

Studium půdních bakterií schopných rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu

Bc. Jaroslav Urban

Diplomová práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaroslav Urban**
Osobní číslo: **T17337**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Studium půdních bakterií schopných rozkladu
1-oktyl-2-pyrrolidonu**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši k zadanému tématu.
2. Provedte pokusy biodegradace uvedené látky půdními mikroorganismy.
3. Pokuste se získat půdní bakterie zodpovědné za rozklad.
4. Výsledky přehledně sepište a práci odevzdejte v řádném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Novotná Z. 2017. Mikrobiální degradace N-oktylpyrrolidonu a popis bakterií schopných rozkladu. Diplomová práce, FT UTB ve Zlíně.

[2] Wagner P., 2006. Inert Reassessments: Two Exemptions from the Requirement of a Tolerance for N-(n-dodecyl)-2-pyrrolidone and N-(n-octyl)-2-pyrrolidone. Action Memorandum, US EPA.

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

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

1. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2019

Ve Zlíně dne 1. února 2019

doc. Ing. Roman Cermák, Ph.D.
děkan

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

Příjmení a jméno:

Obor: IOZP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu 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, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 14. května 2019

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

(1) Vysoká škola 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.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

³¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

V rámci této diplomové práce byl zkoumán rozklad 1-oktyl-2-pyrrolidonu za pomoci půdních bakterií. Z odebraného vzorku půdy bylo izolováno směsné mikrobiální konsorcium, u něhož byla prokázána schopnost využívat 1-oktyl-2-pyrrolidon jakožto hlavní zdroj uhlíku. Následně z něj byly izolovány nejhojněji zastoupené bakteriální kmeny, z nichž byla popsána jako klíčová kultura JU 4, která byla identifikována jako gram negativní tyčinka. K ideálnímu rozkladu však dochází v kombinaci s ostatními bakteriálními kulturami, v tomto případě pod označením JU 3 a JU 6, kde se jednalo o gram pozitivní koky. Bylo tedy prokázáno, že k biologickému rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu dochází působením většího počtu bakteriálních kmenů najednou.

Klíčová slova: 1-oktyl-2-pyrrolidon, pyrrolidon, biodegradace, půdní bakterie

ABSTRACT

In this diploma thesis, the decomposition of 1-octyl-2-pyrrolidone was examined with the aid of soil bacteria. A pooled microbial consortium was isolated from the soil sample and it was demonstrated that the consortium has the ability to use 1-octyl-2-pyrrolidone as the major carbon source. Subsequently, the most abundant bacterial strains were isolated from a pooled consortium. Strain JU 4, which was revealed to be gram-negative rod-shaped bacterium, was described as a key culture for the degradation. However, the nearly complete decomposition occurs in combination with other bacterial strains, in this case under the designation JU 3 and JU 6, which were found to be gram-positive cocci. Thus, it has been shown that biodegradation of 1-octyl-2-pyrrolidone occurs as the effect of an activity of larger number of bacterial strains at one time.

Keywords: 1-octyl-2-pyrrolidone, pyrrolidone, biodegradation, soil bacteria

Na tomto místě bych chtěl poděkovat především doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, ochotu a strávený čas, který mi věnoval během zpracování této diplomové práce. Dále také děkuji všem pracovníkům Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické, UTB ve Zlíně, za pomoc v laboratořích při experimentální části práce.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIODEGRADACE	12
2 1-OKTYL-2-PYRROLIDON	13
2.1 OBECNÉ VLASTNOSTI	13
2.2 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU	13
2.3 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU	14
3 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD STRUKTURNĚ PODOBNÝCH LÁTEK 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU	15
3.1 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE NIKOTINU	16
3.2 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE PIRACETAMU	18
3.3 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE KOFEINU	19
3.4 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE ATRAZINU.....	21
3.5 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE PYRROLIDINU A PIPERIDINU	23
3.6 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE METHYLPYRROLIDONU	23
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
4 METODIKA	25
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	25
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	25
4.3 POUŽITÁ MÉDIA A ŽIVNÉ PŮDY	26
4.3.1 Roztok stopových prvků	26
4.3.2 Minerální médium.....	26
4.3.3 R2A agar	26
4.3.4 Minerální agar a MAN agar	27
Složení MAN agaru: jde o MA agar, obohacený NOP do koncentrace 140 mg·l ⁻¹	27
4.3.5 Fysiologický roztok.....	27
4.4 ANALYTICKÉ POSTUPY	27
4.4.1 Stanovení rozpuštěného organického uhlíku	27
4.4.2 Stanovení intenzity zákalu	28
4.5 POSTUPY JEDNOTLIVÝCH EXPERIMENTŮ	28
4.5.1 Příprava suspence půdních bakterií.....	28
4.5.2 Pokus degradace 1-oktyl-2-pyrrolidonu půdními bakteriemi	28
4.5.3 Utilizace vyšších koncentrací 1-oktyl-2-pyrrolidonu půdním mikrobiálním konsorciem	29
4.5.4 Pomnožení půdního mikrobiálního konsorcia degradujícího NOP	30
4.5.5 Isolace bakterií z půdního mikrobiálního konsorcia, degradujícího 1-oktyl-2-pyrrolidon	30
4.5.6 Dlouhodobá konzervace izolovaných kultur.....	32
4.5.7 Ověření degradace 1-oktyl-2-pyrrolidonu jednotlivými kulturami a společným inokulem	32
4.5.8 Degradace NOP kulturou JU 4 a konsorcii JU 4 + JU X.....	33
4.5.9 Cytochrom oxidázový test.....	34

4.5.10	Katalázový test	34
4.5.11	Gramovo barvení.....	34
4.5.12	Kultivace získaných bakteriálních kultur při různých teplotách.....	35
5	VÝSLEDKY POKUSŮ A JEJICH DISKUSE	36
5.1	POKUS O ROZKLAD 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU ZÍSKANOU MIKROBIÁLNÍ SMĚSÍ.....	36
5.2	UTILIZACE VYŠŠÍCH KONCENTRACÍ 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU PŮDNÍM MIKROBIÁLNÍM KONSORCIEM A ZÍSKÁNÍ IZOLOVANÝCH BAKTERIÁLNÍCH KULTUR	38
5.3	OVĚŘENÍ DEGRADAČNÍCH SCHOPNOSTÍ IZOLOVANÝCH BAKTERIÁLNÍCH KULTUR	41
5.4	OVĚŘENÍ DEGRADACE 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU JEDNOTLIVÝMI KULTURAMI A SPOLEČNÝM INOKULEM	41
5.5	DEGRADACE 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU KULTUROU JU 4 A KONSORCII JU 4 + JU X.....	42
5.6	ZÁKLADNÍ IDENTIFIKACE BAKTERIÍ KLÍČOVÝCH PRO ROZKLAD 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU	43
5.7	KINETIKA ROZKLADU 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU KONSORCIEM BAKTERIÍ JU 4 A JU 3	46
	ZÁVĚR	49
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	56
	SEZNAM TABULEK.....	58

ÚVOD

Mnohé průmyslově vyráběné chemické látky mohou být biologicky odbouratelné, v opačném případě pak při jejich únicích do životního prostředí může docházet k jejich kumulaci a negativnímu působení. Při jejich vyšší intenzitě využívání je účelné tuto informaci znát. 1-oktyl-2-pyrrolidon je průmyslovou, stále hojněji využívanou látkou. Nachází uplatnění v oblastech agrochemie, čištění kovů, v polygrafickém průmyslu jako náplň do inkoustů, při barvicích procesech a také jako průmyslové rozpouštědlo při chemických syntézách. Z hlediska biodegradace je téměř nepopsanou látkou.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda se v půdě nachází bakterie schopné 1-oktyl-2-pyrrolidon rozkládat, tyto bakterie potom z půdy izolovat a jejich degradační schopnosti následně ověřit. V rámci této práce byla také provedena literární rešerše s cílem popsat mechanismy biologického rozkladu látek strukturně podobných 1-oktyl-2-pyrrolidonu.

1-oktyl-2-pyrrolidon je na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně, Fakultě technologické, Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí dlouhodobě zkoumanou látkou a již v minulých letech byl testován z hlediska jeho biodegradability, avšak výhradně bakteriemi pocházejícími z vodních prostředí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIODEGRADACE

Obecně se biodegradací rozumí rozklad (mineralizace) organických látek za pomoci mikroorganismů či jiných organismů. Vzhledem k rozsáhlé industrializaci a značné míře znečištění prostředí xenobiotiky i přírodními organickými látkami, představují mikrobiální biodegradace účinný nástroj pro řešení tohoto problému. Zásadně tak napomáhají snížit vzniklou kontaminaci daného prostředí, především pak vod a půd. (Das et al. 2014; Jørgensen 2008)

Mikroorganismy jsou nejpočetnějšími živými organismy na Zemi, pokud jde o počet druhů i celkovou hmotnost biomasy, jsou takřka všudypřítomné a z hlediska jejich metabolismu velice rozmanité. Mnohé z nich se snadno adaptují na různé typy prostředí i nové potravní zdroje. Jsou schopny rozkládat některá xenobiotika v rámci několika hodin (např. monomerní uhlovodíky, nízkomolekulární alkoholy), ale jiné až za mnoho let (retardéry hoření, DDT). Výhoda jejich využití při biodegradacích spočívá v jejich dostupnosti, a také díky ekonomičnosti při provádění sanaci. Je možné s nimi pracovat in-situ i ex-situ. Nevýhodou biodegradací může být delší doba provádění sanace (např. při rozkladu těžce rozložitelného xenobiotika). (Panigrahu et al. 2019; Das et al. 2014; Jørgensen 2008; Mara et al. 2003)

Při posouzení toxické látky z hlediska biodegradability platí několik obecných pravidel (Jørgensen 2008):

1. Čím vyšší molekulová hmotnost látky, tím horší biologická odbouratelnost, horší biodostupnost.
2. Alifatické sloučeniny jsou lépe biologicky odbouratelné, než aromatické.
3. Halogen- a nitro-substituenty snižují biologickou rozložitelnost.
4. Přítomnost dvojných a trojných vazeb v molekule zvýší biologickou rozložitelnost.
5. Přemostění kyslíku a dusíku v molekule sníží biologickou rozložitelnost.
6. Rozvětvené molekuly jsou hůře biodegradabilní, než jejich primární molekuly.

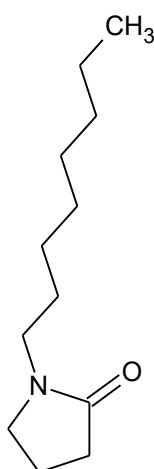
2 1-OKTYL-2-PYRROLIDON

2.1 Obecné vlastnosti

1-oktyl-2-pyrrolidon (NOP) - jedná se o molekulu složenou se ze dvou základních částí (viz Obrázek 1):

1. Hydrofobní postranní řetězec oktylu
2. Hydrofilní laktamový kruh 2-pyrrolidonu

Jeho základní vlastnosti shrnuje Tabulka 1.



Obrázek 1: Struktura NOP

Tabulka 1: Vlastnosti NOP (*PubChem Compound 2005*)

Název	1-oktyl-2-pyrrolidone
Molekulární hmotnost	197.322 g/mol
Číslo CAS	2687-94-7
Skupenství při 25 °C	Nažloutlá kapalina
Bod varu	170–172 °C
Bod tuhnutí	–25 °C
Hustota při 25 °C	0,92 g/ml
GHS klasifikace	Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Způsobuje poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici. Toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky.

2.2 Průmyslové využití 1-oktyl-2-pyrrolidonu

Vzhledem k amfipatické struktuře molekuly NOP nachází využití v průmyslových odvětvích jako je agrochemie, v chemickém průmyslu jako rozpouštědlo či surfaktant. Další uplatnění

NOP můžeme najít v polygrafickém průmyslu jako součást inkoustových náplní, nebo jako přísadu v barvicích procesech. (Yim et al. 2019)

Dále je NOP zkoumán i v oblasti farmaceutického průmyslu, například z hlediska transportu amfifilních léčiv skrze pokožku, kde byl prokázán jeho pozitivní účinek při transportu. (Warner et al. 2008, Yoneto et al. 1995)

2.3 Bakteriální rozklad 1-oktyl-2-pyrrolidonu

NOP je z hlediska výzkumu jeho biodegradability v odborné literatuře téměř nepopsanou látkou. Na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně, Fakultě technologické, Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí se jeho biodegradabilita v rámci diplomových a bakalářských prací zkoumá již několik let. Biodegradaci NOP ve vodním prostředí za pomoci bakterií izolovaných z aktivovaného kalu zkoumal ve své diplomové práci Křížek (2012). V ní byl NOP úspěšně některými bakteriálními kmeny degradován. Koncentrace NOP se pohybovaly okolo $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Další práce zabývající se biodegradací NOP zpracovala Novotná 2015, kde byly z hlediska biodegradability zkoumány říční bakterie. Izolované bakteriální kmeny byly schopny rozkladu NOP do koncentrací $150\text{--}170 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. (Křížek, 2012; Novotná, 2015)

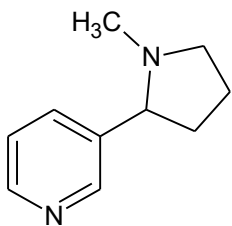
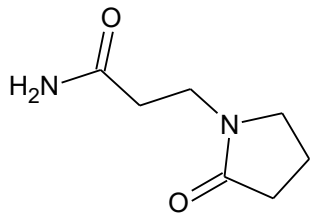
3 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD STRUKTURNĚ PODOBNÝCH LÁTEK 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU

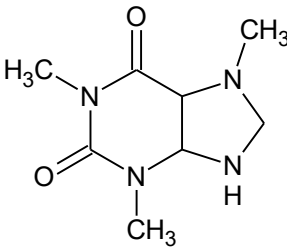
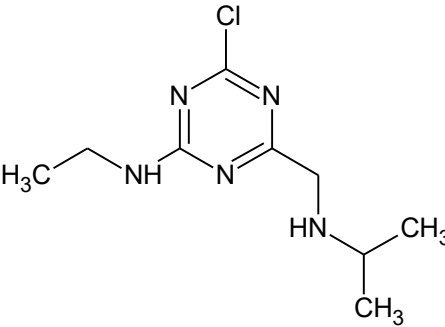
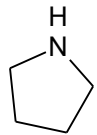
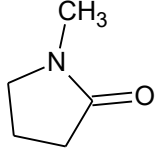
Vzhledem k tomu, že na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí byly již v minulých letech zpracovány diplomové a bakalářské práce shrnující literární rešerši dostupných informací o NOP viz Křížek, 2012; Vrlová, 2012, Novotná, 2015; Salač, 2015; Novotná 2017, bude se tato rešeršní část diplomové práce zaměřovat na shrnutí poznatků o biologickém rozkladu strukturně podobných organických sloučenin. Existuje totiž korelace mezi strukturou látky a jejím chováním v bakteriálním metabolismu (Jørgensen 2008). Je účelné tuto rešerši na danou problematiku provést.

