

# Mikrobiální degradace 1-oktyl 2-pyrrolidonu v povrchových vodách

Zlata Novotná

---

Bakalářská práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zlata Novotná**  
Osobní číslo: **T120002**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Mikrobiální degradace 1-oktyl 2-pyrrolidonu  
v povrchových vodách**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte odběr vzorků říční vody a stanovte v ní počet psychrofilních bakterií kultivační metodou.
2. V odebraných vzorcích proveďte testy biodegradace 1-oktyl 2-pyrrolidonu.
3. 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 1-oktyl 2-pyrrolidonu.  
Předcházející Bc. práce vypracované na ÚIOŽP v letech 2012 až 2014.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

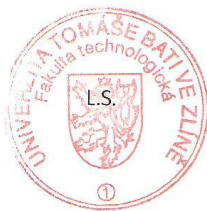
**20. ledna 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**22. května 2015**

Ve Zlíně dne 10. února 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



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

Příjmení a jméno: NOVOTNÁ JIŘATA

Obor: ICŽP

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 10.5.2015

Novotná

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

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

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

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

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

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

V mé bakalářské práci se zabývám tematikou mikrobiální degradace 1-oktyl 2-pyrrolidonu v povrchové tekoucí vodě. Vzorek vody pocházel z řeky Dřevnice, která protéká Zlínem. Kromě sledování mikrobiální rozložitelnosti bylo v práci také provedeno kultivační stanovení heterotrofních bakterií v dané vodě a byly také učiněny pokusy o izolaci degradačních bakterií ze vzorků. V podobě smíšené kultury bylo též sledováno následné pomnožení degradujících mikroorganismů při různých koncentracích 1-oktyl 2-pyrrolidonu.

Klíčová slova: mikrobiální degradace, 1-oktyl 2-pyrrolidon, kultivační stanovení, izolace bakterií

## **ABSTRACT**

In my work I deal with the theme of the microbial degradation of the 1-octyl 2-pyrrolidone in surface running water. The water sample originated from the Dřevnice river flowing across Zlín. In addition to determination of microbial degradability the counts of culturable heterotrophic bacteria were found and several attempts to isolate degrading bacteria from water samples were done. Furthermore, subsequent propagations of degrading microbial consortium at different 1-octyl 2-pyrrolidone concentrations were performed.

Keywords: microbial degradation, 1-octyl 2-pyrrolidone, culturable bacteria, bacteria isolation

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, ochotu a za svůj čas, který mi věnoval při přípravě mé bakalářské práce.

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

# OBSAH

ÚVOD .....	9
I TEORETICKÁ ČÁST .....	10
1 1-OKTYL 2-PYRROLIDON.....	11
1.1 POUŽITÍ.....	11
1.2 VLASTNOSTI.....	11
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	13
2 POKUSY O MIKROBIÁLNÍ DEGRADACI OP.....	14
2.1 KULTIVAČNÍ STANOVENÍ CELKOVÝCH POČTŮ HETEROTROFNÍCH PSYCHROFILNÍCH BAKTERIÍ VE SLEDOVANÝCH VZORCÍCH ŘÍČNÍ VODY.....	14
2.1.1 Postup.....	14
2.2 SLEDOVÁNÍ MIKROBIÁLNÍHO ROZKLADU OKTYLPYRROLIDONU VE VZORKU VODY.....	14
2.2.1 Postup.....	14
2.3 POKUSY O DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ ZE VZORKŮ VOD.....	15
2.3.1 Složení minerálního agaru na 100 ml.....	15
2.3.2 Příprava agarů.....	16
2.3.3 Postup.....	16
2.4 POMNOŽENÍ DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ.....	16
2.4.1 Složení minerálního média na 100ml.....	17
2.4.2 Příprava minerálního média.....	17
2.4.3 Postup.....	17
3 VÝSLEDKY.....	20
3.1 POČET HETEROTROFNÍCH PSYCHROFILNÍCH BAKTERIÍ V ŘÍČNÍ VODĚ.....	20
3.2 SLEDOVÁNÍ ROZKLADU OKTYLPYRROLIDONU V ŘÍČNÍ VODĚ.....	21
3.3 POKUSY ISOLACÍ A KULTIVACÍ PŘI ZVÝŠENÝCH KONCENTRACÍCH.....	22
ZÁVĚR .....	24
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	26
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	27
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	28
SEZNAM TABULEK .....	29



