

Kometabolická degradace dichloroethylenů bakterií *Comamonas testosteroni* RF2

Bc. Michal Zálešák

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michal ZÁLEŠÁK**
Osobní číslo: **T11558**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Kometabolická degradace dichloroethylenů bakterií
Comamonas testosteroni RF2**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na schopnost bakterií kometabolicky rozkládat jednotlivé dichloroethyleny. Dle možností se zvláště zaměřte na schopnosti rodu *Comamonas*.
2. Provedte sérii experimentů kometabolické degradace dichloroethylenů bakteriální kulturou *Comamonas testosteroni* RF2.
3. Dle možností ověřte míru přežívání buněk uvedené kultury během degradace.
4. Výsledky přehledně zpracujte požadovanou formou a diplomovou práci odevzdejte v písemné i elektronické podobě v předepsaném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Odborné práce získané z vědeckých databází, především z Web of Science, SCOPUS, ScienceFinder, Medline a dalších, dle aktuálních potřeb.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: ZAĽEŠÁK MICHAL.....

Obor: IOŽP.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 4.5.2014


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce je seznámit čtenáře s problematikou kometabolické degradace dichlorethylenů. Teoretická část práce uvádí látky spadající do kategorie chlorovaných ethylenů a popisuje jejich fyzikálně chemické vlastnosti. Dále objasňuje příčiny znečištění životního prostředí těmito látkami a jejich transport v něm. Poskytuje čtenáři poznatky o schopnostech různých bakterií kometabolicky rozkládat jednotlivé dichlorethyleny. Součástí práce byla série pokusů na kometabolickou degradaci dichlorethylenů bakterií *Comamonas testosteroni* RF2 a byla zkoumána míra přežívání buněk této bakterie po proběhlé kometabolické degradaci dichlorethylenů. Rovněž byly provedeny kontroly degradací dichlorethylenů bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy (oxigenas). Bylo zjištěno, že bakterie RF2 je schopna s různou mírou úspěšnosti kometabolicky odstranit jednotlivé izomery dichlorethylenů. Určité množství cis-1,2-dichlorethylenů může být touto bakterií odstraněno i bez účasti fenol oxygenasy.

Klíčová slova: kometabolická degradace, *Comamonas testosteroni* RF2, chlorované ethyleny, dichlorethyleny, cis-1,2-dichlorethylen, fenol oxygenasa

ABSTRACT

The aim of this master thesis is to familiarize readers with the issue regarding to cometabolic degradation of dichloroethenes. It introduces the substances which are ranked into the group of chlorinated ethenes and describes their physicochemical properties. An essay which clarifies the causes of the environmental pollution caused by chlorinated ethenes and their transport in the environment follows. This thesis also provides variety of information about different bacteria and its ability to cometabolically break down various isomers of dichloroethenes. A series of experiments were conducted in the experimental part of this thesis. These experiments were consisted from cometabolic degradation of dichloroethenes in bacteria *Comamonas testosteroni* strain RF2 and potential toxic effect of dichloroethenes on the bacteria cells was examined after cometabolic degradation was performed. The control assays for dichloroethenes degradation in bacteria RF2 were performed in absence of phenol oxygenase. It has been found that bacteria strain RF2 is able to cometabolically break down various isomers of dichloroethenes with different level of achievement. Among others, it has been proved that bacteria RF2 is able to remove certain amount of cis-1,2-dichloroethene in absence of phenol oxygenase.

Keywords: cometabolic degradation, *Comamonas testosteroni* RF2, chlorinated ethenes, dichloroethenes, cis-1,2-dichloroethene, phenol oxygenase

Mile rád bych zde poděkoval vedoucímu mé diplomové práce panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho ochotu, odbornou pomoc, plno užitečných rad a připomínek a v neposlední řadě za čas, který do mé práce vložil. Dále bych rád poděkoval paní Ing. Marii Dvořáčkové, Ph.D. za její pomoc a cenné rady související s ovládním plynového chromatografu a s vyhodnocováním výsledků naměřených na tomto přístroji. Rovněž bych rád poděkoval panu Ing. Josefu Houserovi, Ph.D. za jeho čas a pomoc při stanovení anorganických chloridů a všem paním laborantkám z ÚIOŽP za jejich ochotu a čas, zvláště pak paní Lence Machálkové.

„Nakonec si uchráníme jen to, co milujeme. Milujeme jen to, čemu jsme schopni porozumět. Porozumět dokážeme jen tomu, čemu jsme naučeni.“

Baba Dioum

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CHLOROVANÉ ETHYLENY	13
1.1 FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI CHLOROVANÝCH ETHYLENŮ	13
1.2 PERCHLORETHYLEN (PCE)	14
1.3 TRICHLORETHYLEN (TCE).....	15
1.4 1,2-DICHLORETHYLENY.....	15
1.5 1,1-DICHLORETHYLEN (1,1DCE)	16
1.6 VINYLCHLORID (VC)	17
2 BIODEGRADACE CHLOROVANÝCH ETHYLENŮ	18
2.1 ANAEROBNÍ REDUKTIVNÍ DECHLORACE	19
2.2 AEROBNÍ KOMETABOLICKÁ DEGRADACE	20
2.3 AEROBNÍ METABOLICKÁ DEGRADACE	22
3 SCHOPNOST BAKTERIÍ KOMETABOLICKY ROZKLÁDAT JEDNOTLIVÉ DICHLORETHYLENY	23
3.1 AEROBNÍ KOMETABOLICKÝ ROZKLAD CDCE A TDCE POMOCÍ BAKTERIÁLNÍHO KONSORCIA Z KONTAMINOVANÝCH LOKALIT V AFRICE	23
3.1.1 Příprava pokusů.....	23
3.1.2 Způsob vyhodnocení pokusů a jejich výsledky	24
3.2 KOMETABOLICKÁ DEGRADACE CHLOROVANÝCH ALKENŮ BAKTERIÍ <i>XANTOBACTER</i> SP. PY2	25
3.2.1 Růst a příprava buněk.....	26
3.2.2 Analytické postupy.....	26
3.2.3 Degradace chlorovaných uhlovodíků.....	26
3.3 ETHEN JAKO PRIMÁRNÍ SUBSTRÁT PRO KOOXIDACI VINYLCHLORIDU A CIS-1,2-DICHLORETHYLENU.....	28
3.3.1 Izolace směsné bakteriální kultury K20	29
3.3.2 Experimentální pokusy.....	29
Kometabolická degradace 1,2-cis-dichlorethylenu.....	29
Kometabolická degradace vinylchloridu	30
Inhibice oxidace 1,2-cis-dichlorethylenu v prostředí perchlorethylenu a trichlorethylenu	31
Vliv cis-1,2-dichlorethylenu na aktivitu a životaschopnost směsné bakteriální suspenze K20	32
3.4 DEGRADACE 1,1-DICHLORETHYLENU BAKTERIÍ <i>ALCALIGENES</i> SP. IZOLOVANOU Z AKTIVOVANÉHO KALU	33
3.4.1 Aklimatizace kalu.....	33
3.4.2 Izolace a identifikace bakterie <i>Alcaligenes</i> sp.....	33
3.4.3 Degradace 1,1-dichlorethylenu (dávková studie).....	34
3.5 KOMETABOLICKÁ DEGRADACE CIS-1,2-DICHLORETHYLENU BAKTERIEMI VYUŽÍVAJÍCÍ VINYLCHLORID JAKO PRIMÁRNÍ SUBSTRÁT	34
3.5.1 Aerobní metabolismus vinylchloridu bakterií <i>Mycobacterium aurum</i> L1	35

Isolace bakteriálního kmene degradující vinylchlorid	35
3.5.2 Kometabolická degradace cis-1,2-dichlorethylenu bakteriálními kulturami vyrostlými na vinylchloridu.....	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
4 MATERIÁLY A METODY MĚŘENÍ.....	41
4.1 MATERIÁLY	41
4.1.1 Chemikálie pro přípravu standardních roztoků jednotlivých dichlorethylenů.....	41
4.1.2 Chemikálie pro přípravu minerálních médií (MM)	41
4.1.3 Pro přípravu živných půd, degradačních pokusů, pokusů na přežívání buněk, a stanovení chloridů.....	41
4.1.4 Bakteriální kultury	42
4.2 METODY MĚŘENÍ.....	42
4.2.1 Metodika měření na plynovém chromatografu HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II s koncentrátorem TECKMAR LSC 2000	42
4.2.2 Příprava standardních roztoků dichlorethylenů a směšného vzorku s trichlorethylenem	43
4.2.3 Zhotovení kalibračních křivek	44
4.2.4 Sterilizace pokusných vialek a uzávěrů s plynotěsnými septy.....	44
4.2.5 Kometabolická degradace dichlorethylenů, směšného vzorku s trichlorethylenem a kontrola degradací těchto látek bez účasti fenoloxigenasy.....	44
4.2.6 Ověření míry přežívání buněk.....	45
4.2.7 Stanovení produkce chloridů.....	46
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	47
5.1 VYJADŘOVÁNÍ KONCENTRACÍ DICHLORETHYLENŮ A TRICHLORETHYLENU	47
5.2 EXPERIMENTÁLNÍ POKUSY S CIS-1,2-DICHLORETHYLENEM.....	47
5.3 EXPERIMENTÁLNÍ POKUSY S TRANS-1,2-DICHLORETHYLENEM	57
5.4 EXPERIMENTÁLNÍ POKUSY S 1,1-DICHLORETHYLENEM.....	62
5.5 EXPERIMENTÁLNÍ POKUSY SE SMĚŠNÝM STANDARDEM.....	69
ZÁVĚR	74
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	76
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	82
SEZNAM OBRÁZKŮ	83
SEZNAM TABULEK.....	84

ÚVOD

Zdrojem znečištění životního prostředí dichlorethyleny je časté používání široké škály rozpouštědel, odmašťovadel a prostředků pro čištění, jejichž složení je bohaté na výše chlorované uhlovodíky. Nejčastějšími škodlivými látkami obsaženými v takových komerčních prostředcích jsou tetrachlorethylen (perchlorethylen, PCE) a trichlorethylen (TCE).

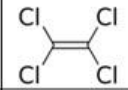

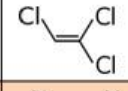

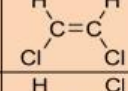

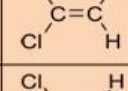

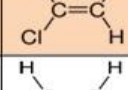

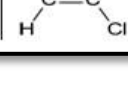

Perchlorethylen a trichlorethylen jsou látky karcinogenní a vysoce toxické. Zároveň to jsou látky, které v podzemních vodách podléhají velmi pozvolnému anaerobnímu rozkladu v průběhu tzv. přírodní atenuace. Jde o proces reduktivní dehalogenace či dechlorace, při kterém dochází k redukci atomů chlóru a vzniku níže chlorovaných uhlovodíků. Následná akumulace vzniklých dichlorethylenů, zejména pak cis-1,2-dichlorethylenů (cDCE), způsobuje, že se z těchto látek stávají významné environmentální kontaminanty.

Biodegradace dichlorethylenů je často limitujícím faktorem pro řízené využití reduktivní dechlorace jako jediného přístupu pro sanace kontaminovaných lokalit. Proto pochopení faktorů, které ovlivňují transformaci dichlorethylenů, je rozhodující pro stanovení technických postupů v jejich odstraňování. Jednou z možných variant jejich odstranění z životního prostředí může být využití kometabolické degradace. A právě kometabolická degradace dichlorethylenů bakterií *Comamonas testosteroni* RF2 je stěžejní částí této diplomové práce. V práci jsou zkoumány degradační vlastnosti zmíněné bakterie s využitím fenolu jako primárního substrátu, pro navození tvorby bakteriálních katabolických enzymů, potřebných pro zahájení degradačních procesů. Již dříve bylo prokázáno, že bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 má schopnost kometabolicky degradovat trichlorethylen. Bakterie schopná rozkládat trichlorethylen i jeho degradační produkty by mohla být využita jako levný prostředek pro sanace znečištěných lokalit. Práce si rovněž klade za cíl poskytnout čtenáři ucelený přehled o problematice chlorovaných ethylenů a biodegradačních metodách pro jejich odstranění a poskytuje přehled o schopnostech různých bakterií kometabolicky rozkládat jednotlivé dichlorethyleny.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHLOROVANÉ ETHYLENY

Do skupiny chlorovaných ethylenů se řadí tetrachlorethylen (perchlorethylen, PCE), trichlorethylen (TCE), cis-1,2-dichlorethylen (cDCE), trans-1,2-dichlorethylen (tDCE), 1,1-dichlorethylen (1,1DCE) a vinylchlorid (VC). Jedná se o synteticky vyráběné průmyslové látky, které jsou velmi častou příčinou znečištění podzemních vod [1,2]. Jejich přítomnost je důsledkem aplikací TCE a PCE v různých oblastech průmyslu.

Perchloethylen	PCE		
Trichlorethylen	TCE		
Cis-1,2-dichlorethylen	cDCE		
Trans-1,2-dichlorethylen	tDCE		
1,1-dichlorethylen	1,1DCE		
Vinylchlorid	VC		

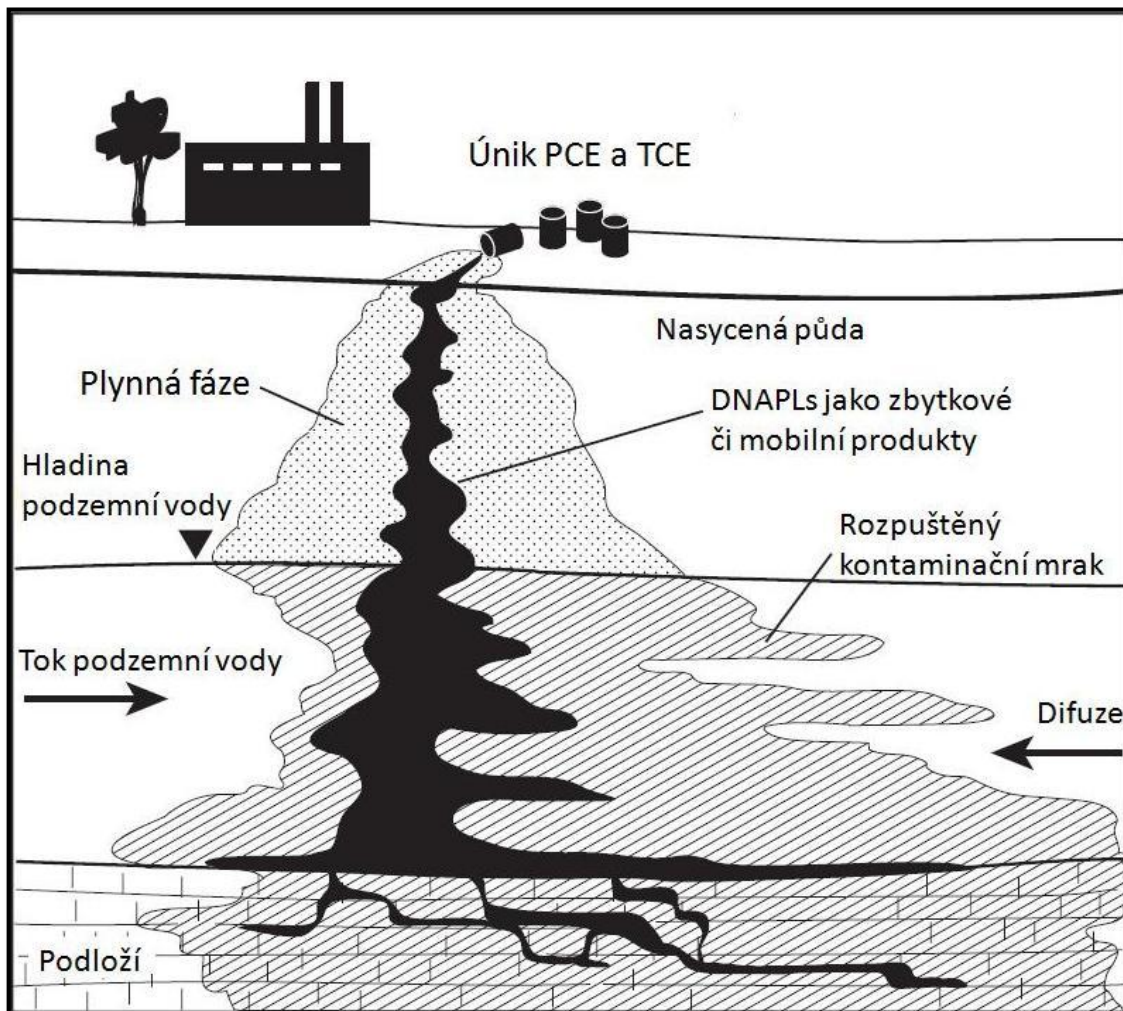
Obr. 1. Seznam chlorovaných ethylenů

1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti chlorovaných ethylenů

Chlorované ethyleny jsou chlorované alifatické organické uhlovodíky syntetického původu, které se skládají ze dvou atomů uhlíku, navzájem spojenými dvojnou vazbou, a s různým počtem substituovaných atomů chlóru. Počet substituovaných atomů chlóru přímo ovlivňuje jejich fyzikální a chemické vlastnosti. S rostoucím počtem atomů chlóru se zvyšuje molekulová hmotnost a hustota, zatímco tlak par a rozpustnost ve vodě se snižuje. Některé z nich jsou prokázanými karcinogeny a svojí chemickou povahou se řadí mezi látky xenobiotické, tedy látky v přírodě cizorodé, byť v nepatrných koncentracích jsou i přirozenými procesy vytvářeny [3]. Mezi nežádoucí vlastnosti těchto látek patří vysoká toxicita, rezistentnost a schopnost akumulace v živých i neživých složkách životního prostředí včetně člověka [1].

Chlorované ethyleny patří do skupiny DNAPL'S (Dense Non-Aqueous Phase Liquids), což jsou kapalně látky o vyšší hustotě než voda. Jsou tedy těžší a hromadí se na nepropust-

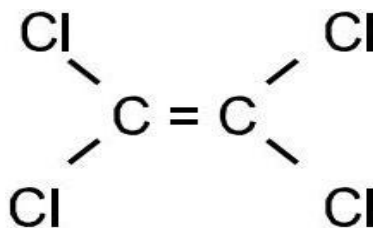
ném podloží. Difuzí se mohou šířit i proti směru toku podzemní vody [1]. Na Obr. 2. Transport DNAPL v podzemí je znázorněn jejich únik během průmyslové činnosti a následný transport v životním prostředí.



Obr. 2. Transport DNAPL v podzemí [4]

1.2 Perchlorethylen (PCE)

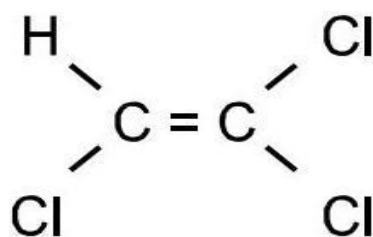
Perchlorethylen (chemický název 1,1,2,2-tetrachlorethylen) je bezbarvá kapalina, téměř nerozpustná ve vodě a nehořlavá [5]. Z celé řady chlorovaných ethylenů je PCE se svými čtyřmi substituovanými atomy chlóru nejvýše chlorovaným zástupcem. Spolu s trichlorethylenem je používán jako rozpouštědlo v chemických čistírnách a ve strojnictví. Slouží také jako základ pro výrobu fluorovodíku [5]. Je klasifikován jako zdraví škodlivý pro člověka a nebezpečný pro životní prostředí. Jedná se o podezřelý karcinogen řadící se do kategorie 2A (pravděpodobný lidský karcinogen), je toxický pro vodní organismy a může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí [5,6].



Obr. 3. Strukturní vzorec PCE

1.3 Trichlorethylen (TCE)

Trichlorethylen (chemický název 1,1,2-trichlorethylen) je bezbarvá viskóznější kapalina, lehce sladkého zápachu a sladké pálivé chuti. Je málo rozpustný ve vodě, vysoce těkavý a jen slabě hořlavý [7]. Ve světovém měřítku se využívá více než 50 let, zejména jako rozpouštědlo v chemických čistírnách a ve strojnictví, dále jako prostředek pro odstraňování barev, lepidel a skvrn. Je zdraví nebezpečný pro člověka, podezřelý z karcinogenity (kategorie 2A) a nebezpečný pro životní prostředí [7,8].



Obr. 4. Strukturní vzorec TCE

1.4 1,2-dichlorethyleny

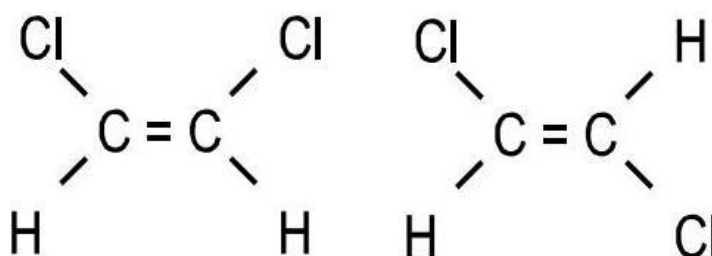
1,2-dichlorethyleny jsou vysoce hořlavé, bezbarvé kapaliny charakteristického ostrého zápachu již při jejich velmi nízkých koncentracích ve vzduchu. Vyskytují se ve dvou odlišných izomerních formách. Jedná se o cis-1,2-dichlorethylen (cDCE) a trans-1,2-dichlorethylen (tDCE). Převážně se vyskytují v jejich relativně čistých formách, tvořených z velké části pouze molekulami cDCE nebo tDCE, ale někdy mohou tvořit mix obou těchto forem. Historicky byly používány jako rozpouštědla pro vosky, pryskyřice a celulosu, při extrakci kaučuku a jako nemrznoucí kapaliny v chladicích zařízeních [9,10].

Do životního prostředí se dostávají díky průmyslovým aktivitám. Zejména pak prostřednictvím náhodných úniků z chemických závodů, které je přímo vyrábí nebo používají pro výrobu jiných látek. Dalšími zdroji znečištění jsou skládky nebezpečných odpadů obsahující chlorované uhlovodíky, spalování látek obsahující vinylchlorid a biodegradační proce-

sy, při kterých vznikají jako dceřiné produkty z původního PCE a TCE. Jejich přítomnost byla doložena v ovzduší, půdě a vodě [9]. Po úniku 1,2-dichlorethylenů do životního prostředí dochází k jejich rychlému vypařování. Zejména při uvolnění do vlhké půdy, jezer, řek a dalších vodních ploch se jejich většina vypaří do vzduchu. Při uvolnění pod povrchem půdy (k čemuž může dojít například při skládkování nebezpečných odpadů) jsou rozpouštěny ve vodě, vsakovány hlouběji do půdy a v konečném důsledku dochází ke kontaminaci podzemních vod [9].

Lidé mohou být vystaveni nežádoucímu kontaktu s těmito látkami několika různými způsoby. Vdechováním kontaminovaného vzduchu, pitím kontaminované vody, přímým kontaktem s pokožkou a stravou. K expozici může rovněž dojít při používání pitné vody z kohoutku, která byla kontaminována těmito látkami (při vaření, koupání a umývání nádobí) [9].

Vdechování vyšších koncentrací 1,2-dichlorethylenů může způsobit nevolnost, ospalost a únavu. Jednorázové vdechnutí velmi vysoké koncentrace par 1,2-dichlorethylenů může být pro člověka smrtelné (přené koncentrace nejsou specifikovány) [9].



Obr. 5. Strukturní vzorce cDCE a tDCE

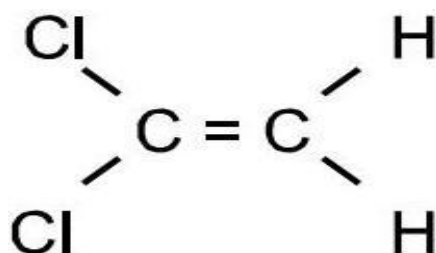
1.5 1,1-dichlorethylen (1,1DCE)

1,1-dichlorethylen je bezbarvá kapalina s jemně nasládlým zápachem připomínající chloroform [11,12]. Je prakticky nerozpustný ve vodě, rozpustný v acetonu, ethanolu a mnohých organických rozpouštědlech. Je používán pro výrobu určitých druhů plastů, používaných v potravinářském průmyslu na obalové materiály, pro výrobu retardérů hoření, při nátěrech ocelových trubek a pro výrobu lepidel [12].

1,1DCE vstupuje do životního prostředí díky únikům při jeho výrobě a používání. Dále jako biodegradační produkt polymerního polyvinyliden chloridu a rovněž jako produkt biotických a abiotických degradací 1,1,1-trichlorethanu, PCE, TCE a 1,1-dichlorethanu [11]. Velmi rychle se vypařuje z vod a půd do vzduchu. Ve vodním prostředí je perzistent-

ní a v půdě dochází k jeho pozvolné degradaci na méně škodlivé produkty [12]. K expozici 1,1DCE může docházet v případě zaměstnanců průmyslových podniků, které tuto látku vyrábí nebo používají pro jiné účely. V blízkosti průmyslových závodů vdechováním znečištěného ovzduší. Jídlo, které je balené v plastovém obalu může obsahovat jeho velmi nízké koncentrace a rovněž pitná voda může obsahovat malé množství 1,1DCE [12].

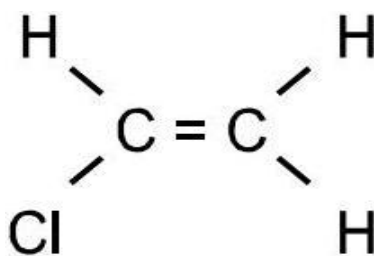
Při jednorázovém vdechnutí vysoké dávky 1,1DCE dochází k působení na centrální nervovou soustavu. Postižená osoba ztrácí dech a může omdlít. Vdechováním nižších koncentrací (přesněji není specifikováno) po delší dobu dochází k poškození nervového systému, jater a plic [12].



