

Studium vodních bakterií, schopných degradace 2-ethylhexylsalicylanu

Bc. Alena Proislová

Diplomová práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena Proislová**
Osobní číslo: **T16204**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium vodních bakterií, schopných degradace
2-ethylhexylsalicylanu**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte rešerši zaměřenou na bakteriální rozklad 2-ethylhexylsalicylanu a di-2-ethylhexylftalátu.
2. Provedte experimenty rozkladu di-2-ethylhexylftalátu bakteriemi získanými z vod a schopnými rozkladu 2-ethylhexylsalicylanu.
3. Vybrané bakteriální kultury identifikujte a zjistěte jejich růstové vlastnosti.
4. Práci přehledně zpracujte a odevzdejte ve stanoveném termínu v tištěné i elektronické podobě.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

HORN, Owen, Sandro NALLI, David COOPER a Jim NICELL. 2004. Plasticizer metabolites in the environment. Water Research. 38(17), 3693–3698.

NALLI, Sandro, Owen J. HORN, Adam R. GROCHOWALSKI, David G. COOPER a Jim A. NICELL. 2006. Origin of 2-ethylhexanol as a VOC. Environmental Pollution. 140(1), 181–185.

Vědecké publikace v databázích Web of Science a Scopus, případně i Medline.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

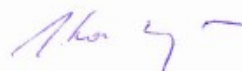
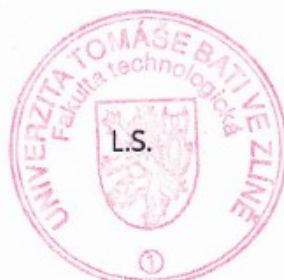
17. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

děkan



prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno:PROISLOVÁ ALENA.....

Obor:IOŽP.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby 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 užit 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 Zlíně15.5.2018.....

..........

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Práce byla věnována studiu bakterií schopných rozkladu 2-ethylhexylsalicylanu a jejich možným degradačním schopnostem vůči látkám strukturně podobným, di(2-ethylhexyl) ftalátu a 2-ethylhexanolu. Schopnost biodegradace byla testována měřením optické hustoty, počítáním buněk pomocí mikroskopických metod, ale také extrakcí di(2-ethylhexyl) ftalátu do *n*-hexanu a následným měřením absorbance pomocí UV-VIS spektrometru. Byly provedeny testy zkoušející schopnost kultur růst v odlišných podmínkách, při různém pH, teplotě či osmotickém tlaku. Nakonec byly kultury identifikovány jako bakterie rodu *Rhodococcus*.

Klíčová slova: 2-Ethylhexylsalicylan, di(2-ethylhexyl) ftalát, biodegradace, identifikace

ABSTRACT

This work was focused on study of 2-ethylhexyl salicylate degrading bacteria and its possible capability for degrading structurally similar substances such as bis(2-ethylhexyl) phthalate and 2-ethylhexanol. The culture's ability to degrade was tested by optical density measuring, determination of cell counts using microscopic methods and also by extraction of bis(2-ethylhexyl) phthalate into *n*-hexane followed by subsequent measurement of absorbance using a UV-VIS spectrometer. The abilities of bacteria to grow under different pH, temperature and osmotic pressure were tested as well. The cultures were eventually identified as the members of genus *Rhodococcus*.

Keywords: 2-Ethylhexyl salicylate, bis(2-ethylhexyl)phthalate, biodegradation, identification

Na tomto místě chci především poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, rady, trpělivost, ochotu, velký zájem o danou problematiku a čas, jež mi věnoval při zpracovávání mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala paní Bc. Veronice Kučabové, Ing. Olze Vlčkové a Ing. Zuzaně Svobodové, za jejich věcnou ochotu a nápomoc při práci v laboratoři, a také kolektivu na Ústavu ochrany životního prostředí Fakulty technologické, UTB ve Zlíně, za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Svou vděčnost chci vyjádřit také rodině, přátelům, všem, kdo mi byl v době studia oporou, a bez jejichž podpory by tato práce nemohla vzniknout.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 2-ETHYLHEXYLSALICYLAN.....	12
2 DI(2-ETHYLHEXYL) FTALÁT	13
3 2-ETHYLHEXANOL.....	21
II PRAKTICKÁ ČÁST	23
4 POUŽITÝ MATERIÁL A METODIKA POKUSŮ	24
4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY	24
4.2 POUŽITÉ ŽIVNÉ PŮDY A ROZTOKY	24
4.2.1 TYA agar (HIMEDIA, Indie).....	24
4.2.2 R2A agar (HIMEDIA, Indie)	24
4.2.3 Chemikálie	25
4.2.4 Tekuté minerální médium (MM).....	25
4.2.5 Roztok stopových prvků	25
4.2.6 Fyziologický roztok.....	26
4.2.7 MEM vitamíny	26
4.3 POKUSY	26
4.3.1 Ověření růstu kultur na EHS	26
4.3.2 Sledování růstu kultur při různých koncentracích NaCl na TYA agaru	27
4.3.3 Sledování růstu kultur při různých teplotách na TYA agaru	27
4.3.4 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-Ethylhexylsalicylanu s přídatkem vitamínů při různém pH	27
4.3.5 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-Ethylhexanolu.....	28
4.3.6 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu v různých koncentracích	28
4.3.7 Růst kultur AP12 a AP14b na DEHP	30
4.3.8 Růst kultur AP11, AP12, AP14b a AP16 na EHS s vitamíny a bez vitamínů	30
4.3.9 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu o různých koncentracích	30
4.3.10 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP	31
4.3.11 Extrakce hexanem	32
4.3.12 Kalibrační řada pro měření DEHP v hexanu pomocí UV-vis spektrometrie	33
4.3.13 Degradace DEHP kulturami AP12 a AP14b společně, za přídatku EHS.....	35
4.3.14 Utilizace DEHP kulturami AP12 a AP14b jednotlivě, za přídatku EHS.....	35
4.3.15 Vylepšení metodiky pro extrakci DEHP do <i>n</i> -hexanu	36
4.3.16 Utilizace DEHP kulturou AP14b za přídatku EHS – podrobnější pokus.....	38
5 IDENTIFIKACE KULTUR AP12 A AP14B	41

5.1	GRAMOVO BARVENÍ	41
5.2	IZOLACE DNA	41
5.3	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	42
5.4	AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	42
5.5	PŘEČIŠTĚNÍ PCR PRODUKTU.....	42
6	VÝSLEDKY	43
6.1	OVĚŘENÍ RŮSTU KULTUR NA EHS.....	43
6.2	SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTUR AP12 A AP14B PŘI RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH NA CL NA TYA AGARU	44
6.3	SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTUR AP12 A AP14B PŘI RŮZNÝCH TEPLITÁCH NA TYA AGARU	45
6.4	RŮST KULTUR AP12 A AP14B NA 2-ETHYLHEXYLSALICYLANU S PŘÍDAVKEM VITAMÍNŮ PŘI RŮZNÉM PH.....	47
6.5	RŮST KULTUR AP12 A AP14B NA 2-ETHYLHEXANOLU	48
6.6	RŮST KULTUR AP12 A AP14B NA 2-ETHYLHEXANOLU V RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH.....	48
6.6.1	Růst kultur AP12 a AP14 na 2-ethylhexanolu v rozmezí koncentrací 50 – 300 mg.l ⁻¹	48
6.6.2	Růst kultur AP12 a AP14 na 2-ethylhexanolu v rozmezí koncentrací 200 – 450 mg.l ⁻¹	49
6.7	RŮST KULTUR AP12 A AP14 B NA DEHP.....	49
6.8	RŮST KULTUR AP11, AP12, AP14B A AP16 NA EHS S VITAMÍNY A BEZ VITAMÍNŮ	50
6.9	RŮST KULTUR AP12 A AP14B NA 2-ETHYLHEXANOLU O RŮZNÝCH KONCENTRACÍCH.....	52
6.9.1	Pokus první, růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu	52
6.9.2	Pokus druhý, růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s upraveným postupem.....	53
6.10	RŮST KULTUR AP12 A AP14B NA 2-ETHYLHEXANOLU S DEHP	55
6.10.1	Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP pokus první.....	55
6.10.2	Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP pokus druhý.....	56
6.10.3	Extrakce DEHP <i>n</i> -hexanem	57
6.10.4	Degradace DEHP kulturami AP12 a AP14b společně, za přídavku EHS.....	58
6.10.5	Utilizace DEHP kulturami AP12 a AP14b jednotlivě, za přídavku EHS.....	62
6.10.6	Účinnost extrakce	67
	První pokus.....	67
	Druhý pokus	68
6.10.7	Utilizace DEHP kulturou AP14b za přídavku EHS – podrobnější pokus.....	69
6.10.8	Utilizace DEHP kulturou AP14b, za přídavku EHS – podrobnější pokus podruhé	72

6.11 IDENTIFIKACE KULTUR AP12 A AP14B	74
ZÁVĚR	78
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	84
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	85
SEZNAM TABULEK	86
SEZNAM PŘÍLOH	89

ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá bakteriemi schopnými rozkladu 2-ethylhexylsalicylanu, látky, jejíž biodegradabilita není v odborné literatuře ještě příliš popsána. Bakterie byly získány v průběhu mé bakalářské práce, ve které byla potvrzena jejich schopnost látku využívat jako jediný zdroj uhlíku pro svůj růst a v této práci se jimi zabývám podrobněji.

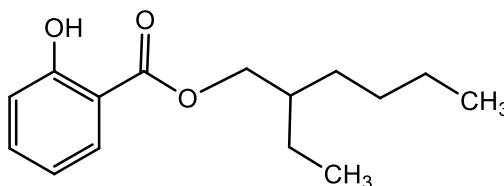
Strukturně podobnou látkou, vykazující však toxickejší účinky na lidský organismus, je di(2-ethylhexyl) ftalát, změkčovadlo, jež se do prostředí dostává během celého „životního“ cyklu (při výrobě, spotřebě, i likvidaci), a globálním cílem je snaha o omezení jeho výroby a používání jiných než ftalátových změkčovadel. Proto jakékoli poznatky o jeho případné degradaci bakteriemi vyskytujícími se v povrchových vodách by byly přínosem pro další snahy o odstranění nebo alespoň omezení vstupu tohoto perzistentního polutantu do životního prostředí.

Tato práce se také zabývala možnou souvislostí mezi degradací EHS a utilizací DEHP při kultivaci.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 2-ETHYLHEXYLSALICYLAN

2-Ethylhexylsalicylan (EHS) neboli ethylhexyl ester kyseliny salicylové je bezbarvá kapalina hojně používaná v různých kosmetických přípravcích, ať už jako účinná látka krémů pohlcující záření v oblasti UV, nebo jako vonná přísada v dekorativní kosmetice, šampónech, toaletních mýdlech a jiných toaletních potřebách. Je také využíván v nekosmetických produktech, například pracích a čisticích prostředcích pro domácnost.[1]



Obrázek 1 – Struktura 2-ethylhexylsalicylanu

Další názvy této látky jsou: Dermoblock OS; Escalol 587; Heliosol 2; Octyl Salicylate nebo 2-Hydroxy-2-Ethylester.

Tabulka 1 – Fyzikální vlastnosti EHS

Sumární vzorec	$C_{15}H_{22}O_3$
Molekulová hmotnost	250,34 g/mol
Bod varu	190 °C
Rozpustnost ve vodě (při 25 °C)	0,7171 mg.l ⁻¹
Hustota (při 25 °C)	1,014 g.ml ⁻¹
Log K_{OW}	6,02

Jeho rozpustnost ve vodě je minimální, je však dobře rozpustný v tucích, alkoholech a jiných organických rozpouštědlech. [2]

Biodegradabilita EHS byla zkoumána i v rámci závěrečných studentských prací FT UTB, Evy Ringlové a Aleny Proislové. V obou případech bylo zjištěno, že EHS je biologicky odbouratelný, ať už bakteriemi vyskytujícími se v aktivovaném kalu čističky odpadních vod (ČOV) nebo bakteriemi přirozeně se vyskytujícími v říční vodě [3, 4].

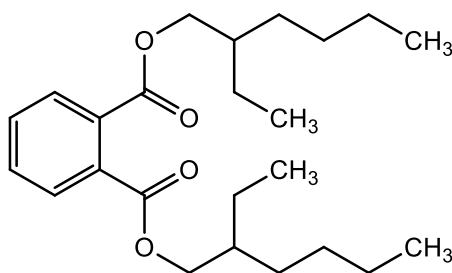
2 DI(2-ETHYLHEXYL) FTALÁT

Di(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP) je sloučeninou široce využívanou jako změkčovadlo v plastových materiálech a jiných produktech, zvláště v lékařských přístrojích, materiálech pro výrobu nábytku a v kosmetice. Je nekovalentně vázán k plastům a z toho důvodu dochází při opakovaném používání, zahřívání a/nebo čištění k postupnému uvolňování anebo vyluhování z produktů. Pro nadměrné využívání DEHP v mnoha produktech se dostává do životního prostředí, jednak díky vypouštění z průmyslových zařízení a z míst pro zpracování plastového odpadu, jednak z výrobků s jeho obsahem. [5]

Do těla může vstoupit inhalací, požitím nebo častým dermálním kontaktem, což vyvolává obavy ohledně jeho bezpečnosti a možných účinků na lidské zdraví. [5]

DEHP se může vázat na částice prachu ve vzduchu a být přenášen na velké vzdálenosti a na zemi opět uvolněn. Může se také vázat na půdní částice a velmi pomalu se rozpouštět v podzemní vodě. [6]

Dalšími názvy pro DEHP jsou bis (2-ethylhexyl) ftalát nebo dioktyl ftalát (DOP).



Obrázek 2 – Struktura di(2-ethylhexyl) ftalátu

Jedná se o viskózní, lipofilní tekutinu rozpustnou spíše v látkách jako jsou ředidla, organická rozpouštědla, benzín či olej než ve vodě. Nemá téměř žádný zápach. Nevypařuje se snadno a malá množství se mohou vyskytovat v blízkosti zdrojů výroby. Ročně je celosvětově vyprodukováno více než 2 milióny tun DEHP. [7]

DEHP poškozují endokrinní systém, způsobuje mutace plodu a problémy s reprodukcí. Váže se na tukovou tkáň, má schopnost bioakumulace v potravním řetězci. Může vyvolávat tvorbu močových kamenů, podráždění kůže, očí a dýchacího traktu, a také rozostřené vidění. [8]

Dle platné evropské legislativy (Nařízení Evropské komise č. 1272/2008) je DEHP klasifikován jako látka toxická pro reprodukci, kategorie 1B, což vypovídá, že existují dostatečné vědecké důkazy o jeho toxicitě u zvířat. [9]

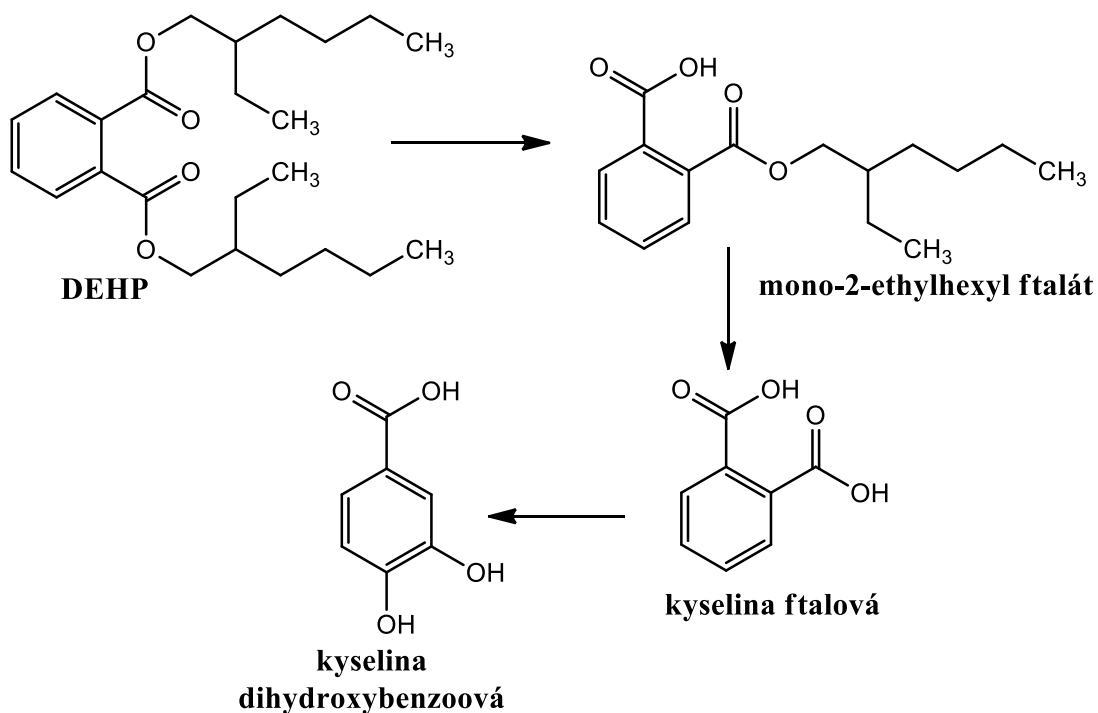
Tabulka 2 – Fyzikální vlastnosti DEHP [10]

Sumární vzorec	$C_{24}H_{38}O_4$
Molekulová hmotnost	390,6 g/mol
Bod varu	<200 °C
Rozpustnost ve vodě (při 20 - 25 °C)	0.0006 – 1.3 mg/l
Hustota (při 20 °C)	0.98 g/ml
Log K_{OW}	7,5

O této látce je známo, že se hromadí v čistírenském kalu, což může přispět k omezení jejich využívání. Díky nedávným studiím s čistými kulturami bylo prokázáno, že biologická degradace změkčovadel včetně DEHP vytváří toxické metabolity včetně kyseliny 2-ethylhexanové, 2-ethylhexanolu a 2-ethylhexanalu. Dopady a osudy produktů degradace těchto změkčovadel jsou však neznámé, proto se Beauchesne a kol. zabývali zjišťováním koncentrace DEHP a Bis(2-ethylhexyl) adipátu (DEHA) a jejich metabolitů v různých čistírenských kalech. Koncentrace DEHP v primárních, sekundárních, odvodněných či sušených kalech se pohybovala v rozmezí od 15 do 346 mg.kg⁻¹ a metabolity obou látek byly detekovány téměř ve všech kalech, kromě těch, které prošly sušícím procesem za vysokých teplot. Předpokládá se tedy, že čistírenské kaly mohou představovat významný zdroj změkčovadel a jejich toxických metabolitů v životním prostředí. [11]

Biodegradace esterů kyseliny ftalové probíhá účinkem esteráz, za vzniku isomerů kyseliny ftalové, které jsou poté převedeny na dihydroxylované meziprodukty pomocí specifických a indukovatelných dioxygenáz. Geny, kódující enzymy podílející se na degradaci, jsou uspořádány v operonech přítomných buď na plazmidu nebo chromosomu nebo na obou, a jsou indukované specifickým izomerem ftalátu. Pochopení metabolických cest, rozmanitosti a jejich genetické regulace může pomoci při konstrukci bakteriálních kmenů pomocí genetického inženýrství pro zlepšení efektivity bioremediace a čištění kontaminovaných míst. [12]

V jedné ze studií věnované biodegradaci DEHP a dalších ftalátů byl z půdy izolován bakteriální kmen schopný degradace di-2-ethylhexylftalátu a jeho identifikací bylo zjištěno, že se jedná o *Bacillus subtilis*. Ten byl schopný využít jako zdroj uhlíku také další látky: di-butylftalát, diethylftalát, di-pentylftalát, di-propylftalát a kyselinu ftalovou; účinnost biodegradace byla přes 99 %, když byla inkubace provedena po dobu 5 dnů při 30 °C. Tento mikroorganismus degradoval di-2-ethylhexylftalát a di-butylftalát za vzniku mono-2-ethylhexylftalátu a monobutylftalátu, které byly následně metabolizovány na kyselinu ftalovou a ta dále rozkládána cestou přes kyselinu dihydroxybenzoovou, což bylo doloženo studii spotřeby kyslíku a GC-MS analýzou. Byla také zjišťována míra dekontaminace půdy znečištěné DEHP a výsledky ukázaly, že kmen by mohl degradovat kolem 80 % 5 mmol DEHP prostým přidáním 8 % kultivačního média do půdy; to naznačuje, že degradace může nastat i v přítomnosti jiných organismů. [13]



Obrázek 3 – Degradace DEHP přes kyselinu ftalovou

Ve studii zabývající se odstraňováním DEHP z odpadních vod byly měřeny koncentrace DEHP ve vodných fázích, v různých stupních běžné čistírky odpadních vod (ČOV). Byla zpracována hmotnostní bilance, která ukázala, že celková účinnost odstraňování DEHP z vodné fáze ČOV byla v průměru 94 % z koncentrace obsažené v přitékající odpadní vodě. Hlavním procesem odstraňování však byla sorpce na primární a sekundární

kal. Biodegradace byla odhadnuta na cca 14 % DEHP. Primární biotransformační produkt DEHP, monoethylhexylftalát, nebyl zjištěn v žádném stupni. [14]

V další studii, jež se věnovala rozkladu různých esterů kyseliny ftalové (PAE), zejména di-n-butylftalátu (DBP) a DEHP, bakteriemi přirozeně se vyskytujícími ve vodě z řeky Tempaku, bylo degradováno téměř 100 % diethylftalátu (DEP) a přibližně 70 % DEHP po 7 denní kultivaci. Bylo získáno 8 bakteriálních kultur, které všechny vykazovaly schopnost biodegradace i některých dalších PAE, kromě dimethylftalátu (DMP). Jako nejaktivnější se ukázaly kultury *Acinobacter lwoffii*, které vykazovaly nejvyšší degradační aktivitu. [15]