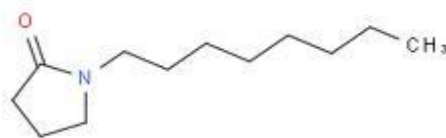
## ÚVOD

Je známo, že lidé při průmyslových výroбах produkují různé sloučeniny, které mohou být zdraví škodlivé a mohou nejrůznějšími způsoby ovlivňovat jednotlivé sféry vnějšího prostředí. Tyto sloučeniny se mohou dostávat do ovzduší, půdy a povrchových i podzemních vod. Proto je pro nás užitečné vědět, zda jsou v daném prostředí mikroorganismy, schopné rozkladu průmyslově využívaných sloučenin, a také jak dlouho takový rozklad trvá. Cílem této práce je tedy stanovení počtu psychrofilních bakterií ve vzorku říční vody kultivační metodou a poté provedení testů biodegradace 1-oktyl 2-pyrrolidonu v odebraných vzorcích vody.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 1-OKTYL 2-PYRROLIDON

O mikrobiální rozložitelnosti 1-oktyl 2-pyrrolidonu (OP, oktylpyrrolidon) nejsou doposud známé žádné informace ve vědecké literatuře. Struktura látky je uvedena níže, na obr. 1.



Obr. 1. Struktura 1-oktyl 2-pyrrolidonu<sup>1</sup>

### 1.1 Použití

1-oktyl 2-pyrrolidon se používá jako rozpouštědlo pro polymery a hydrofobní látky, dále jako smáčedlo v tiskových procesech, změkčovadlo nebo čistič kovů. Své využití může najít i jako čisticí prostředek ve farmaceutickém průmyslu a také ve veterinární medicíně. Je meziproduktem používaným při výrobě agrochemikálií, elektroniky, průmyslových chemikálií. Může být též počáteční produkt pro chemické syntézy nebo solvent.<sup>2</sup>

### 1.2 Vlastnosti

Jedná se o kapalinu slabého zápachu jako amin, bezbarvého až nažloutlého zbarvení s vysokým bodem varu (306 – 307 °C) a nízkým tlakem par. Je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, toxický pro vodní organismy, netěkavý a má povrchově aktivní vlastnosti. Špatně se rozpouští ve vodě (rozpustnost je přibližně do 1 g/l), avšak rozpouští se ve všech organických rozpouštědlech.<sup>3</sup> Jeho hustota činí zhruba 0,9 g/ml,

molekulová hmotnost 197,3. Teplota tání 1-oktyl 2-pyrrolidonu je  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$  a bod vzplanutí  $1421\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>4</sup> Je žíravý, leptá kůži, oči a dýchací cesty.<sup>2</sup>

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## **2 POKUSY O MIKROBIÁLNÍ DEGRADACI OP**

### **2.1 Kultivační stanovení celkových počtů heterotrofních psychrofilních bakterií ve sledovaných vzorcích říční vody**

#### **2.1.1 Postup**

Vzorek každé odebrané vody byl asepticky napipetován do 6 sterilních petriho misek.

2 x 0,1 ml, 2 x 10  $\mu$ l, 2 x 1  $\mu$ l (1  $\mu$ l byl dávkován jako 100  $\mu$ l 100-krát zředěného vzorku).

2 misky z každého ředění byly zality sterilním vlašným TYA agarem (Trypton Yeast Extract Agar) a dvě misky R2A agarem. Po dokonalém promíchání se ponechaly ztuhnout. Všechny misky byly kultivovány psychrofilně při 23°C ve tmě. Odečet počtu kolonií proběhl následně po 7 a následně 30 dnech.

### **2.2 Sledování mikrobiálního rozkladu OP ve vzorku vody**

#### **2.2.1 Postup**

Do 3 sterilních láhví bylo sterilním válečkem nadávkováno po 50 ml vzorku vody, do všech láhví byl přidán sterilní zásobní roztok minerálních solí (0,5 ml do každé láhve) a do všech láhví bylo automatickou pipetou přidáno 5,5  $\mu$ l sterilního oktylpyrrolidonu (vznikla tedy koncentrace 100 mg/l) a vše bylo dokonale promícháno. Zásobní roztok minerálních solí byl svým složením identický složení minerálního média, které je uvedeno níže, v části 2.4.1

Všechny láhve byly kultivovány při 25°C na laboratorní vratné třepače, při 100 cyklech za minutu a byl sledován vznik případného zákalu coby indikátoru množení bakterií. V průběhu kultivace byl prováděn aseptický odběr vzorků, odstranění buněk filtrací přes MILLIPORE MCE 0,22  $\mu$ m a ve filtrátu byla stanovována koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) jako indikátoru rozkladu a mineralizace oktylpyrrolidonu. Stanovení DOC bylo prováděno pomocí automatického analyzátoru uhlíku Shimadzu 5000A.