Obr. 6. Strukturní vzorec 1,1DCE

1.6 Vinylchlorid (VC)

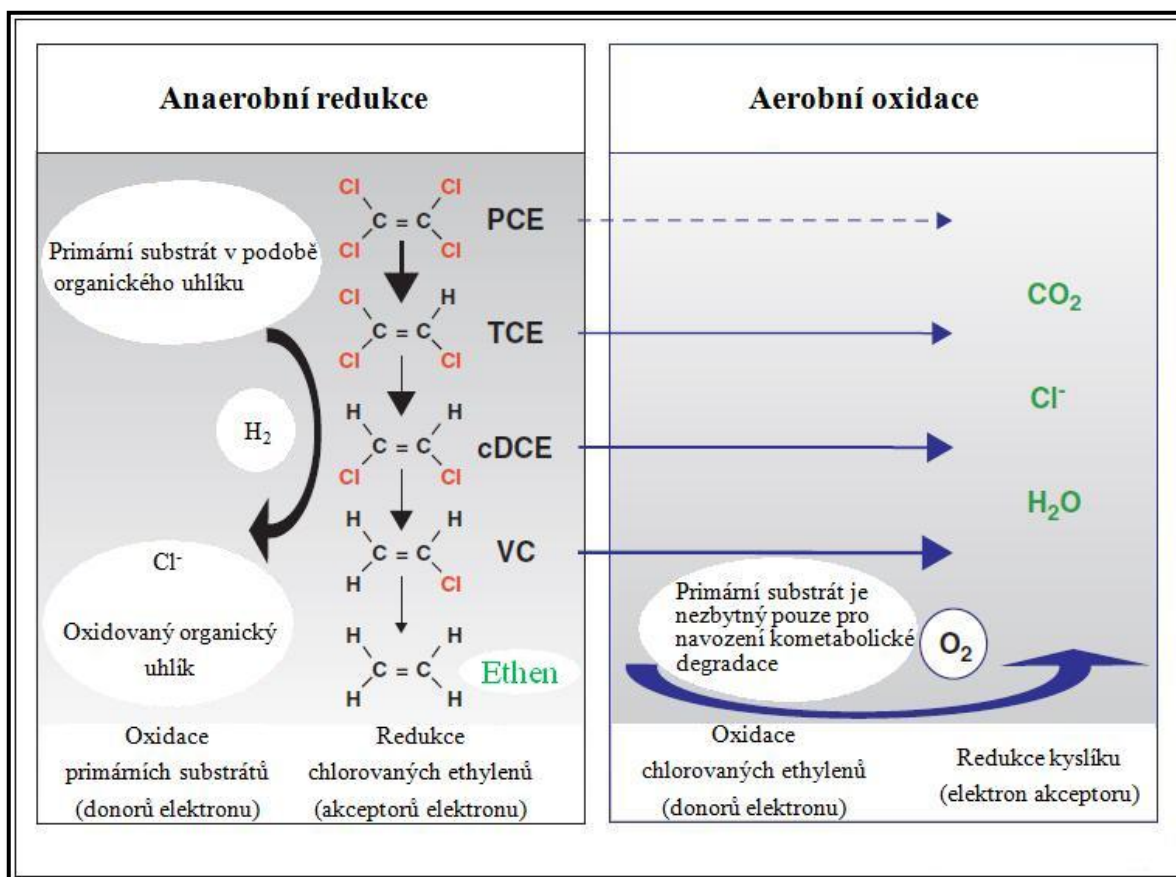
Vinylchlorid je triviální název pro chlorethylen. Jedná se o bezbarvý plyn, který velmi dobře hoří, je nestabilní za vysoké teploty a má mírně nasládlou vůni. VC je antropogenní a v přírodě se přirozeně nevyskytuje, nicméně může vznikat rozpadem jiných látek antropogenního původu, jako jsou perchlorethylen, trichlorethylen a trichlorethan. V dřívější době se používal jako chladicí médium a hnací plyn ve sprejích, avšak později byl kvůli své nebezpečnosti pro tento druh použití zakázán [13]. V současné době se využívá zejména při výrobě polyvinylchloridu (PVC). Podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny je řazen do 1. kategorie látek, tedy takových, které jsou karcinogenní pro lidi [13].



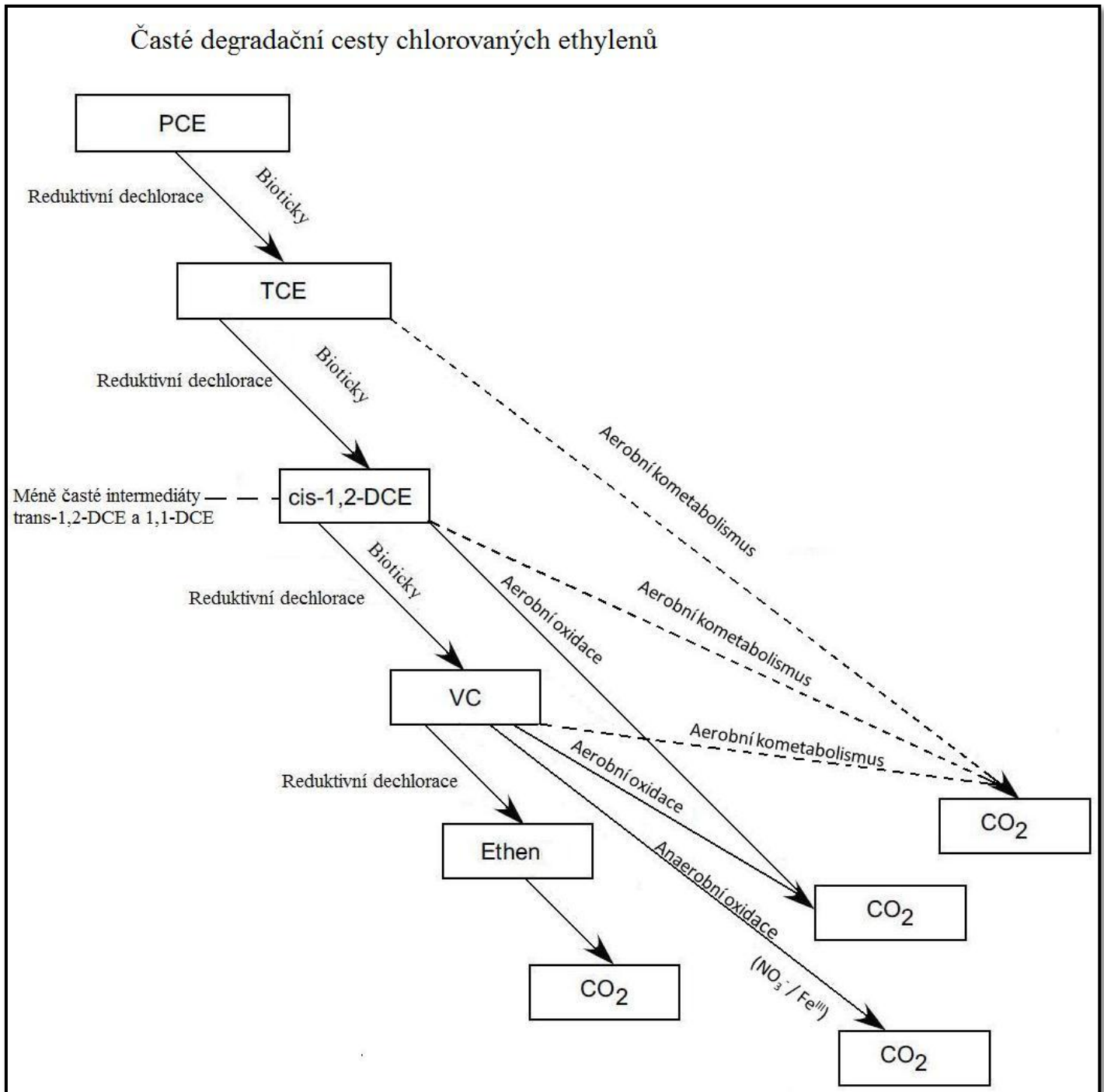
Obr. 7. Strukturní vzorec VC

2 BIODEGRADACE CHLOROVANÝCH ETHYLENŮ

Chlorované ethyleny mohou podléhat biodegradaci v průběhu tzv. přírodní atenuace, což je proces reduktivní dechlorace za anaerobních podmínek, nebo oxidací v aerobním prostředí. Tendence chlorovaných ethylenů podléhat reduktivní dechloraci se snižuje s klesajícím počtem substituovaných atomů chlóru. Zatímco PCE a TCE podléhají relativně snadno reduktivní dechloraci, biodegradace dichlorethylenů a vinylchloridu probíhá mnohem snadněji jejich oxidací za aerobních podmínek [14]. Aerobní oxidační degradace může probíhat dvěma různými způsoby: buď kometabolickou degradací za přítomnosti primárního substrátu, nebo metabolickou degradací, kdy je jediným zdrojem energie samotná cizorodá látka. Jako nejúčinnější biodegradační způsob odstraňování chlorovaných ethylenů jako celku se jeví kombinace anaerobní reduktivní dechlorace PCE a TCE s následnou oxidací dichlorethylenů a vinylchloridu. Nespornou výhodou této metody je, že předchází nadměrnému hromadění dichlorethylenů a vinylchloridu během anaerobní dechlorace [15].



Obr. 8. Anaerobní redukce a aerobní oxidace chlorovaných ethylenů [15]



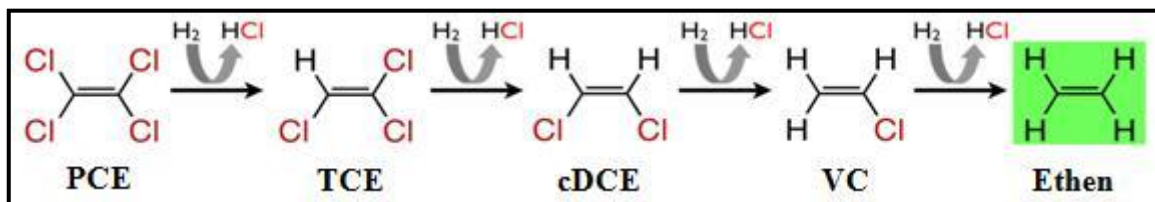
Obr. 9. Časté degradační cesty chlorovaných ethylenů [4]

2.1 Anaerobní reduktivní dechlorace

Anaerobní reduktivní dechlorace neboli halorespirace je anaerobní respirační proces využívající chlorované ethyleny jako akceptory elektronů a vodík jako donor elektronů. Jak již bylo zmíněno, jedná se o běžně se vyskytující přírodní proces, známý pod pojmem přírodní atenuace. Ovšem tento proces je rovněž cíleně využíván pro technické sanace kontamino-

vaných podzemních vod. V technických bioremediacích je vodík dodáván v podobě organického substrátu (biostimulace), který je rozkládán fermentativními bakteriemi, což vede k tvorbě volného vodíku, potřebného pro některé dehalorespirační bakterie. Atomy chlóru chlorovaných ethylenů jsou postupně nahrazovány atomy vodíku, důsledkem čehož dochází k dechlorační redukci z PCE přes TCE, cDCE (který je nejčastěji se tvořícím izomerem ze všech tří dichlorethylenů) a VC až na relativně neškodný ethen [15]. Ethen je klasifikován podle IARC (International Agency for Research on Cancer) jako karcinogen 3. kategorie [16]. Avšak vzhledem k jeho předpokládané nízké koncentraci v podzemních vodách a schopnostem mikroorganismů jej degradovat, nepředstavuje významnější riziko. Díky tomu, že rychlost dechlorace klesá s klesajícím počtem substituovaných atomů chlóru, dochází k hromadění dichlorethylenů nebo vinylchloridu. Takové hromadění představuje významné environmentální problémy a je podstatným nedostatkem při využívání anaerobní reduktivní dechlorace jako jediného sanačního přístupu pro dekontaminace postižených lokalit.

Je známo několik skupin bakterií, které jsou schopny za anaerobních podmínek redukovat PCE a TCE na cDCE jako konečný produkt. Jedná se o zástupce rodů *Desulfomonile*, *Dehalobacter*, *Desulfitobacterium* a *Desulfuromonas* [14,17]. Ovšem jen jedna bakterie z rodu *Dehalococcoides* je schopná kompletní reduktivní dechlorace z perchlorethylenů na ethen, ale i pro ni platí, že dechlorace z PCE na cDCE je rychlejší a termodynamicky příznivější než dechlorace z cDCE na vinylchlorid [17]. Protože nejpomalejším dechloračním krokem je konečná transformace vinylchloridu na ethen, dochází k častým akumulacím cDCE a vinylchloridu [14].

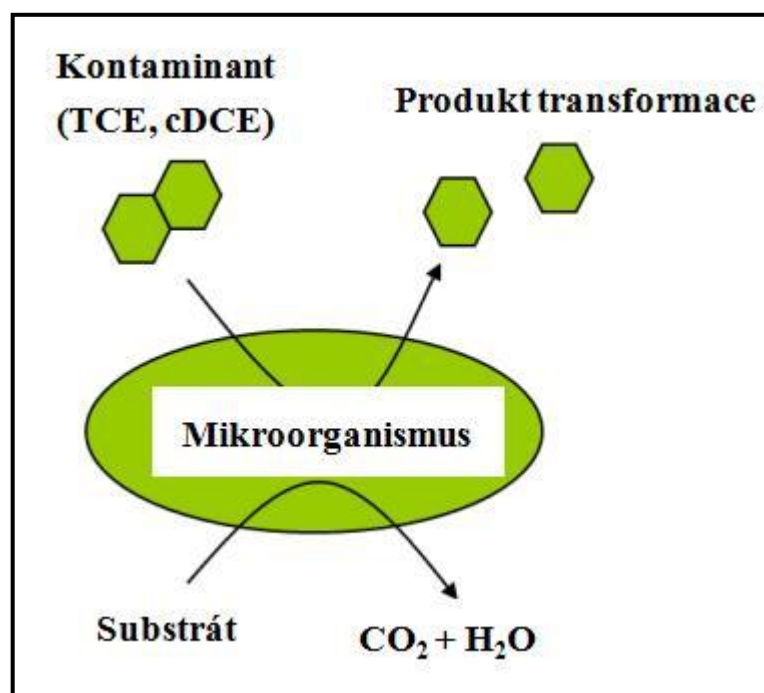


Obr. 10. Reduktivní dechlorace bakterií *Dehalococcoides* [18]

2.2 Aerobní kometabolická degradace

Některé typy cizorodých látek, mezi které se řadí i dichlorethyleny, nejsou četné mikroorganismy schopny využívat přímo jako zdroje uhlíku, stavebních prvků či energie pro svůj

růst a proto tyto sloučeniny nebývají v běžných podmínkách prostředí rozkládány. Některé z nich však mohou být určitými druhy nebo skupinami bakterií rozkládány za specifických podmínek, a to většinou po kontaktu mikrobiálních buněk s vybranou organickou látkou, která je označována jako primární substrát. Takový proces rozkladu, s nutnou účastí jiné látky, označujeme jako kometabolismus [19,20]. Mikroorganismy jej neprovozují “cíleně“, neboť jim nesaturuje žádnou zdrojovou oblast přímého metabolismu, nicméně za určitých situací díky nadprodukci některých skupin enzymů s nízkou substrátovou specificitou, participují tyto biochemické katalyzátory i na transformaci jiných látek. Podstata kometabolismu spočívá v neschopnosti daných cizorodých látek indukovat v mikrobiálních buňkách tvorbu potřebných typů katabolických enzymů, takže jejich tvorba pak musí být indukována primárním substrátem [21]. Nejčastěji používanými primárními substráty pro navození kometabolické degradace např. TCE jsou fenol, toluen, benzen, methan a amoniak [2]. Díky širší substrátové specificitě příslušných enzymů (oxigenas) dochází k ataku nejen samotných primárních substrátů, ale i dalších látek jako TCE či dichlorethylenů [20].



Obr. 11. Schematické znázornění kometabolismu [21]

K úspěšnému využití kometabolického rozkladu pro dekontaminace znečištěných lokalit (nejčastěji podzemních vod) je třeba znát faktory, které jsou nutné pro úspěšné provedení těchto způsobů remediace prostředí. Těmito faktory jsou:

- výběr vhodné mikrobiální kultury, znalost jejich růstových a fyziologických vlastností a také její patogenity,
- znalost jednoho či více induktorů potřebných katabolických enzymů, jeho toxicity, potřebné koncentrace a doby jeho působení pro navození tvorby enzymů, a také rychlost jeho spotřebování mikrobiálními buňkami (pro zamezení případné substrátové kompetice)
- znalost klíčového enzymu či enzymů, pH optima a afinity k oběma substrátům (přírodnému i cizorodému),
- znalost produktů degradace nebo vyloučení vzniku toxických sloučenin, zejména pak epoxidů či dead-end produktů [22].

2.3 Aerobní metabolická degradace

Zatímco během kometabolické degradace jsou chlorované ethyleny degradovány víceméně náhodně díky přítomnosti primárního substrátu, který indukuje tvorbu potřebných katabolických enzymů, v případě metabolické oxidace jsou jediným zdrojem uhlíku a energie právě samotné chlorované ethyleny [14]. Skutečnost, že není třeba přítomnost primárního substrátu v průběhu metabolické oxidace, má řadu výhod v porovnání s kometabolickými degradačními cestami. Tou hlavní je skutečnost, že je vyloučena kompetice o katabolické enzymy mezi primárním substrátem a chlorovanými ethyleny [14,23,24,25,26] a rovněž je nižší spotřeba kyslíku [27,28,29]. Netvoří se toxické epoxidy a konečně metabolická oxidace je schopna degradovat vyšší koncentrace chlorovaných ethylenů v kratším období a s vyšším procentem konečného rozkladu než jak je tomu v průběhu kometabolické oxidace. Zatím bylo opakovaně prokázáno, že vinylchlorid podléhá metabolické degradaci bakterií *Pseudomonas earuginosa* MF1 a 1,1-dichlorethylen je metabolicky degradován bakterií *Alcaligenes* sp. [23,30,31,32]. Problémem pro její širší využití v současnosti je fakt, že v přítomnosti jiných chlorovaných ethylenů dochází k vzájemným interakcím a k významnému snižování degradačního potenciálu cDCE a VC [14]. Není pochyb, že v budoucích letech bude docházet k novým objevům a snad lepšímu porozumění jak tuto metodu efektivně využívat pro dekontaminace znečištěných lokalit.

3 SCHOPNOST BAKTERIÍ KOMETABOLICKY ROZKLÁDAT JEDNOTLIVÉ DICHLORETHYLENY

Tato část diplomové práce se zabývá schopnostmi bakterií kometabolicky rozkládat jednotlivé dichlorethylene. Cílem bylo nalézt nejdůležitější poznatky o této problematice z dostupných vědeckých článků. Jsou zde popsány různé metody pro navození kometabolického rozkladu, zda autoři pracovali s čistými kulturami bakterií či s konsorcií, jaké isomery dichlorethylenů byly rozkládány, v jakých koncentracích a pokud autoři článků uvádí, jaké byly konečné produkty rozkladů.

3.1 Aerobní kometabolický rozklad cDCE a tDCE pomocí bakteriálního konsorcia z kontaminovaných lokalit v Africe

Kometabolický rozklad cDCE a tDCE za aerobních podmínek byl pozorován u mnoha mikroorganismů schopných oxidovat toluen, fenol a propylen, dále u metanotrofních a nitrifikačních bakterií, přičemž přídavek primárního substrátu se ukázal jako nezbytný pro indukci potřebných typů katabolických enzymů. Některé z těchto primárních substrátů jako fenol a toluen jsou samy o sobě nebezpečné a neakceptovatelné látky v podloží zemin, zatímco jiné, tak jako propylen, methan a propan jsou plynné substráty s nízkou rozpustností ve vodě. Proto je vhodnější zvolit ve vodě rozpustné a netoxické substráty, které mohou zahájit mikrobiální degradaci cDCE a tDCE [33].

Tato studie zkoumala efekt některých ve vodě rozpustných, netoxických a nehořlavých primárních substrátů na biodegradaci cDCE a tDCE prostřednictvím konsorcia aerobních bakterií izolovaných z kontaminovaných lokalit v Africe. Bakteriální kmeny použité v této studii byly izolovány ze vzorků kontaminované půdy v Jižní Africe a Nigérii. Čisté kultury byly kultivovány z těchto vzorků na živném agaru. Jednalo se o tyto zástupce: *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.* a *Acinetobacter sp.*[33].

3.1.1 Příprava pokusů

Byly provedeny tři série pokusů. První série zkoumala degradaci jednotlivých cDCE a tDCE za podmínek, kdy byly tyto látky jedinými zdroji uhlíku. Druhá série zkoumala za stejných podmínek degradaci směsného vzorku těchto ethylenů a v třetí sérii byla zkoumána kometabolická degradace cDCE a tDCE v přítomnosti různých primárních substrátů.

V první sérii bylo do 250 ml lahví dávkováno 150 ml minerálního média, které bylo následně zaočkováno 2 ml bakteriální suspenze. Kapalná a plynná fáze byly v poměru 3:2 (152 ml/98ml). Následně byl přidán cDCE či tDCE o koncentraci 1 mM (96,95 mg.l⁻¹). Všechny láhve byly utěsněny plynotěsnými uzávěry pro zabránění úniku plynné fáze. Druhá série pokusů byla provedena identicky, avšak s tím, že namísto jednotlivých cDCE a tDCE byl přidán jejich směsný vzorek. V třetí sérii byl přidán jeden z dvojice používaných dichlorethylenů a jeden z následujících primárních substrátů: glukosa, sacharosa, laktosa, hnojivo, extrakt z kvasnic (vše v koncentracích 0,1%) a toluen nebo fenol o koncentracích 50 mM [33].

3.1.2 Způsob vyhodnocení pokusů a jejich výsledky

Degradační pokusy probíhaly sedm dní. Jednotlivé vzorky byly denně monitorovány injekcí 100 µl plynné fáze ze vzorkovnic pomocí 100 µl plynotěsného dávkovače do plynového chromatografu vybaveného plamenově ionizačním detektorem [33].

V první sérii pokusů došlo k 69,5% degradaci cDCE a 74,37% degradaci tDCE. V druhé sérii, kde byl použit směsný vzorek obou těchto dichlorethylenů, došlo k 46,45% degradaci cDCE a 63,63% degradaci tDCE. V přítomnosti různých primárních substrátů došlo k navýšení procentuální degradace cDCE a tDCE. Nejvýznamnější vliv na rozložitelnost dichlorethylenů měla glukosa, která přispěla k nárůstu rozložitelnosti cDCE o 22,18% s konečným procentem rozkladu 91,68%. V případě tDCE došlo k nárůstu rozložitelnosti o 12,16% s konečným procentem rozkladu 86,98%. Sacharosa měla rovněž významný podíl na degradaci těchto látek. Oproti tomu použití toluenu a fenolu nemělo významný vliv pro navýšení rozložitelnosti cDCE a tDCE tímto konsorciem mikroorganismů [33]. Výsledky jednotlivých pokusů jsou uvedeny v Tab. 1. Navýšení procentuální degradace cDCE a tDCE kometabolismem v přítomnosti různých primárních substrátů.

Tab. 1. Kometabolické navýšení procentuální degradace cDCE a tDCE v přítomnosti různých primárních substrátů [33]

Primární substrát	Degradace cDCE a tDCE [%]		Navýšení degradace kometabolismem [%]	
	cDCE	tDCE	cDCE	tDCE
Bez substrátu	69,50	74,37	-	-
Glukosa	91,68	86,98	22,18	12,61
Sacharosa	84,39	80,89	14,89	6,52
Laktosa	72,34	77,64	2,84	3,27

Primární substrát	Degradace cDCE a tDCE [%]		Navýšení degradace kometabolismem [%]	
	cDCE	tDCE	cDCE	tDCE
Toluen	72,38	76,52	2,88	2,15
Fenol	71,63	74,76	2,13	0,39
Hnojiva	80,46	78,39	10,96	4,02
Extrakt z kvasnic	81,55	74,54	12,05	1,17

Výsledky studie ukazují, že biodegradace obou dichlorethylenů byla navýšena po přidavku některého z primárních substrátů. Autoři článku uvádějí, že navýšení degradace je způsobeno kometabolismem, avšak cDCE a tDCE byly degradovány i bez přítomnosti primárních substrátů (69,50% cDCE a 74,37% tDCE). Pokud tedy označujeme kometabolismus jako proces rozkladu s nutnou účastí jiné látky, neměli bychom v tomto případě mluvit o navýšení kometabolismem. Jeví se, že degradace cDCE a tDCE byla způsobena metabolicky a přidavek primárních substrátů jako zdroje uhlíku a energie pouze podpořil tento proces.

3.2 Kometabolická degradace chlorovaných alkenů bakterií *Xanthobacter* sp. Py2

Hlavním cílem této práce bylo prověřit schopnost dané kultury oxidovat dvou a tří uhlíkaté chlorované alkeny a potvrdit roli enzymu alken monooxygenasy, jako katalyzátoru této oxidace [34]. Autoři této práce vycházeli z dřívějších poznatků, zaměřených na identifikaci bakterií rostoucích v prostředí jednoduchých alkenů: ethenu, propylenu a butylenu jako jejich jediného zdroje uhlíku a energie a které jsou schopny trvale udržitelné biodegradace chlorovaných alkenů [35]. Takové bakterie, disponující enzymem alken monooxygenasou, iniciují oxidaci alkenů prostřednictvím jejich okysličováním na příslušné epoxidy [35]. Vzniklé epoxidy později podléhají enzymatické oxidaci poskytující energii a uhlík mikrobiálním buňkám [35,36]. Epoxidy jsou známy jako toxické meziprodukty vznikající v průběhu biodegradací cizorodých látek, často působící jako inhibitory celulárních proteinů. Avšak díky schopnosti těchto bakterií enzymaticky metabolizovat reaktivní epoxidy, může být dosaženo dlouhodobě úspěšné biodegradace chlorovaných alkenů. Například bakterie *Mycobacterium* sp. L1 dokáže využívat ethen a vinylchlorid jako jediný zdroj energie a uhlíku při svém růstu [37]. Bakterie *Rhodococcus erythropolis* JE77 je schopna kometabolicky degradovat trichlorethylen, dichlorethyleny a vinylchlorid [38]. Pro experimentální pokusy v této práci byla vybrána bakterie *Xanthobacter* sp. Py2, izolovaná na

propylenu, která byla zvolena pro její vysokou degradační kapacitu u chlorovaných uhlovodíků [34, 39]. Kromě propylenu, je bakterie *Xantobacter* sp. Py2 schopna růst i na dalších dvou alkenových substrátech, jimiž jsou ethen a buten, dále pak na glukose, sukcinátu, jedno až čtyř uhlíkatých alkoholech, propylenglykolu, propionaldehydu a propylenoxidu, který je meziproduktem oxidace propylenu [34, 39, 40].

