	0	1,2	2,4	0	0	0
13	0	1,3	2,4	0	0	0
16	0	1,3	2,4	0	0	0
18	-	Konec	Konec	0	0	0
20	-	-	-	0	0	0



Obrázek 11 Grafické znázornění density buněk kultury 5BZS při různých koncentracích fenolu

5.2 Testy degradace TCE

5.2.1 Průběh degradace TCE kulturou 1AZS při nízké teplotě a pH 7,2

Po úspěšném ověření růstu obou bakteriálních kultur při různých podmínkách prostředí byl proveden pokus první degradace TCE při neutrálním pH za snížené teploty, tedy při 8 °C. Kultivace probíhala po dobu 21 dní. Degradace TCE při 8 °C a pH 7,2 bakteriální kulturou 1AZS nebyla příliš úspěšná, Z počáteční koncentrace TCE 2474 µg/l byla po 21 dnech naměřena průměrná koncentrace ve vialkách 1994,5 µg/l. Celkem bylo rozloženo pouze 19,4 % TCE. Výsledky degradace jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Tabulka 12 Degradace TCE kulturou 1AZS při pH 7,2 a teplotě 8 °C

Vzorek	Plocha peaku	Výsledná koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
Blank 1	642 947	2450,4	2474,0
Blank 2	655 328	2497,6	
Vzorek 1	574 309	2188,8	1994,5
Vzorek 2	472 323	1800,1	

5.2.2 Průběh degradace TCE kulturou 5BZS při nízké teplotě a pH 7,2

Totožný pokus degradace TCE při neutrálním pH a snížené teplotě 8 °C byl proveden i s bakteriální kulturou 5BZS. Degradace TCE při 8 °C a pH 7,2 touto bakteriální kulturou byla 100 % úspěšná. Z počáteční koncentrace TCE 2405,6 µg/l nebyl po 21 dnech při analýze vzorků nalezen žádný pík TCE, tudíž byl TCE kompletně degradován. Výsledné koncentrace TCE po 21-denní degradaci jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tabulka 13 Degradace TCE kulturou 5BZS při pH 7,2 a teplotě 8 °C

Vzorek	Plocha peaku	Výsledná koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
Blank 1	642 358	2448,2	2405,6
Blank 2	619 986	2362,9	
Vzorek 1	0	0,0	0
Vzorek 2	0	0,0	

5.2.3 Průběh degradace TCE bakteriálními kulturami při teplotě 8 °C, pH 5,3 a koncentraci fenolu 150 mg/l

Po provedených pokusech degradace TCE s neutrálním pH byly provedeny obdobné pokusy při sníženém pH 5,32 a koncentraci fenolu 150 mg/l. Kultivace zaočkovaných vialek s obsahem MMK, vitamínů MEM, fenolu o koncentraci 150 mg/l a bakteriální suspenze a přítomností TCE probíhala po dobu 30 dní při teplotě 8 °C a průběžně byly měřeny koncentrace TCE. Zbylé suspenze po měření byly použity k měření optické hustoty bakterií a pH. Z naměřených hodnot je patrné, že ani jedna kultura nebyla úspěšná v degradaci TCE za podmínek vstupního pH 5,32, teploty 8 °C a koncentraci fenolu 150 mg/l. Kultura 1AZS po 30 dnech kultivace rozložila pouze 6,44 % TCE a kultura 5BZS za stejnou dobu degradace rozložila pouze 7,59 %. Pokus byl vyhodnocen jako neúspěšný pro obě bakteriální kultury. Výsledky měření obsahu TCE ve vzorcích u obou bakteriálních kultur i blanků jsou uvedeny v tabulkách č. 14 a 15.

Tabulka 14 Degradace TCE kulturou 1AZS při teplotě 8 °C a pH 5,3

Dny kultivace	Bakteriální kultura 1AZS	Plocha peaku	Koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
7	Blank 1	457 564	1743,9	1713,3
7	Blank 2	441 508	1682,7	
23	Vzorek 1	386 041	1471,3	1514,1
23	Vzorek 2	408 517	1557,0	
30	Vzorek 3	388 841	1482,0	1602,9
30	Vzorek 4	431 419	1644,3	
30	Vzorek 5	441 429	1682,4	
30	Blank 3	426 736	1626,4	1686,6
30	Blank 4	458 325	1746,8	

Tabulka 15 Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C a pH 5,3

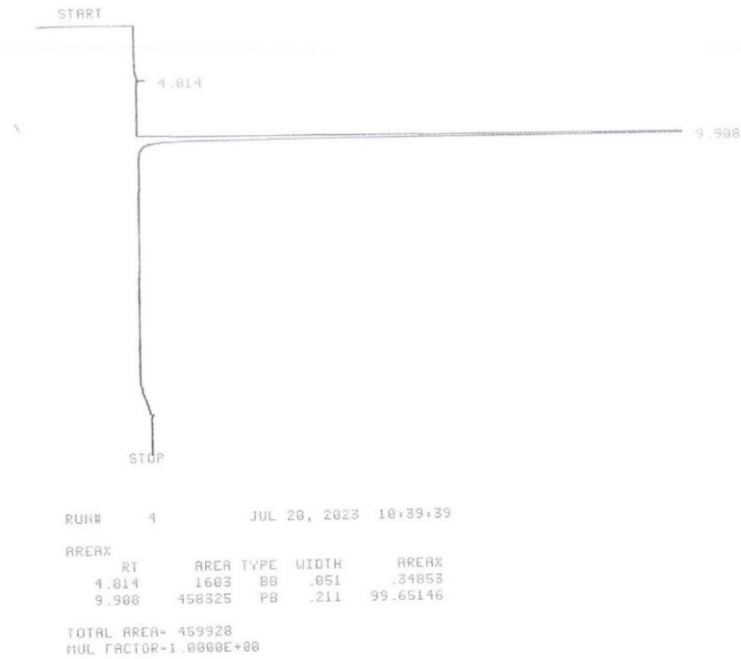
Dny kultivace	Bakteriální kultura 5BZS	Plocha peaku	Koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
7	Blank 1	457 564	1743,9	1713,3
7	Blank 2	441 508	1682,7	
23	Vzorek 1	414 404	1579,4	1579,4
30	Vzorek 2	403 865	1539,2	1583,2
30	Vzorek 3	405 783	1546,5	
30	Vzorek 4	436 518	1663,7	
30	Blank 3	426 736	1626,4	1686,6

Po stanovení TCE ve vzorcích bylo ve zbylých suspenzích měřeno pH, přičemž bylo zjištěno, že dochází k zásadnímu poklesu. U bakteriální kultury 1AZS byl pokles pH z původních 5,32 na 4,1 a u bakteriální kultury 5BZS byl pokles z původního pH 5,32 až na pH 3,8. Zásadní snížení pH tak mohlo ovlivnit schopnost obou bakteriálních kultur degradovat TCE a tak zapříčinit jeho neúspěšnou degradaci. K poklesu pH došlo nejspíše vlivem prvotní degradace fenolu, který byl do testů přidán jako růstový substrát a který bakteriální kultury spotřebovávají jako první. Naměřené hodnoty pH a jejich pokles v průběhu degradace u obou bakteriálních kultur jsou uvedeny v tabulce č. 16.

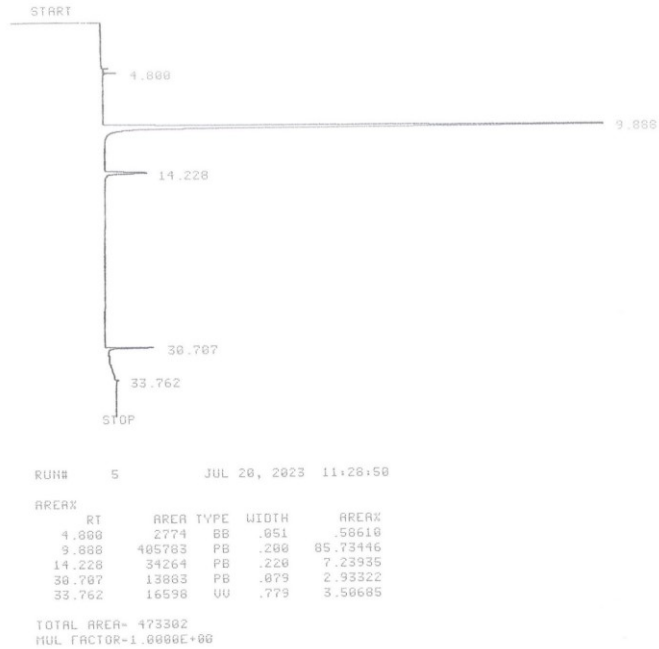
Tabulka 16 Hodnoty pH bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS po růstu na fenolu a po nepatrné degradaci TCE, při teplotě 8 °C a počátečním pH 5,3

Dny kultivace	pH 1AZS	pH 5BZS	pH blank
0	5,3	5,3	5,3
23	4,2	3,9	-
23	4,2	-	-
30	4,0	3,85	5,35
30	4,1	3,80	5,3
30	4,1	3,80	-

