

# **Význam více druhů bakterií pro rozklad syntetických látek**

Sabina Krajčířiková

---

Bakalářská práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Sabina Krajčířiková**  
Osobní číslo: **T16757**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Význam více druhů bakterií pro rozklad syntetických látek**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární rešerši na dané téma.
2. Provedte experimenty dle zadání vedoucího, se zaměřením na vybranou syntetickou látku.
3. Výsledky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v předepsaném termínu.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské 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] Měrková M. et al., 2018. Degradation of the surfactant Cocamidopropyl betaine by two bacterial strains isolated from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation Web of Science*, 127, 236–240.

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

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

**1. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**17. května 2019**

Ve Zlíně dne 1. února 2019

L.S.

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

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

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

**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 .....

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ABSTRAKT

V práci byla studována biodegradace N-oktyl-2-pyrrolidonu pomocí dvou kultur, které byly izolovány z povrchové vody. Cílem bylo pokusit se zjistit úlohu jednotlivých kultur při rozkladu této látky. Byla provedena řada pokusů růstu kultur i na strukturních částech N-oktyl-2-pyrrolidonu, tj. na oktanu, pyrrolidonu, ale také na N-methylpyrrolidonu a N-ethylpyrrolidonu. Výsledky ukázaly, že kultura Dr2 zahajuje rozklad, neboť je schopna využívat oktan ke svému růstu a taky vykazuje slabý růst na samotném N-oktyl-2-pyrrolidonu. Kultura Dr1 nebyla schopna růstu na žádné látce, avšak její růst se projevil na metabolitech kultury Dr2 po částečné degradaci N-oktyl-2-pyrrolidonu.

Klíčová slova: Biodegradace, N-oktyl-2-pyrrolidon, oktan, pyrrolidon, N-methylpyrrolidon, N-ethylpyrrolidon, mikrobiální kultury, spolupráce kultur.

## ABSTRACT

In this bachelor thesis, the biodegradation of N-octyl-2-pyrrolidone was studied using 2 strains, which were isolated previously from the surface water. Main goal was to find out, how the strains work separately in the decomposition of this substance. A lot of experiments aimed to the strains growth on N-octyl-2-pyrrolidone and its structural parts such as octane and pyrrolidone, were realized; also an utilization of N-methylpyrrolidone and N-ethylpyrrolidone by the strains was examined. Obtained results showed that strain Dr2 started the decomposition, because it was able to use octane for its growth and was able to partial utilization of N-octyl-2-pyrrolidone as well. Strain Dr1 was not able to grow on any of tested substances, but its growth proceeded on metabolites originated from partial degradation of N-octyl-2-pyrrolidone performed by strain Dr2.

Keywords: Biodegradation, N-octane-2-pyrrolidone, octane, pyrrolidone, N-methylpyrrolidone, N-ethylpyrrolidone, microbial strains, cooperation of strains.

***Poděkování***

Ráda bych z tohoto místa poděkovala především vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho čas, cenné rady, ochotu a pomoc při vytváření této práce. Dále mé poděkování patří mé rodině, přátelům a kolegům za pomoc a podporu při studiu.

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

**OBSAH**

ÚVOD.....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
<b>1 N-OKTYL-2-PYRROLIDON .....</b>	<b>12</b>
1.1 VLASTNOSTI .....	12
1.2 POUŽITÍ .....	12
<b>2 PŘEDCHOZÍ PRÁCE .....</b>	<b>13</b>
<b>3 SPOLUPRÁCE MIKROORGANISMŮ PŘI BIODEGRADACI LÁTEK .....</b>	<b>14</b>
3.1 SDÍLENÍ RŮSTOVÝCH FAKTORŮ .....	14
3.2 ODSTRAŇOVÁNÍ TOXICKÝCH MEZIPRODUKTŮ .....	15
3.3 SEKVENČNÍ BIODEGRADACE.....	15
3.4 ZVYŠOVÁNÍ PŘÍSTUPNOSTI MIKROORGANISMŮ K DEGRADOVANÉ LÁTCE.....	15
<b>4 BIODEGRADACE POLYETHYLENU POMOCÍ <i>PSEUDOMONAS</i> <i>FLUORESCENS</i>, BIOSURFAKTANTU A SDS .....</b>	<b>16</b>
<b>5 DEGRADACE KOKAMIDOPROPYL BETAINU BAKTERIEMI Z AKTIVOVANÉHO KALU .....</b>	<b>17</b>
<b>6 METABOLICKÉ DRÁHY FLUORANTHENU .....</b>	<b>18</b>
<b>7 DEGRADACE POLYETHYLENU BAKTERIEMI Z LAREV ZAVÍJEČE VOSKOVÉHO .....</b>	<b>19</b>
<b>8 BIODEGRADACE UHLOVODÍKŮ ROPY .....</b>	<b>20</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>21</b>
<b>9 METODIKA .....</b>	<b>22</b>
9.1 ROZTOKY, ŽIVNÁ MÉDIA, CHEMIKÁLIE, BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	22
9.1.1 ROZTOKY .....	22
9.1.2 ŽIVNÁ MÉDIA.....	22
9.1.3 CHEMIKÁLIE .....	23
9.1.4 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	23
9.2 PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY .....	23
9.2.1 PŘÍSTROJE .....	23
9.2.2 LABORATORNÍ POMŮCKY .....	24
9.3 OBECNÉ POSTUPY .....	24



9.3.1 OVĚŘENÍ DEGRADACE N-OKTYL-2-PYRROLIDONU JEDNOTLIVÝMI KULTURAMI A SPOLEČNÝM INOKULEM .....	24
9.3.2 OVĚŘENÍ DEGRADACE VYŠŠÍCH KONCENTRACÍ N-OKTYL-2-PYRROLIDONU KULTUROU DR2 .....	25
9.3.3 POSTUPNÁ DEGRADACE VYŠŠÍCH KONCENTRACÍ N-OKTYL-2-PYRROLIDONU KULTUROU DR2 A SUPERNATANTU KULTUROU DR1 .....	25
9.3.4 VYUŽITÍ PYRROLIDONU, N-METHYL PYRROLIDONU A N-ETHYL PYRROLIDONU KULTURAMI DR1 A DR2 INDIVIDUÁLNĚ .....	26
9.3.5 VYUŽITÍ PYRROLIDONU, N-METHYL PYRROLIDONU A N-ETHYL PYRROLIDONU KULTUROU DR1 INDIVIDUÁLNĚ, KONTROLY .....	26
9.3.6 VYUŽITÍ OKTANU, OKTANOLU, PYRROLIDONU, N-METHYL PYRROLIDONU A N-ETHYL PYRROLIDONU KULTUROU DR2 INDIVIDUÁLNĚ, PYR A NEP V KONSORCIU S DR1, KONTROLY .....	27
9.3.7 RŮST KULTUR DR2 I DR1 NA RŮZNÝCH KOMBINACÍCH, KONTROLY .....	28
9.3.8 DEGRADACE N-OKTYL-2-PYRROLIDONU SEKVENČNĚ, KULTURAMI DR2 – DR1 .....	29
<b>10 VÝSLEDKY .....</b>	<b>30</b>
10.1 OVĚŘENÍ DEGRADACE N-OKTYL-2-PYRROLIDONU JEDNOTLIVÝMI KULTURAMI A SPOLEČNÝM INOKULEM .....	30
10.2 OVĚŘENÍ DEGRADACE VYŠŠÍCH KONCENTRACÍ N-OKTYL-2-PYRROLIDONU KULTUROU DR2 .....	31
10.3 POSTUPNÁ DEGRADACE VYŠŠÍCH KONCENTRACÍ N-OKTYL-2-PYRROLIDONU KULTUROU DR2 A SUPERNATANTU KULTUROU DR1 .....	32
10.4..... VYUŽITÍ PYRROLIDONU, N-METHYL PYRROLIDONU A N-ETHYL PYRROLIDONU KULTURAMI DR1 A DR2 INDIVIDUÁLNĚ .....	33
10.5..... VYUŽITÍ PYRROLIDONU, N-METHYL PYRROLIDONU A N-ETHYL PYRROLIDONU KULTUROU DR1 .....	34
10.6 VYUŽITÍ OKTANU, OKTANOLU, PYRROLIDONU, N-METHYL PYRROLIDONU A N-ETHYL PYRROLIDONU KULTUROU DR2 INDIVIDUÁLNĚ, PYR A NEP V KONSORCIU S DR1, KONTROLY .....	36
10.7 RŮST KULTUR DR2 I DR1 NA RŮZNÝCH KOMBINACÍCH .....	38
10.8 DEGRADACE N-OKTYL-2-PYRROLIDONU SEKVENČNĚ DR2 – DR1 .....	40
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>42</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>46</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>47</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>48</b>

## ÚVOD

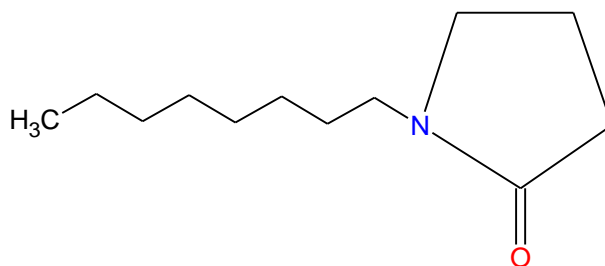
V dnešní době se vyrábí čím dál více syntetických látek. Některé podléhají biodegradaci a ty nepředstavují pro životní prostředí žádné nebezpečí. Horší je to s těmi, které mikroorganismy rozložit nedokážou. Ty se pak akumulují, zatěžují a škodí životnímu prostředí i organismům, které v něm žijí. A proto je pro nás a hlavně pro další generace důležité vyvíjet látky biologicky rozložitelné. K tomu nám pomůže znalost mechanismu rozkladu různých látek mikroorganismy. Mechanismy biodegradací jsou různorodé a může dokonce docházet ke spolupráci mikroorganismů při degradaci. Tato kooperace mnohdy zajistí účinnější a rychlejší odstranění látek.

Tato bakalářská práce se proto zabývá principy biodegradace N-oktyl-2-pyrrolidonu, který je syntetickou látkou, která je schopna podléhat rozkladu při působení dvou konkrétních, dříve izolovaných mikrobiálních kultur, přičemž jednotlivě tyto kultury nejsou schopny výraznějšího rozkladu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 N-OKTYL-2-PYRROLIDON

Jedná se o syntetickou látku, která obsahuje ve své struktuře pyrrolidon, který je rovinný pětičlenný laktam a alkanový řetězec navázaný na dusík (N). (Kaytan a Bonnet, 2008) Strukturní vzorec se nachází níže na obr. 1.



