

Srovnání vlastností degradačních bakterií získaných z různých prostředí

Bc. Kateřina Pančochová

Diplomová práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Kateřina Pančochová
Osobní číslo:	T18554
Studijní program:	N2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor:	Inženýrství ochrany životního prostředí
Forma studia:	Kombinovaná
Téma práce:	Srovnání vlastností degradačních bakterií získaných z různých prostředí

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte rešerši zaměřenou na degradační schopnosti vybraných rodů bakterií.
2. Experimentálně ověřte schopnost vybraných degradačních kultur využívat k růstu určité uhlovodíky, případně dusíkaté heterocyklické látky nebo jejich metabolity.
3. Na základě získaných výsledků porovnejte vlastnosti bakterií pocházejících z vodního a půdního prostředí.
4. Získané poznatky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v tištěné i elektronické formě v řádném termínu.

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

Seznam doporučené literatury:

1. D. Mara, N. Horan. 2003. The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Microbial degradation of recalcitrant compounds: pp 559 ? 576. Academic Press.
2. Novotná Z. 2017. Mikrobiální degradace N-oktylpyrrolidonu a popis bakterií schopných rozkladu. Diplomová práce, FT UTB ve Zlíně.
3. Krajčířiková S. 2019. Význam více druhů bakterií pro rozklad syntetických látek. Bakalářská práce, FT UTB ve Zlíně.
4. Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect a Medline.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: 3. února 2020

Termín odevzdání diplomové práce: 15. května 2020

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

V této diplomové práci byla zkoumána biodegradace N-oktyl-2-pyrrolidonu (NOP) prostřednictvím bakteriálních kultur získaných v předešlých pracích na Univerzitě Tomáše Bati. Jednalo se o zástupce rodů *Achromobacter*, *Arthrobacter* a dvě odlišné kultury rodu *Phenyllobacterium*. Cílem této práce bylo především srovnání jejich biodegradačních vlastností a jejich porovnání mezi sebou. Byly testovány tyto vlastnosti: i) utilizace alifatických uhlovodíků, pyrrolidonu a jeho derivátů; ii) sekvenční biodegradace NOP; iii) utilizace dusíku z molekuly NOP.

Klíčová slova: *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Phenyllobacterium*, biodegradace, uhlovodíky, NOP

ABSTRACT

In this diploma thesis the biodegradation of N-octyl-2-pyrrolidone (NOP) through bacterial strains obtained in previous works at Tomas Bata University has been tested. In fact, the members of genera *Achromobacter*, *Arthrobacter* and two different strains of genus *Phenyllobacterium* have been used for testing. The primary aim of the thesis was general comparison of all the strains as well as their biodegradation properties. The following behaviour have been tested: i) utilization of aliphatic hydrocarbons, pyrrolidone and its derivatives; ii) sequential biodegradation of NOP; iii) utilization of nitrogen involved in NOP molecule.

Keywords: *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Phenyllobacterium*, Biodegradation, Hydrocarbons, NOP

V prvé řadě bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení a podnětné rady, ochotu a strávený čas, který mi věnoval během zpracovávání této diplomové práce. Dále také děkuji laborantkám z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické, UTB ve Zlíně, za vždy připravené roztoky a další pomůcky.

Poděkování pak především patří také všem, kteří mě během celé doby studia podporovali.

„Věda zjistila, že nic nemůže zmizet beze stopy. Příroda nezná zničení, pouze změnu.“

Wernher von Braun

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

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1 N-OKTYL-2-PYRROLIDON	10
1.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI	10
1.2 ENVIRONMENTÁLNÍ, EKOTOXIKOLOGICKÉ A TOXIKOLOGICKÉ VLASTNOSTI	10
1.3 VÝROBA A VYUŽITÍ	11
1.3.1 Thidiazuron (TDZ).....	11
1.3.2 Diuron (DCMU).....	11
2 BIODEGRADACE	12
3 SHRUTÍ VÝSLEDKŮ PŘEDCHOZÍCH PRACÍ.....	13
3.1 DIPLOMOVÁ PRÁCE JANA SALAČE	13
3.2 BAKALÁŘSKÁ PRÁCE ZLATY NOVOTNÉ	13
3.3 DIPLOMOVÁ PRÁCE ZLATY NOVOTNÉ	13
3.4 BAKALÁŘSKÁ PRÁCE SABINY KRAJČÍRIKOVÉ	13
3.5 DIPLOMOVÁ PRÁCE JAROSLAVA URBANA.....	14
4 CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH RODŮ A PŘEHLED DEGRADAČNÍCH VLASTNOSTÍ.....	15
4.1 <i>ACHROMOBACTER</i> SP. DR1	15
4.1.1 Degradální vlastnosti	15
4.2 <i>PHENYLOBACTERIUM</i> SP. DR2.....	16
4.2.1 Degradální vlastnosti	16
4.3 <i>ARTHROBACTER</i> SP. JU3	18
4.3.1 Degradální vlastnosti	18
4.3.2 <i>Arthrobacter humicola</i> a <i>Arthrobacter oryzae</i>	19
4.4 <i>PHENYLOBACTERIUM</i> SP. JU4	19
5 CHARAKTERIZACE TESTOVANÝCH LÁTEK	20
5.1 NASYCENÉ ALIFATICKÉ UHLOVODÍKY	20
5.1.1 Hexan	20
5.1.2 Oktan	21
5.1.3 Dekan	21
5.1.4 Dodekan	22
5.1.5 Tetradekan.....	22
5.1.6 Hexadekan.....	23
5.2 PYRROLIDON A JEHO DERIVÁTY	23
5.2.1 Pyrrolidon.....	23
5.2.2 N-methyl-pyrrolidon (NMP).....	24
5.2.3 N-ethyl-pyrrolidon (NEP)	24

6	CÍLE PRÁCE	25
II	PRAKTICKÁ ČÁST	26
7	MATERIÁL A METODY	27
7.1	PŘÍPRAVA MÉDIÍ A FYZIOLOGICKÉHO ROZTOKU	27
7.1.1	Příprava tekutého minerálního média (MM) a fyziologického roztoku.....	27
7.1.2	Příprava tekutého minerálního média bez dusíku (MMNF)	28
7.1.3	Příprava bezdusíkatého roztoku stopových prvků	28
7.2	EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY	29
7.2.1	Utilizace oktanu, fenolu, toluenu a hexadekanu kulturami <i>Arthrobacter</i> sp. JU3, <i>Phenylobacterium</i> sp. JU4, <i>Achromobacter</i> sp. Dr1 a <i>Phenylobacterium</i> sp. Dr2 individuálně.....	29
7.2.2	Utilizace hexanu kulturami <i>Phenylobacterium</i> sp. Dr2 a <i>Phenylobacterium</i> sp. JU4	30
7.2.3	Utilizace dekanu kulturami <i>Achromobacter</i> sp. Dr1, <i>Phenylobacterium</i> sp. Dr2, <i>Arthrobacter</i> sp. JU3 a <i>Phenylobacterium</i> sp. JU4.....	30
7.2.4	Utilizace dodekanu a tetradekanu kulturami <i>Phenylobacterium</i> sp. Dr2 a <i>Phenylobacterium</i> sp. JU4 individuálně.....	30
7.2.5	Utilizace pyrrolidonu (PYR), N-methyl pyrrolidonu (NMP) a N-ethyl pyrrolidonu (NEP) kulturou <i>Arthrobacter</i> sp. JU3 a konsorciem JU3+JU4.....	31
7.2.6	Sekvenční biodegradace NOP kulturami <i>Phenylobacterium</i> sp. Dr2 a <i>Arthrobacter</i> sp. JU3	32
7.2.7	Utilizace NOP kulturami <i>Phenylobacterium</i> sp. JU4 a <i>Phenylobacterium</i> sp. Dr2 individuálně bez externího zdroje dusíku	33
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
8.1	UTILIZACE VYBRANÝCH UHLOVODÍKŮ	36
8.2	UTILIZACE PYRROLIDONU A JEHO DERIVÁTŮ	39
8.3	SEKVENČNÍ BIODEGRADACE.....	41
8.4	RŮST BEZ EXTERNÍHO ZDROJE DUSÍKU	45
	ZÁVĚR	54
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	62
	SEZNAM OBRÁZKŮ	63
	SEZNAM TABULEK.....	64
	SEZNAM PŘÍLOH.....	65

ÚVOD

Jednadvacáté století se mimo technologický pokrok ve většině odvětví vyznačuje i celosvětovým zvýšeným zájmem o zlepšení stavu přírody a krajiny. Nejen odborná, ale i laická veřejnost se stále více snaží o porozumění následků antropogenních aktivit na stav celé planety.

Znečištění těžkými kovy a organickými kontaminanty jsou pravděpodobně největším problémem, a to kvůli ireverzibilitě kontaminace.

Kontaminace může mít vliv na lidské zdraví přímým kontaktem, nebo potravním řetězcem (také kontaminovanou vodou). Projevy přítomnosti polutantů v ekosystému pak bývají velmi rozmanité. U organismů může docházet ke stimulaci až po totální inhibici v závislosti na době expozice a afinitě metabolismu.

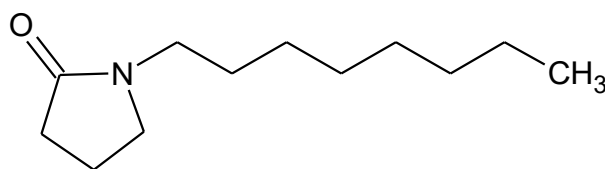
Díky aplikovaným poznatkům biochemických reakcí jsme v dnešní době schopni úspěšně snižovat dopad většiny antropogenních látek na životní prostředí. Abychom se vyvarovali nadužívání dalších chemikálií, byly podpořeny přírodě blízké způsoby odstraňování polutantů. Zásadní praktickou součástí je tak i důkladná znalost mikroorganismů, jejich vlastností, a především degradačních schopností.

V rámci této diplomové práce, byly srovnávány vlastnosti vybraných degradačních bakterií, které byly získány v rámci předešlých bakalářských a diplomových prací na Univerzitě Tomáše Bati, Fakultě Technologické, Ústavu Inženýrství ochrany životního prostředí. Tyto bakterie byly vybrány z důvodu schopnosti degradace N-oktyl-2-pyrrolidonu, jehož mikrobiálním rozkladem se výzkumná činnost se Ústavu zabývá.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 N-OKTYL-2-PYRROLIDON

Neboli 1-n-Octyl-2-pyrrolidone, dále jen NOP, je organická molekula složená z hydrofilního laktamového kruhu a hydrofobního alifatického řetězce (PubChem, 2019).



Obr. 1: molekulární struktura NOP, $C_{12}H_{23}NO$

1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Při 20 °C a tlaku 1013 hPa se jedná o bezbarvou kapalinu s lehce dráždivým zápachem, mrznoucí při -31,1 °C. Bod varu je 306,5 °C (ECHA, 2019). Další vlastnosti jsou shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1: Další vybrané vlastnosti (přepřacováno dle ECHA, 2019).

Hustota	0,92 g/cm ³
Rozpustnost ve vodě	1250 mg/l
Povrchové napětí	30,8 mN/m (c=1000 mg/l)
Bod vzplanutí	113 °C
Charakterizace	Nehořlavá, nevýbušná

1.2 Environmentální, ekotoxikologické a toxikologické vlastnosti

N-oktyl-2-pyrrolidon byl vyhodnocen jako biodegradabilní ve vodě, s nízkou úrovní hydrolyzy (nezávislé na pH) a střední úrovní mobility ve všech typech půd. Dále byl označen jako nebezpečný pro životní prostředí s dlouhodobými účinky (viz tab. 2). Při sledování toxických účinků na suchozemské rostliny bylo zjištěno, že LC_{50} (při krátkodobé expozici) je 164 mg/kg půdy, a LC_{10} (při dlouhodobé expozici) je 62,5 mg/kg půdy (ECHA, 2019).

Ze zdravotního hlediska byl NOP vyhodnocen jako žíravý (kategorie 1B), způsobující poškození kůže a poškození očí. Vyznačuje se slabým bioakumulačním potenciálem. U krysy je LD_{50} orálně 2020 mg/kg a dermálně 4000 mg/kg (ECHA, 2019). Jeho ekotoxikologické vlastnosti vůči vodním organismům jsou shrnuty v tab. 2.

Tab. 2: Ekotoxické vlastnosti pro vodní org. (přepřacováno dle ECHA, 2019).

Organismus	Stanovení	Rozsah [hod]	Koncentrace [mg/l]
Sladkovodní ryby	LC ₅₀	96	22,0
Bezobratlí (<i>Daphnia magna</i>)	LC ₅₀	48	12,2
Zelené řasy	EC ₅₀	72	16,6
Mikroorganismy	IC ₅₀	0,5	460

1.3 Výroba a využití

Používá se jako rozpouštědlo přípravků pro ochranu rostlin v oblastech zemědělství a lesnictví. Ročně se jej pro tyto účely vyrobí více jak 1000 tun (společnost OXEYNS) s příspěvkem 10–100 tun (společnost RotamFrance) (ECHA, 2019). Tyto přípravky jsou poté z Evropy distribuovány po celém světě, především pak do Asie (OXEYNS, 2019). N-(n-dodecyl)-2-pyrrolidon a N-(n-oktyl)-2-pyrrolidon se používají jako inertní složky v defoliantech bavlny obsahující thidiazuron a diuron jako aktivní složky (EPA, 2019).

1.3.1 Thidiazuron (TDZ)

TDZ je substituovaná fenylnmočovinová sloučenina, která podporuje organogenezi rostlin (regeneraci výhonků) a regeneraci rostlin (Murthy, 1998).

TDZ vykazuje jedinečnou vlastnost napodobování jak auxinových, tak cytokininových účinků na růst a diferenciaci kultivovaných explantátů (CliniScience, 2019). Prokázal se jako vysoce účinný bioregulant morfogeneze v tkáňové kultuře mnoha druhů rostlin. Aplikace TDZ indukuje rozmanité spektrum odpovědí od vyvolání kalusu po tvorbu somatických embryí (Murthy, 1998).

1.3.2 Diuron (DCMU)

DCMU je derivátem dichlorbenzenu, známý jako bílý krystalický prášek. Používá se jako herbicid k ničení plevelů, trav a mechů. Hojně se také využívá pro kontrolu řas rybích nádrží. Je toxický pro vodní organismy i bezobratlé. (PubChem, 2019).

2 BIODEGRADACE

Biodegradace je jedním z nejefektivnějších přírodních procesů pro odstranění polutantů z prostředí (Lou a kol., 2019). Tato metabolická schopnost mikroorganismů umožňuje přeměnit nebo mineralizovat organické polutanty na látky méně škodlivé, které jsou pak integrovány do přírodních biochemických cyklů. Intenzita samotné biodegradace je ovlivněna mnoha faktory, mezi které může patřit koncentrace a dostupnost kyslíku, kontaminujících látek, živin, hodnota pH, fyzikální a chemický charakter vlastního polutantu a mnoho dalších (Margesin a Schinner, 2001).

Biodegradace jednotlivých organických látek je zkoumána již více než 90 let. Zpočátku byly ve středu zájmů především perzistentní pesticidy v půdě, ale postupem času se oblast zájmu rozšířila na další neméně nebezpečné látky. Biodegradační mikroorganismy můžeme nalézt ve znečištěné i čisté půdě a vodě, kde mají díky jejich schopnosti degradovat různé xenobiotické sloučeniny nesmírný význam (Singh a Ward, 2004).

Mikroorganismy degradující uhlovodíky hrají důležitou roli v biologickém čištění znečištěných stanovišť – vod, půd, sedimentů i ovzduší. Biodegradace širokého spektra uhlovodíků, včetně alifatických, aromatických, halogenovaných a nitrovaných sloučenin, byla prokázána i na různých extrémních stanovištích (Margesin a Schinner, 2001).

3 SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ PŘEDCHOZÍCH PRACÍ

Problematika degradace NOP již byla na univerzitě v minulosti několikrát studována, proto se následující kapitola zabývá shrnutím nejdůležitějších výsledků těchto prací.

3.1 Diplomová práce Jana Salače

Tato práce byla první, která se zabývala 1-oktyl-pyrrolidonem. Student zkoumal protimikrobní účinky, na místo možných degradačních pochodů. Byly prokázány toxické účinky této látky vůči konkrétním mikrobiálním organismům. V závěru práce bylo také zjištěno, že koncentrace $0,6 - 2,0 \text{ g.l}^{-1}$ měla na aktivovaný kal téměř úplný inhibiční účinek.

3.2 Bakalářská práce Zlaty Novotné

V této práci byla zkoumána mikrobiální degradace N-oktyl-2-pyrrolidonu v říční vodě a bylo zjištěno, že většina NOP byla rozložena během 7-8 dní. Později byly z pomnožené mikrobiální směsné kultury izolovány dvě čisté, tehdy neidentifikované kultury, které byly zakonzervovány.

3.3 Diplomová práce Zlaty Novotné

V práci byly studovány dvě kultury společně rozkládající NOP (kultury označeny Dr1 a Dr2), které byly získány při bakalářské práci. Bylo zjištěno, že kultura Dr2 je sama schopna velmi mírného růstu na NOP, přičemž ale společný růst obou kultur na NOP je výraznější. Dále bylo zjištěno, že kultura Dr2 je schopna růstu na oktanolu a že žádná z kultur nedokáže růst na pyrrolidonu. Podstata společného růstu na NOP tedy nebyla zjištěna. Kultury se v závěru práce podařilo rodově identifikovat, a to jako *Achromobacter* sp. Dr1, *Phenylobacterium* sp. DR2.