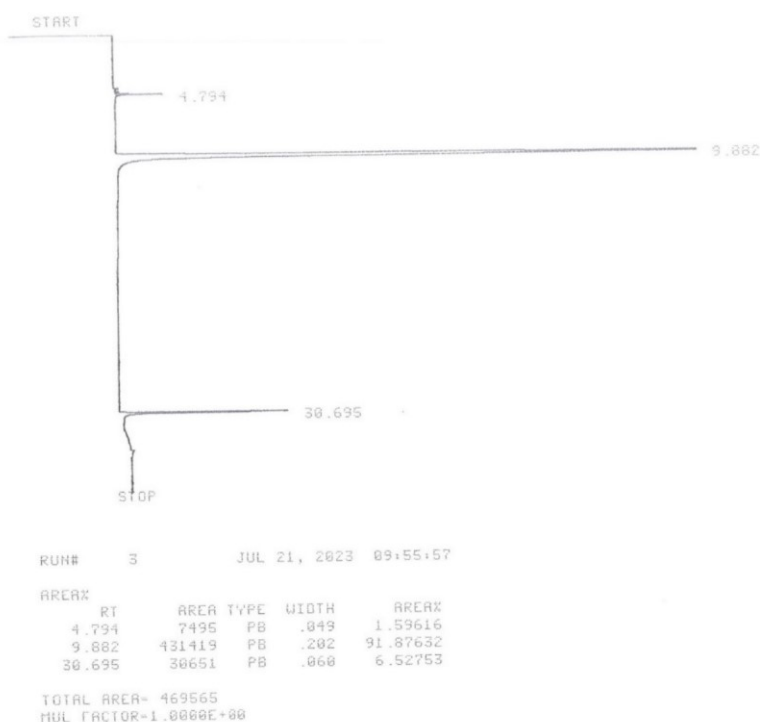
Možným řešením tohoto problému se tak nabízely dva rozdílné přístupy. Jedním bylo využití laktátu sodného v různých koncentracích jako druhého substrátu, v kombinaci s potřebným fenolem. Druhou možností bylo použití klidových buněk, předpěstovaných na samotném fenolu, ale při mírně vyšším pH (např. pH 6, s předpokladem poklesu na pH cca 5), s následným použitím odstředěných buněk pro degradaci TCE již bez přídavku fenolu. Obě možnosti byly v rámci dalších fází práce ověřeny.



Obrázek 12 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - blank, 29 dní kultivace



Obrázek 13 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 5BZS, 29 dní kultivace



Obrázek 14 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 1AZS, 30 dní kultivace

5.2.4 Průběh degradace TCE nerostoucími buňkami při teplotě 8 °C a pH 5,3

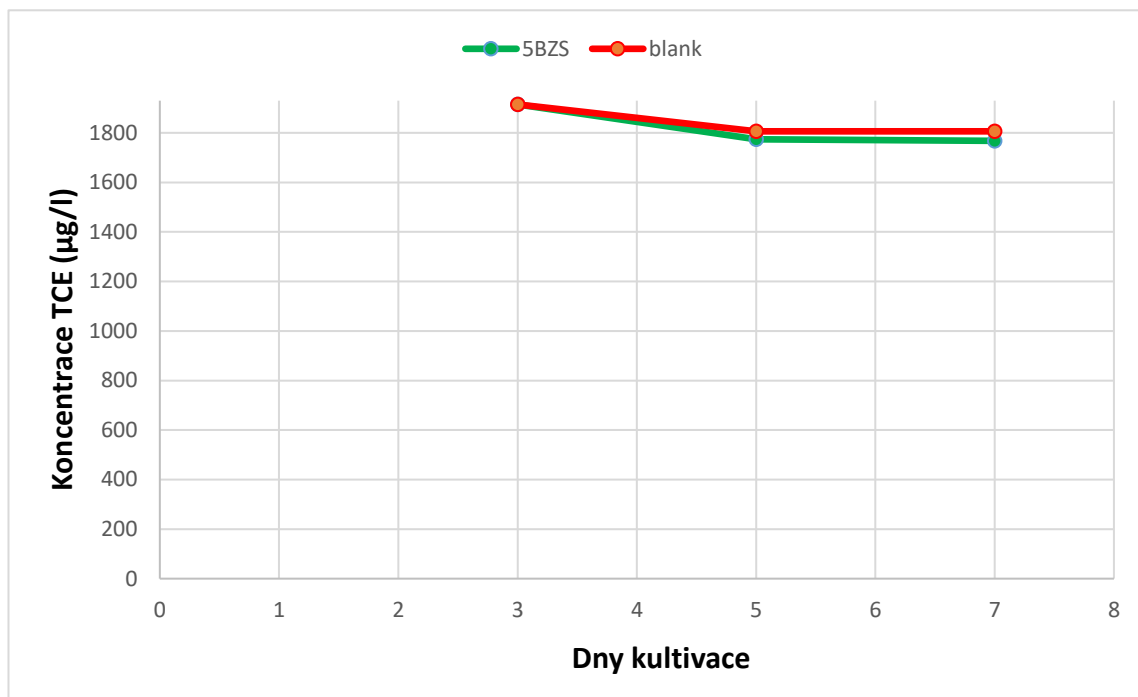
Jelikož byl pokus degradace při pH 5,3, teplotě 8 °C a koncentraci fenolu 150 mg/l vlivem přílišného poklesu pH při degradaci neúspěšný, bylo jednou z možností k zabránění poklesu pH použití klidových buněk, předpěstovaných na fenolu při pH 6. Takto předpěstované klidové buňky pak byly využity k degradaci TCE již bez dalšího přídavku fenolu. Bylo provedeno předpěstování buněk obou bakteriálních kultur na fenolu o koncentraci 150 mg/l při vstupním pH 6. Kultivace probíhala při teplotě 8 °C na třepačce. Předpoklad počátečního růstu u kultury 1AZS byl mezi 12.-14. dnem a jeho maximum bylo předpokládáno mezi 21.-24. dnem. U bakteriální kultury 5BZS byl předpokládán počátek růstu u kultury 5BZS byl cca 10. den kultivace a jeho maxima cca 14. den.

Kultura 5BZS byla po 18 dnech kultivace narostena výrazně lépe než kultura 1AZS. Optická hustota po 18 dnech kultury 5BZS byla 1,4 a 1,5. Výsledné pH po kultivaci bylo 5,01. Bylo proto dále pracováno již jen s kulturou 5BZS. Po 18 denní kultivaci 5BZS byla tedy provedena centrifugace ve sterilních kyvetách s následnou resuspendací buněk do připraveného MMK. Následoval pokus degradace TCE při 8 °C a pH 5,2.

Vzorky i blanky byly následně kultivovány při 8 °C a průběžně byly měřeny koncentrace TCE v intervalu 3, 5 a 7 dní, kdy byl pokus pro neúspěšnost ukončen. Po 7 dnech nerostoucí buňky kultury 5BZS rozložily pouze 12,4 % přítomného TCE. 5. den od zahájení degradace byla změřena i hodnota pH, která byla průměrně 5,31. Jelikož bakteriální kultura 1AZS byla již při kultivaci buněk při koncentraci fenolu 150 mg/l při pH 6 neúspěšná, nebyla již v dalších pokusech degradace v rámci této práce využívána. Výsledky měření obsahu TCE ve vzorcích a blankách jsou uvedeny v tabulce č. 17, jejich grafické znázornění je uvedeno na obrázku č.15.

Tabulka 17 Degradace TCE nerostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C a pH 5,3

Dny kultivace	Bakteriální kultura 5BZS	Plocha peaku	Koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
3	Blank 2	502379	1914,7	1914,7
5	Vzorek 1	445093	1771	1773,8
5	Vzorek 3	466175	1776,5	
7	Blank 3	464666	1771	1806,2
7	Blank 4	494735	1885,5	
7	Blank 5	462353	1762	
7	Vzorek 4	461931	1765,5	1767,7
7	Vzorek 5	458849	1749	
7	Vzorek 6	469203	1788,5	



Obrázek 15 Grafické znázornění průběhu degradace TCE nerostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C a pH 5,3

5.2.5 Ověření změn pH při růstu bakteriálních kultur na fenolu v kombinaci s laktátem sodným, při počátečním pH 5,3

Jelikož při prvních pokusech degradace TCE docházelo vlivem fenolu, používaného jako růstový substrát, k výraznému poklesu pH (viz dále), měl tento pokles pravděpodobně vliv na schopnost bakteriálních kultur degradovat TCE. Abychom předešli těmto poklesům, bylo jednou z možností použití přídavku laktátu, při jehož asimilaci by mělo pH mírně vzrůstat. Bylo tedy provedeno ověření růstu bakteriálních kultur na fenolu s přídavkem laktátu a to v různých poměrech koncentrací. Postup byl proveden obdobně jako předchozí růstové pokusy, s rozdílem snížení koncentrace fenolu a s přidáním laktátu sodného. Množství dávkovaných komponent a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce č. 9. Kultivace kultur probíhala při teplotě 8 °C po dobu 26 dní, kdy byl opticky sledován růst kultury a po 26 dnech bylo přeměřeno pH a optická densita buněk. Mírný nárůst kultury 1AZS při koncentraci 150 mg/l fenolu bez přídavku laktátu byl zaznamenán 21. den kultivace, při koncentraci fenolu 75 mg/l a laktátu 125 g/l byl zaznamenán růst kultury již 17. den kultivace. Při koncentraci fenolu 75 mg/l a laktátu 150 mg/l byl růst zaznamenán 13. den a ve zkumavkách s fenolem o koncentraci 50 mg/l a fenolu 150 mg/l byl mírný růst zaznamenán již 12. den. Výsledky

ukazují, že se zvyšující se koncentrací laktátu roste rychlost růstu. Snížená koncentrace fenolu neměla na růst zvláště velký vliv.

Totožný pokus se stejnými koncentracemi fenolu i laktátu byl proveden i s kulturou 5BZS. Slabý růst byl při koncentraci fenolu 150 mg/l bez přídavku laktátu zaznamenán 17. den kultivace, při koncentraci fenolu 75 mg/l a laktátu 125 mg/l byl mírný růst pozorován již 10. – 11. den. Při koncentraci fenolu 75 mg a zvýšené koncentraci laktátu 150 mg/l byl nárůst pozorován 10 den kultivace, stejně tak růst ve zkumavkách s obsahem fenolu o koncentraci 50 mg/l a laktátu 150 mg/l. Kultura 5BZS roste s kombinací substrátu fenol + laktát mnohem rychleji, než na samotném fenolu, což značí, že přidaný laktát má příznivý vliv na růst kultury.

