Biodegradabilita sloučenin využívaných k ochraně a úpravě materiálů

Ing. Markéta Měrková, Ph.D.

Teze disertační práce

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Teze dizertační práce

Biodegradabilita sloučenin využívaných k ochraně a úpravě materiálů

Biodegradability of compounds applied for materials protection and modification

Autor: **Ing. Markéta Měrková**

Studijní program: Chemie a technologie materiálů (P2808)

Studijní obor: Chemie a technologie materiálů (2808V009)

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

Oponenti: prof. RNDr. Kateřina Malachová, CSc.
prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
doc. RNDr. Miroslav Němec, CSc.

Zlín, květen 2018

© Markéta Měrková

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary.**
Publikace byla vydána v roce 2018.

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

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

Plná verze dizertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7454-738-6

ABSTRAKT

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

OBSAH

ABSTRAKT ... 3
ABSTRACT ... 4
OBSAH ... 5
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY ... 6
1.1 Biodegradabilita vybraných syntetických vysokomolekulárních látek ... 6
1.1.1 Poly(vinylalkohol) ... 6
1.1.2 Poly(vinylpyrrolidon) ... 8
1.2 Biodegradace vybraných syntetických nízkomolekulárních sloučenin ... 9
1.2.1 2-ethylhexylsalicylát ... 9
1.2.2 2-ethylhexanol ... 10
1.2.3 Kokamidopropylbetain ... 12
1.3 Souhrn chybějících poznatků k biodegradabilitě zkoumaných látek ... 13
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE ... 14
3. MATERIÁL A METODIKA ... 15
3.1 Použitý biologický materiál ... 15
3.2 Významné chemikálie ... 15
3.3 Metodika ... 15
4. VÝSLEDKY A DISKUZE ... 17
4.1 Biodegradabilita poly(vinylalkoholu) ... 17
4.2 Biodegradabilita poly(vinylpyrrolidonu) ... 19
4.3 Studium bakteriálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylátu ... 20
4.3.1 Růst kultury *Rhodococcus* sp. ES 12 na jednotlivých strukturních částech molekuly 2-ethylhexylsalicylátu ... 20
4.3.2 Rozklad ekvimolárních koncentrací 2-ethylhexylsalicylátu a jeho strukturních částí kulturou *Rhodococcus* sp. ES 12 ... 21
4.3.3 Růst kultury *Rhodococcus* sp. ES 12 na 2-ethylhexanolu a předpokládaných meziproduktech jeho rozkladu ... 22
4.4 Studium bakteriálního rozkladu 2-ethylhexanolu ... 23
4.4.1 Růst kultury *Pseudomonas* sp. P na předpokládaných meziproduktech rozkladu 2-ethylhexanolu ... 24
4.5 Biodegradabilita kokamidopropylbetainu ... 25
4.5.1 Růstové vlastnosti kultur *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM spojené s rozkladem kokamidopropylbetainu ... 25
5. ZÁVĚR ... 30
6. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI ... 31
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ... 32
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK ... 42
9. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ ... 43
10. CURRICULUM VITAE ... 44
11. SEZNAM PUBLIKACÍ ... 45

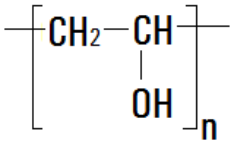
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

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

1.1 Biodegradabilita vybraných syntetických vysokomolekulárních látek

1.1.1 Poly(vinylalkohol)

Poly(vinylalkohol) (PVA) je ve vodě rozpustný syntetický polymer, v pevném stavu bílý až krémový prášek krystalického charakteru (Ducháček, 2006). Jeho chemická struktura je znázorněna na *Obr. 1.1*.



Obr. 1.1: Chemická struktura PVA (DeMerlis a Schoneker,2003)

Poly(vinylalkohol) je vyráběn hydrolýzou poly(vinylacetátu) (Ducháček, 2006). Je hojně využíván při výrobě papíru, dále v textilním, chemickém či kosmetickém průmyslu (DeMerlis a Schoneker, 2003).

Z informací dostupných v literatuře (Sanders a Matthews, 1990; DeMerlis a Schoneker, 2003) pak vyplývá, že toxicita PVA je poměrně nízká. Dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek (NOAEL) je 5000 mg/kg/den (Kelly *et al.*, 2003).

Biodegradace PVA

V důsledku jeho stále se zvyšující produkce je mikrobiální rozklad PVA dlouhodobě předmětem výzkumu. Byla popsána již řada mikroorganismů schopných jeho biodegradace, zahrnující jak gramnegativní, tak grampozitivní bakterie, a také některé druhy mikroskopických vláknitých hub. Bakterie schopné rozkladu PVA jsou zástupci rodů *Achromobacter* (Lee a Kim, 2003), *Alcaligenes* (Matsumara *et al.*, 1994), *Bacillus* (Mori *et al.*, 1996), *Brevibacillus* (Lim a Park, 2001; Kim a Yoon, 2010), *Geobacillus* (Kim a Yoon, 2010), *Janthinobacterium* (Du *et al.*, 2007), *Microbacterium* a *Paenibacillus* (Choi *et al.*, 2004), *Novosphingobium* (Rong *et al.*, 2009), *Povalibacter* (Nogi *et al.*,

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

Díky izolaci tak značného množství kultur degradérů PVA je poměrně dobře znám i mechanismus jeho aerobního mikrobiálního rozkladu. Ten probíhá ve dvou krocích, kdy v prvním z nich dochází k oxidaci jedné nebo dvou sousedních hydroxylových skupin. Oxidace jedné hydroxylové skupiny má za následek vytvoření monoketonové struktury, kdežto oxidace dvou sousedních skupin vede k tvorbě β-diketonové struktury. V této fázi rozkladu se uplatňují dva typy enzymů, a to PVA-oxidáza nebo PVA-dehydrogenáza (Kawai a Hu, 2009). Všechny doposud popsané PVA-dehydrogenázy (Kawai a Hu, 2009) jsou závislé na přítomnosti pyrrolochinolin chinonu (PQQ). Ten je nekovalentně vázanou prostetickou skupinou řady chinoproteinů a je tvořen kyselinou glutamovou a tyrosinem. Schopností jeho tvorby disponují některé kmeny gramnegativních bakterií, např. *Acinetobacter* (Duine *et al.,* 1979), *Pseudomonas* (Sakazawa *et al.,* 1981) či *Cardiobacterium* (Lee a Kim, 2003).

Podle produktů vzniklých v prvním kroku rozkladu PVA probíhají reakce v kroku druhém. V této fázi podléhá oxidovaný PVA buď aldolázové reakci (u monoketonové struktury), nebo hydrolýze (u β-diketonové struktury). Hydrolýza je katalyzována β-diketonhydrolázou (BDH), a jelikož je délka uhlíkového řetězce na každé straně diketonu různá, dochází při ní na kratší straně k produkci methylketonu a na delší k tvorbě karboxylové kyseliny. Vzniklé karboxylové kyseliny jsou poté v buňkách obvykle dále metabolizovány pomocí β-oxidace mastných kyselin a v cyklu trikarboxylových kyselin. Další enzym, který katalyzuje druhou fázi rozkladu, izoloval Klomklang *et al*. (2005) a jedná se o hydrolázu oxidovaného poly(vinylalkoholu) (OPH); působení tohoto enzymu je velmi podobné účinkům BDH.

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

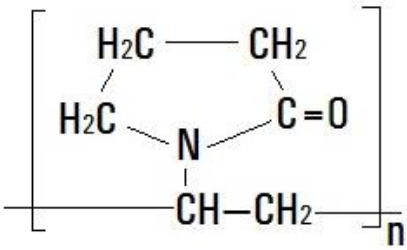
Vlivu dalších environmentálních faktorů, jako například přítomnosti či koncentraci různých nutrientů, na mikrobiální degradaci poly(vinylalkoholu) se věnuje relativně malé množství prací. Vlivu přítomnosti různého zdroje dusíku na rozklad PVA symbiotickou dvojicí kultur SA2

a S*phingomonas* sp. SA3 se věnovali Kim *et al.* (2003); jako nejvhodnější zdroj dusíku byly zjištěny amonné soli. Také Chen *et al.* (2007) sledovali vliv přítomnosti různého zdroje dusíku na rozklad PVA smíšenou kulturou mikroorganismů s převažujícím zastoupením rodů *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* a *Paenibacillus*. Výsledkem práce bylo zjištění, že pro růst a biodegradaci PVA touto smíšenou kulturou mikroorganismů je vhodnější přítomnost anorganického zdroje dusíku než organického. Naopak Du *et al.* (2007), kteří zkoumali rozklad PVA kulturou *Janthinobacterium* sp., pozorovali pravý opak, tedy vyšší nárůst biomasy i enzymovou aktivitu v přítomnosti organického zdroje dusíku.

Některé další podmínky, ovlivňující rozklad PVA smíšenou kulturou tvořenou bakteriemi rodu *Bacillus* a *Curtobacterium*, byly sledovány ve studii Zhanga *et al.* (2009). Bylo zjištěno, že optimální pH pro degradaci PVA je 8, a taktéž bylo zjištěno, že pozitivně lze ovlivnit průběh biodegradace přidáním malého množství vhodného organického substrátu, a že i poměr uhlíku k dusíku může významně ovlivnit výslednou míru procesu.

1.1.2 Poly(vinylpyrrolidon)

Poly(vinylpyrrolidon) (PVP), označovaný také jako Kollidon, Povidon, Polyvidon či poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidon), je ve vodě rozpustný syntetický polymer. Chemická struktura PVP je znázorněna na *Obr. 1.2*. V pevném stavu je to bílý či nažloutlý prášek, s částicemi různé velikosti (Robinson, 1990; Bühler *et al.*, 2005).



Obr. 1.2: Chemická struktura PVP (Robinson, 1990)

Výroba PVP spočívá v polymeraci *N*-vinyl-2-pyrrolidonu (Robinson, 1990). Poly(vinylpyrrolidon) pak nachází uplatnění především ve farmaceutickém průmyslu, kde se používá jako pojivo do tablet a přípravků s řízeným uvolňováním. Je využíván také v potravinářském či kosmetickém průmyslu, také jako stabilizátor při polymeraci a ve fotografickém průmyslu; přidává se i do barviv či inkoustů. Z dostupných informací pak vyplývá, že PVP je látka s velmi nepatrnou toxicitou (Robinson, 1990). Dávka NOAEL byla stanovena na 5 g/kg/den.

