

# **Biodegradace N-methyl-2-pyrrolidonu v pramenných vodách**

Alena Černotová

---

Bakalářská práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Alena Černotová  
Osobní číslo: T11471  
Studijní program: B2808 Chemie a technologie materiálů  
Studijní obor: Inženýrství ochrany životního prostředí  
Forma studia: prezenční

Téma práce: Biodegradace N-methyl-2-pyrrolidonu  
v pramenných vodách

Zásady pro vypracování:

1. Vytipujte 2 lokality pramenných vod a proveďte odběry vzorků.
2. V odebraných vzorcích stanovte celkový počet psychrofilních heterotrofních bakterií kultivační metodou, případně ověřte použití různých živných půd.
3. V odebraných vzorcích proveďte testy biodegradace N-methyl-2-pyrrolidonu.
4. Získané výsledky zpracujte přehlednou formou a práci odevzdejte v řádném termínu v tištěné i elektronické podobě.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Literatura zaměřená na vlastnosti N-methyl-2-pyrrolidonu.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

**10. února 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**23. května 2014**

Ve Zlíně dne 10. února 2014

  
doc. Ing. Román Čermák, Ph.D.  
děkan



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

Příjmení a jméno: ČERNOTOVÁ ALENA

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, 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 16.5.2014

Ale Černotová

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

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

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

<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 vzdělávacího 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 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 jim 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

V bakalářské práci byla zkoumána biodegradace N-methyl-2-pyrrolidonu (NMP) v pramenitých vodách. Cílem práce bylo najít a identifikovat případné bakteriální kultury, které využívají NMP jako zdroj živin. Zkoumání biodegradace NMP ve vzorcích probíhalo v kultivačních lahvích. Degradace se projevila vznikem zákalu a také zjišťováním průběžné hodnoty rozpuštěného organického uhlíku pomocí automatického analyzátoru. I přes nízký počet bakterií v daných vzorcích vod došlo k degradaci N-methyl-2-pyrrolidonu v průběhu 99 - 142 dní kultivace.

Klíčová slova: pramenitá voda, N-methyl-2-pyrrolidon, biodegradace, bakterie.

## **ABSTRACT**

In my thesis I investigated the biodegradation of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) in spring waters. The aim was to find and identify bacterial cultures that use NMP as a source of nutrients. The examination of NMP biodegradation in the samples took place in culture-flasks. The degradation was confirmed by the turbidity formation as well as by measuring of running values of dissolved organic carbon using an automatic analyzer. Despite the low number of bacteria in the given water samples the degradation of N-methyl-2-pyrrolidone in the course of 99 - 142 days of cultivation occurred.

Keywords: spring water, N-methyl-2-pyrrolidone, biodegradation, bacteria.

Ráda bych poděkovala především panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho ochotu, odbornou pomoc, trpělivost a cenné rady. Mé poděkování patří i paní Lence Machákové za její pomoc při experimentální práci a v neposlední řadě všem, kteří mě v průběhu studia podporovali.

*„Utrhl jsem květinu a ona zvadla,  
chytil jsem motýla a on zemřel,  
pochopil jsem, že přírody se mohu dotknout pouze srdcem.“*

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 N-METHYL PYRROLIDON</b> .....	<b>12</b>
1.1 ZKOUMÁNÍ BAKTERIÍ ROZKLADAJÍCÍ NMP VE VĚDECKÉ LITERATUŘE.....	13
1.1.1 Biodegradace NMP v odpadních vodách .....	13
1.2 PRAMENNÉ VODY .....	13
1.2.1 Vlastnosti pramenných vod.....	13
1.2.2 Zkoumání počtu bakterií v pramenných vodách pomocí různých typů živných medií .....	14
<b>2 VÝSLEDKY PŘEDCHOZÍCH PRACÍ NA FT UTB</b> .....	<b>15</b>
2.1 DP K. KRÍŽEK - ISOLACE BAKTERIÍ ROZKLÁDAJÍCÍ NMP Z AKTIVOVANÉHO KALU .....	15
2.2 BcP J. FUSKOVÁ - ROZKLAD NMP V POVRCHOVÉ STOJATÉ VODĚ.....	15
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>16</b>
<b>3 MATERIÁLY A METODIKA</b> .....	<b>17</b>
3.1 SLOŽENÍ POUŽITÝCH ROZTOKŮ A ŽIVNÝCH PŮD .....	17
3.1.1 Zásobní roztok solí.....	17
3.1.2 Zásobní roztok minerálů .....	17
3.1.3 TYA agar.....	18
3.1.4 R2A agar .....	18
3.1.5 MT agar s tryptonem, kvasničným autolyzátem a sojovým peptonem.....	18
3.1.6 Minerální agar (MA).....	18
3.2 MÍSTA ODBĚRU .....	20
3.3 KULTIVAČNÍ STANOVENÍ CELKOVÝCH POČTŮ HETEROTROFNÍCH BAKTERIÍ.....	21
3.3.1 Jarní pokus .....	21
3.3.2 Podzimní pokus.....	21
3.4 SLEDOVÁNÍ MIKROBIÁLNÍHO ROZKLADU NMP.....	21
3.4.1 Jarní pokus .....	21
3.4.2 Podzimní pokus.....	22
3.5 ISOLACE BAKTERIÍ, KTERÉ JSOU SCHOPNÉ DEGRADOVAT NMP.....	22
3.5.1 Orientační identifikace získaných kultur .....	22
<b>4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY</b> .....	<b>24</b>
4.1 POMŮCKY.....	24
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	24
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>25</b>
5.1 JARNÍ POKUS .....	25
5.2 PODZIMNÍ POKUS.....	28
5.3 ZÍSKÁNÍ BAKTERIÍ, KTERÉ JSOU SCHOPNÉ DEGRADOVAT NMP .....	32
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>33</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>34</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>36</b>



<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>37</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>38</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>39</b>

## ÚVOD

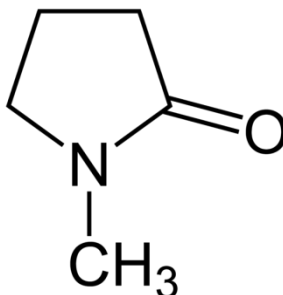
Voda, třpytivá, čistá průhledná kapalina, jedna z nejcennějších věcí na planetě. K životu ji potřebují jak lidé, živočichové, tak i rostliny. Již v dřívějších dobách se věřilo, že má voda blahodárné účinky. V dnešní době se do vod dostávají chemické látky, které mohou způsobit zdravotní problémy a znečištění životního prostředí. Obranou vod proti cizím látkám je schopnost pomoci bakterií, které se ukrývají ve vodě, tyto látky degradovat. Mikrobiální degradace je jednou z nejlepších přírodních cest, jak zneškodnit cizorodé látky.

V čistírnách odpadních vod se mikrobiální degradace používá pro čištění odpadních vod z domácností či průmyslu. Tyto vody mají jiné složení než vody povrchové, pramenné či podzemní, především však obsahují obrovské množství mikroorganismů. Do přírodních vod, ve kterých se mikroorganismy vyskytují v počtech mnohonásobně menších, se chemické látky mohou dostat např. ze zemědělství či jiných aktivit lidského původu. Proto jsme se rozhodli prozkoumat biodegradaci N-methyl-2-pyrrolidonu v pramenných vodách. Vzorke vody byly odebrány z oblasti přírodního parku Vizovické vrchy v obci Jasenná.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 N-METHYL PYRROLIDON

N-methyl pyrrolidon ( $C_5H_9NO$ , NMP) je někdy znám pod dalším názvem jako 1-Methyl-2-pyrrolidon, anglicky 1-Methyl-2-pyrrolidone. Jeho struktura je uvedena na obrázku 1. [1].



**Obr. 1.** Struktura NMP

NMP je bezbarvá až slabě nažloutlá kapalina zapáchající po čpavku. Při intenzivním zahřívání vytváří se vzduchem výbušné směsi. V případě požáru může dojít k vytváření nebezpečných hořlavých plynů nebo výparů. Mohou se uvolňovat oxidy dusíku a oxidy uhlíku [1].

NMP je stabilní za běžných podmínek. Prudce reaguje se silnými oxidačními činidly, např. s peroxidem vodíku. Je potřebné jej skladovat v čistých ocelových nebo slitinových bubnech při teplotě max. 25 °C [2].

Jeho základní fyzikálně - chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tab. 1.** Fyz.-chem. vlastnosti NMP [3].

Molární hmotnost	99,13 g/mol
Hodnota pH	8,5-10 (100 g/l, při 20°C)
Bod varu	202 °C
Bod tání	-24 °C
Relativní hustota 20 °C	1,03 g/cm <sup>3</sup>

### Toxikologické vlastnosti

Při styku s NMP může dojít k podráždění kůže, očí. NMP může způsobit podráždění dýchacích cest a poškodit plod v těle matky. Při výzkumu toxikologických vlastností NMP

byl proveden i Amesův test, který dopadl negativně, což znamená, že NMP nemá žádné mutagenní účinky [1].