Nalli a kol. se zabývali biodegradací změkčovadel pomocí *Rhodococcus rhodochrous*, a v tomto případě byla bakterie pěstována v přítomnosti jednoho ze tří změkčovadel: bis 2-ethylhexyl adipátu (BEHA), dioktyl ftalátu (DOP, neboli DEHP) nebo dioktyl tereftalátu (DOTP). Žádné ze změkčovadel nebylo bakterií degradováno bez dodání dalšího zdroje uhlíku, jako např. hexadekanu. Když však byl *Rhodococcus rhodochrous* pěstován v přítomnosti hexadekanu jako přidaného substrátu, došlo k naprosté degradaci BEHA a mírné degradaci DEHP. DOTP byl v přítomnosti hexadekanu degradován přibližně z poloviny. Ve všech těchto růstových studiích během degradace změkčovadel rostla toxicita média, v němž byly bakterie kultivovány. Ve všech případech byla zjištěna akumulace jednoho či dvou meziproductů s narůstající toxicitou. Jeden z nich byl identifikován jako kyselina 2-ethylhexanová a byla pozorována při degradaci všech tří zkoumaných změkčovadel. Její koncentrace se navyšovala, dokud nebyla degradace změkčovadel ukončena a vždy byla přítomna na konci procesu. Další meziproduct byl identifikován jako 2-ethylhexanol a ten byl pozorován pouze při degradaci BEHA. Tento alkohol byl pozorován již dříve ve studiích zabývajících se degradací BEHA a na konci experimentu již pozorován nebyl (byl oxidován na kyselinu). Oba meziproducty, 2-ethylhexanol i 2-ethylhexanová kyselina, se ukázaly jako toxické a jejich přítomnost vysvětlovala nárůst toxicity v průběhu degradace. Výskyt těchto meziproductů byl konzistentní s již popsány-
mi degradačními mechanismy pro všechny 3 změkčovadla, zahrnující hydrolyzu esterových vazeb s následnou oxidací uvolněného alkoholu. [16]

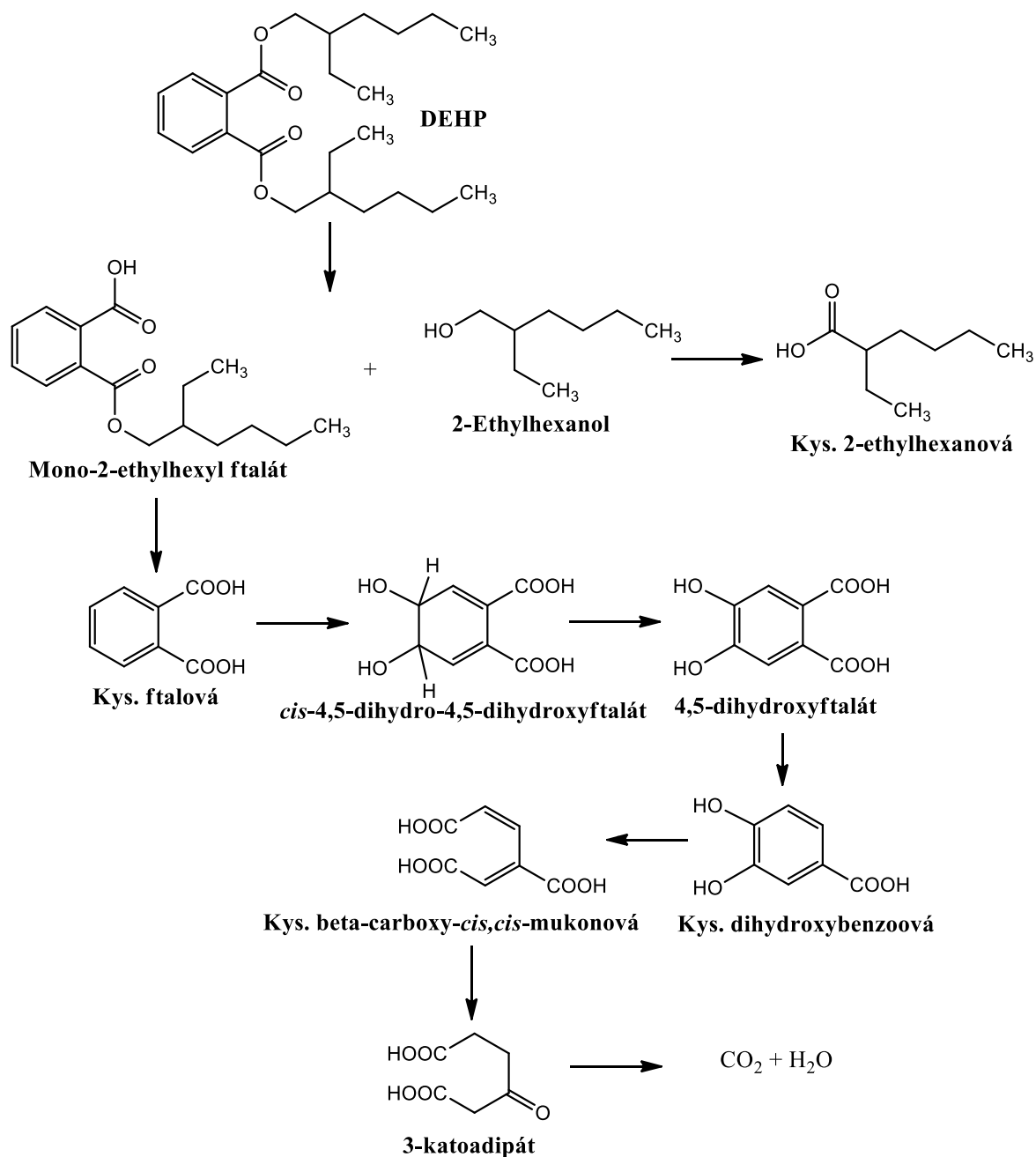
Všechny tři izomery kyseliny ftalové (*ortho*, *meta* a *para* benzen dikarboxylová kyselina) jsou produkovány ve velkém množství a používány v chemickém průmyslu jako suroviny pro výrobu změkčovadel nebo polyesterů. Během výroby izomerů kyseliny ftalové se obecně vyskytují vysoké koncentrace aromatických kyselin. Pro studium potenciální

biodegradability těchto hlavních antropogenních sloučenin v anaerobních reaktorech byly provedeny testy biodegradability. Testované sloučeniny byly benzoát, *ortho*-ftalát, isoftalát, tereftalát, a také dimethyl ftalát, dimethyl tereftalát, *para*-toluát a *para*-xylen. Zdroji mikroorganismů byly 2 typy granulovaného kalu a běžný čistírenský kal z městské čistírny. Bylo zjištěno, že všechny isomery kyseliny ftalové a jím odpovídající dimethyl-estery mohou být kompletně mineralizovány veškerými studovanými mikrobiálními společenstvy. Lagové fáze, které však byly v testech zjištěny, se pohybovaly v rozmezí 17 – 156 dnů. Pozorované degradační křivky tak autoři vysvětlovali růstem původně malého množství mikroorganismů přítomných v inokulu, se specifickou schopností degradovat konkrétní isomer ftalátu. Pozorované pořadí v délce lagové fáze pro testované látky je: ftalát < tereftalát < isoftalát. Toto pořadí se zdá být spojeno s hojností různých isomerů kyseliny ftalové v přírodě. Počáteční krok v degradační cestě obou dimethyl esterů byla hydrolyza postranního řetězce esteru, končící tvorbou odpovídajícího mono-methyl-isomeru a poté isomeru kyseliny ftalové. Krokem limitujícím rychlost mineralizace obou esterů, dimethyl-ftalátu a dimethyl-tereftalátu, byla degradace příslušného isomeru kyseliny ftalové. Tyto výsledky značí, že čas potřebný pro nastartování anaerobních bioreaktorů pro čištění odpadních vod obsahující izomery a estery kyseliny ftalové záleží jen málo na mikrobiálním složení použitého inokula, ale může trvat několik měsíců. [17]

Achromobacter denitrificans kmen SP1, izolovaný ze splaškového kalu zatíženého plastem, dokázal efektivně využít DEHP jako zdroj uhlíku, když byl přidán do jednoduchého základního minerálního média (BSM). Pro optimalizování parametrů procesu byla použita metoda odezvy plochy (RSM). Za optimálních podmínek – míchání: 200 otáček za minutu, teplota: 32 °C, koncentrace DEHP: 10 mmol.l⁻¹, čas 72 h a pH 8,00 – byl experimentálně pozorovaný úbytek DEHP 63 %, přičemž předpovídaná hodnota byla 59 %. Korelační koeficient mezi těmito hodnotami byl 0,998, což je velmi blízko předpokládanému modelu. Byla používána analytická metoda GC-MS a způsob degradace byl částečně odvozen pomocí produkce meziproductů: 2-ethylhexyl-ftalátu a 2-ethylhexanolu. Stručně řečeno, tato studie popisuje *A. denitrificans* kmen SP1 jako vysoce účinnou bakterii pro kompletní remediaci prostředí s obsahem DEHP v koncentraci 10 mmol.l⁻¹ za 96 hodin v BSM (50 % spotřebováno za 60 hodin). [18]

Acinetobacter sp. SN13 identifikovaný pomocí sekvenční analýzy genu pro 16S rRNA byl schopný rozkladu DEHP v uměle kontaminované vodě (došlo k odstranění 90 % DEHP během 5 dnů inkubace). Kmen byl izolován z aktivovaného kalu získaného z místní

čistírny odpadních vod (Macau, Čína). Optimální teplota procesu byla 30 °C, pH prostředí nemělo velký vliv a proces probíhal při pH 3-9. Nejvyšší rychlost degradace byla dosažena, když počáteční koncentrace DEHP činila 400 mg.l⁻¹. Obsah železných iontů (Fe³⁺ při 100-1000 μg.l⁻¹) vykazoval stimulační účinek pro biodegradaci DEHP, zatímco Mn²⁺ stimuloval biodegradaci při nižších koncentracích (100 μg.l⁻¹), ale inhiboval při vyšších koncentracích (500 – 1000 μg.l⁻¹). Případná degradační cesta DEHP byla navržena identifikací následujících meziproductů: 2-ethylhexyl-ftalátu (EHP), kyseliny ftalové (PA), protokatechoátu, β-karboxy-*cis-cis*-mukonové kyselina a 3-katoadipátu. [19]



Obrázek 4 – Navržená degradační cesta DEHP bakterií *Acinetobacter* sp.

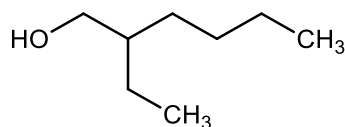
Nově izolovaný kmen *Agromyces* sp. MT-O dokázal využít různé ftaláty a efektivně degradovat DEHP. Pro optimalizaci metody byla použita metoda plochy odezvy (RSM) a byly zjištěny optimální podmínky: pH 7,2; teplota 29,6 °C a OD_{600} inokula 0,2; což mělo za následek téměř úplnou degradaci DEHP v koncentraci 200 mg.l^{-1} do 7 dnů. Při různých počátečních koncentracích ($20 - 1000 \text{ mg.l}^{-1}$) DEHP odpovídaly degradační křivky kinetickému modelu prvního řádu, a poločas rozpadu DEHP se pohyboval od 0,83 do 2,92 dnů. GC-MC analýza ukázala, že DEHP byl degradován na monoethylhexylftalát a

kyselinu ftalovou před jeho úplnou mineralizací. Bioaugmentace půdy, kontaminované DEHP, kmenem MT-O výrazně zvýšila stupeň úbytku DEHP v dané půdě. [20]

Cílem další studie bylo izolovat kmen schopný utilizace DEHP, který by dokázal využívat DEHP jako zdroj uhlíku v tekutém médiu i v půdě. Z půdy, jež byla kontaminována ftaláty (PAE), byl izolován kmen bakterií WJ4, jež byl přirazen k rodu *Rhodococcus* a byl schopen účinně odstranit DEHP z půdy. K degradaci 96,4 % DEHP (200 mg.l⁻¹) v tekutém médiu bylo třeba 7 dní, a k degradaci 55 % DEHP (1,0 g.kg⁻¹) z uměle kontaminované půdy 21 dní. Tento kmen měl silnou schopnost degradovat DEHP v tekutém médiu a uměle kontaminované půdě bez přidaných živin. Proto tento kmen představuje nový nástroj pro odstraňování PAE z kontaminovaných půd a může mít velký potenciál při remediaci ftaláty znečištěného prostředí.[21]

Zajímavostí je, že byly rovněž provedeny pokusy s růstem hlívy ústříčné na médiu obsahující glukózu a DEHP. Nejvyšší produkce biomasy byla pozorována v médiu s obsahem DEHP 1000 mg.l⁻¹. Hlíva ústříčná degradovala 100 % DEHP po 504 hodinách. Meziprodukty biodegradace DEHP byly identifikovány pomocí GC-MS a byla navržena biodegradační cesta DEHP. DEHP je pravděpodobně metabolizován ve třech fázích, z nichž první je deesterifikační, produkující 2-ethyl-1-hexanol a kyselinu ftalovou. Obě tyto látky jsou dále rozkládány na jednodušší látky (zejména na kyselinu octovou, vstupující do Krebsova cyklu) a také butandiol. Bylo také zjištěno, že hlíva ústříčná degrduje a využívá jako zdroj uhlíku a energie vysoké koncentrace DEHP, až do hodnoty 1000 mg.l⁻¹. [22]

3 2-ETHYLHEXANOL



Obrázek 5 – Struktura 2-ethylhexanolu

Tabulka 3 – Fyzikální vlastnosti 2-ethylhexanolu [23]

Sumární vzorec	$C_8H_{18}O$
Molekulová hmotnost	130,23 g/mol
Bod varu	184 °C
Hustota (při 25 °C)	0,83 g.ml ⁻¹
Log K_{OW}	2,73

Další názvy: Isooktylalkohol, 2-ethylhexan-1-ol.

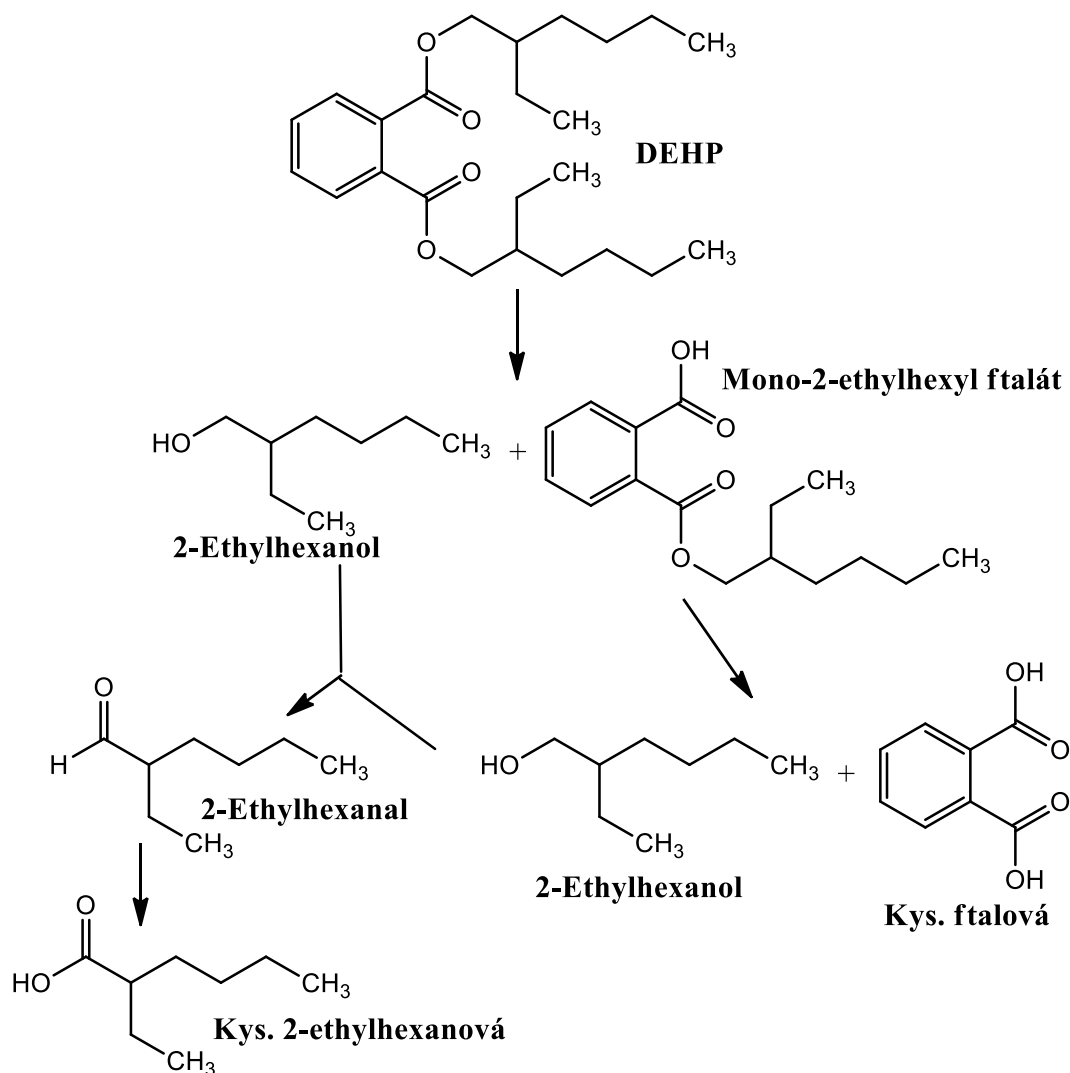
2-Ethylhexanol (EHOL) je derivát uhlovodíku, mastná bezbarvá kapalina s jemnou, nasládlou vůní, slabě rozpustná ve vodě. Používá se na výrobu esterů, mimo jiné DEHP. Používá se také jako přídavná složka v dekorativní kosmetice, šamponech, toaletních mýdlech a jiných toaletních potřebách. Dále je používán jako přísada domácích mycích prostředků a detergentů. Jeho celosvětová roční spotřeba se udává 0,1 – 1 tisíc tun ročně. [24]

EHOL byl také identifikován jako těkavá organická látka výrazně přispívající ke zhoršené kvalitě vzduchu v budovách a vnitřních prostorech.

Změkčovadla jsou běžné složky prachu a stavebního materiálu a jsou degradována směsí bakterií a hub za vzniku 2-ethylhexanolu a jiných metabolitů. 2-Ethylhexanol se vyznačuje značnou těkavostí a v přírodě byl zaznamenán ve významném množství. Koncentrace, ve kterých byl 2-ethylhexanol pozorován jako organická těkavá látka ve vzorcích vzduchu, mohly být ovlivněny faktem, že mnoho mikroorganismů, které jej produkují, jsou zároveň schopné jej oxidovat na 2-ethylhexanovou kyselinu, která je těkavá mnohem méně. Vedou se diskuze o tom, že abiotický degradační mechanismus změkčovadel, jež by vedl ke vzniku 2-ethylhexanolu, je málo pravděpodobný, a pokud by se tak dělo, měl by být pozorován i vznik dalších metabolitů. Nejpravděpodobnějším zdrojem 2-ethylhexanolu ve vnitřním vzduchu je tedy mikrobiální degradace změkčovadel. Byl zjištěn vztah mezi

částecnou biodegradací změkčovadel mikroorganismy a výskytem těkavých organických látek (VOC), spojenými se špatnou kvalitou vnitřních prostor. [25]

Také v další studii, zabývající se změkčovadly v životním prostředí, bylo zjištěno, že interakce mikrobů se změkčovadly vede ke tvorbě metabolitů, včetně kyseliny 2-ethylhexanové a 2-ethylhexanolu, jež odolávají další degradaci. Přítomnost těchto metabolitů byla zjištěna v různých vzorcích životního prostředí. I v komplexním mikrobiálním ekosystému nebyla degradace změkčovadel úplná a byl při ní pozorován vznik významného množství kyseliny 2-ethylhexanové a 2-ethylhexanolu. U těchto dvou látek bylo pomocí testu Microtox prokázáno, že vykazují akutní toxicitu u hrotnatky obecné, pstruha duhového a jelečka velkohlavého. Předpokládá se, že jelikož jsou změkčovadla v životním prostředí všudypřítomná, bude tomu tak také u jejich problematických metabolitů. [26]



Obrázek 6 – Vznik 2-ethylhexanolu z DEHP

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 POUŽITÝ MATERIÁL A METODIKA POKUSŮ

Mikrobiální kultury, s nimiž bylo pracováno, pocházejí z mé bakalářské práce, ve které byly izolovány a uchovány při -80 °C pro další použití.

Většinou bylo pracováno s jejich suspenzí ve fyziologickém roztoku podle 2. stupně McFarlandovy zákalové stupnice.

4.1 Použité přístroje a laboratorní pomůcky

Aseptický laminární box Telstar (Španělsko); Spektrofotometr pro mikrotitrační desičky TECAN (Sunrise, USA); Dvoupaprskový UV-VIS spektrofotometr Unicam UV 500 (Thermo Spectronic); Spektrofotometr Halo DB-20 (Dynamic Scientific); Laboratorní váhy Adventurer Pro 500; Analytické váhy SI 64 A (Denver instrument); Laboratorní sterilizátor SANOclav (Wolf, SRN); Třepačka laboratorní vratná GFL (SRN); Elektromagnetické míchadlo s ohřevem MMZA (Laboratorní přístroje Praha, ČR); Chladnička ARDO; Mikroskop Olympus CX41 (Japonsko); Termostaty BT 120 pro psychrofilní i mezofilní kultivaci (Laboratorní přístroje Praha, ČR); Termocyklér PTC 100 MJ Research (Bio-Rad)

Filtry Millex GS Filter Unit 0,22 µm; Mikrotitrační desičky - 96 jamek (GAMA, ČR); pipety; dávkovače; sterilní kličky; sterilní zkumavky; běžné laboratorní sklo; plastové Petriho misky.