Biodegradace PVP

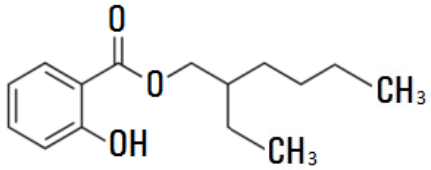
Biologická rozložitelnost PVP byla zkoumána v rámci několika studií (Trimpin *et al.*, 2001, Julinová *et al.*, 2012, Julinová *et al.*, 2013), jejichž výsledky naznačují, že polymer je biologicky nerozložitelný, či jen nepatrně rozložitelný.

Trimpin *et al.* (2001) sledovali biologickou rozložitelnost PVP v reaktoru s pevným ložem, promývaném říční vodou s PVP. Po 30 dnech nebyla pozorována žádná oxidace koncových skupin PVP, ani rozdíl v počtu opakujících se jednotek. Ve studii Julinové *et al.* (2012), věnované možnosti odstranění PVP z odpadních vod, byla potenciální biodegradace testována v pěti různých druzích aktivovaného kalu. Na rozdíl od ostatních druhů kalů, byl v testu s kalem vznikajícím při výrobě penicilinu v kombinaci s přídavkem odpadního mycelia pozorován nárůst produkce oxidu uhličitého cca o 10 %. V rámci práce byly jednotlivé kaly dále aklimatizovány v přítomnosti *N*-methyl-2-pyrrolidonu, a použity do testů biodegradace PVP. I zde bylo dosaženo mírně pozitivních výsledků, a to degradace 8 – 14 % PVP během 350 hodin. V navazující studii Julinové *et al.* (2013) byl poté sledován rozklad PVP aktivovaným kalem v přítomnosti různých induktorů biodegradace: akrylamidu, *N*-acetylfenylalaninu a *N*-methyl-2-pyrrolidonu. Ačkoliv v případě samotného PVP biodegradace pozorována nebyla, při přídavku akrylamidu byl pozorován úbytek PVP přibližně 20 %. Z výsledků práce tak vyplývá, že částečný mikrobiální rozklad PVP může být podpořen přítomností některých dalších látek.

1.2 Biodegradace vybraných syntetických nízkomolekulárních sloučenin

1.2.1 2-ethylhexylsalicylát

2-ethylhexylsalicylát (EHS), nebo také ethylhexyl salicylát či oktylsalicylát, je bezbarvá kapalina charakteristického zápachu. Dle Lapczynski *et al.* (2007) je prakticky nerozpustný ve vodě (0,7171 mg/l), molární hmotnost je 250,34 g/mol, hustota 1,014 g/cm^3. Chemická struktura je znázorněna na *Obr. 1.3*.



Obr. 1.3: Chemická struktura 2-ethylhexylsalicylátu (Lapczycnski et al., 2007)

Výroba 2-ethylhexylsalicylátu spočívá v azeotropní esterifikaci 2-ethylhexanolu a kyseliny salicylové. Hlavní využití pak EHS nachází v ochranných prostředcích proti slunečnímu záření, tj. v opalovacích krémech a dalších prostředcích osobní péče, kde slouží jako organický UV filtr (Andersen,

2003; Lapczynski *et al.*, 2007). Je používán také jako vonná přísada v dekorativní kosmetice, lze jej nalézt i v domácích čisticích prostředcích. Jeho množství v těchto přípravcích je pak obvykle od 0,001 do 5 % (Andersen, 2003). Ze studií Výzkumného ústavu pro vonné materiály (Lapczynski *et al.*, 2007) vyplývá, že působením EHS nedochází k významnému podráždění kůže, pouze v některých případech může EHS způsobit mírné zarudnutí. Dávka NOAEL nebyla pro EHS stanovena, pravděpodobně však přesahuje hodnotu 250 mg/kg/den (EU, 2000).

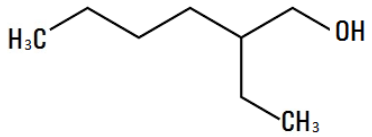
Biodegradace 2-ethylhexylsalicylátu

Produkce a spotřeba prostředků osobní péče obsahujících UV filtry za poslední desetiletí díky zvyšujícímu se veřejnému povědomí o škodlivých účincích UV záření značně stoupá (Ramos *et al.*, 2016). Výskyt organických UV filtrů včetně EHS byl zjištěn v různých vzorcích vodního prostředí (Ramos *et al.*, 2016). Díky lipofilní povaze (log K_{OW} = 5,97) může u EHS docházet v jisté míře i k jeho adsorpci na sedimenty a částice aktivovaného kalu (Rodil *et al.*, 2009; Negreira *et al.*, 2011; Sanchéz-Brunete *et al.*, 2011; Benedé *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2015).

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

1.2.2 2-ethylhexanol

2-ethylhexanol (EHOL) je bezbarvá, mírně olejovitá kapalina aromatického zápachu. Jeho rozpustnost ve vodě je omezená a údaje o ní se liší; Amidon *et al.* (1974) uvádí rozpustnost ve vodě při 25 °C 880 mg/l, McGinty *et al.* (2010) pak 1379 mg/l. Molární hmotnost je 130,23 g/mol, hustota 0,833 g/cm^3. Chemická struktura je znázorněna na *Obr. 1.4*.



Obr. 1.4: Chemická struktura 2-ethylhexanolu (Wyatt et al., 1987)

Výroba EHOLu je vícestupňový proces, jehož první krok spočívá v hydroformylaci propenu (Kessen *et al.,* 1987). Hlavní využití 2-ethylhexanol nachází především při výrobě změkčovadel di-2-ethylhexylftalátu a di-2-ethylhexyladipátu a mnoha dalších chemikálií (Astill *et al.,* 1996a; Chenier, 2012). Je také používán jako vonná přísada v řadě přípravků, od dekorativní kosmetiky, až po domácí čisticí prostředky a detergenty (Nalli *et al.,* 2002, McGinty *et al.,* 2010).

Dávka NOAEL byla stanovena na 125 mg/kg/den (Astill *et al.,* 1996b) a kromě toxicity ve studiích na zvířatech byla potvrzena toxicita EHOLu také pro řadu vodních živočichů a mikroorganismů. Ve studii Nalliho *et al.* (2002) byla toxicita 2-ethylhexanolu a kyseliny 2-ethylhexanové, vznikající při rozkladu některých změkčovadel, sledována pomocí testu Microtox. I v rámci další studie (Horn *et al.,* 2004) byla sledována toxicita těchto dvou metabolitů pro některé vodní organismy, a to pro střevle, pstruhy duhové a dafnie. Byly stanovovány hodnoty inhibiční koncentrace IC_{25} pro střevle a letální koncentrace LC_{50} pro pstruhy a dafnie. Výsledky těchto dvou studií jsou shrnuty v *Tab. 1.1*.

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

Sledovaná látka	Microtox EC_{50} (mg/l)	Střevle IC_{25} (mg/l)	Pstruh duhový LC_{50} (mg/l)	Dafnie LC_{50} (mg/l)
2-ethylhexanol	7,8	>15	27	100
Kyselina 2-ethylhexanová	43	23,0	150	120

Biodegradace 2-ethylhexanolu

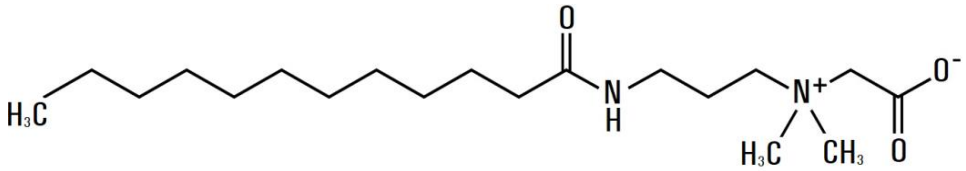
Díky svému využití pro výrobu řady průmyslově využívaných látek, včetně změkčovadel, se EHOL dostává do životního prostředí. Biologickému rozkladu EHOLu se věnovali Wyatt *et al.* (1987). V rámci této studie se z jezerní vody podařilo izolovat kulturu se schopností utilizace EHOLu jako jediného zdroje uhlíku a energie. Tuto kulturu se následně podařilo identifikovat jako zástupce rodu *Pseudomonas*, blízkého druhu *Pseudomonas putida*, a byl studován mechanismus rozkladu EHOLu touto kulturou. Počátek degradace EHOLu je pravděpodobně katalyzován pomocí alkohol- a aldehyddehydrogenáz, jejichž

působením dochází ke vzniku kyseliny 2-ethylhexanové; ta je dále metabolizována (Wyatt *et al.,* 1987).

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

1.2.3 Kokamidopropylbetain

Kokamidopropylbetain (CAPB) je čirá až světle žlutá kapalina, která je rozpustná ve vodě, přičemž rozpustnost ve vodě při 25 °C se uvádí 2 g/10ml (Burnett *et al.,* 2012). Jeho chemická struktura je obvykle odvozena od kokosového oleje a dimethylaminopropylaminu. Převládající mastnou kyselinou v kokosovém oleji je kyselina laurová (C12); struktura lauramidopropylbetainu je uvedena na *Obr. 1.5* (Worthen *et al.,* 2014).



Obr. 1.5: Chemická struktura lauramidopropylbetainu (Worthen et al., 2014)

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

CAPB je díky svým výhodným vlastnostem hojně využíván ponejvíce v kosmetických prostředcích a prostředcích osobní péče (Burnett *et al.,* 2012). Z dostupných informací vyplývá, že kokamidopropylbetain je látka s poměrně nízkou toxicitou. Dávka NOAEL pro systémovou toxicitu 30% roztoku CAPB byla stanovena na 1000 mg/kg/den (HERA, 2005).

