

Vlastnosti a identifikace degradačních bakterií isolovaných z povrchových vod

Bc. Jana Fusková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Fusková**

Osobní číslo: **T13356**

Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vlastnosti a identifikace degradačních bakterií
isolovaných z povrchových vod**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na toxikologické vlastnosti N-methyl-2-pyrrolidonu a na popis metod identifikace bakterií.
2. Experimentálně ověřte schopnosti bakterií izolovaných z povrchových vod degradovat N-methyl-2-pyrrolidon a také schopnost jejich růstu při zvýšených koncentracích N-methyl-2-pyrrolidonu.
3. Provedte testy potřebné k identifikaci výše uvedených kultur a dle možností kultury zařadte do taxonomického systému bakterií.
4. Výsledky přehledně zpracujte požadovanou formou a diplomovou práci odevzdejte v písemné i elektronické podobě v předepsaném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Odborné práce získané z vědeckých databází, především z Web of Science, SCOPUS, ScienceFinder, Medline, TOXNET a dalších, dle aktuálních potřeb.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2015

Ve Zlíně dne 10. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: ... FUSKOVA' JANA

Obor: ... 103P

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně ... 12.5.2015

..... JANA FUSKOVA'

²¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

²²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

²³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Byly zkoumány kultury izolované z předcházejících bakalářských prací. Tyto kultury byly zkoumány z pohledu biochemických, růstových, degradačních vlastností a pocházely z povrchových vod – tekoucích, stojatých a pramenných. Bylo zjištěno, že všechny kultury jsou schopny rozkládat N-methyl-2-pyrrolidon v koncentraci 300 mg/l. Kultury mají různé biochemické vlastnosti. Některé kultury mají například schopnost rychlé degradace, jsou schopné růst při vyšších koncentracích solí, jiné jsou na přítomnost solí citlivé a některé jsou schopny rozkládat zvýšené koncentrace N-methyl-2-pyrrolidonu. Tyto kultury patří jak mezi gramnegativní, tak grampozitivní bakterie a bylo zjištěno, že patří do rodů *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mesorhizobium*, *Patulibacter*, *Rhizobium*, případně *Agrobacterium*.

Klíčová slova: N-methyl-2-pyrrolidon, bakterie, degradace, povrchové vody, identifikace

ABSTRACT

Bacterial cultures isolated from running, stagnant and spring water samples during previous bachelor's thesis were investigated. These cultures were examined from the perspective of their biochemical, growth and degradation properties. It was found that all the cultures were capable to N-methyl-2-pyrrolidone degradation at its concentration of 300 mg/l. The cultures possessed different biochemical characteristic; for example, some of them were able to cause rapid degradation and were able to grow at higher salt concentrations, whilst the other were salt sensitive and some of them were able to degrade increased N-methyl-2-pyrrolidone concentrations. All the cultures were identified and involve both the gram-negative and gram-positive bacteria. It was found that they belong to *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mesorhizobium*, *Patulibacter*, *Rhizobium* or *Agrobacterium* genera.

Keywords: N-methyl-2-pyrrolidone, bacteria, degradation, surface water, identification

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu diplomové práce panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala laborantkám mikrobiologické laboratoře paní Lence Machálkové a Bc. Veronice Kučabové, za jejich pomoc při práci v laboratoři. Také bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za podporu během studia a při sepisování této práce.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 1-METHYL-2-PYRROLIDON.....	12
1.1 POUŽITÍ	12
1.2 VLASTNOSTI	12
1.2.1 Toxikologické vlastnosti.....	13
1.2.2 Ekotoxikologické vlastnosti.....	14
2 PYRROLIDIN.....	15
2.1 VÝSKYT A JEHO POUŽITÍ	15
2.2 VLASTNOSTI	15
2.3 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE PYRROLIDINU.....	15
3 VÝSLEDKY PŘEDCHOZÍCH BAKALÁŘSKÝCH PRACÍ	18
3.1 BcP J. FUSKOVÁ – MIKROBIÁLNÍ DEGRADACE NMP V POVRCHOVÉ STOJATÉ VODĚ	18
3.2 BcP M. SMĚLÍK – MIKROBIÁLNÍ DEGRADACE NMP V POVRCHOVÉ TEKOUcí VODĚ	19
3.3 BcP A. ČERNOTOVÁ – BIODEGRADACE NMP V PRAMENNÝCH VODÁCH.....	20
4 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ.....	21
II PRAKTICKÁ ČÁST	22
5 MATERIÁL A METODIKA.....	23
5.1 POUŽITÉ ROZTOKY A ŽIVNÉ PŮDY PRO KULTIVACI BAKTERIÍ	23
5.1.1 TYA agar (Tryptone Yeast extract Agar, HIMEDIA).....	23
5.1.2 R2A agar (HIMEDIA).....	23
5.1.3 Masopeptonový agar (MPA, HIMEDIA)	23
5.1.4 Minerální agar	23
5.1.5 Minerální agar s NMP.....	24
5.1.6 Zásobní roztoky solí	24
5.1.7 Minerální médium	24
5.1.8 Minerální médium s NMP.....	25
5.1.9 Minerální médium 2MM (dvakrát koncentrované).....	25
5.1.10 Zásobní roztok gamma-aminomáselné kyseliny (GABA) o koncentraci 5 g/l.....	25
5.1.11 Zásobní roztok N-acetyl-L-phenylalaninu (NAP) o koncentraci 5 g/l	25
5.1.12 Fyziologický roztok.....	25
5.2 ISOLOVANÉ KULTURY	26
5.3 PROVÁDĚNÉ POKUSY	26
5.3.1 Stanovení maximální růstové koncentrace NMP	26
5.3.2 Sledování růstu kultur při různých teplotách	27
5.3.3 Sledování růstu kultur při zvýšených koncentracích NaCl.....	27
5.3.4 Sledování růstu kultur na gamma-aminomáselné kyselině.....	28
5.3.5 Sledování růstu kultur na N-acetyl-L-fenylalaninu	28
5.3.6 Sledování růstu kultur na 1-octyl-2-pyrrolidonu.....	28
5.3.7 Sledování pohyblivosti degradačních kultur	28

5.3.8	Degradace 300 mg/l NMP jednotlivými kulturami	29
5.3.9	Vlastnosti kultur	29
	NEFERMtest 24	29
	Oxidačně-fermentační test	29
	Test na katalasu a cytochromoxidasu	30
	KOH test	30
5.3.10	Identifikace kultur pomocí molekulárně biologické metody	30
6	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	34
6.1	POMŮCKY	34
6.2	PŘÍSTROJE.....	34
7	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	35
7.1.1	Stanovení maximální růstové koncentrace NMP	35
7.1.2	Růstové vlastnosti kultur.....	37
	Kultivace při různých teplotách	37
	Růst kultur při zvýšených koncentracích NaCl.....	37
	Růst kultur na gamma-aminomáselné kyselině o koncentraci 0,5 g/l	38
	Růst kultur na N-acetyl-L-fenylalaninu o koncentraci 0,5 g/l	38
	Růst kultur na 1-octyl-2-pyrrolidonu o koncentraci 0,1 g/l	38
7.1.3	Sledování pohyblivosti degradačních kultur	38
7.1.4	Degradace 300 mg/l NMP jednotlivými kulturami	39
	Kultura JF1	40
	Kultura Š	41
	Kultura MS1	42
	Kultura MS2	44
	Kultura J10	45
	Kultura J20	46
	Kultura RO	48
	Kultura R4-P	49
7.1.5	Vlastnosti a orientační identifikace kultur J10, J20, R4-P a RO.....	50
	NEFERMtest 24	50
	Oxidačně-fermentační test	52
	Test na katalasu a cytochromoxidasu	52
	KOH test	52
7.1.6	Identifikace kultur pomocí PCR.....	52
7.1.7	Shrnutí vlastností jednotlivých kultur.....	54
	ZÁVĚR	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	60
	SEZNAM OBRÁZKŮ	62
	SEZNAM TABULEK	63
	SEZNAM PŘÍLOH	65

ÚVOD

Lidé produkují různé průmyslové sloučeniny, které se po použití nebo při nežádoucím úniku dostávají do životního prostředí. Tyto sloučeniny mohou někdy způsobovat velké problémy, z environmentálního i zdravotního hlediska. Proto je nezbytné znát chování těchto látek v prostředí.

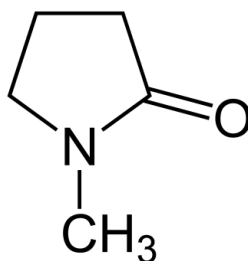
O N-methyl-2-pyrrolidonu v aktivovaném kalu víme, že podléhá rychlé degradaci, ale v povrchových vodách, jak zjistily předchozí tři bakalářské práce, může, byť nemusí docházet k jeho rychlé biodegradaci. V některých případech bylo zjištěno, že dochází k biodegradaci poměrně pomalu.

Obecně nás zajímá, jaké mikroorganismy jsou schopné rozkladu průmyslových sloučenin. Tyto mikroorganismy chceme poznávat a případně v budoucnu využívat. Proto je tato diplomová práce zaměřena na poznávání izolovaných kultur z předcházejících bakalářských prací na ÚIOŽP.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 1-METHYL-2-PYRROLIDON

1-methyl-2-pyrrolidon je také známý jako N-methyl-2-pyrrolidon (zkratkou NMP), anglicky N-methyl-2-pyrrolidone, N-methylpyrrolidone, 1-methyl-2-pyrrolidone nebo 1-methyl-2-pyrrolidinone [1]. Jedná se o bezbarvou hygroskopickou kapalinu charakteristického zápachu po čpavku [2]. Svou strukturou patří mezi pětičlenné dusíkaté heterocykly (γ -laktamy, viz Obrázek 1 – Struktura NMP).



Obrázek 1 – Struktura NMP

1.1 Použití

NMP se používá k mnoha různým účelům. Je používán hlavně jako rozpouštědlo pro extrakci v petrochemickém průmyslu, pro odstranění barev, graffiti, nátěrů v pracovním prostředí. Používá se také jako přísada do různých insekticidů, herbicidů a fungicidů. NMP se dále používá jako meziproduct ve farmaceutickém průmyslu a jako přísada do kosmetických výrobků. [3]

1.2 Vlastnosti

NMP je bazická, polární sloučenina s vysokou stabilitou [4]. Je dobře rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v alifatických uhlovodících a rozpouští mnoho organických a anorganických sloučenin. Dále je mísitelný s nižšími alkoholy a ketony, s ethery, acetonem, chloroformem a benzenem [1]. Souhrn nejdůležitějších fyzikálních a chemických vlastností NMP je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 – Souhrn nejdůležitějších fyzikálních a chemických vlastností NMP [2], [5]

Molekulový vzorec	C ₅ H ₉ NO
Molární hmotnost	99,13 g/mol
Hodnota pH (100 g/l, při 20 °C)	8,5 – 10
Bod varu	202 °C
Bod tání	- 24 °C
Relativní hustota (při 20 °C)	1,028 g/cm ³
Viskozita (při 20 °C)	1,80 mPa.s
Rozpustnost ve vodě (při 25 °C)	1000 g/l
Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda	- 0,38

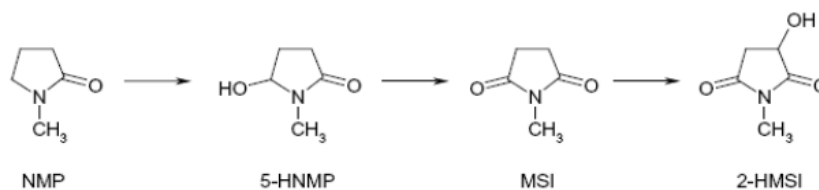
1.2.1 Toxikologické vlastnosti

Zda může mít N-methyl-2-pyrrolidon u lidí toxické účinky, nebylo dosud dokonale prostudováno. Většina informací pochází z pokusů na zvířatech.

Jeden z mála výzkumů účinků N-methyl-2-pyrrolidonu na lidské zdraví provedla organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) a zjistila, že tato látka velmi rychle proniká lidskou pokožku. Po dlouhodobém přímém kontaktu s lidskou kůží může způsobit otok kůže, puchýře nebo popáleniny. [6]

Studie na zvířatech ukázaly, že může způsobit podráždění dýchacích cest a očí. Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 (REACH) nebyla u NMP zjištěna karcinogenita ani mutagenita, avšak látka byla zařazena do 2.kategorie reprodukční toxicity (může poškodit plod v těle matky). [2]

N-methyl-2-pyrrolidon se dobře vstřebává do těla jak inhalační cestou (40 – 60 %), tak přes kůži (≤ 100 % v závislosti na podmínkách). U lidí je NMP distribuován do celého organismu a je odstraňován především hydroxylací na polární sloučeniny, které jsou vylučovány močí. Při vniknutí do těla je NMP rychle přeměněn na hlavní metabolit, kterým je 5-hydroxy-N-methyl-2-pyrrolidon (5-HNMP), ten je dále oxidován na N-methylsukcinimid (MSI), který je hydroxylován na 2-hydroxy-N-methylsukcinimid (2-HMSI) (viz obrázek 2). Během 24 hodin je z těla močí vyloučeno kolem 80 % těchto metabolitů. [4]



Obrázek 2 – Metabolismus N-methyl-2-pyrrolidonu v lidském těle [4]

NMP má nízkou akutní toxicitu při orální, dermální a inhalační expozici. Akutní toxicita byla testována na potkanech a králících. Testováním akutní toxicity na potkanech orální cestou byla zjištěna letální dávka LD_{50} , která činí 3 598 mg/kg. Dále při inhalaci par byla letální koncentrace $LC_{50} > 5,1$ mg/l / 4h. Letální dávka LD_{50} u králíků dermální aplikací byla 8000 mg/kg. [2]

1.2.2 Ekotoxikologické vlastnosti

Podle agentury pro ochranu životního prostředí USA (EPA) je ekologické nebezpečí NMP ve vodách považováno za nízké, NMP má také nízkou bioakumulaci a biokoncentrační faktor. Studie biodegradací opakovaně ukázaly, že tato látka je poměrně snadno biologicky odbouratelná. [4]

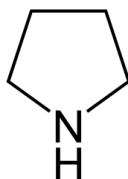
Při testování na rybách *Lepomis macrochirus* byla zjištěna letální koncentrace LC_{50} s hodnotou 832 mg/l / 96 h. Dále byly provedeny testy na perloočkách druhu *Daphnia magna*, u tohoto testu byla hodnota účinné (efektivní) koncentrace EC_{50} stanovena na 4 797 mg/l / 48 h. Inhibiční koncentrace IC_{50} u řas (druh *Desmodesmus subspicatus*) byla větší než 500 mg/l / 72 h. [2]

Na rozdíl od údajů uvedených v bezpečnostním listu společnosti PENTA, zcela jiné výsledky ekotoxicity NMP zjistili autoři C.-H. Lan, C.-Y. Peng a T.-S. Lin, kteří zkoumali akutní toxicitu rovněž na *Daphnia magna* a zjistili, že střední letální dávka LC_{50} dosahuje hodnot 2,50 mg/l / 24 h. a 1,23 mg/l / 48 h. Výsledky tak ukázaly, že toxicita NMP vůči *Daphnia magna* je vyšší než například toxicita methanolu, ethanolu, formaldehydu nebo chloroformu. Tato studie tedy ukazuje, že NMP může vážně ovlivnit vodní ekosystém, jakmile je vypuštěn nebo transportován do vodního prostředí. [7]

Protože je o mikrobiální degradaci N-methyl-2-pyrrolidonu velmi málo odborných článků a výzkumných studií, zaměřím se na strukturně blízkou látku - pyrrolidin.

2 PYRROLIDIN

Pyrrrolidin (C_4H_9N) je heterocyklická dusíkatá sloučenina a patří mezi biogenní aminy.