Obr. 1. Strukturní vzorec N-oktyl-2-pyrrolidonu

### 1.1 Vlastnosti

N-oktyl-2-pyrrolidon je kapalina, která je bezbarvá až žlutá. Má podobnou vůni jako aminy a rozpouští se v organických rozpouštědlech. (BASF, 2009) Tato látka má vysoký bod varu 170 - 172 °C, nízký tlak par a je netěkavá. Je toxická pro vodní organismy. Vykazuje dlouhodobé nebezpečí pro vodní prostředí. Pro lidi je žíravý, způsobuje poleptání kůže a poškození očí. (Chemicalbook, 2017) Má povrchově aktivní schopnosti. Pyrrolidon se dokáže elektrostaticky asociovat k neiontovým látkám a tato interakce se může transportovat z jedné povrchově aktivní látky do druhé. (Login, 1995) Zvyšuje prostupnost látek přes kůži a jeho schopnost transportovat steroidní permeáty byl zkoumán na myši kůži využitím modelu kožní paralelní dráhy. (Sigma-Aldrich) Obtížně se rozpouští ve vodě, jeho rozpustnost je asi 1 g/l. Hustota látky se odhaduje na 0,92 g/ml a molekulová hmotnost je 197,3 g/mol. Teplota tání N-oktyl-2-pyrrolidonu je -25 °C a bod vzplanutí 230 °C. (Royal Society of Chemistry, 2015)

### 1.2 Použití

N-oktyl-2-pyrrolidon se používá jako meziproduct (pomocná látka, ne účinná) pro výrobu agrochemikálií, elektroniky a průmyslových chemikálií. Dále může být počátečním produktem pro chemické syntézy a rozpouštědla. Pro polymery a hydrofobní látky je N-oktyl-2-pyrrolidon rozpouštědlo. Můžeme se s ním setkat i v tiskových procesech, kde se používá jako smáčedlo. Jeho další využití najdeme při čištění kovů, ve farmaceutickém průmyslu jako čisticí prostředek, ve veterinární medicíně jako změkčovadlo. (BASF, 2009) Také se s ním můžeme setkat v některých insekticidech nebo při zpracování ropy. (Ansell a Fowler, 1988)

## 2 PŘEDCHOZÍ PRÁCE

V bakalářské práci Zlaty Novotné se zkoumala degradace N-oktyl-2-pyrrolidonu v říční vodě. Domnívala se, že látka má negativní dopad na prostředí, a proto je pro tuto látku biodegradace důležitá. Prvním krokem výzkumu bylo zjištění psychrofilních bakterií ve vodě a dále byly provedeny biodegradční testy N-oktyl-2-pyrrolidonu. Pomnožení bakterií probíhalo lépe na R2A agaru než na TYA agaru, tudíž je R2A agar vhodnější a i já jsem ho využila pro nárůst kultur. Při izolaci bakterií byla prokázána toxicita N-oktyl-2-pyrrolidonu, kdy na samotném minerálním agaru rostla lépe než na agaru s přidaným N-oktyl-2-pyrrolidonem. Kolegyně ještě zjistila, že bakterie jsou schopny růst při koncentraci 150 mg/l. (BP Zlata Novotná, 2015)

Dále Zlata Novotná ve své diplomové práci zkoumala možnost spolupráce dvou izolovaných kultur, nazvané Dr1 a Dr2, při degradaci N-oktyl-2-pyrrolidonu. Byly zjištěny následující skutečnosti: samotná kultura Dr1 na NOP neroste, zatímco u kultury Dr2 byl pozorován mírný růst. Obě kultury najednou rostou na NOP ještě lépe než kultura Dr2 sama. Maximální možná koncentrace NOP v médiu pro růst obou kultur byla stanovena na 150-170 mg/l. Bohužel se nedalo stanovit nejvyšší koncentraci, při které by rostla samotná kultura Dr2, ale povedlo se určit, že pro svůj růst využívá oktanol, nikoli pyrrolidon. U kultury Dr1 nebyl pozorován růst ani na oktanolu ani na pyrrolidonu. Zřejmě neroste ani na jedné ze složek. Kolegyně nedokázala z dostupných informací určit podstatu spolupráce při degradaci. (DP Bc. Zlata Novotná, 2017)

### 3 SPOLUPRÁCE MIKROORGANISMŮ PŘI BIODEGRADACI LÁTEK

Dnes se často hovoří o hromadění odpadních látek v prostředí a objevují se snahy to-  
muto předcházet. Začaly se zkoumat účinky různých mikroorganismů a výsledkem bylo, že  
mnoho odpadních látek jsme schopni odstranit pomocí biodegradace, protože mikroorga-  
nismy jsou schopny některé látky využít jako zdroj uhlíku (energie) ke své existenci. Tímto  
se mikroorganismy staly nejúčinnějším způsobem jak odstranit nežádané materiály. Vzhle-  
dem k tomu se objevil velký zájem o studium biodegradace sloučenin pomocí mikrobiálních  
kultur.

Můžeme se setkat s tím, že látku je schopna rozložit (za daných podmínek) i čistá mikro-  
biální kultura, však běžněji se v přírodních prostředích (vody, půdy, sedimenty, čistírenské  
suspenze a kaly) setkáme s rozkladem pomocí dvou nebo více kultur a někdy je to i nutné.  
Stává se, že jedna kultura začne rozklad sloučeniny, rozloží nějakou část, ale dále není  
schopná pokračovat (nedokáže využít zbytek), a tak musí nastoupit kultura druhá, která by  
zase nezvládla biodegradaci započít, ale může rozložit nebo spotřebovat zbylou část slouče-  
niny. (Mara a Horan, 2003) Např. dané mikroorganismy mohou rozkládat různé druhy po-  
lyakrylátusodného (PSA) a mnohé z nich jsou symbiotické nebo žijí v konsorciích. (Iwaha-  
shi, 2003) Kultura s bakteriálním konsorciem označená jako L7-B, která je složená ze tří  
druhů bakterií je schopna za dva týdny degradovat 73 % PSA s průměrnou molární hmotností  
kolem 1000, 49 % PSA, s průměrnou molární hmotností 1500 a 20 % PSA, s průměrnou  
molární hmotností 4000. (Hayashi, 1994)

Ačkoli já ve své práci studuji biodegradaci N-oktyl-2-pyrrolidonu při působení dvou kul-  
tur, jejíž mechanismus nebyl dosud objeven, ale předpokládáme, že nějaká závislost mezi  
kulturami a látkou existuje, můžeme předpokládat, že principy budou podobné jako u již  
studovaných látek a kultur schopných je rozložit.

Důvodů proč spolu mikroorganismy spolupracují může být spousta – jak již bylo uvedeno  
výše, že jedna kultura musí biodegradaci započít, aby se druhá kultura dostala k části, kterou  
může rozložit – to je tzv. sekvenční biodegradace, dále sdílení látek podporujících růst (růst-  
tové faktory) nebo odstranění toxických meziproduktů. Při spolupráci mikroorganismy ne-  
musí používat jen jeden mechanismus rozkládání, ale mohou použít i více najednou nebo  
dokonce jejich kombinaci.

#### 3.1 Sdílení růstových faktorů

Sdílení růstových faktorů se dělí na dvě formy. První z nich je komenzalismus. V případě  
komezalismu se jedná o produkci růstových faktorů (živin, vitamínů, aminokyselin a jiných  
látek podporujících růst), které potřebuje degradující organismus, jiným organismem. Dru-  
hým způsobem je mutualismus, při kterém si organismy vzájemně předávají růstové faktory.  
Předávání se uskutečňuje v přirozených podmínkách, ale bylo popsáno i v aktivovaném  
kalu. (Mara a Horan, 2003)

### 3.2 Odstraňování toxických meziproduktů

Při biodegradaci se někdy uvolňují do prostředí meziprodukty rozkladu. (Mara a Horan, 2003) Následně tam jsou hromaděny, což samo o sobě není problém, až do té doby, kdy se meziprodukty nahromadí v koncentraci toxické. Tehdy je důležitá přítomnost dalších kultur, které si poradí s těmito látkami a odbourají je. Se zvyšující se koncentrací roste i potřeba přítomnosti spolupracující kultury a také roste obtížnost se s ní vypořádat. Můžeme si to přiblížit na rozkladu polyethylen glykolu s vysokou molekulovou hmotností pomocí bakterií *Sphingomonas terrae*. Tento bakteriální druh uvolňuje dvouuhlíkaté fragmenty od konce řetězce PEG, a to ve formě kyseliny glyoxylové. Kyselina glyoxylová je však pro degradující kulturu toxická a nemůže ji rozložit. Když tato bakterie bude v prostředí s některou z bakterií *Rhizobium* sp., *Agrobacterium* sp. nebo *Methylobacterium* sp., degradace proběhne a kyselina je odbouraná. (Kawai, 1999)

### 3.3 Sekvenční biodegradace

Další důležitou formou biodegradace je tzv. sekvenční biodegradace, která je založená na spolupráci dvou nebo více kultur, kdy jedna bez druhé nejsou schopny danou látku celkově rozložit. (Mara a Horan, 2003) Důvodem může být nedostatečné enzymové vybavení vzhledem k degradované látce, tudíž mikroorganismus využije pouze nějakou část molekuly, a proto rozklad není úplný. Tehdy je žádoucí provést sekvenční biodegradaci. V takovém případě se dá postupovat dvěma způsoby. Dá se vícero mikroorganismy „bombardovat“ stejnou molekulu na různých místech nebo jedna kultura zahájí degradaci, tudíž provede první krok a po ní následují další kultury a každá rozloží specifickou část látky a takto se postupuje až k úplnému rozkladu nebo do doby vzniku biologicky nerozložitelné látky. Sekvenční biodegradaci můžeme sledovat u plísně bílé hniloby (*Phanerochaete chrysosporium*) ve spolupráci s půdními mikroorganismy, v průběhu rozkladu polyakrylátu a jeho kopolymeru s polyakrylamidem, které se nacházejí v půdě. (Stahl a kol., 2000) Bez spolupráce plísně by půdní mikroorganismy nebyly schopny tyto polymery rozložit. Plíseň je schopna látku rozpouštět a produkuje potřebné enzymy, díky kterým půdní organismy jsou schopny polymery značně zmineralizovat. (Di Gioia a kol., 2004)