Tato část teoretické práce zahrnuje popis bakteriálního rozkladu látek strukturně podobných NOP. Jedná se tedy především o heterocyklické látky, jež mají ve své struktuře zakomponován atom dusíku, případně obsahují celý pyrrolidonový kruh.

Mezi strukturně podobné látky v tomto ohledu byly vybrány tyto látky: nikotin, kofein, piracetam, atrazin, pyrrolidin a methylpyrrolidon, viz Tabulka 2.

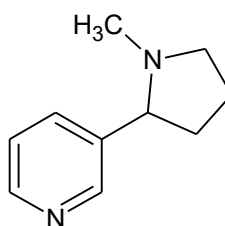
Tabulka 2: Vybrané organické látky strukturně podobné NOP

Název	Strukturní vzorec
Nikotin	
Piracetam	

Název	Strukturní vzorec
Kofein	
Atrazin	
Pyrrolidin	
Methylpyrrolidon	

3.1 Bakteriální degradace nikotinu

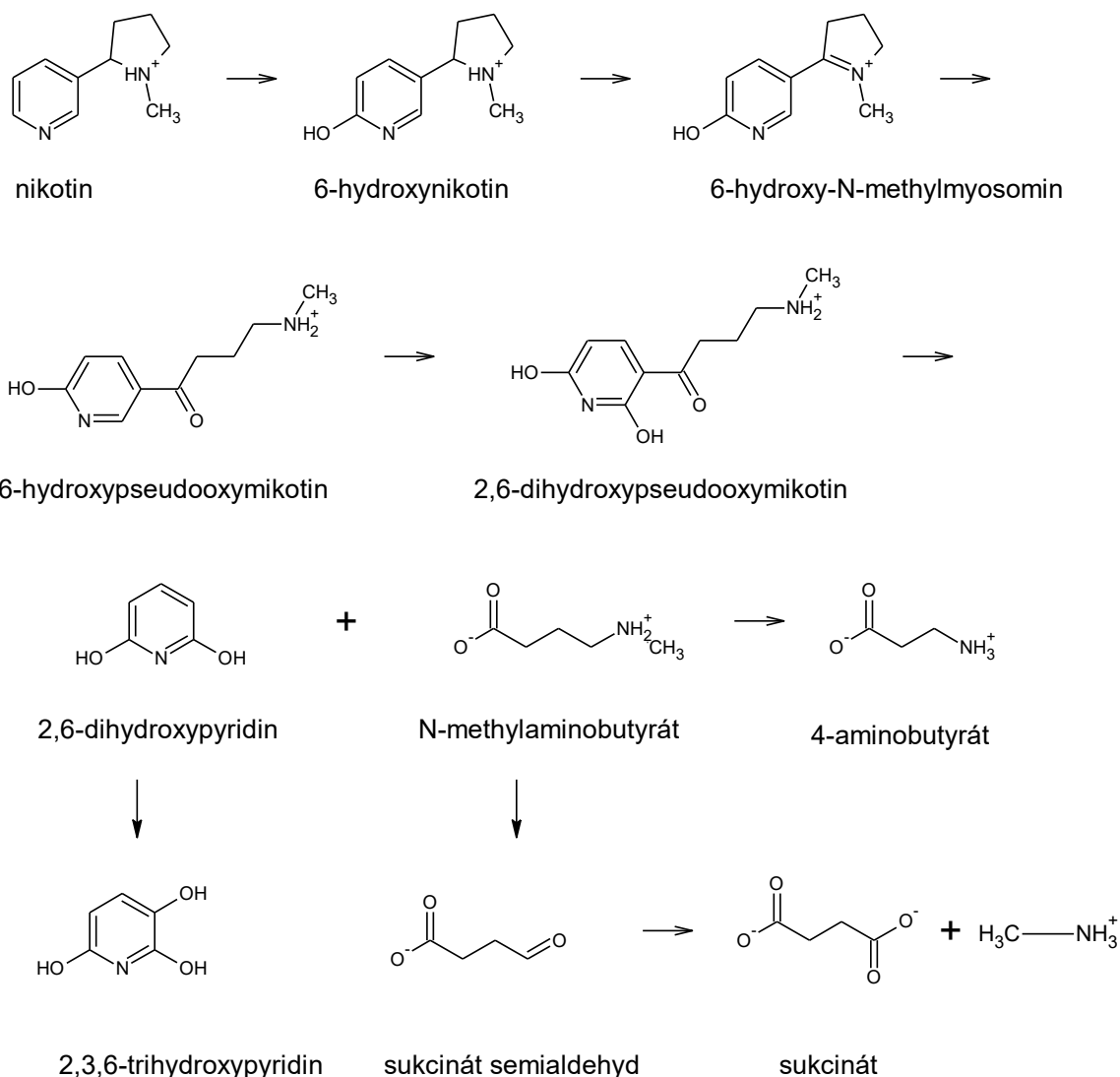
Nikotin je přírodním alkaloidem, jehož molekulu tvoří pyrrolidinový i pyridinový kruh, viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Molekula nikotinu

Dosud jsou popsány v zásadě dvě hlavní metabolické dráhy bakteriálního rozkladu nikotinu, lišící se především rozdílným iniciačním krokem rozkladu. Prvním typem je pyridinová

dráha, charakteristická pro bakterie *Arthrobacter nicotinovorans*, u které dochází nejprve k hydroxylaci pyrridinového kruhu. Druhou je pyrrolidinová dráha, začínající oxidací vazby uhlík-dusík v pyrrolidinovém kruhu, tato dráha je charakteristická pro celou řadu bakterií rodu *Pseudomonas*. V poslední době byla popsána také hybridní cesta, která je započata hydroxylací pyridinového kruhu (pyridinová dráha), následující kroky typickými pro dráhu pyrrolidonovou. Schéma tohoto rozkladu shrnuje Obrázek 3. (Fitzpatrick et al. 2018)

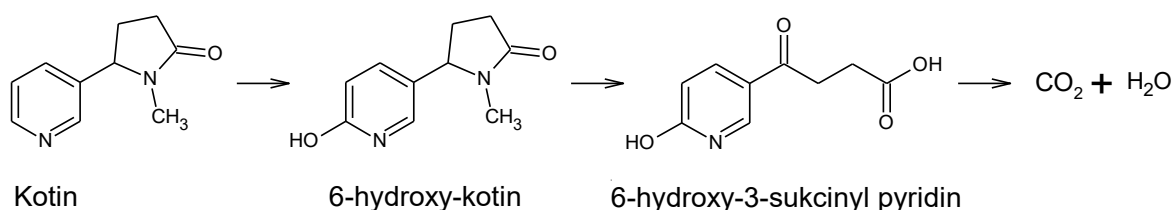


Obrázek 3: Schéma bakteriálního rozkladu nikotinu (upraveno dle Fitzpatrick et al. 2018)

Bakterie z rodu *Pseudomonas* byly schopny metabolizovat nikotin v nejširších fyzikálně-chemických podmínkách, ať už jde o jeho koncentraci, pH a teplotu daného prostředí. Jak ve své studii uvádějí Wank et al. 2012, tyto bakterie izolované z tabákových polí byly schopny účinně nikotin rozkládat až do koncentrace $4000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ při pH v rozmezí 6–10. U bakterie *Arthrobacter nicotinovorans* izolované z tabákového odpadu byla ovšem popsána

tolerance až do $8000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, degradace v tomto případě probíhala při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $\text{pH } 7,0$. (Ruan et al. 2018)

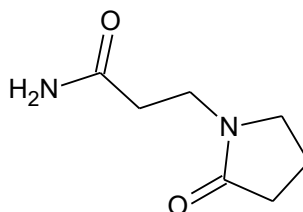
Významnou látkou přímo souvisejícím s nikotinem je kotin, který vzniká metabolickou přeměnou nikotinu v lidském těle a je vylučován močí. V jeho případě jsou nejvýznamnějšími degradanty bakterie z rodu *Nocardioides*. Zjednodušený mechanismus jeho rozkladu je znázorněn na obrázku 4. Bakterie z rodu *Nocardioides* úspěšně rozkládaly kotin ve vodním prostředí v koncentracích okolo $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ při $\text{pH } 7$ a teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$. (Qiu et al. 2018)



Obrázek 4: Mechanismus rozkladu kotinu prostřednictvím bakterií rodu *Nocardioides* (upraveno podle Qiu et al. 2018)

3.2 Bakteriální degradace piracetamu

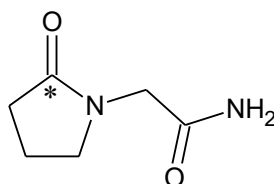
Piracetam (viz Obrázek 5) je léčivem, patřící do skupiny psychoanaleptik, a vyskytujícím se často i v odpadních vodách (WHO 2018).



Obrázek 5: Struktura piracetamu

Při výzkumu jeho bakteriální degradace byly popsány dva klíčové mikrobiální kmeny *Ochrobactrum antropi* MW6 a *Ochrobactrum intermedium* MW7, které jsou schopny využívat piracetam jako zdroj uhlíku pro svůj růst (Woźniak-Karczewska et al. 2016). Bakterie *Ochrobactrum antropi* jsou schopny také mimo jiné rozkládat molekulu glyfosfátu (rostlinný herbicid) (Sviridov et al. 2012). U bakterií *Ochrobactrum intermedium* byly zase popsány degradační účinky pro mnohé ropné látky. Bakterie tohoto rodu jsou schopny produkovat glykolipopeptidální biosurfaktant, jenž výrazně zvyšuje dostupnost hydrofobních skupin, podobný mechanismus může hrát významnou roli i u rozkladu NOP. (Bezza et al. 2015)

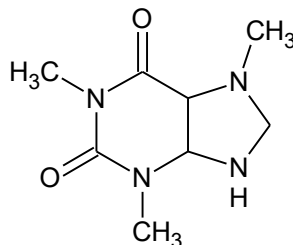
K metabolickému rozkladu heterocyklické vazby uhlík-dusík piracetamu v případě *Ochrobactrum antropi* MW6 a *Ochrobactrum intermedium* MW7 docházelo přímo v heterocyklickém kruhu, jak naznačuje Obrázek 6. Vstupní koncentrace látky ve vodném roztoku při degradaci se pohybovala okolo $1500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a k úplnému rozkladu piracetamu pak došlo cca po 53 hodinách kultivace. (Woźniak-Karczewska et al. 2016)



Obrázek 6: Štěpení heterocyklického kruhu piracetamu (upraveno dle Woźniak-Karczewska et al. 2016)

3.3 Bakteriální degradace kofeinu

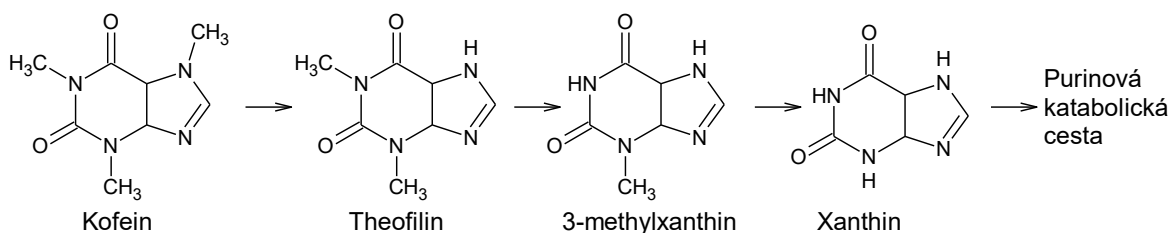
Kofein je dalším z řady molekul s heterocyklickým dusíkatým kruhem (struktura viz Obrázek 7); patří opět mezi přírodní alkaloidy, u něhož bylo nalezeno velké množství bakteriálních kultur a metabolických drah podílejících se jeho na jeho biodegradaci. (Gummady et al. 2012)



Obrázek 7: Struktura molekuly kofeinu

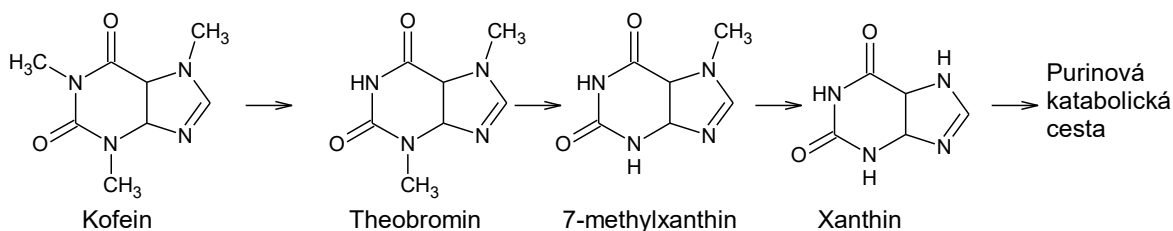
Prozatím byly zkoumány především mechanismy rozkladu v aerobním prostředí, jednotlivé typy degradací znázorňuje Obrázek 8–10. (Gummady et al. 2012)

Schéma na obrázku 8 popisuje katabolismus kofeinu, kdy jako první vzniká teofylin následovaný postupnou demethylací, probíhá především v houbách; významnými zástupci využívající tuto metabolickou dráhu jsou například *Aspergillus* a *Penicillium*. (Gummady et al. 2012)

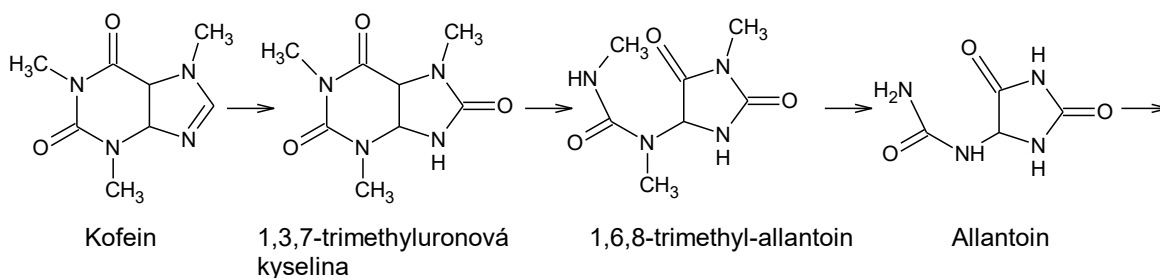


Obrázek 8: Katabolismus kofeinu v mikroorganismech theofilinová ceta (upraveno podle Gummady et al. 2012)