Obrázek 3 – Struktura pyrrrolidinu

2.1 Výskyt a jeho použití

Je to běžná přírodní sloučenina, vyskytuje se například v zelenině, mléčných výrobcích, cigaretách, alkoholických nápojích a kávě. Používá se také v chemickém průmyslu, při výrobě léčiv a antibiotik a jako urychlovač vulkanizace. [8]

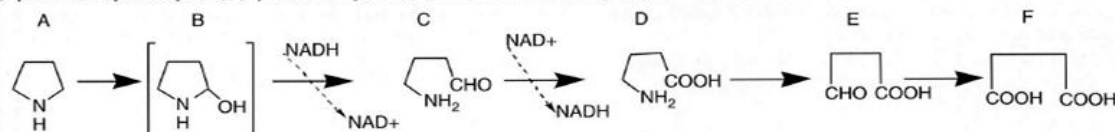
2.2 Vlastnosti

Jedná se o bezbarvou až nažloutlou kapalinu charakteristického zápachu po čpavku. Je mísitelná s vodou, rozpustná v ethanolu, ethyletheru a mírně rozpustná v benzenu a chloroformu. [8]

2.3 Bakteriální degradace pyrrrolidinu

Autoři M. Trigui, S. Pulvin, P. Poupin a D. Thomas se ve své studii věnovali biologické rozložitelnosti pyrrrolidinu pomocí gramnegativní bakterie *Pseudomonas putida*. Tato bakterie je schopná využít pyrrrolidin jako jediný zdroj dusíku, uhlíku a energie. Schopnost rozkladu pyrrrolidinu v čisté kultuře byla provedena v kapalném médiu minerálních solí. Jelikož byl pyrrrolidin použit jako jediný zdroj uhlíku, dusíku a energie, byl pyrrrolidin rozložen během 24 hodin. Prvním krokem degradační dráhy pyrrrolidinu, nutným pro otevření jeho kruhu, je α -hydroxylace na atomu uhlíku, sousedícím s aminoskupinou, s následným rozštěpením C – N vazby, což vede ke vzniku nestabilního meziprojektu - γ -aminobutyraldehydu. Tento meziprodukt je dále oxidován na γ -aminomáselnou kyselinu a ta je deaminována přes příslušný aldehyd na kyselinu jantarovou. Degradace dráha je znázorněna na obrázku 4. [9]

Fig. 4. Proposed pathway for the degradation of pyrrolidine by *Pseudomonas putida* O1G3. (A) Pyrrolidine. (B) 2-Hydroxypyrrolidine. (C) γ -Aminobutyraldehyde. (D) γ -Aminobutyrate. (E) Succinic semialdehyde. (F) Succinic acid.



Obrázek 4 – Navrhovaná dráha degradace pyrrrolidinu pomocí bakterie *Pseudomonas putida* [9]

Další studií aerobní a anaerobní degradace pyrrolidinu za přítomnosti denitrifikačních bakterií se zabývali autoři Hee-Sung Bae a kol. Za účelem poznání metabolické dráhy rozkladu pyrrolidinu se autoři pokusili testovat aktivitu enzymů, pravděpodobně klíčových při rozkladu pyrrolidinu. Enzymy byly následující – pyrrolidin dehydrogenasa (PYR-DH), pyrrolidin monooxygenasa (PYR-MO), kyselina γ -aminomáselná/ α -ketoglutarát aminotransferasa (GABA/ α -KG-AT) a sukcinát semialdehyd dehydrogenasa (SSAL-DH). Pro tyto pokusy byly připraveny bezbuněčné extrakty ze tří aerobních bakteriálních kmenů – TGOPY13 (patřící do skupiny bakterií *Thauera*), CJANPY1 (skupina *Castellaniella*) a TJOPY13 (skupina *Rhizobium*), rostoucí na pyrrolidinu za aerobních a denitrifikačních podmínek. Aktivita všech výše uvedených enzymů byla zjištěna, s výjimkou enzymu pyrrolidon monooxygenasy, což umožnilo sestavit metabolickou dráhu rozkladu pyrrolidinu. Aktivita enzymů zahrnutých v metabolismu pyrrolidinu, měřená u třech uvedených izolátů za aerobních a denitrifikačních podmínek je znázorněna v tabulce 2.

Tabulka 2 – Specifická aktivita enzymů zahrnutých v metabolismu pyrrolidinu za aerobních a denitrifikačních podmínek [10]

Kmen	Enzym	Specifická aktivita enzymů [mU/mg proteinu]	
		Aerobní podmínky	Anaerobní podmínky
TGOPY 13 (skupina <i>Thauera</i>)	PYR-DH	13,0 ± 9,0	7,5 ± 3,1
	PYR-MO	< 0,1	< 0,1
	GABA/α-KG-AT	24,9 ± 8,7	15,0 ± 4,7
	SSAL-DH	104,9 ± 12,5	78,4 ± 17,6
CJANDY1 (skupina <i>Castellaniella</i>)	PYR-DH	16,0 ± 1,4	6,3 ± 1,3
	PYR-MO	< 0,01	< 0,01
	GABA/α-KG-AT	11,4 ± 0,3	12,7 ± 2,6
	SSAL-DH	41,4 ± 1,8	261,3 ± 0,1
TJOPY13 (skupina <i>Rhizobium</i>)	PYR-DH	7,3 ± 1,2	6,1 ± 0,1
	PYR-MO	< 0,01	< 0,01
	GABA/α-KG-AT	33,5 ± 2,3	8,9 ± 2,5
	SSAL-DH	262,6 ± 1,8	186,7 ± 10,4

Obrázek 5 znázorňuje navrhovanou dráhu pro aerobní a anaerobní degradaci pyrrolidinu na základě enzymových aktivit. Za těchto podmínek je pyrrolidin vždy nejprve oxidován pomocí pyrrolidin dehydrogenasy na Δ^1 -pyrrolin, který je převeden neenzymovou hydrolytickou reakcí na γ -aminobutyraldehyd. Těmito kroky se uvedená metabolická dráha liší od metabolické dráhy popsané na Obrázek 4. Γ -aminobutyraldehyd může pak být následně přeměněn aminobutyraldehyd dehydrogenasou na γ -aminomáselnou kyselinu (GABA), jejíž další přeměna je katalyzována GABA/ α -KG aminotransferasou. Vzniklý semialdehyd kyseliny jantarové je pak dehydrogenázou přeměněn na kyselinu jantarovou. [10]

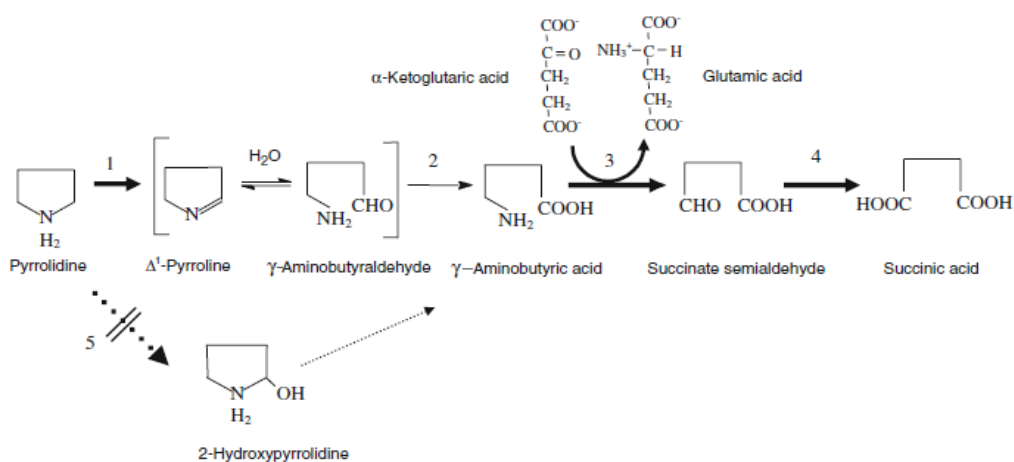


Fig. 3 Proposed pathway for the aerobic and anaerobic degradation of pyrrolidine by three heterocyclic amine-degrading isolates, strains TGOPY13 (*Thaueria* group), CJANPY1 (*Castellaniella* group), and TJOPY13 (*Rhizobium* group). Compounds in bracket are hypothetical.

1 Pyrrolidine dehydrogenase, 2 γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase, 3 GABA/ α -KG aminotransferase, 4 succinate semialdehyde dehydrogenase, 5 pyrrolidine monooxygenase. The enzyme activity assayed in this study was indicated by the **bold arrows**

Obrázek 5 – Navrhovaná dráha aerobní a anaerobní degradace pyrrolidinu [10]

3 VÝSLEDKY PŘEDCHOZÍCH BAKALÁŘSKÝCH PRACÍ

Na téma mikrobiální degradace N-methyl-2-pyrrolidonu byly provedeny tři bakalářské práce, které se lišily typem vod, v nichž byla degradace zkoumána.

3.1 BcP J. Fusková – Mikrobiální degradace NMP v povrchové stojaté vodě

Bakalářská práce se zabývala především zkoumáním rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu v povrchové stojaté vodě, která byla odebrána z mokřadu z lokality přírodní památky Rákosina ve Stříteži nad Bečvou. Celkem byla provedena dvě sledování rozkladu. Na jaře roku 2012 byl proveden první tzv. „orientační“ pokus a na podzim roku 2012 druhý, podrobnější pokus. Vzorky vod byly v obou pokusech nadávkovány do kultivačních láhví, které obsahovaly NMP o koncentraci 300 mg/l a minerální soli. Rozklad NMP byl sledován stanovením koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC). U prvního „orientačního“ pokusu rozklad započal po 15 dnech, a to pouze v jedné ze dvou pokusných láhví. Po celkem 90 dnech kultivace byl NMP spotřebován přítomnými mikroorganismy i ve druhé láhvi, neboť hodnoty koncentrace DOC poklesly na hodnoty DOC odpovídající vodě bez přídavku NMP. V jarním i podzimním pokusu bylo ve vodě zjištěno velice malé vstupní množství bakterií. Druhý pokus probíhal odlišně než první. Počet odebíraných vzorků v průběhu kultivace byl daleko vyšší a odběry probíhaly přibližně ve stejných časových intervalech. Proces biodegradace NMP probíhal téměř ve všech láhvích různě, zřejmě díky velmi nízkému počtu bakterií ve zkoumané vodě. Po 80 dnech experimentu rozklad NMP nenastal v jedné láhvi ze čtyř, zatímco v ostatních láhvích byl NMP prakticky úplně rozložen. Zvláštností v druhém pokusu bylo nalezení přítomnosti korýšů rodu *Daphnia* v použité vodě. Po provedené biodegradaci NMP byly získány dvě kultury se schopností NMP rozkládat. Z prvního pokusu to byla kultura označená jako JF1 a z druhého pokusu kultura označená jako Š (šedá). Provedením laboratorních testů byly zjištěny jejich základní vlastnosti. Obě kultury byly nefermentující bakterie a pozitivní na katalasu. Kultura Š byla pozitivní na cytochromoxidasu, zatímco kultura JF1 negativní. Pomocí Gramova barvení bylo zjištěno, že jsou obě kultury zcela odlišné. Díky tomu, že kultura Š byla zjištěna jako gramnegativní bakterie, bylo možné provést NEFERMtest 24, jehož výsledky však identifikaci této kultury neumožnily. Kultura JF1 byla grampozitivní nepravidelnou tyčinkou. Práce ukázala, že v použité přírodní stojaté vodě je NMP mikrobiálně odbouratelný, avšak doba tohoto procesu je relativně dlouhá a vyžaduje trvání kolem 80 dnů. [11]

3.2 BcP M. Smělik – Mikrobiální degradace NMP v povrchové tekoucí vodě

Bakalářská práce se zabývala rozkladem N-methyl-2-pyrrolidonu v tekoucí povrchové vodě, která byla odebrána z řeky Dřevnice ve Zlíně. Práce se skládala ze dvou pokusů. Vzorky vody z prvního jarního pokusu obsahovaly jen malé vstupní množství heterotrofních bakterií, avšak ve druhém podzimním pokusu vstupní počet bakterií značně vzrostl. Tato skutečnost byla zřejmě způsobena tím, že přes léto narůstá ve vodních tocích biomasa a tím i počty bakterií. Další částí jarního pokusu bylo sledování rozkladu NMP ve vzorcích vod. Ty byly nadávkovány do kultivačních láhví, do kterých byl přidán NMP o koncentraci 300 mg/l a minerální soli. Poté probíhala kultivace, při které již po pěti dnech došlo k téměř úplnému rozkladu NMP. Druhý podzimní pokus probíhal obdobně jako první a bylo zjištěno, že značná část NMP byla rozložena po čtyřech dnech od zahájení kultivace a po dalších třiceti dnech byl rozložen NMP úplně. Celkový rozklad NMP tedy probíhal 35 dní. Po provedené biodegradaci se podařilo z prvního pokusu získat dvě kultury schopné rozkládat NMP, označené jako MS1 a MS2 a z druhého pokusu další dvě kultury, označené jako MSY a MSZ. Kultury byly podrobeny různým testům, díky kterým se podařilo zjistit, že se jedná o gramnegativní nefermentující bakterie tyčinkovitého tvaru, které byly pozitivní na katalasu a cytochromoxidasu. Dále bylo zjištěno, že kultury MS2 a MSZ mají schopnost produkovat fluorescentní pigment. Všechny kultury byly schopné růst při 37 °C, nikoliv však při 43 °C. Díky tomu, že všechny kultury byly gramnegativní bakterie, bylo možné provést NEFERMtest 24. Výsledky tohoto testu ukázaly, že všechny bakterie spadaly do rodu *Pseudomonas*. S vysokou pravděpodobností byl u kultury MS1 určen i druh, a to *Pseudomonas fluorescens*. U ostatních kultur bylo zapotřebí k určení druhů provést dodatečné testy. Tím byla kultivace při 4 °C, která zjistila, že kultury MS2, MSY a MS patří do druhu *Pseudomonas putida*, jelikož tento druh roste při vyšších teplotách než 4 °C. Tato bakalářská práce ukázala, že N-methyl-2-pyrrolidonu je biologicky odbouratelný i v běžných říčních vodách, a to během několika dnů. [12]

3.3 BcP A. Černotová – Biodegradace NMP v pramenných vodách

Cílem této bakalářské práce bylo především zjistit, zda je N-methyl-2-pyrrolidon biologicky rozložitelný v pramenných vodách. Vzorke vod byly odebrány z přírodního parku Vizovické vrchy, v blízkosti obce Jasenná. Byly odebrány dva vzorky pramenité vody, první pod zkratkou J, vytékající z lesa a druhý pod zkratkou R z louky. Probíhaly celkem dva pokusy – jarní a podzimní. V jarním pokusu byl ve vodě zjištěn velice malý počet heterotrofních bakterií. Rozklad NMP byl sledován v kultivačních láhvích s minerály a NMP, v koncentraci 300 mg/l. Po určité době byly stanoveny hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Hodnoty DOC ukázaly, že po celkem 140 dnech došlo k celkovému rozkladu NMP. U podzimního pokusu byl zjištěn větší počet heterotrofních bakterií než u jarního pokusu. Tento pokus byl důslednější, jelikož byly odebírány vzorky pro stanovení DOC v pravidelných intervalech. Výsledky DOC ukázaly, že u vzorků vody R proběhl rozklad NMP během 49 dní. U vzorků vody J se však rozklad lišil. V jedné láhvi ze čtyř trval rozklad delší dobu než u ostatních, a to 142 dní. U ostatních láhví došlo k rozkladu NMP během 99 dnů. Na závěr se podařilo získat tři kultury. Z jarního pokusu to byly dvě kultury označené jako J20 a RO, a z podzimního pokusu kultura R4P. S těmito kulturami bylo provedeno pouze Gramovo barvení, které ukázalo, že se ve všech případech jedná o gram-negativní tyčinky. [13]

Tato bakalářská práce ukázala, že i v pramenných vodách žijí bakterie, které využívají N-methyl-2-pyrrolidon jako svůj substrát, a tím dochází k jeho biodegradaci. Biodegradace NMP v těchto vodách však probíhá daleko pomaleji než u vod povrchových - tekoucích i stojatých.