3.2.1 Růst a příprava buněk

Růst bakterií probíhal v nádobách o objemu 1 litru obsahujících 0,5 l minerálního média a 50 ml propylenu (10% vol/vol) nebo s 1 g glukosy (0,2% wt/vol). Nádoby určené pro kultivaci mikroorganismů s propylenem byly uzavřeny gumovými zátkami s přívodními trubičkami a septy, přes které byl v přetlaku přidáván propylen. Během růstu mikroorganismů bylo zajištěno periodické doplňování vzduchu a propylenu do nádob. Mikrobiální buňky byly izolovány po dosažení optimální hustoty kapalné fáze (A_{600}). Průběh izolace buněk byl následovný: odstředění na centrifuze s následnou resuspendací buněk v pufru o pH 7,2, obsahující 50 mM Na_3PO_4 . Takto získané buňky byly znovu odděleny centrifugací a uloženy před samotným zahájením experimentálních pokusů v ledničce jako tzv. klidové buňky, které již disponují potřebnými katabolickými enzymy [34].

3.2.2 Analytické postupy

Stanovení koncentrací chlorovaných uhlovodíků bylo prováděno pomocí plynové chromatografie s využitím FID a ECD detektorů. Kvantifikace proteinů v buněčné suspenzi byla určena pomocí biuretové reakce, po solubilizaci v 3M NaOH po dobu 30 minut a při teplotě 65°C [34].

3.2.3 Degradace chlorovaných uhlovodíků

Degradační pokusy byly zaměřeny na osm různých chlorovaných uhlovodíků (1,3-dichlorpropan, 2,3-dichlorpropan, perchlorethylen, trichlorethylen, cis-1,2-dichlorethylen, trans-1,2-dichlorethylen, 1,1-dichlorethylen a vinylchlorid) [34]. Vzhledem k tomu, že se tato diplomová práce zabývá biodegradacemi chlorovaných ethylenů, veškerá pozornost byla směřována výhradně na tyto látky.

Pokusy degradace chlorovaných uhlovodíků byly prováděny v uzavřených vialkách se silikonovými septy. Vialky o objemu 9 ml obsahovaly 2 ml pufru a 500 nmol některého ze zkoumaných chlorovaných uhlovodíků (83 $\mu\text{g.l}^{-1}$ PCE, 66 $\mu\text{g.l}^{-1}$ TCE, 48 $\mu\text{g.l}^{-1}$ cDCE, tDCE nebo 1,1DCE, a 31 $\mu\text{g.l}^{-1}$ VC), které byly připraveny v nasycených vodných roztocích.

Pouze vinylchlorid byl přidán jako plyn. Chlorované uhlovodíky byly dávkovány do vialek pomocí plynotěsného dávkovače, přičemž množství přidaného substrátu bylo odhadnuto z tabulek rozpustnosti [41]. Nakonec byly přidány bakteriální suspenze obsahující bakterie vyrostlé na propylenu (1,1 mg proteinů) a glukose (1,3 mg proteinu). Vzorke plynné fáze o objemu 25 µl byly odebírány během inkubace za neustálého protřepávání vialek při 30°C. Tyto vzorky byly odebírány okamžitě po zahájení pokusů a poté v určitých časových intervalech po dobu 30 minut a analyzovány [34]. Výsledky z jednotlivých měření jsou uvedeny v Tab. 2. Hodnoty v tabulce představují průměr z trojího měření se standardní odchylkou pod 5%. Z výsledků je patrné, že bakteriální suspenze získaná z bakterií vyrostlých na propylenu byla schopna do určité míry degradovat některé chlorované ethyleny. Oproti tomu suspenze bakterií vyrostlých na glukose nebyla schopna degradovat žádnou z těchto látek. Rovněž byl proveden pokus s bakteriální suspenzí buněk vyrostlých na propylenu, kultivovaných s propylenem. Stejně jako v případě buněk vyrostlých na glukose, nedošlo k degradaci žádné ze zkoumaných látek. Jako poslední byl proveden kontrolní pokus s převařenými bakteriemi vyrostlými na propylenu, ve snaze ověřit, že k úbytku chlorovaných uhlovodíků nedochází díky abiotickým vlivům, ale naopak, že odstranění je způsobeno oxidací aktivních bakteriálních buněk vyrostlých na propylenu. V průběhu kontrolního pokusu nedošlo k odstranění žádné ze zkoumaných látek (data neuvedena) [34].

Tab. 2. Procento odstranění chlorovaných ethylenů bakteriálními suspenzemi [34]

Substrát	Způsob kultivace buněčné suspenze a % odstranění substrátu		
	Propylen	Propylen + Propyn	Glukosa
	Odstranění subst. [%]	Odstranění subst. [%]	Odstranění subst. [%]
Tetrachlorethylen	1,00	2,00	3,00
Trichlorethylen	46,00	0,00	2,00
cis-1,2-dichlorethylen	69,00	1,00	7,00
trans-1,2-dichlorethylen	84,00	3,00	6,00
1,1-dichlorethylen	6,00	2,00	0,00
Vinylchlorid	100	0,00	2,00

Během této studie bylo potvrzeno, že enzym alken monooxygenasa hraje důležitou roli při oxidaci chlorovaných ethylenů, kde působí jako katalyzátor této oxidace. Potvrzení úlohy tohoto enzymu, jako katalyzátoru při oxidaci chlorovaných ethylenů, bylo demonstrováno porovnáním bakterií rodu *Xanthobacter* sp. Py2 vyrostlých na odlišných substrátech: glukose, propylenu a kombinaci propylenu s propylenem. Bylo zjištěno, že bakterie rostoucí

pouze v prostředí glukosy nedisponují katabolickým enzymem alken monooxygenasou a nejsou tak schopny oxidovat chlorované ethyleny. U bakterií rostoucích v přítomnosti kombinovaného substrátu obsahujícího propylen a propyn, dochází k selektivní inaktivaci enzymu alken monooxygenasy propynem, a tím je znemožněna oxidace chlorovaných ethylenů. Pouze bakterie rostoucí na propyleny jako jejich jediného zdroje uhlíku a energie jsou schopné do určité míry degradovat některé z chlorovaných ethylenů [34].

3.3 Ethen jako primární substrát pro kooxidaci vinylchloridu a cis-1,2-dichlorethylenu

Tato studie zkoumala konsorcium bakterií metabolizující ethen jako jediný zdroj uhlíku a energie, které kometabolizuje a kompletně dehalogenuje cis-1,2-dichlorethylen a vinylchlorid [42]. Již v předešlých studiích zabývajících se kometabolickou degradací těchto chlorovaných uhlovodíků bylo prokázáno, že některé bakteriální kmeny jsou schopné kooxidace dichlorethylenů a vinylchloridu. Z dřívějších prací lze dohledat, že methanotrofní bakterie *Methylosinus trichosporium* OB3b kooxiduje TCE a níže chlorované ethyleny [43, 44, 45, 46]. Bakterie využívající izopren, *Alcaligenes denitrificans* ssp. *xylosoxidans* JE 75 a *Rhodococcus erythropolis* JE 77, kometabolizují trichlorethylen, dichlorethyleny a vinylchlorid [47]. Amoniak oxidující bakterie, například *Nitrosomonas europa*, rovněž kooxiduje několik chlorovaných ethylenů prostřednictvím enzymu amoniak monooxygenasy [48]. Ve studiích zabývajících se úlohou primárních substrátů v průběhu kometabolické degradace chlorovaných uhlovodíků bylo zjištěno, že aplikace primárních substrátů: methanu, izoprenu a amoniaku, běžně sloužících pro navození tvorby katabolických enzymů, nezbytných pro zahájení kometabolické degradace těchto látek, má řadu nevýhod pro dlouhodobé technické aplikace [43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51]. Zejména, je to postupně se snižující účinnost biodegradací v důsledku kontaminace mikroorganismy, které nekometabolizují chlorované ethyleny. Proto, například izopren není nejvhodnějším primárním substrátem pro dlouhodobě trvající biodegradace, u kterých může docházet k nadměrnému růstu mikroorganismů, které jsou kometabolicky inaktivní proti chlorovaným ethylenům [52]. Další nevýhodou při aplikaci těchto primárních substrátů jsou často se vyskytující inaktivace buněčných proteinů vysoce reaktivními metabolity [53]. Za účelem vyhnout se těmto nevýhodám byl jako alternativní primární substrát vytipován ethen, který by měl sloužit jako zdroj uhlíku a energie, donor

elektronů a induktor vhodných oxigenas. Ethen je strukturně velmi blízký chlorovaným ethylenům, díky čemuž autoři článku očekávali, že bude snadno oxidován [42].

3.3.1 Izolace směsné bakteriální kultury K20

Směsná bakteriální kultura K20, obsahující tyto kmeny bakterií: *Mycobacterium* strain K1, *Mycobacterium* strain K2, *Corynebacterium* strain K3, *Proteobacterium* strain K4 a *Proteobacterium* strain K5, byla získána z čistírny odpadních vod v Německu. Mikroorganismy byly kultivovány v minerálním médiu doplněném o ethen 13 až 90 ml (3 až 20% v/v), který byl použit jako jediný zdroj uhlíku a energie. Inkubace probíhala v 500 ml Erlenmeyerových baňkách, utěsněných teflonovými septy. Každá z těchto baněk obsahovala 50 ml již zmíněného minerálního média s ethenem. Baňky byly umístěny na rotační třepačce a protřepávány při 30°C. Po dosažení požadované optické hustoty buněčné suspenze v minerálním médiu, byly mikroorganismy přeočkovány na minerální živné agary a později používány jako tzv. klidové buňky při degračních pokusech cis-1,2-dichlorethylenu a vinylchloridu [42].

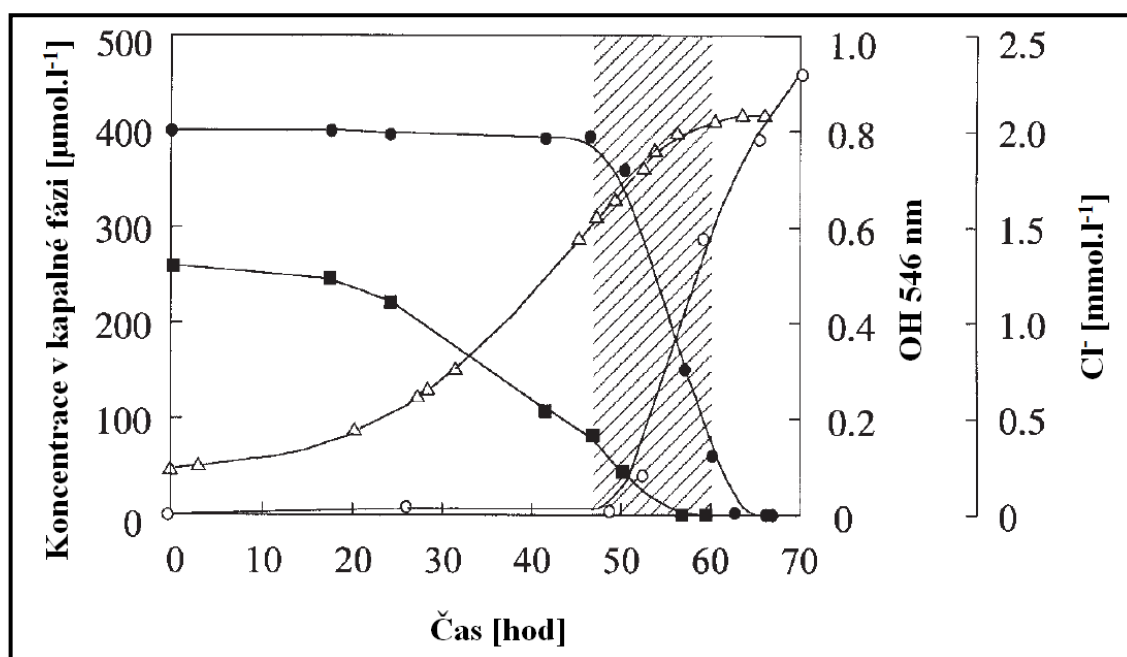
3.3.2 Experimentální pokusy

Experimentální pokusy byly zaměřeny na kometabolické degradace cis-1,2-dichlorethylenu a vinylchloridu směsnou bakteriální kulturou K20, na možnou inhibici oxidace cDCE v prostředí perchlorethylenu a trichlorethylenu a na přežívání buněk během degradace cDCE. Všechny vzorky chlorovaných ethylenů a ethenu byly odebírány plynotěsným dávkovačem z plynné fáze Erlenmeyerových baněk (headspace metoda). Jejich zbytková koncentrace byla stanovena na plynovém chromatografu. Pro stanovení cis-1,2-dichlorethylenu, vinylchloridu a ethenu byl použit FID detektor. Perchlorethylen a trichlorethylen byly stanoveny pomocí ECD detektoru. Uvolnění chloridů při kometabolické degradaci cDCE bylo stanoveno iontově-selektivní elektrodou [42].

Kometabolická degradace 1,2-cis-dichlorethylenu

100 ml Erlenmeyerovy baňky obsahovaly 8 ml minerálního média, 0,3 ml bakteriální suspenze klidových buněk vyrostlých na ethenu a 1,2 mmol.l⁻¹ (116 mg.l⁻¹) cis-1,2-dichlorethylenu. Koncentrace cDCE v kapalné fázi činila 400 μmol.l⁻¹ (38 mg.l⁻¹). 4,6 ml ethenu (5% v/v) bylo přidáno plynotěsným dávkovačem. Koncentrace ethenu v kapalné fázi byla 250 μmol.l⁻¹ (7 mg.l⁻¹). pH bylo upraveno na 6,5 a baňky byly protřepávány při

30°C. Vzorčky plynné fáze byly odebrány periodicky po dobu 70 hodin. Celý průběh experimentálního pokusu je znázorněn na Obr. 12 [42].

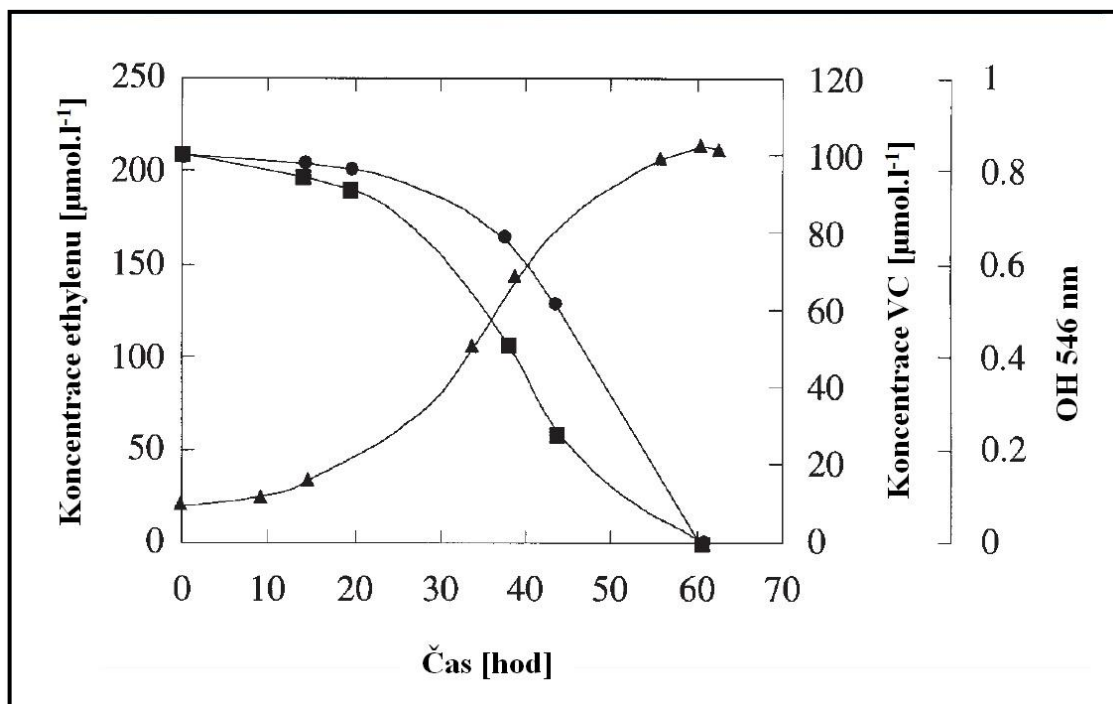


Obr. 12. Kooxidace cDCE směsnou bakteriální kulturou K20 v přítomnosti ethenu [42]

Z Obr. 12 lze odečíst, že ethen byl spotřebován za necelých 60 hodin (■). Po 70 hodinách došlo k odstranění $1,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($106,6 \text{ mg.l}^{-1}$) 1,2-cis-dichlorethylenu (●), což činí zhruba 91,90% z jeho původní koncentrace. Šrafovaná oblast znázorňuje časový interval, ve kterém probíhala souběžná degradace ethenu (substrátu) a cDCE (kosubstrátu). Koncentrace chloridů (○) byla určena iontově-selektivní elektrodou a po 70 hodinách činila zhruba $2,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ (78 mg.l^{-1}). Růst buněk (Δ) byl sledován spektrofotometricky při vlnové délce 546 nm. Počáteční biomasa byla stanovena na 16 mg.l^{-1} a konečná (po 70 hodinách) na 165 mg.l^{-1} [42].

Kometabolická degradace vinylchloridu

100 ml Erlenmeyerovy baňky obsahovaly 8 ml minerálního média, 0,3 ml bakteriální suspenze klidových buněk vyrostlých na ethenu a $1,8 \text{ mmol.l}^{-1}$ (112 mg.l^{-1}) vinylchloridu. Koncentrace vinylchloridu v kapalných fázích činila 100 μmol.l^{-1} ($6,25 \text{ mg.l}^{-1}$). 3,9 ml ethenu (4,2% v/v) bylo přidáno plynotěsným dávkovačem. Koncentrace ethenu v kapalných fázích byla 200 μmol.l^{-1} ($5,61 \text{ mg.l}^{-1}$) [42]. Další parametry a rovněž postup tohoto experimentálního pokusu byl totožný s pokusem na kometabolickou degradaci cis-1,2-dichlorethylenu a jeho průběh je znázorněn na Obr. 13 [42].



Obr. 13. Kooxidace VC směsnou bakteriální kulturou K20 v přítomnosti ethenu [42]

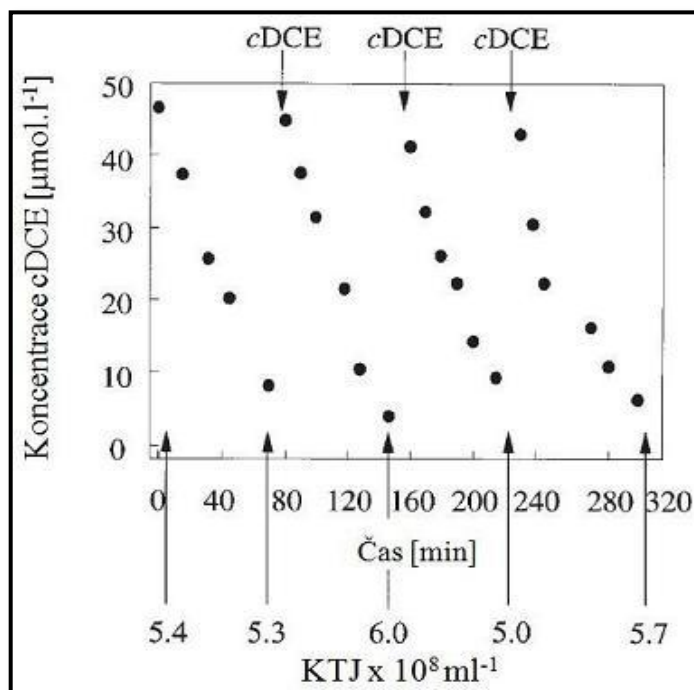
Z Obr. 13 je patrné, že ethen byl spotřebován po 60 hodinách od zahájení pokusu (■). Po 70 hodinách došlo k odstranění $1,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ (75 mg.l^{-1}) vinylchloridu, což činí zhruba 67%-tní úbytek z jeho původní koncentrace. Růst buněk (▲) byl monitorován spektrofotometricky o vlnové délce 546 nm. Počáteční biomasa byla stanovena na 15 mg.l^{-1} a konečná činila 152 mg.l^{-1} [42].

Inhibice oxidace 1,2-cis-dichlorethylenu v prostředí perchlorethylenu a trichlorethylenu

Za účelem prověřit vliv perchlorethylenu a trichlorethylenu na kometabolickou degradaci cis-1,2-dichlorethylenu, byly provedeny pokusy v 100 ml Erlenmeyerových baňkách obsahujících 12 ml suspenze klidových buněk vyrostlých na ethenu, 200 μmol.l^{-1} ($19,39 \text{ mg.l}^{-1}$) cDCE a ($5, 50, 100 \text{ μmol.l}^{-1}$) perchlorethylenu a trichlorethylenu, tj. ($0,83; 8,3; 16,58 \text{ mg.l}^{-1}$) pro perchlorethylen a ($0,66; 6,6; 13,14 \text{ mg.l}^{-1}$) pro trichlorethylen. Žádná významná inaktivace degradace cDCE perchlorethylenem či trichlorethylenem nebyla pozorována. Degradace cDCE probíhala v rozmezí od $0,22$ do $0,28 \text{ μmol.min}^{-1}.\text{l}^{-1}$ ($21,33 - 27,15 \text{ μg.min}^{-1}.\text{l}^{-1}$) nezávisle na přítomnosti či absenci PCE a TCE [42].

Vliv cis-1,2-dichlorethylenu na aktivitu a životaschopnost směsné bakteriální suspenze K20

Byl posuzován vliv cis-1,2-dichlorethylenu na aktivitu a životaschopnost buněk směsné bakteriální suspenze K20. Buňky vyrostlé na ethenu byly promyty, následně resuspendovány v 1 ml 50 mmol.l⁻¹ fosfátovém pufru a inkubovány ve vialkách o objemu 10 ml. cDCE byl přidán o koncentraci 50 μmol.l⁻¹ (4,85 mg.l⁻¹) a jeho úbytek byl monitorován plynovou chromatografií. Po každém odstranění zhruba 85% cDCE, bylo přidáno dalších 50 μmol.l⁻¹ cDCE a takový přírůstek se opakoval ještě dvakrát. Před přidáním každé další dávky cDCE byly odebrány vzorky, které byly po sérii desetinných ředění vyočkovány na minerální agary. Inkubace probíhala 7 dní při teplotě 30°C. Po této době byla zkoumána životaschopnost buněk přepočítáním kolonií tvořících jednotky (KTJ). Pokus je znázorněn na Obr. 14 [42].



Obr. 14. Schopnost přežívání buněk v přítomnosti cDCE [42]

Horní šipky na Obr. 14 znázorňují přidávky cis-1,2-dichlorethylenu a dolní šipky vyznačují doby, kdy byly odebrány vzorky pro určení životaschopnosti buněk. Z obrázku je patrné, že během pokusů se množství KTJ pohybovalo mezi 5 – 6.10⁸ ml⁻¹. U pěti různých kmenů směsné bakteriální suspenze nebyly pozorovány žádné výrazné změny v množství

přežívání buněk. Aktivita směsné buněčné kultury K20 byla v průběhu prvních 180 minut experimentu stabilní. V dalším průběhu došlo k mírnému snížení aktivity buněk [42].

Závěrem lze říci, že se ethen ukázal jako vhodný primární substrát pro kometabolické degradace chlorovaných uhlovodíků. Pokusy na kometabolickou degradaci cis-1,2-dichlorethylenu a vinylchloridu v prostředí ethenu prokázaly jejich vysoké procento odstranění. V průběhu 70 hodin bylo z počátečních 116 mg.l^{-1} cDCE odstraněno $106,6 \text{ mg.l}^{-1}$, což činí zhruba 91,90%. Vinylchlorid byl odstraněn z 67%, přičemž z jeho původní koncentrace 112 mg.l^{-1} zůstalo nerozloženo 37 mg.l^{-1} [42].

3.4 Degradace 1,1-dichlorethylenu bakterií *Alcaligenes* sp. izolovanou z aktivovaného kalu

I přesto, že je tato diplomová práce zaměřena zejména na kometabolické degradace dichlorethylenů, je třeba brát v úvahu i jiné cesty biologického odstranění těchto látek z životního prostředí. Zvláště pak, pokud 1,1-dichlorethylen podléhá kometabolické degradaci jen s obtížemi a jeho procento odstranění tímto způsobem bývá často nedostačující. Tento problém může být potenciálně vyřešen bioremediacemi s aplikací bakterií, které jsou schopné oxidovat 1,1-dichlorethylen metabolicky. Bakteriální kmen D-B zkoumaný v této práci, byl izolovaný z aktivovaného kalu a později na základě biochemického testu identifikován jako gramnegativní bakterie *Alcaligenes* sp., která může růst na 1,1-dichlorethylenu jako jediném zdroji uhlíku a energie [32].

3.4.1 Aklimatizace kalu

Do 0,7 l lahví obsahujících 250 ml minerálního média bylo asepticky přidáno 400 ml aktivovaného kalu odebraného ze sekundární sedimentační nádrže v čistírně odpadních vod v Číně a byl přidán 1,1-dichlorethylen. Inkubace probíhala při 35°C . Vstupní koncentrace 1,1-dichlorethylenu byly postupně navyšovány od 10 do $300 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$ [32].

3.4.2 Izolace a identifikace bakterie *Alcaligenes* sp.

Z minerálního média obsahujícího 20 mg.l^{-1} 1,1-dichlorethylenu, byly získány bakteriální kmeny, a to metodou desetinného ředění s následným přeočkováním na živné půdy. Po 48 hodinové inkubaci při 32°C byly nejlépe vyrostlé kolonie bakterií mikroskopicky zkoumány. Kmen D-B byl vyhodnocen jako nejvýkonnější izolát a později identifikován jako bakterie *Alcaligenes* sp. [32].

3.4.3 Degradace 1,1-dichlorethylenu (dávková studie)

Do pokusných nádob obsahujících minerální médium s bakteriální suspenzí byly nadávkovány různé vstupní koncentrace 1,1-dichlorethylenu. Připravené nádoby byly umístěny na rotační třepače a neustále protřepávány při 32°C. Vzorů kapalných fází byly periodicky odebírány po dobu 24 hodin, extrahovány v hexanu a analyzovány plynovou chromatografií [32, 54]. Výsledky studií jsou uvedeny v Tab. 3. [32].