### 3.4 Zvyšování přístupnosti mikroorganismů k degradované látce

ohoto jevu se využívá při biodegradaci ropných sloučenin mikrobiálními společenstvy. Ty ale často potřebují ke své činnosti přítomnost *Pseudomonas aeruginosa*, která produkuje rhamnolipidy. Kvůli nízké rozpustnosti ropných látek ve vodě je jejich biodegradace značně zpomalená. Pro úspěšnou degradaci je potřebné směs emulgovat, což zajistí právě rhamnolipidy. Tím se celá biodegradace stane rychlejší a počet rozložených ropných uhlíků se zvýší z 32% na 61% za 10 dnů. (Abalos a kol., 2004)

#### 4 BIODEGRADACE POLYETHYLENU POMOCÍ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*, BIOSURFAKTANTU A SDS

Autoři výzkumu se snažili dosáhnout zvýšení míry oxidace polyethylenu (PE) a tím iniciovat rozpouštění aniontovým surfaktantem; takový účinek by měl umožňovat mikrobiální degradaci opracovaného polymeru. V této studii byly komerčně dostupné polyethyleny vystaveny působení 3 faktorů: biosurfaktantu produkovaného při růstu bakterie *Bacillus licheniformis* (při 37°C), dále aniontovému surfaktantu dodecylsulfátu sodnému (SDS, při 60°C) a bakterii *Pseudomonas fluorescens* (při 30°C), a to v různých kombinacích, pro co nejvyšší biologické odbourání PE. Účinek každého faktoru trval 1 měsíc, pro růst obou bakterií byla dávkována glukóza.

Po řadě pokusů autoři vyhodnotili, že nejvýraznějšího působení na PE bylo dosaženo při této posloupnosti: 1. působení bakterií *Pseudomonas fluorescens*, 2. působení bakterií *Bacillus licheniformis* a jejího biosurfaktantu a 3. působení dodecylsulfátem sodným.

Za první měsíc došlo k mírné oxidaci PE bakterií *Pseudomonas fluorescens* a během druhého měsíce byl zaznamenán pokles karbonylových skupin díky působení *Bacillus licheniformis* a jeho biosurfaktantu. Pokles hmotností PE dosahoval 5 – 7 % a solubilizace plastu po celých uvedených 3 měsících byla prokázána přítomností alifatických kyselin, alkoholů a krátkých uhlovodíků. (Mukherjee a kol., 2017)



## 5 DEGRADACE KOKAMIDOPROPYL BETAINU BAKTERIEMI Z AKTIVOVANÉHO KALU

Měrková a kol. (2018) zkoumali, které bakterie aktivovaného kalu jsou schopny využít či rozložit kokamidopropyl betain (CAPB). Kokamidopropyl betain je povrchově aktivní látka, používaná v kosmetických přípravcích.

Experimenty byly prováděny v prostředí s vhodným zdrojem dusíku i v prostředí bezdusíkatém. Aplikovaly se dva izolované kmeny. V dusíkatém prostředí došlo k mineralizaci značně rychleji než bez zdroje dusíku. Autoři také prokázali, že kmen FV (identifikován jako zástupce rodu *Pseudomonas*) je schopen rozložit alkylové části molekul CAPB. Druhý kmen, označovaný jako FM (identifikován jako *Rhizobium* sp.), byl schopen využívat pro svůj růst (a tedy rozložit) výsledný dusíkatý meziprodukt degradace, vyloučený kmenem FV a v bezdusíkatém médiu také vytvořit zdroj dusíku pro kulturu FV. Společným působením obou kultur tak bylo dosaženo vysoké míry mineralizace uvedené látky.

## 6 METABOLICKÉ DRÁHY FLUORANTHENU

Pro odstranění polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) z prostředí je nejvhodnějším procesem mikrobiální degradace, neboť jde o přirozený proces zapojení prvků do koloběhu živin v přírodě. Zhao a kol. (2016) studovali metabolické dráhy rozkladu PAU v jednotlivých čistých kulturách, podílejících se na společné degradaci fluoranthenu; jejich snahou bylo zjistit úlohu jednotlivých členů mikrobiálního společenství a spektrum meziproduktů při degradaci. Autoři zjistili, že existuje mnohočetné provázání jednotlivých kroků rozkladu fluoranthenu mezi členy společenství (komunity, konsorcia), které přirovnali k síti (network). Na základě studia genomů autoři prokázali, že rod *Mycobacterium* zahajuje rozklad tohoto uhlovodíku, protože jeho dioxygenázy hydroxylují aromatické kruhy fluoranthenu a tím je štěpí, a dále že bakterie rodu *Diaphorobacter* poskytují většinu dehydrogenáz, které navazují v rozkladu na účinek dioxygenáz. Další mikrobiální členové konsorcia - *Hyphomicrobium*, *Agrobacterium* a *Sphingopyxis* - mají geny kódující enzymy, které se podílejí na tzv. spodních částech degradace fluoranthenu, tedy na reakcích, které probíhají po rozštěpení a dehydrogenacích aromatických kruhů. Příspěvky těchto dalších bakterií, ve smyslu jejich enzymů podílejících se na rozkladu, již byly velmi rozmanité: *Hyphomicrobium* mělo vysoké zastoupení alkohol dehydrogenáz, zatímco „přínos“ rodu *Pseudomonas* v dalších reakcích byl jen velmi malý. Tato práce jako první popisuje složitou kooperativní metabolickou síť, která popisuje příspěvky různých mikrobiálních skupin během degradace PAU. Spolupráce mezi různými mikroby je prospěšná a usnadňuje tak degradaci PAU.

## 7 DEGRADACE POLYETHYLENU BAKTERIEMI Z LAREV ZAVÍJEČE VOSKOVÉHO

Polyethylen (PE) byl po desetiletí považován za biologicky neodbouratelný. Bylo však zjištěno, že larva zavíječe voskového je schopná žvýkat a částečně strávit PE. Na základě tohoto pozorování byly z trávicího traktu larev tohoto zavíječe izolovány dva bakteriální kmeny, které byly schopny degradace PE. Byly to *Enterobacter asburiae* a *Bacillus* sp. S těmito kulturami byl uspořádán experiment a byl sledován jejich účinek na PE folie. Po 28 dnech inkubace bylo na PE foliích pozorováno snížení hydrofobity. Dále byly pomocí elektronového mikroskopu pozorovány v PE filmech viditelné prohloubeniny. Tvorba karbonylových skupin (= zvýšení hydrofility) byla ověřena pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie. Suspenzní kultury ( $10^8$  buněk/ml) byly v průběhu pokusů schopny degradovat zhruba 6,1% a 10,7% PE filmu za 60 dnů, přičemž molekulová hmotnost zbytku PE folie se snížila. Výsledky potvrdily přítomnost PE-degradujících bakterií ve střevech larev zavíječe voskového, a tudíž je naděje pro biodegradaci PE v životním prostředí. Autoři předpokládají, že uvedené bakterie při degradaci PE určitým způsobem kooperují; charakter jejich kooperace však doposud studován nebyl. (Jun Yang a kol., 2014)

## 8 BIODEGRADACE UHLOVODÍKŮ ROPY

Chen a kol. (2014) isolated two bacterial strains, *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., from samples of oil-contaminated soil. Compared to the experiment of hydrocarbon degradation with pure cultures, the use of both strains showed a significant increase in degradation efficiency. The rate of hydrocarbon degradation was increased from 89,35% and 74,32% to 97,41%. In the mixed culture, *Acinetobacter* sp. provided sufficient carbon (energy) for its growth and could start producing a byproduct, which was then utilized by the *Pseudomonas* sp. culture. Thanks to this, *Pseudomonas* sp. could produce rhamnolipid. From the moment *Pseudomonas* sp. started growing, the effect of the *Acinetobacter* sp. strain was inhibited until the end of the process.

The result of the study was the finding that the use of mixed culture increased the success of biodegradation from 87,29% (pure culture) to 97,41%. Also, the surface tension of the media changed, from  $73,2 \cdot 10^{-3}$  to  $28,6 \cdot 10^{-3}$  N/m. Thanks to the newly discovered cooperation of two strains *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., the existing procedures for biodegradation of oil-contaminated soil and oil can be changed to a more biologically degradable substance.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 9 METODIKA

### 9.1 Roztoky, živná média, chemikálie, biologický materiál

#### 9.1.1 Roztoky

##### *Fyziologický roztok (FR) - složení*

8,5 g NaCl v 1000 ml destilované vody.

##### *Roztok A - složení*

9,07 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 1000 ml destilované vody.

##### *Roztok B - složení*

23,90 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  v 1000 ml destilované vody.

##### *Roztok stopových prvků - složení*

$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,043 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	0,057 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,043 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	0,037 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	0,025 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0,040 g

Po navážení byly navážky látek rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

##### *Minerální médium (MM) - složení*

Příprava 100 ml minerálního média:

Destilovaná voda.....	86 ml
Roztok A.....	2 ml
Roztok B.....	8 ml
Roztok stopových prvků.....	0,15 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g.l <sup>-1</sup> ).....	1 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (2,2 g.l <sup>-1</sup> ).....	1 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1 g.l <sup>-1</sup> ).....	1 ml
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (30 g.l <sup>-1</sup> ).....	1 ml

Po smíchání byla provedena kontrola pH. Správná hodnota je 7,4 – 7,6.

Po sterilizaci a zchladnutí bylo asepticky přidáno 0,1 ml/100 ml MEM vitamínů (Biosera).

#### 9.1.2 Živná média

Tryptone Yeast extract Agar (TYA), R2A agar (Himedia)

### 9.1.3 Chemikálie

*N-oktyl-2-pyrrolidon (NOP, Sigma-Aldrich)*

*Pyrrolidon (PYR, Sigma-Aldrich)*

*N-metylpyrrolidon (NMP, Sigma-Aldrich)*

*N-etylpyrrolidon (NEP, Sigma-Aldrich), roztok 100 g/l*

*Trypton (TRYP, Himedia)*

*1-Oktanol, 2- Oktanol (Sigma-Aldrich)*

*Octan sodný, Glycerol (GLYC), Oktan*

Ostatní chemikálie byly získány od běžných dodavatelů laboratorních chemikálií.

