

# **Mikrobiální degradace N-methyl-2-pyrrolidonu v povrchové tekoucí vodě**

Michal Smělík, Dis.

---

Bakalářská práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michal SMĚLÍK, DiS.**  
Osobní číslo: **T10606**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Mikrobiální degradace N-methyl-2-pyrrolidonu  
v povrchové tekoucí vodě**

Zásady pro vypracování:

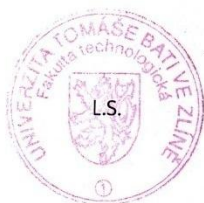
1. Vytipujte běžnou lokalitu tekoucí povrchové vody a proveďte sérii odběrů vzorků.
  2. V odebraných vzorcích stanovte celkový počet psychrofilních a mesofilních heterotrofních bakterií kultivační metodou.
  3. V odebraných vzorcích proveďte testy mikrobiálního rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu.
  4. Pokuste se izolovat mikrobiální kulturu odpovědnou za biodegradaci uvedené sloučeniny.
  5. Získané výsledky zpracujte přehlednou formou a práci odevzdejte v řádném termínu v tištěné i elektronické podobě.
-

Rozsah bakalářské práce:  
Rozsah příloh:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**  
Seznam odborné literatury:  
**Literatura zaměřená na vlastnosti N-methyl-2-pyrrolidonu.**

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
Datum zadání bakalářské práce: **10. února 2014**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **23. května 2014**

Ve Zlíně dne 10. února 2014

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



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

Příjmení a jméno: SMĚLÍK MICHAL

Obor: IOŽP

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 2.5.2014

Michal Smělík

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Tato práce byla zaměřena na problematiku rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu v povrchových tekoucích vodách. Bylo potřeba zjistit, zda se ve vytipovaných lokalitách nachází mikroorganismy, které jsou schopny daný N-methyl-2-pyrrolidon rozložit. Cílem bylo rovněž identifikovat konkrétní mikroorganismy. Biodegradace byla v průběhu experimentů sledována jak visuálně, tak i analyticky, a to stanovením obsahu rozpuštěného organického uhlíku v průběhu degradace. Byla tak stanovena rychlost rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu za definovaných podmínek. Ze vzorků s proběhlou biodegradací byly izolovány mikrobiální kultury schopné rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu a byly zařazeny do příslušné taxonomické skupiny.

Klíčová slova: biodegradace, N-methyl-2-pyrrolidon, bakterie, tekoucí vody

## **ABSTRACT**

This work focuses on the issue of decomposition of N-methyl-2-pyrrolidone in running surface water. It was necessary to find out whether microorganisms with the ability to decompose N-methyl-2-pyrrolidone can be found in selected localities. The aim was to determine whether N-methyl-2-pyrrolidone was really decomposed and to identify specific microorganisms. Biodegradation was observed both visually and analytically by means of content analysis of dissolved organic carbon. The decomposition rate of N-methyl-2-pyrrolidone was assessed as well as its amount under normal conditions. The microorganisms were isolated and classified into appropriate groups.

Keywords: biodegradation, N-methyl-2-pyrrolidone, bacteria, running water

Velmirád bych poděkoval za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost a obětovaný čas, panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. a jeho kolektivu.

