

Studium schopnosti rhodokoků rozkládat sloučeniny s 2-ethylhexylovým řetězcem

Bc. Klára Mikulčíková

Diplomová práce
2019

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Mikulčíková**
Osobní číslo: **T17335**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Studium schopnosti rhodokoků rozkládat sloučeniny s 2-ethylhexylovým řetězcem**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši k zadanému tématu.
2. Provedte pokusy biodegradací uvedených látek kulturami rhodokoků.
3. Výsledky přehledně sepište a práci odevzdejte v řádném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Proislová A., 2018. Studium vodních bakterií, schopných degradace 2-ethylhexylsalicylanu. Diplomová práce, FT UTB ve Zlíně.

[2] Nalli S. et al., 2002. Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Biodegradation. Web of Science*, 13(5), 343-352.

[3] Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect a Medline.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

1. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2019

Ve Zlíně dne 1. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Příjmení a jméno: MIKULČÍKOVÁ KLÁRA

Obor: 102P

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 15.05.2019

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

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

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

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

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

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

³¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Práce byla věnována studiu schopnosti rhodokoků rozkládat sloučeniny s 2-ethylhexylovým řetězcem. Schopnost biodegradace byla ověřována růstem dvou mikrobiálních kultur rodu *Rhodococcus* na jednotlivých substrátech a následným měřením absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometru. U vybraných substrátů se dále měřila kinetika růstu pomocí aparatury OXITOP. V práci bylo zjištěno, že obě kultury jsou schopny růstu při využití Bis(2-Ethylhexyl) adipátu, Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu, 2-Ethylhexyl acetátu a také 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-Ethylhexanoátu) jako jediného zdroje uhlíku energie.

Klíčová slova: biodegradace, degradace, 2-Ethylhexyl acetát, Bis(2-Ethylhexyl) adipát, Bis(2-Ethylhexyl) sebakát, 2-Ethylhexyl glycerol, 2-Ethylhexyl glycidyl ether, 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-Ethylhexanoát)

ABSTRACT

This thesis was focused on a capability of two *Rhodococcus* strains to decompose several synthetic compounds containing 2-ethylhexyl chain. The biodegradation was tested by the growth of both bacterial strains on the substrates individually; the growth was monitored by measuring of optical density using UV-VIS spectrophotometer after incubation. Further, the growth kinetics was measured for selected substrates by the OXITOP apparatus. The obtained results showed that, both strains were able to grow using Bis(2-Ethylhexyl) adipate, Bis(2-Ethylhexyl) sebacate, 2-Ethylhexyl acetate and 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-Ethylhexanoate) as the only carbon and energy source.

Keywords: biodegradation, degradation, 2-Ethylhexyl acetate, Bis(2-Ethylhexyl) adipate, Bis(2-Ethylhexyl) sebacate, 2-Ethylhexyl glycerol, 2-Ethylhexyl glycidyl ether, 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-Ethylhexanoate)

Na tomto místě chci především poděkovat mému vedoucímu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, rady, připomínky, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval při zpracování mé diplomové práce. Zároveň chci poděkovat své rodině, přátelům, všem, kteří mi byli oporou v průběhu celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 MIKROBIÁLNÍ KULTURY AP12 A EHS12	12
2 BAKTERIE RODU RHODOCOCCUS	14
3 CHARAKTERISTIKA LÁTEK.....	16
3.1 2-ETHYLHEXYL ACETÁT.....	16
3.2 BIS(2-ETHYLHEXYL) ADIPÁT	17
3.3 BIS(2-ETHYLHEXYL) SEBAKÁT	18
3.4 2-ETHYLHEXYL GLYCEROL	19
3.5 2-ETHYLHEXYL GLYCIDYL ETHER.....	20
3.6 2,2-ETHYLENEDIOXYDIETHYL BIS(2-ETHYLHEXANOÁT)	21
II PRAKTICKÁ ČÁST	22
4 POUŽITÝ MATERIÁL A METODIKA POKUSŮ.....	23
4.1 POUŽITÉ ŽIVNÉ PŮDY.....	23
4.2 POUŽITÉ ZAŘÍZENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY	23
4.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	23
4.3.1 Použité chemikálie	23
4.3.2 Minerální medium.....	23
4.3.3 Roztok stopových prvků	24
4.3.4 MEM vitamíny	25
4.4 ZKOUŠKY	25
4.4.1 Zkoušky růstu kultur na různých substrátech.....	25
4.4.2 Kinetika růstu kultury AP12 na vybraných substrátech.....	26
4.4.3 Zkouška růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu a Bis(2-Ethylhexyl) adipátu	27
4.4.4 Zkouška růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu za snížené koncentrace, 2-Ethylhexyl acetátu a 2-Ethylhexyl glycidyl etheru.....	28
4.4.5 Zkouška růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl acetátu za snížené koncentrace a Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu a kultury EHS12 na 2-Ethylhexyl acetátu, Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu, 2-Ethylhexyl glycidyl etheru, 2-Ethylhexyl glycerolu a Bis(2-ethylhexyl) adipátu	28
4.4.6 Zkouška růstu kultury AP12 na EDODEBEH a 2-Ethylhexyl glycerolu za snížené koncentrace a kultury EHS12 na EDODEBEH a 2-Ethylhexyl acetátu.....	29
4.4.7 Zkouška růstu kultur AP12 a EHS12 na 2-Ethylhexyl glycerolu za snížené koncentrace	30
4.4.8 Zkouška kinetiky růstu kultury AP12 na různých substrátech s využitím měřících lahví OXITOP.	31
5 VÝSLEDKY.....	33

5.1	RŮST KULTURY AP12 NA 2-ETHYLHEXYL GLYCEROLU A BIS(2-ETHYLHEXYL) ADIPÁTU	33
5.2	RŮST KULTURY AP12 NA 2-ETHYLHEXYL GLYCEROLU ZA SNÍŽENÉ KONCENTRACE, 2-ETHYLHEXYL ACETÁTU A 2-ETHYLHEXYL GLYCIDYL ETHERU	34
5.3	RŮST KULTURY AP12 NA 2-ETHYLHEXYL ACETÁTU ZA SNÍŽENÉ KONCENTRACE, BIS(2-ETHYLHEXYL) SEBAKÁTU A KULTURY EHS12 NA 2-ETHYLHEXYL ACETÁTU, BIS(2-ETHYLHEXYL) SEBAKÁTU, 2-ETHYLHEXYL GLYCIDYL ETHERU, 2-ETHYLHEXYL GLYCEROLU A BIS(2-ETHYLHEXYL) ADIPÁTU	35
5.4	RŮST KULTURY AP12 NA EDODEBEH A 2-ETHYLHEXYL GLYCEROLU ZA SNÍŽENÉ KONCENTRACE A KULTURY EHS12 NA EDODEBEH A 2-ETHYLHEXYL ACETÁTU	37
5.5	RŮST KULTUR AP12 A EHS12 NA 2-ETHYLHEXYL GLYCEROLU ZA SNÍŽENÉ KONCENTRACE	39
5.5.1	Sumarizace výsledků zkoušek ověřujících růst kultur na jednotlivých substrátech	39
5.6	KINETIKA RŮSTU KULTURY AP12 NA RŮZNÝCH SUBSTRÁTECH S VYUŽITÍM MĚŘÍCÍCH LAHVÍ OXITOP	41
5.6.1	Kinetika růstu kultury AP12 na Bis(2-Ethylhexyl) adipátu	42
5.6.2	Kinetika růstu kultury AP12 na Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu	44
5.6.3	Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl acetátu	45
5.6.4	Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu	47
5.6.5	Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycidyl etheru	49
5.6.6	Porovnání růstu kultury AP12 na různých substrátech	50
ZÁVĚR		52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		54
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		58
SEZNAM OBRÁZKŮ		59
SEZNAM TABULEK		60
SEZNAM GRAFŮ		61

ÚVOD

V současné době je lidmi vyráběna celá řada syntetických látek, které se dostávají do životního prostředí buď samotnou výrobou, použitím anebo v podobě odpadů. V životním prostředí se tyto látky mohou hromadit, což může mít při dlouhodobé expozici negativní vliv nejen na životní prostředí, ale i dopad na lidské zdraví. V životním prostředí je však zároveň široké spektrum bakterií, které jsou díky svým rozmanitým vlastnostem schopny tyto látky rozkládat. Nicméně je velmi důležité vědět, zda jsou vyráběné sloučeniny pro běžné bakterie substrátem či nikoliv, neboť v pozitivním případě jsou tyto látky po použití vráceny zpět do koloběhu živin v přírodě.

Proto se studium v rámci této diplomové práce zaměřilo na rozklad látek s 2-ethylhexylovou částí za pomoci bakterií rodu *Rhodococcus*. K ověření biodegradability těchto látek byly použity dvě mikrobiální kultury AP12 a EHS12, které byly již dříve získány v rámci předchozích studií na Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí Fakulty technologické UTB.

Cílem diplomové práce bylo na základě sérií pokusů ověřit a zjistit, zdali jsou tyto bakteriální kultury schopny tyto látky rozkládat, čili zda jsou vybrané látky pro obě mikrobiální kultury růstovým substrátem či nikoliv.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROBIÁLNÍ KULTURY AP12 A EHS12

V této diplomové práci je mimo jiné čerpáno z poznatků, které byly získány v předchozích pracích zabývajících se biodegradabilitou syntetických látek.

Jednou z těchto prací je bakalářská práce Aleny Proislové „Studium mikrobiálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylanu v povrchových vodách“, ve které bylo získáno sedm samostatně rostoucích kultur, které byly od sebe vzájemně odlišné. Izolovanou mikrobiální kulturou, schopnou růstu na 2-ethylhexylsalicylanu (EHS), byla právě kultura AP12 (malá, bílá kolonie), která byla použita v pokusu i v této diplomové práci. Jednotlivé kultury byly v práci Aleny Proislové podrobeny pokusu, zdali jsou schopny rozkladu salicylanu sodného a 2-ethylhexanolu (EHOL), čili jak salicylové, tak ethylhexylové části molekuly EHS. Salicylan sodný využily pro svůj růst čtyři ze sedmi kultur. K těmto kulturám se řadí i kultura AP12. EHOL rozkládala pouze jediná kultura, kultura AP12 nikoliv. Použitím přístroje Micro-oxymax však bylo prokázáno, že EHS je biologicky rozložitelný, neboť došlo v průběhu 30 dní k produkci více jak 60 % oxidu uhličitého. (Proislová, 2016)

S izolovanou kulturou AP12 pracovala Alena Proislová i ve své diplomové práci „Studium vodních bakterií schopných degradace 2-ethylhexylsalicylanu“. Kultura AP12 byla charakterizována jako grampozitivní tyčka, odpovídající zástupcům bakteriálního rodu *Rhodococcus*. Na základě řady pokusů bylo zjištěno, že tato kultura je schopná růstu při teplotách 10 °C až 30 °C na TYA agaru a je relativně odolná vůči vyšším koncentracím soli v prostředí, a to až do koncentrace NaCl 6,5 %. Aby však byla tato kultura schopna využít EHS jako růstový substrát, je vyžadován přídavek MEM vitaminů. Růst je možný při pH v rozmezí 6-9. Na základě zjištění, že je tato kultura schopna využít EHS jako růstový substrát o koncentraci maximálně 350 mg/l, byla v této práci provedena série pokusů, zdali je kultura schopna rozkladu Bis(2-ethylhexyl) ftalátu (DEHP). Provedené pokusy však ukázaly, že DEHP není kulturou využíván jako jediný zdroj uhlíku a energie pro její růst, nicméně několik sérií dalších experimentů naznačilo, že při růstu kultury na EHS dochází i k částečnému rozkladu DEHP. (Proislová, 2018)

Další mikrobiální kulturou, u které bylo prokázáno využití EHS jako růstového substrátu, je kultura získaná v rámci diplomové práce Markéty Jelénkové „Studium bakteriálních kultur schopných rozkladu kosmetických sloučenin“, a to z aktivovaného kalu adaptovaného na 2-ethylhexyl salicylan. Kultura nesoucí pracovní označení EHS12, je oproti kultuře AP12 schopna růstu již při 5 °C, maximální teplotou a přídavkem NaCl se neliší.

Kultura byla rovněž předběžně identifikována jako zástupce rodu *Rhodococcus* nebo *Nocardia* a pro práci byl použit R2A agar. Studium vlastností této kultury se dále zabývala i Markéta Měrková ve své doktorské práci „Biodegradabilita sloučenin využívaných k ochraně a úpravě materiálů“, která zjistila, že kultura EHS12 je schopna využívat jak salicylovou tak i tu 2-ethylhexylovou část molekuly EHS a že je schopna růst i na samotném 2-ethylhexanolu, avšak jeho koncentrace nesmí být rovněž vyšší jak 350 mg/l. Pomocí analýzy 16S rDNA ji autorka identifikovala jako zástupce rodu *Rhodococcus*, s 99% shodou s druhem *R. erythropolis* a několika dalšími kulturami tohoto rodu. Kultura EHS12 je uložena v České sbírce mikroorganismů Brno, pod katalogovým číslem CCM 8808 jako *Rhodococcus* sp. ES12. (Jelénková, 2016; Měrková, 2016)

Z těchto cenných poznatků o jednotlivých mikrobiálních kulturách se vycházelo i při přípravě dílčích pokusů v této diplomové práci. Cílem bylo prověřit, zdali jsou tyto kultury schopny využít jako růstový substrát i jiné látky, obsahující 2-ethylhexylový řetězec, jaké koncentrace takových substrátů jsou pro kultury přijatelné či naopak toxické, anebo zda jej skutečně využívat nedokážou.

