

Mikrobiální degradace N-methyl-2-pyrrolidonu v povrchové stojaté vodě

Jana Fusková

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jana FUSKOVÁ**
Osobní číslo: **T10591**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Mikrobiální degradace N-methyl-2-pyrrolidonu
v povrchové stojaté vodě**

Zásady pro vypracování:

1. Vytipujte lokalitu přírodní stojaté povrchové vody a proveďte sérii odběrů vzorků.
2. V odebraných vzorcích stanovte celkový počet psychrofilních a mesofilních heterotrofních bakterií.
3. V odebraných vzorcích proveďte testy mikrobiálního rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu.
4. Získané výsledky zpracujte přehlednou formou a práci odevzdejte v řádném termínu v tištěné i elektronické podobě.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

8. února 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

24. května 2013

Ve Zlíně dne 8. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: FUSKOVA' JANA

Obor: IOŽP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, 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 20.5.2013

..... Jana Fusková

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

(1) Vysoká škola 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.

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užíje-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).

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

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

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

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

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývala problematikou, zdali je rozkládán ve stojaté povrchové vodě N-methyl-2-pyrrolidon, tedy zdali v ní žijí mikroorganismy, které ho využívají jako svou živinu. Cílem této práce bylo také najít a pokusit se identifikovat ty bakteriální kultury, které jsou právě schopny rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu. Biodegradace N-methyl-2-pyrrolidonu byla sledována pozorováním zákalu jednotlivých suspenzí v kultivačních láhvích a především stanovením obsahu rozpuštěného organického uhlíku za pomoci automatického analyzátoru. Výsledky ukázaly, že přes velmi nízký obsah bakterií v dané vodě je uvedená sloučenina po 80–90 dnech kultivace rozložitelná.

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

ABSTRACT

This thesis dealt with the issue of whether N-methyl-2-pyrrolidone is degraded in stagnant surface water, and whether there are water-live microorganisms that use it as their carbon source. The goal of this work was also to find and to try to identify the bacterial cultures capable of N-methyl-2-pyrrolidone decomposition. Biodegradation of N-methyl-2-pyrrolidone was monitored by observing turbidity of suspensions in culture bottles and primarily with the determination of dissolved organic carbon using an automatic analyser. The results showed that despite the very low bacterial counts in the water the compound is after 80–90 days of cultivation biodegradable.

Keywords: biodegradation, N-methyl-2-pyrrolidone, bacteria, stagnant water

Mé poděkování patří především panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce a za jeho ochotu, trpělivost a vstřícnost. Poděkovat chci také paní Lence Machálkové za její pomoc při výzkumné části a za podporu.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 1-METHYL-2-PYRROLIDON.....	11
1.1 POUŽITÍ.....	11
1.2 VLASTNOSTI.....	11
1.2.1 Toxikologické vlastnosti.....	12
1.2.2 Ekologické informace.....	12
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	13
2 MATERIÁL A METODIKA.....	14
2.1 SLOŽENÍ POUŽITÝCH ROZTOKŮ A ŽIVNÝCH PŮD.....	14
2.1.1 TYA agar (Tryptone yeast extract agar).....	14
2.1.2 Minerální agar.....	14
2.1.3 Minerální agar s NMP.....	14
2.1.4 Roztoky stopových prvků.....	14
2.1.5 Zásobní roztoky solí.....	15
2.1.6 Zásobní roztok minerálů.....	15
2.1.7 Fyziologický roztok.....	16
2.1.8 Popis lokality a odběry vzorků vod.....	16
2.1.9 Stanovení celkových počtů heterotrofních bakterií.....	16
2.1.10 Sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu – první orientační pokus.....	17
2.1.11 Sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu – druhý pokus.....	17
2.1.12 Isolace bakterií schopných rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu.....	17
2.1.13 Vlastnosti a orientační identifikace získaných kultur.....	18
Oxidačně-fermentační test.....	18
Gramovo barvení.....	19
Test na katalasu a cytochromoxidasu.....	19
NEFERMtest 24.....	19
3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	20
3.1 POMŮCKY.....	20
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	20
4 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	21
4.1.1 Provedení prvního orientačního pokusu rozkladu NMP.....	21
4.1.2 Provedení druhého pokusu rozkladu NMP.....	22
4.1.3 Získání kultur se schopností rozkladu NMP.....	26
ZÁVĚR.....	29
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	31
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	32
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	33
SEZNAM TABULEK.....	34
SEZNAM PŘÍLOH.....	35

ÚVOD

Ochrana životního prostředí je v současné době velmi důležitým a zároveň často diskutovaným tématem. Stačí se kolem sebe rozhlédnout. Lidé vypouští do ovzduší, řek či půdy mnoho škodlivin, ať už při průmyslové výrobě, z dopravy, lékařství nebo také ze zemědělství. Hromadění těchto někdy nebezpečných látek v prostředí může znamenat velké environmentální, ale rovněž i zdravotní riziko. Proto je potřebné znát chování průmyslově používaných látek v různých sférách vnějšího prostředí včetně povrchových vod, které jsou obohaceny různými formami života.

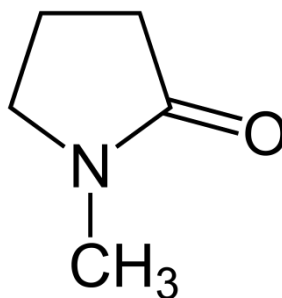
Jednou z nejvýznamnějších možností, jak zabránit dalšímu hromadění látek v prostředí, je mikrobiální degradace. Při čištění odpadních vod jde o přirozený proces odstraňování průmyslově používaných sloučenin působením mikroorganismů, které škodlivé látky využívají jako svůj substrát. Dosud neprozkoumanou oblastí je, zda k této biodegradaci dochází i vlivem přirozeného mikrobiálního osídlení povrchových vod, které je obvykle podstatně chudší než na čistírnách odpadních vod a zda je možné, že budou dané látky v povrchových vodách přirozeně odbourávány při nežádoucích znečištěních či při haváriích.

Bakalářská práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části jsou uvedeny vlastnosti a možnosti využití zkoumané látky (N-methyl-2-pyrrolidonu). Praktická část začíná seznámením s použitými roztoky a živnými půdami včetně jejich složení a návodů, dále se věnuje popisu lokality, ze které byly vzorky vod odebrány a stěžejní část sleduje rozklad N-methyl-2-pyrrolidonu ve stojaté povrchové vodě a je zaměřena na případnou izolaci bakterií, které tuto látku dokážou rozložit.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 1-METHYL-2-PYRROLIDON

1-methyl-2-pyrrolidon – C_5H_9NO (viz Obrázek 1) nebo také N-methyl-2-pyrrolidon, anglicky 1-methyl-2-pyrrolidone nebo N-methyl-2-pyrrolidone. Používá se také zkratka NMP. Jedná se o stabilní, bezbarvou kapalinu s charakteristickým zápachem po čpavku. Při vystavení světlu se rozkládá a žlutne [1].



Obrázek 1 – Struktura NMP

1.1 Použití

NMP je známý pro jeho nízkou toxicitu a díky jeho silným rozpouštěcím schopnostem je v Evropě používán v mnoha průmyslových a profesionálních aplikacích, ve kterých se používá jako rozpouštědlo pro širokou řadu chemikálií a polymerů nebo jako rozpouštědlo při zpracování a čištění ropy, pryskyřice, plynů, olefinů atd. [2]. Mimo Evropu může být NMP využíván také v různých produktech, které jsou poté k dispozici na trhu spotřebitele – například v nátěrech a čisticích prostředcích [3].