Dávkování jednotlivých komponent a jejich koncentrací bylo totožné jako u bakteriální kultury 1AZS. V tabulce č. 18 lze vidět kromě koncentrací substrátů také konečné hodnoty pH obou kultur v závislosti na různých poměrech dávkovaných komponent. Vliv laktátu na pH byl při pokusech s oběma bakteriálními kulturami značný. U obou kultur došlo se zvyšující se koncentrací laktátu ke zvýšení pH. Větší zvýšení pH s přidaným laktátem bylo naměřeno u bakteriální kultury 5BZS, oproti pH bez přidání laktátu, nicméně konečné hodnoty pH jsou u obou kultur v podstatě totožné při všech zkoušených koncentracích laktátu.

Tabulka 18 Vstupní koncentrace fenolu, laktátu a hodnoty pH po inkubaci

Konc. fenolu (mg/l)	Konc. laktátu (mg/l)	pH konec 1AZS	pH konec 5BZS
150	---	4,01+4,25	3,75+3,78
75	125	5,45+5,47	5,59+5,60
75	150	5,65+5,63	5,68+5,69
50	150	5,75+5,78	5,73+5,76

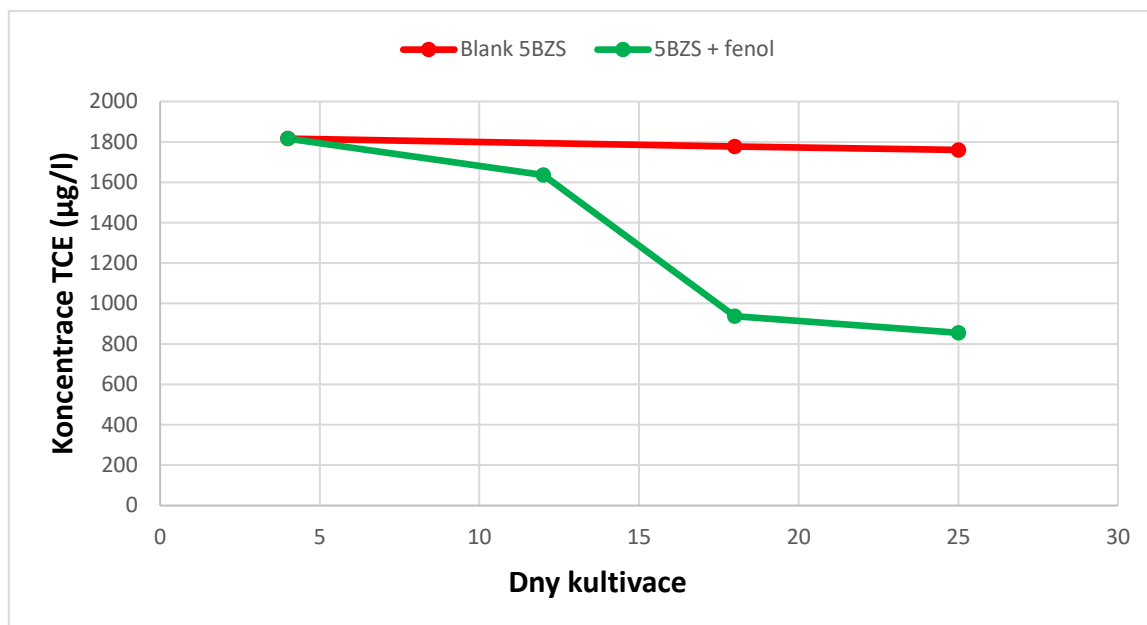
5.2.6 Průběh degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C a snížené koncentraci fenolu s přidaným laktátem, pH 5,2

Druhou možností, jak zabránit poklesu pH při degradaci TCE, bylo snížení koncentrace fenolu a přidání laktátu. Byl tedy proveden pokus degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS za podmínek snížené koncentrace fenolu s přidaným laktátem. Koncentrace fenolu byla 80 mg/l, koncentrace laktátu 125 mg/l. Vstupní pH minerálního média bylo 5,2

a teplota kultivace 8 °C. Kultura byla kultivována po dobu 25 dní. V průběhu kultivace byla měřena koncentrace TCE a zbylá suspenze po měření TCE byla využita na měření optické hustoty buněk. Z naměřených dat lze vidět mírnou degradaci TCE. Jeho koncentrace byla na počátku pokusu 1816,2 µg/l a konečná koncentrace po 25 dnech kultivace byla 854,95 µg/l. Celkem bylo po 25 dnech kultivace odstraněno 52,93 % trichlorethylénu, což lze považovat za mírně pozitivní výsledek. Klesající koncentrace TCE ve vzorcích v průběhu 25 denní kultivace je uvedena v tabulce č. 19 a grafické znázornění úbytku TCE je vyobrazeno na obrázku č. 16. Naměřené data ukazují, že kultura 5BZS je schopna degradace TCE při pH 5,2 a teplotě 8 °C mnohem více s přidavkem laktátu, jelikož nedochází k výraznému poklesu pH, jako v předchozích testech.

Tabulka 19 Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C a pH 5,2, snížené koncentraci fenolu a s přidavkem laktátu

Dny kultivace	Bakteriální kultura 5BZS	Plocha peaku	Koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
4	Blank 1	473 389	1804,2	1816,2
4	Blank 2	464 799	1771,5	
4	Blank 3	491 452	1873,1	
12	Vzorek 1	441 379	1682,2	1636,0
12	Vzorek 2	433 187	1651,0	
12	Vzorek 3	413 170	1574,7	
18	Vzorek 4	297 415	1133,5	936,9
18	Vzorek 5	216 997	827,0	
18	Vzorek 6	223 098	850,3	
18	Blank 4	471 861	1798,4	1777,4
18	Blank 5	460 867	1756,5	
25	Vzorek 7	222 143	846,6	854,95
25	Vzorek 8	226 514	863,3	
25	Blank 6	452 473	1724,5	1760,2
25	Blank 7	459 782	1752,4	
25	Blank 8	473 248	1803,7	



Obrázek 16 Grafické znázornění průběhu degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C, sníženém obsahu fenolu a s přidavkem laktátu

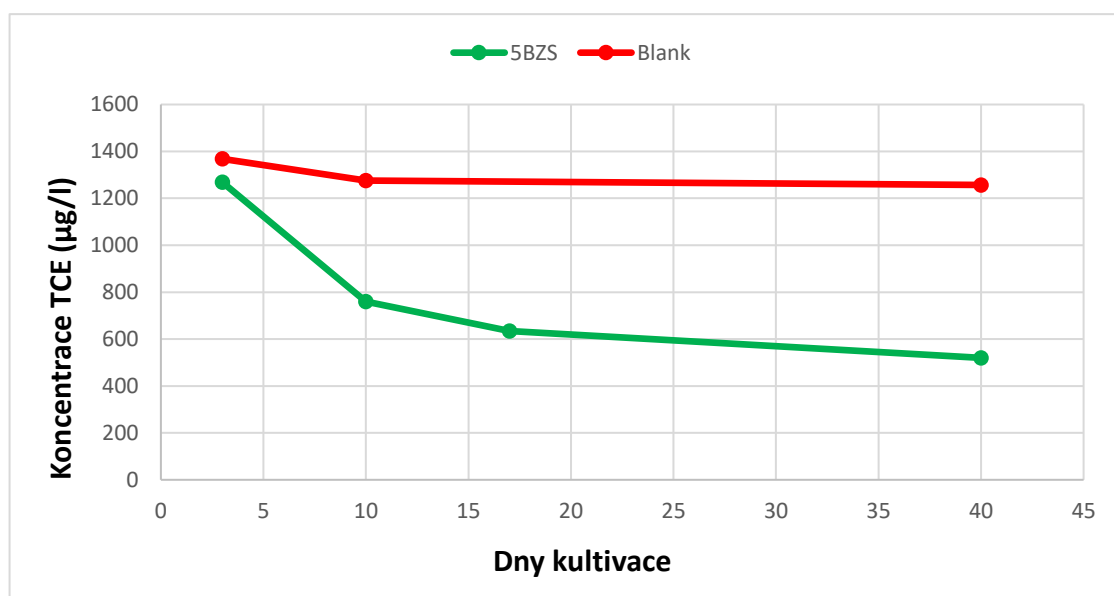
5.2.7 Průběh degradace TCE rostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 23 °C, snížené koncentraci fenolu s laktátem a pH 5,2

Abychom si ověřili, zda malá míra degradace TCE je více ovlivněna nižší teplotou či kyselejším pH, byl proveden totožný pokus degradace TCE kulturou 5BZS (rostoucími buňkami) za podmínek pH 5,2, snížené koncentrace fenolu s přidaným laktátem, ale při vyšší teplotě (23 °C). Kultura byla kultivována rovněž po dobu 25 dní a průběžně byla měřena koncentrace TCE a zbylá suspenze po měření TCE byla využita na měření optické hustoty buněk.

