

# **Studium bakterií rozkládajících strukturní analogy vinylpyrrolidonu**

Bc. Karel Křížek

---

Diplomová práce  
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2011/2012

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Karel KRÍŽEK**  
Osobní číslo: **T10341**  
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Studium bakterií rozkládající strukturní analogy  
vinylpyrrolidonu**

Zásady pro vypracování:

- 1. Provedte literární rešerši zaměřenou na zhodnocení biodegradace 1-methyl-2-pyrrolidonu, 1-octyl-2-pyrrolidonu a akrylamidu bakteriálními kulturami.**
- 2. Z dostupných vzorků čistírenských kalů či půd izolujte či pokuste se izolovat bakterie schopné degradace 1-methyl-2-pyrrolidonu a 1-octyl-2-pyrrolidonu.**
- 3. Získané kmeny mikroorganismů popište, zjistěte jejich schopnost rozkladu uvedených substrátů v čisté kultuře a případně i připravte k identifikaci.**
- 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

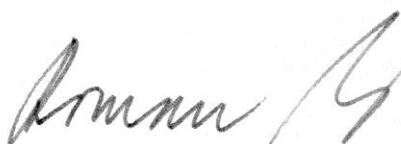
Datum zadání diplomové práce:

**13. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce:

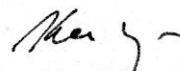
**4. května 2012**

Ve Zlíně dne 13. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

*děkan*



doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: KRÍŽEK KAREL

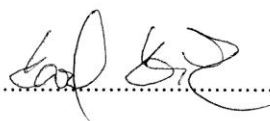
Obor: 102P

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít 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 ..... 4.5.2012

.....  


<sup>1)</sup> 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 nevydělečně 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.

<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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 užit 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Byla sledována degradace 1-methyl-2-pyrrolidonu (NMP) a 1-octyl-2-pyrrolidonu (2-OP) bakteriálními kmeny v tekutém minerálním médiu, za účelem najít a pokusit se identifikovat ty kmeny, které jsou schopny NMP a 2-OP rozkládat. Jako první byly testy prováděny s koncentrací 2 g/l NMP, která se ukázala být nevhodnou. Proto byla pro druhou sérii pokusů zvolena nižší koncentrace 300 mg/l NMP a 200 mg/l 2-OP. Schopnost biodegradace jednotlivých kultur byla vyhodnocena měřením zákalu jednotlivých suspenzí v kultivačních lahvích a sledováním úbytku substrátu, pomocí stanovení rozpuštěného organického uhlíku automatickým analyzátozem.

Klíčová slova: biodegradace, strukturní analogy, vinylpyrrolidon, 1-methyl-2-pyrrolidon, 1-octyl-2-pyrrolidon, akrylamid

## **ABSTRACT**

Degradation of 1-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and 1-octyl-2-pyrrolidone (2-OP) was monitored in liquid mineral medium (MM), in order to find and to attempt to identify bacterial strains that are capable of NMP and 2-OP degradation. First tests were performed with a concentration of 2 g/l NMP, which prove to be inappropriate. For a second series of experiments lower concentration of 300 mg/l NMP and 200 mg/l 2-OP was selected. Biodegradation ability of the cultures was evaluated by measuring turbidity of each suspension and by monitoring substrate utilization by measuring dissolved organic carbon.

Keywords: biodegradation, structure analogues, vinylpyrrolidone, 1-methyl-2-pyrrolidone, 1-octyl-2-pyrrolidone, acrylamide

Rád bych na tomto místě poděkoval vedoucímu mé diplomové práce panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho ochotu, odbornou pomoc, cenné rady a připomínky a za svůj čas, který mi věnoval při zpracování mé diplomové práce. Dále bych rád poděkoval všem zaměstnancům ÚIOŽP Fakulty technologické, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a zvláště pak paní Lence Machálkové, za jejich pomoc při experimentální práci a za vytvoření vynikajících pracovních podmínek pro provedení mé práce. V neposlední řadě taky děkuji všem, kteří mě v průběhu studia a psaní diplomové práce podporovali.

*„Vzdělaný člověk by měl znát nejen od všeho něco, ale také od něčeho vše“*

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 POLYVINYLPIRROLIDON</b> .....	<b>13</b>
1.1 POUŽITÍ .....	13
1.2 VLASTNOSTI.....	13
1.2.1 Toxikologické vlastnosti .....	14
1.2.2 Ekologické informace .....	14
<b>2 1-METHYL-2-PYRROLIDON</b> .....	<b>15</b>
2.1 POUŽITÍ .....	15
2.2 VLASTNOSTI.....	15
2.2.1 Toxikologické vlastnosti .....	16
2.2.2 Ekologické informace .....	16
2.2.3 Působení na lidské zdraví.....	17
2.3 BIODEGRADABILITA .....	17
<b>3 AKRYLAMID</b> .....	<b>20</b>
3.1 POUŽITÍ .....	20
3.2 VLASTNOSTI.....	20
3.2.1 Toxikologické vlastnosti .....	20
3.3 BIODEGRADABILITA .....	21
3.3.1 Bacillus cereus.....	21
3.3.2 Antarctic bakterium.....	22
<b>4 1-OCTYL-2-PYRROLIDON</b> .....	<b>24</b>
4.1 POUŽITÍ .....	24
4.2 VLASTNOSTI.....	24
4.2.1 Toxikologické vlastnosti .....	24
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>25</b>
<b>5 NÁVODY</b> .....	<b>26</b>
5.1 PŘÍPRAVA MINERÁLNÍCH ŽIVNÝCH PŮD .....	26
5.1.1 TYA agar.....	26
5.1.2 Minerální agar s kvasničným autolyzátem .....	26
5.1.3 Agar s obsahem NMP .....	26
5.1.4 Agar s obsahem 2-OP.....	26
5.1.5 Ochuzený agar .....	26
5.2 IZOLACE BAKTERIÁLNÍCH KULTUR.....	27
5.2.1 Kultury rozkládající NMP .....	27
5.2.2 Kultury rozkládající 2-OP .....	27
5.3 TEKUTÉ MINERÁLNÍ MÉDIUM.....	27
5.3.1 Složení.....	27



5.3.2	Příprava .....	28
5.4	DEGRADACE <i>N</i> -METHYL PYRROLIDONU V TEKUTÉM MÉDIU.....	28
5.4.1	Postup při vstupní koncentraci 2 g/l NMP .....	28
5.4.2	Postup při vstupní koncentraci 300 mg/l NMP .....	29
5.5	DEGRADACE 1-OCTYL-2-PYRROLIDONU V TEKUTÉM MÉDIU .....	29
5.5.1	Postup při vstupní koncentraci 200 mg/l 2-OP .....	29
5.6	PŘÍPRAVA TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA SE SNÍŽENÝM OBSAHEM DUSÍKU.....	30
5.6.1	Složení.....	30
5.6.2	Příprava .....	30
5.7	VYUŽITÍ <i>N</i> -METHYL PYRROLIDONU JAKO JEDINÉHO ZDROJE DUSÍKU .....	30
5.8	OXIDAČNĚ FERMENTAČNÍ TEST .....	31
5.8.1	Složení média pro OF-test.....	31
5.8.2	Příprava .....	31
5.8.3	Postup.....	32
5.9	NEFERMTEST 24 .....	32
5.9.1	Potřeby pro práci .....	32
5.9.2	Příprava inokula .....	32
5.9.3	Inokulace .....	32
5.9.4	Inkubace .....	33
5.9.5	Hodnocení .....	33
5.9.6	Identifikace.....	33
5.10	GRAMOVO BARVENÍ .....	33
<b>6</b>	<b>PŘÍSTROJE.....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>36</b>
7.1	PŮVOD MIKROBIÁLNÍCH KULTUR.....	36
7.2	ZÁKLADNÍ IDENTIFIKACE BAKTERIÁLNÍCH KULTUR .....	36
7.2.1	Kultivace bakteriálních kultur na rozdílných agarrech.....	36
7.2.2	Gramovo barvení.....	37
7.3	DALŠÍ IDENTIFIKAČNÍ TESTY .....	38
7.3.1	Kultivace při různých teplotách .....	38
7.3.2	Oxidačně fermentační test, oxidasa, katalasa.....	39
7.3.3	NEFERMtest 24 .....	39
7.4	BIODEGRADACE V TEKUTÉM MÉDIU PŘI KONCENTRACI NMP 2 G/L.....	41
7.4.1	Bakteriální kultura MP1 .....	41
7.4.2	Bakteriální kultura MP2 .....	43
7.4.3	Bakteriální kultura MP3 .....	45
7.4.4	Bakteriální kultura MP4 .....	46
7.4.5	Bakteriální kultura MP7 .....	48
7.4.6	Bakteriální kultura FEN2B.....	49
7.5	BIODEGRADACE V TEKUTÉM MÉDIU PŘI KONCENTRACI NMP 300 MG/L .....	51
7.5.1	Bakteriální kultura MP1 .....	52
7.5.2	Bakteriální kultura MP2 .....	53
7.5.3	Bakteriální kultura FEN2B.....	55

7.5.4	Bakteriální kultura MP10 .....	57
7.5.5	Bakteriální kultura MP11 .....	58
7.5.6	Bakteriální kultura MP13 .....	60
7.6	NMP JAKO JEDINÝ ZDROJ DUSÍKU .....	62
7.6.1	Bakteriální kultura MP1 .....	62
7.6.2	Bakteriální kultura MP2 .....	63
7.6.3	Bakteriální kultura FEN2B.....	65
7.7	DEGRADACE 200 MG/L 1-OCTYL-2-PYRROLIDONU V TEKUTÉM MÉDIU .....	66
7.7.1	Bakteriální kultura OP1 .....	66
7.7.2	Směsná bakteriální kultura OP2.....	67
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>69</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>		<b>71</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>		<b>74</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>75</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>77</b>

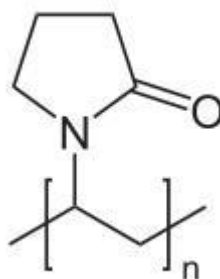
## ÚVOD

Některé člověkem vytvořené organické sloučeniny, které se samy nevyskytují ve volné přírodě, se nazývají xenobiotika. Jejich nízká biodegradabilita může být způsobena neschopností mikroorganismů efektivně využívat organické sloučeniny s neobvyklými chemickými strukturami nebo vlastnostmi. Nicméně schopnost mikroorganismů biodegradovat xenobiotika, mezi které patří i N-methylpyrrolidon nebo N-oktylpyrrolidon, může být zvýšena obohacením mikrobiálních kultur nebo jejich adaptací na specifické organické sloučeniny. Čas, který mikroorganismy potřebují k mineralizaci xenobiotik, a jejich koncentrace je kritickým faktorem určujícím efektivní biodegradabilitu v čistírnách odpadních vod. Cílem práce je pokusit se izolovat a popsat bakterie, které právě tyto xenobiotika dokáží rozložit, protože bakterie schopné rozkladu N-methylpyrrolidonu, N-oktylpyrrolidonu nebo akrylamidu by teoreticky mohly zahájit rozklad vinylpyrrolidinu nebo postranních řetězců polyvinylpyrrolidonu a tím jej pomoci eliminovat z odpadních vod.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYVINYLPIRROLIDON

Polyvinylpyrrolidon –  $(C_6H_9NO)_n$  (obr. 1) nebo také 1-ethenyl-2-pyrrolidon, povidon, polyvidon, PNVP, PVP, byl poprvé syntetizován profesorem Walterem Reppem, který si ho v roce 1939 nechal patentovat. Vyrábí se z *N*-vinylpyrrolidonu, za normálních podmínek lehce nažloutlé organické sloučeniny s charakteristickým zápachem, která je však vysoce toxická pro vodní organismy.



Obr. 1 - Struktura PVP

### 1.1 Použití

Začal se používat už v první polovině 20. století jako náhrada krevní plazmy a později našel řadu uplatnění v medicíně, farmacii, kosmetice a průmyslové výrobě. PVP se běžně používá jako pojivo v lécích ve formě tablet. S jodem tvoří komplex s dezinfekčními vlastnostmi, který se používá například v tekutých mýdlech, mastech nebo chirurgických lázních. Dále se PVP používá při výrobě různých šampónů, mýdel, zubních past, nátěrových hmot a lepidlech. Jako aditivum do potravin má označení E1201 a používá se jako stabilizátor. PVP se také dobře váže na polární molekuly, což vedlo k jeho využití ve vrstvách pro fotografické papíry, folie k inkoustovému tisku a také v inkoustech pro tiskárny

### 1.2 Vlastnosti

PVP je rozpustný ve vodě a jiných polárních rozpouštědlech. Jedná se o bílý prášek charakterického zápachu. Rozkládá se při teplotách vyšších než 130°C. Rozpuštěný ve vodě má newtonovskou viskozitu, závislou na jeho molekulární hmotnosti, kdy vyšší koncentrace roztoku znamená i vyšší hodnotu viskozity.

### 1.2.1 Toxikologické vlastnosti

Testováním akutní toxicity na potkanech byla zjištěna  $LD_{50} > 2000 \text{ mg/kg}$ . Při inhalaci par pak  $LC_{50} > 5,2 \text{ mg/l /4h}$ . Při testech na králících bylo zjištěno, že polyvinylpyrrolidon nedráždí oči, ani pokožku.<sup>3</sup> Dále nebyly zjištěny žádné karcinogenní, teratogenní nebo mutagenní účinky na testované zvířata.<sup>2</sup>

Nebezpečné vlastnosti nelze vyloučit, ale jsou nepravděpodobné tehdy, pokud je s výrobkem nakládáno patřičným způsobem. S produktem je nutno zacházet s opatrností, obvyklou při nakládání s chemikáliemi

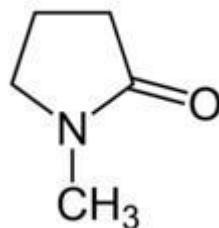
### 1.2.2 Ekologické informace

Produkt by se nikdy neměl vylévat do vody, odpadních vod nebo do půdy, protože je těžce eliminovatelný. Biodegradace je menší než 10%/15 d.

Při testování toxicity na rybách *Leuciscus idus* byla zjištěna  $LC_{50} > 10000 \text{ mg/l /96 h}$ . Při koncentraci větší než 1995 mg/l /30 min je PVP toxický pro bakterie v aktivovaném kalu.<sup>3</sup>

## 2 1-METHYL-2-PYRROLIDON

N-methylpyrrolidon –  $C_5H_9NO$  (obr. 2) nebo také NMP, 1-methyl-2-pyrrolidon, N-methyl-2-pyrrolidon. Jedná se o xenobiotikum, tedy cizorodou látku, která není vytvářena přírodními procesy. Jeho strukturní vzorec připomíná N-vinylpyrrolidon, monomer pro výrobu PVP.



Obr. 2 - Struktura NMP

### 2.1 Použití

NMP je používán jako přísada do různých pesticidů pro zemědělské potřeby. Díky jeho dobrým rozpouštěcím vlastnostem je dále využíván v mnoha průmyslových odvětvích jako rozpouštědlo pro širokou řadu chemikálií a polymerů nebo jako rozpouštědlo při zpracování a čištění ropy, pryskyřice, plynů, olefinů atd. Dále bývá využíván ve farmaceutickém průmyslu, kde zajišťuje rychlejší přechod léčiv skrz pokožku.<sup>5</sup>

### 2.2 Vlastnosti

NMP je za normálních podmínek (20°C, 101,3 kPa) stabilní bezbarvá kapalina slabého charakteristického zápachu. Jedná se o nehořlavou a nevznětlivou kapalinu bez oxidačních vlastností, mísitelnou s vodou nebo s organickými rozpouštědly. Rozkládá se při teplotě vyšší než 300°C a při koncentraci 100 g/l  $H_2O$  má roztok pH v rozmezí 8-10. Při skladování a manipulaci podle pokynů nedochází k nebezpečným reakcím. S kyselinami a zásadami probíhají exotermní reakce a při jeho tepelném rozkladu může docházet ke vzniku toxických zplodin – oxidů dusíku ( $NO_x$ ) a oxidů uhlíku ( $CO$ ,  $CO_2$ ).<sup>4</sup>

### 2.2.1 Toxikologické vlastnosti

Testováním na hlodavcích byla zjištěna  $LD_{50} > 3600$  mg/kg u králíka při orální aplikaci, při aplikaci dermálně na potkanech pak  $LD_{50} > 8000$  mg/kg. Při inhalaci, kdy byla působení NMP vystavena pouze hlava potkana byla  $LC_{50} > 5,1$  mg/l /4h. Při působení na celé tělo byla tato koncentrace  $LC_{50} > 1,7$  mg/l /4h a to díky prostupu látky skrz pokožku. Dále bylo zjištěno, že N-methylpyrrolidon způsobuje podráždění očí i kůže.

NMP není potřeba klasifikovat jako karcinogenní. Během různých testů s bakteriemi a buněčnou kulturou savců nebyl zjištěn žádný mutagenní účinek. Testy mutagenních vlivů prováděných *in vivo* přinesly negativní výsledky. NMP je podle EU zařazen do druhé kategorie reprodukční toxicity, takže by na něj mělo být hleděno jako na látku poškozující lidský plod (vývinu škodící). Opakované testování na zvířatech při vysokých expozicích, které způsobují i jiné toxické efekty, vedlo k poškození varlat.<sup>4</sup>

Při zkoumání NMP bylo zjištěno, že má nízkou akutní toxicitu při vdechnutí, požití nebo při styku s kůží, prakticky nedráždí kůži, ale způsobuje středně silné podráždění očí. Ve studiích u metabolismu zvířat byl NMP podáván jak orálně tak i vdechováním a stykem s kůží. Chemikálie byla velmi rychle roznesena v celém těle, metabolismem přeměněna na 5-hydroxy-N-methyl-2-pyrrolidon a vyloučena močí ven z těla (přibližně 80% do 24 h).<sup>5</sup>

### 2.2.2 Ekologické informace

Při testech toxicity u ryb, konkrétně u *Leuciscus idus* a *Salmo gairdneri* byla zjištěna  $LC_{50} > 500$  mg/l /96 hod. Dále je NMP toxický pro bezobratlé živočichy, kdy u testů na *Daphnia magna* byla zjištěna  $LC_{50} > 1000$  mg/l /24 hod, a při koncentracích vyšších než 600 mg/l působí negativně na aktivovaný kal.

Výrobce N-methylpyrrolidonu uvádí, že bioakumulace v organismech je nepravděpodobná vzhledem k hodnotě rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda. Podle kritérií OECD je N-methylpyrrolidon biologicky odbouratelný, dochází k biodegradaci více než 90%.<sup>4</sup>



### 2.2.3 Působení na lidské zdraví

Pro NMP byly toxické účinky pozorovány pouze při vysokých koncentracích a při opakované a dlouhodobé expozici. Při průmyslovém používání NMP není člověk vystaven tak velkým koncentracím, takže se předpokládá, že riziko toxických účinků je malé.<sup>5</sup>

## 2.3 Biodegradabilita

Autoři Sui Tse Chow a Tju Lik Ng se ve své práci<sup>6</sup> věnovali studiu biodegradace N-methyl-2-pyrrolidonu pomocí bakterií, obsaženými v aktivovaném kalu. Die-away test probíhal pomocí metody doporučené Britskou STSCD<sup>7</sup>. Mikroorganismy schopné biodegradace NMP byly obsaženy ve vzduchem vysušeném, aktivovaném kalu, který pocházel z čistírny odpadních vod Kim Chuan. Na semi-kontinuální test aktivovaného kalu byla použita metoda pro biodegradaci syntetických detergentů popsána Americkou ASTM.<sup>8</sup> Byl použit stejný aktivovaný kal jako v případě die-away testu. Efektivita tohoto systému byla ověřena použitím dobře biodegradabilního lineárního alkyl benzen sulfonátu standardu a špatně biodegradabilního standardu tetrapropylen benzen sulfonátu, dodaných z Chemische Werke Huls, Německo. Vstupní koncentrace NMP byla 100ppm.

Pro stanovení sledování rozkladu autoři použili dvě analytické metody. První byla založena na měření koncentrace NMP ve vodném roztoku pomocí plynové chromatografie, za použití FID detektoru. Druhá byla založena na měření chemické spotřeby kyslíku podle metody APHA.<sup>9</sup>

Kalibrační křivka koncentrace NMP byla lineární v rozsahu 5-100ppm. Výsledky die-away testu prokázaly, že NMP je snadno rozložitelný ve statickém systému, kdy po dvou týdnech došlo k 95% biodegradaci. Při semi-kontinuálním testu a po 5ti denní adaptaci kalu na 100ppm NMP došlo po dalších 7mi dnech k průměrné biodegradabilitě 95% původního množství NMP. Bohužel se autoři dále nevěnovali studiu aktivovaného kalu a identifikaci bakterií, díky kterým biodegradace probíhala.