### **Použití**

Díky nízké toxicitě a dobré rozpustnosti se NMP používá pro nátěry v zemědělství i jako rozpouštědlo. Jako pomocné rozpouštědlo může zlepšit lesk podlahových leštidel. Pro svou nízkou těkavost se používá v automobilovém průmyslu [2]. NMP se používá ve farmacii jako pomocná látka usnadňující rychlejší přenos aktivních látek přes kůži (penetraci) [4].

## **1.1 Zkoumání bakterií rozkládající NMP ve vědecké literatuře**

### **1.1.1 Biodegradace NMP v odpadních vodách**

Chow a Ng (Singapur) zkoumali biodegradaci NMP v odpadních vodách. Provedli tzv. Die-away test, kde byly jako inokulum použity mikroorganismy ze sušeného kalu z místní komunální čistírny odpadních vod. Počáteční koncentrace NMP v degradační suspensi byla 100 ppm. Výsledky ukázaly, že je NMP snadno biologicky odbouratelný, protože během dvou týdnů inkubace bylo dosaženo 95% biodegradace. Současně však autoři zjistili, že produktem degradace NMP je určitá karbonylová sloučenina [5].

## **1.2 Pramenné vody**

### **1.2.1 Vlastnosti pramenných vod**

Prameniště vznikají zpravidla na plochách, kde vyvěrá podzemní voda, uprostřed luk, lesů i v alpínském bezlesí.

Koncentrace rozpuštěných minerálů v pramenných vodách je značně proměnlivá, v závislosti na geologickém podloží; může být i extrémně nízká, ale na rozdíl od ostatních typů vod neklesá pH k extrémně kyselým hodnotám díky neustálému proudění. Teplota vody na vydatných prameništích jen málo kolísá během roku [6].

Podzemní voda má významnou roli při vytváření charakteru ekosystémů a v jejich funkcích [7] a obecně představuje skrytý a nedostatečně prostudovaný aspekt ekosystémů jak suchozemských, tak vodních. Podzemní vody se vyznačují vysokou bakteriální rozmanitostí i diversitou bezobratlých živočichů, která je zatím prozkoumána jen částečně [8].

Podzemní voda podporuje celou řadu funkcí přilehlých nadzemních ekosystémů, a to do té míry, že některé ekosystémy jsou na podzemní vodě zcela závislé [9].

Bakterie v přírodních minerálních vodách, které jsou získané z podzemních zdrojů, mají obecně velký význam, protože tato voda je po celém světě často používána jako voda pitná. Přírodní pramenné vody nejsou nikdy bez bakterií a možnost jejich kultivačního stanovení byla prověřována v několika pracích.

### 1.2.2 Zkoumání počtu bakterií v pramenných vodách pomocí různých typů živných medií

Ve Francii byla Marym a kol. provedena studie o mikrobiologických vlastnostech francouzské minerální vody. Obecně autoři uvádějí, že v komerčních přírodních minerálních vodách se nacházejí dvě skupiny bakterií. Jednak tzv. autochtonní bakterie, což jsou původní bakterie přirozeně přítomné v dané vodě, a jednak bakterie alochtonní, které jsou do výrobku zavedeny plnicím systémem. U autochtonních bakterií bylo zjištěno, že jsou dobře přizpůsobeny oligotrofním podmínkám podzemních vod a že většina z těchto bakterií patří mezi gram-negativní. Většina získaných kultur byla přiřazena k rodu *Pseudomonas*, ostatní byly identifikovány jako *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* a *Flexibacter*. Pro získání bakterií ze vzorků pramenných vod autoři použili několik typů agarových živných medií, a to R2A agar, Plate count agar (PCA), zředěný PCA agar, Mueller Hinton agar a King B agar. Při těchto kultivacích zjistili, že na R2A agaru vyrůstá největší počet bakteriálních kolonií, a to o půl až dva řády více než na ostatních živných agarech [10].

Ruckmani a Chakrabarti zkoumali podobně diversitu kultivovaných bakterií pomocí tří různých typů medií o různém zastoupení živin. Použili tryptický sojový bujón (TSBA), který je bohatý na živiny, dále středně bohatý Plate count agar (PCA) a 100x zředěný TSBA agar s nízkou koncentrací živin, tzv. TD agar. Misky byly kultivovány při 37°C po dobu 96 hodin. Počty kolonií (CFU/ml) byly následující:

TD agar  $4,98 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ , PCA  $1,82 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  a TSBA  $7,8 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$ , takže výsledky ukázaly, že nutričně nejchudší TD agar poskytl nejvyšší počet bakteriálních kolonií [11].

## 2 VÝSLEDKY PŘEDCHÁZEJÍCÍCH PRACÍ NA FT UTB

### 2.1 DP K. Křížek – izolace bakterií rozkládající NMP z aktivovaného kalu

V diplomové práci byla zkoumána schopnost čistých bakteriálních kultur, získaných ze vzorků aktivovaných kalů, rozkládat N-metyl pyrrolidon a 1-octyl 2-pyrrolidon v tekutých médiích. Cílem bylo najít a případně identifikovat bakteriální kultury, které byly schopny využít NMP jako zdroj uhlíku a dusíku a tím jej eliminovat z prostředí. Celkově bylo izolováno 6 kultur schopných rozkládat NMP. Pracovalo se s kulturami MP1, MP2 a FEN2B, které byly již dříve získány na ÚIOŽP, a se třemi kulturami izolovanými z aktivovaného kalu ČOV Malenovice, označenými MP10, MP11 a MP13. Zatímco kultura MP2 byla grampozitivní a byla identifikována jako zástupce rodu *Rhodococcus*, ostatní patřily ke gramnegativním rodům *Paracoccus*, *Acinetobacter* a *Pseudomonas* [12].

### 2.2 BcP J. Fusková – rozklad NMP v povrchové stojaté vodě

Bakalářská práce se zabývala zejména zkoumáním rozkladu NMP v povrchové stojaté vodě. Celkem byla provedena dvě sledování rozkladu NMP: na jaře 2012 první "orientační" pokus a na podzim 2012 druhý.

U orientačního pokusu nastal rozklad po 15 dnech, a to pouze v jedné ze dvou pokusných lahví. Po další kultivaci byl rozklad NMP potvrzen i ve druhé láhvi. V druhém pokusu během 80 dní experimentu nenastal rozklad NMP v jedné láhvi ze čtyř, zatímco v ostatních láhvích byl NMP prakticky kompletně rozložen.

Po provedení biodegradace NMP byly ze suspensí získány dvě čisté bakteriální kultury se schopností NMP rozkládat. Kultury byly označeny jako JF1 a Š (šedá) a šlo o grampozitivní (JF1) a gramnegativní bakterii (Š) [13].

Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli prozkoumat rozklad NMP ve vodách pramených, kde se dá očekávat velmi nízký obsah aerobních heterotrofních mikroorganismů.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



### 3 MATERIÁLY A METODIKA

#### 3.1 Složení použitých roztoků a živných půd

##### 3.1.1 Zásobní roztok solí

Každá sloučenina byla navážena podle tabulky 2 a dále jednotlivě rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

**Tab. 2.** Zásobní roztok solí - složení

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
NaCl	5,0 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	3,0 g

##### 3.1.2 Zásobní roztok minerálů

Roztok se připravil do uzavíratelné láhve, kde se nejdříve dávkovaly roztoky fosforečnanů podle tabulky 3 do cca 70 ml destilované vody.

**Tab. 3.** Zásobní roztok minerálů - složení

Roztok $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , koncentrace 9,07 g/l	2,0 ml
Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , koncentrace 23,90 g/l	8,0 ml
Zásobní roztoky solí	1,0 ml každý
Roztok stopových prvků	0,1 ml

Pak byly po jednom postupně přidávány roztoky dalších solí. Při přidání 1 ml soli se láhev vždy promíchala. Po přidání všech solí se láhev doplnila do 100 ml destilovanou vodou. Konečný roztok byl sterilizován v autoklávu při 121°C 25 minut.

### 3.1.3 TYA agar ( Trypton Yeast Extract Agar, HIMEDIA)

Živná půda byla připravena navážením 4,2 g TYA agaru, který byl smíchán s 200 ml destilované vody. Po rozpuštění byla láhev sterilizována v autoklávu při 125 °C. Po ukončení sterilizace jsme nechali agar ochladit na cca 50 °C, promíchali a rozlili do připravených sterilních Petriho misek. Tloušťka agaru měla 3 - 4 mm.

### 3.1.4 R2A agar ( HIMEDIA)

Ve 200 ml destilované vody byla rozpuštěna navážka 3,6 g R2A agaru. Proběhla sterilizace v autoklávu, ochlazení a rozlití do Petriho misek.

### 3.1.5 MT agar s tryptonem, kvasničným autolyzátem a sojovým peptonem

U tohoto agaru byly naváženy složky dle tabulky 4.