Biodegradace CAPB

Osudem kokamidopropylbetainu v životním prostředí se zabývalo již několik vědeckých studií, přičemž všichni autoři dokumentovali relativně rychlou degradaci CAPB v různých mikrobiálních společenstvech (Eichhorn a Knepper, 2001; Sun *et al.,* 2004; Vonlanthen *et al.,* 2011; Gheorghe *et al.*; 2012, Zhou *et al.,* 2017).

Většina studií se zabývala pouze primární biodegradací CAPB; například Eichhorn a Knepper (2001) ji sledovali v laboratorním bioreaktoru s pevným

ložem a s říční vodou jako inokulem. Po 48 hodinách došlo k degradaci více než 95 % CAPB, jeho vstupní koncentrace však činila pouze 10 mg/l. Naopak Sun *et al.* (2004) sledovali primární degradaci 100 mg/l CAPB v mořské vodě; bylo zjištěno, že po 120 hodinách inkubace při 20 °C došlo k rozkladu více než 80 % přítomného kokamidopropylbetainu, přičemž míra degradace rostla s teplotou. Primární biodegradaci CAPB v zahuštěném aktivovaném kalu sledovali Zhou *et al.* (2017).

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

1.3 Souhrn chybějících poznatků k biodegradabilitě zkoumaných látek

Tato práce se věnuje studiu bakteriálního rozkladu vybraných syntetických vysokomolekulárních a nízkomolekulárních látek. Tyto látky jsou široce využívány v řadě průmyslových odvětví, jejich biodegradability a hlavně znalosti o nich jsou však značně odlišné.

Poly(vinylalkohol) je polymer, jehož biodegradabilita byla potvrzena již řadou studií; některým aspektům, jako je vliv různých environmentálních faktorů ovlivňujících jeho rozklad konkrétními kulturami, doposud nebyla věnována dostatečná pozornost. Naproti tomu biodegradabilita poly(vinylpyrrolidonu) je značně omezená a doposud nebyl izolován mikroorganismus schopný ani částečného rozkladu tohoto polymeru.

O biologické rozložitelnosti studovaných nízkomolekulárních sloučenin je ve vědecké literatuře dostupné pouze velmi omezené množství informací. V případě 2-ethylhexylsalicylátu se současná vědecká literatura zaměřuje především na vývoj analytických metod schopných detekce jeho velmi nízkých koncentrací, doposud však nebyly izolovány ani studovány žádné konkrétní mikroorganismy schopné jeho utilizace.

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

Také v případě poslední sledované látky, kokamidopropylbetainu, nebyly ve vědecké literatuře nalezeny žádné zmínky o konkrétních mikrobiálních zástupcích, odpovídajících za degradaci této látky.

Je tedy zřejmé, že problematika mikrobiální degradace každé z uvedených látek je vždy jedinečným problémem a studium tak musí být zaměřeno na poněkud jiný aspekt těchto procesů.

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

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

Dílčí cíle dizertační práce byly následovné:

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

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Použitý biologický materiál

Konsorcium KOKK: získáno v práci Křížka, rozklad 1-oktyl-2-pyrrolidonu.
Kultura *Sphingomonas* sp. JK2: izolována z ČOV Zlín (Václavková, 2006).
Kultura *Sphingomonas* sp. OT2: izolována z ČOV Otrokovice (Riedl, 2004).
Kultura *Pseudomonas* sp. P: izolována ČOV Zlín v rámci této práce.
Kultura *Rhodococcus* sp. ES 12: izolována z ČOV Zlín (Jelénková, 2016).
Kultura *Pseudomonas* sp. FV: izolována z ČOV Zlín (Ringlová, 2015).
Kultura *Rhizobium* sp. FM: izolována z ČOV Zlín (Ringlová, 2015).

3.2 Významné chemikálie

Poly(vinylalkohol): obchodní označení MOWIOL 5 – 88, výrobce firma Clariant, SRN. První číslo značí viskozitu 4% vodného roztoku PVA při 20 °C, která je 5 mPa.s. Druhé číslo značí stupeň hydrolýzy – 88 mol%.

Poly(vinylpyrrolidon): obchodní označení Poly(vinylpyrrolidon) K 15, výrobce firma Fluka.

Kokamidopropylbetain: dodán firmou Enaspol (Česká republika) ve formě 30% roztoku, obsahujícího přibližně 5 % NaCl, pod názvem Flavol KDA. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin (v %): k. laurová 44 – 51, k. myristová 13 – 18, k. palmitová 7 – 10, k. kaprylová 5 – 9, k. olejová 5 – 8, k. kaprinová 4 – 10, k. stearová 1 – 4 a k. linoleová 1 – 3 (údaje fy. Enaspol).

3.3 Metodika

Biodegradační testy

Biodegradační testy byly prováděny za aerobních podmínek v tekutém prostředí minerálního média, za přídavku testované látky. Odpovídající množství čisté kultury bakterií nebo kalového inokula bylo očkováno ve formě suspense, v případě potřeby byl přidán PQQ či vitaminy. Průběh biodegradace byl sledován ve zvolených časových intervalech a odebrané vzorky byly dále analyzovány.

Spektrofotometrické stanovení koncentrace poly(vinylalkoholu)

Spektrofotometrické stanovení koncentrace PVA bylo prováděno metodou v mikrotitračních destičkách, kdy byl do jednotlivých jamek sloupců destičky dávkován supernatant centrifugovaných vzorků. Absorbance komplexu vzniklého po reakci PVA ve vzorku s jodidem draselným v přítomnosti kyseliny borité byla měřena při vlnové délce 660 nm. Výsledná koncentrace PVA byla vypočtena z rovnice kalibrační přímky, získané měřením předem připravených roztoků PVA o určitých koncentracích.

Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC)

Před tímto stanovením byla nejdříve z odebraných vzorků odstraněna biomasa buněk, získaný supernatant byl dále naředěn podle předpokládané koncentrace substrátu a analyzován na analyzátoru uhlíku Shimadzu.

Měření zákalu degradačních suspenzí OD_{600}

Jako ukazatel růstu mikroorganismů byl v průběhu degradace sledován vznikající zákal pomocí dvou-paprskového spektrofotometru Unicam při vlnové délce 600 nm.

Stanovení počtu buněk

V rámci některých pokusů probíhalo stanovování počtu buněk, a to buď přímo, počítáním jednotlivých buněk v počítacích komůrkách Cyrus II pomocí mikroskopu Olympus CX 41, nebo nepřímo plotnovou metodou.

Stanovení koncentrace 2-ethylhexanolu pomocí SPE-GC

Extrakce EHOLu z vodných vzorků a jeho případné zakoncentrování bylo docíleno metodou extrakce na pevnou fázi (SPE – solid phase extraction), pomocí aparatury VacMaster™ 10 a SPE kolonek Isolute C18 (100 mg/3 ml, Biotage); jako eluční činidlo byl používán hexan. Koncentrace získaného analytu byla následně stanovena pomocí plynového chromatografu (GC), vybaveného kapilární kolonou HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm film) a plamenově ionizačním detektorem.

Získání čistých degradačních kultur

Izolace čistých degradačních kultur probíhala z tekutého média s aktivovaným kalem, adaptovaným na daný substrát. Po adaptaci byla část suspenze šetrně protřepána a sériově ředěna fyziologickým roztokem. Vybraná ředění pak byla očkována do čerstvého sterilního MM s vitaminy a substrátem o stejné vstupní koncentraci. Takto připravené lahve byly kultivovány a následně byly suspenze vyočkovány křížovým roztěrem na TYA nebo R2A agar. Jednotlivé, morfologicky se lišící kolonie, byly postupně přeočkovány a získané čisté kultury byly ověřeny na schopnost rozkladu; aktivní kmeny byly zakonzervovány v glycerolu při -80 ºC.

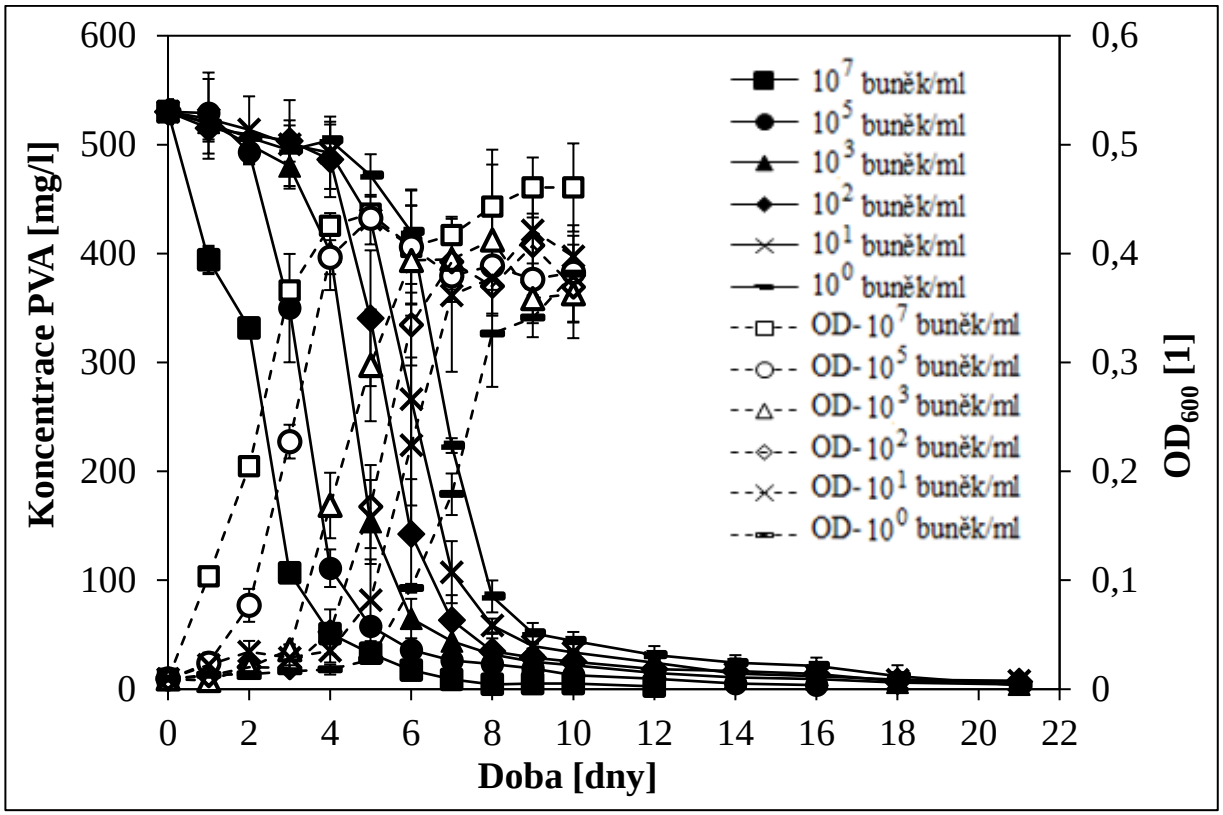
Studium vlastností získaných degradačních kultur