2 BAKTERIE RODU RHODOCOCCUS

Na základě dosavadních informací se biodegradace nežádoucích organických látek s použitím různých bakteriálních kmenů rodu *Rhodococcus* jeví jako velmi slibná. Rod *Rhodococcus* je velmi rozšířená skupina bakterií, která je díky svým rozmanitým degradačním schopnostem vhodnými průmyslovými mikroorganismy pro biodegradace a biotransformace mnoha organických a anorganických sloučenin. Tyto bakterie jsou schopny degradovat uhlovodíky s krátkým i dlouhým řetězcem, halogenované uhlovodíky a četné aromatické sloučeniny nebo polycyklické aromatické uhlovodíky. (Martínková a kol., 2009; Larkin et al., 2005)

Schopností rozkladu syntetických látek za přítomnosti rhodokoků se zabývali například ve své práci „Biodegradation of plasticizer by *Rhodococcus rhodochrous*“ Nalli a Cooper. Bakterie byla zkoumána za přítomnosti tří změkčovadel: Bis 2-Ethylhexyl adipátu (BEHA), di(octyl) ftalátu (DOP) a di(octyl) tereftalátu (DOTP). Žádné ze změkčovadel však nebylo degradováno, pokud nebyl přítomen další specifický zdroj uhlíku. Po přidavku hexadekanu byl však BEHA zcela degradován a částečně rozložen byl i DOP a DOTP. Ve všech těchto růstových studiích, kdy bylo změkčovadlo degradováno, se však zvýšila toxicita média. Autoři zjistili, že došlo k akumulaci jednoho nebo dvou meziproductů. Jedním z těchto meziproductů, který byl přítomen u všech třech změkčovadel, byl charakterizován jako kyselina 2-ethylhexanová. Koncentrace této kyseliny se postupným rozkladem změkčovadel zvyšovala, dokud nedošlo k jeho úplné degradaci. Dalším zaznamenaným meziproductem byl 2-ethylhexanol, který byl však zaznamenán pouze v přítomnosti BEHA. 2-ethylhexanol byl pozorován zejména brzy po zahájení rozkladu změkčovadla. Oba meziproducty vykazovaly známky toxicity, jak prokázal i test Microtox. (Nalli et al., 2002)

Další studií prokazující rozklad látek za přítomnosti rhodokoků je práce od H-M. Zhao „Biodegradation pathway of di(2-ethylhexyl) phthalate by a novel *Rhodococcus pyridinivorans* XB and its bioaugmentation for remediation of DEHP contaminated soil“. Bakteriální kmen izolovaný v tomto experimentu byl schopný degradovat některé estery kyseliny ftalové v kontaminované půdě a za optimálních kultivačních podmínek i DEHP. Při koncentraci v rozmezí od 200 mg/l do 400 mg/l došlo k rozkladu látky během 48 hodin. (Zhao et al., 2018).

Rozmanité vlastnosti a schopnosti této bakterie dokazuje i práce od Gongu „Biodegradation and metabolit pathway of nicotine in *Rhodococcus sp.* Y22“. Autor této práce se zabývá rozkladem látek, které jsou produkovány tabákovými výrobky, a to především nikotinem. Získané bakterie byly schopny rozložit nikotin během 2 týdnů. Dále například výzkum L. Chunyana ukázal, že bakteriální kmen *Rhodococcus* je schopen z 88,95 % rozložit chlorimuron-ethyl, který se nejčastěji používá jako herbicidní přípravek. (Gong et al., 2019; Chunyan et al.; 2016)

3 CHARAKTERISTIKA LÁTEK

V této diplomové bylo použito 6 látek, jejichž molekula obsahuje 2-ethylhexylový řetězec. Všechny tyto látky se dostávají do životního prostředí výrobou a použitím určitých výrobků nebo v podobě odpadů, kde se můžou hromadit. Následující podkapitoly jsou věnovány charakteristice těchto látek.

3.1 2-Ethylhexyl acetát

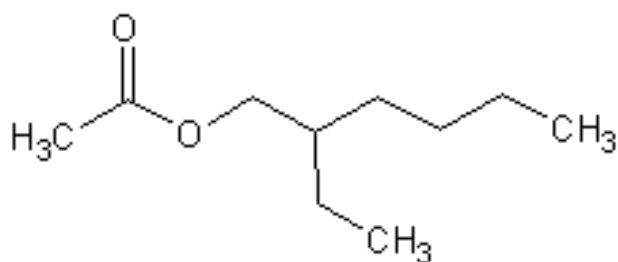
2-Ethylhexyl acetát (EHA) je čirá, ve vodě obtížně rozpustná látka s charakteristickým esterovým zápachem. Látka je snadno mísitelná se všemi běžnými rozpouštědly, jako jsou např. alkoholy, aldehydy nebo aromatické uhlovodíky. Dalšími názvy této látky jsou 2-ethylhexyl ester kyseliny octové, 2-ethyl-1-hexanol acetát. (Pubchem, 2019)

2-ethylhexyl acetát má široké spektrum použití. Nejčastěji se však používá jako přísada při výrobě rozpouštědel, laků, nátěrů nebo čisticích prostředků. Hojně je používán i v kožedělném průmyslu, protože zlepšuje fyzikální odolnost kůže a kožených materiálů. Dále se používá jako meziproduct v petrochemickém průmyslu. (Chemoxy, 2019)

Samotná látka nebo její výpary mohou při expozici mírně dráždit oči, pokožku i dýchací ústrojí. Evropská agentura pro chemické látky (ECHA), která hraje stěžejní roli při uplatňování zásadních právních předpisů EU týkajících se chemických látek ve prospěch lidského zdraví a životního prostředí zpracovala dokument, který hodnotí tuto látku podle nařízení REACH. Z hodnocení bylo zjištěno, že je tato látka ve vodním prostředí biologicky odbouratelná (látka byla po 28 dnech ze 70 % rozložena). Ačkoliv je látka biodegradabilní, hodnocení odhalilo akutní toxicitu pro vodní organismy (LC₅₀ 96h 8,27 mg/l). Níže uvedená tabulka znázorňuje fyzikální vlastnosti této látky. (ECHA, 2016)

Tab. 1 Fyzikální vlastnosti 2-Ethylhexyl acetátu (Pubchem, 2019)

Sumární vzorec	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
Molekulární hmotnost	172,268 g/mol
Bod varu	199 °C
Rozpustnost ve vodě	0,088 g/l
Hustota (při 20 °C)	0,872 g.ml ⁻¹



Obr. 1 Strukturální vzorec 2-Ethylhexyl acetátu

3.2 Bis(2-Ethylhexyl) adipát

Bis(2-Ethylhexyl) adipát, diester 2-ethylhexanolu a kyseliny adipové, je bezbarvá až světle nažloutlá, ve vodě obtížně rozpustná až nerozpustná kapalina s mírným zápachem. Látka je rovněž označována jako Di(2-ethylhexyl) adipate, Diethylhexyl adipate, dioctyl adipate nebo zkratkou DEHA. (Pubchem, 2019)

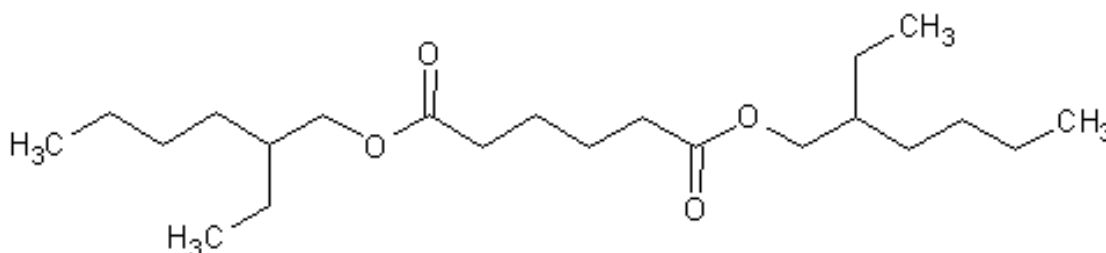
Nejčastěji se používá jako přísada při výrobě lepidel, tmelů, hraček, kabelů a změkčovadel nebo jako přísada při výrobě autokosmetiky. Rovněž se uplatňuje jako změkčovadlo při výrobě ohebných polyvinylchloridových produktů, zejména potravinářských folií. V souvislosti s obsahem DEHA v potravinářských foliích provedl Petersen a kol. studii, zdali dochází k přenosu obsažených látek na potraviny. Pokus byl aplikován na 2 druhy nejprodávanějších sýrů, které jsou běžně dostupné v Dánských prodejnách (Whole matured Danbo 45+ a Whole matured Danbo 30+). Vzorky byly zabaleny do potravinářské fólie a simuloval se proces použití jako v prodejnách. Přenos této látky byl potvrzen, když v průběhu dvou hodin při teplotě 5 °C došlo k přenosu 45 mg/kg DEHA na sýr. Tato látka se přidává i do kosmetických přípravků nebo přípravků osobní péče. (Petersen et al., 1995)

Bylo provedeno i několik studií, zdali má tato látka negativní vliv na lidské zdraví. Ve výzkumu, který provedl Lambert, bylo prokázáno, že tato látka způsobuje intrauterinní retardaci plodu u potkanů a snižuje plodnost u myši. Dále bylo prokázáno, že je mírně toxická, pokud je látka podávána intravenózně. Při přímém styku s touto látkou dochází především k podráždění očí a pokožky. (Lambert et al., 1987)

Tab. 2 Fyzikální vlastnosti Bis(2-ethylhexyl) adipátu (Pubchem, 2019)

Sumární vzorec	$C_{22}H_{42}O_4$
Molekulární hmotnost	370,574 g/mol

Bod varu	175 °C
Rozpustnost ve vodě	-
Hustota (při 25 °C)	0,925 g.ml-1



Obr. 2 Strukturální vzorec Bis(2-Ethylhexyl) adipátu

3.3 Bis(2-Ethylhexyl) sebakát

Bis(2-Ethylhexyl) sebakát (DEHSE) je nažloutlá, ve vodě nerozpustná organická sloučenina s mírným zápachem. Je známa i pod dalšími názvy, jako jsou dioctyl sebakát, Bisoflex, Bis(2-Ethylhexyl) decanedioate, Bis(2-Ethylhexyl) sebacete. (Pubchem, 2019)

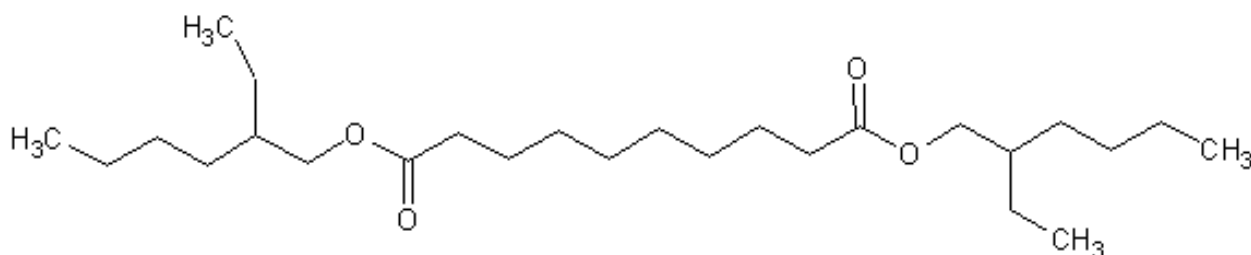
Látka se používá zejména jako plastifikátor při výrobě PVC a jeho komponent, dále při výrobě nitrocelulózy, styrenové pryskyřice nebo i jiných syntetických sloučenin. Rovněž je DEHSE přítomen v celé řadě běžně dostupných výrobků: mycí a čisticí prostředky, přípravky na ochranu rostlin, mazadla a tuky, stavební materiál, textilní a kožené výrobky, barvy a laky, autokosmetika nebo vonné látky a osvěžovače vzduchu. (ECHA, 2019)

Na základě hodnocení dle OECD je látka hodnocena jako biologicky rozložitelná, neboť dle oxidu uhličitého došlo po 28 dnech k rozkladu 84,6 % látky. Toxicita u této látky nebyla prokázána. Při přímém styku způsobuje látka podráždění očí, alergické projevy u pokožky či podráždění dýchacího traktu. Fyzikální vlastnosti látky jsou uvedeny v následující tabulce č. 3. (ECHA, 2019)

Tab. 3 Fyzikální vlastnosti Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu (Pubchem, 2019)

Sumární vzorec	$C_{26}H_{50}O_4$
Molekulární hmotnost	426,682 g/mol

Bod varu	256 °C
Rozpustnost ve vodě	-
Hustota (při 20 °C)	0,912 g.ml ⁻¹



Obr. 3 Strukturální vzorec Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu

3.4 2-Ethylhexyl glycerol

Látka pod zkratkou EHGL je také označována jako ethylhexylglycerin, 3-(2-Ethylhexyloxy)-1,2-propanediol či Octoxyglycerin. Jde o bezbarvou látku, bez zápachu a rozpustnou ve vodě. Spolehlivě inhibuje zápach ve výrobcích, protože působí inhibičně na bakterie, kvasinky a plísně. (Kratochvíl, 2019)

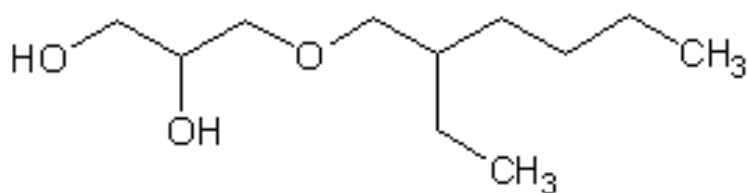
V nízkých koncentracích tak působí jako bezpečný konzervant, který je vhodnou alternativou za parabeny. Jedná se o jednu z nejběžnějších látek, která je obsažena ve výrobcích určených pro osobní péči, jako jsou především deodoranty, kondicionéry, ochranné sluneční přípravky nebo v krémech určených pro citlivou pokožku. (Kratochvíl, 2019)

Ačkoliv je ethylhexylglycerin považován za zdravotně nezávadný, bylo ve výzkumu Linsena a Goossense zjištěno, že může způsobit alergickou dermatitidu. Tabulka č. 4 představuje fyzikálně chemické vlastnosti této látky. (Linsen et al., 2002)

Tab. 4 Fyzikální vlastnosti 2-Ethylhexyl glycerolu (Pubchem, 2019)

Sumární vzorec	C ₁₁ H ₂₄ O ₃
Molekulární hmotnost	204,31 g/mol
Bod varu	325 °C
Rozpustnost ve vodě	1,8 g/l

Hustota (při 20 °C)	0,962 g.ml ⁻¹
---------------------	--------------------------