Děkuji.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 1-METHYL-2-PYRROLIDON</b> .....	<b>12</b>
1.1    POUŽITÍ.....	12
1.2    VLASTNOSTI.....	12
1.2.1    Toxikologické vlastnosti.....	13
1.2.2    Ekologické informace.....	13
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>14</b>
<b>2 NÁVODY A POSTUPY</b> .....	<b>15</b>
2.1    ŽIVNÉ PŮDY A ROZTOKY POTŘEBNÉ K PRÁCI.....	15
2.1.1    Tryptoneyeastextract agar.....	15
2.1.2    Minerální agar.....	15
2.1.3    Minerální agar s NMP.....	15
2.1.4    Roztok stopových prvků.....	16
2.1.5    Zásobní roztoky solí.....	16
2.1.6    Zásobní roztok minerálů.....	17
2.1.7    Fyziologický roztok.....	17
2.2    VÝBĚR LOKALITY ODBĚRU.....	17
2.2.1    Popis lokality odběru.....	17
2.2.1.1    Dřevnice.....	17
2.2.2    Způsob odběru.....	18
2.3    SLEDOVÁNÍ A STANOVENÍ.....	18
2.3.1    Stanovení celkového počtu heterotrofních bakterií.....	18
2.3.2    Sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu - 1. orientační pokus.....	18
2.3.3    Sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu - 2. podrobný pokus.....	19
2.3.4    Způsob identifikace získaných kultur.....	20
2.3.4.1    Oxidačně-fermentační test.....	20
2.3.4.2    Gramovo barvení.....	20
2.3.4.3    Test na katalasu a cytochromoxidasu.....	21
2.3.4.4    Test na pigmentaci a růstu za různých teplot.....	21
2.3.4.5    NEFERMtest 24.....	21
<b>3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY</b> .....	<b>22</b>
3.1    POMŮCKY.....	22
3.2    POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	22
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>23</b>
4.1.1    Výsledky a zjištění z prvního pokusu rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu.....	23
4.1.2    Provedení druhého, podrobného pokusu rozkladu NMP.....	24
4.1.3    Isolace kultur bakterií schopných rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu.....	29
4.1.3.1    Gramovo barvení.....	29
4.1.3.2    Oxidačně-fermentační test.....	32
4.1.3.3    Test na katalasu.....	32
4.1.3.4    Test na cytochrom-oxidázu.....	33
4.1.3.5    Sledování pigmentace a růstu při teplotách 43°C a 37°C.....	33
4.1.3.6    NEFERMtest 24.....	34
4.1.3.7    Stanovení růstu bakterií při 4°C.....	36



<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>37</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>39</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>40</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>41</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>42</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>43</b>

## ÚVOD

V dnešní době je životní prostředí velkým tématem a problematikou lidstva. Je známo, že čím více se lidstvo rozvíjí a rozrůstá, krajina kolem nás trpí a snižuje se její kvalita.

Proto jsem si vybral tuto problematiku a mohl být nápomocen zlepšit životní prostředí v našem okolí i ve světě. V přírodě se objevují a budou objevovat xenobiotika, což jsou látky člověkem vytvořené a přírodě cizí. Spousta z nich se dostává do ovzduší, půdy a také vod. Proto je potřebné znát jejich vlastnosti a omezit jejich působení škod na minimum, aby nedocházelo k poškození životního prostředí.

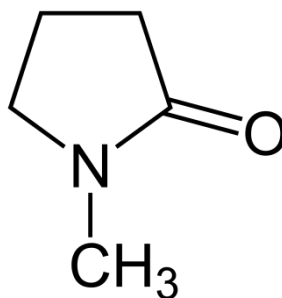
Jedním z přirozených způsobů, jak zabránit jejich hromadění a následné kontaminaci ekosystémů, je jejich biodegradace. Je to určitý způsob rozkladu xenobiotik za pomoci mikroorganismů. Při čištění odpadních vod jde o přirozený proces odstraňování průmyslově používaných sloučenin působením mikroorganismů, které škodlivé látky využívají, jako zdroj živin. Ale jak je tomu v přírodních povrchových tekoucích vodách, kdy mikroorganismy nejsou tak koncentrovány a nemají ideální podmínky jako v čistírnách odpadních vod?

Cílem práce je proto vnést do odebraného vzorku z tekoucích vod xenobiotikum (v tomto případě N-methyl-2-pyrrolidon) a zjistit, zda jsou mikroorganismy v daném vzorku schopny jej rozložit. Dále zjistit, do jaké míry N-methyl-2-pyrrolidon bude rozložen, za jakou dobu a izolovat mikroorganismy, které jsou tohoto procesu schopny.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 1-METHYL-2-PYRROLIDON

1-methyl-2-pyrrolidon –  $C_5H_9NO$  (Obrázek 1) nebo také N-methyl-2-pyrrolidon, anglicky 1-methyl-2-pyrrolidone nebo N-methyl-2-pyrrolidone. Dále už jen jako zkratka NMP. Jedná se o cizorodou stabilní, bezbarvou kapalinu s charakteristickým zápachem po čpavku. Je to monomer a na světle dochází k jeho rozkladu a žloutnutí[1].