K určení, zda-li se N-methyl-2-pyrrolidon kompletně rozloží na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O byla při degradaci monitorována i chemická spotřeba kyslíku. Na konci testu se ukázalo, že se NMP nerozkládal úplně, ale vznikal metabolit, jehož CHSK byla asi poloviční nežli u NMP. Bohužel vznikající metabolit nebyl detekován při plynové chromatografii.

Závěr autorů byl takový, že NMP je za normálních podmínek v čistírnách odpadních vod biodegradabilní, nicméně metabolitem této biodegradace byla karbonylová sloučenina, která měla vysokou hodnotu CHSK a za testovaných podmínek nebyla dále rozložitelná. <sup>6</sup>

Autoři Jong Kwang Lee a kol. <sup>10</sup> sledovali rozklad diethyleneglycol monomethyletheru (DGMME), 1-amino-2-propanolu (APOL), 1-methyl-2-pyrrolidonu (NMP), diethyleneglycol monoethyletheru (DGMEE), tetraethyleneglycolu (TEG) a tetrahydrothiophene-1,1-dioxinu bakteriálními kulturami, které izolovali ve svých předchozích pracích. Jednalo se o bakterie *Acinetobacter* sp., *Cupravidus* sp., *Pseudomonas* sp., *Paracoccus* sp. a *Pseudomonas* sp..

Každá z kultur byla předkultivována zvlášť v tekutém minerálním médiu obohaceném o 2 g/l každého xenobiotika, které byly tyto bakterie schopné rozkládat. Kultivace probíhala po dobu 72 hodin při 30°C a za stálého míchání 120 ot/min. Poté byly jednotlivé kultury centrifugovány 30 minut při 4°C a 5000g, smíchány a imobilizovány na polyethyleglykol (PEG) nosič a označeny jako SMIC-PEG. Autoři navíc připravili i druhý směsný vzorek, který byl obohacen o aktivovaný kal a označen jako AS-SMIC-PEG.

Tyto směsné kultury byly poté vlyty do reaktorů, obsahujících odpadní vodu ze společnosti vyrábějící elektroniku, která byla předtím analyzována a byl u ní zjištěn přesný obsah jednotlivých xenobiotik. V obou reaktorech byly nastaveny stejné podmínky a to teplota 30°C, 3mg/l rozpuštěného kyslíku a pH 7, které byly automaticky monitorovány a regulovány. Jednotlivé xenobiotika byly analyzovány pomocí plynové a kapalinové chromatografie po dobu 9 dní ve tří denních intervalech.

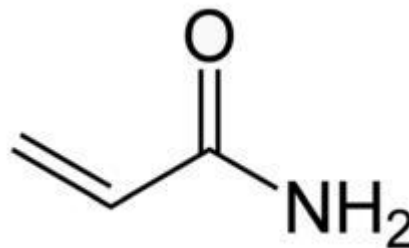
Na začátku kultivace obsahovala odpadní voda 93,2 mg/l N-methyl-2-pyrrolidonu. V reaktoru obsahujícím SMIC-PEG dosáhla koncentrace NMP 1,26 mg/l již po 6ti dnech a po 9ti dnech již NMP nebyl detekován. V reaktoru s AS-SMIC-PEG byla biodegradace pomalejší, kdy po 6ti dnech koncentrace NMP dosahovala hodnoty 17,3 mg/l, ale stejně jako u předchozího reaktoru nebyl na konci 9. dne NMP detekován.

V závěru svojí práce autoři uvádějí, že bylo dosaženo 85%-ní biodegradace veškerých xenobiotik a 95%-ní biodegradace NMP. Bohužel se ve svojí práci nezabývají studiem, která z uvedených bakteriálních kultur má na svědomí rozklad NMP, protože je použili dohromady ve formě směsného vzorku a nezkoumali je jednotlivě. Zároveň svými výsledky vy-

vrací závěry prací autorů T. Barkay a kol.<sup>11</sup>, S.R. Hutchins a kol.<sup>12</sup>, E.L. Madsen a kol.<sup>13</sup> a J.C. Spain a kol.<sup>14</sup> ve kterých se tvrdí, že NMP je typické xenobiotikum, těžce rozložitelné pomocí mikroorganismů bez předchozí adaptace nebo vyskytujících se v přírodním prostředí.

Autoři Alejandro Ocegüera-Cervantes a kol. se zabývali rozkladem polyuretanu a *N*-methyl pyrrolidonu pomocí dvou kmenů *Alicyclophilus* sp. . V průběhu svojí práce zjistili, že tyto bakteriální kmeny jsou schopny během první fáze růstu na polyuretanovém plastu využívat NMP jako jediný zdroj uhlíku a dusíku. V závěru práce pak uvádějí, že jejich práce je první zmínkou o bakterii schopné využívat NMP ke svému růstu. Jejich objev, že *Alicyclophilus* sp. je schopna takto NMP využívat a vzhledem ke známým toxikologickým vlastnostem NMP, může mít velký význam při výzkumu jak se vyhnout toxickým následkům při jeho vypouštění do životního prostředí.<sup>24</sup>

### 3 AKRYLAMID



Obr. 3 - Struktura akrylamidu

#### 3.1 Použití

Akrylamid je používán v mnoha průmyslových odvětvích jako je papírenský, stavební, metalurgický nebo textilní průmysl, avšak více než 90% celosvětové produkce je použito na výrobu polyakrylamidu.

#### 3.2 Vlastnosti

Široké uplatnění a nekontrolované vypouštění akrylamidu a polyakrylamidu vedlo ke kontaminování půd a vody. Díky jeho chronické toxicitě je velmi nežádoucím kontaminantem v pitných vodách. Dráždí kůži a dýchací cesty a je rychle vstřebáván všemi cestami. Vykazuje akutní, subchronickou a chronickou toxicitu. USEPA jej klasifikovala jako možný karcinogen pro člověka.<sup>15</sup>

##### 3.2.1 Toxikologické vlastnosti

Při laboratorních testech byla při orálním podávání u krys zjištěna LD<sub>50</sub> 203-300mg/kg za 24hodin nebo 159-191mg/kg za 168 hodin. 10%ní vodný roztok aplikovaný na neporušenou kůži králíka nevyvolal žádnou dráždivou reakci, avšak při aplikaci na poškozenou kůži způsoboval červenání a otoky. Při aplikaci do očí způsoboval bolest a mírné podráždění spojivek, které bylo kompletně vyléčeno po 24 hodinách.

U člověka způsobuje podráždění pokožky a dýchacího ústrojí.<sup>15</sup>

### 3.3 Biodegradabilita

Je známo již několik mikrobiálních kultur, které umí využívat akrylamid jako svůj jediný zdroj uhlíku a dusíku. Například *Arthrobacter* sp., *Rhodoroccus rhodochrous*, *Bacillus sphaericus*, *Pseudomonas putrefaciens* a *Rhodococcus* sp.. Aklimatizace těchto kultur na akrylamid pak zvyšuje míru jeho biodegradace.<sup>19</sup>

Akrylamid je za aerobních podmínek snadno biodegradabilní ve vodě i v půdách, za přítomnosti mikroorganismů schopných produkovat enzym amidázu, která deaminuje akrylamid na akrylovou kyselinu a amoniak. Ke kompletní degradaci 10-20 ppm akrylamidu v řece dojde asi za 12 dní. Při aklimatizaci mikroorganismů asi za 2 dny.<sup>19</sup>

Ačkoli je akrylamid v povrchových vodách a při nízkých (10 ppm) koncentracích velmi rychle biodegradován, při vyšších koncentracích se biodegradace zpomaluje.<sup>22</sup> I přes široký výběr mikroorganismů se schopností akrylamid degradovat trvá několik dní, než jsou patrné nějaké známky biodegradace. Doba setrvání pro akrylamid může být v řádu dní, týdnů nebo i měsíců v řekách nebo na pobřeží s nízkou mikrobiální aktivitou.<sup>16</sup>

#### 3.3.1 *Bacillus cereus*

Autoři M.Y. Shukor a kol. izolovali ze vzorku půdy několik druhů bakterií schopných rozkladu akrylamidu. Jedna kultura, která měla nejvyšší růst na akrylamidu jako zdroji uhlíku, byla izolována pro pozdější charakterizaci a studium. Tato kultura byla identifikována a označena jako *Bacillus cereus* kmen DRY135. Vzorky půdy byly odebírány z několika zemědělských oblastí Malajsie, kde se používal polyakrylamid v herbicidu známém pod obchodní značkou ROUNDUP.<sup>17</sup>

#### **Vliv pH:**

Vliv počáteční hodnoty pH byl zkoumán za pokojové teploty, hodnota pH byla měněna mezi pH 6 – 8, pomocí 50 mM fosfátového pufru. Měření růstu bylo prováděno po 72 hodinové inkubaci. Z výsledků měření pak vyšlo najevo, že bakterie nejlépe rostly v rozmezí pH 6,8-7,0

**Vliv teploty:**

Růst byl sledován při různých teplotách a to v rozmezí 20-40°C. Z výsledků pak vyšlo najevo, že růst nejlépe probíhal za teplot 25 a 30°C bez většího rozdílu mezi těmito hodnotami. Vysoký pokles v počtu kolonií byl sledován při teplotách vyšších než 35°C.

**Vliv zdrojů uhlíku:**

Nejrůznější zdroje uhlíku, jako například glukosa, fruktosa, laktosa, maltosa, mannitol a kyselina citronová, byly použity při koncentraci 1%, aby se zjistilo, jaký budou mít vliv na bakterie degradující akrylamid, který je zároveň jejich jediný zdroj dusíku. Všechny tyto zdroje uhlíku zvyšovaly růst mikroorganismů ale nejvíce z nich glukosa. Optimální koncentrace pro růst *Bacillus cereus* kmen DRY135 byla 0,5-1%. Při vyšších koncentracích byla pozorována redukce růstu, pravděpodobně zvyšujícím se osmotickým tlakem nebo snížením aktivity vody.

**Vliv koncentrace akrylamidu:**

Tento experiment byl proveden za účelem zjištění optimální koncentrace akrylamidu pro růst kmene DRY135. Koncentrace byly zvoleny v rozmezí 100-4000 mg/l. Nejvyšší růst by pozorován při koncentraci akrylamidu v rozmezí hodnot od 500 do 1500 mg/l. Koncentrace vyšší než 3000 mg/l byla pro tyto bakterie toxická.

**3.3.2 Antarctic bacterium**

Autoři M.Y. Shukor a kol. izolovali bakterie schopné rozkladu akrylamidu ze vzorků půdy. Tyto vzorky pocházely z pobřeží Wilkes Land v oblasti jménem Windmill Islands v Antarktidě a kde je odebral pan Omar Pozan. Z těchto vzorků byla později izolována kultura bakterií, která byla označena jako *Pseudomonas* sp. kmen DRYJ7.<sup>18</sup>

**Vliv pH:**

Kultura DRYJ7 roste při širokém rozmezí pH hodnot a to od 6,0 až do 8,5. Nicméně prováděný pokus ukázal, že optimální hodnotou je pH mezi 7,5 až 8,5. Pokus probíhal při 10°C za použití fosfátového pufru a hodnoty byly měřeny po 40ti hodinové kultivaci.

**Vliv teploty:**

Bakterie byly kultivovány v rozmezí teplot od 5 do 50 °C. Nejlepší růst probíhal za teploty 15°C. Vzhledem k tomu, že v Antarktidě může bioremediace probíhat pouze v létě, když

jsou teploty mezi 0 až 10°C, může se tato kultura použít i za těchto teplot, ale růst a následná efektivita rozkladu akrylamidu nebude tak velká

**Vliv zdrojů uhlíku:**

Jako zdroje uhlíku byly postupně použity sacharosa, glukosa, maltosa, fruktosa, laktosa a kyselina citronová. Jednotlivé pokusy s těmito látkami ukázaly, že nejlepším zdrojem uhlíku je sacharosa a glukosa. Laktóza s kyselinou citronovou růst vůbec nepodporovaly. Jako optimální množství byla zvolena koncentrace 1-2% glukosy. Se zvyšující se koncentrací glukosy se snižoval růst DRYJ7.

**Vliv koncentrace akrylamidu:**

Tento experiment byl proveden za účelem zjištění optimální koncentrace akrylamidu pro růst kmene DRYJ7. V experimentu byly použity koncentrace v rozmezí 100 až 2000 mg/l, přičemž se ukázalo, že optimální koncentrace akrylamidu byla 500mg/l. Při vyšších koncentracích bakteriální růst dramaticky klesal.

## 4 1-OCTYL-2-PYRROLIDON

O biodegradabilitě, případně o mikroorganismech rozkládajících 1-octyl-2-pyrrolidon, nejsou ve vědecké literatuře dostupné žádné informace.

### 4.1 Použití

Rozpouštědlo pro polymery a hydrofobní látky, nosič barviva u aramidových tkanin, smáčedlo v průmyslových a institučních čističích, čisticí prostředek ve farmacii (například ve veterinární medicíně), změkčovač v čističích tvrdých povrchů a při čištění kovů

### 4.2 Vlastnosti

Jedná se o mírně nažloutlou kapalinu slabého zápachu, s vysokým bodem varu i vzplanutí a s velmi nízkým tlakem páry. Má velmi nízkou rozpustnost ve vodě, ale rozpouští se v nejrůznějších organických rozpouštědlech.<sup>23</sup>

#### 4.2.1 Toxikologické vlastnosti

Při zkoumání akutní toxicity na zvířatech byly použity laboratorní krysy o váze 200-300g, kterým byla podávána dávka *N*-oktyl-2-pyrrolidonu po dobu 18-24 hodin. Poté byly navraceny do svých klecí a byly pozorovány známky toxicity. Při testech byla zjištěna  $LD_{50}=2,05$  g/kg.<sup>21</sup>

Při testech na dráždivé účinky očí a kůže byli použiti králíci. Každý test probíhal s čistou látkou a následně s 2%ní suspenzí. Na závěr testů byl *N*-oktyl-2-pyrrolidon vyhodnocen jako extrémně dráždivý pro oči i kůži za použití čistého vzorku, nedráždivý pro oči a slabě dráždivý pro kůži za použití suspenze.<sup>21</sup>

Způsobuje poleptání, je toxický pro vodní organismy a ve vodním prostředí může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky.<sup>20</sup>



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 NÁVODY

### 5.1 Příprava minerálních živných půd

#### 5.1.1 TYA agar

Tryptone Yeast extract Agar

4,2 g TYA agaru bylo smícháno s 200 ml vody. Po důkladném rozpuštění byl sterilizován v autoklávu 23 minut při 122°C. Po sterilizaci byl rozlit do připravených Petriho misek v mikrobiologickém boxu.

#### 5.1.2 Minerální agar s kvasničným autolyzátem

3,9 g základu pro minerální agar s kvasničným autolyzátem + 0,3 ml roztoku stopových prvků + 200 ml destilované vody. Sterilizace probíhala 23 minut při 122°C

#### 5.1.3 Agar s obsahem NMP

Příprava byla stejná jako v případě 5.1.2, avšak po sterilizaci bylo do lahví s agarem přidáno 6 ml sterilního roztoku NMP, až poté byl agar rozlit do Petriho misek.

#### 5.1.4 Agar s obsahem 2-OP

Příprava byla stejná jako v případě 5.1.2, avšak po sterilizaci bylo do lahví s agarem přidáno 30 µl sterilního roztoku 1-octyl-2-pyrrolidonu.

#### 5.1.5 Ochuzený agar

0,5 g TYA agaru + 1,5 g čistého agaru + 0,33 g 60% roztoku mléčnanu sodného + 0,2 g octanu sodného + 0,2 g citrátu sodného + 100 ml destilované vody. Po smíchání a důkladném rozpuštění byl agar sterilizován 23 minut při 122°C a následně rozlit do připravených Petriho misek v mikrobiologickém boxu.

## 5.2 Izolace bakteriálních kultur

### 5.2.1 Kultury rozkládající NMP

Aktivovaný kal z ČOV Malenovice byl rozředěn do dvou děliček o objemu 200ml na obsah sušiny 1g/l a 0,1 g/l. Do obou pak bylo nadávkováno po 1ml 10% roztoku NMP. Po týdnu byl zkontrolován rozklad NMP pomocí stanovení DOC. Po třech týdnech od nasazení bylo z děličky obsahující kal o sušině 0,1 g/l odebráno 0,5 ml suspenze a provedeno desetinné ředění až na hodnotu  $10^{-5}$ . Z jednotlivých zkumavek s desetinným ředěním pak bylo odebráno 50  $\mu$ l, které byly naočkovány na minerální agar s obsahem NMP. Po týdenní kultivaci při teplotě 23°C byl na miskách pozorován nárůst kolonií různých bakteriálních druhů. Pro pokus degradace NMP v tekutém médiu byly vybrány 4 kultury, označeny jako MP10, MP11, MP12 a MP13 a tyto byly přeočkovány na TYA agar a na minerální agar s NMP pro získání čistých kultur. Kultury MP11 a MP12 se poté ukázaly jako totožné, proto s kulturou MP12 testy nakonec neprobíhaly.

### 5.2.2 Kultury rozkládající 2-OP

Ze současně probíhající diplomové práce Martiny Vyoralové byly získány lahve s obsahem půdního inokula a aktivovaného kalu, ve kterých proběhl rozklad 1-octyl-2-pyrrolidonu. Do těchto lahví byl v průběhu tří měsíců postupně přidáván další 2-OP v koncentracích 100 mg/l (4x), aby došlo k pomnožení degradačních mikroorganismů. Lahve byly inkubovány při 25°C za stálého míchání na třepačce. Po třech měsících byl z lahve s aktivovaným kalem odebrán vzorek, který byl zředěn pomocí desetinného ředění až na hodnotu  $10^{-5}$  a poté naočkován na minerální agar s obsahem 2-OP. Po týdenní kultivaci při teplotě 23°C byla pro následující testy přeočkována nejvýrazněji rostoucí kultura OP1 a dále i kultury DX a DY.

## 5.3 Tekuté minerální médium

### 5.3.1 Složení

20 ml roztoku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o koncentraci 9,07 g/l

80 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci 23,90 g/l

2 ml roztoku stopových prvků, který obsahoval:

43 mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 57 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 43 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25 mg/l  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 37 mg/l  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

10 ml roztoku  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci 10 g/l

10ml roztoku  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci 3 g/l

10 ml roztoku  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci 1 g/l

10ml roztoku NaCl o koncentraci 50 g/l

10ml roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o koncentraci 30 g/l

848 ml destilované vody

### 5.3.2 Příprava

Do odměrné baňky o objemu 1 l bylo nalito asi 500ml destilované vody, postupně pak byly přidávány zásobní roztoky jednotlivých solí a nakonec byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku a minerální médium bylo promícháno. Nakonec ještě byla změřena hodnota pH, která se musela pohybovat v rozmezí 7,4 – 7,5

## 5.4 Degradace *N*-methyl pyrrolidonu v tekutém médiu

Láhve A, B, C: kultivační

Láhev D: kontrola vstupního množství DOC a kontrola vstupní hodnoty  $\text{OD}_{600}$

Láhev E: kontrola vstupní hodnoty  $\text{OD}_{600}$  a kontrola hodnoty DOC pozadí

### 5.4.1 Postup při vstupní koncentraci 2 g/l NMP

Pro pokus s jednou kulturou bylo nutno připravit 5 lahví s 49 ml roztoku minerálního média. Tyto lahve byly označeny písmeny A-E. Po jejich sterilizaci, která probíhala v autoklávu při 122°C 23 minut, a po následném vychladnutí byl do lahví A-D přidán 1 ml sterilního 10%-ního roztoku *N*-methyl pyrrolidonu a do lahve E 1ml sterilní destilované vody. Poté bylo do lahví A, B, C a E přidáno 50  $\mu\text{l}$  suspenze zkoumané kultury (2. stupeň McFarlan-

dovy stupnice) připravené z čerstvé kultury rostoucí na TYA agaru. Do lahve D bylo přidáno 50 µl sterilního fyziologického roztoku.

Po přípravě byly lahve A, B a C dokonale promíchány, kultivovány při 25°C na třepačce a denně z nich byly odebírány vzorky. V den nasazení pokusu byl z lahve D odebrán vzorek o objemu 3 ml, z něhož byl 1 ml zředěn destilovanou vodou v poměru 1:14 a zmražen pro pozdější stanovení DOC automatickým analyzátozem. Zbývající 2 ml byly použity na změření optické hustoty při 600 nm ( $OD_{600}$ ). Z lahve E byl v den nasazení pokusu odebrán vzorek o objemu 10 ml, ze kterého byly použity 2 ml pro stanovení  $OD_{600}$  a zbytek byl centrifugován v režimu 10000 g, 12 minut a 4°C. Získaný supernatant byl bez ředění zamražen pro pozdější stanovení DOC automatickým analyzátozem.