U vybraných získaných čistých bakteriálních kultur byl sledován růst v závislosti na koncentraci vybraného substrátu, využívání různých substrátů, pH, teplotě, koncentraci NaCl, či v denitrifikačním testu.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

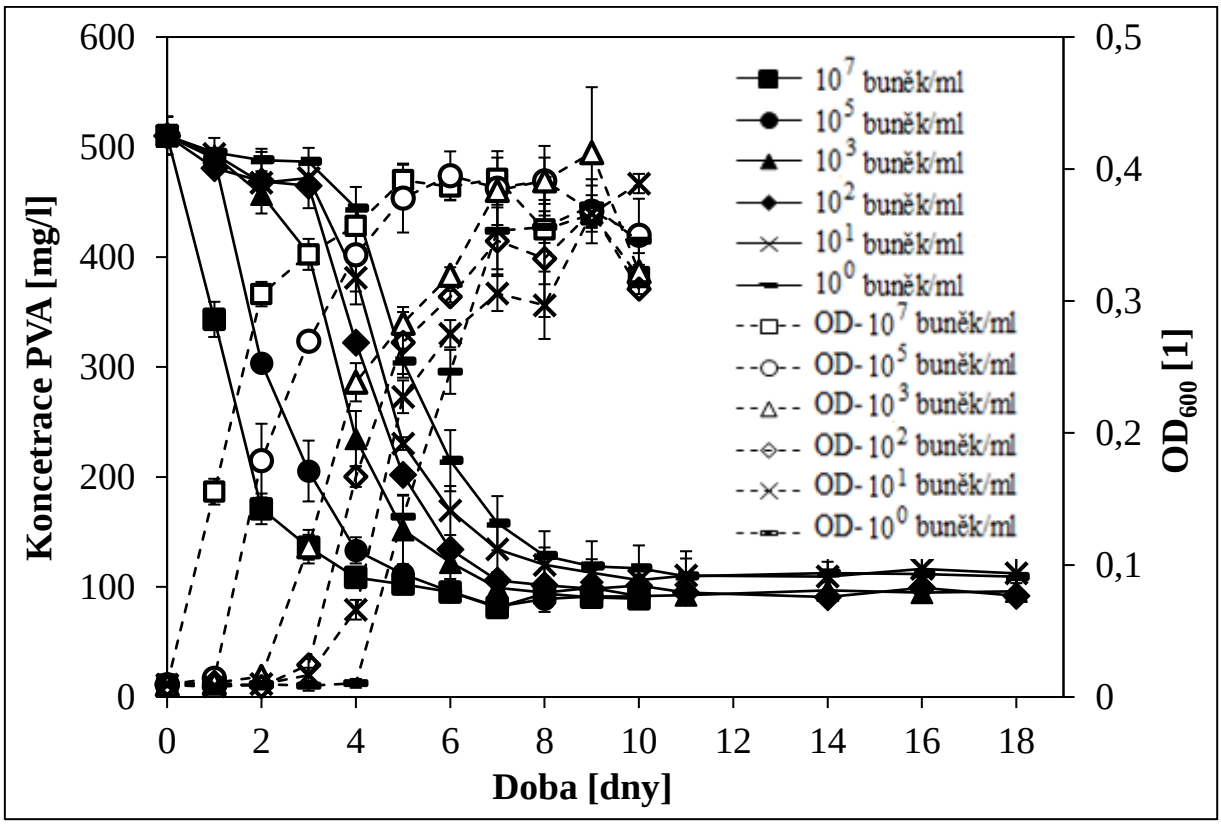
4.1 Biodegradabilita poly(vinylalkoholu)

První část dizertační práce byla věnována experimentům bakteriálního rozkladu poly(vinylalkoholu) dvěma kulturami rodu *Sphingomonas*. V těchto experimentech byl sledován průběh mikrobiálního rozkladu poly(vinylalkoholu) kulturami *Sphingomonas* sp. JK2 a OT2 v závislosti na míře inokulace. Byly uskutečněny dva rozsáhlejší experimenty, kde byla každá série zaočkována jiným množstvím buněk degradačních kultur tak, aby jejich koncentrace na začátku pokusu činila v jednotlivých sériích 10^7, 10^5, 10^3, 10^2, 10^1 a 10^0 buněk/ml. Koncentrace PVA a hodnoty OD_{600} v průběhu obou pokusů jsou znázorněny na *Obr. 4.1* (rozklad kulturou JK2) a *Obr. 4.2* (rozklad kulturou OT2). Hodnoty uvedené v grafech odpovídají průměrům stanovení ze tří paralelních lahví; chybové úsečky jsou rovny směrodatným odchylkám.



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

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



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

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

Skutečné množství bakteriálních degradérů v kontaminovaných matricích může obecně hrát zásadní roli pro zahájení biodegradačního procesu a následnou rychlost odstraňování znečišťujících látek. Toto téma již bylo zkoumáno v rámci několika studií, avšak z jejich výsledků nelze vyvodit jednoznačný závěr. Některé výzkumy ukázaly významný vliv velikosti inokul na proces biodegradace. Například Ramadan *et al.* (1990) zjistili, že *Pseudomonas cepacia* je schopna mineralizovat p-nitrofenol v jezerní vodě po inokulaci $3{,}3.10^4$ a $3{,}6.10^5$ buněk/ml, přičemž rozdíl rychlosti degradace mezi těmito inokuly byl minimální, zatímco po inokulaci $3{,}3.10^2$ buněk/ml prakticky žádná mineralizace zjištěna nebyla. Podobně Miethling a Karlson (1996) popisují významnou mineralizaci pentachlorfenolu kulturou *Sphingomonas*

chlorophenolica RA2 v půdě, po inokulaci 10^8 buněk/g; použití inokula 10^6 buněk/g vedlo k významnému snížení rychlosti mineralizace a u inokula 10^4 buněk/g se již výsledky významně nelišily od negativní kontroly.

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

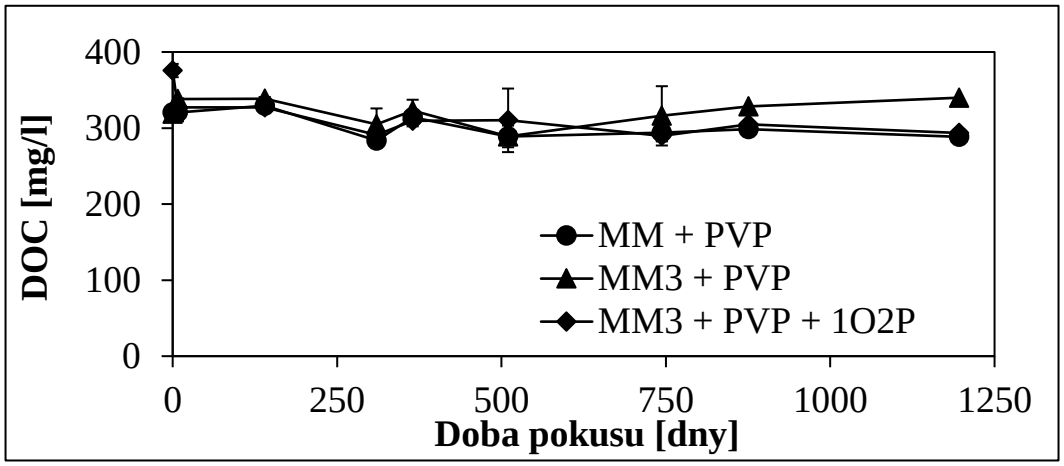
Podobné výsledky lze vyvodit i z této práce, která je první prací zkoumající tak širokou škálu velikostí inokul; z tohoto hlediska je dosažení úspěšné biodegradace PVA s minimálními velikostmi inokul slibným zjištěním. Výsledky naznačují, že proces biodegradace by mohl probíhat v různých vodních prostředích, včetně těch s omezenými bakteriálními komunitami, samozřejmě za předpokladu přítomnosti buněk s odpovídajícím enzymovým vybavením. Tento výsledek je pravděpodobně dán také nízkou toxicitou PVA. Je třeba poznamenat, že ve vědecké literatuře neexistují žádné známky o toxickém působení, které by tento polymer při použitých koncentracích proti bakteriím vykazoval. Je tak možno se domnívat, že tato nízká toxicita představuje rozhodující faktor při biodegradaci PVA minimálními inokuly, v porovnání s výsledky některých biodegradací, zmíněných výše, kde použití malých inokul vedlo k výraznému snížení míry degradace polutantů.

4.2 Biodegradabilita poly(vinylpyrrolidonu)

Minoritní součástí práce bylo také studium možnosti bakteriální degradace poly(vinylpyrrolidonu); do jisté míry šlo o kontrast vůči části věnované rozkladu poly(vinylalkoholu). Ačkoliv se totiž v obou případech jedná o netoxické vinylové polymery, rozpustné ve vodě, liší se zcela zásadně svou biodegradabilitou. V návaznosti na řadu prací proběhlých na ÚIOŽP se jako jedna z posledních možností jevilo odzkoušení biodegradace PVP směsným konsorciem bakterií KOKK, které bylo získáno v rámci paralelně probíhající doktorské práce Křížka. Toto konsorcium bylo schopno rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu (1O2P), látky strukturně blízké monomeru PVP, a bylo získáno z aktivovaného kalu.