Obrázek 1 – Struktura NMP

### 1.1 Použití

Nejznámější využití NMP je v zemědělství, jako důležitá složka v pesticidech, ale také má velmi důležité uplatnění v průmyslu jako rozpouštědlo řady

chemikálií a polymerů. Je také používán ve farmaceutickém průmyslu, za účelem rychlejšího vstřebávání látek skrze pokožku. Za zmínku také stojí jeho využití při zpracování a čištění nerostných surovin jako je ropa a plyn.[2]

### 1.2 Vlastnosti

NMP-za normálních podmínek, což je  $25^{\circ}C$  a tlak 100kPa, je stabilní látka. Je to bezbarvá kapalina schopna vázat vzdušnou vlhkost, s charakteristickým zápachem po čpavku. Kapalina je nehořlavá a je lehce mísitelná s vodou a organickými rozpouštědly (aceton, ethylacetát, ether, benzen atd.). Velmi reaktivní je s kyselinami a zásadami – vznik nebezpečných látek: oxidů dusíku ( $NO_x$ ) a oxidů uhlíku ( $CO$ ,  $CO_2$ ). Teplota rozkladu NMP je  $300^{\circ}C$  a výš[3].

Tabulka 1 – Vlastnosti NMP[4].

<b>Molekulový vzorec:</b>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO
<b>Molární hmotnost:</b>	99,13 g/mol
<b>Hustota (při 20 °C):</b>	1,028 g/cm <sup>3</sup>
<b>Bod tání:</b>	-24 °C
<b>Bod varu:</b>	202 °C
<b>Hodnota pH:</b>	8,5 – 10 (100 g/l, při 20°C)
<b>Viskozita:</b>	1,80 mPa/s
<b>LD<sub>50</sub>:</b>	3914 mg/kg (potkan)

### 1.2.1 Toxikologické vlastnosti

U NMP bylo zjištěno, že má velmi nízkou toxicitu jak při vdechnutí, tak i při styku s pokožkou. Způsobuje středně silné podráždění očí. Při vniknutí látky do těla orální cestou je přeměněn na 5-hydroxy-N-methyl-2-pyrrolidon a 80% této látky je do 24 hodin vyloučeno močí ven z těla.

Při testování na hlodavcích byly zjištěny tyto letální dávky: LD<sub>50</sub>>3600mg/kg orálně, LD<sub>50</sub>>8000 mg/kg dermálně, LD<sub>50</sub>>1,7 mg/l/4h na celé tělo[3].

NMP nebyl prokázán jako karcinogenní a dle Evropské unie byl od roku 2006 NMP zařazen do 2. kategorie reprodukční toxicity (nebezpečný pro plod a jeho vývoj) [5].

### 1.2.2 Ekologické informace

Bioakumulace NMP v organismech je nepravděpodobná, vzhledem k hodnotě rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda. Podle kritérií OECD je NMP biologicky odbouratelný, k biodegradaci v odpadních vodách dochází, a to více než z 90% [3].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 2 NÁVODY A POSTUPY

### 2.1 Živné půdy a roztoky potřebné k práci

#### 2.1.1 Tryptoneyeastextract agar

Tryptoneyeastextract agar, dále jen TYA agar, byl připraven smícháním 4,2g TYA agaru od výrobce (Himedia, India) a 200ml destilované vody. Po důkladném promíchání a rozpuštění byl TYA agar sterilován v autoklávu při 125°C po dobu 25minut. Po sterilizaci byl ochlazen na cca 50°C a nalit do sterilních Petriho misek tak, aby vznikla po celé ploše misky souvislá vrstva zhruba 4mm. Aplikace TYA agaru do misek byla provedena ve sterilním mikrobiologickém boxu za účelem minimalizace kontaminace. (viz příloha PII).

#### 2.1.2 Minerální agar

Pro přípravu minerálního agaru bylo nejprve zapotřebí připravit směs biogenních prvků. Směs se skládala z  $K_2HPO_4$  0,100g,  $NH_4Cl$  0,110g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,020g,  $CaCl_2$  0,002g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,005g a agaru 1,600g. Tato směs byla suspendována ve 100ml destilované vody a na závěr bylo přidáno 0,2ml roztoku stopových prvků. Celý roztok byl sterilizován při teplotě 125°C po dobu 25minut. Hodnota pH minerálního agaru se musí nacházet v rozmezí 7,2-7,4, což jsou vhodné podmínky pro většinu mikroorganismů.

#### 2.1.3 Minerální agar s NMP

Příprava je obdobná jako v kapitole 2.1.2. jen s rozdílem, že po sterilizaci byl přidán sterilní 10% roztok N-methyl-2-pyrrolidonu v množství 1 ml na 100 ml (koncentrace NMP 1 g/l). Celá směs byla důkladně promíchána a opět byla ve sterilním mikrobiologickém boxu rozlita do sterilních Petriho misek.