Hlavními bakteriálními rody schopné biodegradace kofeinu jsou *Pseudomonas* a *Serratia*. Degradace probíhá dvěma základními mechanismy. Především u rodu *Pseudomonas* demethylací (Obrázek 9), kdy se kofein nejprve převede na teobromin a paraxantin a následně vzniká xantin a 7-methylxantin (Gummady et al. 2012; Swati et al. 2016). Druhým způsobem katabolismu kofeinu je jeho oxidace, tento mechanismus byl pozorován bakterií rodu *Klebsiella* a *Rhodococcus*. Touto cestou se kofein oxiduje na osmém uhlíku a vzniká kyselina 1,3,7-trimethyluronová, která degraduje na 3,6,8-trimethylallantoin a ten následně tvoří dimethylmočovinu (Obrázek 10). (Gummady et al. 2012; Mohapatra et al. 2006)



Obrázek 9: Katabolismus kofeinu v mikroorganismech theobrominová ceta (upraveno podle Gummady et al. 2012)

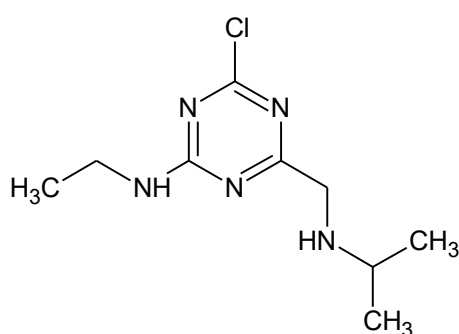


Obrázek 10: Katabolismus kofeinu v mikroorganismech allatoninová ceta (upraveno podle Gummady et al. 2012)

Byly však také prezentovány práce popisující možnosti rozkladu kofeinu v anaerobním prostředí (s výslednou methanogenezí), proces při kterém vzniká jako hlavní produkt metan, amoniak a oxid uhličitý. (Chen et al. 2018; Ulloa Rojas et al. 2018; Hakil et al. 1998)

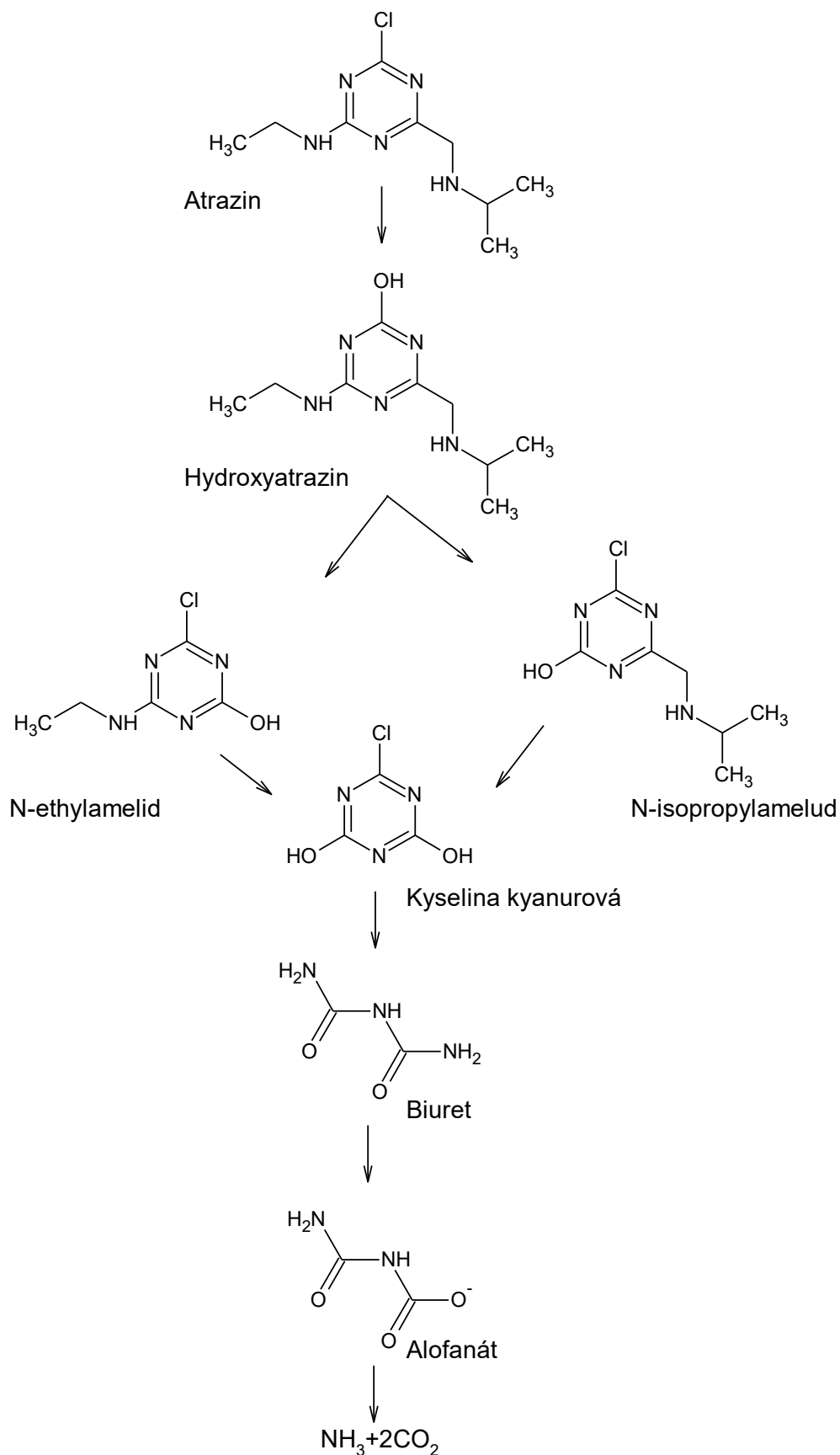
3.4 Bakteriální degradace atrazinu

Atrazin (jeho molekula viz Obrázek 11) je dlouhé léta využíván jako herbicidní přípravek (na území Evropské unie je od roku 2004 zakázán na základě nařízení evropské komise 2004/248/EC z 10. března 2004, ve Spojených státech je však dosud hojně využíván). V minulosti byl obtížně biologicky rozložitelný, avšak v tomto případě byl za posledních třicet let popsán postupný evoluční vývoj (adaptace mikroorganismů) na jeho přítomnost a schopnost jeho mineralizace v důsledku jeho opakované expozice. Mechanismus rozkladu atrazinu je znázorněn na níže uvedeném schématu, viz Obrázek 12. (Udiković-Kolić et al. 2012)



Obrázek 11: Molekula atrazinu

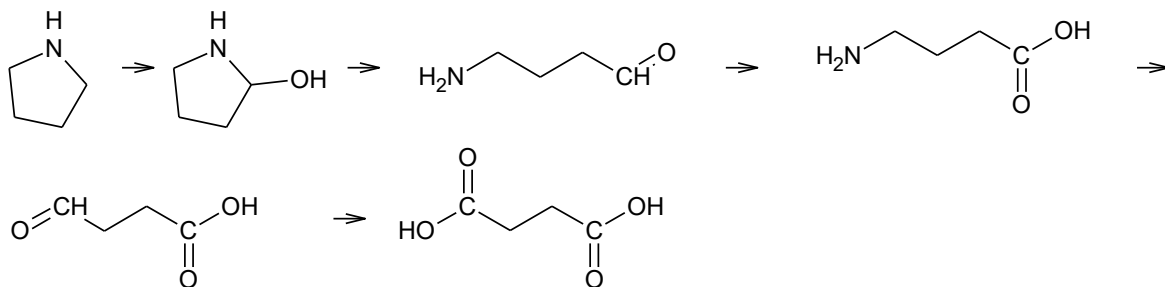
Mezi popsané bakteriální kmeny schopné rozkladu atrazinu v půdě, které byly izolovány při koncentraci atrazinu $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, patří například *Pseudomonas* sp. a *Achromobacter* sp. (Tonelli Fernandes et al. 2018)



Obrázek 12: Mechanismus rozkladu atrazinu (upraveno podle Tonelli Fernandes et al. 2018)

3.5 Bakteriální degradace pyrrolidinu a piperidinu

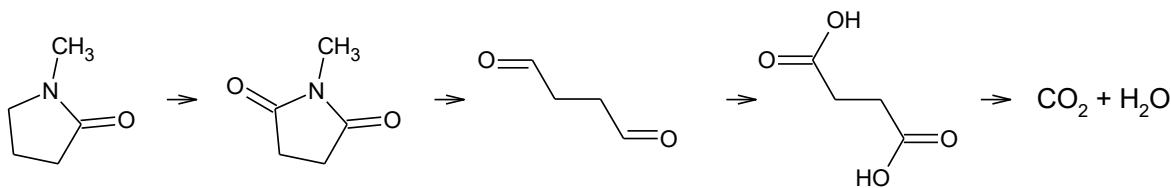
Bakteriální odbourávání pyrrolidinu a piperidinu bylo zdokumentováno například u bakterií druhu *Pseudomonas putida*. Získaný kmen může tyto sloučeniny používat jako jediný zdroj uhlíku, dusíku a energie. Mechanismus rozkladu popisuje obrázek 13. (Trigui et al. 2003)



Obrázek 13: Mechanismus rozkladu pyrrolidinového kruhu (upraveno podle Trigui et al. 2003)

3.6 Bakteriální degradace methylpyrrolidonu

Methylpyrrolidon je prakticky totožná struktura jako NOP, vyjma postranního oktylového řetězce. V jeho případě byl rozklad úspěšně prováděn bakteriemi izolovanými z vodního prostředí, v nichž byly jako klíčové popsány rody *Pseudomonas*, *Rhodococcus* a *Patulibacter* (Růžička et al. 2016), nebo bakterie rodu *Paracoccus* sp. NMD-4, které methylpyrrolidon rozkládaly až do koncentrací $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Cai et al. 2014). Mechanismus rozkladu popisuje rovnice na obrázku 14.



Obrázek 14: Mechanismus rozkladu methylpyrrolidonu (upraveno podle Cai et al. 2014)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 METODIKA

4.1 Použité chemikálie

- Destilovaná voda
- Roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4 ; $9,07 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Roztok dodekahydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$; $23,90 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Roztok stopových prvků
- Roztok heptahydrátu síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Roztok hexahydrátu síranu železnatého ($\text{FeSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $2,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Roztok dihydrátu chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Roztok chloridu amonného (NH_4Cl ; $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- N-oktyl-2-pyrrolidon (Sigma-Aldrich)
- 3% peroxid vodíku
- Safranin, krystalická violet, aceton
- Lugolův roztok
- Roztok MEM vitamínů (Biosera)

4.2 Použité přístroje

- Spalovací analyzátor uhlíku Shimadzu 5000A
- Spalovací analyzátor uhlíku Shimadzu TOC-L
- Spektrofotometr TECAN Sunrise
- Třepačka orbitální GLF
- Centrifuga ROTANTA
- Mikrovlnný autokláv MICROJET
- Váhy KERN
- Automatické dávkovače Eppendorf, BioHit
- Laminární box TELLSTAR
- Termostat biologický
- Mikroskop s imerzním objektivem Olympus CX 41

4.3 Použitá média a živné půdy

4.3.1 Roztok stopových prvků

Složení roztoku stopových prvků je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení roztoku stopových prvků na 1000 ml destilované vody

Název látky	Množství [g]
MnSO ₄ ·5 H ₂ O	0,043
H ₃ BO ₃	0,057
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,043
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O	0,037
Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	0,025
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,040

4.3.2 Minerální médium

Složení minerálního média (MM) na 100 ml roztoku je uvedeno v tabulce 4. MM bylo následně sterilizováno v mikrovlnném autoklávu při teplotě 135 °C po dobu 3 minut.

Tabulka 4: Složení R2A agaru

Název látky	Objem [ml]
Destilovaná voda	86,0
KH ₂ PO ₄ ; 9,07 g·l ⁻¹	2,0
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O; 23,90 g·l ⁻¹	8,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O; 10 g·l ⁻¹	1,0
FeSO ₄ ·6H ₂ O; 2,2 g·l ⁻¹	1,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O; 1 g·l ⁻¹	1,0
NH ₄ Cl; 30 g·l ⁻¹	1,0
Roztok stopových prvků	0,1

4.3.3 R2A agar

Je universální, živný agar vyvinutý Agenturou pro životní prostředí v USA, pro růst aerobních a fakultativně anaerobních heterotrofních bakterií, zejména vhodný pro bakterie vyskytující se ve vnějším prostředí. Agar má neutrální pH 7,2 a jeho složení je uvedeno v tabulce 5. (Thermo Fisher)

Tabulka 5: Složení R2A agaru

Název látky	Množství [g]
Kaseinový hydrolyzát	0,500
Dextróza	0,500
Škrob	0,500
Kvasničný extrakt	0,500
Dihydrogenfosforečnan sodný	0,300
Pyruvát sodný	0,300
Pepton z kaseinu	0,250
Pepton z masa	0,250
Síran hořečnatý	0,024
Agar	15,00
Destilovaná voda	1000,00

4.3.4 Minerální agar a MAN agar

Složení minerálního agaru (MA) agaru je uvedeno v tabulce 6.

Tabulka 6: Složení minerálního agaru

Název látky	Množství [g]
K_2HPO_4	0,1
NH_4Cl	0,11
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001
$CaCl_2$	0,001
Roztok stopových prvků	0,2 ml
Agar	1,7
Destilovaná voda	100

Složení MAN agaru: jde o MA agar, obohacený NOP do koncentrace $140 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.3.5 Fysiologický roztok

Fysiologický roztok obsahoval 8,5 g NaCl na 1000 ml destilované vody.

4.4 Analytické postupy

4.4.1 Stanovení rozpuštěného organického uhlíku

Obsahu rozpuštěného organického uhlíku DOC byl stanovován za pomoci spalovacího analyzátoru uhlíku Shimadzu 5000A a Shimadzu TOC-L. Principem stanovení DOC je nejprve stanovení celkového uhlíku ve vzorku (TC), veškerý uhlík je při teplotě $680 \text{ }^\circ\text{C}$ oxidován na oxid uhličitý a ten je následně stanoven za pomoci infračerveného spektrometru. Dále je stejným způsobem stanoven anorganický uhlík (IC), u kterého je nejprve z roztoku vzorku

odstraněn organický uhlík za pomoci proudu kyslíku a přítomnosti kyseliny fosforečné, organický uhlík je takto vytěsněn ve formě oxidu uhličitého. Rozpuštěný organický uhlík (DOC) je pak určen rozdílem hodnot TC a IC.

4.4.2 Stanovení intenzity zákalu

Intenzita zákalu byla stanovována jednak vizuálně a to při intenzivním osvětlení proti černému podkladu, dále byl použit spektrofotometr TECAN Sunrise ve kterém probíhalo stanovení triplicitně v mikrotitrační destičce, měřeno při vlnové délce 600 nm.

4.5 Postupy jednotlivých experimentů

4.5.1 Příprava suspense půdních bakterií

Pro získání směsného mikrobiálního konsorcia byla pro odběr vzorku vytipována přírodní lokalita co nejméně poznamenaná průmyslovou činností. Jako vhodná lokalita v tomto ohledu byla zvolena aluviální louka v údolí řeky Bystřice (GPS souřadnice: 49.6376706N, 17.4044978E). Z čerstvě vyhrnuté krtiny bylo do sterilní lahvičky odebráno asi 50 g vzorku půdy.