3.4 Bakalářská práce Sabiny Krajčířikové

V této práci byla provedena řada pokusů se snahou objasnit úlohu obou kultur při společné degradaci. Bylo prokázáno, že kultura Dr1 není sama schopna žádného růstu na NOP. Dále byl nepochybně prokázán růst kultury Dr2 na oktanu a vysloven předpoklad, že kultura Dr2 zahajuje degradaci s využitím oktylové části NOP. Opětovně byl zkoušen růst obou kultur

na pyrrolidonu a jeho derivátech (N-metylpyrrolidonu – NMP, N-ethylpyrrolidonu - NEP), avšak s negativními výsledky. Závěrem této práce tak byla tato zjištění:

- i) podstata společné degradace NOP je jiná než jen degradace odlišných částí molekuly jednotlivými kulturami,
- ii) degradace NOP při působení obou kultur je velmi efektivní a je patrné, že kultura Dr2 zahajuje degradaci a po ní nastupuje kultura Dr1, která je klíčová pro rozklad zbývající části molekuly.

3.5 Diplomová práce Jaroslava Urbana

V této diplomové práci byl zkoumán rozklad N-oktyl-2-pyrrolidonu půdními mikroorganismy, získanými v podobě směsné suspenze z nivní zeminy. Ve vodném prostředí byly schopny téměř úplného rozkladu NOP přibližně po 14 dnech. Z pomnožené směsi byly izolovány nejhojněji zastoupené bakteriální kultury a tyto kultury byly označeny JU3, JU6 a JU4. Pouze jediná kultura JU4 byla sama schopna mírného růstu na NOP, avšak v kombinaci s kulturou JU3 nebo JU6 byl růst bakterií i rozklad NOP efektivnější. I zde tedy bylo prokázáno, že pro rozklad NOP půdními bakteriemi je nutná přítomnost minimálně dvou odlišných kultur. Kultury identifikovány nebyly, ale byly popsány alespoň základní vlastnosti. JU4 byla popsána jako gramnegativní oxidázo-pozitivní tyčka, zatímco JU3 a JU6 jako grampozitivní, oxidázo-negativní koky.

Pro důkladnější pochopení rozkladu NOP vybranými rody bakterií, bylo potřeba srovnání jejich degradačních vlastností různých látek (viz kapitola 4).

4 CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH RODŮ A PŘEHLED DEGRADAČNÍCH VLASTNOSTÍ

Jak již bylo uvedeno dříve, byly izolovány dva rody vodních a dva rody půdních bakterií, které jsou schopny rozkládat N-oktyl-2-pyrrolidon. Ve vodním prostředí se jedná o rody *Achromobacter* a *Phenylobacterium*.

Oba tyto rody jsou řazeny do kmene Proteobacteria, který zahrnuje mj. mnohé bakterie schopné rozkladu různých organických polutantů, např. dominantní bakterie v degradaci polyaromatických uhlovodíků (dále jen PAU) v životním prostředí (Singleton a kol., 2011).

4.1 *Achromobacter* sp. Dr1

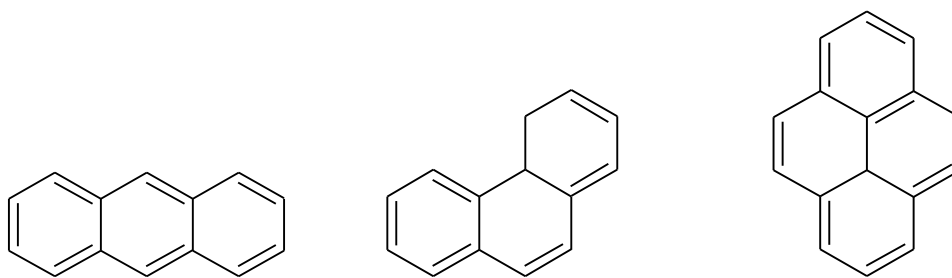
Rod *Achromobacter* řadíme do kmene Proteobacteria, třídy Betaproteobacteria, řádu Burkholderiales a čeledi Alcaligenaceae (NCBI, 2017).

Jsou to aerobní, pohyblivé gram-negativní tyčky se zaoblenými konci, rostoucí převážně ve dvojicích (Novotná, 2017). Tyto nepigmentující bakterie jsou schopny oxidace maltózy, mannitolu a sacharózy (Chester, 1978). Rostou na běžných kultivačních médiích, např. Brain heart infusion (BHI) při teplotách do 37°C, MacConkey agaru i na médiích s obsahem NaCl v rozmezí 0-5%. Teplota růstu je 5° až 37°C (Yabuuchi a kol., 1998).

4.1.1 Degradáční vlastnosti

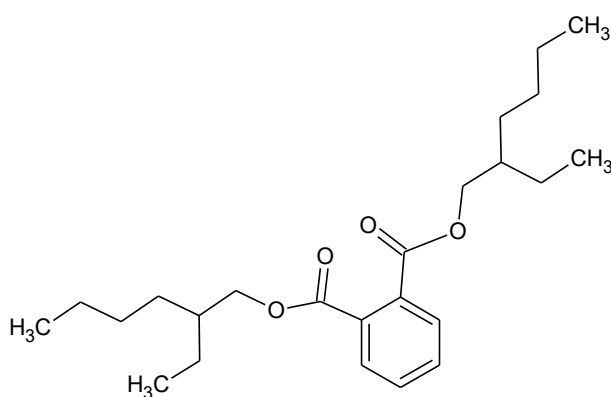
Bakterie rodu *Achromobacter* využívají jako zdroj uhlíku řadu organických kyselin a aminokyselin (Sedláček, 2007) a nejspíše se do některých degradačních procesů zapojují až sekundárně (Yambuuchi a kol., 1998), ne tedy při primárním zahájení rozkladu. Této situaci odpovídají výsledky již provedených prací na Univerzitě Tomáše Bati (bakalářská práce S. Krajčířikové), stejně jako výsledky výzkumu Lu a kol., (2019), kteří se zabývali biodegradací polyaromatických uhlovodíků (PAU), nebo výzkumu Chen a kol. (2019) - biodegradace fenolu.

Degradace PAU rodem *Achromobacter* byla studována vícero odborníky. Například Deng a kol. (2014) doložili rozklad anthracenu, fenanthrenu i pyrenu jak v půdním, tak i vodním prostředí.



Obr. 2: Anthracen, $C_{14}H_{10}$ Obr. 3: Fenanthren, $C_{14}H_{10}$ Obr. 4: Pyren, $C_{16}H_{10}$

Achromobacter denitrificans dokáže dle výsledků práce Pradeepa a kol. (2014) degradovat i složitější látky, jako di-(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP) a to do 96 hodin.



Obr. 5: molekulární struktura DEHP, $C_{24}H_{38}O_4$

4.2 *Phenylobacterium* sp. Dr2

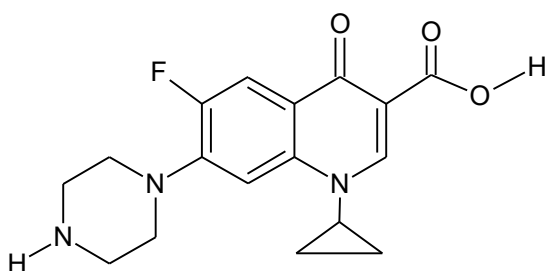
Rod *Phenylobacterium* řadíme do kmene Proteobacteria, třídy Alphaproteobacteria, řádu Caulobacterales, čeledi Caulobacteraceae (NCBI, 2017).

Jsou to aerobní nebo fakultativně anaerobní, gram-negativní tyčky až koky se zaoblenými konci. Růst mohou jednotlivě i ve shlicích pouze v prostředí s nižší koncentrací NaCl (1-2%), přičemž teplotou růstu je rozmezí od 5° do 30°C (Novotná, 2017). Tento rod byl izolován z půdního i vodního prostředí (Kanso, 2004).

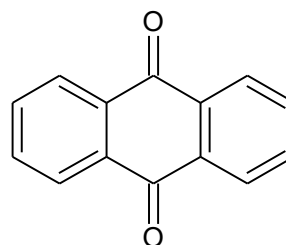
4.2.1 Degradční vlastnosti

Bakterie rodu *Phenylobacterium* jsou schopny degradace některých syntetických látek, jak dokazuje Liao a kol. (2016), kteří se zabývali degradací ciprofloxacinu (široce rozšířené antibiotikum, zanechávající problémová rezidua ve vodách). Rogers a kol., (2015) ve svém

výzkumu také potvrdili degradaci anthraquinonu, patřícího mezi oxygenované polyaromatické uhlovodíky.

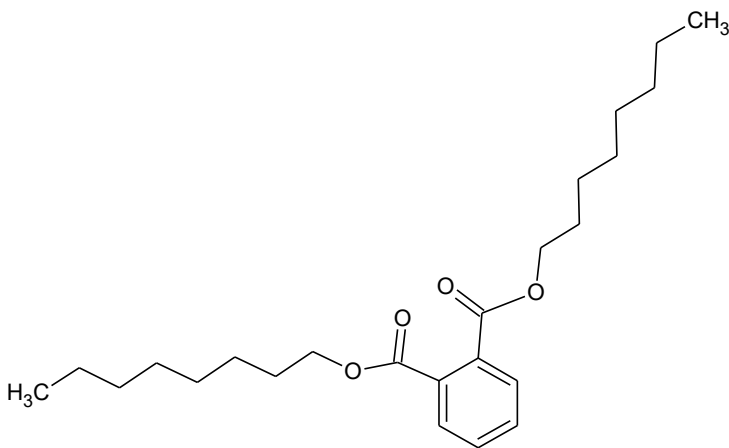


Obr. 6: Ciprofloxacin, $C_{17}H_{18}FN_3O_3$

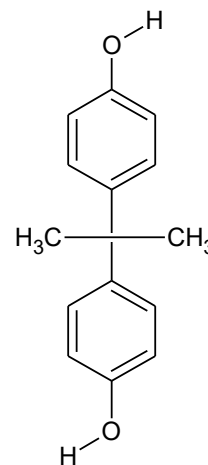


Obr. 7: Anthraquinon, $C_{14}H_8O_2$

Chen a kol. (2017), kteří se zabývali degradací di-n-oktylfthalátu (DOP), člena esterů kyseliny ftalátové, identifikovali *Phenylobacterium* sp. jako nejslibnější rod pro bioremediaci prostředí znečištěných touto látkou. Xiong a kol. (2017) zjistili zvýšenou přítomnost rodu *Phenylobacterium*, při degradaci bisfenolu A (BPA) mikrobiálním konsorciem. Zvýšená početnost rodu v konsorciu se však projevila v 7. týdnu inkubace a nemohl tudíž tuto biodegradaci započít.



Obr. 8: Di-n-oktylfthalát, $C_{24}H_{38}O_4$



Obr. 9: Bisfenol A, $C_{15}H_{16}O_2$

Z prací prováděných na Univerzitě Tomáše Bati bylo zjištěno, že *Phenylobacterium* sp. Dr2 se do rozkladu NOP zapojuje jako primární degradér. Z dosavadních poznatků však není ale zřejmé, jak tento proces probíhá dále a zda přispívá k rozkladu pyrrolidonové části molekuly.

Jak již bylo uvedeno, z půdního prostředí byly izolovány rovněž 2 kultury schopné společného rozkladu NOP, které byly označeny jako JU3 a JU4. Po sekvenaci části genu 16S rRNA byla v průběhu září 2019 kultura JU3 identifikována jako *Arthrobacter humicola* (s pravděpodobností 99,69 %) nebo jako *Arthrobacter oryzae* (99,61 %) a kultura JU4 jako *Phenylobacterium* sp. (J. Růžicka, osobní sdělení).

4.3 *Arthrobacter* sp. JU3

Rod *Arthrobacter* řadíme do kmene Terrabacteria, třídy Actinobacteria, řádu Micrococcales, čeledi Micrococcaceae (NCBI, 2017).

Rod *Arthrobacter* jsou typickými představiteli půdní mikrobioty, tvoří 50-60 % z celkového počtu bakterií, aktivně se podílí na zvyšování úrodnosti půdy a jejich četnost v půdě klesá se vzrůstající aciditou (Jones a Keddle, 1992, Puntus a kol., 2017).

Rod *Arthrobacter* jsou grampozitivní, obligátně aerobní mikroorganismy.

Vytváří bílé, krémově nebo žlutě pigmentované kolonie, které mají v průměru 3 – 5 mm, přičemž významným morfologickým znakem je střídání forem (kok a tyčka) během růstového cyklu. Stacionární fáze trvá 2 až 7 dnů a v jejím průběhu se vytváří koky. V exponenciální fázi se po přenesení do čerstvého komplexního média tvoří nepravidelné tyčky, které mohou být uspořádány do tvaru V naznačující primární větvení, přičemž ale pravé mycelium nevytvářejí. Během růstového cyklu se tyčky postupně mění na formu koků.

Optimální teplotou pro růst je 25-30 °C u běžně se vyskytujících druhů. Obligátně psychrofilní druhy tolerují i teplotu od –5 do 20 °C (Jones a Keddle, 1992).

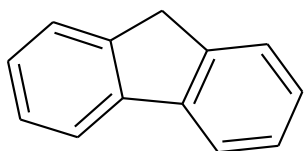
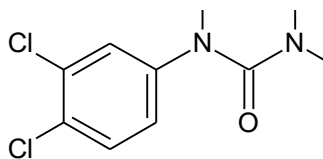
Pro zástupce tohoto rodu je také charakteristická schopnost využívat řadu látek jako zdroj výživy. Jedná se o extrémně konkurenční organizmus s rezistencí k vysychání a hladovění (Turnbull a kol., 2001).

4.3.1 Degradční vlastnosti

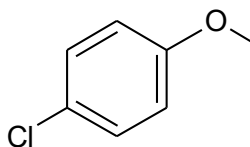
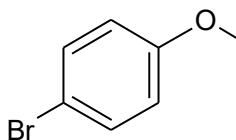
Zástupci rodu *Arthrobacter* jsou schopni degradace herbicidů a pesticidů, produkce fytohormonů a fixace dusíku (Jones a Keddle, 1992).

Casellas a kol. (1997) prokázali degradaci fluorenů (barvivo, prekursor léčiv) a jejich derivátů.

Tixier a kol. (2002) ve své práci popsali schopnost rodu *Arthrobacter* degradovat fenylmočovinné herbicidy (diuron, chlorotoluron), které se vyznačují perzistencí v půdě, kde se mohou kumulovat i po několik let.

Obr. 10: Fluoren, $C_{13}H_{10}$ Obr. 11: Diuron, $C_9H_{10}Cl_2N_2O$

Westerberg a kol. (2000) izolovali z půdy zástupce rodu *Arthrobacter*, který byl schopen růst i v přítomnosti vysokých koncentrací 4-chlorofenolu a stejně tak byl schopen degradovat i jiné fenoly jako např. 4-bromfenol a 4-fluorofenol.

Obr. 12: 4-chlorofenol, C_6H_4ClO Obr. 13: 4-bromofenol, C_6H_4BrO

4.3.2 *Arthrobacter humicola* a *Arthrobacter oryzae*

Oba druhy mají velmi podobné vlastnosti, ať již optimální pH, teplotu růstu, či vzhled.

Jsou to grampozitivní, aerobní bakterie, pohyblivé díky bičíkům. Na YD agaru jsou kolonie krémově zbarveny. Růst na YD agaru při počátečních hodnotách pH mezi 6 - 11 (*A. oryzae*) a 6 -10 (*A. humicola*) a při teplotách mezi 4 až 34 ° C (Kageyama a kol., 2008).

4.4 *Phenylobacterium* sp. JU4

Rod *Phenylobacterium* již byl charakterizován výše (viz kap. 4.2), nicméně dle sekvence části genu pro 16S rRNA je kultura JU4 nejbližší druhu *Phenylobacterium haematophilum* (s pravděpodobností 97,82 %) nebo *Phenylobacterium koreense* (97,2 %) či *Phenylobacterium mobile* (97,2 %).

5 CHARAKTERIZACE TESTOVANÝCH LÁTEK

V rámci experimentů byl testován růst zkoumaných kultur na různých uhlovodících a dalších látkách.

5.1 Nasycené alifatické uhlovodíky

Jako první se růst vybraných kultur testoval na skupině nasycených alifatických uhlovodíků (alkanů). Alkany mají otevřený řetězec s jednoduchými vazbami mezi atomy uhlíku. Stejně jako další organické látky tvoří řadu sloučenin podobných vlastností, lišících se homologickým rozdílem sousedních členů (Pečová, 2002).

Uhlovodíky jsou jednou z nejčastějších znečišťujících látek, které se akumulují v půdním prostředí v důsledku antropogenních činností a které mohou mít škodlivé účinky. Negativní vliv mohou mít na lidské zdraví, ale také mohou vyvolat změny biologických a fyzikálně-chemických vlastností půdy, jako je změna mikrobiální populace, aktivity půdních enzymů, či schopnost zadržovat vodu (Govarathan a kol., 2017).