Kromě uvedených tří lahví bylo ještě do 2 kádinek nadávkováno po 50 ml vzorku říční vody, byl přidán sterilní zásobní roztok minerálních solí (po 0,5 ml) a přidáno po 5,5  $\mu$ l sterilního oktylpyrrolidonu. Poté byl z každé kádinky, po dokonalém promíchání, dvojmo odebrán vzorek 3 ml, který byl zředěn 3 ml destilované vody (tedy ředění 2x) a po filtraci přes MILLIPORE MCE 0,22  $\mu$ m v nich byla stanovena hodnota DOC (pro zjištění vstupní hodnoty DOC v pokusu).

Kromě toho byla hodnota DOC změřena i v samotné říční vodě (bez přídavku čehokoliv), po filtraci přes identický filtr (pro odstranění buněk). Provedlo se dvojí stanovení, bez ředění.

Při založení pokusu bylo do 1 sterilní lahve nadávkováno 50 ml říční vody, po filtraci přes MILLIPORE MCE 0,22  $\mu$ m, (čímž byl vzorek zbaven mikroorganismů) byl přidán sterilní zásobní roztok minerálních solí (0,5 ml) a 5,5  $\mu$ l sterilního oktylpyrrolidonu. Vše tedy bylo sterilní tak, aby k rozkladu nedošlo. Tato láhev byla inkubována společně s třemi pokusnými lahvemi, nebyly z ní odebírány žádné vzorky, až na konci pokusu, pro stanovení DOC (ředění 1 : 1). Tato lahev sloužila pro důkaz, že oktylpyrrolidon nepodléhá ve vodě hydrolyze, nerozkládá se a nemineralizuje samovolně.

### 2.3 Pokusy o izolaci degradačních bakterií ze vzorků vod

Byly připraveny jednak petriho misky s minerálním agarem (MA) a jednak petriho misky s minerálním agarem a příslušnou sloučeninou (oktylpyrrolidonom) o koncentraci 120 mg/l.

#### 2.3.1 Složení minerálního agaru na 100 ml

0,1g  $K_2HPO_4$

0,11g  $NH_4Cl$

0,02g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0,001g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

0,001g  $CaCl_2$

0,1ml roztok stopových prvků

1,7g agar

100,0 ml destilovaná voda

Navážka 1,9 g základu byla suspendována ve 100 ml destilované vody, byl přidán roztok stopových prvků a po nabotnění následovala sterilizace v autoklávu při 121°C po dobu 25 minut.

### 2.3.2 Příprava agarů

Samotný minerální agar o objemu 150 ml byl nadávkován do 9 petriho misek. Do dalších 150 ml bylo po sterilizaci asepticky přidáno 20  $\mu$ l oktylpyrrolidonu a proběhlo nadávkování do dalších 9 petriho misek.

### 2.3.3 Postup

Říční voda po proběhlé degradaci oktylpyrrolidonu byla jemně protřepána se sterilními skleněnými kuličkami a asepticky napipetována v objemu 5  $\mu$ l na dvě petriho misky s oktylpyrrolidonem a na jednu petriho misku s minerálním agarem. Kromě toho byl na jednu petriho misku s minerálním agarem a jednu petriho misku s oktylpyrrolidonem vzorek napipetován v objemu 50  $\mu$ l. Inokula byla rozetřena sterilní skleněnou hokejkou po celé ploše misek. Inkubace probíhala ve tmě při 25°C po dobu 3 týdnů, kontrola probíhala vždy po několika dnech.

Při kontrole bylo pátráno po koloniích, které rostly lépe na MA s oktylpyrrolidonem než na samotném MA.

## 2.4 Pomnožení degradačních bakterií

Cílem pokusu bylo pomnožit hledané degradační bakterie a přitom zjistit, při jaké koncentraci oktylpyrrolidonu jsou ještě schopné jej rozkládat a využívat pro svůj růst.