### 2.1.4 Roztok stopových prvků

Všechny stopové prvky byly naváženy v množství podle tabulky a rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

Tabulka 2 – Složení roztoku stopových prvků

<b>MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	0,043g
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	0,057g
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0,043g
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub></b>	0,03 g
<b>Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	0,025g
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	0,040g

### 2.1.5 Zásobní roztoky solí

Každá sůl byla navážena v množství podle tabulky a poté rozpuštěna ve 100ml destilované vody.

Tabulka 3 – Složení zásobních roztoků solí

<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	1,0g
<b>Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	0,3g
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	0,1g
<b>NaCl</b>	0,5g
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	3,0g



### 2.1.6 Zásobní roztok minerálů

Do zásobní láhve bylo dávkováno 70ml destilované vody a přidány tyto roztoky fosforečnanů:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o koncentraci 9,07 g/l (2ml)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  o koncentraci 23,90 g/l (8ml)

Zásobní roztoky solí (viz výše, každý 1ml)

Roztok stopových prvků (0,1ml)

Nakonec byl roztok doplněn do objemu 100 ml destilovanou vodou.

### 2.1.7 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním NaCl o hmotnosti 8,5g v 1 litru destilované vody.

## 2.2 Výběr lokality odběru

### 2.2.1 Popis lokality odběru

Pro odběr vzorků byla vybrána řeka Dřevnice z důvodů:

Splnění podmínky přírodní tekoucí povrchová voda.

Z důvodu, že se tok nachází v blízkém okolí.

Místo odběru bylo ve Zlíně, pod baťovským průmyslovým areálem, z pravého břehu ve směru toku, konkrétně u benzínové pumpy OMV (naproti Havlíčkova nábřeží, souřadnice místa: 49.227787, 17.657960).

Odběry byly provedeny dvakrát: dne 26. 3. 2012 a dne 1. 10. 2012.

Řeka v den prvního odběru (26.3.2012 v 11:00) byla klidná a její výška hladiny byla víceméně v normálu. Voda nebyla nijak výrazně zakalena a v řece a jejím okolí bylo možno pozorovat různé druhy ryb a ptactva (viz příloha 1). Počasí v předešlém týdnu bylo slunečné, bez srážek a nárazového větru. Teplota vzduchu byla 17°C a vody 11°C.

Dne 1. 10. 2012 se řeka jevila opět v normálním stavu, nebylo pozorováno žádné výrazné zakalení toku nebo zvýšení hladiny. Teplota vzduchu 15°C a vody 15°C. (viz příloha 1).

#### 2.2.1.1 Dřevnice

Dřevnice je levostranný přítok řeky Moravy ve Zlínském kraji. Délka toku je 42,3 km.

Plocha povodí měří 434,6 km<sup>2</sup>. Řeka pramení na jihu Hostýnských vrchů, zhruba 3 km

severně od obce Držková, v nadmořské výšce 551 m.

Protéká Slušovicemi, Zlínem a Otrokovicemi, u kterých se vlévá zleva do řeky Moravy v nadmořské výšce 182 m.

### **2.2.2 Způsob odběru**

Odběr byl prováděn do již označené sterilní láhve o objemu 500 ml, do které bylo odebráno cca 300ml vzorku. Do nádoby byla nabrána pouze voda bez nečistot a usazenin ze dna koryta řeky. V láhvi bylo ponecháno dostatečné množství kyslíku z důvodu zachování přírodních aerobních dějů (viz příloha PI). V tentýž den byl vzorek transportován v temnu do laboratoře a následně ihned zpracován. Doba transportu trvala 5 minut.

## **2.3 Sledování a stanovení**

### **2.3.1 Stanovení celkového počtu heterotrofních bakterií**

Pro stanovení celkového počtu heterotrofních bakterií bylo zapotřebí vzorky naředit. Ředění se provádělo za pomoci již připraveného sterilního fyziologického roztoku. Stupeň ředění byl proveden 10x, 100x, 1000x, a 10 000x, aby byla možnost co nejpřesnějšího pozdějšího odečtu kolonií. Do Petriho misek byly kápnuty ředěné roztoky, o ředění  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , a to vždy 4 misky pro každé ředění, přičemž 2 misky z každého ředění byly kultivovány psychrofilně (při 20°C) a 2 misky mezofilně (při 37 °C). Vzorky byly přelity TYA agarem a ponechány zhruba 10minut ztuhnout. Po ztuhnutí byly uloženy do termostatů s již zmíněnými teplotami.