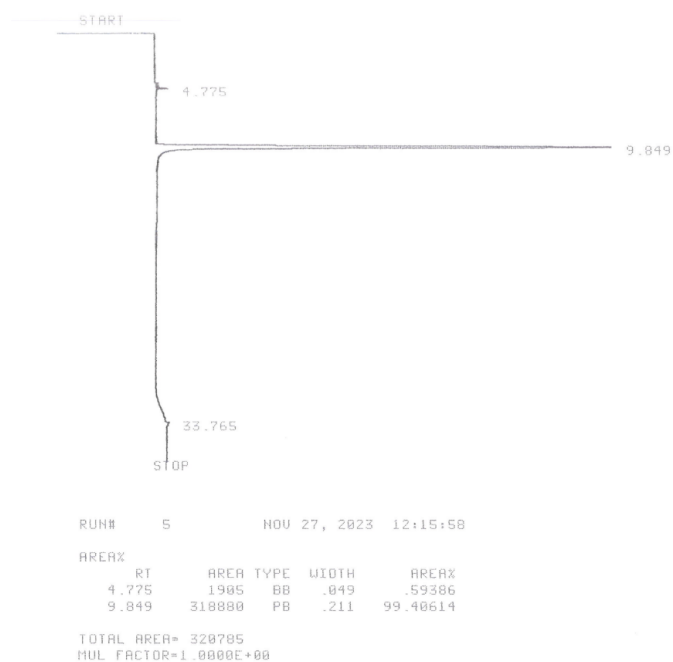
Výsledky uvedené v tabulce č. 20 a jejich grafické znázornění na obrázku č. 17 naznačují, že schopnost degradace TCE kulturou 5BZS je sice mírně lepší při teplotě 23 °C než při 8 °C, ale zdaleka nedosahuje úplného odstranění TCE. Celkově kultura po 40 dnech kultivace při 23 °C odstranila 62 % TCE. Výsledky tak naznačují, že teplota má jen mírný pozitivní vliv na schopnost degradace TCE touto bakteriální kulturou.

Tabulka 20 Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 23 °C a pH 5,2, snížené koncentraci fenolu a s přidavkem laktátu

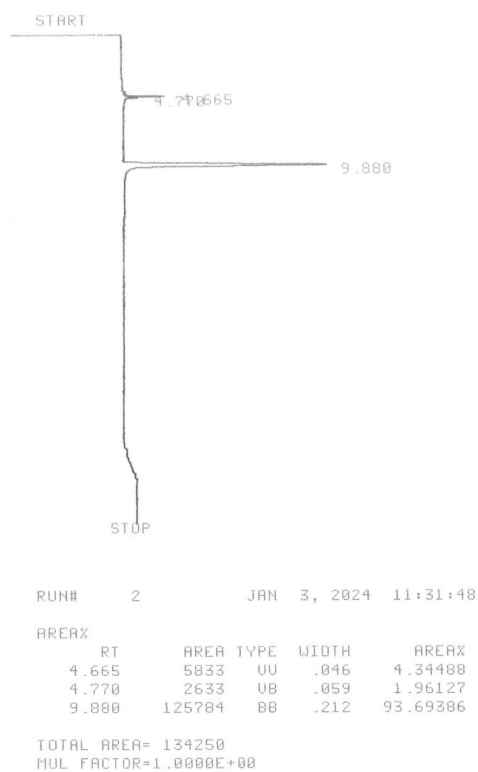
Dny kultivace	Bakteriální kultura 5BZS	Plocha peaku	Koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
3	Blank 1	349 770	1333,1	1368,2
3	Blank 2	351 929	1341,3	
3	Blank 3	375 288	1430,3	
3	Vzorek 1	318 880	1215,3	1268,5
3	Vzorek 2	346 776	1321,7	
10	Vzorek 3	195 728	746,0	760,1
10	Vzorek 4	200 144	762,8	
10	Vzorek 5	202 448	771,6	
10	Blank 4	331 093	1261,9	1257,1
10	Blank 5	338 043	1288,4	
17	Vzorek 6	163 703	623,9	634,1
17	Vzorek 8	181 604	692,1	
40	Vzorek 9	125 784	479,4	519,9
40	Vzorek 10	135 321	515,7	
40	Vzorek 11	148 105	564,5	
40	Blank 6	272 908	1040,1	1257,1
40	Blank 7	364 884	1390,7	
40	Blank 8	351 741	1340,6	



Obrázek 17 Grafické znázornění průběhu degradace TCE kultury 5BZS při teplotě 23 °C, pH 5,2 a sníženém obsahu fenolu, s přidavkem laktátu



Obrázek 18 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 5BZS, 3 dny kultivace při 23 °C



Obrázek 19 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 5BZS, 32 dny kultivace při 23 °C

V průběhu degradace byly zbytky bakteriální suspenze po změření koncentrace TCE využity na změření pH. Výsledky ukazují na mírné zvýšení pH v průběhu kultivace, které bylo způsobeno využívaným laktátem sodným – výsledky tak ukázaly, že takto zvolené podmínky degradace jsou správné pro zabezpečení vhodnější hladiny pH. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 21.

Tabulka 21 Změny pH během růstu kultury 5BZS při degradaci TCE při 23 °C a pH 5,2 s přídavkem laktátu a snížené koncentraci fenolu

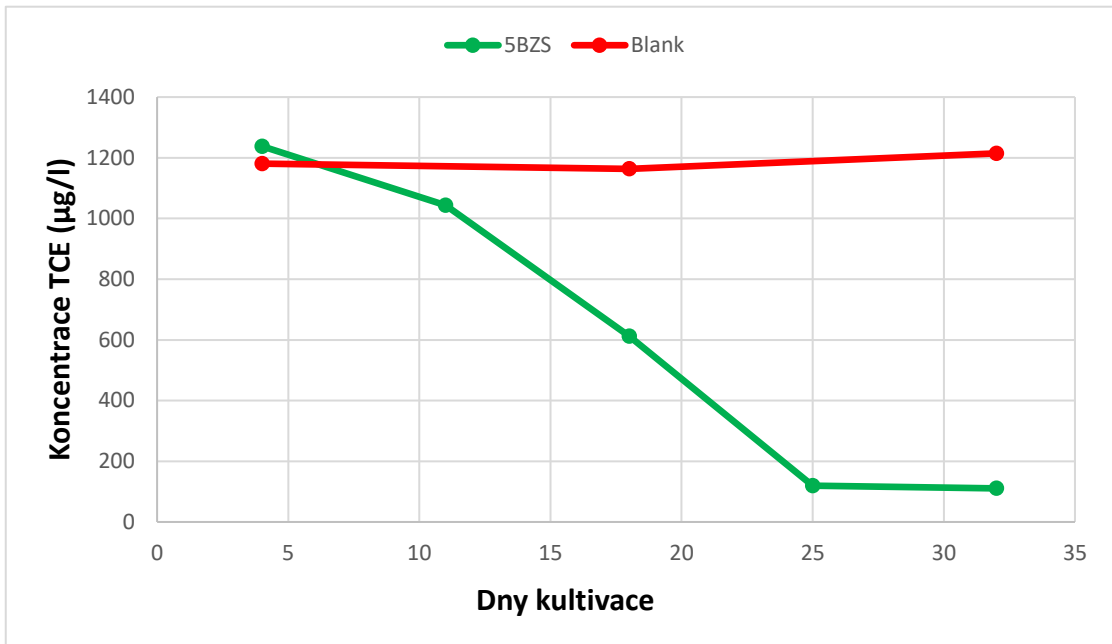
Dny kultivace	pH bakteriální kultury 5BZS			Průměrné pH
3	5,45	5,56	-	5,51
10	5,63	5,68	5,67	5,66
17	5,75	5,8	5,84	5,8
40	5,95	5,99	5,91	5,95

Jelikož pokus degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C, koncentrací fenolu 80 mg/l, 125 mg/l laktátu, pH 5,2 ukázal jen částečnou míru odstranění TCE, byl proveden prakticky stejný pokus, ovšem se sníženou vstupní koncentrací TCE.

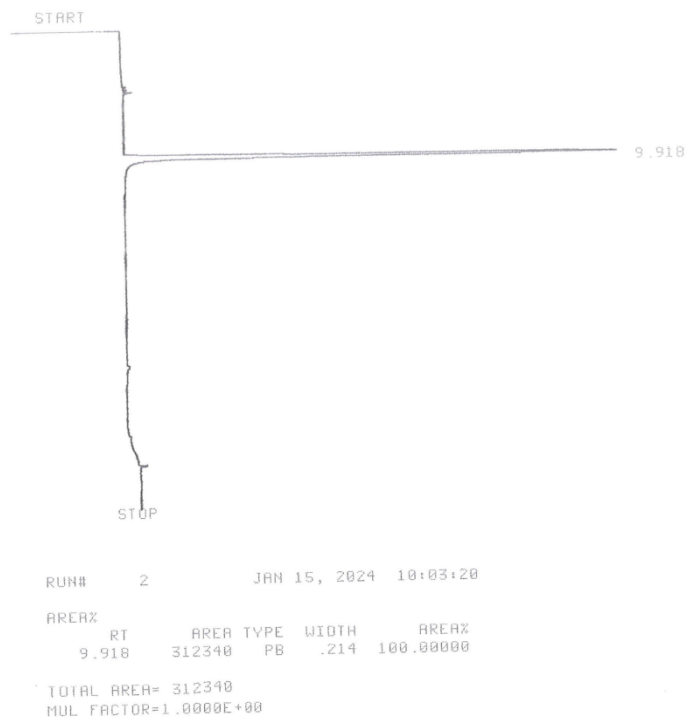
Bylo připraveno minerální médium MMK o pH 5,2 s obsahem vitamínů MEM, zásobního roztoku fenolu a zásobního roztoku laktátu. Vialky byly připraveny s MMK s obsahem vitamínů MEM, zásobního roztoku fenolu o koncentraci 190 mg/l a zásobního roztoku laktátu o koncentraci 125 mg/l. Poté byl do všech vialek přidán zásobní roztok TCE v objemu 20 µl. Kultivace probíhala při teplotě 8 °C po dobu 32 dnů a průběžně byla měřena koncentrace TCE a ze zbytku suspenze bylo provedeno měření hodnot pH. Z naměřených dat uvedených v tabulce č. 22 a jejich grafického znázornění na obrázku č. 20 vyplývá, že schopnost rozložení TCE touto bakteriální kulturou při snížené vstupní koncentraci TCE je velmi příznivá. Z počáteční koncentrace TCE 1181 µg/l bylo rozloženo celkem 89,8 %.