Z kultivačních lahví A, B, C byl denně odebrán vzorek o objemu 5 ml, z něhož byly 2 ml použity pro stanovení  $OD_{600}$  a zbytek byl centrifugován v režimu 10000 g, 12 minut a 4°C. Získaný supernatant byl poté podle potřeby zředěn destilovanou vodou a zamražen pro pozdější stanovení DOC automatickým analyzátozem.

Pokus byl ukončen v okamžiku, kdy se již neměnila hodnota DOC v kultivačních lahvích.

#### **5.4.2 Postup při vstupní koncentraci 300 mg/l NMP**

Do lahví A-D bylo přidáno namísto 1 ml pouze 150 µl 10%-ního roztoku NMP a do lahve E 150 µl sterilní destilované vody.

### **5.5 Degradace 1-octyl-2-pyrrolidonu v tekutém médiu**

#### **5.5.1 Postup při vstupní koncentraci 200 mg/l 2-OP**

Postup práce byl totožný jako při degradaci *N*-methyl pyrrolidonu, avšak s tím rozdílem, že kultivační lahve obsahovaly 50ml MM a místo dávkování NMP se do lahví A, B, C, D dávkovalo 10 µl roztoku 1-octyl-2-pyrrolidonu, do lahve E 10 µl destilované vody a pro stanovení DOC byl vzorek po centrifugaci ředěn destilovanou vodou pouze v poměru 1:1

## 5.6 Příprava tekutého minerálního média se sníženým obsahem dusíku

Pro pokus, zda-li jsou námi izolované kultury bakterií schopny využívat *N*-methyl pyrrolidon jako jediný zdroj dusíku, jsem musel připravit minerální médium, ve kterém jsem nahradil soli obsahující dusík jinými, bezdusíkatými.

### 5.6.1 Složení

20 ml roztoku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o koncentraci 9,07 g/l

80 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci 23,90 g/l

1 ml roztoku stopových prvků, který obsahoval:

30 mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 57 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 43 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20,4 mg/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  
40 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 18 mg/l  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

10 ml roztoku  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci 10 g/l

10ml roztoku  $\text{FeCl}_3$  o koncentraci 2,06 g/l

10 ml roztoku  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci 1 g/l

10ml roztoku  $\text{NaCl}$  o koncentraci 50 g/l

858 ml destilované vody

Jediný dusík, ve stopovém množství, byl obsažen v tetrahydrátu molybdenanu amonného, protože jiná sůl molybdenu nebyla k dispozici.

### 5.6.2 Příprava

Stejný postup jako v bodě 5.3.2

## 5.7 Využití *N*-methyl pyrrolidonu jako jediného zdroje dusíku

Pro každou z bakteriálních kultur bylo zapotřebí 6 lahví se 49,5 ml vysterilizovaného minerálního média. To bylo provedeno v autoklávu při 122°C 23 minut. 3 lahve obsahovaly pouze minerální médium se sníženým obsahem dusíku a 3 lahve obsahovaly navíc 270  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o koncentraci 30 g/l. Do každé lahve bylo poté přidáno 150  $\mu\text{l}$  sterilního 10%-ního roztoku NMP a 50  $\mu\text{l}$  suspenze zkoumané kultury, která byla předem vypěstována na ochuzeném agaru. Z těchto lahví byly v den nasazení pokusu odebrány 2 ml pro sta-

novení  $OD_{600}$  a 4 ml které byly centrifugovány v režimu 10000g, 12 minut a 4°C. Získaný supernatant byl dále zředěn v poměru 1:3 destilovanou vodou a bylo v něm provedeno stanovení celkového množství dusíku analyzátozem SKALAR. Dále bylo do třech lahví pro kontrolu množství dusíku nadávkováno 49 ml minerálního média, přidáno 270  $\mu$ l  $NH_4Cl$  a bylo z nich odebráno 12 ml, po centrifugaci byl stanoven obsah dusíku. Dále byly z kultivačních lahví denně odebrány 2 ml vzorku pro stanovení  $OD_{600}$ . Pokus byl ukončen v okamžiku, kdy se již hodnota  $OD_{600}$  neměnila. Poslední den pokusu bylo odebráno 8 ml, které byly opět centrifugovány v režimu 10000g, 12 minut, 4°C. Získaný supernatant byl ředěn poměrem 1:1 a bylo v něm provedeno stanovení celkového množství dusíku automatickým analyzátozem.

## 5.8 Oxidačně fermentační test

### 5.8.1 Složení média pro OF-test

0,2 g Peptonu

0,5 g NaCl

0,03 g  $K_2HPO_4$

1,0 g Glukosy

0,006 g Bromthymolové modři

0,3 g čistého agaru

100 ml destilované vody

### 5.8.2 Příprava

Jednotlivé složky byly postupně rozpuštěny v destilované vodě a po přidání agaru byly rozvařeny ve vodní lázni. Po rozpuštění agaru byla upravena hodnota pH na 7,2-7,4. Barva média byla tmavě zelená. Médium bylo poté rozlito do jednotlivých zkumavek, které byly umístěny do autoklávu a poté byly sterilizovány při 115°C po dobu 35 minut.

### 5.8.3 Postup

Na kličku byla nanesena čerstvá kultura vypěstovaná na TYA agaru a poté byl touto kličkou proveden vpich do celého objemu zkumavky s médiem.

## 5.9 NEFERMtest 24

### 5.9.1 Potřeby pro práci

Destička NEFERMtest 24

Suspenzní médium pro NEFERMtest 24

Činidlo pro test INDOL

Činidlo pro test FOSFATÁZA

Činidlo pro test NITRÁTY

Sterilizovaný parafinový olej

Petriho misky s kultivačním médiem

Zkumavky se sterilním fyziologickým roztokem

Zkumavka s 2.stupněm McFarlandovy zákalové stupnice

Mikropipeta a sterilní špičky

Běžné laboratorní mikrobiologické vybavení (kličky, popisovače, kahan)

### 5.9.2 Příprava inokula

Byla připravena zkumavka s 2.stupněm McFarlandovy zákalové stupnice, smícháním 0,2 ml 1% roztoku  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 9,8 ml 1% roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Z čisté kultury vypěstované na TYA agaru (viz 5.1.1) byla ve fyziologickém roztoku připravena suspenze.

### 5.9.3 Inokulace

Bakteriální suspenze ve fyziologickém roztoku byla důkladně homogenizována. Do všech jamek destičky ve sloupcích E-H bylo inokulováno 0,1 ml suspenze. Poté byl ze suspenze ve fyziologickém roztoku odpipetován 1 ml do roztoku z ampulky suspenzního média pro NEFERMtest 24. Tato zředěná suspenze byla důkladně homogenizována a inokulována po



0,1 ml do všech jamek ve sloupcích A-D. K jamkám H, G, F a E prvního řádku byly po inokulaci přidány 2 kapky parafinového oleje

#### **5.9.4 Inkubace**

Naočkovaná destička pro NEFERMtest 24 byla vložena do PE sáčku a při teplotě 30°C inkubována 48 hodin

#### **5.9.5 Hodnocení**

Po 48 hodinách inkubace byly některá jamky zakapány různými činidly, a to :

- 1. řada, jamka H – 2 kapky činidla pro IND
- 2. řada, jamka H – 1 kapka činidla pro PHS
- 3. řada, jamka H – 1 kapka činidla pro NIT
- 3. řada, jamka G – 1 kapka činidla pro NIT

Destička byla poté inkubována dalších 15 minut při laboratorní teplotě pro vývoj barevných reakcí. Po uplynutí této doby byly odečteny a zaznamenány výsledky všech testů. Pokud byl výsledek testu Nitráty negativní, byl do jamky opatrně přisypán zinkový prášek a destička byla opět inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Až poté byla odečtena reakce a výsledek byl zapsán do formuláře pro záznam výsledků.

#### **5.9.6 Identifikace**

Identifikace probíhala pomocí softwaru TNW

### **5.10 Gramovo barvení**

Byla připravena suspenze jednotlivých kultur. Po nanesení na podložní sklíčko a následném vysušení byl tento roztěr převrstven roztokem krystalové violeti, kde působil 60 sekund. Poté byl tento roztok bez oplachování slit a preparát byl převrstven Lugolovým roztokem, který působil opět 60 sekund. Následně byl roztok spláchnut destilovanou vodou a pomocí etanolu byl preparát odbarvován asi 20 sekund, než došlo k odečtení barviva. Preparát byl poté znovu opláchnut destilovanou vodou a dobarven zředěným karbolfuchsi-

nem po dobu 60ti sekund. Nakonec byl preparát opatrně opláchnut destilovanou vodou a byl ponechán nad zdrojem tepla k oschnutí.

## 6 PŘÍSTROJE

Formacs<sup>HT/TN</sup> TOC/TN Analyzer – Skalar, Holandsko

Centrifuga Rotanta 460R – Hettich, Velká Británie

Analyzátor TOC 5000A – Shimadzu, Japonsko

Autokláv LaM-MCS – SANOclav, Německo

Spekol 11 – Carl Zeiss Jena, Německo

Mikrobiologický box Bio II A – Telstar, Španělsko

Centrifuga MR23i – Jouan, Francie

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Původ mikrobiálních kultur

MP1, MP2, MP3, MP4, MP5, MP6, MP7 – z aktivovaného kalu ČOV Slovenská Lupča

FEN2B – z laboratorního bioreaktoru, ve kterém byl prováděn rozklad fenolu o koncentraci 2 g/l

Tyto kultury byly získány již čisté, z dřívějších prací UIOŽP, nebyl však u nich ověřen rozklad 1-methyl-2-pyrrolidonu nebo 1-octyl-2-pyrrolidonu

MP10, MP11, MP12, MP13 – z aktivovaného kalu ČOV Malenovice s přidavkem 500 mg/l NMP pro adaptaci bakterií obsažených v kalu

OP1, OP2 – kultury z aktivovaného kalu, adaptovaném postupnými přídávky 1-octyl-2-pyrrolidonu, a poté naočkovány a namnoženy na minerálním agaru s 2-OP

### 7.2 Základní identifikace bakteriálních kultur

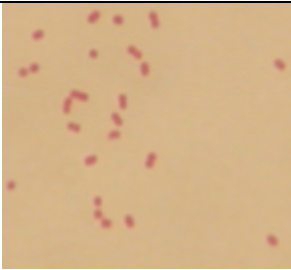
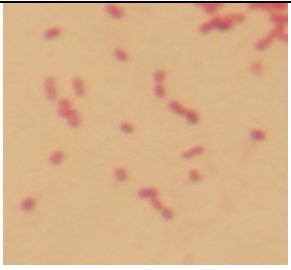
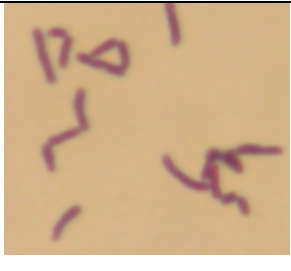


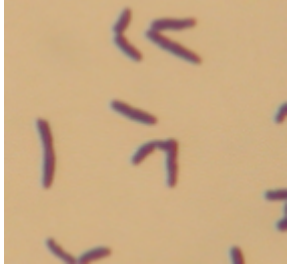

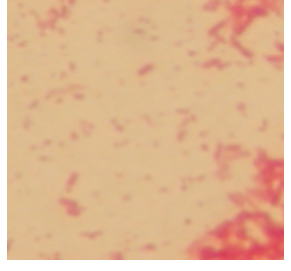

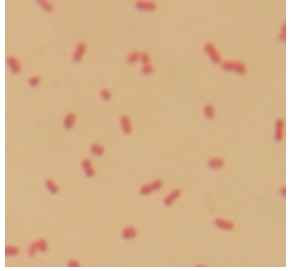
#### 7.2.1 Kultivace bakteriálních kultur na rozdílných agarech

Kultivace probíhala 72 hodin na TYA agaru a na minerálním agaru s přidavkem *N*-methyl pyrrolidonu. Po ukončení byly vyhodnoceny výsledky. Všechny kultury rostly na TYA agaru, na agaru s NMP nerostla jako jediná kultura s označením MP5 a proto byla vyloučena z dalších testů. Mezi kulturami MP2 - MP6 a MP3 - MP4 byla pozorována jejich vzájemná podobnost. Zda-li se jednalo o stejné kultury bylo zjištěno v následujících testech.

## 7.2.2 Gramovo barvení

Postup viz kapitola 5.10

Tabulka 1 - Gramovo barvení bakteriálních kultur

FEN2B	G- koky		MP1	G- koky	
MP2	G+ tyčinky		MP3	G- tyčinky	
MP4	G- tyčinky		MP6	G+ tyčinky	
MP7	G- tyčinky		MP10	G- tyčinky	
MP11	G- tyčinky		MP13	G- tyčinky	

OP1	G+ tyčinky				
-----	---------------	---	--	--	--

### 7.3 Další identifikační testy

#### 7.3.1 Kultivace při různých teplotách

Bakteriální kultury MP1, MP2 a FEN2B byly pomocí křížového roztěru naočkovány na předem připravené Petriho misky s TYA agarem a kultivovány při teplotách 8°C, 23°C, 37°C a 45°C. Výsledky těchto testů pomohly určit rozsah teplot, při kterých jsou tyto kultury schopné růstu. Kultivace probíhala 72 hodin.

Tabulka 2 – Kultivace bakteriálních kultur při rozdílných teplotách

	MP1	MP2	FEN2B
8°C	Žádný	Velmi slabý	Slabý
23°C	Velmi dobrý	Velmi dobrý	Velmi dobrý
37°C	Velmi dobrý	Žádný	Slabý
45°C	Žádný	Žádný	Velmi slabý

### 7.3.2 Oxidačně fermentační test, oxidasa, katalasa

Postup viz kapitola 5.8

Tabulka 3 - OF test, oxidasa, katalasa

Kultura	Využití glukosy aerobně	Využití glukosy anaerobně	Alkalizace OF média	Oxidasa	Katalasa
FEN2B	-	-	+	-	+
MP1	-	-	-	+	+
MP2	-	-	+	-	++
MP10	+	-	-	+	+
MP11	+	-	-	+	++
MP13	-	-	-	+	++

- negativní reakce

+ pozitivní reakce

++ silně pozitivní (bouřlivá) reakce

### 7.3.3 NEFERMtest 24

Pomocí 24 biochemických testů obsažených v NEFERMtest 24, byla snaha identifikovat alespoň některé bakteriální kultury schopné při degradaci NMP. Jednotlivé testy byly umístěny v jamkách mikrotitrační destičky vždy ve třech řadách po osmi jamkách pro identifikaci každého kmene.

Tabulka 4 - NEFERMtest 24 pro kulturu FEN2B

	H		G		F		E		D		C		B		A	
1	I		A		U		L		G		F		I		S	
	N	-	R	-	R	-	Y	-	L	-	R	-	N	-	U	-
	D		G		E		S		U		U		O		C	
2	P		b		b		N		M		X		C		G	
	H	-	G	-	G	-	A	-	A	-	Y	-	E	-	A	-
	S		A		L		G		N		L		L		L	
3	N		N		E		G		L		M		T		S	
	O	-	O	+	S	-	G	-	A	-	L	-	R	-	C	+
	3		4		L		T		C		T		E		I	

Tabulka 5 - NEFERMtest 24 pro kulturu MP1

	H		G		F		E		D		C		B		A	
1	I		A		U		L		G		F		I		S	
	N	-	R	-	R	+	Y	-	L	+	R	+	N	+	U	+
	D		G		E		S		U		U		O		C	
2	P		b		b		N		M		X		C		G	
	H	-	G	+	G	-	A	-	A	+	Y	+	E	-	A	+
	S		A		L		G		N		L		L		L	
3	N		N		E		G		L		M		T		S	
	O	+	O	+	S	+	G	+	A	+	L	-	R	-	C	-
	3		4		L		T		C		T		E		I	



Tabulka 6 - NEFERMtest 24 pro kulturu MP2

	H		G		F		E		D		C		B		A	
1	I		A		U		L		G		F		I		S	
	N	-	R	-	R	+	Y	-	L	+	R	+	N	+	U	+
	D		G		E		S		U		U		O		C	
2	P		b		b		N		M		X		C		G	
	H	-	G	+	G	-	A	-	A	+	Y	+	E	-	A	+
	S		A		L		G		N		L		L		L	
3	N		N		E		G		L		M		T		S	
	O	+	O	+	S	+	G	+	A	+	L	-	R	-	C	-
	3		4		L		T		C		T		E		I	

Pomocí softwaru TNW nebyl ani jeden z bakteriálních kmenů identifikován.

Kultury FEN2B, MP1 a MP2 pak byly společně s MP10, MP11, MP13 a OP1 připraveny ve formě čistých kultur a byly předány v rámci probíhající doktorské práce Ing. Lucii Husárové a zaslány k molekulárně biologické identifikaci.

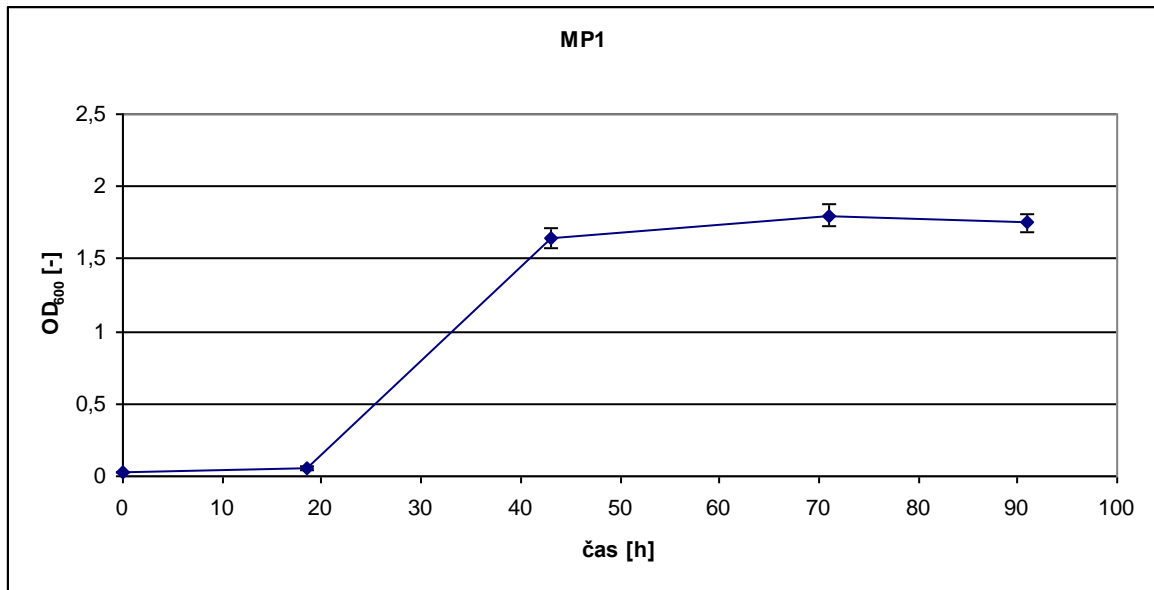
## 7.4 Biodegradace v tekutém médiu při koncentraci NMP 2 g/l

V první sérii pokusu byla sledována schopnost bakteriálních kultur MP1, MP2, MP3, MP4, MP6, MP7 a FEN2B rozkládat *N*-methyl pyrrolidon. Růst jednotlivých kultur byl monitorován pomocí měření zákalu (optické hustoty) suspenzí při 600 nm a úbytek substrátu byl vyhodnocován stanovením DOC. Získané hodnoty jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech.