Z tohoto vzorku bylo dále v laboratoři naváženo 5 g půdy do sterilní skleněné lahve o objemu 250 ml, k tomuto vzorku bylo dále přidáno 100 ml sterilního MM a ponecháno na třepačce po dobu 15 minut, pro převedení bioty do kapalně suspenze.

Po usazení hrubého podílu suspenze, obsahujícího zbytky rostlin, písek a jíly, bylo k dalším pokusům odebráno 5 ml suspendované kapaliny z horní části roztoku obsahující mikrobiální biotu.

4.5.2 Pokus degradace 1-oktyl-2-pyrrolidonu půdními bakteriemi

Do čtyř 500ml lahví bylo přidáno 100 ml MM, které bylo následně sterilizováno v mikrovlnném autoklávu při teplotě 135 °C po dobu 3 minut.

Do všech pěti lahví bylo dále přidáno 10,9 µl NOP (odpovídajících 10 mg NOP). Dvě z takto připravených lahví byly naočkovány 2 ml výše připravené půdní suspenze a dvě lahve byly ponechány jako slepý kontrolní vzorek.

Lahve byly dokonale homogenizovány za účelem úplného rozpuštění NOP v roztoku a z takto připravených vzorků odebráno 6 ml roztoku jako počáteční bod pro stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC), za účelem sledování postupného mikrobiálního rozkladu.

Následně byly láhve se vzorky kultivovány při teplotě 25 °C na třepačce ve tmě. Následovaly odběry pro stanovení DOC po 6 ml roztoku v intervalech 5, 12 a 19 dní.

Postup odběru: Z láhve bylo sterilní špičkou odebráno asi 10 ml zhomogenizované suspenze, která byla následně centrifugována, při 10 000 g po dobu deseti minut při 10 °C, k DOC analýze odebráno 6 ml vzniklého supernatantu.

4.5.3 Utilizace vyšších koncentrací 1-oktyl-2-pyrrolidonu půdním mikrobiálním konsorciem

Pokus za účelem odstranění balastních mikroorganismů přítomných v celkovém konsorciu zvýšením koncentrace NOP v médiu.

Jako inokulum pro následující pokusy byly použity dvě finální mikrobiální suspenze, získané v předchozím pokusu o degradaci NOP půdními bakteriemi.

Příprava pokusu:

- 100 ml tekutého MM sterilizováno v mikrovlnném autoklávu při teplotě 135 °C po dobu 3 minut.
- Následně asepticky odebráno 10 ml sterilizovaného MM do sterilní zkumavky – označení roztoku MM.
- Do dalších 10 ml MM napipetováno 0,5 ml inokula z každé ze dvou lahví z předchozího pokusu degradace NOP – označení MMI
- Do zbývajících 80 ml MM přidáno 43,6 µl NOP – výsledná koncentrace NOP v roztoku byla tedy 500 mg·l⁻¹. Láhev s NOP důkladně protřepána pro dokonalé rozpuštění NOP. Označení tohoto roztoku MMNOP.
- Dále připraveno 14 sterilních zkumavek, do kterých bylo dávkováno příslušné množství jednotlivých roztoků v pořadí MM-MMNOP-MMI. Po každém přidavku dokonale homogenizováno. Dávkované objemy jsou uvedeny v tabulce 7. Následně byly zkumavky inkubovány ve tmě na třepačce při 25 °C, pro zajištění dostatečného množství kyslíku byly zkumavky inkubovány v horizontální poloze.

Tabulka 7: Příprava jednotlivých roztoků pro následnou degradaci

Číslo zkumavky	Objem MM [ml]	Objem MMNOP [ml]	Objem MMI [ml]	Výsledná koncentrace NOP [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
1+2	1,250	0,000	1,250	0
3+4	0,750	0,500		100
5+6	0,625	0,625		125
7+8	0,500	0,750		150
9+10	0,375	0,875		175
11+12	0,250	1,000		200
13+14	0,000	1,250		250

4.5.4 Pomnožení půdního mikrobiálního konsorcia degradujícího NOP

Cílem tohoto pokusu bylo pomnožení půdního mikrobiálního konsorcia degradujícího NOP pro následnou izolaci jednotlivých přítomných bakteriálních kmenů.

Ze zkumavek číslo 7 a 8 z předchozího pokusu (viz kapitola 4.5.3) se vstupní koncentrací NOP $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo odebráno 25 μl inokula ze zkumavky 7 (dále označení jako zkumavka A) a 25 μl inokula ze zkumavky 8 (dále označení jako zkumavka B), inokula byla naředěna do 2,5 ml sterilního MM s koncentrací NOP $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Inkubace probíhala ve tmě na třepače při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu jednoho týdne, pro zajištění dostatečného množství kyslíku byly zkumavky inkubovány v horizontální poloze.

4.5.5 Isolace bakterií z půdního mikrobiálního konsorcia, degradujícího 1-oktyl-2-pyrrolidon

Cílem tohoto pokusu byla izolace jednotlivých bakteriálních kmenů, přítomných ve směsném inokulu schopném degradace a růstu v médiu obsahujícím NOP jakožto jediný zdroj uhlíku. Pro pokus bylo použito konsorcium půdních bakterií získané po týdenní inkubaci v předchozím pokusu (viz kapitola 4.5.4).

Postup izolace jednotlivých bakterií:

a) Kultivace směsné kultury

Zkumavky A a B z předchozího pokusu (viz kapitola 4.5.4) s pomnoženými mikroorganismy byly rozředěny desetinným ředěním $10\ 000 \times$ což odpovídá řádu 10^{-4} . Ředění bylo provedeno asepticky do sterilního fyziologického roztoku. Bylo odebráno 0,5 ml směsného inokula do 4,5 ml fyziologického roztoku a homogenizováno, z tohoto rozředěného inokula bylo dále odebráno dalšího 0,5 ml do 4,5 ml fyziologického roztoku a homogenizováno, tento postup byl poté $2 \times$ opakován až na konečných 10^{-4} . Postup ředění shrnuje tabulka 8.

Tabulka 8: Příprava inokula desetinným ředěním pipetováno do 4,5 ml fyziologického roztoku

Označení zkumavky	Pipetované množství inokula [ml]	Pipetované ze zkumavky	Výsledné naředění
1A	0,5	A	10^{-1}
2A		1A	10^{-2}
3A		2A	10^{-3}
4A		3A	10^{-4}
1B		B	10^{-1}
2B		1B	10^{-2}
3B		2B	10^{-3}
4B		3B	10^{-4}

Následně bylo asepticky očkováno 0,5 ml naředěného inokula ze zkumavek 2A, 2B, 4A a 4B do Petriho misek s R2A a MAN agarem. MAN agar s výslednou koncentrací NOP $140 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Inokulum bylo na miskách důkladně rozetřeno po celé ploše agaru a odsušeno v laminárním boxu. Výsledné zředění na miskách bylo tedy 10^{-3} , respektive 10^{-5} . Všechny naočkované misky byly inkubovány ve tmě v termostatu při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

b) Izolace jednotlivých bakteriálních kultur

Po 14 denní kultivaci byly dále izolovány nejhojněji se vyskytující bakteriální kmeny dle následujícího postupu:

Každá z nejhojněji zastoupených bakteriálních kultur byla asepticky odebrána za pomoci sterilní kličky, přeočkována na novou misku s R2A agarem s koncentrací NOP $140 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a opětovně inkubována za stejných podmínek jako v bodě a). Celkem bylo takto získáno 7 bakteriálních kultur, které byly pro další pokusy pracovníě označeny jako JU 1 – JU 7.

c) Ověření degradačních schopností směsi získaných bakteriálních kultur

Každá ze získaných kultur (JU 1 – JU 7) byla samostatně převedena do 1 ml fyziologického roztoku tak, že výsledný zákal suspenze odpovídal cca 1. stupni dle McFarlandovy stupnice. Do nové sterilní zkumavky bylo připraveno směsné inokulum vzniklé smícháním 0,1 ml z každé izolované kultury, které bylo následně naočkováno do pěti zkumavek obsahujících MM a tři z nich s koncentrací NOP $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Dvě neočkované zkumavky byly ponechány jako kontrolní vzorek. Postup přípravy viz Tabulka 9.

Tabulka 9: Příprava pokusu pro ověření degradačních schopností směšného inokula

Číslo zkumavky	Pipetované množství MM [ml]	Pipetované množství MMNOP [ml]	Koncentrace NOP [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	Pipetované množství směšného inokula [μl]
1	1,75	0,75	150	25
2				
3				
4				0
5				

Inkubace takto připravených vzorků probíhala ve tmě na třepačce při 25 °C po dobu dvou týdnů.

4.5.6 Dlouhodobá konzervace izolovaných kultur

Každá bakteriální kultura (JU 1 – JU 7) byla naočkována na R2A agar a po kultivaci při 25 °C byla biomasa každé kultury odebrána z petriho misek sterilní kličkou do sterilní mikrozskumavky v množství 5–10 kliček biomasy a smíchána se dvěma kapkami sterilního glycerolu. Po promíchání byly mikrozskumavky uloženy do hlubokomrazícího boxu při teplotě –80 °C.

4.5.7 Ověření degradace 1-oktyl-2-pyrrolidonu jednotlivými kulturami a společným inokulem

Cílem tohoto pokusu bylo ověření degradačních vlastností směšného inokula po třech měsících zakonzervování a zároveň pokus o degradaci NOP jednotlivými izolovanými kmeny. Vzhledem k tomu, že se v následujících pokusech jednalo o práci s izolovanými kmeny, byla zvolena nižší koncentrace NOP na 120 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Každá ze zakonzervovaných bakteriálních kultur JU 1 – JU 7 byla po rozmražení nejprve kultivována na R2A agaru (3–5 dní při teplotě 25 °C), poté odebrána za pomoci sterilní kličky a převedena do 1 ml fyziologického roztoku, tak že výsledný zákal odpovídal cca 1 stupni dle McFarlanda.

Poté bylo do 200 ml MM asepticky přidáno 200 μl MEM vitamínů a 26,2 μl NOP, takže byla výsledná koncentrace NOP 120 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Následně bylo připraveno 18 sterilních zkumavek, do kterých byly přidány 3 ml výše připraveného MM a 5 μl suspenze bakteriálních kultur. Současně byla připravena směsná kultura smícháním 0,1 ml inokula z každé kultury JU 1 – JU 7 po homogenizace, byla stejným způsobem očkovaná do zkumavek 15 a 16. Dále přípravu shrnuje Tabulka 10.

Tabulka 10: Příprava jednotlivých roztoků pro následnou degradaci NOP

Číslo zkumavky	Kultura JU1 [μl]	Kultura JU2 [μl]	Kultura JU3 [μl]	Kultura JU4 [μl]	Kultura JU5 [μl]	Kultura JU6 [μl]	Kultura JU7 [μl]	Směsná kultura [μl]
1+2	5	0	0	0	0	0	0	0
3+4	0	5	0	0	0	0	0	0
5+6	0	0	5	0	0	0	0	0
7+8	0	0	0	5	0	0	0	0
9+10	0	0	0	0	5	0	0	0
11+12	0	0	0	0	0	5	0	0
13+14	0	0	0	0	0	0	5	0
15+16	0	0	0	0	0	0	0	5
17+18	0	0	0	0	0	0	0	0

Inkubace probíhala při teplotě 25 °C na třepačce ve tmě po dobu dvou týdnů.

4.5.8 Degradace NOP kulturou JU 4 a konsorcii JU 4 + JU X

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, která kombinace ze získaných bakteriálních kultur (ve dvojici s klíčovou kulturou JU 4) je vhodná pro degradaci NOP.

Každá z bakteriálních kultur JU 1 – JU 7 byla odebrána za pomoci sterilní kličky a převedena do 1 ml fyziologického roztoku tak, že výsledný zákal odpovídal cca 1 stupni dle McFarlanda.

Poté bylo do 200 ml MM asepticky přidáno 200 μl MEM vitamínů a 26,2 μl NOP, takže byla výsledná koncentrace NOP 120 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Následně bylo připraveno 23 sterilních zkumavek, do kterých byly přidány 4 ml výše připraveného roztoku MM, MEM vitamínů a NOP a očkováno kombinací suspenzí jednotlivých bakteriálních kultur JU 1 – JU 7. Dvě neočkované zkumavky ponechány jako kontrolní vzorky. Dále přípravu shrnuje Tabulka 11.

Tabulka 11: Příprava jednotlivých směsných roztoků pro degradaci NOP

Číslo zkumavky	Kultura JU1 [μl]	Kultura JU2 [μl]	Kultura JU3 [μl]	Kultura JU4 [μl]	Kultura JU5 [μl]	Kultura JU6 [μl]	Kultura JU7 [μl]
1+2+3	5	0	0	5	0	0	0
4+5+6	0	5	0	5	0	0	0
7+8+9	0	0	5	5	0	0	0
10+11+12	0	0	0	5	5	0	0
13+14+15	0	0	0	5	0	5	0
16+17+18	0	0	0	5	0	0	5
19+20+21	0	0	0	5	0	0	0
22+23	0	0	0	0	0	0	0

Inkubace probíhala při teplotě 25 °C na třepačce ve tmě po dobu dvou týdnů.

4.5.9 Cytochrom oxidázový test

Za pomoci kličky bylo odebráno menší množství bakteriální biomasy, která byla nanášena na diagnostický proužek typu Mikro-La-Test OXItest (Erba Lachema). Vyhodnocení proběhlo po jedné minutě. V přítomnosti oxidázy vzniká modré zbarvení indofenolenové modři.

4.5.10 Katalázový test

Za pomoci kličky bylo odebráno menší množství bakteriální biomasy spolu s fyziologickým roztokem, které bylo následně rozetřeno na podložním sklíčku. Poté bylo přidáno několik kapek 3% peroxidu vodíku a rozmícháno. Důkazem přítomnosti katalázy byla tvorba bublinek kyslíku.

4.5.11 Gramovo barvení

Gramovo barvení slouží k odlišení gram-pozitivních a gram-negativních bakteriálních kultur. Postup obarvení bakterií je založen na rozdílném složení bakteriálních stěn u těchto dvou typů bakterií.

Postup pokusu:

- Za pomoci kličky bylo odebráno menší množství bakteriální biomasy spolu s fyziologickým roztokem následně rozetřeno na podložním sklíčku.
- Sklíčko bylo odsušeno a biomasa zafixována nad kahanem.
- Zafixovaná biomasa byla následně zakápnuta krystalovou violetí po dobu 1 minuty.
- Dále byla krystalová violet' smyta a překryta lugolovým roztokem s dobou působení 1 minuta.