Obr. 4 Strukturní vzorec 2-Ethylhexyl glycerolu

3.5 2-Ethylhexyl glycidyl ether

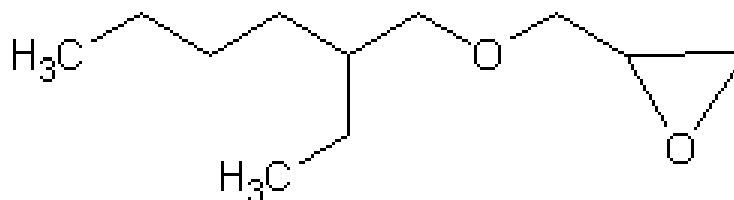
2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE) je bezbarvá, ve vodě obtížně rozpustná kapalina. Pod dalším názvem je látka známá jako 2-(2-ethylhexoxymethyl) oxirane. (Pubchem, 2019)

EHGE se uplatňuje v řadě produktů, jako jsou například nátěrové hmoty, plniva nebo tmely. Své využití našla tato látka i ve stavebnictví (omítky) a chemickém průmyslu, kde se přidává jako meziprodukt při výrobě barev. (ECHA, 2019)

Při přímém kontaktu s touto látkou dochází k podráždění očí, kožním alergickým reakcím nebo podráždění dýchacího traktu. Hodnocení podle OECD shledala tuto látku ve vodním prostředí za biologicky neodbouratelnou, protože po 28 dnech nedošlo k žádnému rozkladu. (ECHA, 2019)

Tab. 5 Fyzikální vlastnosti 2-Ethylhexylglycidyl etheru (Pubchem, 2019)

Sumární vzorec	C ₁₁ H ₂₂ O ₂
Molekulární hmotnost	186,295 g/mol
Bod varu	112 °C
Rozpustnost ve vodě	0,143 g/l
Hustota (při 25 °C)	0,893 g.ml ⁻¹



Obr. 5 Strukturální vzorec 2-Ethylhexyl glycidyl etheru

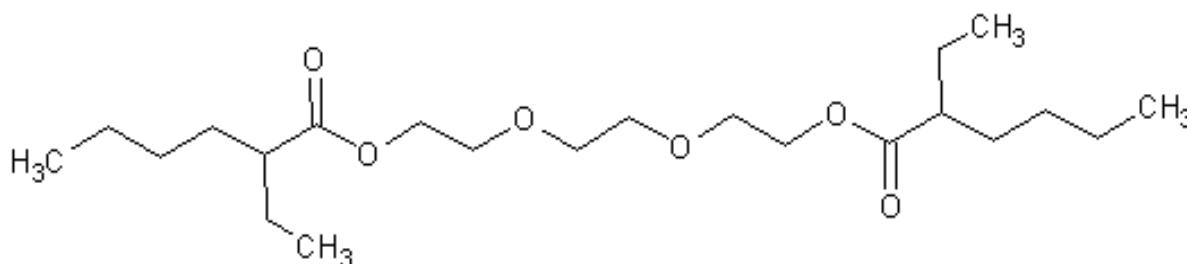
3.6 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-Ethylhexanoát)

Tato chemická látka známá pod dalším názvem Triethylene glykol bis(2-ethylhexanoát) a pod zkratkou EDODEBEH je čirá tekutina bez zápachu, nerozpustná ve vodě, ale dobře v organických rozpouštědlech. (Celanese, 2019)

Díky svým vlastnostem jako je vysoký bod varu, hydrofobita, průhlednost, aj. je tato látka používána při výrobě vrstvených bezpečnostních skel u automobilů. Dále se používá jako přísada do lepidel, barev nebo nátěrů, stavebních materiálů, textilních a kožených výrobků nebo plastových a pryžových výrobků. (Celanese, 2019; Pubchem, 2019)

Tab. 6 Fyzikální vlastnosti 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-Ethylhexanoátu) (Pubchem, 2019)

Sumární vzorec	$C_{22}H_{42}O_6$
Molekulární hmotnost	402,572 g/mol
Bod varu	381 °C
Rozpustnost ve vodě	-
Hustota (při 25 °C)	0,893 g.ml ⁻¹



Obr. 6 Strukturální vzorec 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-ethylhexanoátu)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 POUŽITÝ MATERIÁL A METODIKA POKUSŮ

V diplomové práci byly použity suspenze mikrobiálních kultur AP12 a EHS12 ve sterilním fyziologickém roztoku. Obě kultury byly získány už dříve v průběhu kvalifikačních prací prováděných na FT UTB ve Zlíně a byly uchovány k opětovnému použití v glycerolu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1 Použité živné půdy

Na základě zkušeností z předchozích prací byl použit Trypton yeast extract agar (TYA agar, Himedia Indie).

4.2 Použité zařízení a laboratorní pomůcky

Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky TECAN Sunrise; Aseptický laminární box Telstar; Laboratorní sterilizátory; Laboratorní třepačka vratná; Chladnička; aparatura OXITOP.

Mikrotitrační destičky (96 jamek); dávkovače; pipety; sterilní špičky; sterilní kličky; sterilní laboratorní sklo; běžné laboratorní sklo; odměrné válce, plastové Petriho misky.

4.3 Použité chemikálie a roztoky

V následujících 4 podkapitolách jsou uvedeny veškeré použité chemikálie a roztoky.

4.3.1 Použité chemikálie

Použité pracovní látky 2-Ethylhexyl acetát, 2-Ethylhexyl glycidyl ether, Bis(2-Ethylhexyl) adipát, Bis(2-Ethylhexyl) sebakát, 2-Ethylhexyl glycerol a 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-ethylhexanoát) byly nakoupeny od společnosti TCI (Tokyo Chemical Industry CO., LTD). Ostatní použité látky pochází od dodavatelů základních laboratorních potřeb.

4.3.2 Minerální medium

Pro přípravu 200 ml minerálního media bylo odměrným válcem odměřeno 170 ml destilované vody a postupně přidány další složky dle pořadí v tabulce. Vše bylo důkladně promícháno a uloženo ke sterilizaci do autoklávu. Hodnota pH se u MM pohybovala v rozmezí 7,4 - 7,6.

Tab. 7 Složení minerálního média

Složka	Objem (ml)
Destilovaná voda	170
Roztok A (9,07 g KH_2PO_4 /1000 ml)	4
Roztok B (23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /1000 ml)	16
Roztok stopových prvků	0,3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)	2
$\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($2,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)	2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)	2
NH_4Cl ($30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)	2
NaCl ($50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)	1

4.3.3 Roztok stopových prvků

Roztok stopových prvků byl připraven navážením a následným rozpuštěním daných látek v 1000 ml destilované vody dle níže uvedené tabulky.

Tab. 8 Složení roztoku stopových prvků

Stopové prvky	Hmotnost (g)
$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,043
H_3BO_3	0,057
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,043
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,037
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,040

4.3.4 MEM vitamíny

Přídavek vitaminového doplňku stimuluje růst a prodlužuje životaschopnost buněk v kultuře. Roztok MEM vitaminů byl předem sterilizován filtrací přes filtry Ahlstrom Relia Prep™ CA s velikostí pórů 0,20 µm a uchován při -18 °C. Ve všech pokusech byl roztok po rozmrazení nadávkován v poměru 0,1 ml do 100 ml minerálního média. MEM vitamíny byly pořízeny u společnosti Biosera.

Tab. 9 Složení roztoku MEM vitaminů (Biosera, 2019)

Vitamíny	Koncentrace (mg/l)
Cholin chlorid	100
D-Ca-Pantotenan vápenatý	100
Kyselina listová	100
Niacinamid	100
Pyridoxal hydrochlorid	100
Ryboflavin	10
Thiaminhydrochlorid	100
i-inositol	200

4.4 Zkoušky

V této diplomové práci byla provedena série pokusů ověřující růst mikrobiálních kultur AP12 a EHS12 na jednotlivých substrátech. Níže uvedený postup byl aplikován u všech pokusů. Přesné objemy a koncentrace použitých substrátů a roztoků jsou uvedeny u jednotlivých pokusů.

4.4.1 Zkoušky růstu kultur na různých substrátech

Nejprve bylo připraveno požadované množství minerálního média, které bylo namícháno dle tabulky č. 7 a následně sterilizováno v laboratorním autoklávu při teplotě 121 °C. Po vychladnutí bylo MM dle potřeby asepticky rozlito do sterilních 100 ml kultu-

vačních lahví. Ve zbytku MM byla vždy změřena absorbance při vlnové délce 600 nm v mikrotitrační destičce (200 μ l) na spektrofotometru. Následně bylo potřeba připravit suspenzi mikrobiální kultury ve sterilním fyziologickém roztoku, který byl připraven předem. Z Petriho misky byla vyžíhanou kličkou odebrána požadovaná kultura, která byla rozmíchána ve zkumavce s obsahem sterilního fyziologického roztoku. Patříčné množství této suspenze (obvykle 100 μ l na 100 ml média) bylo pak nadávkováno do kultivačních lahví obsahujících MM a MEM vitaminy. Po zaočkování lahví, byl do těchto lahví dále přidán substrát o vypočteném objemu tak, aby bylo dosaženo určité koncentrace, a to vždy ve dvou paralelních lahvích. Každý odběr substrátu ze zásobní lahvičky bylo nutné provést novou sterilní špičkou. Rovněž byly vyčleněny lahve, kam nebyl přidán substrát nebo suspenze. Tyto lahve sloužily jako slepý pokus nebo negativní kontrola. V některých pokusech byly použity i pozitivní kontroly, tj. naočkování zkoumaných kultur do média obsahujícího již prověřený růstový substrát; tyto kontroly byly prováděny pro potvrzení jak životaschopnosti kultur, tak správné přípravy médií.

Jakmile byly lahve naplněny MM, MEM vitaminy, suspenzí a substrátem (vždy v tomto pořadí) byla zahájena kultivace, která probíhala po dobu až 14 dní. Všechny tyto lahve byly umístěny do místnosti bez přístupu světla, se stálou teplotou 25 °C na vratnou laboratorní třepačku. Lahve byly během kultivace pravidelně vizuálně kontrolovány, zdali byl zahájen rozklad či nikoliv. V pozitivním případě došlo k růstu kultury, který se projevil zjevným zákalem. Po uplynutí 14 dní kultivace byly lahve ze třepačky sejmuty a znovu vizuálně zkontrolovány. Následně bylo z každé lahve odebráno 200 μ l jejího obsahu, který byl změřen na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm (vždy provedeno několik paralelních měření). Z naměřených dat bylo možné vyhodnotit, zdali je látka využívána jako růstový substrát či nikoliv. V případě, že k rozkladu nedošlo, nebo byly výsledky nejasné, byl pokus zopakován za snížené koncentrace substrátu.

4.4.2 Kinetika růstu kultury AP12 na vybraných substrátech

U vybraných substrátů se dále zjišťovala kinetika růstu. Biochemická spotřeba kyslíku (BSK) se měřila pomocí aparatury OXITOP. Měření OXITOP je založeno na podtlaku v uzavřeném systému. Mikroorganismy, které se nachází ve vzorku, spotřebovávají kyslík a zároveň produkují CO₂. Oxid uhličitý se přitom adsorbuje na sorbent (upravený NaOH). Tím vzniká podtlak, podle kterého se může odečíst přímo naměřená hodnota BSK v mg/l. Pro tento pokus byla zvolena pouze kultura AP12. Nejprve bylo potřeba namíchat potřebný

objem minerálního média a rovněž jej vysterilizovat v laboratorním autoklávu. Jako u předchozích pokusů byl nutný přídavek MEM vitaminů. MM bylo následně rozlito do připravených sterilizovaných lahví s míchadly. Poté byly lahve zaočkovány suspenzí mikrobiální kultury AP12, která byla připravena dopředu. Na závěr se přidaly jednotlivé substráty a lahve se uzavřely hlavicí aparatury OXITOP. Každá z hlavic obsahovala granule hydroxidu sodného, sloužící jako sorbent. Měření probíhalo za stálé teploty a míchání po dobu 14 dní. Lahve byly během tohoto procesu vizuálně pozorovány, zdali dochází k rozkladu a zároveň zdali je tento proces zachycen i na přístroji. Po ukončení měření byla data z přístroje přenesena do počítače. Z dat bylo možné vyčíst, jestli dochází ke spotřebě kyslíku a produkci oxidu uhličitého.

4.4.3 Zkouška růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu a Bis(2-Ethylhexyl) adipátu

Pro ověření růstu kultury AP12 na jednotlivých substrátech bylo 150 ml MM s přídavkem 150 μ l MEM vitaminů asepticky rozlito do 8 sterilních lahví po 15 ml. Dále byla připravena suspenze kultury AP12 ve sterilním fyziologickém roztoku. Dle následující tabulky bylo poté do lahví přidáno:

Tab. 10 Zkouška růstu kultury AP12 na EHGL a DEHA

Označení vzorku	Substrát	Koncentrace (mg/l)	Objem substrátu (μ l)	Suspenze AP12(μ l)
1;2	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	400	6	15
3;4	Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA)	400	6,5	15
5;6	bez substrátu	-	-	15
7;8	Bis(2-Ethylhexyl) adipát	400	6,5	-

Lahve 5,6,7,8 sloužily jako slepý pokus. Během kultivace byly lahve vizuálně pozorovány. Po 7 dnech kultivace byl obsah lahve přeměřen na spektrofotometru.

4.4.4 Zkouška růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu za snížené koncentrace, 2-Ethylhexyl acetátu a 2-Ethylhexyl glycidyl etheru

200 ml MM s přidavkem 200 μ l MEM vitaminů bylo asepticky rozlito do 10 sterilních kultivačních lahví po 20 ml. Taktéž byla připravena suspenze mikrobiální kultury AP12 ve sterilním fyziologickém roztoku. Po nadávkování suspenze bylo do lahví následně přidáno:

Tab. 11 Zkouška růstu kultury AP12 na EHGL za snížené koncentrace EHA a EHGE

Označení vzorku	Substrát	Koncentrace (mg/l)	Objem substrátu (μ l)	Suspenze AP12 (μ l)
1;2	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	200	4	20
3;4	2-Ethylhexyl acetát (EHA)	250	5,7	20
5;6	2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE)	250	5,6	20
7;8	2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE)	250	5,6	-
9;10	bez substrátu	-	-	20

Lahve s označením 7 a 8 sloužily jako slepý pokus. Během 14 dní kultivace byly lahve vizuálně sledovány.