4.2 Použité živné půdy a roztoky

4.2.1 TYA agar (HIMEDIA, Indie)

Bylo naváženo 2,1 g půdy, přidáno 100 ml destilované vody a po 5 minutách suspendace byla živná půda sterilizována v autoklávu při 121°C po dobu 26 minut.

4.2.2 R2A agar (HIMEDIA, Indie)

Bylo naváženo 1,8 g půdy, přidáno 100 ml destilované vody a po 5 minutách suspendace byla živná půda sterilizována v autoklávu při 121°C po dobu 26 minut.

4.2.3 Chemikálie

2-Ethylhexylsalicylan (EHS), bis(2-ethylhexyl)-ftalát (DEHP), 2-ethylhexanol (EHOL) a 2-ethylhexanal (EHAL) byly získány od firmy Sigma-Aldrich, ostatní chemikálie od běžných dodavatelů základních laboratorních potřeb.

4.2.4 Tekuté minerální médium (MM)

Do 1 l odměrné baňky bylo odměřeno potřebné množství destilované vody vypočtené dle Tabulky 4 a ve stejném pořadí jako v tabulce byly přidávány další složky. Vše bylo poté dobře promícháno a bylo změřeno pH, které se mělo pohybovat v rozmezí 7,4 – 7,5. Minerální médium bylo poté rozlito dle potřeby do kultivačních lahví a poté sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 26 minut.

Tabulka 4 – Složení tekutého minerálního média na 100 ml

Složka	Objem [ml]
Destilovaná voda	85
Roztok A (9,07 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/1000$ ml)	2
Roztok B (23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}/1000$ ml)	8
Roztok stopových prvků	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	1
$\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,2 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	1
NH_4Cl (30 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	1
NaCl (50 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	0,5

4.2.5 Roztok stopových prvků

Do odměrné baňky byly naváženy jednotlivé soli s obsahem stopových prvků a poté rozpuštěny v 1 l destilované vody.

Tabulka 5 – Složení roztoku stopových prvků

Sůl	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

4.2.6 Fyziologický roztok

8,5 g NaCl bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. Roztok byl sterilizován při 121 °C po dobu 26 minut.

4.2.7 MEM vitamíny

MEM vitamíny byly předem připraveny a ve všech pokusech byly dávkovány v poměru 1 µl MEM vitamínů na 1 ml MM.

Tabulka 6 – Informace o složení MEM vitamínů od výrobce (Biosera, Francie)

Složka	Koncentrace [mg.l ⁻¹]
Vitamíny	
Cholin chlorid	100,0
D-Pantotenan vápenatý	100,0
Kyselina listová	100,0
Nikotinamid	100,0
Pyridoxal hydrochlorid	100,0
Riboflavin	10,0
Thiamin hydrochlorid	100,0
i-Inositol	200,0
Anorganické soli	
Chlorid sodný (NaCl)	8500,0

4.3 Pokusy

4.3.1 Ověření růstu kultur na EHS

Kultivace bakterií probíhala v tekutém minerálním médiu, do potřebného počtu sterilních 100 ml lahvíček bylo nadávkováno po 15 ml MM, 15 µl MEM vitamínů, 15 µl dané kultury (2x vedle sebe) a 15 µl EHS. Do 2 lahvíček nebyla nadávkována žádná kultura a ty

sloužily jako srovnávací (blank). Bylo pracováno se sedmi kulturami označenými jako AP11, AP12, AP13, AP14a, AP14b, AP15 a AP16. Pokus byl kultivován na vratné třepačce ve tmě při 25 °C.

4.3.2 Sledování růstu kultur při různých koncentracích NaCl na TYA agaru

Byl připraven obohacený TYA agar, s koncentracemi NaCl v rozsahu 1 - 10 % (hm./obj.), dle tabulky 7, a na ně byly očkované kultury AP12 a AP14b. Misky byly inkubovány v psychrofilních podmínkách v termostatu při 25 °C po dobu 10 dní.

Tabulka 7 – Koncentrace NaCl v obohaceném TYA agaru

Koncentrace NaCl [%]	Celkový objem TYA agaru [ml]
1	100
2	100
3	100
4	100
5	100
6,5	100
10	100

4.3.3 Sledování růstu kultur při různých teplotách na TYA agaru

Kultury AP12 a AP14b byly naočkované na misky s TYA agarem a inkubovány v různých tepelných podmínkách (5 °C, 10 °C, 20 °C, 26 °C, 30 °C, 37 °C a 43 °C) po dobu 10 dní.

4.3.4 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-Ethylhexylsalicylanu s přidavkem vitamínů při různém pH

Bylo připraveno tekuté minerální médium o různém pH, což bylo dosaženo změnou poměru roztoku A (9,07 g KH_2PO_4 /1000 ml) a roztoku B (23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /1000 ml), dle tabulky 8.

Všechny složky pro přípravu tekutých minerálních médií byly smíchány dle návodu v daném pořadí, kromě roztoku A a roztoku B, a byly rozděleny po 45 ml do 9 lahvíček. Poté byly přidány fosforečnany dle tabulky 4 a pomocí pH metru bylo zkontrolováno pH. Lahvičky s předpokládaným pH 8,5 a 9 byly dále upraveny roztokem 1M KOH.

Tabulka 8 – Objemové množství roztoků A a B pro přípravu MM o různém pH

pH	Roztok A KH ₂ PO ₄ [ml/50ml]	Roztok B Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O [ml/50ml]
5,0	5	0
5,5	4,8	0,2
6,0	4,4	0,6
6,5	3,4	1,6
7,0	2	3
7,5	0,8	4,2
8,0	0,2	4,8
8,5	0,0	5,0
9,0	0,0	5,0

Do sterilních zkumavek byly pipetovány 3 ml příslušného MM, asepticky bylo přidáno 3 μ l sterilních MEM vitamínů, 3 μ l EHS a nakonec bylo očkováno 5 μ l suspenze zkoumané kultury. Pro každou kulturu byly ještě připraveny 2 zkumavky s pH 7,5 bez EHS, které poté sloužily jako kontroly (očkované). Po 8 dnech inkubace na třepačkách ve tmě a při 25 °C byla měřena optická denzita při 600 nm (OD₆₀₀) na přístroji TECAN.

4.3.5 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-Ethylhexanolu

Tekuté minerální médium bylo rozlito po 15 ml do 6 lahvíček o objemu 100 ml a do každé lahve bylo přidáno 15 μ l MEM vitamínů a 9 μ l 2-ethylhexanolu (v koncentraci 500 mg.l⁻¹). 2 Lahvičky byly naočkovány 15 μ l kultury AP12 a 2 lahvičky 15 μ l kultury AP14b. Lahvičky byly umístěny na třepačku do místnosti bez přístupu světla při 25 °C po dobu 14 dní.

4.3.6 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu v různých koncentracích

Dle tabulky 9 byly připraveny lahvičky s koncentracemi 2-ethylhexanolu v rozmezí 50 – 300 mg.l⁻¹. Bylo dávkováno 15 nebo 30 ml MM; 15 nebo 30 μ l MEM vitamínů; 15 nebo 30 μ l kultury AP12 či AP14b.

Tabulka 9 – Dávkované objemy složek

Koncentrace 2-ethylhexanolu [mg.l ⁻¹]	Objem 2-ethylhexanolu [μl]	Objem MM [ml]	Objem MEM vitamínů [μl]	Objem kultury [μl]
50	1,81	30	30	30
100	1,81	15	15	15
200	3,62	15	15	15
300	5,42	15	15	15

Pokus byl optometricky zhodnocen po 7 dnech kultivace na třepáčkách a kvůli pozitivnímu výsledku pokusu byl nasazen další pokus stejného typu s větším rozsahem koncentrací.

Byly nachystány lahvičky o různých koncentracích 2-ethylhexanolu pro každou kulturu:

AP12: 300 mg/l; 350 mg/l; 400 mg/l a 450 mg/l

AP14b: 200 mg/l; 250 mg/l; 300 mg/l a 350 mg/l

Bylo dávkováno 15 ml MM; 15 μl MEM vitamínů; 15 μl kultury AP12 či AP14b a 2-ethylhexanol dle tabulky 10.

Tabulka 10 – Dávkované objemy složek

Koncentrace 2-ethylhexanolu [mg.l ⁻¹]	Dávkovaný objem 2-ethylhexanolu [μl]
200	3,62
250	4,52
300	5,42
350	6,34
400	7,24
450	8,15

Tento pokus byl po 7 dnech kultivace vyhodnocen stejným způsobem jako předchozí.

4.3.7 Růst kultur AP12 a AP14b na DEHP

Do lahvíček bylo dávkováno 15 ml MM, 15 μ l MEM vitamínů, 9,5 μ l DEHP (koncentrace cca 560 mg.l⁻¹), nakonec přidáno 15 μ l suspenze dané kultury a pokus byl kultivován stejně jako v předchozích případech na třepačce, ve tmě a při 25 °C 14 dnů.

4.3.8 Růst kultur AP11, AP12, AP14b a AP16 na EHS s vitamíny a bez vitamínů

Byly připraveny 2 sady pokusů, se stejným postupem i chemikáliemi, jedna se od druhé lišila pouze přidavkem MEM vitamínů, jež ve 2. sadě pokusů dávkovány nebyly. Do každé lahve o objemu 100 ml bylo dávkováno 15 ml MM, 15 μ l MEM vitamínů, 15 μ l EHS (500 mg.l⁻¹) a nakonec 15 μ l suspenze kultur. Lahve byly po přípravě pokusu kultivovány při 25 °C na laboratorní vratné třepačce, při 100 cyklech za minutu v místnosti bez přístupu světla. V průběhu 13 dnů byly v daných časových intervalech asepticky odebírány vzorky (2x200 μ l z každé lahve) pro měření optické hustoty při 600 nm (OD₆₀₀) na přístroji TECAN.

4.3.9 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanalů o různých koncentracích

Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanalů, pokus první

Byly připraveny suspenze s 50 ml MM, 50 μ l MEM vitamínů a 50 μ l kultury AP12 či AP14b a různým objemem 2-ethylhexanalů pro dosažení chtěných koncentrací dle tabulky 11.

Tabulka 11 – Koncentrace a dávkované objemy 2-ethylhexanalů v lahvích

Koncentrace 2-ethylhexanalů [mg.l ⁻¹]	Objem 2-ethylhexanalů [μ l]
20	1,22
30	1,80
40	2,24
50	3,0

Pro nejasné výsledky byl pokus opakován s drobnými úpravami.

Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s upraveným postupem, pokus druhý

Nejdříve byl připraven zásobní roztok 2-ethylhexanolu o koncentraci 200 mg.l^{-1} , navážením 20 mg 2-ethylhexanolu do 100 ml odměrné baňky a doplněním po rysku destilovanou vodou. Roztok byl přefiltrován přes sterilní stříkačkový filtr do sterilních zkumavek. MM bylo rozplněno do 18 lahviček po 19 ml, sterilizováno a po zchladnutí bylo přidáno příslušné množství MEM vitamínů (na 1 ml MM 1 μl MEM vitamínů).

1+2: Zaočkováno 7 μl suspence kultury AP 12 a byl přidán 1 ml sterilní destilované vody.

3+4: Zaočkováno 7 μl suspence kultury AP 14b a byl přidán 1 ml sterilní destilované vody.

5+6: Přidán 1 ml sterilního zásobního roztoku 2-ethylhexanolu (200 mg/l), neočkováno.

7+8: Zaočkováno 7 μl suspence kultury AP 12 a byl přidán 1 ml sterilního zásobního roztoku 2-ethylhexanolu

9+10: Zaočkováno 7 μl suspence kultury AP 14b a byl přidán 1 ml sterilního zásobního roztoku 2-ethylhexanolu

11+12 Zaočkováno 7 μl suspence kultury AP 12 a bylo přidáno 1,55 ml sterilního zásobního roztoku 2-ethylhexanolu.

13+14 Zaočkováno 7 μl suspence kultury AP 14b a bylo přidáno 1,55 ml sterilního zásobního roztoku 2-ethylhexanolu.

15+16 Zaočkováno 7 μl suspence kultury AP 12 a bylo přidáno 2,12 ml sterilního zásobního roztoku 2-ethylhexanolu

17+18 Zaočkováno 7 μl suspence kultury AP 14b a bylo přidáno 2,12 ml sterilního zásobního roztoku 2-ethylhexanolu

Byla změřena výchozí hodnota OD_{600} z lahviček 1 – 6, 200 μl , odebráno asepticky.

4.3.10 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP***Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP, pokus první***

Bylo připraveno 15 lahviček o objemu 100 ml s 15 ml MM, byly sterilizovány a dle rozpisu plněny:

1 – 6 AP12, do každé lahvičky 15 μl MEM vitamínů

1;2 – 15 μl suspence AP12, 9 μl EHOL (500 mg.l^{-1})

3;4 - 15 μl suspence AP12, 9 μl EHOL + 10 μl DEHP (656 mg.l^{-1})

5;6 – 15 μl suspence AP12, 10 μl DEHP (656 mg.l^{-1})

1 – 6 AP14b, do každé lahvičky 15 μ l MEM vitamínů

1;2 – 15 μ l suspence AP14b, 9 μ l EHOL (500 mg.l⁻¹)

3;4 – 15 μ l suspence AP14b, 9 μ l EHOL + 10 μ l DEHP (656 mg.l⁻¹)

5;6 – 15 μ l suspence AP14b, 10 μ l DEHP (656 mg.l⁻¹)

13;14;15 – kontroly – 9 μ l EHOL (500 mg.l⁻¹) + 10 μ l DEHP (656 mg.l⁻¹) bez očkování

Po 240 hod (10. den) bylo do vzorků AP12 3; AP12 4; AP14b 3; AP14b 4 (vzorky, jež obsahoval jak 2-ethylhexanol, tak DEHP) přidáno 9 μ l 2-ethylhexanolu. Po 336 hod (14. den) z lahviček AP12 4 a AP14b 3 z předchozího pokusu s 2-ethylhexanolem přidáno 15 μ l kultur. Po 408 hod bylo asepticky odebráno malé množství vzorků a byla provedena mikroskopická kontrola za použití pozorovací komůrky CYRUS II a mikroskopu OLYMPUS CX41 s fázovým kontrastem, při zvětšení 100x10. Pomocí fotoaparátu CANON 1100D a softwaru Quick PHOTO MICRO 3.1 byly pořízeny fotografie vzorků. Počet buněk na 1 ml byl přepočítáván dle velikosti komůrky CYRUS II, při rozměru 50x50 μ m byl výsledný průměr buněk násoben 8 000 000. [27]

Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP, pokus druhý

Pokus byl opakován s naočkováním bakterií přímo z lahví, ve kterých se bakterie pomnožily (Z lahví z prvních pokusů s 2-ethylhexanolem – AP12 narostlý na 2-ethylhexanolu a DEHP a AP14b narostlý na 2-ethylhexanolu), jinak se postup nelišil. Pokus byl zhodnocen analyticky a optometricky.

4.3.11 Extrakce hexanem

Pro extrakci hexanem byly vybrány vzorky z předchozího pokusu Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu, které se zdály být pozitivní, tudíž u nich byl pozorován zákal a také DEHP nebyl viditelný na hladině, jako tomu bylo na začátku pokusu.

Extrakce do hexanu byla prováděna v poměru hexan : vzorek 1:3. Dávkováno 5 ml *n*-hexanu do každé lahve (s cca 15 ml MM), minutu ručně třepáno, poté hodinu mícháno na magnetických míchačkách. Pro následné ředění vzorku byla pipetou opatrně odebrána průzračná horní hexanová vrstva, v objemu vhodném pro dané ředění.

Obvyklé ředění vzorků:

AP12 5; AP14b 5 a 15 – ředění 20x (0,5 ml vzorku + 9,5 ml hexanu)

AP12 4; AP14b 4 – ředění 25x (1 ml vzorku + 4 ml hexanu, z toho odebrán 1 ml vzorku a přidány 4 ml hexanu)

Z důvodu časové nenáročnosti a dostupnosti byla pro stanovení koncentrace DEHP ve vzorcích vybrána UV spektrometrie, s jejíž pomocí byla měřena absorbance a z rovnice kalibrační křivky byla počítána zbylá koncentrace ftalátu. Na základě výsledků plynoucích z diplomové práce Jindřišky Vyskočilové, ve které určovala nejvhodnější vlnovou délku pro měření koncentrace DEHP, byla zvolena vlnová délka 224 nm, při níž nedocházelo k nevhodnému posouvání maxima píku v závislosti na koncentraci, ale průběh byl lineární. [28]

4.3.12 Kalibrační řada pro měření DEHP v hexanu pomocí UV-vis spektrometrie

Byl připraven zásobní roztok DEHP v hexanu v koncentraci 1 g DEHP/1000 ml. Kalibrační řada byla v koncentracích 5; 10; 25; 50 a 100 mg.l⁻¹. Bylo naváženo 250 mg DEHP a doplněno na 250 ml hexanem pro vznik zásobního roztoku, z něhož byla dle výpočtů vytvořena kalibrační řada.

1000 mg/l → 100 mg/l (Ze zásobního roztoku bylo odebráno 25 ml a doplněno po rysku 250 ml odměrné baňky)

Vypočteno dle rovnice:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$1000 \cdot V_1 = 100 \cdot 250$$

$$V_1 = 25 \text{ ml}$$

100 mg/l → 50 mg/l

$$100 \cdot V_1 = 50 \cdot 250$$

$$V_1 = 125 \text{ ml}$$

50 mg/l → 25 mg/l

$$50 \cdot V_1 = 25 \cdot 250$$

$$V_1 = 125 \text{ ml}$$

25 mg/l → 10 mg/l

$$25 \cdot V_1 = 10 \cdot 250$$

$$V_1 = 100 \text{ ml}$$

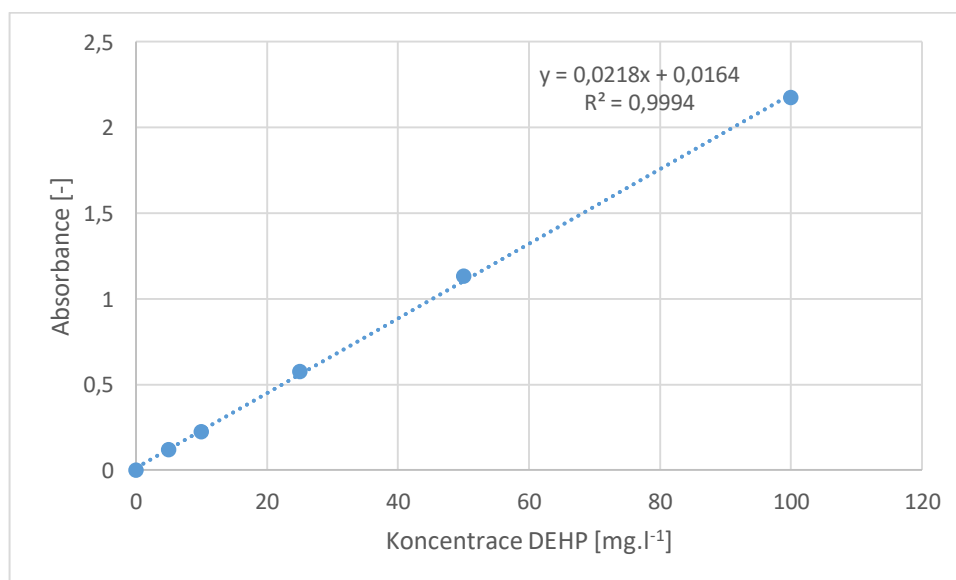
10 mg/l → 5 mg/l

$$10 \cdot V_1 = 5 \cdot 250$$

$$V_1 = 125 \text{ ml}$$

Tabulka 12 – Naměřené absorbance DEHP v *n*-hexanu při vlnové délce $\lambda=224$ nm

c [mg/l]	A [-]
5	0,122
10	0,224
25	0,578
50	1,135
100	2,175



Obrázek 7 – Kalibrační křivka pro DEHP v *n*-hexanu při $\lambda = 224$ nm ()

Absorbance vzorků byly většinou měřeny na spektrofotometru Unicam UV 500, jen u pokusu popsaného v kap. 5.10.7 byl použit spektrofotometr Halo DB-20.

4.3.13 Degradace DEHP kulturami AP12 a AP14b společně, za přídavku EHS

Bylo připraveno 12 kusů 100 ml lahvíček, do kterých bylo plněno MM po 15 ml, sterilizováno a po zchladnutí byly přidány MEM vitamíny.

Lahvičky 1-6 byly očkované 7 μl suspenze AP12 a 7 μl suspenze AP14b a dále byl přidáván DEHP a EHS dle tabulky 13. Lahvičky 7 – 12 byly ponechány neočkované.

Tabulka 13 – Dávkované objemy DEHP a EHS

Označení lahvičky	Objem DEHP [μl]	Koncentrace DEHP [mg.l^{-1}]	Objem EHS [μl]	Koncentrace EHS [mg.l^{-1}]
1; 2	8	525	0	-
3; 4	8	525	3	203
5; 6	0	-	3	203
7; 8	8	525	0	-
9; 10	8	525	3	203
11; 12	8	525	0	-

Inkubace všech lahvíček probíhala při 25°C, na třepače a ve tmě.