V experimentu byly nasazeny tři série se dvěma typy minerálních médií a vždy se 600 mg/l PVP; do třetí série bylo kromě PVP dávkováno také 50 mg/l 1O2P, který zde měl sloužit jako případný induktor tvorby enzymů. První série obsahovala kompletní MM s PVP, druhá a třetí série pak MM3 (bez dusíku) s PVP; všechny lahve byly inokulovány bakteriální suspenzí konsorcia KOKK. Pokus trval po dobu přibližně 1 200 dní a během této doby byly všechny série několikrát opětovně inokulovány uvedeným konsorciem KOKK, ale také

čistírenským aktivovaným kalem. Koncentrace DOC v průběhu pokusu jsou graficky znázorněny na *Obr. 4.3*.



Obr. 4.3: Mikrobiální degradace PVP

Jak je z *Obr. 4.3* zřejmé, ani k částečné mineralizaci PVP v žádném případě nedošlo. Pouze v sérii s přídavkem 1O2P byl pozorován jistý úvodní pokles v hodnotách koncentrace DOC, který však byl způsoben degradací a utilizací 1O2P konsorciem KOKK; dále se již koncentrace DOC výrazně neměnila a ani zde tedy ani k dílčí utilizaci PVP nedošlo. I přes dodatečnou inokulaci všech pokusů konsorciem KOKK a suspenzí čistírenského aktivovaného kalu, které proběhly ve 140-tém, 365-tém a 876-tém dni pokusu, nebyl žádný významný pokles koncentrace DOC zjištěn. Po proběhnutí tohoto dlouhodobého experimentu tak bylo možno uzavřít, že mikrobiální utilizace polymeru nebylo dosaženo.

4.3 Studium bakteriálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylátu

Studiu bakteriálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylátu se v posledních letech věnovaly některé závěrečné práce probíhající na FT UTB. V rámci práce Ringlové (2015) byla potvrzena biodegradabilita EHS v prostředí aktivovaného kalu a v práci Proislové (2016) také v říční vodě. Cílem doktorské práce pak bylo studium mikrobiálních zástupců podílejících se na rozkladu této látky.

Izolace a identifikace kultury schopné rozkladu EHS byly provedeny ve spolupráci s diplomovou prací Jelénkové (2016). Degradační kultura ES 12 byla izolována z ČOV Zlín a byla identifikována jako zástupce rodu *Rhodococcus*, s 99% shodou s druhem *R. erythropolis*. Rozklad EHS kulturou ES 12 pak byl potvrzen již v uvedené práci Jelénkové (2016).

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

V rámci práce bylo snahou zjistit, zda je rozklad EHS touto kulturou kompletní. Vzhledem k tomu, že se EHS skládá z dvou strukturně odlišných částí (2-ethylhexanolu a kyseliny salicylové) bylo testováno, zda je získaná kultura

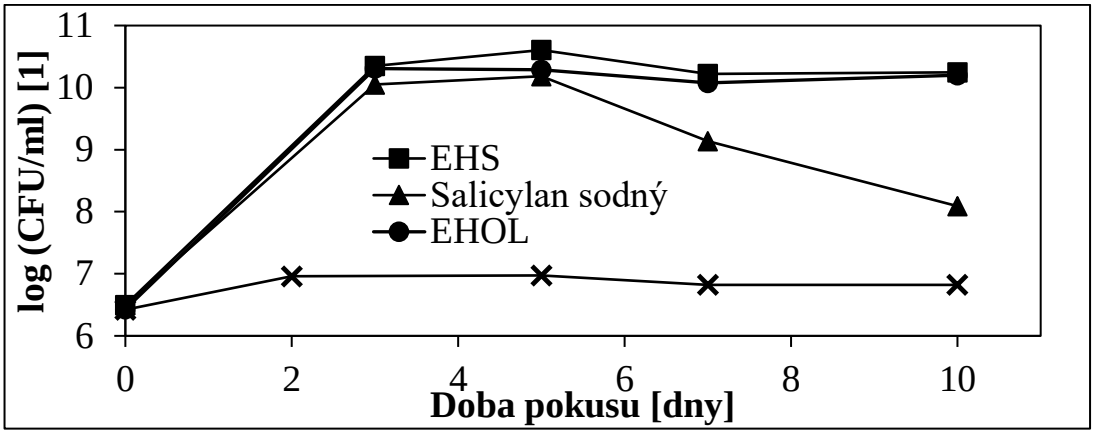
schopna utilizace obou těchto strukturních částí. Růst kultury na 2-ethylhexanolu (EHOL) a salicylanu sodném byl testován s každým substrátem v koncentraci 500 mg/l. Bylo zjištěno, že kultura *Rhodococcus* sp. ES 12 je schopna růstu na salicylanu sodném, nikoliv však na EHOLu v použité koncentraci. Vzhledem k získaným výsledkům bylo předpokládáno, že v průběhu růstu kultury ES 12 na 2-ethylhexylsalicylátu dochází ke vzniku a hromadění 2-ethylhexanolu, který zůstává v médiu nerozložen. Takový jev není ojedinělý, vznik a hromadění 2-ethylhexanolu a následně i kyseliny 2-ethylhexanové popsal již Horn *et al.* (2004), při biodegradaci di-2-ethylhexylftalátu a di-2-ethylhexyladipátu.

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

Další pokus s kulturou *Rhodococcus* sp. ES 12 tedy směřoval k potvrzení produkce 2-ethylhexanolu v průběhu utilizace EHS. Pro měření koncentrací EHOLu v tekutém médiu byla na základě literárních zdrojů vytipována, ověřena a optimalizována metoda SPE-GC, která je podrobněji popsána v metodické části. Vznik a akumulaci EHOLu se však v degradačním médiu při rozkladu EHS prokázat nepodařilo, což naznačilo, že by kultura ES 12 mohla být přece jen kompletního rozkladu EHS schopna. Cílem dalšího pokusu tedy bylo opětovné testování této domněnky i přesto, že utilizace EHOLu touto kulturou již byla dříve testována a potvrzena nebyla.

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

V tomto experimentu byl sledován růst kultury ES 12 na EHS a molárně odpovídajících koncentracích jeho strukturních částí, tedy salicylanu sodném a 2-ethylhexanolu. V experimentu byly nasazeny čtyři série MM s vitaminy; první série obsahovala 250 mg/l EHS, druhá 160 mg/l salicylanu sodného, třetí pak 130 mg/l EHOLu; poslední série obsahovala pouze samotné MM s vitaminy jako kontrolu. Průběh experimentu byl vyhodnocován stanovováním počtu buněk plotnovou metodou; počet buněk a charakter suspenzí byl monitorován také mikroskopicky. Výsledné počty CFU/ml jsou ve formě logaritmu graficky znázorněny na *Obr. 4.4*.



Obr. 4.4: Počty bakterií při růstu kultury Rhodococcus sp. ES 12 na EHS, salicylanu sodném a EHOLu

Z *Obr. 4.4* vyplývá, že u kultury *Rhodococcus* sp. ES 12 došlo k růstu na všech sledovaných substrátech. K navýšení počtu buněk pak docházelo ve formě jemné suspenze (potvrzeno mikroskopicky), tudíž výsledky kultivačního stanovení nebyly ovlivněny případnou tvorbou vloček. V rámci tohoto pokusu byla tedy utilizace 2-ethylhexanolu v koncentraci 130 mg/l potvrzena a bylo tak zřejmé, že jeho koncentrace je zásadním faktorem určujícím růst kultury.

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

Cílem dalšího experimentu bylo tedy otestovat, na jakých koncentracích uvedeného alkoholu je kultura *Rhodococcus* sp. ES 12 schopna růst a zda může ke svému růstu využít i kyselinu 2-ethylhexanovou.

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

V tomto experimentu byl sledován růst kultury na různých koncentracích 2-ethylhexanolu (EHOL), 2-ethylhexanalu (EHAL) a sodné soli kyseliny 2-ethylhexanové (EHA). Průběh pokusu byl hodnocen vizuálně a nejvyšší růstové koncentrace těchto látek jsou uvedeny v *Tab. 4.1*.

Tab. 4.1: Nejvyšší růstové koncentrace látek pro kulturu Rhodococcus sp. ES 12

Sledovaná látka	Koncentrace [mg/l]
EHOL	350
EHAL	20
EHA	1000

Z výsledků uvedených v *Tab. 4.1* vyplývá, že maximální růstová koncentrace 2-ethylhexanolu je pro zkoumanou kulturu 350 mg/l. Bylo zřejmé, že neschopnost jejího růstu při vyšších koncentracích úzce souvisí s toxicitou alkoholu, nebo, pravděpodobněji, s toxicitou příslušného aldehydu. Kultura je schopna růstu na obou předpokládaných meziproduktech degradace EHOLu; v případě EHALu byl však růst kultury pozorován pouze na nejnižší testované koncentraci 20 mg/l, naopak u sodné soli EHA docházelo k růstu i v koncentraci 1000 mg/l.

Toxicitou EHOLu, EHALu a EHA, které mohou vznikat také v průběhu biodegradace některých ftalátů, sledovali pomocí testů Microtox Nalli *et al.* (2002); ti udávají hodnotu EC_{50} pro EHOL 7,8 mg/l; pro EHAL 7,7 mg/l a pro EHA 43 mg/l. Zjistili tedy srovnatelnou toxicitu 2-ethylhexanolu a 2-ethylhexanalu vůči *Vibrio fischeri*. Naproti tomu, informace uvedené v bezpečnostních listech daných látek, poskytnutých výrobcem, udávají, že například hodnota EC_{50} pro dafnie po 48 hodinové expozici je u EHOLu 39 mg/l (Sigma-Aldrich, ©2018a), zatímco u EHALu je hodnota EC_{50} za stejných podmínek 4,7 mg/l (Sigma-Aldrich, ©2018b). Tyto hodnoty tak ukazují na rozdílné toxické chování obou látek vůči různým organismům.