4.4.5 Zkouška růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl acetátu za snížené koncentrace a Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu a kultury EHS12 na 2-Ethylhexyl acetátu, Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu, 2-Ethylhexyl glycidyl etheru, 2-Ethylhexyl glycerolu a Bis(2-ethylhexyl) adipátu

Minerální medium o objemu 400 ml s přidavkem 400 μ l MEM vitaminů bylo asepticky rozlito do 16 sterilních kultivačních lahví po 20 ml do každé. Dále byly připraveny suspenze mikrobiálních kultur, které byly dle laboratorního plánu nadávkovány do příslušných lahví. Poté byly přidány jednotlivé substráty.

Tab. 12 Zkouška růstu kultury AP12 na EHA za snížené koncentrace, DEHSE a kultury EHS12 na EHA, DEHSE, EHGL a DEHA

Označení vzorku	Substrát	Koncentrace (mg/l)	Objem substrátu (μl)	Suspenze AP12 (μl)
1;2	2-Ethylhexyl acetát (EHA)	175	4	20
3;4	Bis(2-Ethylhexyl) sebakát (DEHSE)	400	8,7	20
16	Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA)	400	8,7	20
Označení vzorku	Substrát	Koncentrace (mg/l)	Objem substrátu (μl)	Suspenze EHS12 (μl)
5;6	2-Ethylhexyl acetát (EHA)	175	4	20
7;8	Bis(2-Ethylhexyl) sebakát (DEHSE)	400	8,7	20
9;10	2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE)	200	4,6	20
11;12	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	200	4	20
13;14	Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA)	400	8,7	20
15	bez substrátu	-	-	20

Vzorek s označením 16 sloužil jako pozitivní kontrola. Kultivace probíhala po dobu 14 dní a během tohoto procesu byly všechny lahve vizuálně pozorovány.

4.4.6 Zkouška růstu kultury AP12 na EDODEBEH a 2-Ethylhexyl glycerolu za snížené koncentrace a kultury EHS12 na EDODEBEH a 2-Ethylhexyl acetátu

Pro tuto zkoušku růstu kultur AP12 a EHS12 bylo připraveno 200 ml MM s obsahem 200 μl MEM vitaminů a následně asepticky rozlito do 10 sterilních inkubačních lahví po 20 ml. Příslušné lahve s obsahem MM a MEM vitaminů byly vyočkovány kulturami AP12 a EHS12. Poté byly do lahví nadávkovány jednotlivé substráty dle níže uvedené tabulky.

Tab. 13 Zkouška růstu kultur AP12 na EDODEBEH a EHS12 na EHGL za snížené koncentrace a EDODEBEH

Označení vzorku	Substrát	Koncentrace (mg/l)	Objem substrátu (μl)	Suspenze AP12(μl)
5;6	Triethylene glykol bis(2-ethylhexanoát) (EDODEBEH)	400	8,2	20
7;8	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	100	2	20
9	Bis(2-ethylhexyl) adipát (DEHA)	400	8,7	20
10	bez substrátu	-	-	20
Označení vzorku	Substrát	Koncentrace (mg/l)	Objem substrátu (μl)	Suspenze EHS12 (μl)
1;2	2-Ethylhexyl acetát (EHA)	100	2,3	20
3;4	Triethylene glykol bis(2-ethylhexanoát) (EDODEBEH)	400	8,2	20

Láhev s označením vzorku 9 sloužila jako pozitivní kontrola a láhev 10, která neobsahovala žádný substrát, sloužila jako negativní kontrola. Všechny lahve byly uloženy k 14 denní kultivaci a průběžně vizuálně kontrolovány.

4.4.7 Zkouška růstu kultur AP12 a EHS12 na 2-Ethylhexyl glycerolu za snížené koncentrace

Po sterilizaci 200 ml MM bylo asepticky přidáno 200 μl MEM vitaminů a následně asepticky nadávkováno do 4 sterilních lahví o objemu 250 ml po 40 ml (vzorek 1, 2, 3 a 4) a do 4 sterilních lahví o objemu 100 ml po 10 ml. Následně byly všechny zaočkovány danou suspenzí. Po očkování byl do lahví přidán substrát dle následující tabulky.

Tab. 14 Zkouška růstu kultur AP12 a EHS12 na EHGL za snížené koncentrace

Označení vzorku	Substrát	Koncentrace (mg/l)	Objem substrátu (μl)	Suspenze AP12(μl)
3;4	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	100	4	20
6	Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA)	400	4,4	20

8	bez substrátu	-	-	20
Označení vzorku	Substrát	Koncentrace (mg/l)	Objem substrátu (μl)	Suspenze EHS12 (μl)
1;2	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	100	4	20
5	Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA)	400	4,4	20
7	bez substrátu	-	-	20

Lahve se vzorkem č. 5 a 6 sloužily u obou kultur jako pozitivní kontrola. Vzorky v lahvích s označením 7 a 8 neobsahovaly substrát, čili sloužily jako negativní kontrola. Všechny lahve byly kultivovány po dobu 14 dní na laboratorní třepačce. Během kultivace byly všechny lahve vizuálně pozorovány.

4.4.8 Zkouška kinetiky růstu kultury AP12 na různých substrátech s využitím měřících lahví OXITOP.

Pro tuto zkoušku bylo potřeba nejprve nachystat 1000 ml minerálního média. Po namíchání a sterilizaci, bylo minerální medium asepticky rozlito do 3 lahví a poté byly přidány MEM vitaminy, a to následovně: 2 x 350 μl a 1 x 300 μl. Poté bylo provedeno zaočkování lahví suspenzí mikrobiální kultury AP12: 2 x 700 μl a 1 x 600 μl. Do předem sterilizovaných 12 lahví s míchadly o objemu 250 ml bylo do každé z těchto lahví asepticky rozlito 82 ml zaočkovaného a vitamíny obohaceného MM. Na závěr byl do každé lahve přidán substrát, jak lze vidět na následující tabulce.

Tab. 15 Zkouška kinetiky růstu kultury AP12 na různých substrátech s využitím měřících lahví OXITOP

Označení vzorku	Substrát	Koncentrace (mg/l)	Objem substrátu (μl)
1;2	bez substrátu	-	-
3;4	Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA)	100	8,8
5;6	Bis(2-Ethylhexyl) sebakát (DEHSE)	100	9,1

7;8	2-Ethylhexyl acetát (EHA)	100	9,4
9;10	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	100	8,5
11;12	2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE)	100	9,2

Všechny lahve byly uzavřeny hlavicí aparatury OXITOP a umístěny na laboratorní magnetickou míchačku. Data byla zaznamenávána každou hodinu po dobu 14 dní za stálého míchání.

5 VÝSLEDKY

Následující podkapitoly jsou věnovány výsledkům měření z jednotlivých pokusů ověřujících růst mikrobiálních kultur AP12 a EHS12 na vybraných substrátech.

5.1 Růst kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu a Bis(2-Ethylhexyl) adipátu

Cílem tohoto pokusu bylo ověřit, zdali je kultura AP12 schopná využívat pro svůj růst EHGL a DEHA. Již po 48 hodinách kultivace bylo možné pozorovat zřetelný zákal u obou paralelních lahví obsahujících jako substrát Bis(2-Ethylhexyl) adipát. Přítomné byly nejprve vločky s bakteriální biomasou, které však šly po delší době roztřepat. Po 72 hodinách kultivace bylo už vloček přítomno méně a byla přítomna spíše suspenze.

Naopak tomu však bylo u lahví s obsahem 2-Ethylhexyl glycerolu, kde ani po 7 dnech kultivace nebylo možné pozorovat zákal, což se později potvrdilo i při měření na spektrofotometru. Absorbance byla měřena po 7 dnech kultivace.

Tab. 16 Růst kultury AP12 na EHGL a DEHA

Kultura AP12			MM
Substrát	Označení vzorku	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀
2-Ethylhexyl glycerol (EHGL, 400 mg/l)	1	0,048	0,033
	2	0,048	
Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA; 400 mg/l)	3	0,561	
	4	0,563	

Jak ukázaly výsledky měření, mikrobiální kultura AP12 je schopna využít Bis(2-Ethylhexyl) adipát jako svůj růstový substrát v koncentraci 400 mg/l, zatímco 2-Ethylhexyl glycerol nikoliv. Nepředpokládalo se, že bude EHGL pro mikrobiální kulturu toxický, proto byl pokus nasazen ještě jednou za snížené koncentrace.

5.2 Růst kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu za snížené koncentrace, 2-Ethylhexyl acetátu a 2-Ethylhexyl glycidyl etheru

Jak bylo zjištěno u předchozího pokusu, koncentrace EHGL 400 mg/l se jevila jako příliš vysoká na to, aby jej byla kultura AP12 schopna rozložit. Cílem tohoto pokusu bylo tedy ověřit, zdali snížením koncentrace dojde k rozkladu substrátu. Koncentrace EHGL byla proto snížena na polovinu tj. 200 mg/l. Obě lahve s obsahem EHGL byly po 7 dnech inkubace zkontrolovány, avšak ani u jedné nebyl pozorován žádný zákal coby průkaz růstu kultury. Po 14 dnech kultivace byl obsah obou lahví opět vizuálně zkontrolován a následně přeměřen na spektrofotometru.

Další látka, na které se ověřoval růst mikrobiální kultury AP12, byl EHA. Rozklad EHA a růst kultury byl znatelný pouze u jedné z lahví, kdy vzorek č. 4 měl na konci kultivace podobu husté suspenze a vzorek č. 3 nikoliv. Což bylo prokázáno i na spektrofotometru, kdy byla po 14 dnech kultivace přeměřena absorbance. Přítomnost bakterií však byla potvrzena u obou lahví, a to vyočkováním bakteriologickou kličkou na Petriho misky s TYA agarem. Toto vyočkování jednak ukázalo, že láhev č. 4 nebyla kontaminována jinou kulturou a jednak to, že kultura AP12 skutečně nebyla schopna v lahvi č. 3 růst.

Výsledek růstu kultury AP12 na EHGE byl podobný jako u EHGL. Ačkoliv byla přítomnost inokula po kultivaci potvrzena následným vyočkováním z obou lahví na Petriho misky, kultura AP12 EHGE jako růstový substrát nevyužila.

Tab. 17 Růst kultury AP12 na EHGL za snížené koncentrace, EHA a EHGE

Kultura AP12			MM
Substrát	Označení vzorku	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀
2-Ethylhexyl glycerol (EHGL; 200 mg/l)	1	0,038	0,0365
	2	0,037	
2-Ethylhexyl acetát (EHA; 250 mg/l)	3	0,038	
	4	0,259	
2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE; 250 mg/l)	5	0,054	
	6	0,038	

Výsledky měření absorpance EHGL jasně ukázaly, že tato látka není mikrobiální kulturou AP12 využívána k růstu. Koncentrace EHGL proto byla v dalším pokusu snížena na 175 a poté i na 100 mg/l.

Nepravidelný a pomalý růst kultury AP12 na EHA mohl naznačovat, že koncentrace EHA 250 mg/l je pro studovanou kulturu hraniční a proto byla zkouška růstu kultury AP12 na EHA znovu zopakována, za dále snížené koncentrace.

Díky získaným výsledkům z měření absorpance, bylo možno utvořit závěr, že kultura není schopna využít 2-Ethylhexyl glycidyl ether jako růstový substrát, neboť použitá koncentrace této látky není pro mikrobiální kulturu AP12 toxická, protože EHGE je v této koncentraci ve vodě prakticky nerozpustný.

5.3 Růst kultury AP12 na 2-Ethylhexyl acetátu za snížené koncentrace, Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu a kultury EHS12 na 2-Ethylhexyl acetátu, Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu, 2-Ethylhexyl glycidyl etheru, 2-Ethylhexyl glycerolu a Bis(2-Ethylhexyl) adipátu

Na základě nejednoznačných výsledků ověřujících růst kultury AP12 na EHA, byl pokus proveden ještě jednou. Koncentrace EHA byla snížena na 175 mg/l. Po 5 dnech od nastavení pokusu byl zjevný zákal pouze u jedné z lahví. Po dalších 2 dnech byly lahve znovu vizuálně zkontrolovány, ale k růstu kultury u druhé lahve nedošlo. Proto byly lahve znovu vyočkovány. Po uplynutí dalších 7 dní byl zřetelný zákal již u obou lahví, jak dokazují i výsledky ze spektrofotometru. Absorpance byla měřena po 14 dnech od nasazení pokusu. Pomalejší a nepravidelný růst byl pravděpodobně způsoben opět tím, že je EHA ještě pořád v koncentraci 175 mg/l mírně toxický, neboť má strukturu podobou jako jiná rozpouštědla, např. ethyl acetát nebo butyl acetát, které jsou v průmyslu pro své rozpouštědlové vlastnosti běžně používané.

Pozitivní výsledky přinesla i zkouška ověřující růst mikrobiální kultury AP12 na DEHSE. Jelikož se DEHSE svou strukturou podobá DEHA, byl podobný výsledek očekáván. Zakalení obou lahví proběhlo poměrně rychle, a to již po 5 dnech od nasazení pokusu.

Dále bylo cílem ověřit růst mikrobiální kultury EHS12 na jednotlivých substrátech. Na základě předchozích zkušeností při ověřování růstu kultury AP12 na EHA, byla

pro zkoušku růstu EHS12 na EHA použita přímo nižší koncentrace tj. 175 mg/l. Průběh rozkladu EHA touto kulturou byl naprosto totožný s průběhem rozkladu kulturou AP12. Zpočátku byla zakalena pouze jedna z paralelních lahví a až po 14 dnech inkubace se zákal projevil v obou lahvích. To dokazuje i následující tabulka obsahující naměřené hodnoty absorbancí.

Jako růstový substrát se pro kulturu EHS12 jednoznačně jevil DEHSE o koncentraci 400 mg/l i DEHA s koncentrací 400 mg/l. U obou substrátů byl zahájen rozklad během prvních 5 dní od nastavení pokusu. Jednoznačné výsledky ukazují i data získaná při měření na spektrofotometru.