U některých chemikálií byly připraveny sterilní zásobní roztoky pro lepší dávkování do pokusů. Tyto roztoky byly připraveny navážením vypočtených navážek, rozpuštěním v definovaném objemu destilované vody a přefiltrováním přes sterilní filtr Ahlstrom ReliaPrep s velikostí pórů 0,2 µm, do sterilních zkumavek. Šlo o tyto zásobní roztoky: Pyrrolidon, N-metylpyrrolidon (každý 15 g/l), Trypton (1 g/l), Octan sodný, glycerol (každý 50 g/l).

### 9.1.4 Biologický materiál

**Kultura Dr1** izolovaná z říční vody (řeka Dřevnice) v rámci BcP Zlaty Novotné a dále zkoumaná v DP Zlaty Novotné. Bylo zjištěno, že se jedná o psychrofilní gramnegativní tyčinku a byla identifikovaná jako *Achromobacter* sp.

**Kultura Dr2** izolovaná z říční vody (řeka Dřevnice) v rámci BcP Zlaty Novotné a dále zkoumaná v DP Zlaty Novotné. Bylo zjištěno, že se jedná o psychrofilní gramnegativní kratší tyčinku a byla identifikovaná jako *Phenylobacterium* sp.

## 9.2 Přístroje a laboratorní pomůcky

### 9.2.1 Přístroje

Chlazená centrifuga MR23i.....	Jouan, Francie
Chladnička s mrazákem.....	Ardo, ČR
Třepačka LT2.....	ČR
Laboratorní autokláv.....	Sanoclav, St-MCS-203, SRN

Spektrofotometr TECAN Sunrise, pro mikrotitrační destičky..... TECAN, USA  
Automatický analyzátor uhlíku 5000A.....Shimadzu, Japonsko  
pH metr inoLab 720 + skleněná elektroda..... WTW, SRN  
Aseptický laminární box BIO-II-A.....Telstar, Španělsko  
Termobox na 25 °C.....ÚIOŽP, FT

### 9.2.2 Laboratorní pomůcky

Standardní 96-jamková mikrodestička.....Gama, Česká Republika  
Mikrodávkoč ( 2-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l, 1-5 ml).....Biohit, Finsko  
Mikrodávkoč (10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l).....Plastomed, Polsko  
Filtr Ahlstrom ReliaPrep (0,2  $\mu$ m).....Ahlstrom, Německo

## 9.3 Obecné postupy

### 9.3.1 Ověření degradace N-oktyl-2-pyrrolidonu jednotlivými kulturami a společným inokulem

Prvním krokem bylo oživení kultur Dr1 a Dr2, pocházejících z DP Zlatý Novotný. Ty byly vyočkovány z mražáku (-80°C) na R2A a TYA agary a kultivovány při 25°C po dobu 7 dnů. Dále jsem připravila 200 ml MM, které následně prošlo sterilizací v autoklávu. Z každé oživené kultury byla připravena suspenze ve sterilním fyziologickém roztoku (hustota přibližně 1. stupeň dle McFarlanda). Do již sterilního minerálního média bylo asepticky přidáno 200  $\mu$ l MEM vitamínů a NOP do koncentrace 120 mg/l, což znamená, že při množství MM 200 ml byl přírůstek 26,2  $\mu$ l. Do 16 zkumavek bylo asepticky dávkováno po 4 ml promíchaného MM. Vždy bylo očkováno po 4 zkumavkách po 10  $\mu$ l suspenze jednotlivých kultur, další 4 zkumavky suspenzí obou kultur (10  $\mu$ l suspenze Dr1 + 10  $\mu$ l suspenze Dr2) a poslední 4 očkované nebyly. Zkumavky byly inkubovány ve tmě na třepačce při 25°C po dobu jednoho týdne. Po týdnu byl vizuálně zkontrolován zákal a pro přesnější stanovení bylo odpipetováno 200  $\mu$ l vzorku ze dvou zkumavek z každé čtveřice do mikrotitrační destičky a ve fotospektrometru byla změřena absorpce při vlnové délce 600 nm. Zkumavky byly vráceny na třepačku a inkubovány další týden. Po dvoutýdenní inkubaci proběhla centrifugace za podmínek: 10 000 g, 15°C po dobu 12 minut. Vzniklý supernatant byl zředěn 1:2 a byl stanoven organický rozpuštěný uhlík (DOC).



### 9.3.2 Ověření degradace vyšších koncentrací N-oktyl-2-pyrrolidonu kulturou Dr2

Bylo odebráno 50 ml MM z 1. pokusu a přidala jsem 6,6 µl NOP, čímž získáme MM o koncentraci 240 mg/l NOP (MM240). Znovu jsem odebrala 40 ml MM z 1. pokusu a bylo zaočkováno kulturou Dr2, tím jsem získala očkované minerální médium (MMO).

Pak byly připraveny zkumavky s objemy uvedených tří minerálních médií:

Tab. 1.: Objemy jednotlivých MM a koncentrace NOP

Číslo zkumavek	Objem MM (ml)	Objem MMO (ml)	Objem MM240 (ml)	Koncentrace NOP (mg/l)
1+2	2	2	0	120
3+4	1,65	2	0,35	130
5+6	1,3	2	0,7	140
7+8	1	2	1	150
9+10	0,65	2	1,35	160
11+12	0,3	2	1,7	170
13+14	0	2	2	180
15+16	0	0	4	240

Kultivace probíhala při 25°C, kontroly proběhly po 2, 3 a 7 dnech vizuálně, zhodnotil se zákal v porovnání ke zkumavkám 15 + 16.

### 9.3.3 Postupná degradace vyšších koncentrací N-oktyl-2-pyrrolidonu kulturou Dr2 a supernatantu kulturou Dr1

Bylo připraveno 200 ml sterilního MM. Do něj bylo asepticky přidáno 200 µl MEM vitamínů a NOP do koncentrace 150 mg/l, což znamená, že při množství MM 200 ml byl přírůstek 33 µl. MM bylo zaočkováno 200 µl suspenze kultury Dr2. Dále bylo rozděleno po 40 ml do 3 sterilních láhví a zbylých 80 ml bylo ponecháno v původní láhvi a asepticky odpipetováno 10 ml, přefiltrováno přes 0,2 µm filtr (Ahlstrom), filtrát byl zředěn 1:1 destilovanou vodou a rozdělen na 2 vzorky pro stanovení DOC. Všechny 4 láhve byly kultivovány ve tmě, při 25°C na třepače.

Po 2, 5 a 9 dnech kultivace (po vizuální kontrole), byly asepticky odebrány vzorky ze 2 láhví, po 4 ml, dále byly přefiltrovány přes 0,2 µm filtr (Ahlstrom), filtrát byl zředěn 1:1 destilovanou vodou a pak byl stanoven DOC.

Po 12 dnech kultivace (po vizuální kontrole), byly vybrané suspenze zcentrifugovány za podmínek 10 000 g, 15°C po dobu 12 minut a poté byl supernatant přefiltrován přes 0,2 µm filtr (Ahlstrom) do 3 sterilních láhví po cca 20 – 40 ml. Tyto vzorky byly zaočkovány

suspenzí Dr1 (kolik ml filtrátu, tolik  $\mu\text{l}$  suspenze). Láhve byly opět kultivovány a odebíraly se 4 ml vzorků dle předchozího postupu, aspoň ze 2 láhví. Část filtrátu byla rovněž zředěna 1:1 destilovanou vodou a ponechána pro stanovení DOC.

#### 9.3.4 Využití pyrrolidonu, N-methyl pyrrolidonu a N-ethyl pyrrolidonu kulturami Dr1 a Dr2 individuálně

Bylo připraveno 400 ml MM, byla provedena kontrola pH. MM bylo rozděleno do 16 láhví o objemu 250 ml, po 25 ml. Po sterilizaci a zchladnutí bylo asepticky přidáno 25  $\mu\text{l}$  MEM vitamínů do každé láhve. Poté byly do lahví přidány asepticky níže uvedené dávky:

Láhve

1 – 4.....	4 $\mu\text{l}$ pyrrolidonu (PYR)
5 – 8.....	4 $\mu\text{l}$ N-methyl pyrrolidonu (NMP)
9 – 12.....	40 $\mu\text{l}$ N-ethyl pyrrolidonu (NEP) (10 % roztok)
13 + 14.....	bez substrátu, ale byly zaočkovány (slepý pokus)
15 + 16.....	bez substrátu a bez kultur

Příprava suspenzí:

Nejprve byla připravena suspenze kultury Dr2 a zaočkovány sudé láhve (2 až 14) 25  $\mu\text{l}$  suspenze, teprve pak byla připravena suspenze kultury Dr1 a zaočkovány liché láhve (1 až 13) 25  $\mu\text{l}$  suspenze.

Kultivace probíhala rovněž ve tmě, při 25°C na třepačce po dobu 6 dnů.

#### 9.3.5 Využití pyrrolidonu, N-methyl pyrrolidonu a N-ethyl pyrrolidonu kulturou Dr1 individuálně, kontroly

Bylo připraveno 100 ml MM a vysterilizováno. Po sterilizaci a zchladnutí bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  MEM vitamínů. Dále bylo odebráno 25 ml média a přidáno 13,1  $\mu\text{l}$  NOP, čímž vznikla koncentrace NOP 480 mg/l (MM480).