### **2.3.2 Sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu - 1. orientační pokus**

Bylo odměřeno po 50ml vzorku vody ze zásobní odběrové láhve a nadávkováno do tří sterilních láhví. Po té do každé láhve bylo přidáno 0,5ml sterilního zásobního roztoku minerálních solí. Následně, ale už jen do dvou, byl přidán sterilní 10% roztok NMP o objemu 150 $\mu$ l. Díky tomu vznikla koncentrace NMP 300mg/l. Láhve byly označeny, aby nedošlo k záměně a kultivovány na třepačce při 25°C. V následujících dnech byla prováděna vizuální kontrola, kde byl pozorován zákal ve vzorcích. Z lahví byly odebírány vzorky, ze kterých se pomocí centrifugy (přetížení 10 000 g, 12 minut, při 15°C) odloučily buňky a z čirého vzorku bylo dále provedeno stanovení celkové koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Stanovení DOC bylo provedeno

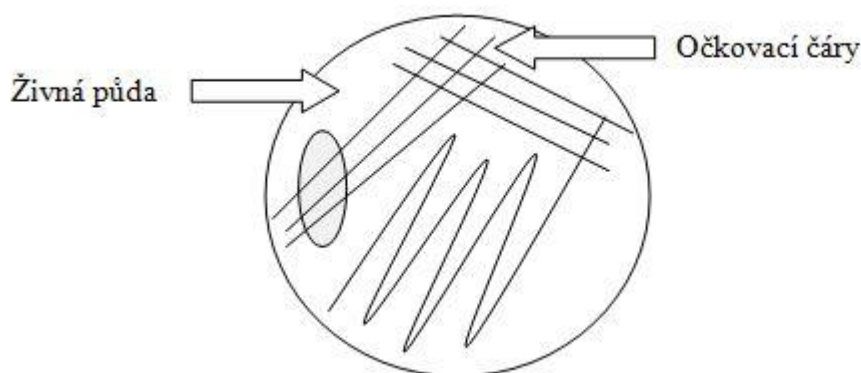
na laboratorním přístroji pro analýzu uhlíku Shimadzu 5000A odborným personálem ÚIOŽP UTB.

### **2.3.3 Sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu - 2. podrobný pokus**

Do 5 sterilních lahví (500ml) bylo sterilním válcem nadávkováno po 60ml vzorku ze zásobní odběrové láhve. Do každé láhve byl přidán sterilní zásobní roztok minerálních solí (po 0,6ml) a do 4 lahví bylo přidáno 180 $\mu$ l sterilního 10 % roztoku NMP. Tak aby opět vznikla koncentrace 300mg/l. Po důkladném promíchání všech lahví bylo z každé láhve s NMP odebráno po 3ml pro stanovení výchozí hodnoty DOC a zároveň byly odebrány dva vzorky po 3ml z láhve bez NMP. Vzorky byly zfiltrány přes ultrafiltr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m a ty, které obsahovaly NMP, byly zředěny v poměru 2:1 destilovanou vodou (4ml destilované vody a 2ml filtrátu). Všechny láhve byly kultivovány při 25°C na třepačce a v určitých časových intervalech (2-3 dny) byly z lahví obsahujících NMP odebrány vzorky o objemu 3ml. Každý odebraný vzorek byl stejným způsobem přefiltrován, dále rozředěn v poměru 2:1 destilovanou vodou (4ml destilované vody a 2ml filtrátu). Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí automatického analyzátoru uhlíku Shimadzu 5000A, kde bylo provedeno stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku.

### **Isolace bakterií schopných rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu**

Na již připravenou sterilní živnou půdu obsahující minerální agar s NMP byly sterilní mikropipetou přidány 2 $\mu$ l vzorku a ty rozetřeny po celé ploše sterilní skleněnou zahnutou tyčinkou (dále jen tzv. hokejkou), tedy metodou roztěru. Stejným způsobem byla naočkována i miska jen s minerálním agarem (bez NMP). Petriho misky s takto připravenou kulturou se nechaly kultivovat po dobu 7 dnů v kultivátoru za konstantní teploty 25°C. Kolonie, které narostly na misce s NMP a nebyly patrné na misce bez NMP, byly dále přeočkovány do dalších 3 Petriho misek. Jedna miska obsahovala stejný minerální agar s NMP, druhá universální TYA agar a do třetí pro porovnání byl opět použit čistý minerální agar bez NMP. Očkování tentokrát bylo provedeno tzv. křížovým roztěrem, viz. obrázek č.2.