Zkouška růstu kultury EHS12 na EHGL a EHGE ukázala, že ani tato kultura není schopná využít tyto substráty jako jediný zdroj uhlíku. Lahve byly rovněž pravidelně vizuálně kontrolovány, avšak bez jakýchkoliv známek růstu i po 14 dnech kultivace. To potvrdily i výsledky z měření na spektrofotometru na konci pokusu.

Tab. 18 Růst kultury AP12 na EHA za snížené koncentrace a DEHSE a růst kultury EHS12 na EHA, DEHSE, EHGE, EHGL a DEHA

Kultura AP12			MM
Substrát	Označení vzorku	OD₆₀₀	OD₆₀₀
2-Ethylhexyl acetát (EHA; 175 mg/l)	1	0,134	0,03775
	2	0,168	
Bis(2-Ethylhexyl) sebakát (DEHSE; 400 mg/l)	3	0,580	
	4	0,574	
Kultura EHS12			MM
Substrát	Označení vzorku	OD₆₀₀	OD₆₀₀
2-Ethylhexyl acetát (EHA; 175 mg/l)	5	0,277	0,03775
	6	0,145	
Bis(2-Ethylhexyl) sebakát (DEHSE; 400 mg/l)	7	0,745	

	8	0,880
2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE; 200 mg/l)	9	0,068
	10	0,057
2-Ethylhexyl glycerol (EHGL; 200 mg/l)	11	0,046
	12	0,045
Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA, 400 mg/l)	13	0,822
	14	0,605

I přes pomalý a nepravidelný růst kultur AP12 a EHS12 na EHA, lze konstatovat, že je tato látka využívána jako růstový substrát v koncentraci 175 mg/l. I když je tato látka využívána jako růstový substrát, byla zkouška růstu kultury EHS12 na EHA zopakována ještě jednou za snížené koncentrace. Jednoznačným růstovým substrátem pro obě látky je DEHSE o koncentraci 400 mg/l. Stejně jako kultura AP12 využívá DEHA 400 mg/l jako růstový substrát i kultura EHS12. EHGE 200 mg/l není kulturou EHS12 využíván jako růstový substrát. Zkouška růstu kultury EHS12 na EHGL byla nastavena ještě jednou. Koncentrace byla snížena na 100 mg/l.

5.4 Růst kultury AP12 na EDODEBEH a 2-Ethylhexyl glycerolu za snížené koncentrace a kultury EHS12 na EDODEBEH a 2-Ethylhexyl acetátu

Jedním z cílů toho pokusu bylo ověření růstu kultury AP12 a EHS12 na EDODEBEH o koncentraci 400 mg/l. Po uplynutí 14 dní od nasazení pokusu bylo již během optometrické kontroly konstatovat, že je tato látka využívána jako růstový substrát, protože došlo k zakalení u obou paralelních lahví. Což následně ukázala i naměřená absorbance po 14 dnech od nastavení pokusu.

Pro kulturu AP12 byl opět zopakován pokus růstu na EHGL, ale nyní při koncentraci 100 mg/l. Po 14 dnech kultivace však bylo dosaženo nejasných výsledků. U jedné z paralelních lahví se projevil mírný zjevný zákal a u druhé nikoliv, což se projevilo i na výsledcích ze spektrofotometru.

Ačkoliv se EHA ukázal jako růstový substrát pro obě kultury, zkouška růstu byla pro kulturu EHS12 nasazena ještě jednou. I přesto, že byla koncentrace substrátu EHA snížena o 75 mg/l na 100 mg/l růst kultury stále probíhal pomaleji než u ostatních růstových substrátů. Zjevný zákal se projevil až ke konci samotné kultivace a výsledky se oproti předchozím pokusům příliš neliší.

Tab. 19 Růst kultury AP12 na EDODEBEH a na EHGL za snížené koncentrace a kultury EHS12 na EDODEBEH a na EHA za snížené koncentrace

Kultura AP12			MM
Substrát	Označení vzorku	OD600	OD600
Triethylene glycol bis(2-Ethylhexanoát) (EDODEBEH; 400 mg/l)	5	0,229	0,0363
	6	0,272	
2-Ethylhexyl glycerol (EHGL; 100 mg/l)	7	0,125	
	8	0,014	
Kultura EHS12			MM
Substrát	Označení vzorku	OD600	OD600
2-Ethylhexyl acetát (EHA; 100 mg/l)	1	0,134	0,0363
	2	0,115	
Triethylene glycol bis(2-Ethylhexanoát) (EDODEBEH; 400 mg/l)	3	0,233	
	4	0,290	

Na základě tohoto pokusu bylo také zjištěno, že kultura AP12 i EHS12 využívají EDODEBEH jako růstový substrát o koncentraci 400 mg/l. Dále bylo zjištěno, že snížení koncentrace EHA nepřispívá k urychlení růstu kultury. Kvůli nejasným výsledkům zkoušky růstu kultury AP12 na EHGL, byl pokus zopakován ještě jednou.

5.5 Růst kultur AP12 a EHS12 na 2-Ethylhexyl glycerolu za snížené koncentrace

Tento pokus přinesl jasné výsledky o tom, že EHGL není využíván ani jednou kulturou jako růstový substrát. Po 14 dnech kultivace nebylo možné vizuálně pozorovat žádný zjevný zákal. Výsledná data získaná měřeními na spektrofotometru tento závěr potvrdily.

Tab. 20 Růst kultury AP12 a EHS12 na EHGL za snížené koncentrace

Kultura AP12			MM
Substrát	Označení vzorku	OD₆₀₀	OD₆₀₀
2-Ethylhexyl glycerol (EHGL; 100 mg/l)	3	0,041	0,347
	4	0,040	
Kultura EHS12			MM
Substrát	Označení vzorku	OD₆₀₀	OD₆₀₀
2-Ethylhexyl glycerol (EHGL; 100 mg/l)	1	0,046	0,347
	2	0,047	

Slabý zjevný zákal u předchozího pokusu byl pravděpodobně způsoben chybným na-dávkováním nějaké složky či jinou chybou. Díky tomuto závěrečnému pokusu však lze říci, že kultura AP12 ani EHS12 nevyužívají EHGL ani v koncentraci 100 mg/l jako jediný zdroj uhlíku.

5.5.1 Sumarizace výsledků zkoušek ověřujících růst kultur na jednotlivých substrátech

Níže uvedená tabulka představuje přehled látek a koncentrací, které jsou pro kultury AP12 a EHS12 růstovými substráty. Zároveň je zde vyobrazen přehled látek a jejich koncentrace, které kultury jako jediný zdroj uhlíku nevyužívají.

Tab. 21 Přehled látek, které kultura AP12 využívá jako růstový substrát, a které nikoliv

Kultura AP12			
Potvrzen růst		Nepotvrzen růst	
Substrát	Koncentrace (mg/l)	Substrát	Koncentrace (mg/l)
Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA)	400	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	400
2-Ethylhexyl acetát (EHA)	175	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	200
Bis(2-Ethylhexyl) sebakát (DEHSE)	400	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	100
Triethylene glycol bis(2-Ethylhexanoát) (EDODEBEH)	400	2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE)	250
		2-Ethylhexyl acetát (EHA)	250

Tab. 22 Přehled látek, které kultura EHS12 využívá jako růstový substrát, a které nikoliv

Kultura EHS12			
Potvrzen růst		Nepotvrzen růst	
Substrát	Koncentrace (mg/l)	Substrát	Koncentrace (mg/l)
Bis(2-ethylhexyl) adipát (DEHA)	400	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	200
2-Ethylhexyl acetát (EHA)	175	2-Ethylhexyl glycerol (EHGL)	100
Bis(2-Ethylhexyl) sebakát (DEHSE)	400	2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE)	200
2,2-Triethylene glycol bis(2-Ethylhexanoát) (EDODEBEH)	400		

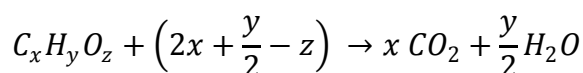
Jak už naznačuje výše uvedená tabulka, mikrobiální kultura AP12 i mikrobiální kultura EHS12 využívají ke svému růstu pouze ty substráty, které obsahují esterovou vazbu.

Čili organické sloučeniny, ve kterých je -OH skupina karboxylové kyseliny nahrazena organickým zbytkem vzniklým z alkoholu po odštěpení vodíku z OH skupiny. Naopak látky s etherovou vazbou studované kultury jako růstové substráty využít nedokážou. Etery jsou látky, které obsahují ve svých molekulách dvojnásobnou skupinu -O-, na kterou se vážou dva uhlovodíkové zbytky.

5.6 Kinetika růstu kultury AP12 na různých substrátech s využitím měřících lahví OXITOP

Kultura AP12 byla podrobena zkoušce, ověřující kinetiku růstu na jednotlivých substrátech. Růst byl sledován, jak na růstových substrátech, prověřených v předchozích substrátech, tak i na látkách, které jako růstový substrát kultury využít nedokážou. Růst byl stanoven měřením biochemické spotřeby kyslíku pomocí měřicího přístroje OXITOP. Celý pokus byl také koncipován jako potvrzovací experiment výsledků, získaných v předcházejících částech práce. Postup pokusu je popsán v metodické části a všechny studované sloučeniny byly použity ve stejné koncentraci 100 mg/l.

Aerobní mikroorganismy využívají přítomné organické látky jako zdroj energie a uhlíku pro růst vlastních buněk a syntézu zásobních látek. Tyto látky rozkládají a spotřebovávají přitom kyslík přítomný ve vodě. Úplná biochemická spotřeba kyslíku v buňkách mikroorganismů probíhá za normální teploty během 10 až 20 dní. To odpovídá hodnotě BSK_u. V případě této práce jde o BSK₁₄, neboť měření probíhalo po dobu 14 dní. Teoretickou spotřebou kyslíku (TSK) se rozumí takové množství kyslíku v g.g⁻¹ látky, kdy dojde podle dané stechiometrické rovnice k úplné oxidaci přítomné organické látky až na oxid uhličitý a vodu. Pro každou organickou sloučeninu, neobsahující jiné prvky než C, H a O lze na základě jejich sumárního vzorce napsat stechiometrickou oxidační rovnici. (Richter, 2005)



Specifická hodnota TSK je poté pro organickou látku s relativní molekulovou hmotností M_r vypočítán následovně:

$$TSK = \frac{8 * (4 * x + y - 2 * z)}{M_r}$$

x = počet atomů uhlíku

y = počet atomů vodíku

z = počet atomů kyslíku

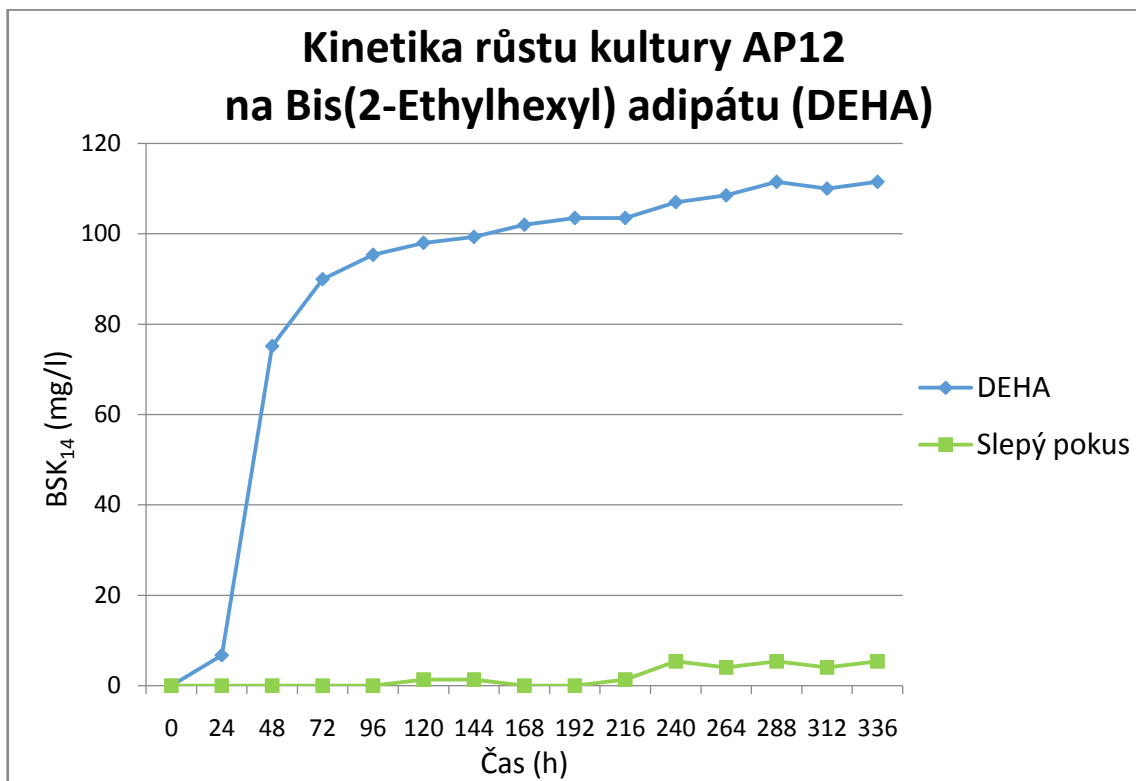
Biologickou spotřebu kyslíku lze spočítat, dle níže uvedeného vzorce:

$$BSK = \frac{\text{nejvyšší naměřená hodnota} - \emptyset \text{ slepý pokus}}{\text{koncentrace}}$$

Richter ve svém díle uvádí, že pokud je poměr BSK_5/TSK 0,4 – 0,2 je příslušná organická látka snadno a rychle rozložitelná. Při nižších hodnotách biochemická rozložitelnost příslušných organických látek klesá, resp. směsná mikrobiální kultura není na biochemický rozklad dostatečně adaptována. Velikost tohoto poměru ale nevypovídá o rychlosti biochemického rozkladu. Jiná literatura však uvádí, že poměr BSK/TSK větší nebo roven 0,5 ukazuje na látku velmi dobře biologicky rozložitelnou. Při poměru menším než 0,2 jde o látku biologicky těžko rozložitelnou. Nachází-li se však hodnoty mezi těmito limity, mluvíme pak o látkách biologicky středně rozložitelnými. (Richter, 2005; Hoffmann a kol. 2000)

5.6.1 Kinetika růstu kultury AP12 na Bis(2-Ethylhexyl) adipátu

Následující graf zachycuje růstu kultury AP12 na Bis(2-Ethylhexyl) adipátu. Rozklad organické látky byl zahájen již během prvních 24 h od nastavení pokusu. Spotřeba kyslíku se během 48 h prudce zvýšila na 75,15 mg/l a následně se zvyšovala již jen pomalu. V závěru pokusu dosahovala hodnota BSK_{14} 1,0475 g.g⁻¹. Při porovnání růstové křivky s křivkou slepého pokusu, je již na první pohled patrné, že DEHA je pro kulturu AP12 růstovým substrátem.