### 7.4.1 Bakteriální kultura MP1

Tabulka 7 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP1

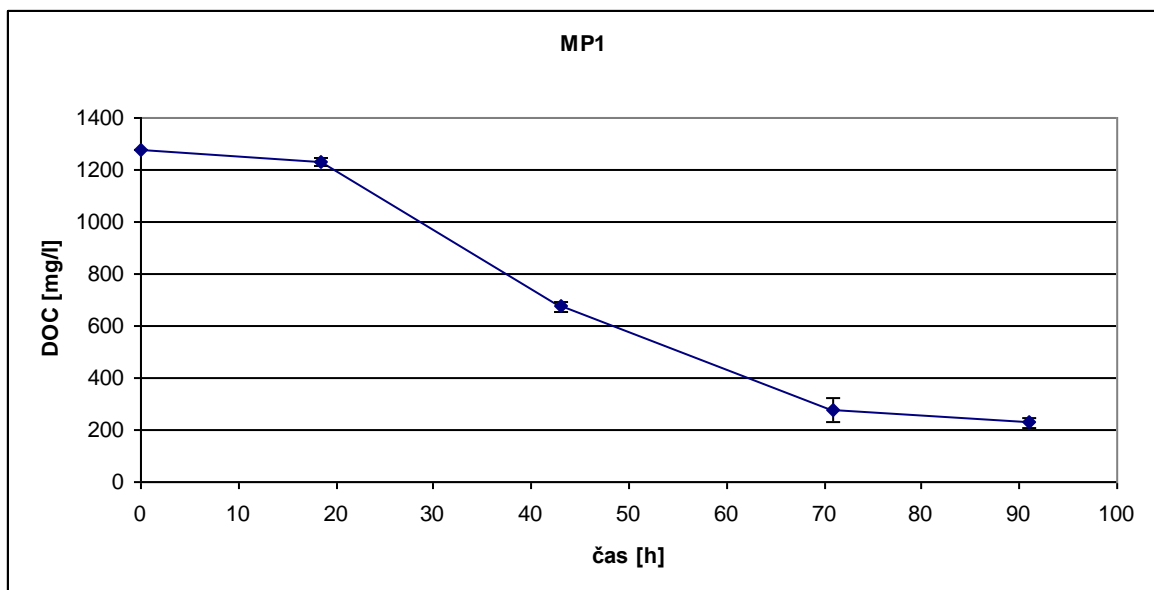
čas (h)	MP1 A	MP1 B	MP1 C	MP1 D	MP1 E
0	-	-	-	0,027	0,029
18,5	0,063	0,045	0,059	-	-
43	1,635	1,589	1,705	-	-
71	1,86	1,742	1,804	-	-
91	1,811	1,730	1,705	-	0,033



Obr. 4 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP1 na čase

Tabulka 8 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP1

MP1	DOC (mg/l)		
čas (h)	láhev A	láhev B	láhev C
0	1279,836	1279,836	1279,836
18,5	1242,636	1215,336	1240,236
43	685,086	688,086	655,086
71	297,186	307,566	230,586
91	206,686	241,686	234,286



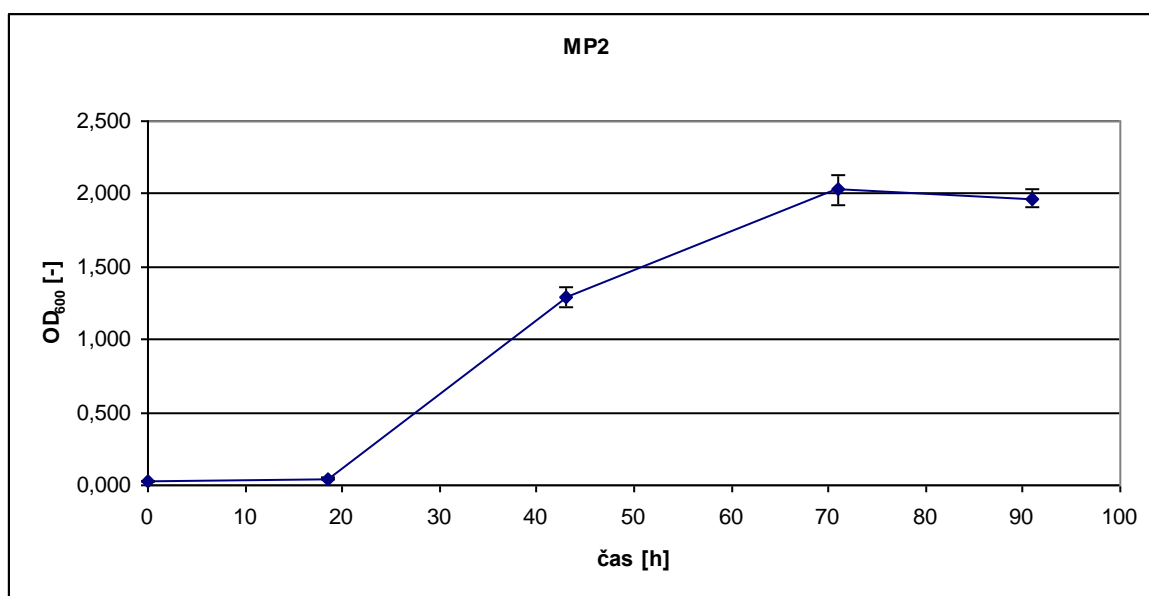
Obr. 5 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP1

Kultura MP1 je schopna rozkládat *N*-methyl pyrrolidon velmi dobře a v poměrně krátkém čase. Po úvodní, asi 20ti hodinové lagové fázi, začalo docházet k nárůstu biomasy v kulturačních lahvích, což se projevilo nárůstem hustoty suspenze a úbytkem DOC. Přibližně po dvou dnech byl NMP degradován z 50% a po 72 hodinách se již dále nerozkládal. Z grafu lze také vyčíst, že kultura MP1 není schopna za daných podmínek degradovat NMP kompletně nebo po ní zůstává určitý metabolit, koncentrace uhlíku v minerálním médiu se po ukončení pokusu pohybovala kolem hodnoty 230 mg/l.

#### 7.4.2 Bakteriální kultura MP2

Tabulka 9 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP2

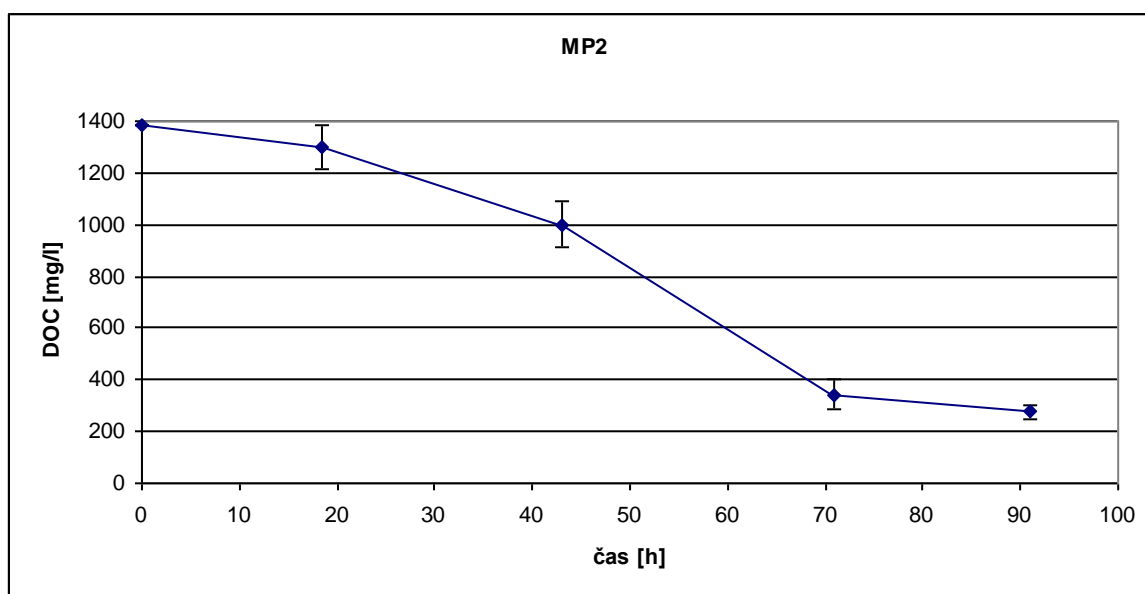
čas (h)	MP2 A	MP2 B	MP2 C	MP2 D	MP2 E
0	-	-	-	0,027	0,030
18,5	0,053	0,044	0,042	-	-
43	1,338	1,215	1,325	-	-
71	1,921	2,074	2,095	-	-
91	1,908	1,986	2,019	-	0,026



Obr. 6 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP2 na čase

Tabulka 10 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP2

MP2	DOC (mg/l)		
čas (h)	láhev A	láhev B	láhev C
0	1385,848	1385,848	1385,848
18,5	1218,298	1358,698	1320,748
43	904,498	1055,098	1042,498
71	392,398	340,858	293,578
91	281,498	296,498	251,898



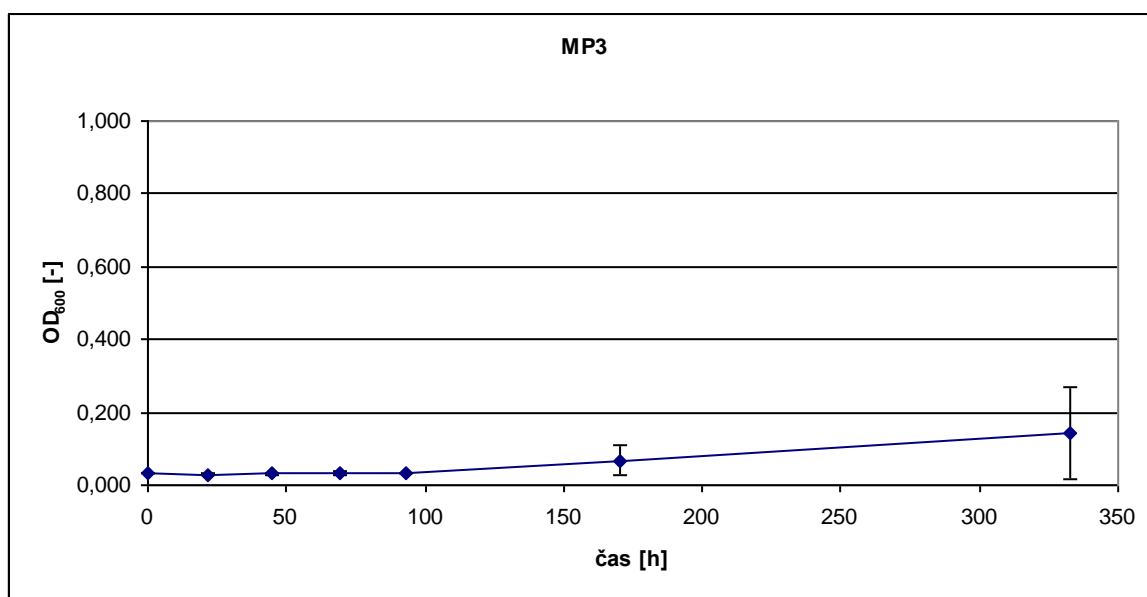
Obr. 7 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP2

Kultura MP2 je podobně jako MP1 schopna rozkládat NMP. Z grafů lze pozorovat, že asi po 20ti hodinách začalo docházet k úbytku DOC v kultivačních lahvích, a to i přes to že ze začátku nedocházelo k nárůstu biomasy. Po 72 hodinách se rozklad NMP zastavil. U kultury MP2 také nedochází za daných podmínek k úplné degradaci NMP, ale v minerálním médiu zůstává určitý zbytek nebo metabolit. Koncentrace uhlíku po ukončení pokusu se pohybovala okolo 270 mg/l.

### 7.4.3 Bakteriální kultura MP3

Tabulka 11 - měření optické hustoty při 600nm pro kulturu MP3

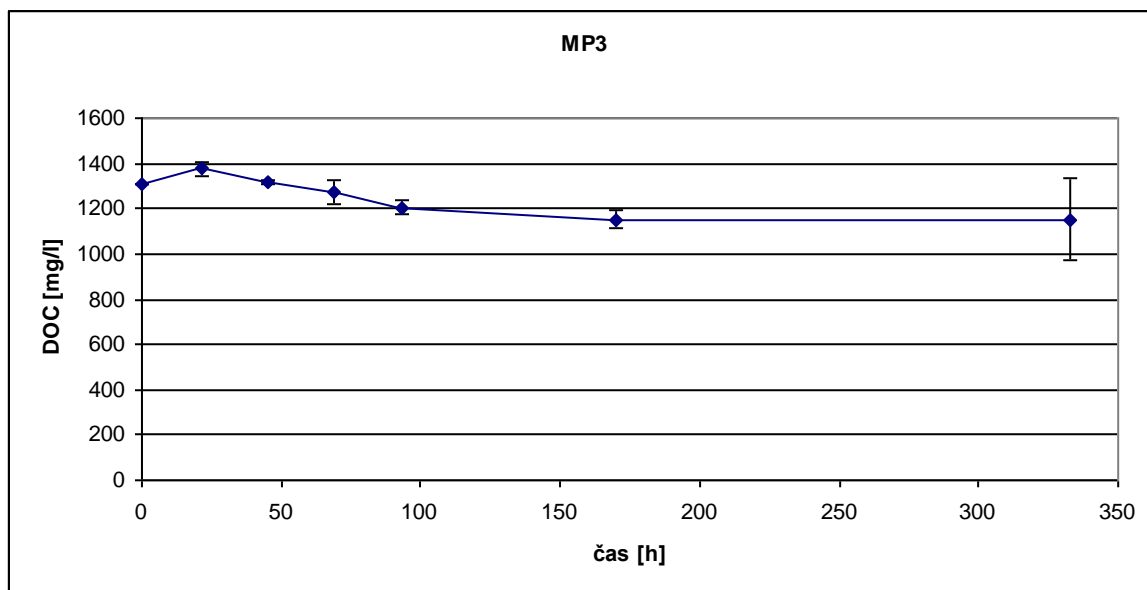
čas (h)	MP3 A	MP3 B	MP3 C	MP3 D	MP3 E
0	-	-	-	0,032	0,026
21,5	0,027	0,032	0,031	-	-
45	0,034	0,028	0,033	-	-
69	0,032	0,041	0,030	-	-
93	0,034	0,035	0,035	-	-
170	0,056	0,040	0,108	-	-
333	0,064	0,278	0,081	-	0,032



Obr. 8 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP3 na čase

Tabulka 12 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP3

MP3	DOC (mg/l)		
čas (h)	láhev A	láhev B	láhev C
0	1311,898	1311,898	1311,898
21,5	1376,548	1346,398	1403,248
45	1310,398	1316,998	1323,148
69	1286,848	1315,648	1224,448
93	1190,698	1240,348	1186,348
170	1177,348	1161,898	1109,548
333	1278,148	977,248	1203,748



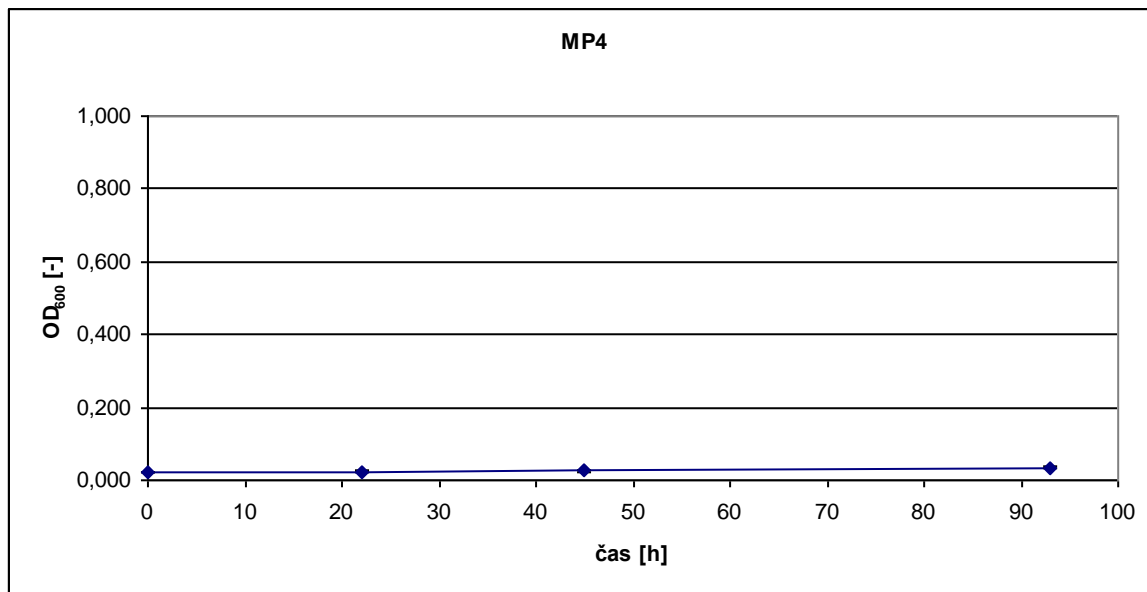
Obr. 9 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP3

Kultura MP3 za daných podmínek rozkládá NMP jenom minimálně, když po týdnu klesla koncentrace DOC asi o 100 mg/l a na stejné hodnotě zůstala další týden, kdy se vůbec neměnila. V kultivačních lahvích nebyl zpozorován ani nárůst biomasy, kromě posledního odběru u lahve B. Následné vyočkování na TYA agar ukázalo, že tato láhev obsahovala směšnou kulturu. Pro další pokusy byla kultura MP3 vyloučena

#### 7.4.4 Bakteriální kultura MP4

Tabulka 13 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP4

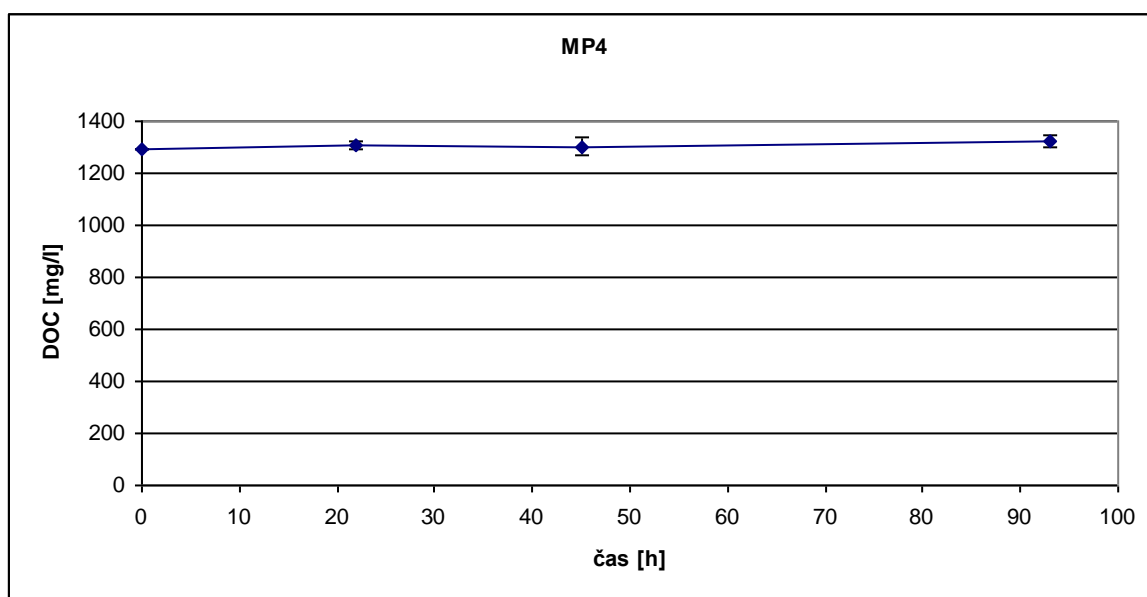
čas (h)	MP4 A	MP4 B	MP4 C	MP4 D	MP4 E
0	-	-	-	0,023	0,026
22	0,026	0,020	0,024	-	-
45	0,029	0,024	0,027	-	-
93	0,031	0,035	0,035	-	0,022



Obr. 10 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP4 na čase

Tabulka 14 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP4

MP4	DOC (mg/l)		
čas (h)	láhev A	láhev B	láhev C
0	1291,678	1291,678	1291,678
22	1298,278	1320,928	1306,678
45	1272,928	1305,478	1330,078
93	1333,078	1299,778	1335,328



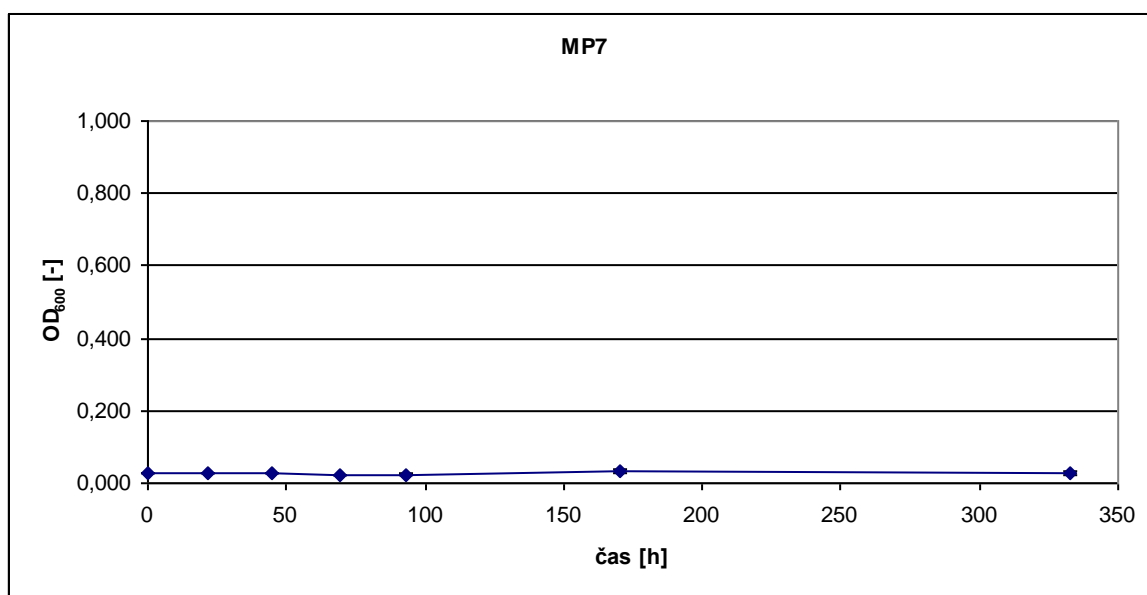
Obr. 11 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP4