Tab. 3. Vliv počáteční koncentrace 1,1DCE na jeho odstranění bakterií *Alcaligenes* sp. [32]

Počáteční koncentrace 1,1DCE [mg.l ⁻¹]	0,15	0,30	0,70	1,20
Odstranění 1,1DCE [%]	78,98	85,32	53,17	52,16

Výsledky ukazují, že bakterie *Alcaligenes* sp. je schopna metabolicky degradovat 1,1-dichlorethylen. K nejvýraznějšímu procentuálnímu odstranění 1,1DCE (85,32%) došlo při jeho vstupní koncentraci 0,3 mg.l⁻¹. Při dalším navyšování vstupních koncentrací 1,1DCE nad 0,3 mg.l⁻¹, docházelo k postupnému snižování procentuálního odstranění [32].

3.5 Kometabolická degradace cis-1,2-dichlorethylenu bakteriemi využívající vinylchlorid jako primární substrát

Vzhledem k tomu, že cDCE je nejčastěji vznikající dceřiný meziprodukt procesu anaerobní dehalogenace a vinylchlorid je naopak prokázán karcinogen pro člověka, problematika odstranění těchto látek z postižených lokalit je velmi významná. Během různých studií zabývajících se problematikou biologického odstranění těchto látek, bylo popsáno několik možných způsobů, jak lze cDCE a vinylchlorid odstranit s využitím některých druhů bakterií. Například, methan vznikající za anaerobních podmínek a migrující spolu s dceřinými meziprodukty reduktivní dehalogenace (perchlorethylenu a trichlorethylenu) do aerobního prostředí, může sloužit jako primární substrát pro kometabolickou degradaci vinylchloridu a cDCE. Vinylchlorid a cDCE jsou za těchto podmínek odbourávány některými methanotrofními bakteriemi, mezi které se řadí *Methylosinus trichosporium* OB3b a jiné [55]. Ethen a ethan, jež vznikají při anaerobní dehalogenaci vinylchloridu, mohou sloužit jako primární substráty pro kometabolickou degradaci cDCE bakterií *Polaromonas* sp. JS666. Stejná studie se zmiňuje i o tom, že bakterie *Polaromonas* sp. JS666 je schopna do určité míry degradovat cDCE metabolicky [56]. Primární substráty ethen a ethan mohou rovněž

sloužit pro kometabolickou degradaci vinylchloridu bakteriemi *Pseudomonas* sp. EA1 a *Pseudomonas aeruginosa* DL1 [57, 58]. Vinylchlorid může také sloužit jako růstový substrát pro některé aerobní mikroorganismy. Jednou z takových bakterií, která využívá vinylchlorid jako růstový substrát je, *Pseudomonas aeruginosa* MF1 [31, 59]. Velmi zajímavou možností pro odstranění cDCE se jeví jeho kometabolická degradace mikroorganismy, které jsou schopny využívat vinylchlorid jako primární substrát pro navození katabolických enzymů, nezbytných pro zahájení degradace cDCE. *Mycobacterium aurum* L1 byla první popsanou bakterií využívající vinylchlorid a kometabolizující cDCE [60].

3.5.1 Aerobní metabolismus vinylchloridu bakterií *Mycobacterium aurum* L1

Autoři práce se zmiňují o vzniku vinylchloridu v podzemních vodách, kontaminovaných perchlorethylenem a trichlorethylenem. Uvádějí, že vinylchlorid vzniká v průběhu redukativní dechlorace a koncentrace takto vzniklého vinylchlorid bývá vyšší než 1 mg.l^{-1} . Autoři práce dále zdůrazňují důležitost aerobní transformace vinylchloridu v podzemních vodách, které jsou jím kontaminovány. Jejich argumentem je skutečnost, že vinylchlorid podléhá redukativní dechloraci velmi pozvolna a dochází k jeho akumulacím. Hlavním cílem autorů tohoto článku bylo prozkoumat schopnost bakterie *Mycobacterium aurum* L1 využívat vinylchlorid jako jediný zdroj energie a uhlíku. Dále zkoumali schopnost této bakterie využívat vinylchlorid jako primární substrát pro kometabolickou degradaci trichlorethylenu a jednotlivých izomerů dichlorethylenů. Rovněž popsali počáteční krok v metabolismu vinylchloridu touto bakterií. Uvádějí, že tento počáteční krok je katalyzován enzymem alken monooxygenasou a dochází k transformaci vinylchloridu na reaktivní epoxid chloroxiran [60].

Isolace bakteriálního kmene degradující vinylchlorid

Bakterie *Mycobacterium* strain L1 byla izolována z půdy, která byla několik let kontaminována vodou s obsahem vinylchloridu [60].

Analytické metody

Koncentrace vinylchloridu, ethenu, epoxyalkanů a chlorovaných ethylenů byly určeny analýzou 100 μl vzorku plynné fáze na plynovém chromatografu [60].

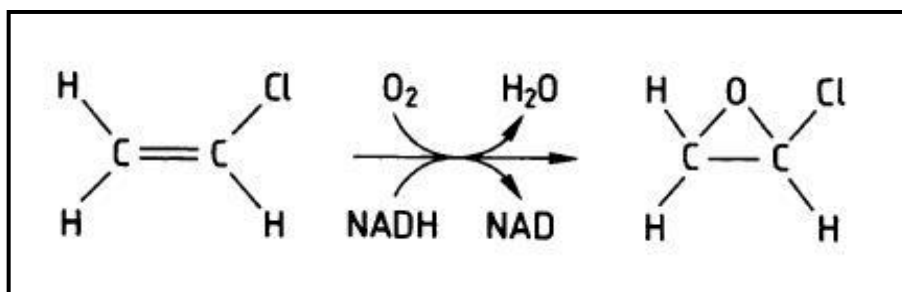
Degradační pokusy

Degradační pokusy byly provedeny s klidovými buňkami bakterie *Mycobacterium* L1, který byly promyty v 50 mM fosfátovém pufru o pH 7. Oxidace chlorovaných ethylenů

proběhla v lahvích o objemu 300 ml, utěsněných víčky s plynotěsnými septy. Do těchto lahví bylo dávkováno 5 μl některého z chlorovaných ethylenů, 25 nebo 50 ml suspenze klidových buněk v pufru fosforečnanu draselného o pH 7 [60].

Metabolismus vinylchloridu

Bylo zjištěno, že buňky bakterie *Mycobacterium* L1, dříve vyrostlé na vinylchloridu, jsou schopny jej oxidovat při počáteční rychlosti 55 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg suché hm}^{-1}$. Avšak byla zjištěna velmi rychlá inaktivace degradace vinylchloridu, která byla zapříčiněna vzniklým toxickým metabolitem, který se může akumulovat mimobuněčně. Nejpatrnějším toxickým metabolitem, který vzniká v průběhu transformace vinylchloridu, byl určen chloroxiran a nebo produkt jeho přesmyku, chloracetaldehyd [60].



Obr. 15. Počáteční krok metabolismu VC bakterií *M. aurum* L1 [60]

Oxidace chlorovaných ethylenů bakterií *Mycobacterium aurum* L1

Během pokusů na oxidaci chlorovaných ethylenů bakterií *M. aurum* L1, vyrostlou na vinylchloridu, bylo zjištěno, že jednotlivé dichlorethyleny jsou oxidovány v podobném rozsahu jako vinylchlorid. Trichlorethylen naopak nepodléhal oxidaci vůbec. Výsledky z těchto pokusů jsou shrnuty v Tab. 4. [60]. Trichlorethylen a jednotlivé dichlorethyleny byly rovněž testovány jako růstové substráty. V průběhu těchto pokusů však nedošlo k výraznější degradaci substrátu či tvorbě oxidu uhličitého [60].

Tab. 4. Počáteční rychlost oxidace chlorovaných ethylenů bakterií *M. aurum* L1 [60]

Substrát	Vstupní koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	Počáteční rychlost oxidace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg suché hm}^{-1}$]
Vinylchlorid	22,57	3,547
1,1-dichlorethylen	16,00	0,966
Cis-1,2-dichlorethylen	83,37	2,908
Trans-1,2-dichlorethylen	41,20	2,434
Trichlorethylen	42,04	< 0,131

3.5.2 Kometabolická degradace cis-1,2-dichlorethylenu bakteriálními kulturami vyrostlými na vinylchloridu

Primárním cílem autorů této práce, bylo prověřit schopnost mikrobiálních kultur, vyrostlých na vinylchloridu, transformovat cis-1,2-dichlorethylen, trans-1,2-dichlorethylen, 1,1-dichlorethylen a trichlorethylen. Autoři článku pracovali se směsnou kulturou bakterií vyrostlých na vinylchloridu a s bakterií *Pseudomonas aeruginosa* MF1, která byla izolována z dříve zmíněné směsné kultury. Chlorované ethyleny, které byly podrobeny degradačním pokusům, sloužily buď jako růstový, nebo nerůstový substrát [31].

Chemikálie

Vinylchlorid (95% čistota a s obsahem méně než 0,5% fenolu pro inhibici polymerizace), cDCE (97%), tDCE (98%), 1,1-DCE (99%) a TCE (99,5%) [31].

Analytické metody

Pro zjištění úbytku vinylchloridu, jednotlivých dichlorethylenů a trichlorethylenu během degradačních pokusů bylo odebíráno 100 ml plynné fáze z pokusných lahví a analyzováno pomocí plynové chromatografie [31].

Degradační pokusy se směsnou kulturou mikroorganismů

Směsná kultura mikroorganismů byla udržována v přítomnosti vinylchloridu, jako jediného zdroje uhlíku a energie po dobu tří let před samotnými pokusy. Při testech degradace bylo do lahví o objemu 160 ml dávkováno minerální médium, suspenze klidových buněk a některý ze zkoumaných chlorovaných ethylenů o celkovém objemu vzorku 100 ml (přesné dávkování jednotlivých složek není autory uvedeno). Chlorované ethyleny byly dávkovány buď samostatně, nebo současně s přídatkem vinylchloridu [31].

První série pokusů probíhala v přítomnosti pouze některého z chlorovaných ethylenů. Autoři práce se zaměřili hlavně na pokusy s cDCE, které popsali podrobněji. Do pokusných lahví obsahujících minerální médium a suspenzi klidových buněk bylo nadávkováno 200 μM cDCE (19,39 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Bylo zjištěno, že bakterie směsného konsorcia zapříčinily úplné odstranění cDCE během tří dnů. Ovšem další přírůstek o koncentraci 220 μM cDCE (21,33 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) již tyta kultura nebyla schopna kompletně odstranit, a to ani po dvanácti dnech od tohoto přírůstku. Během těchto pokusů bylo prokázáno, že dochází k tvorbě cDCE epoxidů, které pravděpodobně způsobily inhibici degradace. Stejný pokus, avšak s výrazně nižší vstupní koncentrací (0,12 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), byl proveden s tDCE. Během tohoto pokusu došlo

k úplnému odstranění tDCE v průběhu pěti dnů. Naopak, při pokusech s 1,1DCE (12,60 mg.l⁻¹) a TCE (22,34 mg.l⁻¹), nedošlo k žádným degradacím [31].

Druhá sérii pokusů byla zaměřena pouze na biodegradace cDCE a tDCE. Do pokusných lahví byl kromě některého z dichlorethylenů přidán i vinylchlorid, který sloužil jako růstový substrát. Pokus na degradaci cDCE probíhal 85 dní a během této doby došlo k opakovanému přidavku 0,2 až 0,3 mM cDCE (19,34 - 29,08 mg.l⁻¹) a 1,3 mM vinylchloridu (83,85 mg.l⁻¹). Směsná bakteriální kultura byla schopna po celou dobu (85 dní) odstranit vždy nově přidanou dávku vinylchloridu i cDCE. Pokus s tDCE probíhal po dobu 24 dnů a opět došlo k opakovanému přidavku zhruba 2,8 μM tDCE (0,27 mg.l⁻¹) a 200 μM vinylchloridu (12,90 mg.l⁻¹). Rovněž i v tomto případě byla směsná bakteriální kultura schopna odstranit nové přídavky vinylchloridu a tDCE [31].

Degradační pokusy s bakterií *Pseudomonas aeruginosa* MF1

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* MF1 byla izolována z dříve popsané směsné kultury vyrostlé na vinylchloridu. Takto získaná bakterie byla následně kultivována po dobu 140 dní v reaktoru s obsahem vinylchloridu, který obsahoval stopové množství fenolu. Avšak podle autorů této studie bakterie *Pseudomonas aeruginosa* MF1 nedokáže využívat fenol jako jediný zdroj energie a uhlíku. Po odstranění vinylchloridu z reaktoru, byly odebrány vzorky suspenze o objemu 25 ml a dávkovány do 70 ml pokusných lahví. Autoři článku opět neudávají přesné objemy minerálního média a testovaných látek, které dávkovali pro přípravu degradačních pokusů. Byly provedeny dvě série pokusů na degradaci chlorovaných ethylenů. V první sérii pokusů byly dávkovány chlorované ethyleny jako růstové substráty a ve druhé sérii pokusů byl kromě chlorovaných ethylenů přidán i vinylchlorid. Autoři práce uvádějí výsledky degradací v podobě transformačních kapacit uvedené kultury pro testované látky [31].

Pokus na kometabolickou degradaci cDCE probíhal po dobu 12 dnů. Byly testovány různé vstupní koncentrace v rozmezí 25 až 150 μM (2,42 - 14,5 mg.l⁻¹). Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* MF1 byla schopna rozložit všechny cDCE až do jeho vstupní koncentrace 120 μM (11,63 mg.l⁻¹). Konečné množství cDCE, které je kometabolizováno po jedné enzymové indukci, uvádí tzv. transformační kapacita, $T_{cDCE} = 0,82 \pm 0,06 \mu\text{mol cDCE.mg TSS}^{-1}$. Další pokusy na kometabolickou degradaci byly provedeny pro trans-1,2-dichlorethylen o vstupních koncentracích v rozmezí od 0,01 do 8,73 mg.l⁻¹, 1,1-dichlorethylen (0,48 - 1,94 mg.l⁻¹) a trichlorethylen (0,66 - 1,58 mg.l⁻¹). Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* MF1 ne-

projevila žádnou kometabolickou aktivitu během degradačních pokusů s tDCE a TCE. Malá aktivita byla pozorována během pokusu zaměřeného na degradaci 1,1DCE, kde hodnota transformační kapacity ($T_{1,1DCE}$) dosáhla jen $2 \cdot 10^{-5} \mu\text{mol } 1,1DCE \cdot \text{mg TSS}^{-1}$ [31].

Experimentální pokusy s růstovým substrátem (vinylchloridem) byly zaměřeny na degradaci cDCE. Byly provedeny tři pokusy s různým dávkováním vinylchloridu a cDCE. První pokus byl proveden s přebytkem vinylchloridu ($60 \mu\text{M}$ vinylchloridu a $6 \mu\text{M}$ cDCE). V druhém pokusu byly obě látky v rovnováze ($6 \mu\text{M}$ pro obě látky) a třetí pokus byl proveden s přebytkem cDCE ($6 \mu\text{M}$ vinylchlorid, $30 \mu\text{M}$ cDCE). Ve všech třech případech došlo nejprve ke spotřebování vinylchloridu před zahájením vlastní degradace cDCE. Vyšší koncentrace cDCE ($30 \mu\text{M}$) zapříčinila rychlejší utilizaci vinylchloridu a tím i samotné zahájení degradace cDCE proběhlo rychleji [31].

Diskuse k výsledkům

Výsledky této práce jasně prokazují schopnost mikroorganismů, vyrostlých na vinylchloridu, kometabolicky degradovat cis-1,2-dichlorethylen, přičemž vinylchlorid slouží jako primární substrát pro navození tvorby katabolických enzymů. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* MF1, stejně jako výše popsaná bakterie *M. aurum* L1, využívá enzym alken monooxygenasu pro zahájení metabolismu vinylchloridu [31].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁLY A METODY MĚŘENÍ

4.1 Materiály

Cis-1,2-dichlorethylen o čistotě 99,1% a trans-1,2-dichlorethylen o čistotě 99,7% byly dodány firmou Fluka Analytical a 1,1-dichlorethylen o čistotě 99,9% byl dodán firmou SUPELCO. Ostatní chemikálie, které byly použity v experimentálních pokusech, byly vyrobeny v třídě p.a. a dodány běžnými dodavateli chemikálií.

4.1.1 Chemikálie pro přípravu standardních roztoků jednotlivých dichlorethylenů

Metanol, cis-1,2-dichlorethylen 99,1%, trans-1,2-dichlorethylen 99,7% a 1,1-dichlorethylen 99,9%.

4.1.2 Chemikálie pro přípravu minerálních médií (MM)

MM s obsahem laktátu sodného (MML, v g.l⁻¹, není-li uvedeno jinak):

NH₄Cl 0,3; MgSO₄.7H₂O 0,1; Fe(NH₄)₂.(SO₄)₂.6H₂O 0,03; CaCl₂.2H₂O 0,01; NaCl 0,5; laktát sodný (10% roztok) 1 ml; roztok stopových prvků 1 ml; fosfátový pufr (Na₂HPO₄.12H₂O 1,91; KH₂PO₄ 0,18) 1000 ml.

Bezchloridové MM (BMM, v g.l⁻¹, není-li uvedeno jinak):

(NH₄)₂SO₄ 0,37; Fe(NH₄)₂.(SO₄)₂.6H₂O 0,03; MgSO₄.7H₂O 0,1; Ca(NO₃)₂.4H₂O 0,016; NaNO₃ 0,05; roztok stopových prvků 1 ml; fosfátový pufr 1000 ml.

4.1.3 Pro přípravu živných půd, degradačních pokusů, pokusů na přežívání buněk, a stanovení chloridů

Pro přípravu živných půd:

Tryptone Yeast extract Agar (21 g.l⁻¹); destilovaná voda a fenol (10 g.l⁻¹).

Pro degradační pokusy a pokusy na přežívání buněk:

MML; destilovaná voda; fenol (50 g.l⁻¹); fyziologický roztok; mikrobiální kultura *Comamonas testosteroni* RF2; neznámé mikrobiální konsorcium VMZ; metanolicke roztoky cDCE (192,6 mg.l⁻¹; 204,5 mg.l⁻¹; 2,45 g.l⁻¹); tDCE (192,7 mg.l⁻¹; 1927 mg.l⁻¹); 1,1DCE (190 mg.l⁻¹; 192,2 mg.l⁻¹; 1900 mg.l⁻¹) a vodný roztok TCE (1,1 g.l⁻¹).

Pro stanovení chloridů:

BMM, destilovaná voda, fenol (50 g.l⁻¹), fyziologický roztok, mikrobiální kultura *Comamonas testosteroni* RF2 metanolický roztok cDCE (192,6 mg.l⁻¹).

4.1.4 Bakteriální kultury

V práci byla použita bakteriální kultura *Comamonas testosteroni* RF2, získaná na FT UTB v průběhu předchozích DP (DP Vít) a uložena na ÚIOŽP v mrazicím boxu v glycerolu při -80°C.

Byla též použita směsná bakteriální kultura VMZ, získaná v průběhu této DP.

4.2 Metody měření

4.2.1 Metodika měření na plynovém chromatografu HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II s koncentrátorem TECKMAR LSC 2000

Kapalné vzorky o objemu 5 ml, jež byly určeny pro zhotovení kalibračních křivek a stanovení vstupních a zbytkových koncentrací dichlorethylenů a trichloretylenu, byly podrobeny analýze plynovou chromatografií. Pro analýzu těchto vzorků byl využíván plynový chromatograf HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II s následným vybavením: kapilární kolona QUADREX (stacionární fáze – Methyl Pehynyl Cyanopropyl Silicone) délka 30 m, vnitřní průměr 530 μm, tloušťka filmu 3 μm; koncentrátor TECKMAR LSC 2000; dvouliniový integrátor HEWLETT PACKARD 3396; detektor elektronového záchytu (ECD).

Koncentrátor TECKMAR LSC 2000 je řízen mikroprocesorem a prochází automaticky jednotlivými kroky. Je připojen k tlakové lahvi s inertním plynem (dusíkem), který je současně stripovacím i nosným plynem a je propojen pomocí vyhřívací trubice s kolonou plynového chromatografu. Operační systém koncentrátoru prochází postupnými kroky: STANDBY; PURGE READY; PURGE; DESORB READY; DESORB PREHEAT; DESORB; INJECT; BAKE [61].

Před samotným měřením byly nastaveny parametry pro plynový chromatograf HP 5890 SERIES II; integrátor HP 3396 SERIES II; koncentrátor TECKMAR LSC 2000. Tyto parametry jsou uvedeny níže a byly neměnné pro všechny experimentální pokusy.

Nastavení parametrů plynového chromatografu HP 5890 SERIES II:

OVEN TEMP 35 °C; INIT VALUE 35 °C; INIT TIME 10 min; RATE 4 DEG/min; FINAL TEMP 150 °C; FINAL VALUE 150; FINAL TIME 5,00; INJ A TEMP OFF; INJ B TEMP OFF; DET A TEMP OFF; DET B TEMP 250 °C; DET A (FID) OFF; DET B (ECD) ON.

Nastavení parametrů integrátoru HP 3396 SERIES II:

[ZERO] **5** – nastavení pozice chromatografické základní linie na papíru. [ATT2] **7** – nastavení citlivosti záznamu. [CHT SP] **0.3** – definice rychlosti papíru. [AR REJ] **80000** - definice minimální plochy pro záznam peaků. [THRSH] **2** – definice minimální šířky pro detekci peaků. [PKWD] **0.04** – nastavení očekávané šířky peaků na hodnotu optimální pro kvantifikaci.

Nastavení parametrů koncentrátoru TECKMAR LSC 2000:

STANDBY 35 °C; PURGE 11 min; DRY PURGE 4 min; DESORB PREAHEAT 245 °C; DESORB 4 min 250 °C; BAKE 4 min 260 °C; AUTO DRAIN ON; VALVE 150 °C; LINE 150 °C.

4.2.2 Příprava standardních roztoků dichlorethylenů a směsného vzorku s trichlorethylenem

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky dichlorethylenů o koncentraci 20 g.l⁻¹. Zředěním těchto roztoků metanolem (10x; 100x) byly získány standardní roztoky o koncentracích 2 g.l⁻¹ a 200 mg.l⁻¹. Všechny roztoky byly připraveny ve vialkách opatřených speciálními uzávěry ON/OFF a plynotěsnými septy. Tyto vialky byly dodány firmou SUPELCO.

Do vialek určených pro přípravu zásobních roztoků byly pipetovány 2 ml metanolu. Napietované množství metanolu, bylo zváženo na analytických vahách Sartorius. Po zvážení hmotnosti metanolu, bylo pomocí plynotěsného dávkovače (HAMILTON – BONADUZ, Switzerland) přidáno 32 µl cis-1,2-dichlorethylenu a tento přírůstek byl opět zvážen. Ze získaných dat byla vypočtena skutečná koncentrace cDCE v zásobním roztoku. Standardní roztok cDCE o koncentraci 200 mg.l⁻¹ byl připraven přidáním 0,02 ml zásobního roztoku do 1,98 ml metanolu, respektive přidáním 0,2 ml zásobního roztoku do 1,8 ml metanolu pro standardní roztok cDCE o koncentraci 2 g.l⁻¹.

Standardní roztoky trans-1,2-dichlorethylenu a 1,1-dichlorethylenu byly získány identickým způsobem. Pro přípravu směsného standardu dichlorethylenů s trichlorethylenem byl

použit standardní roztok cDCE (204,5 mg.l⁻¹), zásobní roztoky tDCE a 1,1DCE (2 g.l⁻¹) a vodný roztok TCE (1,1 g.l⁻¹).

4.2.3 Zhotovení kalibračních křivek

Pro zhotovení kalibračních křivek bylo pomocí plynotěsného dávkovače dávkováno 5 ml kapalných vzorků do koncentrátoru TECKMAR LSC 2000, propojeného s plynovým chromatogramem HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II. Jednotlivé vzorky obsahovaly 5 ml převařené destilované vody a různé objemové množství dichlorethylenů ($V = 0,5; 1; 2; 4 \mu\text{l}$). Tímto bylo dosaženo roztoků o různých koncentracích ($c = 20; 40; 80; 160 \mu\text{g.l}^{-1}$), respektive ($c = 200; 400; 800; 1600 \mu\text{g.l}^{-1}$). Pro každou koncentraci bylo provedeno minimálně dvojí měření a ze získaných výsledků byly zhotoveny kalibrační křivky znázorňující závislost plochy peaku na koncentraci. Z těchto křivek byly odečteny vhodné vstupní koncentrace dichlorethylenů a trichlorethylenu pro degrační pokusy.

4.2.4 Sterilizace pokusných vialek a uzávěrů s plynotěsnými septy

Vialky o objemu 40 ml byly sterilizovány v horkovzdušné troubě MORA při teplotě 180°C po dobu 3 hodin. Uzávěry s plynotěsnými septy byly sterilizovány UV zářením v mikrobiologickém bezpečnostním boxu Telstar Bio-II-A po dobu 30 minut. Takto vysterilizované vialky a uzávěry s plynotěsnými septy byly používány pro všechny níže popsané experimentální pokusy.

4.2.5 Kometabolická degradace dichlorethylenů, směsného vzorku s trichlorethylenem a kontrola degračních těchto látek bez účasti fenol oxygenasy

Následný text popisuje přípravu pokusů na kometabolickou degradaci cDCE a kontrolu degradace cDCE bez účasti fenol oxygenasy. Příprava těchto pokusů s tDCE, 1,1DCE a směsným vzorkem obsahujícím jednotlivé dichlorethyleny a trichlorethylen proběhla totožně.

Stanovení vstupních koncentrací cDCE:

Do vialek bylo dávkováno 10 ml destilované vody, odebráno 70 μl a přidáno 70 μl standardního roztoku cDCE. Stanovení vstupních koncentrací cDCE proběhlo během 24 od přípravy vialek. Vstupní koncentrace byly stanoveny pomocí plynové chromatografie a to dávkováním 5 ml kapalně fáze do koncentrátoru, s použitím vhodného ředění.

