

Dizertační práce

**Biodegradabilita sloučenin využívaných k ochraně
a úpravě materiálů**

**Biodegradability of compounds applied for materials protection
and modification**

Autor: **Ing. Markéta Měrková**

Studijní program: Chemie a technologie materiálů (P2808)

Studijní obor: Chemie a technologie materiálů (2808V009)

Školitel: doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Zlín, 2018

© Markéta Měrková

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.

Publikace byla vydána v roce 2018

Klíčová slova: *poly(vinylalkohol), poly(vinylpyrrolidon), 2-ethylhexylsalicylát, 2-ethylhexanol, kokamidopropylbetain, biodegradace, bakterie*

Key words: *poly(vinylalcohol), poly(vinylpyrrolidone), 2-ethylhexylsalicylate, 2-ethylhexanol, cocamidopropylbetaine, biodegradation, bacteria*

Práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

Motto:

„Vědec je jedinec, který je o něčem skoro přesvědčen.“

[Renard Jules]

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, ochotu a čas, který mi věnoval během celého doktorského studia. Ráda bych poděkovala také laborantkám Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za pomoc v mikrobiologických laboratořích. Zvláštní poděkování patří také mým drahým kolegům z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně za vytvoření pozitivního pracovního prostředí, plné podpory a motivace. Nakonec bych ráda vyjádřila svůj velký dík mé rodině a všem blízkým za trpělivost a důvěru, kterou do mne po celou dobu studia vkládali.

Tato práce vznikla za podpory interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (IGA/FT/2015/012, IGA/FT/2016/012, IGA/FT/2017/003, IGA/FT/2018/009).

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na studium mikrobiálního rozkladu vybraných syntetických vysokomolekulárních i nízkomolekulárních látek, používaných pro úpravu materiálů a přípravků. Zabývala se biodegradací ve vodě rozpustných polymerů, a to poly(vinylalkoholu) a poly(vinylpyrrolidonu), a dále studiem rozkladu některých nízkomolekulárních sloučenin, používaných často v kosmetickém průmyslu, a to 2-ethylhexylsalicylátu, 2-ethylhexanolu a kokamidopropylbetainu.

V teoretické části práce je stručně popsána obecná charakteristika, výroba i využití těchto látek a jsou uvedeny důležité poznatky o jejich toxikologických vlastnostech. Dále jsou pak shrnuty dosavadní znalosti o jejich mikrobiálním rozkladu.

V rámci experimentální části práce byla bakteriální degradace uvedených sloučenin hodnocena v průběhu pokusů především na základě úbytku jejich koncentrace ve vodném prostředí a na základě růstu mikroorganismů. Byly studovány některé faktory, ovlivňující průběh mikrobiální degradace, jako jsou velikost inokula, hodnota pH či přítomnost jiných mikroorganismů. V rámci experimentů zabývajících se studiem biodegradace vysokomolekulárních látek byla potvrzena rozložitelnost poly(vinylalkoholu); oba testované kmeny *Sphingomonas* sp. JK2 a OT2 byly schopny rozkladu polymeru i při použití minimálních inokul, odpovídajících přítomnosti 10^0 buněk/ml. Naproti tomu mikrobiální degradaci poly(vinylpyrrolidonu) se prokázat nepodařilo.

V relevantních případech byly nově izolovány bakteriální kultury schopné rozkladu studovaných látek a byly zkoumány jejich růstové a degradační vlastnosti. Byla tak získána a identifikována kultura *Rhodococcus* sp. ES 12, schopná utilizace 2-ethylhexylsalicylátu, dále kultura *Pseudomonas* sp. P, schopná utilizace 2-ethylhexanolu a byla také objasněna podstata symbiotického vztahu mezi kulturami *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM, schopnými společné biodegradace kokamidopropylbetainu. Tyto 4 kultury byly rovněž deponovány v České sbírce mikroorganismů v Brně.

Klíčová slova: *poly(vinylalkohol)*, *poly(vinylpyrrolidon)*, *2-ethylhexylsalicylát*, *2-ethylhexanol*, *kokamidopropylbetain*, *biodegradace*, *bakterie*

ABSTRACT

The work was focused on a study of microbial degradation of selected synthetic both high and low molecular weight substances used for materials and products modification. It mainly dealt with the study of biodegradation of water-soluble polymers, poly(vinylalcohol) and poly(vinylpyrrolidone), and the study of the decomposition of some low molecular weight compounds, commonly used in the cosmetic industry, namely 2-ethylhexylsalicylate, 2-ethylhexanol, and cocamidopropylbetaine.

In theoretical part of the thesis the general characteristics, production way and the most significant uses of the substances are briefly described, including base knowledge on their toxicological properties. Furthermore, today's knowledge about biodegradability of these compounds is summarized.

The biodegradation of these substances was evaluated mainly on the basis of reduction of their concentration during the experiments and on the basis of microbial growth. In addition, some factors affecting the course of biodegradation, such as the inoculum size, pH or the presence of other microorganisms, were studied as well. In the experiments on the study of biodegradation of high molecular compounds, the biodegradability of poly(vinylalcohol) was confirmed; both used strains, *Sphingomonas* sp. JK2 and OT2, were able to decompose the polymer even when their minimal inoculums of 10^0 cells/ml were applied. In contrast, microbial degradation of poly(vinylpyrrolidone) has not been confirmed.

In some cases bacterial strains capable of decomposition were newly isolated and their growth and degradation properties were examined; *Rhodococcus* sp. ES 12 capable of 2-ethylhexylsalicylate utilization and *Pseudomonas* sp. P capable of 2-ethylhexanol utilization were obtained from activated sludge and finally deposited in Czech Collection of Microorganisms. Furthermore, the nature of the symbiotic relationship between *Pseudomonas* sp. FV and *Rhizobium* sp. FM, capable of cocamidopropylbetaine biodegradation in mixed culture, was revealed.

Keywords: *poly(vinylalcohol)*, *poly(vinylpyrrolidone)*, *2-ethylhexylsalicylate*, *2-ethylhexanol*, *cocamidopropylbetaine*, *biodegradation*, *bacteria*

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
OBSAH.....	6
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
1.1 Biodegradabilita vybraných syntetických vysokomolekulárních látek	8
1.1.1 Poly(vinylalkohol).....	8
1.1.2 Poly(vinylpyrrolidon).....	14
1.2 Biodegradace vybraných syntetických nízkomolekulárních sloučenin..	17
1.2.1 2-ethylhexylsalicylát.....	17
1.2.2 2-ethylhexanol	19
1.2.3 Kokamidopropylbetain	23
1.3 Souhrn chybějících poznatků k biodegradabilitě zkoumaných látek	25
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	27
3. MATERIÁL A METODIKA	28
3.1 Materiál	28
3.1.1 Biologický materiál	28
3.1.2 Chemikálie a roztoky.....	29
3.1.3 Minerální média.....	30
3.1.4 Živné půdy	31
3.1.1 Laboratorní přístroje a pomůcky	32
3.2 Metodika	33
3.2.1 Sledování biodegradace.....	33
3.2.2 Získání čistých degradačních kultur.....	36
3.2.3 Studium vlastností získaných degradačních kultur	36
3.2.4 Molekulárně biologické metody.....	39
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	40
4.1 Biodegradabilita poly(vinylalkoholu).....	40
4.1.1 Sledování biodegradace poly(vinylalkoholu) kulturami <i>Sphingomonas</i> sp. JK2 a OT2 v závislosti na míře inokulace	40
4.1.2 Vliv úpravy pH v průběhu degradace poly(vinylalkoholu)	44
4.1.3 Posouzení potenciální toxicity metabolitů vznikajících v průběhu rozkladu poly(vinylalkoholu) kulturou <i>Sphingomonas</i> sp. OT2.....	46
4.1.4 Sledování biodegradace poly(vinylalkoholu) kulturou <i>Sphingomonas</i> sp. OT2 v přítomnosti aktivovaného kalu.....	51

4.1.5	Sledování biodegradace poly(vinylalkoholu) kulturou <i>Sphingomonas</i> sp. OT2 v přítomnosti říční vody	52
4.2	Biodegradabilita poly(vinylpyrrolidonu)	54
4.2.1	Sledování biodegradace poly(vinylpyrrolidonu) směsným konsorciem bakterií.....	54
4.3	Studium bakteriálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylátu.....	55
4.3.1	Izolace a identifikace kultury schopné rozkladu 2-ethylhexylsalicylátu	56
4.3.2	Obecné růstové vlastnosti kultury ES 12.....	56
4.3.3	Růstové vlastnosti kultury <i>Rhodococcus</i> sp. ES 12 spojené s rozkladem 2-ethylhexylsalicylátu.....	56
4.4	Studium bakteriálního rozkladu 2-ethylhexanolu	62
4.4.1	Izolace a identifikace kultury schopné rozkladu 2-ethylhexanolu	62
4.4.2	Obecné růstové vlastnosti kultury <i>Pseudomonas</i> sp. P	62
4.4.3	Optimalizace a ověření metody stanovení 2-ethylhexanolu ve vodném prostředí.....	63
4.4.4	Růstové vlastnosti kultury <i>Pseudomonas</i> sp. P spojené s utilizací 2-ethylhexanolu.....	64
4.5	Biodegradabilita kokamidopropylbetainu	67
4.5.1	Izolace a identifikace kultur schopných rozkladu kokamidopropylbetainu	67
4.5.2	Obecné růstové vlastnosti kmenů <i>Pseudomonas</i> sp. FV a <i>Rhizobium</i> sp. FM	67
4.5.3	Růstové vlastnosti kultur <i>Pseudomonas</i> sp. FV a <i>Rhizobium</i> sp. FM spojené s rozkladem kokamidopropylbetainu.....	68
5.	ZÁVĚR	73
6.	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI.....	75
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	95
9.	SEZNAM TABULEK.....	97
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ	98
11.	CURRICULUM VITAE.....	100
12.	SEZNAM PUBLIKACÍ	101

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V dnešní době se řada syntetických látek, ať už vysokomolekulárního či nízkomolekulárního charakteru, používá v bezpočtu aplikací pro úpravu a zlepšení vlastností nejrůznějších materiálů a přípravků. Při výrobě, používání, dopravě či jakékoli jiné manipulaci s těmito materiály a přípravky pak může docházet k úniku látek v nich obsažených do životního prostředí. Z těchto důvodů je důležité zabývat se osudem takových látek v prostředí, zejména možnostmi jejich mikrobiálního odstranění, neboť biodegradace je obvykle nejrozšířenější a environmentálně nejvhodnější formou zneškodnění organických látek. Významnými součástmi takových studií jsou i výzkumy faktorů, které biodegradaci ve vnějším prostředí zásadně ovlivňují.

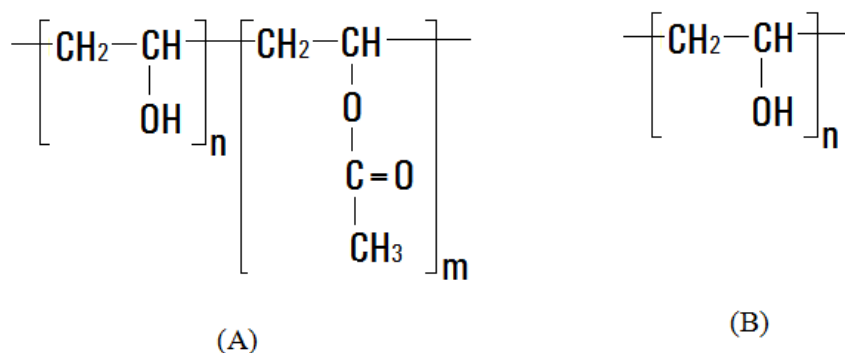
1.1 Biodegradabilita vybraných syntetických vysokomolekulárních látek

1.1.1 Poly(vinylalkohol)

Obecná charakteristika

Poly(vinylalkohol) (PVA) je ve vodě rozpustný syntetický polymer, v pevném stavu bílý až krémový prášek krystalického charakteru (Ducháček, 2006). Jeho chemická struktura je znázorněna na *Obr. 1.1*. PVA je tvořen 1,3-diolovými jednotkami spojenými hlava-pata, ale obsahuje i malé množství 1,2-diolových jednotek spojených hlava-hlava. Díky způsobu výroby obsahuje PVA také určité množství zbytkových acetátových skupin, obvykle do 15 %, což vede k ovlivnění jeho vlastností (Kawai a Hu, 2009). Poly(vinylalkohol) je rozpustný ve vícesytných alkoholech, zatímco v jednosytných alkoholech botná, není rozpustný v olejích a odolává organickým kyselinám a nepolárním organickým rozpouštědlům. Lze jej používat při teplotách od -50 °C do 130 °C, při teplotách vyšších než 200 °C se rozkládá (Ducháček, 2006).

PVA může být vyráběn v různých molekulových hmotnostech, a to v řádu několika tisíců až milionů Da. Horní hranice molekulové hmotnosti značně závisí na ukončení řetězce acetaldehydem při polymeraci vinylacetátu a dále na možné přítomnosti nečistot v průběhu polymerace (Pritchard, 1970). S rostoucí molekulovou hmotností se rozpustnost poly(vinylkoholu) snižuje (Ducháček, 2006).



Obr. 1.1: Chemická struktura PVA: (A) – částečně hydrolyzovaný, (B) plně hydrolyzovaný (Demerlis a Schoneker, 2003)

Výroba a použití PVA

Poly(vinylalkohol) není vyráběn polymerací monomeru, jelikož jeho monomer (vinylalkohol) není ve volném stavu schopen existence. Výsledkem všech reakcí, které by jej poskytovat mohly, je acetaldehyd. PVA je tedy vyráběn hydrolýzou poly(vinylacetátu) (Ducháček, 2006). Ten je vyráběn pomocí radikálové řetězové polymerace v organickém rozpouštědle, obvykle v methanolu. Methanol spolu s iniciátorem umožňuje úpravu molární hmotnosti a také pomáhá odstraňovat teplo vznikající v průběhu polymerace. Poly(vinylalkohol) je pak za přítomnosti katalyzátoru, např. hydroxidu sodného, vyráběn alkoholýzou polyvinylacetátu (Clariant, 1999). Změnou koncentrace katalyzátoru či úpravou dalších parametrů reakce je možné upravit obsah zbytkových acetátových skupin ve výsledném produktu. Jejich rozmístění je potom závislé na pH prostředí, v němž hydrolýza proběhla. Podle obsahu zbytkových acetátových skupin jsou rozlišovány typy PVA s různým stupněm hydrolýzy.

Poly(vinylalkohol) je díky svým vlastnostem využíván v řadě průmyslových odvětví; Kawai a Hu (2001) uvádí, že v roce 2007 bylo vyprodukováno přibližně 1 250 000 tun tohoto polymeru a jeho produkce každoročně vzrůstá. Je hojně využíván při výrobě papíru a v textilním průmyslu (Demerlis a Schoneker, 2003), kde se používá jako klíždlo a pro povrchové úpravy. V chemickém průmyslu nachází uplatnění jako ochranný koloid při suspenzních polymeracích, dále jako zahušťovadlo při výrobě nátěrových hmot či v kombinaci se škrobem pro výrobu lepidel. V kosmetickém průmyslu se PVA používá jako pojivo, filmotvorná látka či činidlo zvyšující viskozitu vodných roztoků (Nair, 1998). Dále je z něj možno vyrábět celou řadu výrobků, jako jsou fólie, obaly, textilní vlákna nebo chirurgické nitě. Mezi výhody těchto výrobků pak patří především to, že je možno je vyrobit jak ve vodě rozpustné, tak nerozpustné formě (Kováčič, 1974; Ducháček, 2006).

Toxicita PVA

Z informací dostupných v literatuře (Sanders a Matthews, 1990; Demerlis a Schoneker, 2003) vyplývá, že toxicita PVA je poměrně nízká. Akutní orální toxicita PVA pro krysy je velmi nízká, hodnota letální dávky LD₅₀ se pohybuje v rozmezí 15 – 20 g/kg, nadto orálně podávaný PVA se v gastrointestinálním traktu velmi špatně absorbuje a k jeho akumulaci v tkáních taktéž nedochází.

Subakutní orální toxicita PVA je taktéž nízká; byla sledována v rámci 90 denní výživové studie u samců a samic krys, v dávkách 2000, 3500 a 5000 mg/kg/den, kdy nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky. Dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek (NOAEL) byla stanovena na 5000 mg/kg/den (Kelly *et al.*, 2003).

Dále, Demerlis a Schoneker (2003) uvádí, že o chronické toxicitě ani karcinogenitě orálně podávaného PVA neexistují doklady. Poly(vinylalkohol) nedráždí normální neporušenou kůži, nepůsobí tedy jako kožní iritant a nedochází k senzibilizaci (Finch, 1992). Na základě dostupných dat (Nair, 1998) byly kriticky zhodnoceny dostupné informace o PVA, pro jeho použití v kosmetických přípravcích, kde byl shledán jako bezpečný. Dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny IARC (1987) je polyvinylalkohol zařazen do kategorie 3, což znamená, že jej z hlediska karcinogenních účinků na člověka nelze zhodnotit.

Ačkoliv zmíněné údaje naznačují, že toxicita PVA je velmi nízká, jeho přítomnost v odpadních vodách, kde se vyskytuje ve velkém množství především z textilního průmyslu a výroby papíru, není zanedbatelná. PVA je sice považován za netoxický pro vodní organismy, ale vykazuje silné povrchově aktivní vlastnosti, což může mít za následek jeho pění ve vodách. Tímto způsobem pak může docházet k omezení přestupu kyslíku do vody, znamenajícím určitou hrozbu pro vodní organismy (Kawai a Hu, 2009).

Biodegradace PVA

Díky širokému využití v textilním a chemickém průmyslu může poly(vinylalkohol) vstupovat do životního prostředí, především pak do vodních ekosystémů. V důsledku jeho stále se zvyšující produkce je mikrobiální rozklad PVA dlouhodobě předmětem výzkumu a bylo již izolováno značné množství kultur schopných jeho degradace.

První zmínka o biologickém rozkladu PVA sahá do roku 1936, kdy byla uveřejněna publikace o degradaci polymeru prostřednictvím houby *Fusarium lini* B (Nord, 1936). Od té doby byla popsána řada dalších mikroorganismů schopných biodegradace, zahrnující jak gramnegativní, tak grampozitivní bakterie, a také některé druhy mikroskopických vláknitých hub.

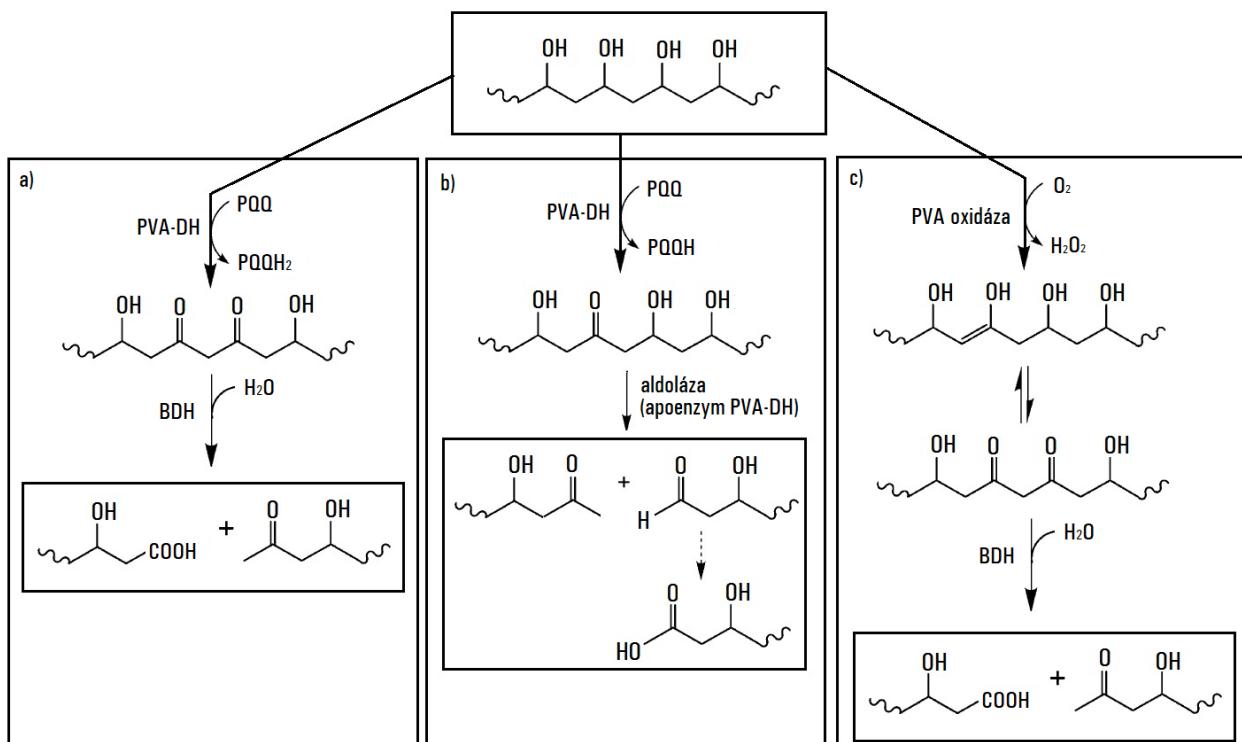
Bakterie schopné rozkladu PVA jsou zástupci rodů *Achromobacter* (Lee a Kim, 2003), *Alcaligenes* (Matsumara *et al.*, 1994), *Bacillus* (Mori *et al.*, 1996), *Brevibacillus* (Lim a Park, 2001; Kim a Yoon, 2010), *Geobacillus* (Kim a Yoon,

2010), *Janthinobacterium* (Du *et al.*, 2007), *Microbacterium* a *Paenibacillus* (Choi *et al.*, 2004), *Novosphingobium* (Rong *et al.*, 2009), *Povalibacter* (Nogi *et al.*, 2014), *Pseudomonas* (Suzuki *et al.*, 1973; Watanabe *et al.*, 1975; Sakazawa *et al.*, 1981; Hashimoto a Fujita, 1985, Fukae *et al.*, 1994; Huixing *et al.*, 2010; Bharathiraja *et al.*, 2013), *Sphingomonas* (Tokiwa *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Vaclavkova *et al.*, 2007), *Sphingopyxis* (Yamatsu *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008), *Stenotrophomonas* (Wei *et al.*, 2018) a *Streptomyces* (Zhang *et al.*, 2006). Mezi mikroskopické houby schopné rozkladu PVA patří zástupci rodů *Fusarium* (Nord, 1936) a *Penicillium* (Qian *et al.*, 2004). Většina z těchto mikroorganismů je pak schopna poly(vinylalkohol) využívat jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Díky izolaci tak značného množství kultur degradérů PVA je poměrně dobře znám i mechanismus jeho aerobního mikrobiálního rozkladu. Ten probíhá ve dvou krocích, kdy v prvním z nich dochází k oxidaci jedné nebo dvou sousedních hydroxylových skupin. Oxidace jedné hydroxylové skupiny má za následek vytvoření monoketonové struktury, kdežto oxidace dvou sousedních skupin vede k tvorbě β -diketonové struktury, jak je znázorněno na *Obr. 1.2*. V této fázi rozkladu se uplatňují dva typy enzymů, a to PVA-oxidáza nebo PVA-dehydrogenáza (Kawai a Hu, 2009). PVA-oxidáza, která přenáší elektrony ze substrátu na kyslík za vzniku peroxidu vodíku, byla poprvé popsána u kultur *Pseudomonas* sp. O-3 a *P. vesicularis* PD (Suzuki *et al.*, 1976; Watanabe *et al.*, 1976) a patří do skupiny oxidáz sekundárních alkoholů. Druhým typem enzymu je PVA-dehydrogenáza (PVA-DH), jejímž působením nedochází ke vzniku peroxidu jako v případě PVA-oxidázy, ale získané elektrony jsou dále předávány a využity energeticky v respiračním řetězci. Všechny doposud popsané PVA-dehydrogenázy (Kawai a Hu, 2009) jsou závislé na přítomnosti pyrrolochinolin chinonu (PQQ). Ten je nekovalentně vázanou prostetickou skupinou řady chinoproteinů a je tvořen kyselinou glutamovou a tyrosinem. Schopností jeho tvorby disponují některé kmeny gramnegativních bakterií, např. *Acinetobacter* (Duine *et al.*, 1979), *Pseudomonas* (Sakazawa *et al.*, 1981) či *Cardiobacterium* (Lee a Kim, 2003). Četné dehydrogenační reakce, které probíhají za účasti PQQ, např. oxidace alkoholů, jsou uskutečňovány v periplasmatickém prostoru (Goodwin *et al.*, 1998).

Podle produktů vzniklých v prvním kroku rozkladu PVA probíhají reakce v kroku druhém. V této fázi podléhá oxidovaný PVA buď aldolázové reakci (u monoketonové struktury), nebo hydrolýze (u β -diketonové struktury), což je znázorněno na *Obr. 1.2*. Hydrolýza je katalyzována β -diketonhydrolázou (BDH), a jelikož je délka uhlíkového řetězce na každé straně diketonu různá, dochází při ní na kratší straně k produkci methylketonu a na delší k tvorbě karboxylové kyseliny. V případě rozkladu částečně hydrolyzovaného PVA (Sakai *et al.*, 1998) dochází u *Pseudomonas vesicularis* PD navíc k deacetylaci zbytkových acetátových skupin zprostředkované cytoplasmatickou esterázou

vedoucí k uvolnění kyseliny octové. Vzniklé karboxylové kyseliny jsou poté v buňkách obvykle dále metabolizovány pomocí β -oxidace mastných kyselin a v cyklu trikarboxylových kyselin. Další enzym, který katalyzuje druhou fázi rozkladu, izoloval Klomklang *et al.* (2005) a jedná se o hydrolázu oxidovaného poly(vinylalkoholu) (OPH); působení tohoto enzymu je velmi podobné účinkům BDH.



Obr. 1.2: Mechanismus mikrobiálního rozkladu PVA pomocí a) PVA-DH a BDH (Shimao *et al.*, 1986), b) PVA-DH a aldolázové reakce (Matsumara *et al.*, 1999), c) PVA oxidázy a BDH (Suzuki *et al.*, 1979)

Některé z výše zmíněných mikroorganismů jsou však schopny utilizace PVA pouze v přítomnosti určitých látek, které jsou jim dodávány jinými mikroorganismy. Lze tedy mluvit o symbiotické degradaci; poprvé byla popsána v 80-tých letech 20. století, kdy byly ze smíšené kultury bakterií izolovány dva kmene schopné společně využít PVA. Sakazawa *et al.* (1981) zjistili, že účinek PVA-degradujícího enzymu kmene *Pseudomonas* sp. VM15C je podmíněn přítomností kmene *Pseudomonas putida* VM15A. Posléze Shimao *et al.* (1986) prokázali, že kmen *Pseudomonas* sp. VM15C rozkládá polymer za účasti PVA-dehydrogenázy, jejíž činnost je závislá na přítomnosti PQQ.

Obdobně Kim *et al.* (2003) izolovali kulturu *Sphingomonas* sp. SA3 schopnou 85%-tního rozkladu PVA v koncentraci 5 g/l během 5 dní, za přítomnosti kmene SA2, dodávajícího PQQ. Byl popsán také případ symbiotické degradace PVA, kdy byl potřebným růstovým faktorem pro zahájení degradace jiný faktor než PQQ. Rong *et al.* (2009) izolovali *Novosphingobium* sp. P7, se schopností téměř kompletního rozkladu 8 g/l PVA

během 7 dní, kde potřebným růstovým faktorem byl methionin, dodávaný symbiotickým kmenem *Xanthobacter flavus* B2.

Mezi nejvýznamnější degradéry PVA patří především zástupci gramnegativních bakterií rodu *Sphingomonas*. Tento rod patří do podskupiny α -proteobakterií, v roce 2001 jej Takeuchi *et al.* (2001), rozdělil do čtyř nových rodů *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* a *Sphingopyxis*; v roce 2006 ještě Maruyama *et al.* (2006) přiřadili rod *Sphingosinicella*. Specifické degradační schopnosti sfingomonád vůči polymerům byly některými autory (Klomklang *et al.*, 2005, Mamoto *et al.*, 2006, Kawai *et al.*, 2013) podrobněji studovány u kultury *Sphingopyxis* sp. 113P3. Klomklang *et al.* (2005) při studiu lokalizace degradačních enzymů prokázali, že nejvyšší aktivita PVA-DH a OPH je vázána především na periplasmatickou frakci buněk. Následně Kawai *et al.* (2013) potvrdili, že poly(vinylalkohol) je při rozkladu transportován skrze buněčnou stěnu do periplasmatického prostoru, kde je přeměňován za účasti PVA-degradačních enzymů.

Důležitými činiteli ovlivňujícími rozklad PVA mohou být různé environmentální faktory. Obecně může k rozkladu docházet v aerobním či anaerobním prostředí, přičemž všechny výše uvedené studie se zabývaly aerobní degradací PVA. Existují ale také dvě studie potvrzující anaerobní rozklad tohoto polymeru; doposud se však nepodařilo izolovat žádnou čistou kulturu, zodpovědnou za anaerobní degradaci PVA nebo se na ní podílející (Kawai a Hu, 2009; Marušincová *et al.*, 2013).

Matsumara *et al.* (1993) zkoumali anaerobní rozklad PVA v anaerobních říčních sedimentech. Biodegradace polymeru o molekulových hmotnostech 2 000 a 14 000 byla sledována prostřednictvím úbytku rozpuštěného organického uhlíku (DOC), přičemž u PVA s vyšší molekulovou hmotností docházelo k rozkladu pomaleji. Po 125 dnech inkubace byl zjištěn úbytek PVA více než 60 %. Biologická degradace PVA byla zkoumána také za denitrifikačních podmínek, při použití mikrobiálního společenství pocházejícího z čistírny městských odpadních vod (Marušincová *et al.*, 2013). I v tomto případě byl rozklad PVA úspěšně prokázán. Na základě izolace DNA, její amplifikace polymerázovou řetězovou reakcí a separace amplikonů pomocí gelové elektroforézy v teplotním gradientu bylo zjištěno, že mikroorganismem hrajícím významnou roli v biodegradaci PVA za denitrifikačních podmínek je bakterie *Steroidobacter* sp. PD, kterou se však nepodařilo izolovat.

To, jak je osud PVA v životním prostředí závislý na charakteru prostředí, v němž se polymer vyskytuje, dokumentuje několik studií, které sledovaly rozklad této látky v kompostech a půdách (Chiellini *et al.*, 2003; Kopčilová *et al.*, 2013). Tam totiž k biodegradaci PVA téměř nedochází nebo je jen nepatrná. Zanedbatelný rozklad v těchto prostředích může být vysvětlen jako důsledek absence či vzácnosti PVA-degradujících mikroorganismů nebo také jako důsledek interakce PVA s půdními částicemi,

kdy může docházet k adsorpci molekul polymeru na tyto částice, což vede k jeho zneprístupnění pro mikroorganismy (Chiellini *et al.*, 2003).

Vlivu dalších environmentálních faktorů, jako například přítomnosti či koncentraci různých nutrientů, na mikrobiální degradaci poly(vinylalkoholu) se věnuje relativně malé množství prací. Vlivu přítomnosti různého zdroje dusíku na rozklad PVA symbiotickou dvojicí kultur SA2 a *Sphingomonas* sp. SA3 se věnovali Kim *et al.* (2003); jako nejvhodnější zdroj dusíku byly zjištěny amonné soli, optimální pH degradace pak bylo 8 a teplota 30 – 35 °C. Také Chen *et al.* (2007) sledovali vliv přítomnosti různého zdroje dusíku na rozklad PVA smíšenou kulturou mikroorganismů. Výsledkem práce bylo zjištění, že pro růst a biodegradaci PVA kulturou mikroorganismů s převažujícím zastoupením rodů *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* a *Paenibacillus* je vhodnější přítomnost anorganického zdroje dusíku než organického. Naopak Du *et al.* (2007), kteří zkoumali rozklad PVA kulturou *Janthinobacterium* sp., pozorovali pravý opak, tedy vyšší nárůst biomasy i enzymovou aktivitu v přítomnosti organického zdroje dusíku. V rámci této studie byl testován také vliv dalších nutričních a environmentálních faktorů; optimální podmínky pro biodegradaci 10 g/l PVA byly následující: 3 g/l glukózy, 6 g/l kvasničného extraktu, 2 g/l K₂HPO₄, 0,25 g/l KH₂PO₄, 0,03 g/l MgSO₄, 0,05 g/l CaCl₂·7H₂O, 0,02 g/l FeSO₄ a 0,02 g/l NaCl při pH 7,2 a teplotě 30 °C.

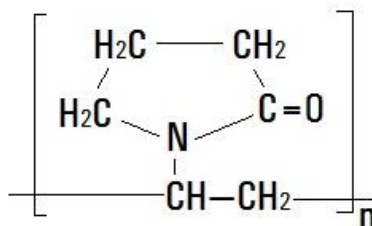
Některé další podmínky, ovlivňující rozklad PVA smíšenou kulturou tvořenou bakteriemi rodu *Bacillus* a *Curtobacterium*, byly sledovány ve studii Zhanga *et al.* (2009). Bylo zjištěno, že optimální pH pro degradaci PVA je 8, pravděpodobně v důsledku vyšší aktivity degradačních enzymů produkovaných konsorciem v tomto prostředí. Taktéž bylo zjištěno, že pozitivně lze ovlivnit průběh biodegradace přidáním malého množství vhodného organického substrátu, a že i poměr uhlíku k dusíku může významně ovlivnit výslednou míru procesu. Optimální podmínky pro biodegradaci 0,5 % PVA tak byly nalezeny při výchozím pH 8, s přidavkem 0,15 % glukózy, a přidavkem močoviny tak, aby poměr uhlík/dusík dosáhl hodnoty 1,5/1.

1.1.2 Poly(vinylpyrrolidon)

Obecná charakteristika PVP

Poly(vinylpyrrolidon) (PVP), označovaný také jako Kollidon, Povidon, Polyvidon či poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidon), je ve vodě rozpustný syntetický polymer. Chemická struktura PVP je znázorněna na Obr. 1.3. V pevném stavu je to bílý či nažloutlý prášek, s částicemi různé velikosti (Robinson, 1990; Bühler *et al.*, 2005). Jako pevná látka i ve formě vodných roztoků je za normálních podmínek stabilní. PVP je kromě vody rozpustný také v řadě organických rozpouštědel, nerozpustným se stává především v důsledku zesíťování (Bühler *et al.*, 2005).

PVP je možno vyrábět v různých molekulových hmotnostech, obvykle v rozsahu 2,5 – 1200 kDa. Různé průměrné molekulové hmotnosti polymeru jsou označovány hodnotou K, kterou lze vypočítat z hodnoty relativní viskozity PVP ve vodě, a je součástí obchodního označení výrobku (např. K-15, K-30).