- Následně byl preparát opláchnut destilovanou vodou a odbarven acetonem po dobu cca 20 s.
- Následovalo obarvení safraninem po dobu 1 minuty a opět oplach destilovanou vodou pro odstranění přebytečného roztoku.
- Nakonec byl preparáty vysušen a mikroskopován imerzním objektivem se zvětšením $100\times$ (Olympus CX 41).

4.5.12 Kultivace získaných bakteriálních kultur při různých teplotách

Za účelem zjištění teplotního optima pro růst degradačních bakteriálních kultur JU 3, JU 4 a JU 6 byl sledován jejich růst za různých teplotních podmínek, které jsou uvedeny v tabulce 12. Každá z bakteriálních kultur byla očkovaná sterilní kličkou na R2A agar. Kultivace probíhala po dobu jednoho týdne.

Tabulka 12: Teplotní podmínky kultivace

Číslo misky	Teplota kultivace [° C]
1	5
2	20
3	25
4	30
5	37
6	42

5 VÝSLEDKY POKUSŮ A JEJICH DISKUSE

5.1 Pokus o rozklad 1-oktyl-2-pyrrolidonu získanou mikrobiální směsí

Nejprve byla provedena degradace NOP v minerálním médiu, a to směsným mikrobiálním konsorciem získaným ze vzorku půdy, počáteční koncentrace NOP v roztoku byla $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Kultivované láhve byly průběžně vizuálně kontrolovány a v časových intervalech 5, 12 a 19 dní byly odebrány vzorky pro stanovení obsahu DOC.

V prvních dnech kultivace nebyl v láhvích pozorován žádný výraznější zákal (neprobíhal rozklad). Vyšší intenzita zákalu způsobeného růstem mikrobiální biomasy byla pozorována přibližně sedmý den kultivace a tento zákal (mikrobiální růst) postupně v průběhu času narůstal. Konečný devatenáctý den kultivace byly v kultivačních láhvích také pozorovány shluky mikrobiální biomasy (takzvané vyvločkování). Vizuální pozorování shrnuje tabulka 13.

Výsledky naměřeného DOC v jednotlivých odběrových intervalech shrnuje tabulka 14. Ze získaných dat byla následně sestavena kinetická křivka rozkladu, která je znázorněná na obrázku 15. Je z ní patrné, že v prvních dnech kultivace nedochází k úbytku DOC, z čehož vyplývá relativně dlouhá lagová (startovací) fáze, kdy se přítomné bakterie adaptují na dané prostředí. Výrazný mikrobiální růst je pak pozorován mezi pátým až dvanáctým dnem kultivace a k téměř úplnému rozkladu dochází cca konečný devatenáctý den degradace. V obou očkovaných láhvích probíhal rozklad přibližně srovnatelně. V kontrolních neočkovaných láhvích nebyl po celou dobu pokusu pozorován žádný vzniklý zákal a konečná hodnota DOC odpovídala výchozímu stavu, nedošlo tedy k žádnému úbytku NOP z roztoku.

Bylo tedy potvrzeno, že v získaném půdním mikrobiálním konsorciu se nacházejí mikroorganismy schopné využívat a tím i rozkládat NOP.

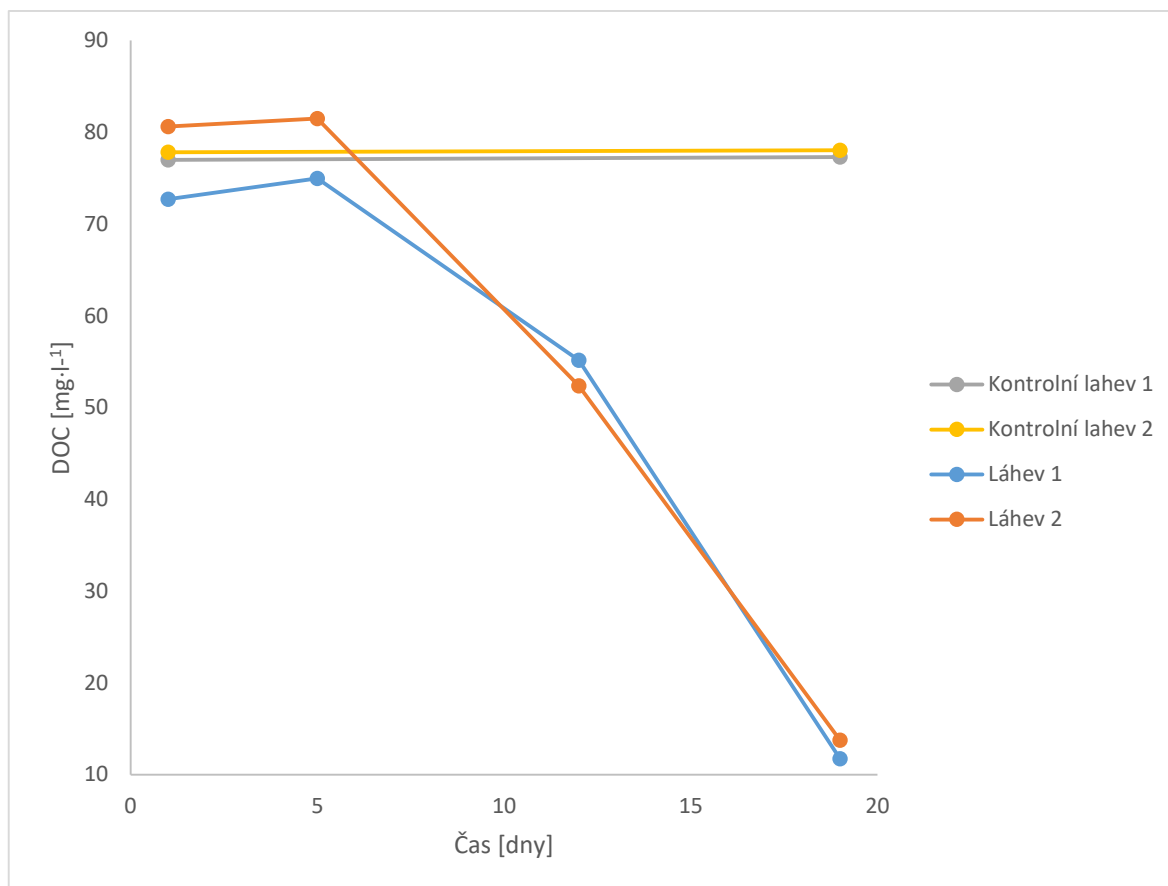
Tabulka 13: Vyhodnocení intenzity zákalu v jednotlivých bodech experimentu

Čas	Název roztoku	Intenzita zákalu
t_0	Očkovaná láhev 1 a 2	0
1. den	Očkovaná láhev 1 a 2	0
2. den	Očkovaná láhev 1 a 2	0
3. den	Očkovaná láhev 1 a 2	0
5. den	Očkovaná láhev 1 a 2	0
7. den	Očkovaná láhev 1 a 2	1
10. den	Očkovaná láhev 1 a 2	3
12. den	Očkovaná láhev 1 a 2	5
15. den	Očkovaná láhev 1 a 2	5
19. den	Očkovaná láhev 1 a 2	4

Hodnocení: 1 – nejmenší zákal, 5 – nejvyšší zákal

Tabulka 14: Výsledky stanovení DOC v kultivačních nádobách v jednotlivých odběrových bodech experimentu

Čas	Název roztoku	Celkový C [mg·l ⁻¹]	Anorg. C [mg·l ⁻¹]	DOC [mg·l ⁻¹]
---	Blank (H ₂ O)	1,3	0,1	1,2
t_0	Neočkovaná kontrolní láhev 1	77,0	2,4	74,6
	Neočkovaná kontrolní láhev 2	77,8	2,9	75,0
	Očkovaná láhev 1	75,1	2,4	72,7
	Očkovaná láhev 2	83,0	2,4	80,6
5. den	Očkovaná láhev 1	78,0	3,0	75,0
	Očkovaná láhev 2	84,1	2,6	81,5
12. den	Očkovaná láhev 1	61,1	6,0	55,2
	Očkovaná láhev 2	59,0	6,7	52,4
19. den	Očkovaná láhev 1	25,9	14,1	11,7
	Očkovaná láhev 2	29,6	15,9	13,8
	Neočkovaná kontrolní láhev 1	77,3	2,7	74,6
	Neočkovaná kontrolní láhev 2	78,0	3,2	74,8



Obrázek 15: Kinetika rozkladu NOP směsnou půdní mikrobiální kulturou

5.2 Utilizace vyšších koncentrací 1-oktyl-2-pyrrolidonu půdním mikrobiálním konsorciem a získání izolovaných bakteriálních kultur

Po provedení degradace NOP bylo v získaném mikrobiálním konsorciu provedeno testování účelem zjištění optimální a také nejvyšší možné koncentrace NOP, v němž je získané mikrobiální konsorcium schopné růstu a tak i rozkladu NOP. A dále také s cílem odstranit ze směsného konsorcia balastní mikroorganismy a získat tak klíčové bakteriální kmeny schopné růstu v prostředí NOP. Pro pokus byla připravena řada roztoků uvedených v kapitole 4.5.3. Nejvyšší testovaná koncentrace NOP v pokusu byla $250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Po naočkování mikrobiální směsí z předcházejícího pokusu a po desetidenní kultivaci byl vyhodnocen růst mikroorganismů při jednotlivých koncentracích na základě intenzity zákalu příslušných vzorků. Výsledky pokusu shrnuje Tabulka 15. Z výsledků experimentu je patrné, že optimální koncentrace NOP pro růst získaného směsného mikrobiálního konsorcia se pohybuje okolo $125\text{--}150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Při koncentracích NOP nad $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ pak již nebyl pozorován téměř žádný mikrobiální růst.

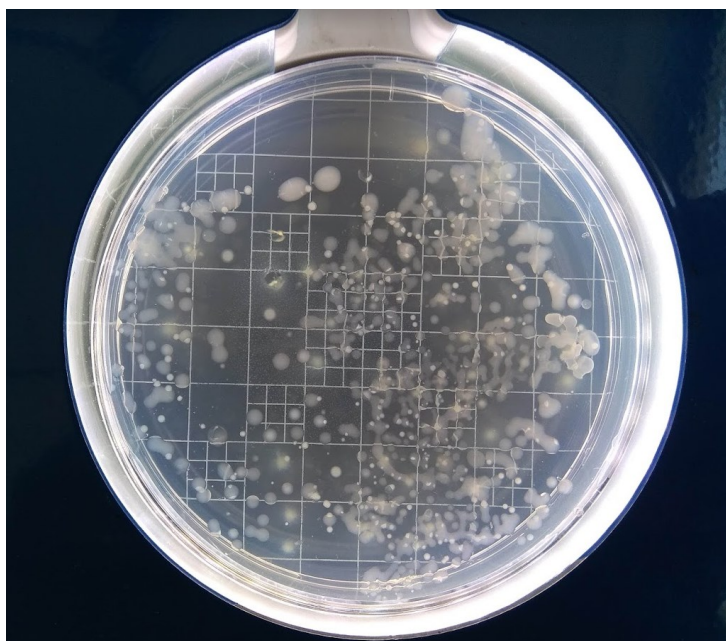
Tabulka 15: Vyhodnocení růstu směsného mikrobiálního konsorcia při jednotlivých koncentracích NOP v roztoku

Číslo zkumavky	Koncentrace NOP [mg·l ⁻¹]	Intenzita zákalu
1+2	0	1
3+4	100	2
5+6	125	4
7+8	150	5
9+10	175	3
11+12	200	2
13+14	250	1

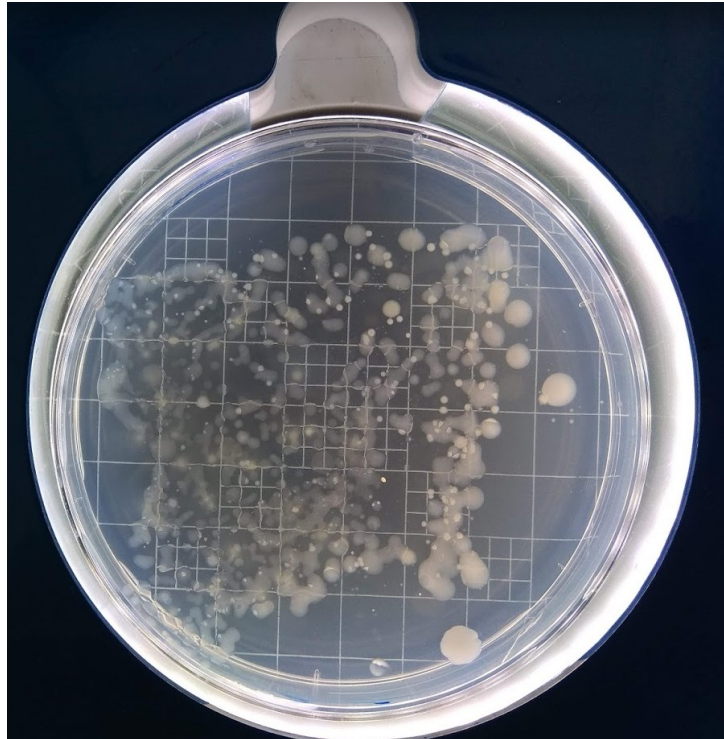
Hodnocení: 1 – nejmenší zákal, 5 – nejvyšší zákal

Následně byla ze zkumavek 7 a 8, ve kterých byl pozorován nejintenzivnější mikrobiální růst, připravena čerstvá směsná kultura (opětovné očkování do roztoku s NOP) pro následnou izolaci jednotlivých bakteriálních kmenů.

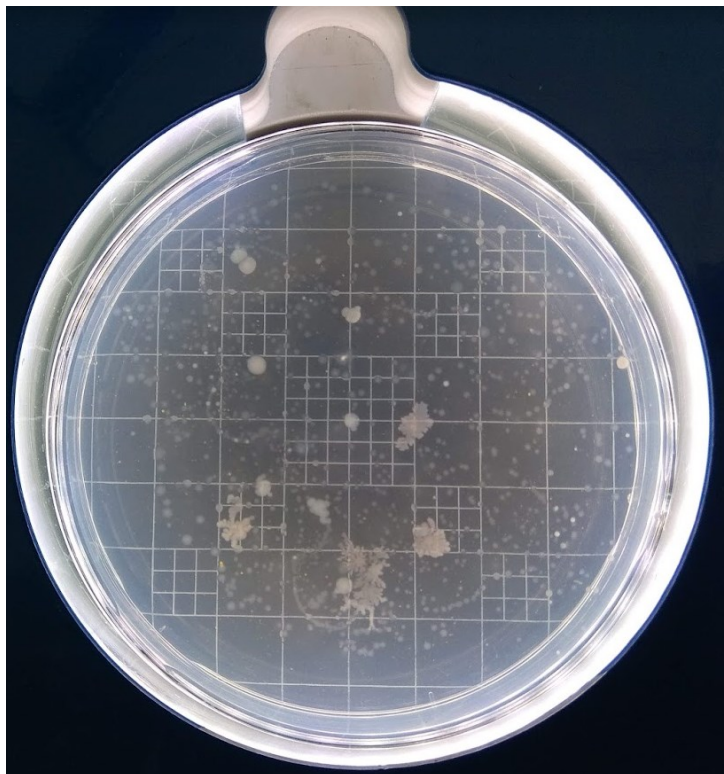
Po sedmidenní kultivaci v čerstvém MMNOP s koncentrací NOP 150 mg·l⁻¹ byla získána vitální pomnožená mikrobiální směs, pro následnou izolaci čistých bakteriálních kultur. Mikrobiální směs byla kultivována při 25 °C na R2A a MAN agaru, ve zředění 10⁻² a 10⁻⁴, příprava viz kapitola 4.5.4. Po sedmidenní kultivaci bylo z inkubovaných petriho misek, viz obrázky 16–18, dále přeočkováno sedm nejhojněji se vyskytujících bakteriálních kultur. Ty se vzájemně lišily charakterem kolonií a izolované bakteriální kmeny byly dále pracovně označeny jako JU 1 – JU 7.