**Tab. 4.** MT agar - složení

Základ pro minerální agar	1,0 g
Agar čistý	2,8 g
Roztok stopových prvků	0,1 ml
Trypton	0,08 g
Kvasničný extrakt	0,06 g
Sojový pepton	0,06 g

Všechny složky byly rozpuštěny v 200 ml destilované vodě. Úprava proběhla stejně jako u předchozích agarů.

### 3.1.6 Minerální agar (MA)

Složení agaru bylo podle tabulky 5.

**Tab. 5.** Složení MA

$K_2HPO_4$	0,1 g
$NH_4Cl$	0,11 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,02 g
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,001 g(stopy)

CaCl <sub>2</sub>	0,001 g (stopy)
Roztok stopových prvků	0,1 ml
Agar	1,7 g
Voda destilovaná	100,0 ml

Navážka 1,9 g byla suspendována ve 100 ml destilované vody a po nabobtnání sterilizována v autoklávu při 121°C po dobu 25 minut.

### 3.2 Místa odběru

Přírodní park Vizovické vrchy je téměř souvisle zalesněná hornatina, jejíž rozloha činí 13 292 ha. Jsou charakteristické osídlením a hospodařením na svazích a v údolích. Oblast je významná krajinářsky, ekologicky a rekreačně [14].

Vzorky byly odebrány ze dvou míst poblíž obce Jasenná. Vzorek J byl pojmenován podle místa odběru "Junácký tábor". Pramenitá voda v této oblasti vytéká ze smíšeného lesa s převážně rostoucími buky, duby a smrky. V období letních prázdnin se pramen využívá jako pitná voda. Buď v syrovém stavu nebo se voda převaří.

Dalším místem odběru vzorku vody byl pramen vyvěrající v údolí mezi pastvinami a lesem. Místní obyvatelé údolí nazývají "Růžanovská". Dvakrát do roka bývá pastvina spásána chovným skotem.

### 3.3 Kultivační stanovení celkových počtů heterotrofních bakterií

#### 3.3.1 Jarní pokus

Od každého vzorku jarního pokusu bylo připraveno 6 Petriho misek. Všechny misky byly zalaty sterilním vlašným TYA agarem a po promíchání se nechaly ztuhnout. Na 4 misky byl napipetován 0,1 ml vzorku, na další 2 misky 1 ml vzorku. Z každého ředění byly 3 misky kultivovány psychrofilně (při 23 °C) a 3 misky mezofilně (při 37 °C).

#### 3.3.2 Podzimní pokus

U podzimního pokusu jsme použili ředění  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ . Vzorky vody byly asepticky napipetovány na povrch živných medií TYA, R2A a MT agar. Od každé živné půdy byly napipetovány 4 Petriho misky. Kultivace probíhala jen psychrofilně (23 °C).

### 3.4 Sledování mikrobiálního rozkladu NMP

Při přidání NMP do lahví se NMP stal jediným zdrojem organického uhlíku ve sledované vodě.

#### 3.4.1 Jarní pokus

Pokus začal odměřením 50 ml vzorku vody do tří sterilních lahví. Do všech lahví bylo přidáno 0,5 ml sterilního zásobního roztoku minerálních solí a do dvou lahví bylo přidáno 150  $\mu$ l 10 %-tního sterilního zásobního roztoku NMP. Vznikla tedy koncentrace 300 mg/l. Všechny láhve byly dokonale promíchány, nechaly se kultivovat při 25 °C na třepače a byl sledován vznik případného zákalu.

Kromě uvedených tří lahví bylo do kádinky nadávkováno 50 ml vzorku vody, byl přidán sterilní zásobní roztok minerálních solí o objemu 0,5 ml a 150  $\mu$ l sterilního 10 %-tního zásobního roztoku NMP. Po promíchání byl trojnásobně odebrán vzorek, který byl zředěn v poměru 1 : 2 destilovanou vodou, tj. 2 ml vzorku : 4 ml destilované vody, pro zjištění vstupní hodnoty organického rozpuštěného uhlíku (DOC) v pokusu.

V určitých časových intervalech byly z lahví s NMP odebrány asepticky sterilní špičkou 2 ml vzorku do kádinky, které byly naředěny 6 ml destilovanou vodou. Po řádném promíchání se nerozpuštěné částice přefiltrovaly přes membránový filtr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m, do vzorkovnice pro stanovení DOC přístrojem Shimadzu.

### 3.4.2 Podzimní pokus

Pokus byl zahájen odměřením 60 ml vzorku vody do 4 sterilních lahví sterilním válečkem. Do všech lahví bylo přidáno 0,6 ml sterilního zásobního roztoku minerálních solí a do tří lahví bylo přidáno po 180  $\mu$ l 10 %-tního sterilního zásobního roztoku NMP. Vznikla tedy koncentrace 300 mg/l. Po dokonalém promíchání se nechaly láhve kultivovat při 25 °C na třepače a byl sledován případný zákal nebo vznik vloček.

Pro zjištění přirozeného množství rozpuštěného organického uhlíku byla hodnota DOC stanovena také u obou vzorků bez přídavku NMP.

Další odběry vzorků byly prováděny po 1 týdnu, kdy z každé lahve s NMP byly odebrány 2 ml vzorku do kádinky, zředěny 6 ml destilovanou vodou. Po řádném promíchání se nerozpuštěné částice přefiltrovaly přes membránový filtr MILLIPORE MCE, do vzorkovnice pro stanovení DOC přístrojem Shimadzu.

### 3.5 Isolace bakterií, které jsou schopné degradovat NMP

Byly připraveny živné půdy z čistého minerálního agaru (MA) a také minerální agar + NMP (500 mg NMP / l) v petriho miskách, automatickou pipetou se sterilní špičkou byl dávkován vzorek vody s proběhlou biodegradací o objemu 5  $\mu$ l. Pomocí skleněné sterilní zahnuté tyčinky byl vzorek rozetřen po ploše agaru v Petriho misce. Misky jsme nechali kultivovat 14 dní při 25 °C. Narostlé kolonie se dále přeočkovaly pomocí křížového roztěru na misky jak s minerálním agarem + NMP, tak na univerzální TYA agar a pro srovnání i na čistý minerální agar. Po získání čistých kultur byly tyto kultury zakonzervovány v glycerolu při -80 °C.

#### 3.5.1 Orientační identifikace získaných kultur

##### Gramovo barvení

Na podložní sklíčko byla asepticky přenesena suspenze bakteriální kultury. Suspenzi jsme rozetřeli kličkou a nechali uschnout na vzduchu nebo vysoko na plameni. Dále bylo sklíčko třikrát protaženo nesvitivým plamenem kahanu a nechalo vychladnout. Fixovaný a zchladlý roztěr na podložním sklíčku byl převrstven roztokem krystalové violeti a nechal se působit 60 vteřin. Poté byla barva bez opláchnutí slita a převrstvena preparátem Lugolovým roztokem, který působil 60 vteřin. Poté byl roztok opatrně opláchnut destilovanou vodou a pomocí ethanolu byl odbarvován v šikmé poloze tak dlouho, dokud odtékalo bar-

vivo (20 - 25 vteřin). Nadále byl preparát dokonale opláchnut destilovanou vodou a dobarven zředěným karbolfuchsinem po dobu 60 vteřin. Nakonec byl preparát důkladně opláchnut destilovanou vodou a nechal se vyschnout. Pozorování bylo prováděno pomocí imersního objektivu při 1000x zvětšení. Pomocí Gramova barvení můžeme bakterie rozdělit na dvě skupiny: grampozitivní (G+), barvící se modře, a gramnegativní (G-), barvící se červeně.

## **4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY**

### **4.1 Pomůcky**

K praktické části byly použity běžné laboratorní pomůcky mikrobiologické laboratoře.

### **4.2 Použité přístroje**

Analyzátor TOC 5000A - Shimadzu, Japonsko

Autokláv LaM-MCS - SANOclav, Německo

Laboratorní rotační třepačka

Počítačka kolonií

Laminární box TELSTAR BIO-II-A (Španělsko)



## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Jarní pokus

Jarní pokus nám sloužil jako orientační pokus ke zjištění, zda ve vzorcích zkoumané vody se NMP rozkládá, a tedy, zda v ní existují bakterie, které tuto látku jsou schopny využívat jako substrát. Pomocí obsahu rozpuštěného organického uhlíku se dalo poznat, zda se NMP v průběhu kultivace vody spotřebovává.