Kometabolická degradace cDCE:

Do vialek bylo dávkováno 10 ml MML; odebráno 100 μ l a přidáno 20 μ l roztoku fenolu (50 g.l⁻¹); 10 μ l bakteriální suspenze obsahující *Comamonas testosteroni* RF2 (bakteriální suspenze RF2) nebo směsné kultury VMZ a 70 μ l standardního roztoku cDCE. Vzorky ve vialkách byly kultivovány 7 dnů za pravidelného promíchávání na třepačce GFL 320 (100 ot/min, režim 15 min pohyb/15min klid), při teplotě 25°C a následně analyzovány na plynovém chromatografu, stejným způsobem jako vzorky pro stanovení vstupních koncentrací cDCE.

Kontrola degradace cDCE:

Do vialek bylo dávkováno 10 ml MML; odebráno 80 μ l a přidáno 10 μ l bakteriální suspenze RF2 a 70 μ l standardního roztoku cDCE. Kultivace vzorků a jejich analýza byla totožná s pokusy na kometabolickou degradaci.

4.2.6 Ověření míry přežívání buněk

Pokusy na ověření míry přežívání buněk byly provedeny se všemi dichlorethyleny a se směsným vzorkem obsahujícím jednotlivé dichlorethyleny a trichlorethylen. Rovněž je uvedena pouze příprava pokusu s cDCE.

Přežívání buněk ve vialkách s cDCE:

Do vialek bylo dávkováno 10 ml MML; odebráno 100 μ l a přidáno 20 μ l roztoku fenolu (50 g.l⁻¹), 10 μ l bakteriální suspenze RF2 a 70 μ l standardního roztoku cDCE.

Přežívání buněk ve vialkách bez cDCE:

Do vialek bylo dávkováno 10 MML; odebráno 30 μ l a přidáno 20 μ l roztoku fenolu (50 g.l⁻¹) a 10 μ l bakteriální suspenze RF2.

Vzorky ve vialkách byly kultivovány 7 dnů za podmínek uvedených výše. Po skončení doby kultivace bylo z každé vialky odebráno po 0,1 ml vzorku, které byly zředěny v sérii zkumavek s obsahem 0,9 ml fyziologického roztoku tak, aby se dosáhlo potřebného zředění vzhledem k charakteru kultivace. Z vhodných zkumavek bylo vyočkováno 0,1 ml suspenze do misek s předem připraveným živným agarem. Misky byly kultivovány v termostatu BT 120 za psychrofilních podmínek po dobu 3 dnů a následně byly odečteny počty kolonií, z nichž byl přepočten počet jednotek tvořících kolonie (KTJ) v 1 ml vzorku.

4.2.7 Stanovení produkce chloridů

Pokus na stanovení produkce anorganických chloridů z degradace cis-1,2-dichlorethylenu proběhl následovně: Bylo připraveno pět sérií vialek. První série sloužila pro stanovení vstupní koncentrace cDCE, jež proběhlo do 24 hodin od samotné přípravy na plynovém chromatografu. Ostatní série vialek byly kultivovány po dobu sedmi dnů, tak jako v případě degradačních pokusů. V těchto sériích byl zkoumán úbytek cDCE (plynovou chromatografií), dále byla zkoumána spontánní hydrolysa cDCE a produkce chloridů z rozkladu cDCE na izotachoforetickém analyzátoru EA100. Byla rovněž zkoumána přirozená produkce chloridů buňkami, bez přítomnosti cis-1,2-dichlorethylenu (izotachoforetický analyzátor EA100). Příprava vialek pro vstupní koncentrace byla totožná jako pro degradační pokusy (viz. výše).

Měření úbytku cDCE a produkce anorganických chloridů:

Do vialek bylo dávkováno 10 ml BMM, odebráno 110 μl a přidáno 10 μl 10%-tního roztoku laktátu sodného, 20 μl zásobního roztoku fenolu (50 g.l^{-1}), 10 μl bakteriální suspenze RF2 a 70 μl standardního roztoku cDCE ($192,6 \text{ mg.l}^{-1}$).

Kontrola spontánní hydrolysy:

Do vialek bylo dávkováno 10 ml destilované vody, odebráno 70 μl a přidáno 70 μl standardního roztoku cDCE ($192,6 \text{ mg.l}^{-1}$).

Měření přirozené produkce anorganických chloridů:

Do vialek bylo dávkováno 10 ml BMM, odebráno 40 μl a přidáno 10 μl 10%-tního roztoku laktátu sodného, 20 μl zásobního roztoku fenolu (50 g.l^{-1}) a 10 μl bakteriální suspenze RF2.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Vyjadřování koncentrací dichlorethylenů a trichlorethylenů

Ve výsledcích a diskusích jsou uváděny pojmy jako celková vstupní koncentrace a koncentrace v kapalně fázi. Pro osvětlení, co je myšleno pod těmito pojmy, je třeba uvést, že oba tyto pojmy značí koncentrace dichlorethylenů a trichlorethylenů v pokusných vialkách. Pojem celková vstupní koncentrace značí takovou koncentraci dichlorethylenů či trichlorethylenů, kdyby veškerý zůstal v kapalně fázi, doslova „vše v kapalně fázi“. Celková vstupní koncentrace je v diskusích a výsledcích uváděna pod zkratkou CK. Pod pojmem koncentrace v kapalně fázi, je myšlena koncentrace dichlorethylenů či trichlorethylenů ve vodně fázi, po ustálení rovnováhy mezi kapalnou a plynnou fázi, a ve výsledcích a diskusích je uváděna pod zkratkou KF.

5.2 Experimentální pokusy s cis-1,2-dichlorethylenem

Kometabolická degradace cis-1,2-dichlorethylenů

Bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 byla podrobena třem pokusům na kometabolickou degradaci cis-1,2-dichlorethylenů. Ta byla provedena rostoucími buňkami, které byly kultivovány v minerálním médiu s přidavkem laktátu sodného a fenolu (každý substrát 100 mg.l⁻¹) a uvedeného cDCE. V prvních dvou pokusech byly použity celkové vstupní koncentrace 0,960 mg.l⁻¹ a 1,432 mg.l⁻¹ cDCE. Vzhledem k dobrým výsledkům, získaným z těchto pokusů, byl proveden třetí pokus o celkové vstupní koncentraci 14,32 mg.l⁻¹ cDCE. Kromě pokusů na kometabolickou degradaci cDCE bakterií *Comamonas testosteroni* RF2, byl proveden pokus s neznámou směsnou kulturou, která byla náhodně získána během experimentálních pokusů a byla pojmenována VMZ. Neznámé bakteriální konsorcium VMZ bylo testováno na kometabolickou degradaci cDCE o celkové vstupní koncentraci 0,960 mg.l⁻¹ postupem identickým jako v případě kultury RF2.

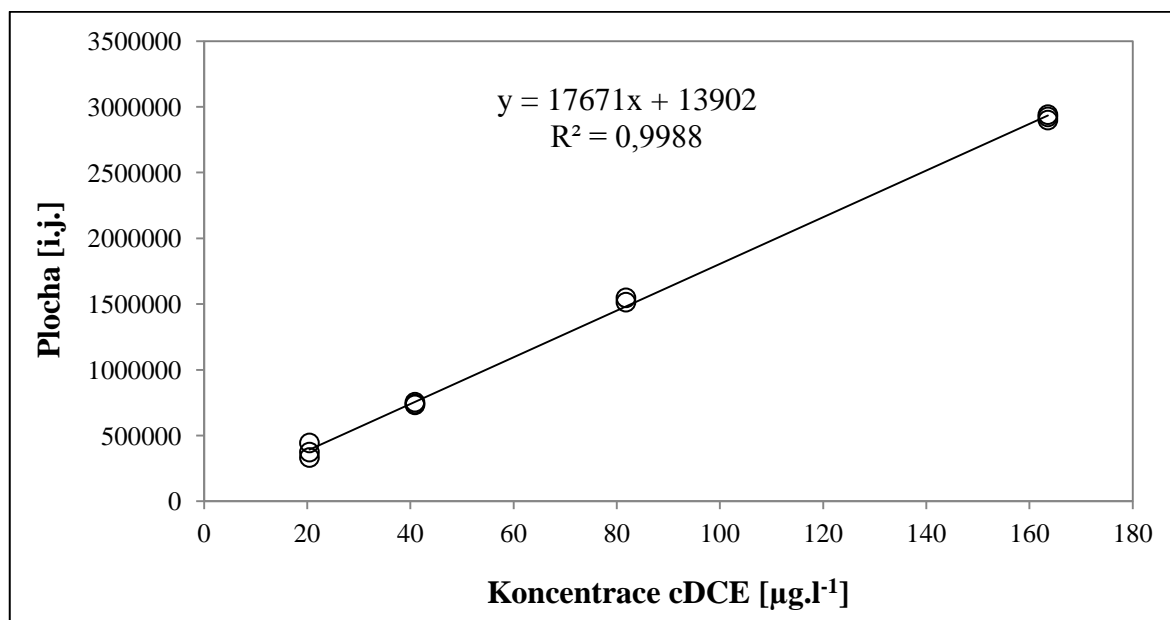
Kometabolická degradace cis-1,2-dichlorethylenů (0,949 mg.l⁻¹; 1,424 mg.l⁻¹ KF) bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ

Byly připraveny standardní roztoky cis-1,2-dichlorethylenů o koncentracích 204,5 mg.l⁻¹, 2045 mg.l⁻¹. Z těchto roztoků byly zhotoveny kalibrační křivky závislosti plochy peaku na koncentraci cDCE (Obr. 16, Obr. 17). Data naměřená pro zhotovení kalibračních křivek jsou uvedena v Tab. 5, Tab. 6. Na kalibračních křivkách jsou mimo jiné vyznačeny celkové

vstupní koncentrace (CK) a koncentrace cDCE v kapalně fázi (KF). Celý pokus sestával z 25 pokusných vialek, přičemž vialky č. 1 – 10 sloužily pro stanovení vstupních koncentrací cDCE ve vodné fázi a výsledky jsou uvedeny v Tab. 7. Vialky č. 11 – 15 byly určeny pro kometabolickou degradaci cDCE ($0,949 \text{ mg.l}^{-1}$ KF) bakterií RF2 a vialky č. 16 – 20 pro kometabolickou degradaci cDCE o stejné vstupní koncentraci v kapalně fázi, avšak se směsnou kulturou VMZ. Vialky č. 21 – 25 byly určeny pro kometabolickou degradaci cDCE ($1,424 \text{ mg.l}^{-1}$ KF) bakterií RF2. Ve vialkách č. 11 – 25 byl zkoumán úbytek cis-1,2-dichlorethylenu a výsledky z těchto měření jsou uvedeny v Tab. 8, Tab. 9.

Tab. 5. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o nízkých koncentracích cDCE

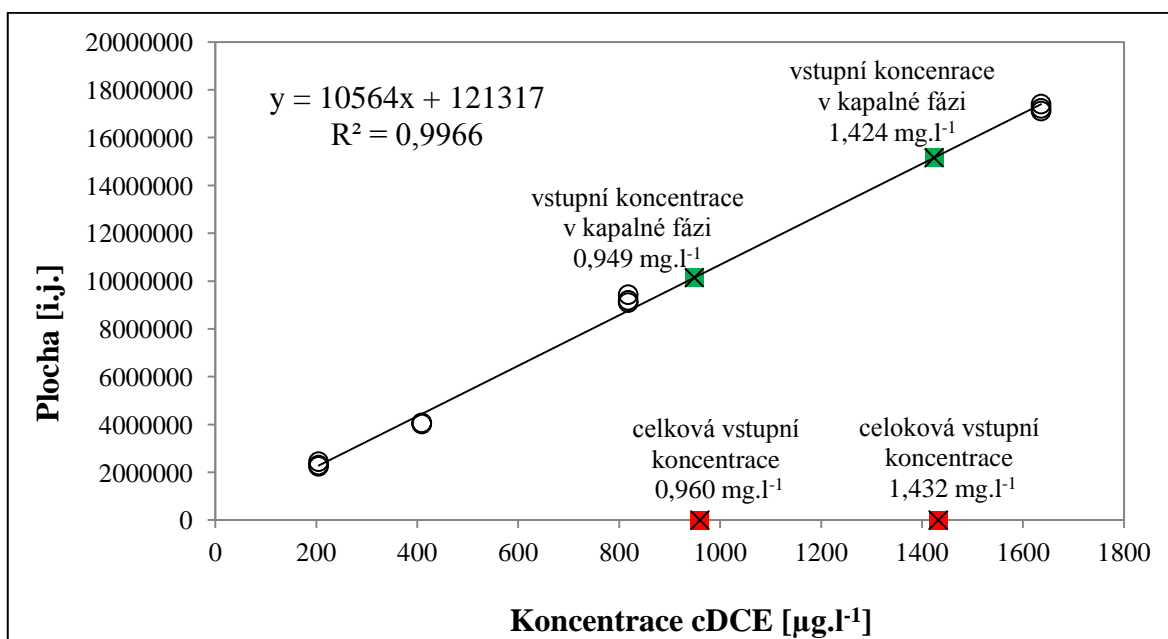
Koncentrace cDCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Číslo měření		
	Plocha peaku [i.j]		
	1	2	3
20,45	374050	332769	443559
40,90	733177	753501	740335
81,80	1514418	1547242	-
163,6	2940721	2899506	2923440



Obr. 16. Kalibrační křivka pro nízké koncentrace cDCE

Tab. 6. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o vyšších koncentracích cDCE

Koncentrace cDCE [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Číslo měření		
	Plocha peaku [i.j.]		
	1	2	3
204,5	2255878	2308345	2450972
409,0	4026674	4073145	4059766
818,0	9436499	9105332	9199151
1636,0	17409609	17229817	17118032



Obr. 17. Kalibrační křivka pro vyšší koncentrace cDCE

Tab. 7. Vstupní koncentrace cDCE v kapalně fázi pro kometabolickou degradaci

Č. v.	Plocha peaku pro cDCE 0,949 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [i.j.]	Č. v.	Plocha peaku pro cDCE 1,424 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [i.j.]
1	-	6	16800512
2	9600352	7	13692080
3	10262664	8	12922856
4	10354168	9	15049835
5	10374536	10	17358752
\emptyset	10147930	\emptyset	15164807

Z rovnice regrese uvedené na Obr. 17 byly vypočteny vstupní koncentrace cDCE v kapalně fázi:

$$y = 10564x + 121317$$

$$x_1 = \frac{10147930 - 121317}{10564} = \underline{\underline{0,949 \text{ mg.l}^{-1} \text{ cDCE}}}$$

$$x_2 = \frac{15164807 - 121317}{10564} = \underline{\underline{1,424 \text{ mg.l}^{-1} \text{ cDCE}}}$$

Po stanovení vstupních koncentrací cDCE v kapalně fázi byly zkoumány zbytkové koncentrace cDCE po proběhlé kometabolické degradaci, a to ve vialkách č. 11 - 25. Po sedmidenní kultivaci vialek byly získány výsledky, jež jsou uvedeny v Tab. 8 a Tab. 9.

Tab. 8. Kometabolická degradace cDCE (0,949 mg.l⁻¹ KF) bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ

Č. vialky		Koncentrace cDCE po 7 denní kultivaci [mg.l ⁻¹]		Odstranění cDCE [%]	
RF2	VMZ	RF2	VMZ	RF2	VMZ
11	16	0	0	100	100
12	17	0	0	100	100
13	18	0	0	100	100
14	19	0	0	100	100
15	20	0	0	100	100
∅		0	0	100	100

Z výsledků uvedených v Tab. 8 je patrné, že bakterie RF2 i neznámá směsná bakteriální kultura VMZ byly schopny během sedmi dnů kometabolicky odstranit veškerý cis-1,2-dichlorethylen o vstupní koncentraci 0,949 mg.l⁻¹ v kap. fázi. Plochy peaků pro toto měření byly nulové a nejsou uvedeny.

Tab. 9. Kometabolická degradace cDCE (1,424 mg.l⁻¹ KF) bakterií RF2

Č. vialky	Koncentrace cDCE po 7 denní kultivaci [mg.l ⁻¹]	Degradace cDCE [%]
21	0	100
22	0	100
23	0	100
24	0	100
25	0	100
∅	0	100

S odkazem na výsledky uvedené v Tab. 9, lze konstatovat, že bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 byla schopna během sedmi dnů kometabolicky odstranit veškerý cis-1,2-

dichlorethylen o vstupní koncentraci $1,424 \text{ mg.l}^{-1}$ v kap. fázi. Plochy peaků pro toto měření byly nulové a nejsou uvedeny.

Míra přežívání buněk v prostředí s cis-1,2-dichlorethylenem ($1,432 \text{ mg.l}^{-1}$ CK)

Pokus na míru přežívání buněk bakterie RF2 s cis-1,2-dichlorethylenem sestával ze 4 vialek. Vialky č. 1 – 2 byly kultivovány bez přídavku cDCE v minerálním médiu s obsahem laktátu sodného 10%-roztoku a fenolu. Ve vialkách č. 3 – 4 byla testována míra přežívání buněk bakterie RF2 po proběhlé kometabolické degradaci cDCE o celkové vstupní koncentraci $1,432 \text{ mg.l}^{-1}$. Výsledky z pokusu jsou uvedeny v Tab. 10. a udávají počty kolonií tvořící jednotky v 1 ml vzorku (KTJ.cm^{-3}).

Tab. 10. Míra přežívání buněk bakterie RF2 s cDCE ($1,432 \text{ mg.l}^{-1}$ CK)

Č. vialky	Látka	Desetinné ředění		
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
		[KTJ.cm^{-3}]		
1	bez cDCE	Neodečitatelné	134	8
2	bez cDCE	Neodečitatelné	79	13
ø	bez cDCE	-	106,5	10,5
3	s cDCE	Neodečitatelné	123	12
4	s cDCE	Neodečitatelné	129	9
ø	s cDCE	-	126	10,5

Desetinné ředění 10^{-5} nebylo dostačující pro odečet počtu KTJ. Ve vialkách č. 1 - 2 bylo odečteno $106,5 \cdot 10^6 \text{ KTJ.cm}^{-3}$, respektive $10,5 \cdot 10^7 \text{ KTJ.cm}^{-3}$. Ve vialkách č. 3 – 4 bylo odečteno $126 \cdot 10^6 \text{ KTJ.cm}^{-3}$, respektive $10,5 \cdot 10^7 \text{ KTJ.cm}^{-3}$. Výsledky z pokusu nenaznačují, že by přítomnost a degradace cDCE v použité koncentraci byla toxická pro buňky bakterie RF2. Jinými slovy, přítomnost a degradace cDCE neměla vliv na počty přeživších buněk.

Degradace cis-1,2-dichlorethylenu ($956,8 - 1722 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ KF) bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy

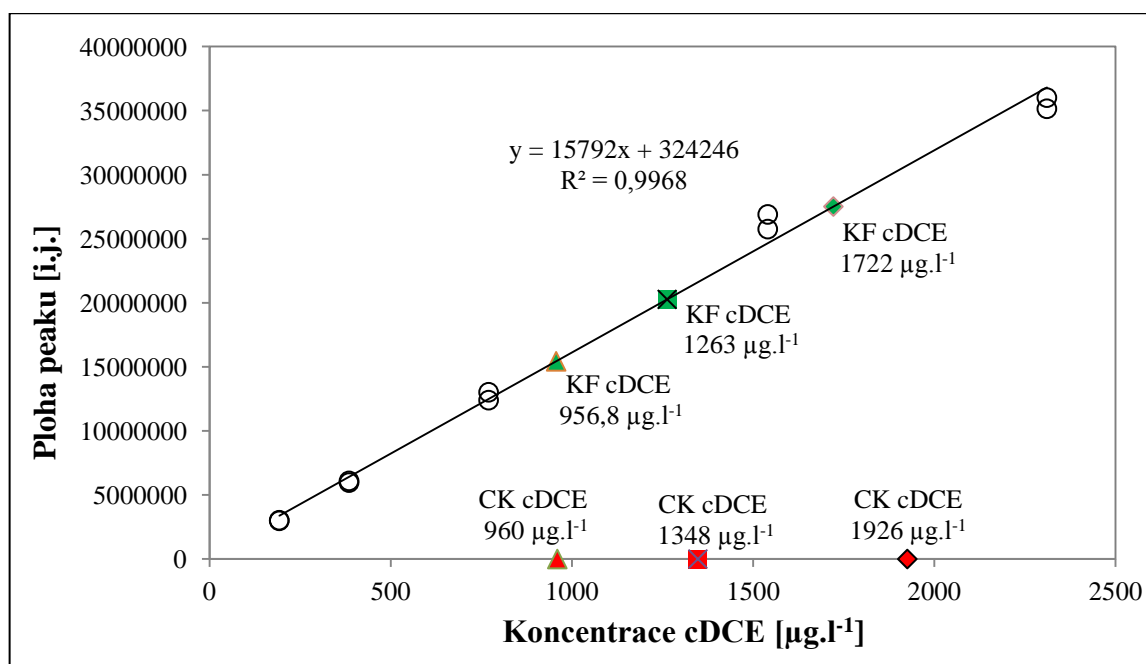
Vzhledem k výměně TRAPU na plynovém chromatografu HEWLETT PACKARD 5890 SERIES II musela být provedena nová kalibrace standardního roztoku cDCE. Byl připraven standardní roztok cDCE (1926 mg.l^{-1}), který sloužil pro zhotovení kalibrační křivky (Obr. 18). Naměřená data pro zhotovení kalibrační křivky jsou uvedena v Tab. 11.

Pokus na degradaci cDCE bez účasti fenol oxygenasy byl proveden v osmnácti vialkách. Do vialek č. 1 – 3 a 10 - 12 byly dávkovány celkové vstupní koncentrace cDCE ($0,960$

mg.l⁻¹), do vialek č. 4 – 6 a 13 – 15 byly dávkovány celkové vstupní koncentrace cDCE (1,348 mg.l⁻¹) a do vialek č. 7 – 9 a 16 – 18 byly dávkovány celkové vstupní koncentrace cDCE (1,926 mg.l⁻¹). Ve vialkách č. 1 – 9 byly stanoveny vstupní koncentrace cDCE v kapalně fázi, výsledky z tohoto měření jsou uvedeny v Tab. 12. Ve vialkách č. 10 – 18 byl zkoumán úbytek cDCE a výsledky jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab. 11. Naměřené hodnoty pro novou kalibrační křivku o vyšších koncentracích cDCE

Koncentrace cDCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Číslo měření	
	Plocha peaku [i.j.]	
	1	2
192,6	3028216	2982933
385,2	6099263	5966720
770,4	12401368	13017554
1540,8	26901712	25756584
2311,2	35150317	36018967



Obr. 18. Nová kalibrační křivka pro cDCE o vyšších koncentracích

Tab. 12. Stanovení vstupních koncentrací cDCE v kap. fázi. (degradace bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy)

Č. vialky	Plocha peaku cDCE [i.j.]	Vstupní koncentrace cDCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
1	15247868	956,8
2	15934622	
3	15117293	
4	20380086	1263,1
5	19841955	
6	20591217	
7	28214935	1722,0
8	27423318	
9	26913741	

Vstupní koncentrace uvedené v Tab. 12 byly vypočteny z průměru ploch peaků dosažených do rovnice regrese uvedené na Obr. 18.

Tab. 13. Degradace cDCE bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy

Č. vialky	Plocha peaku cDCE [i.j.]	Koncentrace cDCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Odstranění cDCE [%]	
10	7333760	443,90	53,61	72,94
11	2448258	153,00	84,01	
12	3147848	180,00	81,19	
13	18175359	1130,00	10,33	13,12
14	17098434	1062,20	15,90	
15	20872168	-	-	
16	24669411	1541,60	10,48	9,51
17	25147901	1571,90	8,72	
18	24978839	1561,20	9,34	

Z výsledků uvedených v Tab. 13 vyplývá, že bakterie RF2 byla schopna rozložit 72,92% z původně stanovených 956,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ cDCE v kap. fázi. Ve vialkách o vstupních koncentracích 1263,1 a 1722,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$ cDCE v kap. fázi, došlo k výraznému snížení procentuálního odstranění této látky. Ve vialkách č. 13 – 15 bylo průměrně odstraněno 13,12% cDCE, přičemž ve vialce č. 15 nedošlo k degradaci cDCE vůbec a tento výsledek nebyl brán v potaz při vyhodnocování konečných výsledků. Ve vialkách č. 16 – 18 bylo průměrně odstraněno 9,51% cDCE. Výrazný rozdíl v míře odstranění cDCE mohl být zapříčiněn více faktory. Jednak vstupní koncentrace cDCE v kap. fázi byla postupně mírně navyšována a zároveň mohla sehrát svoji roli samotná fyziologická kondice buněk bakterie RF2. Vstupní koncentraci

trance cDCE $956,8 \mu\text{g.l}^{-1}$ byla podrobena degradaci bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy jako první a až po získaných výsledcích byly provedeny další degradace cDCE o vstupních koncentracích v kap. fázi $1263,1$ a $1722,0 \mu\text{g.l}^{-1}$. Tudíž byla použita nově připravená suspenze bakterií RF2, což mohlo mít v konečném důsledku vliv na získané výsledky pro míru odstranění cDCE. Není však pochyb o tom, že bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 je schopna do určité míry odstranit nižší koncentrace cis-1,2-dichlorethylenu i bez účasti fenol oxygenasy.

Stanovení chloridů

Celý pokus na stanovení produkce chloridů sestával z patnácti vialek. Vialky č. 1 – 3 sloužily pro stanovení vstupní koncentrace cDCE v kapalně fázi a výsledky z tohoto měření jsou uvedeny v Tab. 14. Vialky č. 4 – 6 byly určeny pro kometabolickou degradaci cDCE bakterií RF2 a byl v nich zkoumán jeho úbytek. Vialky č. 7 – 9 byly určeny pro kontrolu případné spontánní hydrolysy cDCE. Ve vialkách č. 10 – 12 byly měřeny chloridy po proběhlé kometabolické degradaci cDCE a ve vialkách č. 13 – 15 byla měřena přirozená produkce chloridů buňkami.

Tab. 14. Vstupní koncentrace cDCE v kap. fázi

Číslo vialky	Plocha peaku cDCE [i.j]	Koncentrace cDCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
1	16149702	978,14
2	15673485	
3	15490112	

Vstupní koncentrace cDCE ($978,14 \mu\text{g.l}^{-1}$ KF) byla vypočtena dosazením průměrné hodnoty z naměřených ploch peaků do rovnice regrese uvedené na Obr. 18. Bakterie RF2 kometabolicky odstranila veškerých $978,14 \mu\text{g.l}^{-1}$ cDCE ve vialkách č. 4 - 6, čímž bylo potvrzeno, že degradace opravdu proběhla (data neuvedena).