### 2.4.1 Složení minerálního média na 100 ml

2ml Roztok A (9,07 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /1000 ml)

8ml Roztok B (23,90 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /1000 ml)

85ml Destilovaná voda

0,2ml Roztok stopových prvků

1ml  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $10 \text{ g.l}^{-1}$ )

1ml  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $3 \text{ g.l}^{-1}$ )

1ml  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g.l}^{-1}$ )

1ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $30 \text{ g.l}^{-1}$ )

1ml  $\text{NaCl}$  ( $50 \text{ g.l}^{-1}$ )

### 2.4.2 Příprava minerálního média

Bylo připraveno minerální médium o objemu 250 ml. Poté bylo rozplněno po 15 ml do inkubačních lahví o objemu 100 ml a ty byly sterilizovány.

### 2.4.3 Postup

Během sterilizace byla připravena suspence mikroorganismů, která se skládala ze směsi biomasy z původních inkubačních lahví, ve kterých probíhal primární rozklad oktylpyrrolidonu, a ze směsi kolonií z petriho misek z pokusu o izolaci degradačních bakterií.

Po sterilizaci a zchladnutí láhví byly do 7 z nich přidány níže uvedené objemy koncentrovaného oktylpyrrolidonu, čímž vznikly koncentrace v rozmezí 100-2500 mg/l.

Tabulka 1 – Přidávané koncentrace oktylpyrrolidonu v 1. pokusu

Číslo lahve (objem média 15 ml)	Přídavek koncentrovaného oktylpyrrolidonu [μl]	Koncentrace oktylpyrrolidonu [mg/l]
1	1,7	100
2	3,4	200
3	5,0	300
4	8,3	500
5	12,4	750
6	16,7	1000
7	41,7	2500

Všechny láhve byly zaočkované 10 μl připravené mikrobiální směsné suspence a byly inkubovány při 25°C na třepačce. Následně byl po dobu několika týdnů sledován vznik zákalu coby indikátoru množení bakterií.

### Druhý pokus o opětovné pomnožení bakterií

Poté následoval pokus o opětovné pomnožení degradačních bakterií. Cílem bylo znovu pomnožit hledané bakterie a získat fyziologicky mladé buňky (pro další isolační pokus) a také přesněji zjistit, při jaké koncentraci oktylpyrrolidonu jsou bakterie ještě schopné jej rozkládat. Do šesti lahví bylo rozděleno minerální medium, potom přišla na řadu sterilizace. Poté byly přidány různé objemy koncentrovaného oktylpyrrolidonu (viz Tab. 2) a každá láhev byla zaočkována inokulem (10 μl suspence z předchozího pokusu, z lahve o koncentraci OP 100 mg/l).

Tabulka 2 – Přidávané koncentrace oktylpyrrolidonu v 2. pokusu

Číslo lahve (objem média 15ml)	Koncentrace OP [mg/l]
1	100
2	125
3	150
4	175
5	200
6	250

### Druhý pokus o izolaci degradačních bakterií

Další pokus o izolaci byl proveden s použitím minerálního agarů s bromthymolovou modří (složení identické s minerálním agarem, ale s přidavkem 5 mg br. modří/l). Bromthymolová modř nám měla pomoci lépe vidět narostlé bakteriální kolonie a také zjistit, zda nedochází k poklesu pH. Jako výchozí inokulum byla použita lahev č. 3 z předchozího pomnožovacího pokusu, jelikož se v ní vyskytovalo velké množství volných bakterií (zákaly média). Do dvou petriho misek byl nalit čistý minerální agar, na další dvě misky minerální agar s oktylpyrrolidonem. Následovalo napipetování suspenze o objemech 1  $\mu$ l a 5  $\mu$ l a jejich rozetření skleněnou sterilní hokejkou po celé ploše. Misky byly kultivovány ve tmě při 23°C po dobu asi třech týdnů.