Na začátku pokusu byly nejdříve stanoveny celkové počty heterotrofních psychrofilních a mesofilních bakterií, jako ukazatel mikrobiálního oživení zkoumané vody. Výsledky kulti-vačních stanovení jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tab. 6.** Počet heterotrofních bakterií ve vzorcích - jarní pokus

Skupina bakterií	Vzorek pramenné vody	
	J CFU/ml	R CFU/ml
Mesofilní bakterie	5	260
Psychrofilní bakterie	78	870

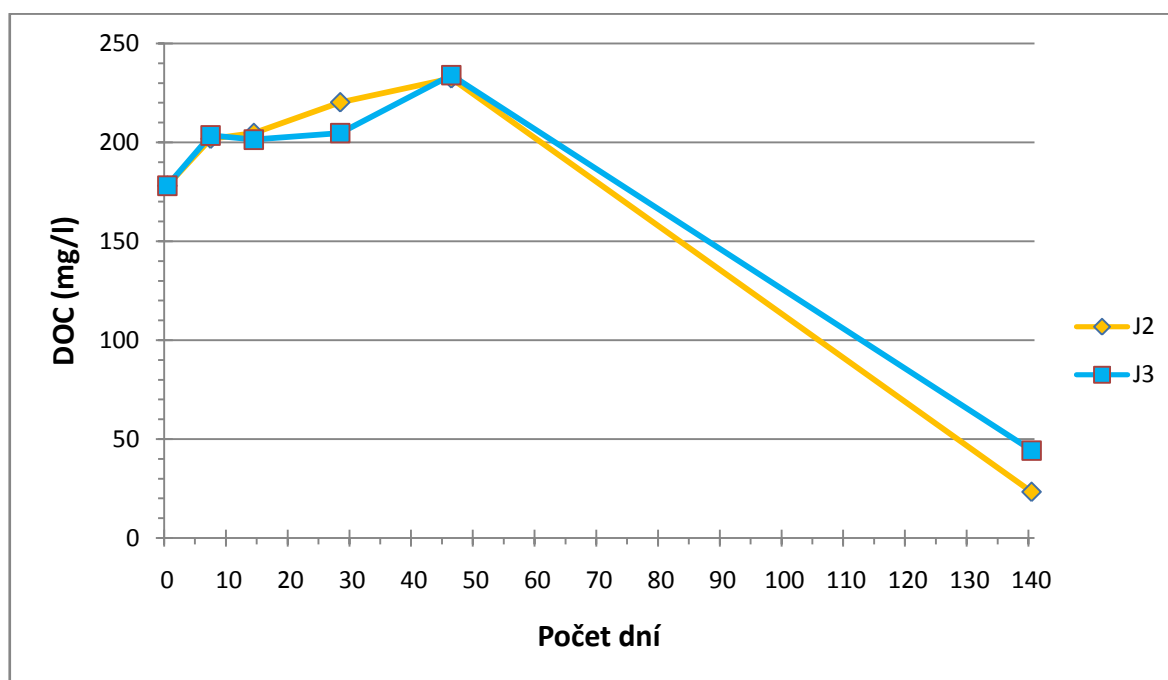
Lze si všimnout, že počet psychrofilních nebo-li chladnomilných bakterií je podstatně vyšší jak počet mesofilních. U vzorku R je počet bakterií 10ti násobně větší než u vzorku J.

Sledování rozkladu NMP bylo provedeno v 6 kultivačních lahvích. Tři láhve vzorku R a tři láhve vzorku J. V každé skupině vzorků byla jedna láhev bez přidání NMP (vzorky J1 a R1, kontroly přirozeného množství DOC), do zbylých lahví (J2, J3, R2, R3) byl přidán NMP v koncentraci 300 mg/l. Všechny láhve byly kultivovány při 25 °C na třepačce a během kultivace byl sledován vznik zákalu. V určitých časových intervalech byly z lahví, které obsahovaly NMP, odebírány vzorky pro zjištění hodnoty DOC. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

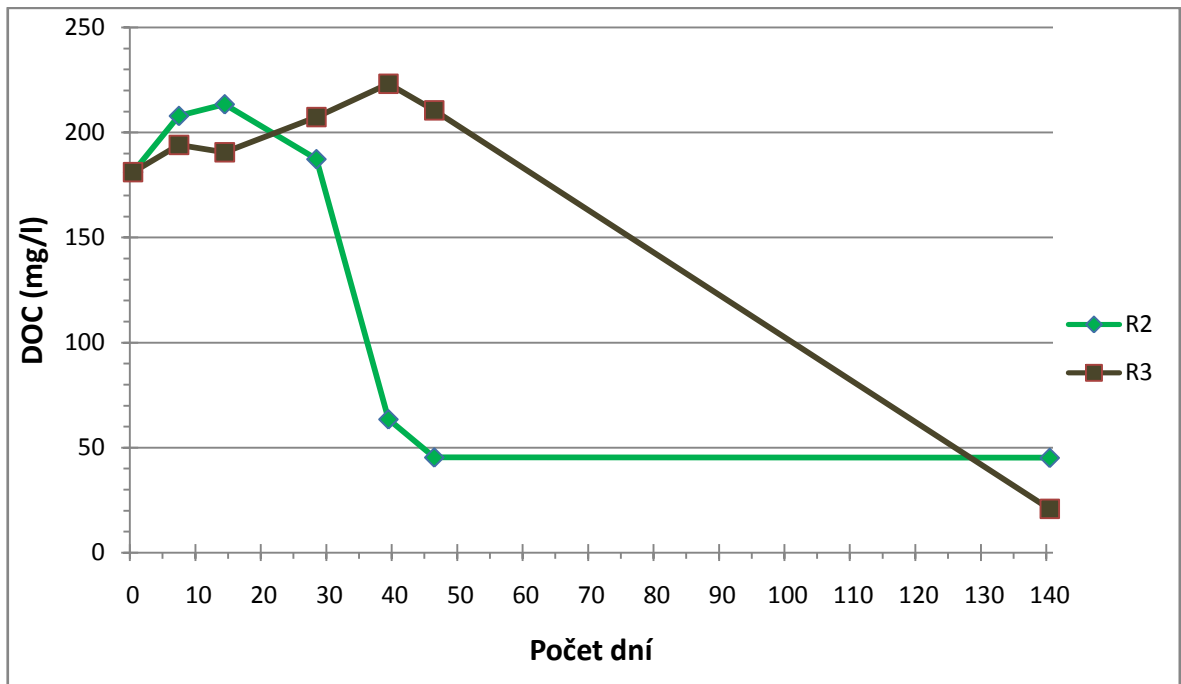
**Tab. 7.** Koncentrace DOC ve vzorcích vody během kultivace - jarní pokus

Počet dní	DOC ve vzorcích [mg/l]			
	J2	J3	R2	R3
0	178,07	178,07	181,20	181,20
7	201,78	203,49	207,93	194,16
14	207,72	201,36	213,48	190,65
28	220,23	204,69	187,35	207,36
39	-	-	63,48	223,20
46	232,29	233,94	45,33	210,54
140	23,42	44,31	45,14	20,835

Z uvedených hodnot v tabulce 7 je zřejmé, že během 140 dní dochází k biodegradaci NMP u všech lahví. Pro lepší představu byla data zpracována do grafů na obrázku 2 a obrázku 3.

**Obr. 2.** Graf biodegradace NMP jarní pokus- vzorky J v lahvi č. 2 a č. 3.

Degradace NMP v lahvích č. 2 a č. 3 probíhala podobně. Po 46. dni kultivace došlo k viditelnému poklesu DOC a tedy k degradaci NMP v obou lahvích.



**Obr. 3.** Graf biodegradace NMP jarní pokus - vzorky R v lahvi č. 2 a č. 3.

V láhvi R2 začala probíhat degradace již po 20ti dnech kultivace, pravděpodobně díky většímu počtu bakterií, než bylo u vzorků J. V láhvi R3 však začala degradace poněkud později, až po 40. dni kultivace.

Výsledky úvodního pokusu celkově ukázaly, že i v pramenných vodách se vyskytují bakterie schopné rozkladu N-methyl pyrrolidonu.

## 5.2 Podzimní pokus

V podzimním pokusu byly připraveny od každého vzorku 4 pokusné láhve. Stejně jako u jarního pokusu byly nejdříve stanoveny celkové počty heterotrofních psychrofilních bakterií; počty mesofilních bakterií již sledovány nebyly. Zato však byly psychrofilní bakterie kultivovány na třech odlišných živných agaroch, pro posouzení vhodnosti těchto agarů pro růst bakterií pramenných vod. Výsledky kultivačního stanovení jsou uvedeny v tabulce 8.

**Tab. 8.** Počet heterotrofních psychrofilních bakterií ve vzorcích - podzimní pokus

Psychrofilní bakterie	Vzorek pramenné vody	
	J CFU/ml	R CFU/ml
TYA	$1,6 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$
<b>R2A</b>	<b><math>8,3 \cdot 10^3</math></b>	<b><math>3,5 \cdot 10^3</math></b>
MT	$2,8 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$

Pro kultivaci byly použity TYA, R2A a MT živné agary. Z počtu bakterií se ukázalo, že R2A je nejvhodnější živná půda pro psychrofilní bakterie pramenných vod. Větší počet bakterií v podzimním pokusu byl u vzorku J. Celkově byly počty bakterií větší než u jarního pokusu.