Dále je využíván ve farmaceutickém průmyslu, kde zajišťuje rychlejší přenos látek přes kůži a také je používán jako přísada do různých pesticidů pro zemědělské a domácí zahradní použití [4].

1.2 Vlastnosti

NMP je hygroskopický, ale za normálních podmínek stabilní. Je rozpustný v etheru a acetonu, rozpustný ve vodě, mísitelný s nižšími alkoholy a ketony, ethylacetátem, chloroformem a benzenem, je mírně rozpustný v alifatických uhlovodících a rozpouští mnoho organických a anorganických sloučenin. Prudce reaguje se silnými oxidačními činidly, jako jsou peroxid vodíku, kyselina dusičná, kyselina sírová, atd. [5].

Při tepelném rozkladu může docházet ke vzniku toxických zplodin - oxidů dusíku (NO_x) a oxidů uhlíku (CO , CO_2) [6]. Základní vlastnosti NMP jsou uvedeny v tabulce 1 [7].

Tabulka 1 – Základní vlastnosti NMP

Molekulový vzorec	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$
Molární hmotnost	99,13 g/mol
Hustota (při 20 °C)	1,028 g/cm ³
Bod tání	-24 °C
Bod varu	202 °C
Hodnota pH	8,5 – 10 (100 g/l, při 20 °C)
Viskozita	1,80 mPa/s

1.2.1 Toxikologické vlastnosti

Při zkoumání bylo zjištěno, že NMP má nízkou akutní toxicitu při vdechnutí, požití nebo při styku s kůží, ale při dlouhodobém nebo opakovaném působení může způsobit silné podráždění očí, kůže a při vdechování podráždění dýchacích cest. Látku není potřeba klasifikovat jako karcinogenní a také u ní nebyl zjištěn žádný mutagenní účinek. Při opakovaných testech na zvířatech při vysokých expozicích, které způsobují i jiné toxické efekty, však docházelo k poškození varlat [6].

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006, ze dne 18. prosince 2006, podle článku 57 (c) je proto tato látka identifikována jako toxická pro reprodukci a vývoj [8].

1.2.2 Ekologické informace

Bioakumulace NMP v organismech je nepravděpodobná vzhledem k hodnotě rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda. Podle kritérií OECD je NMP biologicky odbouratelný, k biodegradaci v odpadních vodách dochází, a to více než z 90% [6].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

2 MATERIÁL A METODIKA

2.1 Složení použitých roztoků a živných půd

2.1.1 TYA agar (Tryptone yeast extract agar)

Při přípravě živné půdy bylo naváženo 4,2 g TYA agaru (HIMEDIA, Indie) a smíchán s 200 ml destilované vody. Po dokonalém rozpuštění byl sterilizován v autoklávu při 125 °C při zvýšeném tlaku vodních par po dobu 25 minut. Po autoklávování se ochladil na cca 50 °C a po dostatečném promíchání byl rozlit do připravených sterilních Petriho misek, aby v nich vznikla vrstva asi 3–4 mm.

2.1.2 Minerální agar

Navážku připravené směsi v množství 1,9 g uvedené v tabulce 2 bylo potřeba suspendovat ve 100 ml destilované vody, poté byl přidán roztok stopových prvků v množství 0,2 ml a sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut. Hodnota pH musela být v rozmezí 7,2–7,4.

Tabulka 2 – Složení směsi pro přípravu minerálního agaru

K₂HPO₄	0,100 g
NH₄Cl	0,110 g
MgSO₄.7H₂O	0,020 g
FeSO₄.7H₂O	0,005 g
CaCl₂	0,002 g
Agar	1,600 g

2.1.3 Minerální agar s NMP

Příprava byla stejná jako v případě minerálního agaru, avšak po sterilizaci a zchladnutí na cca 50 °C byl přidán sterilní 10% roztok N-methyl-2-pyrrolidonu v množství 1 ml na 100 ml média, který byl dokonale promíchán a rozlit do Petriho misek.

2.1.4 Roztoky stopových prvků

Všechny stopové prvky byly naváženy v množství podle tabulky 3 a rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

Tabulka 3 – Složení roztoku stopových prvků

MnSO₄·5H₂O	0,043 g
H₃BO₃	0,057 g
ZnSO₄·7H₂O	0,043 g
(NH₄)₆Mo₇O₂₄	0,037 g
Co(NO₃)₂·6H₂O	0,025 g
CuSO₄·5H₂O	0,040 g

2.1.5 Zásobní roztoky solí

Každá sůl byla navážena v množství podle tabulky 4 a rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

Tabulka 4 – Složení zásobních roztoků solí

MgSO₄·7H₂O	1,0 g
Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O	0,3 g
CaCl₂·2H₂O	0,1 g
NaCl	0,5 g
NH₄Cl	3,0 g

2.1.6 Zásobní roztok minerálů

Do uzavíratelné láhve s cca 70 ml destilované vody byly nejprve nadávkovány roztoky fosforečnanů v množstvích uvedených v tabulce 5 a dále byly postupně přidávány zásobní roztoky jednotlivých solí v množství po 1 ml; po důkladném promíchání byl roztok doplněn destilovanou vodou do 100 ml. Nakonec byla změřena hodnota pH, která se musela pohybovat v rozmezí 7,4–7,5. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu.

Tabulka 5 – Složení zásobního roztoku minerálů

Roztok KH₂PO₄ o koncentraci 9,07 g/l	2,0 ml
Roztok Na₂HPO₄·12H₂O o koncentraci 23,90 g/l	8,0 ml
Zásobní roztoky solí	1,0 ml každý
Stopové prvky	0,1 ml

2.1.7 Fyziologický roztok

Tento roztok byl připravován rozpuštěním 8,5 g chloridu sodného v 1 litru destilované vody.

2.1.8 Popis lokality a odběry vzorků vod

Vzorky vod byly odebrány z přirozeného mokřadu z lokality přírodní památky Rákosina ve Stříteži nad Bečvou. Rákosina se nachází v chráněné krajinné oblasti Beskydy, která je součástí flyšového pásma Západních Karpat. Geograficky území náleží do Rožnovské brázdy a leží v nadmořské výšce 339–341 m pod severním úpatím zalesněného vrchu Hostýn (416 m n. m.). Podle zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, patří Rákosina do kategorie maloplošných zvláště chráněných území a jedná se o přírodní památku, jak již bylo uvedeno. Představuje vzácný ekosystém mokřadního stanoviště s rozsáhlými porosty rákosu přecházejícími do volných vodních ploch; celá lokalita je útočištěm vzácných a ohrožených druhů rostlin a živočichů. Péče o toto přírodně cenné území spadá do působnosti Českého svazu ochránců přírody (ČSOP), regionální organizace ve Valašském Meziříčí. Přírodní památkou byla Rákosina vyhlášena roku 1994, celková rozloha činí 1,7582 ha, okolo území je vyhlášeno ochranné pásmo o rozloze 15 ha [9].