4.3.14 Utilizace DEHP kulturami AP12 a AP14b jednotlivě, za přídavku EHS

MM bylo rozplněno po 15 ml do 10 lahvíček, sterilizováno a po zchladnutí byly přidány MEM vitamíny. Lahvičky 1 – 4 byly očkované 14 μl suspenze AP12, lahvičky 5 – 8 14 μl suspenze AP14b. Lahvičky 9 a 10 byly očkované suspenzemi oběma kultur pro kontrolu předešlého pokusu (7 μl AP12 a 7 μl AP14b). Chemikálie byly nadávkovány dle rozpisu v tabulce 14.

Tabulka 14 – Dávkované objemy DEHP a EHS

Označení vzorku	Objem DEHP [μl]	Koncentrace DEHP [mg.l^{-1}]	Objem EHS [μl]	Koncentrace EHS [mg.l^{-1}]
1; 2	0	-	3	203
3; 4	8	525	3	203
5; 6	0	-	3	203

7; 8	8	525	3	203
9; 10	8	525	3	203

Všechny lahvičky byly inkubovány při 25 °C ve tmě na třepačce a po 2, 5 a 7 a 9 dnech bylo změřeno OD₆₀₀ a provedeno mikroskopické počítání buněk, v komůrce CYRUS II, 50x50 μm při zvětšení 10x100.

4.3.15 Vylepšení metodiky pro extrakci DEHP do *n*-hexanu

Pokusy s extrakcí 1

70 ml MM bylo smícháno s buňkami AP14b z misky, hustota buněk přibližně odpovídala zákalu na konci pokusů utilizace DEHP v pozitivních lahvičkách.

Do vytárovaných lahviček byly dávkovány chemikálie dle tabulky a zapsány jejich hmotnosti po přidání látek.

Tabulka 15 – Objemy a hmotnosti DEHP ve vzorcích

Označení lahve	Objem DEHP [μl]	Teoretická koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Hmotnost DEHP [mg]
1	8,9	586,6	8,8
2	8,9	540	8,1
3	8,9	560	8,4
4	8,9	606,7	9,1
5	4,5	263	-
6	4,5	263	-

Hmotnosti DEHP kolem 4,5 mg již nebylo možné zvážit, docházelo k velkému kolísání hodnot. Do lahviček 1 + 2 bylo přidáno 15 ml čistého MM, do ostatních 15 ml MM s buňkami. Takto byly lahve ponechány 30 minut na třepačce. Do všech lahví bylo přidáno míchadlo, 7,5 ml hexanu (poměr hexan: vzorek 1:2) a extrakce byla provedena jako u předchozího pokusu. Po hodině extrakce a dokonalém oddělení hexanové vrstvy byla velmi pozvolna přidávána destilovaná voda, až se hexanová vrstva dostala do hrdla. Poté, dle charakteru hexanové vrstvy, byly odebírány min. 2 vzorky z každé lahve a následovalo

naředění vzorku hexanem ve vialkách, dle rozpisu zaznamenaného v tabulce 16. Vzorky s předpokládanou vyšší koncentrací DEHP byly ředěny 15x, vzorky s předpokládanou nižší koncentrací DEHP byly ředěny 10x.

Tabulka 16 – Ředění jednotlivých vzorků hexanem

Označení vzorku	Ředění	Objem vzorku [ml]	Objem hexanu [ml]
1; 2; 3; 4	15x	0,5	7
5; 6	10x	0,5	4,5

Následovalo vysušení bezvodým síranem sodným přidáním jeho malého množství a ručním vytřepáním. Vzorky byly poté měřeny při $\lambda=224$ nm.

Pokusy s extrakcí 2

Další pokus s extrakcí se od předchozího lišil drobnými úpravami samotné extrakce.

Tabulka 17 – Objemy a hmotnosti DEHP ve vzorcích

Označení lahve	Objem DEHP [μ l]	Koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]
1	8,9	525
2	8,9	525
3	8,9	525
4	8,9	525
5	4,5	263
6	4,5	263

Do všech lahviček bylo přidáno 7,5 ml hexanu. Lahvičky byly pečlivě uzavřeny a 1 minutu ručně třepány. Poté byly umístěny na míchačky po dobu 30 minut a následně ponechány 15 minut v klidu pro dobré odsazení vrstev. Dále byla povolna přidávána destilovaná voda až se hexanová vrstva dostala do hrdla lahve. Byly odebírány minimálně 2 vzorky z každé lahve. Naředění hexanem proběhlo ve stejném poměru jako v předchozím pokusu. S lahvemi se kvůli škodlivým účinkům rozpouštědla pracovalo v digestoři, a kvůli možnému vytěkání a koncentrování ftalátu do hexanu muselo být pracováno rychle a vzor-

ky musely být ihned po odběru pečlivě uzavírány. Po naředění bylo do každé vialky přidáno půl malé lžičky bezvodého síranu sodného. Měření probíhalo při $\lambda=224$ nm.

4.3.16 Utilizace DEHP kulturou AP14b za přídavku EHS – podrobnější pokus

Utilizace DEHP kulturou AP14b za přídavku EHS, pokus první

Bylo nachystáno 20 lahvíček, do každé bylo přidáno 15 ml MM, byly sterilizovány a po zchladnutí přidány MEM vitamíny. Další složky byly přidány v pořadí: 14 μ l suspenze kultury AP14b, DEHP a/nebo EHS dle tabulky 17. Lahvičky 1 až 16 byly očkované, lahvičky 17 – 20 nikoli.

Tabulka 18 – Dávkování chemikálií a jejich koncentrace ve vzorcích

Označení vzorku	Objem DEHP [μ l]	Koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Objem EHS [μ l]	Koncentrace EHS [mg.l ⁻¹] [μ l]
1; 2	0	-	3	203
3; 4	8,9	525	3	203
5; 6	4,5	263	3	203
7; 8	8,9	525	0	-
9; 10	4,5	263	0	-
11; 12	0	-	3	203
13; 14	0	-	3	203
15; 16	0	-	3	203
17; 18	8,9	525	0	-
19; 20	4,5	263	0	-

Lahvičky byly inkubovány při stejných podmínkách jako předchozí pokus, jen každý 4. den bylo provedeno provzdušnění v laminárním boxu po dobu 15 minut. 9. den inkubace bylo provedeno mikroskopické počítání buněk v lahvích 1 až 6. V 10. dni inkubace byla provedena extrakce hexanem a stanovena koncentrace DEHP u lahví 1 až 10. V 11. dni inkubace bylo do lahví 11 a 12 přidáno 8 μ l DEHP, promícháno a extrahováno hexanem. Byla stanovena koncentrace DEHP. Do lahví 13 – 14 byly přidány 4 μ l DEHP, vše bylo promícháno, extrahováno, a byla stanovena koncentrace DEHP. Po získání výsledných

koncentrací DEHP bylo rozhodnuto, že bude pokus proveden ještě jednou, s delším časem inkubace.

Útílizace DEHP kulturou AP14b, za přídavku EHS – pokus druhý

Bylo nachystáno 20 lahvíček, do každé bylo přidáno 15 ml MM, byly sterilizovány a po zchladnutí přidány MEM vitamíny. Další složky byly přidány v pořadí: 14 μl suspenze kultury AP14b, DEHP a/nebo EHS dle níže uvedené tabulky. Lahvičky 1 až 16 byly očkovány, lahvičky 17 – 20 nikoli.

Tabulka 19 – Dávkování chemikálií a jejich koncentrace ve vzorcích

Označení vzorku	Objem DEHP [μl]	Koncentrace DEHP [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	Objem EHS [μl]	Koncentrace EHS [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] [μl]
1; 2	0	-	3	203
3; 4	8,9	525	3	203
5; 6	4,5	263	3	203
7; 8	8,9	525	0	-
9; 10	4,5	263	0	-
11; 12	0	-	3	203
13; 14	0	-	3	203
15; 16	0	-	3	203
17; 18	8,9	525	0	-
19; 20	4,5	263	0	-

Lahvičky byly inkubovány při stejných podmínkách jako předchozí pokus a 9. den inkubace bylo do lahvíček 15 a 16 přidáno 8,9 μl DEHP.

14. den inkubace bylo provedeno mikroskopické počítání buněk v lahvích 1 - 6.

15. den inkubace byla provedena extrakce hexanem a stanovena koncentrace DEHP v lahvích 1; 2; 7; 8; 9; a 10.

16. den inkubace bylo do lahví 11 a 12 přidáno 8 μl DEHP, promícháno a extrahováno hexanem. Byla stanovena koncentrace DEHP. Do lahví 13 – 14 byly přidány 4 μl DEHP, vše bylo promícháno, extrahováno, a byla stanovena koncentrace DEHP.

17. den inkubace byla provedena extrakce hexanem a stanovena koncentrace DEHP v lahvích 3; 4; 5; 6; 15 a 16.

5 IDENTIFIKACE KULTUR AP12 A AP14B

5.1 Gramovo barvení

Gramovo barvení patří mezi jednoduché metody, jež dělí běžné bakterie na dvě skupiny, grampozitivní (G+) a gramnegativní G (-), lišící se uspořádáním buněčné stěny.

Pro tento pokus byly použity čerstvé, po 2 dnech na TYA agaru narostlé kultury.

Nejprve byla na podložní sklíčko nanесena kapka sterilního fyziologického roztoku. Pomocí vyžíhané bakteriologické kličky bylo odebráno adekvátní množství biomasy, jež bylo rozetřeno s kapkou fyziologického roztoku na podložním sklíčku. Po vyschnutí biomasy na sklíčku byl preparát krátce zafixován nad plamenem kahanu. Poté na něj bylo kapátkem nanесeno dostatečné množství krystalové violeti, jež se nechala působit 1 minutu. Bez oplachu byla vrstva slita a na ni bylo kapátkem nanесeno dostatečné množství Lugolova roztoku, jež se opět nechal působit 1 minutu. Po uplynutí této doby byla vrstva slita, preparát jemně opláchnut destilovanou vodou a pomocí acetonu byla vrstva splachována, dokud přestalo odtékat barvivo. Poté byl preparát opět opláchnut destilovanou vodou a dobarven safraninem, který se nechal působit 1 minutu. Nakonec byl preparát opět jemně opláchnut destilovanou vodou a opatrně usušen nad plamenem kahanu a mikroskopicky pozorován pomocí imersního objektivu při zvětšení 1000x.

5.2 Izolace DNA

Bylo pracováno dle návodu MO Laboratories Inc. Pomocí PowerSoil DNA Isolation Kit. Kultury AP12 a AP14b byly suspendovány v připravených zkumavkách a opatrně promíchány pomocí vortexu. Bylo přidáno 60 μ l zásobního roztoku C1 a vše promícháno. Pomocí Mo Bio vortex adaptéru (Mo Bio k.č. 13000-V1) byly vzorky míchány 10 minut. Vzorky byly dále centrifugovány 30 sekund při 10 000 x g. Supernatant byl přenesen do čisté 1,5 ml zkumavky. K tomu bylo přidáno 250 μ l roztoku C2. Inkubováno 5 minut při 4 °C a dále centrifugováno 1 minutu při 10 000 x g. Do mikrozkušavky bylo přeneseno přibližně 500 μ l supernatantu, přidáno 200 μ l roztoku C3, promícháno a inkubováno 5 minut při 4 °C. Centrifugováno 1 minutu a do mikrozkušavky přeneseno maximálně 750 μ l supernatantu. Přidáno 1200 μ l roztoku C4 a promícháno. 675 μ l tohoto roztoku bylo přeneseno do kolonky a centrifugováno 1 minutu. Filtrát byl vylit a bylo přidáno dalších 675 μ l směsi a opět centrifugováno. Přidáno 500 μ l roztoku C5, centrifugováno 30 s. Filtrát byl

vyelit, a vše bylo znovu centrifugováno 1 minutu. Kolonka přenesena do mikrozkušavky, přidáno 30 μl roztoku C6 a ponecháno 5 minut v klidu. Centrifugováno 30 sekund. Takto připravená DNA byla použita pro další aplikace.

5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí PCR byl pomnožen úsek genu pro 16S rRNA, potřebný pro identifikaci kultur. Úsek DNA, který bylo třeba replikovat, bylo nutno ohraničit na začátku a na konci tzv. primery, krátkými oligonukleotidy DNA. Byly použity primery FD1 a RD1. Vzorky upravené dle návodu byly umístěny do termocykléru PTC 100 MJ Research (Bio-Rad), v němž proběhla amplifikace DNA. Byl nastaven program PCR TOUCH DOWN: 95 °C/2 min. → (95 °C 30 s; 56 – 61 °C 30 s; 72 °C 1,3 min.) 9 cyklů → (95 °C 30 s; 56 °C 30 s; 72 °C 1,3 min.) 24 cyklů → 72 °C 10 min.

5.4 Agarózová gelová elektroforéza

Bylo naváženo 0,5 g agarózy, jež byla následně rozvařena v 50 ml TAE pufru pomocí mikrovlnné trouby. K tomu bylo přidáno malé množství etidiumbromidu (1 – 2 kapky) a to bylo nalito do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Gel byl ponechán tuhnouti po dobu cca 30 minut. Po zatuhnutí gelu z něj byl hřebínek vyňat a amplifikovaná PCR směs byla nanesena do vytvarovaných komůrek, v pořadí:

1. 5 μl Quick Load® Purple bp DNA Ladder HNO551G – standard s fragmenty DNA známé délky
2. 3 μl AP12
3. 3 μl AP14b
4. 3 μl kontroly – PCR směs bez DNA matrice

Byla provedena elektroforéza, při které záporně nabitá DNA migruje ke kladné elektrodě. Fragmenty DNA byly pozorovány na UV transiluminátoru a pomocí DNA markeru byla určena velikost produktu.

5.5 Přečištění PCR produktu

Purifikace byla provedena dle PCR clean-up protokolu, pomocí Small DNA fragment extraction kitu. Na TECANu byla posléze zjištěna čistota produktu a vzorky byly odeslány na sekvenaci DNA.

6 VÝSLEDKY

6.1 Ověření růstu kultur na EHS

Prvním pokusem celé práce bylo ověření schopnosti dříve izolovaných kultur růst na 2-ethylhexylsalicylanu jako jediném zdroji uhlíku. Po naočkování všech kultur, získaných v průběhu bakalářské práce, do MM s EHS a vitamíny, byl růst v průběhu kultivace hodnocen vizuálně a výsledky jsou uvedeny v tabulce 20.

Tabulka 20 – Růst kultur na EHS

Název kultury	24 h	48 h	120 h	168 h
AP 11	Přítomnost vloček	Přítomnost vloček	Přítomnost vloček	Přítomnost vloček
AP 12	Přítomnost vloček	+ zákal	+ zákal	+ zákal
AP 13	+/-	-	-	-
AP 14 a	-	-	-	-
AP 14 b	-	+ zákal	+ zákal	+ zákal
AP 15	-	-	-	-
AP 16	-	-	-	-

Pozorování růstu kultur ukázalo, že kultury AP12 a AP14b byly jednoznačně schopny využít EHS jako jediný zdroj uhlíku, neboť zákal média se u nich v průběhu kultivace zvyšoval a emulze EHS mizela. Kultura AP11 sice zpočátku vykazovala rovněž slabé zakalení média, to se však v průběhu kultivace nezvyšovalo, navíc šlo spíše o drobné vločky vzniklé pravděpodobně flokulací buněk. Protože emulze EHS u této kultury přetrvávala po celou dobu inkubace, bylo zřejmé, že kultura AP11 EHS nevyužívá a proto s ní nadále nebylo pracováno.

6.2 Sledování růstu kultur AP12 a AP14b při různých koncentracích NaCl na TYA agaru

Cílem pokusu bylo zjistit, na kolik jsou studované kultury schopné růst v prostředí se zvýšenou salinitou, přičemž bylo zjištěno, že obě kultury zvládají bez problému koncentraci do 4 % NaCl, přičemž jim k nárůstu stačilo 24 hodin, při vyšších koncentracích do 6,5 % byl růst pomalejší, při koncentraci 10 % NaCl již nebyly schopny růstu. Bylo zjištěno, že kultury AP12 a AP14b jsou poměrně odolné vůči zvýšené koncentraci soli v prostředí.

Tabulka 21 – Růst při konc. NaCl 1 %

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	+	+	+	+	+	+
AP14b	+	+	+	+	+	+

Tabulka 22 – Růst při konc. NaCl 2 %

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	+	+	+	+	+	+
AP14b	+	+	+	+	+	+

Tabulka 23 – Růst při konc. NaCl 3 %

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	+	+	+	+	+	+
AP14b	+	+	+	+	+	+

Tabulka 24 – Růst při konc. NaCl 4 %

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	+	+	+	+	+	+
AP14b	+	+	+	+	+	+

Tabulka 25 – Růst při konc. NaCl 5 %

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	-	+	+	+	+	+
AP14b	-	+	+	+	+	+

Tabulka 26 – Růst při konc. NaCl 6,5 %

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	-	-/+	-/+	+	+	+
AP14b	-	-/+	-/+	+	+	+

Tabulka 27 – Růst při konc. NaCl 10 %

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	-	-	-	-	-	-
AP14b	-	-	-	-	-	-

6.3 Sledování růstu kultur AP12 a AP14b při různých teplotách na TYA agaru

Cílem pokusu bylo zjistit, na kolik jsou studované kultury schopné růst v prostředí s různou teplotou, přičemž bylo zjištěno, že obě kultury zvládají bez problému teploty od 10 °C do 30 °C, čímž se řadí mezi psychrofilní bakterie.

Tabulka 28 – Růst při teplotě 5 °C

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	-	-	-	-	-	-
AP14b	-	-	-	-	-	-

Tabulka 29 – Růst při teplotě 10 °C

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	+	+	+	+	+	+
AP14b	+	+	+	+	+	+

Tabulka 30 – Růst při teplotě 20 °C

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	+	+	+	+	+	+
AP14b	+	+	+	+	+	+

Tabulka 31 – Růst při teplotě 26 °C

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	+	+	+	+	+	+
AP14b	+	+	+	+	+	+

Tabulka 32 – Růst při teplotě 30 °C

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	+	+	+	+	+	+
AP14b	+	+	+	+	+	+

Tabulka 33 – Růst při teplotě 37 °C

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	-	-	-	-	-	-
AP14b	-	-	-	-	-	-

Tabulka 34 – Růst při teplotě 43 °C

	24 h	2 dny	3 dny	4 dny	7 dní	10 dní
AP12	-	-	-	-	-	-
AP14b	-	-	-	-	-	-

6.4 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-Ethylhexylsalicylanu s přísávkem vitamínů při různém pH

Cílem pokusu bylo vyzkoušet odolnost kultur vůči výkyvům pH v prostředí a bylo zjištěno, že kultury jsou poměrně odolné, schopné růstu při pH 6 až 9, přičemž u krajních hodnot pH 6; 8,5 a 9 rostly pomaleji. Kultury nebyly schopny růstu při pH 5,5 a níže.

Tabulka 35 – Růst AP12 na EHS při různém pH

pH [-]	Výskyt zákalu po 8 dnech kultivace	OD ₆₀₀ po 8 dnech kultivace
5	-	0,037
5,5	-	0,039
6	+	0,237
6,5	+	0,422
7	+	0,440
7,5	+	0,408
8	+	0,474
8,5	+	0,128
9	+	0,293

Tabulka 36 – Růst AP14b na EHS při různém pH

pH [-]	Výskyt zákalu po 8 dnech kultivace	OD 600 po 8 dnech kultivace
5	-	0,040
5,5	-	0,040
6	+	0,225
6,5	+	0,373
7	+	0,352
7,5	+	0,345
8	+	0,446
8,5	+	0,114
9	+	0,290

6.5 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-Ethylhexanolu

Cílem pokusu bylo zjistit, zda jsou kultury AP12 a AP14b schopny využívat pro svůj růst i tu část EHS, jež se v předchozí bakalářské práci jevila jako obtížněji využitelná.

Tabulka 37 – Růst kultur na 2-ethylhexanolu

Kultura	168 hod		336 hod	
	1. lahev	2. lahev	1. lahev	2. lahev
AP12	+	-	+	-
AP14b	+	vločky	+	-

Výsledky pokusu nebyly jednoznačné, jelikož i po 14 dnech inkubace lahvíček byla zakalena pouze 1 paralelní lahev od každé kultury. Proto byl pokus nasazen znovu, ale s různými koncentracemi 2-ethylhexanolu, v koncentraci od 50 do 300 mg.l⁻¹.

6.6 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu v různých koncentracích

6.6.1 Růst kultur AP12 a AP14 na 2-ethylhexanolu v rozmezí koncentrací 50 – 300 mg.l⁻¹

Pokus byl proveden dvakrát vedle sebe s různými rozsahy koncentrací 2-ethylhexanolu, pro ověření růstu při vyšších koncentracích 2-ethylhexanolu.

Tabulka 38 – Schopnost růstu kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu o různé koncentraci po 7 denní kultivaci.

Koncentrace 2-ethylhexanolu [mg.l ⁻¹]	Schopnost růstu	
	AP 12	AP14b
50	+	+
100	+	+
200	+	+
300	+	-

6.6.2 Růst kultur AP12 a AP14 na 2-ethylhexanolu v rozmezí koncentrací 200 – 450 mg.l⁻¹

Tabulka 39 – Schopnost růstu kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu o různé koncentraci po 7 denní kultivaci

Koncentrace [mg.l ⁻¹]	Schopnost růstu	
	AP 12	AP14b
200	+	+
250	+	+
300	+	-
350	+	-
400	-	*
450	-	*

* Pokus nebyl proveden, růst při těchto koncentracích nebyl předpokládán.