Tabulka 22 Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C, pH 5,2, s přidavkem laktátu, 90 mg/l fenolu a snížené koncentraci vstupního TCE

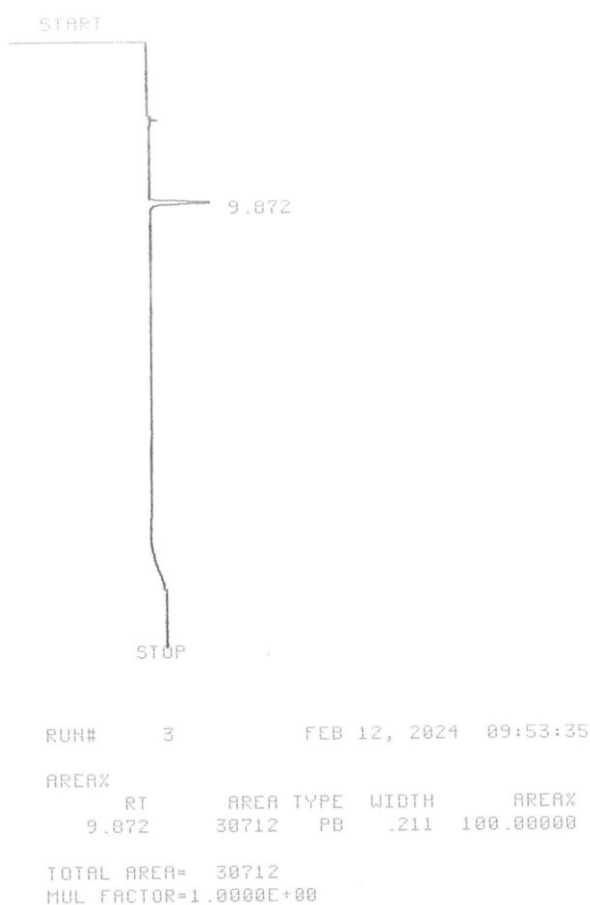
Dny kultivace	Bakteriální kultura 5BZS	Plocha peaku	Koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
4	Blank 1	312 340	1190,4	1181,0
4	Blank 2	307 379	1171,5	
4	Vzorek 1	332 948	1269,0	1238,0
4	Vzorek 2	316 690	1207,0	
11	Vzorek 3	267 004	1017,6	1044,7
11	Vzorek 4	275 757	1051,0	
11	Vzorek 5	279 581	1065,6	
18	Vzorek 6	154 378	588,4	612,0
18	Vzorek 7	194 108	739,8	
18	Vzorek 8	133 275	507,9	
18	Blank 3	300 977	1147,1	1163,3
18	Blank 4	308 192	1174,6	
18	Blank 5	306 506	1168,2	
25	Vzorek 9	29 627	112,9	119,7
25	Vzorek 10	33 169	126,4	
32	Blank 6	321 124	1223,9	1214,4
32	Blank 7	316 001	1204,4	
32	Blank 8	318 761	1214,9	
32	Vzorek 11	26 016	99,2	110,7
32	Vzorek 12	30 393	115,8	
32	Vzorek 13	30 712	117,1	



Obrázek 20 Grafické znázornění průběhu degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C, pH 5,2, s přidavkem laktátu, 90 mg/l fenolu a snížené koncentraci vstupního TCE



Obrázek 21 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - blank, snížená vstupní koncentrace TCE



Obrázek 22 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 5BZS, kultivace 32 dní při snížené vstupní koncentraci TCE

V průběhu degradace bylo rovněž měřeno pH, kdy naměřené hodnoty opět ukazovaly na mírné zvýšení v průběhu degradace. Zvýšení pH v tomto i předchozích pokusech s přidáním laktátem naznačují jeho úspěšnost v zabránění poklesu pH. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 23.

Tabulka 23 Změny pH při degradaci TCE kulturou 5BZS při 8 °C a pH 5,2 s přidavkem laktátu, 90 mg/l fenolu a snížené koncentraci vstupního TCE

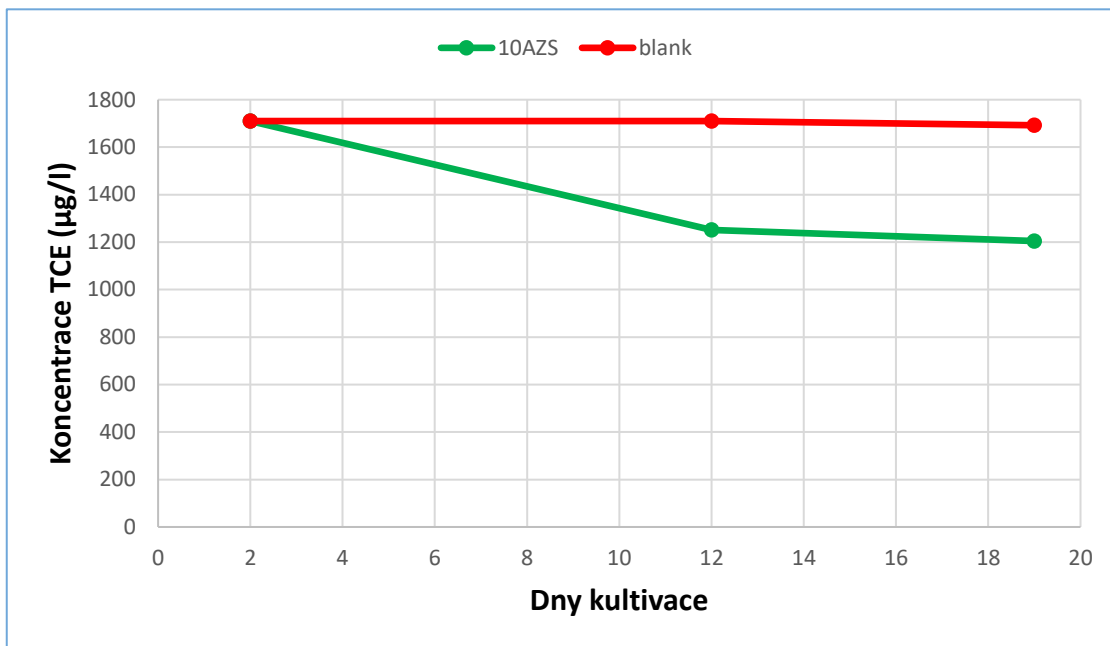
Dny kultivace	pH bakteriální kultury 5BZS			Průměrné pH
4	5,2	5,2	-	5,2
11	5,45	5,39	5,48	5,44
18	5,71	5,82	5,78	5,77
25	5,65	5,57	-	5,61
32	5,65	5,62	5,63	5,63

5.2.8 Průběh degradace TCE rostoucími buňkami kultury 10AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl

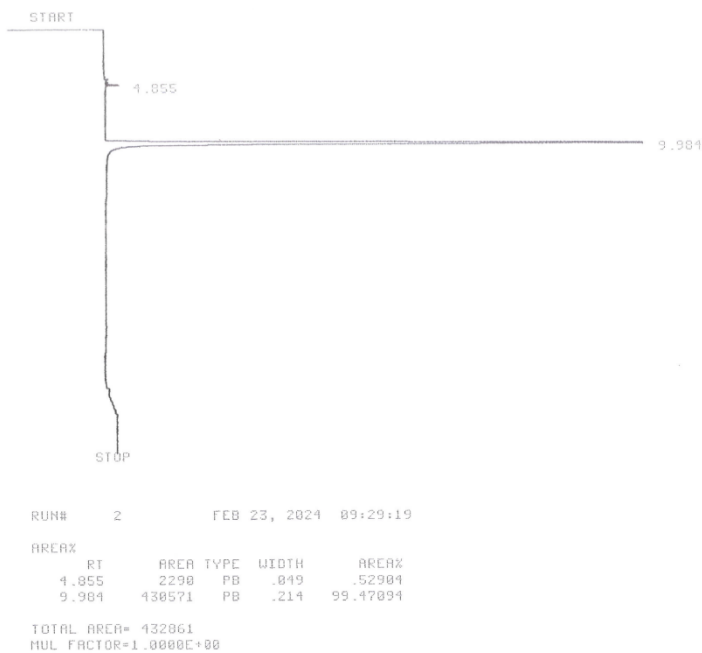
Jelikož bylo cílem této práce i ověření degradace TCE v přítomnosti zvýšené koncentrace NaCl, byl proveden pokus degradace TCE v přítomnosti fenolu o koncentraci 180 mg/l, při pH 7,2 s přítomností 4 % NaCl bakteriální kulturou 10AZS. Všechny vialky s obsahem MM4 s přidavkem vitamínů MEM, fenolu o koncentraci 180 mg/l, 4 % NaCl byly obohaceny o TCE a kultivovány při 8 °C po dobu 19 dní. Průběžně byla měřena koncentrace TCE. V tabulce č. 24 jsou uvedeny naměřené koncentrace TCE ve zkušebních i slepých vialkách. Dle naměřených výsledků byla degradace TCE nepříliš úspěšná, po 19 dnech bylo rozloženo pouze 29,6 % přítomného TCE. Grafické znázornění průběhu degradace je uvedeno na obrázku č. 23.