Graf 1 Kinetika růstu kultury AP12 na Bis(2-Ethylhexyl) adipátu

Teoretická spotřeba kyslíku DEHA dle výše uvedeného vzorce:

$$TSK = \frac{8 * (4 * x + y - 2 * z)}{Mr}$$

$$TSK = \frac{8 * (4 * 22 + 44 - 2 * 4)}{370,574 \text{ g/mol}}$$

$$TSK = 2,68 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

Teoretická spotřeba kyslíku Bis(2-Ethylhexyl) adipátu je $2,68 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$

Biochemická spotřeba kyslíku DEHA:

$$BSK_{14} = \frac{\text{nejvyšší naměřená hodnota (mg/l)} - \emptyset \text{ slepý pokus (mg/l)}}{\text{koncentrace (mg/l)}}$$

$$BSK_{14} = \frac{111,5 \text{ mg/l} - 6,75 \text{ mg/l}}{100 \text{ mg/l}}$$

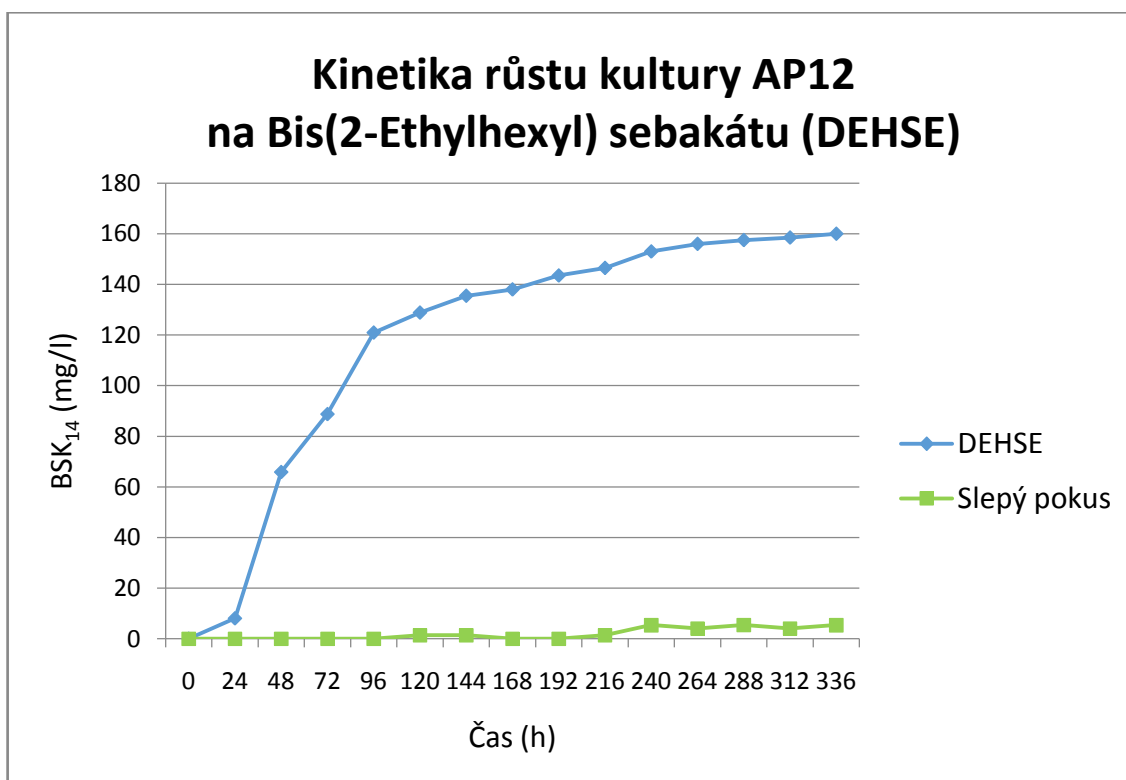
$$BSK_{14} = 1,0475 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

$$BSK_{14} = 39,10 \% \text{ z TSK}$$

Jelikož hodnota BSK_{14} dosahuje 39,10 % z TSK, lze tak dle Richtera (2005) Bis(2-Ethylhexyl) adipát zařadit mezi biologicky snadno a rychle rozložitelné látky. Avšak podle Hoffmanna (2000), by se tato organická látka zařadila spíše mezi středně rozložitelné.

5.6.2 Kinetika růstu kultury AP12 na Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu

Z níže uvedeného grafu lze vyčíst, že růst mikrobiální kultury byl rovněž zahájen téměř okamžitě. Přístroj OXITOP začal zaznamenávat růst už v průběhu 24 hodin, kdy byla spotřeba kyslíku 8,05 mg/l. Během dalších 24 hodin byla spotřeba kyslíku téměř osminásobná a stále se pozvolna zvyšovala až do ukončení měření. V závěru byla biochemická spotřeba kyslíku BSK_{14} 1,5325 g.g⁻¹. Zároveň se jedná o nejvyšší biochemickou spotřebu kyslíku ze všech zkoumaných substrátů, což naznačuje i tomu, že je tato látka dobře biologicky rozložitelná.



Graf 2 Kinetika růstu kultury AP12 na Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu

Teoretická spotřeba kyslíku DEHSE:

$$TSK = \frac{8 * (4 * x + y - 2 * z)}{Mr}$$

$$TSK = \frac{8 * (4 * 26 + 50 - 2 * 4)}{426,682 \text{ g/mol}}$$

$$TSK = 2,74 \text{ g.g}^{-1}$$

Teoretická spotřeba kyslíku Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu je 2,74 g.g⁻¹.

Biochemická spotřeba kyslíku DEHSE:

$$BSK_{14} = \frac{\text{nejvyšší naměřená hodnota (mg/l)} - \emptyset \text{ slepý pokus (mg/l)}}{\text{koncentrace (mg/l)}}$$

$$BSK_{14} = \frac{160 \text{ mg/l} - 6,75 \text{ mg/l}}{100 \text{ mg/l}}$$

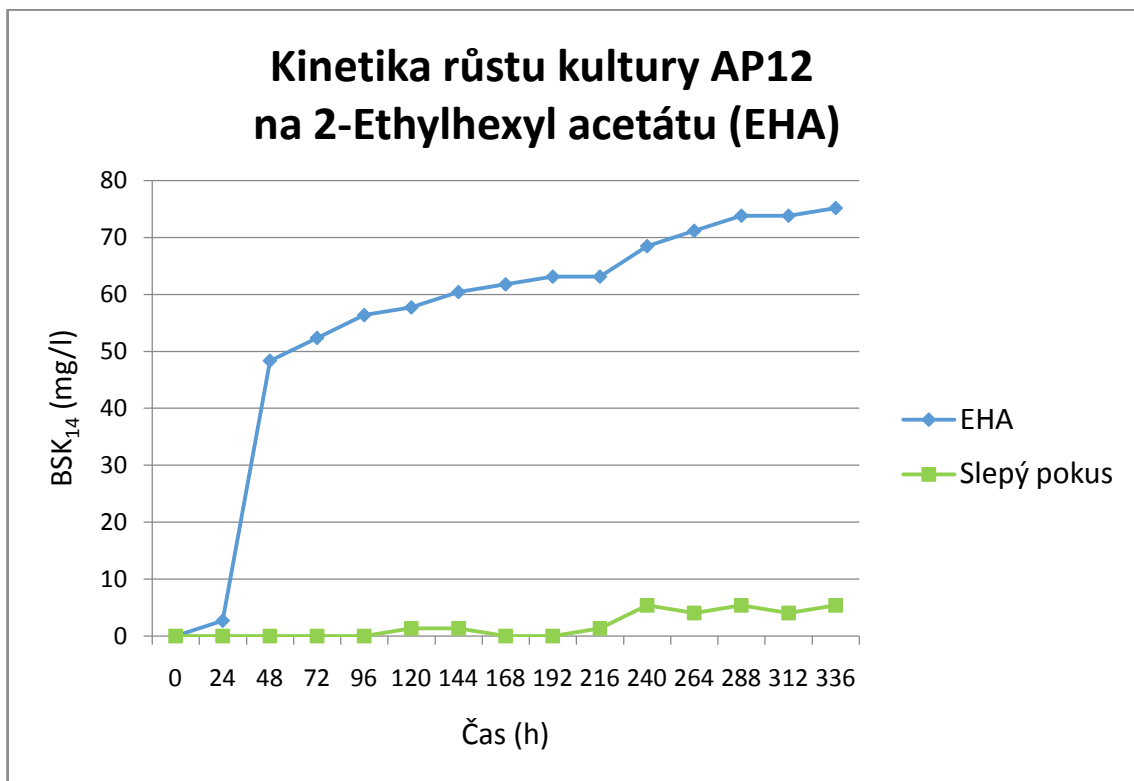
$$BSK_{14} = 1,5325 \text{ g.g}^{-1}$$

$$BSK_{14} = 55,93 \% \text{ z TSK}$$

Biochemická spotřeba kyslíku DEHSE byla vypočítána na 1,5325 g.g⁻¹. Bis(2-Ethylhexyl) sebakát tak lze jednoznačně zařadit mezi rychle a snadno biologicky rozložitelné organické látky. A to jak dle Richtera (2005), tak i Hoffmanna (2000), neboť hodnota BSK₁₄ činí skoro 56 % z TSK.

5.6.3 Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl acetátu

Stejně jako u předchozích růstových substrátů, byl růst kultury AP12 na 2-Ethylhexyl acetátu taktéž zaznamenán již během prvních 24 hodin. V porovnání s předchozími substráty byl však růst nejpomalejší, jak dokazuje i níže uvedený graf. V průběhu 24 hodin se spotřeba kyslíku zvyšovala zhruba o 2 mg/l. V závěru měření dosahovala hodnota BSK₁₄ 0,6840 g.g⁻¹.



Graf 3 Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl acetátu

Teoretická spotřeba kyslíku EHA:

$$TSK = \frac{8 * (4 * x + y - 2 * z)}{Mr}$$

$$TSK = \frac{8 * (4 * 10 + 20 - 2 * 2)}{172,268 \text{ g/mol}}$$

$$TSK = 2,60 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

Teoretická spotřeba kyslíku 2-Ethylhexyl acetátu je $2,60 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Biochemická spotřeba kyslíku EHA:

$$BSK_{14} = \frac{\text{nejvyšší naměřená hodnota (mg/l)} - \emptyset \text{ slepý pokus (mg/l)}}{\text{koncentrace (mg/l)}}$$

$$BSK_{14} = \frac{75,15 \text{ mg/l} - 6,75 \text{ mg/l}}{100 \text{ mg/l}}$$

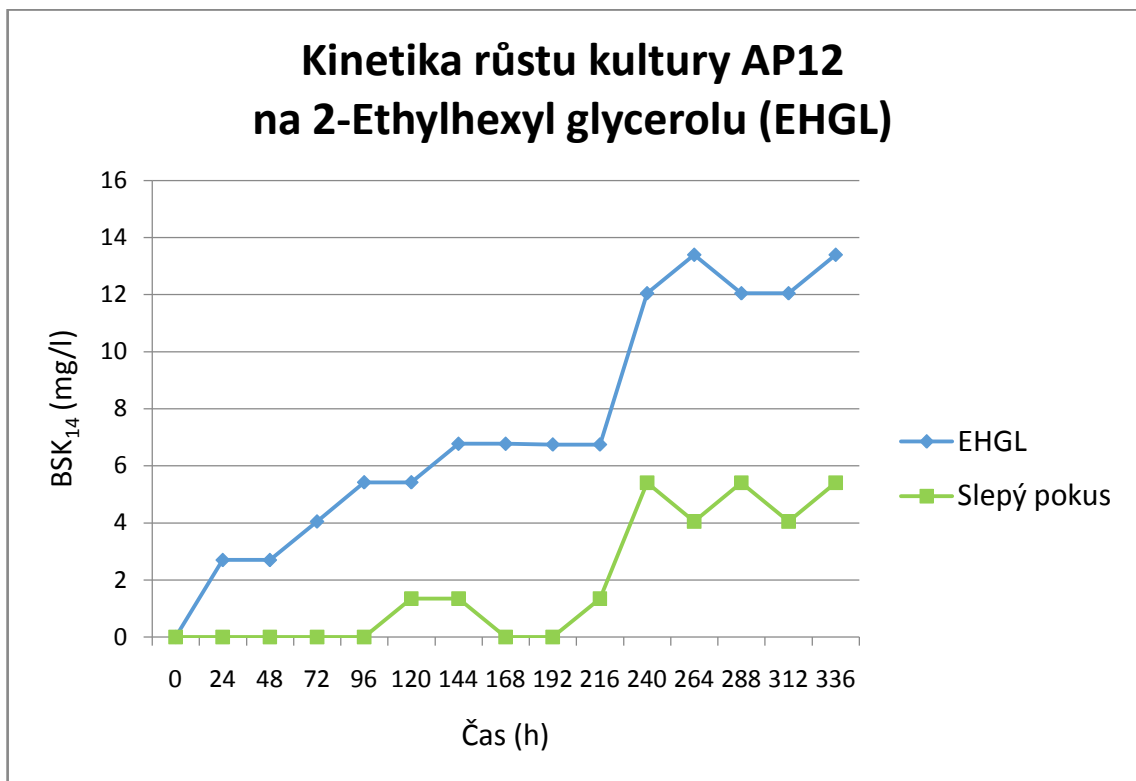
$$BSK_{14} = 0,6840 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

$$BSK_{14} = 26,31 \% \text{ z TSK}$$

Hodnota BSK_{14} pro 2-Ethylhexyl acetát dosahovala pouze $0,6840 \text{ g.g}^{-1}$ což činí 26,31 % z teoretické spotřeby kyslíku. Richter i Hoffman ve své literatuře uvádí, že aby bylo možné látku hodnotit, jako snadno biologicky rozložitelnou nesmí být poměr BSK/TSK nižší jak 0,2 tj. 20 % (Richter, 2005; Hoffmann a kol. 2000). I přesto, že toto kritérium EHA splňuje, hodnota BSK se blíží k hranici těžce biologicky rozložitelných látek. Což však může být způsobeno již zmiňovanými rozpouštědlovými vlastnostmi (a tím i potenciální slabou toxicitou), ale i mírnou těkavostí, která se mohla projevit na přesnosti testu. O skutečné míře využití této látky zkoumanou kulturou by tak musely rozhodnout další, velmi podrobné testy v plynotěsných vzorkovnicích a detailním analytickým vyhodnocením.

