

# **Mikrobiální degradace N-oktylpyrrolidonu a popis bakterií schopných rozkladu**

Bc. Zlata Novotná

---

Diplomová práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zlata Novotná**  
Osobní číslo: **T15678**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Mikrobiální degradace N-oktylpyrrolidonu a popis bakterií schopných rozkladu**

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte danou problematiku ve vědeckých zdrojích.
2. Prozkoumejte průběh mikrobiálního rozkladu vybrané látky.
3. Pokuste se získat klíčové mikroorganismy a popište jejich vlastnosti.
4. Získané výsledky přehledně sepište a práci odevzdejte v písemné i elektronické podobě v určeném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Vědecká literatura zahrnutá v databázích Web of Science, Scopus a Medline.**

**Předchozí DP vypracované na našem Ústavu.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**3. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce:

**12. května 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



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

Příjmení a jméno: .....NOVOTNÁ ZLATA.....

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

Ve Zlíně .....21.4.2017.....

.....  
.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

V této diplomové práci se zabývám mikrobiální degradací 1-oktyl-2-pyrrolidonu bakteriálními kulturami pocházejícími z mé bakalářské práce. Schopnost biodegradace byla ověřována měřením zákalu a stanovením rozpuštěného organického uhlíku v jednotlivých suspenzích, které byly kultivovány v lahvích s tekutým minerálním médiem a uvedeným substrátem. Dále jsem se zabývala identifikací těchto bakterií a zkoumáním jejich základních růstových vlastností.

Klíčová slova: 1-oktyl-2-pyrrolidon, mikrobiální degradace, kultivace, mikrobiální kultury

## **ABSTRACT**

In this Master's thesis I deal with the microbial degradation of 1-octyl-2-pyrrolidone by bacterial cultures obtained during my bachelor work. The culture's ability to biodegradation was verified both by measuring turbidity and by determination of dissolved organic carbon in individual suspensions, which were incubated in bottles containing liquid mineral medium amended with noted substrate. I was also concerned with identifying these bacteria and examining their basal growth properties.

Key words: 1-octyl-2-pyrrolidone, microbial degradation, cultivation, microbial cultures

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a také za jeho čas, ochotu, odbornou pomoc a podnětné rady, které mi během realizace diplomové práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala paní Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za jejich pomoc při experimentální práci v mikrobiologické laboratoři. Poděkování také patří všem, kteří mě během celé doby studia podporovali.

*„Cílem vědy není otvírat dveře nekonečné moudrosti, nýbrž vytknout meze nekonečnému omylu.“*

Bertold Brecht

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

# OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
<b>1 1-OKTYL-2-PYRROLIDON.....</b>	<b>13</b>
1.1 VLASTNOSTI .....	13
1.2 POUŽITÍ 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU A JEHO SLOUČENIN .....	14
1.3 VLIV NA ČLOVĚKA .....	17
1.4 VLIV NA ZVÍŘATA .....	17
1.5 VLIV NA VODNÍ ORGANISMY .....	18
1.6 OSOBNÍ PÉČE.....	18
1.7 BIODEGRADABILITA .....	18
1.8 PROTIMIKROBNÍ ÚČINKY .....	20
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>22</b>
<b>2 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>23</b>
2.1 SCHOPNOST ROZKLADU 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU KULTURAMI DROBNÁ A MLÉČNÁ .....	23
2.1.1 POTŘEBY PRO PRÁCI.....	23
2.1.2 PŘÍPRAVA TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA .....	23
2.1.3 POSTUP .....	24
2.2 POKUS IZOLACE DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ ZE SMĚSNÉ KULTURY Z BAKALÁŘSKÉ PRÁCE .....	24
2.2.1 PŘÍPRAVA TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA .....	24
2.2.2 POSTUP .....	25
2.3 RŮST KULTURY DROBNÁ V PŘÍTOMNOSTI NaCl A PŘI RŮZNÝCH TEPLITÁCH.....	26
2.3.1 POSTUP .....	26
2.4 OVĚŘENÍ KULTUR NOP 1-4 ZÍSKANÝCH ZE SMĚSNÉ KULTURY Z BAKALÁŘSKÉ PRÁCE .....	26
2.4.1 PŘÍPRAVA TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA .....	26
2.4.2 POSTUP.....	26
2.5 SCHOPNOST ROZKLADU 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU KULTURAMI DROBNÁ 1 A DROBNÁ 2 .....	27
2.5.1 PŘÍPRAVA TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA .....	27
2.5.2 POSTUP .....	27
2.6 RŮST KULTUR DROBNÁ 1 A DROBNÁ 2 PŘI RŮZNÝCH TEPLITÁCH A KONCENTRACÍCH NaCl.....	28



2.6.1	POSTUP .....	28
2.7	RŮST KULTURY DROBNÁ 2 PŘI RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU JAKO JEDINÉM ZDROJI UHLÍKU .....	28
2.7.1	PŘÍPRAVA 2X KONCENTROVANÉHO TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA .....	28
2.7.2	POSTUP .....	29
2.8	RŮST KULTUR DROBNÁ 1 A DROBNÁ 2 PŘI RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU JAKO JEDINÉM ZDROJI UHLÍKU .....	31
2.8.1	PŘÍPRAVA TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA .....	31
2.8.2	POSTUP .....	31
2.9	RŮST KULTUR DROBNÁ 1 A DROBNÁ 2 NA 1-OKTANOLU A 2-PYRROLIDONU JAKO JEDINÉM ZDROJI UHLÍKU .....	31
2.9.1	PŘÍPRAVA TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA .....	31
2.9.2	POSTUP .....	32
2.10	VYUŽITÍ 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU JAKO ZDROJE DUSÍKU .....	32
2.10.1	PŘÍPRAVA TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA BEZ ZDROJE DUSÍKU .....	32
2.10.2	POSTUP .....	33
2.11	RŮST KULTUR DROBNÁ 1 A DROBNÁ 2 S VITAMÍNY NA 1-OKTANOLU A NA 2-PYRROLIDONU JAKO JEDINÉM ZDROJI UHLÍKU .....	33
2.11.1	PŘÍPRAVA 2X KONCENTROVANÉHO TEKUTÉHO MINERÁLNÍHO MÉDIA .....	33
2.11.2	POSTUP .....	33
<b>3</b>	<b>IDENTIFIKACE BAKTERIÍ SCHOPNÝCH ROZKLADU .....</b>	<b>35</b>
3.1	GRAMOVO BARVENÍ .....	35
3.2	DETEKCE CYTOCHROMOXIDÁZY .....	35
3.3	KATALÁZOVÝ TEST .....	35
3.4	KOH TEST .....	35
3.5	OXIDAČNĚ – FERMENTAČNÍ TEST .....	36
3.6	IZOLACE DNA .....	36
3.7	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR) .....	37
3.8	AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA .....	38
3.9	PŘEČIŠTĚNÍ PCR PRODUKTU .....	39
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A PŘÍSTROJE .....</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>41</b>
5.1	OVĚŘENÍ DEGRADAČNÍ SCHOPNOSTI KULTUR MLÉČNÁ A DROBNÁ ....	41
5.2	IZOLACE DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ ZE SMĚSNÉ KULTURY .....	42
5.3	RŮST KULTURY DROBNÁ 2 V PŘÍTOMNOSTI SOLI A PŘI RŮZNÝCH TEPLITÁCH .....	43
5.4	OVĚŘENÍ KULTUR NOP 1-4 .....	43
5.5	DEGRADAČNÍ SCHOPNOSTI KULTUR DROBNÁ 1 A DROBNÁ 2 .....	44
5.6	RŮST KULTUR DROBNÁ 1 A DROBNÁ 2 PŘI RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU JAKO JEDINÉM ZDROJI UHLÍKU .....	46

5.7	RŮST OBOU KULTUR PŘI RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU JAKO JEDINÉM ZDROJI UHLÍKU .....	48
5.8	RŮST KULTUR NA 1-OKTANOLU A 2-PYRROLIDONU JAKO JEDINÉM ZDROJI UHLÍKU .....	49
5.9	VYUŽITÍ 1-OKTYL-2-PYRROLIDONU JAKO ZDROJE DUSÍKU .....	51
5.10	RŮST KULTUR NA 1-OKTANOLU A 2-PYRROLIDONU JAKO JEDINÉM ZDROJI UHLÍKU S VITAMÍNY .....	52
5.11	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DROBNÁ 1 A DROBNÁ 2 .....	53
5.12	IZOLACE A SEKVENACE DNA .....	56
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>59</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>66</b>

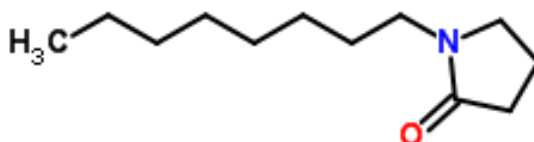
## ÚVOD

S rozvojem průmyslu se do životního prostředí dostalo a dostává mnoho nově syntetizovaných chemických látek. Některé záměrně, jako hnojiva, pesticidy, jedy a jiné jako nechtěný vedlejší produkt výroby. A tak stopy nejrůznějších xenobiotik nalézáme nejen v ovzduší, půdě a užitkových vodách, ale i ve vodě pitné a tudíž i v potravinách. Mezi xenobiotika patří právě také 1-oktyl-2-pyrrolidon, který se začíná hojně využívat v různých průmyslových odvětvích. Bylo by tedy přínosem vědět, zda v našem prostředí existují mikroorganismy, které jsou schopné jeho rozkladu. Popřípadě při jakých podmínkách je rozklad možný a jak dlouho trvá. Díky předchozímu studiu byly získány degradační bakterie pocházející z řeky Dřevnice, jež byly zakonzervovány a uloženy po dobu dvou let. Byla také uchována směsná mikrobiální kultura. Cílem této práce je ověření degradační schopnosti těchto bakteriálních kultur a jejich identifikace.

## I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 1-OKTYL-2-PYRROLIDON

1-oktyl-2-pyrrolidon (dále jen 1O2P) též jako N-oktylpyrrolidon



Obr. 1 Struktura 1-oktyl-2-pyrrolidonu

### 1.1 Vlastnosti

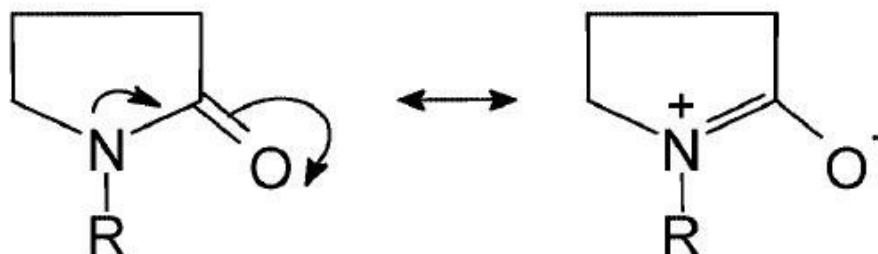
Jedná se o viskózní kapalinu slabého zápachu jako amin, mírně nažloutlého zbarvení, s vysokým bodem varu v rozmezí 306 - 307°C a velmi nízkým tlakem par.<sup>1</sup> Pyrrolidon je rovinný pětičlenný laktam. 1O2P je dobře rozpustný ve všech organických rozpouštědlech a ve velmi nízkých koncentracích i ve vodě (rozpustnost je přibližně do 1 g/l při 20°C). Jako rozpouštědla pro 1O2P slouží aceton, etanol, xylen, heptan, parafinový olej a další.<sup>2</sup>

Jeho molekulová hmotnost je 197,3 g.mol<sup>-1</sup>. Hustota činí 0,92 g.cm<sup>-1</sup> při 25°C a jeho pH nabývá hodnoty 9,1 ve 100 g/l. Bod vzplanutí nastává při 142°C a bod mrazu je -26°C. Dynamická viskozita 1O2P je 8 mPa.s při 25°C a tlak páry 0,0008 mbar při 20°C.<sup>3</sup>

1O2P patří mezi látky s povrchově aktivními vlastnostmi a je netěkavý. Při hoření může docházet k tvorbě toxických výparů s obsahem CO, CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, HCl a HCN.<sup>4</sup> Je chemicky stabilní za doporučených skladovacích podmínek.<sup>5</sup>

Vzhledem k uspořádání rovinné části pyrrolidonu, může kyslík snadno způsobit přemísťování elektronů s vysokou elektronegativitou. Způsobuje to vysoký dipólový moment.

Z tohoto důvodu jsou alkylypyrrolidony rozpustné v polárních i nepolárních rozpouštědlech.<sup>6</sup>



Obr. 2 Delokalizace elektronů v alkylypyrrolidonu

## 1.2 Použití 1-oktyl-2-pyrrolidonu a jeho sloučenin

1O2P se používá jako rozpouštědlo pro polymery a hydrofobní látky, jako smáčedlo pro vodní systémy nebo čistič kovů. Dále své využití může najít jako čisticí prostředek ve veterinární medicíně a ve farmaceutickém průmyslu, kde je využíván při syntéze látek obsahující alkaloidy a jako stabilizátor ve vodních směsích. Často se využívá také jako insekticid nebo při zpracování ropy. Je obsažen ve speciálních inkoustech a nátěrových hmotách. Díky svým vlastnostem je využíván v zemědělském průmyslu, například jako přídavek do směsí na ochranu rostlin. Vzhledem ke svým povrchově aktivním vlastnostem je zkoumán jako přídatná složka šampónů. V průmyslu nachází své uplatnění jako přísada do čisticích přípravků.<sup>7</sup> Je meziproduktem používaným při výrobě agrochemikálií, elektroniky, průmyslových chemikálií.<sup>4</sup> Může být též počáteční produkt pro chemické syntézy.

1O2P je sloučeninou ze skupiny alkylypyrrolidonů, které se vyznačují vhodnou kombinací vlastností, jako je schopnost přizpůsobit se nízkým teplotám. Dalšími jsou nízká těkavost, nižší teploty zpracování, rychlé gelovatění a vynikající jasnost/transparentnost, která může být upravena pro specifické aplikace. Bylo prokázáno, že alkylypyrrolidony jsou velmi účinná změkčovadla PVC, a jsou až o 40% účinnější než standardní změkčovadla. Mohou být použity k výrobě měkčeného PVC, využitelného při nízkých teplotách, extrémně měkčeného PVC a polotuhého PVC. Délka alkylového řetězce se může měnit v širokém rozsahu (C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>). Oktylypyrrolidon a dodecylpyrrolidon jsou již komerčně dostupné a registrované.<sup>2</sup>

2-pyrrolidon je používán jako součást do nátěrů dřeva a jiných podlahových krytin. Je také přidáván do inkoustů a tiskařských barev.

N-methyl-2-pyrrolidon je extrémně odolný proti hydrolýze a vyšším teplotám. Je součástí některých průmyslových čisticích prostředků i některých agrochemikálií. 1-methyl-2-pyrrolidon je používán jako přísada do různých pesticidů pro zemědělské potřeby. Využívá se v mnoha průmyslových odvětvích jako rozpouštědlo pro širokou řadu chemikálií a polymerů nebo jako rozpouštědlo při zpracování a čištění ropy, pryskyřice, plynů, olefinů atd. Dále může být využit ve farmaceutickém průmyslu, kde zajišťuje rychlejší průchod léčiv skrz pokožku.<sup>1</sup>

N-ethyl-2-pyrrolidon spolu s jinými rozpouštědly slouží k odstranění zbytků tavidel, olejů a tuků. Používá se také jako alternativa za N-methyl-2-pyrrolidon.

N-hydroxyethyl-2-pyrrolidon a N-cyklohexyl-2-pyrrolidon jsou velice účinné k odstraňování chemicky odolných povlaků či nátěrů za vysoké teploty. Slouží jako rozpouštědla v čisticích prostředcích. N-cyklohexyl-2-pyrrolidon může být použit ke zjasnění barev.