### 3 VÝSLEDKY

#### 3.1 Počet heterotrofních psychrofilních bakterií v říční vodě

Na počátku práce byl kultivačně stanoven počet této nejvýznamnější skupiny mikroorganismů sledované vody. Dle postupu uvedeného v metodické části byly získány výsledky počtu kolonií, které jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3 – Počet kolonií po 7 dnech

Po 7 dnech kultivace		
Ředění vzorku[ml]	Počet kolonií na R2A	Počet kolonií na TYA
$10^{-3}$	65	
$10^{-3}$	91	
$10^{-2}$	-	98
$10^{-2}$	-	111
$10^{-1}$	-	-
$10^{-1}$	-	-

Tabulka 4 – Počet kolonií po 30 dnech

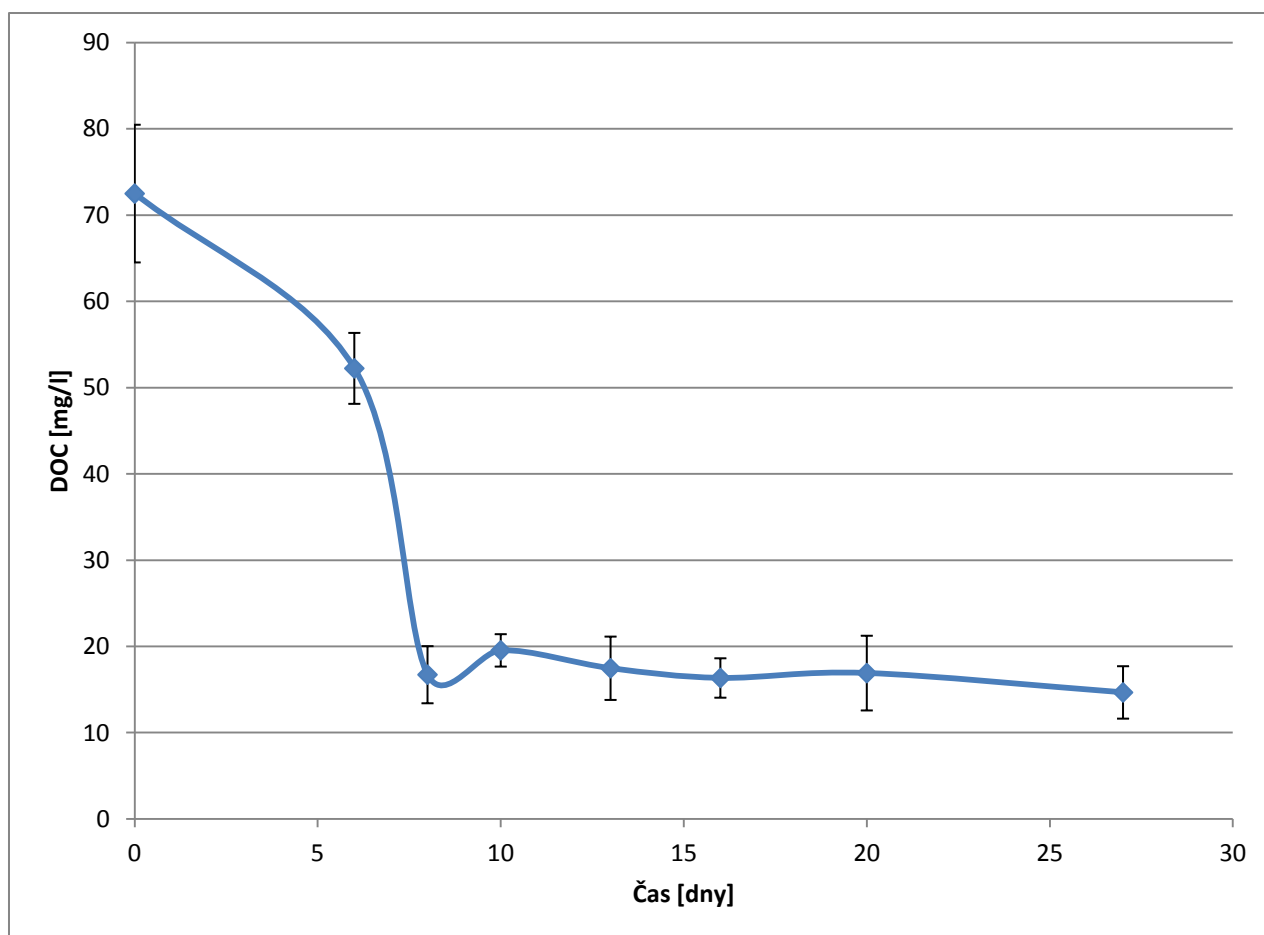
Po 30 dnech		
Ředění vzorku[ml]	Počet kolonií na R2A	Počet kolonií na TYA
$10^{-3}$	121	24
$10^{-3}$	124	15
$10^{-2}$	-	131
$10^{-2}$	-	159
$10^{-1}$	-	-
$10^{-1}$	-	-

Již po 7 dnech kultivace bakterií na petriho miskách bylo patrné, že na R2A agaru vyrostlo více bakteriálních kolonií než na TYA agaru. Při ředění vzorku  $10^{-3}$  byly kolonie ještě dobře počítatelné, ve stejném ředění na TYA agaru ještě nebyly narostlé téměř žádné kolonie. V jiném ředění u R2A agaru již nešly kolonie spočítat, protože byl jejich počet hodně vysoký.