Kultura MP4 není schopna rozkladu NMP v tekutém minerálním médiu za daných podmínek. V průběhu pokusu nebyl pozorován žádný nárůst biomasy v kultivační lahvi nebo úbytek uhlíku při měření DOC. Kultura MP4 byla z dalších pokusů vyloučena

#### 7.4.5 Bakteriální kultura MP7

Tabulka 15 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP7

čas (h)	MP7 A	MP7 B	MP7 C	MP7 D	MP7 E
0	-	-	-	0,026	0,030
21,5	0,029	0,026	0,027	-	-
45	0,029	0,026	0,028	-	-
69	0,026	0,023	0,020	-	-
93	0,025	0,024	0,024	-	-
170	0,030	0,037	0,032	-	-
333	0,030	0,020	0,028	-	0,028

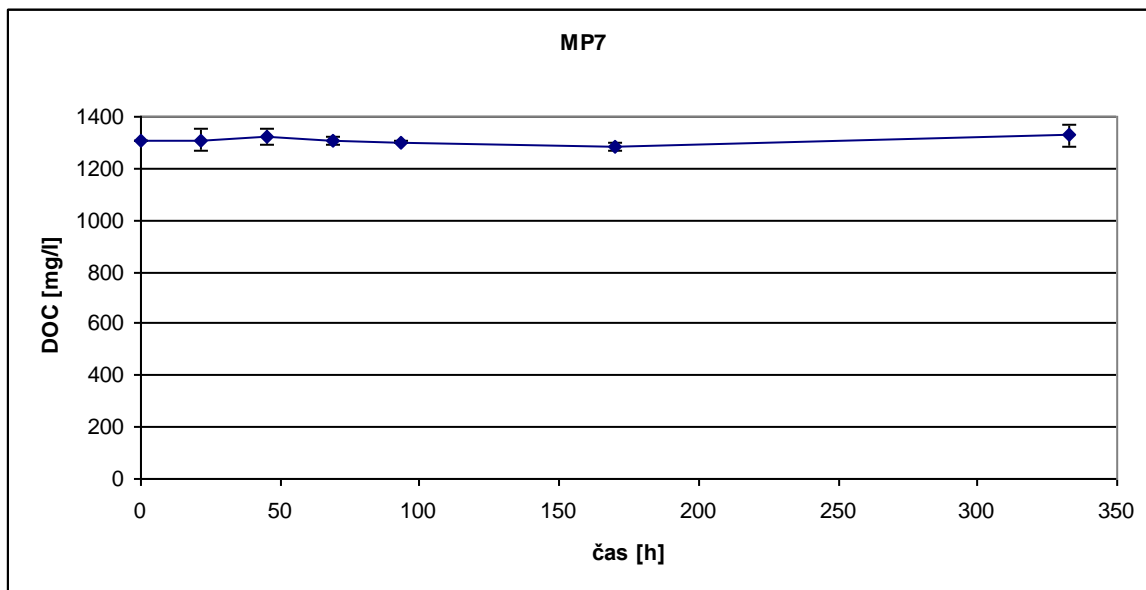


Obr. 12 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP7 na čase

Tabulka 16 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP7

MP7 čas (h)	DOC (mg/l)		
	láhev A	láhev B	láhev C
0	1310,768	1310,768	1310,768
21,5	1349,018	1276,268	1298,318
45	1352,918	1311,218	1300,268
69	1318,568	1312,118	1287,968
93	1300,868	1299,218	1303,418
170	1296,668	1266,368	1292,918
333	1371,968	1307,018	1303,868





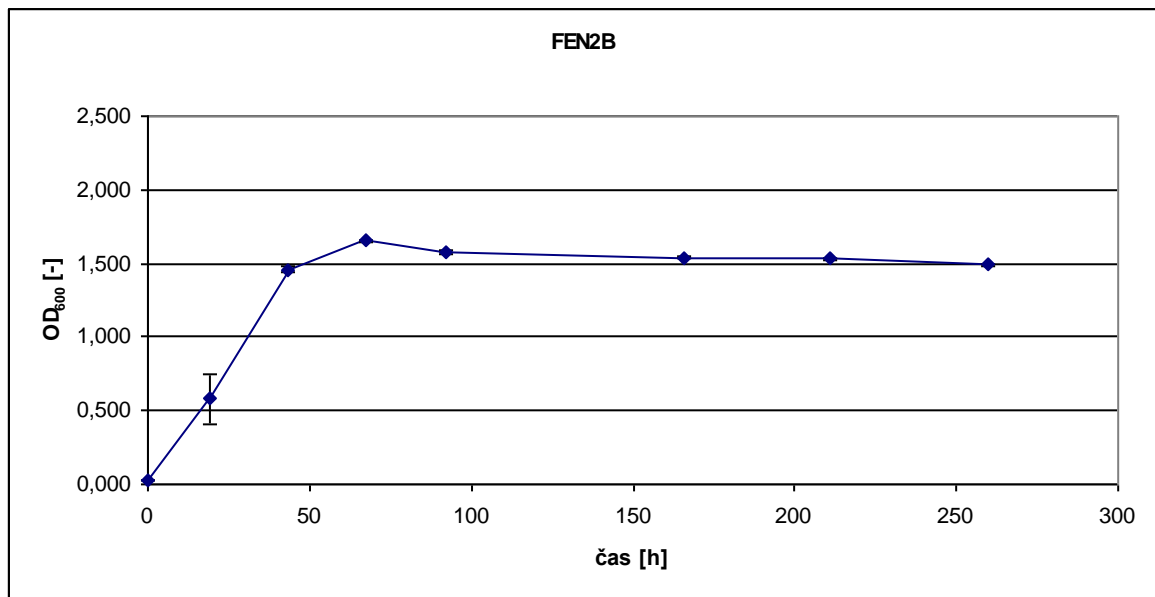
Obr. 13 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP7

Kultura MP7 není za daných podmínek schopna rozkladu NMP v minerálním médiu. Ani po dvou týdnech nebyl zpozorován žádný nárůst biomasy v lahvích nebo úbytek uhlíku při měření DOC. Kultura MP7 byla pro další pokusy vyloučena.

#### 7.4.6 Bakteriální kultura FEN2B

Tabulka 17 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu FEN2B

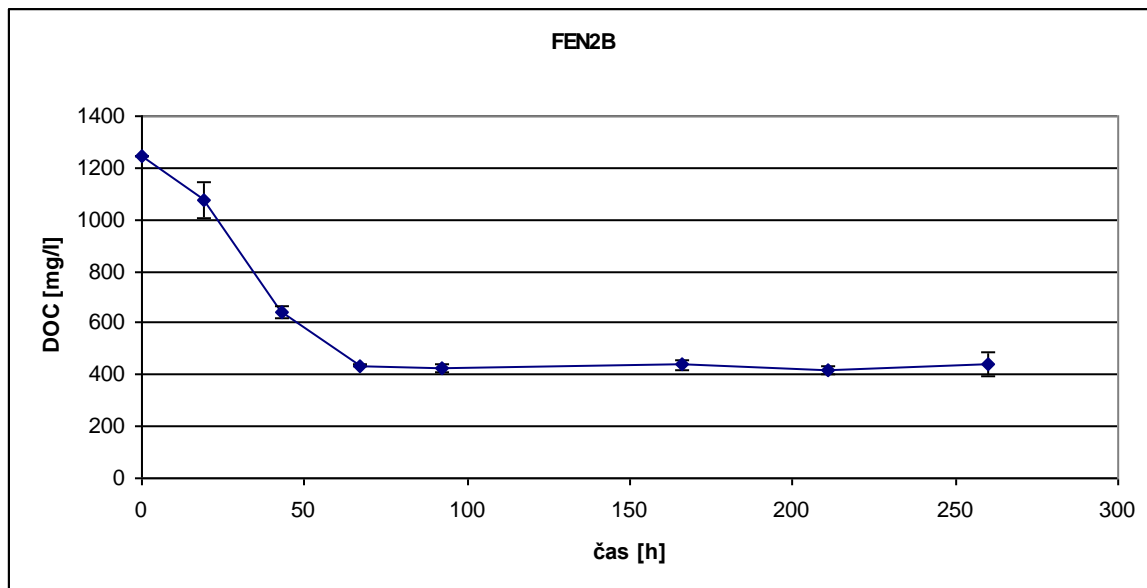
čas (h)	FEN2B A	FEN2B B	FEN2B C	FEN2B D	FEN2B E
0	-	-	-	0,030	0,038
19,25	0,573	0,728	0,441	-	-
43	1,445	1,478	1,445	-	-
67,25	1,663	1,646	1,654	-	-
92	1,572	1,573	1,592	-	-
166	1,539	1,537	1,542	-	-
211	1,532	1,524	1,540	-	-
260	1,496	1,485	1,496	-	0,022



Obr. 14 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze FEN2B na čase

Tabulka 18 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou FEN2B

FEN2B	DOC (mg/l)		
čas (h)	láhev A	láhev B	láhev C
0	1243,148	1243,148	1243,148
19,25	1058,648	1025,648	1138,748
43	624,548	640,148	659,798
67,25	431,798	441,698	437,198
92	435,848	409,448	430,598
166	447,998	444,398	418,898
211	400,148	425,798	421,148
260	421,748	414,548	488,198



Obr. 15 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou FEN2B

Kultura FEN2B rozkládá NMP velmi dobře a rychle. Při měření nebyla zpozorována žádná lagová fáze a přibližně po 48 hodinách došlo k 50% degradaci NMP. Kultura FEN2B ovšem za daných podmínek nerozkládá NMP kompletně. Při měření DOC bylo zjištěno, že v kultivačních lahvích zůstává přes 400mg/l rozpuštěného uhlíku a to i přes prodloužení doby trvání pokusu na 11 dní.

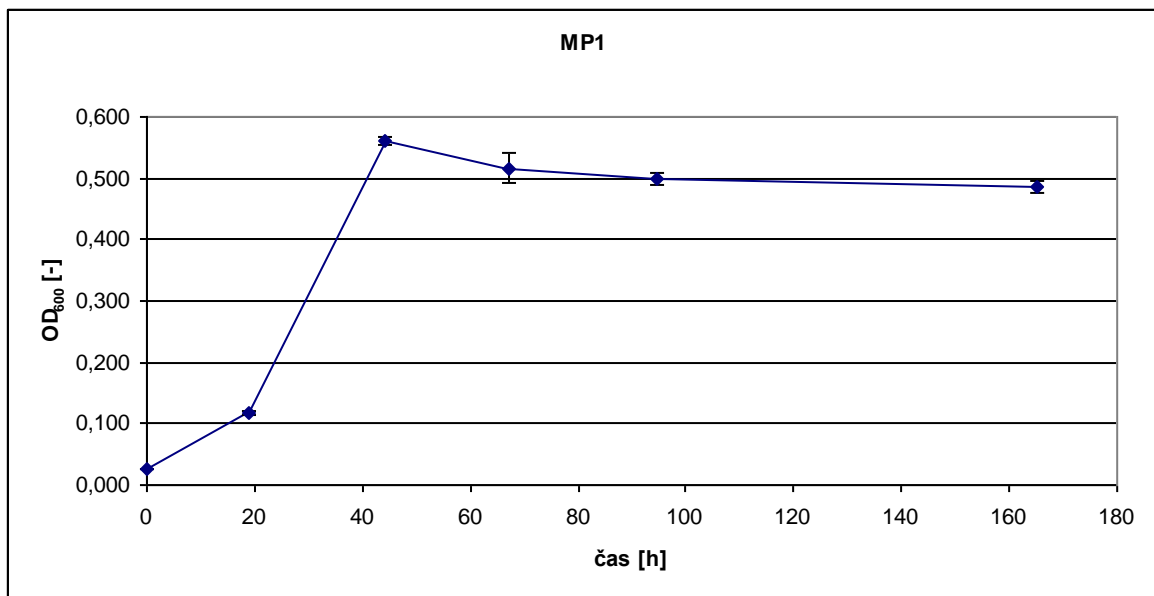
## 7.5 Biodegradace v tekutém médiu při koncentraci NMP 300 mg/l

Předchozí pokusy ukázaly, že NMP je rozkládán kulturami MP1, MP2 a FEN2B, avšak nikoliv kompletně. Proto byly provedeny pokusy se sníženou vstupní koncentrací NMP a to na hodnotu 300 mg/l. Předpoklad byl, že při této koncentraci nebude v minerálním médiu nedostatek minerálních látek a zároveň bude vznikat méně odpadních produktů, než tomu bylo v předchozí sérii pokusů. K již zmíněným kulturám MP1, MP2 a FEN2B navíc přibýly kultury získané z aktivovaného kalu ČOV Malenovice, označené jako MP10, MP11 a MP13, u kterých byl prokázán rozklad NMP na minerálním agaru.

## 7.5.1 Bakteriální kultura MP1

Tabulka 19 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP1

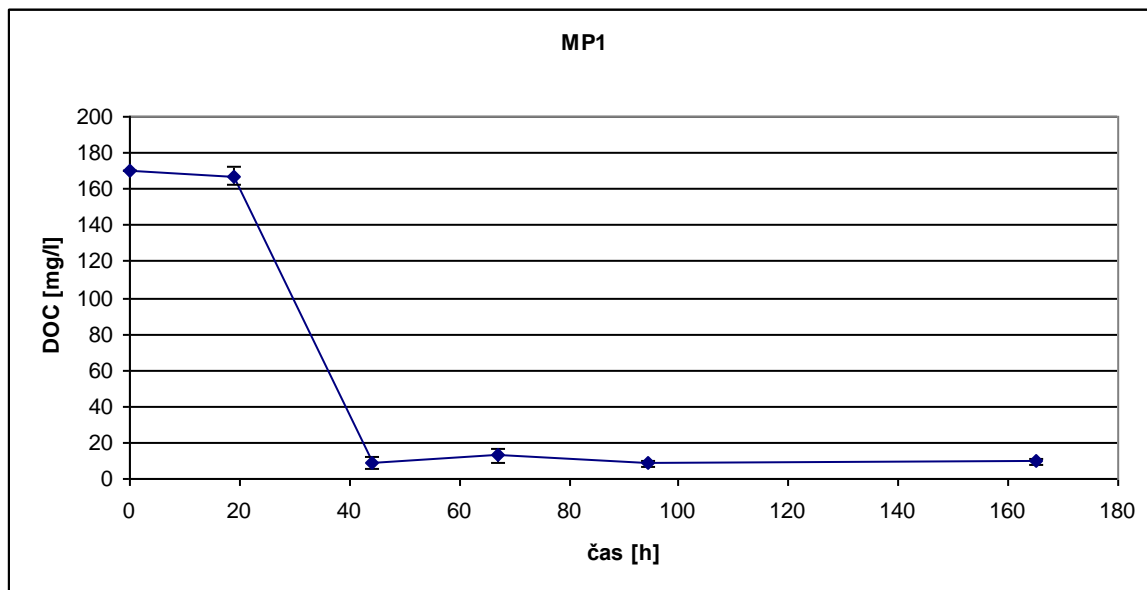
čas (h)	MP1 A	MP1 B	MP1 C	MP1 D	MP1 E
0	-	-	-	0,026	0,013
19	0,114	0,115	0,120	-	-
44	0,552	0,565	0,565	-	-
67	0,493	0,523	0,533	-	-
94,5	0,491	0,505	0,501	-	-
165	0,478	0,493	0,488	-	0,015



Obr. 16 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP1 na čase

Tabulka 20 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP1

MP1	DOC (mg/l)		
	láhev A	láhev B	láhev C
čas (h)			
0	169,865	169,865	169,865
19	166,235	172,415	163,415
44	5,879	9,855	10,783
67	16,807	10,339	11,327
94,5	8,187	10,111	7,531
165	8,055	10,703	10,335



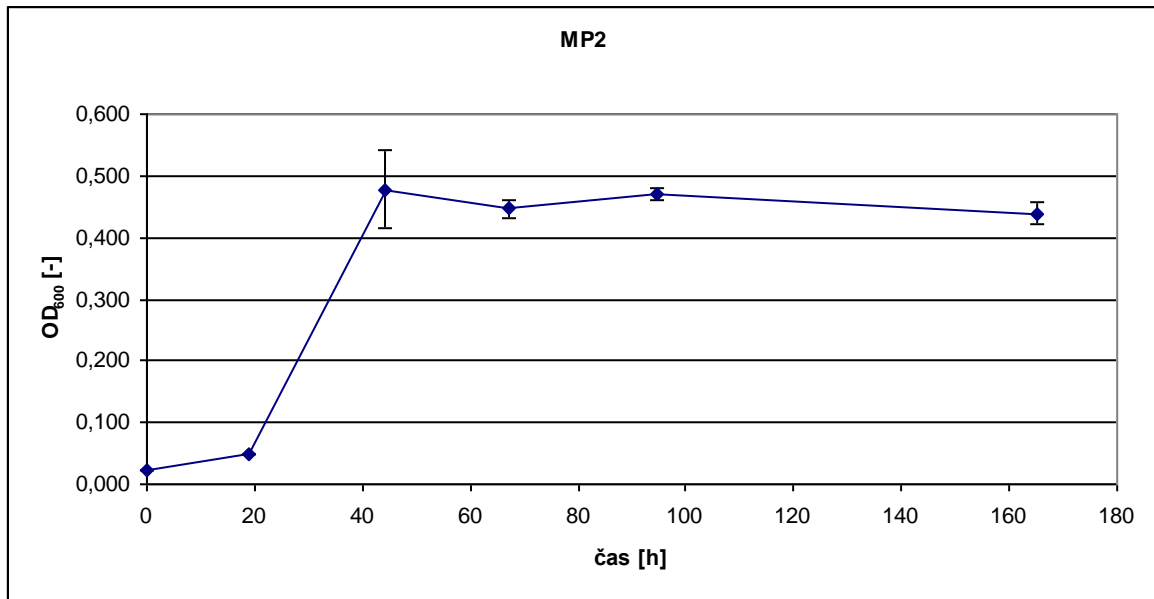
Obr. 17 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP1

Při snížené vstupní koncentraci rozkládá kultura MP1 za daných podmínek NMP velmi dobře. Již po dvou dnech dochází k zastavení růstu optické hustoty a ke snižování DOC v kultivačních lahvích. Při analýze bylo zjištěno konečné množství DOC kolem 10 mg/l. Můžeme tedy říct, že kultura MP1 byla při této koncentraci a za daných podmínek schopna rozložit NMP prakticky kompletně.