N-vinyl-2-pyrrolidon spolu s multifunkčním akrylátem za pomoci UV záření vytváří vytvrditelný povlak, který je odolný proti otěru. Používá se k výrobě ochranných okenních fólií, kreditních karet nebo plastových kontaktních čoček.<sup>8</sup> Polyvinylpyrrolidon (PVP) se začal používat již v první polovině 20. století jako náhrada krevní plazmy a později našel řadu uplatnění v medicíně, farmacii, kosmetice a průmyslové výrobě. PVP se běžně používá jako pojivo v lécích ve formě tablet. K přípravě léků se využívá také kvůli tomu, že dokáže upravit jejich rozpustnost a usnadnit jejich pohyb v těle a u některých léků snižuje jejich nepříznivé vlastnosti. V medicíně a biomedicíně jej lze najít také ve formě hydrogelů, díky schopnosti zadržovat tekutiny v 3D síti. S jodem tvoří komplex s dezinfekčními vlastnostmi, který se používá například v tekutých mýdlech, mastech či chirurgických lázních. PVP se využívá také při výrobě některých šampónů, zubních past, nátěrových hmot a lepidel. Dobře se váže na polární molekuly, proto našel své využití ve vrstvách pro fotografické papíry a také v inkoustech pro tiskárny.<sup>9</sup> Kromě těchto průmyslových odvětví našel uplatnění také v potravinářství, kde se pod označením E 1201 používá jako stabilizátor, plnidlo, nosič či emulgátor. Lze jej nalézt i v umělých sladidlech, potravinářských barvivech, vitamínech, slazených nápojích, cukrovinkách atd.<sup>10</sup>

Podle patentu Gu z roku 1991 mohou být N-alkyl-2-pyrrolidony využity jako mikrobicidy v přípravcích na čištění kontaktních čoček. Přidáním pyrrolidonů se zvyšuje účinnost dezinfekce, výhodou je alkylová skupina oktyl, decyl nebo dodecyl. Podle tohoto vynálezu mohou být N-alkyl-2-pyrrolidony v roztoku jako jediné antimikrobiální činidlo nebo mohou být použity v kombinaci s jinými povrchově aktivními činidly, včetně neiontových, kationtových, aniontových nebo amfoterních povrchově aktivních látek. S cílem dosáhnout požadované antimikrobiální účinnosti mohou být N-alkyl-2-pyrrolidony použity v koncentracích ve vodném roztoku od 0,0001% do 0,5% hmotnosti roztoku. Desinfekční účinnost vůči mikroorganismům byla testována ve zkumavkách naplněných sterilním fyziologickým roztokem, s obsahem  $10^6$  buněk (vyjádřeno jako CFU) na mililitr. Koncentrace CFU byla stanovena krátce předtím, než byla přidána desinfekční látka v různých koncentracích. N-alkyl-2-pyrrolidony byly přidávány v pufrovaném fyziologickém roztoku. Roztoky byly testovány pomocí kvasinky *Candida albicans*. Přežívající buňky byly stanovovány v různých časových intervalech. Výsledky zaznamenaly úhyn buněk za 0,2 hodiny při koncentraci N-oktyl-2-pyrrolidonu 0,1% a při koncentraci 0,05% za 2 hodiny. Podle uvedeného patentu mohou být pro potřeby uchování a desinfekce kontaktních čoček N-alkyl-2-pyrrolidony použity v roztoku nebo jako ve vodě rozpustné tablety.<sup>11</sup>

Velké množství komerčních, průmyslových a zemědělských výrobků je předmětem mikrobiálního napadení a degradace, které snižují jejich ekonomickou hodnotu. Jako příklady materiálů, které mohou být vystaveny mikrobiální degradaci, jsou povrchové nátěry, výrobky ze dřeva, zemědělská semena a další zemědělské komodity, textil, kůže či plastické hmoty. Mikroorganismy mohou být do výrobků či na ně zaneseny již při výrobním procesu nebo posléze vzduchem, lidmi, vodou atp. Také další výrobky obsahující velké množství vody a zároveň organické materiály jsou náchylné k mikrobiálnímu napadení. Do takové skupiny patří především latexy, lepidla, škroby, vosky, emulgátory a různé suspenze. Přítomnost mikroorganismů se může projevit ztrátou viskozity, tvorbou plynu, nežádoucími pachy, změnou barvy či gelovatěním. Dalším nežádoucím jevem je výskyt slizu, který vzniká množением bakterií, jež vytvářejí viskózní, silně hydratované látky (extracelulární polymery). Sliz může být lepkavé, pastovité, gumovité nebo tvrdé struktury a omezuje především papírenský průmysl, kde značně snižuje výnosy z výroby. Předmětem patentu Hollise, Rayudu a Whitemorea je tedy poskytnout způsob ke zpomalení nebo zabránění růstu mikroorganismů ve vodních systémech a tak potlačit tvorbu slizu v průmyslových chladících vodách nebo vodách používaných při výrobě papíru. Patentovanými protimik-



robními prostředky jsou N-dodecyl-heterocyklické sloučeniny (včetně N-dodecyl-2-pyrrolidonu), které mohou najít své využití jako průmyslové nekorozivní konzervační látky. Mohou se přidávat se přímo do systému, čímž dojde k usmrcení bakterií produkujících sliz. Mikrobicidy použité v tomto vynálezu mají řadu dalších výhod. Jsou hydrolyticky stabilní v širokém rozmezí pH (3-11), jsou rozpustné v mnoha rozpouštědlech a mohou být použity do nátěrů pro impregnaci nebo aplikaci na povrch dřeva, umělé hmoty či jiných materiálů.<sup>12</sup>

V patentu Kabry jsou deriváty 2-pyrrolidonu uvedeny jako konzervanty zejména pro oční, ušní a nosní přípravky. Antimikrobiální a konzervační účinnost byla stanovována pomocí zkušebního testu, kdy byly vzorky naočkovány gram-pozitivními vegetativními bakteriemi (*Staphylococcus aureus*), gram-negativními vegetativními bakteriemi (*Pseudomonas aeruginosa*) a kvasinkami (*Candida albicans*). Data byla odečítána po 24 hodinách a po 7 dnech. Test prokázal, že ve vzorcích s N-oktyl-2-pyrrolidonem o koncentraci 0,05% došlo k úhynu gram-negativních i gram-pozitivních bakterií po 6 hodinách a kvasinky *Candida albicans* po 7 dnech.<sup>6</sup>

### 1.3 Vliv na člověka

1O2P patří mezi žíraviny. Po kontaktu s ním negativně reaguje nejen s lidská pokožka, ale i jiné tkáně, neboť způsobuje poleptání dýchacích cest a poškození očí.<sup>4</sup> Při kontaktu s očima může dojít k neprůhlednosti rohovky, po dobu až 7 dnů. Dále způsobuje dušnost, bolesti hlavy a nevolnost. Po orálním podání může docházet k akumulaci v organismu. Mutagenita ani karcinogenita však nebyly prokázány.<sup>12</sup>

### 1.4 Vliv na zvířata

Ansell a spol. testovali akutní toxicitu 1O2P na krysách o váze 200-300 g. Látka byla podávána ve stupňovaných koncentracích po dobu 18-24 hodin. Toxikologické a farmaceutické účinky byly sledovány ve 14 denní periodě. Po skončení testu byla provedena pitva. Pitevnické nálezy ukázaly poškození ledvin, jater a plic.<sup>1</sup> Pro krysou činí LD<sub>50</sub> při orálním požití 2,050 mg/kg a pro králíka kožní LD<sub>50</sub> je > 2,000 mg/kg.<sup>5</sup>

U králíka byly testovány dráždivé účinky 1O2P pro oči a kůži. Testování probíhalo s čistou látkou i s 2%ní suspenzí. U čistého vzorku bylo prokázáno extrémně vysoké podráždění očí a kůže. U suspenze nebyla prokázána dráždivost očí, jen slabé podráždění kůže.<sup>1</sup>

### **1.5 Vliv na vodní organismy**

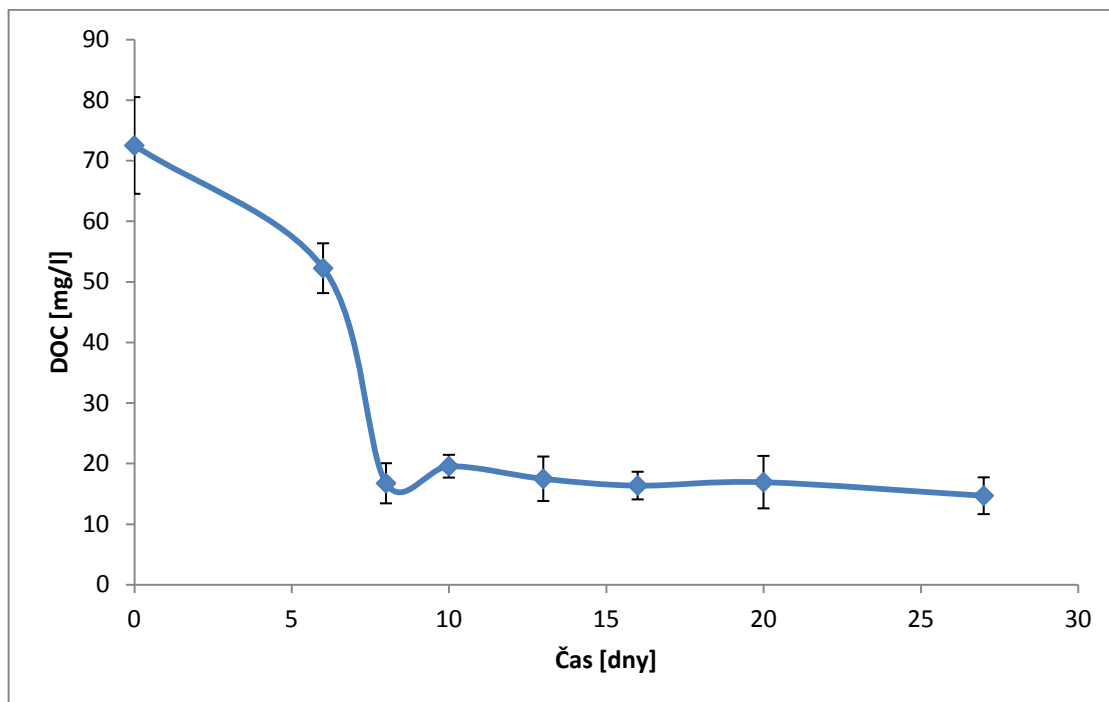
U 1O2P byla prokázána akutní toxicita pro ryby a vodní bezobratlé s možnými dlouhodobými nepříznivými účinky. V závislosti na koncentraci a podmínkách může působit nepříznivě na vodní rostliny, zelené řasy i na biologické procesy u aktivovaného kalu.<sup>13</sup>

### **1.6 Osobní péče**

Bylo prokázáno, že v produktech osobní péče jsou C<sub>8</sub>P a C<sub>12</sub>P účinné pomocné přípravky pro ošetření vlasů, jako je například barvení, bělení a trvalá ondulace. Rychlost procesu je zvýšena pomocí smáčedel. Vlasy jsou po celou dobu chráněny a nedochází k jejich poškození.<sup>1</sup>

### **1.7 Biodegradabilita**

V mé bakalářské práci jsem se zabývala rozkladem 1-oktyl-2-pyrrolidonu v říční vodě. Pokus spočíval ve sledování koncentrací rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v průběhu kultivace. Bylo provedeno 8 odběrů vzorků. Výchozí koncentrace 1O2P byla 100 mg/l. Z naměřených hodnot byl zhotoven graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase. Z grafu je patrné, že rozklad probíhal poměrně rychle a to 7-8 dní.



Obr. 3 Graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase

Byly také prováděny pokusy o izolaci degradačních bakterií, kdy byly připraveny petriho misky se samotným minerálním agarem a s minerálním agarem s 1O2P. Po uplynutí kulturační doby byl zřejmý větší výskyt bakteriálních kolonií na samotném agaru, což svědčí o určitých toxických účincích 1O2P.

Při pokusu o pomnožení degradačních bakterií byly inkubovány lahve s minerálním médiem a s odstupňovanou koncentrací 1-oktyl-2-pyrrolidonu. V určitých časových intervalech byl sledován zákal, který signalizoval růst bakterií. Po ukončení inkubace byla zjištěna přítomnost bakterií jen v lahvi s koncentrací 100 mg/l 1O2P. Při vyšší koncentraci zákal nevznikl, protože bakterie již nebyly schopny se množit vzhledem k předpokládané toxicitě 1O2P.

V dalším pokusu byly zvoleny koncentrace 1O2P těsně nad 100 mg/l, aby bylo přesněji zjištěno, při jaké koncentraci byly bakterie ještě schopné rozkladu. Nejvyšší koncentrace, při které pak ještě došlo k množení bakterií, byla 150 mg/l. Při izolaci klíčových bakterií je tedy nutno volit jen relativně nízké koncentrace 1O2P.

Dvě čisté mikrobiální kolonie, pojmenované ZN1 a ZN2, byly zakonzervovány v glycerolu a uloženy při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  po dobu dvou let pro případné pozdější studium. Byla také

uchována směsná kultura při 25°C, ke které byl občasně přidán 1O2P o koncentraci 100 mg/l.<sup>14</sup>

## 1.8 Protimikrobní účinky

V diplomové práci Jana Salače byly zkoumány protibakteriální účinky 1O2P vůči čistým bakteriálním kulturám a oproti směsné kultuře v aktivovaném kalu. Vůči čistým bakteriálním kulturám byly stanoveny hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) metodou sledování růstu kultur v živném médiu v 96 - jamkových mikrotitračních destičkách, s odstupňovanými koncentracemi sledovaných látek, případně jejich směsí. Stanovení MIC a MBC probíhalo primárně s použitím čtyř gram-pozitivních a čtyř gram-negativních kultur.

Kultura	Fenoxyethanol		1-oktyl-2-pyrrolidon	
	MIC	MBC	MIC	MBC
	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[g.l <sup>-1</sup> ]
<b>Grampozitivní</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	6,0	7,5	0,25	0,25-0,50
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	7,5	15,0	0,25	0,25
<i>Rhodococcus erythropolis</i> FR6	7,0	>13,0	0,10	0,10
<i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216				
- prekultivovaný 72 hod.	6,0	>15,5	0,10	>1,0
- prekultivovaný 20 hod.	7,5	7,5	0,10	0,1
<b>Gramnegativní</b>				
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	4,5	6,0	0,50	0,50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 4416	6,0	6,0	0,25	0,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	4,5	7,5	>2,00	
<i>Pseudomonas</i> sp. MP11	4,5	6,0	>1,00	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MS1	6,0	>7,0	>1,00	

Obr. 4 Souhrnná tabulka MIC a MBC vůči testovacím bakteriálním kulturám

Zkoušky s 1O2P vůči čistým kulturám bakterií ukázaly mnohem vyšší toxicitu 1O2P než fenoxxyethanolu. Hodnoty MIC a MBC se (až na výsledek u *Klebsiella pneumoniae*) shodovaly, což také ukazuje na vyšší účinnost 1O2P inhibovat bakterie. Mezi testovacími organismy však prokázaly vysokou schopnost odolávat 1O2P bakterie rodu *Pseudomonas*. Kromě kultury *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byly na toxicitu 1O2P zkoumány také kultury *Pseudomonas aeruginosa* kmeny FT1, FT2 a FT4, *Pseudomonas fluorescens* MS1 a *Pseudomonas putida* FR3, a i tyto kultury prokázaly schopnost odolávat i koncentraci 1O2P 1 g.l<sup>-1</sup> (hranice rozpustnosti 1O2P ve vodě). Určitá pozornost byla věnována sporulující bakterii *Bacillus subtilis* CCM 2216, která byla použita po dvojnásobné prekultivaci, a to 20 a 72 hodin. Kultura prekultivovaná 72 hodin prokázala velkou schopnost odolávat i vysokým koncentracím 1O2P oproti kultuře prekultivované jen 20 hodin.

Byla také zkoumána toxicita 1O2P vůči směsné kultuře aktivovaného kalu (AK) z čistírny odpadních vod. Principem bylo sledování rychlosti respirace s odstupňovanými koncentracemi 1O2P. Nejnižší zkoumané koncentrace 1O2P 10-50 mg.l<sup>-1</sup> měly na respirační schopnost kalu účinek jen 13-18%. Důvodem může být, že nižší koncentrace 1O2P nejsou pro AK toxické nebo došlo k vychytání 1O2P na nebuněčnou složku vloček AK. Koncentrace 1O2P 0,6-2,0 g.l<sup>-1</sup> však již měly na AK téměř úplný inhibiční účinek. Dále byla pro 1O2P vypočtena hodnota EC<sub>50</sub> 0,185 g.l<sup>-1</sup>.<sup>15</sup>

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 2 MATERIÁL A METODY

Mikrobiální kultury ZN1 a ZN2 pocházející z bakalářské práce byly vyočkovány na petriho misky s R2A agarem a podle jejich vzhledu byly přejmenovány na Mléčná a Drobná.

### 2.1 Schopnost rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu kulturami Mléčná a Drobná

#### 2.1.1 Potřeby pro práci

300 ml minerálního média (MM)

Sterilní odměrný válec 100 ml

Sterilní láhve objem 250 ml – 6 ks

1-oktyl-2-pyrrolidon

Obě kultury ne starší než 1 týden

Sterilní fyziologický roztok ve 2 zkumavkách (cca po 3 ml)

#### 2.1.2 Příprava tekutého minerálního média (MM):

Složení MM (na 300 ml):

Destilovaná voda.....	260 ml
Roztok A (9,07 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /1000 ml).....	6 ml
Roztok B (23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /1000 ml).....	24 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	3 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	3 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	3 ml
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (30 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	3 ml
$\text{NaCl}$ (50 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	1 ml

### 2.1.3 Postup

Kultury Mléčná a Drobná byly naočkovány křížovým roztěrem na petriho misky s R2A agarem a následně inkubovány v do termostatu pro psychrofilní kultivaci.