Sledování rozkladu NMP bylo provedeno ve třech z připravených lahvích. V každé skupině vzorků byla navíc jedna láhev bez přidání NMP, do zbylých tří lahví byl přidán NMP v koncentraci 300 mg/l. Všechny láhve byly kultivovány při 25 °C na třepačce a během kultivace byl sledován vznik zákalu. V určitých časových intervalech byly z lahví, které obsahovaly NMP, odebírány vzorky pro zjištění hodnoty DOC. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9 a 10.

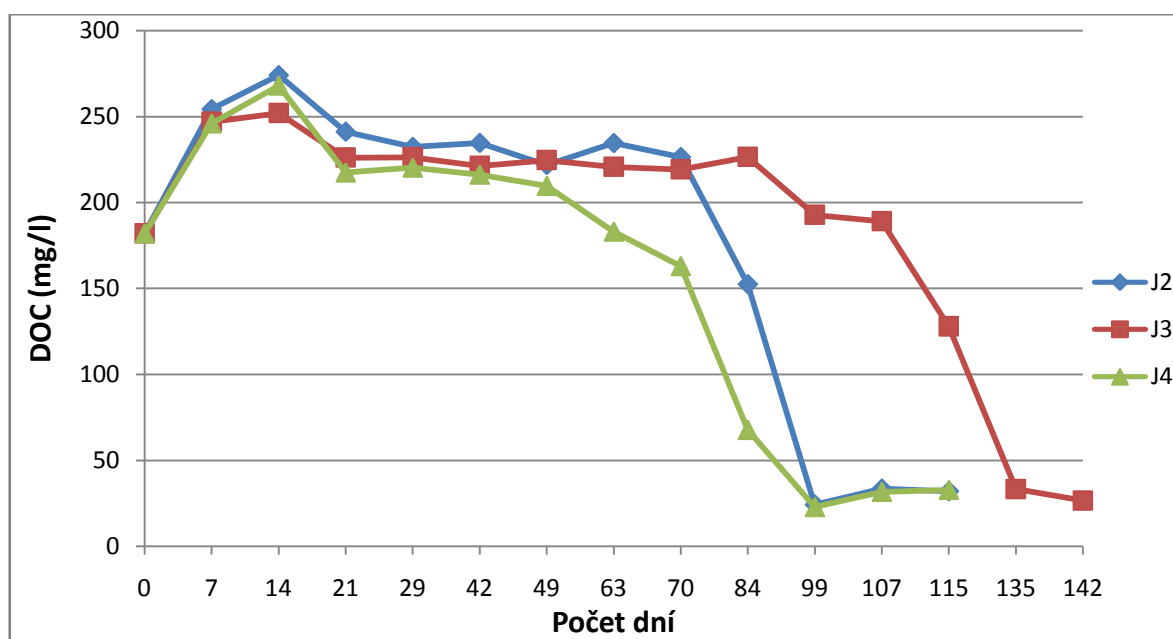
**Tab. 9.** Koncentrace DOC ve vzorcích vody J  
během kultivace - podzimní pokus

Počet dní	DOC ve vzorcích [mg/l]		
	J2	J3	J4
0	181,98	181,98	181,98
7	254,00	246,96	246,00
14	274,00	252,00	268,00
24	241,08	226,16	217,44
29	232,24	226,32	220,28
42	234,56	221,28	216,24
49	221,76	224,64	209,68
63	234,52	220,76	183,04
70	226,36	219,24	162,96
84	152,40	226,52	67,68
99	24,11	192,84	22,82
107	33,41	189,08	31,65
115	31,91	127,92	32,78
135	-	33,22	-
142	-	26,61	-

**Tab. 10.** Koncentrace DOC ve vzorcích vody R  
během kultivace - podzimní pokus

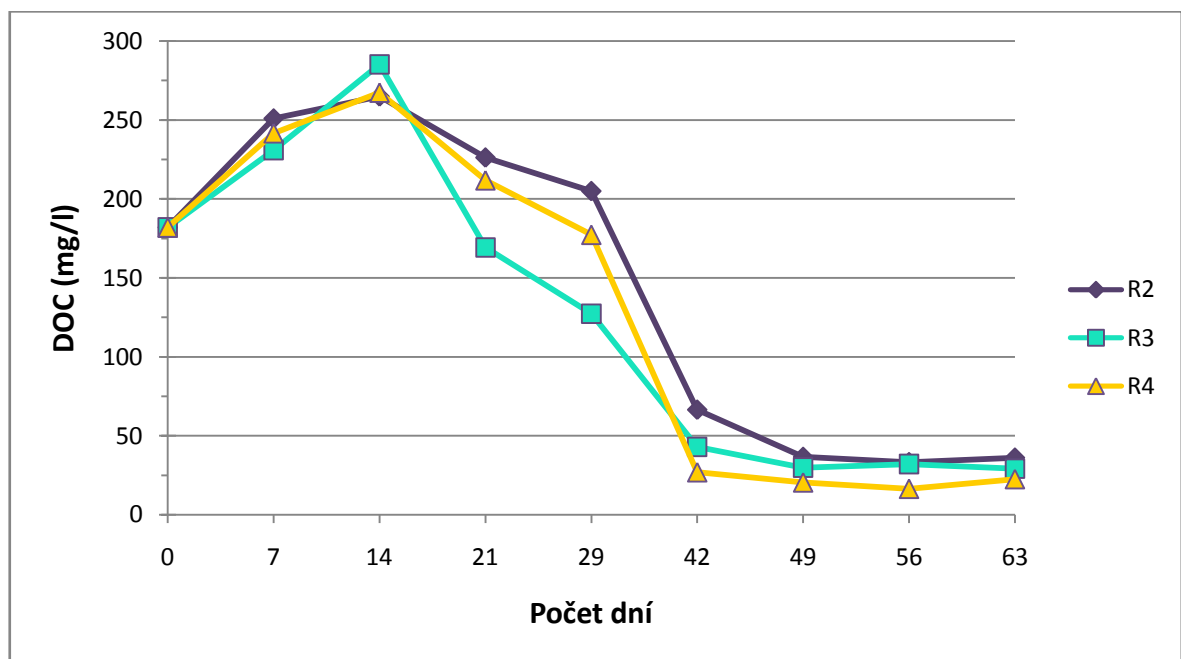
Počet dní	DOC ve vzorcích [mg/l]		
	R2	R3	R4
0	181,85	181,85	181,85
7	250,80	230,80	241,48
14	264,76	285,12	267,20
24	226,08	169,16	211,68
29	204,84	127,2	177,20
35	216,88	144,6	140,28
42	66,40	42,92	26,92
49	36,52	29,83	20,48
56	33,18	32,06	16,46
63	36,03	29,14	22,57

Z hodnot v tabulkách 9. a 10. lze říci, že degradace NMP proběhla ve všech zkoumaných lahvích s přidavkem NMP. Data z podzimního pokusu byly taky zpracovány do grafů, jsou uvedeny na obrázcích 4 a 5.



**Obr. 4.** Graf biodegradace NMP podzimní pokus - vzorky J v lahvích č. 2,3,4.

Z počátku probíhaly mikrobiální procesy v lahvích se vzorkem J stejně a docházelo k mírnému růstu DOC. Kolem 21. dne došlo k mírnému poklesu na hodnoty výchozí. Pak hodnoty zůstávaly poměrně konstantní až do 49. dne. V láhvi J4 došlo poté k rychlejší degradaci než u ostatních zkoumaných lahví. K úplné degradaci došlo po 99 dnech kultivace, kdy i u láhve J2 došlo k úplné degradaci NMP, i přesto, že rychlejší degradace v láhvi J2 nastala během 70 dne kultivace. Poněkud pomaleji degradace probíhala v láhvi J3, kde trvala 142 dní.



**Obr. 5.** Graf biodegradace NMP podzimní pokus - vzorky R v lahvích č. 2, 3, 4.

Degradace NMP v lahvích R u podzimního pokusu trvala kratší dobu, s porovnáním ostatních pokusů, i přes nižší hodnoty počtu bakterií než měly láhve J. Rozklad byl prakticky ukončen ve 49. dni pokusu, hodnoty DOC již poté neklesaly.

U všech grafů si můžeme všimnout, že křivky na počátku rostou. Stalo se tak pravděpodobně díky rozpadu některých bakterií. Došlo tím k uvolnění organického uhlíku, a proto hodnoty narostly.

### 5.3 Získání bakterií, které jsou schopné degradovat NMP

Během pokusu jsme se snažili získat čisté kultury, které mají schopnost degradovat NMP a využívat NMP jako zdroj uhlíku a energie. Jako vzorky pro získání takových bakterií byly použity suspenze z pokusů biodegradace NMP z obou pokusů.

Vzorky byly naočkovány na minerální agar (MA, pro srovnání), TYA agar a minerální agar s NMP. Po kultivaci byly hledány kolonie bakterií, vyrostené na minerálním agaru s NMP, které však nebyly přítomné na minerálním agaru (nebo tam byly vyrostlé jen velmi slabě). Následným přeočkováním takových kolonií na stejné živné agary byly postupně vypěstovány 3 kultury, které rostly lépe na minerálním agaru s NMP než na ostatních agarrech.