Obr. 1.3: Chemická struktura PVP (Robinson, 1990)

Výroba a použití PVP

Výroba PVP spočívá v polymeraci *N*-vinyl-2-pyrrolidonu (Robinson, 1990), v důsledku čehož je možné ve výsledném produktu nalézt také velmi malé množství nezměněného monomeru, obvykle do 0,2 %. Nejčastěji využívaným postupem výroby je polymerace ve vodě, v menší míře je uplatňována polymerace v izopropylalkoholu, přičemž oběma postupy je PVP produkován ve formě roztoku.

Poly(vinylpyrrolidon) nachází uplatnění především ve farmaceutickém průmyslu, kde se používá jako pojivo do tablet a přípravků s řízeným uvolňováním. Široké využití nachází také díky své schopnosti tvořit komplexy s řadou látek (Bühler *et al.*, 2005). V komplexu s jódem je poly(vinylpyrrolidon) využíván v antimikrobiálních mýdlech či desinfekčních přípravcích. Další využití (Robinson, 1990) nachází v potravinářském průmyslu jako pojivo pro vitaminové tablety či stabilizátor vitaminů a minerálních koncentrátů. Dále je využíván jako zahušťovadlo v kosmetickém průmyslu, jako stabilizátor při polymeraci ve výrobě plastů, ve fotografickém průmyslu, přidává se také do barviv, inkoustů, nátěrů aj.

Toxicita PVP

Z dostupných informací vyplývá, že PVP je látka s velmi nepatrnou toxicitou (Robinson, 1990). Akutní orální toxicita pro krysy je nízká, LD₅₀ u orálně podávaného PVP převyšují hodnoty 100 g/kg, u intravenózně a intraperitoneálně podávaného PVP jsou tyto hodnoty potom 10 g/kg a více. Studie subchronické toxicity na hlodavcích a psech prokázaly, že s výjimkou průjmu při vysokých dávkách orálně podávaného PVP neexistuje žádný důkaz o jakékoliv jeho toxicitě. Dávka NOAEL byla stanovena na 5 g/kg/den. Chronická toxicita PVP byla studována za použití PVP K-25 při dávkách v potravě 10 % a PVP K-90 při dávkách 5 %, po dobu dvou let. Za tuto dobu nebyl prokázán jakýkoliv náznak toxicity této látky, taktéž nebyla prokázána jeho karcinogenita ani akumulace v orgánech. Rovněž dle IARC (1987) je poly(vinylpyrrolidon)

zařazen do kategorie 3, což znamená, že jej z hlediska karcinogenních účinků na člověka nelze zhodnotit.

Biodegradace PVP

Poly(vinylpyrrolidon) je díky svým vlastnostem a velmi nízké toxicitě využíván v mnoha průmyslových odvětvích. Jeho biologická rozložitelnost byla zkoumána v rámci několika studií (Trimpin *et al.*, 2001, Julinová *et al.*, 2012, Julinová *et al.*, 2013), jejichž výsledky naznačují, že polymer je biologicky nerozložitelný, či jen nepatrně rozložitelný.

Trimpin *et al.* (2001) sledovali biologickou rozložitelnost PVP v reaktoru s pevným ložem, promývaném říční vodou s PVP v koncentraci 10 mg/l. Po 30 dnech nebyla pozorována žádná oxidace koncových skupin PVP, ani rozdíl v počtu opakujících se jednotek. Nepatrné snížení v distribuci molekulové hmotnosti autoři přičítali spíše adsorpci velkých molekul PVP na lože reaktoru, než biologickému rozkladu. Je vysoce pravděpodobné, že na čistírnách odpadních vod je PVP z vodné fáze částečně odstraňován adsorpcí na vločky aktivovaného kalu.

Ve studii Julinové *et al.* (2012), věnované možnosti odstranění PVP z odpadních vod, byla potenciální biodegradace testována v pěti různých druzích aktivovaného kalu. Tyto kaly pocházely z městské čistírny odpadních vod (ČOV), z ČOV výroby léků na bázi morfolinu, dále bylo použito také několik druhů kalů pocházejících z výroby penicilinu, a také odpadní mycelium z této výroby. Na rozdíl od ostatních druhů kalů, byl v testu s kalem vznikajícím při výrobě penicilinu v kombinaci s přísadkou odpadního mycelia pozorován nárůst produkce oxidu uhličitého cca o 10 %. V rámci práce byly jednotlivé kaly dále aklimatizovány v přítomnosti *N*-methyl-2-pyrrolidonu, a použity do testů biodegradace PVP. I zde bylo dosaženo mírně pozitivních výsledků, a to degradace 8 – 14 % PVP během 350 hodin.

V navazující studii Julinové *et al.* (2013) byl poté sledován rozklad PVP aktivovaným kalem v přítomnosti různých induktorů biodegradace (kosubstrátů): akrylamidu, *N*-acetylfenylalaninu a *N*-methyl-2-pyrrolidonu. Ačkoliv v případě samotného PVP biodegradace pozorována nebyla, při přidavku akrylamidu byl pozorován úbytek PVP přibližně 20 %. Z výsledků práce tak vyplývá, že částečný mikrobiální rozklad PVP může být podpořen přítomností některých dalších látek.

Vzhledem k nízké biodegradabilitě PVP byla v několika studiích jako možnost předúpravy odpadních vod s obsahem PVP zkoumána fotooxidace. Hokirosi *et al.* (2001) studovali fotooxidaci ve vodě rozpuštěného PVP za využití UV/TiO₂, pro detailnější výzkum fotooxidace laktamového kruhu PVP pak byl jako modelová látka použit 2-vinylpyrrolidon. Experimentální výsledky prokázaly, že v prvním kroku procesu dochází k adsorpci PVP na částice TiO₂, následně dochází k ataku poly(vinylpyrrolidonu) hydroxylovými a/nebo hydroperoxylovými radikály a pak ke štěpení

jak hlavního řetězce tak i laktamového kruhu. Poslední krok zahrnuje tvorbu methylaminu a kyseliny propionové z otevřeného laktamového kruhu, tedy mikrobiálně rozložitelných produktů.

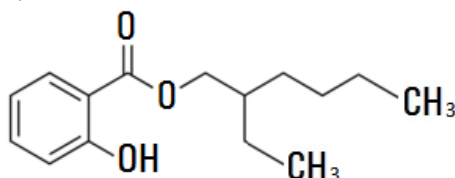
K podobným výsledkům vedla i další studie Loraina *et al.* (2008), kdy byl PVP oxidován za pomoci UV/H₂O₂. Bylo zjištěno, že důležitými parametry celého procesu jsou intenzita UV záření, množství H₂O₂ a délka trvání oxidace, přičemž nastavením těchto parametrů lze výrazně ovlivnit úspěšnost procesu. Výsledky studie ukázaly mírné zvýšení biodegradace vzniklých produktů proti původnímu PVP. Naopak při použití ozonizace (Suzuki *et al.*, 1978) bylo zjištěno, že při předčištění odpadních vod s obsahem PVP k výraznému zlepšení mikrobiálního rozkladu nedochází a biodegradace vzniklých produktů je i nadále obtížná.

1.2 Biodegradace vybraných syntetických nízkomolekulárních sloučenin

1.2.1 2-ethylhexylsalicylát

Obecná charakteristika 2-ethylhexylsalicylátu

2-ethylhexylsalicylát (EHS), nebo také ethylhexyl salicylát či oktylsalicylát, je bezbarvá kapalina charakteristického zápachu. Dle Lapczynski *et al.* (2007) je prakticky nerozpustný ve vodě (0,7171 mg/l), molární hmotnost je 250,34 g/mol, hustota 1,014 g/cm³. Chemická struktura je znázorněna na Obr. 1.4.



Obr. 1.4: Chemická struktura 2-ethylhexylsalicylátu (Lapczynski *et al.*, 2007)

Výroba a použití 2-ethylhexylsalicylátu

Výroba 2-ethylhexylsalicylátu spočívá v azeotropní esterifikaci 2-ethylhexanolu a kyseliny salicylové.

Hlavní využití 2-ethylhexylsalicylátu nachází v ochranných prostředcích proti slunečnímu záření, tj. v opalovacích krémech a dalších prostředcích osobní péče, kde slouží jako organický UV filtr (Andersen, 2003; Lapczynski *et al.*, 2007). EHS je schopen absorpce UVB záření o vlnových délkách 280 – 320 nm. Je používán také jako vonná přísada v dekorativní kosmetice, vůních, šamponech či toaletních mýdlech, lze jej nalézt také v domácích čisticích prostředcích. Jeho množství v těchto přípravcích je pak obvykle od 0,001 do 5 % (Andersen, 2003).

Toxicita 2-ethylhexylsalicylátu

Akutní orální toxicita byla sledována ve studii na králících, provedené Výzkumným ústavem pro vonné materiály (RIFM) v roce 1974, kde po dobu testování 14 dní uhynulo jediné zvíře z deseti. Zjištěná akutní orální LD₅₀ byla 5 g/kg. Hodnota akutní dermální LD₅₀ nebyla ve studii zjištěna, neboť ani při nejvyšší dávce 5 g/kg, kdy byl EHS u testovaných zvířat aplikován po dobu 24 hodin na nepoškozenou i odřenou kůži, nedošlo k žádnému úmrtí a ani nebyly pozorovány žádné klinické příznaky. Údaje o subchronické, případně chronické toxicitě EHS nejsou dostupné (Lapczynski *et al.*, 2007). Dávka NOAEL nebyla pro EHS stanovena, pravděpodobně však přesahuje hodnotu 250 mg/kg/den (EU, 2000).

Ze studií RIFM (Lapczynski *et al.*, 2007) taktéž vyplývá, že působením EHS nedochází k významnému podráždění kůže, pouze v některých případech může EHS způsobit mírné zarudnutí. Údaje o karcinogenitě samotného EHS nejsou dostupné. Belsito *et al.* (2007) však z dostupných údajů o genotoxicitě salicylátů a jejich metabolismu soudí, že karcinogenní účinky salicylátů obecně jsou velmi nepravděpodobné.

Biodegradace 2-ethylhexylsalicylátu

Produkce a spotřeba prostředků osobní péče obsahujících UV filtry za poslední desetiletí díky zvyšujícímu se veřejnému povědomí o škodlivých účincích UV záření značně stoupá (Ramos *et al.*, 2016). UV filtry se proto mohou dostávat do vodního prostředí, a to buďto přímo uvolňováním z kůže při koupání v bazénech, nádržích či v moři, nebo nepřímo, z průmyslových odpadních vod a zejména odpadních vod z domácností, kam se smývají při sprchování, mytí a praní. Za hlavní zdroj UV filtrů v prostředí jsou pak považovány především čistírny odpadních vod, a to v důsledku neúplného odstranění těchto polutantů v průběhu čistírenského procesu (Rodil *et al.*, 2009a; Ekpeghere *et al.*, 2016). Naměřené koncentrace UV filtrů v různých vzorcích vod se pohybují od ng/l v povrchových vodách až po mg/l v bazénových či odpadních vodách (Negreira *et al.*, 2008).

Výskyt organických UV filtrů včetně EHS byl zjištěn v různých vzorcích vodního prostředí (Ramos *et al.*, 2016). Samotný EHS byl již detekován v různých vodních vzorcích jako například v říční vodě (Liu *et al.*, 2010; Kameda *et al.*, 2011; Román *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Ekpeghere *et al.*, 2016), jezerní vodě (Rodil a Moeder, 2008; Rodil *et al.*, 2009a), mořské vodě (Román *et al.*, 2011; Tashiro a Kameda, 2013; Benedé *et al.*, 2014; Tsui *et al.*, 2014a; Sankoda *et al.*, 2015), kohoutkové vodě (Román *et al.*, 2011) i odpadní vodě (Negreira *et al.*, 2009; Rodil *et al.*, 2009a; Tsui *et al.*, 2014b).

Díky lipofilní povaze ($\log K_{ow} = 5,97$) může u EHS docházet v jisté míře i k jeho adsorpci na sedimenty a částice aktivovaného kalu (Rodil *et al.*, 2009b;

Negreira *et al.*, 2011; Sánchez-Brunete *et al.*, 2011; Benedé *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2015).

Ve vědecké literatuře se vyskytuje pouze velmi omezené množství údajů spojených s mikrobiálním rozkladem 2-ethylhexylsalicylátu. Existuje několik studií zabývajících se odstraňováním organických UV filtrů na čistírnách odpadních vod, dodnes však nebyla popsána biodegradace EHS, ať už v aktivovaném kalu či izolovaným mikroorganismem. Například, Negreira *et al.* (2009) měřili koncentrace EHS na různých místech ČOV. Zjištěné koncentrace na přítoku do ČOV byly 28 ng/l a na odtoku 7,5 ng/l. Účinnost odstraňování organických UV filtrů na čistírnách odpadních vod studovali také Tsui *et al.* (2014b). Zde je uvedena účinnost odstranění EHS v aktivovaném kalu obvykle vyšší než 90 %; maximální koncentrace naměřené na přítoku ČOV byly 1188,3 ng/l a na odtoku 128,9 ng/l. Z uvedené studie však není zcela zřejmé, zda k odstranění EHS došlo díky biodegradaci nebo v důsledku jeho adsorpce na vločky aktivovaného kalu. Naproti tomu Ekpeghere *et al.* (2016) uvádí, že průměrná účinnost odstranění EHS v průběhu procesu čištění odpadních vod byla od 32 do 91 %, dle typu čistícího procesu. Autoři detekovali EHS jako dominantní UV filtr především na odtocích ČOV a také v řekách, a předpokládají, že jeho nízká míra odstranění je dána jistou resistencí k degradaci.

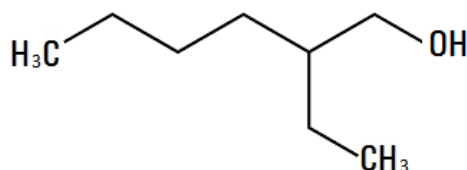
Studiem výskytu a chování některých organických UV filtrů, včetně EHS, se v mořských vodách u japonského pobřeží zabývali Sankoda *et al.* (2015). Koncentrace těchto látek byla sledována na několika rekreačních plážích, jak v letním, tak v zimním období. Přítomnost EHS byla potvrzena ve všech odebraných vzorcích, jeho koncentrace však podléhala značným sezónním výkyvům. Naměřené koncentrace byly ve všech případech vyšší v letním období, což naznačuje přímý vstup EHS do vod díky rekreačnímu koupání. Kolísání koncentrací EHS ve vodách bylo zjištěno i v průběhu dne. Na rozdíl od jiných zkoumaných UV filtrů, kde byl s rostoucím počtem koupajících se osob během denních hodin pozorován významný nárůst jejich koncentrace, u EHS tento trend pozorován nebyl. V průběhu dne nedocházelo k významným změnám v koncentraci EHS, maximální koncentrace pak byla naměřena až v podvečerních hodinách ($2,7 \pm 0,9$ ng/l), kdy již většina návštěvníků odešla. Toto kolísání koncentrace v průběhu dne autoři přičítají poměrně rychlé fotodegradaci EHS, probíhající u hladiny mořské vody.

1.2.2 2-ethylhexanol

Obecná charakteristika 2-ethylhexanolu

2-ethylhexanol (EHOL) je bezbarvá, mírně olejovitá kapalina aromatického zápachu. Je dobře rozpustný v řadě organických rozpouštědel, jeho rozpustnost ve vodě je však omezená a údaje o ní se liší. Amidon *et al.* (1974) uvádí rozpustnost ve vodě při 25 °C 880 mg/l, McGinty *et al.* (2010) pak 1379 mg/l.

Molární hmotnost je 130,23 g/mol, hustota 0,833 g/cm³. Chemická struktura je znázorněna na Obr. 1.5.



Obr. 1.5: Chemická struktura 2-ethylhexanolu (Wyatt *et al.*, 1987)

Výroba a použití 2-ethylhexanolu

Výroba EHOLu spočívá v hydroformylaci propenu (Kessen *et al.*, 1987), čímž je získána reakční směs obsahující n-butanal. Ten se dále z reakční směsi odděluje destilací a následně se podrobí aldolizaci za vzniku odpovídajícího butyraldolu. Po zahřátí dojde k odštěpení vody a vzniku 2-ethylhexenalu, který je následně hydrogenován v přítomnosti vhodných katalyzátorů na 2-ethylhexanol, který se nakonec čistí ve vícestupňovém destilačním procesu.

Weissermel a Arpe (1997) uvádí, že produkce EHOLu v roce 1994 byla přibližně 2 300 000 tun. Hlavní využití 2-ethylhexanol nachází především při výrobě změkčovadel di-2-ethylhexylftalátu a di-2-ethylhexyladipátu. Dále je EHOL používán například při výrobě tris-(2-ethylhexyl)fosfátu, 2-ethylhexyl akrylátu, 2-ethylhexylnitrátu a mnoha dalších chemikálií (Astill *et al.*, 1996a; Chenier, 2012). EHOL je používán také jako vonná přísada v řadě přípravků, od dekorativní kosmetiky, přes vůně, šampony či toaletní mýdla, až po domácí čisticí prostředky a detergenty (Nalli *et al.*, 2002, McGinty *et al.*, 2010).

Toxicita 2-ethylhexanolu

Údaje o akutní orální toxicitě se v různých studiích liší. Například Dave a Lindman (1978) udávají hodnotu akutní orální LD₅₀ EHOLu zjištěnou u krys 3,2 g/kg, naproti tomu Nishimura *et al.* (1994) ve své studii uvádí, že hodnota LD₅₀ je 2,049 g/kg. Z dermálních studií Výzkumného ústavu pro vonné materiály (RIFM) vyplývá, že působením EHOLu dochází k podráždění kůže s mírným zarudnutím a otoky, což bylo pozorováno u všech testovaných zvířat; dermální hodnota LD₅₀ nebyla přesně stanovena, přesahuje však 5 g/kg (McGinty *et al.*, 2010).

Subchronická orální toxicita byla zkoumána v rámci 91-denní studie u samic a samců krys, kdy byl EHOL podáván orálně v dávkách 0, 25, 125, 250 a 500 mg/kg/den. Dávka NOAEL byla stanovena na 125 mg/kg/den (Astill *et al.*, 1996b). EHOL byl dále na základě výsledků studie Astilla *et al.* (1996a) označen za slabý a nejednoznačný karcinogen u myši.

Kromě toxicity ve studiích na zvířatech byla potvrzena toxicita EHOLu také pro řadu vodních živočichů a mikroorganismů. Například v rámci studie biologického rozkladu syntetického motorového oleje (Wyatt *et al.*, 1987), kdy dochází k vzniku 2-ethylhexanolu, byl při získávání potenciálního degradačního mikroorganismu po přidání EHOLu do vodného prostředí sledován prudký pokles v počtu přítomných mikrobiálních druhů. Dále, ve studii Nalliho *et al.* (2002), byla toxicita 2-ethylhexanolu a kyseliny 2-ethylhexanové, vznikající při rozkladu některých změkčovadel, sledována pomocí testu Microtox. I v rámci další studie (Horn *et al.*, 2004) byla sledována toxicita těchto dvou metabolitů pro některé vodní organismy, a to pro střevle, pstruhy duhové a dafnie. Byly stanovovány hodnoty inhibiční koncentrace IC₂₅ pro střevle a letální koncentrace LC₅₀ pro pstruhy a dafnie. Výsledky těchto dvou studií jsou shrnuty v *Tab. 1.1*.

*Tab. 1.1: Porovnání toxicity 2-ethylhexanolu a kyseliny 2-ethylhexanové pomocí různých testů akutní toxicity (Nalli *et al.*, 2002; Horn *et al.*, 2004)*

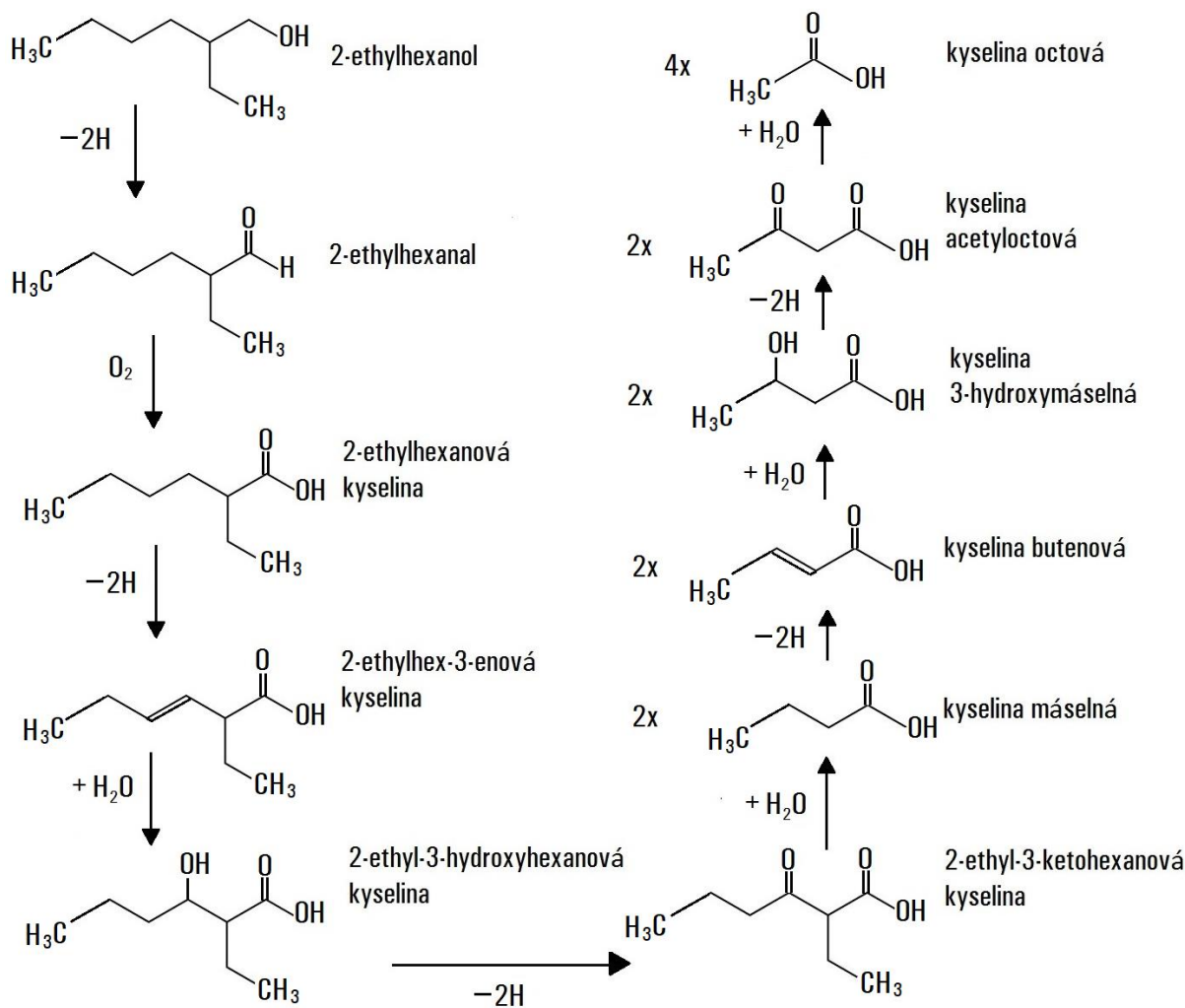
Sledovaná látka	Microtox EC ₅₀ (mg/l)	Střevle IC ₂₅ (mg/l)	Pstruh duhový LC ₅₀ (mg/l)	Dafnie LC ₅₀ (mg/l)
2-ethylhexanol	7,8	>15	27	100
Kyselina 2-ethylhexanová	43	23,0	150	120

Biodegradace 2-ethylhexanolu

Díky svému využití pro výrobu řady průmyslově využívaných látek, včetně změkčovadel, se EHOL dostává do životního prostředí. Biologickému rozkladu EHOLu se věnovali Wyatt *et al.* (1987) v rámci studia biodegradace syntetického motorového oleje. Použitý syntetický olej byl směsí polyesterů, sestávajících z dimerních a trimerních mastných kyselin s dlouhým řetězcem, esterifikovaných kratšími rozvětvenými alkoholy, především 2-ethylhexanolem.

V rámci studie byly z jezerní vody izolovány dvě kultury schopné využití tohoto oleje jako jediného zdroje uhlíku a energie. U obou kultur docházelo působením esteráz v průběhu rozkladu ke vzniku mastných kyselin, využívaných kulturami k růstu, a zároveň k uvolňování a akumulaci 2-ethylhexanolu v prostředí. Dále se proto studie věnovala sledování chování a osudu EHOLu v prostředí. K rozkladu EHOLu původně izolovanými kulturami nedocházelo, avšak z totožné jezerní vody se podařilo izolovat ještě další kulturu, tentokrát se schopností utilizace EHOLu jako jediného zdroje uhlíku a energie. Tuto kulturu se následně podařilo identifikovat jako zástupce rodu *Pseudomonas*, blízkého druhu *Pseudomonas putida*, a byl studován mechanismus rozkladu EHOLu touto kulturou.

Počátek degradace EHOLu je pravděpodobně katalyzován pomocí alkohol- a aldehyddehydrogenáz, jejichž působením dochází ke vzniku kyseliny 2-ethylhexanové; ta je dále metabolizována. Předpokládaný mechanismus biodegradace 2-ethylhexanolu kulturou *Pseudomonas* sp. je znázorněn na Obr. 1.6, přičemž produkty vznikající mezi kyselinou 2-ethylhexanovou a octovou jsou v buňce pravděpodobně přítomny ve formě acyl-CoA (Wyatt *et al.*, 1987).



Obr. 1.6: Předpokládaný mechanismus biologického rozkladu 2-ethylhexanolu bakterií *Pseudomonas* sp. (Wyatt *et al.*, 1987)

Tvorba 2-ethylhexanolu, jako meziprojektu rozkladu, byla prokázána také v řadě prací zabývajících se biologickým rozkladem změkčovadel, jako jsou di-2-ethylhexylftalát či di-2-ethylhexyladipát. (Ejlertsson a Svenson, 1996; Nalli *et al.*, 2002; Horn *et al.*, 2004) Biodegradace těchto změkčovadel je pouze částečná, ústí v produkci toxických metabolitů – 2-ethylhexanolu a kyseliny 2-ethylhexanové, které zřejmě mohou být v některých prostředích odolné další biodegradaci. Tvorba těchto metabolitů jako důsledek mikrobiálního rozkladu uvedených změkčovadel již byla potvrzena u řady testovaných kultur. Patří mezi

ně například někteří zástupci rodů *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* a také někteří zástupci kvasinek a mikroskopických hub, jako jsou *Actinomucor*, *Aspergillus*, *Candida*, *Rhodotorula* a *Phanerochaete* (Nalli *et al.*, 2006).

Koncentrace změkčovadel a jejich metabolitů proto byla zjišťována v řadě vzorků z různých prostředí, jako byly kohoutková voda, roztátý sníh, říční voda, říční sediment či průsaková voda ze skládek. Většina těchto environmentálních vzorků jeden nebo oba metabolity vznikající při rozkladu změkčovadel obsahovala. Ve znatelných množstvích byla ve vzorcích detekována kyselina 2-ethylhexanová, vzorky však obsahovaly také určitá množství méně stabilního 2-ethylhexanolu, který vykazuje vyšší akutní toxicitu než kyselina 2-ethylhexanová. Nejvyšší koncentrace EHOLu pak byla detekována v říčním sedimentu, kde se vyskytoval až v koncentracích 100 µg/kg. (Horn *et al.*, 2004)

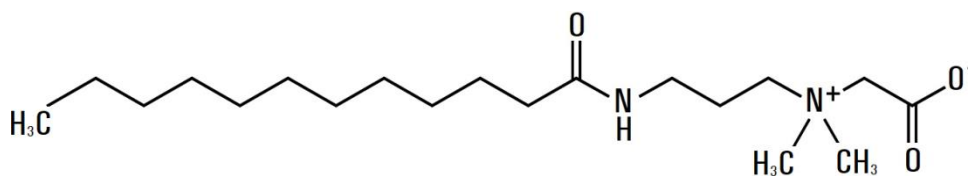
Naměřené koncentrace metabolitů nemusí být pro organismy vyskytující se ve vodním prostředí akutně toxické, avšak jejich velmi pomalý rozklad, uskutečňovaný dle názoru autorů pouze velmi limitovaným počtem mikroorganismů, může vést k tendenci přetrvávat v životním prostředí (Wyatt *et al.*, 1987; Horn *et al.*, 2004).

Vzhledem ke své těkavosti neznámá přítomnost EHOLu problém jen pro vodní prostředí. EHOL patří mezi těkavé organické sloučeniny a jelikož změkčovadla tvoří běžnou složku stavebních materiálů, plastů i prachu, jejich mikrobiálním rozkladem se toxické metabolity mohou uvolňovat i do ovzduší (Nalli *et al.*, 2006). Znamená to, že biodegradace zmíněných změkčovadel je nejpravděpodobnějším zdrojem EHOLu ve vnitřním ovzduší, který tak přispívá také ke zhoršení kvality vnitřního ovzduší budov.

1.2.3 Kokamidopropylbetain

Obecná charakteristika CAPB

Kokamidopropylbetain (CAPB) patří do skupiny amidopropylbetainů a jeho chemická struktura je obvykle odvozena od kokosového oleje a dimethylaminopropylaminu. Převládající mastnou kyselinou v kokosovém oleji je kyselina laurová (C12), i když jiné mastné kyseliny (C8 – C18) jsou v menších podílech také přítomny. Struktura převládajícího lauramidopropylbetainu je uvedena na *Obr. 1.7* (Worthen *et al.*, 2014). CAPB je čirá až světle žlutá kapalina s vůní připomínající tuk, která je rozpustná ve vodě, přičemž rozpustnost ve vodě při 25 °C se uvádí 2 g/10ml (Burnett *et al.*, 2012); dále je rozpustná v ethanolu a izopropylalkoholu a nerozpustná v minerálních olejích. Molární hmotnost je 342,52 g/mol a hustota 1,043 g/cm³ (Hunter *et al.*, 1998). CAPB pro kosmetické účely je obvykle uváděn na trh jako 30% vodný roztok obsahující NaCl (4,6 – 5,6 %) (Burnett *et al.*, 2012).



Obr. 1.7: Chemická struktura lauramidopropylbetainu (Worthen *et al.*, 2014)

Výroba a použití CAPB

Kokamidopropylbetain je vyráběn ve dvoustupňovém procesu (Burnett *et al.*, 2012); v prvním stupni dochází k reakci kokosového oleje nebo mastných kyselin, získaných hydrolýzou tohoto oleje (C12 – C18), s dimethylaminopropylaminem; reakce probíhá ve vodném roztoku při teplotě přibližně 160 °C. Ve druhém stupni se za alkalických podmínek nechá reagovat získaný dimethylaminopropylkokoamid s monochloroctanem sodným a je získán CAPB ve formě roztoku o koncentraci přibližně 30 %.

CAPB je amfoterní syntetický surfaktant, který je díky svým výhodným vlastnostem hojně využíván především v kosmetických prostředcích a prostředcích osobní péče. Zde slouží například jako antistatický prostředek, vlasový a pleťový kondicionér, stabilizátor pěn i jako činidlo zvyšující viskozitu (Burnett *et al.*, 2012). Kromě toho nalézá uplatnění v domácích čistících a pracích prostředcích, včetně prostředků pro ruční mytí nádobí a čistících prostředků na tvrdé povrchy. CAPB lze však použít i v některých specifických inženýrských nebo biologických aplikacích, např. pro zkrácení procesu stabilizace aktivovaného kalu (Zhou *et al.*, 2017) nebo ke zmírnění nadměrného růstu mořských řas (Sun *et al.*, 2004).

Toxicita CAPB

Z dostupných informací vyplývá, že kokamidopropylbetain je látka s poměrně nízkou toxicitou. Akutní orální LD₅₀ 30% roztoku CAPB pro krysy je ≥ 4900 mg/kg (HERA, 2005). Po perorálním podání vysokých dávek docházelo jen ke snížení motorické aktivity či k podráždění gastrointestinálního traktu.

Ze subakutních a subchronických studií prováděných na potkanech byla odvozena dávka NOAEL, která byla pro systémovou toxicitu 30% roztoku CAPB stanovena na 1000 mg/kg/den (HERA, 2005).

CAPB a příbuzné amidopropylbetainy byly v minulosti označeny také jako látky dráždící kůži, avšak současné údaje ukázaly, že za vyvolání kožního podráždění jsou odpovědné nečistoty v konečném produktu, nikoliv samotné betainy (Burnett *et al.*, 2012). Kokamidopropylbetain nepůsobí genotoxicky; o karcinogenitě kokamidopropylbetainu neexistují doklady (HERA, 2005).

Biodegradace CAPB

Časté používání nejrůznějších prostředků osobní péče je typickým aspektem moderního životního stylu; obrovské množství z nich pak denně vstupuje do životního prostředí. Osudem kokamidopropylbetainu v životním prostředí se tak zabývalo již několik vědeckých studií, v nichž byla zkoumána jak jeho primární, tak i celková aerobní biodegradace (Eichhorn a Knepper, 2001; Sun *et al.*, 2004; Vonlanthen *et al.*, 2011; Gheorghe *et al.*; 2012, Zhou *et al.*, 2017). Všichni autoři dokumentovali relativně rychlou degradaci CAPB v různých mikrobiálních společenstvích.

Většina studií se zabývala pouze primární biodegradací CAPB; například Eichhorn a Knepper (2001) ji sledovali v laboratorním bioreaktoru s pevným ložem a s říční vodou jako inokulem. Po 48 hodinách došlo k degradaci více než 95 % CAPB, jeho vstupní koncentrace však činila pouze 10 mg/l. Naopak Sun *et al.* (2004) sledovali primární degradaci 100 mg/l CAPB v mořské vodě; bylo zjištěno, že po 120 hodinách inkubace při 20 °C došlo k rozkladu více než 80 % přítomného kokamidopropylbetainu, přičemž míra degradace rostla s teplotou. Podobné výsledky uvádí také Vonlanthen *et al.* (2011), z jejichž práce vyplývá, že při 15 °C došlo v mořské vodě po 120 hodinách inkubace k téměř kompletnímu odstranění 20 mg/l CAPB.

Primární biodegradaci kokamidopropylbetainu v zahuštěném aktivovaném kalu sledovali Zhou *et al.* (2017), přičemž CAPB byl dávkován v množství 0,08 g/g sušiny kalu. Během 24 hodin došlo k odstranění až 91,2 % CAPB, autoři však uvádějí, že částečně bylo toto odstranění zapříčiněno adsorpcí.

Kompletní aerobní biodegradaci CAPB v aktivovaném kalu pak studovali Gheorghe *et al.* (2012). Biodegradace byla sledována pomocí měření DOC a výsledky experimentu ukázaly, že po 30 dnech došlo k odstranění více než 80 % organického uhlíku. Navíc, Garcia *et al.* (2008) prokázali, že CAPB je velmi dobře biologicky odbouratelný také v anaerobním čistírenském kalu.

1.3 Souhrn chybějících poznatků k biodegradabilitě zkoumaných látek

Tato práce se věnuje studiu bakteriálního rozkladu vybraných syntetických vysokomolekulárních a nízkomolekulárních látek. Z řad vysokomolekulárních sloučenin jde o poly(vinylalkohol) a poly(vinylpyrrolidon), z nízkomolekulárních látek o 2-ethylhexylsalicylát, 2-ethylhexanol a kokamidopropylbetain. Tyto látky jsou široce využívány v řadě průmyslových odvětví, jejich biodegradability a hlavně znalosti o nich jsou však značně odlišné.