Minerální médium bylo po přípravě sterilizováno a následně zchlazeno. Byl asepticky přidán 1-oktyl-2-pyrrolidon v množství 30 mg (= 32,6 µl) a vše bylo dobře promícháno. MM s 1O2P bylo asepticky rozděleno sterilním válcem do 6 sterilních lahví o objemu 250 ml. Zbytek sloužil jako abiotická kontrola, ze které byl ihned odebrán vzorek cca 6 ml na stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

Z obou kultur Mléčná a Drobná byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku

(2. stupeň McFarlandovy stupnice) a jimi byly lahve zaočkovány:

č. 1 + 2: 10 µl suspenze kultury Mléčná

č. 3 + 4: 10 µl suspenze kultury Drobná

č. 5 + 6: 5 µl suspenze kultury Mléčná a 5 µl suspenze kultury Drobná

Všechny láhve byly kultivovány při 25°C na laboratorní vratné třepačce, při 100 cyklech za minutu a byl sledován vznik případného zákalu coby indikátoru množení bakterií. Po 10. a 16. dnu kultivace byly vzorky asepticky odebrány (po 10 ml), poté byly zcentrifugovány (10 000 g, 4°C, 12 minut) a v supernatantu byla změřena koncentrace DOC.

## 2.2 Pokus izolace degradačních bakterií ze směsné kultury z bakalářské práce

### 2.2.1 Příprava tekutého minerálního média (MM)

Složení MM na 200 ml:

Destilovaná voda.....	170 ml
Roztok A (9,07 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /1000 ml).....	4 ml
Roztok B (23,90 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O/1000 ml).....	16 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (10 g.l <sup>-1</sup> ).....	2 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (3 g.l <sup>-1</sup> ).....	2 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (1 g.l <sup>-1</sup> ).....	2 ml
NH <sub>4</sub> Cl (30 g.l <sup>-1</sup> ).....	2 ml



NaCl (50 g.l<sup>-1</sup>)..... 1 ml

### 2.2.2 Postup

Po přípravě bylo minerální médium sterilizováno a následně zchlazeno. Poté byl přidán 1-oktyl-2-pyrrolidon v množství 24 mg (= 26,1 µl) a vše bylo dobře promícháno. Koncentrace 1O2P byla 120 mg/l. Minerální médium s 1O2P bylo asepticky rozděleno sterilním válcem po 15 ml do 6 sterilních lahví o objemu 100 ml.

2 lahve zaočkovány 150 µl suspence pocházející z Bc. práce

2 lahve zaočkovány 15 µl suspence pocházející z Bc. práce

2 lahvičky zaočkovány 1,5 µl suspence pocházející z Bc. práce

Vše bylo inkubováno při 25°C na laboratorní vratné třepače a byl sledován růst ve formě zákalu či vloček.

Po 7. dni inkubace byly lahve prohlédnuty a byla vybrána dvojice těch lahví, které byly zaočkovány nejmenším množstvím inokula.

Opětovně bylo připraveno minerální médium s obsahem 200 ml a po sterilizaci a přidavku 1O2P bylo rozděleno po 10 ml do 16 lahví. Lahve byly inkubovány jako v předešlém případě.

Narostlá suspenze byla šetrně protřepána se sterilními skleněnými kuličkami, které slouží k případnému rozbití vloček či mikrovloček. Poté byla suspenze ředěna desetinným ředěním, ve zkumavkách, od 10<sup>-1</sup> až 10<sup>-8</sup>. Z jednotlivých (od 10<sup>-1</sup> až 10<sup>-8</sup>) byly po 100 µl naočkovány vždy 2 lahve + 2 lahve zůstaly neočkovány, sloužící jako kontrola. Následovala inkubace při 25°C po dobu 20 dnů.

Ze suspenze s ředěním 10<sup>-8</sup> byl proveden křížový roztěr na petriho misku s R2A agarem. Na misce narostly 4 různé kolonie, které byly samostatně rozočkovány na TYA a R2A agary.

## 2.3 Růst kultury Drobná v přítomnosti NaCl a při různých teplotách

### 2.3.1 Postup

Kultura Drobná byla naočkována na příslušné petriho misky s agary s různým obsahem chloridu sodného. Poté byla uložena do termostatu, kde byla kultivována při 25°C. Ostatní misky se uložily do termostátů podle předepsaných teplot. Miska s 5-6 °C byla uložena do lednice.

Tab. 1 Typy použitých agarů

Miska	Typ agaru
1	R2A + 4% NaCl
2	R2A + 4,5% NaCl
3	R2A + 5% NaCl
4	R2A + 5,5% NaCl
5	R2A + 6% NaCl
6	R2A
7	TYA - 10
8	TYA
9	TYA 5% NaCl
10	R2A 5-6°C
11	R2A 20°C
12	R2A 30°C
13	R2A 37°C
14	R2A 45°C

## 2.4 Ověření kultur NOP 1 – 4 získaných ze směsné kultury z bakalářské práce

### 2.4.1 Příprava tekutého minerálního média

Složení MM na 200 ml (viz 2.2.1)

### 2.4.2 Postup

Po přípravě bylo minerální médium sterilizováno a zchlazeno. Byl asepticky přidán 1-oktyl-2-pyrrolidon v množství 20 mg (= 22 µl) a vše bylo dobře promícháno. Koncentrace 1O2P byla 100 mg/l. MM s 1O2P bylo asepticky rozděleno sterilním válcem po 15 ml do sterilních lahví o objemu 100 ml.

Následně byly připraveny suspenze čtyř kultur ve fyziologickém roztoku (2. stupeň McFarlandovy stupnice) a jimi byly lahve zaočkovány:

č. 1 + 2: 15  $\mu$ l suspenze kultury NOP 1

č. 3 + 4: 15  $\mu$ l suspenze kultury NOP 2

č. 5 + 6: 15  $\mu$ l suspenze kultury NOP 3

č. 7 + 8: 15  $\mu$ l suspenze kultury NOP 4

č. 9 + 10: po 5  $\mu$ l suspensí všech kultur (NOP 1 – 4)

č. 11 + 12: kontrola bez zaočkování

Všechny lahve byly inkubovány při 25°C na laboratorní vratné třepačce, při 100 cyklech za minutu a po 4, 6 a 11 dnech byl měřen zákal. Z každé lahve byl asepticky odebrán 1 ml promíchané suspenze do čisté kádinky a poté z každého vzorku bylo dávkováno 200  $\mu$ l trojmo do jamek mikrotitrační destičky a ta byla změřena při 600 nm. Na konci testu byla změřena i koncentrace rozpuštěného organického uhlíku.

## **2.5 Schopnost rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu kulturami Drobná 1 a Drobná 2**

### **2.5.1 Příprava tekutého minerálního média**

Složení MM na 200 ml (viz 2.2.1)

### **2.5.2 Postup**

Po přípravě bylo tekuté minerální médium sterilizováno a zchlazeno. Byl asepticky přidán 1-oktyl-2-pyrrolidon v množství 20 mg (= 22  $\mu$ l) a vše bylo dobře promícháno. Minerální médium s 1O2P bylo asepticky rozděleno sterilním válcem po 15 ml do 8 sterilních lahví o objemu 100 ml.

Byly připraveny suspenze kultur Drobná 1 a Drobná 2 ve fyziologickém roztoku (2. stupeň McFarland) a jimi byly lahve zaočkovány:

č. 1 + 2: 10  $\mu$ l suspenze Drobná 1

č. 3 + 4: 10  $\mu$ l suspenze Drobná 2

č. 5 + 6: 5  $\mu$ l suspenze Drobná 1 + 5  $\mu$ l suspenze Drobná 2

č. 7 + 8: bez zaočkování

Všechny lahve byly inkubovány při 25°C na laboratorní vratné třepačce, při 100 cyklech za minutu. Byl měřen zákal po 2, 6, 8, 10 a 13 dnech kultivace. Na konci testu byly asepticky odebrány vzorky, které byly zcentrifugovány 10 000 g, 4°C, 12 minut) a v supernatantu byla změřena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku.

## 2.6 Růst kultur Drobná 1 a Drobná 2 při různých teplotách a koncentracích NaCl

### 2.6.1 Postup

Bylo připraveno 100 ml R2A agaru (18,12 g na 1000 ml). Agar byl sterilizován a rozlit do petriho misek. Petriho misky byly rozděleny na poloviny a naočkovány hádkem oběma kulturami. Každá miska byla kultivována při jiné teplotě a to při 5, 20, 25, 30, 37, 43°C.

Dále bylo připraveno 7 dávek R2A agaru po 50 ml s přísávkou NaCl: 0,5 g (1%), 1 g (2%), 1,5 g (3%), 2,0 g (4%), 2,5 g (5%), 3,25 g (6,5%), 5,0 g (10%).

Po 10 dnech kultivace byly misky prohlédnuty a růst byl zaznamenán.

## 2.7 Růst kultury Drobná 2 při různých koncentracích 1-oktyl-2-pyrrolidonu jako jediném zdroji uhlíku

### 2.7.1 Příprava 2x koncentrovaného tekutého minerálního média (MM2)

Složení MM2 na 100 ml:

Destilovaná voda.....	70 ml
Roztok A (9,07 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /1000 ml).....	4 ml
Roztok B (23,90 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O/1000 ml).....	16 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (10 g.l <sup>-1</sup> ).....	2 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (3 g.l <sup>-1</sup> ).....	2 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (1 g.l <sup>-1</sup> ).....	2 ml
NH <sub>4</sub> Cl (30 g.l <sup>-1</sup> ).....	2 ml
NaCl (50 g.l <sup>-1</sup> ).....	1 ml

### 2.7.2 Postup

Cílem pokusu bylo zjistit růst kultury při koncentracích 1-oktyl-2-pyrrolidonu (0, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 mg/l). 1O2P byl použit jako jediný zdroj uhlíku.

Po přípravě bylo minerálního médium sterilizováno a zchlazeno. Ke 100 ml sterilní destilované vody bylo přidáno 43,48 µl 1O2P. Do sterilní mikrotitrační destičky bylo do 3 sloupců po 12 jamkách napipetováno po 100 µl dobře míchaného sterilního minerálního média. Zbytek MM byl naočkován 100 µl suspenze kultury Drobná 2 (hustota cca dvojnásobná oproti McFarland 2) a toto zaočkované médium bylo rovněž napipetováno po 100 µl do 3 sloupců po 12 jamkách. (viz tab. 2) Poté se do jamek přidala sterilní destilovaná voda a sterilní roztok 1O2P. (viz tab. 3 a tab. 4)

Tab. 2 Dávkování MM a MM se suspenzí kultury Drobná 2

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
2	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
3	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
4	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
5	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
6	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
7	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
8	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
9	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
10	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
11	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2
12	MM2+Dr2	MM2+Dr2	MM2+Dr2			MM2	MM2	MM2

Tab. 3 Dávkované objemy sterilní destilované vody v  $\mu\text{l}$ 

	A	B	C	Koncentrace 1O2P [mg/l]	E	F	G	H
1	100	100	100	0		100	100	100
2	50	50	50	100		50	50	50
3	45	45	45	110		45	45	45
4	40	40	40	120		40	40	40
5	35	35	35	130		35	35	35
6	30	30	30	140		30	30	30
7	25	25	25	150		25	25	25
8	20	20	20	160		20	20	20
9	15	15	15	170		15	15	15
10	10	10	10	180		10	10	10
11	5	5	5	190		5	5	5
12	0	0	0	200		0	0	0

Tab. 4 Dávkované objemy sterilního roztoku 1O2P v  $\mu\text{l}$ 

	A	B	C	Koncentrace 1O2P [mg/l]	E	F	G	H
1	0	0	0	0		0	0	0
2	50	50	50	100		50	50	50
3	55	55	55	110		55	55	55
4	60	60	60	120		60	60	60
5	65	65	65	130		65	65	65
6	70	70	70	140		70	70	70
7	75	75	75	150		75	75	75
8	80	80	80	160		80	80	80
9	85	85	85	170		85	85	85
10	90	90	90	180		90	90	90
11	95	95	95	190		95	95	95
12	100	100	100	200		100	100	100

Po nadávkování roztoků byla mikrotitrační destička vložena do polypropylenového sáčku a inkubována v termostatu při 25°C. Zákal byl měřen na TECANu při 600 nm po 2, 4, 6, 8 a 10 dnech.

## 2.8 Růst kultur Drobná 1 a Drobná 2 při různých koncentracích 1-oktyl-2-pyrrolidonu jako jediném zdroji uhlíku

### 2.8.1 Příprava minerálního média

Složení MM2 na 100 ml (viz 2.6.1)

### 2.8.2 Postup

Do sterilní mikrotitrační destičky bylo do 3 sloupců po 12 jamkách napipetováno 100  $\mu$ l dobře míchaného sterilního média MM2. Zbytek MM2 byl naočkován 100  $\mu$ l suspenzí kultur Drobná 1 a Drobná 2 (hustota McFarland 2) a toto zaočkované MM2 bylo nepipetováno po 100  $\mu$ l do 3 sloupců po 12 jamkách.

Tab. 5 Dávkování MM2 a MM2 se suspenzí kultur Drobná 1 a Drobná 2

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
3	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
4	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
5	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
6	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
7	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
8	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
9	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
10	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
11	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2
12	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2	MM2+Dr1a2			MM2	MM2	MM2

Dávkování sterilní destilované vody a sterilního roztoku 1O2P bylo stejné jako u předchozího pokusu (viz tab. 3 a 4)

## 2.9 Růst kultur Drobná 1 a Drobná 2 na 1-oktanolu a na 2-pyrrolidonu jako jediném zdroji uhlíku

### 2.9.1 Příprava minerálního média

Složení MM na 200 ml (viz 2.2.1 )

### 2.9.2 Postup

Po přípravě bylo minerální médium promícháno a rozděleno na dvě části po 100 ml. Obě části byly sterilizovány a následně zchlazeny. Do jedné dávky sterilního MM bylo asepticky přidáno 12  $\mu\text{l}$  1-oktanolu přímo ze zásobní lahve. Do druhé dávky byl přidán 1 ml sterilního 1%-tního roztoku 2-pyrrolidonu. Tento roztok byl získán tak, že se 95  $\mu\text{l}$  2-pyrrolidonu (100 mg) rozpustilo v 10 ml destilované vody a přefiltrovalo přes sterilní filtr, o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$ , do sterilní zkumavky.

Po promíchání byly substráty dávkovány pomocí sterilních válců po 15 ml do sterilních lahví. Následovalo zaočkování suspenzemi kultur Drobná 1 a Drobná 2.

č. 1 + 2: Minerální médium + 1-oktanol + 15  $\mu\text{l}$  suspenze Drobná 1

č. 3 + 4: Minerální médium + 1-oktanol + 15  $\mu\text{l}$  suspenze Drobná 2

č. 5 + 6: Minerální médium + 2-pyrrolidon + 15  $\mu\text{l}$  suspenze Drobná 1

č. 7 + 8: Minerální médium + 2-pyrrolidon + 15  $\mu\text{l}$  suspenze Drobná 2

č. 9: Minerální médium + 1-oktanol bez zaočkování

č. 10: Minerální médium + 2-pyrrolidon bez zaočkování

Všechny lahve byly inkubovány při 25°C. Po 2, 4, 6, 8 a 10 dnech byl měřen zákal na TECANu při 600 nm. Po 10. dni inkubace byla změřena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku.

## 2.10 Využití 1-oktyl-2-pyrrolidonu jako zdroje dusíku

### 2.10.1 Příprava minerálního média bez zdroje dusíku (MMB)

Složení MMB na 100 ml:

Destilovaná voda.....	85 ml
Roztok A (9,07 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /1000 ml).....	2 ml
Roztok B (23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /1000 ml).....	8 ml
Roztok stopových prvků.....	0,05 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	1 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	0,5 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	1 ml
$\text{NaCl}$ (50 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ).....	0,5 ml



### 2.10.2 Postup

Po přípravě bylo tekuté minerální médium sterilizováno a zchlazeno. Byl asepticky přidán 1-oktyl-2-pyrrolidon v množství 12  $\mu$ l a vše bylo dobře promícháno. MMB s 1O2P bylo asepticky rozděleno sterilním válcem po 15 ml do 6 sterilních lahví o objemu 100 ml.

Byly připraveny suspenze kultur Drobná 1 a Drobná 2 ve fyziologickém roztoku (2. stupeň McFarlandovy stupnice) a jimi byly lahve zaočkovány:

č. 1 + 2: 15  $\mu$ l suspenze Drobná 2

č. 3 + 4: 15  $\mu$ l suspenze Drobná 1 + 15  $\mu$ l suspenze Drobná 2

č. 5 + 6: lahve bez zaočkování pro kontrolu

Všechny lahve byly inkubovány při 25°C. Po 2, 4, 7, 9 a 14 dnech byl měřen zákal na TE-CANu při 600 nm.