Získání některých čistých kultur bylo komplikované. Některé kultury narostly až během 14 dní kultivace, a tak se prodloužila celková doba získání čistých kultur. Z počátku izolace byly také některé přeočkovávané kultury kontaminovány rychleji rostoucími bakteriemi, pravděpodobně rodu *Pseudomonas* (předpokládáno díky tvorbě žlutozeleného barviva). Přeočkovávání degradačních bakterií tak muselo být vícekrát opatrně opakováno, aby nebyly kontaminující mikroorganismy přeneseny do dalších misek. Získání čistých kultur se tím značně prodloužilo a probíhalo po dobu 3 měsíců.

Nakonec byly získány tři kultury se schopností degradovat NMP. Z jarního pokusu byly použity vzorky z lahví J a R. Kultury byly označeny J2O a R0. Z podzimního vzorku byla kultura nazvána R4P. Fotografie kultur jsou zobrazeny v příloze P I.

K orientační identifikaci kultur bylo použito Gramovo barvení. Všechny zkoumané kultury se projeví jako gramnegativní tyčinky. U kultury R4P se některé tyčinky zbarví do tmavší červené.

Všechny získané kultury byly zakonzervovány smícháním s glycerolem a uložením do mrazáku s teplotou  $-80^{\circ}\text{C}$ , pro případná další studia.



## ZÁVĚR

Jak napovídá nadpis bakalářské práce, cílem bylo zjistit biodegradaci N-methyl pyrrolidonu (NMP) v pramenných vodách. Dílčím cílem bylo případně izolovat a orientačně identifikovat bakteriální kultury se schopností NMP degradovat.

Celkem proběhly dva pokusy. Při jarním, orientačním pokusu, byly prozkoumány 2 vzorky J a R. Od každého vzorku byly odebrány 3 láhve. Do dvou lahví byl přidán roztok minerálů a roztok s NMP, kdy vznikla koncentrace 300 mg NMP/l. Láhve byly kultivovány při 25 °C na třepačce. V jarním pokusu byl zjištěn malý počet heterotrofních bakterií. V průběhu kultivace byly odebírány dílčí vzorky pro stanovení DOC. Hodnoty DOC byly důležité pro určení degradace a ukázaly, že během 140 dní proběhla degradace NMP ve všech zkoumaných lahvích. Konečné hodnoty DOC se pohybovaly mezi 20 - 45 mg/l, oproti výchozím hodnotám DOC kolem 180 mg/l.

V podzimním pokusu probíhal pokus ve 4 lahvích od každého vzorku. Byl přidán roztok minerálů, roztok s NMP, kdy vznikla koncentrace 300 mg NMP/l. Láhve byly kultivovány na třepačce při 25 °C. V pravidelných časových intervalech byly odebírány vzorky pro stanovení DOC. Podle hodnot DOC se ukázalo, že u vzorku R proběhla degradace během 49 dní. Konečné hodnoty DOC byly 22 - 36 mg/l. U vzorků J se čas degradace v jednotlivých lahvích poněkud lišil. V láhvi J3 trvala degradace delší dobu než u ostatních a to 142 dní; u ostatních lahvích nastal rozklad NMP během 99 dnů. Celkově však bylo možné konstatovat, že i tak došlo k degradaci u všech zkoumaných lahví.

V průběhu pokusů byla snaha získat čisté kultury se schopností degradace NMP. Vzorky vod byly asepticky napipetovány na Petriho misky s minerálním agarem+ NMP, TYA agarem a pro srovnání na minerální agar. I při komplikacích, daných pomalým růstem některých kultur a kontaminujícími rychle rostoucími mikroorganismy, se podařilo získat tři čisté kultury. Z jarního pokusu to byly kultury J20 a R0. Z podzimního pokusu R4P. K hrubé identifikaci všech tří kultur bylo použito Gramovo barvení, které prokázalo, že kultury J20, R0 i R4P jsou gramnegativní a jde o tyčinky.

Výsledky práce ukázaly, že v použitých vzorcích pramenné vody jsou určité bakterie, které využívají N-methyl pyrrolidon jako substrát a tak dochází k jeho biodegradaci. Úplná degradace nastala po relativně dlouhé době u vzorků J, jak u jarního, tak i podzimního pokusu. U podzimního pokusu u vzorku R probíhala degradace nejkratší dobu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Bezpečnostní lista Penta. *N-Methyl-2-Pyrrolidon* [online] [cit. 2014-02-20]  
Dostupné z: [http://www.pentachemicals.eu/bezp\\_listy/m/bezplist\\_640.pdf](http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/m/bezplist_640.pdf)
- [2] LoyndellBasell. *N-Methyl-2-Pyrrolidone (NMP)* [online] [cit. 2014-02-20 ]  
Dostupné z: <http://www.lyondellbasell.com/Products/ByCategory/basic-chemicals/PerformanceChemicalsAndSolvents/N-Methyl-2-Pyrrolidone/>
- [3] Merck Millipore. *Methyl-2-Pyrrolidon* [online] [cit. 2014-03-05]  
Dostupné z: [http://www.merckmillipore.com/czech-republic/chemicals/1-methyl-2-pyrrolidon/MDA\\_CHEM-806072/p\\_uuid&PortalCatalogUUID=MLmb.s1LAPoAAAEWr9gfVhTl&BackButtonText=search+results](http://www.merckmillipore.com/czech-republic/chemicals/1-methyl-2-pyrrolidon/MDA_CHEM-806072/p_uuid&PortalCatalogUUID=MLmb.s1LAPoAAAEWr9gfVhTl&BackButtonText=search+results)
- [4] United States Environmental Protection Agency. *N-methylpyrrolidone*. [online] [cit. 2014-03-05]  
Dostupné z: <http://www.epa.gov/opprd001/inerts/methyl.pdf>
- [5] SHUI TSE CHOW, TJU LIK NG, *The biodegradation of N-methyl-2-pyrrolidone in water by sewage bacteria*, Water Research Vol. 17, pp 117-118, Great Britain 1983
- [6] CHYTRÝ, M., KUČERA, T. a kolektiv, *Katalog biotopů České republiky*, druhé vydání; Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha 2010
- [7] ALLAN, J., JOHNSON, L., Catchment - Scale analysis of aquatic ecosystems. *Fresh water Biology* 1997;37:107–11.
- [8] Maitland PS. New horizons — new species ? The invertebrate fauna of unexplored aquatic habitats in Scotland. *Aquatic conservation-marine and fresh water ecosystems* 1999; 9: 529–34.
- [9] Murray BBR, Zeppel MJB, Hose GC, Eamus D. Groundwater-dependent ecosystems in Australia: it's more than just water for rivers. *Ecological Management & Restoration* 2003;4:110–3.
- [10] MARY, P., a kolektiv, *Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: a case study*, *Journal of Applied Microbiology* 1999

- [11] RUCKMANI, A., CHAKRABARTI, T., *Analysis of Bacterial Community composition of a Spring water from the Western Ghats, India Using Culture Dependent and Molecular Approaches*, Current Microbiology, pp 7-15, 2011
- [12] KŘÍŽEK, K. *Diplomová práce - Studium bakterií rozkládajících strukturní analogy vinylpyrrolidonu*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012
- [13] FUSKOVÁ, J. *Bakalářská práce - mikrobiální degradace N-methyl-2-pyrrolidonu v povrchové stojaté vodě*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013
- [14] Beskydy, *Přírodní park Vizovické vrchy*, [online] [cit. 2013-05-06]  
Dostupné z: <http://zajimavosti.beskydy.cz/content/zlinsko-hostynske-vrchy-prirodni-zajimavosti-chranena-uzemi-pp-vizovicke-vrchy.aspx>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

NMP	N-methyl pyrrolidon
TSBA	Tryptický sojový bujón
PCA	Plate count agar
TD	100x zředěný TSBA agar s nízkou koncentrací živin
DP	Diplomová práce
BcP	Bakalářská práce
UIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
TYA	Trypton yeast extract agar
MT	Minerální agar s tryptonem, kvasničným autolyzátem a sojovým peptonem
MA	Minerální agar
MA+NMP	Minerální agar s NMP
DOC	Organický rozpuštěný uhlík

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1	Struktura NMP.....	12
Obrázek 2	Graf biodegradace NMP jarní pokus - vzorky J v láhvi č. 2 a č.3.....	26
Obrázek 3	Graf biodegradace NMP jarní pokus - vzorky R v láhvi č. 2 a č.3.....	27
Obrázek 4	Graf biodegradace NMP podzimní pokus - vzorky J v láhvi č. 2,3,4 .....	30
Obrázek 5	Graf biodegradace NMP podzimní pokus - vzorky R v láhvi č. 2,3,4 .....	31