Obrázek 2 – Křížový roztěr na PM

### 2.3.4 Způsobidentifikace získaných kultur

#### 2.3.4.1 Oxidačně-fermentační test

Látky uvedené v tabulce 4 byly rozpuštěny ve 100ml destilované vody. Dále byl přidán v malém množství agar (0,3 g) a celá směs se rozpustila na vodní lázni. Dále byla upravena hodnota pH na 7,2-7,4. Agarová směs byla rozlita do zkumavek a ty byly sterilovány v autoklávu při 115°C 35minut. Sterilní médium zelené barvy bylo zaočkováno vpichem mikrobiologické kličky s izolovanou kulturou do média. Takto zaočkováná živná půda se nechala kultivovat. V případě fermentujících bakterií se barva živné půdy mění během inkubace ze zelené do žluta a to v celé části vpichu. Pokud barva zůstane nezměněna nebo dojde ke změně jen v povrchové vrstvě média, jedná se o bakterie nefermentující.

Tabulka 4 – Složení média pro oxidačně-fermentační test

Pepton	0,2 g
NaCl	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,03 g
Bromthymolová modř	0,006 g
Glukosa	1,0 g

#### 2.3.4.2 Gramovo barvení

Na sterilní podložní skličko byla nanášena suspenze bakteriální kultury. Skličko s kulturou se nechalo vysušit a následně zafixovat pomocí plamene. Na fixované místo se nanášelo několik kapek roztoku krystalové violeti a nechalo se působit po dobu 60

sekund. Následně byl přebytek slit a bylo přidáno několik kapek Lugolova roztoku a nechalo působit opět 60 sekund. Po uplynutí doby byl přebytek spláchnut destilovanou vodou a vymýván etanolem dokud se nezbavilo přebytečného barviva (cca 20 sekund). Zbytek etanolu byl ještě jednou opláchnut destilovanou vodou a nechán okapat. Dále na sklíčko bylo nakapáno několik kapek karbolfuchsinu a ponecháno 60 sekund působit. Ke konci byl celý preparát opět důkladně opláchnut destilovanou vodou a nechán oschnut pro následné mikroskopování. Na sklíčko byla nanesena kapka imerzního oleje a provedeno pozorování při zvětšení 1000 x. Podle uspořádání buněčné stěny se bakterie obarví modře (gram pozitivní) nebo červeně (gram negativní). Jedná se o základní dělení bakterií.

Velikost buněk byla měřena pomocí softwaru QuickPHOTO PRO 2.1 firmy Olympus.

#### **2.3.4.3 Test na katalasu a cytochromoxidasu**

Přítomnost enzymu katalasy, který dokáže rozkládat peroxid vodíku, byl proveden následným způsobem: část odebrané kultury z Petriho misky byla přenesena do 3% kapky peroxidu vodíku na podložním sklíčku. V případě, že kultura vytvářela katalasu, docházelo k tvoření bublinek v kapce (tvorbě kyslíku).

#### **2.3.4.4 Test na pigmentaci a růstu za různých teplot**

Vzorky izolovaných kultur byly přeočkovány na TYA agar roztěrem do Petriho misek a kultivovány při 43°C a 37°C. V následujících dnech byl pečlivě sledován růst kolonií a zabarvení jak kultur, tak i zabarvení živné půdy.

#### **2.3.4.5 NEFERMtest 24**

Pro další podrobnější identifikaci bakterií byla použita komerční test NEFERMTEST 24 (PLIVA-LACHEMA, Brno), což je sterilní destička s 24 jamkami, obsahující specifické typy živných půd o různém složení. Test je určen pro identifikaci gramnegativních nefermentujících bakterií. Jedna část destičky (3 řádky, tj. 24 testů) je určena pro identifikaci jedné kultury; to znamená, že do každé jamky je nutno naočkovat po 0,1ml suspendované kultury. Takto naočkováná destička se uzavře do sterilního sáčku a nechá se kultivovat při 30°C 48 hodin (viz. příloha P V). Po získání výsledků se data zadají do softwaru TNW, který byl vyvinut právě pro NEFERMtest24.

### **3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY**

#### **3.1 Pomůcky**

Bylo použito běžné vybavení mikrobiologických laboratoří. Nejčastěji byly použity Petriho misky, mikrobiální kličky, filtry, láhve různých objemů a řada dalších. A však nejdůležitější bylo použít většinu pomůcek sterilních, aby nedošlo k nežádoucí kontaminaci z okolí a znehodnocení vzorků (výsledků).