Odběry vzorků vod z přirozeného mokřadu Rákosiny (viz příloha P I) byly provedeny dvakrát, na jaře 25. března 2012 a na podzim 30. listopadu 2012. Bylo odebráno cca 300 ml vody do sterilizované láhve o objemu 500 ml. Láhev nebyla plněna až po okraj, aby nedošlo k vyčerpání kyslíku a vzorek zůstal v aerobním stavu. Materiál byl ponechán přes noc v chladu a ve tmě. Vzorky bylo důležité zpracovat do 24 hodin.

2.1.9 Stanovení celkových počtů heterotrofních bakterií

Ke stanovení celkových počtů bakterií byly vzorky naředěny fyziologickým roztokem desetinnou řadou, a to v řádech 10x, 100x, 1000x a 10 000x. Do prázdných sterilních Petriho misek bylo dávkování ředěného vzorku provedeno tak, aby v nich byla ředění 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , a to vždy 4 misky pro každé ředění, přičemž 2 misky z každého ředění byly kultivovány psychrofilně (při 20 °C) a 2 misky mezofilně (při 37 °C). Všechny misky byly zality sterilním vlažným TYA agarem, uzavřeny, opatrně promíchány a ponechány ve vodorovné poloze pro jeho ztuhnutí (cca 5–10 minut). Po ztuhnutí byly

misky pro psychrofilní i mezofilní kultivaci uloženy do termostatů, které splňovaly výše uvedené teplotní požadavky.

2.1.10 Sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu – první orientační pokus

Pokus byl zahájen odměřením 50 ml vzorku vody do každé ze tří sterilních láhví sterilním válcem a do každé bylo přidáno 0,5 ml sterilního zásobního roztoku minerálních solí. Potom byl do dvou láhví přidán sterilní 10% zásobní roztok N-methyl-2-pyrrolidonu v množství 150 μ l. Tak vznikla koncentrace 300 mg/l. Do třetí láhve roztok NMP přidán nebyl. Všechny láhve byly kultivovány při 25 °C na třepačce, průběžně byl organolepticky sledován vznik zákalu a při jeho zaznamenání byly z láhví odebrány vzorky. Centrifugací (5 000 g, 12 minut, 5 °C) byly odstraněny buňky a ze získaného supernatantu byly stanoveny koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po případném ředění destilovanou vodou pomocí automatického analyzátoru uhlíku Shimadzu 5000A.

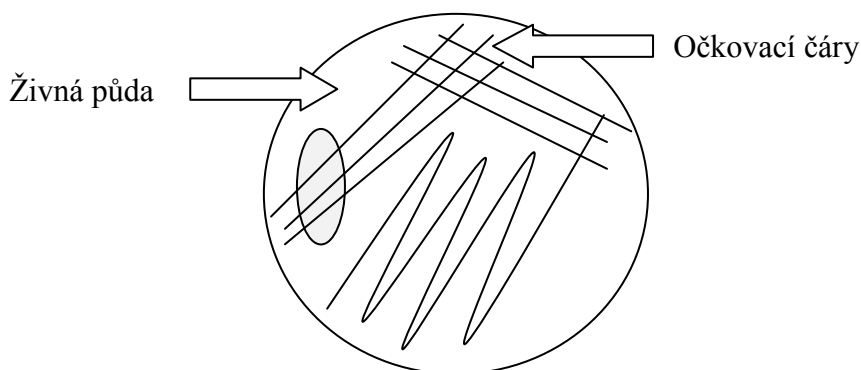
2.1.11 Sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu – druhý pokus

Pokus byl zahájen odměřením 60 ml vzorku vody do každé z pěti sterilních láhví sterilním válcem a do každé bylo přidáno 0,6 ml sterilního zásobního roztoku minerálních solí. Poté byl pouze do čtyř láhví přidán sterilní 10% zásobní roztok N-methyl-2-pyrrolidonu v množství 180 μ l. Vznikla tedy koncentrace 300 mg/l. Po dokonalém promíchání byl ze tří láhví s NMP odebrán vzorek po 3 ml na stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC) a taktéž byly odebrány dva vzorky po 6 ml z láhve bez NMP. Vzorky byly filtrovány a ty, které obsahovaly NMP byly zředěny v poměru 1 : 2 destilovanou vodou, tj. 2 ml filtrátu : 4 ml destilované vody. Všechny láhve byly kultivovány při 25 °C na třepačce a v určitých časových intervalech byly ze stejných tří láhví s NMP odebírány vzorky o objemu 3 ml. Každý vzorek byl filtrován (pro odstranění buněk), poté zředěn destilovanou vodou v poměru 1 : 2 nebo 1 : 1 pro stanovení koncentrace DOC.

2.1.12 Isolace bakterií schopných rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu

Na připravenou sterilní živnou půdu (minerální agar + N-methyl-2-pyrrolidon) byl sterilní pipetou kápnut vzorek o objemu 2 μ l a toto množství bylo rozetřeno po celé Petriho misce pomocí sterilní skleněné zahnuté tyčinky, tzv. hokejky. Tato miska byla 7 dnů kultivována při 25 °C. Narostlé kolonie byly poté přeočkovány jednak na stejný

agar, jednak na universální TYA agar a pro porovnání také na minerální agar (bez N-methyl-2-pyrrolidonu). Po získání čistých kultur pomocí křížového roztěru (viz obrázek 2) byly tyto kultury zakonzervovány v glycerolu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázek 2 – Křížový roztěr

2.1.13 Vlastnosti a orientační identifikace získaných kultur

Oxidačně-fermentační test

Jednotlivé složky, uvedené v tabulce 6, byly postupně rozpuštěny ve 100 ml destilované vody a po přidání agaru byly rozpuštěny ve vodní lázni. Po rozpuštění agaru byla upravena hodnota pH na 7,2–7,4. Barva média byla tmavě zelená. Médium bylo nalito do zkumavky, která poté byla sterilizována v autoklávu při $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 35 minut. Sterilní médium bylo zaočkováno zkoumanou kulturou pomocí vpichem kličky. U fermentujících bakterií se zelená barva média změní v celém sloupci do žluta, pokud k takovému zabarvení nedojde, jedná se o bakterie nefermentující.

Tabulka 6 – Složení média pro OF test

Pepton	0,2 g
NaCl	0,5 g
K₂HPO₄	0,03 g
Bromthymolová modř	0,006 g
Glukosa	1,0 g
Čistý agar	0,3 g

Gramovo barvení

Na podložní skličko byla asepticky připravena suspenze bakteriální kultury. Po vysušení a následné fixaci plamenem byl tento roztěr převrstven roztokem krystalové violeti, který působil 60 sekund. Poté byla tato barva bez oplachování slita a preparát byl převrstven Lugolovým roztokem, který působil opět 60 sekund. Poté byl roztok spláchnut destilovanou vodou a pomocí ethanolu byl preparát odbarvován tak dlouho, dokud neodteklo veškeré barvivo (20 až 25 vteřin). Preparát byl následně dokonale opláchnut destilovanou vodou a dobarven zředěným karbolfuchsinem po dobu 60 sekund. Nakonec byl preparát důkladně opláchnut destilovanou vodou a byl ponechán k uschnutí. Pozorování bylo prováděno pomocí imersního objektivu při zvětšení 1000x. Gramovo barvení umožňuje dělit běžné bakterie na dvě skupiny: grampozitivní barvicí se modře a gramnegativní barvicí se červeně.