Poly(vinylalkohol) je polymer, jehož biodegradabilita byla potvrzena již řadou studií. Přestože je známo velké množství mikroorganismů schopných jeho rozkladu a mechanismus biodegradace je také poměrně dobře prostudován,

některým aspektům, jako je vliv různých environmentálních faktorů ovlivňujících jeho rozklad konkrétními kulturami, doposud nebyla věnována dostatečná pozornost.

Naproti tomu biodegradabilita poly(vinylpyrrolidonu) je značně omezená. Byly zkoušeny různé metody mikrobiálního rozkladu, avšak doposud nebyl izolován mikroorganismus schopný ani částečného rozkladu tohoto polymeru. Ten je tak považován za biologicky nerozložitelný. Jako jedna z mála cest dosažení biodegradace PVP se jeví přítomnost některých induktorů degradace, případně rozklad polymeru velmi specifickými konsorciemi a kulturami bakterií.

O biologické rozložitelnosti studovaných nízkomolekulárních sloučenin je ve vědecké literatuře dostupné pouze velmi omezené množství informací. V případě 2-ethylhexylsalicylátu se současná vědecká literatura zaměřuje především na vývoj analytických metod schopných detekce jeho velmi nízkých koncentrací v různých matricích a detekci těchto látek v různých vzorcích prostředí. Doposud však neexistuje studie zabývající se mikrobiální degradací 2-ethylhexylsalicylátu a nebyly tak izolovány ani studovány žádné konkrétní mikroorganismy schopné jeho utilizace.

U 2-ethylhexanolu je v literatuře popsán pouze jediný případ mikrobiálního rozkladu, kultura byla izolována z říční vody. O mikroorganismech, zodpovědných za rozklad této látky v aktivovaném kalu případně v jiných sférách prostředí, není známo prakticky nic.

Také v případě poslední sledované látky, kokamidopropylbetainu, nebyly ve vědecké literatuře nalezeny žádné zmínky o konkrétních mikrobiálních zástupcích, odpovídajících za degradaci této látky, ať už v procesu čištění odpadních vod, či v jiných environmentálních sférách.

Je tedy zřejmé, že problematika mikrobiální degradace každé z uvedených látek je vždy jedinečným problémem a studium tak musí být zaměřeno na poněkud jiný aspekt těchto procesů. Na druhou stranu, tento přístup umožňuje širší poznání významu biodegradability průmyslových sloučenin a případných dopadů aplikace těchto látek v životním prostředí.

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo studium biodegradability vybraných vysokomolekulárních a nízkomolekulárních syntetických látek. Tyto látky mohou vstupovat do životního prostředí a představovat tak potenciální riziko pro různé ekosystémy.

Dílčí cíle dizertační práce byly následovné:

- Sledování biodegradace poly(vinylalkoholu) bakteriemi rodu *Sphingomonas*
- Výzkum biodegradace poly(vinylpyrrolidonu)
- Studium biodegradace 2-ethylhexylsalicylátu ve vodách
- Sledování biodegradace 2-ethylhexanolu, izolace a identifikace aktivní degradační kultury a studium jejích vlastností
- Studium symbiotické biodegradace kokamidopropylbetainu

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Aktivovaný kal byl získáván z městské čistírny odpadních vod (ČOV) Zlín – Malenovice.

Říční voda pocházela z řeky Dřevnice, místo odběru Čepkov. Vzorke říční vody byly odebírány v den pokusu a byly charakterizovány počtem heterotrofních psychrofilních bakterií, rostoucích na R2A agaru.

Směsné konsorcium KOKK bylo získáno v probíhající práci Ing. Karla Křížka a je schopné rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu (1O2P).

Kultura *Sphingomonas* sp. JK2 byla izolována z aktivovaného kalu ČOV Zlín – Malenovice v rámci předcházející dizertační práce Terezy Václavkové (2006).

Kultura *Sphingomonas* sp. OT2 byla izolována z aktivovaného kalu ČOV Otrokovice v rámci diplomové práce Jiřího Riedla (2004).

Kultura *Escherichia coli* CCM 3954 pocházela z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno).

Kultura *Pseudomonas* sp. P byla izolována z aktivovaného kalu ČOV Zlín – Malenovice v rámci této práce, ve spolupráci s diplomovou prací Markéty Jelénkové (2016). Kultura je uložena v České sbírce mikroorganismů jako *Pseudomonas* sp. P CCM 8809.

Kultura *Rhodococcus* sp. ES 12 byla izolována z aktivovaného kalu ČOV Zlín – Malenovice v rámci diplomové práce Markéty Jelénkové (2016). Kultura je uložena v České sbírce mikroorganismů jako *Rhodococcus* sp. ES12 CCM 8808.

Kultura *Pseudomonas* sp. FV byla izolována z aktivovaného kalu ČOV Zlín – Malenovice v rámci diplomové práce Evy Ringlové (2015). Kultura je uložena v České sbírce mikroorganismů jako *Pseudomonas* sp. FV CCM 8810.

Kultura *Rhizobium* sp. FM byla izolována z aktivovaného kalu ČOV Zlín – Malenovice v rámci diplomové práce Evy Ringlové (2015). Kultura je uložena v České sbírce mikroorganismů jako *Rhizobium* sp. FM CCM 8811.

3.1.2 Chemikálie a roztoky

Běžné chemikálie použité v rámci dizertační práce byly čistoty p. a. a není-li uvedeno jinak, pocházejí od standardních dodavatelů jako je Fluka, Sigma-Aldrich, Lachema či Penta.

Poly(vinylalkohol)

Byl použit PVA s obchodním označením MOWIOL 5 – 88 firmy Clariant, SRN. První číslo značí viskozitu 4% vodného roztoku PVA při 20 °C, která je 5 mPa.s. Druhé číslo značí stupeň hydrolyzy – 88 mol% (zastoupení zbytkových acetátových skupin je 12 %).

Poly(vinylpyrrolidon)

Byl použit PVP s obchodním označením Poly(vinylpyrrolidon) K 15 (Fluka).

Další významné chemikálie

2-ethylhexyl salicylát (EHS), 2-ethylhexanol (EHOL), 2-ethylhexanal (EHAL) a 2-ethylhexanová kyselina (EHA) byly dodány firmou Sigma Aldrich, SRN. Kokamidopropylbetain (CAPB) byl dodán firmou Enaspol (Česká republika) ve formě 30% roztoku, obsahujícího přibližně 5 % NaCl, pod názvem Flavol KDA. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin (v %): k. laurová 44 – 51, k. myristová 13 – 18, k. palmitová 7 – 10, k. kaprylová 5 – 9, k. olejová 5 – 8, k. kaprinová 4 – 10, k. stearová 1 – 4 a k. linoleová 1 – 3 (údaje fy. Enaspol).

Fyziologický roztok

Bylo naváženo 8,5 g NaCl a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl následně sterilizován při teplotě 120 °C po dobu 30 minut.

Zásobní roztok PQQ (100 mg/l)

Byly naváženy 2 mg PQQ a rozpuštěny ve 20 ml fyziologického roztoku. Vzniklý roztok byl sterilizován pomocí injekční stříkačky přes sterilní filtr Millex GS Filter Unit s velikostí pórů 0,22 µm do sterilních mikrozkmavek a uchováván při -18 °C .

Roztok pufru A

Bylo naváženo 9,07 g KH_2PO_4 a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody.

Roztok pufru B

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

Roztok stopových prvků

Byly naváženy jednotlivé soli s obsahem stopových prvků: 0,043 g $\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,057 g H_3BO_3 ; 0,043 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,037 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0,025 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,040 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Po navážení byly látky rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

Roztoky solí

Byly naváženy jednotlivé soli: 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,3 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 2,06 g FeCl_3 ; 3 g NH_4Cl ; 5 g NaCl . Po navážení byla každá zvlášť rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

Roztok vitaminů

Byl použit roztok vitaminů MEM Vitamins (100x), vyráběný společností PAA The Cell Culture Company o koncentraci složek:

D-pantothenát vápenatý (vitamin B5)	100 mg/l
Cholinchlorid	100 mg/l
Kyselina listová	100 mg/l
Myo-Inositol	200 mg/l
Nikotinamid	100 mg/l
Pyridoxal hydrochlorid	100 mg/l
Riboflavin	10 mg/l
NaCl	8500 mg/l
Thiamin hydrochlorid	100 mg/l

Roztok kyseliny borité (40 g/l)

Bylo naváženo 20 g H_3BO_3 a rozpuštěno v 500 ml destilované vody.

Roztok jodu s jodidem draselným

V třetí misce bylo spolu s malým množstvím destilované vody rozetřeno 6,35 g I_2 spolu s 20 g KI. Směs byla dále kvantitativně převedena do 500 ml odměrné baňky a doplněna po rysku destilovanou vodou.

Zásobní roztok tryptonu (25 g/l)

Bylo naváženo 5 g tryptonu a rozpuštěno v 200 ml destilované vody. Před použitím byl roztok sterilizován v autoklávu při 120 °C po dobu 20 minut.

Zásobní roztok salicylanu sodného (10 %-tní)

Byl navážen 1 g salicylanu sodného, rozpuštěn v 8 ml destilované vody a doplněn do 10 ml. Vzniklý roztok byl sterilizován za pomoci injekční stříkačky přes sterilní filtr Millex GS Filter Unit 0,22 μm .

3.1.3 Minerální média

Minerální médium (MM)

Složení:

Roztok A (KH_2PO_4)	20 ml
Roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	80 ml
Destilovaná voda	850 ml
Roztok stopových prvků	2 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l)	10 ml

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O (3 g/l)	10 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (1 g/l)	10 ml
NH ₄ Cl (30 g/l)	10 ml
NaCl (50 g/l)	10 ml

Minerální médium s vitaminy

MM bylo sterilizováno a po sterilizaci bylo asepticky přidáno 10 ml vitamínů MEM.

Minerální médium se sníženou koncentrací fosforečnanů (MM2)

Složení:

Roztok A (KH ₂ PO ₄)	5 ml
Roztok B (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	45 ml
Destilovaná voda	930 ml
Roztok stopových prvků	2 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (10 g/l)	5 ml
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O (3 g/l)	5 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (1 g/l)	5 ml
NH ₄ Cl (30 g/l)	5 ml

Minerální médium bez dusíku (MM3)

Složení:

Roztok A (KH ₂ PO ₄)	20 ml
Roztok B (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	80 ml
Destilovaná voda	859 ml
Roztok stopových prvků	1 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (10 g/l)	10 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O (2,2 g/l)	10 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (1 g/l)	10 ml
NaCl (50 g/l)	10 ml

3.1.4 Živné půdy

Živné agarové půdy byly připraveny navážením jednotlivých složek, které byly rozpuštěny v daném množství destilované vody a vysterilizovány v autoklávu při 120 °C po dobu 20 minut. Po sterilizaci a částečném ochlazení byly agary asepticky rozlity do sterilních Petriho misek.

TYA agar

21 g živné půdy (HiMedia Laboratories, Ltd.) + 1000 ml destilované vody.

R2A agar

18,12 g živné půdy (HiMedia Laboratories, Ltd.) + 1000 ml destilované vody.

R2A agar s přidavkem NaCl

1,8 g živné půdy R2A + přidavek NaCl v množství 0 – 10 hm. % + 100 ml destilované vody.

Minerální agar (MA)

Složení:

K ₂ HPO ₄	0,1 g
NH ₄ Cl	0,11 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001 g
CaCl ₂	0,001 g
Roztok stopových prvků	0,2 ml
Agar	1,7 g
Destilovaná voda	100 ml

Minerální agar s tryptonem

Do MA byl dávkován 1g/l tryptonu, sterilizován v autoklávu a rozlit do Petriho misek.

PVA agar s pyrrolochinolinchinonem (PQQ)

Složení:

PVA	0,1 g
Minerální agar	1,9 g
Zásobní roztok PQQ (100 mg/l)	0,02 ml
Destilovaná voda	100 ml

3.1.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

Aseptický laminární box Telstar (Španělsko)

Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky TECAN (Sunrise, USA)

Destičkový spektrofotometr TECAN Infinite M200 PRO (Rakousko)

Dvoupaprskový UV-VIS spektrofotometr Unicam UV 500 (ThermoSpectronic)

Analyzátor uhlíku TOC-5000A – Shimadzu (Japonsko)

Aparatura VacMasterTM 10 (Biotage)

Plynový chromatograf 7890A, Agilent Technologies Inc. (USA)

pH metr inoLab pH/ION 735 se skleněnou elektrodou SenTix 81(SRN)

Oximetr Oxi 539 s kyslíkovou elektrodou EO-12 (WTW)

Centrifuga MR23i (Jouan, Francie)

Centrifuga Rotanta 460 R (Hettich, SRN)

Termocykler PIKO, Finnzymes, Thermo Fisher Scientific (USA)

Elektroforetická aparatura HU10 Mini-Plus Horizontal, Scie-Plas (GB)
UV transiluminátor In Genius, SynGene Imaging (GB)
Laboratorní váhy Adventurer Pro 500
Analytické váhy SI – 64A (Denver Instrument)
Laboratorní sterilizátor SANOclav (Wolf, SRN)
Třepačka laboratorní vratná (GFL, SRN)
Chladnička ARDO
Mikroskop Olympus CX 41 (Japonsko)
Termostat BT 120 pro psychofilní kultivaci (Laboratorní přístroje Praha, ČR)
Kultivační místnost, 25 °C (ÚIOŽP, FT UTB ve Zlíně)
Filtry Millex GS Filter Unit 0,22 µm
Mikrotitrační destička 96 jamek – GAMA, ČR
SPE kolonky Isolute C18 (100 mg/3 ml; Biotage)
Počítací komůrky CYRUS II

Dále byly používány běžné laboratorní pomůcky, jako dávkovače, pipety, zkumavky, kličky, běžné laboratorní sklo a další laboratorní pomůcky.

3.2 Metodika

3.2.1 Sledování biodegradace

Biodegradační testy

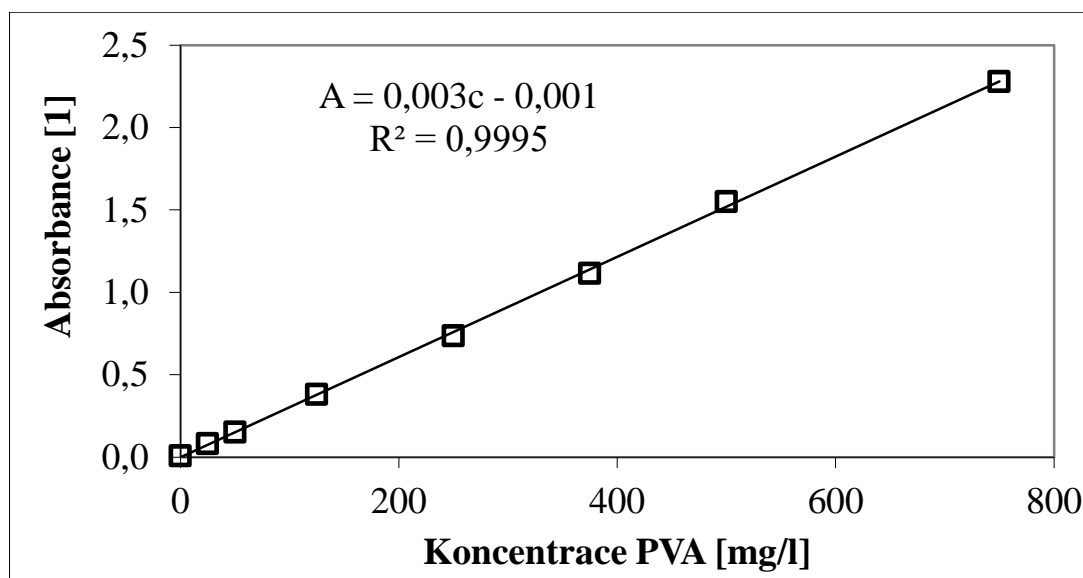
Biodegradační testy byly prováděny v kultivačních lahvích, za aerobních podmínek, v tekutém minerálním médiu, za přídavku testované látky. Objem média byl volen podle charakteru testu, a to 10 – 100 ml; lahve byly plněny tak, aby objem plynné fáze v lahvi tvořil minimálně tři čtvrtiny objemu. Dále byly kultivační lahve zaočkovány 10 – 100 µl čisté kultury bakterií, připravené ve sterilním MM ve formě suspenze, se zákalem odpovídajícím 2. stupni McFarlandovy stupnice; v případě potřeby byl přidán PQQ či vitaminy. V některých případech nebyly kultivační lahve zaočkovávány čistými kulturami bakterií, ale také konsorcií bakterií, kalovým inokulem, inokulem říční vody, případně kombinací uvedených inokul. Kultivace lahví byla prováděna ve tmě, při 25 °C, na třepačce, po dobu min. 7 dnů, dle charakteru pokusu. Průběh biodegradace byl sledován ve zvolených časových intervalech a odebrané vzorky byly analyzovány vybranými a níže uvedenými metodami, v závislosti na rozkládané látce.

Spektrofotometrické stanovení koncentrace poly(vinylalkoholu)

Spektrofotometrické stanovení koncentrace PVA bylo prováděno metodou v mikrotitračních destičkách, kdy byl do jednotlivých jamek sloupců destičky dávkován supernatant centrifugovaných vzorků o objemu 20 µl, k němuž bylo dále přidáno 42 µl roztoku kyseliny borité a 10 µl roztoku jodu s jodidem draselným. Následně byla na přístroji TECAN měřena absorbance vzniklého

tmavě zeleného zabarvení směsi PVA s trijodidem. Měření bylo prováděno při vlnové délce 660 nm, při nastavení přístroje na 20 sekund míchání a 5 sekund klidu. Nejdříve byla změřena absorbance prázdné destičky, poté destička se vzorky a od hodnot absorbance destičky se vzorky byly odečteny hodnoty prázdné destičky. Tyto výsledné hodnoty pro jednotlivé vzorky byly zprůměrovány a dosazeny do rovnice kalibrační přímky, viz *Obr. 3.1*. Tímto způsobem byla stanovena koncentrace PVA v mg/l.

Kalibrační závislost byla zjištěna měřením předem připravených roztoků PVA o určitých koncentracích. Po zpracování kalibrační závislosti byla získána rovnice kalibrační přímky, jež sloužila pro výpočet koncentrace PVA.



Obr. 3.1: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVA

Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC)

Před tímto stanovením byla nejdříve z odebraných vzorků odstraněna biomasa buněk, buďto centrifugací (10 000 g, 25 °C, 10 minut) nebo filtrací přes filtry Millex GS Filter Unit 0,22 µm. Získaný supernatant byl dále naředěn podle předpokládané koncentrace substrátu a analyzován na analyzátoru uhlíku Shimadzu. Princip stanovení celkového uhlíku (TC) spočívá v oxidaci veškerého uhlíku obsaženého ve vzorku ve spalovací trubici s platinovým katalyzátorem při teplotě 680 °C v proudu kyslíku. Vzniklý oxid uhličitý je veden do nedisperzního infračerveného (NDIR) detektoru, kde je signál vznikající absorpcí příslušné vlnové délky zaznamenán jako plocha píku, která je přímo úměrná koncentraci celkového uhlíku ve vzorku. Při stanovení anorganického uhlíku (IC) dochází k dávkování vzorku v proudu kyslíku na inertní nosič s kyselinou fosforečnou, kde dochází k vytěsnění CO₂. Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) je nakonec získána odečtením koncentrace IC od koncentrace TC.

Měření zákalu degradačních suspenzí OD₆₀₀

Jako ukazatel růstu mikroorganismů byl v průběhu degradace sledován vznikající zákal. Po promíchání bylo z lahví, ve kterých probíhala degradace, odebráno malé množství vzorku, u kterého byl pomocí dvou-paprskového spektrofotometru Unicam při vlnové délce 600 nm měřen zákal.

Měření pH média

Hodnoty pH byly měřeny pH metrem inoLab se skleněnou elektrodou.

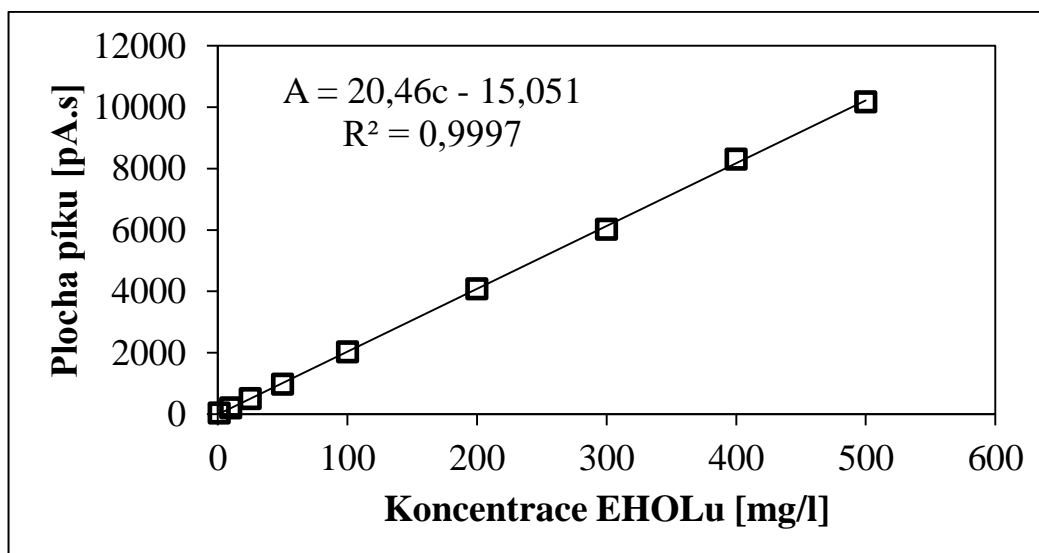
Stanovení počtu buněk

V rámci některých pokusů probíhalo stanovování počtu buněk, a to buď přímo, počítáním jednotlivých buněk v počítacích komůrkách Cyrus II pomocí mikroskopu Olympus CX 41, nebo nepřímo plotnovou metodou. Ve druhém případě byl z degradačních lahví asepticky odebrán dobře promíchaný a protřepaný vzorek, který byl dále ředěn desetinnou řadou ve fyziologickém roztoku a jednotlivá ředění byla následně vyočkována na dvě paralelní misky s R2A agarem. Misky byly kultivovány po dobu 48 hodin při teplotě 25 °C ve tmě; po uplynutí této doby byly vybrány misky ředění vhodné pro odečet a byl odečten počet kolonií. Zjištěný počet kolonií byl u paralelních misek zprůměrován a přepočten na CFU/ml.

Stanovení koncentrace 2-ethylhexanolu pomocí SPE-GC

Extrakce EHOLu z vodných vzorků a jeho případné zakoncentrování bylo docíleno metodou extrakce na pevnou fázi (SPE – solid phase extraction), pomocí aparatury VacMasterTM 10 a SPE kolonek Isolute C18 (100 mg/3 ml, Biotage); jako eluční činidlo byl používán hexan. Koncentrace získaného analytu byla následně stanovena pomocí plynového chromatografu (GC), vybaveného kapilární kolonou HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm film) a plamenově ionizačním detektorem. Při analýze byly injektovány 2 µl vzorku, při nastavení split 1:1, teplota injektoru 240 °C, teplota detektoru 270 °C. Počáteční teplota kolony při analýze byla nastavena na 80 °C po dobu 1 min, s následným zvyšováním teploty o 8 °C/min na teplotu 120 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium, rychlost průtoku byla 2,6 ml/min.

Návratnost EHOLu u použitých kolonek byla zjištěna měřením roztoků o známých koncentracích a je 97 %. Pro hodnocení výsledných koncentrací EHOLu byla vytvořena kalibrační křivka (1 – 500 mg/l), která je znázorněna na *Obr. 3.2*.



Obr. 3.2: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci EHOLu

3.2.2 Získání čistých degradačních kultur

Izolace čistých degradačních kultur probíhala z tekutého média s aktivovaným kalem, adaptovaným na daný substrát. Do 50 ml MM s vitaminy bylo přidáno 5 ml aktivovaného kalu a substrát o vstupní koncentraci 500 mg/l; suspenze byla kultivována po dobu 21 dní ve tmě na třepačce při teplotě 25 °C. Po adaptaci byla část suspenze šetrně protřepána za přidání sterilního mořského písku z důvodu lepší desintegrace vloček a sériově ředěna fyziologickým roztokem až na ředění 10⁻⁵. Vybraná ředění pak byla očkovaná do lahví s 50 ml čerstvého sterilního MM s vitaminy a substrátem o stejné vstupní koncentraci. Takto připravené lahve byly kultivovány po dobu 7 dní ve tmě na třepačce při teplotě 25 °C. Po kultivaci byly suspenze vyočkovány křížovým roztěrem na TYA nebo R2A agar. Jednotlivé, morfologicky se lišící kolonie, byly postupně přeočkovány a získané čisté kultury byly ověřeny na schopnost rozkladu; aktivní kmeny byly zakonzervovány v glycerolu při -80 °C.

3.2.3 Studium vlastností získaných degradačních kultur

U každé ze získaných čistých bakteriálních kultur bylo v první řadě provedeno Gramovo barvení dle Harrigana (1998), jehož výsledek byl potvrzen KOH testem. Dále byly kultury podrobeny dalším, níže uvedeným testům.

Základní biochemické testy

K identifikaci jednotlivých kultur izolovaných bakterií byly mj. použity biochemické testy, které jsou založeny na detekci některých významných enzymů či metabolických drah (Harrigan, 1998). Šlo o tyto testy:

- Test na přítomnost katalázy
- Test na přítomnost cytochromoxidázy
- Oxidačně – fermentační test

Růstové testy

Byl sledován růst kultur v závislosti na:

- **Koncentraci substrátu** (20 – 1000 mg/l 2-ethylhexanolu, 20 – 1000 mg/l 2-ethylhexanalu, 200 – 2000 mg/l kyseliny 2-ethylhexanové, 100 – 1000 mg/l poly(vinylalkoholu))
- **Využívání různých substrátů** (methanolu, ethanolu, propanolu, butanolu, pentanolu, hexanolu, oktanolu, glycerolu; také na salicylanu sodném, octanu sodném či butyrátu sodném; 2-ethylhexanalu, kyselině 2-ethylhexanové)

Testy utilizace různých substrátů a testy závislosti na koncentraci substrátu byly prováděny v tekutém médiu. Do sterilních kultivačních lahví s obsahem MM byly dávkovány vitaminy a zkoumavý substrát; dále byly lahve zaočkovány bakteriální suspenzí zkoumané čisté kultury a kultivovány ve tmě na třepačce při teplotě 25 °C po dobu odpovídající charakteru pokusu. V pokusech byly nasazeny vždy dvě paralelní lahve a kontrola. U lahví byl sledován vznikající zákal a výsledky byly vyhodnocovány převážně na základě vizuálního pozorování.

➤ **pH (5 – 10)**

Závislost růstu kultur na pH byla sledována v minerálním médiu, kde byly zásobní roztoky fosforečnanů (A a B) dávkovány dle Rabinoviče a Chavina (1985) tak, aby bylo dosaženo požadované hodnoty pH; případně byla tato hodnota ještě upravena pomocí NaOH nebo HCl. Po sterilizaci takto připraveného média byly do jednotlivých lahví dávkovány vitaminy, růstový substrát a lahve byly inokulovány. Kultivace probíhala na třepačkách ve tmě při teplotě 25 °C a růst byl hodnocen vizuálně ve zvolených časových intervalech.

➤ **Teplotě (5 – 45 °C)**

Vybrané čisté kultury byly kultivovány na R2A agarech v prostředích s různou teplotou, růst kultur byl hodnocen vizuálně.

➤ **Koncentraci NaCl (0 – 10 hm. %)**

Vybrané čisté kultury byly kultivovány ve tmě v termostatu při 25 °C na R2A agarech obohacených o přídavky různých koncentrací NaCl; růst kultur byl hodnocen vizuálně.

➤ Denitrifikační test

Schopnost denitrifikace vybraných čistých kultur byla sledována v minerálním médiu s přídavkem 500 mg/l KNO₃. Sterilní médium včetně vitamínů a substrátu bylo naplněno do sterilních vysokých zkumavek, do kterých byla dnem vzhůru umístěna Durhamova zkumavka, taktéž naplněná médiem; nakonec byly zkumavky inokulovány. Kultivace probíhala v klidu ve tmě při teplotě 25 °C a tvorba plynu byla hodnocena vizuálně ve zvolených časových intervalech.

Stanovení potenciální toxicity produktů biodegradace PVA na respirační aktivitu vybraných čistých kultur

Byla měřena potenciální toxicita supernatantu, získaného po rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas* sp. OT2, jak na samotnou kulturu, tak na kulturu *Escherichia coli* CCM 3954.

Supernatant z rozkladu polymeru byl získán z degradace 1000 mg/l PVA v MM2 s přídavkem PQQ. Po desetidenním rozkladu byl supernatant získán centrifugací (10 000 g, 4 °C, 10 minut) a před dalším použitím uchovávan v chladu. Pro kontrolní pokus sloužil supernatant, v němž nebyla předpokládána přítomnost potenciálních toxických metabolitů. Jako takový byl použit supernatant získaný z růstu kultury OT2 v MM2 s tryptonem (0,5 g/l tryptonu, kultivace 7 dní). Zásobní suspenze buněk (se sušinou nejméně 1 g/l), na nichž byla potenciální toxicita supernatantu testována, byly připraveny z čistých kultur, kultivovaných na MA s tryptonem, v případě kultury OT2 po dobu 6 dní a u kultury *E. coli* 3954 po dobu 24 hodin. Jako substrát při respiraci byl použit trypton o koncentraci 1 g/l.

Při samotném pokusu byl určitý objem supernatantu spolu se zásobní suspenzí buněk testované kultury a substrátem 30 minut (případně 24 hodin) provzdušňován a tato suspenze byla poté převedena do uzavřené a magnetickým míchadlem míchané respirační cely. V ní byla měřena koncentrace kyslíku pomocí oximetru opatřeného kyslíkovou elektrodou po zvolenou dobu, obvykle 5 – 7 minut. Z naměřených dat byly vypočteny hodnoty specifické respirační rychlosti a po porovnání s hodnotami kontrolního pokusu i procentuální hodnoty inhibice, dle ČSN EN ISO 8192 (2007). Pro výpočet specifické respirační rychlosti R_S (mg.O₂/h.g) byl použit následující vztah:

$$R_S = \frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{s} \quad (3.1)$$

Kde dS je změna v koncentraci O₂ za daný časový interval dt (pro výpočet byla použita směrnice přímky z rovnice lineární regrese), s je sušina buněk v g/l.

Pro výpočet inhibice I (%) byl použit následující vztah:

$$I = \frac{R_{SK} - R_{ST}}{R_{SK}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

Kde R_{SK} je specifická rychlost spotřeby kyslíku u kontrolní suspenze a R_{ST} specifická rychlost spotřeby kyslíku u zkušební suspenze.

3.2.4 Molekulárně biologické metody

Izolace DNA

Izolace DNA z biomasy čistých kultur probíhala za použití komerčně dostupného kitu PowerSoil™ DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc., podle návodu poskytnutého výrobcem.

Úspěšnost izolace DNA byla kontrolována zjištěním čistoty a koncentrace DNA (v ng/μl) pomocí destičkového spektrofotometru TECAN Infinite M200, kde probíhalo měření při vlnových délkách 260 – 280 nm dle Barbase *et al.* (2001). Hodnoty absorbance naměřené při 260 nm prezentují koncentraci DNA, při 280 nm její čistotu, přičemž za čistou DNA je považován vzorek s hodnotami poměru absorbancí v rozmezí 1,8 až 2.

Polymerázová řetězová reakce

Získaná DNA byla dále amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Byly vybrány vhodné primery, teplota jednotlivých kroků PCR a počet cyklů. Po připravení reakčních směsí probíhala PCR v termocykleru.

Po provedení PCR byla provedena kontrola PCR amplikonů pomocí gelové elektroforézy, která probíhala na 1% agarosovém gelu v prostředí trisacetátového pufru, při napětí 90 V, po dobu přibližně 30 minut (v závislosti na délce produktu). Poté byl gel přenesen do UV-transiluminátoru, kde bylo provedeno vyhodnocení po osvětlení gelu UV zářením.

Získaná amplifikovaná DNA byla dále purifikována pomocí High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), dle návodu poskytnutého výrobcem, a úspěšnost procesu byla kontrolována zjištěním čistoty a koncentrace DNA. Vzorky byly dále odeslány na sekvenaci a na základě získaných sekvencí 16S rDNA byly kultury identifikovány pomocí programu BLAST na webových stránkách NCBI (BLAST, 2017).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Biodegradabilita poly(vinylalkoholu)

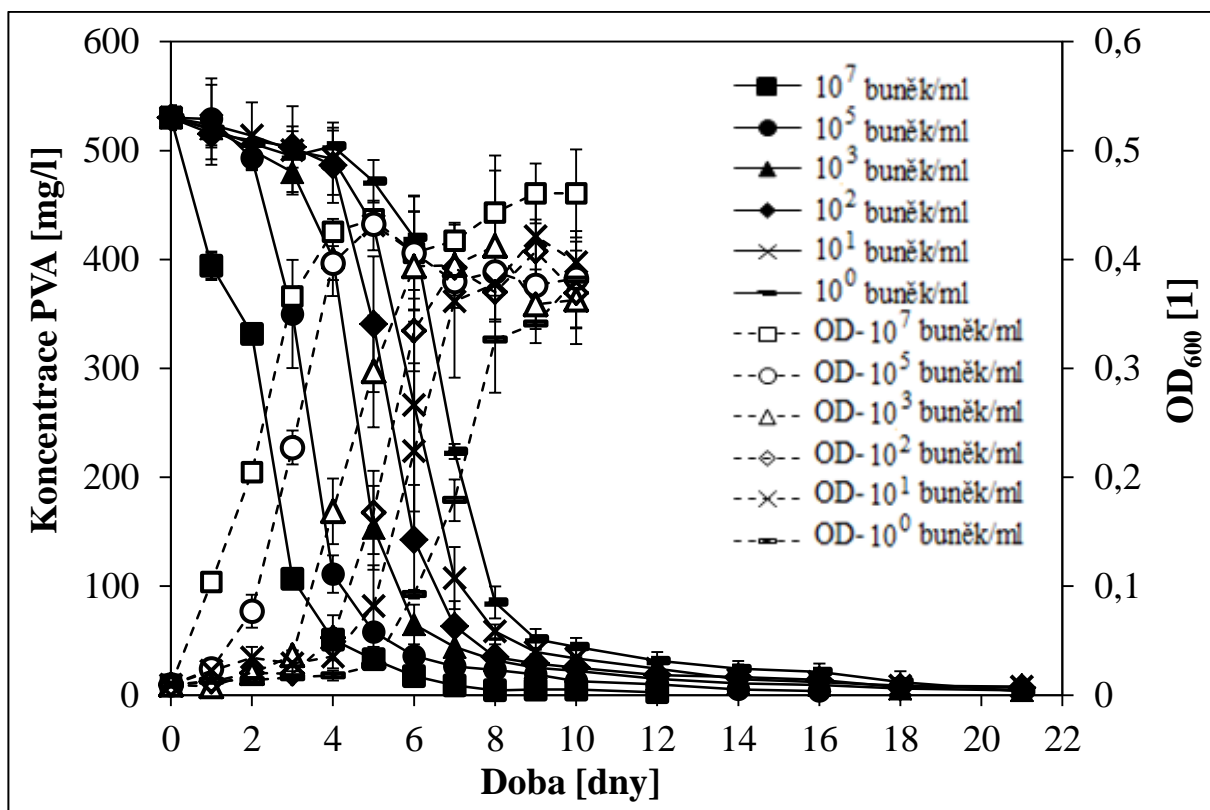
První část dizertační práce byla věnována experimentům bakteriálního rozkladu poly(vinylalkoholu) dvěma kulturami rodu *Sphingomonas*. Tyto kultury byly získány již v předchozích letech v průběhu výzkumných prací na ÚIOŽP, a to ze vzorků z ČOV Otrokovice (kultura OT2) a ČOV Zlín – Malenovice (kultura JK2). Jsou dlouhodobě uloženy v mikrobiologické laboratoři FT UTB. Zaměření testů bylo zvoleno tak, aby zahrnovalo problematiku dosud neřešenou v oblasti biodegradace PVA.