#### **3.2 Použité přístroje**

Analyzátor TOC 5000A – Shimadzu, Japonsko

Autokláv LaM-MCS – SANOclav, Německo

Centrifuga MR23i – Jouan, Francie

Fotoaparát OLYMPUS

Laboratorní rotační třepačka

Laboratorní termostaty

Mikrobiologický box II A – Telstar, Španělsko

Mikroskop Olympus CX 41 (Japonsko)

Mrazicí box (Biotech, a.s.)

Počítač se softwarem TNW - (PLIVA – Lachema, Brno)

Počítačka kolonií

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1.1 Výsledky a zjištění z prvního pokusu rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu

První pokus by se dal nazvat jako orientační a byl použit pouze k základnímu zjištění, kolik se ve vzorku nachází heterotrofních bakterií a zároveň zda vůbec dokážou rozkládat N-methyl-2-pyrrolidon za běžných podmínek tekoucích povrchových vod.

Nejprve byl stanoven ve vzorku celkový počet heterotrofních psychrofilních a mezofilních bakterií, na jeden ml. Ředění bylo při nasazení kultivace odhadnuto na  $10^{-3}$ , ale z důvodu malého počtu vyrostlých kolonií bylo provedeno opakované očkování, se zředěním jen  $10^{-1}$ . Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 – Počty bakterií v odebrané vodě na 1ml

Skupina bakterií	KTJ/ml
Psychrofilní bakterie	$8,6 \cdot 10^3$
Mezofilní bakterie	$6,4 \cdot 10^2$

U pokusu zjištění rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu ve vzorku vody byly připraveny 3 kultivační sterilní láhve a do láhví 1 a 2 bylo přidáno 150 $\mu$ l 10% roztoku NMP pro koncentraci 300mg/l. Láhve byly kultivovány na třepačkách a z počátku každý den pozorovány. V prvních dvou dnech od kultivace se láhve jevily beze změny. V třetím dni od kultivace byl v lahvích s NMP pozorovatelný „mléčný“ zákal a čtvrtý den se v lahvích vytvářely také shluky vloček, které vytvářely drobné hrudky v tekutině. Zákal byl považován za ukazatel růstu mikroorganismů a tedy za ukazatel procesu rozkladu NMP ve vzorcích, proto bylo provedeno stanovení rozpuštěného organického uhlíku v lahvích 1 a 2, a to vždy ve dvou paralelních stanoveních, označených a) a b). Celkové množství rozpuštěného organického uhlíku v lahvích ve třetím a pátém dni pokusu je uvedeno v tabulkách číslo 6 a 7.

Tabulka 6 – Koncentrace DOC po 3 dnech kultivace.

Vzorek	DOC [mg/l]	Průměr DOC [mg/l]
1a)	175,92	175,67
1b)	175,41	
2a)	142,12	142,1
2b)	142,08	
3a (bez NMP)	7,64	8,88
3b (bez NMP)	10,11	

V tabulce č. 6 lze vyčíst, že v láhvi 2 došlo k určité spotřebě NMP než v lahvi číslo 1. I přes patrný úbytek NMP v lahvi 2 však byla koncentrace DOC ještě pořád poměrně vysoká (v porovnání s hodnotami v lahvi číslo 3, proto se láhve ponechaly kultivovat další 2 dny.

Tabulka 7 – Koncentrace DOC po 5 dnech kultivace

Vzorek	DOC [mg/l]	Průměr DOC [mg/l]
1 a	53,41	53,2
1b	52,98	
2 a	42,78	42,42
2 b	42,05	
3a (bez NMP)	4,21	4,4
3b (bez NMP)	4,58	

Z tabulky 7 lze vypořadovat, že pátý den pokusu již v lahvičkách 1a 2 probíhal zřejmý mikrobiální proces, kdy bakterie využívaly NMP jako substrát a tím docházelo k jeho spotřebovávání a snižování DOC. Bylo proti třetímu dni pokusu zřetelné, že DOC ubývá a není potřeba provádět další měření, až do úplného spotřebování DOC. Tomu byla věnována pozornost v druhém pokusu.