4 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

Identifikace bakterií je klíčovým úkolem práce v mikrobiologické laboratoři. Při identifikaci neznámých bakterií se používá mnoho různých metod. Klasické metody identifikace jsou založeny například na morfologických, růstových nebo biochemických vlastnostech, avšak nestačí znát pouze tyto základní vlastnosti. Identifikace bakterií vyžaduje také znalost molekulárně biologických a genetických vlastností a znalost chemického složení buněk. Do těchto metod například patří DNA-DNA hybridizace, stanovení zastoupení bází DNA (% obsah G + C), sekvenční analýza 16S rDNA a také např. analýza spektra mastných kyselin. [14]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Použité roztoky a živné půdy pro kultivaci bakterií

5.1.1 TYA agar (Tryptone Yeast extract Agar, HIMEDIA)

Pro přípravu živné půdy bylo naváženo 4,2 g TYA agaru a smícháno s 200 ml destilované vody. Po důkladném rozpuštění byl sterilizován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po této době byl agar ochlazen na teplotu cca 50 °C a po dokonalém rozmíchání rozlit do předem připravených sterilních Petriho misek.

5.1.2 R2A agar (HIMEDIA)

3,6 g R2A agaru bylo smícháno s 200 ml destilované vody. Po sterilizaci v autoklávu a ochlazení byl agar rozlit do Petriho misek.

5.1.3 Masopeptonový agar (MPA, HIMEDIA)

Navážku 3 g tohoto agaru bylo potřeba suspendovat v 200 ml destilované vody a poté sterilizovat při 121 °C po dobu 15 minut. Poté byl agar rozlit do Petriho misek.

5.1.4 Minerální agar

Navážku 1,9 g připravené směsi uvedené v tabulce 3 bylo potřeba suspendovat ve 100 ml destilované vody. Dále byl přidán roztok stopových prvků v objemu 0,2 ml a poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut. Hodnota pH musela být v rozmezí 7,2 – 7,4. Po sterilizaci byl agar rozlit do Petriho misek.

Tabulka 3 – Složení směsi pro přípravu minerálního agaru

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

5.1.5 Minerální agar s NMP

Postup přípravy minerálního agaru byl stejný jako v případě 5.1.4, avšak po sterilizaci a ochlazení na cca 50 °C byl přidán sterilní 10% roztok N-methyl-2-pyrrolidonu o objemu 1 ml. Po důkladném promíchání byl rozlit do předem připravených sterilních Petriho misek.

5.1.6 Zásobní roztoky solí

Každá sůl byla připravena navážením jednotlivého množství, které je uvedeno v tabulce 4, a poté rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

Tabulka 4 – Složení zásobních roztoků solí

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

5.1.7 Minerální médium

Do odměrné baňky na 100 ml bylo nejdříve nadávkováno cca 60 ml destilované vody, poté byly postupně přidávány roztoky v množstvích uvedených v tabulce 5. Po důkladném promíchání bylo médium doplněno destilovanou vodou po rysku a poté sterilizováno v autoklávu při 122 °C po dobu 20 minut.

Tabulka 5 – Množství zásobních roztoků k přípravě minerálního média

Roztok A – KH₂PO₄ (9,07 g/l)	2,0 ml
Roztok B – Na₂HPO₄·12H₂O (23,90 g/l)	8,0 ml
Roztok stopových prvků	0,2 ml
MgSO₄·7H₂O (10 g/l)	1,0 ml
Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O (3 g/l)	1,0 ml
CaCl₂·2H₂O (1 g/l)	1,0 ml
NH₄Cl (30 g/l)	1,0 ml
NaCl (50 g/l)	1,0 ml

5.1.8 Minerální médium s NMP

Postup přípravy samotného minerálního média byl stejný jako v případě 5.1.7, avšak po sterilizaci a zchlazení byl přidán sterilní roztok N-methyl-2-pyrrolidonu v různých koncentracích, dle potřeby jednotlivých pokusů.

5.1.9 Minerální médium 2MM (dvakrát koncentrované)

Postup přípravy minerálního média byl stejný jako v případě 5.1.7, avšak množství zásobních roztoků všech složek bylo dvojnásobné.

5.1.10 Zásobní roztok gamma-aminomáselné kyseliny (GABA) o koncentraci 5 g/l

0,5 g GABA ve formě prášku bylo rozpuštěno v 70 ml destilované vody. Podle potřeby bylo upraveno pH roztokem 0,1% NaOH na hodnotu 7. Poté byl zásobní roztok doplněn destilovanou vodou po rysku na objem 100 ml. Nakonec byl roztok sterilizován filtrací přes sterilní filtr MILLIPORE MCE o průměru pórů 0,22 μm do sterilních zkumavek.

5.1.11 Zásobní roztok N-acetyl-L-phenylalaninu (NAP) o koncentraci 5 g/l

0,05 g NAP ve formě prášku bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody a roztok byl sterilizován filtrací (viz výše) do sterilních zkumavek.

5.1.12 Fyziologický roztok

8,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 1 litru destilované vody.

5.2 Isolované kultury

V diplomové práci bylo použito celkem 8 kultur, získaných na FT UTB během bakalářského studia, které byly uloženy v mrazicím boxu na ÚIOŽP v glycerolu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kromě kultur, popsaných ve výše uvedených bakalářských pracích, byla v této práci používána i kultura J10, rovněž uchovaná na ÚIOŽP při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tato kultura byla rovněž izolovaná v průběhu BcP A. Černotové a byla považována za identickou s kulturou J20. Všechny tyto kultury jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 – Seznam použitých kultur z bakalářských prací

Jana Fusková [11]	Š
	JF1
Michal Smělík [12]	MS1
	MS2
Alena Černotová [13]	J10
	J20
	RO
	R4-P

5.3 Prováděné pokusy

5.3.1 Stanovení maximální růstové koncentrace NMP

Stanovení probíhalo ve sterilních mikrotitračních destičkách, kdy do jamek sloupců 1 + 2, 4 + 5, 7 + 8, 10 + 11 a do všech jamek sloupce 12 bylo nejdříve asepticky napipetováno 90 μl minerálního média 2MM. Poté byla do těchto jamek přidána destilovaná voda v μl podle schématu uvedeného v tabulce 7.

Tabulka 7 – Přídavek destilované vody do mikrotitrační destičky v μl

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100		100	100		100	100		100	100	100
B	90	90		90	90		90	90		90	90	90
C	80	80		80	80		80	80		80	80	80
D	50	50		50	50		50	50		50	50	50
E	0	0		0	0		0	0		0	0	0
F	80	80		80	80		80	80		80	80	80
G	50	50		50	50		50	50		50	50	50
H	0	0		0	0		0	0		0	0	0

Dále byl asepticky napipetován zásobní roztok NMP o koncentraci 10 g/l a 100 g/l podle schématu uvedeného v tabulce 8.

Tabulka 8 – Přídavek zásobního roztoku NMP o koncentraci 10 g/l a 100 g/l v μl

NMP o koncentraci 10 g/l												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0		0	0		0	0		0	0	0
B	10	10		10	10		10	10		10	10	10
C	20	20		20	20		20	20		20	20	20
D	50	50		50	50		50	50		50	50	50
E	100	100		100	100		100	100		100	100	100
NMP o koncentraci 100 g/l												
F	20	20		20	20		20	20		20	20	20
G	50	50		50	50		50	50		50	50	50
H	100	100		100	100		100	100		100	100	100

Nakonec byly všechny jamky každé dvojice sloupců (kromě sloupce 12) naočkovány 10 μl suspenze jedné zkoumané kultury. Jamky sloupce 12 nebyly očkované, jelikož sloužily jako kontrola sterility, proto do těchto jamek byl přidán fyziologický roztok o objemu 10 μl . Tímto postupem byly ve všech řádcích (A až H) všech sloupců získány koncentrace NMP 0, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25 a 50 g/l. Destičky byly uzavřeny víčkem a inkubovány 2, 5 a 10 dnů při teplotě 25 °C. Po inkubaci byl zhodnocen zákal v jamkách a porovnán se stavem jamek ve sloupci 12 a také byl změřen pomocí spektrofotometru TECAN při 600 nm.

5.3.2 Sledování růstu kultur při různých teplotách

Pokus spočíval v naočkování kultur křížovým roztěrem na Petriho misky s R2A agarem a inkubaci každé kultury při 5, 10, 20, 25, 30, 37 a 45 °C.

5.3.3 Sledování růstu kultur při zvýšených koncentracích NaCl

Nejdříve bylo nutné připravit živnou půdu R2A bez přídavku NaCl a s různými koncentracemi NaCl (0,5, 3, 6,5, 10 a 15 % NaCl). Příprava byla následující: do šesti láhví o objemu 50 ml bylo naváženo 0,906 g R2A agaru a do každé z láhví (kromě jedné bez přídavku NaCl) byla přidána navážka 0,25, 1,5, 3,25, 5 a 7,5 g NaCl. Tahle směs byla smíchána s destilovanou vodou a poté následovala sterilizace v autoklávu. Po sterilizaci byl agar z každé láhve rozlit do třech Petriho misek. Inkubace všech misek po naočkování kultur křížovým roztěrem probíhala při 25 °C.

5.3.4 Sledování růstu kultur na gamma-aminomáselné kyselině

Do sterilního minerálního média o objemu 50 ml bylo přidáno 5,6 ml roztoku kyseliny gamma-aminomáselné (postup přípravy viz 5.1.10). Tím vznikla koncentrace kyseliny 0,5 g/l. Poté bylo médium asepticky napipetováno do sterilních zkumavek v množství 3 ml a nakonec byly zkumavky kulturami naočkovány. Dvě zkumavky zůstaly nenačkovány, jelikož sloužily jako kontroly. Inkubace probíhala na třepačce při 25 °C a byla sledována tvorba zákalu. Výsledky byly odečteny jak vizuálně, tak pomocí spektrofotometru SPEKOL 11 při 600 nm.

5.3.5 Sledování růstu kultur na N-acetyl-L-fenylalaninu

Do sterilního minerálního média o objemu 50 ml bylo přidáno 5,6 ml N-acetyl-L-fenylalaninu (postup přípravy viz 5.1.11), tak vznikla koncentrace 0,5 g/l NAP. Poté bylo médium rozlito po 3 ml do sterilních zkumavek a každá kultura byla do těchto zkumavek pomocí kličky naočkována. Inkubace probíhala na třepačce při teplotě 25 °C a byla sledována tvorba zákalu.

5.3.6 Sledování růstu kultur na 1-octyl-2-pyrrolidonu

Do sterilního minerálního média o objemu 50 ml bylo asepticky přidáno 5,6 µl koncentrovaného 1-octyl-2-pyrrolidonu. Tím vznikla koncentrace 0,1 g/l. Médium bylo poté rozlito po 3 ml do sterilních zkumavek a poté proběhlo očkování kultur do tohoto média. Inkubace probíhala na třepačce při 25 °C a byla sledována tvorba zákalu.

5.3.7 Sledování pohyblivosti degradačních kultur

Podle bodu 4.1.7 bylo připraveno minerální médium o objemu 100 ml. Poté byl tento objem rozlít do dvou lahvíček po 50 ml a do jedné dávky byla přidána navážka 0,15 g čistého agaru. Po sterilizaci a zchlazení byl do obou dávek přidán roztok NMP do koncentrace 1 g/l, což bylo 0,5 ml roztoku. Dávka s agarem byla rozlita po 3,5 ml do sterilních zkumavek a dávka bez agaru po 3 ml. Každá kultura byla naočkována jak do zkumavky s agarem (vpichem), tak do zkumavky bez agaru. Zkumavky s agarem byly inkubovány v klidu ve stojánku a zkumavky bez agaru nalezato, s malým pohybem zkumavek na rotační třepačce. Inkubace v obou případech probíhala 2 – 10 dnů při 20 – 25 °C. Hodnocení pohyblivosti kultur probíhalo u zkumavek s agarem vizuálně (zda má růst rozbíhavý charakter od provedeného vpichu) a u zkumavek bez agaru bylo provedeno mikroskopické pozorování pomocí mikroskopu CX41 s fázovým kontrastem, při zvětšení 400 x.

5.3.8 Degradace 300 mg/l NMP jednotlivými kulturami

Po přípravě minerálního média o objemu 1000 ml bylo médium rozlito po 120 ml do třech láhví (vždy pro jednu kulturu) o objemu 500 ml a poté bylo sterilizováno. Po sterilizaci a následném ochlazení byl do každé láhve přidán sterilní 10% zásobní roztok N-methyl-2-pyrrolidonu v množství 360 μ l. Tak vznikla koncentrace 300 mg/l NMP. Poté byla každá láhev naočkována 120 μ l suspenze čisté kultury o hustotě 2. stupně McFarlandovy stupnice. Následně po dokonalém promíchání bylo z láhví asepticky odebráno 8 ml do zkumavky, z toho 4 ml byly zcentrifugovány při 10 000 g po dobu 15 minut při 10 °C a zbylé 4 ml po promíchání změřeny na spektrofotometru SPEKOL 11 při 600 nm. Po centrifugaci byl z každé zkumavky opatrně odebrán supernatant o objemu 2 ml a zředěn 4 ml destilované vody (poměr 1 : 2) a po dokonalém promíchání byl stanoven obsah rozpuštěného organického uhlíku (DOC) pomocí automatického analyzátoru. Láhve byly kultivovány ve tmě na třepačce při 25 °C.

5.3.9 Vlastnosti kultur

NEFERMtest 24

Souprava NEFERMtest je určena pro identifikaci gramnegativních nefermentujících bakterií. Testy jsou umístěny v jamkách dělené mikrotitrační destičky. Vždy tři řady po osmi jamkách obsahují testy pro identifikaci jednoho kmene [15]. Inkubace probíhala 48 hodin při 30 °C. Testování bylo provedeno dle návodu výrobce Erba Lachema s.r.o.

Oxidačně-fermentační test

Všechny složky, které jsou uvedeny v tabulce 9 byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody a po přidání čistého agaru byly rozvařeny ve vodní lázni. Po rozpuštění agaru byla upravena hodnota pH na 7,2 – 7,4. Barva média byla tmavě zelená. Médium bylo poté rozlito do zkumavek, které byly poté sterilizovány v autoklávu při 115 °C po dobu 35 minut. Po sterilizaci a zchladnutí media byla na kličku nanášena zkoumaná kultura a poté byl touto kličkou proveden vpich do celého objemu zkumavky s médiem. Kultivace byla provedena při 25 °C po dobu 7 dnů. U fermentujících bakterií se zelená barva média změní v celém sloupci do žluta. Pokud k takovému zbarvení nedojde, jedná se o bakterie nefermentující.

Tabulka 9 – Složení média pro oxidačně-fermentační test

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

Test na katalasu a cytochromoxidasu

Přítomnost katalasy byla zjišťována vmícháním inokula zkoumané kultury do kapky 3% peroxidu vodíku na podložním sklíčku. V případě pozitivního výsledku docházelo okamžitě k tvorbě bublinek kyslíku. V případě negativního výsledku neproběhla žádná viditelná reakce.

Přítomnost cytochromoxidasu byla zjišťována pomocí komerčního testu OXI-test. Na speciálně vyrobený papírek firmy Erba Lachema bylo rozetřeno inokulum zkoumané kultury. V případě pozitivního výsledku došlo ke zmodrání papírku. V případě negativního výsledku nedocházelo k žádné barevné změně.

KOH test

Na podložní sklíčko byla nakápnuta jedna kapka 3% KOH a v ní byla kličkou rozmíchána biomasa zkoumané kultury a bylo pozorováno rozpouštění biomasy a uvolňování DNA v podobě vlákn.

5.3.10 Identifikace kultur pomocí molekulárně biologické metody

Identifikace kultur byla prováděna pomocí molekulárně biologické metody – polymeraso-
vé řetězové reakce s následnou sekvenací úseků genu pro 16S rRNA.

Isolace DNA ze získaných bakterií

Čerstvě narostlé kultury na R2A agaru byly kličkou umístěny do zkumavky s rozbíječnými kuličkami a poté proběhla rychlá a dokonalá homogenizace. K izolaci DNA u grampozitivních bakterií byl používán Power SoilTM DNA Isolation Kit, podle postupu stanoveného výrobcem. DNA byla zachycena na křemičité membráně v kolonce. Kolonka byla promývána a eluována z membrány. Poté byla DNA připravena pro PCR analýzu. [16] Isolace u gramnegativních bakterií byla provedena lyzí biomasy buněk v destilované vodě 10 minut při 98 °C.

Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Jde o metodu zmnožení (amplifikace) určité části DNA *in vitro* ve směru 5' → 3' za pomoci termostabilního enzymu DNA-polymerasa. PCR probíhá ve třech krocích – denaturace, annealing a elongace (prodlužování). Denaturace probíhá při teplotě 95 °C a dochází při ní k rozvláknění DNA, tedy ke vzniku dvou jednořetězcových vláken DNA. Poté probíhá tzv. annealing, kdy dochází k vazbě primerů na základě komplementarity bází při 50 – 60 °C. V posledním kroku probíhá elongace, kdy dojde ke zvýšení teploty na 72 °C a na 3' konce primerů nasedá DNA-polymerasa a dochází k prodlužování řetězce ve směru 5' → 3'. Tyto tři kroky se několikrát opakují. PCR se provádí v přístroji, který se nazývá termocykler. [17]

Příprava směsi látek pro zmnožení dané DNA a samotný postup PCR

Jednotlivé složky uvedené v tabulce 10 byly napipetovány do mikrozkušavky a po přípravě byly mikrozkušavky zcentrifugovány při otáčkách 100 rpm po dobu 1 minuty. Byly použity dva primery (syntetické oligonukleotidy) – 341F (CCTACGGGAGGCAGCAG) a 907R (CCGTCAATTCCTTTGAGTTT).

Tabulka 10 – Složky pro přípravu reakční směsi pro amplifikaci dané DNA

Voda pro molekulární biologii	9,5 µl
Roztok primeru 341F	1,0 µl
Roztok primeru 907R	1,0 µl
MasterMix (Roche)	12,5 µl
Vzorek DNA	1,0 µl

Následovalo vložení mikrozkušavek do termocykleru a spuštění programu s kroky, uvedenými v tabulce 11.

Tabulka 11 – Nastavení programu v termocykleru pro PCR

Počáteční denaturace		2 minuty při 95 °C
Cyklus opakování 9x	Denaturace	30 s při 95 °C
	Annealing	30 s při 57 °C
	Elongace	60 s při 72 °C
Cyklus opakování 34x	Denaturace	30 s při 95 °C
	Annealing	30 s při 52 °C
	Elongace	60 s při 72 °C
Závěrečná denaturace		10 minut při 72 °C

Kontrola PCR

Kontrola PCR se provádí pomocí gelové elektroforézy. Je to metoda založená na separaci molekul DNA v agarosovém gelu na základě jejího náboje a molekulární hmotnosti. Principem metody je tedy pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli ke kladně nabitě elektrodě.

Postup kontroly PCR gelovou elektroforézou

1% agarosový gel byl připraven smícháním 1 ml agarosy a 100 ml trisacetátového pufru (TAE) a jeho následným rozvařením. Po ochlazení gelu byly do gelu přidány 4 kapky roztoku ethidium bromid, což je fluorescenční barvivo, které se naváže na DNA a způsobuje zviditelnění separovaných molekul. Směs byla promíchána a vлита do formy s hřebínkem, která byla po ztuhnutí gelu přesunuta do elektroforetické vany. Hřebínek sloužil pro vytvoření jamek potřebných k dávkování vzorků do gelu. Po ztuhnutí byl hřebínek vytáhnut a gel byl zalit TAE pufrem, který sloužil jako elektrolyt. Do první jamky gelu bylo mikropipetou nadávkováno 5 μ l markeru v rozsahu 100 – 1500 bp, což je srovnávací standard, který obsahuje směs molekul nukleových kyselin o známé molekulové hmotnosti a koncentraci a slouží pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů. Do vedlejších jamek gelu byla poté nanášena směs 5 μ l amplifikované DNA se 3 μ l nanášecího pufru, který zatíží DNA (klesne do jamky v gelu) a umožňuje kontrolu nanášení vzorků do příslušné jamky a také migraci DNA v gelu. Elektroforéza probíhala 30 minut při konstantním napětí 90 V. Po skončení byl gel vyjmut a přenesen do UV transluminátoru [18], [19].

Purifikace amplifikované DNA

Purifikace (neboli přečištění PCR produktů) byla provedena pomocí protokolu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit. Do mikrozkuhavky bylo napipetováno 15 μ l amplifikované DNA a 75 μ l DF pufru a směs byla promíchána na vortexu. Do čisté 2ml mikrozkuhavky byla přelita směs amplifikované DNA a pufru a proběhla centrifugace po dobu 30 s při 14 000 rpm. Tím došlo k filtraci, kdy přefiltrovaná kapalina byla vylita, kolonka se předělala do nové mikrozkuhavky a na ní bylo poté napipetováno 90 μ l promývacího pufru s ethanolem. Mikrozkuhavka byla ponechána 15 minut v klidu a poté zcentrifugována po dobu 30 s při 14 000 rpm. Přefiltrovaná kapalina byla opět vylita, kolonka se předělala do nové mikrozkuhavky a následně proběhla centrifugace po dobu 3 minut při 14 000 rpm. Po vložení kolonky do nové mikrozkuhavky bylo do ní napipetováno 20 μ l

elučního pufru. Mikrozkumavka byla ponechána 15 minut v klidu a následně byla zcentrifugována po dobu 2 minut při 14 000 rpm. Kolonka byla vyhozena a v mikrozkumavce byla již přečištěná DNA.

Příprava na sekvenaci

Před odesláním vzorků DNA k sekvenaci bylo potřeba do nové mikrozkumavky k 8,5 μ l vzorku přidat 1,5 μ l roztoků primerů (341F a 907R). Mikrozkumavky byly poté poslány na externí pracoviště k sekvenaci.

Vlastní identifikace

Získané sekvence 16S rDNA byly porovnány s výsledky uloženými v databázi GenBank pomocí programu BLAST. [20]

U identifikace bylo přihlíženo k výsledkům provedených růstových a biochemických testů.

6 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY

6.1 Pomůcky

V praktické části diplomové práce byly používány běžné laboratorní pomůcky mikrobiologické laboratoře.

6.2 Přístroje

Analytické váhy KERN 770

Analyzátor TOC 5000A – Shimadzu, Japonsko

Aparatura pro gelovou elektroforézu

Aseptický box BIO-II-A – TELSTAR, Španělsko

Autokláv LaM-MCS – SANOclav, Německo

Box Aura PCR, BIOAIR

Centrifuga JOUAN Mr 23i, Francie

Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf AG, Německo

Centrifuga Rotanta 460R – Hettich, Velká Británie

Centrifuga Z100 M, Hermle, Německo

Laboratorní třepačky

Mikroskop Olympus CX41

Spektrofotometr SPEKOL 11, Carl Zeiss, Jena

Spektrofotometr TECAN INFINITE M200

UV transluminátor Syngene

UV-VIS spektrometr UNICAM UV 500, Thermo Spectronic, UK

Vortex Genie 2 – MO BIO

Termocykler ESCO AerisTM – DYNEX

Termostat blokový Bio TDB-100 – Biotech

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

Byly sledovány růstové vlastnosti kultur jednak pro získání dat potřebných k identifikaci, tak pro získání dat pro případné využití těchto kultur v přírodních podmínkách (např. růst při různých teplotách, rychlost degradace apod.).

7.1.1 Stanovení maximální růstové koncentrace NMP

Byl sledován růst kultur při koncentracích NMP od 0 do 50 g/l podle postupu uvedeného výše. Kultivace kultur probíhala 10 dnů. Výsledky vizuálního odečtu jsou uvedeny v tabulce 12 a výsledky ze spektrofotometru jsou uvedeny v tabulkách 13 a 14.

Kultura Š nebyla spektrofotometricky stanovena.

Tabulka 12 – Výsledky růstu kultur při koncentracích NMP od 0 – 50 g/l na konci pokusu získané při vizuálním odečtu

c [g/l]		Kultury								Kontrola sterility
		JF1	Š	MS1	MS2	J10	J20	RO	R4-P	
A	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
B	0,5	±	++	+	+	++	+	++	++	–
C	1,0	+	++	++	+	++	++	++	++	–
D	2,5	±	++	++	++	++	++	++	++	–
E	5,0	±	++	++	++	++	++	++	++	–
F	10	±	–	++	++	+	+	+	++	–
G	25	–	–	–	++	–	–	–	–	–
H	50	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Vysvětlivky: – negativní reakce (bez růstu)

± slabě pozitivní reakce

+ pozitivní reakce

++ silně pozitivní reakce

Tabulka 13 – Výsledky růstu kultur JF1, MS1 a MS2 při koncentracích NMP od 0 – 50 g/l na konci pokusu získané ze spektrofotometrického měření

c [g/l]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		JF1			MS1			MS2			---		Kontrola
A	0	0,069	0,083		0,088	0,062		0,061	0,083		---	---	0,033
B	0,5	0,07	0,078		0,177	0,172		0,144	0,142		---	---	0,037
C	1,0	0,183	0,192		0,306	0,303		0,273	0,272		---	---	0,035
D	2,5	0,087	0,087		0,341	0,329		0,545	0,523		---	---	0,036
E	5,0	0,085	0,082		0,361	0,304		0,504	0,471		---	---	0,036
F	10	0,093	0,083		0,329	0,313		0,459	0,460		---	---	0,038
G	25	0,062	0,066		0,037	0,04		0,320	0,316		---	---	0,048
H	50	0,039	0,04		0,037	0,042		0,042	0,045		---	---	0,043

Tabulka 14 – Výsledky růstu kultur J10, J20, RO a R4-P při koncentracích NMP od 0 – 50 g/l na konci pokusu získané ze spektrofotometrického měření

c [g/l]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		J10			J20			RO			R4-P		Kontrola
A	0	0,079	0,097		0,06	0,067		0,079	0,08		0,137	0,138	0,04
B	0,5	0,256	0,217		0,256	0,200		0,302	0,278		0,259	0,243	0,063
C	1,0	0,341	0,252		0,318	0,254		0,355	0,398		0,360	0,367	0,038
D	2,5	0,381	0,626		0,364	0,334		0,565	0,610		0,574	0,583	0,04
E	5,0	0,321	0,295		0,294	0,307		0,602	0,611		0,567	0,569	0,037
F	10	0,214	0,238		0,204	0,203		0,182	0,164		0,463	0,390	0,04
G	25	0,063	0,057		0,057	0,052		0,048	0,052		0,066	0,067	0,038
H	50	0,044	0,042		0,042	0,042		0,044	0,048		0,043	0,048	0,037

Při porovnání těchto třech tabulek lze vidět, že hodnoty získané jak při vizuálním odečtu, tak při spektrofotometrickém vyhodnocení se shodují. Schopnost růstu při nejvyšší koncentraci prokázala kultura MS2, která byla schopna růst až do koncentrace NMP 25 g/l.

7.1.2 Růstové vlastnosti kultur

Kultivace při různých teplotách

Všechny zkoumané kultury byly pomocí křížového roztěru naočkovány na Petriho misky s R2A agarem a kultivovány při teplotách 5, 10, 20, 25, 30, 37 a 45 °C. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 15 a ukázaly, při jakých teplotách jsou jednotlivé kultury schopny růst.

Tabulka 15 – Kultivace kultur při různých teplotách

Teplota	Kultury							
	JF1	Š	MS1	MS2	J10	J20	RO	R4-P
5 °C	+	–	+	+	–	+	–	+
10 °C	+	–	+	+	–	+	+	+
20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
25 °C	++	+	++	++	+	+	+	++
30 °C	++	+	++	++	–	–	+	++
37 °C	–	+	–	–	–	–	–	–
45 °C	–	–	–	–	–	–	–	–

Vysvětlivky: – negativní reakce (žádný nárůst)

+ pozitivní reakce

++ pozitivní reakce (rychlý růst, již za 24 hodin)

Růst kultur při zvýšených koncentracích NaCl

Stejně jako v předchozím případě byly kultury naočkovány na Petriho misky s R2A agarem, avšak s přidavkem různých koncentrací NaCl. Poté následovala kultivace a vizuální odečet případného nárůstu kultur. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16 – Nárůst kultur při zvýšených koncentracích NaCl

c _{NaCl}	Kultury							
	JF1	Š	MS1	MS2	J10	J20	RO	R4-P
0 %	++	++	++	++	++	++	++	++
0,5 %	++	++	++	++	–	+	+	++
3,0 %	++	++	++	++	–	–	–	++
6,5 %	++	–	–	+	–	–	–	–
10 %	+	–	–	–	–	–	–	–
15 %	–	–	–	–	–	–	–	–

Vysvětlivky: – žádný růst

+ slabý růst

++ silný růst

Růst kultur na gamma-aminomáselné kyselině o koncentraci 0,5 g/l

V tomto pokusu byl po kultivaci sledován případný zákal v připravených zkumavkách s kyselinou gamma-aminomáselnou, tedy zdali kultury byly schopné využít tuto kyselinu jako substrát. Podle vizuálního odečtu po týdenní kultivaci proběhla degradace gamma-aminomáselné kyseliny u kultur MS1, MS2, J10, J20, RO a R4-P. U kultury JF1 a Š k rozkladu nedošlo, jelikož jejich nízké hodnoty absorbance téměř odpovídaly hodnotě kontrolní zkumavky bez očkování. Výsledky ze spektrofotometru jsou uvedeny v tabulce 17 a dalo by se říct, že se shodují s odečtem vizuálním.

Tabulka 17 – Naměřené hodnoty absorbancí kultur rostoucích na GABA

Kultura	Absorbance [1]
JF1	0,073
Š	0,026
MS1	0,770
MS2	0,798
J10	0,914
J20	0,907
RO	1,076
R4-P	0,747
Kontrola	0,017

Růst kultur na N-acetyl-L-fenylalaninu o koncentraci 0,5 g/l

Stejně jako v předchozím případě, byl po kultivaci pozorován zákal v připravených zkumavkách s N-acetyl-L-fenylalaninem o koncentraci 0,5 g/l. Po celkové 10denní kultivaci na třepačce bylo zjištěno, že žádná kultura není schopna růstu na této látce.

Růst kultur na 1-octyl-2-pyrrolidonu o koncentraci 0,1 g/l

Byl pozorován zákal po kultivaci jednotlivých kmenů ve zkumavkách s 1-octyl-2-pyrrolidonem o koncentraci 0,1 g/l. Po 9 dnech kultivace na třepačce nebyl pozorován zákal u žádné kultury, tzn., že žádná kultura není schopna růstu na této látce.

7.1.3 Sledování pohyblivosti degradačních kultur

Tento pokus sloužil ke zjištění pohyblivosti degradačních kultur. Byly použity dvě metody. První, u které došlo k mikroskopickému pozorování s fázovým kontrastem při zvětšení 400 x.

A druhá, u které bylo pozorováno, zdali u kultur docházelo (v případě zkumavek s agarem) k rozbíhavému růstu z provedeného vpichu. Výsledek této metody se zjišťoval vizuálně.

Výsledky pohyblivosti z mikroskopického pozorování kultur jsou uvedeny v tabulce 18.

Tabulka 18 – Mikroskopické pozorování pohyblivosti kultur

Kultura	Výsledek
JF1	Nepohyblivá
Š	Nepohyblivá
MS1	Pohyblivá
MS2	Pohyblivá
J10	Pohyblivá
J20	Pohyblivá
RO	Pohyblivá
R4-P	Pohyblivá

U vizuálního hodnocení byl u kultury R4-P po 3 dnech kultivace pozorován jak růst při povrchu agaru, tak i rozbíhavý růst z provedeného vpichu do okolního média. Tato změna nastala po celkem 9 dnech i u dalších kultur, kterými byly kultury MS1, MS2, J10, J20 a RO. Tyto výsledky tedy značily, že jde o kultury pohyblivé. Jako nepohyblivé kultury byly zjištěny kultury JF1 a Š, jelikož u nich nenastala žádná změna z provedeného vpichu. Obě metody ukázaly shodné výsledky, u žádné kultury nebyly zjištěny odlišné výsledky. Fotodokumentace příkladu hodnocení pohyblivé a nepohyblivé kultury je uvedena v příloze I.