Tab. 15. Stanovení anorganických chloridů

Měření	Číslo vialky	Koncentrace Cl^- [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
Kontrola hydrolysy cD-CE	7	0
	8	0
	9	0
Měření chloridů po proběhlé kometabolické degradaci cDCE	10	0
	11	200
	12	0

Měření	Číslo vialky	Koncentrace Cl^- [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	
Měření přirozené produkce chloridů buňkami bakterie RF2	13	0	0
	14	0	
	15	0	

Výsledky ze stanovení anorganických chloridů (Tab. 15) jsou natolik rozdílné, že nedovolují provést exaktní závěr z tohoto měření. Pouze ve vialce č. 11 byla naměřena nenulová koncentrace chloridů a to konkrétně $200 \mu\text{g.l}^{-1} \text{Cl}^-$. I za předpokladu, že by podobná koncentrace chloridů byla nalezena ve vialkách č. 10 a 12, byl by tento výsledek v rozporu s dříve prověřenou kometabolickou degradací cDCE (veškerý cDCE byl odstraněn) a odhadovanou teoretickou koncentrací anorganických chloridů $700 \mu\text{g.l}^{-1}$. Čistě teoreticky, uvolněné chloridy mohly zůstat v bakteriálních buňkách. Závěrem lze pouze konstatovat, že by bylo třeba tento pokus zopakovat a to s provedenou hydrolysou buněk a následným měřením chloridů, což však již z časových důvodů nebylo možné.

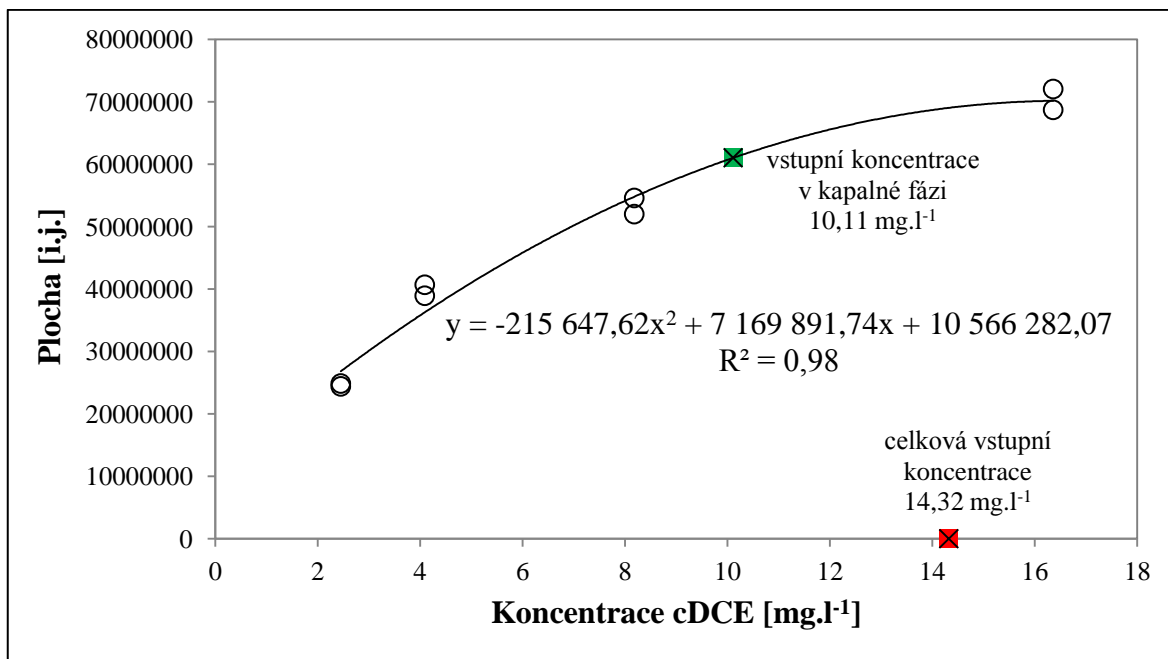
Kometabolická degradace cDCE ($10,11 \text{ mg.l}^{-1}$ KF) bakterií RF2

Pro třetí pokus na kometabolickou degradaci cDCE ($10,11 \text{ mg.l}^{-1}$ KF) bakterií RF2 byla nejprve zhotovena kalibrační křivka (Obr. 19), ta byla zhotovena ze zásobního roztoku cDCE o koncentraci $20,45 \text{ g.l}^{-1}$. Data pro její sestavení jsou uvedena v Tab. 16.

Samotný pokus sestával z deseti vialek, z čehož vialky č. 1 – 5 sloužily pro stanovení vstupní koncentrace cDCE v kapalně fázi a výsledky jsou uvedeny v Tab. 17. Vialky č. 6 – 10 byly určeny pro kometabolickou degradaci a byl v nich zkoumán úbytek cDCE, výsledky jsou uvedeny v Tab. 18.

Tab. 16. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o vysokých koncentracích cDCE

Koncentrace cDCE [mg.l^{-1}]	Číslo měření	
	Plocha peaku [i,j]	
	1	2
2,45	24855040	24401200
4,09	38915680	40671744
8,18	54571728	51987488
16,36	68687168	72022080



Obr. 19. Kalibrační křivka pro vysoké koncentrace cDCE

Tab. 17. Vstupní koncentrace cDCE (10,11 mg.l⁻¹ KF)

Č. vialky	Plocha peaku [i,j]
1.	56404960
2.	62578240
3.	59386528
4.	63554712
5.	63144982
σ	6103884

Z rovnice regrese uvedené na Obr. 19 byla vypočtena vstupní koncentrace cDCE v kapalné fázi:

$$y = -215647,62x^2 + 7169891,74x + 10566282,07$$

$$-215647,62x^2 + 7169891,74x - 50447601,94$$

$$\sqrt{D} = \sqrt{7169891,74^2 - [4 * (-215647,62) * (-50447601,94)]} = \underline{2809221,67}$$

$$x_1 = \frac{-7169891,74 + 2809221,67}{2 * (-215647,62)} = \underline{\underline{10,11 \text{ mg.l}^{-1}}}$$

Po týdenní kultivaci vialek připravených pro kometabolickou degradaci cDCE byly zjištěny tyto výsledky:

Tab. 18. Kometabolická degradace cDCE (10,11 mg.l⁻¹ KF) bakterií RF2

Č. v.	Plocha peaku [i,j]	Koncentrace cDCE po 7 denní kultivaci [mg.l ⁻¹]	Odstranění cDCE [%]
6.	62478217	10,65	0,00
7.	60464759	9,91	1,98
8.	58268254	9,19	9,10
9.	61557801	10,31	0,00
10.	60959807	10,09	0,20

Výsledky, jež jsou uvedeny v Tab. 18, byly získány výpočtem z naměřených ploch peaků, stejně jako byla vypočtena vstupní koncentrace cDCE v kapalné fázi. Je patrné, že bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 nebyla schopna kometabolicky odstranit cis-1,2-dichlorethylen o vstupní koncentraci 10,11 mg.l⁻¹. Taková vstupní koncentrace cDCE se tedy jeví jako toxická. Výsledek z vialky č. 8, kde došlo k 9,10 %- nímu odstranění cDCE byl s největší pravděpodobností způsoben nepřesností během měření.

5.3 Experimentální pokusy s trans-1,2-dichlorethylenem

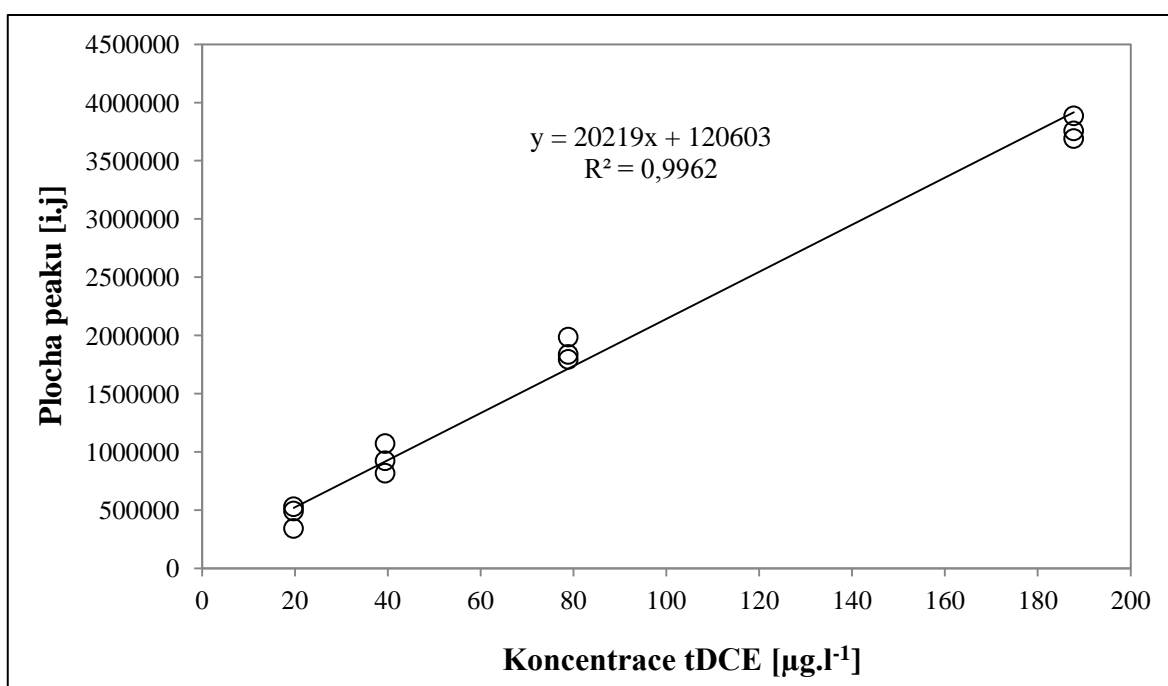
Kometabolická degradace trans-1,2-dichlorethylenu (0,968 mg.l⁻¹ KF) bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ

Bakterie RF2 a neznámá směná kultura VMZ byly podrobeny pokusu na kometabolickou degradaci trans-1,2-dichlorethylenu o celkové vstupní koncentraci 1,38 mg.l⁻¹. Nejprve byly připraveny standardní roztoky o koncentracích 197,2 mg.l⁻¹ a 1972 mg.l⁻¹ tDCE. Z těchto roztoků byly zhotoveny kalibrační křivky (Obr. 20, Obr. 21). Data pro zhotovení těchto křivek jsou uvedena v Tab. 19, Tab. 20.

Celý pokus byl proveden v patnácti vialkách, přičemž vialky č. 1 – 5 sloužily pro stanovení vstupní koncentrace tDCE v kapalné fázi a výsledky z tohoto měření jsou uvedeny v Tab. 21. Vialky č. 6 – 10 byly určeny pro kometabolickou degradaci tDCE bakterií RF2 a vialky č. 11 – 15 pro kometabolickou degradaci tDCE směsnou kulturou VMZ. Ve vialkách č. 6 – 15 byl zkoumán úbytek tDCE, výsledky jsou uvedeny v Tab. 22.

Tab. 19. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o nízkých koncentracích tDCE

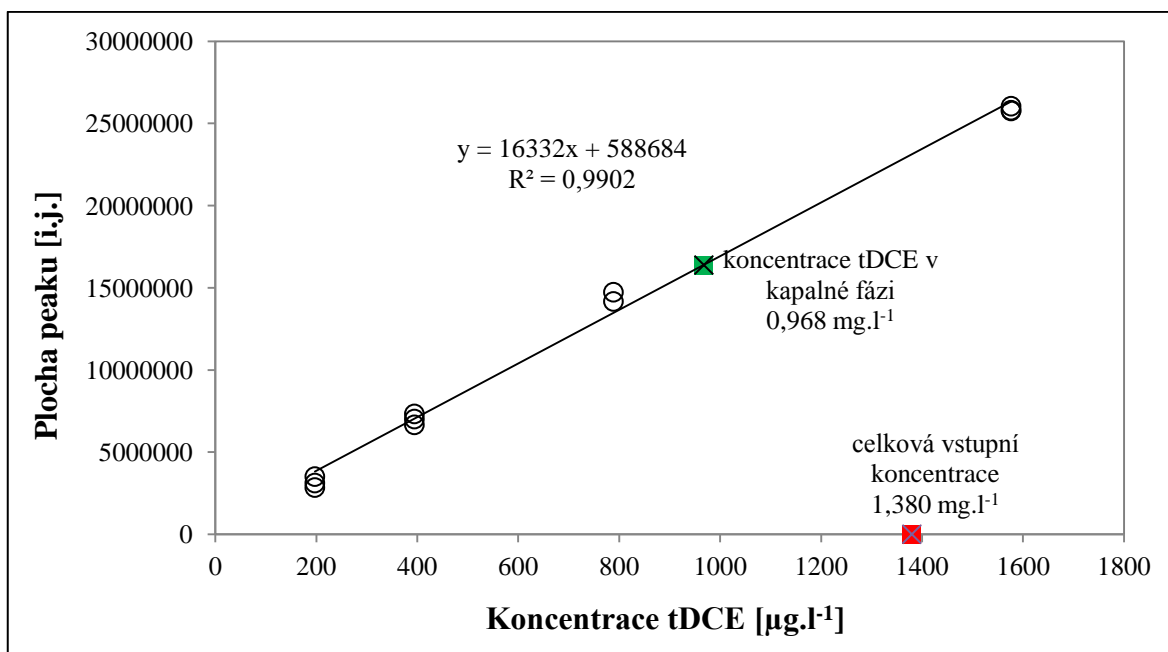
Koncentrace tDCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Číslo měření		
	Plocha peaku [i,j]		
	1	2	3
19,72	529373	342721	492545
39,44	817278	1071798	924112
78,88	1837285	1985904	1794720
187,76	3885942	3690966	3756899



Obr. 20. Kalibrační křivka pro nízké koncentrace tDCE

Tab. 20. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o vyšších koncentracích tDCE

Koncentrace tDCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Číslo měření		
	Plocha peaku [i,j]		
	1	2	3
197,2	3509389	2842133	3115889
394,4	6656874	7321629	7009874
788,8	-	14726608	14165224
1576,6	25799616	25756848	26045243



Obr. 21. Kalibrační křivka pro vyšší koncentrace tDCE

Tab. 21. Vstupní koncentrace tDCE v kap. fázi pro kometabolickou degradaci

Č. vialky	Plocha peaku [i,j]
1.	16109088
2.	16106536
3.	16675384
4.	16332568
5.	16680776
\emptyset	16380870

Z rovnice regrese uvedené na Obr. 21 byla vypočtena vstupní koncentrace tDCE v kapalně fázi:

$$y = 16332x + 588684$$

$$x = \frac{16380870 - 588684}{16322} = \underline{\underline{0,968 \text{ mg.l}^{-1}}}$$

Po stanovení vstupní koncentrace tDCE v kapalně fázi, byly zkoumány zbytkové koncentrace tDCE ve vialkách č. 6 - 15 a to po sedmidenní kultivaci (proběhlé kometabolické degradaci). Výsledky z těchto pokusů jsou uvedeny v Tab. 22.

Tab. 22. Kometabolická degradace tDCE ($0,968 \text{ mg.l}^{-1}$ KF) bakterií RF2 a neznámou směsnou kulturou VMZ

Č. vialky		Plocha peaku [i.j.] Koncentrace tDCE [mg.l^{-1}]				Odstranění tDCE [%]	
RF2	VMZ	RF2		VMZ		RF2	VMZ
6	11	5883296	0,32	7931555	0,45	67,01	53,61
7	12	4695523	0,25	11708152	0,68	74,23	29,91
8	13	4685731	0,25	6390976	0,36	74,23	62,89
9	14	-		6308211	0,33	-	65,98
10	15	4797770	0,26	9991302	0,58	73,20	40,21
∅		5015580	0,27	8466039	0,48	72,17	50,52

Z výsledků v Tab. 22 je zřejmé, že bakterie RF2 kometabolicky odstranila 72,17% tDCE o použité vstupní koncentraci a z původních $0,968 \text{ mg.l}^{-1}$ tDCE zůstalo $0,27 \text{ mg.l}^{-1}$ nerozloženo. Směsná kultura VMZ rozložila 50,52% tDCE o použité vstupní koncentraci, přičemž $0,48 \text{ mg.l}^{-1}$ tDCE zůstalo nerozloženo. V porovnání s cis-1,2-dichlorethylenem, trans-1,2-dichlorethylen podléhá kometabolické degradaci bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ o něco hůře. Podobná vstupní koncentrace, která byla dávkována v tomto pokusu ($0,968 \text{ mg.l}^{-1}$ KF), byla použita i v případě cDCE ($0,949 \text{ mg.l}^{-1}$ KF), kdy došlo k 100%-tnímu odstranění cDCE v porovnání s 72,17%-tním, respektive 50,52%-tním rozložením tDCE bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ.

Míra přežívání buněk bakterie RF2 s tDCE ($1,380 \text{ mg.l}^{-1}$ CK)

Pokus na stanovení míry přežívání buněk bakterie RF2 po proběhlé kometabolické degradaci tDCE ($1,380 \text{ mg.l}^{-1}$ CK) byl proveden totožně jako v případě pokusu na přežívání buněk RF2 s cDCE. Pokus sestával ze čtyř vialek, přičemž vialky č.1 – 2 byly kultivovány bez tDCE a vialky č. 3 – 4 s tDCE.

Tab. 23. Míra přežívání buněk bakterie RF2 s tDCE ($1,380 \text{ mg.l}^{-1}$ CK)

Č. vialky	Látka	Desetinné ředění		
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
[KTJ.cm ⁻³]				
1	bez tDCE	Neprovedeno	63	7
2	bez tDCE	Neprovedeno	74	8
∅	bez tDCE	-	68,5	7,5
3	s tDCE	570	78	5
4	s tDCE	427	49	4
∅	s tDCE	421,5	63,5	4,5

Pro vialky č. 1 – 2 bylo provedeno desetinné ředění 10^{-6} a 10^{-7} . Z takto zředěných vzorků bylo odečteno $68,5 \cdot 10^6$; $7,5 \cdot 10^7$ KTJ.cm⁻³. Ve vialkách č. 3 – 4 bylo provedeno desetinné ředění 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} a bylo odečteno $421,5 \cdot 10^5$; $63,5 \cdot 10^6$; $4,5 \cdot 10^7$ KTJ.cm⁻³. Výsledky z pokusu nenaznačují, že by přítomnost a degradace tDCE v použité koncentraci byla toxická pro buňky bakterie RF2.

Degradace tDCE (1,231 mg.l⁻¹ KF) bakterií RF2 bez účasti fenol oxigenasy

Pokus na degradaci tDCE (1,231 mg.l⁻¹ KF) bez účasti fenol oxigenasy byl proveden v šesti pokusných vialkách. Vialky č. 1 – 3 sloužily pro stanovení vstupní koncentrace tDCE v kapalně fázi a výsledky z tohoto měření jsou uvedeny v Tab. 24. Vialky č. 4 – 6 byly určeny pro degradaci tDCE bakterií RF2 bez účasti fenol oxigenasy a výsledky z tohoto pokusu jsou uvedeny v Tab. 25.

Tab. 24. Vstupní koncentrace tDCE
(1,231 mg.l⁻¹ KF)

Č. vialky	Plocha peaku [i.j.]
1.	19521136
2.	21971392
3.	20573696
σ	20688741

Z rovnice regrese uvedené na Obr. 21 byla vypočtena koncentrace tDCE v kap. fázi:

$$y = 16332x + 588684$$

$$x = \frac{20688741 + 588684}{16332} = \underline{\underline{1,231 \text{ mg.l}^{-1}}}$$

Tab. 25. Degradace tDCE (1,231 mg.l⁻¹ KF) bez účasti fenol oxigenasy

Č.v.	Plocha peaku [i.j.]	Koncentrace tDCE po 7 denní kultivaci [mg.l ⁻¹]	Odstranění tDCE [%]
6	19827136	1,178	4,31
7	20260320	1,204	2,15
8	20202992	1,201	2,44
σ	20096816	1,194	3,01

V Tab. 25 jsou uvedeny plochy peaků naměřené po degradaci tDCE bakterií RF2 bez účasti fenol oxigenasy. Dále jsou uvedeny zbytkové koncentrace tDCE, které byly získány výpočtem z jednotlivých ploch peaků dosazených do rovnice regrese z Obr. 21. Jako poslední

je uvedeno procentuální odstranění tDCE. Z výsledků je patrné, že bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 není schopna degradovat trans-1,2-dichlorethylen bez účasti fenol oxigenasy.

5.4 Experimentální pokusy s 1,1-dichlorethylenem

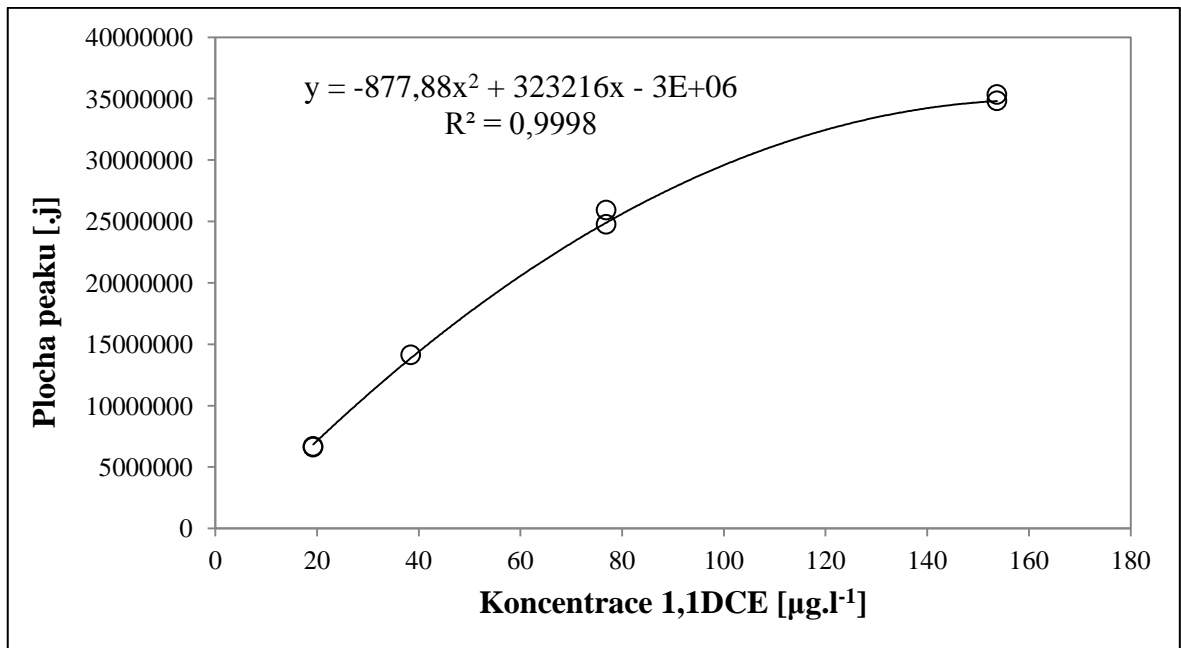
Kometabolická degradace 1,1-dichlorethylenu ($0,649 \text{ mg.l}^{-1}$ KF) bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ

Bakterie RF2 a neznámá směná kultura VMZ byly podrobeny pokusu na kometabolickou degradaci 1,1-dichlorethylenu o celkové vstupní koncentraci $1,345 \text{ mg.l}^{-1}$. Nejprve byly připraveny standardní roztoky o koncentracích $192,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a 1922 mg.l^{-1} 1,1DCE. Z těchto roztoků byly zhotoveny kalibrační křivky (Obr. 22, Obr. 23). Data pro zhotovení těchto křivek jsou uvedena v Tab. 26, Tab. 27.

Samotný pokus byl proveden v patnácti vialkách, vialky č. 1 – 5 sloužily pro stanovení vstupní koncentrace 1,1DCE v kap. fázi a výsledky jsou uvedeny v Tab. 28. Vialky č. 6 – 10 byly určeny pro kometabolickou degradaci 1,1DCE bakterií RF2 a vialky č. 11 - 15 byly určeny pro kometabolickou degradaci 1,1DCE směsnou kulturou VMZ. Ve vialkách č. 6 – 15 byl zkoumán úbytek 1,1DCE a výsledky jsou uvedeny v Tab. 29.