Po 30 dnech kultivování jsme na TYA agaru už mohli pozorovat výskyt několika typů bakteriálních kolonií, kdežto na R2A agaru ve stejném ředění vzorku již byly téměř nespočítatelné. Přepočtený počet bakterií ve vzorku říční vody tak byl na R2A agaru roven  $1,2 \cdot 10^5$  KTJ/ml a na TYA agaru  $2,0 \cdot 10^4$  KTJ/ml, z čehož je zřejmé, že pro množení bakteriálních buněk je vhodnější R2A agar.

### **3.2 Sledování rozkladu oktylpyrrolidonu v říční vodě**

Rozklad 1-oktyl-2-pyrrolidonu v říční vodě byl prováděn sledováním koncentrací rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v průběhu kultivace a po posledním odběru vzorků byl z naměřených hodnot koncentrací DOC zhotoven graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase. Celkem bylo provedeno 8 odběrů vzorků, které byly přefiltrovány pomocí MILLIPORE MCE  $0,22 \mu\text{m}$  a vyhodnoceny na přístroji SHIMADZU 5000A. Výchozí koncentrace 1-oktyl-2-pyrrolidonu byla 100 mg/l. Graf závislosti koncentrací DOC na čase kultivace je uveden níže, na Obr. 2.



Obr. 2 – graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase

Na grafu závislosti koncentrace rozpuštěného organického uhlíku na čase je patrné, že rozklad probíhal poměrně rychle a trval zhruba 7-8 dní. Protože nebylo zcela jasné, zda rozklad proběhl úplně (zůstalo asi 18 mg DOC/l), ponechali jsme pokus probíhat déle. Protože však poté již hodnota rozpuštěného organického uhlíku nepravidelně kolísala nahoru a dolů, ukončili jsme pokus po 27 dnech. Kolísání hodnot mohlo být způsobeno odpadními produkty z buněk, ze kterých se také mohl postupně uvolňovat organický uhlík v podobě metabolitů či odpadních organických látek. Pravděpodobně proto některé hodnoty vzrůstaly.

### 3.3 Pokusy izolací a kultivací při zvýšených koncentracích

Při prvním pokusu o izolaci degradačních bakterií ze vzorků vod, byly petriho misky naočkovány bakteriální suspenzí, sledovány po dobu 3 týdnů, pravidelně po několika dnech. Po uplynutí kultivační doby byl pozorován poněkud překvapivě větší výskyt bakteriálních kolonií na samotném minerálním agaru než na minerálním agaru s oktylpyrrolidonem. Ani po

dalším týdnem výrazné bakteriální kolonie na agaru s oktylpyrrolidonem nenarostly, proto následoval pokus kultivace směsného inokula při zvýšené koncentraci oktylpyrrolidonu.

Pokus o pomnožení degradačních bakterií spočíval v inkubaci lahví s minerálním médiem a odstupňovanou koncentrací oktylpyrrolidonu při laboratorní teplotě na třepačce a po určitých časových intervalech byl sledován narůstající zákal, který znamenal množení bakterií. Zákal byl na konci inkubace patrný jen v první lahvi, tj. při koncentraci 100 mg/l, což znamenalo, že to byla nejvyšší koncentrace, ve které došlo k množení bakterií. V ostatních lahvích s vyšší koncentrací oktylpyrrolidonu zákal nevznikal, jelikož v takových koncentracích už bakterie nebyly schopné růstu vzhledem k předpokládané toxicitě oktylpyrrolidonu.