## 2.11 Růst kultur Drobná 1 a Drobná 2 s vitamíny na 1-oktanolu a na 2-pyrrolidonu jako jediném zdroji uhlíku a společný růst

### 2.11.1 Příprava tekutého minerálního média (MM)

Složení MM na 200 ml (viz 2.2.1 )

### 2.11.2 Postup

Po přípravě bylo MM dokonale promícháno a rozděleno na čtyři části po 50 ml. Ty byly sterilizovány. Po sterilizaci a zchlazení na cca 40°C bylo do dvou dávek asepticky přidáno 50  $\mu$ l roztoku MEM vitamínů.

Do jedné dávky sterilního MM s vitamíny bylo asepticky přidáno 12  $\mu$ l 1-oktanolu (OKT) přímo ze zásobní lahve, do druhé dávky sterilního MM s vitamíny 1 ml sterilního 1%-tního roztoku 2-pyrrolidonu (PYRR).

Po promíchání substrátů bylo provedeno dávkování pomocí sterilních špiček po 5 ml do sterilních zkumavek, které byly zaočkovány takto:

zk. 1 + 2: MM vit + OKT + 15  $\mu$ l suspence kultury Drobná 1

zk. 3 + 4: MM vit + OKT + 15  $\mu$ l suspence kultury Drobná 2

zk. 5 + 6: MM vit + PYRR + 15  $\mu$ l suspence kultury Drobná 1

zk. 7 + 8: MM vit + PYRR + 15 µl suspence kultury Drobná 2

zk. 9 + 10: MM vit + OKT bez zaočkování

zk. 11 + 12: MM vit + PYRR bez zaočkování

Do třetí dávky bylo asepticky přidáno 50 µl roztoku MEM vitamínů jako výše. Po promíchání bylo rozplněno do sterilních zkumavek po 5 ml a ty byly poté zaočkovány. Nebyl použit žádný substrát.

zk. 13 + 14: MM vit + 15 µl suspence kultury Drobná 1

zk. 15 + 16: MM vit + 15 µl suspence kultury Drobná 2

Čtvrtá dávka zůstala bez vitamínů. Byla rozdělena po 25 ml a do jedné z nich bylo asepticky přidáno 7 µl 1-oktanolu a do druhé 0,5 ml sterilního 1%-tního roztoku 2-pyrrolidonu.

zk. 17 + 18: MM + OKT + 15 µl suspence kultury Drobná 1 + 15 µl suspence Drobná 2

zk. 19 + 20: MM + PYR + 15 µl suspence kultury Drobná 1 + 15 µl suspence Drobná 2

Všechny zkumavky byly inkubovány při 25°C horizontálně. Po 4, 6, 11 a 13 dnech byl měřen zákal. Z každé lahve bylo po dokonalém promíchání asepticky odebráno 0,7 ml promíchané suspenze do čisté kádinky a poté z každého vzorku bylo dávkováno 200 µl trojmo do jamek mikrotitrační destičky a ta byla změřena při 600 nm.

## 3 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ SCHOPNÝCH ROZKLADU

### 3.1 Gramovo barvení

Jedná se o jednoduchou metodu, která ve svém výsledku rozliší bakterie na dvě velké skupiny, lišící se v uspořádání buněčné stěny, gram-pozitivní (G+) a gram-negativní (G-) bakterie.

Bakteriologickou kličkou bylo odebráno přiměřené množství biomasy, které bylo rozetřeno spolu s kapkou fyziologického roztoku na podložním sklíčku. Zaschlý nátěr na sklíčku byl fixován protažením plamenem. Na preparát byla nanesena krystalová violet' po dobu 1 minuty. Poté bez oplachování byla krystalová violet' slita a preparát byl převrstven Lugolovým roztokem opět po dobu 1 minuty. Po slítí byl preparát opatrně opláchnut destilovanou vodou a v šikmé poloze byl odbarvován acetonem tak dlouho, dokud odtékalo barvivo (obvykle 20 až 25 vteřin). Po dalším opláchnutí destilovanou vodou byl dobarven safraninem po dobu 1 minuty. Nakonec byl preparát důkladně opláchnut destilovanou vodou, opatrně usušen vysoko nad plamenem a mikroskopován pomocí imersního objektivu.

### 3.2 Detekce cytochromoxidázy

Sterilní bakteriologickou kličkou byla odebrána čistá kolonie z kultivačního média, která se rozetřela na reakční plochu diagnostického proužku testu Mikro-La-Test OXItest. Po uběhnutí inkubační doby (0,5-1 minuta) bylo odečteno vzniklé modré zbarvení - indofenolová modř

### 3.3 Katalázový test

Biomasa zkoumané kultury byla přenesena do kapky 3% roztoku peroxidu vodíku a rozmíchána. Pokud bakterie tvoří katalázu, dochází k rozkladu s peroxidu a objeví se bublinky kyslíku.

### 3.4 KOH test

KOH test slouží k rychlému odlišení gram-pozitivních a gram-negativních bakterií.

Na podložní skličko byla nanesena kapka 3% roztoku KOH. Sterilní bakteriologickou kličkou byla odebrána kolonie, která se následně v kapce roztoku rozmíchávala několik minut. U gram-negativní bakterie byla vytvořena viskózní suspenze.

### 3.5 Oxidačně - fermentační test

Určuje, zda je izolovaná kultura fermentující či nefermentující. Jako fermentující jsou označovány bakterie využívající glukosu jak aerobně (aerobní respirací), tak anaerobně (kvašením). Nefermentující bakterie využívají glukosu jen aerobně, nebo ji nevyužívají vůbec. Po kultivaci je u fermentujících bakterií původně zelená barva média změněna v celém sloupci do žluta. Nefermentující bakterie mění barvu média jen při povrchu do žluta či modra nebo ji nemění vůbec.

Test byl proveden vpichem sterilní bakteriologické kličky s kulturou do připraveného média ve zkumavce. Následovala kultivace při 25°C po dobu 5 dnů.

### 3.6 Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí UltraClean Microbial DNA Isolation Kit. Buněčné pelety kultur Drobná 1 a Drobná 2 byly rozsuspendovány ve 300 µl rozbíjecího pufru (MicroBead Solution) a jemně vortexovány při nižších otáčkách. Vzniklá suspenze byla převedena do rozbíjecí mikrozkuavky (MicroBead tube). Mikrozkuavky byly vortexovány při maximální rychlosti 10 minut. Poté proběhla centrifugace při 10 000 x g 30 sekund. Vzniklý supernatant byl převeden do čisté 2 ml mikrozkuavky. K supernatantu bylo přidáno 100 µl roztoku MD2. Po 5 sekundách vortexování byla mikrozkuavka inhibována při 4°C po dobu 5 minut. Následovala centrifugace při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Kromě pelety byl veškerý supernatant přenesen do čisté 2 ml zkumavky. K supernatantu bylo přidáno 900 µl roztoku MD3. Asi 700 µl získaného roztoku bylo přeneseno do kolonky a centrifugováno 30 sekund. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn. Do kolonky bylo přidáno 300 µl roztoku MD4 a následná centrifugace probíhala 30 sekund. Kolonka byla přenesena do nové mikrozkuavky. Do středu membrány uvnitř kolonky bylo nadávkováno 30 µl roztoku MD5. Po 10 minutách byla mikrozkuavka centrifugována po dobu 30 sekund a kolonka byla odstraněna. Izolovaná DNA zůstala v mikrozkuavce.

### 3.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA založena na principu replikace nukleových kyselin. Úseky DNA, které se mají namnožit, musí být ohraničeny na začátku a na konci tzv. primery (krátkými oligonukleotidy DNA).

PCR směs byla připravována ve 200  $\mu\text{l}$  mikrozkušavkách. Byly smíchány komponenty:

28  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

40  $\mu\text{l}$  Master Mix

Univerzální primery pro gen 16S rDNA:

4  $\mu\text{l}$  primeru 341 F

4  $\mu\text{l}$  primeru 907 R

PCR směs byla rozdělena do 3 mikrozkušavek. Do první byl přidán 1  $\mu\text{l}$  DNA kultury Drobná 1, do druhé 1  $\mu\text{l}$  kultury Drobná 2. Třetí mikrozkušavka neobsahovala DNA matici a představovala tedy negativní kontrolu. Tím bylo ověřeno, že žádná složka PCR reakce nebyla kontaminována. Vzorky byly promíchány a umístěny do termocykléru PTC 100 MJ Research (Bio-Rad), ve kterém následně probíhala syntéza DNA. Amplifikace probíhala dle programu:

Denaturace (tzv. hot start) – 95°C/1 min

Následovalo 35 cyklů:

1. krok denaturace – 95°C/30 s
2. připojení primerů – 61°C/30 s
3. krok syntéza řetězce DNA – 72°C/1 min

Po proběhnutí 35 reakčních cyklů proběhla závěrečná extenze:

Extenze – 72°C/8 min

Z důvodu nepřesných výsledků musel být tento proces opakován s použitím jiných primerů, a to FD1 a RD1. Byla připravena nová PCR směs, ve které byly smíchány komponenty:

42  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

60  $\mu\text{l}$  Master Mix

Univerzální primery 1500 párů bazí:

6  $\mu\text{l}$  primeru FD1

6  $\mu$ l primeru RD1

PCR směs byla rozdělena do 5 mikrozkušavek. Do první byl přidán 1  $\mu$ l DNA kultury Drobná 1, do druhé 1  $\mu$ l kultury Drobná 2. Do třetí a čtvrté mikrozkušavky byl přidán 1  $\mu$ l 10x ředěné DNA kultur Drobná 1 a Drobná 2. Pátá mikrozkušavka neobsahovala DNA matici a představovala negativní kontrolu. Tím bylo ověřeno, že žádná složka PCR reakce nebyla kontaminována. Vzorky byly promíchány a umístěny do termocykléru PTC 100 MJ Research (Bio-Rad), ve kterém následně probíhala syntéza DNA. Amplifikace probíhala dle programu:

Denaturace (tzv. hot start) – 95°C/2 min  
– 95°C/30 s

Následovalo 9 cyklů (v každém cyklu klesla teplota o 0,5°C):

– 72°C/1,30 min

Následovalo 24 cyklů:

– 95°C/30 s

– 52°C/30 s

– 72°C/1,30 min

Extenze:

– 72°C/10 min

### 3.8 Agarózová gelová elektroforéza

0,5 g agarózy bylo rozvařeno v 50 ml TAE pufru v mikrovlnné troubě. Byly přidány 2 kapky etidiumbromidu a obsah byl nalit do připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem. Gel se nechal tuhnout zhruba půl hodiny. Ze ztuhlého agaru byl opatrně vyjmut hřebínek. Amplifikovaná PCR směs byla nanášena do čtyř komůrek. Dvě komůrky obsahovaly neředěnou DNA kultur Drobná 1 a Drobná 2, další dvě obsahovaly 10x ředěnou DNA. Do další komůrky byl nanášen standard (tzv. DNA marker s fragmenty DNA známé délky) Poslední komůrka obsahovala PCR směs bez DNA matrice a sloužila jako kontrola. Poté byly zapojeny elektrody (DNA je záporně nabitá a migruje ke kladnému pólu). Elektroforéza byla ukončena, až barva standardu doputovala do 2/3 gelu. DNA fragmenty byly pozorovány na UV transiluminátoru. Pomocí DNA markeru o známé velikosti byla stanovena velikost PCR produktu.

### 3.9 Přečištění PCR produktu

Přečištění PCR produktu probíhalo pomocí NucleoSpin Gel and Clean-up. K 25  $\mu$ l PCR produktu bylo přidáno 30  $\mu$ l pufru NTI. Následovala centrifugace při 11 000 x g 30 s. Bylo přidáno 700  $\mu$ l pufru NT3 a vše bylo centrifugováno. Tento krok byl proveden dvakrát za sebou. Následovalo přidání 15  $\mu$ l pufru NE do kolonky. Po 10 minutách byla mikrozkumavka centrifugována po dobu 30 sekund. Vznikl čistý purifikovaný namnožený PCR produkt, který byl odeslán na sekvenaci DNA.

## 4 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

1-oktyl-2-pyrrolidon (SIGMA – ALDRICH, Německo)

1-oktanol (SIGMA – ALDRICH, Německo)

2-pyrrolidon (SIGMA – ALDRICH, Německo)

Tryptonový agar s kvasničným extraktem (TYA) (HIMEDIA, Indie)

R2A agar (HIMEDIA, Indie)

Laminární box BIO-II-A (Telstar, Španělsko)

Centrifuga Rotanta 460R – Hettich, Velká Británie

Analyzátor TOC 5000A – Shimadzu, Japonsko

Tecan SUNRISE (TECAN, USA)

Termocyklér PTC 100 MJ Research (Bio-Rad)



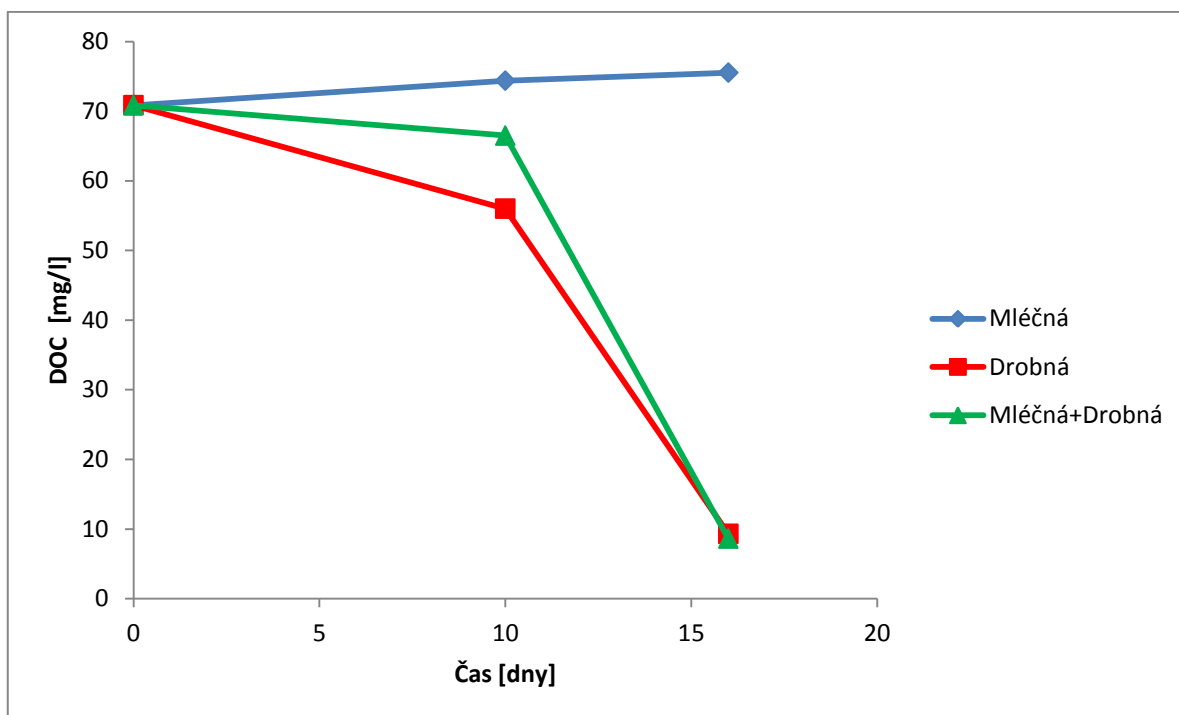
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Ověření degradační schopnosti kultur Mléčná a Drobná

Pokus ověření degradační schopnosti kultur Mléčná a Drobná byl prováděn sledováním koncentrací rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v průběhu kultivace v tekutém MM s 1O2P jako jediným zdrojem uhlíku a energie. Po 10. a 16. dni kultivace byly asepticky odebrány vzorky, které byly centrifugovány a v supernatantech byly koncentrace DOC stanoveny na přístroji Shimadzu 5000A. Z naměřených hodnot byl zhotoven graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase. Graf závislosti koncentrací DOC na čase kultivace je uveden níže, na obr. 5.

Tab. 6 Hodnoty koncentrace rozpuštěného organického uhlíku

Čas [dny]	DOC [mg/l]		
	Mléčná	Drobná	Mléčná+Drobná
0	70,89	70,89	70,89
10	74,38	56,01	66,50
16	75,53	9,31	8,63



Obr. 5 Graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase

Z grafu závislosti koncentrace rozpuštěného organického uhlíku na čase je patrné, že rozklad probíhal jen u kultury Drobná. Kultura Mléčná rozklad poněkud zpomalovala, proto byla z dalších pokusů vyřazena.