Fyzikální vlastnosti uhlovodíků jsou hlavní překážkou při zpracování jejich odpadů, protože tyto sloučeniny jsou vysoce hydrofobní, chemicky inertní a některé jsou těkavé (Leahy a Colwell, 1990). Různé fyzikálně-chemické metody, jako je použití adsorbentů a následný sběr, nebo dispergování ropných látek ve vodních sloupcích pomocí povrchově aktivních látek, anebo přímé spalování (EPA, 2001) jsou drahé a případně škodlivé pro životní prostředí.

Mikroorganismy vyvinuly různé strategie, například sekreci biologicky povrchově aktivních látek, které napomáhají snadné solubilizaci uhlovodíků (Kang a kol., 2010).

Na experimenty byly vybrány kapalné alkany blízké oktanu, jehož utilizace kulturou *Phenyllobacterium* sp. Dr2 byla již prokázána, a to: hexan, dekan, dodekan, tetradekan a hexadekan, které jsou podstatnou součástí ropy a některých ropných produktů.

5.1.1 Hexan

Hexan je nerozvětvený alkan obsahující šest atomů uhlíku. Je to bezbarvá kapalina s nepříjemným zápachem, která je vysoce hořlavá, a jejíž páry mohou být výbušné. Hexan, reprezentativní organická těkavá kapalina (VOC), má charakter nepolárního rozpouštědla a neurotoxinu (PubChem, 2019).

Čistý n-hexan se používá v laboratořích. Většina průmyslových výrobků obsahující n-hexan, je směsí látek podobného charakteru a tvoří rozpouštědla pro extrakci. Hexan je také součástí mnoha spotřebních výrobků jako je benzín, rychle schnoucí lepidla a pryžový cement (PubChem, 2019). Velké množství hexanu se do životního prostředí uvolňuje především z chemických továren (Spigno a De Faveri 2005).

Předchozí studie De Carvalho (2004) prokázali, že hexan je pro mnohé bakteriální druhy toxičtější než jiná rozpouštědla.

Degradace hexanu bakteriemi je relativně pomalá kvůli jeho nízké rozpustnosti a je známo jen několik málo mikroorganismů, které jsou jeho degradace schopny (Lee, 2010).

5.1.2 Oktan

Oktan je alkan s přímým řetězcem obsahující osm atomů uhlíku. Má roli xenobiotika. N-oktan je bezbarvá kapalina se zápachem benzínu, která je nerozpustná ve vodě a vytvářející dráždivé páry.

Oktan je velmi důležitou součástí benzínu. V průmyslovém odvětví je oktan nejčastěji součástí rafinovaných ropných produktů, dále pak výrobních strojů, barviv i hraček (PubChem, 2019).

Jeho biodegradační vlastnosti jsou popisovány a zkoumány především jako složky benzínu, a ne jako čisté látky (Lee, 2010).

5.1.3 Dekan

Dekan je alkan s přímým řetězcem s deseti atomy uhlíku.

N-dekan se jeví jako bezbarvá kapalina, bez zápachu, která je méně hustá než voda s nízkou rozpustností ve vodě. Páry jsou těžší než vzduch a ve vysokých koncentracích mohou být omamně.

Přírozně se vyskytuje v sopečném kouři, ropě a zemním plynu. Dále jej ve stopovém množství můžeme nalézt v potravinách, kde se vyskytuje přírozně. Ve zvýšeném množství jej ale obsahují ryby a měkkýši, z důvodu bioakumulace v potravním řetězci. Dekan je především důležitá komerční chemikálie, který se používá se k výrobě chemikálií, např. chemikálie pro rozpouštědla a pro výzkum tryskového paliva. Je součástí motorového paliva.

Pokud se n-dekan uvolní do životního prostředí, zůstane ve vzduchu, dokud se mokrou depozicí nedostane na povrch země a dál do půdy či vodních toků. Není znám rozklad světlem (PubChem, 2019).

Biodegradace dekanu je známa u hub např. *Penicillium* sp. (Govarthanan a kol., 2017) i bakterií např. *Rhodococcus* sp., *Gordonia* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. (Puntus a kol., 2017).

5.1.4 Dodekan

Dodekan je alkan s přímým řetězcem s dvanácti atomy uhlíku.

N-dodekan je bezbarvá kapalina a je téměř nerozpustný ve vodě. Vyskytuje se v parafínové frakci ropy.

Dodekan je důležitá komerční chemikálie. Dodekan je součástí benzínu a používá se jako rozpouštědlo, ve výzkumu tryskového paliva a v gumárenském a papírenském průmyslu. Obecně se vyskytuje v benzínových výparech a výfukových plynech, ale i v kouři nedokonalého spalování dřeva (PubChem, 2019).

Biodegradace dodekanu byla prokázána např. u *Klebsiella pneumoniae*, *Yarrowia lipolytica* (Ozyurek, 2017).

5.1.5 Tetradekan

Tetradekan je alkan s přímým řetězcem se čtrnácti atomy uhlíku.

N-tetradekan je bezbarvá kapalina a je téměř ne rozpustný ve vodě. Přirozeně se vyskytuje v ropě, ale také v cizrně, nektarinkách, či koření. Má roli rostlinného metabolitu a těkavé olejové složky.

Tetradekan je důležitá komerční chemikálie používaná k výrobě jiných chemikálií. Používá se jako rozpouštědlo, součást tryskového paliva a je součástí některých pesticidních sprejů v domácnosti (PubChem, 2020).

Biodegradace tetradekanu (za méně než 35 dnů) byla prokázána např. u *Klebsiella pneumoniae* (Ozyurek, 2017).

5.1.6 Hexadekan

Hexadekan je alkan s přímým řetězcem se šestnácti atomy uhlíku. Má roli rostlinného metabolitu, těkavé olejové složky a nepolárního rozpouštědla.

Hexadekan je bezbarvá kapalina bez zápachu a je prakticky nerozpustný ve vodě. Přirozeně se vyskytuje v mnoha jedlých rostlinách, v ropě, ve vodě a ve tkáních různých ryb a zvířat. Hexadekan byl detekován v kouři marihuany a v kouři z nedokonalého spalování dřeva.

Hexadekan se používá jako rozpouštědlo a složka benzínu a nafty. Používá se také k výrobě jiných chemikálií a je součástí pesticidních prostředků (PubChem, 2019).

Biodegradace hexadekanu byla prokázána např. u *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Gordonia* sp. (Puntus a kol., 2017).

5.2 Pyrrolidon a jeho deriváty

Růstové vlastnosti zkoumaných kultur byly dále testovány na pyrrolidonu, pro jeho přítomnost v NOP.

Pyrrolidon patří mezi pětičlenné heterocyklické sloučeniny a je odvozen od pyrrolu. Pyrrol je toxická bezbarvá kapalina s narkotickými účinky na nervovou soustavu. Pyrrolové jádro obsahují mnohé biologické látky, jako hemoglobin, chlorofyl či vitamín B12. Při úplné katalytické hydrogenaci vzniká pyrrolidin a jeho následnou oxidací pyrrolidon (Pečová, 2002).

2-pyrrolidon (PYR), N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) a N-ethyl-2-pyrrolidon (NEP) jsou univerzální organická rozpouštědla se širokým spektrem využití pro různé průmyslové aplikace. Využití nacházejí při výrobě textilu, elektroniky a farmaceutických výrobků. Dále se používají také jako rozpouštědla nebo pomocná rozpouštědla při výrobě pesticidů (Li a kol., 2017).

5.2.1 Pyrrolidon

Pyrrolidin-2-on je nejjednodušší člen γ -laktamů, sestávající z pyrrolidinu, ve kterém jsou vodíky nahrazeny oxo-skupinou.

Pyrrolidon je bezbarvá kapalina mísitelná s vodou i většinou organických rozpouštědel.

Má roli polárního rozpouštědla a metabolitu.

Důležitý je jako meziprodukt při výrobě N – vinyl-2-pyrrolidonu (průmyslově používané ředidlo) a piracetamu (doplňky pro zlepšení funkcí mozku). Pyrrolidon je součástí náplní v inkoustových tiskárnách, elektroniky či hygienických přípravků (PubChem, 2020).

5.2.2 N-methyl-pyrrolidon (NMP)

N-methylpyrrolidin-2-on je laktam a je členem skupiny pyrrolidonů. Je to pyrrolidon, ve kterém je vodík vázaný k dusíku nahrazen methylovou skupinou.

N-methyl-2-pyrrolidon se jeví jako čirá bezbarvá kapalina s „rybím“ zápachem. NMP má harmonizovanou klasifikaci jako toxický pro reprodukci (kategorie 1B) a také dráždí oči, dýchací cesty a kůži (PubChem, 2020).

Ve srovnání s jinými toxickými organickými rozpouštědly, např. chlorovanými uhlovodíky, má NMP vysoké extrakční a regenerační výtěžky, stejně jako relativně nízké dopady na životní prostředí (Loh a kol., 2018).

Má roli polárního rozpouštědla. NMP se široce používá při výrobě elektroniky, ropných produktů, léčiv, a jiné speciální chemikálie. Také je součástí barev, ředidel či lepidel (EPA, 2018).

Biodegradace NMP byla prokázána u *Alicyclophilus* sp. (Oceguera-Cervantes a kol. 2007), nebo u *Pseudomonas* sp., *Paracoccus* sp., *Acinetobacter* sp. nebo *Rhodococcus* sp. (Křížek a kol., 2015).

5.2.3 N-ethyl-pyrrolidon (NEP)

N-ethyl-2-pyrrolidon je také členem skupiny pyrrolidonů, a vodík vázaný k dusíku je zde nahrazen ethylovou skupinou.

NEP je bezbarvá až nažloutlá kapalina s charakteristickým zápachem.

N-ethyl-2-pyrrolidon je průmyslový produkt, chemická látka, která se používá jako rozpouštědlo, katalyzátor a povrchově aktivní látka. Byl navržen jako náhrada za strukturální analog N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) v mnoha oblastech použití, včetně nátěrového průmyslu a čištění kovů, skla a plastů (Saillenfait a kol., 2016).

6 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo srovnání vlastností bakterií, podílejících se na rozkladu NOP, získaných z různých prostředí. Dílčí cíle práce:

- charakterizace zjištěných rodů bakterií a jejich biodegradačních procesů (řešeršní část)
- růstové pokusy s kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 na alifatických uhlovodících (zjistit případnou podobnost jejich rozkladných vlastností)
- růstové pokusy s kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 na aromatických uhlovodících (zjistit případnou podobnost jejich rozkladných vlastností)
- růstové pokusy s kulturou *Arthrobacter* sp. JU3 a *Phenylobacterium* sp. JU4 na pyrrolidonu a jeho derivátech (zjistit případnou podobnost jejich rozkladných vlastností s vlastnostmi *Achromobacter* sp. Dr1)
- růstové pokusy s kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 v bezdusíkatém prostředí
- příprava vzorků pro případnou chemickou analýzu metabolitů, vznikajících po rozkladu NOP kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4
- porovnání sledovaných rodů v jejich účincích

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 MATERIÁL A METODY

7.1 Příprava médií a fyziologického roztoku

7.1.1 Příprava tekutého minerálního média (MM) a fyziologického roztoku

Tab. 3: Složení MM pro 100 ml.

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

¹ Roztok stopových prvků:

0,043 g $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,057 g H_3BO_3 ; 0,043 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,037 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,025 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,040 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; látky rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

Po přípravě byla ověřena hodnota pH (7,42) a následně bylo medium vysterilizováno v mikrovlnném autoklávu při teplotě 135 °C a zchlazeno.

Příprava fyziologického roztoku pro 100ml:

NaCl0,9 g

Destilovaná voda.....100 ml

7.1.2 Příprava tekutého minerálního média bez dusíku (MMNF)

Tab. 4: Složení MMNF pro 100 ml.

Látka	Množství
Destilovaná voda	85 ml
Roztok A (9,07 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{l}$)	2 ml
Roztok B (23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}/\text{l}$)	8 ml
Roztok stopových prvků ¹	0,04 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l)	1 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,2 g/l)	1 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l)	1 ml
NaCl (10 g/l)	1 ml

7.1.3 Příprava bezdusíkatého roztoku stopových prvků

Tab. 5: Složení bezdusíkatého roztoku stopových prvků.

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,031 g
H_3BO_3	0,057 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,043 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,051 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,021 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;	0,040 g

7.2 Experimentální postupy

7.2.1 Utilizace oktanu, fenolu, toluenu a hexadekanu kulturami *Arthrobacter* sp.

JU3, *Phenylobacterium* sp. JU4, *Achromobacter* sp. Dr1 a *Phenylobacterium* sp. Dr2 individuálně

Kultury *Arthrobacter* sp. JU3 a *Phenylobacterium* sp. JU4, pocházející z diplomové práce Ing. Jaroslava Urbana a kultury *Achromobacter* Dr1 a *Phenylobacterium* DRr2, pocházející z bakalářské práce Ing. Zlaty Novotné, byly vyočkovány na petriho misky s R2A agarem. Po nárůstu na petriho miskách byla z kultur připravena suspenze ve fyziologickém roztoku. Tekuté minerální medium bylo obohaceno o roztok MEM vitamínů (koncentrace 1 µl roztoku MEM/1 ml MM; pro zlepšení podmínek růstu kultur).

- i) Z 18-ti sterilních vialek s 5 ml MM bylo 9 vialek naočkováno 10 µl suspenze *Arthrobacter* sp. JU3 a 9 vialek 10 µl suspenze *Phenylobacterium* sp. JU4.
- ii) Ze 14-ti dalších sterilních vialek bylo do 7 zaočkováno 10 µl suspenze *Achromobacter* sp. Dr1 a do zbylých 7 vialek 10 µl suspenze *Phenylobacterium* sp. Dr2.

Následně bylo do dvou vialek od každé kultury rozpipetováno 1,5 µl oktanu, 25 µl sterilního roztoku fenolu (koncentrace 5 g/l), 1,5 µl toluenu a 1,5 µl hexadekanu.

Využití oktanu se při měření s kulturami *Achromobacter* sp. Dr1 a *Phenylobacterium* sp. Dr2 neprovádělo z důvodu potvrzení signifikantního růstu *Phenylobacterium* a neschopnosti růstu *Achromobacter* v DP Ing. Zlaty Novotné.

Vialky, uzavřené sterilním plynotěsným septem, byly staticky kultivovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 14 dnů.

V rámci tohoto experimentu bylo rovněž provedeno ověření růstu kultury JU3 na jednoduchých zdrojích uhlíku.

Do dvou sterilních vialek bylo asepticky přidáno 5 ml tekutého minerálního media. Tyto vialky poté byly zaočkovány 10 µl suspenze *Arthrobacter* sp. JU3 a následně bylo do obou vialek přidáno 15 µl sterilního roztoku glycerolu (koncentrace 50 g/l) a 15 µl sterilního roztoku oktanu (koncentrace 50 g/l).

Vialky byly následně uzavřeny sterilním plynotěsným septem a staticky kultivovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 14 dnů.

Ověření růstu (všech kultur) poté bylo prováděno i při všech dalších testech, z důvodu vyloučení falešně negativních výsledků.

7.2.2 Utilizace hexanu kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4

Z kultur *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 byly připraveny suspenze ve fyziologickém roztoku. MM s přidavkem MEM vitamínů bylo asepticky rozplněno do 4 sterilních vialek po 5 ml. Do 2 vialek bylo naočkováno 10 µl suspenze *Phenylobacterium* sp. Dr2 a do 2 zbylých 10 µl kultury *Phenylobacterium* sp. JU4. Následně byly do všech vialek přidány 2 µl hexanu a poté uzavřeny sterilním plynotěsným septem.

Vialky byly staticky kultivovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 14 dnů.

7.2.3 Utilizace dekanu kulturami *Achromobacter* sp. Dr1, *Phenylobacterium* sp. Dr2, *Arthrobacter* sp. JU3 a *Phenylobacterium* sp. JU4

Z kultur byly připraveny suspenze ve fyziologickém roztoku. MM s přidavkem MEM vitamínů bylo asepticky rozplněno do 6 sterilních vialek po 5 ml a do dvou sterilních lahví po 10 ml. Do 3 vialek bylo naočkováno 10 µl suspenze *Phenylobacterium* sp. Dr2 a do 3 zbylých 10 µl suspenze *Phenylobacterium* sp. JU4. Do jedné sterilní láhve bylo naočkováno 20 µl suspenze *Achromobacter* sp. Dr1 a do druhé 20 µl *Arthrobacter* sp. JU3. Následně bylo do 4 vialek přidáno 1,5 µl dekanu a poté uzavřeny sterilním plynotěsným septem. 2 vialky byly ponechány jako kontrolní bez přidavku dekanu. Do obou sterilních lahví bylo napipetováno 3 µl dekanu.

Vialky a láhve byly staticky kultivovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 14 dnů.

7.2.4 Utilizace dodekanu a tetradekanu kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 individuálně

Z kultur byly připraveny velmi slabé suspenze ve fyziologickém roztoku. MM s přidavkem MEM vitamínů bylo asepticky rozplněno do 18ti sterilních zkumavek po 5 ml.

Čtyři zkumavky byly zaočkovány 20 µl kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2, nebo *Phenylobacterium* sp. JU4 a ponechány jako kontrolní.