Do 4 zkumavek bylo odpipetováno po 2,25 ml MM a 0,75 ml MM480, a tím vznikla koncentrace 120 mg/l NOP. Tyto zkumavky pak byly zaočkovány takto:

1+2: zaočkovány Dr2

3+4: zaočkovány Dr1+Dr2

Do 16 dalších zkumavek bylo přidáno 3 ml čistého MM, očkováno jen kulturou Dr1 a přidány asepticky tyto přísady zásobních roztoků (ZR), pro dosažení níže uvedených koncentrací:

- 5+6: 30  $\mu$ l ZR *TRYP* + 30  $\mu$ l ZR *PYR*: trypton **10** mg/l + *PYR* (**150** mg/l)  
7+8: 30  $\mu$ l ZR *TRYP* + 30  $\mu$ l ZR *NMP*: trypton **10** mg/l + *NMP* (**150** mg/l):  
9+10: 30  $\mu$ l ZR *TRYP* + 4,5  $\mu$ l *NEP*: trypton **10** mg/l + *NEP* (**150** mg/l)  
11+12: 30  $\mu$ l ZR *TRYP* + po 6  $\mu$ l ZR *OCTAN* a *GLYC*: octan + glycerol po **100** mg/l) + trypton **10** mg/l  
13+14: 30  $\mu$ l ZR *TRYP*: trypton **10** mg/l  
15+16: 450  $\mu$ l ZR *TRYP*: trypton **150** mg/l  
17+18: po 6  $\mu$ l ZR *OCTAN* a *GLYC*: octan + glycerol (po **100** mg/l)  
19+20: bez substrátu

### 9.3.6 Využití oktanu, oktanolu, pyrrolidonu, N-methyl pyrrolidonu a N-ethyl pyrrolidonu kulturou Dr2 individuálně, *PYR* a *NEP* v konsorciu s Dr1, kontroly

70 ml MM bylo sterilizováno a po zchladnutí bylo přidáno 70  $\mu$ l MEM vitamínů.

Do 4 zkumavek bylo přidáno po 2,25 ml MM a 0,75 ml MM480 a tím vznikla koncentrace 120 mg/l NOP.

1+2: zaočkány Dr2

3+4: zaočkány Dr1+Dr2

Do dalších 12 zkumavek bylo přidáno 3 ml čistého MM, přísady ZR níže a očkováno jen kulturou Dr2:

5+6: *PYR* (**150** mg/l): + 30  $\mu$ l ZR *PYR* (15 g/l)

7+8: *NMP* (**150** mg/l): + 30  $\mu$ l ZR *NMP* (15 g/l)

9+10: *NEP* (**150** mg/l): + 4,5  $\mu$ l *NEP* (100 g/l)

11+12: OKTAN: + 1  $\mu$ l oktanu přímo

13+14: OKTANOL: + 1  $\mu$ l oktanolu přímo

15+16: bez substrátu

Do 4 zkumavek bylo přidáno 3 ml MM, přísady ZR níže a očkováno kulturami Dr1 i Dr2:

17+18: *PYR* (**150** mg/l): + 30  $\mu$ l ZR *PYR* (15 g/l)

19+20: *NEP* (**150** mg/l): + 4,5  $\mu$ l *NEP* (100 g/l)

### 9.3.7 Růst kultur Dr2 i Dr1 na různých kombinacích, kontroly

#### *Kontroly přežití inokul z pokusů 5 a 6*

Vyočkovala jsem ze zkumavek 5,6 (TRYP + PYR) a 9,10 (TRYP + NEP) z pokusu č. 5, které obsahovaly pouze kulturu Dr1 a ze zkumavek 5,6 (PYR) a 9,10 (NEP) z pokusu č. 6, které obsahovaly pouze kulturu Dr2 na R2A agary a ponechala kultivovat.

#### *Růst Dr1, Dr2 a kombinace Dr1+Dr2 na nízké koncentraci PYR a NEP (75 mg/l)*

Postup:

Do zkumavek č. 5,6 a 9,10 z pokusu č. 5 (s kulturou Dr1) a zkumavek č. 5,6 a 9,10 z pokusu č. 6 (s kulturou Dr2) a zkumavek č. 17,18,19,20 z pokusu č. 6 (s kulturou Dr1 i Dr2) bylo přidáno po 3 ml sterilního MM s MEM vitamíny a 30 suspenze stejných kultur (spolu 15  $\mu$ l). Vznikla koncentrace PYR a NEP 75 mg/l. Zkumavky byly dále kultivovány při 25°C v horizontální poloze.

#### *Význam oktanu pro případnou degradaci pyrrolidonu*

Postup:

Do 4 sterilních 100 ml lahvíček bylo nadávkováno 25 ml MM s MEM vitamíny a přidáno 167  $\mu$ l ZR PYR (15 g/l), tj. do koncentrace 100 mg/l. Lahvičky byly očkované po 125  $\mu$ l suspenze obou kultur a do 2 lahvíček bylo ještě asepticky přidáno 2,1  $\mu$ l oktanu, tj. do koncentrace 60 mg/l.

Do 2 sterilních 100 ml lahvíček bylo nadávkováno 25 ml MM s MEM vitamíny a přidáno 167  $\mu$ l ZR PYR (15 g/l), tj. do koncentrace 100 mg/l. Lahvičky byly očkované po 250  $\mu$ l suspenze kultury Dr1 a do 2 lahvíček bylo ještě asepticky přidáno 2,1  $\mu$ l oktanu, tj. do koncentrace 60 mg/l.

#### *Význam produktů jedné bakterie pro druhou při rozkladu pyrrolidonu*

Postup:

Zkumavky č. 15,16 z pokusu č. 5 (s kulturou Dr1) byly přefiltrovány přes filtr (Ahlstrom) a po 1 ml byl vzorek dávkován do 4 sterilních zkumavek a přidalo se po 1 ml sterilního MM s vitamíny. Očkovalo se 20  $\mu$ l kultury Dr2. Do dvou zkumavek se přidalo 13,4  $\mu$ l ZR PYR (15 g/l), tj. do koncentrace 100 mg/l.

Zkumavky č. 11,12 z pokusu č. 6 (s kulturou Dr2), byly přefiltrovány přes filtr (Ahlstrom) a po 1 ml byl vzorek dávkován do 4 sterilních zkumavek a přidalo se po 1 ml sterilního MM s vitamíny. Očkovalo se 20  $\mu$ l kultury Dr1. Do dvou zkumavek se přidalo 13,4  $\mu$ l ZR PYR (15 g/l), tj. do koncentrace 100 mg/l.

### ***Růst kultury Dr2 na oktanolu***

Postup:

Do 2 sterilních 100 ml lahviček bylo nadávkováno 20 ml MM s MEM vitamíny. Očkovovalo se 20  $\mu$ l kultury Dr2 a přidalo se 2,4  $\mu$ l 1-oktanolu do jedné lahvičky a 2,4  $\mu$ l 2-oktanolu do druhé lahvičky (koncentrace oktanolu 100 mg/l). Kultivace byla provedena při 25°C.

#### **9.3.8 Degradace N-oktyl-2-pyrrolidonu sekvenčně, kulturami Dr2 – Dr1**

Bylo připraveno 600 ml MM a rozděleno po 300 ml do dvou láhvi, pak byla provedena sterilizace. Do sterilního minerálního média byly asepticky přidány MEM vitamíny (2 x 300  $\mu$ l) a NOP, do koncentrace 120 mg/l, což znamená 40  $\mu$ l NOP na 300 ml média. Cca 50 ml z každé láhve bylo přelito do jedné sterilní láhve a neočkováno, bylo pouze promícháno a použito jako kontrolní, sterilní vzorek. Zbýlých 250 ml v obou láhvích bylo smícháno a naočkováno 500  $\mu$ l suspenze kultury Dr2. Do 5 sterilních láhvi o objemu 500 ml bylo asepticky dávkováno po 100 ml promíchaného minerálního média s MEM vitamíny a NOP. Z kontrolního vzorku bylo odebráno 2 x 20 ml a přefiltrováno přes filtr s velikostí pórů 0,2  $\mu$ m a filtráty se zamrazily. Láhve se inkubovaly ve tmě, při 25°C na třepačce po dobu min. 8 dnů. Při kultivaci byly odebírány vzorky ze 2 láhvi (po 3, 6, 8 dnech), po 20 ml. Po odběru byla provedena filtrace přes sterilní filtr (Ahlstrom) s velikostí pórů 0,2  $\mu$ m. Vzorky byly uchovány v mrazničce, až do doby měření DOC. Z kontrolního vzorku bylo odebráno jen na začátku pokusu a pak na konci. Po 8 dnech kultivace jsem zbylý objem z 5 naočkovaných láhvi zcentrifugovala za podmínek: 5000 g, při 10°C po dobu 10 minut, poté byl přefiltrován veškerý objem přes filtr (Ahlstrom) do 4 sterilních láhvi, po cca 75 ml. Do každé lahve bylo přidáno 35  $\mu$ l MEM vitamínů. Dvě láhve byly zaočkovány 100  $\mu$ l suspenze kulturou Dr1, další dvě láhve byly zaočkovány suspenzí kultur Dr1 i Dr2. Láhve byly opět kultivovány při 25°C a vzorky na stanovení DOC se odebíraly po cca 2, 5, 8 a 13 dnech dle předchozího postupu, ze všech láhvi.

## 10 VÝSLEDKY

### 10.1 Ověření degradace N-oktyl-2-pyrrolidonu jednotlivými kulturami a společným inokulem

Důvod nasazení:

Test byl nasazen z důvodu kontroly degradačních schopností oživených kultur Dr1 a Dr2 jednotlivě i společným inokulem. A taky ověření správnosti výsledku z předchozích prací, které už zmíněné kultury zkoumaly.

Test:

Sterilní minerální médium o koncentraci 120 mg/l NOP s přidavkem MEM vitamínů bylo po 4 ml dávkováno do 16 zkumavek. Následně 3 čtveřice zkumavek byly zaočkovány suspenzemi kultur Dr1, Dr2 a společným inokulem. Poslední čtveřice očkována nebyla. Inkubovaly se při 25°C. Po dvou týdnech jsem provedla centrifugaci a v zředěném supernatantu byl stanoven DOC.

Výsledky:

Test trval 2 týdny a výsledky stanovení DOC jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2.). Tam můžeme vidět, že hodnota DOC je nejmenší u společného inokula kultur, což svědčí o nejvýraznější degradaci NOP. Kultura Dr2 vykazuje nepatrný růst na NOP a to se projevilo mírným poklesem DOC oproti slepému pokusu. Kultura Dr1 má téměř identickou hodnotu DOC jako slepý pokus a to potvrzuje její neschopnost sama využívat NOP. Tyto výsledky byly ověřeny i změřením zákalu na spektrofotometru. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3.) a potvrzují výsledky ze stanovení DOC.