Tabulka 24 Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 10AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl

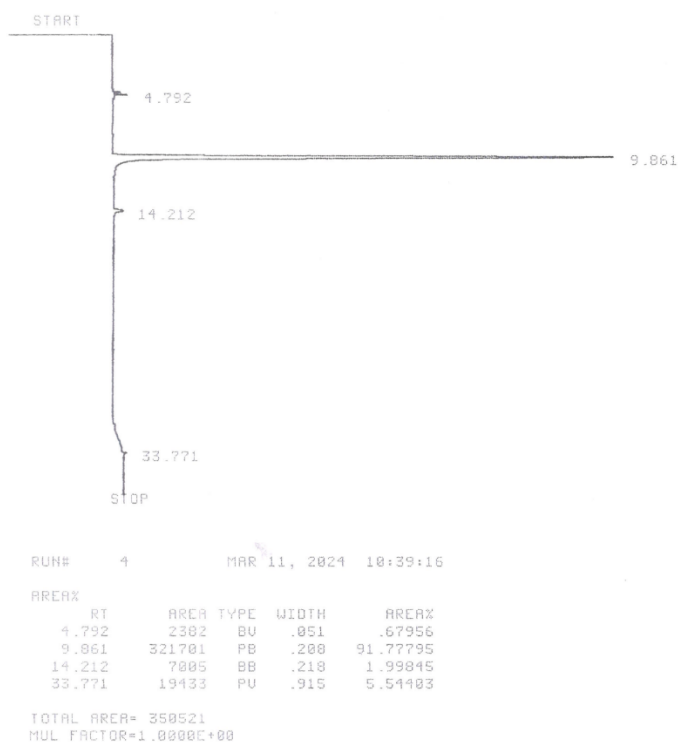
Dny kultivace	Bakteriální kultura 5BZS	Plocha peaku	Koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
2	Blank 1	430 571	1641,0	1709,9
2	Blank 2	474 337	1807,8	
2	Blank 3	441 050	1681,0	
12	Vzorek 1	313 139	1193,5	1251,3
12	Vzorek 2	339 768	1294,9	
12	Vzorek 3	332 064	1265,6	
19	Vzorek 4	320 886	1223,0	1204,6
19	Vzorek 5	305 596	1164,7	
19	Vzorek 6	321 701	1226,1	
19	Blank 4	430 039	1639,0	1692,3
19	Blank 5	452 362	1724,1	
19	Blank 6	449 657	1713,8	



Obrázek 23 Grafické znázornění průběhu degradace TCE rostoucími buňkami kultury 10AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl



Obrázek 24 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE – blank, MM4, 19 dní



Obrázek 25 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 10AZS, MM4, 19 dní

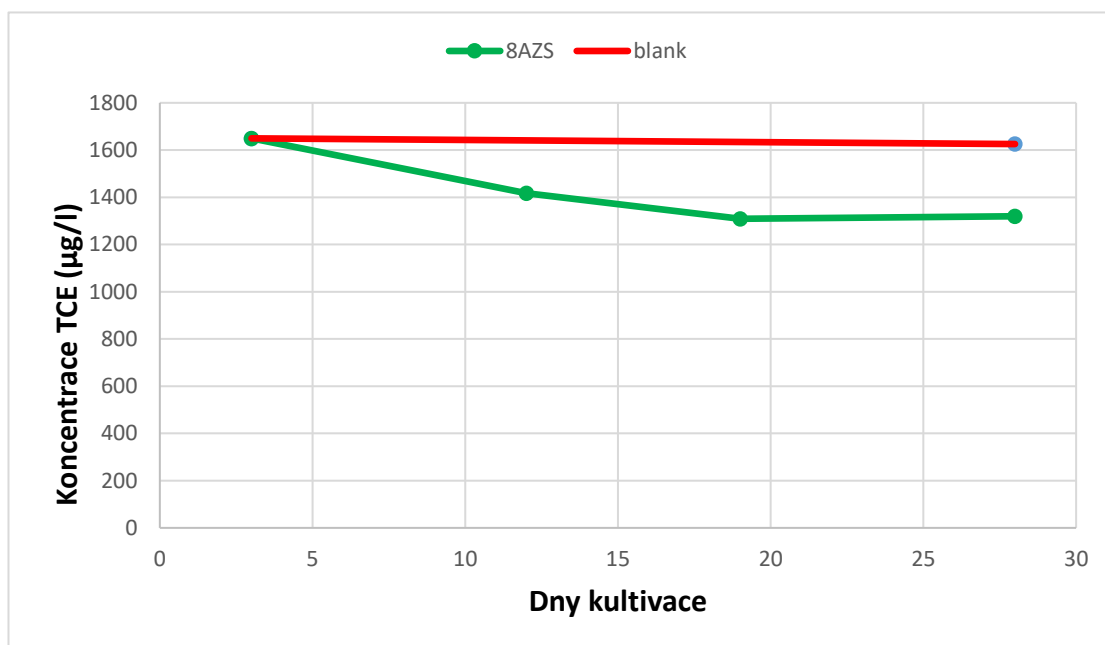
5.2.9 Průběh degradace TCE rostoucími buňkami kultury 8AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl

Jelikož při pokusu degradace TCE bakteriální kulturou 10AZS při snížené teplotě a přítomnosti 4 % NaCl bylo rozloženo pouze 29,6 % TCE, byl proveden totožný pokus degradace TCE za stejných podmínek bakteriální kulturou 8AZS. Byly připraveny vialky s obsahem MM4 s přidavkem vitamínů MEM, koncentrací fenolu 180 mg/l a 4 % NaCl při pH 7,2. Do každé vialky byl přidán zásobní roztok TCE v objemu 30 μ l.

Všechny připravené vialky byly kultivovány při 8 °C po dobu 28 dní. Průběžně byla měřena koncentrace TCE. V tabulce č. 25 jsou uvedeny naměřené koncentrace TCE ve zkušebních i slepých vialkách. Dle naměřených výsledků byla degradace TCE málo úspěšná, po 28 dnech bylo rozloženo pouhých 19,97 % přítomného TCE. Grafické znázornění průběhu degradace je uvedeno na obrázku č. 25.

Tabulka 25 Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 8AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl

Dny kultivace	Bakteriální kultura 5BZS	Plocha peaku	Koncentrace TCE (µg/l)	Průměr koncentrace TCE (µg/l)
3	Blank 1	420 257	1601,7	1649,6
3	Blank 2	433 047	1650,5	
3	Blank 3	445 164	1696,6	
12	Vzorek 1	371 315	1415,2	1417,7
12	Vzorek 2	368 794	1405,6	
12	Vzorek 3	375 841	1432,4	
19	Vzorek 4	333 759	1272,0	1309,0
19	Vzorek 5	348 179	1327,0	
19	Vzorek 6	348 413	1327,9	
28	Blank 4	407 880	1554,5	1625,5
28	Blank 5	440 195	1677,7	
28	Blank 6	431 386	1644,1	
28	Vzorek 7	336 271	1281,6	1320,2
28	Vzorek 8	368 310	1403,7	
28	Vzorek 9	334 597	1275,2	



Obrázek 26 Grafické znázornění průběhu degradace TCE rostoucími buňkami kultury 8AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl

ZÁVĚR

Významným celosvětovým problémem je lokální kontaminace půd a podzemních vod trichlorethylénem (TCE), což je toxická látka neblaze působící na životní prostředí, živočichy i lidské zdraví. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda je kometabolická degradace TCE reálná i při méně příznivých podmínkách, tedy za snížené teploty spolu s nízkým pH nebo s vyšším obsahem solí. V práci byly využity bakteriální kultury pracovně označené 1AZS, 5BZS, 10AZS a 8AZS.

Ověřovací růstové pokusy bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS na fenolu při různých podmínkách prostředí byly úspěšné, ovšem příznivější výsledky vykazovala kultura 5BZS. Úspěšnost degradačních testů TCE při podmínkách pH 7, teplotě 8 °C a 200 mg/l fenolu byly rozdílné. Kultura 1AZS nebyla úspěšná, bylo rozloženo pouze 19,4 % TCE, naopak kultura 5BZS rozložila 100 % přítomného TCE. Naproti tomu, degradace TCE při podmínkách pH 5,2, teplotě 8 °C a koncentraci fenolu 200 mg/l byla neúspěšná pro obě bakteriální kultury, neboť po 30 dnech došlo k rozložení jen velmi malého podílu TCE. Příčinou byl zásadní pokles pH u obou bakteriálních kultur, který byl dán rozkladem jediného substrátu (fenolu), vedoucího k vytvoření podmínek, jež nebyly pro degradaci TCE příznivé. Aby se předešlo snížení pH během růstu buněk na fenolu, byly jednak provedeny degradační testy s klidovými buňkami a také testy degradace TCE s využitím dvou růstových substrátů – fenolu a laktátu sodného. Zatímco testy s klidovými buňkami ukázaly jen nepatrnou míru degradace TCE buňkami kultury 5BZS, pokusy rozkladu TCE při použití fenolu v kombinaci s laktátem přinesly zajímavé výsledky, neboť kultura 5BZS rozložila za 25 dní při pH 5,2, teplotě 8 °C a při vstupní koncentraci 1816,2 µg/l 52,9 % TCE. Pro ověření vlivu teploty byl proveden i pokus při teplotě 23 °C, který se ukázal rovněž úspěšný a bylo při něm rozloženo 62 % TCE. Následně byl proveden také degradační test se sníženou vstupní koncentrací TCE (okolo 1200 µg/l), který byl velmi pozitivní, jelikož bylo rozloženo téměř 90 % TCE. Výsledky testů tedy ukazují, že bakteriální kultura 5BZS je schopna rozkládat TCE i při 8 °C a nižších hodnotách pH, za podmínek použití dvou růstových substrátů – fenolu a laktátu sodného.