5.6.4 Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu

Ačkoliv se v průběhu testování ukázalo, že 2-Ethylhexyl glycerol není pro kulturu AP12 růstovým substrátem, byla zde stejně jako u látek, které jsou růstovými substráty, sledována kinetika „růstu“. Po uplynutí 9 dní od nasazení pokusu, byla nejvyšší naměřená hodnota spotřeby kyslíku pouze $6,75 \text{ mg/l}$. Za dalších 24 hodin se však spotřeba kyslíku skokově zvýšila o $5,28 \text{ mg/l}$. Biochemická spotřeba kyslíku byla pro tuto látku naměřena $0,067 \text{ g.g}^{-1}$.



Graf 4 Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu

Teoretická spotřeba kyslíku EHGL:

$$TSK = \frac{8 * (4 * x + y - 2 * z)}{Mr}$$

$$TSK = \frac{8 * (4 * 11 + 24 - 2 * 3)}{204,31 \text{ g/mol}}$$

$$TSK = 2,43 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

Teoretická spotřeba kyslíku 2-Ethylhexyl glycerolu je $2,43 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Biochemická spotřeba kyslíku EHGL:

$$BSK_{14} = \frac{\text{nejvyšší naměřená hodnota (mg/l)} - \emptyset \text{ slepý pokus (mg/l)}}{\text{koncentrace (mg/l)}}$$

$$BSK_{14} = \frac{13,4 \text{ mg/l} - 6,75 \text{ mg/l}}{100 \text{ mg/l}}$$

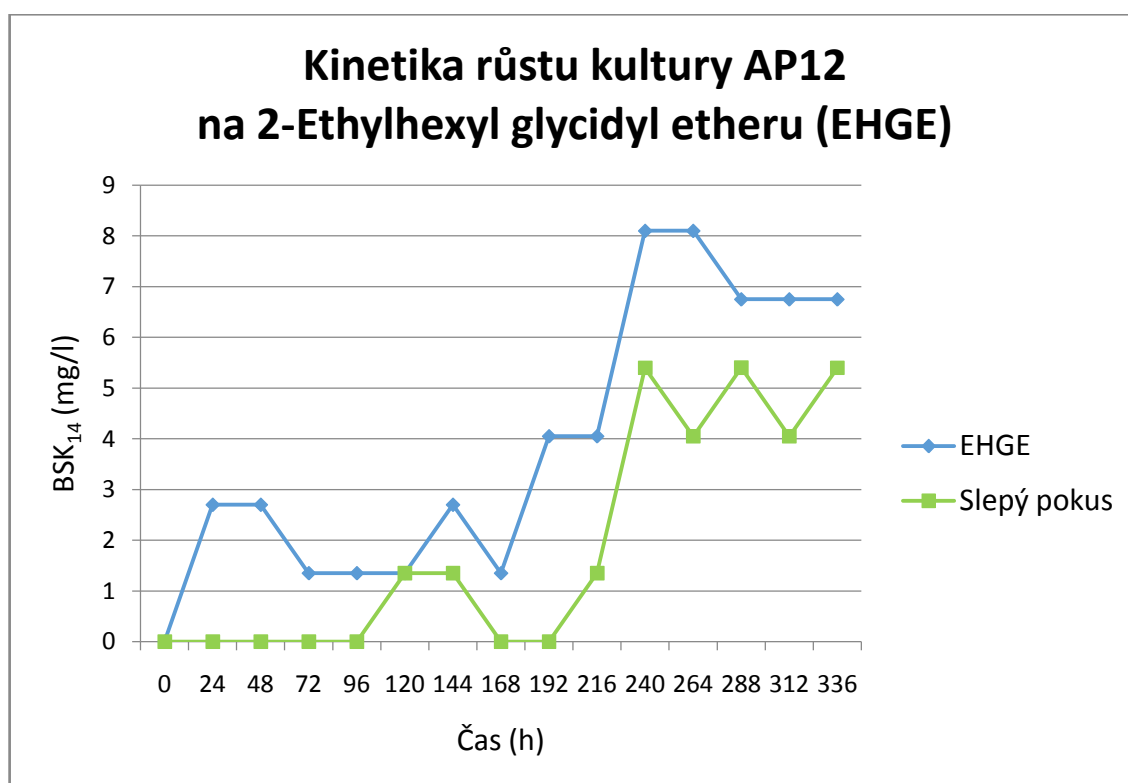
$$BSK_{14} = 0,067 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

$$BSK_{14} = 2,76 \% \text{ z TSK}$$

Již během zkoušky růstu kultury AP12 na EHGL bylo dospěno k názoru, že tato látka není pro kulturu vhodným růstovým substrátem. Kinetika růstu toto tvrzení jen prokázala. Dokazuje to především naměřená biochemická spotřeba kyslíku, která po uplynutí 14 dní kultivace dosahovala $0,067 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ což je pouze 2,76 % z TSK. Tím se EHGL jednoznačně řadí mezi látky, které jsou obtížně biologicky rozložitelné. (Richter, 2005; Hoffmann a kol. 2000). Nepatrně vyšší spotřeba kyslíku v pokusu oproti slepému pokusu pravděpodobně souvisela s využitím organických nečistot v použité chemikálii (např. zbytkového glycerolu).

5.6.5 Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycidyl etheru

Podobně tomu bylo i při růstu kultury AP12 na EHGL, který rovněž není růstovým substrátem. Naměřená spotřeba kyslíku byla hodně rozkolísaná, přičemž maximální dosažená hodnota spotřeby kyslíku byla 8,1 mg/l. Pro EHGE byla biochemická spotřeba kyslíku $0,014 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.



Graf 5 Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycidyl etheru

Teoretická spotřeba kyslíku EHGE:

$$TSK = \frac{8 \cdot (4 \cdot x + y - 2 \cdot z)}{Mr}$$

$$TSK = \frac{8 * (4 * 11 + 22 - 2 * 2)}{186,295 \text{ g/mol}}$$

$$TSK = 2,66 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

Teoretická spotřeba kyslíku 2-Ethylhexyl glycidyl etheru je $2,66 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Biochemická spotřeba kyslíku EHGE:

$$BSK_{14} = \frac{\text{nejvyšší naměřená hodnota (mg/l)} - \emptyset \text{ slepý pokus (mg/l)}}{\text{koncentrace (mg/l)}}$$

$$BSK_{14} = \frac{8,1 \text{ mg/l} - 6,75 \text{ mg/l}}{100 \text{ mg/l}}$$

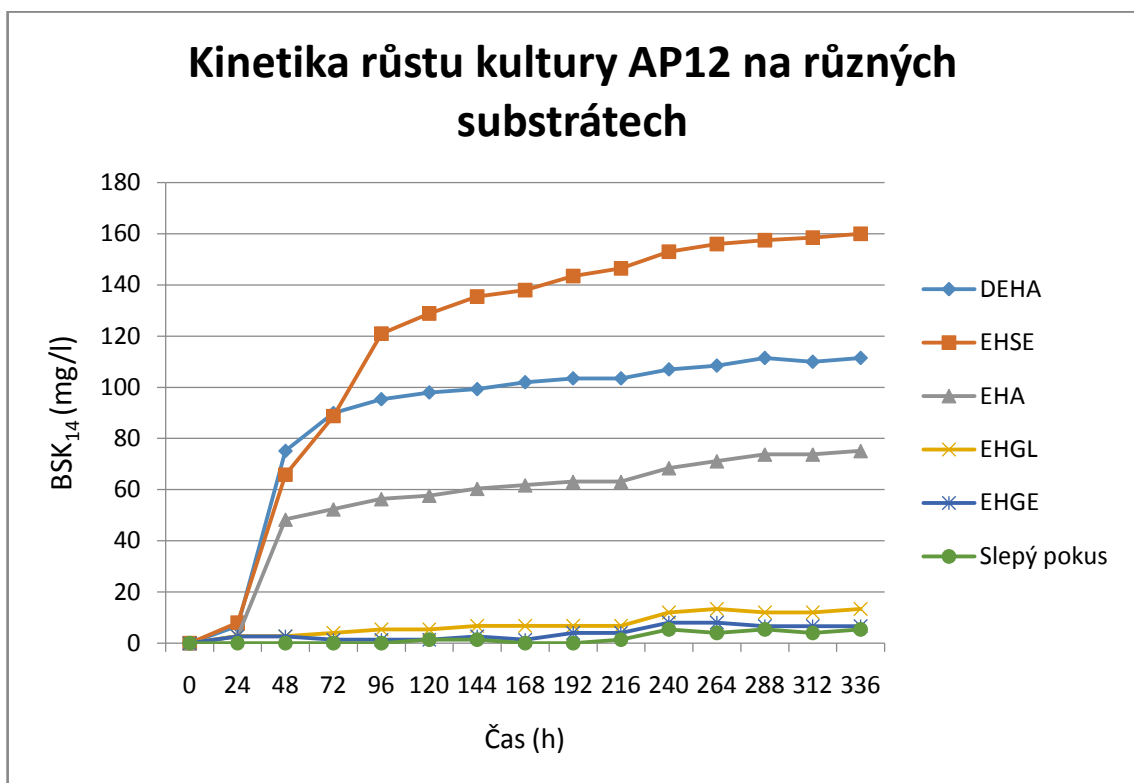
$$BSK_{14} = 0,014 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$$

$$BSK_{14} = 0,53 \% \text{ z TSK}$$

Podobného výsledku jako u EHGL bylo dosaženo u měření kinetiky růstu kultury AP12 na EHGE. Biochemická spotřeba kyslíku byla po 14 dnech inkubace téměř nulová. Hodnota BSK_{14} dosahovala $0,014 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ což je pouze $0,53 \%$ z TSK. Tato látka se tak jednoznačně řadí mezi látky, které jsou studovanými kulturami biologicky nerozložitelné. (Richter, 2005; Hoffmann a kol. 2000)

5.6.6 Porovnání růstu kultury AP12 na různých substrátech

Následující graf znázorňuje kinetiku růstu kultury AP12 na různých substrátech. Z grafu je již na první pohled patrné, které látky jsou pro kulturu růstovými substráty a které nikoliv. Nejvyšší biochemická spotřeba kyslíku byla zaznamenána u DEHSE, následně u DEHA a poté u EHA, u poslední látky je však oproti předchozím biochemickým spotřebám kyslíku poloviční. Lze také pozorovat, jak růstové křivky kultury v přítomnosti EHGL a EHGE téměř kopírují s křivky slepého pokusu. Což je pro látky, které nejsou růstovými substráty, charakteristické.



Graf 6 Kinetika růstu kultury AP12 na různých substrátech

I když nebyl proveden pokus kinetiky růstu s kulturou EHS12, lze předpokládat, že by byl průběh růstu této mikrobiální kultury na jednotlivých substrátech podobný. Tomu již naznačovaly i jednotlivé pokusy ověřující růst kultury EHS12 na testovaných substrátech.

ZÁVĚR

V úvodu praktické části bylo důležité nejprve oživit mikrobiální kultury AP12 a EHS 12, které byly získány již dříve v průběhu kvalifikačních prací provedených na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Následně byla zahájena série pokusů ověřující schopnost těchto zástupců rodu *Rhodococcus* rozkládat sloučeniny s 2-ethylhexylovým řetězcem (či řetězci).

Pro tuto práci bylo vybráno 6 látek, které jsou přítomny v řadě běžně používaných produktů: 2-Ethylhexyl acetát (EHA), Bis(2-Ethylhexyl) adipát (DEHA), Bis(2-Ethylhexyl) sebakát (DEHSE), 2-Ethylhexyl glycerol (EHGL), 2-Ethylhexyl glycidyl ether (EHGE) a Triethylene glycol bis(2-ethylhexanoát) (EDODEBEH). Na všech těchto substrátech byla provedena zkouška růstu obou mikrobiálních kultur a následně ověřena kinetika růstu kultury AP12 na vybraných substrátech za pomoci aparatury OXITOP.

Zkouškou růstu kultury AP12 na EHA bylo zjištěno, že je tato látka pro mikrobiální kulturu růstovým substrátem. Prvně zvolená koncentrace 250 mg/l se pro kulturu jevila jako toxická, proto byla snížena na 175 mg/l. Ze všech růstových substrátů byla u této látky naměřena nejnižší biochemická spotřeba kyslíku, kdy hodnota BSK₁₄ dosahovala pouze 0,6840 g.g⁻¹ (při TSK 2,6 g.g⁻¹). Přesto se však EHA dle použité literatury řadí mezi biologicky rozložitelné, i když je tato hodnota už hraniční. Podobných výsledků bylo dosaženo i během ověřování růstu mikrobiální kultury EHS12 na 2-Ethylhexyl acetátu o koncentraci 175 mg/l. Zde byl taktéž zaznamenán pomalý a nepravidelný růst, který by mohl být částečně vysvětlen mírnou toxicitou látky.