**SEZNAM TABULEK**

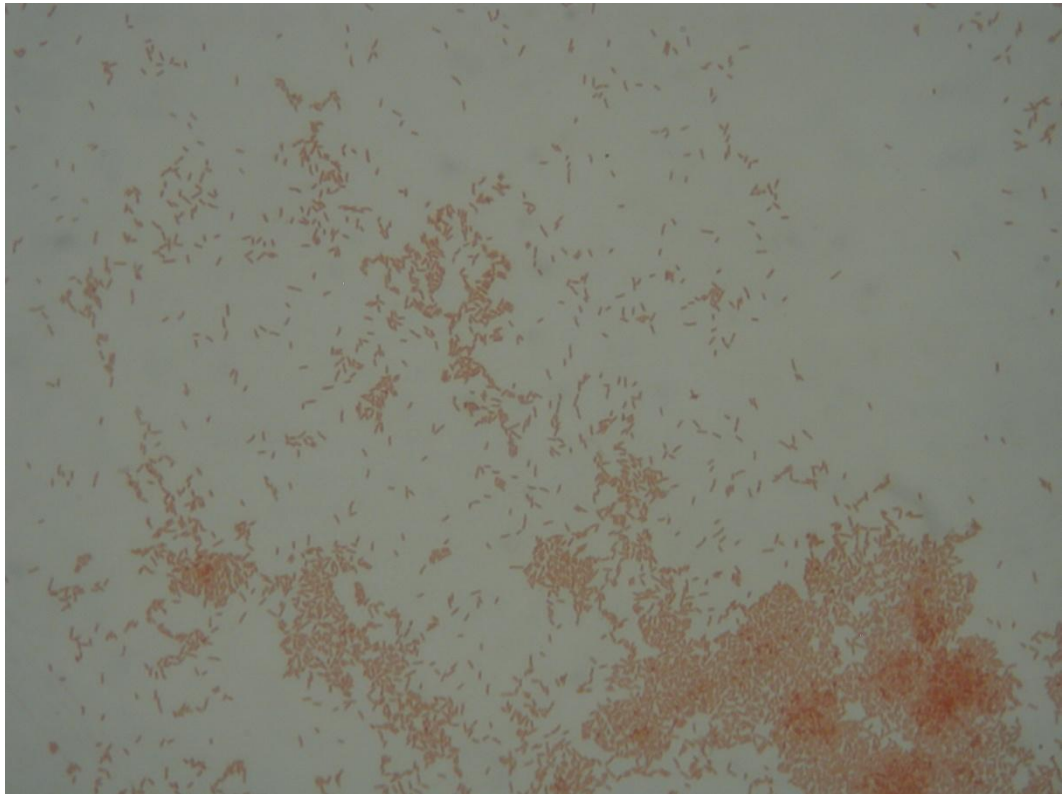
Tabulka 1	Fyzikálně-chemické vlastnosti NMP.....	12
Tabulka 2	Zásobní roztok solí - složení.....	17
Tabulka 3	Zásobní roztok minerálů -složení .....	17
Tabulka 4	Minerální agar - složení.....	18
Tabulka 5	Složení MA.....	18
Tabulka 6	Počet heterotrofních bakterií ve vzorcích - jarní pokus.....	25
Tabulka 7	Koncentrace DOC ve vzorcích během kultivace - jarní pokus .....	26
Tabulka 8	Počet heterotrofních bakterií ve vzorcích - podzimní pokus.....	28
Tabulka 9	Koncentrace DOC ve vzorcích J během kultivace - podzimní pokus .....	29
Tabulka 10	Koncentrace DOC ve vzorcích R během kultivace - podzimní pokus.....	30