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

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

4.4 Studium bakteriálního rozkladu 2-ethylhexanolu

Ačkoliv problematika utilizace EHOLu byla již částečně zkoumána v rámci prací věnujících se rozkladu EHS, experimenty zabývající se rozkladem těchto dvou látek probíhaly souběžně. V této části práce byla pozornost zaměřena na izolaci bakteriální kultury, schopné rozkladu 2-ethylhexanolu při jeho vyšších koncentracích. Izolace kultury s požadovanou vlastností byla provedena z aktivovaného kalu z ČOV Zlín. Tato kultura, pracovně označená jako „P“, byla identifikována jako zástupce rodu *Pseudomonas*, s 99% shodou se záznamy

v databázi GenBank; nejbližšími příbuznými druhy byly *P. putida* a *P. japonica*. Kultura je uložena v České sbírce mikroorganismů jako *Pseudomonas* sp. P pod číslem CCM 8809.

Bylo provedeno několik experimentů, nejdříve byl sledován časový průběh rozkladu 2-ethylhexanolu. Ke kompletnímu rozkladu EHOLu kulturou P docházelo poměrně velmi rychle, koncentrace 500 mg/l byla kompletně utilizována již během 36 hodin.

Dále bylo testováno, zda je kultura schopna růstu také na vyšších koncentracích EHOLu. Vzhledem k tomu, že rozpustnost 2-ethylhexanolu ve vodě je omezená (Amidon *et al.*, 1974; McGinty *et al.*, 2010), byly testovány pouze koncentrace do 1000 mg/l; utilizace substrátu kulturou byla vyhodnocována vizuálně. Růst kultury byl jednoznačně pozorován u všech testovaných koncentrací.

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

Jak již bylo popsáno dříve, rozklad EHOLu je katalyzován alkohol- a aldehyddehydrogenázami, jejichž účinkem dochází k oxidaci 2-ethylhexanolu 2-ethylhexanal (EHAL) a dále na kyselinu 2-ethylhexanovou (EHA), která může být metabolizována (Wyatt *et al.*, 1987). V našich pokusech s kulturou *Rhodococcus* sp. ES 12 byla prokázána výrazná závislost utilizace těchto látek na jejich koncentraci. Z tohoto důvodu byl v dalších pokusech sledován růst kultury *Pseudomonas* sp. P na odstupňovaných koncentracích těchto látek. Nejvyšší z testovaných koncentrací, při kterých byla kultura ještě schopna růstu, jsou uvedeny v *Tab. 4.2*.

Tab. 4.2 Nejvyšší růstové koncentrace látek pro kulturu Pseudomonas sp. P

Sledovaná látka	Koncentrace [mg/l]
EHAL	100
EHA	2000

Z *Tab. 4.2* vyplývá, že schopnost kultury *Pseudomonas* sp. P růst na zvýšených koncentracích EHOLu v porovnání s kulturou *Rhodococcus* sp. ES 12 je doprovázena i její schopností růstu na vyšších koncentracích EHALu. Tento fakt tak podporuje domněnku, že schopnost růstu jednotlivých bakteriálních kultur na určitých koncentracích 2-ethylhexanolu je dána mírou toxicity vznikajícího 2-ethylhexanalu vůči nim, případně rychlostí následné přeměny 2-ethylhexanalu na 2-ethylhexanovou kyselinu.

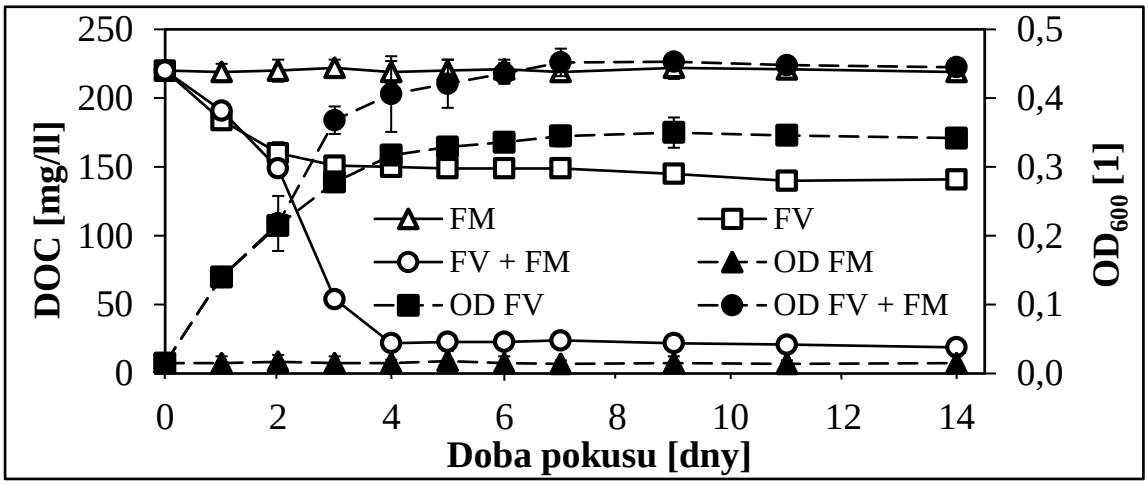
Za pozitivní zjištění lze tak z pohledu biologického čištění odpadních vod a mikrobiálního rozkladu látek, obsahujících estericky vázaný 2-ethylhexylový postranní řetězec, považovat skutečnost, že i v případě uvolňování 2-ethylhexanolu existují v aktivovaném kalu bakterie schopné jeho využívání, a to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

4.5 Biodegradabilita kokamidopropylbetainu

Biodegradabilitou kokamidopropylbetainu (CAPB) se zabývaly již dvě závěrečné práce vypracované na FT UTB. V rámci diplomové práce Ringlové (2015) byla potvrzena biodegradabilita této látky v aktivovaném kalu a byli izolováni původci rozkladu, dvě kultury označené jako FV a FM. Izolované kultury a jejich vztah byly podrobněji studovány v práci Jelénkové (2016) a v této práci. Kultura FV byla se shodou 100 % se záznamy v GenBank identifikována jako zástupce rodu *Pseudomonas*, kultura FM pak s 97% shodou jako zástupce rodu *Rhizobium*.

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

Pro objasnění úlohy jednotlivých bakterií v rozkladném procesu bylo v rámci této práce uskutečněno několik sérií experimentů. Nejprve byla sledována biodegradace CAPB jak jednotlivými kulturami FV a FM, tak i jejich konsorciem. V průběhu pokusu byly odebírány vzorky, u nichž byla stanovována koncentrace DOC a hodnota OD_{600}; výsledky jsou graficky znázorněny na *Obr. 4.5*.



Obr. 4.5: Degradace CAPB kulturami Pseudomonas sp. FV a *Rhizobium* sp. FM

Při degradaci CAPB jednotlivými kulturami a jejich kombinací byly získány výrazně rozdílné výsledky, jak je patrné z *Obr. 4.5*. Zatímco kultura FV byla schopna ke svému růstu CAPB částečně využívat (pokles DOC přibližně o 36 %), sama kultura FM růstu schopna nebyla vůbec. Hodnoty DOC po 14 dnech degradace dosáhly 141,2 mg/l u kultury FV a u kmene FM 219,3 mg/l, takže zůstaly na výchozí hodnotě (220 mg/l). Naproti tomu, společné působení obou kultur zajistilo prakticky úplnou biodegradaci CAPB, a to za pouhé 4 dny, během nichž bylo spotřebováno více než 90 % organického uhlíku; hodnota DOC na konci pokusu činila jen 19,2 mg/l.

Za účelem dalšího ozřejmění role kultury *Rhizobium* sp. FM v degradačním procesu byly proto z finálních degradačních suspenzí, po 14 dnech degradace CAPB jednotlivými kulturami, odstraněny přítomné buňky centrifugací

a získané supernatanty byly ještě zfiltrovány přes sterilní filtry s velikostí pórů 0,22 μm. Sterilní supernatant pocházející z degradace CAPB kulturou FV byl poté zaočkován kulturou FM a naopak. Po 7 a 14 dnech další inkubace byly dvakráte odebrány vzorky, u kterých byly opět stanoveny koncentrace DOC; zjištěné hodnoty jsou uvedeny v *Tab. 4.3* (počáteční koncentrace DOC, při úplném zahájení degradace CAPB, byla 220 mg/l, viz *Obr. 4.5*).

Tab. 4.3: Koncentrace DOC v supernatantech, zaočkovaných druhou kulturou

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

Výsledky uvedené v *Tab. 4.3* ukázaly, že kmen FM dokázal využít podstatný podíl organických sloučenin, které zůstaly v médiu po degradaci CAPB kulturou *Pseudomonas* sp. FV. Na konci testu tak dosáhla koncentrace rozpuštěného organického uhlíku prakticky stejné úrovně, jaká byla pozorována v předchozím testu degradace CAPB konsorciem obou kmenů (18,6 mg/l vs. 19,2 mg/l, viz *Obr. 4.5*). V opačném případě, po působení kultury *Rhizobium* sp. FM na CAPB, vykázala kultura *Pseudomonas* sp. FV pokles koncentrace DOC v supernatantu z 219,3 jen na 140,6 mg/l. Tento výsledek byl rovněž plně v souladu se zjištěním, získaným v prvním testu degradace CAPB kmenem FV, ve kterém byla na konci testu zaznamenána prakticky stejná hodnota DOC 141,2 mg/l. Získané údaje tak naznačily, že za daných podmínek, tj. v kompletním minerálním médiu, zajistila kultura *Pseudomonas* sp. FV primární biodegradaci CAPB, a že produkované metabolity byly následně využity kulturou *Rhizobium* sp. FM. Naproti tomu bylo zřejmé, že působením kultury *Rhizobium* sp. FM na CAPB nedošlo k žádné strukturní změně, která by tento surfaktant zpřístupnila kultuře *Pseudomonas* sp. FV. Další části práce tak byly směřovány k potvrzení tohoto předpokladu a k objasnění, která část CAPB by mohla být využívána jednotlivými kulturami.

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

Cílem experimentu bylo objasnění, která část CAPB je potenciálně využitelná jednotlivými kulturami. Byl zkoumán růst jednotlivých kultur na lauramidu a betainu, včetně růstu v bezdusíkatém minerálním médiu (MM3) a také byla testována utilizace kaprylátu, laurátu, palmitátu a stearátu. Výsledky experimentu byly vyhodnoceny vizuálně a jsou popsány v *Tab. 4.4*.