Tab. 26. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o nízkých koncentracích 1,1DCE

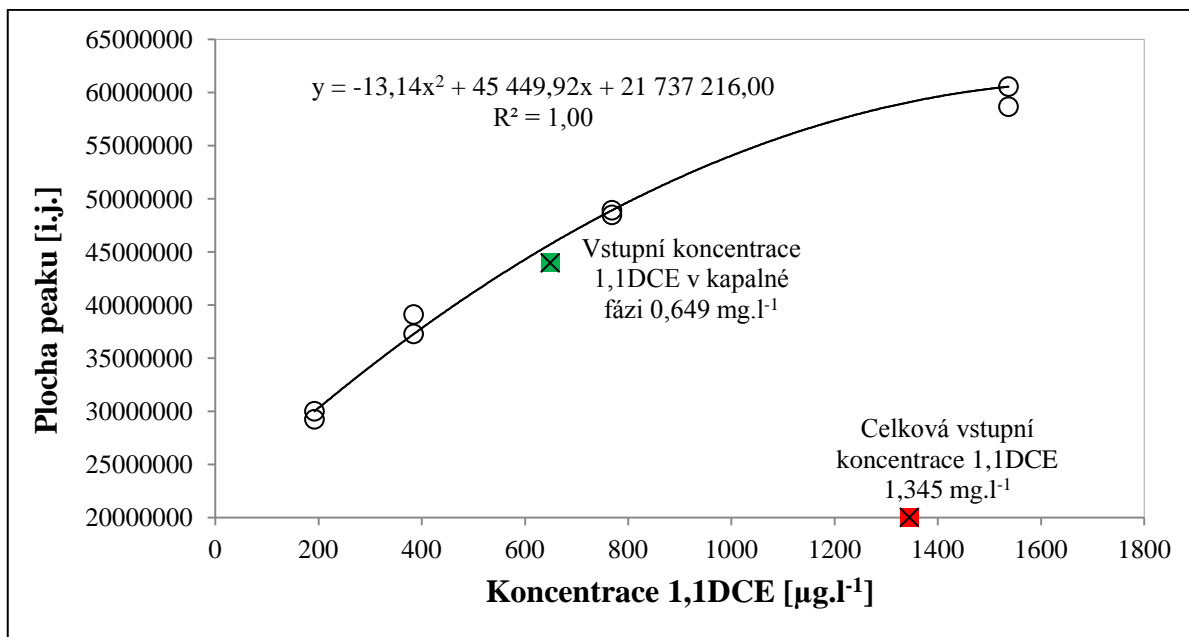
Koncentrace 1,1DCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Číslo měření	
	Plocha peaku [i,j]	
	1	2
19,22	6615677	6680925
38,34	14586312	14136672
76,86	25927296	24767824
153,7	35337888	34823648



Obr. 22. Kalibrační křivka pro nízké koncentrace 1,1DCE

Tab. 27 Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o vyšších koncentracích 1,1DCE

Koncentrace 1,1DCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Plocha peaku [i.j]	
	Číslo měření	
	1	2
19,22	29227776	29984880
38,34	39092224	37262720
76,86	48467424	48904704
153,7	58649313	60542336



Obr. 23. Kalibrační křivka pro vyšší koncentrace 1,1DCE

Tab. 28. Vstupní koncentrace 1,1DCE
v kap. fázi

Č. vialky	Plocha peaku 1,1DCE [i.j.]
1.	42997152
2.	44798592
3.	43203200
4.	45719776
5.	43023360
θ	43948416

Z rovnice regrese uvedené na Obr. 23 byla vypočtena vstupní koncentrace 1,1DCE v kapalně fázi:

$$y = -13,14x^2 + 45449,92x + 21737216,00$$

$$\sqrt{D} = \sqrt{45449,92^2 - [4 * (-13,14) * (21737216 - 43948416)]}$$

$$\sqrt{D} = 28398,86$$

$$X = \frac{-45449,92 + 28398,86}{2 * (-13,14)} = \underline{\underline{649\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}}}$$

Tab. 29. Kometabolická degradace 1,1DCE (0,649 mg.l⁻¹ KF) bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ

Č. vialky		Plocha peaku 1,1DCE [i.j.] Koncentrace 1,1DCE [μg.l ⁻¹]				Odstranění 1,1DCE [%]	
RF2	VMZ	RF2		VMZ		RF2	VMZ
6	11	36612544	406,8	37776320	449,6	37,28	30,68
7	12	33800032	336,4	37766592	449,3	48,13	30,73
8	13	32174960	292,6	38819712	481,0	54,89	25,84
9	14	-	-	38801280	480,4	-	25,93
10	15	-	-	36477984	410,0	-	36,79
∅		34195845	345,3	37928378	454,1	46,77	29,99

Tab. 29 udává naměřené plochy peaků, vypočtené zbytkové koncentrace a procentuální odstranění 1,1DCE bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ. Z výsledků je patrné, že bakterie RF2 kometabolicky rozložila 47,77% 1,1DCE o vstupní koncentraci 0,649 mg.l⁻¹ v kap. fázi, přičemž 345,3 μg.l⁻¹ 1,1DCE v kap. fázi zůstalo nerozloženo. Směsná kultura VMZ byla schopna kometabolicky rozložit stejnou vstupní koncentraci 1,1DCE v kap. fázi z 29,99 % a tak 454,1 μg.l⁻¹ 1,1DCE v kap. fázi zůstalo nerozloženo. V porovnání s ostatními izomery dichlorethylenů (cDCE, tDCE) je zřejmé, že 1,1-dichlorethylen podléhá kometabolické degradaci bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ nejhůře.

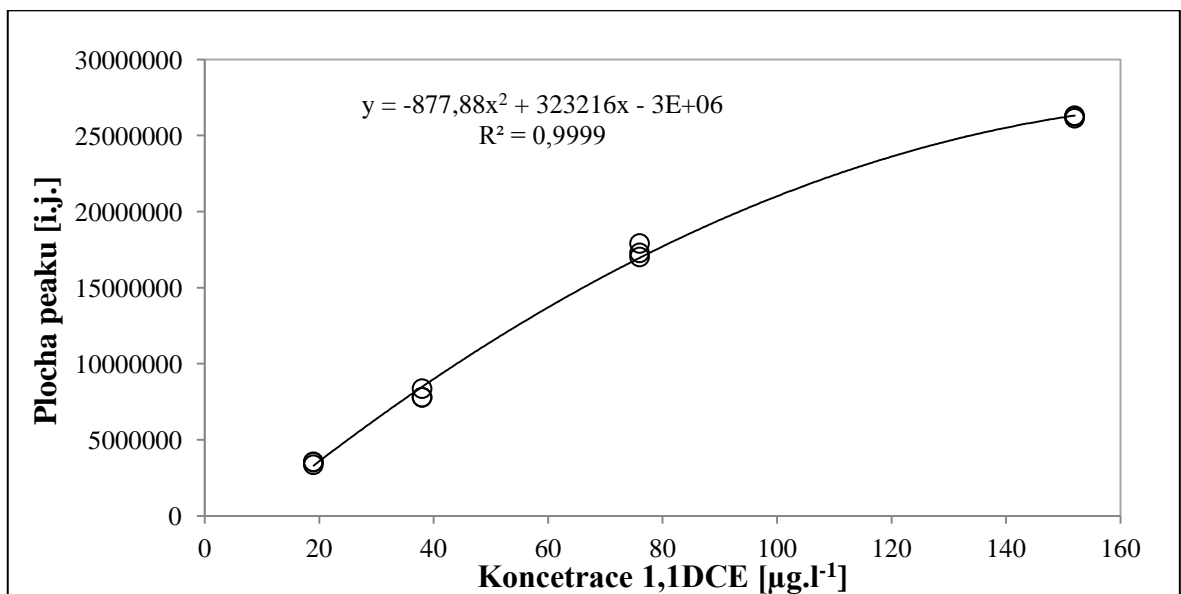
Kometabolická degradace 1,1-dichlorethylenu a jeho degradace bez účasti fenol oxygenasy (370,8 μg.l⁻¹ KF) bakterií RF2

Bakterie RF2 byla testována na kometabolickou degradaci 1,1-dichlorethylenu a jeho degradaci bez účasti fenol oxygenasy o celkové vstupní koncentraci 1,33 mg.l⁻¹. Byly připraveny nové standardní roztoky o koncentracích 190 mg.l⁻¹; 1900 mg.l⁻¹ 1,1DCE. Z těchto roztoků byly zhotoveny nové kalibrační křivky (Obr. 24, Obr. 25). Data naměřená pro zhotovení jednotlivých kalibračních křivek jsou uvedena v Tab. 30, Tab. 31.

Celý pokus sestával z třinácti vialek, z čehož vialky č. 1 – 5 sloužily pro stanovení vstupní koncentrace 1,1DCE v kapalně fázi a výsledky z tohoto měření jsou uvedeny v Tab. 32. Vialky č. 6 – 10 byly určeny pro kometabolickou degradaci 1,1DCE a výsledky jsou uvedeny v Tab. 33. Vialky č. 11 - 13 byly určeny pro degradaci 1,1DCE bez účasti fenol oxygenasy a výsledky jsou uvedeny v Tab. 34.

Tab. 30. Naměřené hodnoty pro novou kalibrační křivku o nízkých koncentracích 1,1DCE

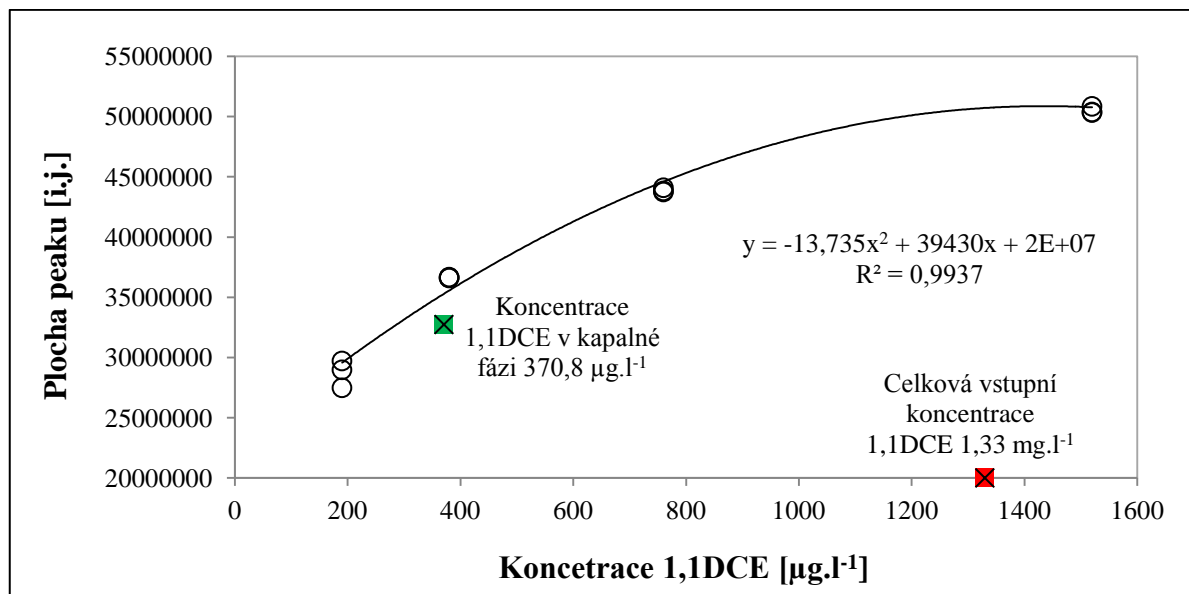
Koncentrace 1,1DCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Číslo měření		
	Plocha peaku [i.j]		
	1	2	3
19	3526286	3557008	3360950
38	7802627	7791555	8366106
76	17291555	17908624	17022128
152	26262832	26141488	26307296



Obr. 24. Nová kalibrační křivka pro nízké koncentrace 1,1DCE

Tab. 31. Naměřené hodnoty pro novou kalibrační křivku o vyšších koncentracích 1,1DCE

Koncentrace 1,1DCE [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Plocha peaku [i.j]		
	Číslo měření		
	1	2	3
190	29708224	27481248	28974304
380	36624288	36666496	36595936
760	43735392	43820480	44085760
1520	50329664	50374080	50841376



Obr. 25. Nová kalibrační křivka pro vyšší koncentrace 1,1DCE

Tab. 32. Vstupní koncentrace 1,1DCE
(370,8 µg.l⁻¹ KF)

Č. vialky	Plocha peaku 1,1DCE [i.j.]
1.	33836768
2.	32053264
3.	32135152
4.	32908720
5.	-
σ	32733476

Z rovnice regrese uvedené na Obr. 25 byla vypočtena vstupní koncentrace 1,1DCE v kapalné fázi:

$$y = -131735x^2 + 39430x + 2 \cdot 10^7$$

$$\sqrt{D} = \sqrt{39430^2 - [4 \cdot (-13,735) \cdot (2 \cdot 10^7 - 32733476)]}$$

$$\sqrt{D} = 29242,91$$

$$X = \frac{-39430 + 29242,91}{2 \cdot (-13,735)} = \underline{\underline{370,8 \mu\text{g.l}^{-1}}}$$

Tab. 33. Kometabolická degradace 1,1DCE (370,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ KF) bakterií RF2

Č.v.	Plocha peaku [i.j.]	Koncentrace 1,1DCE po 7 denní kultivaci [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Úbytek 1,1DCE [%]
6	24042358	128,5	65,35
7	22174592	111,9	69,82
8	22923616	118,1	68,15
9	26855536	185,9	49,87
10	-	-	-
∅	23999026	128,1	65,45

V Tab. 33 jsou uvedeny plochy peaků, zbytkové koncentrace a procentuální úbytek 1,1DCE po sedmidenní kultivaci vialek č. 6 – 10. Tyto výsledky ukazují, že bakterie RF2 kometabolicky rozložila 65,45% 1,1DCE o vstupní koncentraci 370,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ v kap. fázi, přičemž 128,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ 1,1DCE v kap. fázi zůstalo nerozloženo. Z dosažených výsledků vyplývá, že míra odstranění 1,1DCE bakterií RF2 byla vyšší oproti předešlému pokusu na kometabolickou degradaci 1,1DCE o vstupní koncentraci 649 $\mu\text{g.l}^{-1}$ v kap. fázi, kdy bylo rozloženo jen 46,77% 1,1DCE. Výsledky naznačují, že 1,1-dichlorethylen může působit toxicky na mikrobiální buňky bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 a to již při relativně nízkých koncentracích.

Tab. 34. Degradace 1,1DCE (370,8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ KF) bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy

Č.v.	Plocha peaku [i.j.]	Koncentrace 1,1DCE po 7 denní kultivaci [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Odstranění 1,1DCE [%]
11	32541088	364,3	1,76
12	33337984	391,7	0
13	33059680	382,1	0
∅	32979584	379,3	0

Tab. 34. shrnuje výsledky z pokusu na degradaci 1,1DCE bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy. V tabulce jsou uvedeny plochy peaků, zbytkové koncentrace a procentuálního odstranění 1,1DCE. Pouze ve vialce č. 11 došlo k 1,76 %-tnímu odstranění 1,1DCE. V ostatních vialkách byla koncentrace 1,1DCE nepatrně vyšší oproti jeho stanovené vstupní koncentraci, což bylo způsobeno nepřesností v měření. Výsledky jednoznačně prokázaly, že 1,1-dichlorethylen nepodléhá degradaci bakterií *Comamonas testosteroni* RF2 bez účasti fenol oxygenasy.

Míra přežívání buněk bakterie RF2 s 1,1-dichlorethylenem (1,33 mg.l⁻¹ CK)

Metodika pokusu bylo totožná jako v předchozích pokusech pro ověření míry přežívání buněk bakterie RF2. Pokus sestával ze čtyř vialek, vialky č. 1 – 2 byly kultivovány bez 1,1DCE a vialky č. 3 – 4 byly kultivovány s 1,1DCE a byla v nich testována míra přežívání buněk bakterie RF2 po proběhlé kometabolické degradaci této látky.

Tab. 35. Míra přežívání buněk s 1,1DCE (1,33 mg.l⁻¹ CK)

Č. vialky	Látka	Desetinné ředění		
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
		[KTJ.cm ⁻³]		
1	bez 1,1DCE	Neprovedeno	204	29
2	bez 1,1DCE	Neprovedeno	197	27
∅	bez 1,1DCE	-	200,5	28
3	s 1,1DCE	125	20	2
4	s 1,1DCE	131	16	4
∅	s 1,1DCE	128	18	3

Pro vialky č. 1 – 2 bylo provedeno desetinné ředění 10⁻⁶ a 10⁻⁷. Z těchto ředění bylo odečteno 200,5.10⁶; 28.10⁷ KTJ.cm⁻³. Ve vialkách č. 3 – 4 bylo provedeno desetinné ředění 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ a bylo odečteno 128.10⁵; 18.10⁶; 3.10⁷ KTJ.cm⁻³. Výsledky z pokusu ukazují, že přítomnost a degradace 1,1DCE v použité koncentraci měla vliv na počty přeživších buněk bakterie RF2 a snižovala jejich počet oproti kontrole přibližně o jeden řád. Toxicitu tedy vykazuje buď samotný 1,1DCE nebo metabolit(y) vzniklé v průběhu degradace.

5.5 Experimentální pokusy se směsným standardem

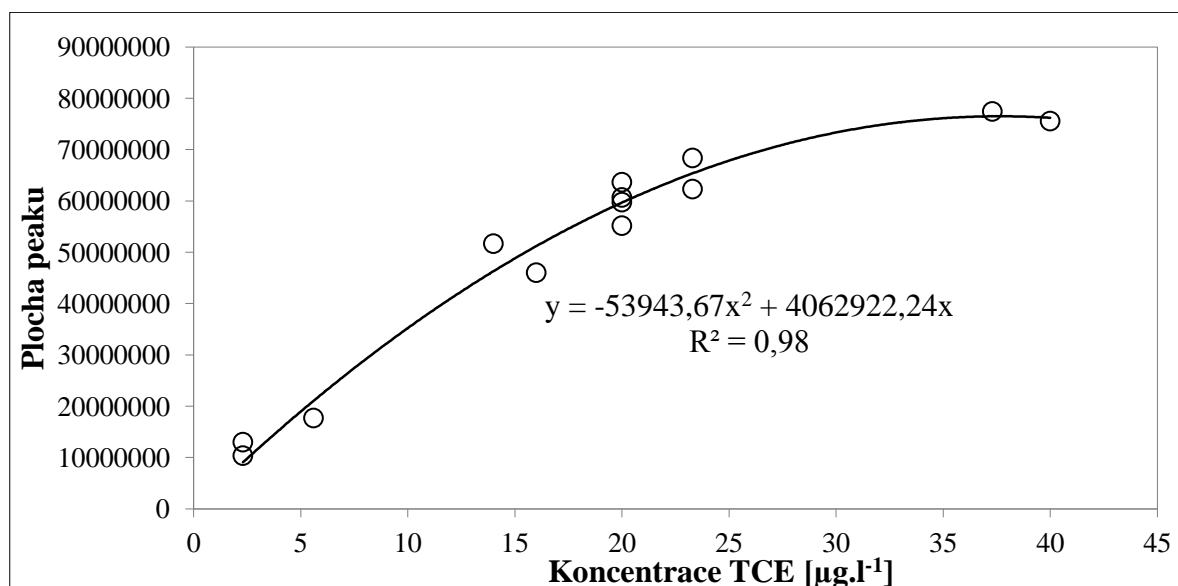
Byl připraven směsný standardní roztok obsahující 22,65 mg.l⁻¹ 1,1-dichlorethylenu, 24,38 mg.l⁻¹ cis-1,2-dichlorethylenu, 21,62 mg.l⁻¹ trans-1,2-dichlorethylenu a 22,03 mg.l⁻¹ trichlorethylenu. Tento směsný standard byl použit pro pokusy na kometabolickou degradaci bakterií RF2, pro degradaci bez účasti fenol oxigenasy a pro pokus na ověření míry přežívání buněk bakterie RF2.

Kometabolická degradace směsného standardu a jeho degradace bakterií RF2 bez účasti fenol oxigenasy

Pokus byl proveden ve dvanácti vialkách, vialky č. 1 – 4 sloužily pro stanovení vstupních koncentrací jednotlivých látek směsného standardu v kapalně fázi a výsledky z tohoto mě-

ření jsou uvedeny v Tab. 36. Vialky č. 5 – 9 byly určeny pro kometabolickou degradaci látek směšného standardu bakterií RF2 a byl v nich zkoumán jejich procentuální úbytek. V Tab. 37 jsou uvedeny výsledky naměřených ploch peaků po sedmidenní kultivaci vialek č. 5 - 9. Výsledky ze samotné kometabolické degradace jsou uvedeny v Tab. 38. Vialky č. 10 – 12 byly určeny pro degradaci látek směšného standardu bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy a rovněž v nich byl zkoumán procentuální úbytek těchto látek. Výsledky z naměřených ploch peaků po sedmidenní kultivaci vialek č. 10 - 12 jsou uvedeny v Tab. 39 a v Tab. 40 jsou uvedeny výsledky ze samotné degradace bez účasti fenol oxygenasy.

Pro výpočty vstupních a zbytkových koncentrací jednotlivých dichlorethylenů byly použity rovnice regresí z dříve získaných kalibračních křivek (Obr. 16, Obr. 20, Obr. 22) a v případě trichlorethylenu byla použita rovnice regrese z Obr. 26. Data pro sestavení Obr. 26 nejsou uvedena.



Obr. 26. Kalibrační křivka pro TCE

Tab. 36. Naměřené vstupní koncentrace KP pro směšný standard

Látka	Číslo vialky					Konc. látky [µg.l ⁻¹]
	Plocha peaku [i.j]					
	1	2	3	4	ø	
TCE	66023936	67194880	68300416	-	67173077	122,55
1,1DCE	10586760	10495736	12015664	12105264	11300856	51,43
tDCE	1863113	1959433	2182010	1884693	1972321	91,58
cDCE	1575451	1416175	1416175	1554941	1505010	84,34

V Tab. 36 jsou uvedeny výsledky z měření ploch peaků pro jednotlivé látky ve směsném standardu. Pro každou látku byl vypočten průměr z naměřených ploch peaků a z těchto průměrů byly vypočteny vstupní koncentrace látek v kap. fázi v $\mu\text{g.l}^{-1}$. Naměřené plochy peaků trichloretylenu odpovídají ředění pětikrát, tak aby bylo možné odečíst jeho vstupní koncentraci z Obr. 26. Postup výpočtu vstupní koncentrace TCE v kapalně fázi byl následovný:

$$y = -53943,67x^2 + 4062922,24x$$

$$\sqrt{D} = \sqrt{4062922,24^2 - [4 * (-53943,67) * (-67173077)]}$$

$$\sqrt{D} = 1418833,3$$

$$x = \frac{-4062922,24 + 1418833,3}{2 * (-53943,67)} = \underline{\underline{24,51 \mu\text{g.l}^{-1}\text{TCE}}}$$

Koncentrace TCE $24,51 \mu\text{g.l}^{-1}$ odpovídá ředění pětikrát, skutečná vstupní koncentrace v pokusných vialkách byla vypočtená následovně:

$$24,51 * 5 = \underline{\underline{122,55 \mu\text{g.l}^{-1}\text{TCE}}}$$

Tab. 37. Naměřené plochy peaků směsného standardu po sedmidenní kultivaci (kometabolická degradace)

Látka	Číslo vialky					
	Plocha peaku [i.j]					
	5	6	7	8	9	ø
TCE	93847	1381358	698124	539948	0	542655
1,1DCE	0	0	0	0	0	0
tDCE	504906	895739	331773	448447	366859	509545
cDCE	0	0	0	0	0	0

Tab. 38. Kometabolická degradace směsného standardu bakterií RF2

Látka	Koncentrace po 7 dnech [$\mu\text{g.l}^{-1}$]						Odstranění [%]					
	Číslo vialky						Číslo vialky					
	5	6	7	8	9	ø	5	6	7	8	9	ø
TCE	0,02	0,34	0,17	0,13	0,00	0,13	99,98	99,72	99,86	99,89	100	99,89
1,1DCE	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100					
tDCE	19,10	38,34	10,44	16,21	12,18	19,25	79,25	58,13	88,64	82,30	86,70	79,00
cDCE	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100					

V Tab. 38 jsou uvedeny výsledky vypočtených zbytkových koncentrací jednotlivých látek a jejich procentuální odstranění. Zbytkové koncentrace byly vypočteny z ploch peaků naměřených po sedmidenní kultivaci (Tab. 37). Bylo zjištěno, že bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 kometabolicky rozložila veškerý 1,1-dichlorethylen a cis-1,2-dichlorethylen o použitých vstupních koncentracích viz. Tab. 36. Dále byl touto bakterií rozložen téměř veškerý trichlorethylen (99,98%) a 79% trans-1,2-dichlorethylenu. Zajímavým zjištěním se jeví fakt, že nízká koncentrace 1,1DCE byla odstraněna zcela, ale v případě tDCE došlo pouze k 79%-tnímu odstranění. Přitom tDCE byl v předchozích pokusech na kometaboličnou degradaci bakterií RF2 degradován snadněji a s vyšší mírou úspěšnosti, než tomu bylo v případě 1,1DCE. Svoji roli zde pravděpodobně sehrála vzájemná interakce látek směsného standardu a zvýšená kompetice těchto látek o katabolické enzymy.

Tab. 39. Plochy peaků směsného standardu po sedmidenní kultivaci (degradace bez účasti fenol oxygenasy)

Látka	Číslo vialky			
	Plocha peaku [i,j]			
	10	11	12	σ
TCE	67390145	67190137	67886088	67488790
1,1DCE	12522056	12570952	12741432	12611480
tDCE	2057605	2153349	2156122	2122359
cDCE	1541991	1662234	1117142	1440456

Tab. 40. Degradace směsného standardu bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy

Látka	Číslo vialky				Číslo vialky			
	Koncentrace po 7 dnech [$\mu\text{g.l}^{-1}$]				Odstranění [%]			
	10	11	12	σ	10	11	12	σ
TCE	123,30	122,60	125,10	123,66	0			
1,1DCE	56,78	57,00	57,77	57,18	0			
tDCE	95,80	100,54	100,67	99,00	0			
cDCE	87,47	93,28	62,43	80,73	0	0	25,98	4,28

V Tab. 40 jsou uvedeny výsledky vypočtených koncentrací jednotlivých látek v kapalně fázi. Tyto koncentrace byly vypočteny z naměřených ploch peaků, uvedených v Tab. 39 a představují jejich zbytkové koncentrace ve vialkách po sedmidenní kultivaci. Pouze ve vialce č. 12 došlo k 25,98%-tnímu odstranění cDCE, avšak s ohledem na vialky č. 10 – 12,

kde bylo procentuální odstranění cDCE nulové, se dá předpokládat, že tento výsledek byl způsoben chybou v měření. Přestože bakterie RF2 je schopna do určité míry rozkládat cDCE i bez účasti fenol oxigenasy (viz. předcházející výsledky), přítomnost ostatních dichlorethylenů a trichlorethylenu ve zkoumaném směsném standardu měla nesporně inhibiční vliv na odstranění cis-1,2-dichlorethylenu v tomto pokusu.

Míra přežívání buněk bakterie RF2 v prostředí směsného standardu

Pokus byl proveden totožně jako v předchozích případech. Sestával se ze čtyř vialek, vialky č. 1 – 2 byly kultivovány bez směsného standardu a vialky č. 3 – 4 byly kultivovány se směsným standardem a byla v nich testována míra přežívání buněk bakterie RF2 po proběhlé kometabolické degradaci směsného standardu.