Test na katalasu a cytochromoxidasu

Přítomnost katalasy (enzymu rozkládajícího H_2O_2) byla zjišťována ponořením biomasy dané kultury do kapky 3% peroxidu vodíku na podložním skličku. V případě pozitivního výsledku docházelo k tvorbě bublinek kyslíku.

Přítomnost cytochromoxidasy byla zjišťována pomocí komerčního testu OXI-test (PLIVA – Lachema, Brno) dle návodu výrobce. V případě pozitivního výsledku docházelo ke zmodrání indikačního papírku.

NEFERMtest 24

Další biochemické vlastnosti získaných kultur byly zjišťovány pomocí komerčního testu NEFERMtest 24 (PLIVA – Lachema, Brno) dle návodu výrobce.

Souprava NEFERMtest 24 je určena pro identifikaci gramnegativních nefermentujících bakterií. Testy jsou umístěny v jamkách dělené mikrotitrační destičky, vždy tři řady po osmi jamkách obsahují testy pro identifikaci jednoho kmene. Inkubace probíhá 48 hodin při 30 °C.

3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Pomůcky

K praktické části byly použity běžné laboratorní pomůcky mikrobiologické laboratoře.

3.2 Použité přístroje

Analyzátor TOC 5000A – Shimadzu, Japonsko

Autokláv LaM-MCS – SANOclav, Německo

Centrifuga MR23i – Jouan, Francie

Mikrobiologický laminární box II A – Telstar, Španělsko

Laboratorní rotační třepačka

Počítačka kolonií

Laboratorní termostaty

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1.1 Provedení prvního orientačního pokusu rozkladu NMP

První, orientační pokus, sloužil k základnímu zjištění, zda se ve vzorcích zkoumané vody N-methyl-2-pyrrolidon rozkládá, a zda v ní tedy existují bakterie, které jsou schopny tuto látku využívat jako substrát. Spotřeba N-methyl-2-pyrrolidonu bylo v průběhu testu detekováno stanovením obsahu rozpuštěného organického uhlíku. Na začátku pokusu byly ve vzorku vody stanoveny celkové počty heterotrofních psychrofilních a mezofilních bakterií, coby ukazatelů mikrobiálního oživení zkoumané vody. Výsledky těchto kultivačních stanovení jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 – Počty psychrofilních a mezofilních bakterií v odebrané vodě

	CFU/ml
Psychrofilní bakterie	$3,15 \cdot 10^2$
Mezofilní bakterie	$1,3 \cdot 10^2$

Vlastní pokus sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu byl proveden ve 3 kultivačních láhvích, z nichž do dvou (č. 2 a 3) byl NMP přidán v koncentraci 300 mg/l. Po zahájení pokusu byl v průběhu kultivace zákal ve všech láhvích trvale sledován. Po určité době nedocházelo v žádných láhvích k pozorovatelnému růstu mikroorganismů, avšak po době trvající 15 dnů přece jen k vytvoření určitého zákalu v jedné láhvi s NMP došlo a pak byl obsah rozpuštěného organického uhlíku (DOC) stanoven. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 – Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku ve vzorcích vody po 15 dnech kultivace

Vzorek	DOC [mg/l]
1a (bez NMP)	3,17
1b (bez NMP)	2,01
2a	4,68
2b	4,26
3a	153,1
3b	152,7

Výsledky ukázaly, že v láhvi č. 2 již došlo po 15 dnech ke spotřebování NMP, zatímco v láhvi č. 3, rozklad v této době neprobíhal. Proto byly vzorky kultivovány dále a celkově po 90 dnech byly hodnoty DOC opětovně stanoveny. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 – Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku ve vzorcích vody po 90 dnech kultivace

Vzorek	DOC [mg/l]
1 (bez NMP)	1,36
2	1,11
3	1,31

Tyto výsledky již definitivně ukázaly, že NMP byl spotřebován přítomnými mikroorganismy na hodnoty DOC odpovídající vodě bez přídavku NMP. Tento výsledek tedy ukázal, že ve vzorku zkoumané stojaté vody žijí mikroorganismy, které využívají N-methyl-2-pyrrolidon jako svou výživu.

4.1.2 Provedení druhého pokusu rozkladu NMP

Stejně jako u prvního pokusu, tento pokus také sloužil ke zjištění rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu ve vzorcích vody. Nejdříve byly v nově odebraném vzorku vody stanoveny celkové počty heterotrofních psychrofilních a mezofilních bakterií, jejichž výsledky jsou zaznamenány v tabulce 10.

Tabulka 10 – Počty psychrofilních a mezofilních bakterií v odebrané vodě

	CFU/ml
Psychrofilní bakterie	$5,6 \cdot 10^2$
Mezofilní bakterie	$5 \cdot 10^1$

Vlastní pokus sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu byl tentokrát proveden v pěti kultivačních láhvích, z nichž do čtyř (č. 2, 3, 4 a 5) byl přidán 10% zásobní roztok N-methyl-2-pyrrolidonu v koncentraci 300 mg/l. Po zahájení pokusu byl v průběhu kultivace ve všech láhvích trvale sledován zákal. V určitých časových intervalech byly z láhví s NMP odebírány vzorky o objemu 3 ml, takže počet odebíraných vzorků v průběhu celé kultivace byl podstatně vyšší než u orientačního pokusu na jaře. Jak je

patrné z údajů v tabulce 10, při zahájení experimentu byl počet bakterií ve vodě opětovně velmi nízký, zato byla zjištěna přítomnost korýšů rodu *Daphnia*.

Obsah rozpuštěného organického uhlíku (DOC) byl průběžně stanovován od nasazení pokusu, v jedné z láhví (č. 2) se zákal objevil po pěti dnech v podobě malých hnědých vloček. Postupem času se tento jev začal vyskytovat i v ostatních láhvích. Výsledky veškerých stanovení DOC všech láhví jsou uvedeny v tabulce 11.

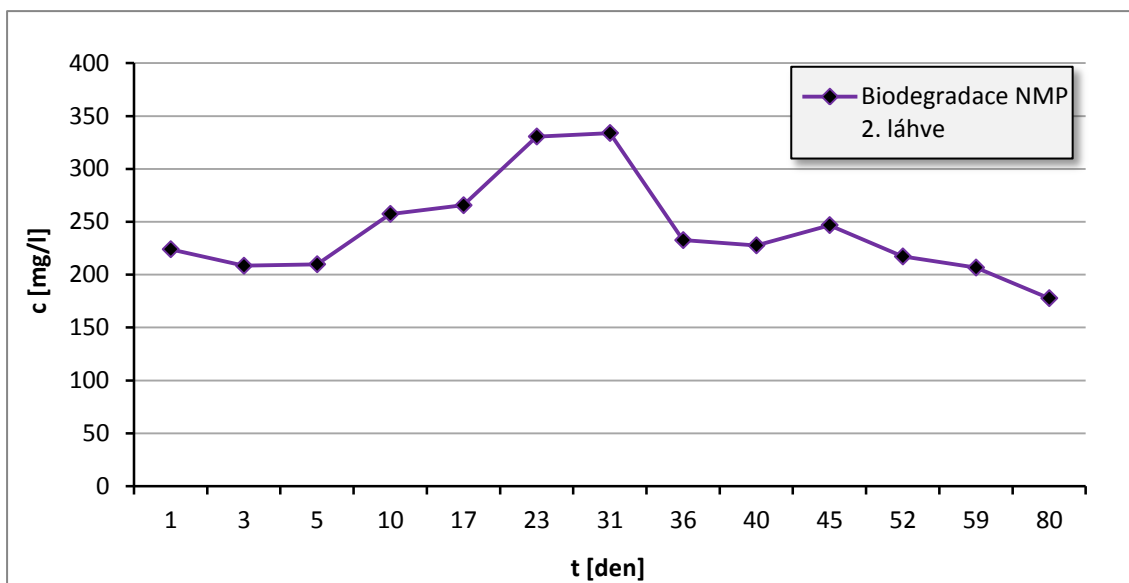
Tabulka 11 – Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku ve vzorcích vody všech čtyř láhví – druhý pokus