Výsledkem pokusů bylo zjištění, že kultura AP12 je schopná využít 2-ethylhexanol pro svůj růst až do koncentrace 350 mg.l⁻¹, zatímco AP14b je schopná využít 2-ethylhexanol při jeho koncentraci nejvýše 250 mg.l⁻¹.

6.7 Růst kultur AP12 a AP14 b na DEHP

Tímto pokusem bylo zjištěno, že kultury AP12 ani AP14b nejsou schopny využít DEHP jako jediný zdroj uhlíku pro svůj růst, jelikož k zakalení vzorků a tedy nárůstu biomasy nedošlo ani po 2 týdnech inkubace.

Tabulka 40 – Růst AP12 na DEHP - 14 dnů kultivace

DEHP [mg.l ⁻¹]	24 h	48 h	120 h	168 h	336 h
560	-	-	-	-	-

Tabulka 41 – Růst AP14b na DEHP - 14 dnů kultivace

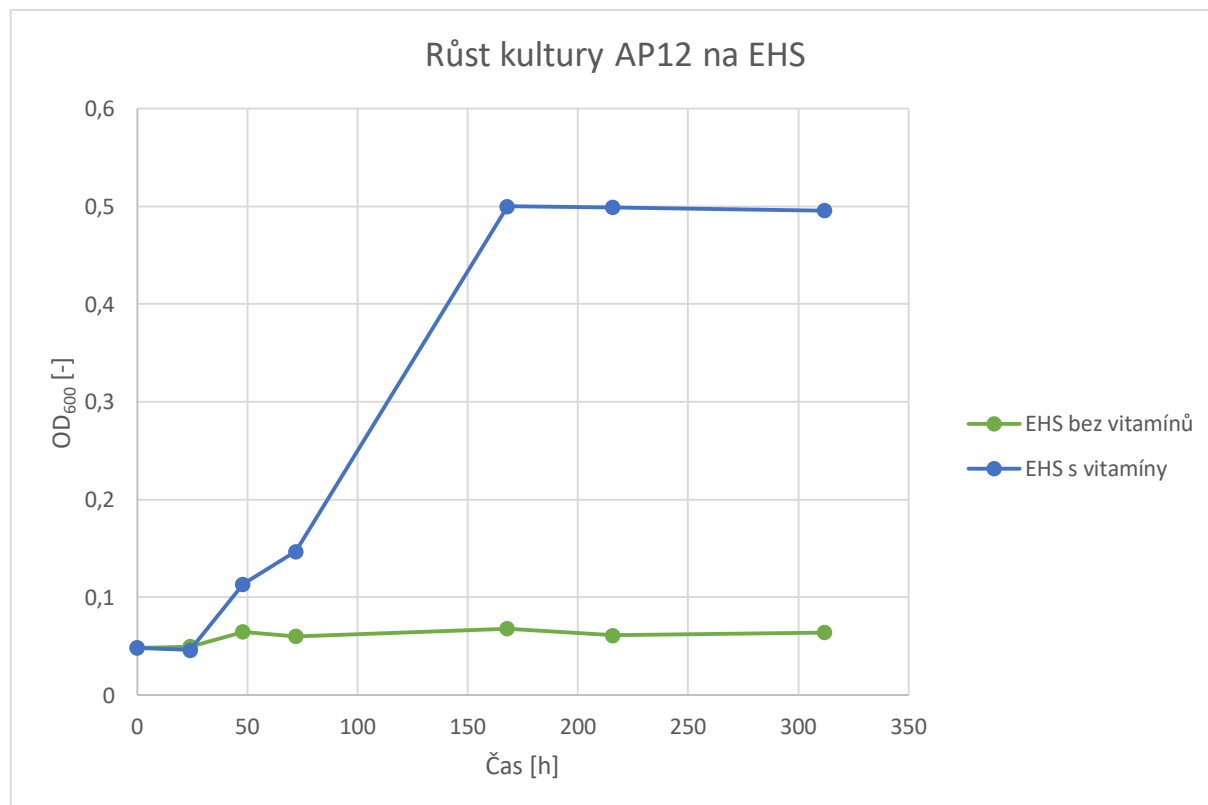
DEHP [mg.l ⁻¹]	24 h	48 h	120 h	168 h	336 h
560	-	-	-	-	-

6.8 Růst kultur AP11, AP12, AP14b a AP16 na EHS s vitamíny a bez vitamínů

Tento pokus přinesl důležité poznatky pro postupy dalších pokusů. Po pravidelném měření OD_{600} byly vytvořeny grafy, ve kterých lze vidět jasný rozdíl mezi pokusem s vitamíny a bez vitamínů. Obě kultury na tom byly dost podobně, jen u AP12 došlo k pomnožení biomasy rychleji a již po 168 hodinách inkubace nabyla OD_{600} svého maxima; u AP14b docházelo k postupnému nárůstu, dokud nedosáhla OD_{600} svého maxima při posledním měření. Z výsledků vyplývá, že obě kultury potřebují pro růst na EHS MEM vitamíny jako podporu při jeho degradaci.

Tabulka 42 – Porovnání růstu kultury AP12 na EHS s vitamíny a bez vitamínů

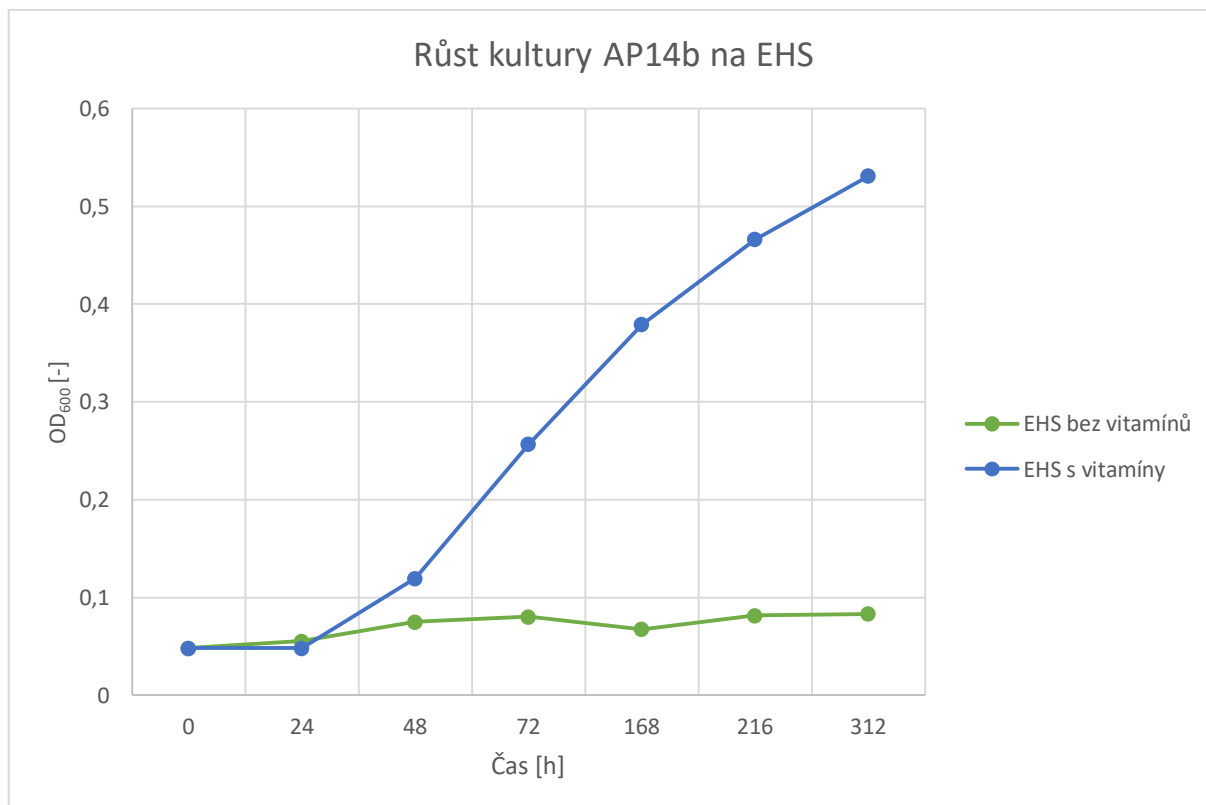
Čas [h]	EHS bez vitamínů	EHS s vitamíny
	OD_{600} [-]	OD_{600} [-]
0	0,048	0,048
24	0,050	0,046
48	0,065	0,114
72	0,060	0,147
168	0,068	0,500
216	0,061	0,499
312	0,064	0,496



Obrázek 8 – Grafické porovnání růstu AP12 na EHS s vitamíny a bez vitamínů.

Tabulka 43 – Porovnání růstu kultury AP14b na EHS s vitamíny a bez vitamínů.

Čas [h]	EHS bez vitamínů	EHS s vitamíny
	OD ₆₀₀ [-]	OD ₆₀₀ [-]
0	0,048	0,048
24	0,055	0,048
48	0,075	0,120
72	0,080	0,257
168	0,067	0,379
216	0,081	0,466
312	0,083	0,531



Obrázek 9 – Grafické porovnání růstu kultury AP14b na EHS s vitamíny a bez vitamínů.

6.9 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanalu o různých koncentracích

6.9.1 Pokus první, růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanalu

Pro zjištění do jaké míry má na utilizaci 2-ethylhexanolu kulturami AP12 a AP14b vliv možný vznik (pro mikroorganismy toxického) metabolitu 2-ethylhexanolu (EHAL), byl nasazen pokus, ve kterém byly zjišťovány růstové vlastnosti kultur na 2-ethylhexanalu při různých koncentracích. První pokus s růstem kultur na 2-ethylhexanalu přinesl poměrně nejasné výsledky. Přestože se zdálo, že došlo k mírnému zakalení lahvíček s nejnižšími koncentracemi 2-ethylhexanolu, bylo tomu tak ve všech případech pouze v jedné ze dvou paralelních lahví.

Tabulka 44 – Růst AP12 na 2-ethylhexanalu.

Koncentrace 2-ethylhexanalu ve vzorku [mg.l ⁻¹]	24 h	48 h	72 h	168 h
20	-	-	+/-	+/-
30	-	-	+/-	-
40	-	-	-	-
50	-	-	-	-

Tabulka 45 – Růst AP14b na 2-ethylhexanalu.

Koncentrace 2-ethylhexanalu ve vzorku [mg.l ⁻¹]	24 h	48 h	72 h	168 h
20	-	-	+/-	+/-
30	-	-	+/-	+/-
40	-	-	-	-
50	-	-	-	-

Pro nejasné výsledky byl upraven postup a pokus byl proveden ještě jednou.

6.9.2 Pokus druhý, růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanalu s upraveným postupem

Přes upravený postup nebo právě díky němu byly výsledky jasné, tentokrát však jednoznačně negativní. V žádné z lahví naočkovaných kulturou a s 2-ethylhexanalem nebyl naměřen zvýšený zákal oproti zákalu minerálního média. Tento výsledek mohl být způsoben sorpcí 2-ethylhexanalu na sterilní stříkačkový filtr.

Tabulka 46 – Měření OD₆₀₀ vzorků 1 – 6 a čistého MM den 0.

Vzorek	OD ₆₀₀ [-]	OD ₆₀₀ [-]	Průměr OD ₆₀₀ [-]
1 – MM, AP12, destilovaná voda	0,055	0,052	0,054
2 – MM, AP12, destilovaná voda	0,055	0,054	0,055

3 – MM, AP14b, destilovaná voda	0,063	0,061	0,062
4 – MM, AP14b, destilovaná voda	0,069	0,092	0,081
5 – MM, EHAL (200 mg.l ⁻¹)	0,053	0,066	0,059
6 – MM, EHAL (200 mg.l ⁻¹)	0,072	0,072	0,072
Čisté MM	0,056	0,054	0,055

Tabulka 47 – Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanalu

Vzorek	OD ₆₀₀ [-]			
	72 h	144 h	192 h	240 h
1 – MM, AP12, destilovaná voda	0,054	0,049	0,046	0,049
2 – MM, AP12, destilovaná voda	0,0689	0,068	0,066	0,067
3 – MM, AP14b, destilovaná voda	0,058	0,068	0,053	0,054
4 – MM, AP14b, destilovaná voda	0,050	0,052	0,047	0,045
5 – MM, EHAL (10 mg.l ⁻¹)	0,055	0,05	0,054	0,045
6 – MM, EHAL (10 mg.l ⁻¹)	0,07	0,064	0,06	0,06
7 – MM, AP12, EHAL (10 mg.l ⁻¹)	0,055	0,053	0,052	0,048
8 – MM, AP12, EHAL (10 mg.l ⁻¹)	0,054	0,052	0,054	0,051
9 – MM, AP14b, EHAL (10 mg.l ⁻¹)	0,06	0,057	0,057	0,056

10 – MM, AP14b, EHAL (10 mg.l ⁻¹)	0,052	0,06	0,053	0,053
11 – MM, AP12, EHAL (15 mg.l ⁻¹)	0,055	0,054	0,053	0,054
12 – MM, AP12, EHAL (15 mg.l ⁻¹)	0,061	0,053	0,056	0,057
13 – MM, AP14b, EHAL (15 mg.l ⁻¹)	0,056	0,051	0,056	0,053
14 – MM, AP14b, EHAL (15 mg.l ⁻¹)	0,053	0,051	0,051	0,048
15 – MM, AP12, EHAL (20 mg.l ⁻¹)	0,067	0,061	0,061	0,062
16 – MM, AP12, EHAL (20 mg.l ⁻¹)	0,052	0,051	0,052	0,05
17 – MM, AP14b, EHAL (20 mg.l ⁻¹)	0,055	0,054	0,054	0,054
18 – MM, AP14b, EHAL (20 mg.l ⁻¹)	0,053	0,053	0,053	0,053

6.10 Růst kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP

6.10.1 Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP pokus první

Vzhledem k negativnímu výsledku snahy o degradaci samotného DEHP kulturami AP12 a AP14b, bylo přistoupeno k experimentu s přídatnou látkou, jakožto možným induktorem enzymu (v tomto případě 2-ethylhexanolem v koncentraci 500 mg.l⁻¹). DEHP byl ve vzorcích přibližně ve stejné koncentraci.

Tabulka 48 – Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP

Označení vzorku	48 hod	216 hod	312 hod	408 hod
AP12 1 – 2-ethylhexanol	-	-	-	-
AP12 2 – 2-ethylhexanol	-	-	-	-
AP12 3 – DEHP + 2-ethylhexanol	-	-	-	-
AP12 4 – DEHP 10 + 2-ethylhexanol	-	+	+	+

AP12 5 – DEHP	-	-	-	-
AP12 6 – DEHP	-	-	-	-
AP14b 1 - 2-ethylhexanol	-	-	-	-
AP14b 2 - 2-ethylhexanol	-	-	-	-
AP14b 3 - DEHP + 2-ethylhexanol	+	+	+	+
AP14b 4 - DEHP + 2-ethylhexanol	+	+	+	+
AP14b 5 – DEHP	-	-	-	-
AP14b 6 – DEHP	-	-	-	-
13 - DEHP + 2-ethylhexanol, bez očkování	-	-	-	-
14 - DEHP + 2-ethylhexanol, bez očkování	-	-	-	-
15 - DEHP + 2-ethylhexanol, bez očkování	-	-	-	-

6.10.2 Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP pokus druhý

Pokus byl opakován s naočkováním bakterií přímo z lahví, ve kterých došlo k jejich pomnožení (z lahví z prvních pokusů s 2-ethylhexanolem), jinak se postup nelišil. Pokus byl zhodnocen pouze optometricky, jelikož zakalení nebylo u lahvíček s kulturou, DEHP a 2-ethylhexanolem tak výrazné jako v předchozím případě, nicméně ve vzorcích, ve kterých byl DEHP spolu s 2-ethylhexanolem a kulturou AP12 po delší době k zakalení vzorků došlo. Vzorky s DEHP, 2-ethylhexanolem a kulturou AP14b zůstaly nezakalené, na úrovni OD_{600} tekutého minerálního média.

Tabulka 49 – Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP

Označení vzorku	48 hod	168 hod	240 hod	408 hod
AP12 1 – 2-ethylhexanol	-	-	-	-
AP12 2 – 2-ethylhexanol	-	-	-	-
AP12 3 – DEHP + 2-ethylhexanol	-	-	-	+
AP12 4 – DEHP + 2-ethylhexanol	-	-	-	+
AP12 5 – DEHP	-	-	-	-
AP12 6 – DEHP	-	-	-	-
AP14b 1 - 2-ethylhexanol	-	-	-	-

AP14b 2 - 2-ethylhexanol	-	+	+	+
AP14b 3 - DEHP + 2-ethylhexanol	-	-	-	-
AP14b 4 – DEHP + 2-ethylhexanol	-	-	-	-
AP14b 5 – DEHP	-	-/+	-/+	-/+
AP14b 6 – DEHP	-	-	-	-
13 - DEHP + 2-ethylhexanol, bez očkování	-	-	-	-
14 - DEHP + 2-ethylhexanol, bez očkování	-	-	-	-
15 - DEHP + 2-ethylhexanol, bez očkování	-	-	-	-

6.10.3 Extrakce DEHP *n*-hexanem

Pro extrakci hexanem byly vybrány vzorky, které se zdály být pozitivní, tudíž u nich byl pozorován zákal a na druhou stranu DEHP na hladině viditelný nebyl, jako tomu bylo na začátku pokusu, a vzorky kontrolní, ve kterých byl samotný DEHP bez 2-ethylhexanolu a jeden vzorek, ve kterém byl DEHP bez jakékoli kultury.

Vzorky byly ředěny podle teoretické koncentrace DEHP v jednotlivých lahvích, aby absorbance vzorků odpovídala koncentraci DEHP v rozmezí kalibrační řady od 5 do 100 mg.l⁻¹.

AP12 5 (DEHP 10μl); **AP14b 5** (DEHP 10 μl) a lahev č. **15** (DEHP 10 μl + 2-ethylhexanol 9 μl, bez očkování) – ředění 20x (0,5 ml vzorku + 9,5 ml hexanu)

AP12 4 (DEHP 10 μl + 2-ethylhexanol 9 μl); **AP14b 4** (DEHP 10 μl + 2-ethylhexanol 9 μl) – ředění 25x.

Větší ředění oproti jiným vzorkům vyplynulo z potřeby dočistit odebranou hexanovou vrstvou, jejíž odběr z těchto vzorků byl náročnější.

Tabulka 50 – Výsledky extrakce do hexanu

Označení vzorku	A [-]	Původní koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Naměřená koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Úbytek DEHP [%]
AP12 4 – DEHP + 2-ethylhexanol (9 μl)	1,679	656	530,04	13
AP12 5 – DEHP (10 μl)	2,744	656	689,95	-
AP14b 4 – DEHP + 2-ethylhexanol (9 μl)	1,266	656	400,66	47
AP14b 5 - DEHP (10 μl)	3,00	656	755,11	-
15 – DEHP (10 μl) + 2-ethylhexanol (9 μl)	2,936	656	739,07	-

Počítáno podle rovnice vyplývající z kalibrační křivky DP Jindřišky Vyskočilové [28]

$$y = 0,0266x - 0,0129$$

$$x = \frac{y + 0,0129}{0,0266}$$

Vzorový výpočet pro koncentraci DEHP ve vzorku AP12 4

$$c = \frac{1,679 + 0,0129}{0,0266} = 63,605 \text{ mg.l}^{-1}$$

Vzorový výpočet přepočtu skutečné koncentrace s ohledem na ředění:

$$c = \frac{63,605 \cdot 25}{3} = 530,04 \text{ mg.l}^{-1}$$

Úbytek DEHP byl počítán v porovnání s lahvemi, ve kterých byl po celou dobu kultivace pouze DEHP.