## SEZNAM PŘÍLOH

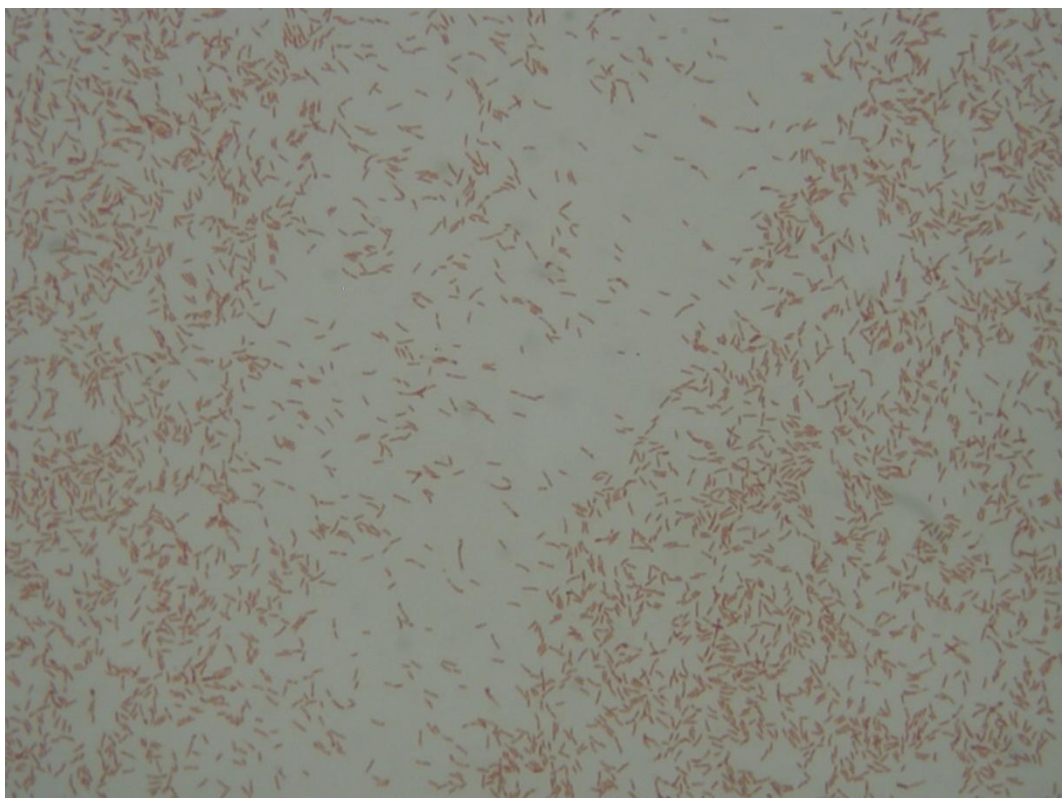
Příloha P I Gramovo barvení

Příloha P II Získané kultury se schopností degradace NMP

## PŘÍLOHA P I: GRAMOVO BARVENÍ

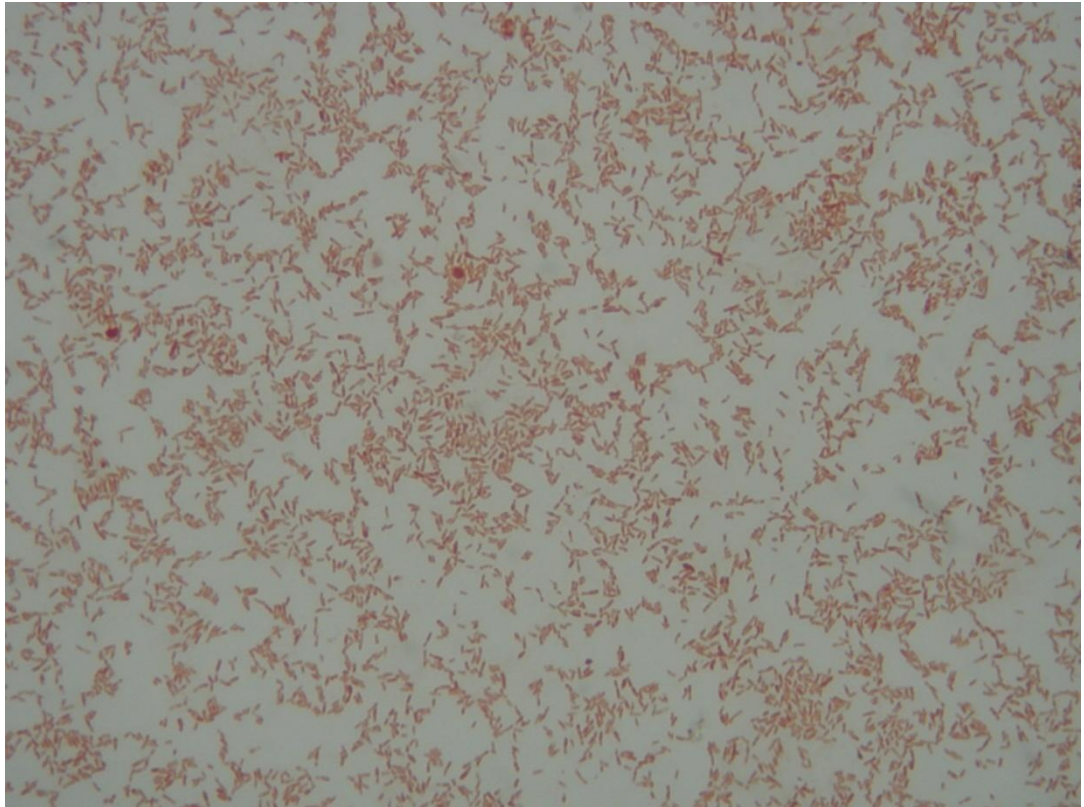


Kultura J20 - gramnegativní tyčinky



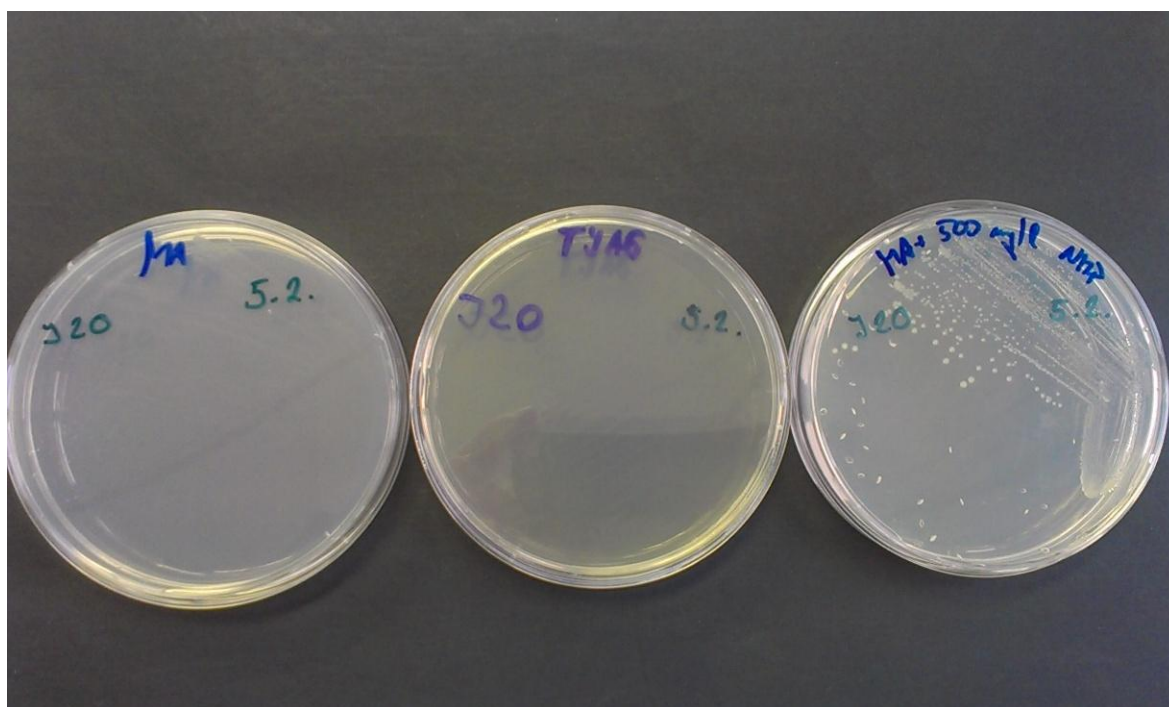
Kultura R0 - gramnegativní tyčinky



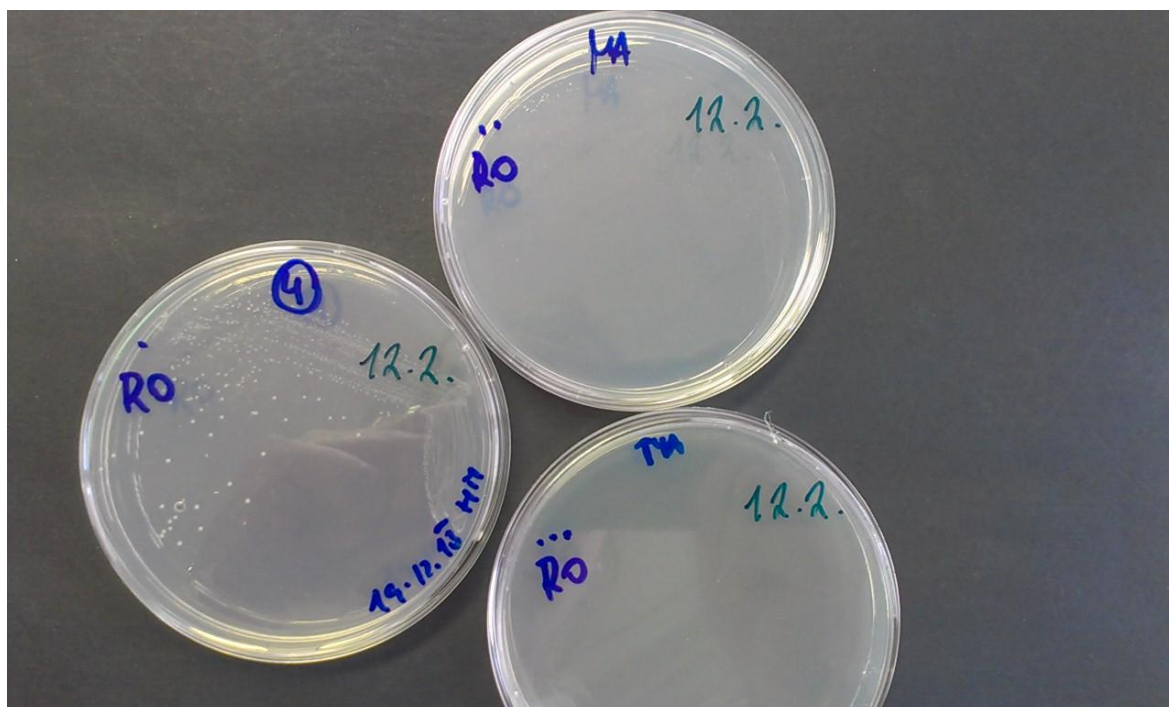


Kultura R4P - gramnegativní tyčinky

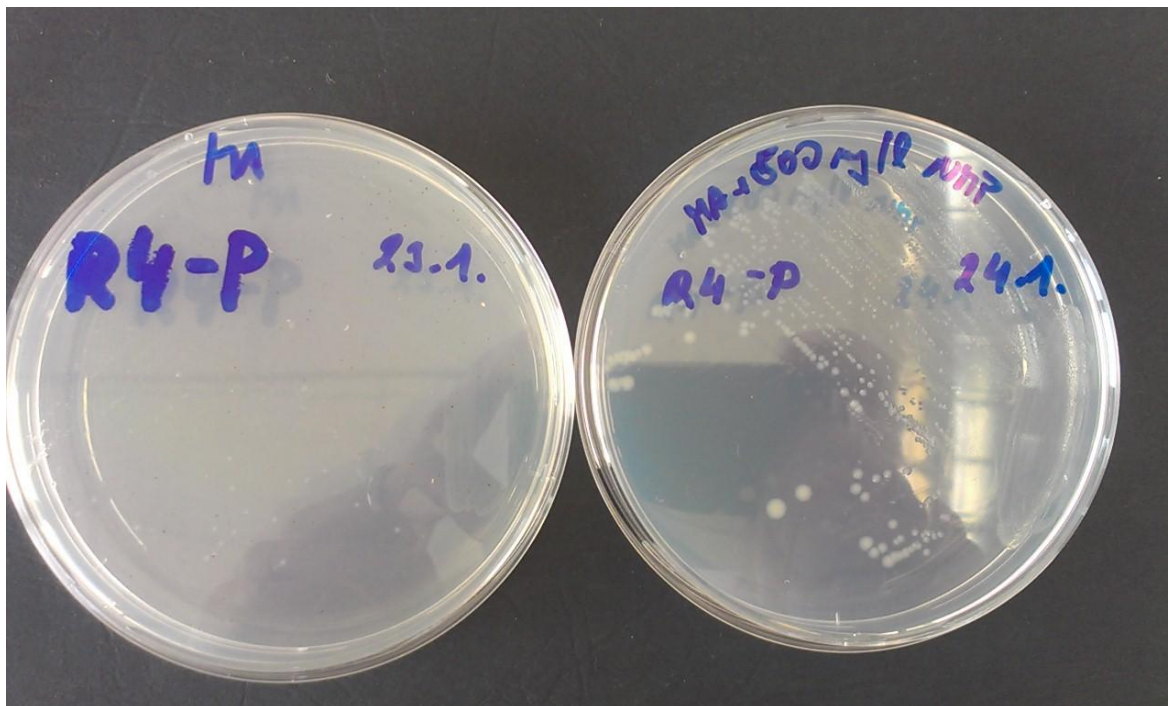
## PŘÍLOHA P II: ZÍSKANÉ KULTURY SE SCHOPNOSTÍ DEGRADACE NMP



Získané kultura J20 se schopností degradovat NMP - porovnání agarů



Porovnání růstu na určitých agarech u kultury RO



Rozdíl růstu kolonií na minerálním agaru a MT + NMP u kultury R4P