Při následujícím pokusu bylo tedy cílem znovu pomnožit hledané bakterie, získat fyziologicky mladé buňky a také přesněji zjistit, při jaké koncentraci oktylpyrrolidonu jsou bakterie ještě schopné jej rozkládat (v užším rozmezí 100 – 250 mg/l). Proto byly sníženy koncentrace oktylpyrrolidonu těsně nad 100 mg/l. K zaočkování lahví bylo použito inokulum z předchozího pokusu z první lahve o koncentraci OP 100 mg/l. Při sledování zákalu v určitých intervalech bylo poté při inkubaci zjištěno, že nejvyšší koncentrace, ve které ještě došlo k množení, byla 150 mg/l (ve třetí lahvi). Tato suspenze se pak stala výchozím vzorkem pro druhý pokus izolace degradačních bakterií. V tomto pokusu byl použit minerální agar s bromthymolovou modří a oktylpyrrolidonem, a také R2A agar. Po kultivaci naočkovaných misek ve tmě bylo zhruba po třech týdnech zjištěno, že bakteriální kolonie na agaru s přidaným oktylpyrrolidonem nerostou tak dobře, jak na samotném minerálním agaru, avšak rostou dobře na R2A agaru. Nicméně protože na agaru s přidaným oktylpyrrolidonem přece jen určité kolonie vyrostly, byly tyto přeočkovány na R2A agary a po týdenní kultivaci byly dvě čisté kultury, označené ZN1 a ZN2, zakonzervovány v glycerolu při -80°C, pro případné další podrobnější studium v rámci navazujících studentských prací.

## ZÁVĚR

V bakalářské práci byla zkoumána mikrobiální degradace 1-oktyl 2-pyrrolidonu v říční vodě. Jedná se o látku, která se využívá v některých průmyslových odvětvích a může mít negativní dopad na životní prostředí.

Cílem bylo provést odběr vzorků říční vody a stanovit v ní počet psychrofilních bakterií kultivační metodou a následně provést testy biodegradace 1-oktyl 2-pyrrolidonu. Vzorek vody pocházel ze zlínské řeky Dřevnice.

Při sledování počtu heterotrofních psychrofilních bakterií v odebraných vzorcích vody byl po 30 dnech kultivace zjištěn mnohem větší počet bakteriálních kolonií na R2A agaru než na TYA agaru (Trypton Yeast Extract Agar) ve stejném ředění. Přepočtený počet bakterií ve vzorku říční vody byl na R2A agaru roven  $1,2 \cdot 10^5$  KTJ/ml a na TYA agaru  $2,0 \cdot 10^4$  KTJ/ml, z čehož je patrné, že pro pomnožení bakteriálních buněk je rozhodně vhodnější R2A agar.

Rozklad 1-oktyl 2-pyrrolidonu v říční vodě byl prováděn sledováním koncentrací rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v průběhu kultivace. Celkem bylo provedeno 8 odběrů vzorků. Po ukončení odběrů byl vyhotoven graf závislosti koncentrace rozpuštěného organického uhlíku na čase, z něhož je zřejmé, že rozklad probíhal 7-8 dní, tedy poměrně rychle. Po této době však byla zbytková hodnota DOC kolem 18 mg/l, proto jsme nechali pokus probíhat o něco déle. Jelikož však hodnota rozpuštěného uhlíku dále už jen nepravidelně kolísala, byl pokus ukončen po 27 dnech. Kolísání hodnot bylo zřejmě způsobeno odpadními produkty z přítomných buněk, ze kterých se také postupně uvolňuje organický uhlík.

U prvního pokusu o izolaci degradačních bakterií byly petriho misky sledovány po dobu 3 týdnů pravidelně v určitých intervalech. Po uplynutí kultivační doby byl pozorován větší výskyt bakteriálních kolonií na samotném minerálním agaru než na minerálním agaru s oktylpyrrolidonem, což svědčí o určitých toxických účincích oktylpyrrolidonu na mikrobiální společenstva.

Při pokusu o pomnožení degradačních bakterií probíhala inkubace lahví s minerálním médiem a odstupňovanou koncentrací oktylpyrrolidonu. V určitých časových intervalech byl sledován zákal, jež signalizoval růst bakterií. Po ukončení inkubace byla zjištěna přítomnost bakterií jen v lahvi při koncentraci 100 mg/l. Při vyšší koncentraci oktylpyrrolidonu už zákal



nevznikl, protože bakterie už nebyly schopny se množit vzhledem k předpokládané toxicitě oktylpyrrolidonu.

Následující pokus spočíval v opětovném pomnožení hledaných bakterií. Byly sníženy koncentrace oktylpyrrolidonu těsně nad 100 mg/l, abychom přesněji zjistili, při jaké koncentraci jsou bakterie ještě schopné jej rozkládat. Po ukončení inkubace byla zjištěna nejvyšší koncentrace, ve které ještě došlo k množení, a to 150 mg/l.