7.1.4 Degradace 300 mg/l NMP jednotlivými kulturami

V těchto pokusech byla sledována schopnost kultur rozkládat N-methyl-2-pyrrolidon v průběhu kultivace. Vlastní sledování probíhal u každé kultury ve třech kultivačních láhvích, do kterých byl přidán sterilní 10% roztok NMP do koncentrace 300 mg/l. Degradace NMP byla sledována pomocí měření zákalu jednotlivých suspenzí na spektrofotometru při 600 nm, dále stanovováním koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) pomocí automatického analyzátoru (po odstranění buněk) a také vizuálně. Získané hodnoty DOC a grafy degradací a absorbancí jednotlivých kultur jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech.

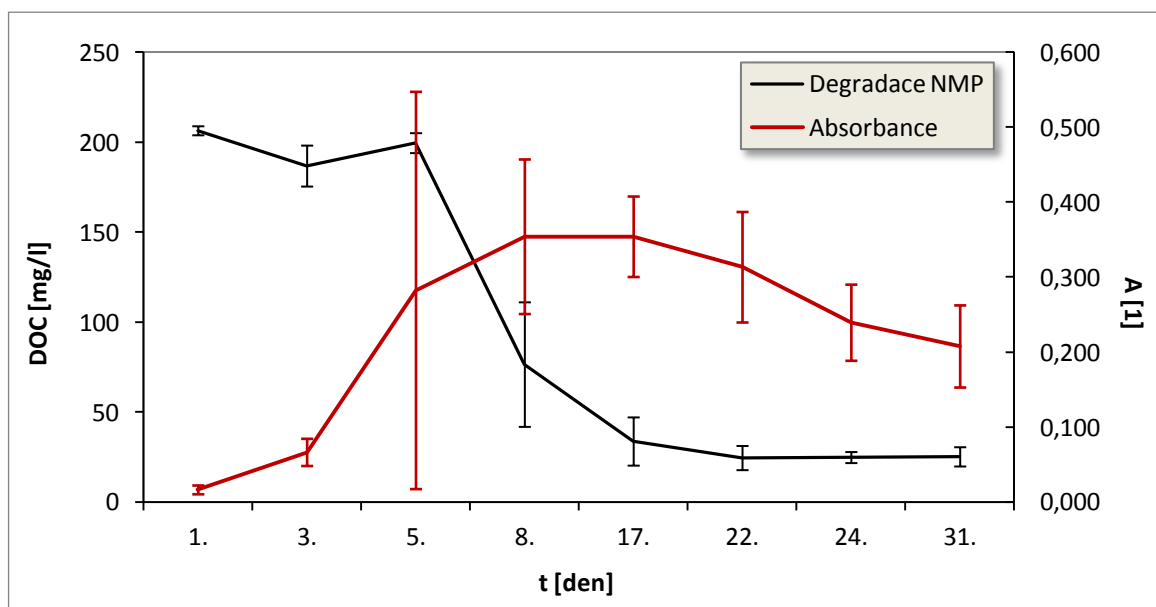
Kultura JF1

Tabulka 19 – Hodnoty DOC ve všech třech láhvích kultury JF1

Čas [den]	DOC [mg/l]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	209,19	205,68	204,33
3.	177,30	183,63	199,41
5.	198,06	205,65	194,88
8.	95,82	36,48	97,02
17.	43,08	39,63	18,33
22.	22,80	31,89	18,78
24.	21,24	26,40	26,70
31.	25,84	30,15	19,51

Tabulka 20 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury JF1

Čas [den]	Absorbance [1]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	0,012	0,014	0,023
3.	0,053	0,087	0,059
5.	0,098	0,586	0,163
8.	0,333	0,466	0,263
17.	0,405	0,359	0,298
22.	0,340	0,370	0,230
24.	0,293	0,233	0,192
31.	0,268	0,194	0,161



Obrázek 6 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou JF1

Z obrázku 6 lze vidět, že kultura JF1 byla schopna převážnou část vneseného NMP rozložit za 21 dnů, přičemž lagová fáze trvala čtyři dny.

Vizuálně bylo zjištěno, že ve všech třech láhvích této kultury se začal tvořit již třetí den od naočkování zákal s viditelnými malými světlými vločkami, ale po důkladném rozmíchání se vločky rozpadly a došlo k vytvoření jemné suspenze. Další dny se tvořil zákal větší, s výrazně větším počtem vloček a během 8. až 17. dne došlo k úplnému vyvločkování. To lze vidět i z obrázku 6 (křivky absorbance), kdy během těchto dnů docházelo ke snižování hodnot absorbance. Konečná hodnota DOC se pohybovala v rozmezí od 20 – 30 mg/l.

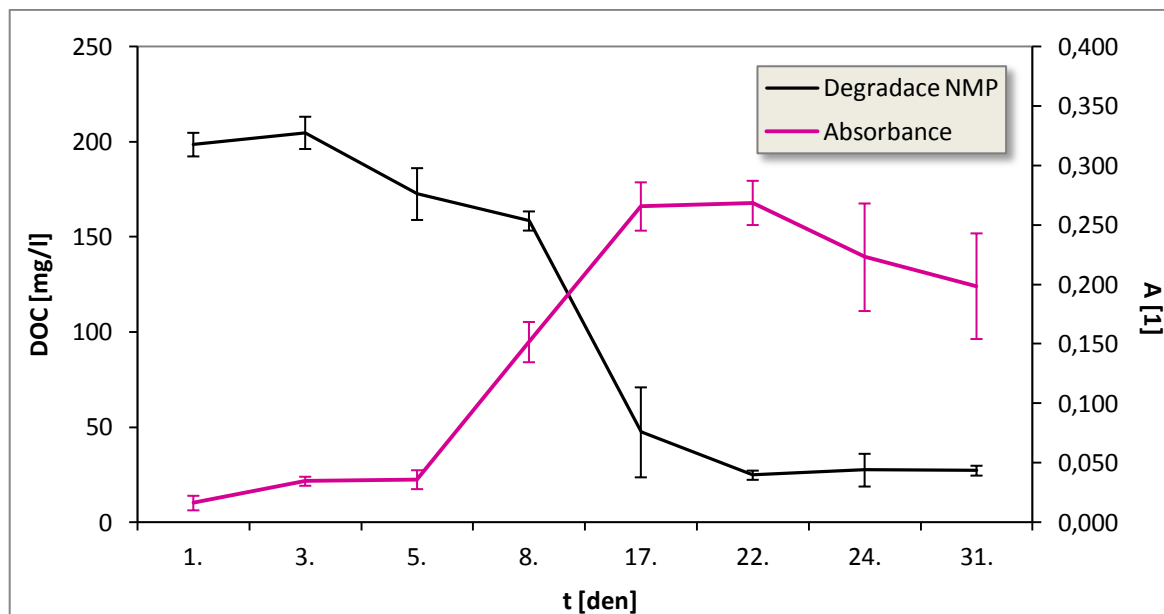
Kultura Š

Tabulka 21 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury Š

Čas [den]	DOC [mg/l]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	205,26	197,34	193,05
3.	195,12	207,93	211,14
5.	175,08	184,77	157,89
8.	162,15	160,41	152,70
17.	20,64	65,55	55,92
22.	22,47	24,75	27,30
24.	29,09	35,19	18,21
31.	29,71	24,54	27,46

Tabulka 22 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury Š

Čas [den]	Absorbance [1]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	0,015	0,011	0,023
3.	0,032	0,039	0,033
5.	0,033	0,030	0,045
8.	0,133	0,166	0,156
17.	0,252	0,256	0,289
22.	0,256	0,260	0,290
24.	0,185	0,211	0,273
31.	0,150	0,209	0,237



Obrázek 7 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou Š

Z obrázku 7 lze vidět, že proces degradace kulturou Š probíhal obdobně jako kulturou JF1. Rozklad NMP proběhl za 21 dní, ale lagová fáze trvala pouze dva dny.

Z vizuálního hlediska byly tyto tři láhve naočkované kulturou Š téměř stejné jako s kulturou JF1. Ve všech třech láhvích se začal tvořit po třech dnech od naočkování zákal, avšak s viditelnými žlutými vločkami a po rozmíchání docházelo u vloček k rozpadu. Změna nastala po 16. dnech od naočkování, kdy byly v láhvích přítomné velké shluky žlutých vloček a po rozmíchání docházelo k jejich rozpadu a poté vzniku malých vloček. Tato změna šla poznat i při měření zákalu na spektrofotometru, kdy v kylvetách byla vidět přítomnost sedimentujících vloček, čímž docházelo ke snižování hodnot absorbancí. Na konci pokusu se hodnota DOC pohybovala okolo 25 mg/l.

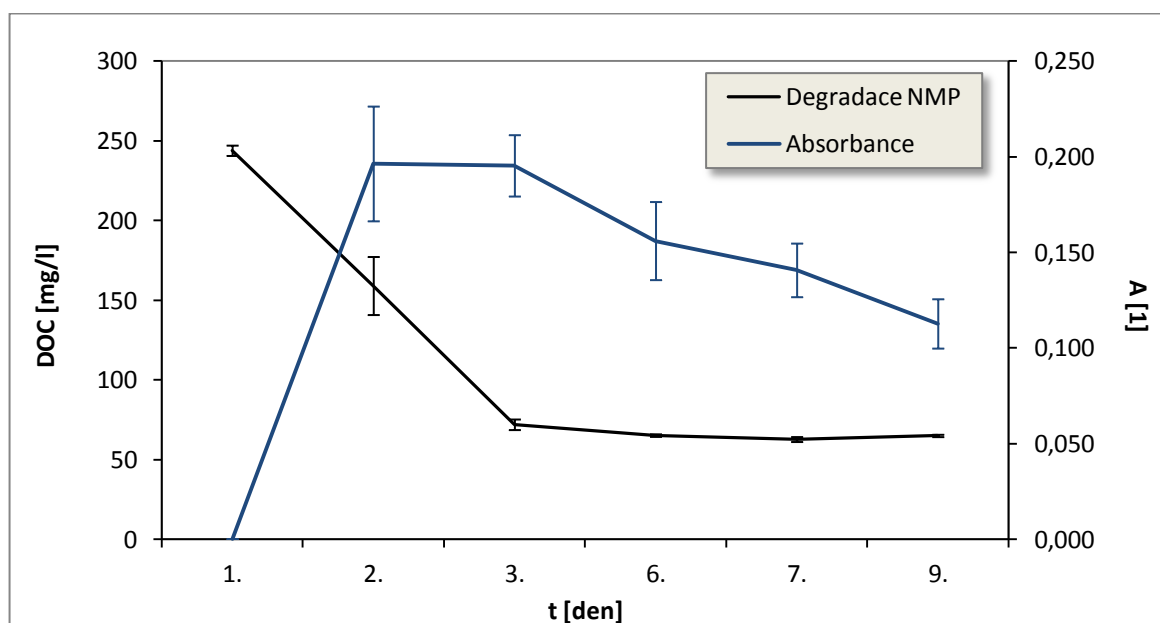
Kultura MS1

Tabulka 23 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury MS1

Čas [den]	DOC [mg/l]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	240,12	245,43	246,00
2.	138,99	163,41	174,60
3.	71,31	75,48	68,94
6.	64,98	64,38	65,97
7.	61,62	61,89	64,44
9.	64,32	65,73	64,68

Tabulka 24 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury MS1

Čas [den]	Absorbance [1]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	0,000	0,000	0,000
2.	0,229	0,190	0,170
3.	0,212	0,180	0,194
6.	0,179	0,149	0,140
7.	0,155	0,140	0,127
9.	0,127	0,109	0,102



Obrázek 8 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou MS1

Podle obrázku 8 lze říci, že kultura MS1 patřila mezi rychle degradující kultury, jelikož byla schopna rozložit NMP za velice krátkou dobu, a to během pěti dní, přičemž většina substrátu byla rozložena během dvou dnů.

Sledováním všech láhví bylo zpozorováno, že po již jednom dni od naočkování se začal tvořit zákal s malými vločkami, avšak po rozmíchání došlo k rozpadu těchto vloček. Po dalších dnech docházelo k vytvoření větších shluků vloček a také docházelo k jejich rozpadu. Tento fakt lze také vidět na obrázku 8 z křivky absorpance, kdy největší hodnoty absorpance byly právě během 2. a 3. dne. Další dny se hodnoty snižovaly, jelikož došlo k úplnému vyvločkování. Konečná hodnota DOC byla kolem 65 mg/l, z čehož nelze vyvodit, že došlo k úplnému rozkladu NMP. Bylo by proto účelné pomocí přímého stanovení NMP toto zjistit, případně zjistit zdali tato hodnota je dána produkcí přirozených metabolitů této kultury.

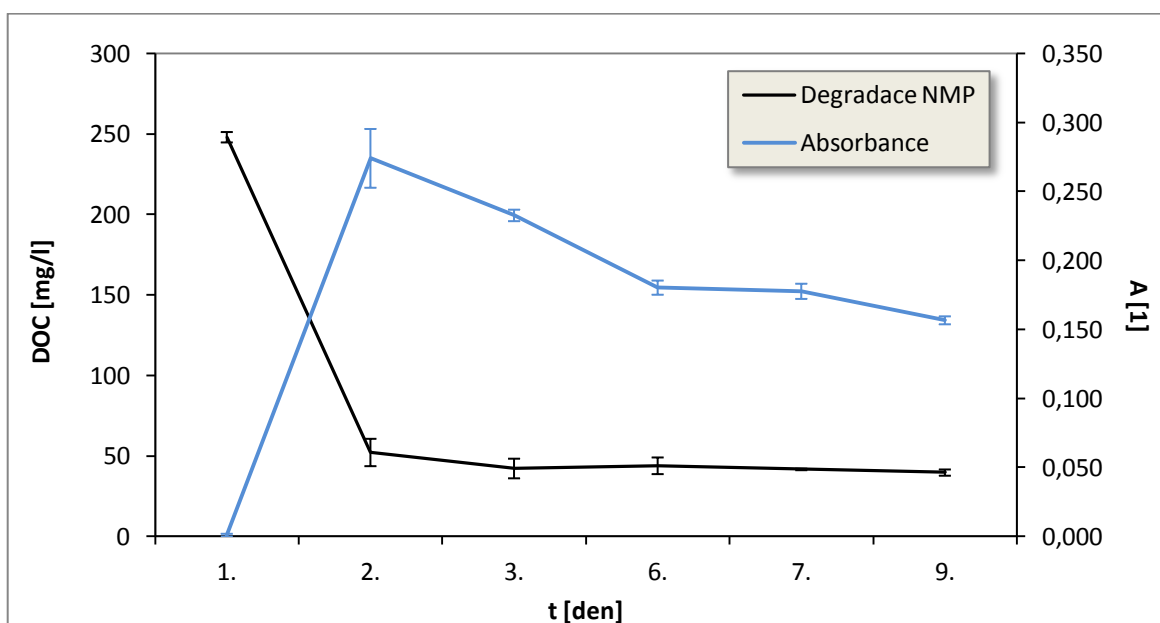
Kultura MS2

Tabulka 25 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury MS2

Čas [den]	DOC [mg/l]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	244,26	249,87	249,84
2.	44,25	51,21	61,14
3.	37,53	49,14	40,11
6.	37,98	46,95	46,92
7.	41,79	41,16	42,06
9.	37,50	40,65	41,01

Tabulka 26 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury MS2

Čas [den]	Absorbance [1]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	0,000	0,001	0,002
2.	0,297	0,270	0,255
3.	0,228	0,236	0,234
6.	0,179	0,186	0,176
7.	0,175	0,174	0,184
9.	0,155	0,155	0,160



Obrázek 9 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou MS2

Z obrázku 9 lze vidět, že i kultura MS2 patřila mezi rychle degradující kultury, jelikož byla schopna rozložit NMP za krátkou dobu, a to během jednoho až dvou dnů.

Vizuálně bylo zpozorováno, že ve všech láhvích došlo ke vzniku zákalu se žlutými viditelnými cárovitými vločkami již po jednom dni od naočkování. Po rozmíchání nedocházelo k jejich úplnému rozpadu, avšak k rozpadu na menší vločky. Tím došlo k vyvločkování, a tím pádem ke snižování hodnot absorbance (viz obrázek 9, křivka absorbance). Hodnota DOC na konci pokusu byla okolo 40 mg/l.