Obrázek 16: Směsná bakteriální kultura po 7 denní kultivaci



Obrázek 17: Směsná bakteriální kultura po 7 denní kultivaci



Obrázek 18: Směsná bakteriální kultura po 7 denní kultivaci

5.3 Ověření degradačních schopností izolovaných bakteriálních kultur

Za účelem potvrzení, že mezi získanými bakteriálními kulturami JU 1 – JU 7 se nachází bakterie s hledanými degradačními schopnostmi, bylo z těchto sedmi izolovaných bakteriálních kultur dále připraveno směsné inokulum, příprava viz kapitola 4.5.5. Tímto směsným inokulem bylo naočkováno směsné MM s NOP a kultivováno po dobu sedmi dnů. Výrazným zákalem ve všech očkovaných zkumavkách 1, 2 a 3 byl potvrzen bakteriální růst a tím i degradační schopnost získaného směsného inokula, tvořeného izolovanými bakteriálními kulturami JU 1 – JU 7. Kontrolní neočkované vzorky MM s NOP nevykazovaly žádný zákal. Po ukončení tohoto pokusu byly jednotlivé izolované kmeny JU 1 – JU 7 pro následující pokusy zakonzervovány v roztoku glycerolu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu cca tří měsíců.

5.4 Ověření degradace 1-oktyl-2-pyrrolidonu jednotlivými kulturami a společným inokulem

V tomto pokusu byly ověřovány degradační schopnosti jednotlivých izolovaných kultur JU 1 – JU 7 za účelem nalezení klíčové bakteriální kultury potřebné pro degradaci NOP. Pro tyto účely práce se samostatnými kulturami byla zvolena nižší koncentrace NOP a to $120\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Kultury byly do MM s NOP naočkovány jednak samostatně, jednak pro porovnání průběhu degradace mezi jednotlivými suspensemi, i všech sedm jako směsné inokulum. Po dvoutýdenní kultivaci byla hodnocena intenzita zákalu v jednotlivých suspensích za pomocí spektrometru. Výsledky měření shrnuje tabulka 16. Z výsledků pokusu je patrné, že k nejefektivnějšímu rozkladu došlo v přítomnosti směsného konsorcia bakterií. Dále pak byl nejintenzivnější růst pozorován u kultury pod označením JU 4. V ostatních kultivačních zkumavkách byl růst v porovnání s neočkovaným roztokem velice nepatrný nebo žádný. Na základě tohoto experimentu je pravděpodobné, že klíčovou kulturou pro bakteriální rozklad NOP je v tomto případě kultura JU 4, kooperující s některou z ostatních kultur JU 1 – JU 7. V následujícím pokusu tak byly zkoumány jednotlivé dvoukombinace s touto kulturou JU 4 (postup viz kapitola 5.5)

Tabulka 16: Intenzita zákalu v jednotlivých suspensích, měřeno při vlnové délce 600 nm

Označení kultury / číslo zkumavky	Absorbance [-]				
	Číslo měření			Průměr	Průměr celkem
	1	2	3		
JU1/1	0,047	0,045	0,051	0,048	0,046
JU1/2	0,050	0,042	0,039	0,044	
JU2/1	0,043	0,046	0,053	0,047	0,046
JU2/2	0,046	0,042	0,043	0,044	
JU3/1	0,041	0,044	0,072	0,052	0,047
JU3/2	0,044	0,040	0,041	0,042	
JU4/1	0,070	0,071	0,073	0,071	0,071
JU4/2	0,073	0,069	0,070	0,071	
JU5/1	0,042	0,042	0,046	0,043	0,046
JU5/2	0,046	0,046	0,049	0,047	
JU6/1	0,047	0,042	0,045	0,045	0,046
JU6/2	0,048	0,045	0,049	0,047	
JU7/1	0,041	0,038	0,039	0,039	0,040
JU7/2	0,042	0,039	0,039	0,040	
Směs JU1–JU7/1	0,129	0,130	0,129	0,129	0,131
Směs JU1–JU7/2	0,133	0,129	0,134	0,132	
Blank/1	0,040	0,039	0,039	0,039	0,040
Blank/2	0,040	0,040	0,042	0,041	

5.5 Degradace 1-oktyl-2-pyrrolidonu kulturou JU 4 a konsorcií JU 4 + JU X

Na základě předchozího pokusu byl testován rozklad NOP všemi kombinacemi kultury JU 4 s ostatními získanými kulturami (vždy triplicitně). Výsledky po dvoutýdenní kultivaci v MM s NOP v koncentraci $120 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ shrnuje Tabulka 17 a 18. Po dvoutýdenním rozkladu byla vizuálně hodnocena intenzita zákalu a výsledný obsah DOC. Trojice jednotlivých směsí měly na konci pokusu srovnatelný zákal, nejintenzivnější zakalení bylo pozorováno u kombinací JU 4 + JU 3 a JU 4 + JU 6. Jelikož byla intenzita zákalu pro jednotlivé trojice zkumavek srovnatelná, byla pro DOC analýzu vybrána pouze jedna série suspensí. Na základě naměřeného DOC byla potvrzena nejvyšší míra rozkladu pro kombinace JU 4 + JU 3 a JU 4 + JU 6; výsledky jsou uvedeny v tabulce 18. Srovnávací neočkovaný vzorek zůstal po kultivaci zcela bez zákalu.

V tomto experimentu byla potvrzena domněnka, že k úplnému rozkladu NOP dochází působením nejméně dvou na sobě závislých bakteriálních kmenů. Zde se jedná o kombinace kultur JU 4 + JU 3 a JU 4 + JU 6.

Tabulka 17: Subjektivní vyhodnocení intenzity zákalu po dvoutýdenním rozkladu

Intenzita zákalu																				
JU1+ JU4			JU2+ JU4			JU3+ JU4			JU4			JU5+ JU4			JU6+ JU4			JU9+ JU4 I		
3	3	3	2	2	2	4	4	4	3	3	3	3	3	3	4	4	4	2	2	2

Hodnocení: 1 – nejmenší zákal, 4 – nejvyšší zákal

Tabulka 18: Vyhodnocení DOC po dvoutýdenním rozkladu

Směs	Celkový C [mg·l ⁻¹]	Anorg. C [mg·l ⁻¹]	DOC [mg·l ⁻¹]
Blank	48,45	0,07	48,38
JU 4	74,75	3,24	71,50
JU 4 + JU 1	59,84	9,54	50,30
JU 4 + JU 2	80,94	4,48	76,45
JU 4 + JU 3	47,52	8,90	38,62
JU 4 + JU 5	78,74	3,51	75,22
JU 4 + JU 6	43,99	8,54	35,45
JU 4 + JU 9	81,85	4,07	77,78

5.6 Základní identifikace bakterií klíčových pro rozklad 1-oktyl-2-pyrrolidonu

U získaných bakterií klíčových pro rozklad NOP (JU 4, JU 3 a JU 6) byly provedeny základní identifikační testy pro jejich skupinové zařazení. Výsledky identifikačních testů shrnuje tabulka 19 a 20. V rámci identifikace bylo provedeno gramovo barvení, katalázový test, test na přítomnost enzymu oxidázy a stanovení teplotního optima jejich růstu.

Klíčová kultura JU 4 byla identifikována jako gram-negativní tyčinka. Z hlediska morfologie velice drobná, s koloniemi mléčně zbarvenými a tvořící spíše menší množství biomasy. Cytochrom oxidáza byla u této kultury prokázána. Naopak kultury JU 3 a JU 6 jsou identifikovány jako gram-pozitivní koky, cytochrom oxidáza negativní, oproti kultuře JU 4 tvořily při kultivaci větší množství biomasy. Přítomnost katalázy prostřednictvím katalázového testu byla prokázána u všech tří kultur.

Dále byl pro trojici vybraných kultur proveden test jejich růstu při různých teplotách pro zjištění jejich teplotního optima. Z výsledků růstu je zřejmé, že se ve všech případech jedná o psychrofilní bakterie. Růst probíhal při teplotách od 5–30 °C, při vyšších teplotách již nebyl pozorován růst žádný. Výsledky shrnují tabulky 19 a 20.

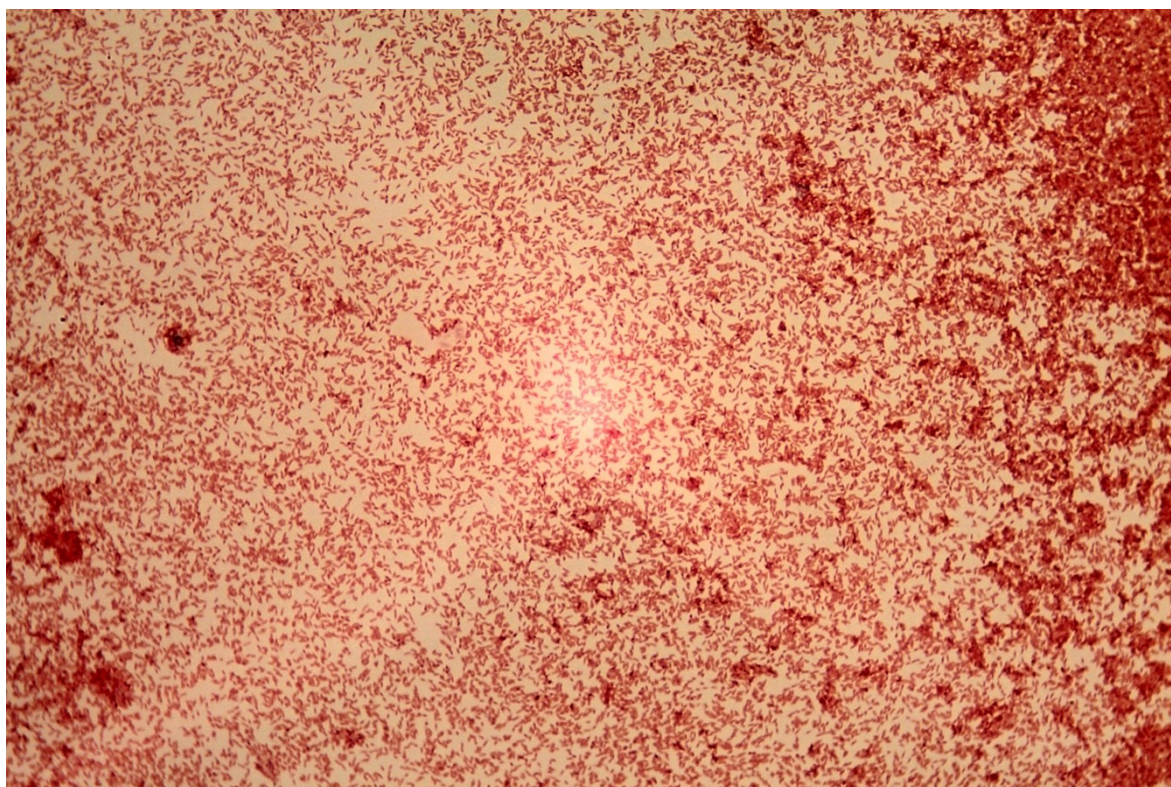
Fotografie bakterií po gramově barvení, pod imerzním objektivem se zvětšením 100 ×, jsou znázorněny na obrázcích 19–21. Fotografie bakterií JU 4, JU 3 a JU 6 po desetidenní kultivaci při 25 °C je uvedena na obrázku 22.

Tabulka 19: Výsledky jednotlivých testů

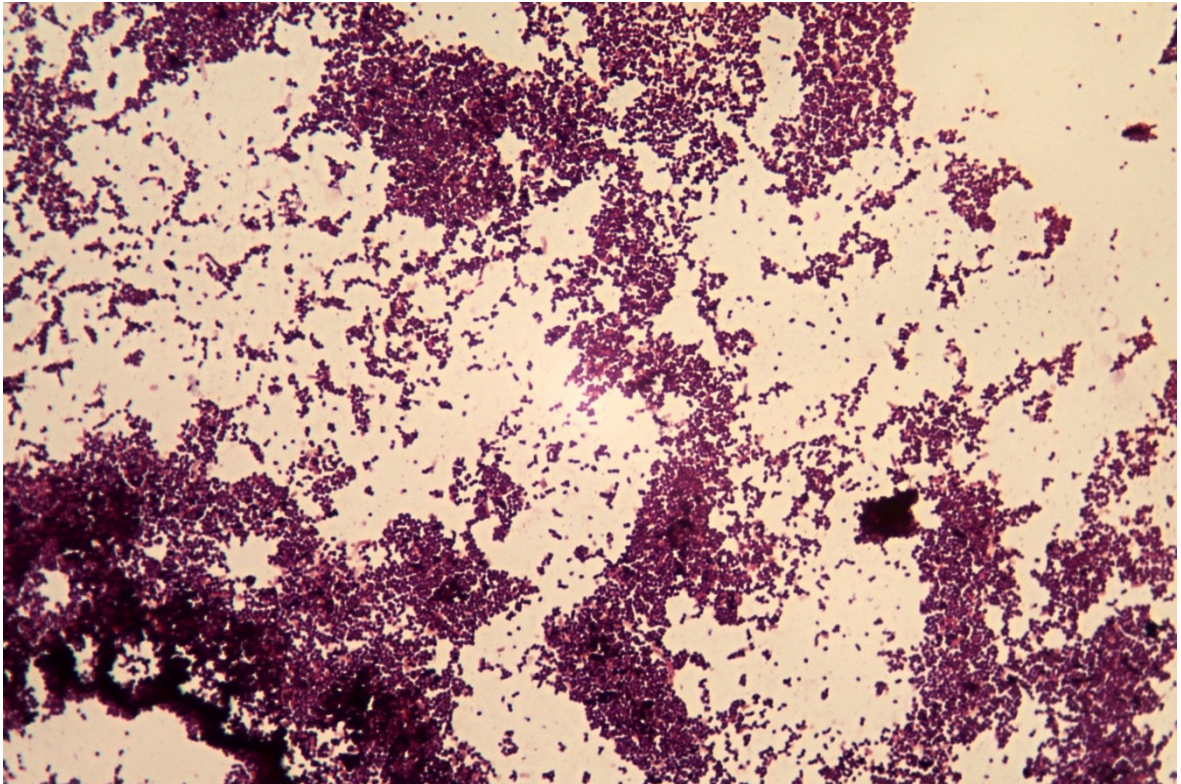
Miska číslo	Gramovo barvení	Přítomnost cytochrom oxidázy	Katalázový test
JU 3	G+	Negativní	Pozitivní
JU 4	G–	Pozitivní	Pozitivní
JU 6	G+	Negativní	Pozitivní