V posledním pokusu, který byl zaměřen na izolaci degradačních bakterií, byl použit agar s bromthymolovou modří, minerální agar s bromthymolovou modří a oktylpyrrolidonem, a také R2A agar. Po kultivaci naočkovaných petriho misek po dobu 3 týdnů byl opět zjištěn lepší růst bakteriálních kolonií na samotném minerálním agaru než na minerálním agaru s oktylpyrrolidonem, nejlépe však kolonie rostly na R2A agaru. Kolonie rostoucí na minerálním agaru byly následně přeočkovány na R2A agary a po týdnu kultivace byly dvě čisté kultury, s označením ZN1 a ZN2, zakonzervovány v glycerolu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Účelem bylo uchování pro případné podrobnější studium mikrobiální degradace 1-oktyl 2-pyrrolidonu v rámci navazujících studentských prací.

Provedená bakalářské práce ukázala, že 1-oktyl 2-pyrrolidon je mikrobiálně rozložitelný v běžné říční vodě, a to během 7 – 8 dnů, a také ukázala, že při izolaci klíčových bakterií je nutno volit jen relativně nízké koncentrace 1-oktyl 2-pyrrolidonu.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1]

[https://www.google.cz/search?q=1-octyl+2-pyrrolidone&biw=1366&bih=623&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ei=41VcVbnyHMfcyWPthoDwBw&ved=0CAYQ\\_AUoAQ#imgrc=tTXMG0x\\_eStNeM%253A%3Bi2YfCSY73-FstM%3Bhttp%253A%252F%252Fmedia.scbt.com%252Fimage.php%253Fimage%253D%252Fi%252F10%252F64%252F106441.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.scbt.com%252Fdatasheet-237605-1-octyl-2-pyrrolidone.html%3B300%3B300](https://www.google.cz/search?q=1-octyl+2-pyrrolidone&biw=1366&bih=623&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ei=41VcVbnyHMfcyWPthoDwBw&ved=0CAYQ_AUoAQ#imgrc=tTXMG0x_eStNeM%253A%3Bi2YfCSY73-FstM%3Bhttp%253A%252F%252Fmedia.scbt.com%252Fimage.php%253Fimage%253D%252Fi%252F10%252F64%252F106441.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fwww.scbt.com%252Fdatasheet-237605-1-octyl-2-pyrrolidone.html%3B300%3B300)

[2] *N-Octyl-2-pyrrolidone dist.*, BASF, [online]. [cit. 2009]. Dostupný z WWW: [http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset\\_type=pds/pdf&language=EN&urn=urn:documentum:eCommerce\\_sol\\_EU:09007bb280063b67.pdf](http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset_type=pds/pdf&language=EN&urn=urn:documentum:eCommerce_sol_EU:09007bb280063b67.pdf)

[3] *N-Octyl-2-pyrrolidone dist.*, BASF, [online]. [cit. 2014]. Dostupný z WWW:

[http://www.standort-ludwigshafen.basf.de/group/corporate/site\\_ludwigshafen/de/brand/N\\_OCTYL\\_2\\_PYRROLIDONE\\_DIST](http://www.standort-ludwigshafen.basf.de/group/corporate/site_ludwigshafen/de/brand/N_OCTYL_2_PYRROLIDONE_DIST)

[4] KRÍŽEK, K., Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, (2012)

[5] Bezpečnostní list Sigma-Aldrich, *1-octyl-2-pyrrolidone*, [online]. [cit 2012-01-22]. Dostupný z WWW:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=75072&brand=FLUKA>>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DOC	Rozpuštěný organický uhlík
MA	Minerální agar
R2A	Oficiální název konkrétního živného agaru
TYA	Trypton Yeast Extract Agar
OP	1-oktyl 2-pyrrolidon
KTJ	Jednotka tvořící kolonie

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

*Obr. 1. Struktura 1-oktyl 2-pyrrolidonu*

*Obr. 2 – graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase*

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Přidávané koncentrace oktylpyrrolidonu v 1. pokusu

Tabulka 2 – Přidávané koncentrace oktylpyrrolidonu v 2. pokusu

Tabulka 3 – Počet kolonií po 7 dnech

Tabulka 4 – Počet kolonií po 30 dnech