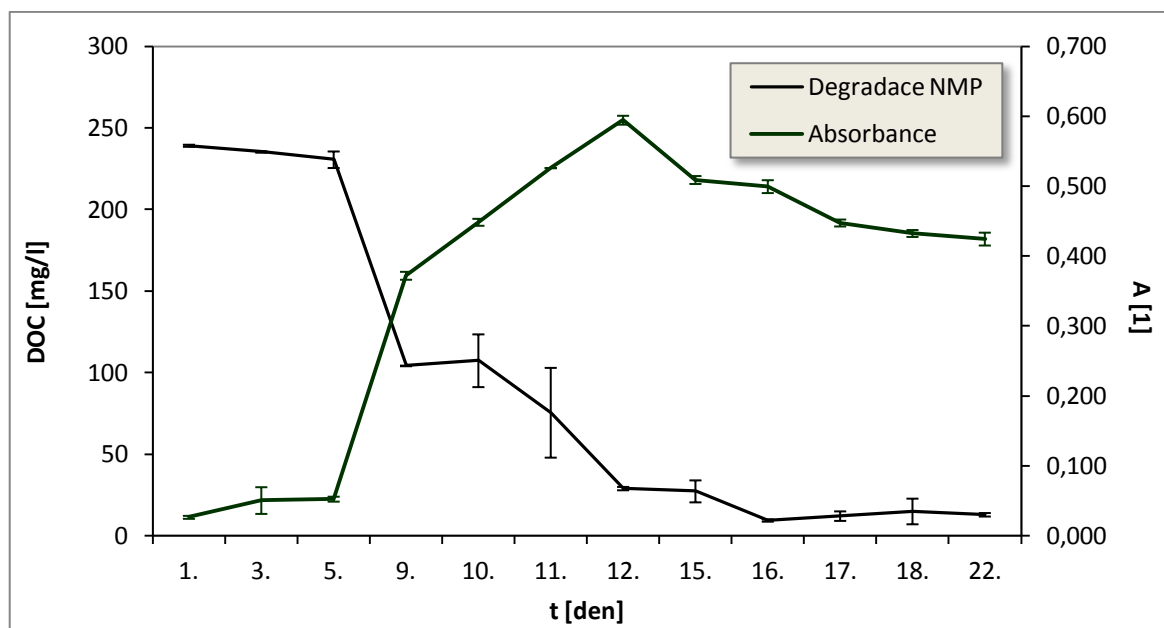
Kultura J10

Tabulka 27 – Hodnoty DOC v 1. a 2. láhvi kultury J10

Čas [den]	DOC [mg/l]	
	Láhev 1	Láhev 2
1.	238,68	239,58
3.	235,65	235,02
5.	234,15	226,98
9.	104,31	104,04
10.	95,91	118,77
11.	94,92	56,01
12.	28,25	29,70
15.	32,04	22,52
16.	9,92	8,92
17.	14,16	10,03
18.	9,39	20,51
22.	12,16	13,68

Tabulka 28 – Hodnoty absorbancí v 1. a 2. láhvi kultury J10

Čas [den]	Absorbance [1]	
	Láhev 1	Láhev 2
1.	0,028	0,025
3.	0,037	0,064
5.	0,050	0,055
9.	0,376	0,368
10.	0,452	0,445
11.	0,526	0,526
12.	0,599	0,590
15.	0,513	0,505
16.	0,506	0,493
17.	0,444	0,451
18.	0,429	0,436
22.	0,418	0,431



Obrázek 10 – Graf degradace 300 mg/l NMP 1. a 2. láhvi kulturou J10

Podle obrázku 10 lze kulturu J10 označit za jednu z pomalu degradujících kultur, jelikož rozklad NMP probíhal poměrně dlouhou dobu, a to zhruba 15 dní. Výsledky byly zaznamenány jen u dvou láhví, z důvodu kontaminace třetí láhve.

Z počátku, po naočkování láhvi, byl pozorován pouhý zákal bez vloček. Avšak po osmém dni došlo k tvorbě žlutých vloček a současně došlo i k nárůstu absorbance. Lze také konstatovat, že kultura J10 prokázala nejvyšší míru odstranění DOC, jelikož její konečná hodnota se pohybovala kolem 9 až 13 mg/l.

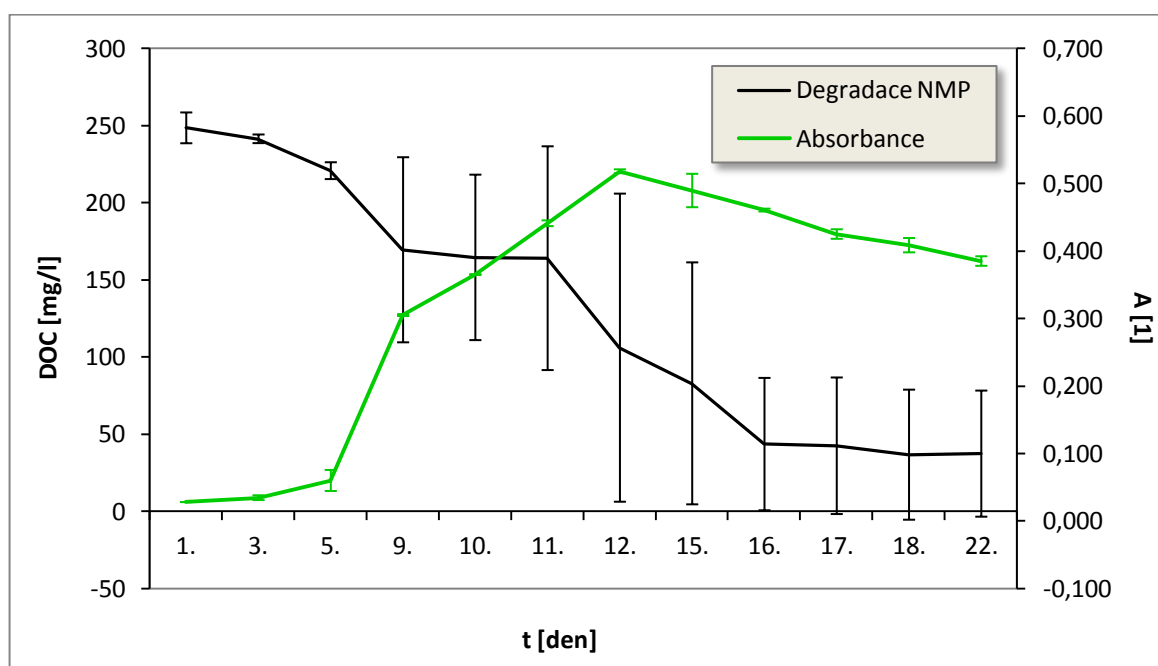
Kultura J20

Tabulka 29 – Hodnoty DOC v 1. a 2. láhvi kultury J20

Čas [den]	DOC [mg/l]	
	Láhev 1	Láhev 2
1.	241,44	255,57
3.	239,43	243,39
5.	216,90	224,61
9.	211,89	127,08
10.	202,47	126,66
11.	215,31	112,77
12.	176,64	35,46
15.	138,36	27,48
16.	73,89	13,23
17.	73,77	11,20
18.	66,51	6,92
22.	66,27	8,49

Tabulka 30 – Hodnoty absorbancí v 1. a 2. láhvi kultury J20

Čas [den]	Absorbance [1]	
	Láhev 1	Láhev 2
1.	0,028	0,028
3.	0,037	0,032
5.	0,071	0,049
9.	0,306	0,304
10.	0,365	0,365
11.	0,438	0,444
12.	0,516	0,520
15.	0,507	0,472
16.	0,462	0,459
17.	0,430	0,420
18.	0,416	0,401
22.	0,390	0,380



Obrázek 11 – Graf degradace 300 mg/l NMP 1. a 2. láhvi kulturou J20

Stejně jako kulturu J10, lze i kulturu J20 zařadit do skupiny pomalu degradujících kultur, jelikož došlo k rozkladu NMP až za 15 dní. I u této kultury byly výsledky zaznamenány jen u dvou láhví, z důvodu kontaminace láhve třetí.

Vizuálně byl na začátku pokusu zpozorován pouze zákal bez vloček. Po osmém dni však došlo k vytvoření žlutých vloček a také ke zvýšení hodnot absorbance. U pokusu s touto kulturou byl zjištěn nejvýznamnější rozdíl mezi průběhem degradace v paralelních vzorcích.

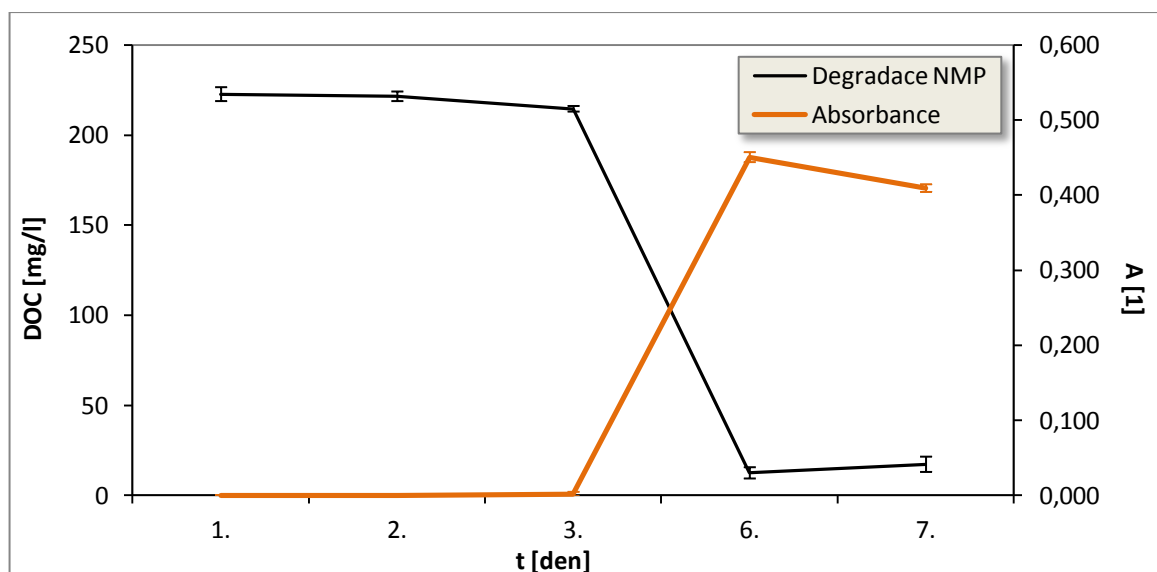
Kultura RO

Tabulka 31 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury RO

Čas [den]	DOC [mg/l]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	221,88	219,39	226,95
2.	219,48	224,55	220,59
3.	212,82	215,31	215,67
6.	9,18	15,39	12,81
7.	18,99	20,27	12,36

Tabulka 32 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury RO

Čas [den]	Absorbance [1]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	0,000	0,000	0,000
2.	0,000	0,000	0,000
3.	0,000	0,000	0,005
6.	0,455	0,443	0,454
7.	0,408	0,405	0,415



Obrázek 12 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou RO

Další rychle degradující kulturou byla kultura RO, jelikož byla schopna rozložit NMP za 5 dní. Z vizuálního hlediska zpočátku pokusu až po třetí den od naočkování nebyl pozorován ve všech láhvích výrazný zákal. Tento fakt lze vidět i v tabulce 32, kdy absorbance byla nulová. Avšak mezi druhým a pátým dnem došlo jak k úbytku substrátu, tak i k vytvoření výrazného bílého zákalu, což prokázalo i měření absorbance. Na konci pokusu byla zjištěna DOC mezi 9 až 15 mg/l. Podle tohoto zjištění, lze říci, že kultura RO byla schopná NMP rozložit prakticky úplně.

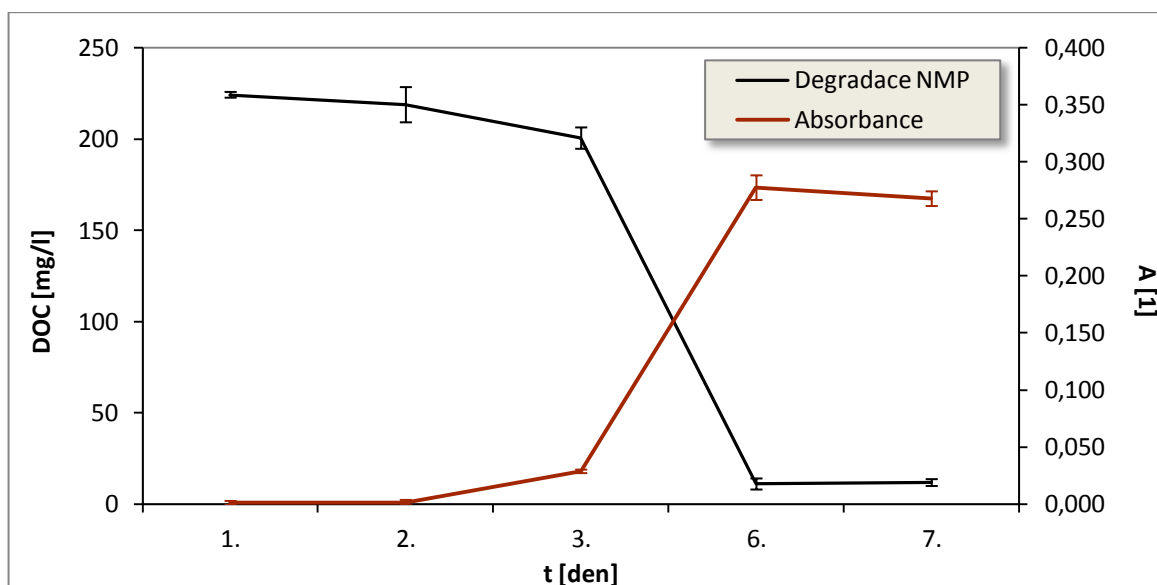
Kultura R4-P

Tabulka 33 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury R4-P

Čas [den]	DOC [mg/l]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	223,17	223,41	226,02
2.	207,72	223,14	225,48
3.	195,69	198,75	207,00
6.	9,00	9,51	14,49
7.	9,99	11,61	13,74

Tabulka 34 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury R4-P

Čas [den]	Absorbance [1]		
	Láhev 1	Láhev 2	Láhev 3
1.	0,003	0,000	0,000
2.	0,004	0,000	0,000
3.	0,027	0,029	0,030
6.	0,265	0,285	0,282
7.	0,263	0,265	0,275



Obrázek 13 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou R4-P

Poslední rychle degradující kulturou byla kultura R4-P. Kultura byla schopna rozkládat NMP velmi dobře a za krátkou dobu.

Již po jednom dni od naočkování došlo k vytváření zákalu s velkými žlutými vločkami, které se po rozmíchání rozpadly na malé. V tomto období začala také růst absorbance a probíhala hlavní fáze degradace. Konečná průměrná hodnota DOC byla 11 mg/l, což znamená, že stejně jako kultura RO, tak kultura R4-P byla schopná rozložit NMP prakticky úplně.

7.1.5 Vlastnosti a orientační identifikace kultur J10, J20, R4-P a RO

NEFERMtest 24

Jelikož bylo zjištěno, že kultury J10, J20, R4-P a RO jsou gramnegativní nefermentující bakterie, bylo možné s nimi provést NEFERMtest 24. Výsledky testů všech kultur jsou uvedeny v tabulkách 35, 36, 37 a 38.

Pomocí programu TNW se bohužel nepodařilo u žádné kultury určit konkrétní druh či rod bakterií. Kultury tedy nebyly běžnými testy identifikovány. Pro jejich identifikaci byly později použity molekulárně biologické metody.