Tab. 2.: Hodnoty organického rozpuštěného uhlíku po rozkladu danými kulturami

Kultura	DOC (mg/l)
Dr1	76
Dr2	63
Dr1 + Dr2	18
Bez inokula	75

Tab. 3.: Hodnoty absorpance při vlnové délce 600nm, po rozkladu NOP danými kulturami

Kultura	Absorbance
Dr1	0,042
Dr2	0,082
Dr1 + Dr2	0,099
Slepý pokus	0,043

## 10.2 Ověření degradace vyšších koncentrací N-oktyl-2-pyrrolidonu kulturou Dr2

Důvod nasazení:

Důvodem nasazení tohoto testu bylo zjištění toxické koncentrace NOP pro kulturu Dr2, tj. zjistit nejvyšší možnou koncentraci NOP, při které je kultura Dr2 schopna růstu a degradace.

Test:

Bylo připraveno 8 koncentrací NOP od 130-180 mg/l, po 10 mg/l, poslední koncentrace byla 240 mg/l

Výsledky:

Z tabulky (Tab. 4.) je patrné, že koncentrace 240 mg/l NOP je pro kulturu Dr2 toxická. Při koncentraci 120 a 130 mg/l s růstem nebyl problém, došlo k němu již v prvních dvou dnech kultivace, ale při koncentracích 140 – 150 mg/l byl růst zpočátku zpomalen. A při koncentracích 170 a 180 mg/l se růst projevil až po 168 hodinách.

Tab. 4.: Hodnocení růstu kultury Dr2 na různých koncentracích NOP

Číslo zkušavky	48 hod	75 Hod	168 hod	Koncentrace NOP (mg/l)
1 + 2	+	++	++	120
3 + 4	+	++	++	130
5 + 6	+ -	+	++	140
7 + 8	+ -	+	++	150
9 + 10	-	+	++	160
11 + 12	-	-	++	170
13 + 14	-	-	++	180
15 + 16	-	-	-	240

+ - nepatrný růst kultury, + mírný růst kultury, ++ velmi dobrý růst kultury

#### Kontrola 75 hodin - vzhled:

Zkušavky 1 – 4 jemný zákal bez vloček

Zkušavky 5 – 6 zákal s trochou vloček

Zkušavky 7 – 8 vyvločkování, drobné vločky ve velkém počtu

Zkušavky 9 – 10 vyvločkování, větší vločky (v menším počtu)

#### Kontrola 168 hodin - vzhled:

Zkušavky 7 – 14 vyvločkování, drobné vločky ve velkém počtu

### **10.3 Postupná degradace vyšších koncentrací N-oktyl-2-pyrrolidonu kulturou Dr2 a supernatantu kulturou Dr1**

Důvod nasazení:

Tento test měl ukázat, zda kultura Dr1 nastupuje po částečném rozkladu kulturou Dr2 a je schopna v rozkladu pokračovat. Dále pokud je schopna rozkladu, jestli potřebuje ke svému růstu metabolity kultury Dr2.

Test: Bylo připraveno MM o koncentraci 150 mg/l NOP a zaočkováno kulturou Dr2. Odebíraly se vzorky pro stanovení DOC. Po 12 dnech kultivace byl filtrát předchozích vzorků zaočkován kulturou Dr1 a ponechán kultivovat. Byly odebírány vzorky pro stanovení DOC.



Výsledky:

Došlo ke kolapsu přístroje Shimadzu 5000A pro stanovení DOC a tak jsem výsledky neobdržela a tento pokus byl v závěru práce opakován.

#### 10.4 Využití pyrrolidonu, N-methyl pyrrolidonu a N-ethyl pyrrolidonu kulturami Dr1 a Dr2 individuálně

Důvod nasazení:

Důvodem nasazení testu bylo zjištění schopnosti degradace této strukturní části NOP oběma kulturami.

Test:

Do zkumavek bylo nadávkováno MM a přidán PYR, NMP, NEP. Dále byly zkumavky zaočkovány kulturami Dr1 a Dr2 individuálně. Kultivace probíhala 6 dnů.

Výsledky:

V tabulce (Tab.: 5.) jsou uvedeny výsledky a všechny byly negativní, tj. žádná kultura neprokázala samostatně schopnost růstu na pyrrolidonu ani jeho použitých derivátech.

Tab. 5.: Hodnoty zákalu na strukturních částech NOP

Substrát	Kultura	Zákal (růst)
PYR	Dr1	-
PYR	Dr2	-
NMP	Dr1	-
NMP	Dr2	-
NEP	Dr1	-
NEP	Dr2	-
-	Dr1	-
-	Dr2	-
SLEPÝ POKUS	-	-
SLEPÝ POKUS	-	-

- bez zákalu (na úrovni kontroly), \* slabý, nejednoznačný zákal, + mírný zákal, ++ výrazný zákal

## 10.5 Využití pyrrolidonu, N-methyl pyrrolidonu a N-ethyl pyrrolidonu kulturou Dr1

Důvod nasazení:

Tento test byl nasazen z důvodu zjištění schopnosti růstu samotné kultury Dr1 na uvedených látkách a také na glycerolu, octanu (= ověření schopnosti růstu v použitém MM) a též na tryptonu. Jako kontrolní pokus byl nasazen i růst obou kultur společně na NOP.

Test:

Do zkumavek bylo nadávkováno MM o koncentraci 120 mg/l NOP, ty byly zaočkovány kulturou Dr2 a společným inokulem kultury Dr1 a Dr2. Do dalších zkumavek byly přidány PYR, NMP, NEP a také GLYC, TRYP (zdroj esenciálních aminokyselin) a octan a ty byly zaočkovány kulturou Dr1. Růst kultury Dr1 na PYR, NMP, NEP byl rovněž sledován za přítomnosti malého množství tryptonu. Kultivace probíhala 12 dnů.

Výsledky:

Kultura Dr2 i společné inokulum kultur Dr1 a Dr2 rostlo na NOP o koncentraci 120 mg/l, jak již vyplynulo z předchozích testů. Kultura Dr1 vykazala na PYR, NMP, NEP s přídavkem TRYP jen slabý růst, odpovídající jen růstu na tryptonu. Výraznější růst byl pozorován ve směsi GLYC a octanu (s přídavkem TRYP i bez), a na samotném TRYP kultura rostla velmi výrazně.

Výsledky tak ukázaly, že kultura Dr1 je schopna růstu v připravovaném MM (je-li substrátem směs glycerolu a octanu či trypton) a že není schopna růstu na pyrrolidu ani jeho N-methyl či N-ethyl derivátech.

Tab. 6.: Hodnoty zákalu pro dané kultury ve sledovaných substrátech

Zkumavka číslo	Substrát (mg/l)	Kultura	3 dny	5 dnů	7 dnů	10 dnů	12 dnů
1	NOP 120	Dr2	+ v	+ v	+	+	+
2	NOP 120	Dr2	+ v	+ v	+	+	+
3	NOP 120	Dr1+Dr2	+ v	+ v	++	++	++
4	NOP 120	Dr1+Dr2	+ v	+ v	++	++	++
5*	PYR 150*	Dr1	.	.	.	.	.
6*	PYR 150*	Dr1	.	.	.	.	.
7*	NMP 150*	Dr1	.	.	.	.	.
8*	NMP 150*	Dr1	.	.	.	.	.
9*	NEP 150*	Dr1	.	.	.	.	.
10*	NEP 150*	Dr1	.	.	.	.	.
11*	OCT+GLY 100+100*	Dr1	+	+	+	+	+
12*	OCT+GLY 100+100*	Dr1	+	+	+	+	+
13*	*	Dr1	.	.	.	.	.
14*	*	Dr1	.	.	.	.	.
15	TRYPT 150	Dr1	+++	+++	+++	+++	+++
16	TRYPT 150	Dr1	+++	+++	+++	+++	+++
17	OCT+GLY 100+100	Dr1	+	+	+	+ v	+ v
18	OCT+GLY 100+100	Dr1	+	+	++	+ v	+ v
19	-----	Dr1	-	-	-	-	-
20	-----	Dr1	-	-	-	-	-

\* přídavek tryptonu v koncentraci 10 mg/l (= zdroj esenciálních aminokyselin), v vložky, · nepatrný náznak růstu (trypton 10 mg/l), + viditelný růst, ++ výrazný růst, - bez růstu

## 10.6 Využití oktanu, oktanolu, pyrrolidonu, N-methyl pyrrolidonu a N-ethyl pyrrolidonu kulturou Dr2 individuálně, PYR a NEP v konsorciu s Dr1, kontroly

Důvody nasazení:

Provedením tohoto testu byly zkoumány degradační schopnosti kultury Dr2 ve stejných látkách jako v předchozím pokusu s kulturou Dr1, a také na oktanu a oktanolu.

Test:

Čtyři zkumavky byly opět naplněné MM o koncentraci 120 mg/l NOP (pozitivní kontrola) a dvě zaočkovány kulturou Dr2 a dvě společným konsorciem Dr1 a Dr2. Do dalších zkumavek byl přidán PYR, NMP, NEP a také oktan a oktanol a ty byly zaočkovány kulturou Dr2. Kultivace probíhala 7 dnů.

Výsledky:

Ve zkumavkách s NOP byl opět výrazný zákal v případě společného inokula, jako v předchozím testu. Samotná kultura Dr2 byla schopna růstu pouze na oktanu a nebyla schopna (kromě mírného růstu na NOP) využít k růstu žádný jiný substrát, dokonce ani společné inokulum obou kultur nerostlo na pyrrolidonu ani N-ethylpyrrolidonu. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce (Tab. 7.).

Tab. 7.: Hodnoty zákalu pro dané kultury ve sledovaných substrátech

Zkumavka Číslo	Substrát (mg/l)	Kultura	3 dny	5 dnů	7 dnů
1	NOP 120	Dr2	+ v	+	+
2	NOP 120	Dr2	+ v	+	+
3	NOP 120	Dr1+Dr2	+ v	+ v	++
4	NOP 120	Dr1+Dr2	+ v	+ v	++
5	PYR 150	Dr2	-	-	-
6	PYR 150	Dr2	-	-	-
7	NMP 150	Dr2	-	-	-
8	NMP 150	Dr2	-	-	-
9	NEP 150	Dr2	-	-	-
10	NEP 150	Dr2	-	-	-
11	OKTAN	Dr2	++	++	++
12	OKTAN	Dr2	++	++	++
13	OKTANOL	Dr2	-	-	-
14	OKTANOL	Dr2	-	-	-
15	---	Dr2	-	-	-
16	---	Dr2	-	-	-
17	PYR 150	Dr1+Dr2	-	-	-
18	PYR 150	Dr1+Dr2	-	-	-
19	NEP 150	Dr1+Dr2	-	-	-
20	NEP 150	Dr1+Dr2	-	-	-

v vločky, + viditelný růst, ++ výrazný růst, - bez růstu

## 10.7 Růst kultur Dr2 i Dr1 na různých kombinacích

Důvody nasazení:

Test byl proveden jednak pro kontrolu přežití kultur v pokusech 5 a 6, dále pro zjištění schopností růstu kultur na nižších koncentracích PYR a NEP a ještě byl zkoumán význam oktanu při degradaci pyrrolidonu a význam metabolitů jedné bakterie pro druhou při rozkladu pyrrolidonu. Následně byla studována i schopnost růstu kultury Dr2 na oktanolu.