4.1.1 Sledování biodegradace poly(vinylalkoholu) kulturami *Sphingomonas* sp. JK2 a OT2 v závislosti na míře inokulace

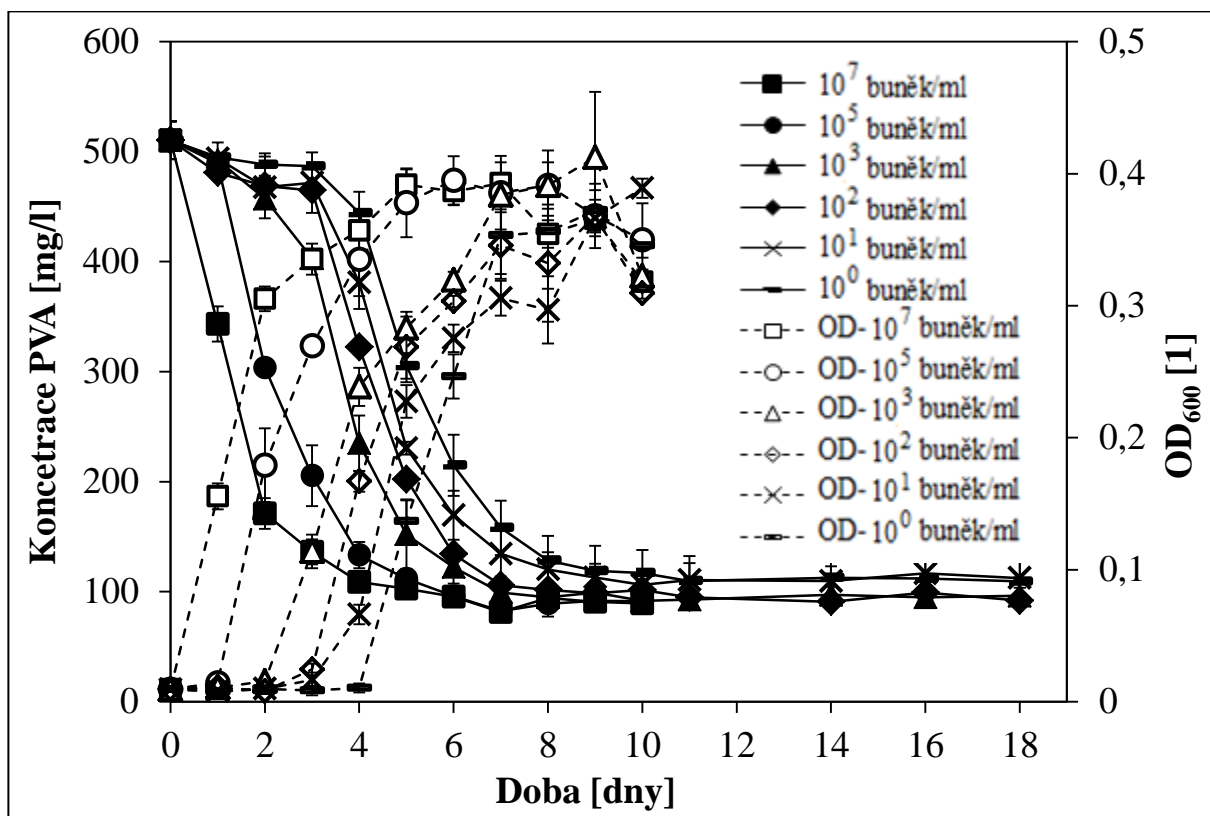
V těchto experimentech byl sledován průběh mikrobiálního rozkladu poly(vinylalkoholu) kulturami *Sphingomonas* sp. JK2 a OT2 v závislosti na míře inokulace. Byly uskutečněny dva rozsáhlejší experimenty, přičemž v každém z nich bylo nasazeno šest sérií minerálních médií s 500 mg/l PVA, vždy se třemi paralelními lahvemi. Každá série byla zaočkována jiným množstvím buněk degradačních kultur tak, aby jejich koncentrace na začátku pokusu činila v jednotlivých sériích 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10^1 a 10^0 buněk/ml.

V pokusu s kulturou JK2 bylo použito MM, naopak u pokusu s kulturou OT2 bylo použito MM2, které bylo v práci Ošťádalové (2010) zjištěno jako optimální pro růst dané kultury. V průběhu pokusu byly ve zvolených časových intervalech odebírány vzorky pro stanovení koncentrací PVA, DOC a pro měření OD_{600} .

Výsledky koncentrací PVA a hodnot OD_{600} v průběhu obou pokusů jsou znázorněny na *Obr. 4.1* (rozklad kulturou JK2) a *Obr. 4.2* (rozklad kulturou OT2). Hodnoty uvedené v grafech odpovídají průměrům stanovení ze tří paralelních lahví; chybové úsečky jsou rovny směrodatným odchylkám.



Obr. 4.1: Biodegradace PVA kulturou *Sphingomonas sp. JK2* v závislosti na míře inokulace



Obr. 4.2: Biodegradace PVA kulturou *Sphingomonas sp. OT2* v závislosti na míře inokulace

Na *Obr. 4.1* a *Obr. 4.2* lze pozorovat pokles koncentrací PVA a nárůst OD_{600} v průběhu pokusů, dokumentující, že obě testované kultury jsou schopny rozkladu a utilizace polymeru. Výsledky stanovení koncentrací DOC dobře korespondovaly s koncentracemi PVA (polymer obsahuje cca 54 % uhlíku), s výjimkou finálních fází rozkladu, kde se již hromadily metabolity kultur (data neuvedena).

Celkově výsledky ukázaly, že při použití největších inokul, obsahujících 10^7 buněk/ml, docházelo u obou kultur k poměrně rychlému rozkladu; velká část polymeru byla odstraněna již během prvních 4 dnů experimentu, přičemž biodegradace započala již během 24 hodin. S klesající velikostí inokul však docházelo k mírnému prodlužování úvodních fází rozkladu (odpovídajících lagové fázi a fázi zrychleného růstu), a to na přibližně 5 – 6 dnů u kultury JK2 a na 4 dny u kultury OT2 u nejmenších inokul 10^0 buněk/ml. Teprve poté, po dosažení určité hustoty buněk, následovaly exponenciální fáze utilizace PVA. Pokusy tak prokázaly, že úspěšná degradace polymeru může nastávat i v přítomnosti minimálních inokul, v řádu jednotlivých buněk degradačních kultur v 1 ml média.

Skutečné množství bakteriálních degradérů v kontaminovaných matricích může obecně hrát zásadní roli pro zahájení biodegradčního procesu a následnou rychlost odstraňování znečišťujících látek. Toto téma již bylo zkoumáno v rámci několika studií, avšak z jejich výsledků nelze vyvodit jednoznačný závěr. Některé výzkumy ukázaly významný vliv velikosti inokul na proces biodegradace. Například Ramadan *et al.* (1990) zjistili, že *Pseudomonas cepacia* je schopna mineralizovat p-nitrofenol v jezerní vodě po inokulaci $3,3 \cdot 10^4$ a $3,6 \cdot 10^5$ buněk/ml, přičemž rozdíl rychlosti degradace mezi těmito inokuly byl minimální, zatímco po inokulaci $3,3 \cdot 10^2$ buněk/ml prakticky žádná mineralizace zjištěna nebyla. Podobně Miethling a Karlson (1996) popisují významnou mineralizaci pentachlorofenolu kulturou *Sphingomonas chlorophenolica* RA2 v půdě, po inokulaci 10^8 buněk/g; použití inokula 10^6 buněk/g vedlo k významnému snížení rychlosti mineralizace a u inokula 10^4 buněk/g se již výsledky významně nelišily od negativní kontroly.

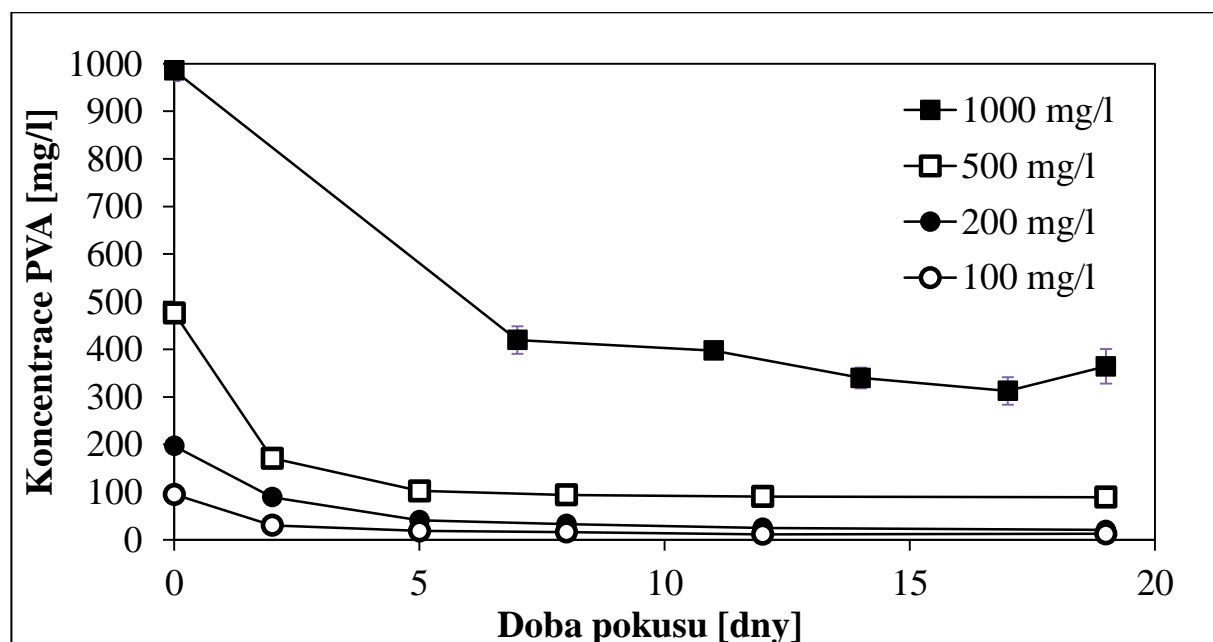
Naopak, ve studiích Chena *et al.* (2008) a Ayeda *et al.* (2009) měly velikosti inokul na biodegradaci zkoumaných látek pouze zanedbatelný vliv. Chen *et al.* (2008) uvádí, že vliv velikosti inokula *Sphingomonas* sp. (10^3 – 10^6 MPN/g) na degradaci fenanthrenu byl méně významný než například vliv salinity. Obdobně Ayed *et al.* (2009) neprokázali zásadní vliv velikosti inokula *Sphingomonas paucimobilis* (v rozmezí 0,001 až 1,0 OD) na rychlost biodegradace malachitové zeleně.

Podobné výsledky lze vyvodit i z této práce, která je první prací zkoumající tak širokou škálu velikostí inokul; z tohoto hlediska je dosažení úspěšné biodegradace PVA s minimálními velikostmi inokul slibným zjištěním. Výsledky naznačují, že proces biodegradace by mohl probíhat v různých vodních prostředích, včetně těch s omezenými bakteriálními komunitami,

samozřejmě za předpokladu přítomnosti buněk s odpovídajícím enzymovým vybavením. Tento výsledek je pravděpodobně dán také nízkou toxicitou PVA. Je třeba poznamenat, že ve vědecké literatuře neexistují žádné známky o toxickém působení, které by tento polymer při použitých koncentracích proti bakteriím vykazoval. Je tak možno se domnívat, že tato nízká toxicita představuje rozhodující faktor při biodegradaci PVA minimálními inokuly, v porovnání s výsledky některých biodegradací, zmíněných výše, kde použití malých inokul vedlo k výraznému snížení míry degradace polutantů.

Obě série pokusů s inokuly ukázaly určitý rozdíl v účincích obou zkoumaných kultur. Biodegradace PVA kulturou *Sphingomonas* sp. JK2 proběhla během 7 až 14 dní pokusu, přičemž rozklad byl vždy prakticky kompletní. U kultury *Sphingomonas* sp. OT2 však ke kompletnímu rozkladu nedocházelo; i při použití největších inokul došlo k degradaci přibližně 80 % polymeru. Obdobný výsledek byl při rozkladu poly(vinylalkoholu) bakteriemi ze skupiny sfingomonád pozorován i jinými autory (Tokiwa *et al.*, 2001; Huixing *et al.*, 2010), bez objasnění tohoto jevu, a bylo proto rozhodnuto pokusit se tento aspekt vysvětlit.

V dalším pokusu byl proto sledován vliv koncentrace PVA na rozklad tohoto polymeru kulturou OT2, v rozmezí 100 až 1000 mg/l. V průběhu pokusu byla měřena koncentrace PVA, jejíž hodnoty jsou znázorněny na Obr. 4.3, a dále koncentrace DOC. Hodnoty koncentrace PVA v grafu opět odpovídají průměru stanovení ze tří paralelních lahví; chybové úsečky jsou rovny směrodatným odchylkám.



Obr. 4.3: Biodegradace různých koncentrací PVA kulturou *Sphingomonas* sp. OT2

Z Obr. 4.3 vyplývá, že čím vyšší byla vstupní koncentrace PVA v médiu, tím vyšší byl také procentuální podíl jeho nerozloženého zbytku; hodnoty DOC zjištěné v průběhu pokusu odpovídaly procentuálnímu zastoupení uhlíku

v PVA. Zatímco u nižších vstupních koncentrací PVA byl podíl nerozloženého polymeru velmi podobný, přibližně 12 % u 100 mg/l a 10 % u 200 mg/l; u vyšších koncentrací byl tento podíl významnější, a to přibližně 19 % u koncentrace 500 mg/l a dokonce 37 % nerozloženého PVA u koncentrace 1000 mg/l.

Podobný trend byl zaznamenán i v již zmíněné práci Huixinga *et al.* (2010), při hledání optimálních podmínek pro degradaci PVA kulturou *Pseudomonas sp. yc02*. Největší míra biodegradace byla zaznamenána při rozkladu 250 mg/l, kde podíl nerozloženého polymeru tvořil pouze 5,5 %; s rostoucí koncentrací PVA pak docházelo ke zvyšování nerozloženého podílu, a to až na přibližně 55 % u koncentrace 3000 mg/l.

Následující pokusy byly věnovány snahám o objasnění tohoto jevu. Při rozkladu vysokých koncentrací PVA došlo k procentuálně nejnižšímu rozkladu polymeru, ale z absolutního pohledu bylo rozložené množství polymeru nejvyšší, proto byl vyloučen případný vliv nedostatku nutrientů u nižších koncentrací. Mikrobiální rozklad polymerů však obecně ovlivňuje celá řada dalších faktorů prostředí, mimo jiné také pH nebo toxicita metabolitů; další pokusy tak byly nejprve směřovány k ovlivnění pH v průběhu degradace.

4.1.2 Vliv úpravy pH v průběhu degradace poly(vinylalkoholu)

Cílem prvního pokusu této části bylo zjistit, zda a jak se mění pH v průběhu rozkladu PVA oběma kulturami.

V experimentu byly nasazeny dvě série MM s 500 mg/l PVA, vždy se třemi paralelními lahvemi, které byly inokulovány buď kulturou JK2, nebo OT2. V průběhu pokusu byly ve zvolených časových intervalech odebírány vzorky, u nichž byla měřena koncentrace PVA a pH. Vlastní rozklad polymeru proběhl velmi podobně jako ve výše uvedených pokusech – koncentrace PVA u kultury JK2 klesla z výchozí hodnoty 539 ± 18 mg/l na 6 ± 2 mg/l na konci pokusu, u kultury OT2 došlo k poklesu koncentrace z počáteční hodnoty 489 ± 11 mg/l na konečnou hodnotu 99 ± 7 mg/l. Hodnoty pH v průběhu pokusu jsou uvedeny v Tab. 4.1. a odpovídají průměru stanovení ze tří paralelních lahví.

Tab. 4.1: Změna pH v průběhu utilizace PVA kulturami OT2 a JK2

Doba pokusu [dny]	MM1 + JK2	MM2 + OT2
0	7,22 ± 0,00	7,35 ± 0,00
3	6,40 ± 0,05	6,34 ± 0,01
7	6,42 ± 0,05	6,38 ± 0,03
11	6,42 ± 0,02	6,46 ± 0,02

Z Tab. 4.1 vyplývá, že u obou kultur dochází v průběhu růstu na PVA velmi obdobně ke snížení pH přibližně o jeden stupeň. Z výsledků provedených degradačních testů je pak zřejmé, že kultura JK2 není tímto poklesem nijak

ovlivněna, jelikož je i přesto schopna kompletního rozkladu polymeru. V případě kultury OT2 tomu však tak není; je však otázkou, zda příčinou neúplné degradace je právě tento pokles pH.

Dosavadní vědecké studie zabývající se rozkladem PVA bakteriemi rodu *Sphingomonas* se věnovaly spíše vlivu počáteční hodnoty pH než sledováním změn pH v průběhu. Například při symbiotickém rozkladu kulturou *Sphingomonas* sp. SA3 a kulturou SA2 (Kim *et al.*, 2003) bylo jako optimální počáteční pH zjištěno pH 8, kdy došlo ke kompletnímu rozkladu PVA; u počátečních pH 7 a níže i pH 8,5 a výše však již docházelo ke značnému snížení míry rozkladu.

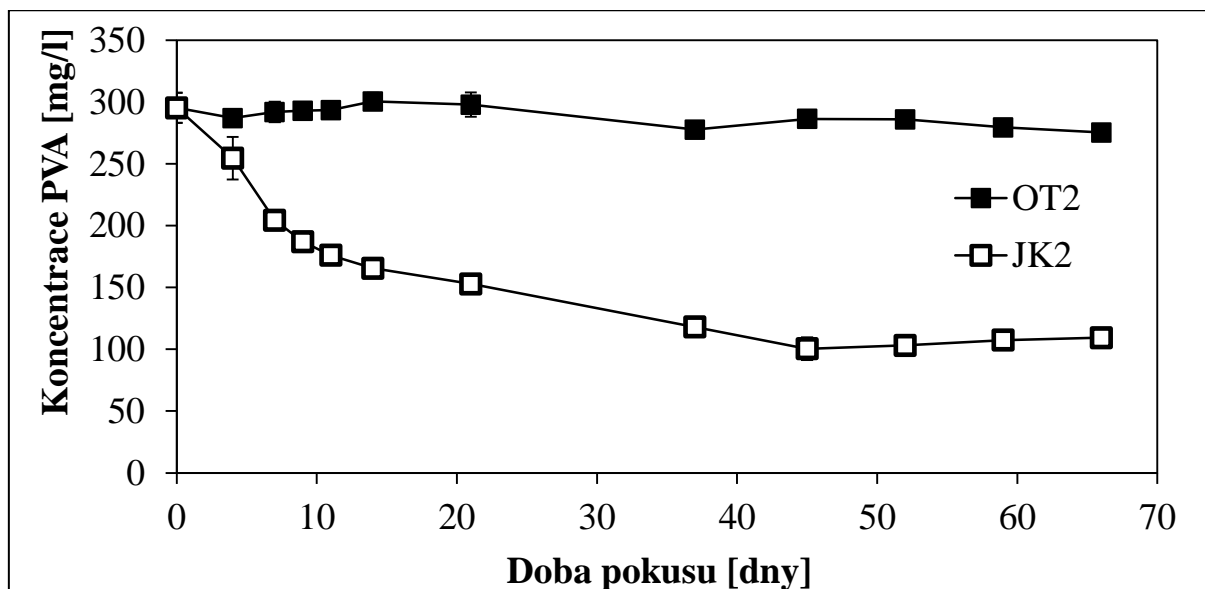
Z tohoto důvodu byl v dalším pokusu sledován rozklad PVA kulturou OT2 v přítomnosti malého množství uhličitanu vápenatého, který by sloužil pro zmírnění poklesu pH v průběhu procesu. Při experimentu byly nasazeny dvě série MM2 s 1000 mg/l PVA, vždy se třemi paralelními lahvemi; obě série lahví byly zaočkovány bakteriální suspenzí kultury OT2 a do jedné série byl dávkován uhličitan vápenatý v koncentraci 100 mg/l. Bylo předpokládáno, že s vyšší vstupní koncentrací PVA bude docházet k výraznějšímu poklesu pH v průběhu. Ve zvolených časových intervalech odebírány vzorky, u nichž byla měřena koncentrace PVA a také pH; výsledky jsou uvedeny v *Tab. 4.2.* a odpovídají průměru stanovení ze tří paralelních lahví.

Tab. 4.2: Změna pH a koncentrace PVA v průběhu utilizace PVA kulturou OT2 s a bez přídavku CaCO₃

Doba pokusu [dny]	MM2 + OT2		MM2 + OT2 + CaCO ₃	
	pH [1]	Koncentrace PVA [mg/l]	pH [1]	Koncentrace PVA [mg/l]
0	7,44 ± 0,00	926 ± 23	7,24 ± 0,00	926 ± 23
3	6,83 ± 0,03	842 ± 10	7,05 ± 0,00	872 ± 27
7	6,02 ± 0,03	419 ± 30	6,35 ± 0,04	450 ± 14
11	6,12 ± 0,06	397 ± 11	6,42 ± 0,02	372 ± 17
14	6,19 ± 0,04	339 ± 22	6,52 ± 0,02	327 ± 15
24	6,26 ± 0,03	313 ± 29	6,79 ± 0,13	339 ± 8

U lahví s přídavkem uhličitanu vápenatého došlo v průběhu pokusu k menšímu poklesu pH než v případě lahví bez něj (o 0,3 – 0,5 jednotky), nicméně na míře rozkladu polymeru se toto prakticky neprojevilo, neboť opět došlo k úbytku přibližně 66 % polymeru, jak je patrné z *Tab. 4.2.* Pro určité další posouzení rozdílu mezi kulturami JK2 a OT2 byl po ukončení tohoto pokusu zbylý obsah všech degradačních lahví smíchán, centrifugován a filtrován přes membránový filtr; vzniklý supernatant byl využit pro nasazení dalšího pokusu. Koncentrace PVA v tomto supernatantu činila 295 ± 12 mg/l. Supernatant byl rozdělen do čtyř lahví; dvě byly opětovně zaočkovány čerstvou

kulturou OT2 a další dvě čerstvou kulturou JK2. V průběhu pokusu byly ve zvolených časových intervalech odebírány vzorky, u nichž byla měřena koncentrace PVA; její hodnoty jsou uvedeny na *Obr. 4.4* a odpovídají průměru stanovení ze dvou paralelních lahví; chybové úsečky jsou rovny směrodatným odchýlkám.



Obr. 4.4: Biodegradace zbytkového PVA v supernatantu kulturami OT2 a JK2

Z *Obr. 4.4* je patrné, že ani čerstvé buňky kultury OT2 nebyly dále schopny zbytek PVA přítomný v supernatantu rozkládat; byl zaznamenán pouze nepatrný pokles v koncentraci, odpovídající přibližně 20 mg/l. Naopak v případě kultury JK2 k rozkladu PVA, nerozloženého kulturou OT2, došlo, nicméně ani zde nebyla degradace kompletní a zastavila se na hodnotě přibližně 100 mg/l. Výsledky tohoto pokusu tak naznačily potenciální možnost přítomnosti toxických metabolitů, což bylo testováno v následujících pokusech.

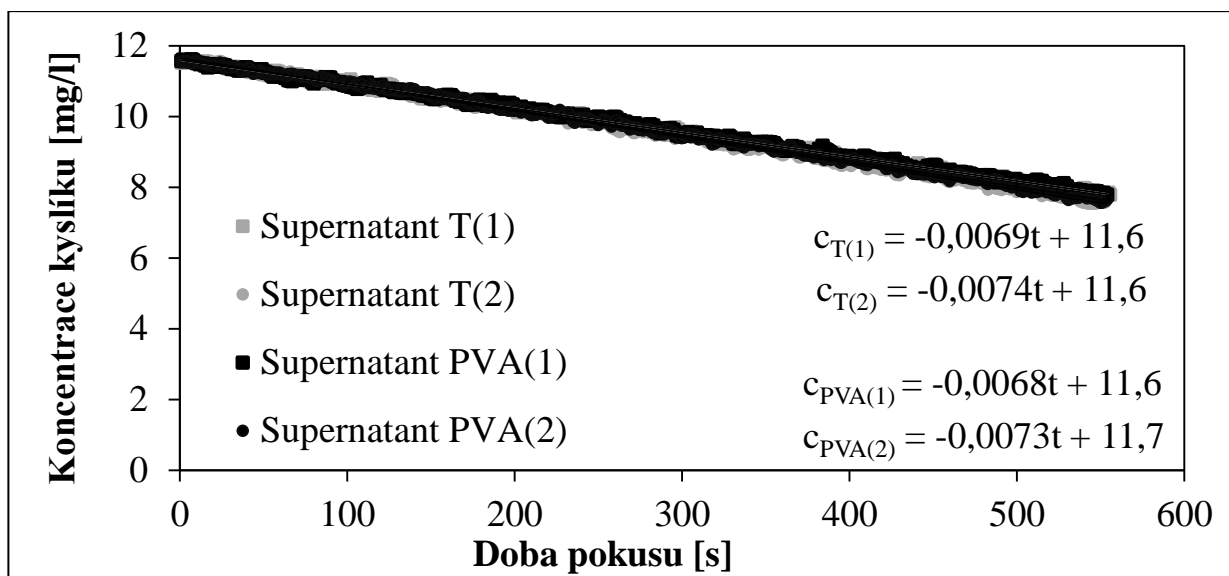
4.1.3 Posouzení potenciální toxicity metabolitů vznikajících v průběhu rozkladu poly(vinylalkoholu) kulturou *Sphingomonas* sp. OT2

Vzhledem ke zjištěním z předchozích pokusů bylo cílem následujících experimentů potvrzení či vyvrácení potenciální přítomnosti toxických produktů/metabolitů, vznikajících při rozkladu PVA kulturou OT2, tedy látek přítomných v supernatantu po odstranění buněk.

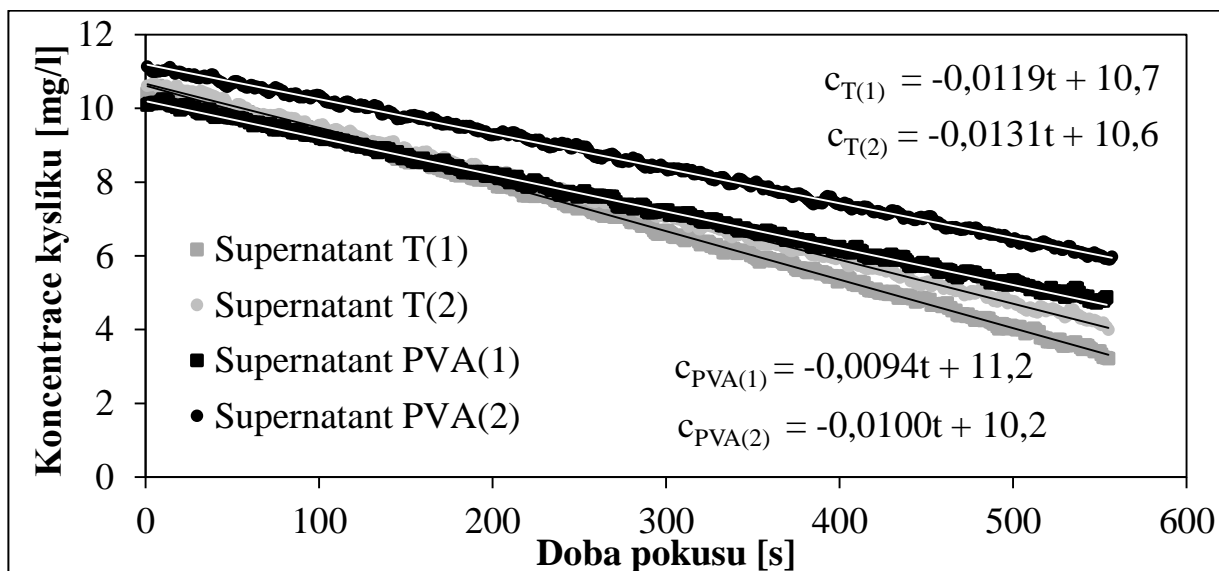
Pokusy stanovení potenciální toxicity metabolitů na respirační aktivitu čistých kultur

Nejprve byla měřena potenciální toxicita supernatantu, získaného po rozkladu PVA kulturou OT2, jak na čerstvé buňky OT2, tak na buňky kultury *Escherichia coli* CCM 3954. Buňky zkoumaných kultur, napěstované na pevných živných půdách, byly v pokusu vystaveny krátkodobému působení dvou supernatantů,

jednak supernatantu po degradaci PVA (Supernatant PVA), jednak kontrolnímu supernatantu po utilizaci tryptonu ve stejném MM (dále jen Supernatant T). Připravené suspenze byly provzdušňovány po dobu 30 minut, poté vždy převedeny do uzavřené, míchané respirační cely, kde byla měřena koncentrace kyslíku pomocí oximetru s kyslíkovou elektrodou. Úbytek koncentrace kyslíku v průběhu jednotlivých měření u kultury OT2 je znázorněn na *Obr. 4.5* a u kultury CCM 3954 na *Obr. 4.6*.



Obr. 4.5: Spotřeba kyslíku kulturou OT2 po 30-ti minutách expozice se supernatanty



Obr. 4.6: Spotřeba kyslíku kulturou CCM 3954 po 30-ti minutách expozice se supernatanty

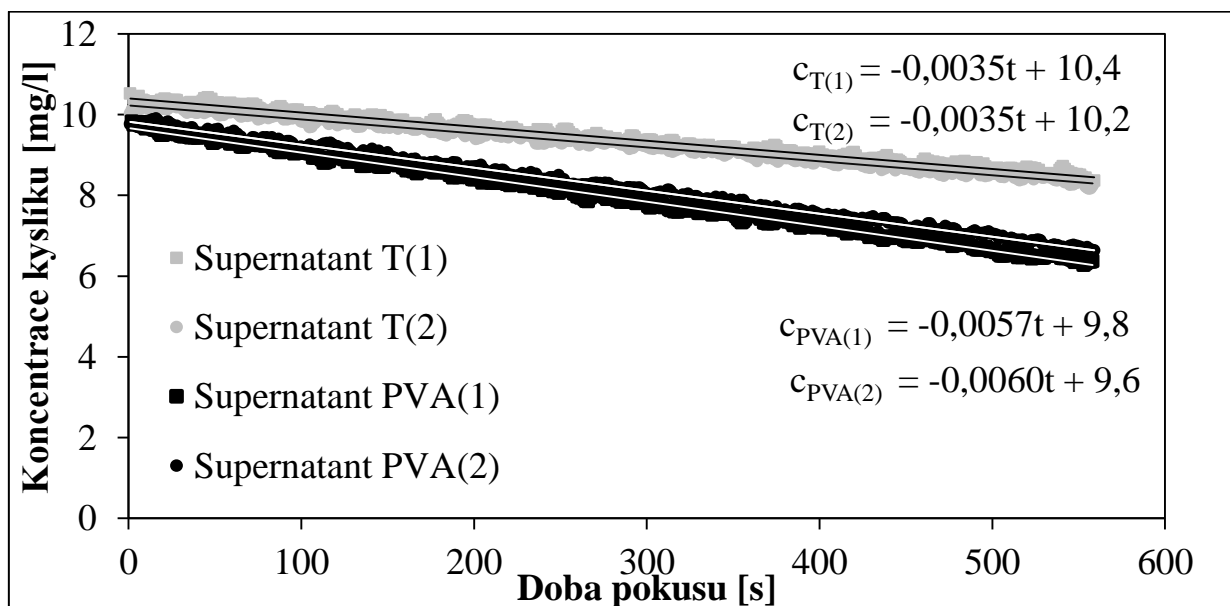
Ze získaných dat byly ze směrníc přímek lineární regrese u obou kultur a obou supernatantů vypočteny hodnoty specifických respiračních rychlostí (R_s). Pro výpočet R_s byly použity předem stanovené sušiny buněk, které činily 2,83 g/l u kultury OT2 a 1,31 g/l u kultury CCM 3954. Vypočtené hodnoty

R_s pro supernatanty PVA byly porovnány s hodnotami R_s pro supernatanty T a vypočtena míra inhibice (I) respirace buněk; tyto hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4.3.

Tab. 4.3: Hodnoty specifických respiračních rychlostí buněk a inhibice respirace po 30-ti minutách expozice buněk

Kultura	Měření	Směrnice	$\bar{O} R_s$ [mg.O ₂ /h.g]	$\bar{O} I$ [%]
<i>Sphingomonas</i> sp. OT2	Supernatant T(1)	-0,0069	45,55	0,00
	Supernatant T(2)	-0,0074		
	Supernatant PVA(1)	-0,0068	44,91	1,40
	Supernatant PVA(2)	-0,0073		
<i>E. coli</i> CCM 3954	Supernatant T(1)	-0,0119	171,61	0,00
	Supernatant T(2)	-0,0131		
	Supernatant PVA(1)	-0,0094	133,17	22,4
	Supernatant PVA(2)	-0,0100		

Výsledky uvedené v Tab. 4.3 ukazují, že supernatant vzniklý po rozkladu PVA kulturou OT2 nepůsobil na respirační aktivitu kultury čerstvých buněk *Sphingomonas* sp. OT2 inhibičně; avšak, mírně inhibičně působil na respirační aktivitu buněk *E. coli* CCM 3954. Protože v případě přítomnosti toxických látek hraje důležitou roli doba expozice buněk, byl proveden druhý pokus, tentokrát již pouze s kulturou OT2, kde byla sledována respirační rychlost buněk po prodloužené době kontaktu buněk s oběma supernatanty. V tomto případě byla expozice buněk před měřením respirační rychlosti prodloužena na 24 hodin; výsledky pokusu jsou znázorněny na Obr. 4.7 a v Tab. 4.4. Sušina buněk kultury OT2 byla 1,08 g/l.