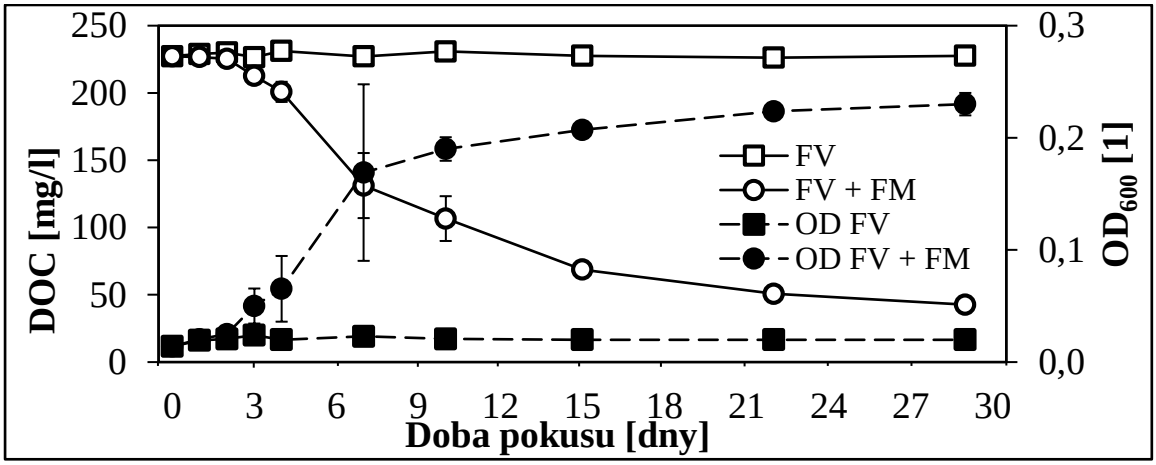
Tab. 4.4: Utilizace substrátů kulturami Pseudomonas sp. FV a Rhizobium sp. FM v kompletním MM a v bezdusíkatém MM3

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

Tab. 4.4 ukazuje na rozdílné metabolické vlastnosti obou kultur. Utilizace betainu a kaprylátu představovaly jediné společné vlastnosti studovaných bakterií. Kmen FV vykázal širší degradační schopnosti, projevující se utilizací mastných kyselin se středním i dlouhým řetězcem a také lauramidu pro svůj růst. Bylo tedy zjevné, že kultura FV je schopna asimilovat dusík lauramidu i betainu; tento nález však neprokazoval její stejnou schopnost pro CAPB. Významným zjištěním byla také utilizace betainu kmenem FM, ukazující na potenciální schopnost této kultury využívat alespoň část molekuly CAPB.

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

Na základě získaných skutečností bylo rozhodnuto uskutečnit experiment, ve kterém by byl otestován růst kultury FV i konsorcia obou kultur na CAPB v prostředí bez externího zdroje dusíku. Průběh degradace CAPB byl sledován pomocí stanovení koncentrace DOC a hodnot OD_{600} a je znázorněn na *Obr. 4.6*.



Obr. 4.6: Degradace CAPB kulturou Pseudomonas sp. FV a konsorciem obou kultur v nepřítomnosti zdroje dusíku

Výsledky uvedené na *Obr. 4.6* jednoznačně ukázaly, že navzdory schopnosti kmene *Pseudomonas* sp. FV využívat betain i lauramid v médiu, neobsahujícím jiný zdroj dusíku, nebyla tato kultura schopna za stejných podmínek využívat CAPB. Tento jev spolu s předchozími výsledky a se skutečností, že k mineralizaci CAPB v bezdusíkatém médiu došlo pouze v přítomnosti obou kultur, poskytl zásadní pohled na způsob společné degradace CAPB a umožnil formulovat možnou roli obou kultur.

Při zohlednění všech získaných výsledků lze kmen *Pseudomonas* sp. FV považovat za původce primární degradace, využívajícího jen alkylové řetězce molekul CAPB, zatímco kultura *Rhizobium* sp. FM využívá alkylamidopropylbetainové metabolity, obsahující podstatně zkrácené alkylové části. Navíc je z *Obr. 4.6* patrné, že přítomnost kultury FM je v podmínkách bez externího zdroje dusíku pro úspěšnou biodegradaci CAPB stejně důležitá jako přítomnost kultury FV. Jinými slovy, *Pseudomonas* sp. FV má schopnost růstu na kokamidopropylbetainu pouze v přítomnosti jiného, pro ni dostupného zdroje dusíku. Za takových podmínek je schopna částečně využít CAPB jako zdroj uhlíku a energie oxidací jeho alkylových skupin, pravděpodobně bez ohledu na délku alkylových řetězců. Tato hypotéza je podpořena schopností této bakterie růst na mastných kyselinách s krátkým, středním i dlouhým řetězcem (kaprylát C8, laurát C12, palmitát C16, stearát C18) a také skutečností, že byla pozorována rychlá a prakticky úplná degradace CAPB konsorciem obou kmenů (viz *Obr. 4.5*).

Obecně platí, že štěpení vazby C-N představuje rozhodující krok pro biodegradaci surfaktantů obsahujících dusík, jak dokládají Garcia *et al.* (2007) a Rios *et al.* (2017) ve svých studiích mikrobiálního rozkladu strukturně podobného kokamidopropylaminoxidu. Z tohoto pohledu je důležitost kultury *Rhizobium* sp. FM nepřehlédnutelná, přestože není schopna takové štěpení realizovat v intaktním CAPB. Její neschopnost štěpit vazbu C-N v molekule kokamidopropylbetainu je zřejmá vzhledem k tomu, že kultura FM nebyla schopna růstu na CAPB ani v kompletním médiu (*Obr. 4.5*) a je neschopna utilizovat lauramid. Nicméně, po primární biodegradaci CAPB kmenem *Pseudomonas* sp. FV, je kultura *Rhizobium* sp. FM je schopna získávat dusík, uhlík i energii ze vznikajících metabolitů, které již kultura FV není schopna dále rozkládat, čímž zajišťuje pokračování degradačního procesu. Navíc, v prostředí neobsahující dostupný dusík kultura FM zásobuje dusíkem i svého degradačního partnera, což je doloženo nejen společnou degradací v bezdusíkatém médiu, ale také růstem kultury FM na betainu za stejných podmínek. Naproti tomu její neschopnost využívat lauramid naznačuje, že alkylový řetězec o určité délce, sousedící s amidovou skupinou, je překážkou pro její asimilaci amidického dusíku.

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

pravděpodobně produkty vylučovanými kulturou *Rhizobium* sp. FM.

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

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

5. ZÁVĚR

Tato práce se soustředila na studium mikrobiálního rozkladu několika látek reprezentujících jak vysokomolekulární, tak nízkomolekulární sloučeniny.

První ze sledovaných vysokomolekulárních látek byl poly(vinylalkohol); experimenty byly zaměřeny na sledování průběhu jeho mikrobiálního rozkladu kulturami *Sphingomonas* sp. JK2 a OT2 v závislosti na míře inokulace. Výsledky ukázaly, že s klesající velikostí inokul docházelo sice k mírnému prodlužování úvodních fází rozkladu, nicméně bylo prokázáno, že úspěšná degradace polymeru může nastávat i v přítomnosti minimálních inokul.

Dále byla sledována mikrobiální rozložitelnost poly(vinylpyrrolidonu), a to za účasti směsného bakteriálního konsorcia, schopného rozkladu sktrukturně podobného, avšak nízkomolekulárního 1-oktyl-2-pyrrolidonu. V rámci dlouhodobého experimentu tímto konsorciem, ani jeho kombinací s inokulem čistírenského kalu, nebyl mikrobiální rozklad polymeru prokázán.

Další část práce byla zaměřena na studium degradace vybraných nízkomolekulárních látek. Kultura schopná utilizace 2-ethylhexylsalicylátu (EHS) byla identifikována jako zástupce rodu *Rhodococcus* a byla sledována především její schopnost utilizace jednotlivých strukturkních částí molekuly EHS. Kultura byla schopna růstu na salicylanu sodném, ale nikoliv na 2-ethylhexanolu v koncentraci 500 mg/l. Další zkoušky však ukázaly, že kultura je utilizace 2-ethylhexanolu schopna, ale pouze v nižších koncentracích – maximální růstová koncentrace byla 350 mg/l. Bylo tak potvrzeno, že kultura *Rhodococcus* sp. ES 12 je schopna utilizace obou strukturních částí molekuly EHS.

V průběhu prací byla z aktivovaného kalu izolována také kultura schopná růstu na 2-ethylhexanolu a byla identifikována jako *Pseudomonas* sp. P. Kmen dokázal růst na 2-ethylhexanolu i v koncentraci 1000 mg/l, maximální růstová koncentrace 2-ethylhexanalu byla výrazně nižší, a to 100 mg/l. Schopnost růstu jednotlivých kultur na 2-ethylhexanolu je tak pravděpodobně dána spíše toxicitou vznikajícího 2-ethylhexanalu, případně rychlostí jeho následné přeměny na kyselinu.

Poslední část studia se věnovala studiu rozkladu kokamidopropylbetainu kulturami *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM. Bylo zjištěno, že *Pseudomonas* sp. FV, která je původcem primární biodegradace, využívá alkylové řetězce molekul CAPB a má schopnost růstu na kokamidopropylbetainu pouze v přítomnosti jiného, pro ni dostupného zdroje dusíku; není totiž schopna asimilovat dusík z molekul CAPB. Naopak, kultura *Rhizobium* sp. FM je po primární biodegradaci CAPB kmenem *Pseudomonas* sp. FV schopna získávat dusík i uhlík a energii ze vznikajících metabolitů, které již kultura FV není schopna dále rozkládat, čímž zajišťuje dokončení degradačního procesu.

6. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Tato práce se věnovala studiu bakteriálního rozkladu vybraných syntetických vysokomolekulárních a nízkomolekulárních látek, které jsou široce využívány v řadě průmyslových odvětví.