	2. láhev	3. láhev	4. láhev	5. láhev
t [den]*	DOC [mg/l]	DOC [mg/l]	DOC [mg/l]	DOC [mg/l]
1	224,0	212,4	209,0	---
3	208,4	203,6	199,2	---
5	209,8	208,2	206,2	---
10	257,4	254,8	255,2	---
17	265,6	261,8	259,0	---
23	330,6	315,3	312,3	---
31	333,9	320,1	290,3	205,1
36	232,6	185,3	182,2	86,9
40	227,7	81,9	160,7	82,9
45	246,8	85,7	166,1	77,9
52	217,2	24,9	42,4	8,9
59	206,7	32,1	28,1	12,3
80	172,7	6,3	14,5	0

* Pozn.: počet dnů od začátku pokusu

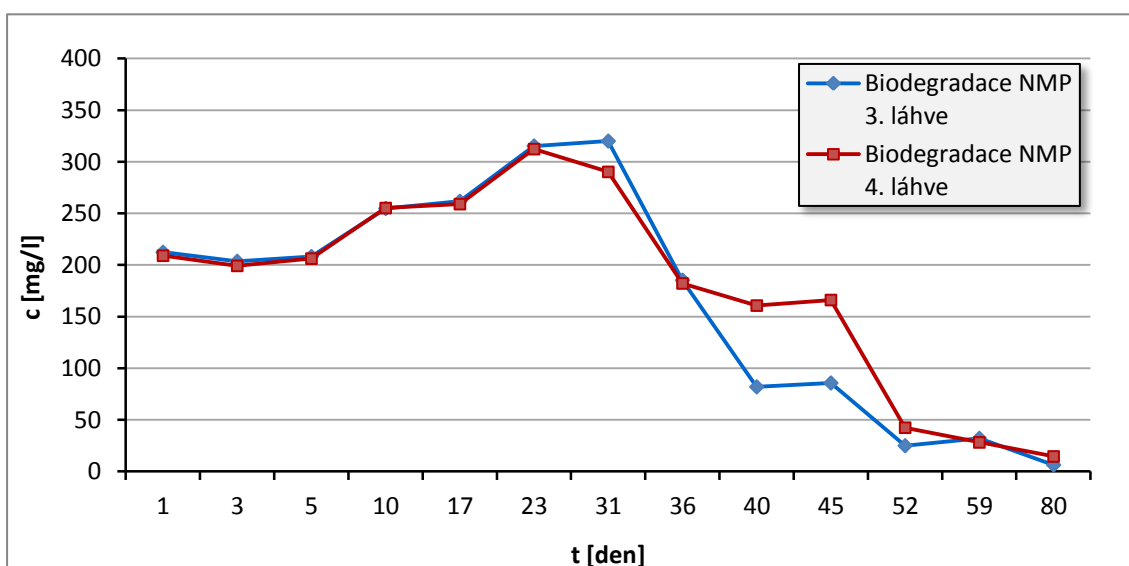
Z výsledků uvedených výše je zřejmé, že proces biodegradace NMP probíhal ve všech čtyřech láhvích různě, a to pravděpodobně vzhledem k velmi malému výchozímu množství bakterií. Grafická podoba výsledků je proto dále většinou uvedena pro jednotlivé láhve.

Z tabulky 11 a z grafu biodegradace NMP ve 2. láhvi (viz obrázek 3) lze vidět, že ve 2. láhvi úplný rozklad NMP nenastal po celou dobu experimentu (80 dnů), i když ke konci sledovaného období již byla patrná mírná tendence k poklesu DOC.



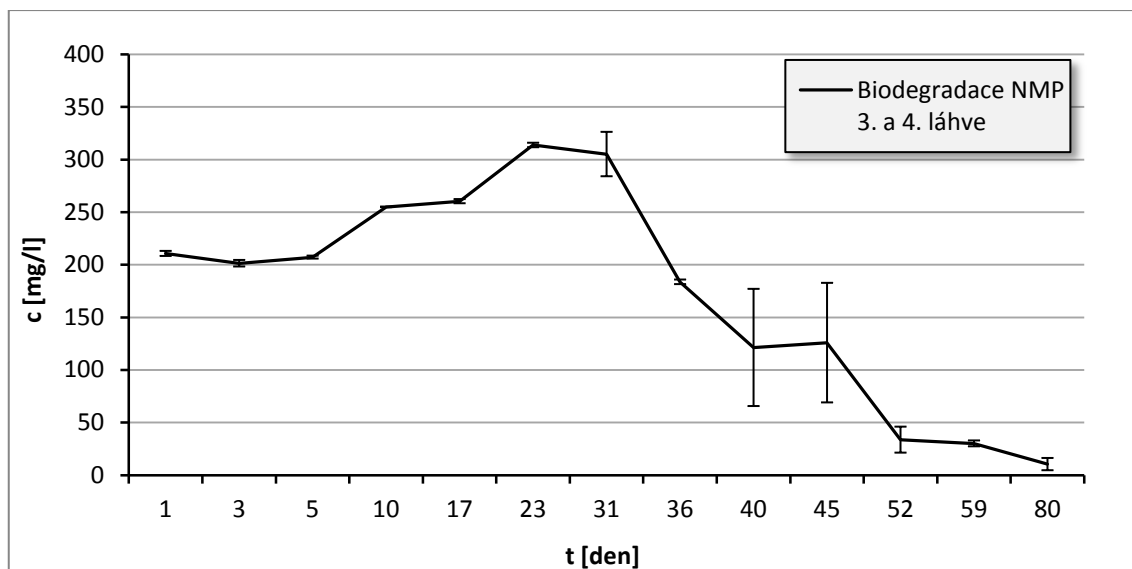
Obrázek 3 – Graf biodegradace NMP ve 2. láhvi

Proces biodegradace NMP ve 3. a 4. láhvi (viz obrázek 4) probíhal téměř stejně a lze vidět, že NMP se rozložil prakticky úplně.