Obr. 4.7: Spotřeba kyslíku kulturou OT2 po 24 hodinách expozice se supernatanty

Tab. 4.4: Hodnoty specifických respiračních rychlostí buněk a inhibice respirace po 24 hodinách expozice

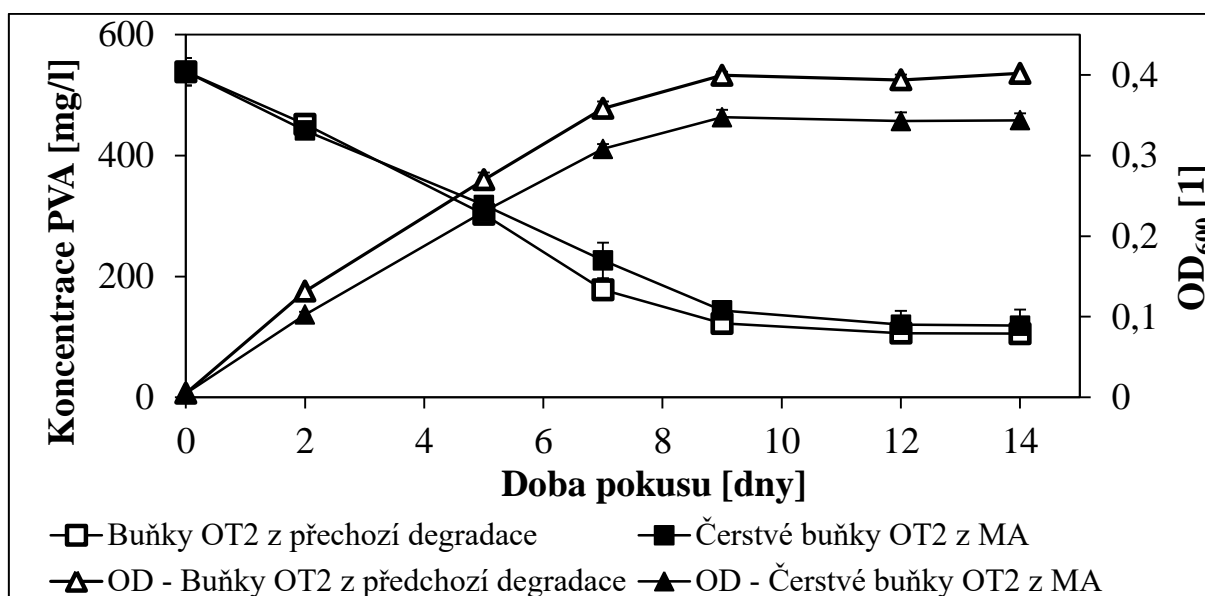
Kultura	Měření	Směrnice	$\bar{O} R_s$ [mg.O ₂ /h.g]	$\bar{O} I$ [%]
<i>Sphingomonas</i> sp. OT2	Supernatant T(1)	-0,0035	57,26	0,00
	Supernatant T(2)	-0,0035		
	Supernatant PVA(1)	-0,0057	99,59	-71,43
	Supernatant PVA(2)	-0,0060		

Proti očekávání nebylo zjištěno, že by dlouhodobá expozice supernatantu z degradace PVA vůči buňkám kultury OT2 vedla ke snížení jejich respirační rychlosti; naopak, byla zaznamenána výrazně vyšší hodnota této veličiny.

Celkově tak z pokusů respirace vyplynulo, že supernatant z rozkladu PVA kulturou OT2 neobsahuje látky inhibující respiraci dané kultury. I když toto zjištění nutně neznamenalo, že by nemohly být určité toxické látky přítomny, přesto vyvolalo potřebu ověřit degradační vlastnosti buněk OT2 z konce degradace PVA. Jinými slovy, bylo potřebné rozhodnout, zda problém zastavení rozkladu polymeru kulturou OT2 je dán vlastnostmi buněk v závěru procesu nebo charakterem prostředí, v němž se tyto buňky nachází. Tomuto zjištění tak byl věnován následující pokus.

Opakovaná degradace poly(vinylalkoholu)

Cílem pokusu bylo použít pro rozklad PVA buňky, které by již jednou degradací tohoto polymeru prošly. V první části pokusu byla proto provedena biodegradace 500 mg/l PVA v MM2 a po zastavení rozkladu, tj. po přibližně 14 dnech, byly buňky z média zachyceny centrifugací, promyty čerstvým médiem a použity jako inokulum v druhé části pokusu. V této části pokusu byly připraveny dvě série MM2 s 500 mg/l PVA, vždy se třemi paralelními lahvemi. První série lahví byla inokulována buňkami z předchozí degradace a série druhá buňkami, kultivovanými na minerálním agaru s tryptonem. Nejdůležitější výsledky jsou uvedeny na *Obr. 4.8*.



Obr. 4.8: Biodegradace PVA různými inokuly kultury OT2

Z Obr. 4.8 je patrné, že se průběh ani míra rozkladu PVA na konci pokusu u obou sérií od sebe zásadním způsobem neliší. Minimální rozdíl mezi inokuly byl pozorován i v případě měření OD₆₀₀, nepatrně vyšší hodnoty byly naměřeny u buněk OT2, které již uskutečnily degradaci. Koncentrace DOC v průběhu pokusu s buňkami kultury OT2, vystavenými předchozí degradaci, poklesla z hodnoty 264 ± 3 mg/l na hodnotu 67 ± 2 mg/l; u čerstvých buněk kultury OT2 z tryptonového agaru došlo k poklesu ze stejné vstupní koncentrace DOC na velmi blízkou hodnotu 74 ± 14 mg/l.

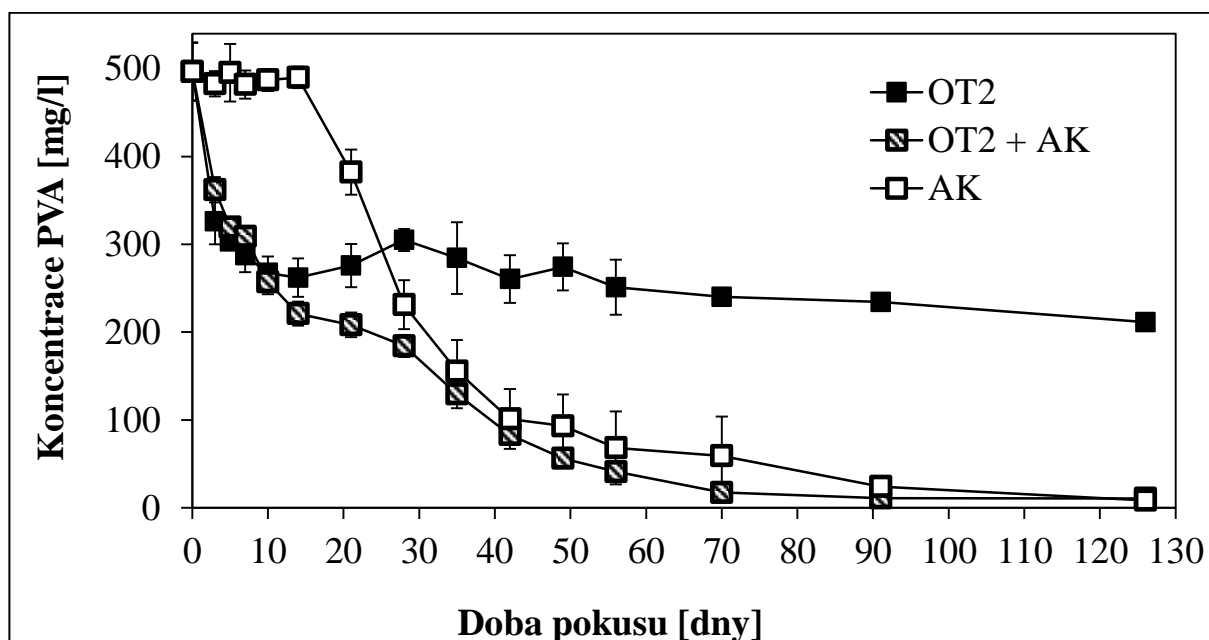
Tento pokus jednoznačně ukázal, že buňky kultury *Sphingomonas* sp. OT2, které uskutečnily předchozí degradaci PVA, nejsou tímto nijak negativně ovlivněny a jsou po přemístění do čerstvého prostředí schopny uskutečnit rozklad polymeru zcela srovnatelně s čerstvými buňkami. Zda je tak pozorované zastavení degradace PVA způsobeno hromaděním určitých metabolitů (z degradace PVA či jiných) nebo uvedeným mírným poklesem pH, či kombinací těchto faktorů, nelze jednoznačně posoudit. Bezpochyby zde sehrává významnou roli fakt, že experimenty probíhaly v uzavřeném prostředí, coby statické testy s čistou kulturou, což jsou podmínky, které v přirozeném prostředí prakticky neexistují (říční vody, čištění odpadních vod, apod.). Takové pokusy jsou však v laboratorních podmínkách používány zcela běžně, včetně autorů zkoumajících rozklad PVA bakteriemi rodu *Sphingomonas* (Tokiwa *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Václavková *et al.*, 2007).

Z těchto důvodů bylo rozhodnuto pokusit se o dosažení úplného rozkladu PVA kulturou OT2, v kombinaci s bakteriemi aktivovaného kalu nebo říční vody, a tím do jisté míry simulovat podmínky vnějšího prostředí, kde jsou cizorodé látky vystaveny působení většího spektra mikroorganismů.

4.1.4 Sledování biodegradace poly(vinylalkoholu) kulturou *Sphingomonas* sp. OT2 v přítomnosti aktivovaného kalu

V experimentu bylo testováno, jak bude rozklad PVA probíhat za účasti mikroorganismů aktivovaného kalu. Při experimentu byly nasazeny tři série MM2 s 500 mg/l PVA, vždy se třemi paralelními lahvemi, které byly zaočkovány různými inokuly. První série byla zaočkována jen kulturou OT2 (100 μ l inokula do 100 ml), série druhá stejným inokulem OT2 s přídavkem 10 μ l suspenze aktivovaného kalu (AK) a série třetí pouze 10 μ l suspenze AK. Inokulum aktivovaného kalu bylo připraveno protřepáním čerstvého AK se sterilním mořským pískem.

V průběhu pokusu byly odebírány vzorky pro stanovení koncentrace PVA a DOC. Získané hodnoty koncentrací PVA jsou uvedeny na Obr. 4.9 a odpovídají průměru stanovení ze tří paralelních lahví; chybové úsečky jsou rovny směrodatným odchylkám.



Obr. 4.9: Biodegradace PVA kulturou *Sphingomonas* sp. OT2 za účasti mikroorganismů aktivovaného kalu

Z Obr. 4.9 je patrné, že utilizace poly(vinylalkoholu) samotnou kulturou OT2 opět nebyla kompletní; při kombinaci s AK však již ke kompletnímu rozkladu došlo, a to během cca 70 dní. U této série byl rozklad během prvních přibližně 14 dní z větší části působen velmi pravděpodobně kulturou OT2, po uplynutí této doby však i nadále docházelo k poklesu koncentrace PVA, téměř jistě v důsledku působení mikroorganismů obsažených v aktivovaném kalu. Také u série se samotným inokulem AK došlo přibližně po 14 dnech k zahájení degradace, kdy následoval prudký pokles koncentrace PVA. Po 42. dni procesu se rozklad začal rovněž zpomalovat, avšak neustával, takže po 126 dnech pokusu dosáhl rozklad polymeru obdobné míry jako u kombinovaného inokula

(nad 98 %). Hodnoty koncentrace DOC v průběhu pokusu odpovídaly procentuálnímu zastoupení uhlíku v PVA, a proto zde nejsou uvedeny.

Výsledky tohoto pokusu nejsou příliš překvapivé, vzhledem k tomu, že velká řada doposud známých degradérů PVA byla izolována právě z aktivovaných kalů; důležitým aspektem je však to, že dochází k prakticky kompletnímu rozkladu polymeru, a také že obohacení kalu kulturou OT2 může vést k určitému zkrácení celkové doby degradace.

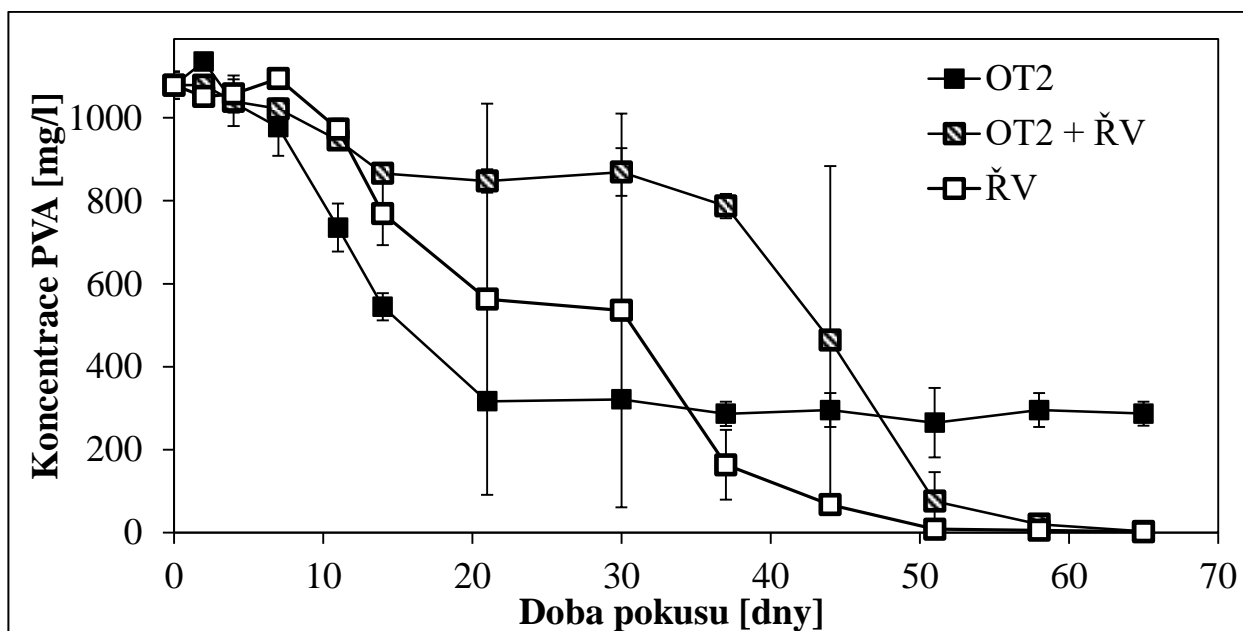
4.1.5 Sledování biodegradace poly(vinylalkoholu) kulturou *Sphingomonas* sp. OT2 v přítomnosti říční vody

Vzhledem k výsledkům předchozího pokusu se náplní posledního experimentu stalo ověření degradace PVA kombinovaným inokulem kultury OT2 s mikroorganismy říční vody. Motivací byla snaha zjistit, jak bude rozklad probíhat při doplnění kultury OT2 jinou a méně početnou mikrobiální komunitou. AK je totiž pro rozklad (nejen) tohoto polymeru velmi vhodný, jelikož čistírny odpadních vod jsou specifickým prostředím, denně vystaveným řadě látek jak přírodního, tak syntetického původu. AK je rovněž charakteristický vysokým celkovým počtem bakterií – např. Lee *et al.* (2003) uvádí, že jejich celkový počet je v rozmezí $2,36 - 2,83 \cdot 10^9$ buněk/ml, Foladori *et al.* (2010) udává srovnatelný výsledek, a to $2,3 \cdot 10^9$ živých buněk/ml kalu.

Použití říční vody k pokusu se tedy jevilo jako vhodné, i z toho důvodu, že rozklad PVA v říční vodě nebyl doposud v literatuře popsán. Konkrétní použitá voda byla charakterizována počtem heterotrofních psychrofilních bakterií rostoucích na R2A agaru, který činil $9 \cdot 10^4$ CFU/ml, pH říční vody vstupující do pokusu bylo 8. V pokusu bylo použito 2x koncentrované MM2, které bylo s říční vodou smícháno v poměru 1 : 1.

Byly nasazeny tři série s 1000 mg/l PVA; první série byla zaočkována jen kulturou OT2, série druhá kombinací OT2 + říční voda a série třetí pouze říční vodou. U první série byla použita říční voda sterilizovaná.

V průběhu pokusu byla u odebraných vzorků stanovována koncentrace DOC a PVA; měření hodnot OD_{600} nebylo vzhledem k silné flokulaci buněk v průběhu pokusu prováděno. Koncentrace poly(vinylalkoholu) v průběhu pokusu jsou graficky znázorněny na *Obr. 4.10*; hodnoty odpovídající průměru stanovení ze tří paralelních lahví, chybové úsečky jsou rovny směrodatným odchylkám.



Obr. 4.10: Biodegradace PVA kulturou *Sphingomonas sp.* OT2 za účasti mikroorganismů říčních vod

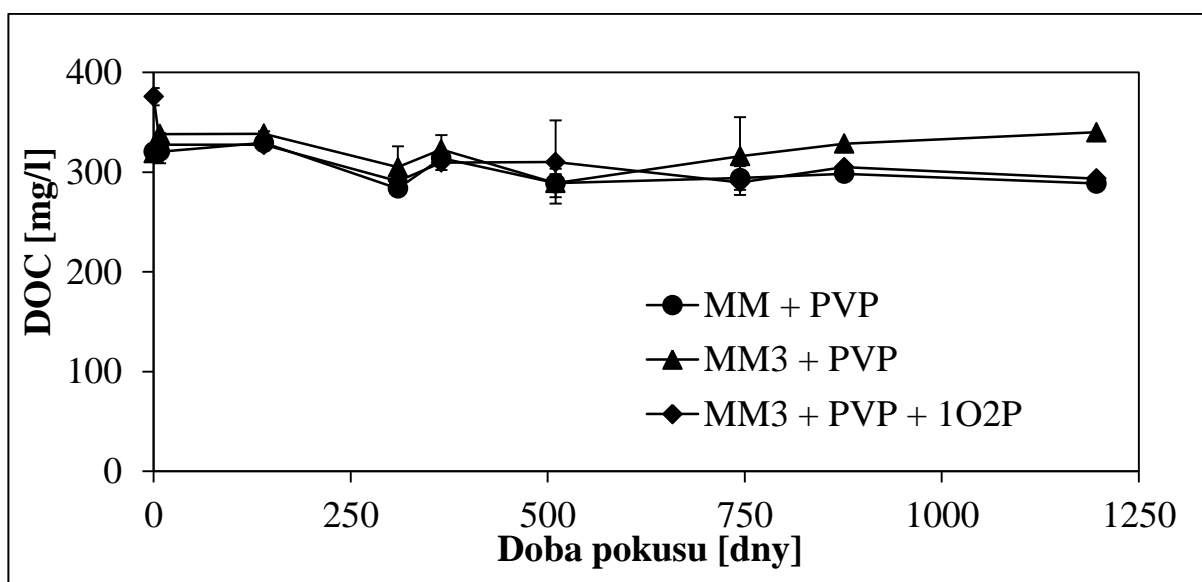
Z Obr. 4.10 je patrný pokles koncentrace PVA v průběhu experimentu; koncentrace DOC odpovídaly procentuálnímu zastoupení uhlíku v PVA a nejsou zde uvedeny. Výsledky se dosti lišily od předcházejícího pokusu, a to zejména v tom, že kombinované inokulum prokázalo nejhorší schopnosti, kde degradační působení kultury OT2 bylo po dobu přibližně 30 dní určitým způsobem potlačeno; teprve poté nastával výraznější rozklad polymeru. Podstatu takového výsledku nelze z pokusu jednoznačně vyvodit. Pozitivním zjištěním naopak byla úplná degradace PVA samotným konsorciem říční vody, ukazující, že i vodní prostředí toku, s podstatně nižším bakteriálním zastoupením oproti aktivovanému kalu, obsahuje mikroorganismy vybavené potřebným enzymovým systémem pro biodegradaci PVA. Toto zjištění má určitou hodnotu, neboť – jak již bylo uvedeno – v dosavadních vědeckých studiích obdobné údaje chyběly. Jediná studie, ve které došlo alespoň k izolaci degradační bakteriální kultury z říční vody, je studie Matsumary *et al.* (1994); zde byl izolován kmen *Alcaligenes faecalis* KK314.

4.2 Biodegradabilita poly(vinylpyrrolidonu)

Minoritní součástí práce bylo také studium možnosti bakteriální degradace poly(vinylpyrrolidonu); do jisté míry šlo o kontrast vůči části věnované rozkladu poly(vinylalkoholu). Ačkoliv se totiž v obou případech jedná o netoxické vinylové polymery, rozpustné ve vodě, liší se zcela zásadně svou biodegradabilitou. Mikrobiální degradaci PVP se zabývala již řada prací probíhajících na FT UTB, v nichž byla možnost mikrobiálního rozkladu tohoto polymeru testována v různých prostředích a při různých podmínkách. Výsledky těchto prací jsou shrnuty ponejvíce v publikacích Julinové *et al.* (2012, 2013); v rámci těchto prací však mikrobiální degradace PVP prakticky nebyla zaznamenána, s výjimkou velmi malé biodegradace za účasti některých kosubstrátů. Také v mé diplomové práci (Měrková, 2014) byla sledována bakteriální rozložitelnost PVP, a to v přítomnosti různých kmenů rodu *Sphingomonas*, případně *Sphingobium*, a při působení směsných inokul bakterií rodu *Sphingomonas* s bakteriemi rozkládajícími *N*-methyl-2-pyrrolidon; avšak ani zde nebyl rozklad PVP zaznamenán. V návaznosti na tyto práce se pak jako jedna z posledních možností jevílo odzkoušení biodegradace PVP směsným konsorciem bakterií KOKK, které bylo získáno v rámci paralelně probíhající doktorské práce Křížka. Toto konsorcium bylo schopno rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu (1O2P), látky strukturně blízké monomeru PVP, a bylo získáno z aktivovaného kalu.

4.2.1 Sledování biodegradace poly(vinylpyrrolidonu) směsným konsorciem bakterií

V experimentu byly nasazeny tři série se dvěma typy minerálních médií a vždy se 600 mg/l PVP; do třetí série bylo kromě PVP dávkováno také 50 mg/l 1O2P, který zde měl sloužit jako případný induktor tvorby enzymů. První série obsahovala kompletní MM s PVP, druhá a třetí série pak MM3 (bez dusíku) s PVP; všechny lahve byly inokulovány bakteriální suspenzí konsorcia KOKK. Pokus trval po dobu přibližně 1 200 dní a během této doby byly všechny série několikrát opětovně inokulovány uvedeným konsorciem KOKK, ale také čistírenským aktivovaným kalem. Ve zvolených intervalech byly odebrány vzorky pro stanovení koncentrace DOC, jejichž hodnoty jsou graficky znázorněny na *Obr. 4.11*.



Obr. 4.11: Mikrobiální degradace PVP

Jak je z Obr. 4.11 zřejmé, ani k částečné mineralizaci PVP v žádném případě nedošlo. Pouze v sérii s přidavkem 1O2P byl pozorován jistý úvodní pokles v hodnotách koncentrace DOC, který však byl způsoben degradací a utižití 1O2P konsorciem KOKK; dále se již koncentrace DOC výrazně neměnila, a ani zde tedy ani k dílčí utižití PVP nedošlo. I přes dodatečnou inokulaci všech pokusů konsorciem KOKK a suspenzí čistírenského aktivovaného kalu, které proběhly ve 140-tém, 365-tém a 876-tém dni pokusu, nebyl žádný významný pokles koncentrace DOC zjištěn.

Po proběhnutí tohoto dlouhodobého experimentu tak bylo možno uzavřít, že ani použitím bakteriálního konsorcia KOKK, ani při jeho kombinaci s inokulem čistírenského kalu, nebylo mikrobiální utižití polymeru dosaženo.

4.3 Studium bakteriálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylátu

Vzhledem k omezenému množství informací o mikrobiální rozložitelnosti 2-ethylhexylsalicylátu (EHS) se i tomuto tématu v posledních letech věnovaly některé závěrečné práce probíhající na FT UTB. V rámci práce Ringlové (2015) byla potvrzena biodegradabilita EHS v prostředí aktivovaného kalu a v práci Proislové (2016) také v říční vodě.

Cílem této práce pak bylo studium mikrobiálních zástupců podílejících se na rozkladu této látky. Izolace a identifikace kultury schopné rozkladu EHS z aktivovaného kalu a sledování jejích obecných růstových vlastností bylo provedeno ve spolupráci s diplomovou prací Jelénkové (2016).

4.3.1 Izolace a identifikace kultury schopné rozkladu 2-ethylhexylsalicylátu

Degradační kultura byla izolována z aktivovaného kalu ČOV Zlín – Malenovice, adaptovaného na EHS v koncentraci 1000 mg/l po dobu 21 dní. Po druhém cyklu pomnožení a vyočkování na R2A agary bylo izolováno několik čistých kultur mikroorganismů, označených jako EHS 11 – 16, které byly dále testovány. Schopnost utilizace EHS jako jediného zdroje uhlíku a energie byla potvrzena jen u kultury EHS 12, která byla dále podrobněji charakterizována; jedná se o nefermentující grampozitivní tyčinku, pozitivní na katalázu a negativní na oxidázu.

Izolovaná kultura byla pomocí analýzy 16S rDNA identifikována jako zástupce rodu *Rhodococcus*, s 99% shodou s druhem *R. erythropolis* a několika dalšími, blíže neurčenými kulturami tohoto rodu. Kultura EHS 12 je uložena v České sbírce mikroorganismů pod číslem CCM 8808 jako *Rhodococcus* sp. ES 12 a je takto dále v textu označována.

4.3.2 Obecné růstové vlastnosti kultury ES 12

Kultura *Rhodococcus* sp. ES 12 byla schopna růstu v teplotním rozmezí 5 – 30 °C a v rozmezí pH 6 – 9,5. K jejímu růstu docházelo rovněž v přítomnosti 0 – 6,5 hm. % NaCl; při vyšších koncentracích solí dochází k inhibici růstu.

Byla sledována také utilizace řady substrátů, jednalo se převážně o alkoholy, které byly testovány v koncentraci 300 mg/l. Bylo zjištěno, že kultura ES 12 je ke svému růstu schopna využívat ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, pentan-1-ol, hexan-1-ol, hexan-2-ol a také propan-1,2,3-triol (glycerol), a naopak není schopna růstu na methanolu, butan-2-olu a oktan-1-olu.

4.3.3 Růstové vlastnosti kultury *Rhodococcus* sp. ES 12 spojené s rozkladem 2-ethylhexylsalicylátu

Rozklad EHS kulturou ES 12 byl potvrzen již v uvedené práci Jelénkové (2016). Vzhledem k velmi nízké rozpustnosti EHS ve vodě nebylo možné pro sledování rozkladu volit konvenční metody, jako stanovení DOC, případně měření OD₆₀₀. Růst kultury na 500 mg/l EHS byl proto sledován za pomoci stanovení buněčných bílkovin v suspenzi během inkubace a bylo prokázáno, že v průběhu 18-ti denní kultivace došlo k pozvolnému nárůstu bílkovin z počáteční hodnoty přibližně 2 mg/l až na 44,8 mg/l. Vzhledem k tomu, že v kontrolních vzorcích nebyl nárůst bílkovin v průběhu kultivace zjištěn, bylo tímto způsobem potvrzeno, že kultura ES 12 je schopna pro svůj růst využít EHS jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Růst kultury *Rhodococcus* sp. ES 12 na jednotlivých strukturních částech molekuly 2-ethylhexylsalicylátu

Další snahou bylo zjistit, zda je rozklad EHS touto kulturou kompletní. Vzhledem k tomu, že se EHS skládá z dvou strukturně odlišných částí (2-ethylhexanolu a kyseliny salicylové) bylo testováno, zda je získaná kultura schopna utilizace obou těchto strukturních částí. Růst kultury na 2-ethylhexanolu (EHOL) a salicylanu sodném byl testován v MM s vitaminy a s každým substrátem v koncentraci 500 mg/l. Růst byl hodnocen vizuálně; pouze na začátku a konci inkubace byla měřena OD_{600} . U série se salicylanem sodným byl nárůst buněk patrný již během prvních dní pokusu, pokus byl proto po 5-ti dnech ukončen; hodnoty OD_{600} při nasazení a ukončení pokusu byly $0,026 \pm 0,001$ a $0,231 \pm 0,007$. Naopak v médiu obsahujícím EHOL nebyl růst kultury pozorován ani po 21 dnech pokusu; hodnoty OD_{600} zůstaly v průběhu inkubace totožné, a to $0,019 \pm 0,001$. Bylo tedy zjištěno, že kultura *Rhodococcus* sp. ES 12 je schopna růstu na salicylanu sodném, nikoliv však na EHOLu v koncentraci 500 mg/l.

Vzhledem k získaným výsledkům bylo předpokládáno, že v průběhu růstu kultury ES 12 na 2-ethylhexylsalicylátu dochází ke vzniku a hromadění 2-ethylhexanolu, který zůstává v médiu nerozložen. Takový jev není ojedinělý, vznik a hromadění 2-ethylhexanolu a následně i kyseliny 2-ethylhexanové popsal již Horn *et al.* (2004), při biodegradaci di-2-ethylhexylftalátu a di-2-ethylhexyladipátu.

Na základě získaných výsledků i práce Horna bylo tak předpokládáno, že kultura ES 12 využívá jen salicylovou část molekuly EHS, a byly proto započaty práce k získání bakteriální kultury z aktivovaného kalu, schopné rozkladu 2-ethylhexanolu, které probíhaly souběžně se studiem rozkladu EHS kulturou ES 12. Výsledky těchto prací jsou podrobně uvedeny v kapitole 4.4.

Další pokus s kulturou *Rhodococcus* sp. ES 12 pak tedy směřoval k potvrzení produkce 2-ethylhexanolu v průběhu utilizace EHS. Pro měření koncentrací EHOLu v tekutém médiu byla na základě literárních zdrojů vytipována, ověřena a optimalizována metoda SPE-GC, která je podrobněji popsána v metodické části.

Sledování vzniku 2-ethylhexanolu v průběhu rozkladu 2-ethylhexylsalicylátu kulturou *Rhodococcus* sp. ES 12

S ohledem na předpokládané množství EHOLu, jež by mohlo být v procesu rozkladu EHS produkováno, a kapacitu SPE kolonek Isolute C18, byla zvolena koncentrace substrátu. V experimentu byly nasazeny dvě série MM s vitaminy a 200 mg/l EHS, první série lahví byla zaočkována kulturou ES 12 a druhá byla ponechána bez zaočkování jako kontrolní pokus. Ve zvolených časových intervalech byly odebírány vzorky, ve kterých byla sledována koncentrace EHOLu. Výsledky jsou uvedeny v *Tab. 4.5*; jedná se o průměry ze tří stanovení tří paralelních lahví.

Tab. 4.5: Koncentrace 2-ethylhexanolu v průběhu rozkladu EHS kulturou *Rhodococcus sp. ES 12*

Doba pokusu [dny]	Koncentrace EHOLu [mg/l]	
	<i>Rhodococcus sp. ES 12</i>	Kontrolní pokus
0	0,91 ± 0,00	0,91 ± 0,00
4	1,50 ± 0,38	1,48 ± 0,00
7	0,96 ± 0,04	1,48 ± 0,00
14	0,91 ± 0,00	1,46 ± 0,00
21	0,92 ± 0,00	1,48 ± 0,00

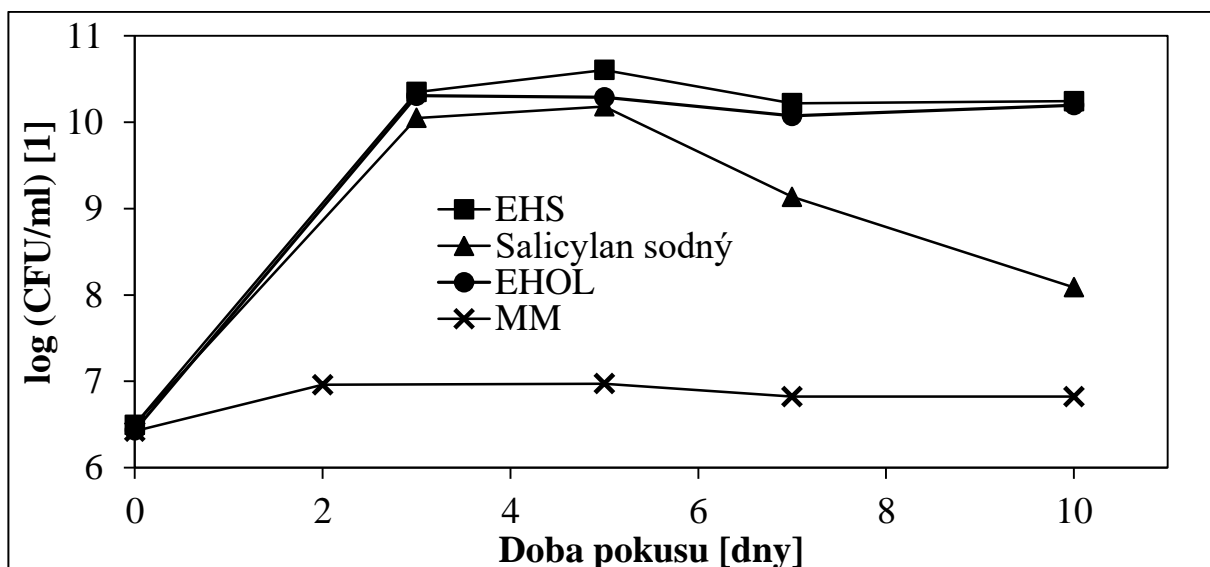
Z Tab. 4.5 vyplývá, že v průběhu růstu kultury *Rhodococcus sp. ES 12* na EHS byly zaznamenány jen minimální koncentrace 2-ethylhexanolu, na úrovni detekčního limitu použité metody SPE-GC, a na úrovni kontrolního pokusu. Vznik 2-ethylhexanolu tedy potvrzen nebyl.

Na konci experimentu, po předpokládaném rozložení substrátu, byla v médiích s kulturou ES 12 kontrolně změřena koncentrace DOC. Zjištěná hodnota $8,6 \pm 0,6$ mg/l však spíše odpovídala „přirozeným“ hodnotám po spotřebování substrátu, nikoliv však přítomnosti odpovídajícího množství 2-ethylhexanolu.