## 5.2 Izolace degradačních bakterií ze směsné kultury

Cílem pokusu bylo co nejvíce pomnožit degradační bakterie a řádově odhadnout množství degradačních bakterií v pomnožené suspenzi. Současně bylo cílem zjistit, zda se v této suspenzi nevyskytují i jiné degradační bakterie než kultura Drobná. Inkubace probíhala v 6 lahvích s tekutým minerálním médiem s přidavkem 1-oktyl-2-pyrrolidonu o koncentraci 120 mg/l. Lahve byly zaočkovány suspenzí, pocházející z mé bakalářské práce, vždy po dvou o objemech 150  $\mu$ l, 15  $\mu$ l a 1,5  $\mu$ l. Po 7. dni inkubace byly lahve prohlédnuty a byla vybrána dvojice lahví, které byly zaočkovány nejmenším množstvím inokula a to 1,5  $\mu$ l. Narostlá suspenze byla ředěna desetinným ředěním od  $10^{-1}$  až  $10^{-8}$ , ze kterých byly následně naočkovány lahve s minerálním médiem. Během 20 dnů inkubace byl sledován růst ve formě zákalu a vloček. Růst byl zaznamenán ve všech lahvích, tudíž ve všech ředěních. Bylo tedy zřejmé, že v 1 ml pomnožené suspenze je minimálně  $10^8$  degradačních bakterií. Ze suspenze s ředěním  $10^{-8}$  byl navíc proveden křížový roztěr na petriho misce s R2A aga-

rem. Na misce narostly 4 různé typy kolonií, které byly samostatně rozočkovány na TYA a R2A agary. Tyto kultury byly pojmenovány NOP 1, NOP 2, NOP 3, NOP 4.

### 5.3 Růst kultury Drobná v přítomnosti NaCl a při různých teplotách

Kultura Drobná byla naočkována na petriho misky s agary s obsahem chloridu sodného (0-6%) a byla kultivována při 25°C. Další misky s R2A agary byly naočkovány a uloženy do termostatů o teplotách 20, 30, 37 a 45°C. Další petriho miska byla uložena do lednice s teplotou 5-6°C.

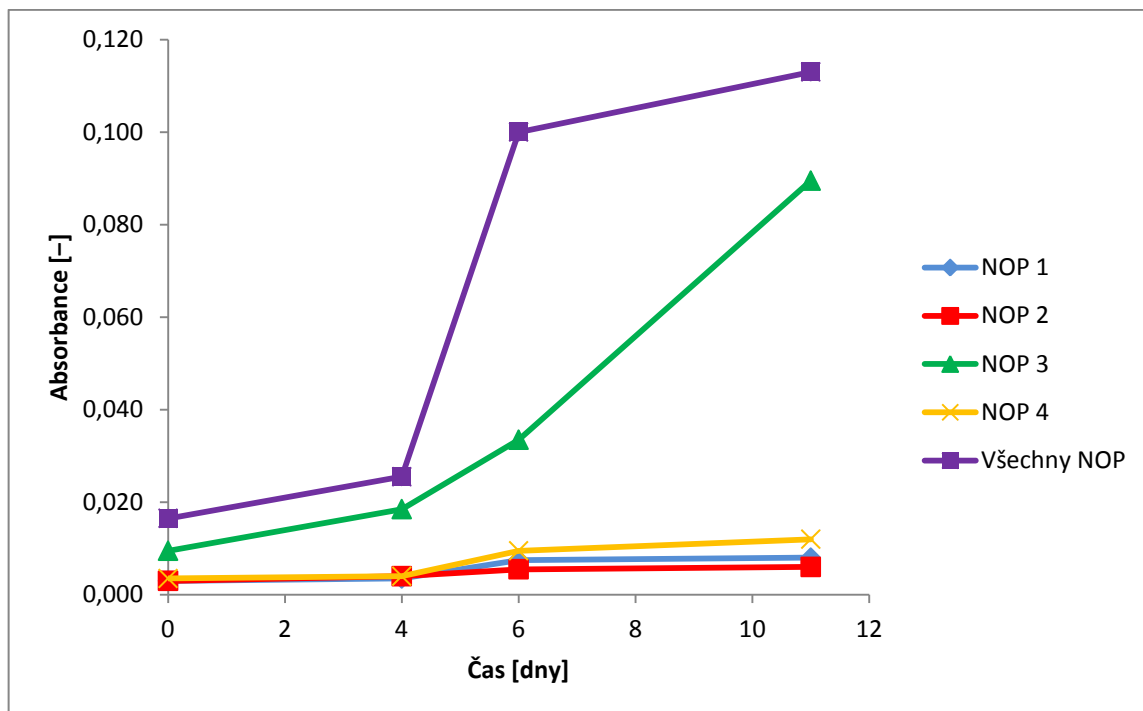
Po šesti dnech kultivace byly misky prohlédnuty. Kultura rostla na agarech s nižším obsahem NaCl (0-4%). Na agarech s vyšším obsahem NaCl (4,5-6%) byl růst zanedbatelný. Kultura je spíše mezofilní. Nejlépe rostla při teplotách 20 a 37°C. Při 45°C a 5-6 °C kultura nerostla vůbec.

### 5.4 Ověření kultur NOP 1 – 4

Pokus o ověření kultur NOP 1 – 4, které byly získány v předchozím pokusu, probíhal ve 12 lahvích s MM, kam byl asepticky přidán 1-oktyl-2-pyrrolidon o koncentraci 100 mg/l. Lahve byly zaočkovány kulturami samostatně i společně. Po 4, 6 a 11 dnech byl měřen zákal, coby indikátor růstu. Měření probíhalo na mikrotitrační destičce při 600 nm.

Tab. 7 Měření optické hustoty při 600 nm pro kultury NOP

Čas [dny]	Absorbance [-]				
	NOP 1	NOP 2	NOP 3	NOP 4	Všechny
0	0,003	0,003	0,010	0,004	0,017
4	0,004	0,004	0,019	0,004	0,026
6	0,008	0,006	0,034	0,010	0,100
11	0,008	0,006	0,090	0,012	0,113



Obr. 6 Graf závislosti optické hustoty bakteriálních suspenzí NOP1 - 4 na čase

Z grafu závislosti optické hustoty kultur NOP 1 – 4 na čase je zřejmé, že samostatný růst nastal u kultury NOP 3. Ostatní kultury rozklad samostatně neuskutečňovaly, ve smíšené kultuře však proces probíhal rychleji než u degradace samotnou kulturou NOP 3. Na konci testu byla také změřena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) pro kulturu NOP 3 a pro všechny kultury dohromady. Hodnota DOC pro NOP 3 byla 38,69 mg/l a pro všechny kultury 12,38 mg/l.

### 5.5 Degradční schopnost kultur Drobná 1 a Drobná 2

V průběhu zkoumání růstových vlastností kultury Drobná bylo zjištěno, že ve skutečnosti jde o smíšenou kulturu, sestávající ze dvou, z pohledu tvorby kolonií velmi podobných kultur. Tyto byly z kultury Drobná samostatně rozočkovány na čisté petriho misky, vyčištěny, a posléze označeny názvy Drobná 1 a Drobná 2. Ty pak byly následně použity ve všech dalších pokusech.

Připravené MM s 1-oktyl-2-pyrrolidonem o koncentraci 100 mg/l bylo rozděleno do 8 lahví, z nichž 2 zůstaly nezaočkované a sloužily jako lahve kontrolní. Další lahve byly vždy po dvou zaočkovány 10  $\mu$ l kultury Drobná 1 a Drobná 2. Poslední 2 lahve byly zaočkovány oběma kulturami dohromady. Z inkubovaných lahví byly po 2, 6, 8, 10 a 13 dnech odebí-

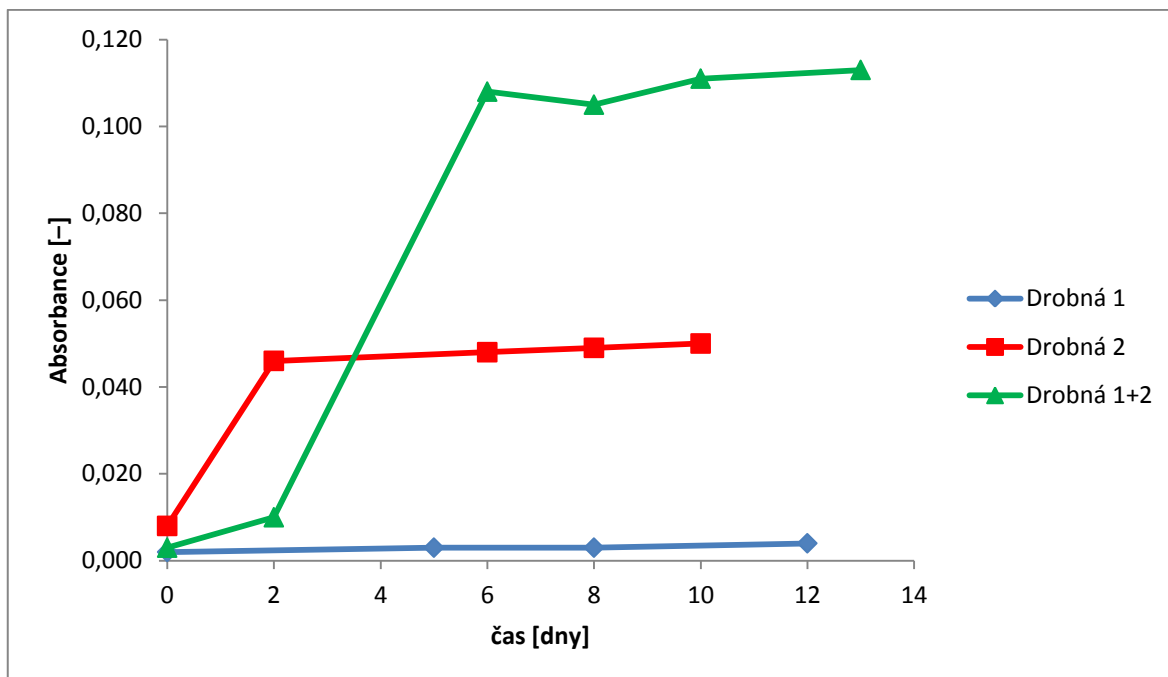
rány vzorky, z kterých byla následně měřena optická hustota. Na konci testu byla v supernatantu změřena i koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

Tab. 8 Měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu Drobná 1

	Absorbance [-]
Čas [dny]	Drobná 1
0	0,002
5	0,003
8	0,003
12	0,004

Tab. 9 Měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu Drobná 2 a obě kultury dohromady

	Absorbance [-]	
Čas [dny]	Drobná 2	Drobná 1+2
0	0,002	0,003
2	0,008	0,010
6	0,046	0,108
8	0,048	0,105
10	0,049	0,111
13	0,050	0,113



Obr. 7 Graf závislosti optické hustoty bakteriálních suspenzí Drobná 1 a Drobná 2 na čase

Tab. 10 Hodnoty rozpuštěného organického uhlíku na konci pokusu

Lahev č.	DOC [mg/l]			
	Drobná 1	Drobná 2	Drobná 1+2	Kontrola
1	90,10	69,89	10,02	108,70
2	88,71	70,76	10,80	111,90

Z grafu závislosti optické hustoty na čase a z naměřených hodnot rozpuštěného organického uhlíku vyplývá, že kultura Drobná 2 roste lépe než kultura Drobná 1. Nejlépe však rostou kultury společně, čemuž odpovídaly i výsledky stanovení DOC.

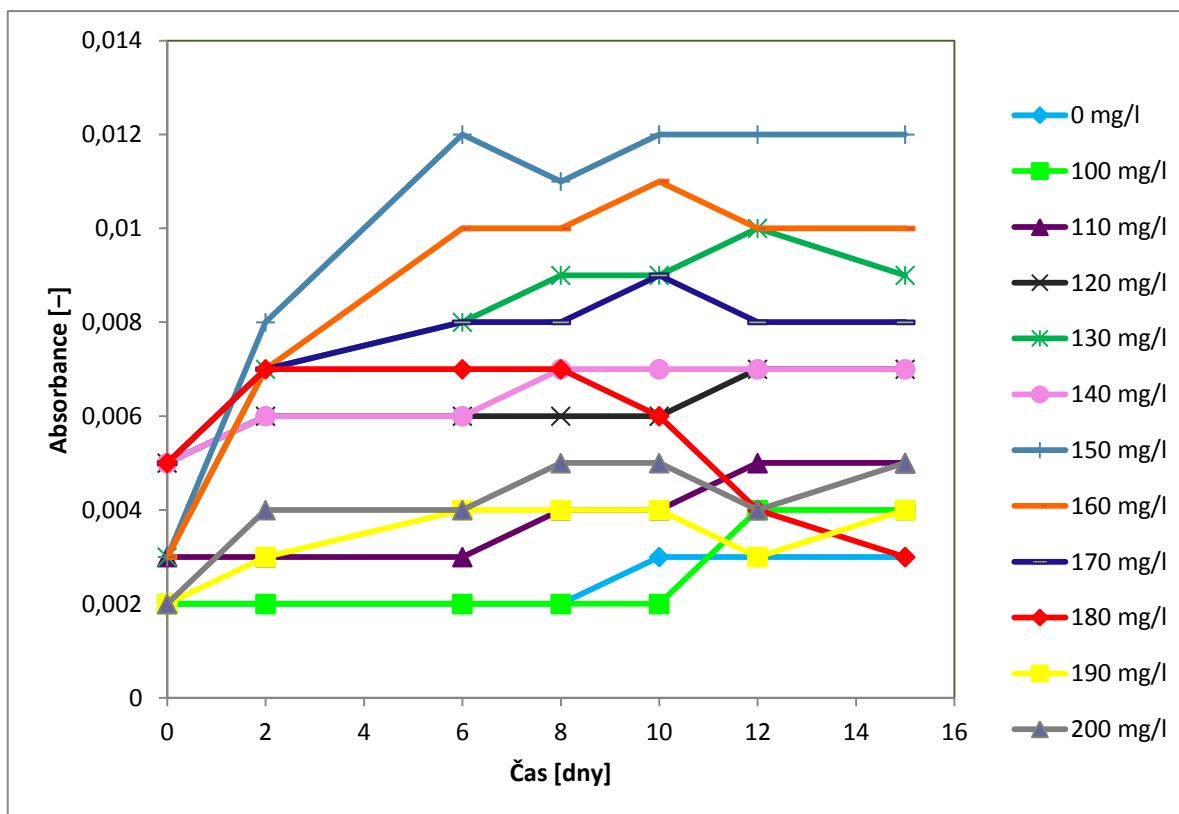
### 5.6 Růst kultury Drobná 2 při různých koncentracích 1-oktyl-2-pyrrolidonu jako jediném zdroji uhlíku

V tomto testu byla sledována schopnost kultury Drobná 2 využívat 1-oktyl-2-pyrrolidon jako jediný zdroj uhlíku. Cílem pokusu bylo také zjistit, jaký je růst kultury při koncentracích 1O2P 0, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 mg/l. Test probíhal ve

sterilní mikrotitrační destičce, kam bylo přidáno kulturou zaočkované minerální médium, destilovaná voda a různé koncentrace IO2P.

Tab. 11 Měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu Drobná 2 při různých koncentracích IO2P

Čas [dny]	Koncentrace IO2P [mg/l]											
	0	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
	Absorbance [-]											
0	0,002	0,002	0,003	0,005	0,003	0,005	0,003	0,003	0,005	0,005	0,002	0,002
2	0,002	0,002	0,003	0,006	0,007	0,006	0,008	0,007	0,007	0,007	0,003	0,004
6	0,002	0,002	0,003	0,006	0,008	0,006	0,012	0,010	0,008	0,007	0,004	0,004
8	0,002	0,002	0,004	0,006	0,009	0,007	0,011	0,010	0,008	0,007	0,004	0,005
10	0,003	0,002	0,004	0,006	0,009	0,007	0,012	0,011	0,009	0,006	0,004	0,005
12	0,003	0,004	0,005	0,007	0,010	0,007	0,012	0,010	0,008	0,004	0,003	0,004
15	0,003	0,004	0,005	0,007	0,009	0,007	0,012	0,010	0,008	0,003	0,004	0,005



Obr. 8 Graf závislosti optické hustoty na čase pro kulturu Drobná 2 při různých koncentracích IO2P

Z grafu lze vyčíst, že kultura rostla jen velmi nepatrně, a to jen při některých koncentracích 1O2P. Výsledky nebyly příliš průkazné, bylo proto rozhodnuto ověřit nejvyšší možnou koncentraci při společném růstu obou kultur.