Testy degradace TCE pomocí bakteriálních kultur 10AZS a 8AZS, prováděné v prostředí s přítomností 4 % NaCl, nebyly příliš úspěšné. Kultura 10AZS při podmínkách 4 % NaCl, teplotě 8 °C a pH 7,2 rozložila pouze 29,6 % TCE ze vstupní koncentrace 1709,9 µg/l. Degradace TCE kulturou 8AZS při stejných podmínkách byla úspěšná také pouze z necelých 20 %. Pro úspěšnou degradaci TCE za chladu a při zvýšených koncentracích NaCl by tedy

bylo do budoucna vhodné pokusit se najít nové (pravděpodobně gramnegativní) bakteriální kultury rostoucí na fenolu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ATAPATTU, Sanka N. a Azamat TEMERDASHEV. Recent advances in gas chromatography injection port derivatization in analytical method development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2023, 168 [cit. 2024-02-25]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2023.117334

AZIZIAN, Mohammad F., Jonathan D. ISTOK a Lewis SEMPRINI. Evaluation of the in-situ aerobic cometabolism of chlorinated ethenes by toluene-utilizing microorganisms using push-pull tests. *Journal of Contaminant Hydrology* [online]. 2007, 90(1-2), 105-124 [cit. 2023-11-27]. ISSN 01697722. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconhyd.2006.09.015

Bonvallot N, Harrison P, Loh M. Trichloroethylene. In: WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants. Geneva: World Health Organization; 2010. 8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138713/>

COLEMAN, Nicholas V., Timothy E. MATTES, James M. GOSSETT a Jim C. SPAIN. Biodegradation of cis -Dichloroethene as the Sole Carbon Source by a β -Proteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2002, 68(6), 2726-2730 [cit. 2024-01-09]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.6.2726-2730.2002

DOLINOVÁ, Iva, Martina ŠTROJSOVÁ, Miroslav ČERNÍK, Jan NĚMEČEK, Jiřina MACHÁČKOVÁ a Alena ŠEVCŮ. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2017, 24(15), 13262-13283 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-017-8867-y

ECHA, © 2023 c. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. Notified classification and labelling according to CLP criteria. [Echa.europa.eu](https://echa.europa.eu/cs/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/124309) [online]. [cit. 2023-12-09]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/124309>

FRIIS, Anne K., Axel C. HEIMANN, Rasmus JAKOBSEN, Hans-Jørgen ALBRECHTSEN, Evan COX a Poul L. BJERG. Temperature dependence of anaerobic TCE-dechlorination in a highly enriched Dehalococcoides-containing culture. *Water Research* [online]. 2007, 41(2), 355-364 [cit. 2024-01-08]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2006.09.026

GAZA, Sarah, Kathrin R. SCHMIDT, Pascal WEIGOLD, Michael HEIDINGER a Andreas TIEHM. Aerobic metabolic trichloroethene biodegradation under field-relevant conditions. *Water Research* [online]. 2019, 151, 343-348 [cit. 2023-11-27]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2018.12.022

CHAUHAN, Mansi, Ayushi KIMOTHI, Avinash SHARMA a Anita PANDEY. Cold adapted *Pseudomonas*: ecology to biotechnology. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2023, 2023-7-17, 14 [cit. 2023-12-09]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2023.1218708

CHHEDA, Dhawal a George A. SORIAL. Evaluation of co-metabolic removal of trichloroethylene in a biotrickling filter under acidic conditions. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2017, 57, 54-61 [cit. 2024-01-05]. ISSN 10010742. Dostupné z: doi:10.1016/j.jes.2016.12.008

IRZ, 2023. INTEGROVANÝ REGISTR ZNEČIŠŤOVÁNÍ. Ministerstvo životního prostředí České republiky. irz.cz [online]. [ivanova

cit. 2023-10-09]. Dostupné z: https://www.irz.cz/sites/default/files/latky/Trichlorethylen_Karta_latky_11012019.pdf

IRZ, 2023. INTEGROVANÝ REGISTR ZNEČIŠŤOVÁNÍ. Ministerstvo životního prostředí České republiky. irz.cz [online]. [cit. 2023-10-09]. Dostupné z: <https://www.irz.cz/sites/irz.env.cz/files/repository/latky/trichlorethylen.pdf>

IVANOVA, Anastasiya A., Svetlana A. MULLAEVA, Olesya I. SAZONOVA, Kirill V. PETRIKOV a Anna A. VETROVA. Current research on simultaneous oxidation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by bacteria of genus *Pseudomonas*. *Folia Microbiologica* [online]. 2022, 67(4), 591-604 [cit. 2023-12-09]. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-022-00966-5

KORSHUNOVA, T. Yu., M. D. BAKAEVA, E. V. KUZINA, G. F. RAFIKOVA, S. P. CHETVERIKOV, D. V. CHETVERIKOVA a O. N. LOGINOV. Role of Bacteria of the Genus *Pseudomonas* in the Sustainable Development of Agricultural Systems and Environmental Protection (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2021, 57(3), 281-296 [cit. 2023-12-10]. ISSN 0003-6838. Dostupné z: doi:10.1134/S000368382103008X

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

LEE, Chi-Yuan a Wen-Der LIU. The effect of salinity conditions on kinetics of trichloroethylene biodegradation by toluene-oxidizing cultures. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2006, 137(1), 541-549 [cit. 2024-01-08]. ISSN 03043894. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jhazmat.2006.02.031](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.02.031)

LEE, Chi-Yuan, Yu-Chia CHAN a Chin-Lung LIN. The effect of salinity on trichloroethylene co-metabolism by mixed cultures enriched on phenol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2005, 21(3), 359-365 [cit. 2024-01-08]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: [doi:10.1007/s11274-004-2611-8](https://doi.org/10.1007/s11274-004-2611-8)

LIANG, Youxiang a Huimin YU. Genetic toolkits for engineering *Rhodococcus* species with versatile applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2021, 49 [cit. 2023-12-09]. ISSN 07349750. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107748](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107748)

Literák, J., Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <<http://www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf>>

MA, Jinglin, Yan ZHUANG, Yonggang WANG, Ning ZHU, Ting WANG, Hongbin XIAO a Jixiang CHEN. Update on new trend and progress of the mechanism of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by *Rhodococcus*, based on the new understanding of relevant theories: a review. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2023, 30(41), 93345-93362 [cit. 2023-12-09]. ISSN 1614-7499. Dostupné z: [doi:10.1007/s11356-023-28894-y](https://doi.org/10.1007/s11356-023-28894-y)

MATTES, Timothy E., Anne K. ALEXANDER a Nicholas V. COLEMAN. Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2010, 2010-07-01, 34(4), 445-475 [cit. 2023-09-29]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00210.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00210.x)

MEDIĆ, Ana B. a Ivanka M. KARADŽIĆ. *Pseudomonas* in environmental bioremediation of hydrocarbons and phenolic compounds- key catabolic degradation enzymes and new analytical platforms for comprehensive investigation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2022, 38(10) [cit. 2023-12-09]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: [doi:10.1007/s11274-022-03349-7](https://doi.org/10.1007/s11274-022-03349-7)

NZILA, Alexis. Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environmental Pollution* [online]. 2013, 178, 474-482 [cit. 2023-11-09]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2013.03.042)

PAROUŠKOVÁ, Klára. Degradace trichloroethenu gramnegativními bakteriemi při nízké teplotě. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2023, 63 s. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí.

PÁTEK, Miroslav, Michal GRULICH a Jan NEŠVERA. Stress response in *Rhodococcus* strains. *Biotechnology Advances* [online]. 2021, 53 [cit. 2023-12-09]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107698

RŮŽIČKA, Jan. Biodegradace trichlorethylenu imobilizovanými bakteriálními kulturami. Brno: Masarykova universita v Brně, 2004

REHM, H.-J. a G. REED, ed. *Biotechnology* [online]. Wiley, 2000 [cit. 2023-12-09]. ISBN 9783527283231. Dostupné z: doi:10.1002/9783527620951

SAEKI, Satoshi, Satoshi MUKAI, Kazuhiro IWASAKI a Osami YAGI. Production of Trichloroacetic Acid, Trichloroethanol and Dichloroacetic Acid from Trichloroethylene Degradation by *Methylocystis* sp. Strain M. *Biocatalysis and Biotransformation* [online]. 2009, 2009-07-11, 17(5), 347-357 [cit. 2024-01-09]. ISSN 1024-2422. Dostupné z: doi:10.3109/10242429909015235

SANOW, Stefan, Weiqi KUANG, Gabriel SCHAAF, Pitter HUESGEN, Ulrich SCHURR, Ute ROESSNER, Michelle WATT a Borjana ARSOVA. Molecular Mechanisms of *Pseudomonas* -Assisted Plant Nitrogen Uptake: Opportunities for Modern Agriculture. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* [online]. 2023, 36(9), 536-548 [cit. 2023-12-10]. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI-10-22-0223-CR

SHAO, Yiru, Paul B. HATZINGER, Sheryl H. STREGER, Rachael T. REZES a Kung-Hui CHU. Evaluation of methanotrophic bacterial communities capable of biodegrading trichloroethene (TCE) in acidic aquifers. *Biodegradation* [online]. 2019, 30(2-3), 173-190 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0923-9820. Dostupné z: doi:10.1007/s10532-019-09875-w

SCHMIDT, Kathrin R., Tobias AUGENSTEIN, Michael HEIDINGER, Siegmund ERTL a Andreas TIEHM. Aerobic biodegradation of cis-1,2-dichloroethene as sole carbon source: Stable carbon isotope fractionation and growth characteristics. *Chemosphere* [online].