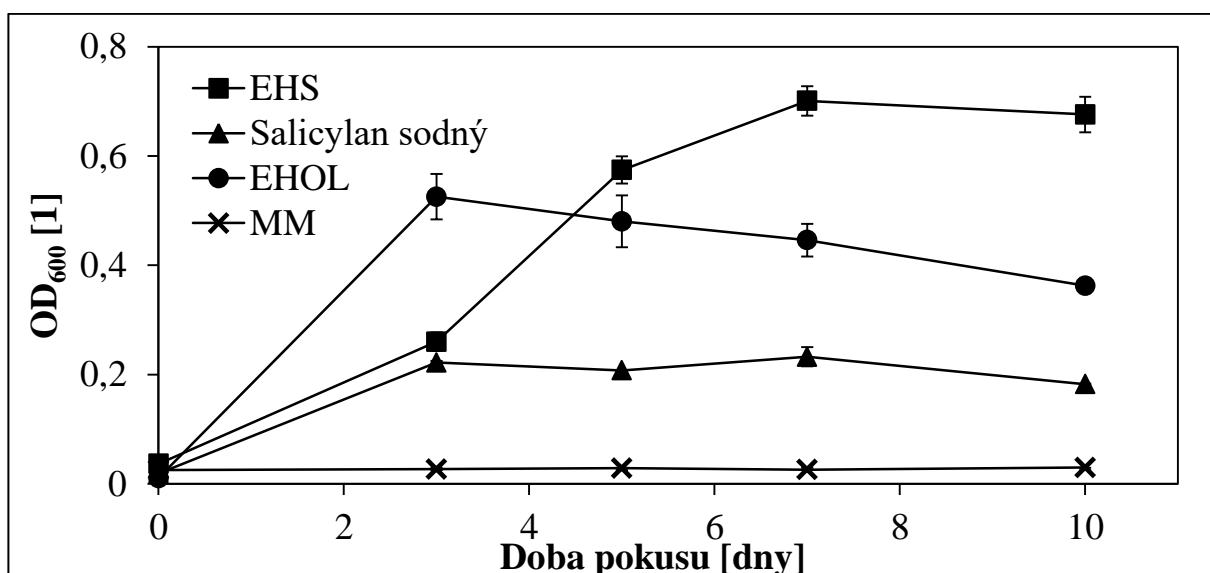
Vznik a akumulaci EHOLu se tak v degradačním médiu při rozkladu EHS prokázat nepodařilo, což naznačilo, že by kultura ES 12 mohla být přece jen kompletního rozkladu EHS schopna. Cílem dalšího pokusu tedy bylo opětovné testování této domněnky i přesto, že utilizace EHOLu touto kulturou již byla dříve testována a potvrzena nebyla.

Rozklad ekvimolárních koncentrací 2-ethylhexylsalicylátu a jeho strukturních částí kulturou *Rhodococcus sp. ES 12*

V tomto experimentu byl sledován růst kultury ES 12 na EHS a molárně odpovídajících koncentracích jeho strukturních částí, tedy salicylanu sodném a 2-ethylhexanolu. V experimentu byly nasazeny čtyři série MM s vitaminy, zaočkované kulturou *Rhodococcus sp. ES 12*. První série obsahovala 250 mg/l EHS, druhá 160 mg/l salicylanu sodného, třetí pak 130 mg/l EHOLu; poslední série obsahovala pouze samotné MM s vitaminy jako kontrolu. Průběh experimentu byl vyhodnocován stanovováním počtu buněk plotnovou metodou; počet buněk a charakter suspenzí byl monitorován také mikroskopicky a byly měřeny hodnoty OD₆₀₀. Výsledné počty CFU/ml jsou ve formě logaritmu graficky znázorněny na Obr. 4.12, hodnoty OD₆₀₀ v průběhu pokusu jsou zobrazeny na Obr. 4.13.



Obr. 4.12: Počty bakterií při růstu kultury *Rhodococcus sp. ES 12* na EHS, salicylanu sodném a EHOLu



Obr. 4.13: Hodnoty OD₆₀₀ v průběhu růstu kultury *Rhodococcus sp. ES 12* na EHS, salicylanu sodném a EHOLu

Z Obr. 4.12 a Obr. 4.13 vyplývá, že u kultury *Rhodococcus sp. ES 12* došlo k růstu na všech sledovaných substrátech. K navýšení počtu buněk pak docházelo ve formě jemné suspenze (potvrzeno mikroskopicky), tudíž výsledky kultivačního stanovení nebyly ovlivněny případnou tvorbou vloček.

Při utilizaci EHS došlo k nárůstu z výchozího počtu $3,1 \cdot 10^6$ CFU/ml až na maximum $4 \cdot 10^{10}$ CFU/ml, při růstu na salicylanu sodném na $1,5 \cdot 10^{10}$ a u EHOLu až na $2 \cdot 10^{10}$ CFU/ml. Také v kontrolním pokusu byl zaznamenán nárůst, avšak významně nižší; maximální hodnota $9,4 \cdot 10^6$ CFU/ml byla pravděpodobně zapříčiněna pomnožením kultury na vitamínech, přítomných v médiu. Na hodnotách OD₆₀₀ se však tento nárůst neprojevil.

Ačkoliv byl růst kultury *Rhodococcus sp. ES 12* na EHOLu v práci sledován již dříve, byla testována pouze koncentrace 500 mg/l (na níž byl růst negativní,

přestože na stejné koncentraci EHS k růstu docházelo). Naopak v rámci tohoto pokusu byla utilizace 2-ethylhexanolu v koncentraci 130 mg/l potvrzena. Bylo tedy zřejmé, že koncentrace této látky je zásadním faktorem určujícím růst kultury.

Podobnou problematikou, s použitím taxonomicky blízkého kmene, se zabývali i Nalli *et al.* (2002), kteří sledovali biodegradaci di-2-ethylhexyladipátu kulturou *Rhodococcus rhodochrous*. Působením tohoto kmene docházelo sice k hydrolyze esterových vazeb a vzniku 2-ethylhexanolu, ten však byl poté oxidován až na kyselinu 2-ethylhexanovou, kterou již kultura nebyla schopna dále využívat, a hromadila se v prostředí. Za nejpravděpodobnější vysvětlení autoři považovali nedostupnost ethylové větve na druhém uhlíku, která může blokovat metabolismus karboxylových kyselin u *R. rhodochrous*.

Naše výsledky ukázaly, že kultura *Rhodococcus* sp. ES 12 se v tomto ohledu chová jinak – koncentrace DOC na konci předchozího experimentu naznačila, že utilizace EHS byla kompletní a byl také prokázán její růst na snížené koncentraci EHOLu. Cílem dalšího experimentu bylo tedy otestovat, na jakých koncentracích uvedeného alkoholu je kultura *Rhodococcus* sp. ES 12 schopna růst a zda může ke svému růstu využít i kyselinu 2-ethylhexanovou.

Růst kultury *Rhodococcus* sp. ES 12 na 2-ethylhexanolu a předpokládaných meziproduktech jeho rozkladu

Cílem experimentu bylo zjištění maximální růstové koncentrace na 2-ethylhexanolu. Byl proto sledován růst kultury v MM s vitaminy na EHOLu v koncentracích 20, 50, 100, 250, 300, 350, 400 a 500 mg/l. Průběh pokusu byl hodnocen vizuálně a výsledky jsou popsány v *Tab. 4.6*.

*Tab. 4.6: Růst kultury *Rhodococcus* sp. ES 12 na různých koncentracích 2-ethylhexanolu po 10-ti dnech kultivace*

Koncentrace EHOLu [mg/l]	20	50	100	250	300	350	400	500
Růst	+	+	+	+	+	+	-	-

Z výsledků uvedených v *Tab. 4.6* vyplývá, že maximální růstová koncentrace 2-ethylhexanolu byla pro zkoumanou kulturu 350 mg/l. Bylo zřejmé, že neschopnost jejího růstu při 400 mg/l a více úzce souvisí s toxicitou alkoholu, nebo, pravděpodobněji, s toxicitou příslušného aldehydu či kyseliny. Tyto dvě sloučeniny coby meziprodukty bakteriálního rozkladu EHOLu byly potvrzeny ve studii Wyatta *et al.* (1987), a proto byl v následném pokusu sledován růst kultury na sodné soli kyseliny 2-ethylhexanové (EHA) a na 2-ethylhexanalu (EHAL), v různých koncentracích. Růst kultury ES 12 byl sledován vizuálně v MM s vitaminy v přítomnosti 20, 50, 100, 250 a 500 mg/l EHALu a dále

na sodné soli EHA v koncentracích odpovídajících 500 a 1000 mg/l EHA. Výsledky pokusů jsou uvedeny v *Tab. 4.7* a *Tab. 4.8*.

Tab. 4.7: Růst kultury Rhodococcus sp. ES 12 na různých koncentracích 2-ethylhexanalu po 10-ti dnech kultivace

Koncentrace EHALu [mg/l]	20	50	100	250	500
Růst	+	-	-	-	-

Tab. 4.8: Růst kultury Rhodococcus sp. ES 12 na různých koncentracích sodné soli kyseliny 2-ethylhexanové po 2 dnech kultivace

Koncentrace EHA [mg/l]	500	1000
Růst	+	+

Z výsledků uvedených v *Tab. 4.7* a *Tab. 4.8* vyplývá, že kultura je schopna růstu na obou předpokládaných meziproduktech degradace EHOLu; v případě EHALu byl však růst kultury pozorován pouze na nejnižší testované koncentraci 20 mg/l, naopak u sodné soli EHA docházelo k růstu i v koncentraci 1000 mg/l. Nejvyšší koncentrace, na kterých docházelo k růstu kultury, z testovaných koncentrací jednotlivých látek se tedy výrazně lišily, což bylo bezpochyby dáno jejich rozdílnou toxicitou. Tou se zabývali i někteří další autoři – toxicitu EHOLu, EHALu a EHA, které mohou vznikat také v průběhu biodegradace některých ftalátů, sledovali pomocí testů Microtox Nalli *et al.* (2002); ti udávají hodnotu EC₅₀ pro EHOL 7,8 mg/l; pro EHAL 7,7 mg/l a pro EHA 43 mg/l. Zjistili tedy srovnatelnou toxicitu 2-ethylhexanolu a 2-ethylhexanalu vůči *Vibrio fischeri*. Naproti tomu, informace uvedené v bezpečnostních listech daných látek, poskytnutých výrobcem, udávají, že například hodnota EC₅₀ pro dafnie po 48 hodinové expozici je u EHOLu 39 mg/l (Sigma-Aldrich, ©2018a), zatímco u EHALu je hodnota EC₅₀ za stejných podmínek 4,7 mg/l (Sigma-Aldrich, ©2018b). Všechny tyto hodnoty tak ukazují na rozdílné toxické chování obou látek vůči různým organismům.

Utilizace EHOLu i EHALu naší kulturou *Rhodococcus sp. ES 12* je tedy výrazně limitována jejich koncentracemi; není možné vyloučit, že omezená růstová koncentrace EHOLu je ve skutečnosti dána toxicitou vznikajícího EHALu. Rozklad samotného EHS však tímto nemusí být nijak zásadně ovlivněn, mimo jiné pravděpodobně také díky nízké rozpustnosti EHS ve vodě, kdy tak k jejímu rozpouštění i rozkladu dochází postupně.

V rámci celé série experimentů tak bylo potvrzeno, že kultura *Rhodococcus sp. ES 12* je schopna utilizace jak samotného EHS, tak obou strukturních částí molekuly – salicylanu sodného a 2-ethylhexanolu – v případě přítomnosti koncentrací 2-ethylhexanolu vyšších než 350 mg/l však přestává být růstu schopna.

4.4 Studium bakteriálního rozkladu 2-ethylhexanolu

Ačkoliv problematika utilizace EHOLu byla již částečně zkoumána v rámci prací věnujících se rozkladu EHS, experimenty zabývající se rozkladem těchto dvou nízkomolekulárních látek probíhaly souběžně. V této části práce byla pozornost zaměřena na izolaci bakteriální kultury schopné rozkladu 2-ethylhexanolu při jeho vyšších koncentracích.

4.4.1 Izolace a identifikace kultury schopné rozkladu 2-ethylhexanolu

Izolace kultury s požadovanou vlastností byla provedena z aktivovaného kalu pocházejícího z ČOV Zlín – Malenovice, adaptovaného na EHOL v koncentraci 500 mg/l, po dobu 21 dní. Po druhém cyklu pomnožení mikroorganismů a po vyočkování na R2A agar se podařilo izolovat čtyři čisté kultury bakterií, označené jako VB, MB, Ž a P, které byly dále testovány. Schopnost individuálního růstu na EHOLu v koncentraci 500 mg/l byla následně potvrzena jen u kultury P a tato kultura byla dále podrobněji charakterizována; byla provedena řada experimentů s cílem zjistit podmínky jejího růstu a rozsah degradačních schopností kultury. Prvotní základní testy ukázaly, že kultura P je nefermentující gramnegativní tyčinka, oxidáza a kataláza pozitivní.

Izolovaná kultura byla pomocí analýzy 16S rDNA identifikována jako zástupce rodu *Pseudomonas*, s 99% shodou se záznamy v databázi GenBank; nejbližšími příbuznými druhy byly *P. putida* a *P. japonica*. Kultura je uložena v České sbírce mikroorganismů jako *Pseudomonas* sp. P pod číslem CCM 8809.

4.4.2 Obecné růstové vlastnosti kultury *Pseudomonas* sp. P

Kultura *Pseudomonas* sp. P rostla velmi dobře v teplotním rozmezí 5 – 37 °C, velmi nepatrný růst byl pozorován i při teplotě 45 °C. Rostla v rozmezí pH 6 – 9 a také v přítomnosti NaCl v koncentracích 0 – 5,5 hm. %.

Dále byl proveden denitrifikační test, kde byly jako substrát použity 2-ethylhexanol a glycerol; oba v koncentraci 700 mg/l. Z tohoto testu vyplynulo, že kultura P není schopna denitrifikace.

Byla testována také schopnost růstu na různých substrátech; bylo zjištěno, že kultura P využívá kromě EHOLu řadu primárních alkoholů jako jsou ethanol, propan-1-ol, butan-1-ol, pentan-1-ol, hexan-1-ol, oktan-1-ol, ale také propan-1,2,3-triol (glycerol); naopak nebyla schopna růstu na methanolu, propan-2-olu, butan-2-olu či hexan-2-olu. Použité alkoholy byly testovány v koncentraci 300 mg/l. Dále byla kultura P schopna růstu také na octanu a butyrátu sodném, které byly testovány rovněž v koncentraci 300 mg/l.

Vzhledem ke schopnosti kultury *Pseudomonas* sp. P rozkládat 2-ethylhexanol, byla ověřována také schopnost růstu na EHS a salicylanu sodném. Substráty byly testovány v koncentraci 500 mg/l. Růst byl hodnocen vizuálně a na začátku a konci kultivace byla měřena hodnota OD₆₀₀. Po 14-ti dnech byla kultivace ukončena, vzhledem k tomu, že žádný růst kultury nebyl pozorován; to bylo potvrzeno také měřením OD₆₀₀. U EHS byly hodnoty

OD₆₀₀ na začátku a konci kultivace $0,039 \pm 0,001$ a $0,042 \pm 0,004$, u salicylanu sodného pak $0,034 \pm 0,001$ a $0,040 \pm 0,007$. Bylo tak potvrzeno, že kultura *Pseudomonas* sp. P není schopna růstu na EHS ani na salicylanu sodném v koncentraci 500 mg/l.

4.4.3 Optimalizace a ověření metody stanovení 2-ethylhexanolu ve vodném prostředí

Pro stanovení koncentrace 2-ethylhexanolu ve vodných vzorcích byla v rámci této práce zavedena metoda SPE-GC, která je zmíněna již v metodické části, v kapitole 3.2.1. Základem pro zavedení metody byla studie Lukiće *et al.* (2005), kteří za pomoci extrakce na pevnou fázi s následným stanovením plynovou chromatografií prováděli stanovení těkavých látek ve vinných destilátech. Byly rovněž využity zkušenosti z práce Křížka *et al.* (2015), který SPE-GC používal pro stanovení koncentrací *N*-methylpyrrolidonu.

Pro extrakci EHOLu z vodných vzorků byly zvoleny kolonky C18 s nepolárním sorbentem (octadecylový funkcionalizovaný silika gel). Extrakce probíhala s využitím aparatury VacMasterTM 10 a SPE kolonek Isolute C18 (100 mg/3 ml, Biotage). Jako eluční činidlo byl nejprve dle Lukiće *et al.* (2005) zvolen dichlormethan, který byl však posléze z důvodu špatné opakovatelnosti měření nahrazen hexanem.

V průběhu přípravy vzorku bylo dbáno na minimalizaci doby manipulace se vzorkem, vzhledem k mírné těkavosti EHOLu. Průběh extrakce byl následující: nejprve byla kolonka iniciována 6 ml hexanu a poté po dobu 10 minut sušena vzduchem, dále bylo dávkováno 6 ml předem centrifugovaného vzorku (10 000 g, 25 °C, 10 minut). Rychlost průtoku kapaliny kolonkou byla nastavena přibližně na 3 ml/min. Po průchodu vzorku kolonkou následovalo opětovné vysušení kolonky; ačkoliv výrobce uvádí sušení po dobu 10 minut, v práci se osvědčilo poměrně razantně zkrátit dobu sušení (1 minuta) za zdvojnásobení průtoku; bylo tak dosaženo vyšší návratnosti testovaného analytu. Po sušení byl analyt zachycený na sorbentu eluován za pomoci 6 ml rozpouštědla (hexanu) a jeho koncentrace byla dále stanovena pomocí plynového chromatografu (GC), vybaveného kapilární kolonou HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm film) a plamenově ionizačním detektorem. Návratnost EHOLu při použití popsaného postupu a kolonek byla zjištěna měřením roztoků o známých koncentracích a je 97 %.

Pro dosažení optimální velikosti signálu a zkrácení doby analýzy byly testovány různé parametry nastavení GC, jako je velikost nastříkovaného vzorku, počáteční teplota na koloně, rychlost zvyšování teploty, apod. Jako nejvhodnější parametry byly nakonec zvoleny tyto: injektáž 2 µl vzorku, při nastavení split 1:1, teplota injektoru 240 °C, teplota detektoru 270 °C; počáteční teplota kolony při analýze byla nastavena na 80 °C po dobu 1 min, s následným zvyšováním teploty o 8 °C/min na teplotu 120 °C; jako nosný plyn bylo použito helium, rychlost průtoku byla 2,6 ml/min. Po této optimalizaci byla

doba analýzy zkrácena na 8 min (retenční čas EHOLu byl 3,8 min). Pro hodnocení výsledných koncentrací EHOLu byla vytvořena kalibrační křivka (1 – 500 mg/l), která je znázorněna na *Obr. 3.2*.

4.4.4 Růstové vlastnosti kultury *Pseudomonas* sp. P spojené s utilizací 2-ethylhexanolu

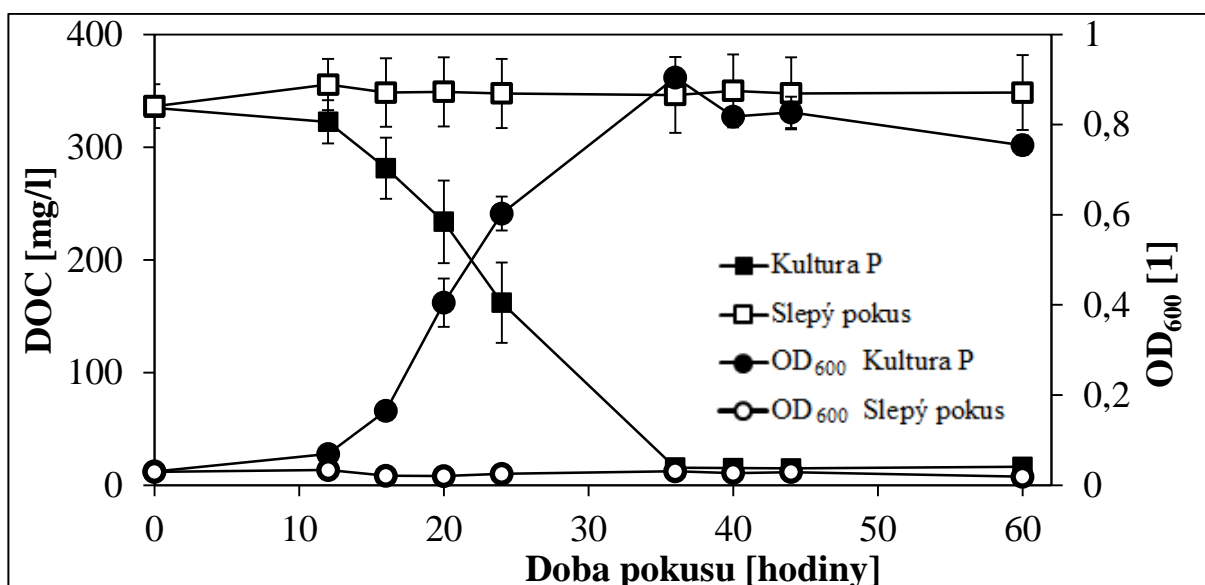
Bylo provedeno několik experimentů, nejdříve byl sledován časový průběh rozkladu 2-ethylhexanolu. V pokusu byly nasazeny dvě série o třech lahvích obsahujících MM s vitaminy a 350 mg/l EHOLu; první série byla inokulována kulturou P a druhá série sloužila jako slepý pokus. V průběhu pokusu byla stanovována koncentrace EHOLu, DOC a byla měřena OD₆₀₀; získané výsledky jsou uvedeny v *Tab. 4.9*.

Tab. 4.9: Růst kultury Pseudomonas sp. P na 2-ethylhexanolu

Série	Doba pokusu [hodiny]	Koncentrace EHOLu [mg/l]	OD ₆₀₀ [1]
<i>Pseudomonas</i> sp. P	0	349 ± 7	0,047 ± 0,000
	24	105 ± 88	0,388 ± 0,091
	48	1,3 ± 0,4	0,942 ± 0,151
Slepý pokus	0	349 ± 7	0,038 ± 0,000
	24	334 ± 18	0,038 ± 0,001
	48	345 ± 8	0,034 ± 0,002

Z *Tab. 4.9* je patrné, že utilizace EHOLu kulturou P je prakticky kompletní již během 48 hodin. Hodnoty DOC v průběhu pokusu odpovídaly procentuálnímu zastoupení uhlíku v EHOLu a nejsou zde tedy uvedeny; hodnoty OD₆₀₀ vykazovaly strmý nárůst.

Pro upřesnění doby trvání rozkladu byl pokus opakován, tentokrát však byla zvolena mírně vyšší koncentrace EHOLu (500 mg/l) tak, aby byla doba rozkladu mírně prodloužena; vzorky byly odebírány v několikahodinových intervalech. Hodnoty DOC a OD₆₀₀ v průběhu druhého pokusu jsou pro lepší přehlednost znázorněny na *Obr. 4.14*.



Obr. 4.14: Biodegradace EHOLu kulturou *Pseudomonas sp. P*

Z Obr. 4.14 je patrné, že rozklad EHOLu kulturou P proběhl opět poměrně velmi rychle, množství 500 mg/l bylo kompletně rozloženo již během 36 hodin. Dále bylo testováno, zda je kultura schopna růstu také na vyšších koncentracích EHOLu. Vzhledem k tomu, že rozpustnost 2-ethylhexanolu ve vodě je omezená (Amidon *et al.*, 1974; McGinty *et al.*, 2010), byly testovány pouze koncentrace 600, 700, 800, 900 a 1000 mg/l a utilizace substrátu kulturou byla vyhodnocována vizuálně. Růst kultury byl jednoznačně pozorován u všech testovaných koncentrací.

Růst kultury *Pseudomonas sp. P* na předpokládaných meziproduktech rozkladu 2-ethylhexanolu

Jak již bylo uvedeno dříve, rozklad EHOLu je katalyzován alkohol- a aldehyddehydrogenázami, jejichž účinkem dochází k oxidaci 2-ethylhexanolu na příslušný aldehyd – 2-ethylhexanal (EHAL) a na kyselinu 2-ethylhexanovou (EHA), která může být dále metabolizována (Wyatt *et al.*, 1987). Navíc v pokusech s kulturou *Rhodococcus sp. ES 12* byla prokázána výrazná závislost utilizace těchto látek na jejich koncentraci. Z tohoto důvodu byl v dalších pokusech sledován růst kultury *Pseudomonas sp. P* na odstupňovaných koncentracích těchto látek. Růst byl sledován v MM s vitaminy s výchozí koncentrací EHALu 100, 150, 200, 500 a 1000 mg/l a sodné soli EHA v koncentraci odpovídající 200, 500, 1000 a 2000 mg/l EHA. Pokus byl hodnocen vizuálně a výsledky jsou popsány v Tab. 4.10 a Tab. 4.11.

Tab. 4.10: Růst kultury *Pseudomonas sp. P* na různých koncentracích 2-ethylhexanolu po 10-ti dnech kultivace

Koncentrace EHALu [mg/l]	100	150	200	500	1000
Růst	+	-	-	-	-

Tab. 4.11: Růst kultury *Pseudomonas sp. P* na různých koncentracích sodné soli kyseliny 2-ethylhexanové po 24 hodinách kultivace

Koncentrace EHA [mg/l]	200	500	1000	2000
Růst	+	+	+	+

Z Tab. 4.10 a Tab. 4.11 vyplývá, že kultura P byla schopna utilizace jak 2-ethylhexanolu, tak kyseliny 2-ethylhexanové. Maximální koncentrace EHALu, na které byl ještě pozorován růst kultury, byla 100 mg/l; u kyseliny 2-ethylhexanové k růstu docházelo na všech testovaných koncentracích, až do 2000 mg/l. Výsledky tohoto experimentu lze porovnat s výsledky zjištěnými u kultury *Rhodococcus sp. ES 12*; data pro oba kmeny jsou zřehledněna v Tab. 4.12.

Tab. 4.12: Porovnání růstových koncentrací látek u kultur *Rhodococcus sp. ES 12* a *Pseudomonas sp. P*

Sledovaná látka	Koncentrace [mg/l]	
	<i>Rhodococcus sp. ES 12</i>	<i>Pseudomonas sp. P</i>
EHOL	350	1000
EHAL	20	100
EHA	1000	2000

Z Tab. 4.12 je zřejmé, že schopnost kultury *Pseudomonas sp. P* růst na zvýšených koncentracích EHOLu v porovnání s kulturou *Rhodococcus sp. ES 12* je doprovázena i schopností růstu na vyšších koncentracích EHALu. Tento fakt tak podporuje domněnku, že schopnost růstu jednotlivých bakteriálních kultur na 2-ethylhexanolu je dána mírou toxicity vznikajícího 2-ethylhexanolu vůči nim, případně rychlostí následné přeměny 2-ethylhexanolu na 2-ethylhexanovou kyselinu.

Za pozitivní zjištění lze tak z pohledu biologického čištění odpadních vod a mikrobiálního rozkladu látek, obsahujících estericky vázaný 2-ethylhexylový postranní řetězec, považovat skutečnost, že i v případě uvolňování 2-ethylhexanolu existují v aktivovaném kalu bakterie schopné jeho využívání, a to i v koncentracích na hranici jeho rozpustnosti ve vodném prostředí.

4.5 Biodegradabilita kokamidopropylbetainu

Biodegradabilitou kokamidopropylbetainu (CAPB) se zabývaly již dvě závěrečné práce vypracované na FT UTB. V rámci diplomové práce Ringlové (2015) byla potvrzena biodegradabilita této látky v aktivovaném kalu a byli izolováni původci rozkladu. Izolované kultury a jejich vztah byly podrobněji studovány v práci Jelénkové (2016) a v této práci.

4.5.1 Izolace a identifikace kultur schopných rozkladu kokamidopropylbetainu

Izolace kultur schopných růstu na kokamidopropylbetainu byla provedena z aktivovaného kalu ČOV Zlín – Malenovice v rámci práce Ringlové (2015). Byly izolovány dvě nefermentující gramnegativní kultury, pracovně označené jako FV a FM; identifikace těchto kultur pomocí analýzy sekvence 16S rDNA a studium některých růstových vlastností kultur proběhly ve spolupráci s Jelénkovou (2016).

Kultura FV byla se shodou 100 % se záznamy v GenBank identifikována jako zástupce rodu *Pseudomonas* sp., přičemž jako neblížší příbuzné druhy byly nalezeny *P. nitroreducens*, *P. citronellolis* a *P. denitrificans*. Kultura je uložena v České sbírce mikroorganismů jako *Pseudomonas* sp. FV CCM 8810 a její částečná sekvence 16S rDNA je uložena v GenBank pod přístupovým číslem MG242132.

Kultura FM byla s 97% shodou se záznamy v GenBank identifikována jako zástupce rodu *Rhizobium* sp., přičemž neblížším příbuzným druhem byl *R. daejeonense*. Kultura je uložena v České sbírce mikroorganismů jako *Rhizobium* sp. FM CCM 8811 a její částečná sekvence 16S rDNA je uložena v GenBank pod přístupovým číslem MG251449.

4.5.2 Obecné růstové vlastnosti kmenů *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM

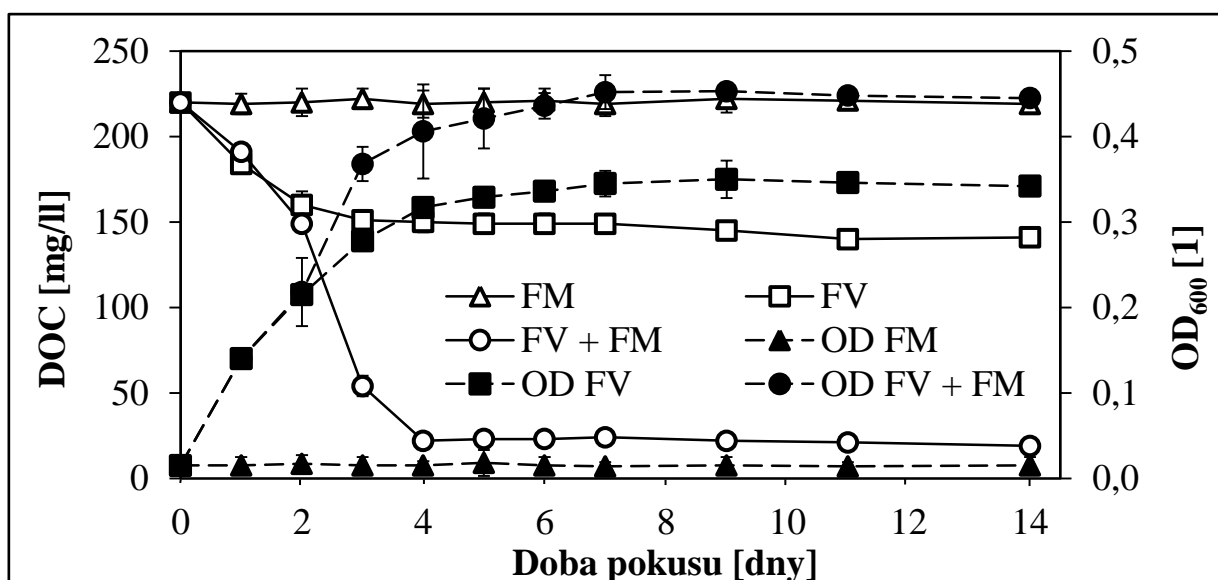
Kultura *Pseudomonas* sp. FV rostla v teplotním rozmezí 10 – 37 °C, potřebná doba inkubace při 30 °C byla 24 hodin. K růstu kultury FV docházelo také v přítomnosti NaCl o koncentraci 0 – 3,0 hm. %; při vyšších koncentracích této soli byla kultura v růstu inhibována.

Kultura *Rhizobium* sp. FM byla schopna růstu v teplotním rozmezí 10 – 41 °C, potřebná doba inkubace při 30 °C však byla 72 hodin. Tato kultura byla citlivější na přítomnost solí, k jejímu růstu docházelo pouze v přítomnosti 0 – 0,5 hm. %; NaCl, při vyšších koncentracích kultura nerostla.

4.5.3 Růstové vlastnosti kultur *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM spojené s rozkladem kokamidopropylbetainu

V práci Jelénkové (2016) bylo potvrzeno, že kultury *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM jsou společně schopny růst na zvýšených koncentracích CAPB, a to až do koncentrace 10 g/l; to naznačuje jejich potenciální význam pro použití v náhodně kontaminovaných lokalitách.

Pro objasnění úlohy jednotlivých bakterií v rozkladném procesu bylo v rámci této práce uskutečněno několik sérií experimentů. Nejprve byla sledována biodegradace CAPB jak jednotlivými kulturami FV a FM, tak i jejich konsorciem. V tomto experimentu byly nasazeny tři série MM s 300 mg/l CAPB, vždy se třemi paralelními lahvemi. Série byly inokulovány buď kulturou FV nebo kulturou FM nebo jejich kombinací. V průběhu pokusu byly odebírány vzorky, u nichž byla stanovována koncentrace DOC a OD_{600} ; výsledky jsou graficky znázorněny na Obr. 4.15.



Obr. 4.15: Degradace CAPB kulturami *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM

Při degradaci CAPB jednotlivými kulturami a jejich kombinací byly získány výrazně rozdílné výsledky, jak je patrné z Obr. 4.15. Zatímco kultura FV byla schopna ke svému růstu CAPB částečně využívat (pokles DOC přibližně o 36 %), sama kultura FM růstu schopna nebyla vůbec. Hodnoty DOC po 14 dnech degradace dosáhly 141,2 mg/l u kultury FV a u kmene FM 219,3 mg/l, takže prakticky zůstaly na výchozí hodnotě 220 mg/l. Naproti tomu, společné působení obou kultur zajistilo prakticky úplnou biodegradaci CAPB, a to za pouhé 4 dny, během nichž bylo spotřebováno více než 90 % organického uhlíku; hodnota DOC na konci pokusu činila jen 19,2 mg/l.

Za účelem dalšího ozřejmění role kultury *Rhizobium* sp. FM v degračním procesu byly proto z finálních degračních suspenzí, po 14 dnech degradace CAPB jednotlivými kulturami, odstraněny přítomné buňky centrifugací a získané supernatanty byly ještě zfiltrány přes sterilní filtry s velikostí pórů

0,22 µm. Sterilní supernatant pocházející z degradace CAPB kulturou FV byl poté zaočkován kulturou FM a naopak. Po 7 a 14 dnech další inkubace byly dvakrát odebrány vzorky, u kterých byly stanoveny koncentrace DOC; zjištěné hodnoty jsou uvedeny v *Tab. 4.13* (počáteční koncentrace DOC, při úplném zahájení degradace CAPB, byla 220 mg/l, viz *Obr. 4.15*).

Tab. 4.13: Koncentrace DOC v supernatantech, zaočkovaných druhou kulturou

Degradace CAPB kulturou	Degradace supernatantu kulturou	Koncentrace DOC [mg/l]		
		Po degradaci CAPB	Degradace	
			7 dní	14 dní
FV	FM	141,2	30,3	18,6
FM	FV	219,3	194,1	140,6

Výsledky uvedené v *Tab. 4.13* ukázaly, že kmen FM dokázal využít podstatný podíl organických sloučenin, které zůstaly v médiu po degradaci CAPB kulturou *Pseudomonas* sp. FV. Na konci testu tak dosáhla koncentrace rozpuštěného organického uhlíku prakticky stejné úrovně, jaká byla pozorována v předchozím testu degradace CAPB konsorciem obou kmenů (18,6 mg/l vs. 19,2 mg/l, viz *Obr. 4.15*).