Další látka, na niž byl prokázán mikrobiální růst jak kultury AP12 tak EHS12, byl Bis(2-Ethylhexyl) adipát v koncentraci 400 mg/l. Růst obou kultur byl na substrátu zahájen téměř okamžitě, přičemž první známky rozkladu bylo možné pozorovat již během prvních 48 hodin od nasazení pokusu. Biochemická spotřeba kyslíku mikrobiální kultury AP12 na příslušném substrátu dosahovala 1,047 g.g⁻¹, což představovalo 39,10 % TSK. Na základě získaných výsledků lze říci, že i DEHA je bakteriálním rodem *Rhodococcus* rozkládán. I přesto, že nebyla provedena zkouška kinetiky růstu pro kulturu EHS12, lze předpokládat, že by bylo dosaženo podobného výsledku.

Mezi růstové substráty obou mikrobiálních kultur se jednoznačně zařadil Bis(2-Ethylhexyl) sebakát. Stejně jako u předchozího substrátu byl mikrobiální rozklad zahájen velmi rychle u obou paralelních lahví. Mikrobiální kultury AP12 a EHS12 jsou

schopny rozkladu DEHSE o koncentraci 400 mg/l. Kinetikou růstu kultury AP12 na DEHSE bylo zjištěno, že hodnota BSK_{14} byla $1,5325 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ což odpovídá 55,96 % z TSK. Tím se tak DEHSE zařadí mezi látky snadno a rychle biologicky rozložitelné.

EDODEBEH se taktéž zařadí mezi růstové substráty kultur AP12 a EHS12. Obě kultury byly schopny růstu na EDODEBEHU v koncentraci 400 mg/l. Kinetika růstu však nebyla z důvodu kapacity aparatur OXITOP pro tuto látku sledována, ale

Mezi substráty, které kultury AP12 a EHS12 rozložit nedovedou, patří 2-Ethylhexyl glycerol a 2-Ethylhexyl glycidyl ether. Jelikož se nepředpokládalo, že bude EHGL pro kulturu AP12 toxický, byla v prvním pokusu zvolena koncentrace 400 mg/l, která však byla postupně snížena až na koncentraci 100 mg/l, avšak ani snížení koncentrace nepřispělo k růstu kultury na tomto substrátu. Kinetika růstu kultury AP12 na EHGL ukázala, že tuto látku skutečně jako růstový substrát nevyužívá. Prakticky totožného výsledku bylo dosaženo jak při zkoušce růstu, tak i kinetiky růstu kultury AP12 na EHGE - tuto látku rovněž kultura nevyužívá jako svůj růstový substrát a ani kultura EHS12 nevyužívá EHGL a EHGE jako svůj růstový substrát.

Na základě získaných výsledků bylo tak dospěno k závěru, že mikrobiální kultury *Rhodococcus sp.* AP12 a *Rhodococcus sp.* EHS12, jsou ze studovaných látek schopny rozkládat pouze látky s esterovou vazbou, nikoliv s vazbou etherovou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PROISLOVÁ, Alena. *Sledování mikrobiálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylanu v povrchových vodách*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2016, 37 (32 052). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/38078>. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.
- [2] PROISLOVÁ, Alena. *Studium vodních bakterií, schopných degradace 2-ethylhexylsalicylanu*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2018, 91 s. (98 390 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/42180>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.
- [3] JELÉNKOVÁ, Markéta. *Studium bakteriálních kultur schopných rozkladu kosmetických sloučenin*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2016, 74 s. (79 871 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/38068>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.
- [4] MĚRKOVÁ, Markéta. *Biodegradabilita sloučenin využívaných k ochraně a úpravě materiálů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2018, 102 s. ISBN 978-80-7454-738-6. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/41627>. Dizertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Růžička, Jan.
- [5] MARTINKOVA, L, B UHNAKOVA, M PATEK, J NESVERA a V KREN. Biodegradationpotentialofthe genus Rhodococcus. *Environment International* [online]. 2009, **35**(1), 162-177 [cit. 2018-10-12]. DOI: 10.1016/j.envint.2008.07.018. ISSN 01604120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412008001499>
- [6] LARKIN, Michael J, Leonid A KULAKOV a Christopher CR ALLEN. Biodegradation and Rhodococcus – mastersofcatabolicversatility. *CurrentOpinion in Biotechnology* [online]. 2005, **16**(3), 282-290 [cit. 2018-10-12]. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.04.007. ISSN 09581669. Dostupné z: <http://elsevier.com/retrieve/pii/S0958166905000637>
- [7] NALLI, S., D. G. COOPER a J. A. NICCEL. Biodegradationofplasticizers by Rhodococcusrhodochrous. *Biodegradation* [online]. KluwerAcademicPublishers,

- 2002, 2002, **13**(10532), 343 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1023/A:1022313810852.
Dostupné z: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1022313810852.pdf>
- [8] ZHAO, Hai-Ming, Rui-Wen HU, Xue-Xue CHEN, et al. Biodegradation pathway of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a novel *Rhodococcus pyridinivorans* XB and its bioaugmentation for remediation of DEHP contaminated soil. *Science of The Total Environment* [online]. 2018, **640-641**, 1121-1131 [cit. 2018-10-12]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.334. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718319867>
- [9] GONG, Xiaowei, Guanghui MA a Yanqing DUAN. Biodegradation and metabolic pathway of nicotine in *Rhodococcus* sp. Y22. *World J Microbiol Biotechnol* [online]. 2019, **32**(11), 188 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1007/s11274-016-2147-8. Dostupné z: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11274-016-2147-8.pdf>
- [10] LI, Chunyan, Hailian ZANG, Qi YU, et al. Biodegradation of chlorimuron-ethyl and the associated degradation pathway by *Rhodococcus* sp. D310-1. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2016, **23**(9), 8794-8805 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1007/s11356-015-5976-3. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-5976-3>
- [11] 2-ethylhexyl acetate. *Pubchem* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2019 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-ethylhexyl_acetate#section=Top
- [12] 2-ethylhexyl acetate. *Chemoxy* [online]. UK: Chemoxy International, 2019 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://www.chemoxy.com/products-and-applications/products/speciality-chemicals/2eha/>
- [13] Substance Evaluation Conclusion document EC No 203-079-1 Template Version 2.1 March 2015 SUBSTANCE EVALUATION CONCLUSION as required by REACH Article 48 and EVALUATION REPORT for 2-ethylhexyl acetate. *ECHA European chemicals agency* [online]. Belgium: Belgian Federal Public Service Health, Food Chain Safety and Environment, Risk Management, 2016 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/documents/10162/adc69e44-f49e-41e6-83ac-e4b2b31934f2>

- [14] Di(2-ethylhexyl) adipate. *Pubchem* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7641>
- [15] PETERSEN, Jens H. Øjslev, Ebbe TUBÆK NAAMANSEN a Preben Aagaard NIELSEN. PVC cling film in contact with cheese: Health aspects related to global migration and specific migration of DEHA. *Food Additives and Contaminants* [online]. 1995, **12**(2), 245-253 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1080/02652039509374299. ISSN 0265-203X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652039509374299>
- [16] LAMBERT, George H, Helen LIETZ, Nancy HASSINGER a John MICHEALS. THE EFFECT OF DIETHYLHEXYL ADIPATE (DEHA) ON CYTOCHROME P-450 (P-450) IN NONPREGNANT (NP) AND PREGNANT (P) MICE. *Pediatric Research* [online]. 1987, **21**(4), 237A-237A [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1203/00006450-198704010-00419. ISSN 0031-3998. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1203/00006450-198704010-00419>
- [17] Bis(2-Ethylhexyl) sebacate. *Pubchem* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31218>
- [18] Bis(2-ethylhexyl) sebacate. *ECHA* [online]. Helsinky: European Chemicals Agency, 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: https://echa.europa.eu/cs/substance-information/-/substanceinfo/100.004.145?_disssubinfo_WAR_disssubinfoportlet_backURL=https%3A%2F%2Fecha.europa.eu%2Fcs%2Fhome%3Fp_p_id%3Ddisssimplesearchhome-page_WAR_dissearchportlet%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D2%26_disssimplesearchhomepage_WAR_dissearchportlet_sessionCriteriaId%3D
- [19] Bis(2-ethylhexyl) sebacate. *ECHA* [online]. Helsinky: European Chemicals Agency, 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/registration-dossier/-/registered-dossier/14100>
- [20] KRATOCHVÍL, František. *ETHYLHEXYLGLYCERIN* [online]. , 1 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <http://www.epitesty.cz/pasports/E%20027.pdf>

- [21] LINSEN, G. a A. GOOSSENS. Allergiccontact dermatitis fromethylhexylglycerin. *Contact Dermatitis* [online]. 2002, **47**(3), 169-000 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1034/j.1600-0536.2002.470308_4.x. ISSN 0105-1873. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1034/j.1600-0536.2002.470308_4.x
- [22] 2-Ethylhexylglycidyl ether. *Pubchem* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17162>
- [23] [[(2-ethylhexyl)oxy]methyl]oxirane. *ECHA* [online]. Helsinki: EuropeanChemical-sAgency, 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/substance-information/-/substanceinfo/100.017.776>
- [24] [[(2-ethylhexyl)oxy]methyl]oxirane. *ECHA* [online]. Helsinki: EuropeanChemical-sAgency, 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/registration-dossier/-/registered-dossier/13238/5/3/2>
- [25] Triethylene glycol bis(2-ethylhexanoate). *Celanese* [online]. 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://www.celanese.com/intermediate-chemistry/products/WVC-3800/Technical-Specifications.aspx>
- [26] Triethylene glycol bis(2-ethylhexanoate). *Pubchem* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2019 [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7185>
- [27] RICHTER, Miroslav. *Technologie ochrany životního prostředí*. 1. Ústí nad Labem: Fakulta životního prostředí UJEP Ústí nad Labem, 2005. ISBN 80-704-4684-6.
- [28] HOFFMANN, Jaromír, Iveta ŘEZNIČKOVÁ a Jan RŮŽIČKA. *Technologická cvičení z Ochrany prostředí*. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 2000. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-214-1709-9.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BSK	Biochemická spotřeba kyslíku
DEHA	Bis(2-Ethylhexyl) adipát
DEHP	Bis(2-Ethylhexyl) ftalát
DEHSE	Bis(2-Ethylhexyl) sebakát
DOP	Bis(octyl) ftalát
DOPT	Bis(octyl) tereftalát
EDODEBEH	Triethylene glycol bis(2-ethylhexanoát)
EHA	2-Ethylhexyl acetát
EHGE	2-Ethylhexyl glycidyl ether
EHGL	2-Ethylhexyl glycerol
EHOL	2-Ethylhexanol
EHS	2-Ethylhexyl salicylan
ECHA	Evropská agentura pro chemické látky
EU	Evropská unie
FT	Fakulta technologická
LD ₅₀	Dávka působící 50% úmrtnost
MM	Minerální médium
MT	Mikrotitrační destička
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
R2A	Reasoner's 2A Agar
REACH	Nařízení Evropské unie
TSK	Teoretická spotřeba kyslíku
TYA	Trypton yeast extract agar
UTB	Univerzita Tomáše Bati

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Strukturní vzorec 2-Ethylhexyl acetátu	17
Obr. 2	Strukturní vzorec Bis(2-Ethylhexyl) adipátu.....	18
Obr. 3	Strukturní vzorec Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu	19
Obr. 4	Strukturní vzorec 2-Ethylhexyl glycerolu	20
Obr. 5	Strukturní vzorec 2-Ethylhexyl glycidyl etheru	21
Obr. 6	Strukturní vzorec 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-ethylhexanoátu)	21

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Fyzikální vlastnosti 2-Ethylhexyl acetátu (Pubchem, 2019)	16
Tab. 2 Fyzikální vlastnosti Bis(2-ethylhexyl) adipátu (Pubchem, 2019)	17
Tab. 3 Fyzikální vlastnosti Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu (Pubchem, 2019)	18
Tab. 4 Fyzikální vlastnosti 2-Ethylhexyl glycerolu (Pubchem, 2019)	19
Tab. 5 Fyzikální vlastnosti 2-Ethylhexylglycidyl etheru (Pubchem, 2019)	20
Tab. 6 Fyzikální vlastnosti 2,2-Ethylenedioxydiethyl bis(2-Ethylhexanoátu) (Pubchem, 2019)	21
Tab. 7 Složení minerálního média	24
Tab. 8 Složení roztoku stopových prvků	24
Tab. 9 Složení roztoku MEM vitaminů (Biosera, 2019)	25
Tab. 10 Zkouška růstu kultury AP12 na EHGL a DEHA	27
Tab. 11 Zkouška růstu kultury AP12 na EHGL za snížené koncentrace EHA a EHGE	28
Tab. 12 Zkouška růstu kultury AP12 na EHA za snížené koncentrace, DEHSE a kultury EHS12 na EHA, DEHSE, EHGL a DEHA	29
Tab. 13 Zkouška růstu kultur AP12 na EDODEBEH a EHS12 na EHGL za snížené koncentrace a EDODEBEH	30
Tab. 14 Zkouška růstu kultur AP12 a EHS12 na EHGL za snížené koncentrace	30
Tab. 15 Zkouška kinetiky růstu kultury AP12 na různých substrátech s využitím měřících lahví OXITOP	31
Tab. 16 Růst kultury AP12 na EHGL a DEHA	33
Tab. 17 Růst kultury AP12 na EHGL za snížené koncentrace, EHA a EHGE	34
Tab. 18 Růst kultury AP12 na EHA za snížené koncentrace a DEHSE a růst kultury EHS12 na EHA, DEHSE, EHGE, EHGL a DEHA	36
Tab. 19 Růst kultury AP12 na EDODEBEH a na EHGL za snížené koncentrace a kultury EHS12 na EDODEBEH a na EHA za snížené koncentrace	38
Tab. 20 Růst kultury AP12 a EHS12 na EHGL za snížené koncentrace	39
Tab. 21 Přehled látek, které kultura AP12 využívá jako růstový substrát, a které nikoliv	40
Tab. 22 Přehled látek, které kultura EHS12 využívá jako růstový substrát, a které nikoliv	40

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kinetika růstu kultury AP12 na Bis(2-Ethylhexyl) adipátu	43
Graf 2 Kinetika růstu kultury AP12 na Bis(2-Ethylhexyl) sebakátu	44
Graf 3 Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl acetátu.....	46
Graf 4 Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycerolu.....	48
Graf 5 Kinetika růstu kultury AP12 na 2-Ethylhexyl glycidyl etheru	49
Graf 6 Kinetika růstu kultury AP12 na různých substrátech	51