6.10.4 Degradace DEHP kulturami AP12 a AP14b společně, za přídavku EHS

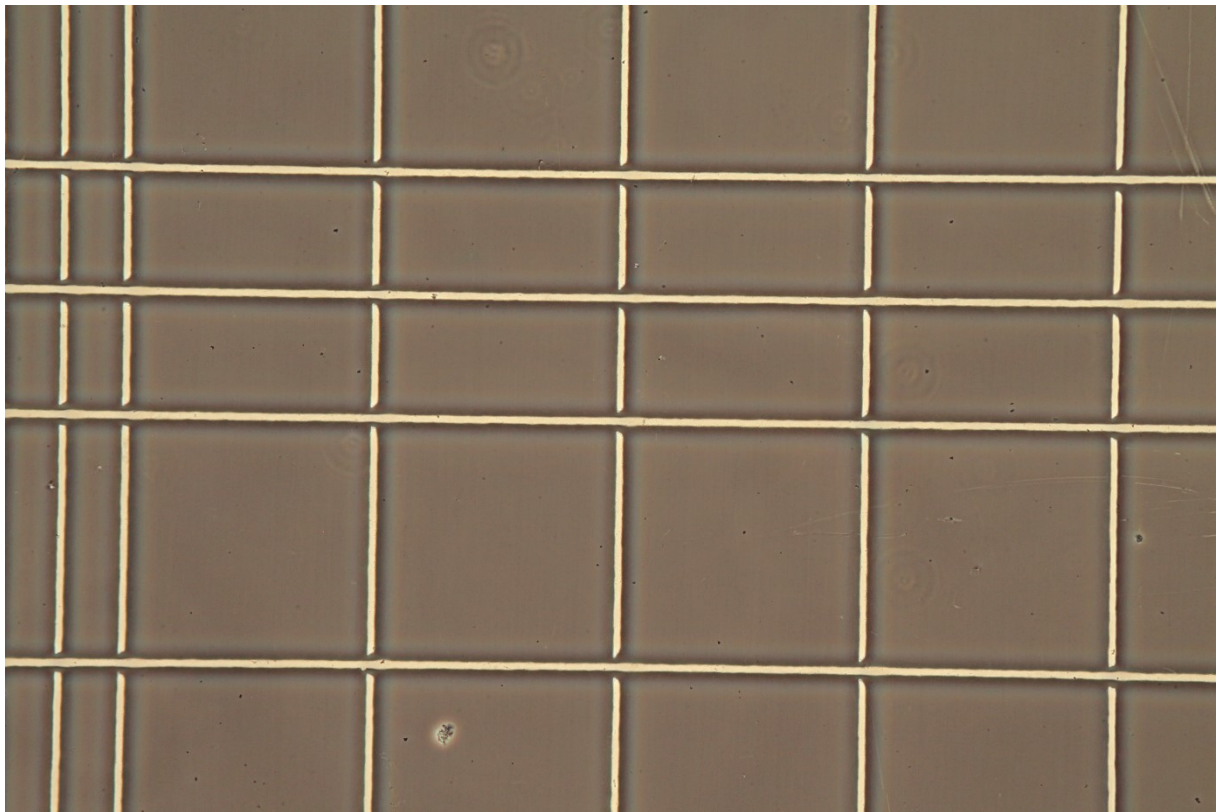
Po 24 hodinách kultivace nebyl ještě viděn žádný rozdíl mezi zákalem tekutého minerálního média, ale již 2. den inkubace byly pozorovány změny v lahvíčkách, ve kterých byl právě dávkován EHS (v menší koncentraci, 203 mg.l⁻¹) a DEHP v koncentraci 525 mg.l⁻¹. Mírný zákal byl pozorován také v lahvích se samotným EHS. Třetí a sedmý den

byla změřena OD₆₀₀ na přístroji TECAN. Výsledky měření jednotlivých vzorků byly porovnávány s OD₆₀₀ tekutého minerálního média. Z výsledků je zřejmé, že zákal narůstal, otázkou však je, do jaké míry byl způsoben pomnožením mikroorganismů v médiu, a na kolik byl způsoben jinými možnými jevy. Počítáním buněk ve vzorcích na konci inkubace však byl pozorován mírně zvýšený počet buněk ve vzorcích s DEHP + EHS oproti vzorkům s pouhým EHS. V tabulce 51 jsou zvýrazněny zvýšené hodnoty OD₆₀₀.

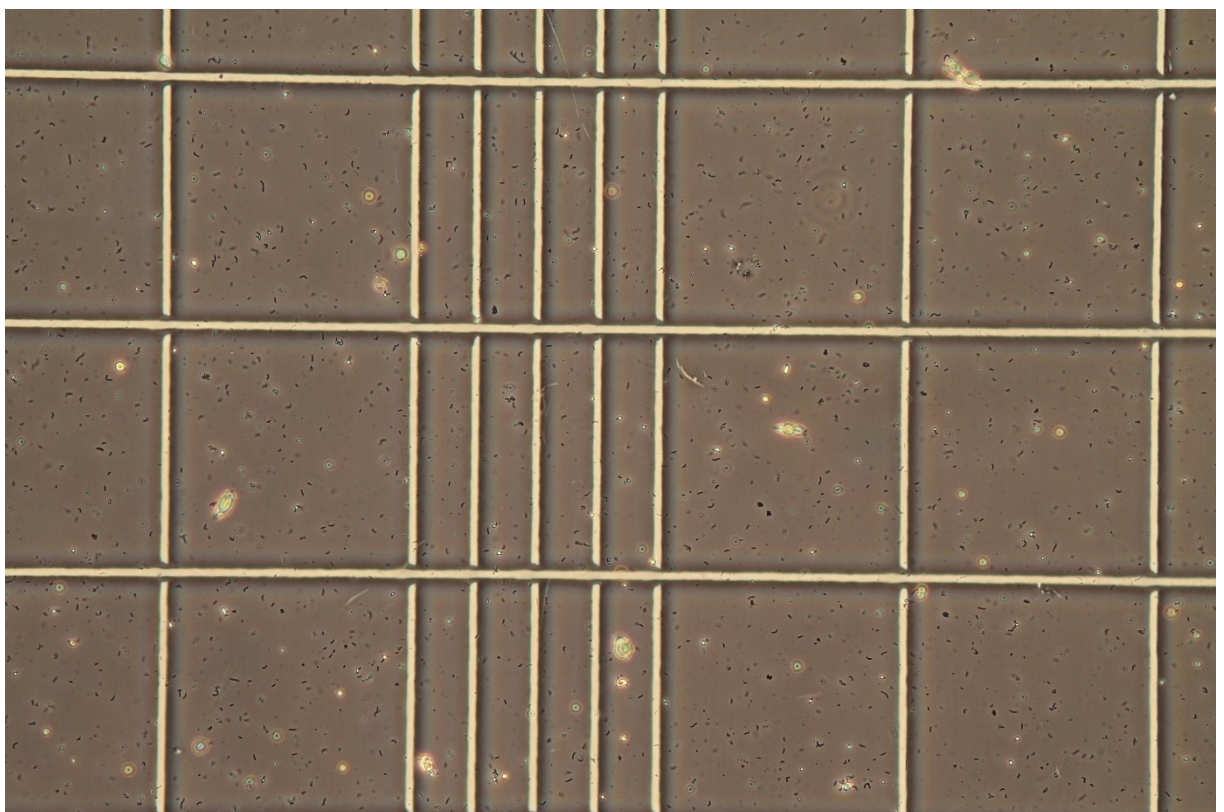
Tabulka 51 – OD₆₀₀ po 3 a 7 dnech ve vzorcích

Vzorek	72 h	168 h
1 – DEHP, AP12, AP14b	0,053	0,05
2 – DEHP, AP12, AP14b	0,05	0,059
3 – DEHP + EHS, AP12, AP14b	0,341	0,44
4 – DEHP + EHS, AP12, AP14b	0,345	0,488
5 – EHS, AP12, AP14b	0,093	0,153
6 – EHS, AP12, AP14b	0,114	0,17
7 – DEHP, neočkované	0,057	0,058
8 – DEHP, neočkované	0,054	0,054
9 – DEHP + EHS, neočkované	0,050	0,051
10 – DEHP + EHS, neočkované	0,055	0,128
11 – DEHP, neočkované	0,053	0,051
12 – DEHP, neočkované	0,055	0,053

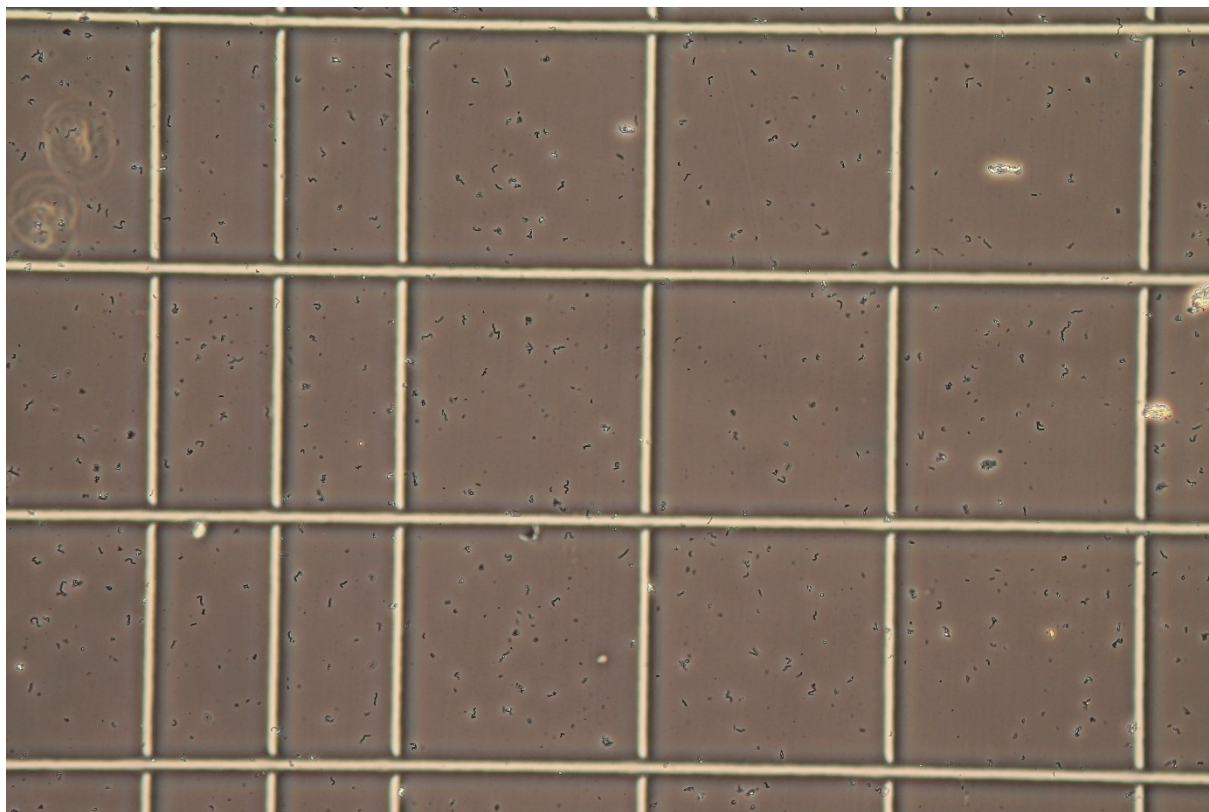
Na fotografiích (Obrázek 10 – 12) byl zachycen rozdíl mezi vzorky se samotným DEHP; samotným EHS a DEHP + EHS. Rozdíl je patrný i z výsledků počítání buněk, kde byly hodnoty mírně vyšší ve vzorcích s DEHP + EHS než ve vzorcích se samotným EHS. Ve vzorcích se samotným DEHP, nedošlo k nárůstu žádné biomasy.



Obrázek 10 – Lahev č. 1 pouze s DEHP, po 7 dnech kultivace, zvětšení 20x100



Obrázek 11 – Lahev č. 3 s DEHP + EHS po 7 dnech kultivace, zvětšení 20x100



Obrázek 12 – Lahev č. 5 pouze s EHS po 7 dnech kultivace, zvětšení 20x100

Tabulka 52 – Počet buněk v pozitivních vzorcích po 7 dnech inkubace

Označení vzorku	Počet buněk v 1 komůrce	Průměr buněk v 1 komůrce	Přepočet buněk na 1 ml
3 – DEHP + EHS, AP12, AP14b	10/14/8/16/18/6	12	$24 * 10^6$
4 – DEHP + EHS, AP12, AP14b	8/8/10/11/9/5	8,5	$17 * 10^6$
5 – EHS, AP12, AP14b	10/1/5/3/5/1	4,16	$8,32 * 10^6$
6 – EHS, AP12, AP14b	3/5/2/4/2/4	3,33	$6,67 * 10^6$

Počítáno v komůrce CYRUS II, 100x100 μm , přepočet:

Vzorek 3 – EHS, AP12 a AP14b

$$(10 + 14 + 8 + 16 + 18 + 6) / 6 = 12$$

$$12 * 2\,000\,000 = 24 * 10^6 \text{ buněk/ml}$$

6.10.5 Utilizace DEHP kulturami AP12 a AP14b jednotlivě, za přídavku EHS

Již 24 hodin po kultivaci byly lahve, do kterých byl dávkován DEHP spolu s EHS a kulturou AP12 zakalenější více než lahve se samotným EHS a samotným DEHP. Lahvičky, do kterých byl dávkován DEHP s EHS a AP14b a DEHP s EHS s oběma kulturami byly zakalené ještě o trochu více. V dalších dnech byl však rozdíl dorovnan.

Tabulka 53 – Naměřené hodnoty OD₆₀₀ v různých časových intervalech

Označení vzorku	OD ₆₀₀ 48 h	OD ₆₀₀ 120 h	OD ₆₀₀ 168 h	OD ₆₀₀ 216 h
1 – AP12 + EHS	0,115	0,14	0,202	0,206
2 – AP12 + EHS	0,106	0,142	0,18	0,217
3 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	0,286	0,304	0,404	0,392
4 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	0,441	0,49	0,551	0,533
5 – AP14b – EHS	0,075	0,146	0,202	0,206
6AP14b – EHS	0,085	0,105	0,168	0,18
7 – AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	0,6	0,598	0,71	0,693
8 - AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	0,398	0,392	0,49	0,468
9 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	0,423	0,412	0,516	0,517
10 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	0,466	0,519	0,626	0,611

Tabulka 54 – Počítání bakterií po 2 dnech při zvětšení 20x100

Označení vzorku	Počet buněk v 1 komůrce	Průměr buněk v 1 komůrce	Počet buněk na 1 ml
1 – AP12 + EHS	4/3/5/2/7/9	5	$4 \cdot 10^7$
2 – AP12 + EHS	4/2/7/1/6/4	4	$3,2 \cdot 10^7$
3 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	6/4/5/6/4/5	5	$4 \cdot 10^7$
4 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	6/3/6/7/5/5	5,33	$4,26 \cdot 10^7$
5 – AP14b – EHS	1/1/0/2/0/0	0,67	$5,36 \cdot 10^6$
6 - AP14b – EHS	2/1/0/0/1/2	1	$8 \cdot 10^6$
7 – AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	9/6/7/6/11/10	8,17	$6,54 \cdot 10^7$
8 - AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	5/10/4/6/9/4	6,33	$5,06 \cdot 10^7$
9 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	6/4/9/7/9/8	7,17	$5,74 \cdot 10^7$
10 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	3/2/4/2/6/9	4,33	$3,46 \cdot 10^7$

Tabulka 55 – Počítání bakterií po 5 dnech při zvětšení 20x100

Označení vzorku	Počet buněk v 1 komůrce	Průměr buněk v 1 komůrce	Přepočet buněk na 1 ml
1 – AP12 + EHS	3/3/0/2/4/20	5,33	$4,26 \cdot 10^7$
2 – AP12 + EHS	4/3/3/3/0/2	2,5	$2 \cdot 10^7$
3 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	3/5/7/8/6/3	5,33	$4,26 \cdot 10^7$
4 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	9/6/10/2/1/5	5,56	$4,45 \cdot 10^7$
5 – AP14b – EHS	3/2/0/4/3/2	2,33	$1,86 \cdot 10^7$
6AP14b – EHS	2/3/0/0/1/4	1,67	$1,34 \cdot 10^7$
7 – AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	7/10/4/9/12/12	9	$7,2 \cdot 10^7$

8 - AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	10/8/6/5/9/8	7,67	6,14*10 ⁷
9 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	12/11/6/7/6/7	8,17	6,54*10 ⁷
10 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	5/5/6/4/3/2	4,17	3,34*10 ⁷

Tabulka 56 – Počítání bakterií po 7 dnech při zvětšení 20x100

Označení vzorku	Počet buněk v 1 komůrce	Průměr buněk v 1 komůrce	Přepočítání buněk na 1 ml
1 – AP12 + EHS	2/0/1/3/3/2	1,83	1,46*10 ⁷
2 – AP12 + EHS	2/4/0/2/2/1	1,83	1,46*10 ⁷
3 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	5/1/2/1/0/3	2	1,6*10 ⁷
4 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	4/7/5/4/4/4	4,67	3,74*10 ⁷
5 – AP14b – EHS	4/7/6/2/3/5	4,5	3,6*10 ⁷
6AP14b – EHS	1/3/5/2/0/1	2	1,6*10 ⁷
7 – AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	15/19/11/12/12/9	12,78	10,22*10 ⁷
8 - AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	11/10/8/8/9/7	8,8	7*10 ⁷
9 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	8/10/6/12/11/4	8,5	6,8*10 ⁷
10 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	8/9/5/4/7/3	6	4,8*10 ⁷

Tabulka 57 – Počítání bakterií po 9 dnech při zvětšení 20x100

Označení vzorku	Počet buněk v 1 komůrce	Průměr buněk v 1 komůrce	Přepočet buněk na 1 ml
1 – AP12 + EHS	6/1/4/3/5/0	3,17	$2,54 \cdot 10^7$
2 – AP12 + EHS	4/10/4/2/1/3	4	$3,2 \cdot 10^7$
3 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	4/2/2/3/5/3	3,17	$2,54 \cdot 10^7$
4 – AP12 + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	7/10/8/3/6/3	6,17	$4,94 \cdot 10^7$
5 – AP14b – EHS	5/3/4/2/3/4	3,5	$2,8 \cdot 10^7$
6 AP14b – EHS	2/5/6/0/2/4	3,17	$2,54 \cdot 10^7$
7 – AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	14/8/10/15/10/13	11,67	$9,34 \cdot 10^7$
8 - AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	9/13/10/11/12/6	10,17	$8,14 \cdot 10^7$
9 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	7/10/10/8/5/8	8	$6,4 \cdot 10^7$
10 - AP12 + AP14b + DEHP (525 mg.l ⁻¹) + EHS	6/4/6/2/4/5	4,5	$3,6 \cdot 10^7$

Lahvičky 3 a 4 byly s EHS (203 mg.l⁻¹) a 8 µl DEHP (525 mg.l⁻¹) očkované kulturou AP12.

Lahvičky 5 a 6 byly negativní kontroly (bez DEHP) očkované kulturou AP14b.

Lahvičky 7 a 8 byly s EHS (203 mg.l⁻¹) a 8 µl DEHP (525 mg.l⁻¹) očkované kulturou AP14b.

Lahvičky 9 a 10 byly s EHS (203 mg.l⁻¹) a 8 µl DEHP (525 mg.l⁻¹) očkované oběma kulturami, AP12 i AP14b.

Tabulka 58 – Úbytek DEHP v pozitivních vzorcích

Označení vzorku	Průměr A [-]	Ředění	Teoretická koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Naměřená koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Úbytek DEHP [%]
3 – AP12 + EHS + DEHP	0,706	20x	525	316,45	51,99
4 – AP12 + EHS + DEHP	0,492	20x	525	218	66,92
5 – AP14b + EHS	0,034	5x	0	1,963	-
6 – AP14b + EHS	0,034	5x	0	1,96	-
7 – AP14b + EHS + DEHP	0,564	20x	525	169,45	74,29
8 - AP14b + EHS + DEHP	1,348	20x	525	211,07	67,97
9 – AP12 + AP14b + EHS + DEHP	0,700	20x	525	313,7	52,40
10 – AP12 + AP14b + EHS + DEHP	0,490	20x	525	217,4	67,01
1 - Pozitivní kontrola EHS + DEHP	1,348	20x	525	618,25	-
2 - Pozitivní kontrola EHS + DEHP	1,477	20x	525	699,9	-

Procentuální úbytek DEHP v očkováných vzorcích byl hodnocen k průměru výsledků pozitivní kontroly vzorků 1 a 2, do kterých bylo přidáno 8 µl DEHP v den extrakce, zatímco očkované vzorky byly 13 dní inkubovány, navíc s přidavkem 3 µl EHS. V dalších

pokusech byl však případný úbytek DEHP v očkovaných vzorcích porovnáván s neočkovanými kontrolami, kultivovanými s DEHP, přidaným na začátku pokusu.

6.10.6 Účinnost extrakce

V předchozím pokuse vznikl při extrakci DEHP do hexanu určitý problém při odběru horní hexanové vrstvy, jelikož tato vrstva byla tenká a přechod mezi vodnou a hexanovou fází nebyl dostatečně ostrý. Byl proto zvolen postup, ve kterém byla po provedené extrakci DEHP do hexanu povolna přidávána destilovaná voda, až se hexanová vrstva dostala do hrdla kultivační lahve. Tento pokus byl první snahou o zdokonalení postupu při extrakci DEHP do *n*-hexanu. Pro očkování vzorků byla použita kultura AP14b.

První pokus

Tabulka 59 – Naměřené a vypočtené hodnoty pro účinnost extrakce – první pokus

Vzorek	Průměr A [-]	Teoretická koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Naměřená koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Účinnost extrakce [%]	Průměrná hodnota pro 2 paralelní měření [%]
1 a – DEHP (525 mg.l ⁻¹) + čisté MM	1,873	525	638,8	121,7	124,65
1 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + čisté MM	1,963	525	669,8	127,6	
2 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + čisté MM	1,644	525	559,8	106,6	114,45
2 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + čisté MM	1,883	525	642,1	122,3	
3 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,587	525	540,5	102,9	118,35
3 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + MM očkované	2,058	525	702,4	133,8	

4 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,878	525	674,2	128,4	135,3
4 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,998	525	746,6	142,2	
5 a - DEHP (263 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,485	525	640,4	122	125,95
5 b - DEHP (263 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,403	525	681,8	129,9	
6 a - DEHP (263 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,288	263	336,8	128	124,45
6 b - DEHP (263 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,461	263	317,9	120,9	

Upravením postupu se odběr hexanové vrstvy velmi zjednodušil a účinnost extrakce přesáhla výrazně 100%. Druhý pokus byl snahou účinnost extrakce přiblížit 100 % a metodu tím ještě zdokonalit, a to vysušením hexanové vrstvy pomocí bezvodého síranu sodného.