Tabulka 20: Kultivační podmínky a intenzita růstu

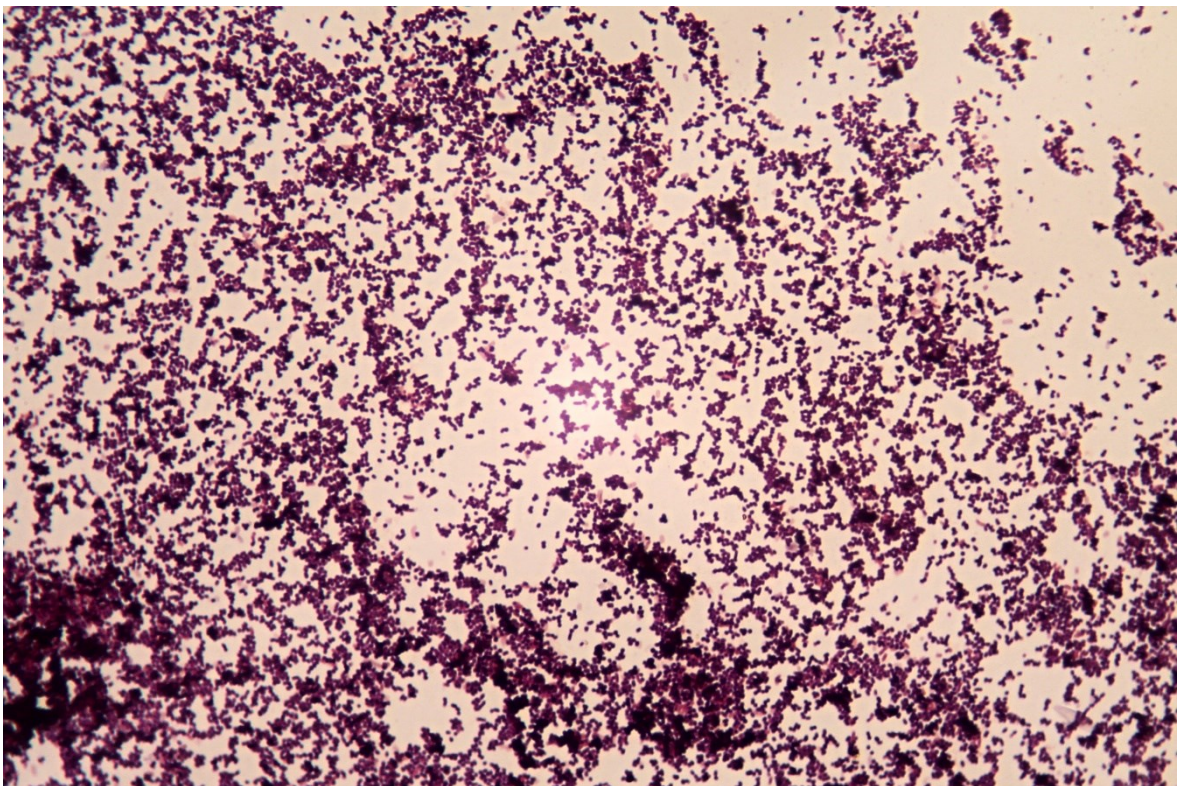
Miska číslo	Teplota [° C]	Název kultury a intenzita růstu [1–5]		
		JU 3	JU 4	JU 6
1	5	5	3	5
2	20	5	4	5
3	25	5	4	5
4	30	4	3	4
5	37	0	0	0
6	42	0	0	0



Obrázek 19: Fotografie bakteriální kultury JU 4 po gramově barvení



Obrázek 20: Fotografie bakteriální kultury JU 3 po gramově barvení



Obrázek 21: Fotografie bakteriální kultury JU 6 po gramově barvení



Obrázek 22: Fotografie bakteriálních kultur JU 4, JU 3 a JU 6 kultivované při 25 °C na R2A agaru

Vzhledem k tomu, že kultury JU 3 a JU 6 byly morfologicky, svými vlastnostmi, i intenzitou rozkladu NOP ve spojení s kulturou JU 4 velice podobné, a jsou velmi pravděpodobně i identické, byla pro další pokus vybrána pouze dvojice bakteriálních kultur JU 3 + JU 4, pro kterou byla následně sestavena kinetická degradační křivka.

5.7 Kinetika rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu konsorciem bakterií JU 4 a JU 3

V tomto pokusu byla sledována kinetika biologického rozkladu NOP směsnou kulturou JU 4 a JU 3. Kultura JU 4 je pro rozklad klíčová a degradaci iniciuje. V kombinaci s kulturou JU 3 však rozklad probíhá intenzivněji.

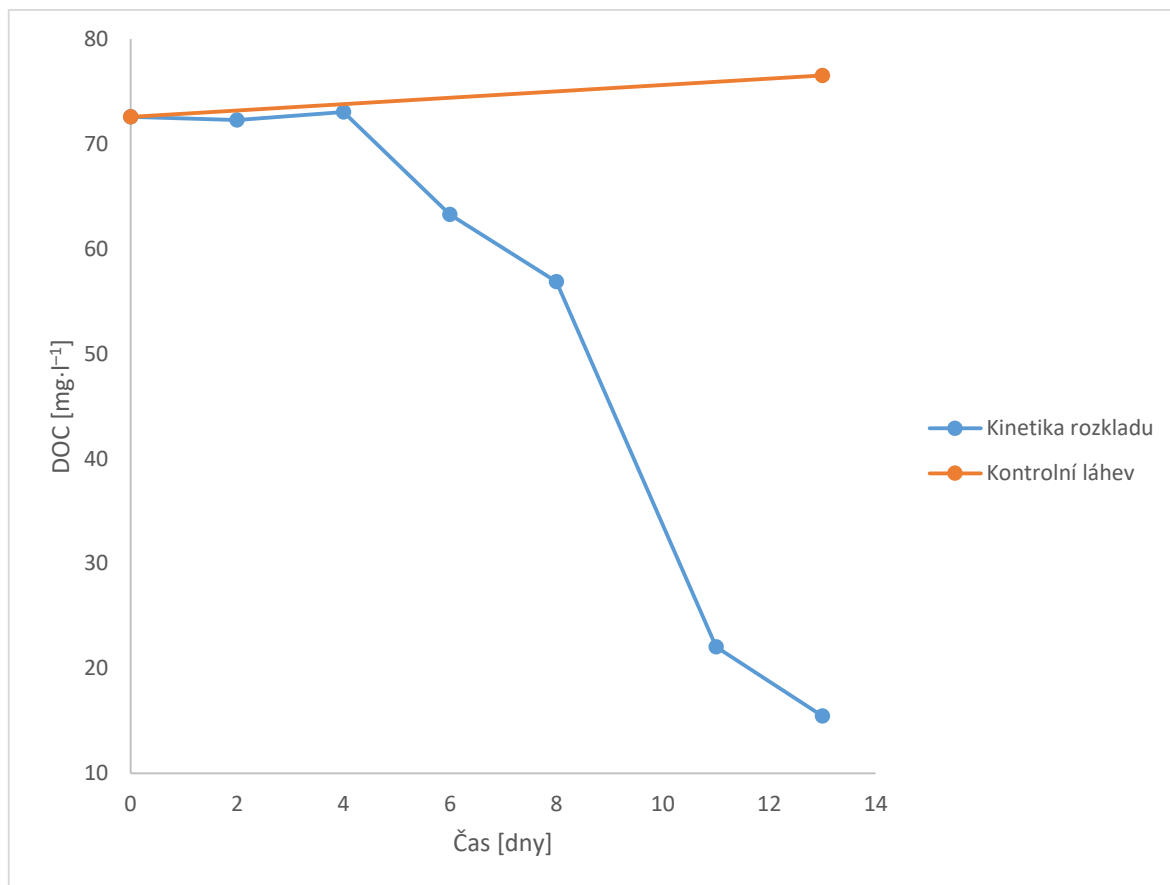
Rozklad pro kombinaci kultur JU 4 a JU 3 byl proveden v koncentraci NOP 120 mg·l⁻¹. Odběrové body byly zvoleny v časových intervalech 0, 2, 4, 6, 8, 11 a 13 dní. V každém odběrovém bodě byl odebrán vzorek ze dvou lahví. Odebraný vzorek byl zfiltrován a zamražen pro následnou analýzu na obsah DOC.

Výsledky naměřeného DOC v jednotlivých odběrových intervalech shrnuje tabulka 21. Ze získaných výsledků byla následně sestavena kinetická křivka, která je znázorněná na obrázku 21.

Tabulka 21: Výsledky stanovení DOC v kultivačních nádobách v jednotlivých odběrových bodech experimentu

Čas	Název roztoku	Celkový C [mg·l ⁻¹]	Anorg. C [mg·l ⁻¹]	DOC [mg·l ⁻¹]	Průměrná hodnota DOC [mg·l ⁻¹]
t ₀	Očkovaná láhev 1	74,14	1,548	72,59	72,6
	Očkovaná láhev 2	---*	---*	---*	
2. den	Očkovaná láhev 1	74,51	2,224	72,79	72,3
	Očkovaná láhev 2	83,80**	2,103	81,70**	
4. den	Očkovaná láhev 1	74,57	3,212	71,36	73,1
	Očkovaná láhev 2	76,98	2,236	74,74	
6. den	Očkovaná láhev 1	66,53	2,080	64,45	63,3
	Očkovaná láhev 2	67,75	5,597	62,15	
8. den	Očkovaná láhev 1	62,77	6,476	56,29	56,9
	Očkovaná láhev 2	61,89	4,422	57,47	
11. den	Očkovaná láhev 1	22,18	6,035	16,15	22,1
	Očkovaná láhev 2	34,73	6,761	27,97	
13. den	Očkovaná láhev 1	21,18	5,860	15,48	15,5
	Očkovaná láhev 2	21,15	5,669	15,48	
	Neočkovaná kontrolní láhev	78,18	1,635	76,55	76,6

* Analýza vzorku se nezdařila; ** Hodnota paralelního stanovení nestandardně odlehla (vyšší obsah uhlíku, než v původním vzorku), vzhledem k předchozímu a následujícímu průběhu v daném roztoku. Způsobena pravděpodobně chybou měření a není do průměru v tomto bodě započítána.



Obrázek 23: Kinetika rozkladu NOP směsnou mikrobiální kulturou JU 4 + JU 3

Z průběhu kinetické křivky na obrázku 15 je patrná lagová (startovací) fáze trvající okolo čtyřech až pěti dnů, následovaná bakteriálním růstem, přičemž můžeme pozorovat dvě hlavní růstové fáze. V první růstové fázi, mezi čtvrtým až osmým dnem, dochází s největší pravděpodobností k rozkladu NOP zapříčiněnému bakteriální kulturou JU 4, která celý rozklad zahajuje, a následně v druhé růstové fázi, mezi cca osmým až jedenáctým dnem kultivace, dochází k zapojení bakteriální kultury JU 3, případně obou přítomných bakteriálních kultur, a tak i k nejintenzivnější spotřebě přítomného NOP a jeho metabolitů. Po třinácti dnech pak byl přítomný NOP téměř zcela rozložen. V kontrolních neočkovaných láhvích nebyl pozorován žádný vzniklý zákal a hodnota DOC odpovídala výchozímu stavu, nepatrně vyšší hodnota na konci pokusu je patrně způsobena chybou samotného měření.

ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byl zkoumán rozklad 1-oktyl-2-pyrrolidonu za pomoci půdních mikroorganismů. Byla popsána kinetika tohoto rozkladu, izolovány klíčové bakteriální kmeny schopné rozkladu a ty byly základním způsobem identifikovány.

Nejprve bylo z půdy do tekutého minerálního média převedeno směsné mikrobiální konsorcium, pro které byla prokázána schopnost využívat 1-oktyl-2-pyrrolidon jakožto jediný zdroj uhlíku. Při prvotním rozkladu směsným mikrobiálním konsorciem byla pozorována relativně dlouhá lagová fáze trvající okolo pěti dnů, k téměř úplnému rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu v roztoku pak došlo přibližně po 14 dnech, měřeno prostřednictvím DOC. Optimálního růstu v následném pokusu pak pomnožené konsorcium dosahovalo při koncentracích 1-oktyl-2-pyrrolidonu $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, přičemž byl testován rozsah koncentrací $0\text{--}250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Následně byly izolovány nejhojněji zastoupené bakteriální kultury přítomné v degradačním konsorciu, ty byly pracovně označeny jako JU 1 – JU 7. V následujících experimentech bylo zjištěno, že k částečné biodegradaci 1-oktyl-2-pyrrolidonu samostatně docházelo pouze v přítomnosti kultury JU 4, která tak byla popsána jako klíčová a celý rozklad NOP iniciovala. Bakteriální kultura JU 4 byla identifikována jako gram-negativní, oxidázo-pozitivní tyčinka. K efektivnějšímu rozkladu studované látky však docházelo v celé směsi izolovaných kultur JU 1 – JU 7. Za účelem zjištění vhodné kombinace pro mikrobiální rozklad byly testovány jednotlivé kombinace kultury JU 4 s dalšími jednotlivými izolovanými kmeny. Bylo zjištěno, že vhodnými bakteriemi v tomto ohledu jsou kombinace kultury JU 4 s kulturou JU 3, případně s JU 6. V těchto případech probíhal rozklad podobně jako u celé směsi kultur JU 1 – JU 7. Bakteriální kultury JU 3 a JU 6 byly identifikovány jako gram-pozitivní, oxidázo-negativní koky. A je pravděpodobné, že se jedná o totožné kmeny. Na celém rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu se tedy podílely minimálně dvě různé bakteriální kultury.