### 7.5.2 Bakteriální kultura MP2

Tabulka 21 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP2

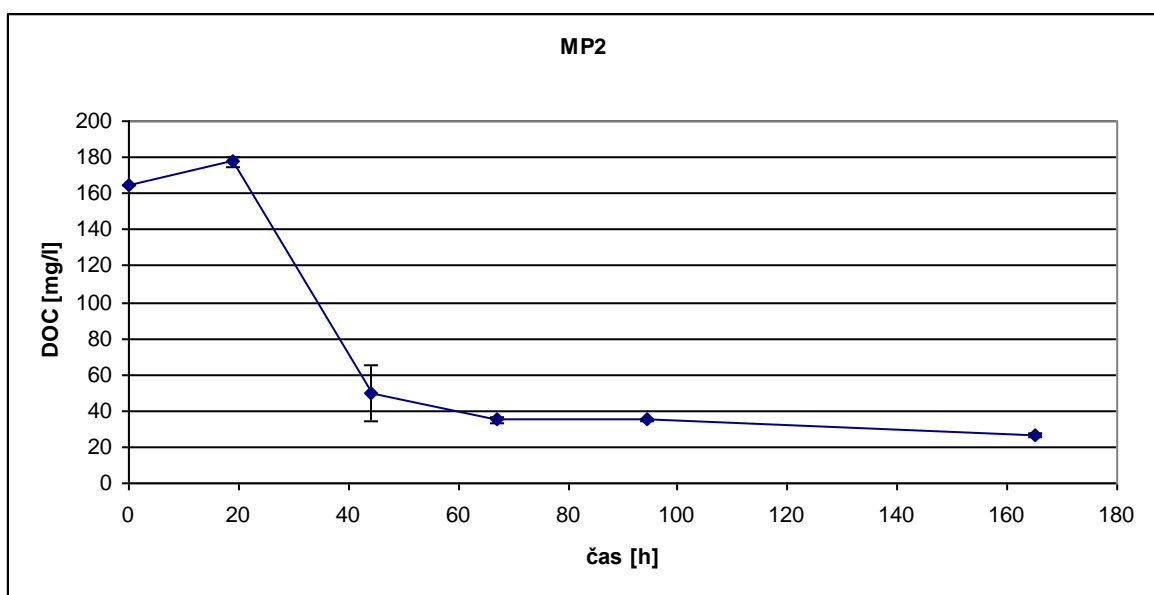
čas (h)	MP2 A	MP2 B	MP2 C	MP2 D	MP2 E
0	-	-	-	0,024	0,015
19	0,050	0,049	0,050	-	-
44	0,483	0,422	0,530	-	-
67	0,438	0,439	0,462	-	-
94,5	0,461	0,479	0,472	-	-
165	0,453	0,424	0,440	-	0,014



Obr. 18 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP2 na čase

Tabulka 22 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP2

MP2 čas (h)	DOC (mg/l)		
	láhev A	láhev B	láhev C
0	164,724	164,724	164,724
19	177,984	175,404	179,844
44	46,524	64,804	37,884
67	36,52	35,408	33,552
94,5	34,908	35,416	34,912
165	27,296	27,196	25,564



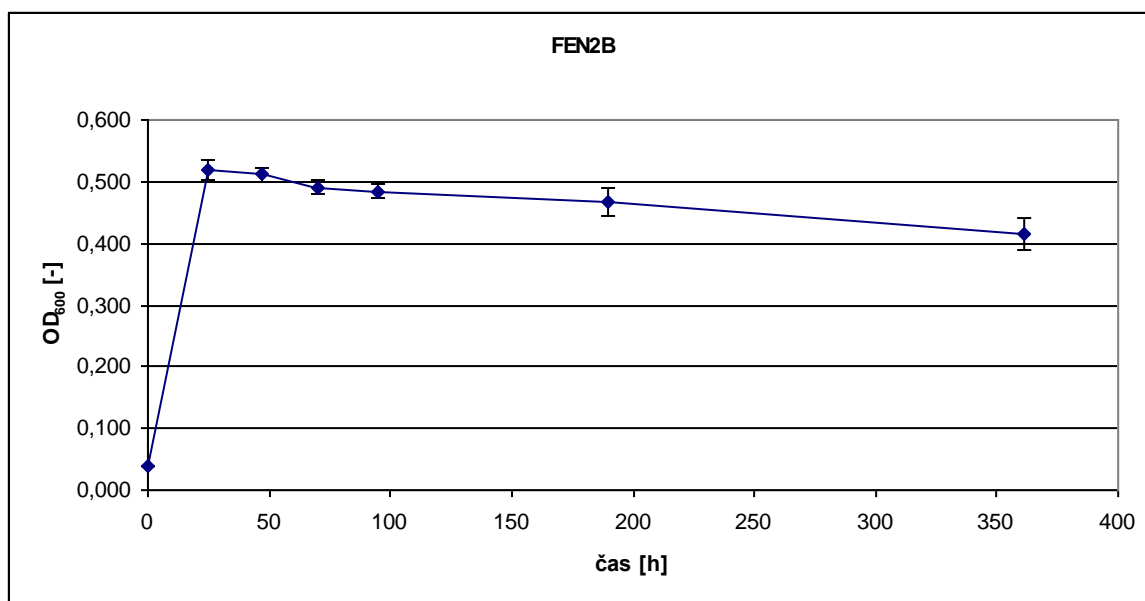
Obr. 19 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP2

Kultura MP2 měla při nižší vstupní koncentraci a za daných podmínek asi 20ti hodinovou lagovou fází, při které nedocházelo k nárůstu biomasy v kultivačních lahvích ani ke snižování DOC. Po skončení lagové fáze začalo docházet k rychlému úbytku DOC, který se výrazně zpomalil přibližně po 70 hodinách od zahájení pokusu. Kultivace probíhala 7 dní, na jejímž konci byla hodnota DOC v kultivačních lahvích okolo 26 mg/l. Kultura MP2 tedy nerozkládá NMP úplně nebo po ní zůstal nějaký metabolit.

### 7.5.3 Bakteriální kultura FEN2B

Tabulka 23 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu FEN2B

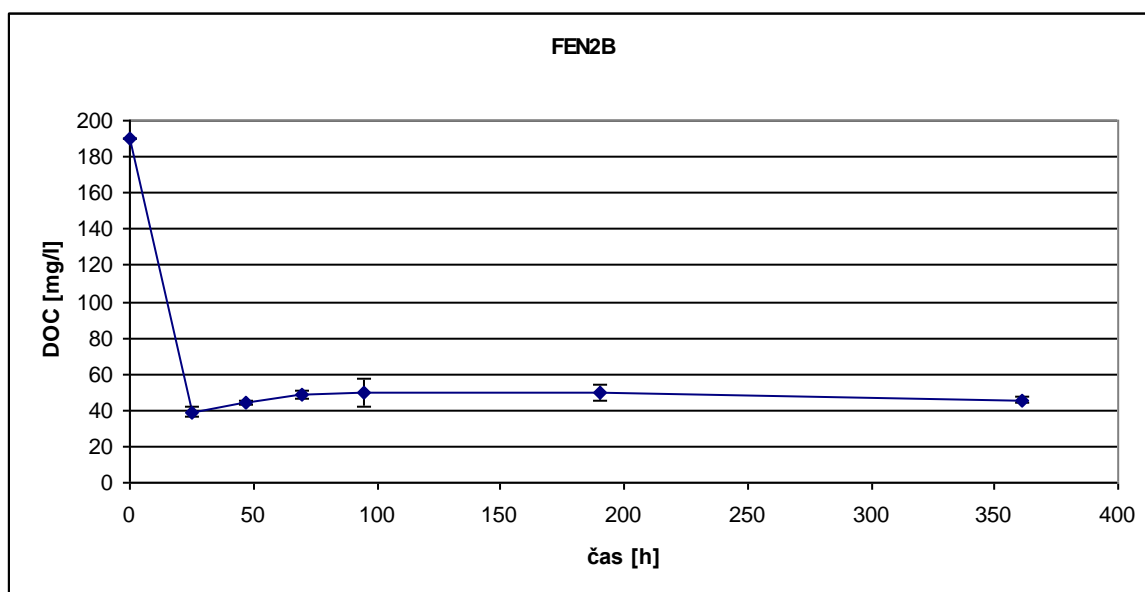
čas (h)	FEN2B A	FEN2B B	FEN2B C	FEN2B D	FEN2B E
0	-	-	-	0,040	0,044
25	0,508	0,509	0,536	-	-
47	0,505	0,505	0,525	-	-
70	0,483	0,487	0,502	-	-
95	0,479	0,478	0,497	-	-
190	0,451	0,461	0,490	-	-
361	0,390	0,423	0,432	-	0,049



Obr. 20 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze FEN2B na čase

Tabulka 24 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou FEN2B

FEN2B	TOC (mg/l)		
čas (h)	láhev A	láhev B	láhev C
0	189,53	189,53	189,53
25	40,53	35,898	41,13
47	44,89	43,49	43,37
70	47	47,3	51,38
95	46,37	44,45	57,29
190	52,43	45,38	51,32
361	44,23	45,11	47,47



Obr. 21 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou FEN2B

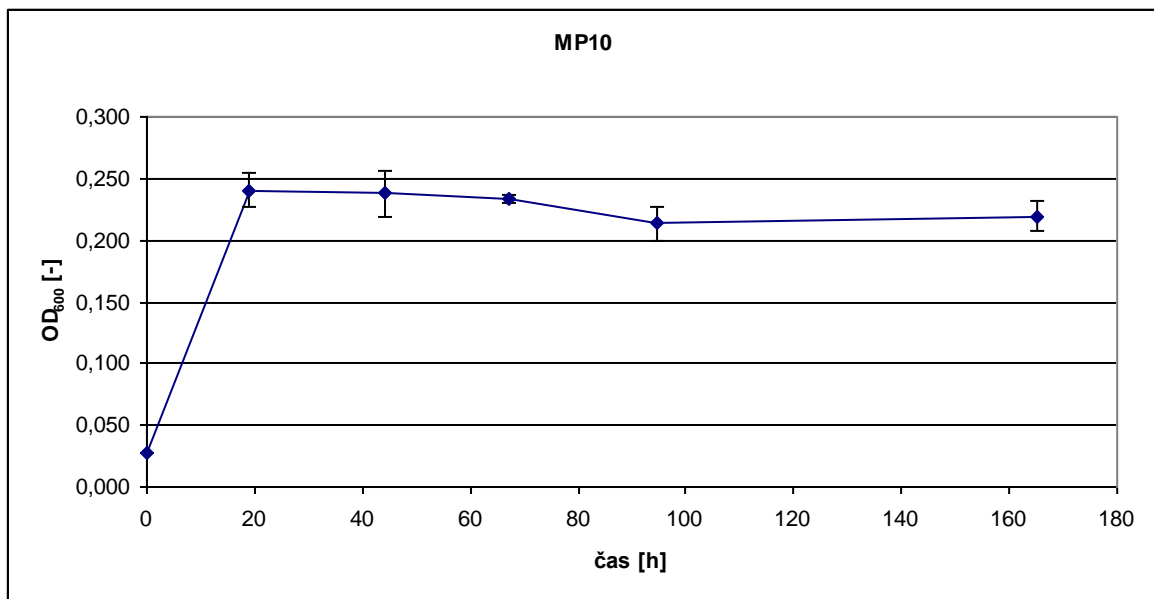
Při rozkladu nižší vstupní koncentrace NMP kulturou FEN2B nedošlo k žádné lagové fázi. NMP byl rozkládán velmi rychle a už po 24 hodinách od naočkování kultivačních lahví došlo k zastavení růstu biomasy a snižování DOC. Pokus byl prodloužen na dobu 15 dní, ale i tak byly hodnoty přibližně stejné jako po prvním dni. Analýza nám však ukázala, že v lahvích zůstalo poměrně hodně rozpuštěného uhlíku, kdy se hodnoty DOC pohybovaly kolem 45 mg/l. Kultura FEN2B tak nebyla za daných podmínek schopna rozložit NMP úplně.



## 7.5.4 Bakteriální kultura MP10

Tabulka 25 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP10

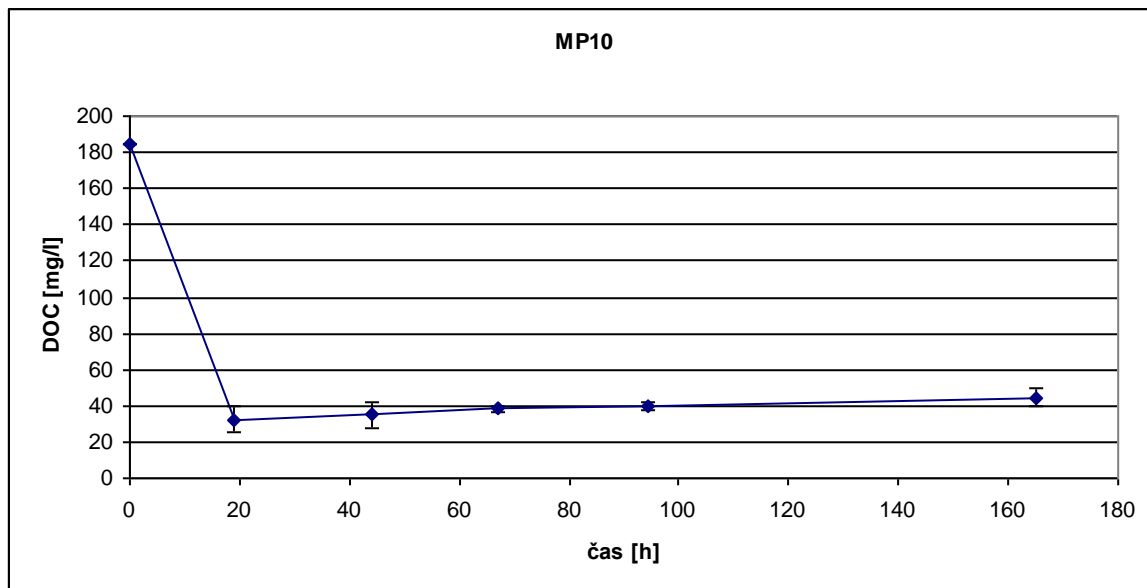
čas (h)	MP10 A	MP10 B	MP10 C	MP10 D	MP10 E
0	-	-	-	0,027	0,027
19	0,225	0,249	0,298	-	-
44	0,243	0,219	0,251	-	-
67	0,230	0,235	0,236	-	-
94,5	0,224	0,201	0,216	-	-
165	0,222	0,208	0,228	-	0,022



Obr. 22 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP10 na čase

Tabulka 26 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP10

MP10 čas (h)	DOC (mg/l)		
	láhev A	láhev B	láhev C
0	184,03	184,03	184,03
19	31,9	26,725	38,68
44	40,96	28,798	35,11
67	39,79	36,94	38,05
94,5	41,41	40	37,6
165	44,68	39,97	48,88



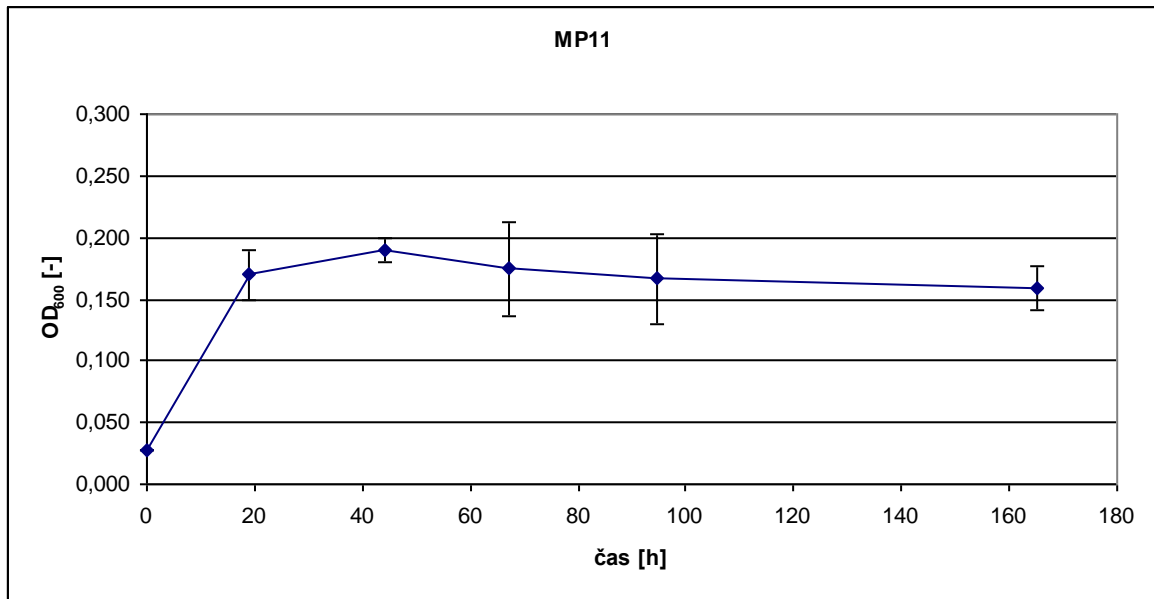
Obr. 23 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP10

Degradace NMP kulturou MP10 probíhala velmi rychle. Během prvního dne pokusu klesla DOC v kultivačních lahvích na hodnotu kolem 40 mg/l a po zbytek pokusu se již neměnila. Zároveň byl s úbytkem DOC pozorován i okamžitý nárůst suspenze v jednotlivých lahvích. Kultura MP10 ale není schopna za daných podmínek NMP úplně rozložit.

### 7.5.5 Bakteriální kultura MP11

Tabulka 27 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP11

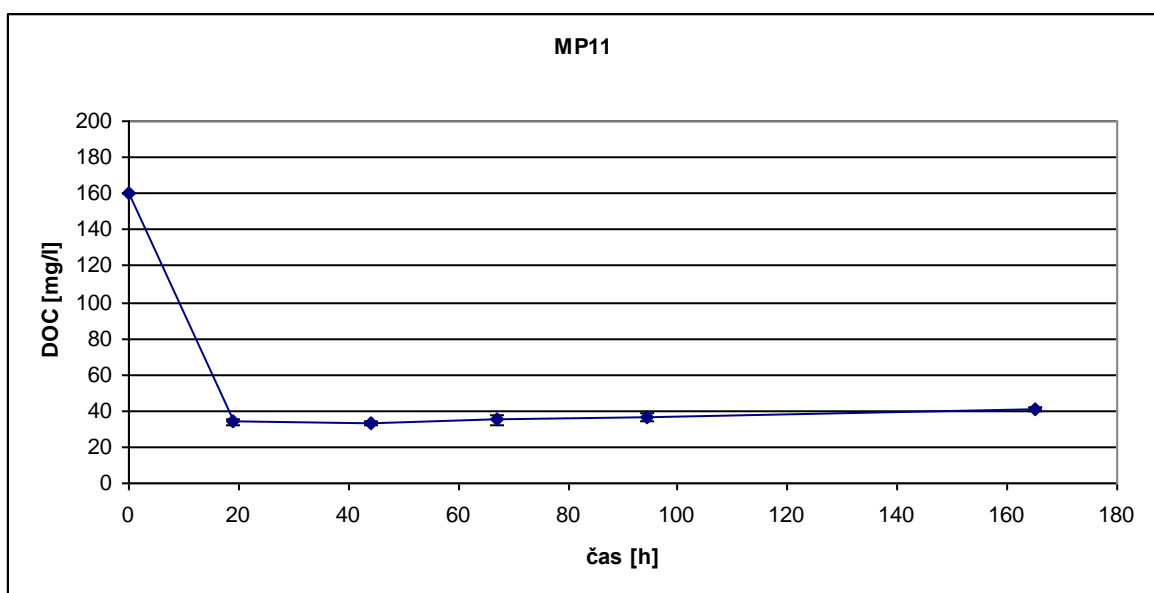
čas (h)	MP11 A	MP11 B	MP11 C	MP11 D	MP11 E
0	-	-	-	0,027	0,027
19	0,187	0,152	0,170	-	-
44	0,200	0,183	0,185	-	-
67	0,145	0,209	0,170	-	-
94,5	0,170	0,134	0,195	-	-
165	0,175	0,145	0,157	-	0,022



Obr. 24 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP11 na čase

Tabulka 28 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP11

MP11 čas (h)	DOC (mg/l)		
	láhev A	láhev B	láhev C
0	160,737	160,737	160,737
19	31,407	36,597	33,477
44	32,817	34,587	32,247
67	38,097	32,667	33,897
94,5	34,227	38,967	35,157
165	41,457	39,897	41,847



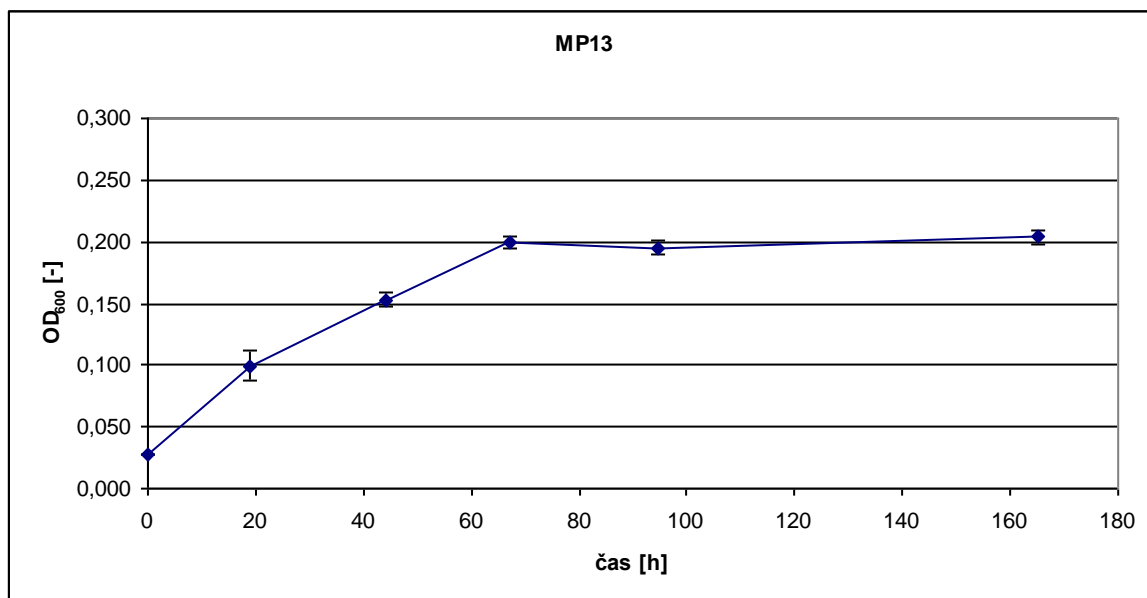
Obr. 25 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP11

U kultury MP11 bylo možno, stejně jako v případě kultury MP10, sledovat okamžitý pokles DOC a nárůst biomasy v kultivačních lahvích. Ovšem u kultury MP11 jsme mohli navíc pozorovat velmi vysokou tvorbu vloček, které ani silným třepáním nešli rozbít, proto bylo v tomto případě měření optické hustoty nepřesné a spíše jenom orientační. Výsledky analýzy však ukázaly, že kultura MP11 je za daných podmínek schopna rozkládat NMP, i když ne úplně. Konečná hodnota DOC se po skončení pokusu pohybovala okolo hodnoty 40 mg/l.