Do zbývajících 14ti zkumavek bylo následně napipetováno:

- i) 1,5 µl oktanu (kontrola růstu kultur) do 4 zkumavek,
- ii) 1,5 µl dodekanu do 6ti zkumavek,
- iii) 1,5 µl tetradekanu do 4 zkumavek.

Dvě zkumavky s dodekanem byly ponechány bez inokula pro kontrolu.

Následně bylo do 2 zkumavek od každé látky naočkováno 20 µl kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2 a zbylé zkumavky 20 µl kultury *Phenylobacterium* sp. JU4.

Všechny zkumavky byly proměřeny na Densilometru a následně staticky kultivovány ve tmě po dobu 14 dnů při laboratorní teplotě.

Po 3 dnech kultivace byly vzorky vizuálně zkontrolovány a všechny se jeví bez nárůstu. Pro lepší růst bylo do každé zkumavky přidáno 4,5 µl dané látky. Výsledný poměr byl tedy 6 µl uhlovodíků/5 ml MM/ 20 µl inokula.

Vzorky byly proměřeny na Densilometru po 7 a 14ti dnech kultivace.

7.2.5 Utilizace pyrrolidonu (PYR), N-methyl pyrrolidonu (NMP) a N-ethyl pyrrolidonu (NEP) kulturou *Arthrobacter* sp. JU3 a konsorciem JU3+JU4

Z kultur byly připraveny suspenze ve fyziologickém roztoku. MM s přídatkem MEM vitamínů bylo asepticky rozplněno do 14 sterilních vialek po 5 ml. Ze 14-ti sterilních vialek bylo do 7 zaočkováno 10 µl suspenze *Arthrobacter* sp. JU3 a do zbylých 7 vialek 10 µl konsorciální suspenze JU3+JU4.

Dvě vialky byly ponechány jako kontrolní bez přídatku dalších látek.

Následně bylo do dvou vialek od každé kultury rozpipetováno 50 µl sterilního roztoku PYR (koncentrace 15 g/l), nebo 50 µl sterilního roztoku NMP (konc. 15 g/l), nebo 7,5 µl sterilního roztoku NEP (konc. 100 g/l).

Využití těchto látek se s kulturami *Achromobacter* sp. Dr1 a *Phenylobacterium* sp. Dr2 neprovádělo z důvodu negativních výsledků růstu těchto kultur v BP Sabiny Krajčířikové.

Vialky, uzavřeny sterilním plynotěsným septem, byly staticky kultivovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 14 dnů.

7.2.6 Sekvenční biodegradace NOP kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Arthrobacter* sp. JU3

Z kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2 byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku. Do odměrné láhve se 100 ml MM s přídavkem MEM vitamínů bylo asepticky napipetováno 13,5 μ l NOP a poté zaočkováno 10 μ l suspenze *Phenylobacterium* sp. Dr2. Odměrná láhev byla kultivována na třepačce, ve tmě, po dobu 14 dnů ($t = 25^\circ\text{C}$). V této době kultura *Phenylobacterium* započala rozklad NOP (potvrzeno mírným zákalem).

Po 14-ti denní kultivaci byl vzorek přefiltrován přes sterilní filtr Ahlstrom s velikostí pórů 0,22 μm do sterilní láhve. Filtrací bylo získáno 90 ml původního vzorku. Supernatant byl doplněn 3 ml sterilního MM s přídavkem MEM vitamínů (100 μ l) a poté rozplněn po 15 ml do 6-ti sterilních falkonek pro bioreaktory RTS-1. Tři falkonky byly zaočkovány 15 μ l suspenze *Arthrobacter* sp. JU3 a zbylé 15 μ l suspenze *Achromobacter* sp. Dr1. Falkonky byly následně umístěny do bioreaktorů „Záznamník růstu mikrobiálních buněk“ (RTS-1, LaboServ) při teplotě 25°C s režimem 500 RPM, změna spinu po 1 minutě. Měření optické hustoty ($\lambda = 800\text{nm}$) probíhalo každých 30 minut po dobu 10 dnů.

Zbylý přefiltrovaný supernatant byl uschován ve sterilní zkumavce mrazáku pro pozdější stanovení DOC.

Po 10 dnech kultivace, kdy růst nebyl prokázán, byly suspenze přefiltrovány do sterilní zkumavky přes filtr 0,45 μm pro pozdější stanovení hodnoty DOC (automatický analyzátor Shimadzu). Ředění 1:1.

7.2.7 Růst kultur *Arthrobacter* sp. JU3 a *Achromobacter* sp. Dr1 na metabolitech po primární biodegradaci NOP kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 nebo *Phenylobacterium* sp. JU4

Z kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 byla připravena suspenze ve fyziologickém roztoku. Bylo připraveno 6 láhví s 50 ml sterilního MM a sterilní MM s NOP (koncentrace 680 mg/l). Do každé odměrné láhve se 50 ml MM s přídavkem MEM vitamínů bylo asepticky napipetováno 10 ml MM s NOP (výsledná koncentrace NOP cca 115 mg/l). Poté byly dvě láhve zaočkovány 60 μ l suspenze *Phenylobacterium* sp. Dr2, další dvě suspenzí *Phenylobacterium* sp. JU4 a dvě láhve zůstaly nezaočkovány pro kontrolu.

Právě z těchto nezaočkovaných láhví bylo odebráno po 11 ml, provedena filtrace přes filtr značky Ahlstrom a úschova v mrazáku pro pozdější stanovení DOC (=vstupní hodnota DOC, před primární biodegradací).

Láhve byly kultivovány na třepačce při 25°C ve tmě po dobu 6ti dnů.

Po 6ti dnech byly připraveny 4 nové lahve s 3 ml sterilního MM s přídavkem MEM vitamínů. Do každé lahve byl přefiltrován skoro celý objem jedné z předchozích lahví. Z každé lahve bylo asepticky odebráno 10 ml pro pozdější stanovení DOC. Poté byla jedna láhev s přefiltrovaným vzorkem kultury Dr2 a jedna láhev s přefiltrovaným vzorkem kultury JU4 zaočkována 30 µl suspenze *Achromobacter* sp. Dr1. Zbylé dvě lahve 30 µl suspenze kultury *Arthrobacter* sp. JU3.

Láhve byly inkubovány na třepačce při teplotě 25°C. Po 4, 7 a 11 dnech bylo ze zaočkovaných vzorků asepticky odebráno 10 ml, které byly přefiltrovány do sterilní zkumavky přes filtr 0,45 µm a uloženy do mrazáku pro pozdější stanovení hodnoty DOC.

Při ukončení pokusu (11. den) byly odebrány i slepé vzorky, které byly inkubovány při 25°C ve tmě bez inokula.

7.2.8 Utilizace NOP kulturami *Phenylobacterium* sp. JU4 a *Phenylobacterium* sp. Dr2 individuálně bez externího zdroje dusíku

I. Část

Bylo připraveno 200 ml MMNF. Následně bylo 100 ml odděleno a byl přidán 1 ml NH₄Cl (30 g/l), čímž vzniklo 100 ml MM a následně byla obě média sterilizována.

Z kultur byly připraveny suspenze ve fyziologickém roztoku.

Do 2 sterilních zkumavek bylo odpipetováno po 5 ml MMNF a do dalších 2 zkumavek po 5 ml MM. Do zbývajících 90 ml každého média bylo přidáno 12 µl NOP (výsledná koncentrace NOP 122 mg/l). Z těchto médií s přídavkem NOP bylo odpipetováno 5 ml do 4 sterilních zkumavek.

Každá z 8 zkumavek byla zaočkována 5 µl kultury *Phenylobacterium* sp. JU4 nebo *Phenylobacterium* sp. Dr2.

Pro každou kulturu byly připraveny 2 mikrotitrační destičky (MTD), do kterých bylo pipetováno 200 μ l MM (bez substrátu NOP), 200 μ l MM (se substrátem), 200 μ l MMNF (bez substrátu) a 200 μ l MMNF (se substrátem) do sloupce 1, 4, 9 a 12, aby byl vyloučen přenos látek mezi jamkami.

Destičky byly staticky kultivovány po dobu 14 dnů při laboratorní teplotě a průběžně proměřovány při $\lambda=600$ nm na destičkovém spektrofotometru TECAN (Sunrise Microplate Reader).

II. Část

Po ukončení první části pokusu bylo pokračováno s druhou částí, ve které byl při přípravě MMNF (1000 ml) použit bezdusíkatý roztok stopových prvků (2 ml, tab. 5) a byla snížena koncentrace použité mikrobiální suspenze.

Připravené MMNF bylo rozděleno do sterilních láhví na 170 ml a dvakrát 400 ml. Do jedné 400 ml dávky bylo přidáno 4 ml sterilního roztoku NH_4Cl (koncentrace 30 g/l), čímž vzniklo MM. Do druhé 400 ml dávky byly přidány 4 ml destilované vody. Do 14ti sterilních láhví (o objemu 250 ml) bylo do 7 rozděleno MM po 55 ml, do dalších 7 po 55 ml MMNF. Následně bylo všech 15 láhví s médií sterilizováno.

Do láhve se 170 ml média bylo po sterilizaci a vychladnutí přidáno 130 μ l NOP (vznik koncentrace 650-700 mg/l). Po dokonalém rozpuštění NOP, bylo do všech 14ti sterilních láhví přidáno 10 ml tohoto roztoku (vznik koncentrace 100-108 mg/l).

Z kultur *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 byly připraveny velmi slabé suspenze ve fyziologickém roztoku. Suspenze byla proměřena na Densilometru a hodnota absorbance obou suspenzí byla 0,2.

Následně bylo těmito suspenzemi zaočkováno 12 láhví. Láhve s MM byly zaočkovány 20 μ l suspenze kultury Dr2 (3 láhve) nebo 20 μ l suspenze kultury JU4 (3 láhve). Láhve s MMNF byly zaočkovány stejně jako MM. Zbylé láhve byly ponechány bez zaočkování jako kontroly.

Z obou nezaočkovýchých láhví bylo asepticky odebráno 10 ml, přičemž 9,2 ml bylo přefiltrováno přes filtr 0,45 μ m a uschováno v mrazáku pro pozdější stanovení DOC. Ze zbylých 0,8 ml bylo napipetováno 200 μ l do 4 jamek mikrotitrační destičky a proměřeno na TECANu při $\lambda=600$ nm.

Všechny láhve byly následně kultivovány na třepačce po dobu 21 dnů při 25°C.

V průběhu pokusu bylo asepticky odebíráno 10 ml z každé série (pouze ze 2 paralelních láhví) pro stejné měření, které byly provedeny na začátku pokusu s nezaočkovanými láhvemi.

Odběry probíhaly 3., 5., 7., 14. a 21. den a při ukončení pokusu byly opět odebrány i vzorky z nezaočkovaných láhví. Taktéž byla na Petriho misky (s R2A agarem) sterilní hokejkou rozetřena suspenze z připraveného ředění vzorků 10^{-2} a 10^{-4} z lahví s MMNF a 10^{-4} a 10^{-6} vzorků z lahví s MM pro stanovení CFU a kontrolu čistoty kultivace. Misky byly kultivovány 6 dnů při teplotě 25°C.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Utilizace vybraných uhlovodíků

První experimenty byly věnovány ověření růstu kultur na vybraných uhlovodících. Experimenty byly prováděny ve sterilních vialkách v 5 ml MM s MEM vitamíny. Vzorky byly zaočkovány 10 µl suspenzemi kultur a 1,5 µl daného uhlovodíku. Vzorky byly staticky kultivovány při laboratorní teplotě a hodnocení probíhalo vizuální kontrolou po 14 dnech.

S aromatickými uhlovodíky (toluen, fenol) nebyl pozorován růst u žádné z kultur po čtrnáctidenní kultivaci. Stejně tak žádná z kultur nebyla schopna využít hexadekan. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6: Přehled utilizace vybraných alifatických uhlovodíků jednotlivými kulturami.

Kultura	Růst		
	pozitivní	negativní	neměřeno
<i>Achromobacter</i> sp. Dr1	-	C8, C10, C16	C6, C12, C14
<i>Phenyllobacterium</i> sp. Dr2	C8, C10, C12	C6, C14, C16	-
<i>Arthrobacter</i> sp. JU3	-	C8, C10, C16	C6, C12, C14
<i>Phenyllobacterium</i> sp. JU4	C8, C10, C12	C6, C14, C16	-

Jak je z tabulky patrné, kultury *Achromobacter* a *Arthrobacter* nebyly schopny využít žádného z vybraných uhlovodíků. Růst na hexanu, dodekanu a tetradekanu u těchto kultur nebyl ani testován z předpokladu neschopnosti využít. Lu a kol. (2019) však ve své práci prokázali u kultury *Achromobacter* růst na aromatických uhlovodících, což je zdánlivě v rozporu s touto prací. Ve svém pokusu ale použili mikrobiální konsorcium, odlišnou dobu kultivace (35 dnů x 14 dnů), a pravděpodobně i jiný druh (půdní bakterie ze znečištěné oblasti v provincii Jiangsu v Číně), a tak mohly nastat tyto rozdílné výsledky. Prokázali rovněž, že do degradace se *Achromobacter* zapojuje až po delší době kultivace. Puntus a kol. (2019) ve své práci pracovali s rodem *Arthrobacter* a jejich výsledky se shodují s touto prací. Růst na dekanu a hexadekanu rovněž nebyl prokázán, ale doložili schopnost rodu dlouho přežít při kultivaci v tekutém médiu. Růst na toluenu také prokázán nebyl. Ederer a kol. (1997) prokázali i degradaci fenolu rodem *Arthrobacter*. Tyto rozdílné výsledky vypovídají o velké variabilitě schopností rozkladu látek v rámci jednoho rodu.

Kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 byly dle očekávání schopny pro svůj růst využívat oktan, hexan se však i pro ně ukázal jako nevyužitelný. Ve zvyšujícím počtu uhlíků byly oba druhy rodu *Phenylobacterium* schopny využít dekan, ale hexadekan už ani jedna; bylo tedy zřejmé, že bylo nutno ještě ověřit růst těchto kultur na dodekanu a tetradekanu.

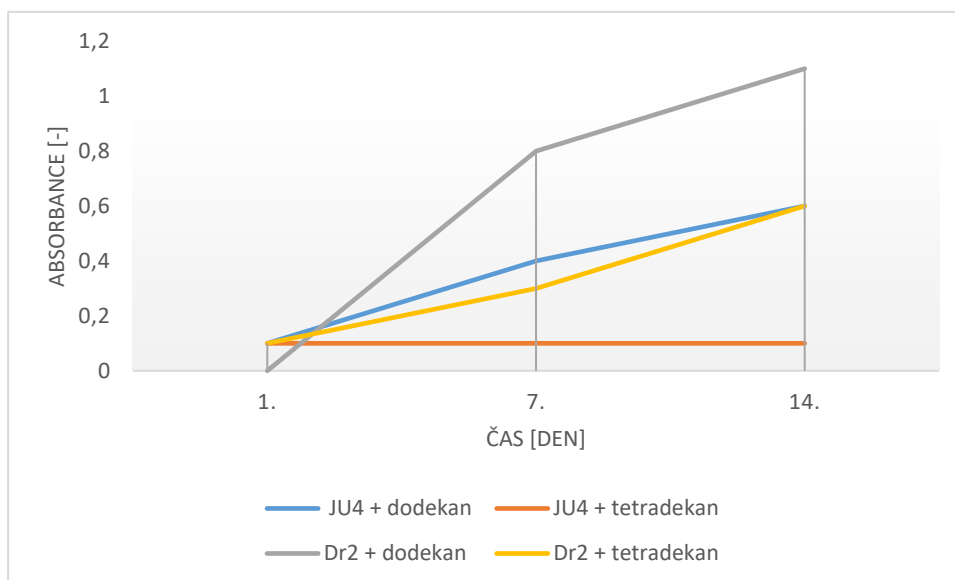
Pokusy s dodekanem a tetradekanem byly prováděny později a byla zvolena i densilametrická kontrola. V rámci pokusu byla testována také absorbance dodekanu v MM (s MEM) bez inokula. Na začátku pokusu byla naměřena hodnota absorbance 0,1, po 7 dnech 0,2 a na konci pokusu 0,0. Tyto hodnoty byly ve výsledcích měření (Tab.7) odečteny.

Obě kultury byly staticky kultivovány za laboratorní teploty i bez uhlovodíkového zdroje a dále také na oktanu. Po 14ti denní kultivaci byla u kultury *Phenylobacterium* sp. JU4 naměřena absorbance na oktanu 1,6 a u kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2 absorbance 2,4. U obou kultur bez uhlovodíkového zdroje byla absorbance 0,0.

Tab. 7: Měření utilizace dodekanu a tetradekanu na Densilamtru.

Kultura	Den	Absorbance			
		Dodekan	Tetradekan	Oktan	Bez zdroje
<i>Phenylobacterium</i> sp. JU4	1.	0,1	0,1	-	0,0
	7.	0,4	0,1	-	0,0
	14.	0,6	0,1	1,6	0,0
<i>Phenylobacterium</i> sp. Dr2	1.	0,0	0,1	-	0,0
	7.	0,8	0,3	-	0,0
	14.	1,1	0,6	2,4	0,0

- Neměřeno



Obr. 14: růst rodů *Phenylobacterium* zaznamenáván na densilametri.