Pro kombinaci kultur JU 4 a JU 3 byla následně stanovena kinetická křivka rozkladu při výchozí koncentraci 1-oktyl-2-pyrrolidonu $120 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Z průběhu kinetické křivky je patrná lagová fáze trvající okolo čtyřech až pěti dnů, následovaná růstem bakterií. Můžeme zde pozorovat dvě hlavní růstové fáze; v první růstové fázi, tj. mezi čtvrtým a osmým dnem, dochází k zahájení rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu bakteriální kulturou JU 4, následovanému druhou růstovou fází, tj. mezi osmým a jedenáctým dnem, kdy se do rozkladu zapojuje i bakteriální kultura JU 3 případně obě přítomné bakteriální kultury JU 4 a JU 3 a tak je

spotřeba 1-oktyl-2-pyrrolidonu a jeho metabolitů v této fázi nejintenzivnější. Celkově došlo k rozkladu téměř veškerého 1-oktyl-2-pyrrolidonu přítomného ve vzorku po třinácti dnech.

V diplomové práci bylo tedy zjištěno, že v půdním prostředí existují mikroorganismy, které jsou schopny přirozeně 1-oktyl-2-pyrrolidon biologicky rozložit a využít jej jako zdroj uhlíku pro svůj růst, přičemž v prvních dnech kontaktu dochází nejprve k adaptaci mikroorganismů na tento zdroj uhlíku. K téměř úplnému rozkladu přítomného 1-oktyl-2-pyrrolidonu pak dochází přibližně po třinácti dnech při kooperaci minimálně dvou různých bakteriálních kmenů, přičemž jedna z kultur je pro zahájení rozkladu klíčová a další je na této iniciaci rozkladu závislá, následně jej však určitým způsobem zefektivní. Faktu, že k rozkladu jsou zapotřebí dva bakteriální kmeny, nasvědčuje i charakter samotné molekuly NOP, skládající se ze dvou hlavních částí, a to postranního hydrofobního řetězce oktylu a hydrofilního laktamového kruhu 2-pyrrolidonu. Avšak pro detailní popis mechanismu rozkladu by byl zapotřebí další výzkum.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BEZZA, Fisseha Andualem, Mervyn BEUKES a Evans M. Nkhalambayausi CHIRWA. Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. *Process Biochemistry*. 2015, **50**(11), 1911-1922. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.07.002. ISSN 13595113.

CAI, Shu, Tianming CAI, Shiyang LIU, Qian YANG, Jian HE, Liwei CHEN a Jiang HU. Biodegradation of N-Methylpyrrolidone by *Paracoccus* sp. NMD-4 and its degradation pathway. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014, **93**, 70-77. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.04.022. ISSN 09648305.

CHEN, Rong, Hongyu JIANG a Yu-You LI. Caffeine degradation by methanogenesis: Efficiency in anaerobic membrane bioreactor and analysis of kinetic behavior. *Chemical Engineering Journal*. 2018, **334**, 444-452 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1016/j.cej.2017.10.052. ISSN 13858947.

DAS, Surajit a HIRAK R. DASH. Microbial Bioremediation. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier, 2014, 2014, s. 1-21. DOI: 10.1016/B978-0-12-800021-2.00001-7. ISBN 9780128000212.

FITZPATRICK, Paul F. The enzymes of microbial nicotine metabolism. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2018, **14**, 2295-2307. DOI: 10.3762/bjoc.14.204. ISSN 1860-5397.

GUMMADI, Sathyanarayana N., B. BHAVYA a Nandhini ASHOK. Physiology, biochemistry and possible applications of microbial caffeine degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, **93**(2), 545-554. DOI: 10.1007/s00253-011-3737-x. ISSN 0175-7598.

HAKIL, M, S DENIS, G VINIEGRA-GONZÁLEZ a C AUGUR. Degradation and Product Analysis of Caffeine and Related Dimethylxanthines by Filamentous Fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, **22**(5), 355-359. DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00205-6. ISSN 01410229.

JØRGENSEN, S.E. Biodegradation. *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier, 2008, 2008, s. 366-367. DOI: 10.1016/B978-008045405-4.00260-3. ISBN 9780080454054.

KŘÍŽEK, Karel. *Studium bakterií rozkládajících strukturní analogy vinylpyrrolidonu*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012, 79 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/21570>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.

MARA, D. Duncan a N. J. HORAN. *Handbook of water and wastewater microbiology*. San Diego: Academic Press, c2003. ISBN 978-0-12-470100-7.

MOHAPATRA, B.R., N. HARRIS, R. NORDIN a A. MAZUMDER. Purification and characterization of a novel caffeine oxidase from *Alcaligenes* species. *Journal of Biotechnology*. 2006, **125**(3), 319-327. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.018. ISSN 01681656.

PubChem Compound. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2005.

NOVOTNÁ, Zlata. *Mikrobiální degradace 1-oktyl 2-pyrrolidonu v povrchových vodách*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015, 29 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/33535>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.

NOVOTNÁ, Zlata. *Mikrobiální degradace N-oktylpyrrolidonu a popis bakterií schopných rozkladu*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2017, 66 s. (65 223 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/40817>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.

PANIGRAHI, Satyanarayan, Parthiban VELRAJ a Toleti SUBBA RAO. Functional Microbial Diversity in Contaminated Environment and Application in Bioremediation. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Elsevier, 2019, 2019, s. 359-385. DOI: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00021-6. ISBN 9780128148495.

QIU, Jiguo, Yanting ZHANG, Lingling ZHAO, Qin HE, Jiandong JIANG, Qing HONG a Jian HE. Isolation and characterization of the cotinine-degrading bacterium *Nocardioides* sp. Strain JQ2195. *Journal of Hazardous Materials*. 2018, **353**, 158-165. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.04.003. ISSN 03043894.

RUAN, Aidong, Yuan GAO, Chao FANG a Yaofei XU. Isolation and characterization of a novel nicotinophilic bacterium, *Arthrobacter* sp. aRF-1 and its metabolic pathway. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2018, **65**(6), 848-856. DOI: 10.1002/bab.1682. ISSN 0885-4513.

RŮŽIČKA, Jan, Jana FUSKOVÁ, Karel KŘÍŽEK, Markéta MĚRKOVÁ, Alena ČERNOTOVÁ a Michal SMĚLÍK. Microbial degradation of N-methyl-2-pyrrolidone in surface water and bacteria responsible for the process. *Water Science and Technology*. 2016, **73**(3), 643-647. DOI: 10.2166/wst.2015.540. ISSN 0273-1223.

SALAČ, Jan. *Protibakteriální účinky fenoxymethanolu a 1-oktyl-2-pyrrolidonu*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015, 107s. (120 988 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/33529>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.

SVIRIDOV, Alexey V., et al. Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 2012, 93.2: 787-796.

Swati Sucharita Dash a Sathyanarayana N. Gummadi . Biodegradation of Caffeine by *Pseudomonas* sp. NCIM 5235. *Research Journal of Microbiology*. 2006, 1(2), 115-123. DOI: 10.3923/jm.2006.115.123. ISSN 18164935.

Thermo Fisher. Paisley: Thermo Fisher, 2019 [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com>

TONELLI FERNANDES, Ana Flavia, Vânia Santos BRAZ, Anelize BAUERMEISTER, Jonas Augusto RIZZATO PASCHOAL, Norberto Peporine LOPES a Eliana Guedes STEHLING. Degradation of atrazine by *Pseudomonas* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from Brazilian agricultural soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, 130, 17-22. DOI: 10.1016/j.ibiod.2018.03.011. ISSN 09648305.

TRIGUI, M, S PULVIN, P POUPIN a D THOMAS. Biodegradation of cyclic amines by a *Pseudomonas* strain involves an amine mono-oxygenase. *Canadian Journal of Microbiology*. 2003, 49(3), 181-188. DOI: 10.1139/w03-025. ISSN 0008-4166.

UDIKOVIĆ-KOLIĆ, Nikolina, Colin SCOTT a Fabrice MARTIN-LAURENT. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 96(5), 1175-1189. DOI: 10.1007/s00253-012-4495-0. ISSN 0175-7598.

ULLOA ROJAS, J.B., J.A.J. VERRETH, S. AMATO a E.A. HUISMAN. Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresource Technology*. 2003, 89(3), 267-274. DOI: 10.1016/S0960-8524(03)00070-1. ISSN 09608524.

VRLOVÁ, Lenka. *Biodegradace polyvinylpyrrolidonu ve vodném anaerobním prostředí*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012, 61 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/22423>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Dvořáčková, Marie.

WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. Oslo: Norwegian Institute of Public Health, 2018.

WANG, H.H., B. YIN, X.X. PENG, J.Y. WANG, Z.H. XIE, J. GAO a X.K. TANG. Biodegradation of nicotine by newly isolated *Pseudomonas* sp. CS3 and its metabolites. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, **112**(2), 258-268. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05208.x. ISSN 13645072.

WARNER, Kevin S., Dalia S. SHAKER, Sarah MOLOKHIA, Qingfang XU, Jinsong HAO, William I. HIGUCHI a S. Kevin LI. Silicone Elastomer Uptake Method for Determination of Free 1-Alkyl-2-Pyrrolidone Concentration in Micelle and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Systems Used in Skin Transport Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008, **97**(1), 368-380. DOI: 10.1002/jps.21094. ISSN 00223549.

WOŹNIAK-KARCZEWSKA, Marta, Monika ČVANČAROVÁ, Łukasz CHRZANOWSKI, Boris KOLVENBACH, Philippe F.-X. CORVINI a Danuta CICHOCKA. Isolation of two *Ochrobactrum* sp. strains capable of degrading the nootropic drug—Piracetam. *New Biotechnology*. 2018, **43**, 37-43. DOI: 10.1016/j.nbt.2017.07.006. ISSN 18716784.

YIM, Joon-Hyuk, Yeong-Su CHOO a Hun-Soo BYUN. Phase behaviour for the (CO₂ + 1-butyl-2-pyrrolidone) and (CO₂ + 1-octyl-2-pyrrolidone) systems at temperatures from (313.2 to 393.2) K and pressures up to 28 MPa. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 2019, **130**, 140-146. DOI: 10.1016/j.jct.2018.10.002. ISSN 00219614.

YONETO, Kunio, Abdel-Halim GHANEM, William I. HIGUCHI, Kendall D. PECK a S. KEVIN LI. Mechanistic Studies of the 1-Alkyl-2-pyrrolidones as Skin Permeation Enhancers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1995, **84**(3), 312-317. DOI: 10.1002/jps.2600840310. ISSN 00223549.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DOC	Rozpuštěný organický uhlík
IC	Celkový obsah anorganického uhlíku
MA	Minerální agar
MM	Minerální médium
NOP	1-oktyl-2-pyrrolidon
TC	Celkový obsah uhlíku

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Struktura NOP</i>	13
<i>Obrázek 2: Molekula nikotinu</i>	16
<i>Obrázek 3: Schéma bakteriálního rozkladu nikotinu (upraveno dle Fitzpatrick et al. 2018)</i>	17
<i>Obrázek 4: Mechanismus rozkladu kotinu prostřednictvím bakterií rodu Nocardioides (upraveno podle Qiu et al. 2018)</i>	18
<i>Obrázek 5: Struktura pyracetamu</i>	18
<i>Obrázek 6: Štěpení heterocyklického kruhu piracetamu (upraveno dle Woźniak-Karczewska et al. 2016)</i>	19
<i>Obrázek 7: Struktura molekuly kofeinu</i>	19
<i>Obrázek 8: Katabolismus kofeinu v mikroorganismech theofilinová ceta (upraveno podle Gummady et al. 2012)</i>	20
<i>Obrázek 9: Katabolismus kofeinu v mikroorganismech theobrominová ceta (upraveno podle Gummady et al. 2012)</i>	20
<i>Obrázek 10: Katabolismus kofeinu v mikroorganismech allatoninová cesta (upraveno podle Gummady et al. 2012)</i>	20
<i>Obrázek 11: Molekula atrazinu</i>	21
<i>Obrázek 12: Mechanismus rozkladu atrazinu (upraveno podle Tonelli Fernandes et al. 2018)</i>	22
<i>Obrázek 13: Mechanismus rozkladu pyrrolidinového kruhu (upraveno podle Trigui et al. 2003)</i>	23
<i>Obrázek 14: Mechanismus rozkladu methylpyrrolidonu (upraveno podle Cai et al. 2014)</i>	23
<i>Obrázek 15: Kinetika rozkladu NOP směsnou půdní mikrobiální kulturou</i>	38
<i>Obrázek 16: Směsná bakteriální kultura po 7 denní kultivaci</i>	39
<i>Obrázek 17: Směsná bakteriální kultura po 7 denní kultivaci</i>	40
<i>Obrázek 18: Směsná bakteriální kultura po 7 denní kultivaci</i>	40
<i>Obrázek 19: Fotografie bakteriální kultury JU 4 po gramově barvení</i>	44
<i>Obrázek 20: Fotografie bakteriální kultury JU 3 po gramově barvení</i>	45
<i>Obrázek 21: Fotografie bakteriální kultury JU 6 po gramově barvení</i>	45
<i>Obrázek 22: Fotografie bakteriálních kultur JU 4, JU 3 a JU 6 kultivované při 25 °C na R2A agaru</i>	46

Obrázek 23: Kinetika rozkladu NOP směsnou mikrobiální kulturou JU 4 + JU 348

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Vlastnosti NOP (<i>PubChem Compound</i> 2005).....	13
Tabulka 2: Vybrané organické látky strukturně podobné NOP.....	15
Tabulka 3: Složení roztoku stopových prvků na 1000 ml destilované vody.....	26
Tabulka 4: Složení R2A agaru.....	26
Tabulka 5: Složení R2A agaru.....	27
Tabulka 6: Složení minerálního agaru.....	27
Tabulka 7: Příprava jednotlivých roztoků pro následnou degradaci.....	30
Tabulka 8: Příprava inokula desetinným ředěním pipetováno do 4,5 ml fyziologického roztoku.....	31
Tabulka 9: Příprava pokusu pro ověření degradačních schopností směsného inokula.....	32
Tabulka 10: Příprava jednotlivých roztoků pro následnou degradaci NOP.....	33
Tabulka 11: Příprava jednotlivých směsných roztoků pro degradaci NOP.....	34
Tabulka 12: Teplotní podmínky kultivace.....	35
Tabulka 13: Vyhodnocení intenzity zákalu v jednotlivých bodech experimentu.....	37
Tabulka 14: Výsledky stanovení DOC v kultivačních nádobách v jednotlivých odběrových bodech experimentu.....	37
Tabulka 15: Vyhodnocení růstu směsného mikrobiálního konsorcia při jednotlivých koncentracích NOP v roztoku.....	39
Tabulka 16: Intenzita zákalu v jednotlivých suspensích, měřeno při vlnové délce 600 nm.....	42
Tabulka 17: Subjektivní vyhodnocení intenzity zákalu po dvoutýdenním rozkladu..	43
Tabulka 18: Vyhodnocení DOC po dvoutýdenním rozkladu.....	43
Tabulka 19: Výsledky jednotlivých testů.....	44
Tabulka 20: Kultivační podmínky a intenzita růstu.....	44
Tabulka 21: Výsledky stanovení DOC v kultivačních nádobách v jednotlivých odběrových bodech experimentu.....	47