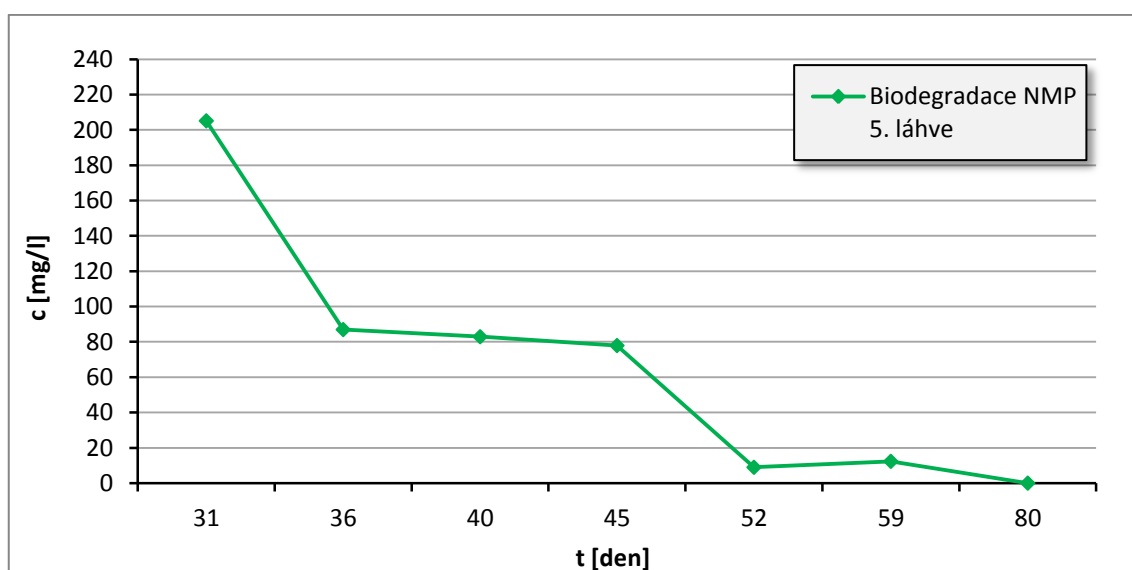
Obrázek 4 – Graf biodegradace NMP ve 3. a 4. láhvi

Pro porovnání průběhu biodegradace v těchto dvou láhvích jsou v grafu na obrázku 5 znázorněny chybové úsečky, které ukazují, že se s výjimkou dvou bodů proces biodegradace NMP 3. a 4. láhve od sebe skutečně neliší.



Obrázek 5 – Graf biodegradace NMP ve 3. a 4. láhvi – průměr a chybové úsečky

Pátá láhev nám původně sloužila jako tzv. záložní, proto na začátku pokusu nebyl z této láhve odebrán žádný vzorek. V průběhu kultivace se však začal i v této láhvi tvořit zákal a proto bylo rozhodnuto odebrat vzorky pro stanovení DOC také z této láhve. Z grafu (viz obrázek 6) lze vidět, že se nakonec NMP i v této láhvi zcela rozložil.



Obrázek 6 – Graf biodegradace NMP v 5. láhvi

Z grafů biodegradace NMP ve 2., 3. a 4. láhvi lze vidět, že zpočátku pokusu docházelo k výraznému růstu koncentrace DOC. Tento nárůst byl pravděpodobně způsoben přítomností korýšů rodu *Daphnia*, přesněji jejich postupným odumíráním, rozkladem a tím uvolňováním DOC do vody. Po 30denní kultivaci však již rozklad NMP probíhal a koncentrace DOC se začaly významně snižovat.

4.1.3 Získání kultur se schopností rozkladu NMP

Další pokus sloužil k tomu, abychom získali kultury se schopností rozkladu NMP. Jako vzorky pro izolaci takových bakterií byly použity suspenze z pokusů biodegradace NMP obou pokusů, a to vždy vzorky z konců kultivace, kdy již biodegradace NMP proběhla a bylo možné předpokládat přítomnost namnožených degradačních bakterií. Naočkováním takových vzorků na minerální agary s NMP a následným přeočkováním na stejné živné agary byly postupně vypěstovány dvě kultury se schopností rozkládat NMP, neboť byly schopny růst znatelně více na živné půdě s NMP než na minerálním agaru samotném. První z těchto kultur, z prvního pokusu, byla označena jako JF1 a druhá kultura, získaná po ukončení druhého pokusu, označena jako Š (šedá). Obě kultury byly schopné kromě růstu na minerálním agaru s NMP růst i na universálním TYA agaru, což ukázalo, že jsou kromě NMP schopny využívat i běžné organické látky. Fotografie těchto kultur jsou zobrazeny v příloze P II.

Obě kultury byly dále zkoumány pomocí níže uvedených testů, které měly sloužit k pokusu o jejich identifikaci.

Oxidačně-fermentační test

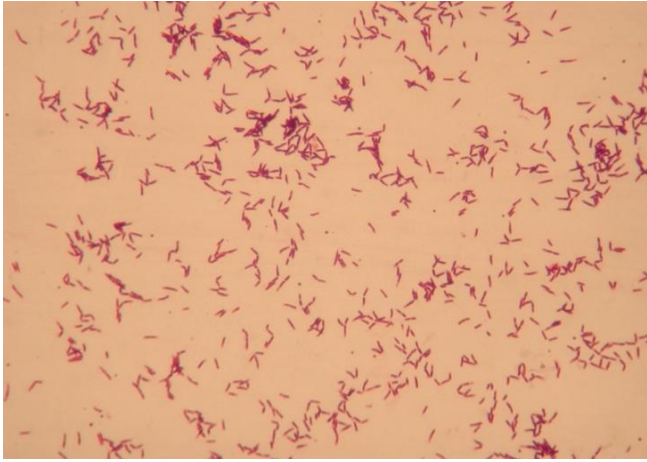
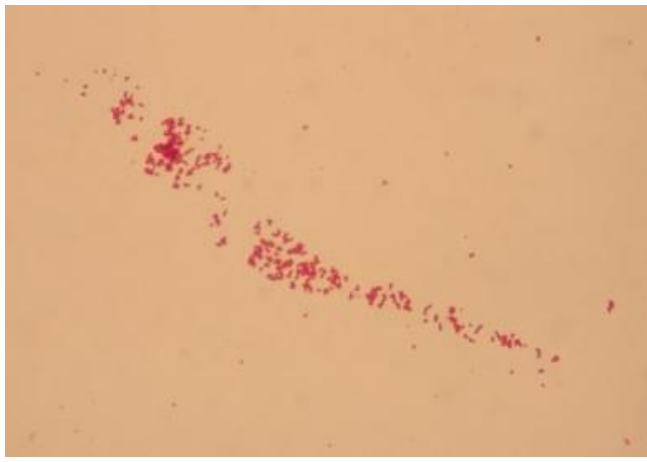
Na kličku byla nanášena čerstvá kultura vypěstovaná na TYA agaru, označená jako JF1 a poté byl touto kličkou proveden vpich do celého objemu zkumavky s médiem. Po pár dnech konzervování bylo zjištěno, že nedošlo k zabarvení média do žluta v celém sloupci a tedy zjištěno, že bakterie z kultury JF1 nerozkládá glukózu. Postup byl proveden i u šedé kultury a také bylo zjištěno, že ani bakterie kultury Š nerozkládá glukosu, tedy že jde v obou případech o bakterie nefermentující.

Gramovo barvení

Kultura JF1 – **gram pozitivní tyčinky** – některé se štíhlými konci, lehce kyjovité, jednotlivé uspořádání, ve dvojicích i v malých skupinách, často ve tvaru V, průměrná délka tyčinek od 2,1 do 2,7 μm .

Kultura Š – **gramnegativní koky**, často se vyskytujících ve dvojicích, průměrná velikost kolem 4 μm , u dvojic kolem 8,0–8,4 μm .