Druhý pokus

Tabulka 60 – Naměřené a vypočtené hodnoty pro účinnost extrakce – druhý pokus

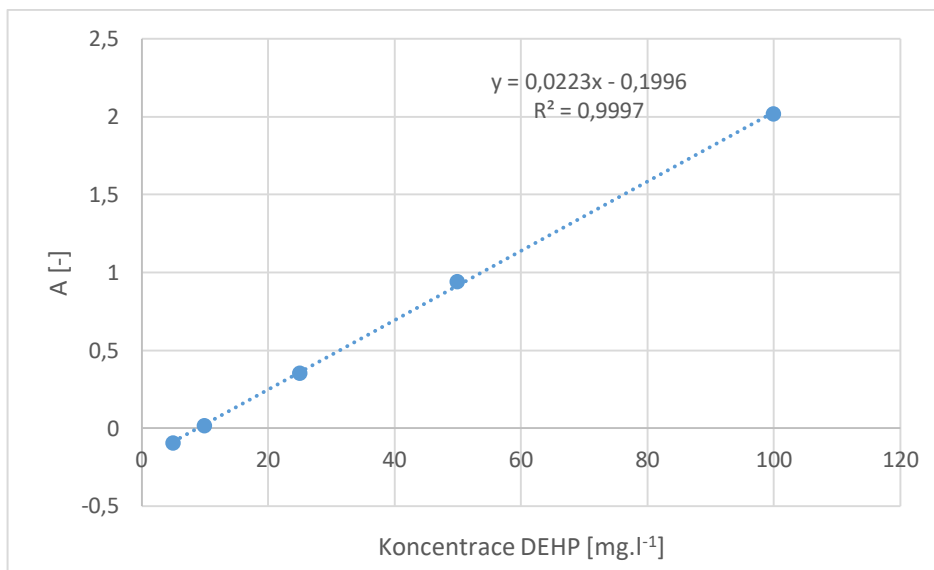
Vzorek	Průměr A [-]	Teoretická koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Naměřená koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Účinnost extrakce [%]	Průměrná hodnota pro 2 pa- ralelní měření [%]
1 a – DEHP (525 mg.l ⁻¹) + čisté MM	1,607	525	547,225	104,23	110,26
1 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + čisté MM	1,791	525	610,562	116,298	
2 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + čisté MM	1,631	525	555,608	105,83	107,37

2 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + čisté MM	1,678	525	571,72	108,9	
3 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,781	525	607,018	115,62	119,86
3 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,91	525	651,4	124,1	
4 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,713	525	583,83	111,21	112,48
4 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,752	525	597,168	113,75	
5 a - DEHP (263 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,291	263	292,4	111,18	115,15
5 b - DEHP (263 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,391	263	315,21	119,85	
6 a - DEHP (263 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,32	263	298,96	113,67	115,71
6 b - DEHP (263 mg.l ⁻¹) + MM očkované	1,367	263	309,67	117,75	

Další pokusy byly prováděny dle 2., metodiky, účinnost extrakce byla stále nad 100 %, ale méně než v předchozím pokusu, a proto bylo počítáno s koeficientem účinnosti extrakce získaným tímto postupem. Koeficient účinnosti extrakce = **1,135**

6.10.7 Utilizace DEHP kulturou AP14b za přídavku EHS – podrobnější pokus

Kalibrace byla znovu změřena, kvůli změně spektrometru.



Obrázek 13 – Kalibrační křivka pro DEHP v *n*-hexanu, $\lambda = 224$ nm, měřeno na UV-VIS spektrofotometru Halo DB-20

Tabulka 61 – Naměřené a vypočtené hodnoty DEHP ve vzorcích.

Vzorek	Průměr A [-]	Teoretická koncentrace DEHP s ohledem na účinnost extrakce [mg.l ⁻¹]	Naměřená koncentrace DEHP [mg.l ⁻¹]	Úbytek DEHP [%]
1 a – EHS	-0,003	0	-	-
1 b – EHS	-0,02	0	-	-
2 a – EHS	-0,014	0	-	-
2 b – EHS	-0,008	0	-	-
3 a – EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,392	595,88	535,292	25,359
3 b - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,603	595,88	606,256	15,464
4 a - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,2835	595,88	498,8	30,448
4 b - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,276	595,88	496,11	30,823

5 a - EHS + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,186	298,51	310,561	2,293
5 b - EHS + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,396	298,51	357,646	+8,172
6 a - EHS + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,076	298,51	285,897	10,62
6 b - EHS + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,24	298,51	322,668	5,423
7 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,828	595,88	681,928	-
7 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹)	2,037	595,88	752,22	-
8 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,871	595,88	696,39	-
8 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,995	595,88	738,094	-
9 a - DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,218	298,51	317,848	-
9 b - DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,275	298,51	330,628	-
10 a - DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,227	298,51	319,866	-
10 b - DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,322	298,51	341,166	-

Bylo počítáno s účinností extrakce, a vzorky s DEHP a EHS byly srovnávány se vzorky s DEHP bez EHS, proto se může zdánlivě zdát, že k úbytku DEHP ve srovnání s teoretickou vstupní koncentrací nedošlo. Největší úbytek DEHP byl pozorován u vzorků s vyšší koncentrací DEHP (525 mg.l⁻¹) + EHS, a to až 31 %. Ve vzorcích s nižší koncentrací DEHP (263 mg.l⁻¹) byl úbytek také pozorován, ale maximálně 10,6 %.

Mikroskopickým pozorováním a počítáním buněk bylo zjištěno, že mezi vzorky s DEHP a DEHP+EHS nebyly velké rozdíly. V lahvičkách se samotným EHS bylo dokonce buněk více.

Tabulka 62 – Počítání buněk po 9 dnech kultivace

Vzorek s kulturou AP14b	Počet buněk v 1 komůrce 50x50 μm	Průměrný počet buněk v 1 komůrce	Počet buněk na 1 ml
1 - EHS (203 mg.l ⁻¹)	11/5/5/9/8/5	7,2	5,76*10 ⁷
2 - EHS (203 mg.l ⁻¹)	4/8/8/8/4/5	6,7	5,36*10 ⁷

3 - EHS (203 mg.l ⁻¹) +DEHP (525 mg.l ⁻¹)	4/8/6/2/4/6	5	4*10 ⁷
4 - EHS (203 mg.l ⁻¹) + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	6/6/4/7/6/3	5,3	4,24*10 ⁷
5 – EHS (203 mg.l ⁻¹) + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	3/3/4/2/5/3	3,3	2,64*10 ⁷
6 - EHS (203 mg.l ⁻¹) + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	2/0/3/3/2/0	1,7	1,36*10 ⁷

6.10.8 Utilizace DEHP kulturou AP14b, za přídavku EHS – podrobnější pokus po-druhý

Do vzorků 15 a 16 byl v druhém týdnu inkubace přidán DEHP v koncentraci 525 mg.l⁻¹, před tím v nich byl pouze EHS.

Tabulka 63 – Naměřené a vypočtené hodnoty DEHP ve vzorcích

Vzorek	Průměr A [-]	Teoretická koncentra- ce DEHP s ohledem na účinn- ost ex- trakce [mg.l ⁻¹]	Naměřená koncentra- ce DEHP [mg.l ⁻¹]	Úbytek DEHP [%]
1 a – EHS	-0,021	0	0	-
1 b – EHS	0,013	0	0	-
2 a – EHS	0,0105	0	0	-
2 b – EHS	0,0256	0	2,386	-
3 a – EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,584	595,88	611,924	12,085
3 b - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,599	595,88	617,911	11,224
4 a - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,447	595,88	558,662	19,737
4 b - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,629	595,88	629,704	9,53

5 a - EHS + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	0,909	298,51	232,406	37,367
5 b - EHS + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	0,973	298,51	249,145	32,856
6 a - EHS + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,221	298,51	313,557	15,497
6 b - EHS + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,31	298,51	336,639	9,277
7 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,734	595,88	670,835	-
7 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,829	595,88	707,696	-
8 a - DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,784	595,88	690,267	-
8 b - DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,848	595,88	715,35	-
9 a - DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,271	298,51	326,599	-
9 b - DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,271	298,51	326,625	-
10 a - DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,625	298,51	418,814	-
10 b - DEHP (263 mg.l ⁻¹)	1,6	298,51	412,209	-
15 a - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	2,06	595,88	797,985	+14,647
15 b - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	2,19	595,88	848,753	+21,941
16 a - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	1,99	595,88	770,665	+10,722
16 b - EHS + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	2,13	595,88	825,327	+18,575

U všech očkovaných vzorků s EHS a s DEHP, přidaným na začátku pokusu, byl po inkubaci zjištěn úbytek ftalátu. Na rozdíl od předchozího pokusu byl tentokrát větší úbytek v lahvích s nižšími koncentracemi DEHP (263 mg.l⁻¹), a to až 37 %. U lahví s počáteční teoretickou koncentrací DEHP 525 mg.l⁻¹ byl největší procentuální pokles o necelých 20 %. Tento pokus byl kultivován po delší dobu než pokus předcházející; je však diskutabilní, zda mělo toto prodloužení nějaký vliv.

Naopak u očkovaných vzorků s DEHP, přidaným až v 9. den inkubace, nebyl pozorován úbytek koncentrace ftalátu, ani pomnožení mikroorganismů.

Tabulka 64 – Počítání buněk po 14 dnech inkubace.

Vzorek s kulturou AP14b	Počet buněk v 1 komůrce 50x50 μm	Průměrný počet buněk v 1 komůrce	Počet buněk na 1 ml
1 - EHS (203 mg.l ⁻¹)	3/3/1/2/3/1	2,2	1,74*10 ⁷
2 - EHS (203 mg.l ⁻¹)	4/3/2/3/2/1	2,5	2*10 ⁷
3 - EHS (203 mg.l ⁻¹) +DEHP (525 mg.l ⁻¹)	7/10/6/5/6/8	7	5,6*10 ⁷
4 - EHS (203 mg.l ⁻¹) + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	8/3/5/6/2/6	5	4*10 ⁷
5 – EHS (203 mg.l ⁻¹) + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	6/5/11/5/2/6	5,8	4,7*10 ⁷
6 - EHS (203 mg.l ⁻¹) + DEHP (263 mg.l ⁻¹)	5/3/4/2/6/2	3,5	2,8*10 ⁷
15 – EHS (203 mg.l ⁻¹) + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	3/4/0/1/0/2	1,7	1,3*10 ⁷
16 - EHS (203 mg.l ⁻¹) + DEHP (525 mg.l ⁻¹)	2/3/2/3/1/2	2,2	1,7*10 ⁷

Z tabulky 62 lze vyčíst, že vzorky s vyšší koncentrací DEHP kultivované s EHS a vzorky pouze s EHS si byly v počtu buněk na 1 ml velmi podobné, ve vzorcích s nižší koncentrací DEHP kultivovaných spolu s EHS byly počty buněk na 1 ml o něco málo nižší.

6.11 Identifikace kultur AP12 a AP14b

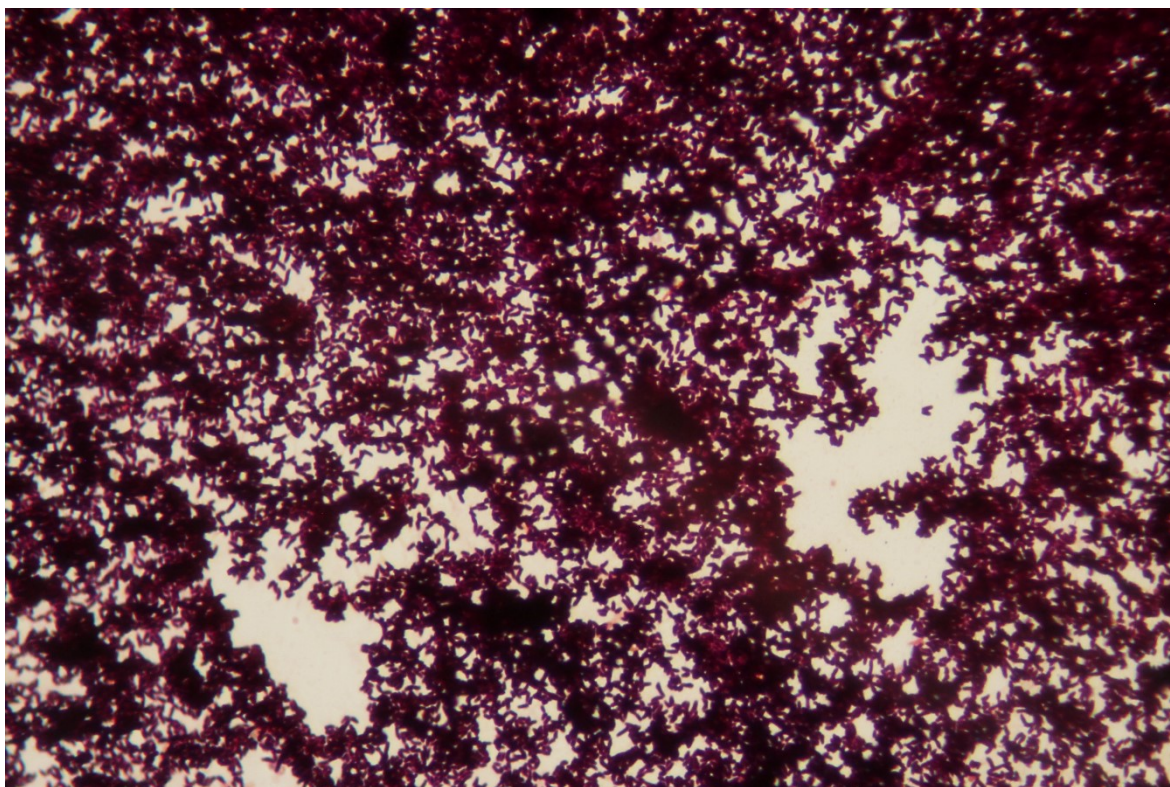
Obě kultury byly identifikovány jako grampozitivní tyčky, schopné růst při teplotě 10 – 30 °C, pH 6 – 9 a osmotickém tlaku, odpovídajícímu koncentraci NaCl až do 6,5 %.

U obou kultur byla provedena izolace DNA, amplifikace části genu pro 16s rRNA a amplikony byly zaslány k sekvenaci. Upravené sekvence jsou udány v příloze.

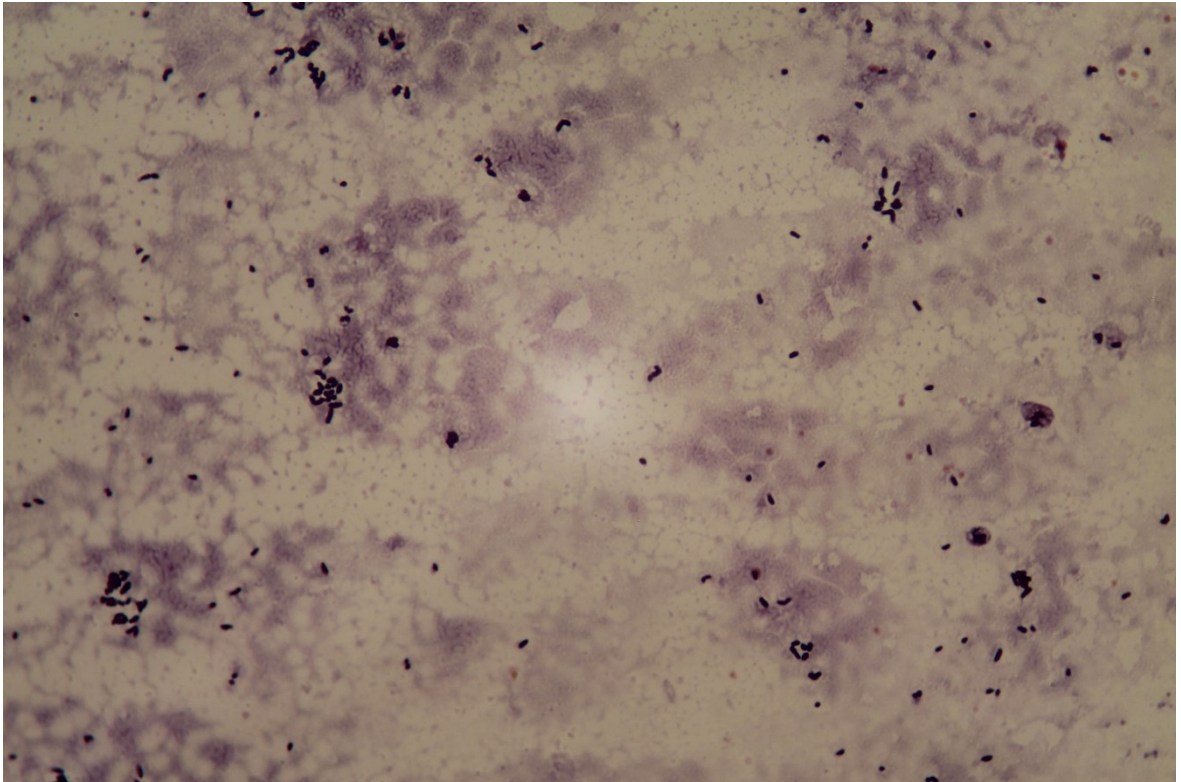
Sekvence byly vloženy do programu BLAST, a bylo zjištěno, že sekvence odpovídá 3 druhům rodu *Rhodococcus*, jak u AP12, tak i u AP14b. Jednalo se o *Rhodococcus jia-*

linqiae; *Rhodococcus qinqshenqii* a *Rhodococcus degradans*. Jelikož nebylo možné bakterie druhově odlišit, byla provedena jen rodová identifikace kultur jako *Rhodococcus sp.*

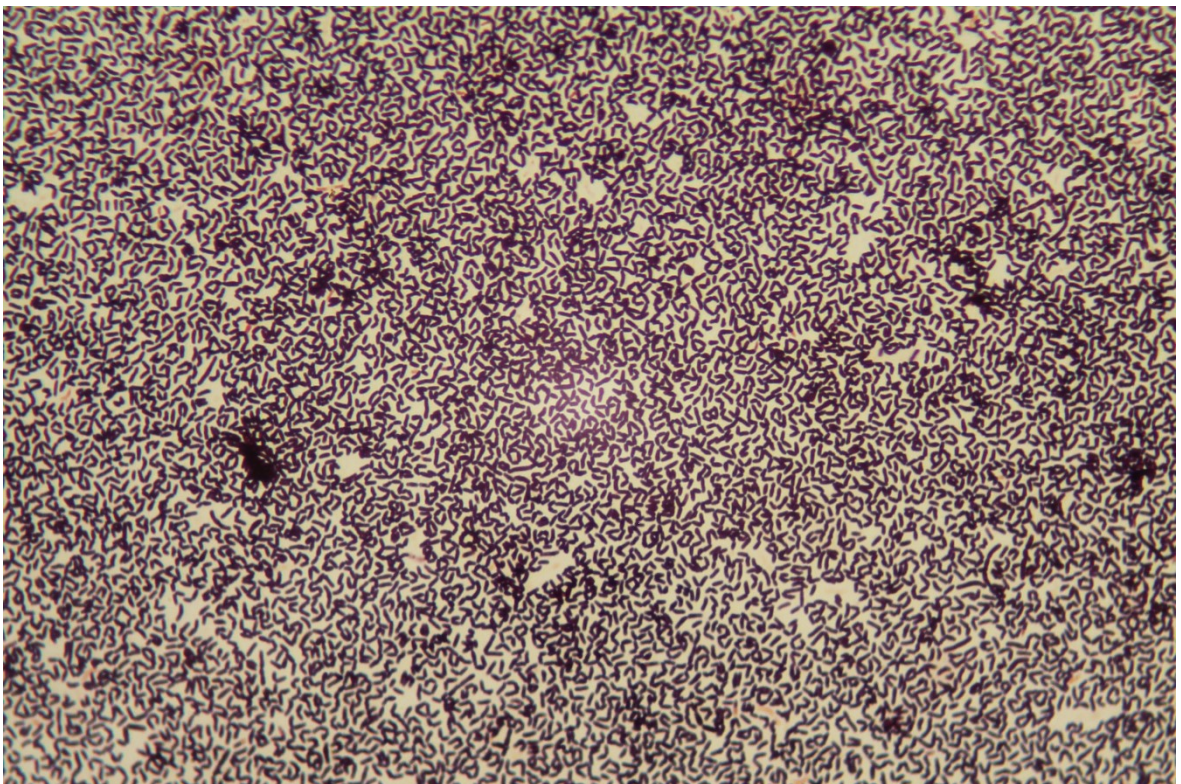
Rod *Rhodococcus* jsou bakterie grampozitivní, aerobní, chemoorganotrofní, kataláza pozitivní a jsou citlivé k lysozymu. Jsou schopny využívat široké rozmezí organických látek jako zdroje uhlíku a energie. Pro rodovou i druhovou klasifikaci rodokoků je klíčová chemotaxonomie, složení buněčné stěny. Jsou široce rozšířené a často se vyskytující v půdě a v hnoji a někteří zástupci jsou patogenní pro lidi a zvířata. Jsou přítomny jak ve sladké, tak slané vodě, ve střevech členovců. Rod má více než 20 druhů. [29]



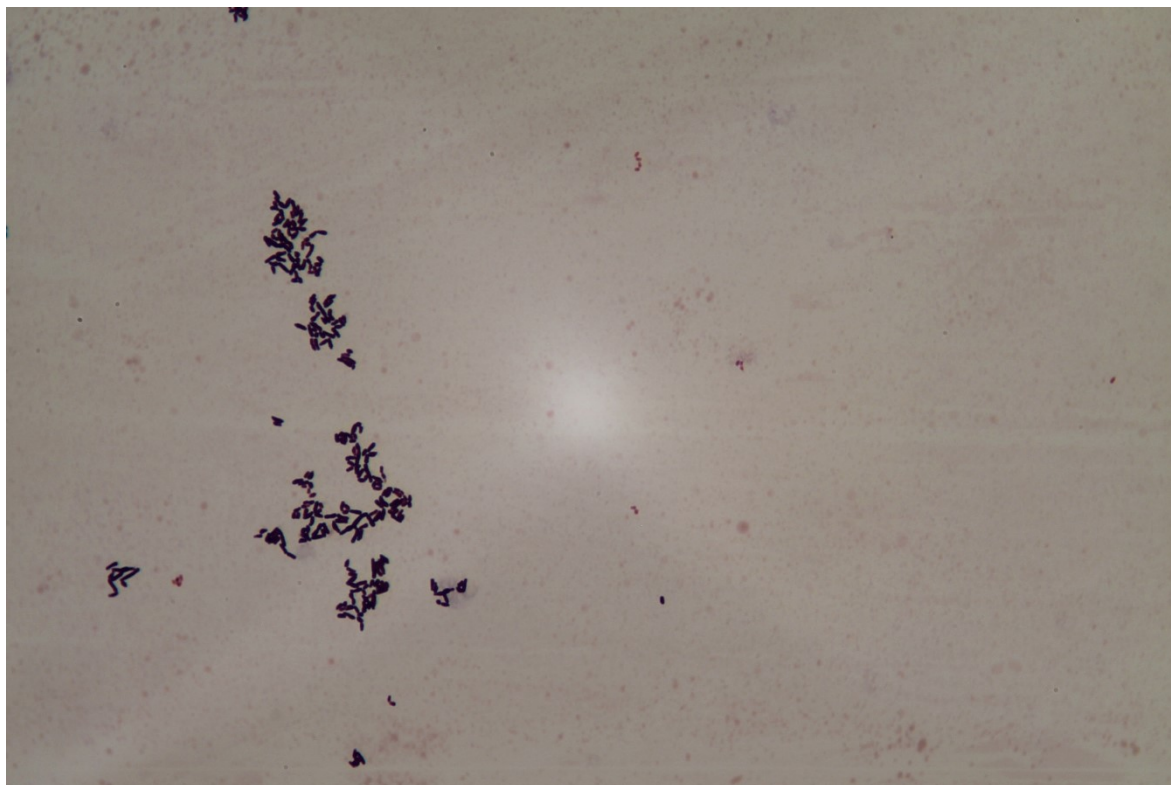
Obrázek 14 – Gramovo barvení kultury AP12, hustší suspenze, zvětšení 1000x



Obrázek 15 – Gramovo barvení kultury AP12, zvětšení 1000x



Obrázek 16 – Gramovo barvení kultury AP14b, hustší suspenze, zvětšení 1000x



Obrázek 17 – Gramovo barvení kultury AP14b, zvětšení 1000x

ZÁVĚR

Na začátku praktické části diplomové práce bylo oživeno 7 kultur z předchozí bakalářské práce, jež byly získány z konsorcia degradujícího EHS. Ověřením jejich růstu na EHS byly pro další práci vybrány 2 kultury, jež si se navzájem vzhledově podobaly, a obě byly schopné EHS využít. Byly to kultury AP12 a AP14b. Obě kultury byly schopné růst na TYA agaru při teplotě od 10 °C do 30 °C, a při koncentraci 1 – 6,5 % NaCl, a byly schopné růst na EHS při pH v rozsahu 6 – 9. Obě kultury byly schopny využít EHS jen za přítomnosti MEM vitamínů.