Jak je z tabulky i grafu patrné, byl pozorován znatelný růst obou kultur na dodekanu, u kultury Dr2 téměř o polovinu výraznější než u JU4. U kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2 došlo již během prvního týdne k prudkému nárůstu zákalu, v průběhu druhého týdne se již růst zpomalil. U kultury *Phenylobacterium* sp. JU4 se růst zákalu po prvním týdne kultivace také zpomalil, celkově ale nedosáhl takových hodnot (a nárůstu) jako kultura Dr2. I z hodnot absorbance růstu na oktanu (1,6 JU4 a 2,4 Dr2) bylo možno pozorovat, že kultura JU4 je ve svém růstu vždy výrazněji pomalejší než kultura Dr2. Tyto výsledky svědčí o rozdílných růstových schopnostech obou kultur.

Utilizace tetradekanu byla pozorována pouze u kultury Dr2, přičemž nárůst zákalu byl poloviční oproti hodnotám s dodekanem. Pro ověření růstu byl experiment pro jistotu zaveden znova, tentokrát ve skleněných zkumavkách pro vyloučení vlivu plastových zkumavek.

Do MM s MEM vitamíny (5 ml) ve skleněných vialkách bylo přidáno 1,5 μ l tetradekanu. Tyto vialky byly zaočkovány 10 μ l kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2 nebo *Phenylobacterium* sp. JU4. Byly založeny i kontrolní vialky nezaočkované a kontrolní s oktanem.

Vzorky byly staticky kultivovány 21 dnů při laboratorní teplotě. Po celou dobu pokusu byly vzorky průběžně sledovány a na konci experimentu byly vzorky proměřeny na densilametri po přelití do sterilních zkumavek.

Tab. 8: Utilizace tetradekanu a oktanu – kontrolní pokus

Kultura	Absorbance		
	Tetradekan	Oktan	Bez zdroje
<i>Phenylobacterium</i> sp. JU4	0,0	1,3	0,0
<i>Phenylobacterium</i> sp. Dr2	0,0	1,1	0,0

U kontrolní vialky s oktanem a kulturou *Phenylobacterium* sp. Dr2 byla naměřena absorbance 1,1 a u kultury *Phenylobacterium* sp. JU4 absorbance 1,3 po 20 dnech kultivace. Vialky s tetradakanem byly všechny negativní, žádný zákal nebyl pozorován. Bylo tedy prokázáno, že obě kultury byly v pořádku a byly ověřeny jejich růstové schopnosti. Utilizace tetradekanu kulturami ale nebyla potvrzena.

8.2 Utilizace pyrrolidonu a jeho derivátů

Do 7 sterilních vialek s MM s MEM vitamíny (5 ml) bylo zaočkováno 10 µl suspenze *Achromobacter* sp. JU3 a do dalších 7 vialek 10 µl konsorciální suspenze JU3+JU4. Dvě vialky byly ponechány jako kontrolní bez přídavku dalších látek.

Následně bylo do dvou vialek od každé kultury rozpipetováno 50 µl sterilního roztoku PYR (koncentrace 15 g/l), nebo 50 µl sterilního roztoku NMP (konc. 15 g/l), nebo 7,5 µl sterilního roztoku NEP (konc. 100 g/l). Vzorky byly staticky kultivovány při laboratorní teplotě a hodnocení probíhalo vizuální kontrolou po 14 dnech.

Kultury *Achromobacter* sp. Dr1 a *Phenylobacterium* sp. Dr2 byly testovány již v BP Sabiny Krajčířikové, přičemž všechny výsledky byly negativní. Kultury byly testovány individuálně i v konsorciu.

Tab. 9: Utilizace pyrrolidonu a jeho derivátů.

Kultura/Konsorcium	Substrát		
	PYR	NEP	NMP
<i>Achromobacter</i> sp. Dr1	_*	_*	_*
<i>Phenylobacterium</i> sp. Dr2	_*	_*	_*
Konsorcium Dr1 + Dr2	_*	_*	_*
<i>Arthrobacter</i> sp. JU3	-	-	-
Konsorcium JU3 + JU4	-	-	-

+ Pozitivní nárůst, tj. využití substrátu jako jediného zdroje uhlíku a energie

- Negativní

- * Negativní růst prokázán v BP Krajčířikové

Dle získaných výsledků je zřejmé, že ani kultury *Arthrobacter* sp. JU3 a *Phenylobacterium* sp. JU4 neprokázaly růst na těchto látkách a zůstává tedy nezodpovězenou otázkou, jak dochází k rozkladu pyrrolidonového jádra v NOP.

Sumarizace všech utilizačních pokusů je pro přehlednost shrnuta v tabulce 10.

Tab. 10: Shrnutí utilizace vybraných látek jednotlivými kulturami.

Kultura	Substrát										
	Toluen	Fenol	PYR	NMP	NEP	C6	C8	C10	C12	C14	C16
Dr1	-	-	-	-	-	N	_*	-	N	N	-
Dr2	-	-	-	-	-	-	_*	+	+	-	-
JU3	-	-	-	-	-	N	-	-	N	N	-
JU4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-

+ Pozitivní nárůst, tj. využití substrátu jako jediného zdroje uhlíku a energie

- Negativní

_* Pozitivní nárůst prokázán v DP Novotné

-* Negativní nárůst prokázán v DP Novotné

N pokus neprováděn

Ze závěrů utilizace jednotlivých látek očividně vyplývá, že kultura *Achromobacter* sp. Dr1, stejně jako *Arthrobacter* sp. JU3 se do rozkladu NOP zapojují až po vzniku neznámého metabolitu, jelikož žádnou z testovaných látek nebyly schopny pro svůj růst využít. I ve výsledcích práce Yambuuchi a kol. (1998), Chen a kol. (2019) nebo Lu a kol. (2019) bylo prokázáno, že se rod *Achromobacter* zapojuje do degradačních procesů až sekundárně. Rod *Arthrobacter* poté lépe degraduje v mikrobiálním konsorciu než individuálně, jak bylo prokázáno práci Tixier a kol. (2002) a Deng a kol. (2014).

U kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 byla prokázána utilizace oktanu, dekanu a dodekanu. I přesto, že se dle sekvenace části genu 16S rRNA, jedná o stejný rod, byly znatelně pozorovány rozdíly v rychlosti jejich růstu. Celkově se kultura Dr2 očividně rychleji adaptuje na nové prostředí i uhlíkatý zdroj, a tím je její růst rychlejší a výraznější než růst kultury JU4.

8.3 Sekvenční biodegradace

I. kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Arthrobacter* sp. JU3

Cílem testu bylo zjistit, zda po primární biodegradaci NOP kulturou Dr2 bude biodegradace pokračovat kulturou *Arthrobacter* sp. JU3. Po 14ti denní kultivaci *Phenylobacterium* sp. Dr2 v MM (s MEM vitamíny) s NOP (koncentrace 123 mg/l) byl vytvořen mírný zákal, tudíž byl potvrzen nárůst kultury.

Veškerý objem média byl centrifugován při 5 000 g po dobu 10 minut při 10°C a po doplnění novým médiem a vitamíny rozdělen do 6ti sterilních falkonek po 15 ml. Falkonky byly zaočkovány 15 µl kultury *Achromobacter* sp. Dr1 nebo *Arthrobacter* sp. JU3 a následně byly umístěny do bioreaktorů RTS-1. Zbylý přefiltrovaný supernatant byl uschován v mrazáku pro pozdější stanovení DOC.

Měření optické denzity (dále jen OD) probíhalo po dobu 10 dnů a poté byl experiment z důvodu negativních výsledků ukončen. Suspenze byly poté přefiltrovány přes filtr 0,45 µm a byly stanoveny hodnoty DOC (Shimadzu).

Důsledkem výpadku elektrické energie byl pokus do 24 hodin od spuštění přerušen a následně obnoven o dva dny později.

Data měření OD vykazovaly minimální nárůst od počátku experimentu až do jeho konce a nebyla tak potvrzena utilizace metabolitů, vzniklých působením kultury Dr2. Minimální nárůst kultur Dr1 a JU3 ale mohl být způsoben i rychlým režimem, zvolenou vlnovou délkou ($\lambda=800\text{nm}$), či necitlivostí bioreaktorů k mírnému nárůstu z důvodu slabého matného zbarvení samotných falkonek.

Stanovení DOC bylo proto provedeno na všech vzorcích z bioreaktorů, a též u vzorku po primárním rozkladu NOP kulturou *Phenylobacterium* sp. Dr2. Právě u tohoto vzorku byla stanovena vstupní hodnota DOC 49,26 mg/l.

Tab. 11: Stanovení DOC – paralelní vzorky po 10 dnech kultivace

	<i>Arthrobacter</i> sp. JU3	<i>Achromobacter</i> sp. Dr1
DOC	50,82	23,00
[mg/l]	51,51	22,12
	51,06	21,51

Z naměřených hodnot (tabulka 11) je zřejmé, že kultura *Arthrobacter* sp. JU3 nebyla schopna využít metabolity rozkladu NOP kulturou *Phenylobacterium* sp. Dr2 a byly tak potvrzeny negativní výsledky z měření OD. Průměrná hodnota DOC z těchto paralelních vzorků (51,1 mg/l), vykazuje sice mírný nárůst od vstupní hodnoty, ale spíše poukazuje na hladovění a úhyn samotné kultury (spojený s uvolňováním organických látek).

Na druhou stranu ale u kultury *Achromobacter* sp. Dr1 je vidět signifikantní pokles hodnot DOC vůči hodnotě vstupní hodnotě 49,26 mg/l. Průměrná hodnota (22,2 mg/l) je o více než polovinu nižší než hodnota vstupní. Tyto hodnoty dokazují utilizaci vzniklého metabolitu a růst dané kultury. Zde výsledky měření OD neodpovídají poklesu rozpuštěného uhlíku, a tato skutečnost mohla být způsobena právě necitlivostí bioreaktorů k slabému růstu kultury.

Pro doplnění výsledků růstu kultur Dr1 a JU3 na metabolitech po primární degradaci byl založen další experiment sekvenční biodegradace.

II. kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2/ *Phenylobacterium* sp. JU4 a *Arthrobacter* sp. JU3/ *Achromobacter* sp. Dr1

Pokus byl z důvodu vyhlášení nouzového stavu proveden v minimalizovaném rozsahu.

Cílem testu bylo zjistit, zda po primární biodegradaci NOP kulturami Dr2 a JU4 bude biodegradace pokračovat kulturami JU3 a Dr1. Po 6ti denní kultivaci *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 v MM (s MEM vitamíny) s NOP (koncentrace 115 mg/l) byly vzorky přefiltrovány a bylo odebráno 10 ml pro stanovení DOC (hodnoty po primární biodegradaci). Vzorky byly doplněny 3 ml nového MM (s MEM vitamíny) a zaočkovány 30 μ l kultury *Achromobacter* sp. Dr1 nebo *Arthrobacter* sp. JU3.

Vzorky byly zaočkovány následovně:

Přefiltrovaný vzorek s utilizovaným NOP kulturou Dr2 + kultura Dr1

Přefiltrovaný vzorek s utilizovaným NOP kulturou Dr2 + kultura JU3

Přefiltrovaný vzorek s utilizovaným NOP kulturou JU4 + kultura Dr1

Přefiltrovaný vzorek s utilizovaným NOP kulturou JU4 + kultura JU3.

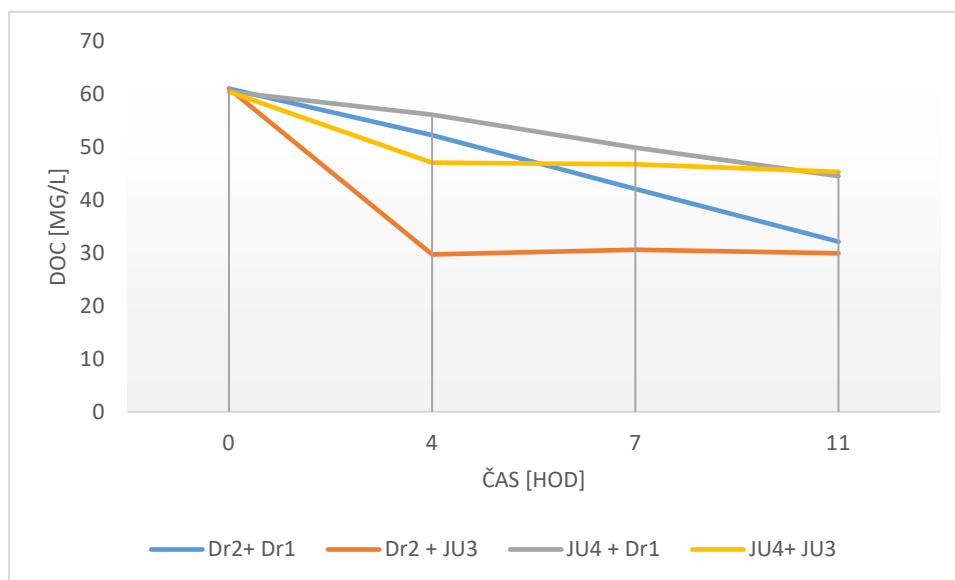
Vzorky byly kultivovány po dobu dalších 11 dnů při 25°C na třepačce. Čtvrtý, sedmý a jedenáctý den od začátku kultivace bylo odebráno a přefiltrováno do sterilních zkumavek 10 ml vzorků pro pozdější stanovení DOC. Kultivovány byly také slepé vzorky bez inokulace pro kontrolu, ze kterých bylo na začátku pokusu a při jeho ukončení odebráno 11 ml pro stanovení DOC. Výchozí hodnoty slepého pokusu byly SP1 69,84 mg/l a SP2 70,77 mg/l, průměrně tedy 70,31 mg/l.

Tab. 12: Hodnoty DOC [mg/l] v průběhu druhé fáze pokusu

čas [den]	Vzorek							
	Dr2	JU4	Dr2+ Dr1	Dr2 + JU3	JU4 + Dr1	JU4+ JU3	SP1	SP2
0	61,03	60,45	-	-	-	-	-	-
4	-	-	54,24	29,72	56,15	47,06	-	-
7	-	-	42,10	30,60	49,90	46,72	-	-
11	-	-	32,14	29,96	44,51	45,33	70,26	69,22

SP slepý pokus

U obou kultur (Dr2 i JU4) byla po primární degradaci NOP snížena hodnota DOC z výchozí hodnoty 70,31 mg/l o cca 10 mg/l.



Obr. 15: Pokles DOC u jednotlivých vzorků v čase

Jak je z tabulky i grafu patrné, největší pokles byl zaznamenán u spojení kultury Dr2 a JU3. Kultura *Arthrobacter* sp. JU3 dokázala již po 4 dnech kultivace na neznámém metabolitu primární biodegradace NOP kulturou Dr2 snížit hodnotu DOC o více než polovinu z výchozí hodnoty 61,03 na 29,72 mg/l. Poté již růst kultury zřejmě stagnoval. Tyto výsledky jsou v rozporu s předešlým pokusem a možným vysvětlením je ovlivnění výsledků kultivací v umělohmotných falconkách v podmínkách bioreaktorů v prvním pokusu.

U spojení kultur *Phenylobacterium* sp. JU4 a *Arthrobacter* sp. JU3 došlo k poklesu DOC z výchozí hodnoty 60,45 na 47,06 mg/l. I u tohoto vzorku již do konce experimentu byly hodnoty téměř totožné pouze s malým poklesem na hodnotu 45,33 mg/l. Tento výsledek překvapivě ukazuje vyšší utilizaci metabolitu po biodegradaci kulturou Dr2 než metabolitu vzniklém kulturou JU4.

Kulturou *Achromobacter* sp. Dr1 docházelo v obou případech k pozvolnému poklesu DOC v průběhu celého experimentu. Ve spojení s metabolitem kultury Dr2 došlo k výraznému poklesu z 61,03 na 32,14 mg/l během 11 dnů kultivace, což byl téměř totožný výsledek jako u kultury JU3. Tento výsledek je velmi podobný výsledku z předchozího experimentu.

Po kultivaci Dr1 na metabolitu kultury JU4 došlo k poklesu z 60,45 na 44,51 mg/l, což byl opět podobný výsledek jako u kultury *Arthrobacter* sp. JU3. Dle naměřených výsledků lze uvažovat, že buď byl neznámý metabolit primární biodegradace NOP kulturou *Phenylobac-*

terium sp. Dr2 pro obě kultury při sekundární degradaci jednodušeji rozložitelný než metabolit *Phenylobacterium* sp. JU4, nebo kultura vytvořila v průběhu primární biodegradace příznivější prostředí pro druhou fázi rozkladu (např. tvorbou nějakého růstového faktoru).

Je tedy patrné, že ač se u primárních degradérů jedná o stejný rod (*Phenylobacterium*), dochází u jednotlivých kultur v průběhu primární biodegradace NOP buď ke vzniku mírně odlišných neznámých metabolitů, nebo k vytvoření vhodnějších podmínek kulturou Dr2 pro následnou degradaci metabolitu navazujícími kulturami.

Kultura *Arthrobacter* sp. JU3 celkově vykázala rychlejší růst (snížení DOC) v obou případech. Po 4 dnech kultivace zřejmě dosáhla maximálního nárůstu a poté již stagnovala. Kultura *Achromobacter* sp. Dr1 rostla pomaleji, ale při ukončení experimentu dosáhla téměř totožných hodnot jako JU3.