### 7.5.6 Bakteriální kultura MP13

Tabulka 29 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP13

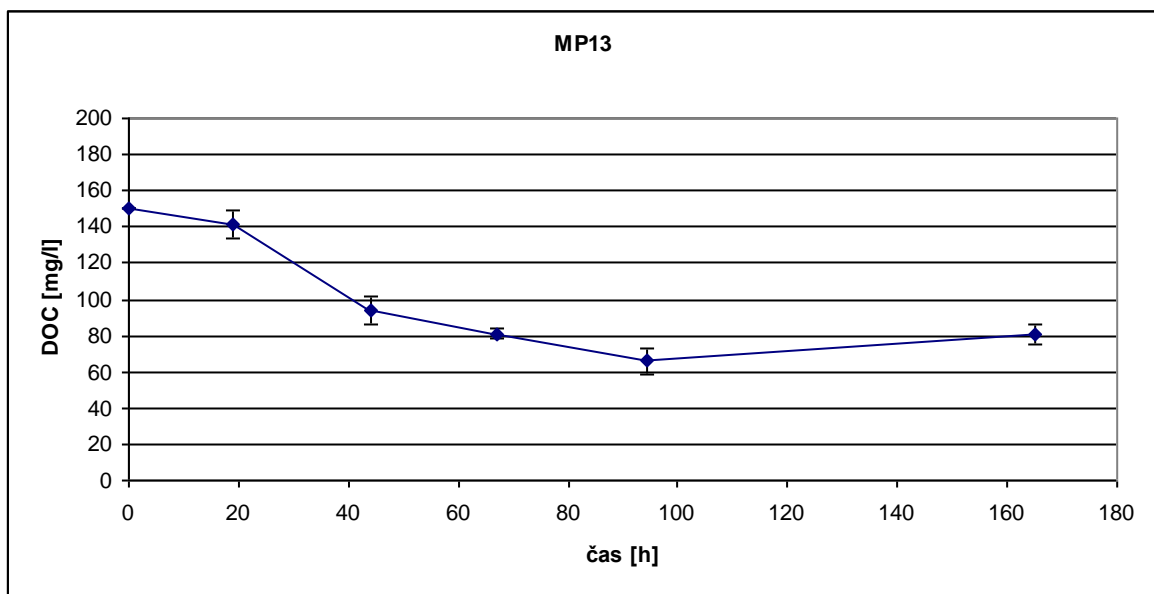
čas (h)	MP13 A	MP13 B	MP13 C	MP13 D	MP13 E
0	-	-	-	0,027	0,025
19	0,092	0,112	0,094	-	-
44	0,149	0,159	0,150	-	-
67	0,199	0,204	0,195	-	-
94,5	0,198	0,189	0,198	-	-
165	0,200	0,201	0,210	-	0,023



Obr. 26 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP13 na čase

Tabulka 30 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP13

MP13	DOC (mg/l)		
čas (h)	láhev A	láhev B	láhev C
0	150,42	150,42	150,42
19	140,133	135,063	148,533
44	96,573	99,423	85,863
67	84,843	79,473	79,323
94,5	58,983	67,803	70,983
165	79,143	85,773	76,713



Obr. 27 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP13

U kultury MP13 neprobíhala degradace NMP tak rychle jako u jiných bakteriálních kultur. K zastavení degradace došlo asi až po 67 hodinách. Z grafů lze vyčíst, že tato kultura byla schopna za daných podmínek rozložit NMP asi jen z 50%. Celý pokus byl prodloužen na 7 dní, avšak ani poté nedošlo k žádné změně ať už v hodnotě DOC nebo v nárůstu biomasy v kultivačních lahvích.

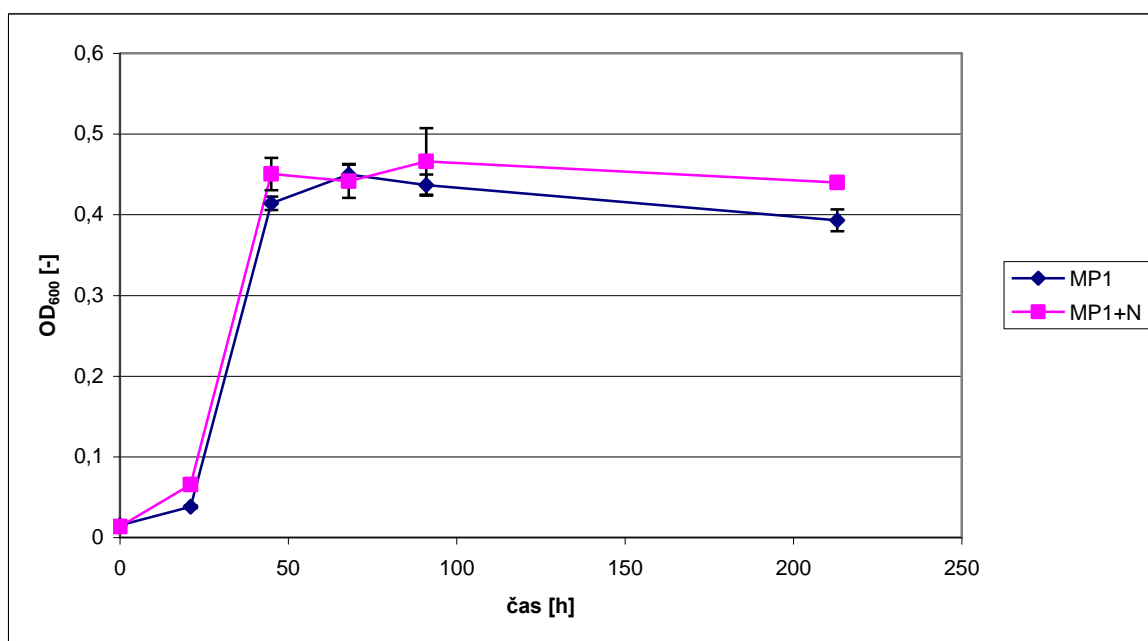
## 7.6 NMP jako jediný zdroj dusíku

V této sérii testů byla sledována schopnost kultur MP1, MP2 a FEN2B využívat *N*-methyl pyrrolidon jako jediný zdroj dusíku. Pro potřeby těchto pokusů byly všechny kultury namnoženy na ochuzeném agaru (viz 5.1.5) aby si bakterie nemohly udělat zásoby dusíku. Dále bylo připraveno i speciální bezdusíkaté minerální médium (viz 5.6), aby se zajistilo, že jediným zdrojem dusíku bude právě NMP. Pro porovnání byla jedna série testů provedena ve stejném minerálním médiu, ale navíc s obsahem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ekvivalentním obsahu dusíku v NMP v každé z kultivačních lahvích. Tyto byly označeny MP1+N, MP2+N a FEN2B+N.

### 7.6.1 Bakteriální kultura MP1

Tabulka 31 - měření optické hustoty při 600 nm pro kultury MP1 a MP1+N

čas (h)	MP1 A	MP1 B	MP1 C	MP1 A+N	MP1 B+N	MP1 C+N
0	0,016	0,015	0,014	0,017	0,012	0,012
21	0,039	0,036	0,039	0,066	0,064	0,066
45	0,412	0,408	0,422	0,455	0,465	0,431
68	0,443	0,442	0,464	0,431	0,464	0,429
91	0,426	0,436	0,448	0,486	0,491	0,421
213	0,381	0,394	0,404	0,441	0,437	0,441



Obr. 28 - graf závislosti optické hustoty suspenzí MP1 a MP1+N na čase

Tabulka 32 - spotřeba dusíku při pokusu s kulturou MP1

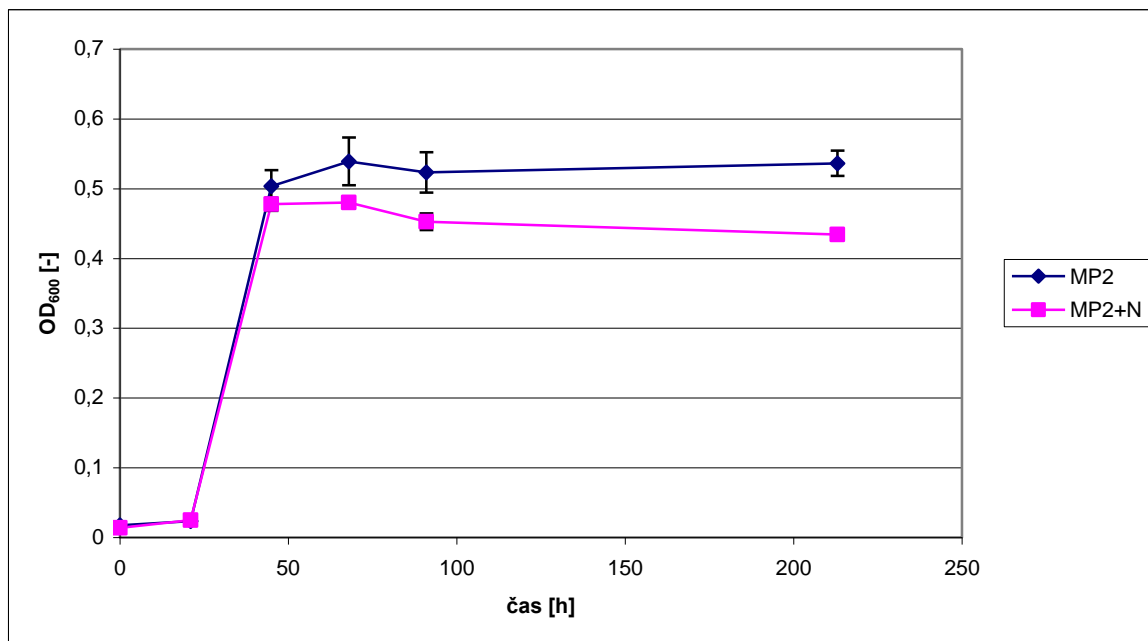
obsah rozpuštěného dusíku v mg/l						
čas (h)	MP1 A	MP1 B	MP1 C	MP1 A+N	MP1 B+N	MP1 C+N
0	43,68	43,84	42,96	88,00	85,12	87,16
213	26,41	24,60	24,92	62,90	61,62	67,26
Úbytek N	17,27	19,24	18,04	25,10	23,50	19,90
% úbytek N	39,54	43,89	41,99	28,52	27,61	22,83

Kultura MP1 byla za daných podmínek schopna využít NMP jako jediný zdroj dusíku. Ten byl pro kulturu MP1 stejně dobrým zdrojem dusíku jako amonná sůl. Z grafu lze vyčíst že již po 48 hodinách dosáhl růst bakterií v minerálním médiu svého maxima jak v lahvích s NMP, tak v lahvích obsahujících amonnou sůl.

### 7.6.2 Bakteriální kultura MP2

Tabulka 33 - měření optické hustoty při 600 nm pro kultury MP2 a MP2+N

čas (h)	MP2 A	MP2 B	MP2 C	MP2 A+N	MP2 B+N	MP2 C+N
0	0,020	0,017	0,016	0,012	0,014	0,015
21	0,024	0,024	0,022	0,024	0,025	0,026
45	0,523	0,484	0,503	0,469	0,485	0,479
68	0,553	0,503	0,561	0,475	0,489	0,477
91	0,552	0,503	0,515	0,461	0,456	0,441
213	0,554	0,523	0,532	0,437	0,431	0,435



Obr. 29 - graf závislosti optické hustoty suspenzí MP2 a MP2+N na čase

Tabulka 34 - spotřeba dusíku při pokusu s kulturou MP2

obsah rozpuštěného dusíku v mg/l						
čas (h)	MP2 A	MP2 B	MP2 C	MP2 A+N	MP2 B+N	MP2 C+N
0	46,44	45,36	43,76	82,52	84,44	84,48
213	30,37	28,89	28,96	66,96	68,86	69,34
Úbytek N	16,07	16,47	14,80	15,56	15,58	15,14
% úbytek N	34,60	36,31	33,82	18,86	18,45	17,92

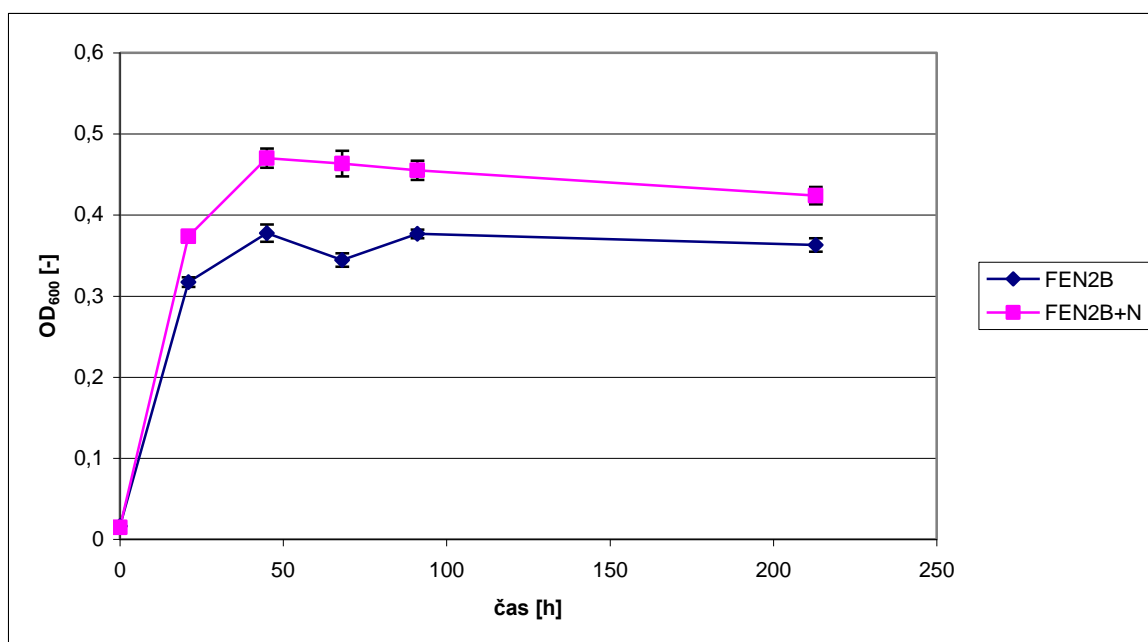
Kultura MP2 měla velmi podobný průběh kultivace jako MP1. Byla tedy za daných podmínek schopna využívat NMP jako jediný zdroj dusíku stejně dobře, jako amonnou sůl. Nárůst biomasy v lahvích obsahujících pouze NMP byl dokonce větší než v lahvích s chloridem amonným. Na začátku kultivace byla asi 20ti hodinová lagová fáze, po jejímž skončení došlo k obrovskému nárůstu biomasy v kultivačních lahvích. Po 48 hodinách dosáhl růst svého maxima a již nepokračoval.



## 7.6.3 Bakteriální kultura FEN2B

Tabulka 35 - měření optické hustoty při 600 nm pro kultury MP1 a MP1+N

čas (h)	FEN2B A	FEN2B B	FEN2B C	FEN2B A+N	FEN2B B+N	FEN2B C+N
0	0,016	0,016	0,017	0,016	0,015	0,013
21	0,323	0,316	0,313	0,378	0,378	0,365
45	0,383	0,384	0,366	0,468	0,481	0,461
68	0,352	0,343	0,338	0,474	0,469	0,447
91	0,382	0,375	0,373	0,464	0,457	0,444
213	0,367	0,368	0,354	0,431	0,427	0,413



Obr. 30 - graf závislosti optické hustoty suspenzí FEN2B, FEN2B+N na čase

Tabulka 36 - spotřeba dusíku při pokusu s kulturou FEN2B

čas (h)	obsah rozpuštěného dusíku v mg/l					
	FEN2B A	FEN2B B	FEN2B C	FEN2B A+N	FEN2B B+N	FEN2B C+N
0	43,00	44,72	42,88	79,56	82,68	78,84
213	27,66	28,02	27,35	65,24	57,41	63,09
Úbytek N	15,34	16,70	15,53	14,32	25,27	15,75
% úbytek N	35,67	37,34	36,22	18,00	30,56	19,98

Kultura FEN2B je za daných podmínek schopna využívat NMP jako jediný zdroj dusíku. Avšak z grafu lze vyčíst, že v lahvích obsahujících chlorid amonný byl nárůst biomasy větší. Chlorid amonný je tedy pro kulturu FEN2B výhodnějším zdrojem dusíku než NMP.

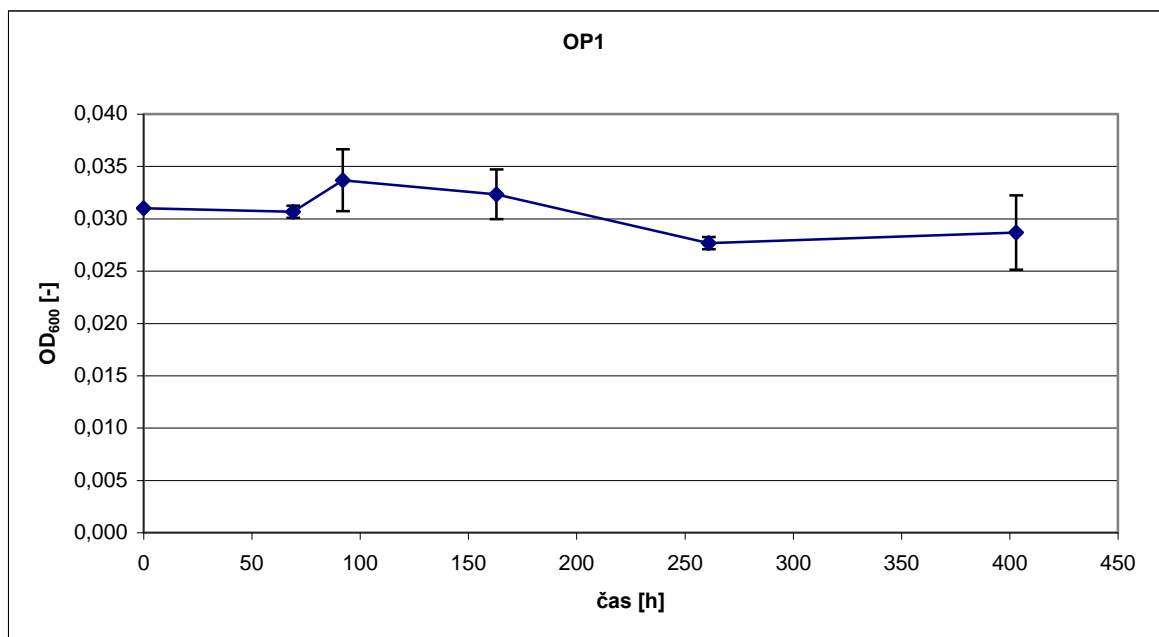
## 7.7 Degradace 200 mg/l 1-octyl-2-pyrrolidonu v tekutém médiu

Degradace 2-OP byla prováděna čistou kulturou OP1 a poté i směsnou kulturou s označením OP2, která se skládala z bakteriálních kultur OP1, DX a DY.