Test:

### *Kontroly přežití inokul z pokusů 5 a 6*

Byly vyočkovány zkumavky z pokusů 5 a 6 na R2A a TYA agar.

### *Růst Dr1, Dr2 a kombinace Dr1+Dr2 na nízké koncentraci PYR a NEP (75 mg/l)*

Do zkumavek z pokusů 5 a 6 bylo přidáno MM a vitamíny MEM a suspenze kultur a vznikly tak koncentrace 75 mg/l PYR i NEP.

### *Význam oktanu pro degradaci pyrrolidonu*

Do lahvíček bylo nadávkováno MM s MEM vitamíny, PYR do koncentrace 100 mg/l a zaočkováno suspenzemi obou kultur a samotné kultury Dr1, následně byl přidán oktan.

### *Význam produktů jedné bakterie pro druhou při rozkladu laktamu*

Obsahy zkumavek z pokusu 5 byly přefiltrovány, pak bylo přidáno MM s MEM vitamíny a PYR, a zaočkováno kulturou Dr2. Taktéž obsahy zkumavek z pokusu 6 byly přefiltrovány, pak bylo přidáno MM s MEM vitamíny a PYR, a zaočkováno kulturou Dr1.

### *Růst kultury Dr2 na oktanolu*

Do lahvíček bylo nadávkováno MM s MEM vitamíny a zaočkováno kulturou Dr2. Dále byl přidán 1-oktanol a 2-oktanol.

Výsledky:

### *Kontroly přežití inokul z pokusů 5 a 6*

Kultury v předešlých pokusech přežily a mohly být využity k pokusu 7. Výsledek také ukázal, že substráty, použité v předešlých pokusech nebyly v baktericidních koncentracích.

***Růst Dr1, Dr2 a kombinace Dr1+Dr2 na nízké koncentraci PYR a NEP (75 mg/l)***

Po 3 dnech kultivace nerostlo nic. Po 5, 7 a 10 dnech byly výsledky stále stejné. Bylo tak potvrzeno, že za daných podmínek nejsou kultury schopné pyrrolidon ani N-ethylpyrrolidon rozkládat a využívat.

***Význam oktanu pro degradaci laktamu***

Mírný růst byl pozorován ve dvou lahvičkách s PYR, oktanem a kombinací Dr1+Dr2 po 3 dnech kultivace. V dalších lahvičkách se růst neprojevil. Po 5 dnech byl opět pozorován mírný růst ve dvou lahvičkách s PYR, oktanem a kombinací Dr1+Dr2, jako po 3 dnech, a objevil se nepatrný zákal v lahvičkách s kulturou Dr1 a přídatkem oktanu. Po 7, 10 a 12 dnech kultivace byly výsledky stále stejné. Obsah lahviček se společným inokulem byl filtrován a filtrát uchován pro stanovení DOC. Hodnoty DOC uvedené v tabulce (Tab. 8.) ukázaly, že PYR nebyl využíván společným inokulem a ani inokulem s přídatkem oktanu, neboť konečné hodnoty DOC byly značně vysoké.

Tab. 8.: Hodnoty DOC pro společné inokulum i s přídatkem oktanu

Kultura	TC (mg/l)	IC (mg/l)	DOC (mg/l)	DOC (mg/l) průměr
Dr1+Dr2	60,79	2,583	58,207	51,3905
Dr1+Dr2	47,71	3,136	44,574	
Dr1+Dr2+oktan	62,77	5,094	57,676	56,5225
Dr1+Dr2+oktan	60,87	5,501	55,369	

***Význam produktů jedné bakterie pro druhou při rozkladu laktamu***

Po 3 dnech kultivace kultura Dr2 rostla ve všech zkumavkách stejně, tj. velmi dobře. Kultura Dr1 nerostla. Po 5, 7 a 10 dnech se výsledky nelišily.

***Růst kultury Dr2 na oktanolu***

Kultura po 3 dnech nerostla v žádné láhvi. Po 5 dnech se objevil nepatrný zákal na 2-oktanolu, což přetrvávalo i po 7 a 10 dnech; tento výsledek však byl dán spíše rozmícháváním oktanolu, nikoliv růstem kultury.

Celkově lze shrnout, že žádná z kombinací použitých v pokusu nevedla k růstu některé kultury na pyrrolidonu. Otázka rozkladu této strukturní části NOP tak zůstala nejasná.

## 10.8 Degradace N-oktyl-2-pyrrolidonu sekvenčně Dr2 – Dr1

Důvod nasazení:

Důvodem nasazení tohoto testu bylo studování rozkladu NOP sekvenčně, kulturami Dr2 a poté Dr1, tedy potvrzení předpokladu, že degradaci NOP zahajuje kultura Dr2 a následně v rozkladu pokračuje kultura Dr1 či obě kultury společně.

Test:

Připravené MM s MEM vitamíny a NOP o koncentraci 120 mg/l bylo zaočkováno kulturou Dr2 a ponecháno kultivovat. Během kultivace byly odebírány vzorky pro stanovení DOC. Po 8 dnech byl veškerý obsah láhví zcentrifugován a přefiltrován. Supernatant byl rozdělen do 4 láhví a 2 byly zaočkovány kulturou Dr1 a 2 společným inokulem. Opět byly během kultivace odebírány vzorky pro stanovení DOC.

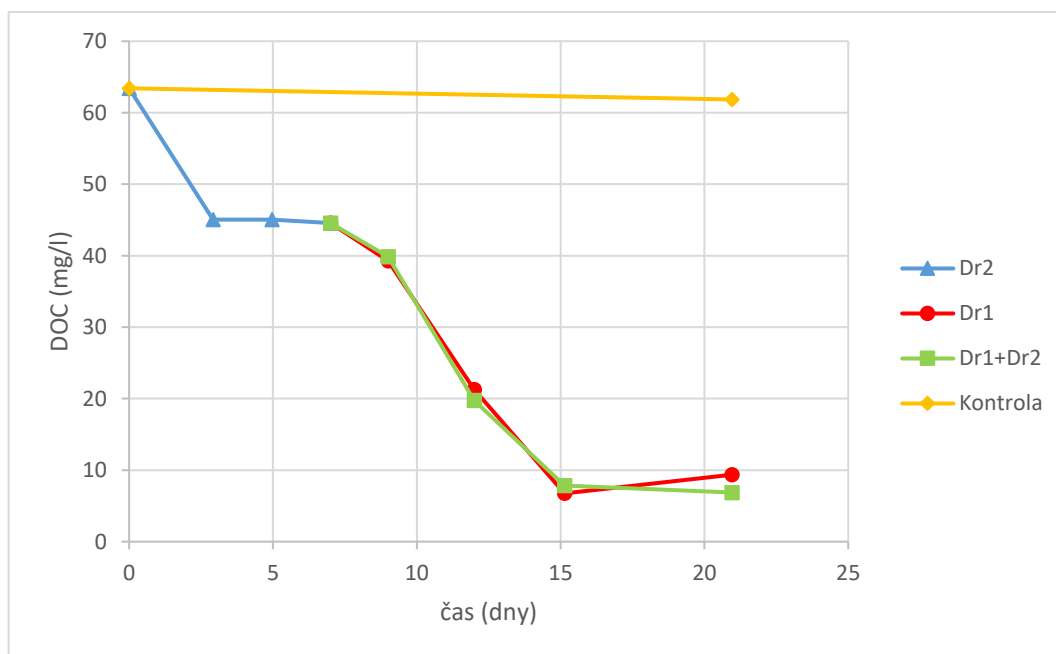
Výsledky:

Z tabulky vyplývá, že kultura Dr2 skutečně zahajuje rozklad a kultura Dr1 v něm pokračuje. Dále hodnoty DOC společného inokula a samotné kultury Dr1 se liší jen mírně, z toho vyplývá, že v degradaci pokračuje kultura Dr1 sama, ale výraznější pokles DOC se projevil po delší době kultivace oproti kultuře Dr2, kde jsem největší pokles DOC zaznamenala již po 3 dnech kultivace. Pro každý vzorek byly stanoveny dvě paralelní měření a ty se mezi sebou většinou téměř nelišily. Hodnota DOC na konci pokusu byla kolem 7 mg/l, což vypovídá o velmi dobrém průběhu degradace a pravděpodobně o kompletním rozkladu NOP.



Tab. 9.: Hodnoty DOC pro jednotlivé kultury i společné inokulum

Čas (dny)	Kultura	TC (mg/l)		IC (mg/l)		DOC (mg/l)		DOC (mg/l) průměr
		Lichý vzorek	Sudý vzorek	Lichý vzorek	Sudý vzorek	Lichý vzorek	Sudý vzorek	
0	Dr2	63,1	69,7	3,4	2,6	59,7	67,1	63,4
3	Dr2	49,2	48,7	3,9	3,9	45,3	44,8	45,0
5	Dr2	49,7	50,9	4,2	6,3	45,5	44,6	45,0
7	Dr2	49,0	50,5	4,8	5,5	44,2	45,0	44,6
9	Dr1	44,1	44,3	4,7	5,1	39,4	39,2	39,3
9	Dr1+Dr2	43,9	45,8	5,0	5,0	38,9	40,8	39,8
12	Dr1	28,5	28,6	7,0	7,5	21,5	21,1	21,3
12	Dr1+Dr2	23,3	24,1	3,9	3,9	19,3	20,2	19,8
15	Dr1	11,2	12,9	5,2	5,3	5,9	7,6	6,8
15	Dr1+Dr2	11,8	16,3	3,9	8,5	7,9	7,8	7,8
21	Dr1	17,7	-	8,3	-	9,4	-	-
21	Dr1+Dr2	-	15,1	-	8,2	-	6,9	-
21	žádná	65,5	-	3,6	-	61,9	-	-



Obr. 2.: Graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase

## ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo prozkoumání principu spolupráce dvou kultur izolovaných z říční vody, při degradaci NOP, který je syntetickou látkou používanou v různých průmyslových odvětvích, a která je jistým nebezpečím pro životní prostředí a především pro vodní organismy.