8.4 Růst bez externího zdroje dusíku

Při zkoumání procesu rozkladu NOP, byly provedeny experimenty s cílem zjistit využití dusíku, obsaženého v NOP, kulturami *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 v průběhu primární degradace.

I. Část

Tato schopnost byla nejprve testována zkoumáním růstu těchto bakterií na NOP v bezdusíkatém minerálním médiu (MMNF, viz tabulka 4), přičemž pro porovnání byl sledován růst na NOP v kompletním MM.

Obě média byla zaočkována kulturou *Phenylobacterium* sp. JU4 nebo *Phenylobacterium* sp. Dr2. Polovina vzorků byla obohacena o NOP (koncentrace NOP 122 mg/l) jako jediný zdroj uhlíku.

Pro každou kulturu byly připraveny 2 mikrotitrační destičky (MTD), do kterých bylo pipetováno:

200 µl MM (bez substrátu NOP)

200 µl MM (se substrátem)

200 µl MMNF (bez substrátu)

200 µl MMNF (se substrátem).

MTD byly staticky kultivovány po dobu 14 dnů při laboratorní teplotě a průběžně proměřovány při $\lambda=600$ nm na destičkovém spektrofotometru TECAN (Sunrise Microplate Reader).

Výsledky jsou uvedeny jednak v tabulkách 13 a 14, a také jsou vyjádřeny graficky na obrázcích 16 a 17 níže.

Vzorky byly označeny následovně:

MM.....dusíkaté minerální médium se substrátem (NOP)

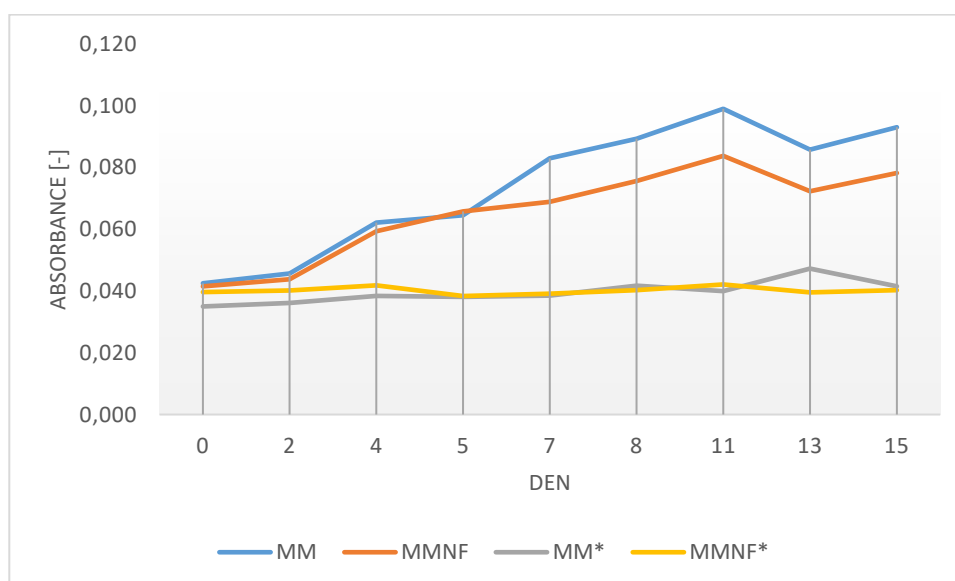
MMNF.....bez dusíkaté minerální médium se substrátem (NOP)

MM*.....dusíkaté minerální médium, bez substrátu

MMNF*.....bez dusíkaté minerální médium, bez substrátu.

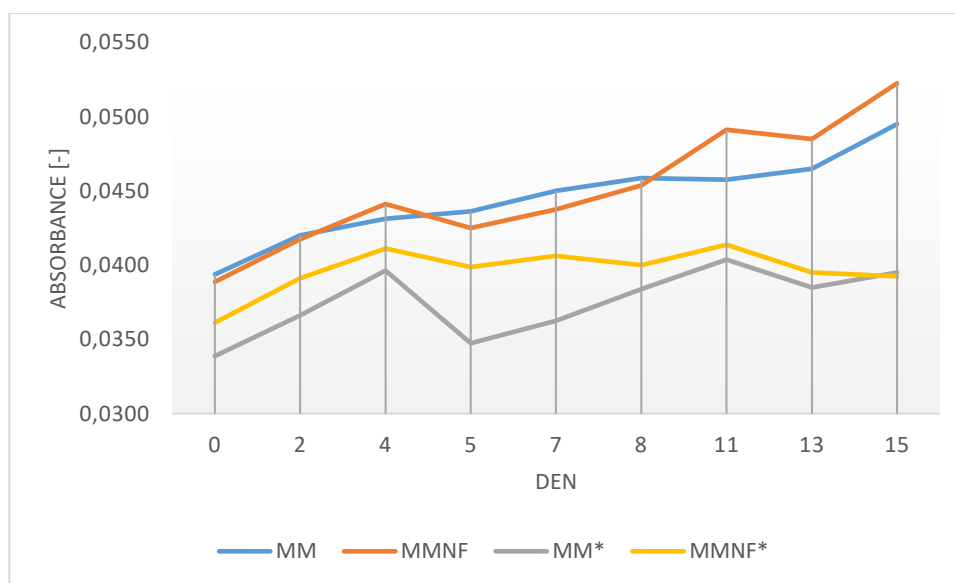
Tab. 13: Hodnoty absorbance kultury *Phenylobacterium sp. Dr2* v různých mediích.

Den	Médium			
	MM	MMNF	MM*	MMNF*
0	0,0425	0,0415	0,0350	0,0396
2	0,0456	0,0438	0,0361	0,0401
4	0,0621	0,0593	0,0384	0,0419
5	0,0645	0,0658	0,0381	0,0384
7	0,0830	0,0680	0,0385	0,0391
8	0,0893	0,0756	0,0417	0,0402
11	0,0990	0,0838	0,0445	0,0421
13	0,0858	0,07225	0,0472	0,0395
15	0,0930	0,07825	0,0415	0,0402



Obr. 16: Nárůst kultury *Phenylobacterium sp. Dr2*.Tab. 14: Hodnoty absorbance kultury *Phenylobacterium sp. JU4* v různých médiích.

Den	Médium			
	MM	MMNF	MM*	MMNF*
0	0,0394	0,0389	0,0339	0,0361
2	0,0420	0,0418	0,0366	0,0391
4	0,0431	0,0441	0,0396	0,0411
5	0,0436	0,0425	0,0348	0,0399
7	0,0450	0,0438	0,0363	0,0406
8	0,0459	0,0454	0,0384	0,0400
11	0,0458	0,0491	0,0404	0,0414
13	0,0465	0,0485	0,0385	0,0395
15	0,0495	0,0523	0,0395	0,0393

Obr. 17: Nárůst kultury *Phenylobacterium sp. JU4*.

Nárůst kultury *Phenylobacterium sp. Dr2* probíhal nejlépe v MM s přidavkem substrátu. Prokazatelně byl ale zaznamenán určitý nárůst i v bezdusíkatém médiu s přidavkem substrátu.

Nárůst kultury *Phenylobacterium* sp. JU4 probíhal celkově pomaleji než růst kultury *Phenylobacterium* sp. Dr2. Překvapivě byl zjištěn i silnější růst v bezdusíkatém minerálním médiu s přidavkem substrátu než na dusíkatém minerálním médiu, a to v pozdějších fázích pokusu.

Celkově, vzhledem k nejasnému vyznění výsledků tohoto pokusu, bylo rozhodnuto o opakování testu růstu obou kultur na NOP v bezdusíkatém médiu, v podmínkách lahvého testu, se sledováním růstu buněk a vyhodnocením utilizace NOP prostřednictvím sledování rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

II. Část

V druhé části experimentu byl pro bezdusíkaté minerální médium použit bezdusíkatý roztok stopových prvků (tab. 5) a byla snížena koncentrace mikrobiální suspenze coby inokula.

Vzorky byly rozděleny následovně:

Kultura *Phenylobacterium* sp. Dr2 v bezdusíkatém minerálním médiu (MMNF)

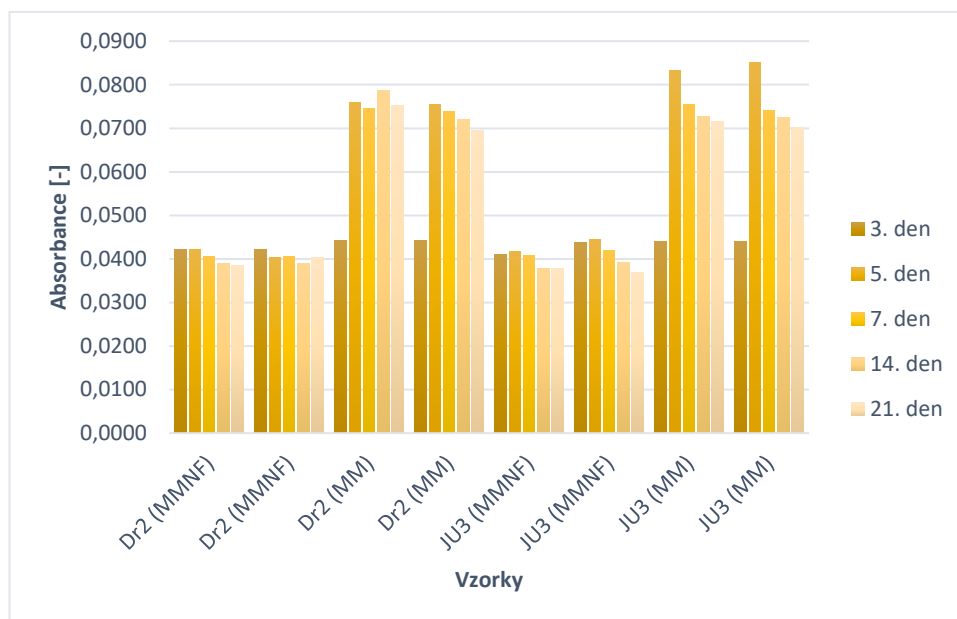
Kultura *Phenylobacterium* sp. Dr2 v minerálním médiu (MM)

Kultura *Phenylobacterium* sp. JU4 v bezdusíkatém minerálním médiu (MMNF)

Kultura *Phenylobacterium* sp. JU4 v minerálním médiu (MM)

Média (55 ml) s 10 ml roztoku NOP (výchozí koncentrace 100-108 mg/l) byla zaočkována 20 µl suspenze kultury Dr2, nebo 20 µl suspenze kultury JU4.

Vzorky byly kultivovány 21 dnů na třepačce při 25°C. Měření absorpance v MTD (po přepipetování vzorků z láhví) při vlnové délce 600 nm na destičkovém spektrofotometru Tecan probíhalo 3., 5., 7., 14. a 21. den od založení pokusu viz grafické vyjádření v obrázcích 18 a 19 níže.

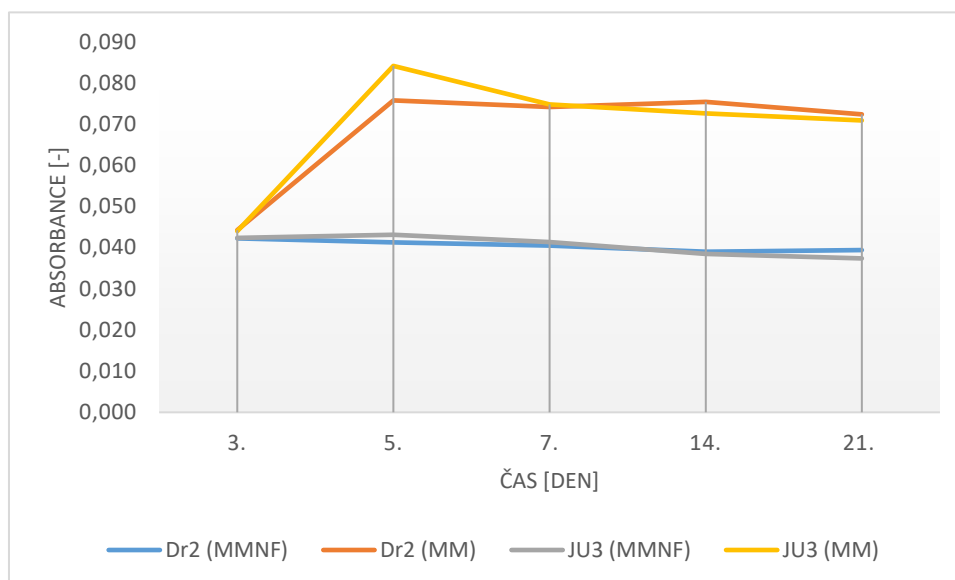


Obr. 18 Průměrné hodnoty absorbance jednotlivých vzorků

V grafu byly použity hodnoty měření paralelních vzorků každého měření. Vzhledem k odpovídajícím hodnotám (pouze s minimálními odchylkami) absorbancí paralelních vzorků nebylo dále potřeba zavádět zdvojená data. Výsledky měření byly dále uváděny jako aritmetický průměr těchto paralel.

Tab. 15: Průměrné hodnoty absorbance vzorků v čase

Vzorek	Čas [den]				
	3.	5.	7.	14.	21.
Dr2 (MMNF)	0,042	0,041	0,041	0,039	0,039
Dr2 (MM)	0,044	0,076	0,074	0,075	0,072
JU3 (MMNF)	0,042	0,043	0,041	0,039	0,037
JU3 (MM)	0,044	0,084	0,075	0,073	0,071



Obr. 19: Závislost absorbance jednotlivých vzorků v čase

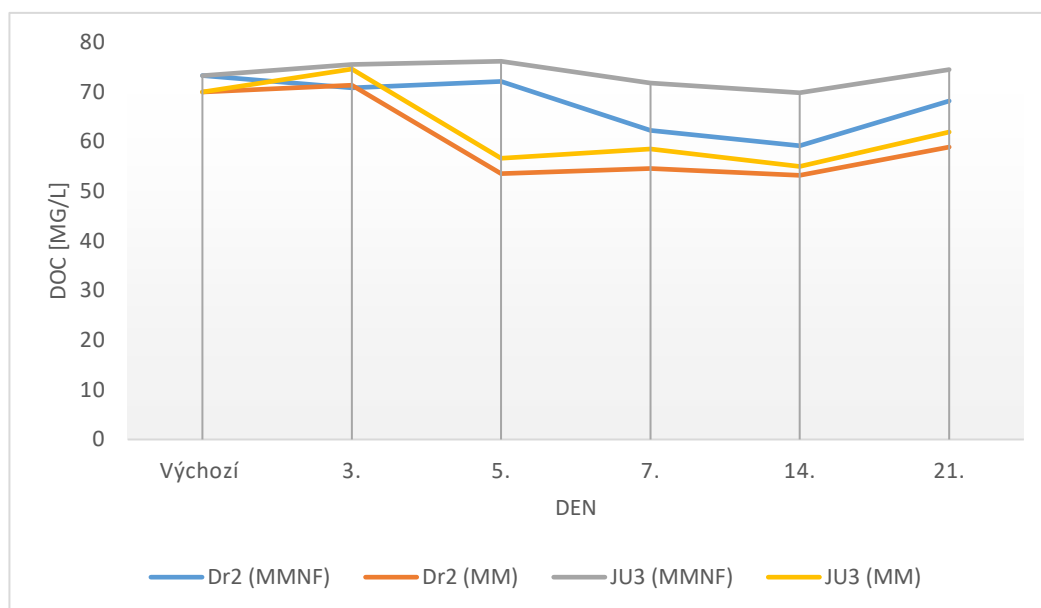
Z grafů i tabulky lze pozorovat, že v bezdusíkatých médiích nebyl růst obou kultur vůbec zaznamenán. Naměřené hodnoty absorbancí vzorků s bezdusíkatým médiem byly téměř totožné jako naměřené hodnoty absorbance samotného bezdusíkatého média 0,042 na začátku pokusu a 0,041 při ukončení. Nebyl tedy zaznamenán zákal způsoben nárůstem biomasy.

Zřetelný růst nastal pouze v médiích se zdrojem dusíku. Hodnoty absorbance samotného dusíkatého média byly 0,043 na začátku pokusu a 0,042 při ukončení, což představuje jen polovinu absorbance zaznamenané na vzorcích kultur v tomto médiu.

Stanovení DOC bylo prováděno z přefiltrovaných vzorků (přes filtr Ahlstrom s velikostí pórů 0,42 μm), které byly do stanovení uloženy v mrazáku.

Tab. 16: Změny hodnot DOC [mg/l] v čase

Vzorek	Den					
	Výchozí	3.	5.	7.	14.	21.
Dr2 (MMNF)	73,28	70,79	72,07	62,26	59,15	68,16
Dr2 (MM)	69,99	71,34	53,51	54,59	53,19	58,87
JU3 (MMNF)	73,28	75,50	76,16	71,76	69,82	74,46
JU3 (MM)	69,99	74,59	56,64	58,49	54,98	61,92



Obr. 20: Změny DOC [mg/l] u vzorků v čase

Na obr. 20 lze pozorovat průběh hodnot DOC, kde křivky obou kultur měly v kompletním MM téměř totožný průběh. Můžeme vidět, že lag fáze trvala pouze tři dny a poté došlo k logaritmické fázi růstu a zřejmě intenzivní utilizaci NOP. Stacionární fáze poté trvala od pátého do 14. dne a poté již nastala fáze odumírání. U kultury Dr2 můžeme také pozorovat jakýsi vývoj křivky, avšak její průběh je celkově pomalejší a růst nedosahuje takové intenzity.