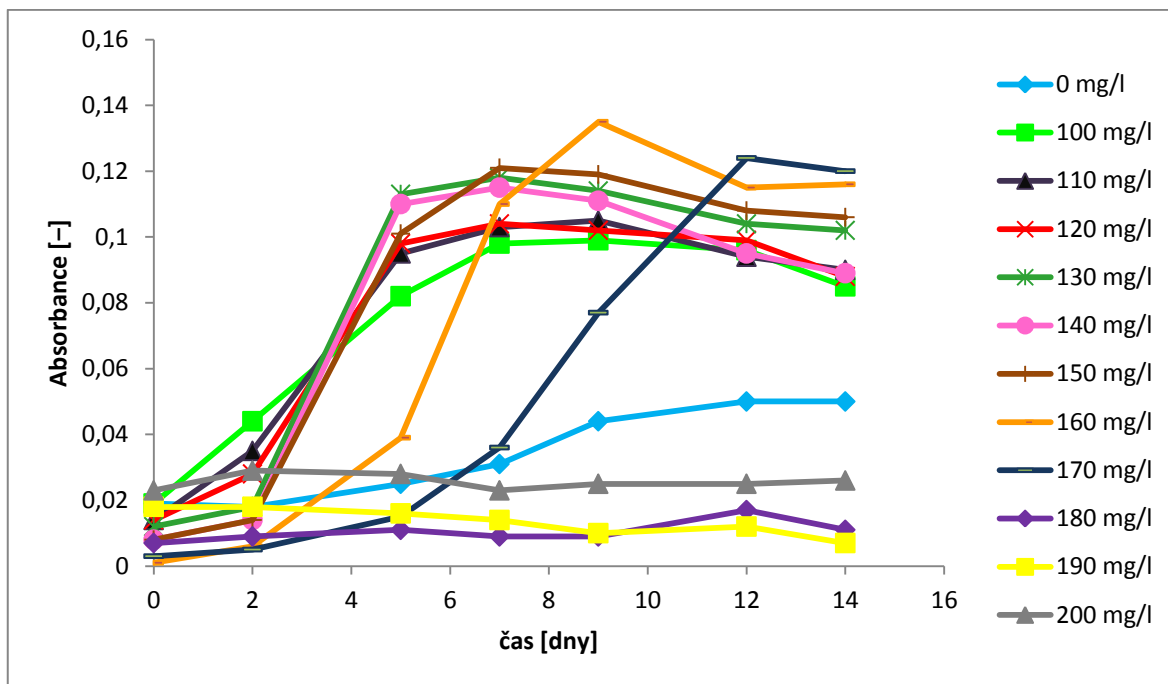
### 5.7 Růst obou kultur při různých koncentracích 1-oktyl-2-pyrrolidonu jako jediném zdroji uhlíku

V tomto testu byla sledována schopnost obou kultur (Drobná 1 a Drobná 2) společně využívat 1-oktyl-2-pyrrolidon jako jediný zdroj uhlíku. Cílem pokusu bylo také zjistit, jaký je růst smíšené kultury při koncentracích 1O2P 0, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 mg/l. Pokus probíhal podobně jako předchozí test.

Tab. 12 Měření optické hustoty při 600 nm pro obě kultury při různých koncentracích 1O2P

Čas [dny]	Koncentrace 1O2P [mg/l]											
	0	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
0	0,019	0,019	0,014	0,014	0,012	0,008	0,008	0,001	0,003	0,007	0,018	0,023
2	0,018	0,044	0,035	0,028	0,018	0,014	0,014	0,006	0,005	0,009	0,018	0,029
5	0,025	0,082	0,095	0,098	0,113	0,110	0,101	0,039	0,015	0,011	0,016	0,028
7	0,031	0,098	0,103	0,104	0,118	0,115	0,121	0,110	0,036	0,009	0,014	0,023
9	0,044	0,099	0,105	0,102	0,114	0,111	0,119	0,135	0,077	0,009	0,010	0,025
12	0,050	0,096	0,094	0,099	0,104	0,095	0,108	0,115	0,124	0,017	0,012	0,025
14	0,050	0,085	0,090	0,088	0,102	0,089	0,106	0,116	0,120	0,011	0,007	0,026





Obr. 9 Graf závislosti optické hustoty na čase pro obě kultury při různých koncentracích 1O2P

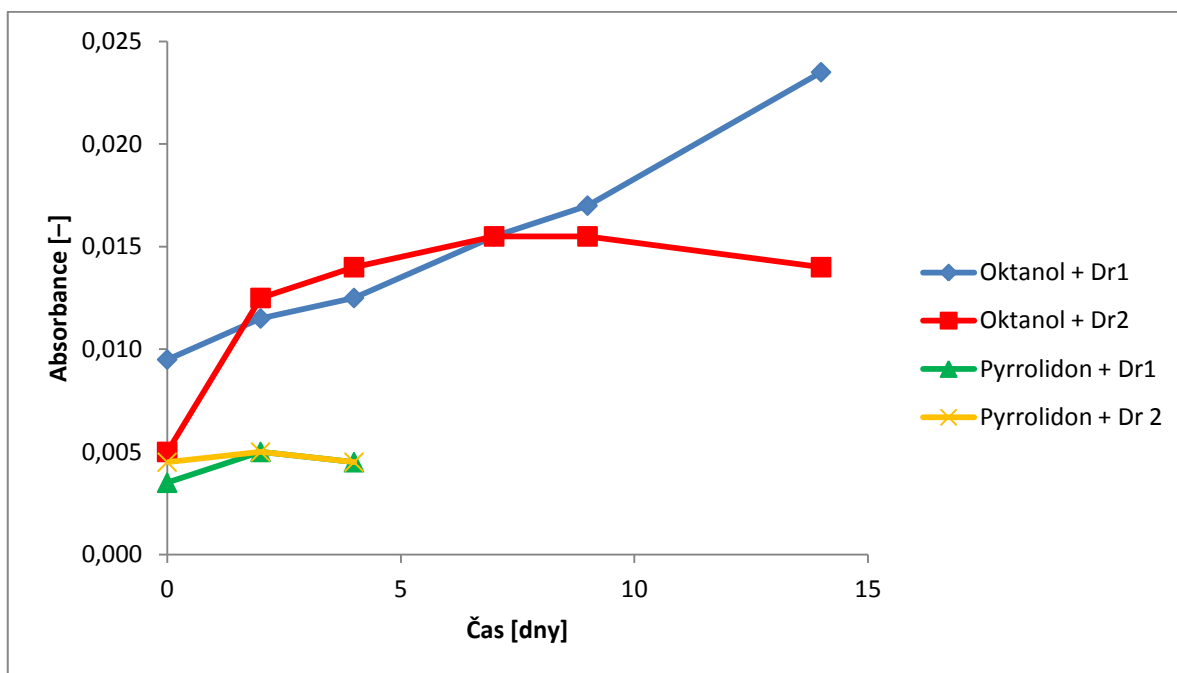
Z grafu závislosti optické hustoty na čase pro obě kultury je patrné, že kultury mohou využívat 1O2P jako jediný zdroj uhlíku. Kultury rostly v koncentracích od 100 mg/l do 170 mg/l. Nejvýraznější, avšak nejpomalejší růst byl zaznamenán u koncentrace 170 mg/l, při které byl zároveň zaznamenán výraznější růst kultur oproti kontrole až po 9 dnech kultivace.

### 5.8 Růst kultur na 1-oktanolu a 2-pyrrolidonu jako jediném zdroji uhlíku

Do jedné dávky sterilního minerálního média byl asepticky přidán 1-oktanol přímo ze zásobní lahve. Do druhé dávky byl přidán 1 ml sterilního 1%-tního roztoku 2-pyrrolidonu. Po promíchání byly substráty dávkovány pomocí sterilních válců do sterilních lahví. Následovalo zaočkování suspenzemi kultur Drobná 1 a Drobná 2.

Tab. 13 Měření optické hustoty při 600 nm pro obě kultury

čas [dny]	Absorbance [-]							
	Oktanol Drobná 1	Oktanol Drobná 1	Oktanol Drobná 2	Oktanol Drobná 2	Pyrrolidon Drobná 1	Pyrrolidon Drobná 1	Pyrrolidon Drobná 2	Pyrrolidon Drobná 2
0	0,010	0,009	0,006	0,004	0,005	0,002	0,005	0,004
2	0,012	0,011	0,014	0,011	0,005	0,005	0,005	0,004
4	0,013	0,012	0,016	0,012	0,004	0,005	0,005	0,004
7	0,018	0,013	0,018	0,013	Pokus ukončen			
9	0,020	0,014	0,019	0,012				
14	0,027	0,020	0,020	0,008				



Obr. 10 Graf závislosti optické hustoty na čase pro obě kultury

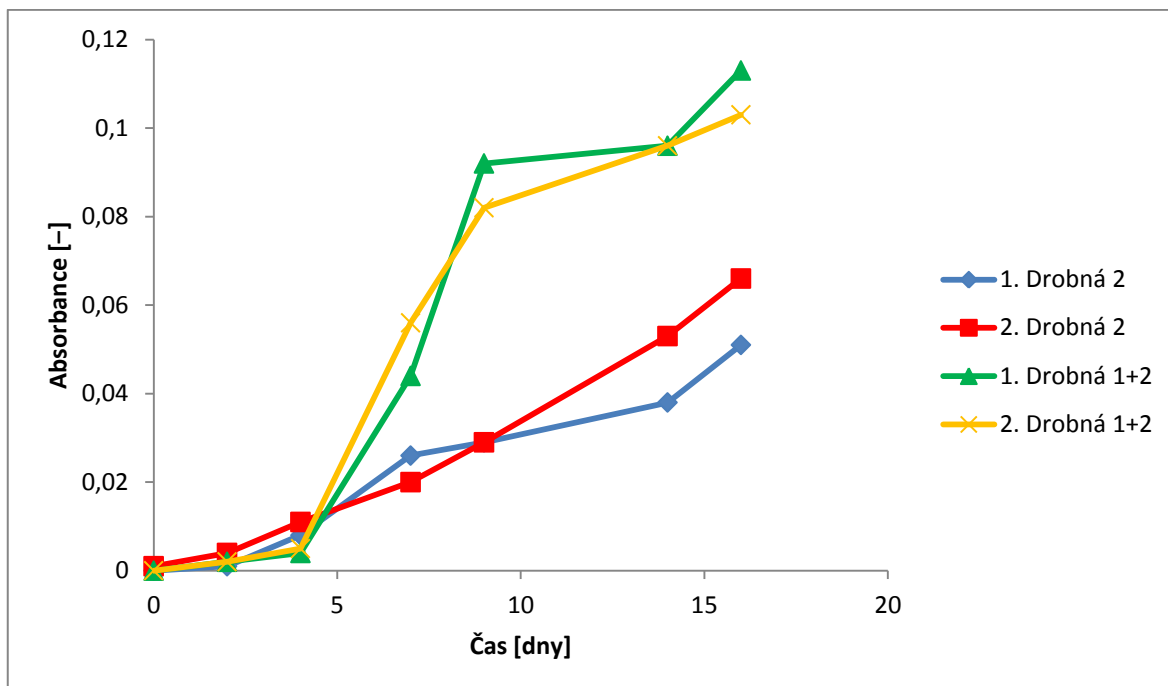
Pokus s růstem kultur na 2-pyrrolidonu musel být ukončen předčasně, z důvodu kontaminace v kultivačních lahvích, která zřejmě pocházela ze zásobního roztoku 2-pyrrolidonu. Růst na 1-oktanolu byl v případě obou kultur jen nepatrný, nárůst optické hustoty médií byl takřka zanedbatelný, a bylo proto rozhodnuto pokus zopakovat, s přidavkem vitamínů oběma kulturám.

## 5.9 Využití 1-oktyl-2-pyrrolidonu jako zdroje dusíku

Po přípravě tekutého minerálního média, s vyloučením chloridu amonného, byl asepticky přidán 1-oktyl-2-pyrrolidon a vše bylo rozděleno do sterilních lahví. Byly připraveny suspenze kultur Drobná 2 a obou kultur dohromady, jimiž byly lahve zaočkovány. Po dobu 16 dnů probíhala inkubace a po 2, 4, 7, 9, 14 a 16 dnech byly odebrány vzorky a následně byl změřen zákal.

Tab. 14 Měření optické hustoty při 600 nm

Čas [dny]	Absorbance [-]			
	Drobná 2	Drobná 2	Drobná 1+2	Drobná 1+2
0	0,000	0,001	0,000	0,000
2	0,001	0,004	0,002	0,002
4	0,008	0,011	0,004	0,005
7	0,026	0,02	0,044	0,056
9	0,029	0,029	0,092	0,082
14	0,038	0,053	0,096	0,096
16	0,051	0,066	0,113	0,103



Obr. 11 Graf závislosti optické hustoty na čase

Z grafu závislosti optické hustoty na čase je jasně vidět, že lépe probíhal růst u lahví se suspenzí obou kultur, než u lahví se samotnou kulturou Drobná 2. Avšak i u těchto lahví byl růst měřitelný, proto je možné říci, že kultury jsou ve společné kultuře schopné využívat IO2P jako zdroj dusíku, stejně jako kultura Drobná 2.

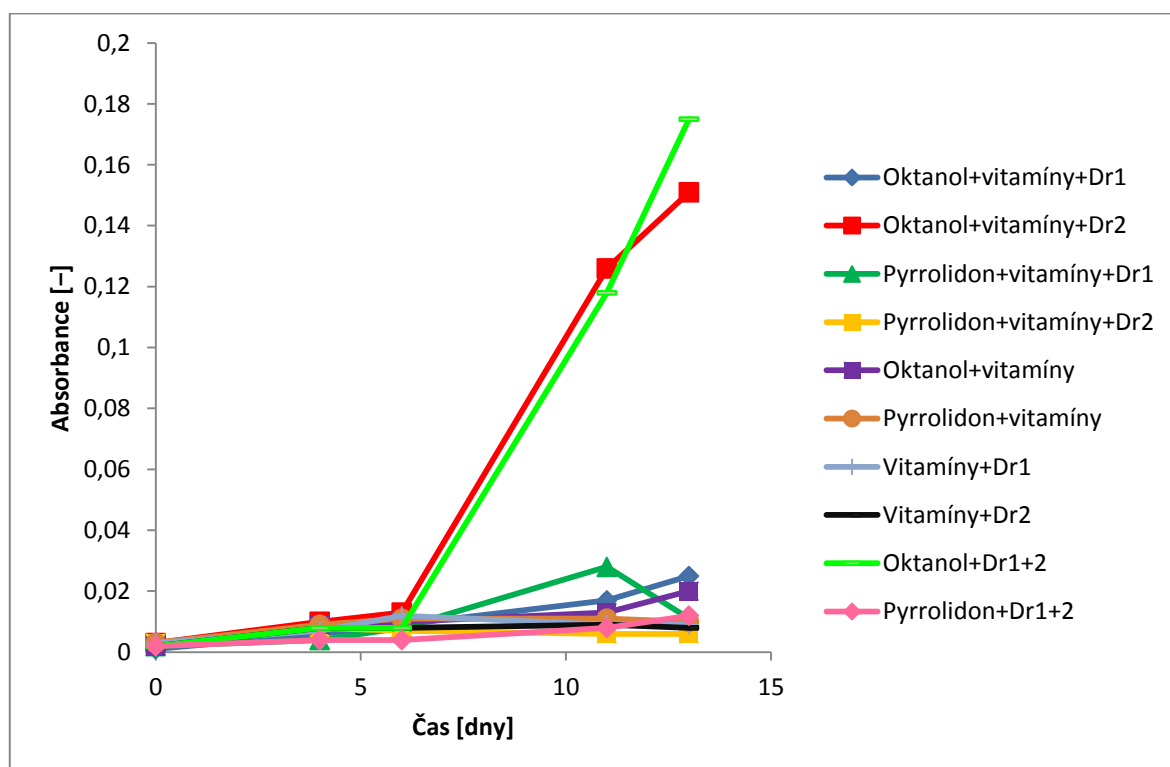
### 5.10 Růst kultur na 1-oktanolu a 2-pyrrolidonu jako jediném zdroji uhlíku s vitamíny

Minerální médium bylo rozděleno na čtyři části. Po sterilizaci a zchlazení byl do dvou dávek asepticky přidán roztok MEM vitamínů. Do jedné dávky MM s vitamíny byl přidán 1-oktanol, do druhé dávky MM s vitamíny 1%-tní roztok 2-pyrrolidonu. Po promíchání substrátů bylo provedeno dávkování do sterilních zkumavek, které byly zaočkovány kulturami podle rozpisu. U třetí dávky MM s roztokem MEM vitamínů nebyl použit žádný substrát. Čtvrtá dávka zůstala bez vitamínů. Do jedné lahve byl přidán 1-oktanol a do druhé 1%-tní roztok 2-pyrrolidonu.

Zkumavky byly inkubovány v horizontální poloze. Po 4, 6, 11 a 13 dnech byl měřen zákal, coby indikátor růstu.