V další části práce bylo zkoumáno, zda jsou tyto kultury alespoň z části schopny využívat pro svůj růst 2-ethylhexanol, potenciální metabolit vznikající při degradaci EHS či strukturně podobných látek. Bylo zjištěno, že obě kultury jsou schopny tento alkohol využít, ale jen do koncentrace 350 mg.l⁻¹ (AP12) a 250 mg.l⁻¹ (AP14b). Byly rovněž provedeny růstové pokusy kultur na 2-ethylhexanalu, které nepřinesly jednoznačné výsledky, naznačily však toxicitu této látky.

Další práce ukázala, že samotný DEHP není kulturami AP12 a AP14b využíván k růstu jako jediný zdroj uhlíku, ale byla provedena série pokusů s DEHP a přídavkem 2-ethylhexanolu, později s přídavky EHS, jež byly brány jako potenciální induktory enzymu pro případný rozklad DEHP.

Většina těchto pokusů ukázala, že k částečné degradaci DEHP, za přítomnosti EHS nebo 2-ethylhexanolu, skutečně došlo, ovšem ve velmi různém rozsahu, od 2 % do 60 %. Současně pokusy ukázaly, že pro dokonalé vyhodnocování takových testů bude nutné výrazně zdokonalit způsob dávkování DEHP do pokusů a také postup stanovení vysokých koncentrací DEHP ve vodných vzorcích, na což by mělo být zaměřeno při dalších výzkumu tohoto směru.

Závěrem byly obě kultury identifikovány a výsledky ukázaly, že se jedná o zástupce bakteriálního rodu *Rhodococcus*.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LAPCZYNSKI, A., D. MCGINTY, L. JONES, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on ethyl hexyl salicylate. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **2007**, 45(1), S393-S396 DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.041. ISSN 02786915.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507003791>
- [2] SIGMA-ALDRICH, 2-Ethylhexyl salicylate, bezpečnostní list, **2011**, verze 5.0, [online]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=52184&brand=SIAL&PageToGToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fproduct%2Fsial%2F52184%3Flang%3Den>
- [3] RINGLOVÁ, Eva. Biodegradace vybraných kosmetických sloučenin v aktivovaném kalu. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, **2015**, 83 s. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/33628>
- [4] PROISLOVÁ, Alena. Sledování mikrobiálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylanu v povrchových vodách. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, **2016**, 37 (32 052). Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/38078>.
- [5] ROWDHWAL, Sai Sandeep Singh a Jiayang CHEN. Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed Research International*[online]. **2018**, 1-10. DOI: 10.1155/2018/1750368. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/1750368/>
- [6] ROSLEV, P., MADSEN P. L., THYME J. B. a HENRIKSEN K. Degradation of phtalate and Di-(2-Ethylhexyl) phtalate by indigenous and inoculated microorganisms insludge-amended soil. *Applied and environmental mikrobiology*, vol. 64, no. 12, pp. 4711-4719, **1998**
- [7] SHELBY MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). NTP CERHR MON **2006**;18.v,vii-7,II-iii-xiii,passim.
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407857>
- [8] C. Vamsee-Krishna, Prashant S. Phale. Bacterial degradation of phtalate isomers and their esters. *Indian Journal of Microbiology*, **2008**, 17 s.

- [9] Arnika, Bis(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP) [online]. Dostupné z: <http://arnika.org/bis2-ethylhexyl-ftalat-dehp>
- [10] INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), Summary Risk Assessment Report, JRC European Commission, **2008**, EUR 23384 EN/2. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/documents/10162/060d4981-4dfb-4e40-8c69-6320c9debb01>
- [11] BEAUCHESNE, I., S. BARNABÉ, D. G. COOPER a J. A. NICELL. Plasticizers and related toxic degradation products in wastewater sludges. *Water Science & Technology* [online]. **2008**, 57(3), 367-. DOI: 10.2166/wst.2008.001. ISSN 0273-1223. Dostupné z: <http://wst.iwaponline.com/cgi/doi/10.2166/wst.2008.001>
- [12] VAMSEE-KRISHNA, C. a Prashant S. PHALE. Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters. *Indian Journal of Microbiology*[online]. **2008**, 48(1), 19-34. DOI: 10.1007/s12088-008-0003-8. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-008-0003-8>
- [13] QUAN, C. S., Q. LIU, W. J. TIAN, J. KIKUCHI a S. D. FAN. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No. 66. *Applied Microbiology and Biotechnology*[online]. **2005**, 66(6), 702-710. DOI: 10.1007/s00253-004-1683-6. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1683-6>
- [14] MARTTINEN, Sanna K, Riitta H KETTUNEN, Kai M SORMUNEN a Jukka A RINTALA. Removal of bis(2-ethylhexyl) phthalate at a sewage treatment plant. *Water Research* [online]. **2003**, 37(6), 1385-1393. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00486-4. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135402004864>
- [15] HASHIZUME, Kiyomatsu, Jo NANYA, Chitose TODA, Teruyo YASUI, Hideo NAGANO a Nakao KOJIMA. Phthalate Esters Detected in Various Water Samples and Biodegradation of the Phthalates by Microbes Isolated from River Water. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* [online]. **2002**, 25(2), 209-214. DOI: 10.1248/bpb.25.209. ISSN 09186158. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/25.209?from=CrossRef>

- [16]NALLI, S., D. G. COOPER a J. A. NICELL. Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous* [online]. **2002**, 13(5), 343-352. DOI: 10.1023/A:1022313810852. ISSN 09239820. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1022313810852>
- [17]KLEEREBEZEM, Robbert, Look W. HULSHOFF POL a GATZE LETTINGA. Biodegradation [online]. 10(1), **1999**, 63-73. DOI: 10.1023/A:1008321015498. ISSN 09239820. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1008321015498>
- [18]PRADEEP, S., M.K. SARATH JOSH, P. BINOD, R. SUDHA DEVI, S. BALACHANDRAN, Robin C. ANDERSON a Sailas BENJAMIN. *Achromobacter denitrificans* strain SP1 efficiently remediates di(2-ethylhexyl)phthalate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*[online]. **2015**, 112, 114-121. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.10.035. ISSN 01476513. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651314005016>
- [19]XU, Jiaming, Qihong LU, Renata Alves DE TOLEDO a Hojae SHIM. Degradation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) by an indigenous isolate *Acinetobacter* sp. SN13. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. **2017**, 117, 205-214. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.01.004. ISSN 09648305. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300045>
- [20]ZHAO, Hai-Ming, Huan DU, Jing LIN, et al. Complete degradation of the endocrine disruptor di-(2-ethylhexyl) phthalate by a novel *Agromyces* sp. MT-O strain and its application to bioremediation of contaminated soil. *Science of The Total Environment* [online]. **2016**, 562, 170-178. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.171. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969716305952>
- [21]WANG, Jun, Man-Yun ZHANG, Ting CHEN, Ye ZHU, Ying TENG, Yong-Ming LUO a Peter CHRISTIE. Isolation and Identification of a Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate-Degrading Bacterium and Its Role in the Bioremediation of a Contaminated Soil. *Pedosphere* [online]. **2015**, 25(2), 202-211. DOI: 10.1016/S1002-0160(15)60005-4. ISSN 10020160. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002016015600054>

- [22] AHUACTZIN-PÉREZ, Miriam, Saúl TLECUITL-BERISTAIN, Jorge GARCÍA-DÁVILA, Ericka SANTACRUZ-JUÁREZ, Manuel GONZÁLEZ-PÉREZ, María Concepción GUTIÉRREZ-RUÍZ a Carmen SÁNCHEZ. A novel biodegradation pathway of the endocrine-disruptor di(2-ethyl hexyl) phthalate by *Pleurotus ostreatus* based on quantum chemical investigation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. **2018**, 147, 494-499. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.004. ISSN 01476513.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651317305778>
- [23] PUB-Chem, 2-Ethylhexanol, Open Chemistry Database, CID 7720. [online]
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7720#section=Top>
- [24] MCGINTY, D., J. SCOGNAMIGLIO, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on 2-ethyl-1-hexanol. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **2010**, 48, S115-S129. DOI: 10.1016/j.fct.2010.05.042. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691510003182>
- [25] NALLI, Sandro, Owen J. HORN, Adam R. GROCHOWALSKI, David G. COOPER a Jim A. NICELL. Origin of 2-ethylhexanol as a VOC. *Environmental Pollution* [online]. **2006**, 140(1), 181-185. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.06.018. ISSN 02697491. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749105003568>
- [26] HORN, Owen, Sandro NALLI, David COOPER a Jim NICELL. Plasticizer metabolites in the environment. *Water Research* [online]. **2004**, 38(17), 3693-3698. DOI: 10.1016/j.watres.2004.06.012. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135404003380>
- [27] HÄUSLER, Jiří. Mikrobiologické metody kontroly jakosti vod II. Ministerstvo životního prostředí ČR v zemědělském nakladatelství BRÁZDA v Praze, **1994**, 296 s.
- [28] VYSKOČILOVÁ, Jindřiška. Katalytická oxidace DEHP peroxidem vodíku. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, **2008**, 75 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/7200>.

- [29] SEDLÁČEK, Ivo. Taxonomie prokaryot. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSM	Basal salt medium (základní minerální medium)
ČOV	Čistička odpadních vod
DBP	Dibutylftalát
DEHA	Di(2-ethylhexyl) adipát
DEHP	Di(2-ethylhexyl) ftalát
DEP	Diethylftalát
DMP	Dimethylftalát
DOP	Dioktyl ftalát
DOTP	Dioktyl tereftalát
EHAL	2-Ethylhexanal
EHOL	2-Ethylhexanol
EHS	2-Ethylhexylsalicylan
FT	Fakulta technologická
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MM	Tekuté minerální médium
PAE	Ester kyseliny ftalové (ftaláty)
R2A	Reasoner's 2A Agar
RSM	Response surface methodology (metoda odezvy plochy)
TYA	Tryptone Yeast extract Agar
UTB	Univerzita Tomáše Bati
VOC	Těkavá organická látka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Struktura 2-ethylhexylsalicylanu.....	12
Obrázek 2 – Struktura di(2-ethylhexyl) ftalátu.....	13
Obrázek 3 – Degradace DEHP přes kyselinu ftalovou	15
Obrázek 4 – Navržená degradační cesta DEHP bakterií <i>Acinetobacter</i> sp.	19
Obrázek 5 – Struktura 2-ethylhexanolu.....	21
Obrázek 6 – Vznik 2-ethylhexanolu z DEHP	22
Obrázek 7 – Kalibrační křivka pro DEHP v <i>n</i> -hexanu při $\lambda = 224$ nm ()	34
Obrázek 8 – Grafické porovnání růstu AP12 na EHS s vitamíny a bez vitamínů.	51
Obrázek 9 – Grafické porovnání růstu kultury AP14b na EHS s vitamíny a bez vitamínů.	52
Obrázek 10 – Lahev č. 1 pouze s DEHP, po 7 dnech kultivace, zvětšení 20x100	60
Obrázek 11 – Lahev č. 3 s DEHP + EHS po 7 dnech kultivace, zvětšení 20x100	60
Obrázek 12 – Lahev č. 5 pouze s EHS po 7 dnech kultivace, zvětšení 20x100	61
Obrázek 13 – Kalibrační křivka pro DEHP v <i>n</i> -hexanu, $\lambda = 224$ nm, měřeno na UV-VIS spektrofotometru Halo DB-20	70
Obrázek 14 – Gramovo barvení kultury AP12, hustší suspenze, zvětšení 1000x	75
Obrázek 15 – Gramovo barvení kultury AP12, zvětšení 1000x	76
Obrázek 16 – Gramovo barvení kultury AP14b, hustší suspenze, zvětšení 1000x	76
Obrázek 17 – Gramovo barvení kultury AP14b, zvětšení 1000x	77

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Fyzikální vlastnosti EHS	12
Tabulka 2 – Fyzikální vlastnosti DEHP [10].....	14
Tabulka 3 – Fyzikální vlastnosti 2-ethylhexanolu [23].....	21
Tabulka 4 – Složení tekutého minerálního média na 100 ml	25
Tabulka 5 – Složení roztoku stopových prvků	25
Tabulka 6 – Informace o složení MEM vitamínů od výrobce (Biosera, Francie)	26
Tabulka 7 – Koncentrace NaCl v obohaceném TYA agaru	27
Tabulka 8 – Objemové množství roztoků A a B pro přípravu MM o různém pH.....	28
Tabulka 9 – Dávkované objemy složek.....	29
Tabulka 10 – Dávkované objemy složek.....	29
Tabulka 11 – Koncentrace a dávkované objemy 2-ethylhexanolu v lahvích	30
Tabulka 12 – Naměřené absorbance DEHP v <i>n</i> -hexanu při vlnové délce $\lambda=224$ nm.....	34
Tabulka 13 – Dávkované objemy DEHP a EHS.....	35
Tabulka 14 – Dávkované objemy DEHP a EHS.....	35
Tabulka 15 – Objemy a hmotnosti DEHP ve vzorcích	36
Tabulka 16 – Ředění jednotlivých vzorků hexanem.....	37
Tabulka 17 – Objemy a hmotnosti DEHP ve vzorcích	37
Tabulka 18 – Dávkování chemikálií a jejich koncentrace ve vzorcích	38
Tabulka 19 – Dávkování chemikálií a jejich koncentrace ve vzorcích.....	39
Tabulka 20 – Růst kultur na EHS	43
Tabulka 21 – Růst při konc. NaCl 1 %.....	44
Tabulka 22 – Růst při konc. NaCl 2 %.....	44
Tabulka 23 – Růst při konc. NaCl 3 %.....	44
Tabulka 24 – Růst při konc. NaCl 4 %.....	44
Tabulka 25 – Růst při konc. NaCl 5 %.....	45
Tabulka 26 – Růst při konc. NaCl 6,5 %.....	45
Tabulka 27 – Růst při konc. NaCl 10 %.....	45
Tabulka 28 – Růst při teplotě 5 °C.....	45
Tabulka 29 – Růst při teplotě 10 °C.....	45
Tabulka 30 – Růst při teplotě 20 °C.....	46
Tabulka 31 – Růst při teplotě 26 °C.....	46
Tabulka 32 – Růst při teplotě 30 °C.....	46

Tabulka 33 – Růst při teplotě 37 °C.....	46
Tabulka 34 – Růst při teplotě 43 °C.....	46
Tabulka 35 – Růst AP12 na EHS při různém pH	47
Tabulka 36 – Růst AP14b na EHS při různém pH.....	47
Tabulka 37 – Růst kultur na 2-ethylhexanolu.....	48
Tabulka 38 – Schopnost růstu kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu o různé koncentraci po 7 denní kultivaci.	48
Tabulka 39 – Schopnost růstu kultur AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu o různé koncentraci po 7 denní kultivaci	49
Tabulka 40 – Růst AP12 na DEHP - 14 dnů kultivace	49
Tabulka 41 – Růst AP14b na DEHP - 14 dnů kultivace	49
Tabulka 42 – Porovnání růstu kultury AP12 na EHS s vitamíny a bez vitamínů.....	50
Tabulka 43 – Porovnání růstu kultury AP14b na EHS s vitamíny a bez vitamínů.....	51
Tabulka 44 – Růst AP12 na 2-ethylhexanolu.....	53
Tabulka 45 – Růst AP14b na 2-ethylhexanolu.	53
Tabulka 46 – Měření OD ₆₀₀ vzorků 1 – 6 a čistého MM den 0.....	53
Tabulka 47 – Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu	54
Tabulka 48 – Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP	55
Tabulka 49 – Růst AP12 a AP14b na 2-ethylhexanolu s DEHP	56
Tabulka 50 – Výsledky extrakce do hexanu	58
Tabulka 51 – OD ₆₀₀ po 3 a 7 dnech ve vzorcích.....	59
Tabulka 52 – Počet buněk v pozitivních vzorcích po 7 dnech inkubace.....	61
Tabulka 53 – Naměřené hodnoty OD ₆₀₀ v různých časových intervalech	62
Tabulka 54 – Počítání bakterií po 2 dnech při zvětšení 20x100	63
Tabulka 55 – Počítání bakterií po 5 dnech při zvětšení 20x100	63
Tabulka 56 – Počítání bakterií po 7 dnech při zvětšení 20x100	64
Tabulka 57 – Počítání bakterií po 9 dnech při zvětšení 20x100	65
Tabulka 58 – Úbytek DEHP v pozitivních vzorcích.....	66
Tabulka 59 – Naměřené a vypočtené hodnoty pro účinnost extrakce – první pokus	67
Tabulka 60 – Naměřené a vypočtené hodnoty pro účinnost extrakce – druhý pokus.....	68
Tabulka 61 – Naměřené a vypočtené hodnoty DEHP ve vzorcích.....	70
Tabulka 62 – Počítání buněk po 9 dnech kultivace.....	71
Tabulka 63 – Naměřené a vypočtené hodnoty DEHP ve vzorcích.....	72

Tabulka 64 – Počítání buněk po 14 dnech inkubace. 74

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I: VÝSLEDNÉ SEKVENCE ČÁSTI GENU PRO 16S rRNA KULTUR AP12
A AP14B

PŘÍLOHA P I: VÝSLEDNÉ SEKVENCE ČÁSTI GENU PRO 16S RNA KULTUR AP12 A AP14B

Sekvence kultury AP12 s použitím primeru FD1

ACAGGTAACGCCTTTCGGGGTACACGAGCAGGCCAACGGGTGAGTAACACGTGGGTG
ATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCT
CCTATCGCATGGTGGGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC
GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCA
GAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCG
TTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTACGCGGTTTGTGCGGTCGTTTGTGAAA
ACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCATGCGATACAGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGG
AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAGATGCGCAGATATCAAGACGAACACCGGTG
GCGAATGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGACGAACGAAAGCGTGCGTAGCGT
ACAGGATGAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTACACTGTGGGCGCTA

Sekvence kultury AP14b s použitím primeru FD1

GCCTTTCGGGGTACACGAGCAGGCCAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTG
CACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCCTATCGCAT
GGTGGGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTG
GTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGC
CACTGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCA
CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGAA
TACTGGGCGTAAAGAGTTCGTACGCGGTTTGTGCGGTCGTTTGTGAAAACCAGCGGC
TCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACAGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGA
ATTCCTGGTGTAGCGGTGAGATGCGCAGATATCAAGAGGAACACCGGTGGCGAATGC
GGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGACGAACGAAAGCGTGCGTAGCGAACAGGATG
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTACACTGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACT
GAATCCGTGACGTAGCTCATGCATTAAGCG