2010, 78(5), 527-532 [cit. 2024-01-09]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.033

SUTTINUN, Oramas, Ekawan LUEPROMCHAI a Rudolf MÜLLER. Cometabolism of trichloroethylene: concepts, limitations and available strategies for sustained biodegradation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* [online]. 2013, 12(1), 99-114 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1569-1705. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-012-9291-x

Ševčík, J., G., K., Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <http://www.natur.cuni.cz/~sevcik/plyn_chrom.pdf>

ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.

TIEHM, Andreas a Kathrin R SCHMIDT. Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes—aspects of field application. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2011, 22(3), 415-421 [cit. 2023-12-09]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2011.02.003

WOJTOWICZ, Petr, *Optimalizace teplotně programovatelného nástřiku velkého objemu vzorku v plynové chromatografii metodou plánovaného experimentu*, Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 71 s. Dostupné také z: <http://theses.cz/id/rayk07/517568> Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.

WU, Zhineng, Quanli MAN, Hanyu NIU, et al. Recent advances and trends of trichloroethylene biodegradation: A critical review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2022, 2022-12-22, 13 [cit. 2023-10-05]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.1053169

YANG, Cai-En, Chih-Yun WU, Yu-Cheng LIU, Ethan I. LAN a Shen-Long TSAI. Cometabolic degradation of toluene and TCE contaminated wastewater in a bench-scale sequencing batch reactor inoculated with immobilized *Pseudomonas putida* F1. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. 2019, 104, 168-176 [cit. 2023-12-10]. ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2019.09.003

ZALESÁK, Michal, Jan RUZICKA, Robert VÍCHA a Marie DVORACKOVÁ, 2017. Cometabolic degradation of dichloroethenes by *Comamonas testosteroni* RF2. *Chemosphere*. 186, 919-927. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.07.156

ZALESÁK, Michal, Jan RUZICKA, Robert VÍCHA a Marie DVORACKOVÁ, 2021. Examining aerobic degradation of chloroethenes mixture in consortium composed of *Comamonas testosteroni* RF2 and *Mycobacterium aurum* L1. *Chemosphere*. 269. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128770

ZHANG, Ying, Miao HU, Pengfei LI, Xin WANG a Qingjuan MENG. Analysis of trichloroethylene removal and bacterial community function based on pH-adjusted in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, 99(21), 9289-9297 [cit. 2024-01-09]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6800-1

ŽIHLOVÁ, Monika. Biodegradace organických polutantů. Brno. MASARYKOVA UNIVERZITA, 2013, 51 s. Dostupné také z: https://is.muni.cz/th/wqrj1/Biodegradace_organickyh_polutantu_Zihlova.pdf. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

cDCE - cis-1,2-dichlorethylen

DCE - Dichlorethylen

ECD – Detektor elektronového záchyty

FID – Plamenový ionizační detektor

GC – Plynová chromatografie

LaNa – Laktát sodný

MMO - Methanmonooxygenáza

MEM – Komerční název vitamínů

MM – Minerální médium

MM1 – Minerální médium o pH 7,2

MM6 – Minerální médium o pH 6

MM4 – Minerální médium s 4 % NaCl

MMK – Minerální médium kyselé o pH 5,2

MPA – Masopeptonový agar

OD – Optická hustota

TCE – Trichlorethylén

TYA – Tryptone yeast extract agar

PCE - Perchlorethylén

pMMO - partikulární (nerozpustná) forma methanmonooxygenázy

sMMO – solubilní forma methanmonooxygenázy

tDCE - trans-1,2-dichlorethylen

VC – Vinylchlorid

VOC – Těkavé organické látky

ŽP – Životní prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Strukturní vzorec Trichlorethylénu (Bonvallot a kol., 2010).....	14
Obrázek 2	Anaerobní redukce a aerobní oxidace chlorovaných ethylenů (Tiehm a kol., 2011)	23
Obrázek 3	Příklad kometabolické degradace TCE s toluenem jako růstovým substrátem (Rehm a kol., 2000)	25
Obrázek 4	Příklad degradace TCE bakteriemi <i>Ralstonia</i> sp. KN2-10A (upraveno dle Ishida a Nakamura, 2000).....	27
Obrázek 5	Kalibrační křivka TCE (FID)	43
Obrázek 6	Růst kultury 1AZS na fenolu při pH 7 a 5 a teplotách 23 °C a 8 °C.....	52
Obrázek 7	Růst kultury 5BZS na fenolu při pH 7 a 5 a teplotách 23 °C a 8 °C.....	53
Obrázek 8	Růst bakteriálních kultur na fenolu při pH 7 a teplotách 23 °C a 8 °C	54
Obrázek 9	Růst bakteriálních kultur na fenolu při pH 5 a teplotách 23 °C a 8 °C	54
Obrázek 10	Grafické znázornění density buněk kultury 1AZS při různých koncentracích fenolu	56
Obrázek 11	Grafické znázornění density buněk kultury 5BZS při různých koncentracích fenolu	57
Obrázek 12	Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - blank, 29 dní kultivace	61
Obrázek 13	Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 5BZS, 29 dní kultivace	61
Obrázek 14	Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 1AZS, 30 dní kultivace	62
Obrázek 15	Grafické znázornění průběhu degradace TCE nerostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C a pH 5,3	64
Obrázek 16	Grafické znázornění průběhu degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C, sníženém obsahu fenolu a s přidavkem laktátu	67
Obrázek 17	Grafické znázornění průběhu degradace TCE kultury 5BZS při teplotě 23 °C, pH 5,2 a sníženém obsahu fenolu, s přidavkem laktátu.....	68
Obrázek 18	Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 5BZS, 3 dny kultivace při 23 °C	69
Obrázek 19	Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 5BZS, 32 dní kultivace při 23 °C	69
Obrázek 20	Grafické znázornění průběhu degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C, pH 5,2, s přidavkem laktátu, 90 mg/l fenolu a snížené koncentraci vstupního TCE.....	72
Obrázek 21	Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - blank, snížená vstupní koncentrace TCE.....	72
Obrázek 22	Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 5BZS, kultivace 32 dní při snížené vstupní koncentraci TCE	73
Obrázek 23	Grafické znázornění průběhu degradace TCE rostoucími buňkami kultury 10AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl.....	75
Obrázek 24	Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE – blank, MM4, 19 dní.....	75

Obrázek 25 Chromatogram ze stanovení koncentrace TCE - 10AZS, MM4, 19 dní.....	76
Obrázek 26 Grafické znázornění průběhu degradace TCE rostoucími buňkami kultury 8AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl	77

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Klasifikace nebezpečných vlastností (ECHA, 2023).....	18
Tabulka 2 Bakterie schopné degradace TCE (Suttin a kol., 2013).....	31
Tabulka 3 Bakterie schopné kometabolické degradace TCE (Dolinová a kol., 2017).....	31
Tabulka 4 Naměřené hodnoty kalibrace	43
Tabulka 5 Dávkování zásobního roztoku fenolu a výsledné koncentrace fenolu.....	44
Tabulka 6 Dávkování jednotlivých komponent.....	46
Tabulka 7 Dávkování jednotlivých komponent.....	46
Tabulka 8 Výsledky růstu kultury 1AZS na fenolu při teplotách 23 a 8 °C a pH 7 a 5	51
Tabulka 9 Výsledky růstu kultury 5BZS na fenolu při teplotách 23 a 8 °C a pH 7 a 5.....	53
Tabulka 10 Densita buněk 1AZS při různých koncentracích fenolu při 8 °C	55
Tabulka 11 Densita buněk 5BZS při různých koncentracích fenolu při 8 °C	57
Tabulka 12 Degradace TCE kulturou 1AZS při pH 7,2 a teplotě 8 °C	58
Tabulka 13 Degradace TCE kulturou 5BZS při pH 7,2 a teplotě 8 °C.....	58
Tabulka 14 Degradace TCE kulturou 1AZS při teplotě 8 °C a pH 5,3	59
Tabulka 15 Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C a pH 5,3.....	60
Tabulka 16 Hodnoty pH bakteriálních kultur 1AZS a 5BZS po růstu na fenolu a po nepatrné degradaci TCE, při teplotě 8 °C a počátečním pH 5,3.....	60
Tabulka 17 Degradace TCE nerostoucími buňkami kultury 5BZS při teplotě 8 °C a pH 5,3	63
Tabulka 18 Vstupní koncentrace fenolu, laktátu a hodnoty pH po inkubaci.....	65
Tabulka 19 Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C a pH 5,2, snížené koncentraci fenolu a s přidavkem laktátu	66
Tabulka 20 Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 23 °C a pH 5,2, snížené koncentraci fenolu a s přidavkem laktátu	68
Tabulka 21 Změny pH během růstu kultury 5BZS při degradaci TCE při 23 °C a pH 5,2 s přidavkem laktátu a snížené koncentraci fenolu	70
Tabulka 22 Degradace TCE kulturou 5BZS při teplotě 8 °C, pH 5,2, s přidavkem laktátu, 90 mg/l fenolu a snížené koncentraci vstupního TCE	71
Tabulka 23 Změny pH při degradaci TCE kulturou 5BZS při 8 °C a pH 5,2 s přidavkem laktátu, 90 mg/l fenolu a snížené koncentraci vstupního TCE	73
Tabulka 24 Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 10AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl	74
Tabulka 25 Degradace TCE rostoucími buňkami kultury 8AZS při teplotě 8 °C, 180 mg/l fenolu, pH 7,2 a přítomnosti 4 % NaCl	77

SEZNAM PŘÍLOH