Tab. 15 Měření optické hustoty suspenze s vitamíny při 600 nm

Čas [dny]	Absorbance [-]									
	Oktanol vitamíny Dr1	Oktanol vitamíny Dr2	Oktanol Dr1	Pyrrolidon Dr2	Oktanol vitamíny	Pyrrolidon vitamíny	Vitamíny Dr1	Vitamíny Dr2	Oktanol Dr1+2	Pyrrolidon Dr1+2
0	0,001	0,003	0,002	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002
4	0,006	0,01	0,004	0,008	0,009	0,009	0,007	0,008	0,008	0,004
6	0,009	0,013	0,008	0,007	0,010	0,011	0,012	0,008	0,008	0,004
11	0,017	0,126	0,028	0,006	0,013	0,011	0,009	0,009	0,118	0,008
13	0,025	0,151	0,011	0,006	0,020	0,010	0,009	0,008	0,175	0,012

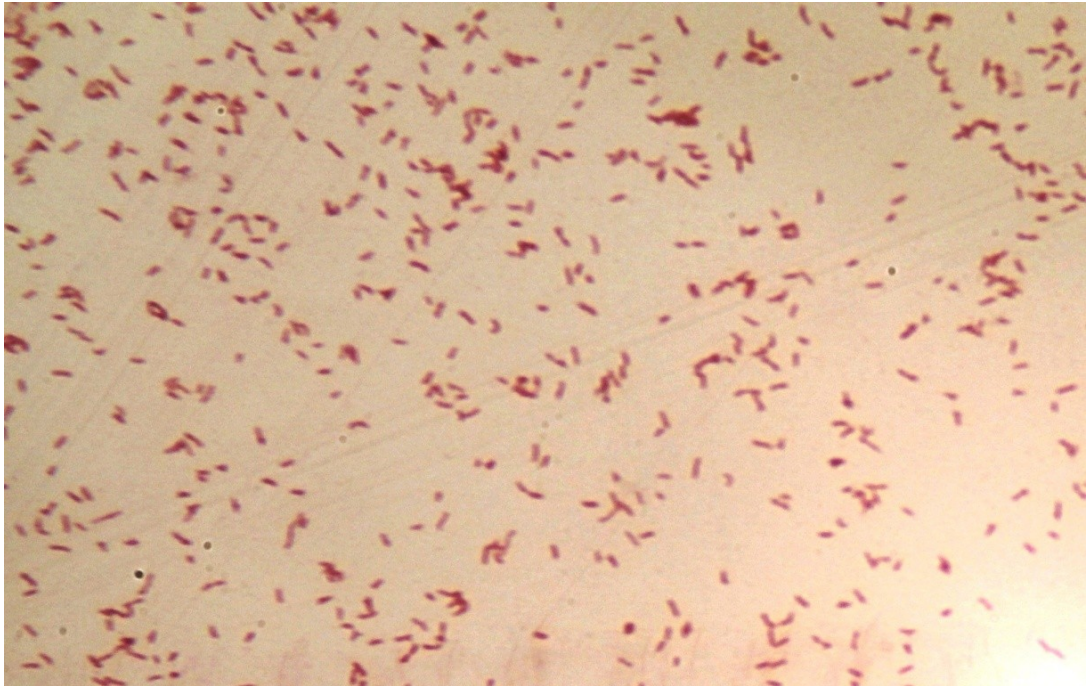


Obr. 12 Graf závislosti optické hustoty na čase pro suspenzi s vitamíny

Graf závislosti optické hustoty na čase ukazuje na průkazný růst kultury Drobná 2 na 1-oktanolu s přidavkem vitamínů. Růst na 1-oktanolu byl také logicky zaznamenán u médií zaočkovaných oběma kulturami dohromady. Naproti tomu růst na 2-pyrrolidonu nebyl patrný u žádné z obou kultur ani v přítomnosti vitamínů.

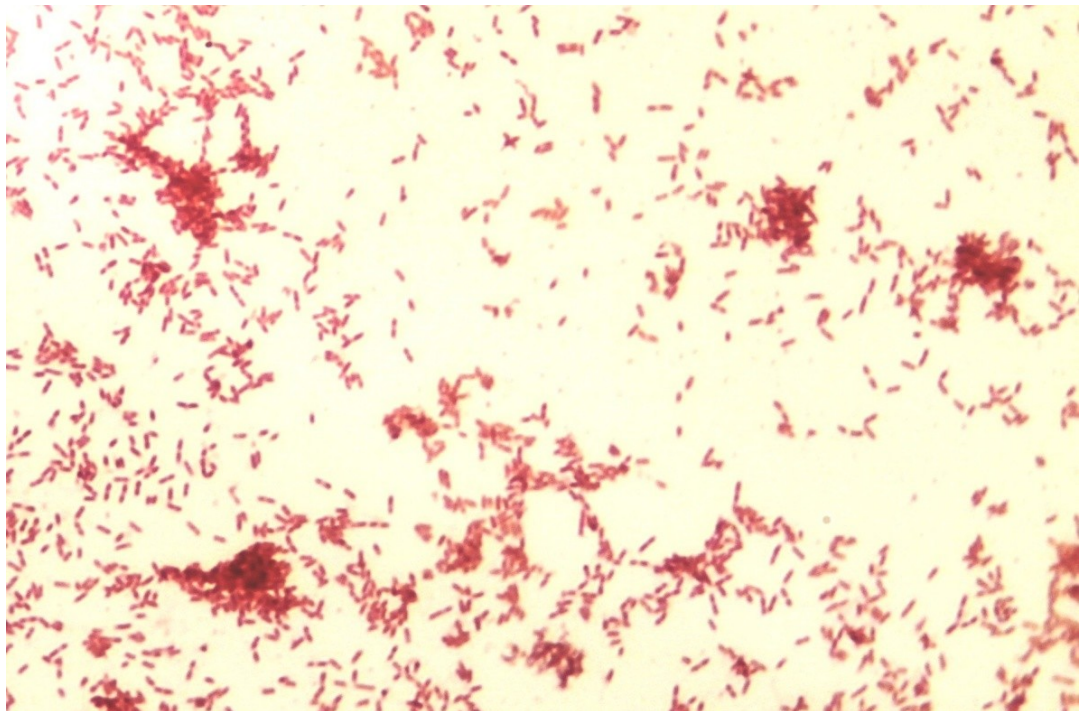
### 5.11 Identifikace bakterií Drobná 1 a Drobná 2

Gramovo barvení a následné mikroskopování bakteriálních kultur ukázalo, že v případě kultury Drobná 1 se jedná o gram-negativní tyčinku se zaoblenými konci. Některé buňky byly rovné, některé ojediněle mírně prohnuté, a byly uspořádané jednotlivě či po dvojicích.



*Obr. 13 Bakteriální kultura Drobna 1*

U mikrobiální kultury Drobna 2 je zřejmé, že je velice podobná kultuře Drobna 1. Rozdíl je však lepší barvitelnost. Rovné gram-negativní tyčinky jsou kratší a mají zaoblené konce. Uspořádání je ve větších shlucích, někdy však i jednotlivě.



*Obr. 14 Bakteriální kultura Drobna 2*

Tab. 16 Výsledky základních testů bakteriálních isolátů Drobná 1 a Drobná 2

	<b>Cytochromoxidáza</b>	<b>Kataláza</b>	<b>KOH test</b>
Drobná 1	negativní nebo velmi slabě pozitivní	pozitivní	gram-negativní
Drobná 2	negativní	velmi slabě pozitivní	gram-negativní

Tab. 17 Růst bakteriálních kolonií při různých koncentracích NaCl

Obsah NaCl [%]	Drobná 1	Drobná 2
1	+	+
2	+	+
3	+	-
4	+	-
5	+	-
6	-	-
10	-	-

Kultura Drobná 2 rostla jen na živných agarech s nízkými koncentracemi chloridu sodného (1-2%), je tedy velice citlivá na osmotický tlak. Kultura Drobná 1 je odolnější, rostla ve větším rozsahu koncentrace soli (1-5%).

Tab. 18 Růst bakteriálních kolonií při různých teplotách

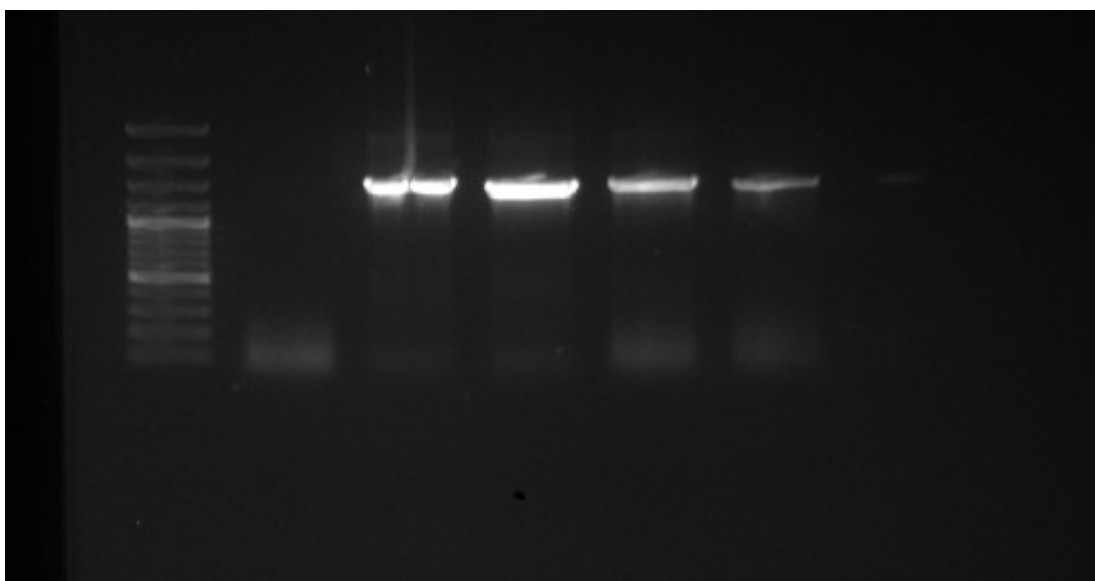
Teplota [°C]	Drobná 1	Drobná 2
5	+	+
20	+	+
25	+	+
30	+	+
37	+	-
45	-	-

Bakteriální kultura Drobná 1 rostla ve větším rozsahu teplot (5-37°C) než kultura Drobná 2 (5-30°C). Při 5°C rostly obě kultury velice pomalu.

## 5.12 Izolace a sekvenace DNA

Po izolaci DNA mikrobiálních kultur Drobná 1 a Drobná 2 následovala polymerázová řetězová reakce (PCR), kde byly amplifikovány úseky DNA. K ohraničení úseků DNA byly nejdříve použity primery 341 F a 907 R, které jsou cíleny na gen pro 16S rRNA, který obsahují všechny bakterie. Gen je kódující molekulou DNA pro molekulu RNA, která tvoří zásadní část bakteriálního ribozomu. Gen obsahuje úseky, které jsou silně konzervativní a úseky variabilní. Variabilní úseky se liší jak mezi skupinami bakterií, tak mezi jednotlivými bakteriemi. Z důvodu získání dvou různých výsledků při sekvenaci kultury Drobná 1, byl tento proces zopakován s použitím jiných primerů, a to FD1 a RD1. Tyto primery se používají při sekvenaci variabilní oblasti V1-V9 genu pro 16S rRNA a měly upřesnit výsledek první sekvenace DNA.

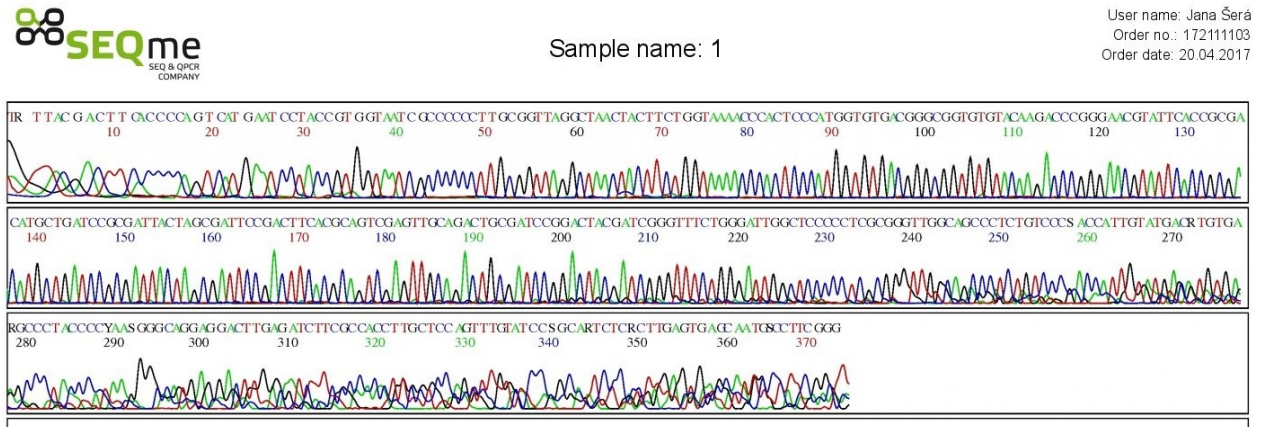
Následovala agarózová gelová elektroforéza, kdy byla amplifikovaná PCR směs byla nanášena do jednotlivých komůrek v gelu. Do první komůrky byl nanášen standard, což je DNA marker, jehož rozmezí fragmentů bylo 100-1500 párů bází. Druhá komůrka obsahovala PCR směs bez DNA matrice a sloužila jako kontrola. Další dvě komůrky obsahovaly neředěnou DNA kultur Drobná 1 a Drobná 2. Poslední dvě obsahovaly 10x ředěnou DNA. Elektroforéza byla ukončena, až barva standardu doputovala do 2/3 gelu. DNA fragmenty byly pozorovány na UV transiluminátoru. Pomocí DNA markeru byla stanovena velikost PCR produktu a to 1250 párů bází.



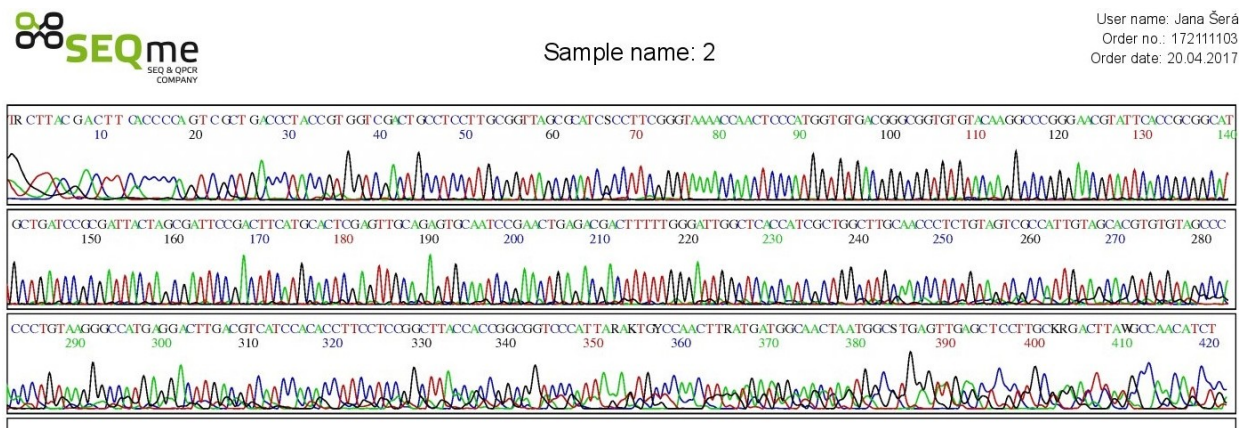
Obr. 15 Snímek PCR produktu z UV transiluminátoru s použitím primerů FD1 a RD1



Pro sekvenaci byly vybrány neřaděné PCR produkty, které musely být přečištěny. Poté vznikly čisté purifikované namnožené PCR produkty, jež byly odeslány na sekvenaci DNA.



Obr. 16 Výsledný sekvenogram DNA bakteriální kultury Drobná 1



Obr. 17 Výsledný sekvenogram DNA bakteriální kultury Drobná 2

Výsledné sekvence byly vloženy do programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který umožňuje srovnání neznámé sekvence se sekvencemi v databázi.

U kultury Drobná 1 program vyhodnotil dva různé výsledky, navzdory opakování PCR s použitím jiných primerů, a to *Achromobacter sp.* a *Bordetella sp.*, v obou případech s pravděpodobností 97%.