Již z předchozích prací jsem věděla, že kultury jsou společně schopny NOP poměrně dobře rozložit, ale nebylo známo, jak přesně spolu fungují. Pro ověření těchto informací jsem nejprve podrobila NOP degradaci jednotlivými kulturami i společným inokulem. Z výsledků bylo zřejmé, že kultura Dr1 není schopná růstu na NOP, ve vzorku se společným inokulem však byl detekován výrazný rozklad látky. U kultury Dr2 byl růst jen slabý, doprovázený mírným poklesem DOC.

NOP vykazuje toxicitu vůči vodním organismům, proto byl další test zaměřen na určení toxické koncentrace pro kulturu Dr2. Kultura Dr2 byla ještě schopna – po určité prodlevě – růstu při koncentraci 180 mg/l NOP, ale koncentrace 240 mg/l již byla toxická.

Dále byla nasazena řada testů, které měly objasnit princip spolupráce kultur. Z předchozích výsledků i výsledků předchozích prací bylo zřejmé, že kultura Dr2 zahajuje degradaci, protože je schopná mírně růst na NOP i sama. Současně existoval předpoklad, že kultura degraduje oktylovou část NOP, neboť v předchozí práci Novotné bylo zjištěno, že roste na oktanolu. Toto sice v této práci potvrzeno nebylo, ale byl nepochybně prokázán růst kultury Dr2 na oktanu.

Předpokladem pro další testy tedy bylo, že kultura Dr2 využívá pro svůj růst oktylový řetězec a kultura Dr1 pyrrolidonový kruh. Proto byl zkoušen růst obou kultur, i jednotlivě, na pyrrolidonu a jeho derivátech (NMP, NEP). Všechny výsledky však byly negativní, ani společná kultura Dr1 + Dr2 nedokázala pro svůj růst pyrrolidonový kruh využít a ani přídatek tryptonu coby zdroje esenciálních aminokyselin neumožnil růst na pyrrolidonu. Je tedy pravděpodobné, že podstata společné degradace NOP je jiná než degradace odlišných částí molekuly jednotlivými kulturami. Je možné, že kultura Dr1 potřebuje nějaký velmi specifický metabolit(y), který vytvoří kultura Dr2 při rozkladu NOP, nebo kultura Dr2 přeměňuje pyrrolidonovou část molekuly NOP na poněkud odlišnou strukturu.

Předpoklad, že kultura Dr2 využívá pro svůj růst pouze oktylový řetězec, byl správný a potvrdil to test, kde se prokázal její růst pouze na oktanu, zatímco na pyrrolidonu, NMP a NEP byl negativní.

Ani další testy nám moc neobjasnily spolupráci. Kultury nebyly schopny růstu ani na nižších koncentracích pyrrolidonu a NEP a k degradaci pyrrolidonu nedošlo ani za přídavku oktanu.

Výsledky posledního testu však prokázaly velmi efektivní degradaci NOP při působení obou kultur a bylo z nich patrné, že kultura Dr2 zahajuje degradaci a po ní nastupuje kultura Dr1, a ta je klíčová pro rozklad zbývající části molekuly.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABALOS, A., M. VIÑAS, J. SABATÉ, M.A. MANRESA a A.M. SOLANAS. Enhanced Biodegradation of Casablanca Crude Oil by A Microbial Consortium in Presence of a Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* AT10. *Biodegradation*. 2004, **15**(4), 249-260. DOI: 10.1023/B:BIOD.0000042915.28757.fb. ISSN 0923-9820. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:BIOD.0000042915.28757.fb>
- ANSELL, JM a JA FOWLER. The acute oral toxicity and primary ocular and dermal irritation of selected n-alkyl-2-pyrrolidones. *Food and chemical toxicology*. 1988, **26**(5), 475-479. DOI: 10.1016 / 0278-6915 (88) 90060-9. 1465-8011.
- DI GIOIA, Diana, Laura FAMBRINI, Ester COPPINI, Fabio FAVA a Claudia BARBERIO. Aggregation-based cooperation during bacterial aerobic degradation of polyethoxylated nonylphenols. *Research in Microbiology*. 2004, **155**(9), 761-769. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.05.015. ISSN 09232508. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250804001378>
- ChemicalBook, 2016* [online]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB0388315.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0388315.htm) [cit. 2019-02-02]
- CHEN, Yu, Chen LI, Zhengxi ZHOU, et al. Enhanced Biodegradation of Alkane Hydrocarbons and Crude Oil by Mixed Strains and Bacterial Community Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, **172**(7), 3433-3447. DOI: 10.1007/s12010-014-0777-6. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-014-0777-6>
- HAYASHI, Takaya, Hiroi NISHIMURA, Kouichi SAKANO a Yoshiki TANI. Microbial Degradation of Poly(sodium acrylate). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014, **58**(2), 444-446. DOI: 10.1271/bbb.58.444. ISSN 0916-8451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.58.444>
- IWAHASHI, Masahide, Tohoru KATSURAGI, Yoshiki TANI, Ken TSUTSUMI a Kiyomi KAKIUCHI. Mechanism for degradation of poly(sodium acrylate) by bacterial consortium no. L7-98. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003, **95**(5), 483-487. DOI: 10.1016/S1389-1723(03)80049-X. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138917230380049X>
- KAYTAN, H a M BONNET. N-alkyl pyrrolidones as innovative PVC plasticisers. *PLASTICS RUBBER AND COMPOSITES*. 2008, **37**(9-10), 411-416. DOI: 10.1179 / 174328908X356572. 1465-8011.
- KAWAI, F. Sphingomonads involved in the biodegradation of xenobiotic polymers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1999, **23**(4-5), 400-407. DOI: 10.1038/sj.jim.2900730. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1038/sj.jim.2900730>
- LOGIN, RB. PYRROLIDONE-BASED SURFACTANTS (A LITERATURE-REVIEW). *JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY*. 1995, **72**(7), 759-771. DOI: 10.1007 / BF02541023. 1465-8011.

- MARA, Duncan, HORAN, Nigel. Recalcitrant organic compounds. In: *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Leeds : Academic Press, 2003, s. 562-563
- MERKOVA, Marketa, Michal ZALESK, Eva RINGLOVA, Marketa JULINOVA a Jan RUZICKA. Degradation of the surfactant Cocamidopropyl betaine by two bacterial strains isolated from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, **127**, 236-240. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.12.006. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517313574>
- MUKHERJEE, Shritama, Uttam ROYCHAUDHURI a Patit P KUNDU. Biodegradation of polyethylene via complete solubilization by the action of *Pseudomonas fluorescens*, biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* and anionic surfactant. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2018, **93**(5), 1300-1311. DOI: 10.1002/jctb.5489. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.5489>
- N-Octyl-2-pyrrolidone dist., BASF, [online]. 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) [cit. 2019-02-02]
- 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. 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.
- Royal Society of Chemistry*, 2015 [online]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2298449.html> [cit. 2019-02-02]
- Sigma-Aldrich Bezpečnostní list, 1-octyl-2-pyrrolidone, [online]. Dostupný z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/332186?lang=en&region=CZ> [cit. 2019-02-02]
- STAHL, James D., Michael D. CAMERON, Joachim HASELBACH a Steven D. AUST. Biodegradation of superabsorbent polymers in soil. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2000, **7**(2), 83-88 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1065/espr199912.014. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1065/espr199912.014>

- YANG, Jun, Yu YANG, Wei-Min WU, Jiao ZHAO a Lei JIANG. Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. *Environmental Science & Technology*. 2014, **48**(23), 13776-13784. DOI: 10.1021/es504038a. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es504038a>
- ZHAO, Jian-Kang, Xiao-Ming LI, Guo-Min AI, Ye DENG, Shuang-Jiang LIU a Cheng-Ying JIANG. Reconstruction of metabolic networks in a fluoranthene-degrading enrichments from polycyclic aromatic hydrocarbon polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*. 2016, **318**, 90-98. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.06.055. ISSN 03043894. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389416306100>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BP	Bakalářská práce
CAPB	Kokamidopropyl betain
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
DP	Diplomová práce
Dr 1	Bakteriální kultura Dr1
Dr 2	Bakteriální kultura Dr2
FM	Bakteriální kultura FM
FR	Fyziologický roztok
FT	Fakulta technologická
FV	Bakteriální kultura FV
GLYC	Glycerol
MM	Minerální médium
MMO	Očkované minerální médium
MM240	Minerální médium s koncentrací 240 mg/l NOP
MM480	Minerální médium s koncentrací 480 mg/l NOP
NEP	N-ethylpyrrolidon
NMP	N-methylpyrrolidon
NOP	N-oktyl-2-pyrrolidon
PAU	Polyaromatické uhlovodíky
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylen glykol
PSA	Polyakrylátsodný
PYR	Pyrrolidon
R2A	Oficiální název konkrétního živného agaru
SDS	Surfaktant dodecylsulfát sodný
TYA	Trypton Yeast Extract Agar
TRYP	Trypton
UIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
ZR	Zásobní roztok

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. Strukturní vzorec N-oktyl-2-pyrrolidonu.....	12
Obr. 2.: Graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase.....	41

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1.: Objemy jednotlivých MM a koncentrace NOP.....	25
Tab. 2.: Hodnoty organického rozpuštěného uhlíku po rozkladu danými kulturami.....	30
Tab. 3.: Hodnoty absorbance při vlnové délce 600nm, po rozkladu NOP danými kulturami.....	31
Tab. 4.: Hodnocení růstu kultury Dr2 na různých koncentracích NOP.....	32
Tab. 5.: Hodnoty zákalu na strukturních částech NOP.....	33
Tab. 6.: Hodnoty zákalu pro dané kultury ve sledovaných substrátech.....	35
Tab. 7.: Hodnoty zákalu pro dané kultury ve sledovaných substrátech.....	37
Tab. 8.: Hodnoty DOC pro společné inokulum i s přídatkem oktanu.....	39
Tab. 9.: Hodnoty DOC pro jednotlivé kultury i společné inokulum.....	41