Tabulka 12 – Gramovo barvení získaných bakteriálních kultur

Kultura JF1	G+ tyčinky	
Kultura Š	G– koky	

Test na katalasu a oxidasu

Test na katalasu kultury JF1 i kultury Š byl pozitivní, tzn., že obě kultury rozkládají peroxid vodíku. Při testu na cytochromoxidasu u kultury JF1 nedošlo ke zmodrání indikačního papírku, výsledek byl tedy negativní, u kultury Š byl test pozitivní, protože indikační papírek zmodral.

NEFERMtest 24

Jelikož bylo zjištěno, že kultura Š jsou gramnegativní bakterie, bylo s ní možno provést NEFERMtest 24. Výsledky testu pro tuto kulturu jsou uvedeny v tabulce 13. Bohužel ani za pomoci programu TNW se nepodařilo určit konkrétní druh či rod bakterií, kultura Š tedy nebyla těmito běžnými testy identifikována a pro její identifikaci tak

bude nutno použít molekulárně biologických metod, stejně jako v případě kultury JF1. Obě izolované bakterie jsou dlouhodobě uloženy v mikrobiologické laboratoři ÚIOŽP pro další výzkum.

Tabulka 13 – NEFERMtest 24 pro kulturu Š

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

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala zejména zkoumáním rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu (NMP) v povrchové stojaté vodě. Dílčím cílem bylo najít a případně identifikovat bakteriální kultury, které jsou schopny v daném prostředí využívat NMP jako substrát a tím jej z tohoto prostředí odstraňovat.

Celkem byla provedena dvě sledování rozkladu NMP: na jaře 2012 první „orientační“ pokus a na podzim 2012 druhý, podrobnější pokus. Vzorky vod byly v obou případech nadávkovány do kultivačních láhví, které obsahovaly minerální soli a zásobní roztok NMP o koncentraci 300 mg/l. Láhve byly umístěny na třepačku a kultivovány při 25 °C. Rozklad NMP byl sledován stanovováním koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

V podzimním i jarním pokusu bylo ve vodě zjištěno velice malé množství bakterií, v rozsahu od 10^1 do 10^2 CFU/ml.

U prvního „orientačního“ pokusu nastal rozklad až po 15 dnech, a to pouze v jedné ze dvou pokusných láhví. Po další kultivaci byl rozklad NMP potvrzen i ve druhé láhvi, neboť hodnoty koncentrace DOC poklesly na hodnoty 1,1–1,3 mg/l.

Druhý pokus probíhal odlišně. Počet odebíraných vzorků v průběhu kultivace byl daleko vyšší a odběry probíhaly přibližně ve stejných časových intervalech. Proces biodegradace NMP probíhal téměř ve všech láhvích různě, zřejmě díky velmi nízkému počtu bakterií v dané vodě. Po 80 dnech experimentu rozklad NMP nenastal v jedné láhvi ze čtyř, zatímco v ostatních láhvích byl NMP prakticky kompletně rozložen, neboť hodnoty koncentrace DOC poklesly na hodnoty pod 15 mg/l, z výchozích hodnot DOC 209–224 mg/l. Zvláštností v druhém pokusu bylo nalezení přítomnosti korýšů rodu *Daphnia* v použité vodě, jejichž pozvolné odumírání v průběhu pokusu způsobilo určitý nárůst koncentrace DOC mezi 5. a 30. dnem pokusu.

Po provedené biodegradaci NMP byly získány z použitých vzorků vody dvě kultury se schopností NMP rozkládat. Tyto kultury byly označeny jako JF1 a Š (šedá). Provedením identifikačních laboratorních testů byly zjištěny jejich základní vlastnosti a pomocí Gramova barvení bylo zjištěno, že jsou zcela odlišné. Díky tomu, že kultura Š byla zjištěna jako gramnegativní bakterie, bylo možné dále provést NEFERMtest 24, jehož výsledky však identifikaci této kultury neumožnily. Kultura JF1 byla

grampozitivní nepravidelnou tyčinkou. Identifikace obou kultur bude muset být v budoucnu provedena pomocí molekulárně biologických metod.

Celkově práce ukázala, že v použité přírodní stojaté vodě je N-methyl-2-pyrrolidon mikrobiálně odbouratelný, avšak doba tohoto procesu je relativně dlouhá a vyžaduje trvání kolem 80 dnů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] IPCS INCHEM. *N-methyl-2-pyrrolidone* [online]. [cit. 2013-03-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0513.htm>>
- [2] KŘÍŽEK, Karel. *Studium bakterií rozkládajících strukturální analogy vinylpyrrolidonu*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [3] LyondellBasell. *N-methyl-2-pyrrolidone* [online]. [cit. 2013-03-08]. Dostupný z WWW:
<http://www.lyondellbasell.com/techlit/techlit/GPS%20Safety%20Summaries%20PDF/N_Methyl_Pyrrolidone_GPS_Safety_Summary.pdf>
- [4] *Inert reassessments: N-methylpyrrolidone* [online]. [cit. 2013-03-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.epa.gov/opprd001/inerts/methyl.pdf>>
- [5] LyondellBasell. *N-methyl-pyrrolidone* [online]. [cit. 2013-03-11]. Dostupný z WWW:
<<http://www.lyondellbasell.com/Products/ByCategory/basic-chemicals/PerformanceChemicalsAndSolvents/N-Methyl-2-Pyrrolidone/>>
- [6] Bezpečnostní list Šarm spol. s r.o. *N-methylpyrrolidon* [online]. [cit. 2013-03-12]. Dostupný z WWW: <www.eurosarm.cz/web/umkatalogdoc/4220.pdf>
- [7] Bezpečnostní list PENTA. *N-methyl-2-pyrrolidon* [online]. [cit. 2013-03-11]. Dostupný z WWW:
<http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/m/bezplist_640.pdf>
- [8] ECHA. *1-methyl-2-pyrrolidone* [online]. [cit. 2013-03-12]. Dostupný z WWW:
<http://echa.europa.eu/documents/10162/13638/svhc_supdoc_1-methyl-2-pyrrolidone_ec_212-828-1_en.pdf>
- [9] CHKO Beskydy. *PP Rákosina ve Stříteži nad Bečvou*. [cit. 2013-03-18]. Dostupný z WWW: <<http://nature.hyperlink.cz/Beskydy/index.htm>>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ČSOP	Český svaz ochránců přírody
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
MA	Minerální agar
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
TOC	Celkový organický uhlík
TYA	Tryptone yeast extract agar
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Struktura NMP	11
Obrázek 2 – Křížový roztěr	18
Obrázek 3 – Graf biodegradace NMP ve 2. láhvi	24
Obrázek 4 – Graf biodegradace NMP ve 3. a 4. láhvi	24
Obrázek 5 – Graf biodegradace NMP ve 3. a 4. láhvi – průměr a chybové úsečky	25
Obrázek 6 – Graf biodegradace NMP v 5. láhvi	25

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Základní vlastnosti NMP	12
Tabulka 2 – Složení směsi pro přípravu minerálního agaru	14
Tabulka 3 – Složení roztoku stopových prvků	15
Tabulka 4 – Složení zásobních roztoků solí	15
Tabulka 5 – Složení zásobního roztoku minerálů.....	15
Tabulka 6 – Složení média pro OF test.....	18
Tabulka 7 – Počty psychrofilních a mezofilních bakterií v odebrané vodě.....	21
Tabulka 8 – Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku ve vzorcích vody po 15 dnech kultivace	21
Tabulka 9 – Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku ve vzorcích vody po 90 dnech kultivace	22
Tabulka 10 – Počty psychrofilních a mezofilních bakterií v odebrané vodě.....	22
Tabulka 11 – Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku ve vzorcích vody všech čtyř láhví – druhý pokus.....	23
Tabulka 12 – Gramovo barvení získaných bakteriálních kultur.....	27
Tabulka 13 – NEFERMtest 24 pro kulturu Š	28