V opačném případě, po působení kultury *Rhizobium* sp. FM na CAPB, vykávala kultura *Pseudomonas* sp. FV pokles koncentrace DOC z 219,3 jen na 140,6 mg/l. Tento výsledek byl plně v souladu se zjištěním, získaným v prvním testu degradace CAPB kmenem FV, ve kterém byla na konci testu zaznamenána prakticky stejná hodnota DOC 141,2 mg/l.

Získané údaje tak silně naznačily, že za daných podmínek, tj. v kompletním minerálním médiu, zajistila kultura *Pseudomonas* sp. FV primární biodegradaci CAPB, a že produkované metabolity byly následně využity kulturou *Rhizobium* sp. FM. Naproti tomu bylo zřejmé, že působením kultury *Rhizobium* sp. FM na CAPB nedošlo k žádné strukturální změně, která by tento surfaktant zpřístupnila kultuře *Pseudomonas* sp. FV. Další části práce tak byly směřovány k potvrzení tohoto předpokladu a k objasnění, která část CAPB by mohla být využívána jednotlivými kulturami. K tomu byly připraveny dvě sady pokusů, jednak růstové testy obou kultur na strukturálních částech CAPB, jednak pokus degradace CAPB v bezdusíkatém minerálním médiu.

Růst kultur *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM na různých substrátech

V této části práce bylo cílem experimentu objasnění, která část CAPB je potenciálně využitelná jednotlivými kulturami. Vzhledem k tomu, že největší podíl kokamidopropylbetainu představuje lauramidopropylbetain, byl zkoumán růst jednotlivých kultur na lauramidu, laurátu sodném a betainu, včetně růstu na lauramidu a betainu v bezdusíkatém minerálním médiu (MM3). Kromě toho byla také testována utilizace kaprylátu, palmitátu a stearátu. Vybrané substráty

byly použity v koncentraci 125 mg/l lauramidu, 300 mg/l betainu, 200 mg/l laurátu sodného a dále přibližně 120 mg/l kaprylátu, palmitátu a stearátu. Výsledky experimentu byly vyhodnoceny vizuálně a jsou popsány v *Tab. 4.14*.

Tab. 4.14: Utilizace substrátů kulturami Pseudomonas sp. FV a Rhizobium sp. FM v kompletním MM a v bezdusíkatém MM3

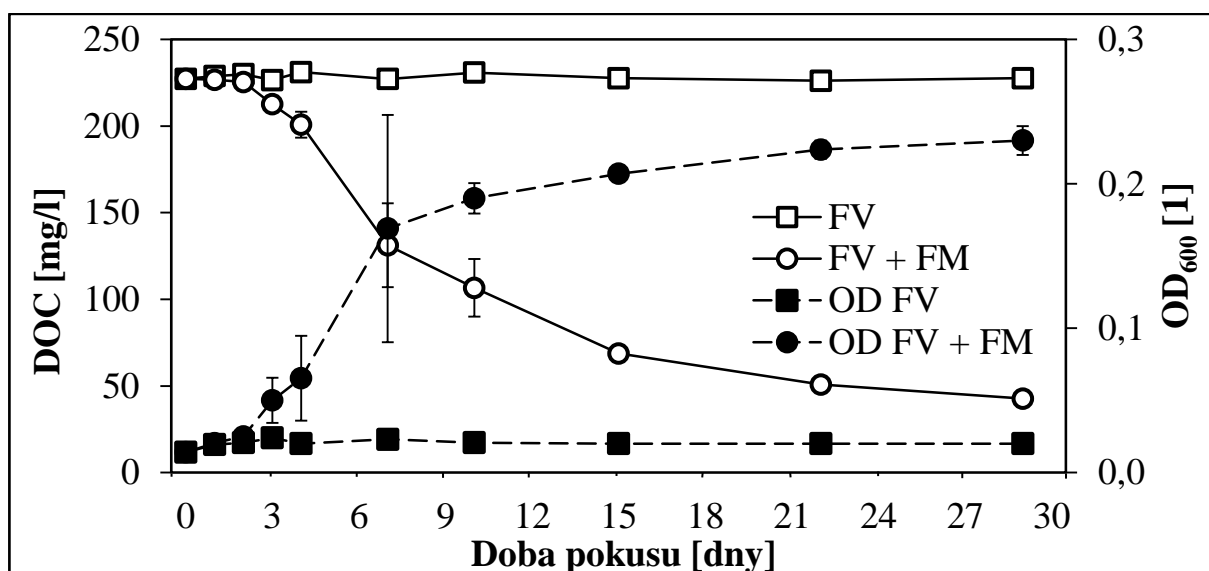
Kultura	Lauramid		Betain		Kaprylát	Laurát	Palmitát	Stearát
	MM	MM3	MM	MM3	MM	MM	MM	MM
FV	+	+	+	+	+	+	+	+
FM	-	-	+	+	+	-	-	-

Tab. 4.14 ukazuje na rozdílné metabolické vlastnosti obou kultur. Utilizace betainu (i bez jakéhokoli jiného zdroje dusíku) a kaprylátu představovaly jediné společné vlastnosti studovaných bakterií. Jak bylo očekáváno, kmen FV vykázal širší degradační schopnosti, projevující se utilizací mastných kyselin se středním i dlouhým řetězcem a také lauramidu pro svůj růst. Bylo tedy zjevné, že kultura FV je schopna asimilovat dusík lauramidu i betainu; tento náález však neprokazoval její stejnou schopnost pro CAPB. Významným zjištěním byla také utilizace betainu kmenem FM, ukazující na potenciální schopnost této kultury využívat alespoň část molekuly CAPB. Na základě těchto skutečností tak bylo rozhodnuto uskutečnit experiment, ve kterém by byl otestován růst jak kultury FV, tak konsorcia obou kultur, na CAPB v prostředí bez externího zdroje dusíku.

Rozklad kokamidopropylbetainu kulturou *Pseudomonas sp. FV* a konsorciem obou kultur v médiu bez jiného zdroje dusíku

Další soubor testů tak zahrnoval zkoumání degradace CAPB v prostředí bez dusíku jak primárním degradérem, tj. kulturou FV, tak kombinací obou kultur FV a FM. K ověření schopnosti růstu kultur v prostředí bez dusíku, byl testován jejich růst na substrátu, který jsou v prostředí klasického MM kultury schopny využívat. Jako testovaný substrát byl využit glycerol v koncentraci 300 mg/l a v rámci experimentu bylo zjištěno, že kultury nejsou schopny glycerol v prostředí bez dusíku využívat.

V experimentu byly proto nasazeny dvě série MM3 (bez dusíku) s 300 mg/l CAPB, vždy ve třech paralelních lahvích. Průběh degradace CAPB byl sledován pomocí stanovení koncentrace DOC a hodnot OD_{600} a je znázorněn na *Obr. 4.16*.



Obr. 4.16: Degradace CAPB kulturou *Pseudomonas sp.* FV a konsorciem obou kultur v nepřítomnosti zdroje dusíku

Výsledky uvedené na Obr. 4.16 jednoznačně ukázaly, že navzdory schopnosti kmene *Pseudomonas sp.* FV využívat betain i lauramid v minerálním médiu, neobsahujícím zdroj dusíku, nebyla tato kultura schopna za stejných podmínek využívat CAPB – nebyly zjištěny žádné známky jejího růstu ani utilizace kokamidopropylbetainu (křivky se čtvercovými značkami na Obr. 4.16). Tento jev spolu s předchozími výsledky a se skutečností, že k mineralizaci CAPB v bezdusíkatém médiu došlo pouze v přítomnosti obou kultur, poskytl zásadní pohled na způsob společné degradace CAPB a umožnil formulovat možnou roli obou kultur.

Při zohlednění všech získaných výsledků lze kmen *Pseudomonas sp.* FV považovat za původce primární degradace, využívajícího jen alkylové řetězce molekul CAPB, zatímco kultura *Rhizobium sp.* FM využívá alkylamidopropylbetainové metabolity, obsahující podstatně zkrácené alkylové části. Navíc je z Obr. 4.16 patrné, že přítomnost kultury FM je v podmínkách bez externího zdroje dusíku pro úspěšnou biodegradaci CAPB stejně důležitá jako přítomnost kultury FV. Jinými slovy, *Pseudomonas sp.* FV má schopnost růstu na kokamidopropylbetainu pouze v přítomnosti jiného, pro ni dostupného zdroje dusíku. Za takových podmínek je schopna částečně využít CAPB jako zdroj uhlíku a energie oxidací jeho alkylových skupin, pravděpodobně bez ohledu na délku alkylových řetězců. Tato hypotéza je podpořena schopností této bakterie růst na mastných kyselinách s krátkým, středním i dlouhým řetězcem (kaprylát C8, laurát C12, palmitát C16, stearát C18) a také skutečností, že byla pozorována rychlá a prakticky úplná degradace CAPB konsorciem obou kmenů (viz Obr. 4.15).

Obecně platí, že štěpení vazby C-N představuje rozhodující krok pro biodegradaci surfaktantů obsahujících dusík, jak dokládají Garcia *et al.* (2007) a Rios *et al.* (2017) ve svých studiích mikrobiálního rozkladu strukturně podobného kokamidopropylaminoxidu. Z tohoto pohledu je důležitost kultury

Rhizobium sp. FM nepřehlédnutelná, přestože není schopna takové štěpení realizovat v intaktním CAPB. Její neschopnost štěpit vazbu C-N v molekule kokamidopropylbetainu je zřejmá vzhledem k tomu, že kultura FM nebyla schopna růstu na CAPB ani v kompletním médiu (Obr. 4.15) a je neschopna využít lauramid. Nicméně, po primární biodegradaci CAPB kmenem *Pseudomonas* sp. FV, je kultura *Rhizobium* sp. FM schopna získávat dusík, uhlík i energii ze vznikajících metabolitů, které již kultura FV není schopna dále rozkládat, čímž zajišťuje pokračování degradačního procesu. Navíc, v prostředí neobsahující dostupný dusík kultura FM zásobuje dusíkem i svého degradačního partnera, což je doloženo nejen společnou degradací v bezdusíkatém médiu, ale také růstem kultury FM na betainu za stejných podmínek. Naproti tomu její neschopnost využívat lauramid naznačuje, že alkylový řetězec o určité délce, sousedící s amidovou skupinou, je překážkou pro její asimilaci amidického dusíku.

Dostupnost dusíku se tak jeví jako klíčový aspekt degradace CAPB, což lze doložit srovnáním rychlostí rozkladu v kompletním a bezdusíkatém médiu. Při utilizaci CAPB konsorciem FV + FM v kompletním MM došlo ke snížení hodnoty DOC z 220,3 na 21,7 mg/l během pouhých 4 dnů, zatímco v podmínkách bez dusíku došlo z počáteční koncentrace 227,2 ke snížení na hodnotu 43 mg/l až po 29 dnech procesu. Je zřejmé, že dosažení stejné úrovně mineralizace v neúplném médiu by tak vyžadovalo více než 1 měsíc inkubace. Lze předpokládat, že důvody takového zpomalení rozkladného procesu v bezdusíkatém prostředí jsou jednak omezený rozsah primární biodegradace kmenem *Pseudomonas* sp. FV a nezbytnost jejího zásobení dusíkem, velmi pravděpodobně produkty vylučovanými kulturou *Rhizobium* sp. FM.

Biodegradace některých surfaktantů vlivem bakteriálních konsorcií již byla některými autory popsána. Například Schleheck *et al.* (2004) dokumentovali primární biodegradaci lineárního alkylbenzensulfonátu bakterií *Parvibaculum lavamentivorans*, s následným využitím některých metabolitů druhu *Comamonas testosteroni* a *Delftia acidovorans*. V případě benzalkoniumchloridu Oh *et al.* (2014) zjistili, že za dealkylaci tohoto surfaktantu byl zodpovědný kmen *Pseudomonas nitroreducens*, zatímco jiné druhy rodu *Pseudomonas*, jako *P. putida* a *P. entomophila*, metabolizovaly benzylové meziproducty pocházející z primární degradace.

Pokud jde o CAPB, analytická studie Eichhorna a Kneppera (2001) ukázala, že intaktní molekuly surfaktantu byly při biodegradaci inkorporovány do buněk a intracelulárně degradovány bez uvolnění jakéhokoliv metabolitu. Jako inokulum pro jejich degradační experimenty však byla použita voda z řeky Rýn a lze tak předpokládat, že složení mikrobiálního konsorcia bylo v jejich studii zcela odlišné od dvojice našich kmenů, izolovaných z aktivovaného kalu. Naše výsledky bezpochyby ukazují, že meziproducty vznikající primární biodegradací CAPB kulturou *Pseudomonas* sp. FV jsou dostupné pro kulturu *Rhizobium* sp. FM ve formě extracelulárních sloučenin.

5. ZÁVĚR

Na základě řady vědeckých studií lze poměrně dobře rozlišit mikrobiálně rozložitelné sloučeniny od sloučenin málo rozložitelných či nerozložitelných. V tomto směru existuje široká škála metod pro zkoumání biodegradability látek i materiálů a je známo již obrovské množství informací. Tato práce se soustředila na studium mikrobiálního rozkladu několika látek reprezentujících jak vysokomolekulární, tak nízkomolekulární sloučeniny, používané pro poměrně rozmanité účely; od povrchových úprav řady materiálů, až po jejich aplikaci do směsí, pro dosažení určitých užitečných vlastností materiálů a přípravků.

První ze sledovaných látek byl poly(vinylalkohol); experimenty byly nejdříve zaměřeny na sledování průběhu jeho mikrobiálního rozkladu kulturami *Sphingomonas* sp. JK2 a OT2 v závislosti na míře inokulace. Celkově výsledky ukázaly, že s klesající velikostí inokul docházelo sice k mírnému prodlužování úvodních fází rozkladu, nicméně bylo prokázáno, že úspěšná degradace polymeru může nastávat i v přítomnosti minimálních inokul, v řádu jednotlivých buněk degradačních kultur v 1 ml média. V rámci těchto experimentů pak bylo mimo jiné zjištěno, že kultura *Sphingomonas* sp. OT2 není v podmínkách statické kultivace schopna kompletního rozkladu polymeru, a proto se další experimenty věnovaly objasnění tohoto jevu. Bylo zkoumáno, zda dochází k zastavení rozkladu vlivem poklesu pH v průběhu utilizace polymeru; to však nebylo jednoznačně potvrzeno. Výsledky následných experimentů nicméně ukázaly, že buňky po proběhlé degradaci jsou dalšího rozkladu schopny po přenesení do čerstvého média. Lze tak usoudit, že pozorované zastavení rozkladu polymeru je tak spíše zapříčiněno hromaděním určitých metabolitů v médiu, či mírným poklesem pH, případně kombinací těchto dvou faktorů. V závěrečných pokusech této série byla pozitivním zjištěním úplná degradace PVA kulturou *Sphingomonas* sp. OT2 v kombinaci s kalovým inokulem a dále i úplná degradace polymeru konsorciem mikroorganismů říční vody, ukazující, že i v těchto prostředích existují mikroorganismy schopné kompletního rozkladu.

Z řad vysokomolekulárních látek byla dále sledována mikrobiální rozložitelnost poly(vinylpyrrolidonu), polymeru rozpustného ve vodě. Biodegradace této látky byla zkoumána za účasti směšného bakteriálního konsorcia, schopného rozkladu sktrukturně podobného, avšak nízkomolekulárního 1-oktyl-2-pyrrolidonu. V rámci tohoto dlouhodobého experimentu však tímto konsorciem, ani jeho kombinací s inokulem čistírenského kalu, nebyl mikrobiální rozklad polymeru prokázán.

Další část práce byla zaměřena na studium degradace vybraných nízkomolekulárních látek, kde souběžně probíhaly experimenty věnující se bakteriálnímu rozkladu 2-ethylhexylsalicylátu (EHS) a 2-ethylhexanolu

(EHOL). Z aktivovaného kalu byly izolovány kultury schopné utilizace těchto látek a ty byly dále zkoumány.

Kultura schopná utilizace EHS byla identifikována jako zástupce rodu *Rhodococcus* a v práci byla především sledována její schopnost utilizace jednotlivých strukturálních částí molekuly EHS. Kultura byla schopna růstu na salicylanu sodném, ale nikoliv na 2-ethylhexanolu v koncentraci 500 mg/l; vznik a hromadění 2-ethylhexanolu v průběhu růstu na EHS se však prokázat nepodařilo. Další zkoušky ovšem ukázaly, že kultura je utilizace 2-ethylhexanolu schopna, ale pouze při jeho nižších koncentracích – maximální růstová koncentrace byla 350 mg/l. Podobně tomu bylo i při růstu na 2-ethylhexanalu (předpokládaném metabolitu 2-ethylhexanolu); zde byla kultura schopna růstu pouze při koncentraci 20 mg/l. V rámci série experimentů tak bylo potvrzeno, že kultura *Rhodococcus* sp. ES 12 je schopna utilizace obou strukturálních částí molekuly EHS. Kultura roste v rozmezí pH 6,0 – 9,5, při teplotách 5 – 30 °C.

V průběhu prací byla dále z aktivovaného kalu izolována kultura schopná růstu na zvýšených koncentracích 2-ethylhexanolu a byla identifikována jako *Pseudomonas* sp. P. Kmen dokázal kompletně využít 500 mg/l 2-ethylhexanolu během 36 hodin a rostl i při jeho koncentraci 1000 mg/l. Maximální růstová koncentrace 2-ethylhexanolu však byla opět výrazně nižší, a to 100 mg/l. Schopnost růstu jednotlivých bakteriálních kultur na 2-ethylhexanolu je tak pravděpodobně dána spíše toxicitou vznikajícího 2-ethylhexanolu, případně ještě rychlostí následné přeměny 2-ethylhexanolu na 2-ethylhexanovou kyselinu.

Poslední část experimentálních prací se věnovala studiu rozkladu kokamidopropylbetainu kulturami *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM. Vzhledem k tomu, že kultury byly schopné kompletní utilizace substrátu pouze ve společném konsorciu, byla v rámci této práce zkoumána a objasněna jejich pravděpodobná úloha při společném rozkladu této látky. Bylo zjištěno, že *Pseudomonas* sp. FV, která je původcem primární biodegradace, využívá alkylové řetězce molekul CAPB a má schopnost růstu na kokamidopropylbetainu pouze v přítomnosti jiného, pro ni dostupného zdroje dusíku; není totiž schopna asimilovat dusík z molekul CAPB. Naopak, kultura *Rhizobium* sp. FM je po primární biodegradaci CAPB kmenem *Pseudomonas* sp. FV schopna získávat dusík i uhlík a energii ze vznikajících metabolitů, které již kultura FV není schopna dále rozkládat, čímž zajišťuje dokončení degradačního procesu. Navíc, v nepřítomnosti externího zdroje dusíku umožňuje konsorciu obou kultur sice zpomalenou, ale přece jen probíhající utilizaci tohoto surfaktantu.

6. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Tato práce se věnovala studiu bakteriálního rozkladu vybraných syntetických vysokomolekulárních a nízkomolekulárních látek, které jsou široce využívány v řadě průmyslových odvětví. Dostupné znalosti o jejich biodegradabilitě jsou značně odlišné; je tedy zřejmé, že studium mikrobiální degradace každé z látek bylo vždy jedinečným problémem a práce tak byla zaměřena na různé aspekty těchto procesů. Tento přístup umožnil širší poznání biodegradability průmyslových sloučenin a případných dopadů aplikace těchto látek v životním prostředí.

Přínos výzkumu mikrobiálního rozkladu poly(vinylalkoholu) a poly(vinylpyrrolidonu) pro vědu a praxi tak může být shrnut v těchto bodech:

- Jedná se o první studii, sledující tak široký rozsah velikostí testovaných inokul. Hlavním vědeckým přínosem se jeví zjištění, že bakteriální rozklad netoxického xenobiotika (PVA) může být zahájen i v přítomnosti minimálního množství buněk s potřebnou schopností, což naznačuje, že k rozkladu může docházet i v prostředích s poměrně nízkým mikrobiálním osídlením.
- Utilizace PVA kulturou *Sphingomonas* sp. OT2 není kompletní, zastavení rozkladu polymeru nastává pravděpodobně vlivem několika faktorů prostředí.
- Bylo potvrzeno, že k rozkladu poly(vinylalkoholu) může docházet také v prostředí s nižším mikrobiálním osídlením, jako jsou například říční vody; vzhledem k obecně dobré rozložitelnosti tohoto polymeru v aerobním prostředí tak neexistují zásadní překážky jeho používání v řadě průmyslových aplikací.
- Bylo zjištěno, že k mikrobiálnímu rozkladu PVP za pomoci konsorcia schopného rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu nedochází, a to ani v kombinaci s mikroorganismy aktivovaného kalu a po jejich dlouhodobém působení.
- Otázkou do budoucna je osud PVP v životním prostředí a zvážení jeho dalšího používání v některých aplikacích; jako řešení se jeví jeho nahrazení lépe rozložitelnými látkami.

Přínos pro vědu a praxi vyplývající z výsledků mikrobiálního rozkladu studovaných syntetických nízkomolekulárních látek lze pak vidět v následujících bodech:

- Byly popsány konkrétní rody bakterií, podílející se na rozkladu daných látek.
- Vzhledem k tomu, že se jedná o bakteriální rody běžně se vyskytující v různých environmentálních sférách, lze do jisté míry předpokládat, že tyto látky budou v prostředí rozkládány a pravděpodobně nebude docházet k jejich zásadní kumulaci.

- V čistírenských suspenzích byla potvrzena přítomnost mikroorganismů schopných kompletní utilizace EHS a byla provedena identifikace aktivního degradačního kmene, která prokázala jeho příslušnost k rodu *Rhodococcus*.
- Koncentrace 2-ethylhexanolu může hrát v procesu mikrobiální degradace látek, obsahujících 2-ethylhexylový řetězec, významnou roli, což je zřejmě dáno také toxicitou meziprojektu jeho rozkladu, tj. 2-ethylhexanalu.
- Byla provedena izolace kmene schopného rozkládat vyšší koncentrace 2-ethylhexanolu a degradační kmen byl identifikován jako zástupce rodu *Pseudomonas*.
- Byla zavedena a optimalizována metoda stanovení koncentrace 2-ethylhexanolu ve vodném prostředí pomocí SPE-GC.
- Byla potvrzena poměrně velmi dobrá biodegradabilita kokamidopropylbetainu za optimálních podmínek.
- Pokusy zabývající se biodegradabilitou CAPB vedly k objasnění vztahu mezi kulturami *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM, což potvrdilo, jaký význam má kooperace mezi různými bakteriálními kmeny při rozkladu určitých látek.
- Práce také ukázala, že přítomnost dostupného zdroje dusíku může mít na rychlost rozkladu CAPB výrazný vliv.
- Bakteriální kultury, které byly v průběhu práce získány, tj. *Rhodococcus* sp. ES 12, *Pseudomonas* sp. P, *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM, byly uloženy v České sbírce mikroorganismů v Brně a jsou tak vědecké komunitě dostupné pro případné další zkoumání.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AMIDON, G. L., S. H. YALKOWSKY a S. LEUNG, 1974. Solubility of Nonelectrolytes in Polar Solvents II: Solubility of Aliphatic Alcohols in Water. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **63**(12), 1858-1866 [cit. 2017-01-16]. DOI: 10.1002/jps.2600631207. ISSN 00223549. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915419446>

ANDERSEN, A. F., 2003. Safety Assessment of Salicylic Acid, Butyloctyl Salicylate, Calcium Salicylate, C12–15 Alkyl Salicylate, Capryloyl Salicylic Acid, Hexyldodecyl Salicylate, Isocetyl Salicylate, Isodecyl Salicylate, Magnesium Salicylate, MEA-Salicylate, Ethylhexyl Salicylate, Potassium Salicylate, Methyl Salicylate, Myristyl Salicylate, Sodium Salicylate, TEA-Salicylate, and Tridecyl Salicylate. *International Journal of Toxicology (Taylor & Francis)* [online]. (22), 1-108 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1080/10915810390239487. ISSN 1092-874X. Dostupné z: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=d45cd050-84c0-4727-96f7-5daa82860631%40sessionmgr104&vid=0&hid=118>

ASTILL, B. D., R. GINGELL, D. GUEST, et al., 1996a. Oncogenicity Testing of 2-Ethylhexanol in Fischer 344 Rats and B6C3F1 Mice. *Toxicological Sciences* [online]. **31**(1), 29-41 [cit. 2016-11-21]. DOI: 10.1093/toxsci/31.1.29. ISSN 10966080. Dostupné z: <http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/31.1.29>

ASTILL, B. D., K. DECKARDT, CHR. GEMBARDT, et al., 1996b. Prechronic Toxicity Studies on 2-Ethylhexanol in F334 Rats and B6C3F1 Mice. *Toxicological Sciences* [online]. **29**(1), 31-39 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1093/toxsci/29.1.31. ISSN 10966080. Dostupné z: <http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/29.1.31>

AYED, L., K. CHAIEB, A. CHEREF a A. BAKHROUF, 2009. Biodegradation of triphenylmethane dye Malachite Green by *Sphingomonas paucimobilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **25**(4), 705-711 [cit. 2018-01-03]. DOI: 10.1007/s11274-008-9941-x. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-008-9941-x>

BARBAS, C. F., D. R. BURTON, J. K. SCOTT a G. J. SILVERMAN, 2007. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. **11**, 47 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1101/pdb.ip47. ISSN 19403402. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.ip47>

BELSITO, D., D. BICKERS, M. BRUZE, et al., 2007. A toxicologic and dermatologic assessment of salicylates when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **45**(1), S318-S361 [cit. 2016-11-21].

DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.066. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004048>

BENEDÉ, J. L., A. CHISVERT, A. SALVADOR, D. SÁNCHEZ-QUILES a A. TOVAR-SÁNCHEZ, 2014. Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. **812**, 50-58 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.aca.2013.12.033. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267013015821>

BHARATHIRAJA, B., J. JAYAMUTHUNAGAI, M. JAYAKUMAR, et al., 2013. Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) using *Pseudomonas alcaligenes*. *Asian Journal of Chemistry* [online]. **25**(15), 8663-8667 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.14233/ajchem.2013.14937. ISSN 09707077. Dostupné z: http://www.asianjournalofchemistry.co.in/user/journal/viewarticle.aspx?ArticleID=25_16_98

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, 2017. *NCBI: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine* [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BÜHLER, Volker, c2005. *Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals: povidone, crospovidone, and copovidone*. New York: Springer. ISBN 3540234128.

BURNETT, Ch. L., W. F. BERGFELD, D. V. BELSITO, et al., 2012. Final Report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel on the Safety Assessment of Cocamidopropyl betaine (CAPB). *International Journal of Toxicology* [online]. **31.4_suppl** (77S-111S) [cit. 2018-01-16]. DOI: 0.1177/1091581812447202. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1091581812447202>

CLARIANT GMBH, 1999. *Mowiol - Polyvinyl Alcohol: Technical Brochure*. Sulzbach.

ČSN EN ISO 8192. *Jakost vod - Zkouška inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem při oxidaci uhlikatých látek a amoniakálního dusíku.*, 2007. Český normalizační institut.

DAVE, G. a U. LIDMAN, 1978. Biological and toxicological effects of solvent extraction chemicals. *Hydrometallurgy* [online]. **3**(3), 201-216 [cit. 2016-11-21]. DOI: 10.1016/0304-386X(78)90023-3. ISSN 0304386x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304386X78900233>

DEMERLIS, C. C. a D. R. SCHONEKER, 2003. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology* [online]. **41**(3), 319-326 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/S0278-6915(02)00258-2. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691502002582>

DU, G., L. LIU, Z. SONG, Z. HUA, Y. ZHU a J. CHEN, 2007. Production of polyvinyl alcohol-degrading enzyme with *Janthinobacterium* sp. and its application in cotton fabric desizing. *Biotechnology Journal* [online]. **2**(6), 752-758 [cit. 2018-01-08]. DOI: 10.1002/biot.200600121. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600121>

DUCHÁČEK, Vratislav, 2006. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 8070806176.

DUINE, J. A., J. Frank JZN. a J.K. VAN ZEELAND, 1979. Glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEBS Letters* [online]. **108**(2), 443-446 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.1016/0014-5793(79)80584-0. ISSN 00145793. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2879%2980584-0>

EICHHORN, P. a T. P. KNEPPER, 2001. Electrospray ionization mass spectrometric studies on the amphoteric surfactant cocamidopropylbetaine. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. **36**(6), 677-684 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1002/jms.170. ISSN 1076-5174. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.170>

EJLERTSSON, J. a B. H. SVENSSON, 1997. Degradation of bis(2-ethylhexyl) phthalate constituents under methanogenic conditions. *Biodegradation* [online]. **7**(6), 501-506 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/BF00115296. ISSN 09239820. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00115296>

EKPEGHERE, K. I., U.-J. KIM, S.-H. O, H.-Y. KIM a J.-E. OH, 2016. Distribution and seasonal occurrence of UV filters in rivers and wastewater treatment plants in Korea. *Science of The Total Environment* [online]. **542**, 121-128 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.033. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969715308494>

EU a European COMMISSION, 2000. *Reports of the Scientific committee on cosmetology: (ninth series)*. Luxembourg: EUR-OP. ISBN 9282889513.

FINCH, C. A., c1992. *Polyvinyl alcohol: developments*. New York: Wiley. ISBN 0471998508.

FOLADORI, P., L. BRUNI, S. TAMBURINI a G. ZIGLIO, 2010. Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. *Water Research* [online]. **44**(13), 3807-3818 [cit. 2018-01-08]. DOI: 10.1016/j.watres.2010.04.027. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135410002800>

FUKAE, Ryohei, Toshiki FUJII, Masahiro TAKEO, Tohei YAMAMOTO, Toshiaki SATO, Yoshimichi MAEDA a Osamu SANGEN, 1994. Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) with High Isotacticity. *Polymer Journal* [online]. **26**(12), 1381-1386 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1295/polymj.26.1381. ISSN 00323896. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1295/polymj.26.1381>

GARCÍA, M. T., E. CAMPOS a I. RIBOSA, 2007. Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants. *Chemosphere* [online]. **69**(10), 1574-1578 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.05.089. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653507007151>

GARCIA, M. T., E. CAMPOS, A. MARSAL a I. RIBOSA, 2008. Fate and effects of amphoteric surfactants in the aquatic environment. *Environment International* [online]. **34**(7), 1001-1005 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.envint.2008.03.010. ISSN 01604120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412008000391>

GHEORGHE, S., I. LUCACIU a L. PASCU, 2012. Biodegradability assessment of cationic and amphoteric raw materials. *Journal of Environmental Protection and Ecology* [online]. **13**(1), 155-163 [cit. 2018-01-16].

GOODWIN, P. M. a CH. ANTHONY, The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Advances in microbial physiology*. 1998, 40: 1-80. [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60129-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065291108601290>

HARRIGAN, W. F., c1998. *Laboratory methods in food microbiology*. 3rd. ed. San Diego: Academic Press. ISBN 0123260434.

HASHIMOTO, S. a M. FUJITA, 1985. Isolation of a bacterium requiring three amino acids for polyvinyl alcohol degradation. *Journal of Fermentation Technology* [online]. **63**(5), 471-474 [cit. 2016-11-14].

HERA, 2005. *Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of household cleaning products Cocamidopropyl betaine (CAPB)* [online]. [cit. 2018-01-16]. Dostupné z: <http://www.heraproject.com/files/45-hh-e101023f-d12f-6a30-deb0770e9bf8e4d0.pdf>

HORIKOSHI, S., H. HIDAKA a N. SERPONE, 2001. Photocatalyzed degradation of polymers in aqueous semiconductor suspensions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. **138**(1), 69-77 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/S1010-6030(00)00388-9. ISSN 10106030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603000003889>

HORN, O., S. NALLI, D. COOPER a J. NICELL, 2004. Plasticizer metabolites in the environment. *Water Research* [online]. **38**(17), 3693-3698 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/j.watres.2004.06.012. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135404003380>

HUNTER, E. J. a J. F. FOWLER JR., Safety to human skin of cocamidopropyl betaine: A mild surfactant for personal-care products. *Journal of Surfactants and Detergents* [online]. **1**(2), 235–239 [cit. 2018-01-16]. Dostupné z: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11743-998-0025-3.pdf>

HU, X., R. MAMOTO, Y. FUJIOKA, A. TANI, K. KIMBARA a F. KAWAI, 2008. The pva operon is located on the megaplasmid of *Sphingopyxis* sp. strain 113P3 and is constitutively expressed, although expression is enhanced by PVA. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **78**(4), 685-693 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/s00253-008-1348-y. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-008-1348-y>

CHEN, J., M. H. WONG, Y.S. WONG a N. F. Y. TAM, 2008. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **57**(6-12), 695-702 [cit. 2018-01-03]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2008.03.013. ISSN 0025326x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X08001665>

CHEN, J., Y. ZHANG, G.-C. DU, Z.-Z. HUA a Y. ZHU, 2007. Biodegradation of polyvinyl alcohol by a mixed microbial culture. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. **40**(7), 1686-1691 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.09.010. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022906004613>

CHENIER, PHILIP J., 2012. *Survey of industrial chemistry*. Third Edition. S.l.: Springer. ISBN 9781461351535.

CHIELLINI, E., A. CORTI, S. D'ANTONE a R. SOLARO, 2003. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science* [online]. **28**(6), 963-1014 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1016/S0079-6700(02)00149-1. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670002001491>

CHOI, K. K., C. W. PARK, S. Y. KIM, W. S. LYOO, S. H. LEE a J. W. LEE, 2004. Polyvinyl alcohol degradation by *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 in dyeing wastewater. *Journal of microbiology and biotechnology* [online]. **14**(5), 1009-1013 [cit. 2016-11-14]. Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/main.html?mod=vol>

IARC. *Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 42 : this publication represents the views and expert opinions of an IARC ad-hoc Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 10-18 March 1987, 1987.* Geneva, Switzerland: Distributed by the World Health Organization, Distribution and Sales Service. ISBN 9283214110.