Po 14ti dnech od začátku experimentu, stejně tak i při ukončení pokusu, bylo sterilně odebráno 10 ml i z MMNF a MM, které byly od začátku bez zaočkování. Média byla také přefiltrována přes filtr a uložena do mrazáku.

Tab. 17: Hodnoty DOC nezaočkových médií

	14. den	21. den
MMNF	72,91 mg/l	70,44 mg/l
MM	71,12 mg/l	72,26 mg/l

Z naměřených hodnot lze vidět, že u vzorků v minerálním médiu se zdrojem dusíku, došlo k výraznému poklesu DOC již v 5 dnech od začátku kultivace (tab. 16). Z 66,99 mg/l na 53,51 mg/l u kultury Dr2, a z 66,99 mg/l na 56,64 mg/l u kultury JU3. To dokazuje částečnou utilizaci NOP kulturami. Kultura *Phenylobacterium* sp. Dr2 vykazuje mírně silnější pokles

DOC než kultura *Phenylobacterium* sp. JU3. Tyto hodnoty odpovídají výsledkům měření absorbance, kde je také v pátém dnu pozorovatelný znatelný nárůst. Kultura JU3 však při měření absorbance vykazovala silnější růst než kultura Dr2.

Kultura *Phenylobacterium* sp. Dr2 byla schopna částečně snížit hodnoty organického uhlíku i v bezdusíkatém minerálním médiu. Což dokazoval i rozdíl hodnot DOC u MMNF bez zaočkování (72,91 mg/l) a MMNF s kulturou Dr2 (59,15 mg/l) po 14ti dnech. Tato skutečnost je možným důsledkem částečného využití uhlíku z NOP (např. k tvorbě buněčných zásob, bez růstu kultury).

U kultury *Phenylobacterium* sp. JU4 byl pokles DOC v minerálním bezdusíkatém médiu pouze nepatrný (69,82 mg/l) oproti nezaočkovanému MMNF (72,91 mg/l) po 14ti dnech. Kultura tedy nejspíš nebyla schopna ani částečného využití uhlíku jako kultura Dr2. V minerální médiu JU4 prokázala kultura mírně slabší snížení DOC než kultura Dr2.

Jak je z tabulky i grafu patrné, obě kultury ve všech vzorcích vykázaly mezi 14. a 21. dnem pokusu mírný nárůst hodnot DOC, což mohlo být způsobeno jejich odumíráním a následným rozkladem biomasy. Dále tedy byly zohledňovány spíše výsledné hodnoty po dvoutýdenní kultivaci.

Pro potvrzení výsledků byly rovněž při ukončení pokusu naočkovány Petriho misky ředěnými suspenzemi z láhví s MM a MMNF. Vzorky s MMNF byly ředěny 10^{-2} a 10^{-4} a vzorky s MM 10^{-4} a 10^{-6} pro stanovení CFU (Colony Forming Units).

Petriho misky byly kultivovány 6 dnů při pokojové teplotě. Dle kontroly nedošlo během této doby k nárůstu jiných bakterií než Dr2 a JU4. Byla tedy závěrem prokázána i čistota vzorků během pokusu.

Výsledné počty kolonií byly odečteny z ředění vzorků Dr2 (MMNF): 10^{-4} ; Dr2 (MM): 10^{-6} ; JU3 (MMNF): 10^{-4} , JU (MM): 10^{-6} . Přepočet kolonií na počet CFU na 1 ml je uveden v Tab. 18.

Tab. 18: Stanovení CFU/ml finálních suspenzí

Vzorek	CFU/ml
Dr2 (MMNF)	$1,2 \cdot 10^6$
Dr2 (MM)	$1,7 \cdot 10^8$
JU3 (MMNF)	$0,9 \cdot 10^6$
JU3 (MM)	$0,5 \cdot 10^8$

Výsledné hodnoty CFU odpovídaly ostatním výsledkům provedených testů. I zde kultura *Phenylobacterium* sp. Dr2 vykazala vyšší nárůst než *Phenylobacterium* sp. JU3 v obou médiích. V minerálním dusíkatém médiu byl počet narostlých kolonií o dva řády vyšší než v bezdusíkatém minerálním médiu.

Druhá část experimentu prokázala, že i když při první části pokusu bylo v MMNF pouze stopové množství dusíku (obsažený v roztoku stopových prvků), byl růst obou kultur výraznější než při úplné absenci dusíku v médiu.

Dle výsledků měření absorbancí, DOC a stanovení CFU tedy nebyla potvrzena schopnost kultur Dr2 a JU4 využít dusík z molekuly NOP pro jejich růst a množení, a byla tak výrazně podpořena hypotéza, že tyto kultury využívají jen oktylovou část molekuly NOP.

Navíc i tento pokus potvrdil, že nejasné výsledky kultivace kultur v plastových laboratorních pomůckách (zkumavky, falconky), získané v některých předcházejících testech, skutečně nelze považovat za správné. Pokusy je třeba provádět výhradně ve skleněných lahvích, a za použití většího počtu metod vyhodnocení procesů, i když jsou takové experimenty často pracnější a časově náročnější.

ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byly zkoumány vlastnosti vybraných kultur, schopných biodegradace N-oktyl-2-pyrrolidonu. Kulture byly izolovány v předešlých pracích na Univerzitě Tomáše Bati, Ústavu ochrany životního prostředí. Jedná se o kulture *Achromobacter* sp. Dr1, *Phenylobacterium* sp. Dr2 a v průběhu této práce identifikované *Arthrobacter* sp. JU3 a *Phenylobacterium* sp. JU4.

Nejprve byla testována utilizace vybraných uhlovodíků jednotlivými kulturami i jejich konsorcií. Vzhledem ke struktuře NOP a v návaznosti na některé výsledky z předešlých prací, byly zvoleny toluen a fenol jako zástupci aromatických uhlovodíků, alifatické uhlovodíky C6 až C16, pyrrolidon a jeho deriváty.

U kulture *Achromobacter* sp. Dr1, stejně jako u *Arthrobacter* sp. JU3, nebyla prokázána utilizace žádného z testovaných uhlovodíků ani pyrrolidonu či jeho derivátů. Tyto druhy jsou dle výsledků závislé na neznámých metabolitech, vznikajících z NOP primární biodegradací, které jsou pro svůj růst schopny využít jako zdroj uhlíku.

U kulture *Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4 byla prokázána utilizace oktanu, dekanu a dodekanu. Bylo tedy potvrzeno, že právě kulture rodu *Phenylobacterium* započínají rozklad NOP využíváním oktylové části molekuly. Ostatní testované látky však ani tyto kulture využít nedokázaly. Rovněž se během pokusů prokázaly mírně odlišné růstové vlastnosti obou těchto kultur. *Phenylobacterium* sp. Dr2 je zřejmě schopna se lépe a rychleji adaptovat na nové prostředí i zdroj uhlíku a byla tedy ve svém růstu rychlejší a výraznější než *Phenylobacterium* sp. JU4.

Následně byla v experimentech věnována pozornost degradaci samotného NOP. Byla testována sekvenční biodegradace dané látky přes neznámý metabolit.

Bylo prokázáno, že kulture, které se do biodegradace zapojují sekundárně (*Achromobacter* sp. Dr1 a *Arthrobacter* sp. JU3) dokáží růst na neznámých metabolitech vzniklých působením obou kultur primárních degradérů (*Phenylobacterium* sp. Dr2 a *Phenylobacterium* sp. JU4) a jsou mezi sebou volně kompatibilní. Po primární biodegradaci došlo u obou kultur k poklesu hodnot DOC a po sekundární biodegradaci se tyto hodnoty opět snížily. Byla tak prokázána důležitost působení mikrobiálního konsorcia. Dle výsledků vede primární biodegradace NOP oběma kulturami rodu *Phenylobacterium* k metabolitu (či metabolitům) využitelným oběma navazujícími kmeny, přičemž po primární biodegradaci kulturou Dr2 bylo

v obou případech dosaženo výraznějšího poklesu hodnot DOC než po primární biodegradaci kulturou JU4. Lze tedy uvažovat, že buď vytváří obě kultury primárních degradérů mírně odlišné metabolity z NOP, nebo vytváří poněkud odlišné prostředí, umožňující rozdílnou degradaci metabolitu navazujícími kulturami.

Závěrem práce byla testována i možnost utilizace dusíku obsaženého v molekule NOP. Pro testy byly vybrány obě kultury rodu *Phenylobacterium*, díky schopnostem primárního rozkladu dané látky. Růst kultur byl testován v bezdusíkatém médiu s NOP jako jediným zdrojem uhlíku a dusíku.

V těchto experimentech nebyla u kultur prokázána schopnost utilizace dusíku z molekuly NOP. Kultura *Phenylobacterium* sp. Dr2 ale zřejmě dokázala využít alespoň část uhlíku z NOP v bezdusíkatém médiu k tvorbě buněčných zásob, neboť bylo zaznamenáno mírné snížení hodnot DOC, bez růstu kultury. V minerálním dusíkatém médiu byly hodnoty absorbance (tedy i růstu) téměř dvojnásobné a pokles hodnot DOC byl také výraznější.

V rámci práce se projeví rozdílné schopnosti a vlastnosti studovaných kultur. Nebyla prokázána utilizace dusíku z molekuly NOP primárními degradéry, stejně jako není doposud známo, jak dochází k degradaci pyrrolidonového kruhu, jelikož žádná z kultur (ani konsorcium) není schopna jeho utilizace. Pro pochopení celé biodegradace N-oktyl-2-pyrrolidonu je zapotřebí dalšího výzkumu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALEXANDER, Martin, c1999. *Biodegradation and bioremediation*. 2nd ed. San Diego: Academic Press. ISBN 0-12-049861-8.

CASELLAS, M., GRIFOLL, M., BAYONA, J.M., SOLANAS, A.M., 1997. *New metabolites in the degradation of fluorene by Arthrobacter sp. Strain F 101*. Appl. Environ. Microbiol., 63: 819-826. DOI: 10.1128/AEM.63.3.819-826.1997

CHEN, Wei, Ke ZHANG a Jia CHEN. *Enhanced Degradation of di-n-octyl phthalate (DOP) by Phenylbacterium ESF-17 isolated from waste water treatment plant*. In: Proceedings of the 2017 3rd International Forum on Energy, Environment Science and Materials (IFEESM 2017). Paris, France: Atlantis Press, 2018, 2018, s. DOI: 10.2991/ifeesm-17.2018.254. ISBN 978-94-6252-453-8.

CHESTER, Brent a L.H. COOPER, 1978 - *Achromobacter species (CDC group Vd): morphological and biochemical characterization*. Journal of clinical microbiology, Vol.9, NO. 3, str. 425-426

CLINISCIENCE [online]. *Reagents and instruments for immunology, cell biology and molecular biology*. Dostupné z: <https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-plant-growth-regulators-cytokinins-4831.html>

DE CARVALHO, Carla C. C. R. a M. Manuela R. DA FONSECA. *Solvent toxicity in organic-aqueous systems analysed by multivariate analysis*. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2004, 26(6), 361-375. DOI: 10.1007/s00449-004-0381-1. ISSN 1615-7591.

DENG, Mao-Cheng, Jing LI, Fu-Rui LIANG, et al. *Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium Achromobacter sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China*. Marine Pollution Bulletin. 2014, 83(1), 79-86. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2014.04.018. ISSN 0025326X.

EDERER, M. M., R. L. CRAWFORD, R. P. HERWIG a C. S. ORSER. *PCP degradation is mediated by closely related strains of the genus Sphingomonas*. Molecular Ecology. 2003, 6(1), 39-49. DOI: 10.1046/j.1365-294X.1997.00151.x. ISSN 0962-1083.

EPA [online]. *United States Environmental Protection Agency*. Dostupné z: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/inert-reassessment-document-n-n-dodecyl-2-pyrrolidone>

EPA [online]. *United States Environmental Protection Agency*. Dostupné z: https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-06/documents/nmp_pf_05-31-18.pdf

ECHA [online]. *European Chemicals Agency*. Annankatu 18, P.O. Box 400, FI-00121 Helsinki, Finland. Dostupné z: https://echa.europa.eu/cs/substance-information/-/substanceinfo/100.100.541#OTHER_IDENTIFIERScontainer

GOVARTHANAN, Muthusamy, Soichiro FUZISAWA, Toshiki HOSOGAI a Young-Cheol CHANG. *Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the filamentous fungus Penicillium sp. CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity*. RSC Advances. 2017, 7(34), 20716-20723. DOI: 10.1039/C6RA28687A. ISSN 2046-2069.

JONES, D., KEDDI, R.M. (1992). *The Prokaryotes, The: A Handbook on the Biology of Bacteria - Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. The genus Arthrobacter*. New York: Springer-Verlag. 1992, 1283-1296. ISBN-10: 0387972587

LEAHY, J G a R R COLWELL. *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment*. Microbiological Reviews. 1990, 54(3), 305-315. DOI: 10.1128/MMBR.54.3.305-315.1990. ISSN 0146-0749.

LEE, Eun-Hee, Jaisoo KIM, Kyung-Suk CHO, Yun Gyong AHN a Geum-Sook HWANG. *Degradation of hexane and other recalcitrant hydrocarbons by a novel isolate, Rhodococcus sp. EH831*. Environmental Science and Pollution Research. 2010, 17(1), 64-77. DOI: 10.1007/s11356-009-0238-x. ISSN 0944-1344.

LI, Hui, Zejun JIANG, Xiaolin CAO, et al. *SPE/GC–MS Determination of 2-Pyrrolidone, N-Methyl-2-pyrrolidone, and N-Ethyl-2-pyrrolidone in Liquid Pesticide Formulations*. Chromatographia. 2018, 81(2), 359-364. DOI: 10.1007/s10337-017-3435-7. ISSN 0009-5893.

LIAO, Xiaobin, Bingxin LI, Rusen ZOU, Yu DAI, Shuguang XIE a Baoling YUAN, 2016. *Biodegradation of antibiotic ciprofloxacin: pathways, influential factors, and bacterial community structure*. Environmental Science and Pollution Research. 23(8), 7911-7918. DOI: 10.1007/s11356-016-6054-1. ISSN 0944-1344.

LINGENS, F., R. BLECHER, H. BLECHER, a kol., 1985. *Phenylobacterium immobile* gen. nov., sp. nov., a Gram-Negative Bacterium That Degrades the Herbicide Chloridazon. International Journal of Systematic Bacteriology. 35(1), 26-39 DOI: 10.1099/00207713-35-1-26. ISSN 0020-7713.

LOH, Chun Heng, Bing WU, Liya GE, Chaozhi PAN a Rong WANG. *High-strength N-methyl-2-pyrrolidone-containing process wastewater treatment using sequencing batch reactor and membrane bioreactor: A feasibility study*. Chemosphere. 2018, **194**, 534-542. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.013. ISSN 00456535.

LOU, Liping a kol., 2019. *Adsorption and degradation in the removal of nonylphenol from water by cells immobilized on biochar*. Chemosphere. **228**, 676-684. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.151. ISSN 00456535.

LU, Chao, Yang HONG, Juan LIU, Yanzheng GAO, Zhao MA, Bing YANG, Wanting LING a Michael Gatheru WAIGI. *A PAH-degrading bacterial community enriched with contaminated agricultural soil and its utility for microbial bioremediation*. Environmental Pollution. 2019, **251**, 773-782. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.05.044. ISSN 02697491.

KAGEYAMA, A., K. MORISAKI, S. OMURA a Y. TAKAHASHI. *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY. 2008, 58(1), 53-56. DOI: 10.1099/ij.s.0.64875-0. ISSN 1466-5026.

KANG, Eun Yong, Chun YE, Ilya SHPITSER a Eleazar ESKIN. *Detecting the Presence and Absence of Causal Relationships between Expression of Yeast Genes with Very Few Samples*. Journal of Computational Biology. 2010, 17(3), 533-546. DOI: 10.1089/cmb.2009.0176. ISSN 1066-5277.

KANSO, S., 2004. *Phenylobacterium lituiforme* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a subsurface aquifer, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY. 54(6), 2141-2146.

KRAJČÍŘIKOVÁ, S. *Význam více druhů bakterií pro rozklad syntetických látek*. Zlín, 2019. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati, Fakulta Technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí.

KŘÍŽEK, K., J. Růžicka, M. Julinová, L. Husárová, J. Houser, M. Dvořáčková a P. Jančová. *N-methyl-2-pyrrolidone-degrading bacteria from activated sludge*. Water Science and Technology. 2015, **71**(5), 776-782. DOI: 10.2166/wst.2015.031. ISSN 0273-1223.

MARGESIN, R. a F. SCHINNER, 2001. *Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments*. Applied Microbiology and Biotechnology. **56**(5-6), 650-663. DOI: 10.1007/s002530100701. ISSN 0175-7598.

MURTHY, B. N. S., S. J. MURCH a Praveen K. SAXENA. *Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis*. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 1998, **34**(4), 267-275. DOI: 10.1007/BF02822732. ISSN 1054-5476.

NCBI [online]. *National Center for Biotechnology Information*. Rockville Pike, 2017. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=222&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle.

NCBI [online]. *National Center for Biotechnology Information*. Rockville Pike, 2017. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=20&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.