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I Přírodní památka Rákosina

Příloha P II Získané kultury se schopností rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu

Příloha P III Identifikační testy

PŘÍLOHA P I: PŘÍRODNÍ PAMÁTKA RÁKOSINA

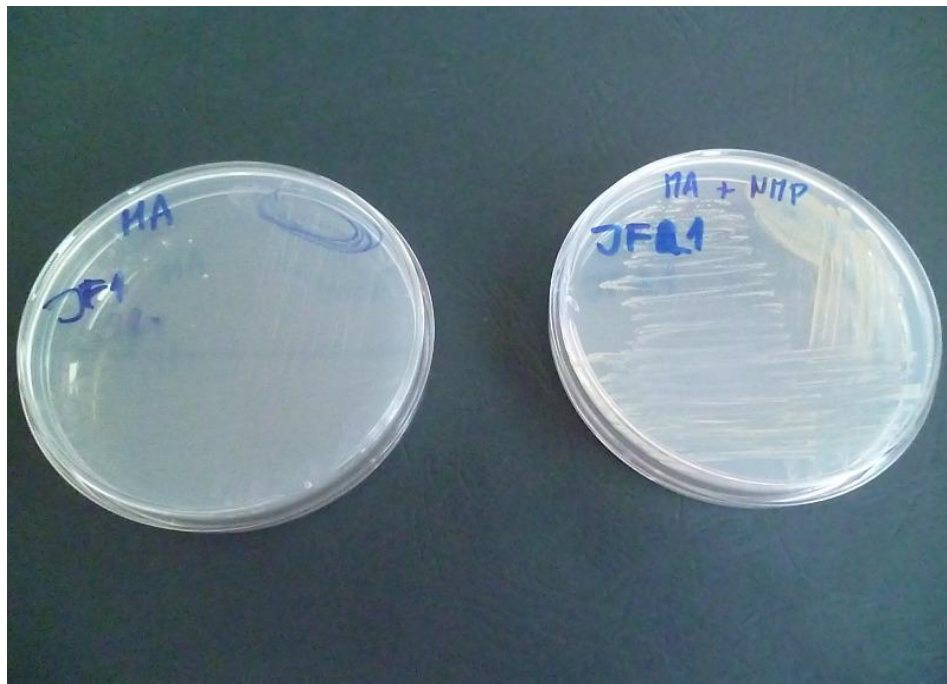


Největší tůňka přírodní památky Rákosiny – odběrové místo

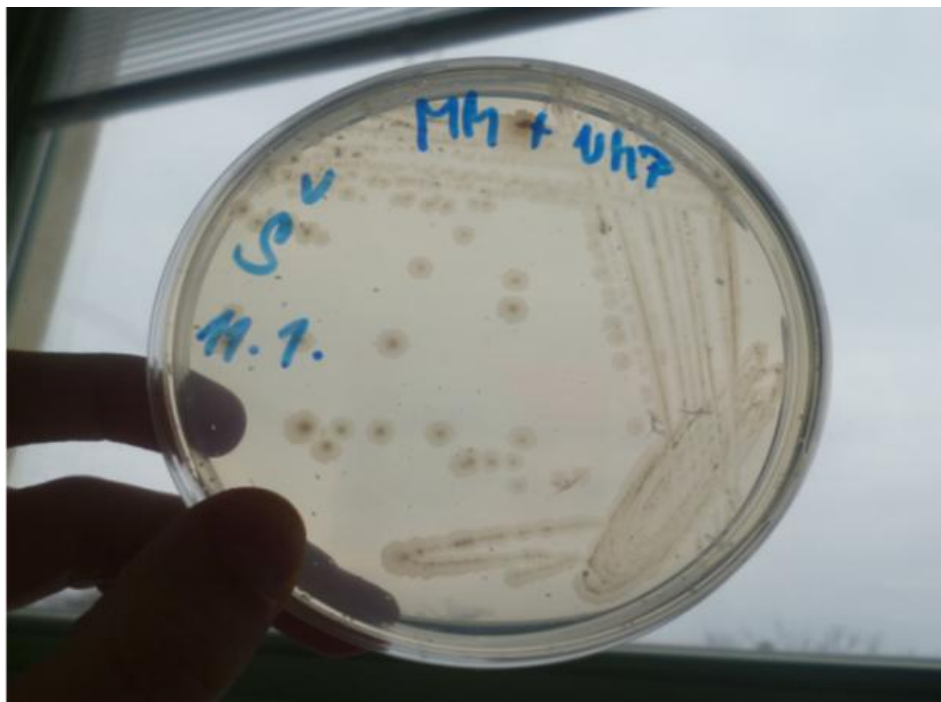


První odběr vody na jaře roku 2012

PŘÍLOHA P II: ZÍSKANÉ KULTURY SE SCHOPNOSTÍ ROZKLADU N-METHYL-2-PYRROLIDONU



Kultura JF1 rozetřená křížovým roztěrem na samotném minerálním agaru a minerálním agaru s N-methyl-2-pyrrolidonem

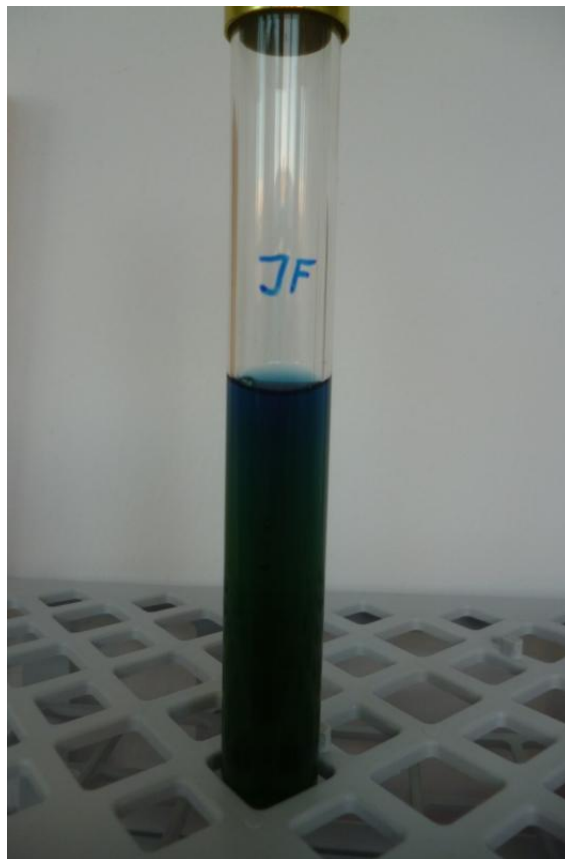


Kultura Š rozetřená křížovým roztěrem na minerálním agaru s N-methyl-2-pyrrolidonem

PŘÍLOHA P III: IDENTIFIKAČNÍ TESTY



NEFERMtest 24 pro kulturu Š



Oxidačně-fermentační test pro kulturu Š