Tabulka 35 – NEFERMtest 24 pro kulturu J10

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

Tabulka 36 – NEFERMtest 24 pro kulturu J20

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

Tabulka 37 – NEFERMtest 24 pro kulturu RO

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

Tabulka 38 – NEFERMtest 24 pro kulturu R4-P

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

Oxidačně-fermentační test

Na kličky byly postupně nanášeny kultury, vypěstované na R2A agaru, označeny jako J10, J20, R4-P a RO. Poté byly kličkami provedeny vpichy do celého objemu zkumavek s médiem. Po 7 dnech kultivace bylo zjištěno, že u žádné z kultur nedošlo k zabarvení média do žluta v celém sloupci. Jedná se tedy o bakterie nefermentující. U kultur J10, J20 a RO avšak došlo ke zmodrání povrchu média, tzn., že došlo k mírné alkalizaci média, pravděpodobně uvolněním amoniaku. Kultura R4-P byla mírně žlutá na povrchu média, tzn., že využívá glukózu aerobně, ostatní kultury ji nevyužívají vůbec.

Test na katalasu a cytochromoxidasu

Test na katalasu kultur J10, J20, R4-P a RO byl slabě pozitivní, tzn., že po chvíli došlo k vytvoření bublinek kyslíku. Kultury tedy rozkládají 3% peroxid vodíku.

Při testu na cytochromoxidasu nedošlo u žádné z kultur ke zmodrání papírku. Výsledek byl tedy negativní.

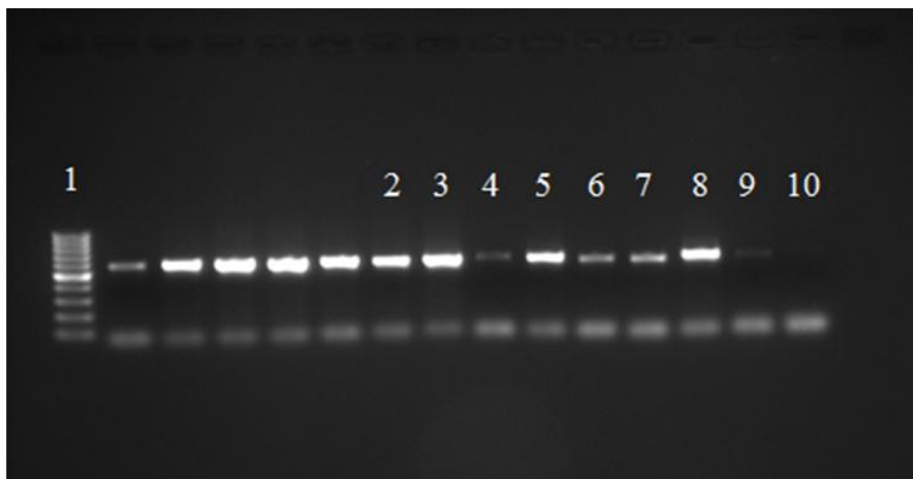
KOH test

U kultury Š byl proveden KOH test pro ověření grampozitivity dané kultury a bylo zjištěno, že účinkem 3% KOH nedochází k rozpouštění buněk a tím ani k uvolňování vlákna DNA. Kulturu tedy bylo nutno považovat za grampozitivní. Tímto byl opraven výsledek zjištěný v průběhu bakalářské práce [11], ve které byla kultura považována za gramnegativní.

7.1.6 Identifikace kultur pomocí PCR

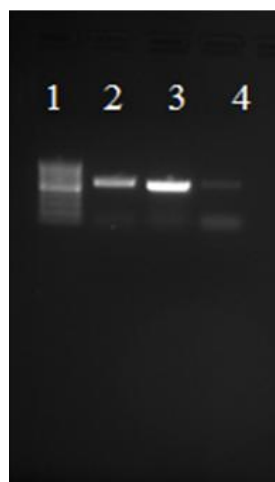
Identifikace kultur byla prováděna pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) s následnou sekvenací úseků genu pro 16S rRNA.

Nejdříve bylo potřeba izolovat DNA z bakterií jak grampozitivních, tak gramnegativních. DNA byla zachycena na membráně v kolonce, která byla dále promyta a eluována z membrány. Poté byla DNA připravena pro PCR podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.10. Po zmnožení určité části DNA proběhla kontrola PCR pomocí gelové elektroforézy na agarosovém gelu s přidávkem ethidium bromidu. Na obrázku 14 lze vidět proužky izolované a amplifikované DNA bakterií. V jamce číslo 1 byl nadávkován srovnávací standard (tzv. marker), který sloužil pro odhad velikosti fragmentů DNA. DNA z jednotlivých bakterií se nacházely v jamkách od čísel 2 do 9. Jamka číslo 10 sloužila jako negativní kontrola.



Obrázek 14 – Kontrola provedené PCR – první pokus, po separaci v agarosovém gelu (2 - kultura JF1, 3 - kultura JF1 neředěná, 4 - kultura Š, 5 - kultura MS1, 6 - kultura J10, 7 - kultura RO, 8 - kultura MS2, 9 - kultura J20)

Z obrázku 14 lze vidět, že u kultur Š a J20 nedošlo k vytvoření očekávaného proužku, proto byl celý postup izolace a purifikace jejich DNA i PCR opakován, s příznivým výsledkem, dokumentovaným na obrázku 15. U ostatních kultur byl úspěšný již první pokus. Předpokládaná délka amplifikované DNA byla kolem 500 bp.



Obrázek 15 – Kontrola provedené PCR – druhý pokus, po separaci v agarosovém gelu (1 - marker, 2 - kultura Š, 3 - kultura J20, 4 - negativní kontrola)

Získané amplifikované úseky 16S rDNA byly zaslány formou zakázky na externí pracoviště k sekvenaci. Získané sekvence po vyhodnocení jsou uvedeny v příloze II. Vlastní identifikace byla provedena použitím programu BLAST. Výsledky jsou shrnuty v následném Závěru.

7.1.7 Shrnutí vlastností jednotlivých kultur

Jednotlivé kultury se od sebe lišily různými vlastnostmi, proto tyto rozmanité vlastnosti, které byly získány, jak ve třech bakalářských pracích a této diplomové práci, byly shrnuty v tabulkách 39 a 40.

Tabulka 39 – Získané vlastnosti kultur JF1, Š, MS1 a MS2

Vlastnosti kultur	Kultura			
	JF1	Š	MS1	MS2
Růst během 2 dnů	ANO	NE	ANO	ANO
Rychlá degradace	NE	NE	ANO	ANO
Maximální růstová koncentrace NMP [g/l]	10	5	10	25
Teplotní rozmezí růstu [°C]	5 - 30	20 - 37	5 - 30	5 - 30
Růst při koncentracích NaCl [%]	0 - 10	0 - 3	0 - 3	0 - 6,5
Růst na GABA	NE	NE	ANO	ANO
Růst na NAP	NE	NE	NE	NE
Růst na 1-octyl-2-pyrrolidonu	NE	NE	NE	NE
Pohyblivost	NE	NE	ANO	ANO
Gramovo barvení	G ⁺ tyčky	G ⁺ koky	G ⁻ tyčky	G ⁻ tyčky
Oxidačně-fermentační test	Nefermentující	Nefermentující	Nefermentující	Nefermentující
Test na katalasu	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
Test na cytochromoxidasu	Negativní	Slabě pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
KOH test	---	Nehydrolyzuje	---	---

GABA ... Gamma-aminomáselná kyselina

NAP N-acetyl-L-fenylalanin

Tabulka 40 – Získané vlastnosti kultur J10, J20, RO a R4-P

Vlastnosti kultur	Kultura			
	J10	J20	RO	R4-P
Růst během 2 dnů	NE	NE	ANO	ANO
Rychlá degradace	NE	NE	ANO	ANO
Maximální růstová koncentrace NMP [g/l]	10	10	10	10
Teplotní rozmezí růstu [°C]	20 - 25	5 - 25	10 - 30	5 - 30
Růst při koncentracích NaCl [%]	0	0 – 0,5	0 – 0,5	0 - 3
Růst na GABA	ANO	ANO	ANO	ANO
Růst na NAP	NE	NE	NE	NE
Růst na 1-octyl-2-pyrrolidonu	NE	NE	NE	NE
Pohyblivost	ANO	ANO	ANO	ANO
Gramovo barvení	G ⁻ tyčky	G ⁻ tyčky	G ⁻ tyčky	G ⁻ tyčky
Oxidačně-fermentační test	Nefermentující	Nefermentující	Nefermentující	Nefermentující
Test na katalasu	Slabě pozitivní	Slabě pozitivní	Slabě pozitivní	Slabě pozitivní
Test na cytochromoxidasu	Negativní	Negativní	Negativní	Negativní
KOH test	---	---	---	---

GABA ... Gamma-aminomáselná kyselina

NAP N-acetyl-L-fenylalanin

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala jednak identifikací kultur izolovaných z předcházejících bakalářských prací a jednak byly kultury zkoumány z pohledu jejich biochemických, růstových a degradačních vlastností.

U všech kultur byla prokázána schopnost využívat N-methyl-2-pyrrolidon jako jediný zdroj uhlíku a energie. Všechny kultury byly schopné tuto látku rozkládat, jelikož spotřebovaly významnou míru tohoto organického substrátu (od 74,3 % do 96 % DOC), přičemž nejvýznamnější míra spotřebování DOC byla zjištěna u kultur J10, RO a R4-P.

Jednotlivé kultury se ve svých vlastnostech poměrně výrazně lišily. Některé byly schopny narůst na pevných živných médiích během 2 dnů (MS1, MS2, RO a R4-P), zatímco jiné vyžadovaly delší kultivaci, obzvláště kultura Š, u které bylo nutno provádět kultivaci minimálně po dobu 5 až 8 dnů. Většinou prokázaly rychle rostoucí kultury i rychlejší degradaci NMP v tekutém prostředí, neboť byly schopny dosáhnout podstatného snížení DOC během jednoho až pěti dnů, zatímco u pomaleji rostoucích kultur vyžadovala degradace 15 až 21 dnů. Kultura MS2 byla schopna růst při nejvyšší koncentraci NMP 25 g/l, většina dalších kultur rostla jen do koncentrace 10 g/l; pouze kultura Š byla schopna růst jen do koncentrace 5 g/l. Jednotlivé vlastnosti jsou shrnuty v přehledových tabulkách na stranách 54 a 55.

Další výsledky ukázaly, že kultury byly taxonomicky rovněž velmi rozmanité. Pomocí programu BLAST po sekvenaci 16S rDNA se podařilo identifikovat kultury na úrovni rodů i jednoho druhu a to takto:

- Kultura JF1 prokázala 99% shodu se šesti druhy rodu *Rhodococcus* (*R. cercidiphylli*, *R. cerastrii*, *R. fascians*, *R. kyotonensis*, *R. erythropolis* a *R. yunnanensis*)
- Kultura Š se shodovala na 97 % s druhy *Patulibacter ginsengiterrae*, *P. minatonensis* a *P. americanus*
- Kultura MS1 patří do druhu *Pseudomonas migulae*, a to se 100% shodou
- Kultura MS2 se shodovala na 99 % s druhy *Pseudomonas putida*, *P. oryzihabitans*, *P. plecoglossicida* a *P. flavescens*
- Kultura J10 vykazala 99% shodu s druhy *Mesorhizobium ciceri*, *M. loti*, *M. qingshengii* a *M. australicum*
- Kultura J20 vykazala 100% shodu s druhy *Mesorhizobium ciceri*, *M. loti* a *M. qingshengii*

- Kultura RO se shodovala na 99 % s druhy *Mesorhizobium amorphae*, *M. plurifarum*, *M. septentrionale* a *M. silamurunense*
- U kultury R4-P byla zjištěna 96% shoda s rody *Rhizobium* a *Agrobacterium*

Pro rozhodnutí definitivní druhové příslušnosti byly kultury zaslány na externí pracoviště (Česká sbírka mikroorganismů v Brně) na identifikaci systémem Biolog a dále je předpokládána identifikace metodou stanovení profilu mastných kyselin.

Práce provedené v rámci této DP zjistily vlastnosti bakterií vyskytující se v povrchových vodách, s degradačními účinky vůči NMP, a potvrdily tak výsledky získané ve všech předcházejících pracích na ÚIOŽP. Práce ukázala rodovou příslušnost těchto kultur, které jsou v povrchových vodách schopny zabezpečit rozklad této významné průmyslové sloučeniny.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *1-methyl-2-pyrrolidon* [online]. Pubchem. [cit. 2014-11-30]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-methyl-2-pyrrolidinone#section=Top>.
- [2] Bezpečnostní list PENTA. *N-methyl-2-pyrrolidon* [online]. [cit. 2014-11-26]. Dostupné z: http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/m/bezplist_640.pdf.
- [3] *N-METHYL-2-PYRROLIDONE* [online]. World Health Organization. [cit. 2014-11-30]. Dostupné z: <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad35.pdf>.
- [4] *Opinion on N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP)* [online]. EUROPEAN COMMISSION. [cit. 2014-12-27]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_050.pdf.
- [5] *Methylpyrrolidone* [online]. TOXNET DATABASE. [cit. 2015-1-12]. Dostupné z: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/872-50-4>.
- [6] *N-Methylpyrrolidone* [online]. United States Environmental Protection Agency. [cit. 2014-12-27]. Dostupné z: http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/TSCA_Workplan_Chemical_Risk_Assessment_of_NMP.pdf.
- [7] LAN, C.-H., C.-Y. PENG, and T.-S. LIN. Acute aquatic toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone to *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2004, vol. 73, p. 392-397. Dostupné z doi: 10.1007/s00128-004-0441-x.
- [8] *Pyrrolidine* [online]. PubChem. [cit. 2014-12-27]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pyrrolidine#section=Top>.
- [9] TRIGUI, M., S.PULVIN, P.POUPIN, and D.THOMAS. Biodegradation of cyclic amines by a *Pseudomonas* strain involves an amine mono-oxygenase. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 2003, vol. 49, no. 3, p. 181-188. Dostupné z doi: 10.1139/W03-025.
- [10] HEE-SUNG BAE, WAN-TAEK IM, YUICHI SUWA, JAMES M. LEE, SUNG-TAIK LEE and YOUNG-KEUN CHANG. Characterization of diverse heterocyclic amine-degrading denitrifying bacteria from various environments. *Archives of Microbiology* [online]. 2009, vol. 191, no. 4, p. 329-340. Dostupné z doi: 10.1007/s00203-008-0452-9.