V tomto případě se pravděpodobně jedná o bakterii rodu *Achromobacter*, třídy *Betaproteobacteria*. Je chemoorganotrofní, jako zdroj uhlíku využívá řadu organických kyselin a aminokyselin.<sup>16</sup> Její schopností je oxidace maltózy a sacharózy.<sup>17</sup> Buňky jsou gram-negativní rovné tyčky se zaoblenými konci. Je nehalofilní, nehemolytická, nepigmentující. Bývá izolována z půdy, sladké i mořské vody a nemocničního prostředí.<sup>16</sup>

Bakterie rodu *Bordetella* se také řadí do třídy *Betaproteobacteria* a jedná se však o parazity a patogeny savců, u kterých osídlují a množí se mezi brvy epitelu horních cest dýchacích. Buňky jsou gram-negativní krátké drobné tyčky. Jsou striktně aerobní a ke kultivaci vyžadují obohacené půdy. *Bordetella pertussis* je původcem černého kašle, který byl považován za jedno z nejzávažnějších onemocnění kojenců a dětí do doby, než bylo zavedeno očkování.<sup>16</sup> Vzhledem k povaze bakterií rodu *Bordetella* je tedy zařazení kultury Drobná 1 do tohoto rodu méně pravděpodobné.

Mikrobiální kultura Drobná 2 byla vyhodnocena jako bakterie rodu *Phenylobacterium*, třídy *Alphaproteobacteria*. Její buňky jsou gram-negativní rovné až mírně zahnuté tyčky až koky, vyskytující se jednotlivě, po dvou nebo v krátkých řetězcích. Mohou být pohyblivé i nepohyblivé. Jsou aerobní či fakultativně anaerobní. Nacházejí se ve vodě i v půdě.<sup>16</sup> Tyto bakterie byly již několikrát popsány jako mikroorganismy s určitými schopnostmi degradace syntetických látek. Např. studie, která se zabývala mikrobiální degradací ciprofloxacinu, což je hojně využívané antibiotikum, prokázala jeho možnou biodegradaci pomocí směsné bakteriální komunity, významně obsahující i mikroorganismy z rodu *Phenylobacterium*.<sup>18</sup> Tento rod bakterií je také schopen degradovat polycyklické aromatické uhlovodíky, jako je antrachinon, v půdě.<sup>19</sup> *Phenylobacterium haematophilum* rovněž dokáže ve stavu čisté kultury aktivně metabolizovat lineární alkylbenzensulfonáty.<sup>20</sup>

## ZÁVĚR

V diplomové práci byla zkoumána schopnost bakteriálních kultur rozkládat 1-oktyl-2-pyrrolidon (1O2P) v tekutých médiích.

K práci byly použity mikrobiální kultury pocházející z mé bakalářské práce, které byly pojmenovány jako ZN1 a ZN2. Po dobu dvou let byly uloženy na ÚIOŽP při  $-80^{\circ}\text{C}$  a po následném vyočkování přejmenovány na Mléčná a Drobná. Kultury byly naočkovány do lahví obsahujících minerální médium (MM) s obsahem 1O2P. Z hodnot rozpuštěného organického uhlíku (DOC) bylo po kultivaci zřejmé, že kultura Mléčná není schopna rozkládat 1O2P ani k rozkladu přispívat. Dále bylo pracováno již jen s kulturou Drobná.

Kromě kultur ZN1 a ZN2 byla uschována i směsná suspenze degradačních bakterií, z níž byly získány 4 různé typy bakterií, které byly pojmenovány NOP 1, NOP 2, NOP 3, NOP 4. Pro jejich ověření byly inkubovány v MM s 1O2P o koncentraci 100 mg/l, a to jednotlivě i společně. Samostatný růst nastal pouze u kultury NOP 3, ve smíšené kultuře však proces probíhal rychleji. Porovnáním morfologie kolonií kultury NOP 3 a kultury Drobná bylo zjištěno, že se velmi pravděpodobně jedná o totožné kultury.

V průběhu zkoumání růstových vlastností kultury Drobná bylo zjištěno, že jde o smíšenou kulturu. Jednalo se o dvě velmi podobné mikrobiální kultury, které po následném samostatném rozočkování dostaly názvy Drobná 1 a Drobná 2. Tyto kultury byly dále použity ve všech následujících pokusech.

Při zkoumání jejich degradační schopnosti bylo zjištěno, že kultury naočkované v lahvích společně rozkládaly 1O2P lépe než kultury naočkované jednotlivě. Z jednotlivých lépe rozkládala 1O2P kultura Drobná 2.

Při sledování schopnosti kultury Drobná 2 využívat 1O2P, rostla kultura velmi nepatrně, a proto byla ověřena nejvyšší možná koncentrace při společném růstu obou kultur. Zde již bylo patrné, že kultury mohou využívat 1O2P jako jediný zdroj uhlíku. Rostly v koncentracích do 170 mg/l.

Při pokusu o růst kultur Drobná 1 a Drobná 2 na 1-oktanolu a 2-pyrrolidonu jako jediném zdroji uhlíku byl zaznamenán jen nepatrný růst na 1-oktanolu. Pokus byl proto opakován s přidavkem MEM vitamínů. Zde byl růst na 1-oktanolu průkazný u kultury Drobná 2 a byl také zaznamenán v médiu zaočkovaném oběma kulturami. Naproti tomu růst na 2-pyrrolidonu nebyl patrný u žádné z obou kultur ani v přítomnosti vitamínů.

Při zkoumání využití 1O2P jako zdroje dusíku bylo použito MM bez chloridu amonného. Růst lépe probíhal u společné suspenze obou kultur, než u samotné kultury Drobná 2. Kultury jsou tedy společně schopné využívat 1O2P jako zdroj dusíku, stejně jako čistá kultura Drobná 2.

Kolonie kultur Drobná 1 a Drobná 2 jsou si velice podobné. V případě kultury Drobná 1 se jedná o gram-negativní tyčinku se zaoblenými konci, negativní na cytochromoxidázu a katalázu. Roste ve větším rozsahu koncentrace chloridu sodného (0-5%) a v rozsahu teplot (5-37°C). Po sekvenaci 16S rDNA této kultury bylo vyhodnoceno, že se jedná o bakterii rodu *Achromobacter* nebo *Bordetella*. V případě kultury Drobná 1 se pravděpodobně jedná o *Achromobacter*, což je rod bakterií, nacházející se v půdě nebo ve slané a sladké vodě. V případě *Bordetella* jde o lidské patogeny, vyžadující obohacené živné půdy.

Buňky kultury Drobná 2 jsou kratší rovné gram-negativní tyčinky se zaoblenými konci. Cytochromoxidáza byla negativní a kataláza velmi slabě pozitivní. Tato kultura je velice citlivá na osmotický tlak, neboť roste jen na živných agarech s nízkými koncentracemi chloridu sodného (do 2%) a také v nižším rozmezí teplot (5-30°C) oproti kultuře Drobná 1. Po vyhodnocení sekvence 16S rDNA této kultury bylo zjištěno, že se jedná o bakterii rodu *Phenylobacterium*, která dokáže degradovat některé cizorodé látky v půdě.

Diplomová práce tak ukázala, že při rozkladu 1O2P, prokázaném v bakalářské práci v říční vodě, hrají klíčovou roli dvě gram-negativní bakterie, které při vlastní degradaci určitým způsobem kooperují.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] LOGIN, R., 1995. Pyrrolidone-Based Surfactants. Research and Development, International Specialty Products, Wayne, New Jersey 07470
- [2] KAYTAN, H., BONNET, M., 2008. N-alkyl pyrrolidones as innovative PVC plasticizers
- [3] HEFEI TNJ CHEMICAL INDUSTRY Co.,Ltd, 2011. Material Safety Data Sheet. N-Octyl-2-Pyrrolidone
- [4] BASF THE CHEMICAL COMPANY, 2009. Technical Data Sheet. [N-Octyl-2-pyrrolidone dist. (NOP)] In: BASF THE CHEMICAL COMPANY. *BASF Corporation* [online]. 2009 [cit. 2014-12-31]. Technical Data Sheet. Dostupné z: [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)
- [5] SIGMA-ALDRICH, 2016. Bezpečnostní list. 1-Octyl-2-Pyrrolidone
- [6] KABRA, B., 2008. *2-pyrrolidone derivates for preservativ of ophthalmic, otic and nasal compositions*. United States. Patent Application Publication
- [7] ANSELL, J. M. a J. A. FOWLER, 1988. The acute oral toxicity and primary ocular and dermal irritation of selected N-alkyl-2-pyrrolidones. *Fd Chem. Toxic*, **5** (26), a2475-479.
- [8] INTERNATIONAL SPECIALTY PRODUCTS. 2005. USA. Performance & Industrial Chemicals. Reference Guide
- [9] KŘÍŽEK, K., Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, (2012)
- [10] VYORALOVÁ, M., 2012. *Předpoklady mikrobiálního rozkladu polyvinylpyrrolidonu*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí.
- [11] GU, B., 1991. Contact lens disinfecting system
- [12] HOLLIS, C., RAYUDU, S., WHITTERMORE, M., 1993. N-dodecyl heterocyclic compounds useful as industrial microbicides and preservatives. United States Patent
- [13] BASF THE CHEMICAL COMPANY, 2013. Safety Data Sheet. [N-Octyl-2-pyrrolidone dist.] In: *BASF CORPORATION* [online]. 11. 02. 2013, verze 1.0 [cit.

2014-12-31]. Dostupné z:

[http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset\\_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase\\_EU:09007af8800937b1.pdf](http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af8800937b1.pdf)

- [14] NOVOTNÁ, Z. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. (2015)
- [15] SALAČ, J. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati. (2015)
- [16] SEDLÁČEK, I., 2007. Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita Brno
- [17] COOPER, L.H., CHESTER, B. (1979) - *Achromobacter* species (CDC group Vd): morphological and biochemical characterization, *Journal of clinical microbiology*, Vol.9
- [18] LIAO, XB., LI, BX., ZOU, RS., 2016. Biodegradation of antibiotic ciprofloxacin: pathways, influential factors, and bacterial community structure, *ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH*, Vol. 23
- [19] RODGERS-VIERA, EA., ZHANG, ZF., 2015. Identification of Anthraquinone-Degrading Bacteria in Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 81
- [20] CORTES-LORENZO, C., SANCHEZ-PEINADO, MD., 2013. Two novel strains within the family Caulobacteraceae capable of degradation of linear alkylbenzene sulfonates as pure cultures, *INTERNATIONAL BIODETERIORATION & BIODEGRADATION*, Vol. 85

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

1O2P	1-oktyl-2-pyrrolidon též N-oktylpyrrolidon
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
MM	Minerální médium
R2A	Reasoner's 2A agar
TYA	Tryptone Yeast extract Agar
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MBC	Minimální bakteriocidní koncentrace
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
PVP	Polyvinylpyrrolidon

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. Struktura 1-oktyl-2-pyrrolidonu.....	13
Obr. 2 Delokalizace elektronů v alkylypyrrolidonu.....	14
Obr. 3 Graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase.....	19
Obr. 4 Souhrnná tabulka MIC a MBC vůči testovacím bakteriálním kulturám.....	20
Obr. 5 Graf závislosti rozpuštěného organického uhlíku na čase.....	42
Obr. 6 Graf závislosti optické hustoty bakteriálních suspenzí NOP1 - 4 na čase.....	44
Obr. 7 Graf závislosti optické hustoty bakteriálních suspenzí Drobná 1 a Drobná 2 na čase.....	46
Obr. 8 Graf závislosti optické hustoty na čase pro kulturu Drobná 2 při různých koncentracích 1O2P.....	47
Obr. 9 Graf závislosti optické hustoty na čase pro obě kultury při různých koncentracích 1O2P.....	49
Obr. 10 Graf závislosti optické hustoty na čase pro obě kultury.....	50
Obr. 11 Graf závislosti optické hustoty na čase.....	52
Obr. 12 Graf závislosti optické hustoty na čase pro suspenzi s vitamíny.....	53
Obr. 13 Bakteriální kultura Drobná 1.....	54
Obr. 14 Bakteriální kultura Drobná 2.....	54
Obr. 15 Snímek PCR produktu z UV transiluminátoru s použitím primerů FD1 a RD1.....	56
Obr. 16 Výsledný sekvenogram DNA bakteriální kultury Drobná 1.....	57
Obr. 17 Výsledný sekvenogram DNA bakteriální kultury Drobná 2.....	57



**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Typy použitých agarů.....	26
Tab. 2 Dávkování minerálního média a minerálního média se suspenzí kultury Drobná 2.....	29
Tab. 3 Dávkované objemy sterilní destilované vody v $\mu\text{l}$ .....	30
Tab. 4 Dávkované objemy sterilního roztoku N-oktylpyrrolidonu v $\mu\text{l}$ .....	30
Tab. 5 Dávkování MM2 a MM2 se suspenzí kultur Drobná 1 a Drobná 2.....	31
Tab. 6 Hodnoty koncentrace rozpuštěného organického uhlíku.....	41
Tab. 7 Měření optické hustoty při 600 nm pro kultury NOP.....	43
Tab. 8 Měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu Drobná 1.....	45
Tab. 9 Měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu Drobná 2 a obě kultury Dohromady.....	45
Tab. 10 Hodnoty rozpuštěného organického uhlíku.....	46
Tab. 11 Měření optické hustoty při 600 nm pro kulturu Drobná 2 při různých koncentracích NOP.....	47
Tab. 12 Měření optické hustoty při 600 nm pro obě kultury při různých koncentracích NOP.....	48
Tab. 13 Měření optické hustoty při 600 nm pro obě kultury.....	50
Tab. 14 Měření optické hustoty při 600 nm.....	51
Tab. 15 Měření optické hustoty suspenze s vitamíny při 600 nm.....	53
Tab. 16 Výsledky testů bakteriálních kolonií Drobná 1 a Drobná 2.....	55
Tab. 17 Růst bakteriálních kolonií při různých koncentracích NaCl.....	55
Tab. 18 Růst bakteriálních kolonií při různých teplotách.....	55

## **SEZNAM PŘÍLOH**

### **PŘÍLOHA I: VÝSLEDNÉ SEKVENCE**

## **PŘÍLOHA I: VÝSLEDNÉ SEKVENCE**

### **Sekvence kultury Drobná 1 s použitím primerů 341 F a 907 R**

TCAKGAGTMTCCAGGCGGTCACTTCACGCGTTAGCTGCGCTACCAAGGCCCGAAGGCCCAACAGCTAGT  
TGACATCGTTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGC  
GTCAGTGTATCCAGGAGGCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTAC  
ACGCGGAATTCCACCTCCCTCTGACACACTCTAGCCCAGTGTAAAAATGCAGTTCCCTAGGTTAAGCCC  
TGGGATTTACATCTTTCTTTCCGAACCGCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAAGCTTG  
CACCCTACGTATTACCGCGGGGATGGCACGGACGTAGCTGGTAAAAATCTCTGGGAGACAGCACGGATT  
ACATACCGTGGTATGTCCAGCGCCCTAACTATGTCCACTAACTGTGGGGCCCTCCGGCCCTTGGTAGCC  
GCACTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAGAAWTTGAMGG

### **Sekvence kultury Drobná 2 s použitím primerů 341 F a 907 R**

CCGKACGTMTCAGGCGGAGTGCTTATGCGTTAGCTGCGTCACCGACATGCATGCATGCCGACAACACTAGC  
ACTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGC  
GTCAGTAACGGGCCAGTGAGTCRCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTAC  
ACTCGGAGTTCCACTCACCTCTCCCGTACTCTAGACAGCCAGTATCAAAGGCAATTTCAAGGTTGAGCCC  
TGGGCTTTCACCTCTGACTAACTGTCCGCTACGCGCCCTTTACGCCAGAAATTCAGAGCAAGGCTAG  
CCCCCGTCGTATAACCGCGGCTGCTGGCGGAGAGTAAGCGATGAGATCCCCTGGTAGTCCACGCCTTAAC  
GTATGAGTGCTAGTTGTCGGCATGCATGCAGATCGTTAACGCACCTAAGGCATAAGTCCCTCCGCCTGGG  
AATTACGGCGCAAAAATAAAAAAYTSAAGAAWTTTRASGA

### **Sekvence kultury Drobná 1 s použitím primerů FD1 a RD1**

TRTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCCTACCGTGGTAATCGCCCCCTTGCGGTTAGGCTAACTACTT  
CTGGTAAAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGACAT  
GCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATC  
GGGTTTTCTGGGATTGGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAGCCCTCTGTCCCSACCATTGTATGAGCATGTGAA  
GCCCTACCCCTAAGGGCCAGGAGGACTTGAGATCTTCGCCACCTTGCTCCAGTTTGTATCCGGCAGTCTC  
ACTTGAGTGAGCAATGTCTTCGGG

### **Sekvence kultury Drobná 1 s použitím primerů FD1 a RD1**

TGCTTACGACTTCACCCCAGTCGCTGACCCTACCGTGGTCGACTGCCTCCTTGCGGTTAGCGCATCGCCT  
TCGGGTAAAACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCA  
TGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGAACCTGAGAC  
GACTTTTTGGGATTGGCTCACCATCGCTGGCTTGCAACCCTCTGTAGTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAG  
CCCACCTGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCACACCTTCCTCCGGCTTACCACCGGCGGTCCCA  
TTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAATGGCGTGAGTTGAGCTCCTTGCGAGACTTATGCCAACAT  
CT