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

- Jde o první studii, testující tak široký rozsah velikostí inokul; se zjištěním, že bakteriální rozklad PVA může být zahájen i v přítomnosti minimálního množství buněk s potřebnou schopností.
- Potvrzení, že k rozkladu poly(vinylalkoholu) může docházet také v prostředí s nižším mikrobiálním osídlením, například v říčních vodách.
- K mikrobiálnímu rozkladu PVP za pomoci konsorcia schopného rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu nedochází, a to ani v kombinaci s mikroorganismy aktivovaného kalu a po jejich dlouhodobém působení.
- Zvážení dalšího používání PVP v některých aplikacích; nahrazení lépe rozložitelnými látkami.

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

- Izolace a popis konkrétních rodů bakterií, podílejících se na rozkladu daných látek.
- Potvrzení přítomnosti mikroorganismů schopných kompletní utilizace EHS v čistírenských suspenzích; identifikace aktivního degradačního kmene jako zástupce rodu *Rhodococcus*.
- Koncentrace 2-ethylhexanolu může hrát v procesu mikrobiální degradace látek, obsahujících 2-ethylhexylový řetězec, významnou roli, což je zřejmě dáno také toxicitou meziproduktu jeho rozkladu, tj. 2-ethylhexanalu.
- Izolace kmene schopného rozkládat vyšší koncentrace 2-ethylhexanolu a jako identifikace jako zástupce rodu *Pseudomomas*.
- Zavedení a optimalizace metody stanovení koncentrace 2-ethylhexanolu ve vodném prostředí pomocí SPE-GC.
- Potvrzení poměrně velmi dobré biodegradability kokamidopropylbetainu za optimálních podmínek a objasnění vztahu mezi kulturami *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM.
- Zjištění, že přítomnost dostupného zdroje dusíku může mít na rychlost rozkladu CAPB výrazný vliv.
- Kultury získané v průběhu práce, tj. *Rhodococcus* sp. ES 12, *Pseudomomas* sp. P, *Pseudomonas* sp. FV a *Rhizobium* sp. FM, byly uloženy v České sbírce mikroorganismů v Brně.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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

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

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

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

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

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

BHARATHIRAJA, B., J. JAYAMUTHUNAGAI, M. JAYAKUMAR, et al., 2013. Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) using Pseudomonas alcaligenes. *Asian Journal of Chemistry* [online]. **25**(15), 8663-8667 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.14233/ajchem.2013.14937. ISSN 09707077. Dostupné

z:http://www.asianjournalofchemistry.co.in/user/journal/viewarticle.aspx?ArticleID=25_16_98

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GARCÍA, M. T., E. CAMPOS a I. RIBOSA, 2007. Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants. *Chemosphere* [online]. **69**(10), 1574-1578 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.05.089. ISSN 00456535. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S00456535070
07151

GARCIA, M. T., E. CAMPOS, A. MARSAL a I. RIBOSA, 2008. Fate and effects of amphoteric surfactants in the aquatic environment. *Environment International* [online]. **34**(7), 1001-1005 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.envint.2008.03.010. ISSN 01604120. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S01604
12008000391

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LEE, J.-A. a M.-N. KIM, 2003. Isolation of new and potent poly(vinyl alcohol)-degrading strains and their degradation activity. *Polymer Degradation and Stability* [online]. **81**(2), 303-308 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/S0141-3910(03)00101-0. ISSN 01413910. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391 003001010

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RAMOS, S., V. HOMEM, A. ALVES a L. SANTOS, 2016. A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. *Environment International* [online]. **86**, 24-44 [cit. 2017-08-20]. DOI: 10.1016/j.envint.2015.10.004. ISSN 01604120. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412015300702

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

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

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

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

RODIL, R., S. SCHRADER a M MOEDER, 2009. Pressurised membrane-assisted liquid extraction of UV filters from sludge. *Journal of Chromatography A* [online]. **1216**(51), 8851-8858 [cit. 2017-08-21]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.10.058. ISSN 00219673. Dostupné z:http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967 30901588X

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

SAKAZAWA, CH., M. SHIMAO, Y. TANIGUCHI a N. KATO, 1981. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* [online]. **41**(1), 261-267 [cit. 2016-11-14]. Dostupné z: http://aem.asm.org/content/41/1/261.long

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WATANABE, Y., M. MORITA, N. HAMADA a Y. TSUJISAKA, 1975. Formation of Hydrogen Peroxide by a Polyvinyl Alcohol Degrading Enzyme. *Agricultural and*

Biological Chemistry [online]. **39**(12), 2447-2448 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1080/00021369.1975.10861980. ISSN 00021369. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00021369.1975.10861980

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

WORTHEN, A. J., P. S. PARIKH, Y. CHEN, S. L. BRYANT, CH. HUH a K. P. JOHNSTON, 2014. Carbon Dioxide-in-Water Foams Stabilized with a Mixture of Nanoparticles and Surfactant for CO2 Storage and Utilization Applications. *Energy Procedia* [online]. **63**, 7929-7938 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.egypro.2014.11.827. ISSN 18766102. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876610214026423

WYATT, J. M., R. B. CAIN a I. J. HIGGINS, 1987. Formation from synthetic two-stroke lubricants and degradation of 2-ethylhexanol by lakewater bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **25**(6), - [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/BF00252017. ISSN 01757598. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/BF00252017

YAMATSU, A., R. MATSUMI, H. ATOMI a T. IMANAKA, 2006. Isolation and characterization of a novel poly(vinyl alcohol)-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp. PVA3. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **72**(4), 804-811 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1007/s00253-006-0351-4. ISSN 01757598. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0351-4

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

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

ZHOU, Y., J. ZHANG, Z. ZHANG, CH. ZHOU, Y. J. SEAN LAI a S. XIA, 2017. Enhanced performance of short-time aerobic digestion for waste activated sludge under the presence of cocoamidopropyl betaine. *Chemical Engineering Journal* [online]. **320**, 494-500 [cit. 2018-01-16]. DOI: 10.1016/j.cej.2017.03.065. ISSN 13858947. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S13858947 17304199

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1O2P	1-oktyl-2-pyrrolidon
BDH	β-diketonhydroláza
CAPB	Kokamidopropylbetain
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	Colony forming units
ČOV	Čistírna odpadních vod
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
EC_{50}	Efektivní koncentrace
EHA	Kyselina 2-ethylhexanová
EHAL	2-ethylhexanal
EHOL	2-ethylhexanol
EHS	2-ethylhexylsalicylát
FT	Fakulta technologická
GC	Plynová chromatografie
IC_{25}	Inhibiční koncentrace
LC_{50}	Letální koncentrace
LD_{50}	Letální dávka
MA	Minerální agar
MM	Minerální médium
MM3	Minerální médium bez dusíku
MPN	Most probable number
NOAEL	No observed adverse effect level
OD	Optická denzita
OPH	Hydroláza oxidovaného polyvinylalkoholu
PQQ	Pyrrolochinolin chinon
PVA	Polyvinylalkohol
PVA-DH	Polyvinylalkohol dehydrogenáza
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R2A	Reasoner's 2A agar
SPE	Extrakce na pevnou fázi
TYA	Tryptone yeast extract agar
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
UTB	Univerzita Tomáše Bati
UV	Ultrafialové záření

9. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tab. 1.1: Porovnání toxicity 2-ethylhexanolu a kyseliny 2-ethylhexanové pomocí různých testů akutní toxicity (Nalli et al., 2002; Horn et al., 2004) ... 11
Tab. 4.1: Nejvyšší růstové koncentrace látek pro kulturu Rhodococcus sp. ES 12 23
Tab. 4.2 Nejvyšší růstové koncentrace látek pro kulturu Pseudomonas sp. P ... 24
Tab. 4.4: Koncentrace DOC v supernatantech, zaočkovaných druhou kulturou 26
Tab. 4.5: Utilizace substrátů kulturami Pseudomonas sp. FV a Rhizobium sp. FM v kompletním MM a v bezdusíkatém MM3 27

Obr. 1.1: Chemická struktura PVA (DeMerlis a Schoneker,2003) 6
Obr. 1.2: Chemická struktura PVP (Robinson, 1990) 8
Obr. 1.3: Chemická struktura 2-ethylhexylsalicylátu (Lapczycnski et al., 2007) 9
Obr. 1.4: Chemická struktura 2-ethylhexanolu (Wyatt et al., 1987) 11
Obr. 1.5: Chemická struktura lauramidopropylbetainu (Worthen et al., 2014) 12
Obr. 4.1: Biodegradace PVA kulturou Sphingomonas sp. JK2 v závislosti na míře inokulace 17
Obr. 4.2: Biodegradace PVA kulturou Sphingomonas sp. OT2 v závislosti na míře inokulace 18
Obr. 4.3: Mikrobiální degradace PVP 20
Obr. 4.4: Počty bakterií při růstu kultury Rhodococcus sp. ES 12 na EHS, salicylanu sodném a EHOLu 22
Obr. 4.5: Degradace CAPB kulturami Pseudomonas sp. FV a *Rhizobium* sp. FM 25
Obr. 4.6: Degradace CAPB kulturou Pseudomonas sp. FV a konsorciem obou kultur v nepřítomnosti zdroje dusíku 27

10. CURRICULUM VITAE

Osobní údaje:

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

Dosažené vzdělání:

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

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

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

Znalosti:

Jazykové znalosti: Angličtina – dosažená úroveň C1
Počítačové znalosti – pokročilý uživatel: MS Windows, Internet, MS Office,
Řidičský průkaz: sk. B

Odborná příprava a zkušenosti:

Řešené projekty:

IGA/FT/2015/012
Výzkum procesů ovlivňujících kvalitu potravin a stav životního prostředí
IGA/FT/2016/012
Výzkum procesů ke zlepšení stavu životního prostředí a kvality potravin
IGA/FT/2017/003
Možnosti snížení výskytu nežádoucích látek v potravinách a v životním prostředí
IGA/FT/2018/009
Rozvoj dosavadních poznatků v oblasti snižování nežádoucích látek v životním prostředí a v potravinářství

11. SEZNAM PUBLIKACÍ

Příspěvky v mezinárodních časopisech s impakt faktorem

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

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

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

Příspěvky ve sbornících z konferencí:

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

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

Ing. Markéta Měrková

Biodegradabilita sloučenin využívaných k ochraně a úpravě materiálů

Biodegradability of compounds applied for materials protection and modification

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,

nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: autor

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2018

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7454-738-6