Tab. 41. Míra přežívání buněk bakterie RF2 v prostředí směsného standardu

Č. vialky	Látka	Desetinné ředění		
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
		[KTJ.cm ⁻³]		
1	Bez směs. standardu	Neprovedeno	63	7
2	Bez směs. standardu	Neprovedeno	74	8
ø	Bez směs. standardu	-	68,5	7,5
3	Směsný standard	281	45	7
4	Směsný standard	362	64	11
ø	Směsný standard	321,5	54,5	9

Pro vialky č. 1 – 2 bylo provedeno desetinné ředění 10^{-6} a 10^{-7} . Z těchto ředění bylo odečteno $68,5 \cdot 10^6$; $7,5 \cdot 10^7$ KTJ.cm⁻³. Ve vialkách č. 3 – 4 bylo provedeno desetinné ředění 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} a bylo odečteno $321,5 \cdot 10^5$; $54,5 \cdot 10^6$; $9 \cdot 10^7$ KTJ.cm⁻³. Výsledky z pokusu nenaznačují, že by přítomnost a degradace látek směsného standardu v použité koncentraci byla toxická pro buňky bakterie RF2.

ZÁVĚR

Cílem rešeršní části této práce bylo seznámení s problematikou kometabolické degradace dichlorethylenů (DCEs). Přítomnost dichlorethylenů v podzemních vodách je důsledkem aplikací perchlorethylenu (PCE) a trichlorethylenu (TCE) v různých oblastech průmyslu a dichlorethyleny vznikají jako jejich dceřiné produkty v procesu zvaném přírodní atenuace. Cis-1,2-dichlorethylen je nejčastěji vznikající dceřiný meziprodukt tohoto procesu. Byly také nastíněny možné biologické metody pro odstranění dichlorethylenů z kontaminovaných podzemních vod, přičemž byl kladen důraz na využití kometabolické degradace. Podstatný díl teoretické části práce se zabýval schopnostmi různých bakterií kometabolicky rozkládat jednotlivé dichlorethyleny. Cílem bylo nalézt nejdůležitější poznatky o této problematice z dostupných vědeckých článků.

Experimentální náplň práce byla série pokusů na kometabolickou degradaci dichlorethylenů bakterií *Comamonas testosteroni* RF2 a byla zkoumána míra přežívání buněk této bakterie po proběhlé kometabolické degradaci dichlorethylenů. Rovněž byly provedeny kontroly degradací dichlorethylenů bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy. Kromě degradačních pokusů dichlorethylenů bakterií RF2, byly provedeny degradační pokusy se směsným standardem, obsahujícím všechny izomerní formy dichlorethylenů a také trichlorethylen. Bylo zjištěno, že bakterie RF2 je schopna s různou mírou úspěšnosti kometabolicky odstranit jednotlivé izomery dichlorethylenů a rovněž nízké koncentrace látek směsného standardu. Bakterie RF2 byla schopna kometabolicky rozložit veškerý cis-1,2-dichlorethylen o vstupní koncentraci $1,424 \text{ mg.l}^{-1}$ v kap. fázi. Byl testován i desetinásobek vstupní koncentrace cDCE ($10,11 \text{ mg.l}^{-1}$ KF), avšak tato koncentrace byla již příliš toxická pro bakterii RF2 a nedošlo k žádnému odstranění cDCE. Kometabolickou degradaci bakterií RF2 byl dále podroben trans-1,2-dichlorethylen o vstupní koncentraci ($0,968 \text{ mg.l}^{-1}$ KF) a 1,1-dichlorethylen o vstupních koncentracích ($0,649 \text{ mg.l}^{-1}$; $370,8 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ KF). Trans 1,2-dichlorethylen byl rozložen ze 72,17% a $0,649 \text{ mg.l}^{-1}$ 1,1-dichlorethylenu bylo rozloženo ze 46,77%. Snížením vstupní koncentrace 1,1DCE ($370,8 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ KF) bylo dosaženo navýšení jeho procentuálního odstranění z 47,77% na 65,45%. Z výsledků na kometabolickou degradaci jednotlivých dichlorethylenů lze odvodit, že kometabolicky nejsnadněji rozložitelným izomerem pro bakterii RF2 je cDCE, naopak 1,1DCE podléhá kometabolické degradaci nejméně. Z pokusu na kometabolickou degradaci směsného standardu bylo zjištěno, že bakterie RF2 byla schopna odstranit veškerých $84,38 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ cDCE a $51,43 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ 1,1DCE. Dále bylo odstraněno 99,89% z původních $122,55 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ TCE a 79,0%

z původních $91,58 \mu\text{g.l}^{-1}$ tDCE. Z pokusů na ověření míry přežívání buněk bylo zjištěno, že 1,1DCE působí toxicky a přímo ovlivnil počty přeživších buněk ve zkoumaných vialkách. U ostatních dichlorethylenů a směsného standardu tento negativní účinek pozorován nebyl. Během pokusů na degradaci dichlorethylenů bez účasti fenol oxigenasy bylo zjištěno, že bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 dokáže rozkládat cDCE bez účasti fenolu jako kosubstrátu. V pokusu na degradaci cDCE bez účasti fenol oxigenasy bylo odstraněno 72,94% z původních $956,8 \mu\text{g.l}^{-1}$ cDCE.

Bakterie *Comamonas testosteroni* RF2 se jeví jako možný prostředek pro remediace lokalit postižených chlorovanými látkami. Není běžné, aby čistá bakteriální kultura byla schopna ve významné míře rozkládat všechny izomery dichlorethylenů, tak jako v případě bakterie RF2. Hodnotnou je zejména skutečnost, že nejlépe dochází k rozkladu cis-1,2DCE, který je nejběžnějším produktem dehalogenace TCE a PCE v kontaminovaných podzemních vodách. Velkým překvapením je potom schopnost kultury RF2 částečně rozložit použité koncentrace cis-1,2-dichlorethylenu bez účasti fenol oxigenasy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BARTOŇ, J., Kontaminace podzemních vod chlorovanými uhlovodíky na lokalitě DKV Břeclav. Brno, 2007. 67str. Diplomová práce na přírodovědecké fakultně university Masarykovy na ústavu geologických věd. Vedoucí práce Mgr. Tomáš Kuchovský, Ph.D.
- [2] Engineered Approaches to In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and Field Applications [online]. [Cit. 2013-10-24]. Dostupný z WWW: <http://epa.gov/tio/download/remed/engappinsitbio.pdf>
- [3] ABRAHAMSSON, K., EKDAHL A., COLLEN, J., PEDERSEN, M. Marine algae – A source of trichloroethylene and perchloroethylene. *Limnology and oceanography*, Vol. 40, November 1995, p. 1321-1326
- [4] Understanding Chlorinated Hydrocarbon Behaviour in Groundwater: Investigation, Assessment and Limitations of Monitored Natural Attenuation [online]. [Cit. 2013-10-25]. Dostupný z WWW: <http://dnr.wi.gov/files/PDF/pubs/rr/RR699.pdf>
- [5] Tetrachlorethylen [online]. [Cit. 2013-10-27]. Dostupný z WWW: <http://arnika.org/tetrachlorethylen-perchlor>
- [6] Perchlorethylen bezpečnostní list [online]. [Cit. 2013-10-27]. Dostupný z WWW: <http://demos.cz/cz/dokumenty/Certifikaty/WPC/bezpecnostni-list-perchlorethylen.pdf>
- [7] Trichlorethylen [online]. [Cit. 2013-10-27]. Dostupný z WWW: <http://arnika.org/trichlorethylen>
- [8] Trichlorethylen, Základní charakteristika IRZ [online]. [Cit. 2013-10-27]. Dostupný z WWW: <http://www.irz.cz/repository/latky/trichlorethylen.pdf>
- [9] 1,2-dichloroethylene, 1. publish health statement [online]. [Cit. 2013-10-28]. Dostupný z WWW: <http://atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp87-c1.pdf>
- [10] Toxicological review of cis-1,2-dichloroethylene and trans-1,2-dichloroethylene [online]. [Cit. 2013-10-28]. Dostupný z WWW: <http://epa.gov/iris/toxreviews/0418tr.pdf>
- [11] Toxicological review of 1,1-dichloroethylene [online]. [Cit. 2013-10-28]. Dostupný z WWW: <http://epa.gov/iris/toxreviews/0039tr.pdf>

- [12] 1,1-dichloroethene [online]. [Cit 2013-10-29]. Dostupný z WWW:
<http://atsdr.cdc.gov/tfacts39.pdf>
- [13] Vinylchlorid [online]. [Cit. 2013-11-08]. Dostupný z WWW:
<http://arnika.org/vinylchlorid>
- [14] MATTES, T.E., ALEXANDER, A.K., COLEMAN, N.V. Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiol Rev*, Vol. 34, Issue 4, July 2010, p. 445-475
- [15] TIEHM, A., SCHMIDT, K.R. Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes – aspects of field application. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 22, pages, March 2011, p. 415 - 421
- [16] Ethylene [online]. [Cit. 2013-12-12]. Dostupný z WWW:
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/mono60-6.pdf>
- [17] FUTGAMI, T., GOTO M., FURUKAWA, K. Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *Chem Rec.*, Vol. 8, 2008, p. 1 - 12
- [18] Chloroethene reduction [online]. [Cit 2013-12-14]. Dostupný z WWW:
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Chloroethene_reduction.png
- [19] HORVATH, R.S. Co-Metabolism and the Degradation of Organic Compounds in Nature. *Bacteriological review*, Vol. 36, No. 2, June 1972, p. 146 - 155
- [20] HANZEN, T.E. Cometabolic bioremediation. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_185, 2010, p. 2506 – 2514
- [21] MIKEŠ, J., SIGLOVÁ, M., KOZUMPLÍKOVÁ, M., JAGOŠOVÁ, V., HRDINOVÁ, J., MINAŘÍK, M. Komotabolický a vylehčovací efekt v technologii bioremediačního kompostování. *Odpadové fórum*, Kouty nad Desnou, duben 2011
- [22] FUKSA, J.K. Biodegradace specifických polutantů. *Sanační technologie XVI*, Uherské Hradiště, květen 2013
- [23] SAYAVEDRA - SOTO, L.A., GVAKHARIA, B., BOTTOMLEY, P.J., ARP, D.J., DOLAN, M.E. Nitrification and degradation of halogenated hydrocarbons – a tenuous balance for ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol.86, 2010, p. 435 – 444

- [24] WENDLANDT, K.D., STOTTMEISTER, U., HELM, J., SOLTMANN, B., JECHOREK, M., BECK, M. The potential of methane-oxidizing bacteria for applications in environmental biotechnology. *Eng Life Sci*, Vol.10, 2010, p. 87 – 102
- [25] FRASCARI, D., PINELLI, D., NOCENTINI, M., BALEANI, E., CAPPELLETTI, M., FEDI, S. A kinetic study of chlorinated solvent cometabolic biodegradation by propane-grown *Rhodococcus* sp. PB1. *Biochem Eng*, Vol.42, January 2008, p. 139 – 147
- [26] GUIOT, S.R., CIMPOIA, R., KUHN, R., ALAPLANTIVE, A. Electrolytic methanogenic-methanotrophic coupling for tetrachloroethylene bioremediation: proof of concept. *Environ Sci Technol*, Vol. 42, 2008, p. 3011 – 3017
- [27] GIDDINGS, C.G.S., Liu, F., GOSSETT, J.M. Microcosm assessment of *Polaromonas* sp. JS666 as a Bioaugmentation Agent for Degradation of cis-1,2-dichloroethene in Aerobic, Subsurface Environments. *Ground Water Monit Remediation*. Vol. 30, 2010, p. 106 – 113
- [28] SCHMIDT, K.R., AUGENSTEIN, T., HEIDINGER, M., ERTL, S., TIEHM, A. Metabolic aerobic biodegradation of cis-1,2-dichloroethene: Stable carbon isotope fractionation and growth characteristics. *Chemosphere*, Vol.78, 2010, p. 527 - 532
- [29] ZHAO, H.P., SCHMIDT, K.R., TIEHM, A. Inhibition of aerobic metabolic cis-1,2-dichloroethene biodegradation by other chloroethenes. *Water Res*, Vol.44, 2010, p. 2276-2282
- [30] SCHMIDT, K.R., TIEHM, A. Natural attenuation of chloroethenes: Identification of sequential reductive/oxidative biodegradation by microcosm studies. *Water Sci Technol*, Vol.58, 2008, p. 1137 – 1145
- [31] MATTHEW, F., VERCE, C.K., GUNSCH, A.S., FREEDMAN D., FREEDMAN D.L. Cometabolism of cis-1,2-Dichloroethene by Aerobic Cultures Grown on Vinyl Chloride as the Primary Substrate. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 36, 2002, p. 2171 – 2177
- [32] XUE, Z., DONGMEI, L., QI, Y., CHUNBO, H. Isolation and Characterization of a 1,1-Dichloroethylene-Degrading Bacterial Strain From Activated Sludge. *Fresenius Environmental Bulletin*, Vol. 21, 2012, p. 2051 – 2055

- [33] OLANIRAN, A.O., PILLAY, D., PILLAY, B. Aerobic cometabolic degradation of cis- and trans-dichloroethene by consortium of bacteria isolated from contaminated sites in Africa. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5, October 2006, p. 1913 – 1917
- [34] ENSIGN, S.A., HYMAN, M.R., ARP, D.J. Cometabolic Degradation of Chlorinated Alkenes by Alkene Monoxygenase in a Propylene-Grown *Xantobacter* Strain. *Applied and environmental mikrobiology*, Vol. 58, September 1992, p. 3038 – 3046
- [35] HARTMANS, S., DE BONT, J.A.M., HARDER, W. Microbial metabolism of short-chain unsaturated hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, Vol. 63, 1989, p. 235 – 264
- [36] WEIJERS, C.A.G.M., VAN GINKEL, C.G., DE BONT, J.A.M. Microbial production and metabolism of epoxides. *Microbiol. Sci.*, Vol. 5, 1988, p. 156 – 159
- [37] HARTMANS, S., DE BONT, J.A.M., TRAMPER, J., LUYBEN, K.C.A.M. Bacterial degradation of vinyl chloride. *Biotechnol. Lett.*, Vol. 7, 1985, p. 383 – 388
- [38] EWERS, J., FREIER-SCHRÖDER, D., KNACKMUSS, H.J. Selection of trichloroethene (TCE) degrading bacteria that resist inactivation by TCE. *Arch. Microbiol.*, Vol. 154, 1990, p. 410 - 413
- [39] VAN GINGEL, C.G., DE BONT, J.A.M. Isolation and characterization of alkene-utilizing *Xantobacter* spp. *Arch. Microbiol.*, Vol. 145, 1986, p. 403 – 407
- [40] VAN GINKEL, C.G., WELTEN, H.G.J., DE BONT, J.A.M. Epoxidation of alkenes by alkene-grown *Xantobacter* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 24, 1986, p. 334 – 337
- [41] HORVATH, A.L., Halogenated hydrocarbons: solubility miscibility with water. Marcel Dekker, Inc., New York, 1982
- [42] KOZIOLLEK, P., BRYNIOK, D., KNACKMUSS, H.J. Ethene as an auxiliary substrate for the cooxidation of cis-1,2-dichloroethene and vinyl chloride. *Arch Microbiol*, Vol. 172, 1999, p. 240 – 246
- [43] LITTLE, C.D., PALUMBO, A.V., HERBES, S.E., LIDSTROM, M.E., TYNDALL, R.L., GILMER, P.J. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 54, 1988, p. 951 – 956

- [44] OLDENHUIS, R., VINK, R.L.J.M., JANSSEN, D.B., WITHOLT, B. Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 55, 1989, p. 2819 - 2826
- [45] TSIEN, H.C., BRUSSEAU, G.A., HANSON, R.S., WACKETT, L.P. Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 55, 1989, p. 3155 – 3161
- [46] FOX, B.G., BORNEMAN, J.G., WACKETT, L.P., LIPSCOMB, J.D. Haloalkene oxidation by the soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: mechanistic and environmental implications. *Biochemistry*, Vol. 29, 1990, p. 6419 - 6427
- [47] EWERS, J., FREIER, S.D., KNACKMUSS, H.J. Selection of trichloroethene (TCE) degrading bacteria that resist inactivation by TCE. *Arch. Microbiol.*, Vol. 154, February 1990, p. 410 - 413
- [48] ARCIERO, D., VANELLI, T.M., LOGAN, M., HOOPER, A.B. Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 159, 1989, p. 640 – 643
- [49] NEWMAN, L.M., WACKETT, L.P. Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry*, Vol. 34, 1995, p. 14066 – 14076
- [50] NEWMAN, L.M., WACKETT, L.P. Trichloroethylene oxidation by purified toluene 2-monooxygenase: products, kinetics, and turnover-dependent inactivation. *J. Bacteriol.*, Vol. 179, 1997, p. 90 – 96
- [51] MARS, A.E., HOUWING, J., DOLFING, J., JANSSEN, D.B. Degradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, 1996, p. 886 – 891
- [52] EWERS, J. Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau chlorsubstituierter Ethene. Stuttgart, Germany 1990, PhD Thesis, Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology
- [53] WACKETT, L.P., HOUSEHOLFER, S.R. Toxicity of trichloroethene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 55, 1989, p. 2723 – 2725

- [54] MATHUR, A.K., MAJUMDER, C.B., CHATTERJEE, S. Combined removal of BTEX in air stream by using mixture of sugar cane bagasse, compost and GAC as biofilter media. *J. Hazard. Mater.*, Vol. 148, 2007, p. 64 -74
- [55] ANDREASON, J.E., MCCARTHY, P.L. Transformation yields of chlorinated ethenes by a methanotrophic mixed culture expressing particulate methane monooxygenase. *Applied and environmental microbiology*, Vol 63, February 1997, p. 687 – 693
- [56] NISHINO, S.F., SHIN, K.S., GOSSETT, J.M., SPAIN, J.C. Cytochrome P450 Initiates Degradation of cis-Dichloroethene by *Polaromonas* sp. Strain JS666. *Appl Environ Microbiol*, Vol. 79, April 2013, p. 2263 – 2272
- [57] VERCE, M.F., FREEDMAN, D.L. Modeling the kinetics of vinyl chloride cometabolism by an ethane-grown *Pseudomonas* sp. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 71, March 2001, p. 274 – 285
- [58] VERCE, M.F., ULRICH, R.L., FREEDMAN, D.L. Transition from cometabolic to growth-linked biodegradation of vinyl chloride by *Pseudomonas* sp. isolated on ethene. *Environ Sci Technol.*, Vol. 35, November 2001, p. 4242 - 4251
- [59] VERCE, M.F., ULRICH, R.L., FREEDMAN, D.L. Characterization of an Isolate That Uses Vinyl Chloride as a Growth Substrate under Aerobic Conditions. *Appl Environ Microbiol.*, August 2000, Vol. 66, p. 3535 – 3542
- [60] HARTMANS, S., DE BONT, J.A. Aerobic vinyl chloride metabolism in *Mycobacterium aurum* L1. *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 58, April 1992, p. 1220 – 1226
- [61] Optimizing the Analysis of Volatile Organic Compounds. *Technical guide*, [online]. [Cit. 2014-05-05]. Dostupný z WWW:
<http://www.restek.com/pdfs/59887B.PDF>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1,1DCE	1,1-dichlorethylen
BMM	Bezchloridové minerální médium
CK	Celková vstupní koncentrace
cDCE	Cis-1,2-dichlorethylen
DCEs	Dichlorethyleny
DNAPL'S	Dense Non-Aqueous Phase Liquids
ECD	Electron Capture Detector (Detektor elektronového záchytu)
FID	Flame Ionization Detector (Plamenově ionizační detektor)
IARC	International Agency for Research on Cancer
i.j.	Integrální jednotka
KF	Kapalná fáze
KTJ	Kolonie tvořící jednotky
MM	Minerální médium
MML	Minerální médium s obsahem laktátu sodného
PCE	Perchlorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
TCE	Trichlorethylen
tDCE	Trans-1,2-dichlorethylen
T _x	Transformační kapacita látky x
TSS	Total Suspended Solids
VC	Vinylchlorid
vol/vol	procentuální objemová koncentrace (objem rozpuštěné látky/objem roztoku)
wt/vol	procentuální koncentrace (hmotnost látky/objem roztoku)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Seznam chlorovaných ethylenů	13
Obr. 2. Transport DNAPL v podzemí [4]	14
Obr. 3. Strukturní vzorec PCE	15
Obr. 4. Strukturní vzorec TCE	15
Obr. 5. Strukturní vzorce cDCE a tDCE	16
Obr. 6. Strukturní vzorec 1,1DCE	17
Obr. 7. Strukturní vzorec VC	17
Obr. 8. Anaerobní redukce a aerobní oxidace chlorovaných ethylenů [15]	18
Obr. 9. Časté degradační cesty chlorovaných ethylenů [4]	19
Obr. 10. Reduktivní dechlorace bakterií <i>Dehalococcoides</i> [18]	20
Obr. 11. Schematické znázornění kometabolismu [21]	21
Obr. 12. Kooxidace cDCE směsnou bakteriální kulturou K20 v přítomnosti ethenu [42]	30
Obr. 13. Kooxidace VC směsnou bakteriální kulturou K20 v přítomnosti ethenu [42]	31
Obr. 14. Schopnost přežívání buněk v přítomnosti cDCE [42]	32
Obr. 15. Počáteční krok metabolismu VC bakterií <i>M. aurum</i> L1 [60]	36
Obr. 16. Kalibrační křivka pro nízké koncentrace cDCE	48
Obr. 17. Kalibrační křivka pro vyšší koncentrace cDCE	49
Obr. 18. Nová kalibrační křivka pro cDCE o vyšších koncentracích	52
Obr. 19. Kalibrační křivka pro vysoké koncentrace cDCE	56
Obr. 20. Kalibrační křivka pro nízké koncentrace tDCE	58
Obr. 21. Kalibrační křivka pro vyšší koncentrace tDCE	59
Obr. 22. Kalibrační křivka pro nízké koncentrace 1,1DCE	63
Obr. 23. Kalibrační křivka pro vyšší koncentrace 1,1DCE	64
Obr. 24. Nová kalibrační křivka pro nízké koncentrace 1,1DCE	66
Obr. 25. Nová kalibrační křivka pro vyšší koncentrace 1,1DCE	67
Obr. 26. Kalibrační křivka pro TCE	70

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Kometabolické navýšení procentuální degradace cDCE a tDCE v přítomnosti různých primárních substrátů [33]	24
Tab. 2. Procento odstranění chlorovaných ethylenů bakteriálními suspenzemi [34]	27
Tab. 3. Vliv počáteční koncentrace 1,1DCE na jeho odstranění bakterií <i>Alcaligenes</i> sp. [32].....	34
Tab. 4. Počáteční rychlost oxidace chlorovaných ethylenů bakterií <i>M. aurum</i> L1 [60].....	36
Tab. 5. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o nízkých koncentracích cDCE	48
Tab. 6. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o vyšších koncentracích cDCE.....	49
Tab. 7. Vstupní koncentrace cDCE v kapalně fázi pro kometabolickou degradaci	49
Tab. 8. Kometabolická degradace cDCE (0,949 mg.l ⁻¹ KF) bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ.....	50
Tab. 9. Kometabolická degradace cDCE (1,424 mg.l ⁻¹ KF) bakterií RF2	50
Tab. 10. Míra přežívání buněk bakterie RF2 s cDCE (1,432 mg.l ⁻¹ CK).....	51
Tab. 11. Naměřené hodnoty pro novou kalibrační křivku o vyšších koncentracích cDCE	52
Tab. 12. Stanovení vstupních koncentrací cDCE v kap. fázi. (degradace bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy)	53
Tab. 13. Degradace cDCE bakterií RF2 bez účasti fenol oxygenasy	53
Tab. 14. Vstupní koncentrace cDCE v kap. fázi.....	54
Tab. 15. Stanovení anorganických chloridů	54
Tab. 16. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o vysokých koncentracích cDCE	55
Tab. 17. Vstupní koncentrace cDCE (10,11 mg.l ⁻¹ KF)	56
Tab. 18. Kometabolická degradace cDCE (10,11 mg.l ⁻¹ KF) bakterií RF2	57
Tab. 19. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o nízkých koncentracích tDCE.....	58
Tab. 20. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o vyšších koncentracích tDCE	58
Tab. 21. Vstupní koncentrace tDCE v kap. fázi pro kometabolickou degradaci.....	59
Tab. 22. Kometabolická degradace tDCE (0,968 mg.l ⁻¹ KF) bakterií RF2 a neznámou směsnou kulturou VMZ.....	60
Tab. 23. Míra přežívání buněk bakterie RF2 s tDCE (1,380 mg.l ⁻¹ CK)	60
Tab. 24. Vstupní koncentrace tDCE (1,231 mg.l ⁻¹ KF).....	61
Tab. 25. Degradace tDCE (1,231 mg.l ⁻¹ KF) bez účasti fenol oxygenasy	61
Tab. 26. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o nízkých koncentracích 1,1DCE.....	62

Tab. 27. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku o vyšších koncentracích 1,1DCE	63
Tab. 28. Vstupní koncentrace 1,1DCE v kap. fázi	64
Tab. 29. Kometabolická degradace 1,1DCE (0,649 mg.l ⁻¹ KF) bakterií RF2 a směsnou kulturou VMZ.....	65
Tab. 30. Naměřené hodnoty pro novou kalibrační křivku o nízkých koncentracích 1,1DCE.....	66
Tab. 31. Naměřené hodnoty pro novou kalibrační křivku o vyšších koncentracích 1,1DCE.....	66
Tab. 32. Vstupní koncentrace 1,1DCE (370,8 µg.l ⁻¹ KF).....	67
Tab. 33. Kometabolická degradace 1,1DCE (370,8 µg.l ⁻¹ KF) bakterií RF2	68
Tab. 34. Degradace 1,1DCE (370,8 µg.l ⁻¹ KF) bakterií RF2 bez účasti fenol oxigenasy.....	68
Tab. 35. Míra přežívání buněk s 1,1DCE (1,33 mg.l ⁻¹ CK).....	69
Tab. 36. Naměřené vstupní koncentrace KP pro směsný standard.....	70
Tab. 37. Naměřené plochy peaků směsného standardu po sedmidenní kultivaci (kometabolická degradace).....	71
Tab. 38. Kometabolická degradace směsného standardu bakterií RF2	71
Tab. 39. Plochy peaků směsného standardu po sedmidenní kultivaci (degradace bez účasti fenol oxigenasy).....	72
Tab. 40. Degradace směsného standardu bakterií RF2 bez účasti fenol oxigenasy	72
Tab. 41. Míra přežívání buněk bakterie RF2 v prostředí směsného standardu	73