NOVOTNÁ, Z. *Mikrobiální degradace N-oktylpyrrolidonu a popis bakterií schopných rozkladu*. Zlín, 2017. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí.

OZYUREK, B., a I. SEYIS BILKAY. *Biodegradation of petroleum by Klebsiella pneumoniae isolated from drilling fluid*. International Journal of Environmental Science and Technology. 2018, **15**(10), 2107-2116. DOI: 10.1007/s13762-017-1581-y. ISSN 1735-1472.

OXEYNS [online]. Registered office 4 Cornmarket Street, Oxford, OX1 3HA. Dostupné z: www.oxeyns.com

OCEGUERA-CERVANTES, A., A. Carrillo-Garcia, N. Lopez, S. Bolanos-Nunez, M. J. Cruz-Gomez, C. Wachter a H. Loza-Tavera. *Characterization of the Polyurethanolytic Activity of Two Alicyclophilus sp. Strains Able To Degrade Polyurethane and N-Methylpyrrolidone*. Applied and Environmental Microbiology. 2007, **73**(19), 6214-. DOI: 10.1128/AEM.01230-07. ISSN 0099-2240.

PEČOVÁ, Danuše. *Organická chemie*. 2002, 19-37. V Olomouci: Studio nakladatelství Olomouc.

PUNTUS, Irina F., Oksana V. BORZOVA, Tatyana V. FUNTIKOVA, et al. *Contribution of soil bacteria isolated from different regions into crude oil and oil product degradation*. Journal of Soils and Sediments. 2019, 19(8), 3166-3177. DOI: 10.1007/s11368-018-2003-6. ISSN 1439-0108.

PubChem [online]. *National Center for Biotechnology Information*. 8600 Rockville Pike, Bethesda. 20894 USA. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diuron#section=Toxicity-Summary>.

RODGERS-VIEIRA, Elyse A., Zhenfa ZHANG, Alden C. ADRION, Avram GOLD, Michael D. AITKEN a F. E. LÖFFLER. *Identification of Anthraquinone-Degrading Bacteria in Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Applied and Environmental Microbiology. 2015, 81(11), 3775-3781. DOI: 10.1128/AEM.00033-15. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.00033-15>

SAILLENFAIT, A.M., F. MARQUET, J.P. SABATÉ, D. NDIAYE a A.M. LAMBERT-XOLIN. *4-Week repeated dose oral toxicity study of N-ethyl-2-pyrrolidone in Sprague Dawley rats*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2016, 81, 275-283. DOI: 10.1016/j.yrtph.2016.09.011. ISSN 02732300.

SEDLÁČEK, Ivo, 2007. *Taxonomie prokaryot (Taxonomy of prokaryotes)*. V Brně: Masarykova univerzita, ISBN 80-210-4207-9.

SINGH, Ajay a Owen P. WARD, 2004. *Biodegradation and bioremediation*. New York: Springer. ISBN 3540211012.

SINGLETON, David R., Stephen D. RICHARDSON a Michael D. AITKEN, 2011. *Pyr sequence analysis of bacterial communities in aerobic bioreactors treating polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil*. Biodegradation. 22(6), 1061-1073. DOI: 10.1007/s10532-011-9463-3. ISSN 0923-9820. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10532-011-9463-3>

SPIGNO, Giorgia a D. Marco DE FAVERI. *Modeling of a vapor-phase fungi bioreactor for the abatement of hexane: Fluid dynamics and kinetic aspects*. Biotechnology and Bioengineering. 2005, 89(3), 319-328. DOI: 10.1002/bit.20336. ISSN 0006-3592.

TIXIER, C., Sancelme, M., SELIM, A., WIDHEM, P., BONNEMOY, F., CUER, A., TRUFFAUT, N., VESCHAMBRE, H. (2002). *Biotransformation of phenylurea herbicides*

by soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere*, 46: 519-526. DOI: 10.1016/s0045-6535(01)00193-x

TOWNSEND, Colin R., Michael BEGON a John L. HARPER, 2010. *Základy ekologie*. V Olomouci: Univerzita Palackého. ISBN 978-80-244-2478-1.

TURNBULL, G.A., CULLINGTON, J.E., WALKER, A., MORGAN, J.A.W., 2001. *Identification and characterisation of a diuron-degrading bacterium*. *Biol. Fertil. Soils.*, 33: 472-476. DOI 10.1007/s003740100353.

URBAN, J. *Studium půdních bakterií schopných rozkladu 1-oktyl-2-pyrrolidonu*. Zlín, 2019. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí.

WESTEBERG, K., ELVANG, A.M., STACKEBRANDT, E., JANSSEN, J.K., 2000. *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentration of 4-chlorophenol. *Journ. Appl. Mic. biol.*, 88: 764-772. DOI: 10.1099/00207713-50-6-2083.

XIONG, Jukun, Taicheng AN, Guiying LI a Ping'an PENG. *Accelerated biodegradation of BPA in water-sediment microcosms with Bacillus sp. GZB and the associated bacterial community structure*. *Chemosphere*. 2017, 184, 120-126 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.163. ISSN 00456535.

YABUUCHI, Eiko a kol. 1998. *Emendation of Genus Achromobacter and Achromobacter xylosoxidans (Yabuuchi and Yano) and Proposal of Achromobacter ruhlandii (Packer and Vishniac) Comb. Nov., Achromobacter piechaudii (Kiredjian et al.) Comb. Nov., and Achromobacter xylosoxidans Subsp. de*. *Microbiology and Immunology*. 42(6), 429-438 DOI: 10.1111/j.1348-0421.1998.tb02306.x. ISSN 03855600.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CFU	Colony Forming Units.
DOC	Dissolved Organic Carbon.
MM	Minerální médium.
MMNF	Bezdušikaté minerální médium.
MTD	Mikrotitrační destička.
NOP	N-octyl-2-pyrrolidon.
OD	Optická denzita.
PAU	Polyaromatické uhlovodíky.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: molekulární struktura NOP, $C_{12}H_{23}NO$</i>	10
<i>Obr. 2: Anthracen, $C_{14}H_{10}$ Obr. 3: Fenanthren, $C_{14}H_{10}$ Obr. 4: Pyren, $C_{16}H_{10}$</i>	16
<i>Obr. 5: molekulární struktura DEHP, $C_{24}H_{38}O_4$</i>	16
<i>Obr. 6: Ciprofloxacin, $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ Obr. 7: Anthraquinon, $C_{14}H_8O_2$</i>	17
<i>Obr. 8: Di-n-oktylfthalát, $C_{24}H_{38}O_4$ Obr. 9: Bisfenol A, $C_{15}H_{16}O_2$</i>	17
<i>Obr. 10: Fluoren, $C_{13}H_{10}$ Obr. 11: Diuron, $C_9H_{10}Cl_2N_2O$</i>	19
<i>Obr. 12: 4-chlorofenol, C_6H_4ClO Obr. 13: 4-bromofenol, C_6H_4BrO</i>	19
<i>Obr. 14: růst rodů Phenylobacterium zaznamenáván na densilametri.</i>	38
<i>Obr. 15: Pokles DOC u jednotlivých vzorků v čase</i>	44
<i>Obr. 16: Nárůst kultury Phenylobacterium sp. Dr2.</i>	47
<i>Obr. 17: Nárůst kultury Phenylobacterium sp. JU4.</i>	47
<i>Obr. 18 Průměrné hodnoty absorbance jednotlivých vzorků</i>	49
<i>Obr. 19: Závislost absorbance jednotlivých vzorků v čase</i>	50
<i>Obr. 20: změny DOC [mg/l] u vzorků v čase</i>	51

SEZNAM TABULEK

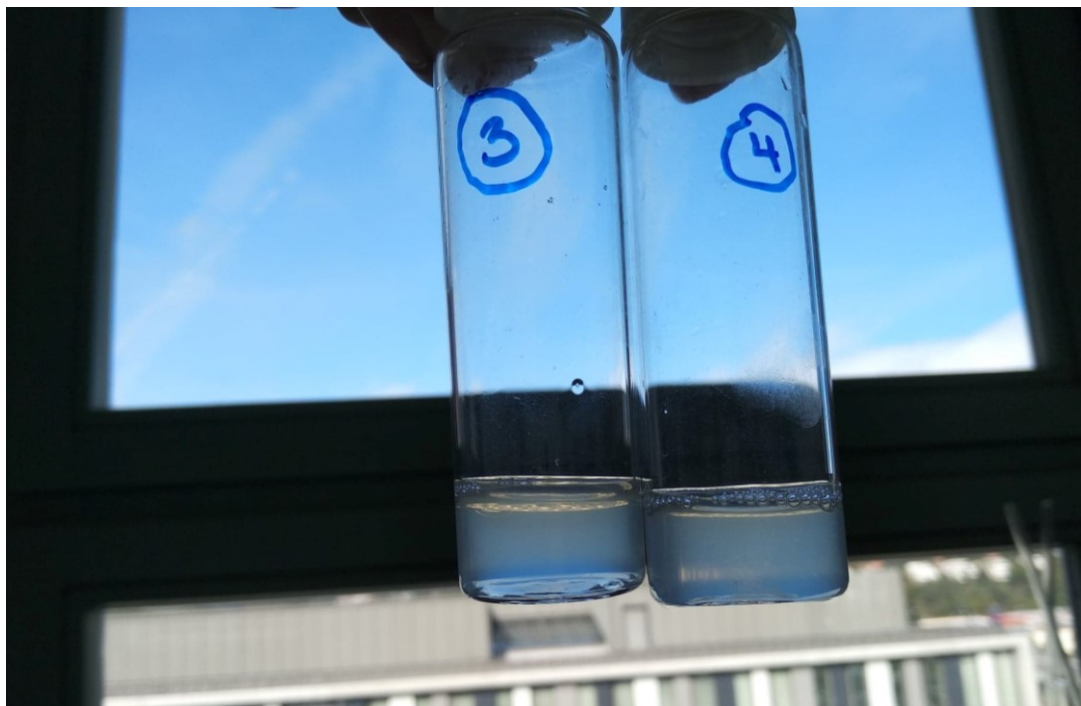
<i>Tab. 1: Další vybrané vlastnosti (přepřacováno dle ECHA,2019).....</i>	<i>10</i>
<i>Tab. 2: Ekotoxické vlastnosti pro vodní org. (přepřacováno dle ECHA,2019).....</i>	<i>11</i>
<i>Tab. 3: Složení MM pro 100 ml.</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 4: Složení MMNF pro 100 ml.</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 5: Složení bezdusíkatého roztoku stopových prvků.</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 6: Přehled utilizace vybraných uhlovodíků jednotlivými kulturami.</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 7: Měření utilizace dodekanu a tetradekanu na Densilamtru.</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 8: Utilizace tetradekanu a oktanu – kontrolní pokus</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 9: Utilizace pyrrolidonu a jeho derivátů.</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 10: Shrnutí utilizace vybraných látek jednotlivými kulturami.</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 11: Stanovení DOC – paralelní vzorky po 10 dnech kultivace.....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 12: Hodnoty DOC [mg/l] v průběhu pokusu</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 13: Hodnoty absorbance kultury Phenylobacterium sp. Dr2 v různých mediích.</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 14: Hodnoty absorbance kultury Phenylobacterium sp. JU4 v různých médiích.</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 15: Průměrné hodnoty absorbance vzorků v čase.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 16: Změny hodnot DOC [mg/l] v čase.....</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 17: Hodnoty DOC nezaočkovaných médií.....</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 18: Stanovení CFU/ml finálních suspenzí</i>	<i>52</i>

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha PI: Vizuální hodnocení utilizace dekanu kulturou *Phenylobacterium* sp. Dr2.

Příloha PII: Průběžné měření OD v MTD na spektrofotometru Tecan, růst bez dusíku II. část.

**PŘÍLOHA P I: VIZUÁLNÍ HODNOCENÍ UTILIZACE DEKANU
KULTUROU *PHENYLOBACTERIUM* SP. DR2.**



**PŘÍLOHA P II: PRŮBĚŽNÉ MĚŘENÍ OD V MTD NA
SPEKTROFOTOMETRU TECAN, RŮST BEZ DUSÍKU II. ČÁST.**

17.2.20 (15:00)													
A1	0,041	0,043	0,041	0,044	0,04	0,036	0,036	0,036	0,047	0,04	0,04	0,042	A3
	0,032	0,032	0,033	0,033	0,036	0,034	0,035	0,037	0,035	0,036	0,038	0,036	
B1**	0,042	0,043	0,048	0,044	0,036	0,039	0,036	0,035	0,045	0,042	0,044	0,046	B2**
	0,032	0,033	0,033	0,034	0,035	0,035	0,037	0,039	0,034	0,034	0,034	0,034	
C1	0,04	0,04	0,041	0,043	0,035	0,039	0,039	0,035	0,044	0,043	0,043	0,045	C2
	0,031	0,033	0,035	0,038	0,035	0,039	0,036	0,037	0,035	0,036	0,036	0,034	
D2	0,041	0,048	0,043	0,044	0,036	0,034	0,034	0,034	0,043	0,043	0,046	0,044	D3
	0,034	0,033	0,037	0,037	0,036	0,038	0,035	0,036	0,033	0,037	0,035	0,036	
** VLOČKY													
19.2.20 (15:00)													
A1	0,041	0,043	0,041	0,044	0,038	0,036	0,034	0,036	0,043	0,038	0,039	0,041	A3
	0,033	0,032	0,033	0,033	0,035	0,033	0,037	0,035	0,034	0,034	0,035	0,036	
B1	0,074	0,075	0,078	0,077	0,036	0,038	0,035	0,034	0,075	0,075	0,076	0,076	B2
	0,032	0,034	0,033	0,034	0,035	0,035	0,037	0,036	0,034	0,034	0,034	0,035	
C1	0,042	0,041	0,041	0,043	0,035	0,037	0,037	0,035	0,043	0,042	0,042	0,051	C2

	0,031	0,035	0,036	0,038	0,036	0,037	0,036	0,035	0,036	0,035	0,035	0,039	
D2	0,078	0,087	0,084	0,084	0,036	0,035	0,039	0,035	0,084	0,086	0,087	0,083	D3
	0,035	0,033	0,036	0,038	0,036	0,038	0,038	0,036	0,038	0,037	0,038	0,039	
21.2.20 (11:30)													
A1	0,039	0,04	0,041	0,042	0,038	0,034	0,034	0,036	0,041	0,038	0,043	0,04	A3
	0,032	0,032	0,034	0,033	0,035	0,032	0,034	0,034	0,034	0,034	0,034	0,035	
B1	0,073	0,073	0,076	0,076	0,034	0,034	0,035	0,034	0,073	0,074	0,074	0,074	B2
	0,032	0,034	0,033	0,035	0,036	0,034	0,035	0,035	0,034	0,034	0,034	0,035	
C1	0,04	0,04	0,04	0,043	0,035	0,036	0,038	0,036	0,042	0,041	0,041	0,044	C2
	0,031	0,033	0,035	0,037	0,034	0,034	0,036	0,035	0,035	0,034	0,034	0,034	
D2	0,073	0,079	0,075	0,075	0,035	0,034	0,034	0,034	0,076	0,076	0,076	0,068	D3
	0,032	0,033	0,041	0,037	0,035	0,037	0,037	0,037	0,035	0,036	0,036	0,037	
28.2.20 (10:00)													
A1	0,038	0,039	0,038	0,041	0,038	0,039	0,04	0,037	0,039	0,037	0,039	0,041	A3
	0,032	0,032	0,034	0,034	0,041	0,034	0,043	0,035	0,04	0,035	0,034	0,038	
B1	0,089	0,078	0,074	0,074	0,037	0,036	0,041	0,035	0,071	0,072	0,072	0,073	B2
	0,032	0,034	0,033	0,037	0,035	0,035	0,042	0,036	0,042	0,037	0,034	0,035	
C1	0,038	0,037	0,037	0,039	0,036	0,037	0,044	0,037	0,04	0,039	0,038	0,04	C2
	0,032	0,036	0,037	0,036	0,041	0,037	0,043	0,037	0,036	0,035	0,036	0,036	
D2	0,072	0,074	0,072	0,073	0,039	0,036	0,042	0,037	0,071	0,072	0,074	0,073	D3
	0,033	0,033	0,035	0,035	0,04	0,038	0,043	0,038	0,034	0,036	0,037	0,036	
6.3.2020 (10:15)													
A1	0,039	0,037	0,039	0,039	0,039	0,038	0,05	0,037	0,039	0,041	0,039	0,042	A3
	0,033	0,032	0,034	0,034	0,037	0,033	0,039	0,035	0,036	0,035	0,034	0,037	
B1	0,086	0,073	0,07	0,072	0,036	0,035	0,04	0,035	0,068	0,067	0,07	0,073	B2
	0,033	0,034	0,033	0,036	0,036	0,035	0,043	0,036	0,037	0,036	0,034	0,035	
C1	0,038	0,037	0,037	0,039	0,036	0,037	0,042	0,036	0,037	0,036	0,036	0,039	C2
	0,033	0,034	0,036	0,036	0,036	0,037	0,041	0,037	0,036	0,034	0,036	0,034	
D2	0,071	0,072	0,07	0,073	0,038	0,037	0,04	0,035	0,07	0,069	0,07	0,072	D3
	0,034	0,034	0,035	0,036	0,037	0,038	0,041	0,038	0,034	0,035	0,036	0,036	