### 7.7.1 Bakteriální kultura OP1

Tabulka 37 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu OP1

čas (h)	OP1 A	OP1 B	OP1 C	OP1 D	OP1 E
0	-	-	-	0,031	0,031
69	0,030	0,031	0,031	-	-
92	0,032	0,037	0,032	-	-
163	0,030	0,034	0,033	-	-
261	0,028	0,027	0,028	-	-
403	0,025	0,030	0,031	-	-



Obr. 31 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze OP1 na čase

Hodnota DOC na začátku pokusu – 139,84 mg/l

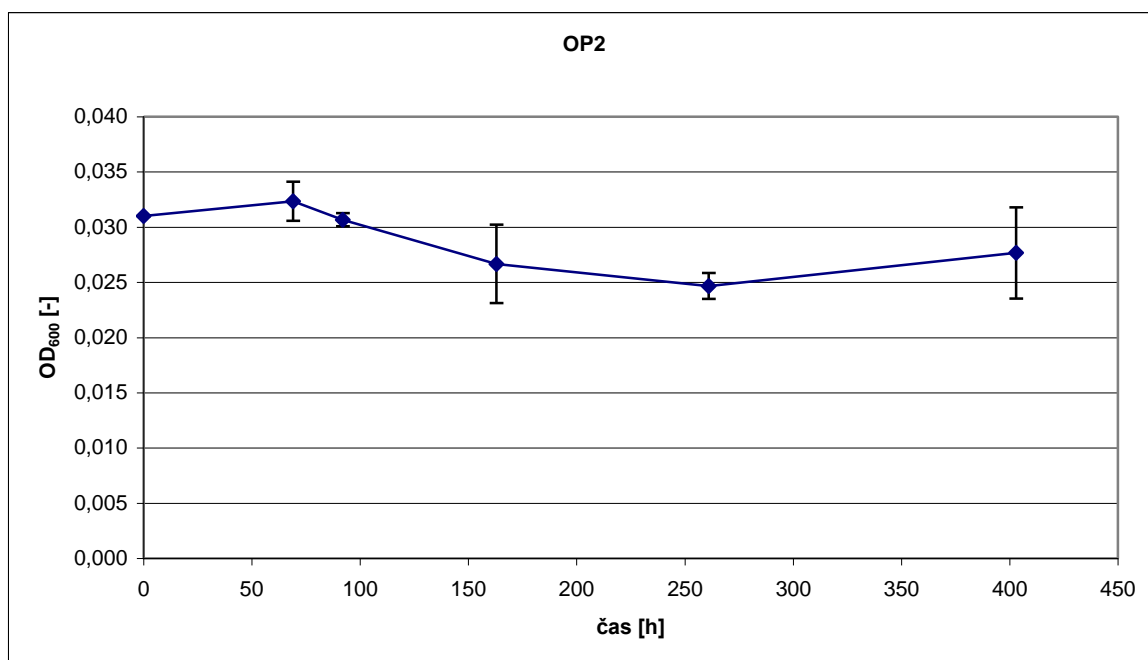
Hodnota DOC po 403 hodinách – 127,36 mg/l

Ani po 17ti dnech od zahájení pokusu nedošlo k žádnému nárůstu biomasy v kultivačních lahvích, avšak měřením rozpuštěného organického uhlíku bylo zjištěno, že došlo k minimálnímu rozkladu 2-OP a to asi o 8%. Kultura OP1 je tedy schopna za daných podmínek jenom velmi špatně rozkládat 1-octyl-2-pyrrolidon a zároveň má velmi dlouhou lagovou fázi a nárůst biomasy se tak zatím nemohl projevit. Je tedy zřejmé, že pro rozklad 2-OP čistou kulturou OP1 je zapotřebí buď delší doba nebo další neznámá kultura či určitý klíčový faktor (vitamín, koenzym apod.).

### 7.7.2 Směsná bakteriální kultura OP2

Tabulka 38 - měření optické hustoty při 600 nm pro směsnou kulturu OP2

čas (h)	OP2 A	OP2 B	OP2 C	OP2 D	OP2 E
0	-	-	-	0,031	0,031
69	0,031	0,034	0,032	-	-
92	0,031	0,030	0,031	-	-
163	0,026	0,024	0,030	-	-
261	0,026	0,024	0,024	-	-
403	0,025	0,032	0,026	-	-



Obr. 32 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze OP2 na čase

Hodnota DOC na začátku pokusu – 142,60 mg/l

Hodnota DOC po 403 hodinách – 121,81 mg/l

I směsná bakteriální kultura OP2 je za daných podmínek schopna jenom velmi špatně rozkládat 1-octyl-2-pyrrolidon, kdy byl při analýze zjištěn úbytek DOC asi o 15 % za 17 dní, tedy jen nepatrně vyšší než v případě použití čisté kultury OP1. V kultivačních lahvích ani po 17ti dnech nedošlo k výraznému nárůstu biomasy. Stejně jako v případě čisté kultury OP1 je zřejmé, že pro rozklad 2-OP směsnou kulturou OP2 je zapotřebí buď delší čas nebo další neznámá kultura či určitý klíčový faktor (vitamín, koenzym apod.).

## ZÁVĚR

V diplomové práci byla zkoumána schopnost čistých bakteriálních kultur rozkládat *N*-methyl pyrrolidon (NMP) a 1-octyl-2-pyrrolidon (2-OP) v tekutých médiích. Tyto látky se používají v mnoha průmyslových odvětvích a mají negativní vliv na životní prostředí.

Cílem bylo najít a případně identifikovat bakteriální kultury, které byly schopny využít NMP jako zdroj uhlíku a dusíku a tím jej eliminovat z prostředí.

Bylo pracováno jednak s kulturami uloženými na ÚIOŽP, avšak doposud neověřenými z pohledu degradace NMP, a jednak byly izolovány nové kmeny bakterií z aktivovaného kalu. Jednotlivé kultury byly nadávkovány do kultivačních lahví obsahujících minerální médium s obsahem NMP o koncentraci 2 g/l. Ty byly umístěny na třepačku a kultivovány při laboratorní teplotě 25°C. Doba kultivace se v jednotlivých případech lišila podle toho, jak rychle daná kultura byla schopna růstu a degradace NMP. Z původních šesti kultur uložených na ÚIOŽP bylo zjištěno, že pouze 3 z nich byly za daných podmínek schopny NMP degradovat, avšak zvolená koncentrace 2 g/l byla příliš velká a v lahvích zůstávalo vysoké množství rozpuštěného uhlíku. Proto byla pro následující sérii pokusů zvolena koncentrace NMP v lahvích 300 mg/l. Testoval se rozklad NMP kulturami MP1, MP2 a FEN2B, které byly schopny jeho rozkladu v první sérii testů. K těmto kulturám navíc přibyly další 3, které se podařilo izolovat z aktivovaného kalu ČOV Malenovice. Tyto kultury byly označeny MP10, MP11 a MP13.

Kultura MP1 měla při rozkladu NMP lagovou fázi, která trvala přibližně 20 hodin. Během 44 hodin od počátku pokusu však došlo k degradaci více než 90% NMP. Kultura MP2 měla podobně jako MP1 asi 20ti hodinovou lagovou fázi, po jejímž skončení došlo během dalších 24 hodin k biodegradaci asi 70% NMP. Po týdnu od zahájení pokusu byl NMP degradován z více jak 80%. U kultury FEN2B nebyla zaznamenána žádná lagová fáze, k rozkladu tedy docházelo již od nasazení pokusu. Po 24 hodinách došlo přibližně k 75% degradaci NMP. I přes prodloužení pokusu na 15 dní se již hodnota rozpuštěného organického uhlíku (DOC) neměnila. U bakteriální kultury MP10 se taktéž neprojevila žádná lagová fáze, a již po 20 hodinách došlo k degradaci přibližně 75% NMP. Pokus trval 7 dní ale hodnoty zůstávaly stejné jako po 20 hodinách od nasazení. Bakteriální kultura MP11 měla prakticky stejný průběh jako kultura MP10. Žádná lagová fáze, nejnižší hodnota DOC dosažena po 20ti hodinách od nasazení a dále se již neměnila. NMP byl rozložen

přibližně ze 75%. Degradace NMP kulturou MP13 měla nejpomalejší průběh a také bylo dosaženo nejnižšího výsledku. NMP byl rozkládán velmi pomalu a minima rozpuštěného uhlíku v kultivačních lahvích bylo dosaženo až po 67 hodinách od začátku pokusu. NMP byl degradován asi z 50%. I přes prodloužení pokusu se konečné hodnoty neměnily.

U kultur MP1, MP2 a FEN2B bylo navíc zkoumáno, zda-li dokáží využít NMP jako jediný zdroj dusíku. Bylo připraveno speciální bezdusíkaté minerální médium a kultury byly namnoženy na ochuzeném agaru, aby si případně nemohly vytvořit zásobu dusíku. Tímto bylo zajištěno, že NMP byl v lahvích opravdu jediným zdrojem uhlíku. Pro porovnání byly při pokusu použity i lahve s obsahem  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Pokus probíhal 9 dní a na jeho konci bylo zjištěno, že všechny zkoumané kultury jsou schopny využívat NMP jako jediný zdroj dusíku. Výsledky také naznačily, že u kultury FEN2B byl chlorid amonný výhodnějším zdrojem, kdy v tomto minerálním médiu byl nárůst kultury větší.

Celkově výsledky jednotlivých kultur ukázaly, že v aktivovaných kalech se vyskytují bakterie schopné výrazné a rychlé degradace *N*-methyl pyrrolidonu, pro které tato látka slouží jako jediný zdroj uhlíku a energie a že pro minimálně některé z nich i jako zdroj dusíku. Současně výsledky naznačily, že rozklad NMP nemusí být úplný a že bude potřebné tuto problematiku blíže prostudovat.

Při testování biodegradace 2-OP byla použita čistá kultura s označením OP1 a směsná kultura OP2, složená ze tří kultur, které byly předtím izolovány z aktivovaného kalu a namnoženy na minerálním agaru s obsahem 2-OP. Testy v minerálním médiu při koncentraci 200 mg/l 2-OP neukázaly ani v jednom případě ani po 17 dnech výrazný nárůst biomasy v kultivačních lahvích. Hodnota DOC v průběhu pokusů klesla asi o 8% u čisté kultury OP1 a asi o 15% při rozkladu směsnou kulturou OP2. I zde tedy bude další studium nezbytné.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MARUŠINCOVÁ, H., *Diplomová práce*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, (2009)
- [2] PVP [online]. [cit. 2012-01-21]. Dostupný z WWW: <<http://online1.ispcorp.com/Brochures/Performance%20Chemicals/PVP.pdf>>
- [3] Bezpečnostní list MERCK, *Polyvidon 25 Ph Eur*
- [4] Bezpečnostní list Šarm spol. s r.o., *N-methylpyrrolidon* [online]. [cit. 2012-01-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.eurosarm.cz/web/umkatalogdoc/4220.pdf>>
- [5] *Inert reassessments: N-methylpyrrolidone* [online]. [cit. 2011-10-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.epa.gov/opprd001/inerts/methyl.pdf>>
- [6] SHUI TSE CHOW and TJU LIK NG, *The biodegradation of N-methyl-2-pyrrolidone in water by sewage bacteria*, Water Res. Vol. 17, p. 117-118, Great Britain 1983
- [7] Standing Technical Committee on Synthetic Detergents, U.K. (1967) Ninth Progress Report, HMSO, London
- [8] ASTM (1975) American Society for Testing and Materials, Method D2667-70 (Reapproved 1975) Standard method of test for biodegradability of alkylbenzene sulfonates
- [9] APHA (1971) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 13<sup>th</sup> Edition, p.495. American Public Health Association, Washington, DC.
- [10] JONG KWANG LEE, WOO JIN LEE, YONG-JU CHO, DOO HYUN PARK, YONG-WOO LEE and JINWOOK CHUNG *Variation of bacterial community immobilized in polyethylene glycol carrier during mineralization of xenobiotics analyzed by TGGE technique*, Korean J. Chem. Eng., 27(6), p. 1816-1821 (2010)
- [11] BARKAY T. and PRITCHARD H., *Microbiol. Sci.*, 5, 165 (1988)
- [12] HUTCHINS S.R., TOMSON M.B., WILSON J.T. and WARD C.H., *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 1039 (1984)
- [13] MADSEN E.L., SINCLAIR J.L. and GHIORSE W.C., *Science*, 252, 830 (1983)

- [14] SPAIN J.C. and VAN VELD P.A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 428 (1983)
- [15] *Chemical summary for acrylamide*, Office of pollution prevention and toxics U.S. Environmental protection agency (1994), EPA 749-F-94-005a, [online]. [cit. 2012-01-21]. Dostupný z WWW: <[http://www.epa.gov/chemfact/s\\_acryla.txt](http://www.epa.gov/chemfact/s_acryla.txt)>
- [16] SATHESH-PRABU C., THATHEYUS A.J., *Biodegradation of acrylamide employing free and immobilized cells of Pseudomonas aeruginosa*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60 (2007), p. 69-73
- [17] SHUKOR M.Y., GUSMANIZAR N., AZMI N.A., HAMID M., RAMIL J., SHAMAAN N.A. and SYED M.A., *Isolation of an acrylamide-degrading Bacillus cereus*, *J. Environ. Biol.*, 30(1), p. 57-64 (2009)
- [18] SHUKOR M.Y., GUSMANIZAR N., RAMLI J., SHAMAAN N.A., MACCORMACK W.P. and SYED M.A., *Isolation of an acrylamide-degrading Antarctic bacterium*, *J. Environ. Biol.*, 30(1), p. 107-112 (2009)
- [19] US Environmental Protection Agency (USEPA), 1985. *Health and Environmental Effects Profile for Acrylamide*. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington, DC.
- [20] Bezpečnostní list Sigma-Aldrich, *1-octyl-2-pyrrolidone*, [online]. [cit 2012-01-22]. Dostupný z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=75072&brand=FLUKA>>
- [21] ANSELL J. M. and FOWLER J.A., *The acute oral toxicity and primary ocular and dermal irritation of selected N-Alkyl-2-pyrrolidones*, *Fd Chem. Toxic* Vol.26, No. 5, p 475-479, 1988, Great Britain
- [22] CHERRY, A.B., GABACCIA, A.J., SENN, H.W., 1956. *The assimilation behaviour of certain toxic organic compounds in natural water*, *Sewage Industrial Wastes* 28, p. 1137-1146
- [23] *N-Octyl-2-pyrrolidone dist.*, BASF, [online]. [cit. 2012-01-22]. Dostupný z WWW:<[http://www.basf.com/group/corporate/en/brand/N\\_OCTYL\\_2\\_PYRROLIDONE\\_DIST](http://www.basf.com/group/corporate/en/brand/N_OCTYL_2_PYRROLIDONE_DIST)>



- [24] OCEGUERA-CERVANTES A. et al., *Characterization of the Polyurethanic Activity of Two Alicyclophilus sp. Strains Able To Degrade Polyurethane and N-methylpyrrolidone*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 19, Oct. 2007, p. 6214-6223

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

2-OP	1-octyl-2-pyrrolidon
APHA	American Public Health Association
ASTM	American Society for Testing and Materials
CHSK	Chemická spotřeba kyslíku
ČOV	Čistírna odpadních vod
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
FID	Plamenný ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
LC <sub>50</sub>	Smrtná koncentrace
LD <sub>50</sub>	Smrtná dávka
NMP	1-methyl-2-pyrrolidon
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PEG	Polyethylenglykol
ppm	Parts per milion – jedna miliontina z celku
PVP	Polyvinylpyrrolidon
STSCD	Standing Technical Committee on Synthetic Detergents
TYA	Tryptone Yeast extract Agar
USEPA	United States Environmental Protection Agency
ÚIOŽP	Ústav Inženýrství Ochrany Životního Prostředí

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1 - Struktura PVP .....</i>	13
<i>Obr. 2 - Struktura NMP .....</i>	15
<i>Obr. 3 - Struktura akrylamidu .....</i>	20
<i>Obr. 4 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP1 na čase .....</i>	42
<i>Obr. 5 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP1 .....</i>	42
<i>Obr. 6 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP2 na čase .....</i>	43
<i>Obr. 7 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP2 .....</i>	44
<i>Obr. 8 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP3 na čase .....</i>	45
<i>Obr. 9 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP3 .....</i>	46
<i>Obr. 10 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP4 na čase .....</i>	47
<i>Obr. 11 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP4 .....</i>	47
<i>Obr. 12 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP7 na čase .....</i>	48
<i>Obr. 13 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou MP7 .....</i>	49
<i>Obr. 14 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze FEN2B na čase .....</i>	50
<i>Obr. 15 - graf biodegradace 2 g/l NMP kulturou FEN2B .....</i>	51
<i>Obr. 16 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP1 na čase .....</i>	52
<i>Obr. 17 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP1 .....</i>	53
<i>Obr. 18 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP2 na čase .....</i>	54
<i>Obr. 19 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP2 .....</i>	54
<i>Obr. 20 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze FEN2B na čase .....</i>	55
<i>Obr. 21 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou FEN2B .....</i>	56
<i>Obr. 22 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP10 na čase .....</i>	57
<i>Obr. 23 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP10 .....</i>	58
<i>Obr. 24 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP11 na čase .....</i>	59
<i>Obr. 25 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP11 .....</i>	59
<i>Obr. 26 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze MP13 na čase .....</i>	60
<i>Obr. 27 - graf biodegradace 300 mg/l NMP kulturou MP13 .....</i>	61
<i>Obr. 28 - graf závislosti optické hustoty suspenzí MP1 a MP1+N na čase .....</i>	62
<i>Obr. 29 - graf závislosti optické hustoty suspenzí MP2 a MP2+N na čase .....</i>	64
<i>Obr. 30 - graf závislosti optické hustoty suspenzí FEN2B, FEN2B+N na čase .....</i>	65
<i>Obr. 31 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze OP1 na čase .....</i>	66

---

*Obr. 32 - graf závislosti optické hustoty bakteriální suspenze OP2 na čase ..... 67*

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 - Gramovo barvení bakteriálních kultur.....	37
Tabulka 2 – Kultivace bakteriálních kultur při rozdílných teplotách .....	38
Tabulka 3 - OF test, oxidasa, katalasa .....	39
Tabulka 4 - NEFERMtest 24 pro kulturu FEN2B .....	40
Tabulka 5 - NEFERMtest 24 pro kulturu MP1 .....	40
Tabulka 6 - NEFERMtest 24 pro kulturu MP2.....	41
Tabulka 7 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP1 .....	41
Tabulka 8 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP1 .....	42
Tabulka 9 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP2 .....	43
Tabulka 10 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP2.....	44
Tabulka 11 - měření optické hustoty při 600nm pro kulturu MP3 .....	45
Tabulka 12 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP3 .....	45
Tabulka 13 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP4 .....	46
Tabulka 14 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP4.....	47
Tabulka 15 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP7 .....	48
Tabulka 16 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP7.....	48
Tabulka 17 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu FEN2B.....	49
Tabulka 18 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou FEN2B.....	50
Tabulka 19 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP1 .....	52
Tabulka 20 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP1 .....	52
Tabulka 21 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP2 .....	53
Tabulka 22 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP2.....	54
Tabulka 23 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu FEN2B.....	55
Tabulka 24 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou FEN2B.....	56
Tabulka 25 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP10 .....	57
Tabulka 26 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP10.....	57
Tabulka 27 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP11 .....	58
Tabulka 28 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP11 .....	59
Tabulka 29 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu MP13 .....	60
Tabulka 30 - hodnoty DOC v průběhu pokusu s kulturou MP13 .....	61
Tabulka 31 - měření optické hustoty při 600 nm pro kultury MP1 a MP1+N.....	62

---

Tabulka 32 - spotřeba dusíku při pokusu s kulturou MP1 .....	63
Tabulka 33 - měření optické hustoty při 600 nm pro kultury MP2 a MP2+N.....	63
Tabulka 34 - spotřeba dusíku při pokusu s kulturou MP2 .....	64
Tabulka 35 - měření optické hustoty při 600 nm pro kultury MP1 a MP1+N.....	65
Tabulka 36 - spotřeba dusíku při pokusu s kulturou FEN2B.....	65
Tabulka 37 - měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu OP1 .....	66
Tabulka 38 - měření optické hustoty při 600 nm pro směsnou kulturu OP2 .....	67

## EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

<b>Sigla</b> (místo uložení diplomové práce)	Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
<b>Název diplomové práce</b>	Studium bakterií rozkládajících strukturní analogy vinylpyrrolidonu
<b>Autor diplomové práce</b>	Bc. Karel Křížek
<b>Vedoucí diplomové práce</b>	doc. RNDr. Jan Růžička Ph.D.
<b>Vysoká škola</b>	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
<b>Adresa vysoké školy</b>	Nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín
<b>Fakulta</b> (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Fakulta technologická, Nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
<b>Katedra</b> (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
<b>Rok obhájení DP</b>	2012
<b>Počet stran</b>	79
<b>Počet svazků</b>	1
<b>Vybavení (obrázky, tabulky...)</b>	70
<b>Klíčová slova</b>	Biodegradace, strukturní analogy, vinylpyrrolidon, <i>N</i> -methyl pyrrolidon, 1-octyl-2-pyrrolidon, akrylamid