JELÉNKOVÁ, Markéta, 2016. *Studium bakteriálních kultur schopných rozkladu kosmetických sloučenin.* Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

JULINOVÁ, M., J. KUPEC, J. HOUSER, R. SLAVÍK, H. MARUŠINCOVÁ, L. ČERVEŇÁKOVÁ a S. KLÍVAR, 2012. Removal of Polyvinylpyrrolidone from Wastewater Using Different Methods. *Water Environment Research* [online]. **84**(12), 2123-2132 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.2175/106143012X13373575830999. ISSN 10614303. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&iissn=1061-4303&volume=84&issue=12&spage=2123>

JULINOVA, M., J. KUPEC, R. SLAVIK a M. VASKOVA, 2013. Initiating Biodegradation of Polyvinylpyrrolidone in an Aqueous Aerobic Environment: Technical Note *Ecological Chemistry and Engineering S* [online]. **20**(1), - [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.2478/eces-2013-0015. ISSN 18986196. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/eces.2013.20.issue-1/eces-2013-0015/eces-2013-0015.xml>

KAMEDA, Y., K. KIMURA a M. MIYAZAKI, 2011. Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution* [online]. **159**(6), 1570-1576 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.envpol.2011.02.055. ISSN 02697491. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749111001308>

KAWAI, F. a X. HU, 2009. Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **84**(2), 227-237 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/s00253-009-2113-6. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2113-6>

KAWAI, F., S. KITAJIMA, K. ODA, T. HIGASA, J. CHAROENPANICH, X. HU a R. MAMOTO, 2013. Polyvinyl alcohol and polyethylene glycol form polymer bodies in the periplasm of Sphingomonads that are able to assimilate them. *Archives of Microbiology* [online]. **195**(2), 131-140 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/s00203-012-0859-1. ISSN 03028933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-012-0859-1>

KELLY, C. M, C. C DEMERLIS, D. R SCHONEKER a J. F BORZELLECA, 2003. Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **41**(5), 719-727 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1016/S0278-6915(03)00003-6. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691503000036>

KESSEN, G., B. CORNILS, W. GICK, E. WIEBUS, J. HIBBEL, H- BACH a W. ZGORZELSKI, *Process for the production of 2-ethyl-hexanol*. U.S. Patent. No 4,684,750. Uděleno 1987.

KIM, B. C., C. K. SOHN, S. K. LIM, J. W. LEE a W. PARK, 2003. Degradation of polyvinyl alcohol by *Sphingomonas* sp. SA3 and its symbiote. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. **30**(1), 70-74 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/s10295-002-0010-4. ISSN 13675435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-002-0010-4>

KIM, M. N. a M. G. YOON, 2010. Isolation of strains degrading poly(Vinyl alcohol) at high temperatures and their biodegradation ability. *Polymer Degradation and Stability* [online]. **95**(1), 89-93 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.09.014. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391009003255>

KLOMKLANG, W., A. TANI, K. KIMBARA, R. MAMOTO, T. UEDA, M. SHIMAO a F. KAWAI, 2005. Biochemical and molecular characterization of a periplasmic hydrolase for oxidized polyvinyl alcohol from *Sphingomonas* sp. strain 113P3. *Microbiology* [online]. (151.4), 1255-1262 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1099/mic.0.27655-0. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27655-0>

KŘÍŽEK, K., J. RŮŽIČKA, M. JULINOVÁ, L. HUSÁROVÁ, J. HOUSER, M. DVOŘÁČKOVÁ a P. JANČOVÁ, 2015. N-methyl-2-pyrrolidone-degrading bacteria from activated sludge. *Water Science & Technology* [online]. **71**(5), 776- [cit. 2018-01-29]. DOI: 10.2166/wst.2015.031. ISSN 0273-1223. Dostupné z: <http://wst.iwaponline.com/cgi/doi/10.2166/wst.2015.031>

KOPČILOVÁ, M., J. HUBÁČKOVÁ, J. RŮŽIČKA, et al., 2013. Biodegradability and Mechanical Properties of Poly(vinyl alcohol)-Based Blend Plastics Prepared Through Extrusion Method. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **21**(1), 88-94 [cit. 2017-01-23]. DOI: 10.1007/s10924-012-0520-8. ISSN 15662543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-012-0520-8>

KOVAČIČ, Ľ. a J. BÍNA, 1974. *Plasty: vlastnosti, spracovanie, využitie*. Bratislava: Alfa.

LAPCZYNSKI, A., D. MCGINTY, L. JONES, C. S. LETIZIA a A. M. API, 2007. Fragrance material review on ethyl hexyl salicylate. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **45**(1), S393-S396 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.041. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507003791>

LEE, H. W., S. Y. LEE, J. O. LEE, H. G. KIM, J. B. PARK, E. CHOI a Y. K. PARK, 2003. The microbial community analysis of a 5-stage BNR process with step feed system. *Water Science and Technology: 2nd IWA Specialized Conference on Environmental Biotechnology* [online]. **48**(3), 135-141 [cit. 2018-01-08]. ISSN 0273-1223.

LEE, J.-A. a M.-N. KIM, 2003. Isolation of new and potent poly(vinyl alcohol)-degrading strains and their degradation activity. *Polymer Degradation and Stability* [online]. **81**(2), 303-308 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/S0141-3910(03)00101-0. ISSN 01413910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391003001010>

HUIXING L., L. ZHAOXIA a CH. XIN, 2010. Isolation and degradation characterization of PVA degrading strain. In: *2010 The 2nd Conference on Environmental Science and Information Application Technology* [online]. IEEE, 2010, s. 693-696 [cit. 2018-01-04]. DOI: 10.1109/ESIAT.2010.5568923. ISBN 978-1-4244-7387-8. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5568923/>

LIM, J. G. a D. H. PARK, 2001. Degradation of polyvinyl alcohol by *Brevibacillus laterosporus*: metabolic pathway of polyvinyl alcohol to acetate. *Journal of microbiology and biotechnology* [online]. **11**(6), 928-933 [cit. 2016-11-14]. Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/main.html?mod=vo>

LIU, H., L. LIU, Y. XIONG, X. YANG a T. LUAN, 2010. Simultaneous determination of UV filters and polycyclic musks in aqueous samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. **1217**(43), 6747-6753 [cit. 2017-08-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.06.004. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310007569>

LORAINÉ, G. A., 2008. Oxidation of Polyvinylpyrrolidone and an Ethoxylate Surfactant in Phase-Inversion Wastewater. *Water Environment Research* [online]. **80**(4), 373-379 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.2175/106143008X266779. ISSN 10614303. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1061-4303&volume=80&issue=4&spage=373>

LUKIĆ, I., M. BANOVIĆ, Đ. PERŠURIĆ, S. RADEKA a B. SLADONJA, 2006. Determination of volatile compounds in grape distillates by solid-phase extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. **1101**(1-2), 238-244 [cit. 2018-01-25]. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.09.057. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305018649>

MAMOTO, R., R. NAGAI, S. TACHIBANA, M. YASUDA, K. KIMBARA a F. KAWAI, 2006. Cloning and expression of the gene for periplasmic poly(vinyl alcohol) dehydrogenase from *Sphingomonas* sp. strain 113P3, a novel-type quinoxaemoprotein alcohol dehydrogenase. *Microbiology* [online]. (152), 1941-1949 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1099/mic.0.28848-0. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28848-0>

MARUŠINCOVÁ, H., L. HUSÁROVÁ, J. RŮŽIČKA, M. INGR, V. NAVRÁTIL, L. BUŇKOVÁ a M. KOUTNY, 2013. Polyvinyl alcohol biodegradation under denitrifying conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. **84**, 21-28 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.05.023. ISSN 09648305. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830513002060>

MARUYAMA, T., H.-D. PARK, K. OZAWA, Y. TANAKA, T. SUMINO, K. HAMANA, A. HIRAIISHI a K. KATO, 2006. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a microcystin-degrading bacterium.

INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY [online]. **56**(1), 85-89 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1099/ijs.0.63789-0. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.63789-0>

MATSUMURA, S., H. KURITA a H. SHIMOKOBE, 1993. Anaerobic biodegradability of polyvinyl alcohol. *Biotechnology Letters* [online]. **15**(7), 749-754 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1007/BF01080150. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01080150>

MATSUMURA, S., Y. SHIMURA, K. TERAYAMA a T. KIYOHARA, 1994. Effects of molecular weight and stereoregularity on biodegradation of poly(vinyl alcohol) by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters* [online]. **16**(11), 1205-1210 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/BF01020852. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01020852>

MATSUMURA, S., N. TOMIZAWA, A. TOKI, K. NISHIKAWA a K. TOSHIMA, 1999. Novel Poly(vinyl alcohol)-Degrading Enzyme and the Degradation Mechanism. *Macromolecules* [online]. **32**(23), 7753-7761 [cit. 2018-01-02]. DOI: 10.1021/ma990727b. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma990727b>

MCGINTY, D., J. SCOGNAMIGLIO, C. S. LETIZIA a A. M. API, 2010. Fragrance material review on 2-ethyl-1-hexanol. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **48**, S115-S129 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1016/j.fct.2010.05.042. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691510003182>

MIETHLING, R. a U. KARLSON, 1996. Accelerated Mineralization of Pentachlorophenol in Soil upon Inoculation with *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP1 and *Sphingomonas chlorophenolica* RA2. *Applied and environmental microbiology*. **62**(12), 4361-4366. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/62/12/4361.full.pdf>

MĚRKOVÁ, Markéta, 2014. *Biodegradace syntetických polymerů bakteriemi rodu Sphingomonas*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

MORI, T., M. SAKIMOTO, T. KAGI a T. SAKAI, 1996. Isolation and Characterization of a Strain of *Bacillus megaterium* That Degrades Poly(vinyl alcohol). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. **60**(2), 330-332 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1271/bbb.60.330. ISSN 09168451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.60.330>

NAIR, B., 1998. Final Report On the Safety Assessment of Polyvinyl Alcohol. *International Journal of Toxicology* [online]. **17**(5 Suppl), 67-92 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1177/109158189801700505. ISSN 10915818. Dostupné z: <http://ijt.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/109158189801700505>

NALLI, S., O. J. HORN, A. R. GROCHOWALSKI, D. G. COOPER a J. A. NICELL, 2006. Origin of 2-ethylhexanol as a VOC. *Environmental Pollution* [online]. **140**(1), 181-185 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.06.018. ISSN 02697491. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749105003568>

NALLI, S., D. G. COOPER a J. A. NICELL, 2002. Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Biodegradation* [online]. **13**(5), 343-352 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1023/A:1022313810852. ISSN 09239820. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1022313810852>

NEGREIRA, N., P. CANOSA, I. RODRÍGUEZ, M. RAMIL, E. RUBÍ a R. CELA, 2008. Study of some UV filters stability in chlorinated water and identification of halogenated by-products by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. **1178**(1-2), 206-214 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.11.057. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307020419>

NEGREIRA, N., I. RODRÍGUEZ, M. RAMIL, E. RUBÍ a R. CELA, 2009. Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. **638**(1), 36-44 [cit. 2017-08-23]. DOI: 10.1016/j.aca.2009.02.015. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267009002578>

NEGREIRA, N., I. RODRÍGUEZ, E. RUBÍ a R. CELA, 2011. Optimization of pressurized liquid extraction and purification conditions for gas chromatography–mass spectrometry determination of UV filters in sludge. *Journal of Chromatography A* [online]. **1218**(2), 211-217 [cit. 2017-08-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.11.028. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731001602X>

NISHIMURA, H., S. SAITO, F. KISHIDA a M. MATSUO, 1994. Analysis of Acute Toxicity (LD50-Value) of Organic Chemicals to Mammals by Solubility Parameter (.DELTA.). (1). Acute Oral Toxicity to Rats. *Sangyo Igaku* [online]. **36**(5), 314-323 [cit. 2016-11-21]. DOI: 10.1539/joh1959.36.5_314. ISSN 00471879. Dostupné z: http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/joh1959/36.5_314?from=CrossRef

NOGI, Y., M. YOSHIKAWA, K. HAMANA, M. MIYAZAKI a K. HORIKOSHI, 2014. *Povalibacter uvarum* gen. nov., sp. nov., a polyvinyl-alcohol-degrading bacterium isolated from grapes. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. **64**(Pt 8), 2712-2717 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1099/ijs.0.062620-0. ISSN 14665026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.062620-0>

NORD, F. F., 1936. Dehydrogenation activity of *Fusarium lini* B. *Naturwissenschaften* [online]. (24: 763) [cit. 2016-11-14].

OH, S., Z. KURT, D. TSEMENTZI, et al., 2014. Microbial Community Degradation of Widely Used Quaternary Ammonium Disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **80**(19), 5892-5900 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1128/AEM.01255-14. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01255-14>

OŠŤÁDALOVÁ, Kateřina, 2010. *Význam minerálních solí při biodegradaci polyvinylalkoholu*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

PRITCHARD, J. G., 1970. *Poly (vinyl alcohol): basic properties and uses*. London: Macdonald Technical & Scientific. ISBN 356 03335 X.

PROISLOVÁ, Alena, 2016. *Sledování mikrobiálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylanu v povrchových vodách*. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

QIAN, D., G. DU a J. CHEN, 2004. Isolation and Culture Characterization of a New Polyvinyl Alcohol-Degrading Strain: *Penicillium* sp. WSH02-21. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **20**(6), 587-591 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1023/B:WIBI.0000043172.83610.08. ISSN 09593993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:WIBI.0000043172.83610.08>

RABINOVIČ, V. A. a Z. J. CHAVIN, 1985. *Stručná chemická příručka*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury.

RAMADAN, M. A., O. M. EL-TAYEB a M. ALEXANDER, 1990. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**(5), 1392-1396.

RAMOS, S., V. HOMEM, A. ALVES a L. SANTOS, 2016. A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. *Environment International* [online]. **86**, 24-44 [cit. 2017-08-20]. DOI:

10.1016/j.envint.2015.10.004. ISSN 01604120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412015300702>

RAMOS, S., V. HOMEM, A. ALVES a L. SANTOS, 2015. Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment — A review. *Science of The Total Environment* [online]. **526**, 278-311 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.04.055. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969715005069>

RIEDL, Jiří, 2004. *Biodegradace polyvinyl alkoholu*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce: prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

RINGLOVÁ, Eva, 2015. *Biodegradace vybraných kosmetických sloučenin v aktivovaném kalu*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

RÍOS, F., M. LECHUGA, M. FERNÁNDEZ-SERRANO a A. FERNÁNDEZ-ARTEAGA, 2017. Aerobic biodegradation of amphoteric amine-oxide-based surfactants: Effect of molecular structure, initial surfactant concentration and pH. *Chemosphere* [online]. **171**, 324-331 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.070. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516318021>

ROBINSON, B. V., c1990. *PVP: a critical review of the kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone (povidone)*. Chelsea, MI: Lewis Publishers. ISBN 0873712889.

RODIL, R. a M. MOEDER, 2008. Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. **1179**(2), 81-88 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.11.090. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307020894>

RODIL, R., S. SCHRADER a M. MOEDER, 2009a. Non-porous membrane-assisted liquid–liquid extraction of UV filter compounds from water samples. *Journal of Chromatography A* [online]. **1216**(24), 4887-4894 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.04.042. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309005986>

RODIL, R., S. SCHRADER a M. MOEDER, 2009b. Pressurised membrane-assisted liquid extraction of UV filters from sludge. *Journal of Chromatography A* [online]. **1216**(51), 8851-8858 [cit. 2017-08-21]. DOI:

10.1016/j.chroma.2009.10.058. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730901588X>

ROMÁN, I. P., A. CHISVERT a A. CANALS, 2011. Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography–mass spectrometry for UV-filter determination in water samples. *Journal of Chromatography A* [online]. **1218**(18), 2467-2475 [cit. 2017-08-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.02.047. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311002743>

RONG, D., K. USUI, T. MOHOROSHI, N. KATO, M.-H. ZHOU a T. IKEDA, 2009. Symbiotic degradation of polyvinyl alcohol by *Novosphingobium* sp. and *Xanthobacter flavus*. *Journal of Environmental Biotechnology* [online]. **9**(2), 131-134 [cit. 2016-11-14]. Dostupné z: <http://www.jseb.jp/jeb/09-02/09-02-131.pdf>

SAKAI, K., M. FUKUBA, Y. HASUI, K. MORIYOSHI, T. OHMOTO, T. FUJITA a T. OHE, 1998. Purification and Characterization of an Esterase Involved in Poly(vinyl alcohol) Degradation by *Pseudomonas vesicularis* PD. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. **62**(10), 2000-2007 [cit. 2018-01-02]. DOI: 10.1271/bbb.62.2000. ISSN 0916-8451. Dostupný z: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1271/bbb.62.2000>

SAKAZAWA, CH., M. SHIMAO, Y. TANIGUCHI a N. KATO, 1981. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* [online]. **41**(1), 261-267 [cit. 2017-11-14]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/41/1/261.long>

SANDERS, J. M. a H. B. MATTHEWS, 1990. Vaginal Absorption of Polyvinyl Alcohol in Fischer 344 Rats. *Human & Experimental Toxicology* [online]. **9**(2), 71-77 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1177/096032719000900202. ISSN 09603271. Dostupné z: <http://het.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/096032719000900202>

SÁNCHEZ-BRUNETE, C., E. MIGUEL, B. ALBERO aj. L. TADEO, 2011. Analysis of salicylate and benzophenone-type UV filters in soils and sediments by simultaneous extraction cleanup and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. **1218**(28), 4291-4298 [cit. 2017-08-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.05.030. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311006583>

SANKODA, K., K. MURATA, M. TANIHATA, K. SUZUKI, K. NOMIYAMA a R. SHINOHARA, 2015. Seasonal and Diurnal Variation of Organic Ultraviolet Filters from Personal Care Products Used Along the Japanese Coast. *Archives of Environmental Contamination*

and Toxicology [online]. **68**(2), 217-224 [cit. 2017-01-09]. DOI: 10.1007/s00244-014-0106-7. ISSN 00904341. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00244-014-0106-7>

SHIMAO, M., K. NINOMIYA, O. KUNO, N. KATO a C. SAKAZAWA, 1986. Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinone-dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **51**(2), 268-275 [cit. 2016-11-14]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/51/2/268.short>

SCHLEHECK, D., T. P. KNEPPER, K. FISCHER a A. M. COOK, 2004. Mineralization of Individual Congeners of Linear Alkylbenzenesulfonate by Defined Pairs of Heterotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **70**(7), 4053-4063 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1128/AEM.70.7.4053-4063.2004. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.70.7.4053-4063.2004>

SIGMA-ALDRICH, ©2018a. 2-Ethyl-1-hexanol (W315109): BEZPEČNOSTNÍ LIST podle Nařízení (ES) č. 453/2010, Verze 5 . 5 Datum revize 10.09.2015. *Merck KGaA* [online]. Darmstadt, Germany [cit. 2018-01-18]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=W315109&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D2-ethyl-1-hexanol%26interface%3DAll%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Den%26region%3DCZ%26focus%3Dproduct>

SIGMA-ALDRICH, ©2018b. 2-Ethylhexanal (E29109): BEZPEČNOSTNÍ LIST podle nařízení (ES) č. 1907/2006 Verze 5 . 3 Datum revize 24.04.2014. *Merck KGaA* [online]. Darmstadt, Germany [cit. 2018-01-18]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=E29109&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D2-ethylhexanal%26interface%3DAll%26N%3D0%26mode%3Dmatch%2520partialmax%26lang%3Den%26region%3DCZ%26focus%3Dproduct>

SUN, X.-X., K.-N. HAN, J.-K. CHOI a E.-K. KIM, 2004. Screening of surfactants for harmful algal blooms mitigation. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **48**(9-10), 937-945 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2003.11.021. ISSN 0025326x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X03005393>

SUZUKI, J., K. HUKUSHIMA a S. SUZUKI, 1978. Effect of ozone treatment upon biodegradability of water-soluble polymers. *Environmental Science & Technology* [online]. **12**(10), 1180-1183 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1021/es60146a002. ISSN 0013936x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es60146a002>

SUZUKI, T., 1979. Degradation of poly (vinyl alcohol) by microorganisms. *J Appl Polym Sci Appl Polym Symposium*. (35), 431-437.

SUZUKI, T., Y. ICHIHARA, M. YAMADA a K. TONOMURA, 1973. Some Characteristics of *Pseudomonas* 0–3 which Utilizes Polyvinyl Alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry* [online]. **37**(4), 747-756 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1080/00021369.1973.10860756. ISSN 00021369. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00021369.1973.10860756>

TAKEUCHI, M., K. HAMANA a A. HIRAISHI, 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **51**(4), 1405-1417 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1099/00207713-51-4-1405. ISSN 14665026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-4-1405>

TASHIRO, Y. a Y. KAMEDA, 2013. Concentration of organic sun-blocking agents in seawater of beaches and coral reefs of Okinawa Island, Japan. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **77**(1-2), 333-340 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.09.013. ISSN 0025326x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X13005493>

TOKIWA, Y., G. KAWABATA a A. JARERAT, 2001. A modified method for isolating poly (vinyl alcohol)-degrading bacteria and study of their degradation patterns. *Biotechnology Letters* [online]. **23**(23), 1937-1941 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1023/A:1013785817554. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1013785817554>

TRIMPIN, S., P. EICHHORN, H. J. RÄDER, K. MÜLLEN a T. P. KNEPPER, 2001. Recalcitrance of poly(vinylpyrrolidone): evidence through matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. **938**(1-2), 67-77 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01153-0. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301011530>

TSUI, M. M. P., H. W. LEUNG, T. CH. WAI, N. YAMASHITA, Sachi TANIYASU, W. LIU, P. K. S. LAM a M. B. MURPHY, 2014a. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters

in surface waters from different countries. *Water Research* [online]. **67**, 55-65 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.watres.2014.09.013. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135414006423>

TSUI, M. M. P., H. W. LEUNG, P. K. S. LAM a M. B. MURPHY, 2014b. Seasonal occurrence, removal efficiencies and preliminary risk assessment of multiple classes of organic UV filters in wastewater treatment plants. *Water Research* [online]. **53**, 58-67 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1016/j.watres.2014.01.014. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135414000414>

VÁCLAVKOVÁ, Tereza, 2006. *Studium mikroorganismů významných při rozkladu polyvinyl alkoholu*. Zlín. Dizertační práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

VACLAVKOVA, T., J. RUZICKA, M. JULINOVA, R. VICHA a M. KOUTNY, 2007. Novel aspects of symbiotic (polyvinyl alcohol) biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **76**(4), 911-917 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/s00253-007-1062-1. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-1062-1>

VONLANTHEN, S, M. T. BROWN a A. TURNER, 2011. Toxicity of the amphoteric surfactant, cocamidopropyl betaine, to the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology* [online]. **20**(1), 202-207 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1007/s10646-010-0571-3. ISSN 0963-9292. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10646-010-0571-3>.

WATANABE, Y., M. MORITA, N. HAMADA a Y. TSUJISAKA, 1975. Formation of Hydrogen Peroxide by a Polyvinyl Alcohol Degrading Enzyme. *Agricultural and Biological Chemistry* [online]. **39**(12), 2447-2448 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1080/00021369.1975.10861980. ISSN 00021369. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00021369.1975.10861980>

WEISSERMEL, K. a H.-J. ARPE, 1997. *Industrial organic chemistry*. 3rd completely rev. ed. New York: VCH. ISBN 3527288384.

WEI, Y., J. FU, J. WU, et al., 2018. Bioinformatics Analysis and Characterization of Highly Efficient Polyvinyl Alcohol (PVA)-Degrading Enzymes from the Novel PVA Degradator *Stenotrophomonas rhizophila* QL-P4. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **84**(1), e01898-17- [cit. 2018-01-07]. DOI: 10.1128/AEM.01898-17. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01898-17>

WORTHEN, A. J., P. S. PARIKH, Y. CHEN, S. L. BRYANT, CH. HUH a K. P. JOHNSTON, 2014. Carbon Dioxide-in-Water Foams Stabilized with

a Mixture of Nanoparticles and Surfactant for CO₂ Storage and Utilization Applications. *Energy Procedia* [online]. **63**, 7929-7938 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.egypro.2014.11.827. ISSN 18766102. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876610214026423>

WU, J.-W., H.-CH. CHEN a W.-H. DING, 2013. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction plus simultaneous silylation for rapid determination of salicylate and benzophenone-type ultraviolet filters in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* [online]. **1302**, 20-27 [cit. 2017-08-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.06.017. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967313009126>

WYATT, J. M., R. B. CAIN a I. J. HIGGINS, 1987. Formation from synthetic two-stroke lubricants and degradation of 2-ethylhexanol by lakewater bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **25**(6), - [cit. 2017-11-11]. DOI: 10.1007/BF00252017. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00252017>

YAMATSU, A., R. MATSUMI, H. ATOMI a T. IMANAKA, 2006. Isolation and characterization of a novel poly(vinyl alcohol)-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp. PVA3. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **72**(4), 804-811 [cit. 2017-11-11]. DOI: 10.1007/s00253-006-0351-4. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0351-4>

ZHANG, H. Z., 2009. Influence of pH and C/N Ratio on Poly(Vinyl Alcohol) Biodegradation in Mixed Bacterial Culture. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. **17**(4), 286-290 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1007/s10924-009-0151-x. ISSN 15662543. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-009-0151-x>

ZHANG, Y., Y. LI, W. SHEN, D. LIU a J. CHEN, 2006. A new strain, *Streptomyces venezuelae* GY1, producing a poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **22**(6), 625-628 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/s11274-005-9081-5. ISSN 09593993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-005-9081-5>

ZHOU, Y., J. ZHANG, Z. ZHANG, CH. ZHOU, Y. J. SEAN LAI a S. XIA, 2017. Enhanced performance of short-time aerobic digestion for waste activated sludge under the presence of cocoamidopropyl betaine. *Chemical Engineering Journal* [online]. **320**, 494-500 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.cej.2017.03.065. ISSN 13858947. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894717304199>

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1O2P	1-oktyl-2-pyrrolidon
AK	Aktivovaný kal
BDH	β -diketonhydroláza
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAPB	Kokamidopropylbetain
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	Colony forming units
ČOV	Čistírna odpadních vod
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
EC ₅₀	Efektivní koncentrace
EHA	Kyselina 2-ethylhexanová
EHAL	2-ethylhexanal
EHOL	2-ethylhexanol
EHS	2-ethylhexylsalicylát
FT	Fakulta technologická
GC	Plynová chromatografie
I	Inhibice
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IC	Anorganický uhlík
IC ₂₅	Inhibiční koncentrace
LC ₅₀	Letální koncentrace
LD ₅₀	Letální dávka
MA	Minerální agar
MM	Minerální médium
MM2	Minerální médium se sníženou koncentrací fosforečnanů

MM3	Minerální médium bez dusíku
MPN	Most probable number
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NOAEL	No observed adverse effect level
OD	Optická denzita
OPH	Hydroláza oxidovaného polyvinylalkoholu
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PQQ	Pyrrolochinolin chinon
PVA	Polyvinylalkohol
PVA-DH	Polyvinylalkohol dehydrogenáza
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rDNA	Ribozomální DNA
R _s	Specifická respirační rychlost
R2A	Reasoner's 2A agar
RIFM	Výzkumný ústav pro vonné materiály
SPE	Extrakce na pevnou fázi
T	Trypton
TC	Celkový uhlík
TYA	Tryptone yeast extract agar
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
UTB	Univerzita Tomáše Bati
UV	Ultrafialové záření

9. SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1.1: Porovnání toxicity 2-ethylhexanolu a kyseliny 2-ethylhexanové pomocí různých testů akutní toxicity (Nalli et al., 2002; Horn et al., 2004)...</i>	21
<i>Tab. 4.1: Změna pH v průběhu utilizace PVA kulturami OT2 a JK2</i>	44
<i>Tab. 4.2: Změna pH a koncentrace PVA v průběhu utilizace PVA kulturou OT2 s a bez přídavku CaCO₃.....</i>	45
<i>Tab. 4.3: Hodnoty specifických respiračních rychlostí buněk a inhibice respirace po 30-ti minutách expozice buněk</i>	48
<i>Tab. 4.4: Hodnoty specifických respiračních rychlostí buněk a inhibice respirace po 24 hodinách expozice.....</i>	49
<i>Tab. 4.5: Koncentrace 2-ethylhexanolu v průběhu rozkladu EHS kulturou Rhodococcus sp. ES 12</i>	58
<i>Tab. 4.6: Růst kultury Rhodococcus sp. ES 12 na různých koncentracích 2-ethylhexanolu po 10-ti dnech kultivace</i>	60
<i>Tab. 4.7: Růst kultury Rhodococcus sp. ES 12 na různých koncentracích 2-ethylhexanalu po 10-ti dnech kultivace</i>	61
<i>Tab. 4.8: Růst kultury Rhodococcus sp. ES 12 na různých koncentracích sodné soli kyseliny 2-ethylhexanové po 2 dnech kultivace</i>	61
<i>Tab. 4.9: Růst kultury Pseudomonas sp. P na 2-ethylhexanolu</i>	64
<i>Tab. 4.10: Růst kultury Pseudomonas sp. P na různých koncentracích 2-ethylhexanalu po 10-ti dnech kultivace</i>	65
<i>Tab. 4.11: Růst kultury Pseudomonas sp. P na různých koncentracích sodné soli kyseliny 2-ethylhexanové po 24 hodinách kultivace</i>	66
<i>Tab. 4.12: Porovnání růstových koncentrací látek u kultur Rhodococcus sp. ES 12 a Pseudomonas sp. P</i>	66
<i>Tab. 4.13: Koncentrace DOC v supernatantech, zaočkovaných druhou kulturou</i>	69
<i>Tab. 4.14: Utilizace substrátů kulturami Pseudomonas sp. FV a Rhizobium sp. FM v kompletním MM a v bezdusíkatém MM3</i>	70

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1.1: Chemická struktura PVA: (A) – částečně hydrolyzovaný, (B) plně hydrolyzovaný (Demerlis a Schoneker, 2003)</i>	9
<i>Obr. 1.2: Mechanismus mikrobiálního rozkladu PVA pomocí a) PVA-DH a BDH (Shimao et al., 1986), b) PVA-DH a aldolázové reakce (Matsumara et al., 1999), c) PVA oxidázy a BDH (Suzuki et al., 1979)</i>	12
<i>Obr. 1.3: Chemická struktura PVP (Robinson, 1990)</i>	15
<i>Obr. 1.4: Chemická struktura 2-ethylhexylsalicylátu (Lapczynski et al., 2007)</i>	17
<i>Obr. 1.5: Chemická struktura 2-ethylhexanolu (Wyatt et al., 1987).....</i>	20
<i>Obr. 1.6: Předpokládaný mechanismus biologického rozkladu 2-ethylhexanolu bakterií Pseudomonas sp. (Wyatt et al., 1987)</i>	22
<i>Obr. 1.7: Chemická struktura lauramidopropylbetainu (Worthen et al., 2014).24</i>	
<i>Obr. 3.1: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVA</i>	34
<i>Obr. 3.2: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci EHOLu</i>	36
<i>Obr. 4.1: Biodegradace PVA kulturou Sphingomonas sp. JK2 v závislosti na míře inokulace</i>	41
<i>Obr. 4.2: Biodegradace PVA kulturou Sphingomonas sp. OT2 v závislosti na míře inokulace</i>	41
<i>Obr. 4.3: Biodegradace různých koncentrací PVA kulturou Sphingomonas sp. OT2</i>	43
<i>Obr. 4.4: Biodegradace zbytkového PVA v supernatantu kulturami OT2 a JK2</i>	46
<i>Obr. 4.5: Spotřeba kyslíku kulturou OT2 po 30-ti minutách expozice se supernatanty</i>	47
<i>Obr. 4.6: Spotřeba kyslíku kulturou CCM 3954 po 30-ti minutách expozice se supernatanty</i>	47
<i>Obr. 4.7: Spotřeba kyslíku kulturou OT2 po 24 hodinách expozice se supernatanty</i>	48
<i>Obr. 4.8: Biodegradace PVA různými inokuly kultury OT2</i>	50
<i>Obr. 4.9: Biodegradace PVA kulturou Sphingomonas sp. OT2 za účasti mikroorganismů aktivovaného kalu</i>	51
<i>Obr. 4.10: Biodegradace PVA kulturou Sphingomonas sp. OT2 za účasti mikroorganismů říčních vod</i>	53
<i>Obr. 4.11: Mikrobiální degradace PVP</i>	55

<i>Obr. 4.12: Počty bakterií při růstu kultury Rhodococcus sp. ES 12 na EHS, salicylanu sodném a EHOLu</i>	59
<i>Obr. 4.13: Hodnoty OD₆₀₀ v průběhu růstu kultury Rhodococcus sp. ES 12 na EHS, salicylanu sodném a EHOLu</i>	59
<i>Obr. 4.14: Biodegradace EHOLu kulturou Pseudomonas sp. P</i>	65
<i>Obr. 4.15: Degradace CAPB kulturami Pseudomonas sp. FV a Rhizobium sp. FM</i>	68
<i>Obr. 4.16: Degradace CAPB kulturou Pseudomonas sp. FV a konsorciem obou kultur v nepřítomnosti zdroje dusíku</i>	71

11. CURRICULUM VITAE

Osobní údaje:

Jméno a příjmení: Ing. Markéta Měrková
Datum narození: 26. 05. 1990
Kontaktní adresa: 756 02 Huslenky 674
E-mail: merkmark@centrum.cz

Dosažené vzdělání:

2014 – dosud *Doktorské studium*
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Obor: Chemie a technologie materiálů

2012 – 2014 *Navazující magisterské studium*
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí
Získaný titul: Ing.

2009 – 2012 *Bakalářské studium*
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí
Získaný titul: Bc.

Znalosti:

Jazykové znalosti: Angličtina – dosažená úroveň C1

Počítačové znalosti – pokročilý uživatel: MS Windows, Internet, MS Office,

Řidičský průkaz: sk. B

Odborná příprava a zkušenosti:

Řešené projekty:

IGA/FT/2015/012

Výzkum procesů ovlivňujících kvalitu potravin a stav životního prostředí

IGA/FT/2016/012

Výzkum procesů ke zlepšení stavu životního prostředí a kvality potravin

IGA/FT/2017/003

Možnosti snížení výskytu nežádoucích látek v potravinách a v životním prostředí

IGA/FT/2018/009

Rozvoj dosavadních poznatků v oblasti snižování nežádoucích látek v životním prostředí a v potravinářství

12. SEZNAM PUBLIKACÍ

Příspěvky v mezinárodních časopisech s impakt faktorem

Ruzicka, J., Fuskova, J., Krizek, K., **Merkova, M.**, Cernotova, A., Smelik, M., 2016. Microbial degradation of *N*-methyl-2-pyrrolidone in surface water and bacteria responsible for the process. *Water Science and Technology*, 73.3: 643-647. DOI: 10.2166/wst.2015.540. (IF = 1,19)

Merkova, M., Julinova, M., Houser, J., Ruzicka, J., An effect of salt concentration and inoculum size on poly (vinyl alcohol) utilization by two *Sphingomonas* strains. *Journal of Polymers and the Environment* [online], 2017, 1-7. DOI: 10.1007/s10924-017-1122-2. ISSN 1566-2543. (IF = 1,87)

Merkova, M., M. Zalesak, E. Ringlova, M. Julinova a J. Ruzicka, 2018. Degradation of the surfactant Cocamidopropyl betaine by two bacterial strains isolated from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 127, 236-240. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.12.006. ISSN 09648305. (IF = 2,96)

Příspěvky ve sbornících z konferencí:

Merkova M., Sera J., Jelenkova M., Proislova A., Ringlova E., Julinova M., Ruzicka J.: Microbial degradation of 2-ethylhexylsalicylate in waste and river water. Poster, 27. kongres ČSSM, Praha, 7. – 9. 9. 2016, ISBN: 978-80-270-0136-1.

Merkova M., Ruzicka J., Kucabova V.: Isolation of 2-ethylhexanol utilizing *Pseudomonas japonica* strain P for potential remediation of contaminated environments. Poster, Biotech 2017 and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition, Prague, 13. – 17.6.2017, ISBN: 978-880-7080-989-1.