- [11] FUSKOVÁ, Jana. *Mikrobiální degradace N-methyl-2-pyrrolidonu v povrchové stojaté vodě*. Zlín, 2013. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [12] SMĚLÍK, Michal. *Mikrobiální degradace N-methyl-2-pyrrolidonu v povrchové tekoucí vodě*. Zlín, 2014. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [13] ČERNOTOVÁ, Alena. *Biodegradace N-methyl-2-pyrrolidonu v pramenných vodách*. Zlín, 2014. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [14] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [15] Erba Lachema s.r.o. *NEFERMtest 24* [online]. [cit. 2015-4-19]. Dostupné z: <https://www.erbalachema.com/attachments/NEFERMtest%2024%20N-CZ+SK+EN+RU+PL.pdf>.
- [16] MO BIO Laboratories, Inc. *Power SoilTM DNA Isolation Kit*. Postup použití výrobku (isolační soupravy).
- [17] MARŠÁLKOVÁ, Kristýna. *Využití metody Real Time-PCR v detekci genů pro dekarboxylační enzymy u vybraných bakterií*. Zlín, 2014. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [18] MARTINKOVÁ, Martina. *Izolace mikroorganismů produkujících depolymerizační enzymy*. Zlín, 2013. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [19] VFU Brno. Fakulta veterinární hygieny a ekologie. *Gelová elektroforéza* [online]. [cit. 2015-4-29]. Dostupné z http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz.
- [20] BLAST. *Basic Local Alignment Search Tool* [online]. [cit. 2015-4-29]. Dostupné z <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2-HMSI	2-hydroxy-N-methylsukcinimid
5-HNMP	5-hydroxy-N-methyl-2-pyrrolidon
BcP	Bakalářská práce
bp	Páry bází (base pair)
C	Cytosin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOC	Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku
DP	Diplomová práce
EC ₅₀	Účinná (efektivní) koncentrace
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí USA
F	Forward primer (kódující)
G	Guanin
GABBA	Gamma-aminomáselná kyselina
GABA/ α -KG-AT	Kyselina γ -aminomáselná/ α -ketoglutarát aminotransferasa
IC ₅₀	Koncentrace působící 50% inhibici studovaného jevu
LC ₅₀	Koncentrace působící 50% úmrtnost
LD ₅₀	Dávka působící 50% úmrtnost

MM	Minerální médium
MPA	Masopeptonový agar
MSI	N-methylsukcinimid
NAP	N-acetyl-L-phenylalanin
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PCR	Polymerasová řetězová reakce
PYR-DH	Pyrrolidin dehydrogenasa
PYR-MO	Pyrrolidin monooxygenasa
R	Reverse primer
RNA	Ribonukleová kyselina
rpm	Otáčky za minutu (round per minute)
SSAL-DH	Sukcinát semialdehyd dehydrogenasa
TYA	Tryptone yeast extract agar
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Struktura NMP	12
Obrázek 2 – Metabolismus N-methyl-2-pyrrolidonu v lidském těle [4].....	14
Obrázek 3 – Struktura pyrrolidinu	15
Obrázek 4 – Navrhovaná dráha degradace pyrrolidinu pomocí bakterie <i>Pseudomonas putida</i> [9].....	15
Obrázek 5 – Navrhovaná dráha aerobní a anaerobní degradace pyrrolidinu [10]	17
Obrázek 6 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou JF1	40
Obrázek 7 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou Š	42
Obrázek 8 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou MS1	43
Obrázek 9 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou MS2.....	44
Obrázek 10 – Graf degradace 300 mg/l NMP 1. a 2. láhvi kulturou J10	46
Obrázek 11 – Graf degradace 300 mg/l NMP 1. a 2. láhvi kulturou J20	47
Obrázek 12 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou RO.....	48
Obrázek 13 – Graf degradace 300 mg/l NMP kulturou R4-P	49
Obrázek 14 – Kontrola provedené PCR – první pokus, po separaci v agarosovém gelu.....	53
Obrázek 15 – Kontrola provedené PCR – druhý pokus, po separaci v agarosovém gelu.....	53

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Souhrn nejdůležitějších fyzikálních a chemických vlastností NMP [2], [5].....	13
Tabulka 2 – Specifická aktivita enzymů zahrnutých v metabolismu pyrrolidinu za aerobních a denitrifikačních podmínek [10].....	16
Tabulka 3 – Složení směsi pro přípravu minerálního	23
Tabulka 4 – Složení zásobních roztoků solí	24
Tabulka 5 – Množství zásobních roztoků k přípravě minerálního.....	24
Tabulka 6 – Seznam použitých kultur z bakalářských prací	26
Tabulka 7 – Přídavek destilované vody do mikrotitrační destičky v μl	26
Tabulka 8 – Přídavek zásobního roztoku NMP o koncentraci 10 g/l a 100 g/l v μl	27
Tabulka 9 – Složení média pro oxidačně-fermentační test.....	30
Tabulka 10 – Složky pro přípravu reakční směsi pro amplifikaci	31
Tabulka 11 – Nastavení programu v termocykleru pro PCR	31
Tabulka 12 – Výsledky růstu kultur při koncentracích NMP od 0 – 50 g/l na konci pokusu získané při vizuálním odečtu.....	35
Tabulka 13 – Výsledky růstu kultur JF1, MS1 a MS2 při koncentracích NMP od 0 – 50 g/l na konci pokusu získané ze spektrofotometrického měření	36
Tabulka 14 – Výsledky růstu kultur J10, J20, RO a R4-P při koncentracích NMP od 0 – 50 g/l na konci pokusu získané ze spektrofotometrického měření	36
Tabulka 15 – Kultivace kultur při různých teplotách.....	37
Tabulka 16 – Nárůst kultur při zvýšených koncentracích NaCl	37
Tabulka 17 – Naměřené hodnoty absorbancí	38
Tabulka 18 – Mikroskopické pozorování pohyblivosti kultur.....	39
Tabulka 19 – Hodnoty DOC ve všech třech láhvích kultury JF1	40
Tabulka 20 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury JF1	40
Tabulka 21 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury Š	41
Tabulka 22 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury Š	41
Tabulka 23 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury MS1	42
Tabulka 24 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury MS1	43
Tabulka 25 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury MS2	44
Tabulka 26 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury MS2	44
Tabulka 27 – Hodnoty DOC v 1. a 2. láhvi kultury J10.....	45
Tabulka 28 – Hodnoty absorbancí v 1. a 2. láhvi kultury J10	45

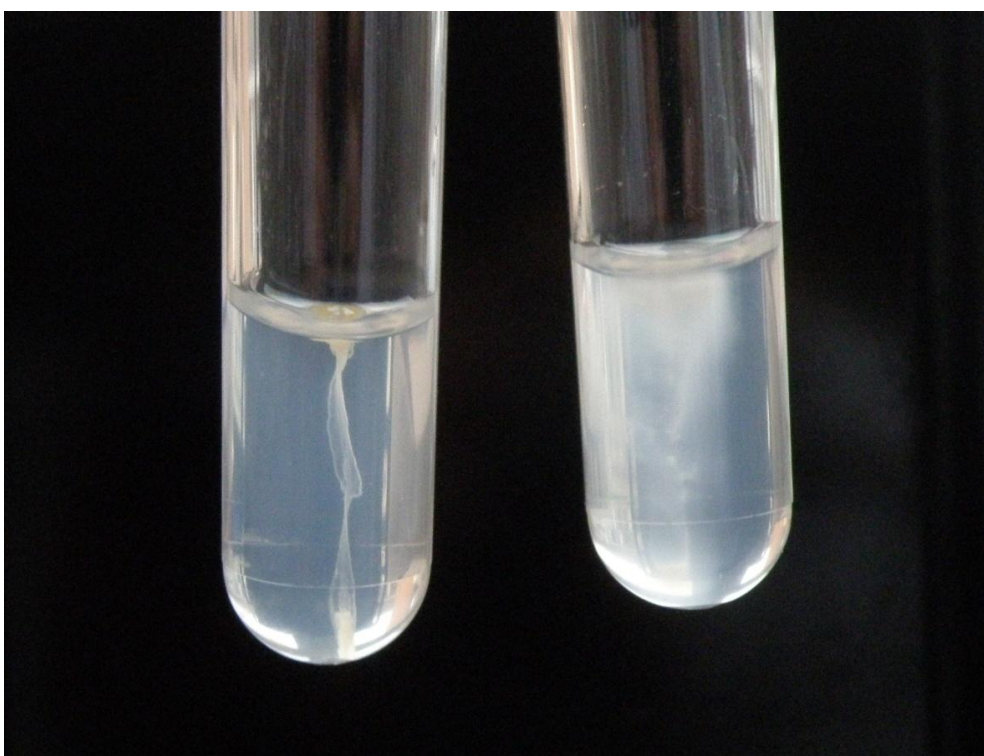
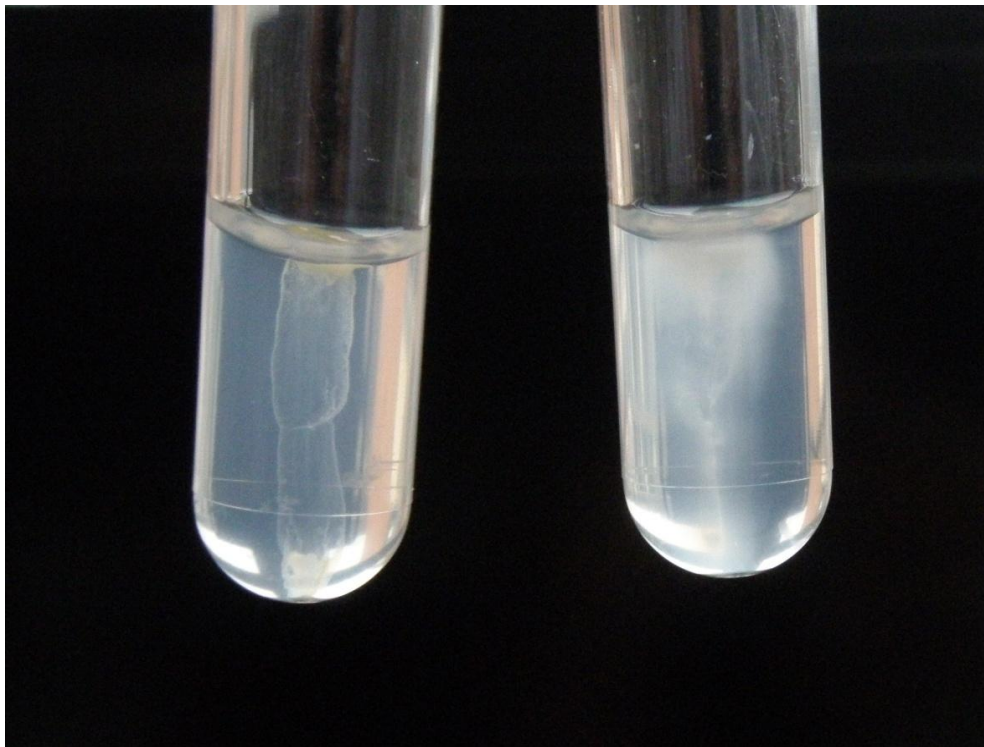
Tabulka 29 – Hodnoty DOC v 1. a 2. láhvi kultury J20.....	46
Tabulka 30 – Hodnoty absorbancí v 1. a 2. láhvi kultury J20	47
Tabulka 31 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury RO.....	48
Tabulka 32 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury RO	48
Tabulka 33 – Hodnoty DOC ve všech láhvích kultury R4-P	49
Tabulka 34 – Hodnoty absorbancí ve všech láhvích kultury R4-P.....	49
Tabulka 35 – NEFERMtest 24 pro kulturu J10	50
Tabulka 36 – NEFERMtest 24 pro kulturu J20	50
Tabulka 37 – NEFERMtest 24 pro kulturu RO	51
Tabulka 38 – NEFERMtest 24 pro kulturu R4-P.....	51
Tabulka 39 – Získané vlastnosti kultur JF1, Š, MS1 a MS2	54
Tabulka 40 – Získané vlastnosti kultur J10, J20, RO a R4-P.....	55

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I Vyhodnocení pohyblivosti kultur

Příloha P II Získané sekvence studovaných kultur (primer 907R)

PŘÍLOHA P I: VYHODNOCENÍ POHYBLIVOSTI KULTUR



Kultura JF1 bez rozbíhavého charakteru (oba obrázky vlevo) a kultura RO (oba obrázky vpravo) s rozbíhavým charakterem po provedeném vpichu a kultivaci

PŘÍLOHA P II: ZÍSKANÉ SEKvence STUDOVANÝCH KULTUR (PRIMER 907R)

Kultura JF1 (541 bp)

AGTCGTGTCTCGCAGGCGGGGCGCTTATGCGTTAGCTACGGCACAGATCCCGT
GGAAGGAACCCACACCTAGCGCCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT
CTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGTTCCCTCAGCGTCAGTTGTTTCCCAGAG
ACCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACAC
CAGGAATTCCAGTCTCCCCTGAAACTCAAGTCTGCCCCGTATCGCCTGCAAG
CCCGAAGTTGAGCCCCGGGTTTTACAAACGACGCGACAAACCGCCTACGAAC
TCTTTACGCCAGTAATTCCGGACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCT
GCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCACGCTTCG
TCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTC
GCTGCATCAGGCTTCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGGCACCCCGTA
GGAAA

Kultura Š (559 bp)

CAGGGCGTCTCGCAGGCGGGATACTTAATGCGTTAGCTTCGGCACGGAGGGAG
TTGACACCCCCACACCTAGTATCCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT
CTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGTCTCAGCGTCAGTAACGTTCCAGC
GAGCTGCCTTCGCCATAGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACA
CCAGGAATTCCACTCGCCCCTCCCGTACTCTAGCCGAGCAGTATCTGCCGCATC
CCAGGGTTGAGCCCTGGACTTTCACAGCAGACTTACTCAGCCGCCTACACGCG
CTTTACGCCCAATGATTCCGGACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTG
CTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGAAGGTACCGTCACTCCAATGAGCT
ATTAACCCGCGAAGCTTCGTCCCAACTGAAAGCGGTTTACAACCCTAAGGCCT
TCTTCCCGCACGCGGCGTTGCTGCATCACGCTTTCGCGCATTGTGCAAGATTCC
CCACTGCTGCACCCGTAGGGAG

Kultura MS1 (562 bp)

AAATGGCTCTACGAGGCGGTCACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTC
AAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATC
TAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGT
GGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACAC
AGGAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTTGTTCAGTTTTGAATGCAGTT
CCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTAACAAACCACCTACGCGCG
CTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTG
CTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTCGGTAACGTCAAGACAGCAACG
TATTAGGTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCT
TCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCC
CCACTGCTGGTCCCCGGTAGGGAGAA

Kultura MS2 (562 bp)

AGTGGGCTCTACGAGGCGGTCACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTC
AAGGATTCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATC
TAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGT
GGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACAC
AGGAAATTCCACCACCCTCTACTGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTT
CCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTAACAAACCACCTACGCGCG
CTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTG
CTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTCGGTAACGTCAAACAGCAAGG
TATTCGCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCT
TCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCC
CCACTGCTGGTCCCCCGTAAGAGAGT

Kultura J10 (532 bp)

GAATTATCTGTATAGACGGAGAGCTTATGCGTTAGCTGCGCCACCGACAAGTA
AACTTGCCGACGGCTAGCTCTCATAGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTACCGAGCCAGTGA
GCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACT
CGGAATTCCACTCACCTCTCTCGGACTCGAGATTGCCAGTATTAAAGGCAGTTC
CAGGGTTGAGCCCTGGGATTTACCCCTAACTTAACAATCCGCCTACGTGCGCT
TTACGCCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTACGGTTACCGTCATTATCTTCACCGTT
GAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATC
AGGCTTTCGCCCATTTGTCCAATATTCCCCACTGCTCTCCCCCGTAGGAA

Kultura J20 (532 bp)

TATGCGTCTCGAGGCGGAGAGCTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCGACAAGTAA
ACTTGCCGACGGCTAGCTCTCATAGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTACCGAGCCAGTGAG
CCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTC
GGAATTCCACTCACCTCTCTCGGACTCGAGATTGCCAGTATTAAAGGCAGTTC
AGGGTTGAGCCCTGGGATTTACCCCTAACTTAACAATCCGCCTACGTGCGCTT
TACGCCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTACGGTTACCGTCATTATCTTCACCGTTG
AAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATCA
GGCTTTCGCCCATTTGTCCAATATTCCCCACTGCTAAATCCAGTAAGGAA

Kultura RO (532 bp)

AAATTATCTCTATCAGGCGGGAGCTTATGCGTTAGCTGCGCCACCGACAAGTA
AACTTGCCAACGGCTAGCTTCCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTACCGGACCAGTGAG
CCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACTC
GGAATTCACCTCACCTCTTCCGGACTCGAGATACCCAGTATCAAAGGCAGTTC
CGGGGTTGAGCCCCGGGATTTACCCCTGACTTAAGTATCCGCCTACGTGCGCT
TTACGCCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTACGGTTACCGTCATTATCTTCACCGTT
GAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATC
AGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCGCCACTGCTCTTCCCCCGTAGGA

Kultura R4-P (520 bp)

AGGCGGATGTTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCGAACAGTATACTGCCCCGACGG
CTAACATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTAATGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCA
CTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACTCAGGAATTCACCTT
ACCTCTTCATACTCAAGATACCCAGTATCAAAGGCAGTTCCAGAGTTGAGCT
CTGGGATTTACCCCTGACTTAAATATCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCCAGTA
ATTCCGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAATT
AGCCAGGGCTTCTCTGCAGATACCGGCCTTAACCTCTCCAGGTAAACAACCTT
TCAAACCCTAGGGCGTTGGCCCTCCTACCGCATTGGCGGTTCCGCGTGGGGAC
CACTGGCCCAAATTCACACTTGATGGAATTTGAGAGGA