#### 4.1.2 Provedení druhého, podrobného pokusu rozkladu NMP

Druhý pokus probíhal z počátku obdobně jako první. Byly odebrány nové vzorky povrchové tekoucí vody, dne 1. 10. 2012. Cílem bylo opět zjistit celkové počty heterotrofních psychrofilních a mezofilních bakterií a zjistit průběh rozkladu N-methyl-



2-pyrrolidonu ve vzorcích vody. Jelikož z prvního pokusu bylo zjištěno malé množství heterotrofních bakterií, bylo provedeno ředění  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ . Výsledky jsou uvedeny v tabulce číslo 8

Tabulka 8 – Počty bakterií v odebrané vodě na 1ml

Skupina bakterií	KTJ/ml
Psychrofilní bakterie	$1,2 \cdot 10^5$
Mezofilní bakterie	$1,2 \cdot 10^5$

Z tabulky č. 8 je patrný značně vyšší počet bakterií než ve vzorku z jarního pokusu. Je to zřejmě způsobeno tím, že přes léto a teplejší měsíce narůstá ve vodních tocích biomasa a tím i samozřejmě bakterie. Proto bylo dodatečně provedeno zředění vzorku  $10^{-4}$  (tabulka č. 8).

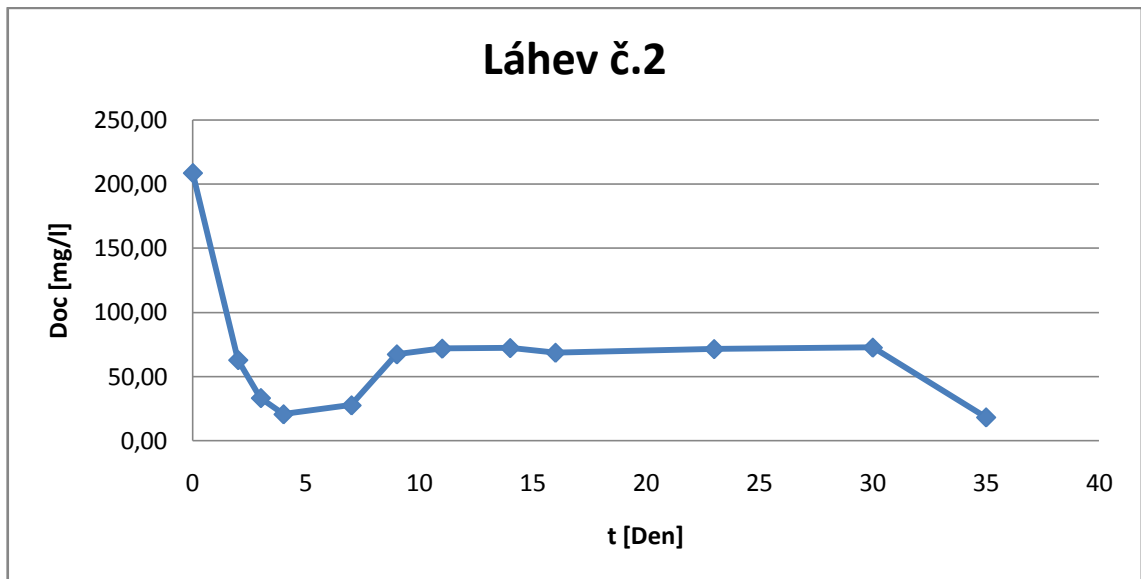
Sledování rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu bylo provedeno v 5 sterilních láhvích o obsahu 500ml. Do všech pěti láhví byl dán vzorek vody a do lahví č. 2-5 ještě přidán 10% zásobní roztok N-methyl-2-pyrrolidonu, pro získání koncentrace 300mg/l. Láhve byly důkladně promíchány a kultivovány na třepačkách při 25°C. V den kultivace a v následujících dnech byly prováděny odběry pro stanovení DOC a také bylo prováděno pozorování zákalu. Již druhý den od zahájení pokusu byl v láhvi č.2 pozorovatelný bílý zákal s prstencem nečistot na hladině. Třetí den se zákal s prstencem nečistot vytvořil i u láhví 3,4 a 5. V láhvi bez NMP byl stav totožný jako na počátku, jen se také vytvořil prsteneček nečistot na hladině. V sedmém dni pokusu zákal začal ustupovat a během dvou dnů se kapalina vyčeřila a na hladině zůstaly jen shluky větších vloček (viz příloha PIII). U čistého vzorku bez NMP k zákalu nedošlo, vločky se také vytvořily, ale v podstatně menším množství a o menší velikosti. Dále do ukončení pokusu v láhvích neproběhla žádná změna. Výsledky stanovení DOC jsou uvedeny v tabulce č.9.

Tabulka 9 – Koncentrace DOC ve vzorcích vody všech čtyř láhví

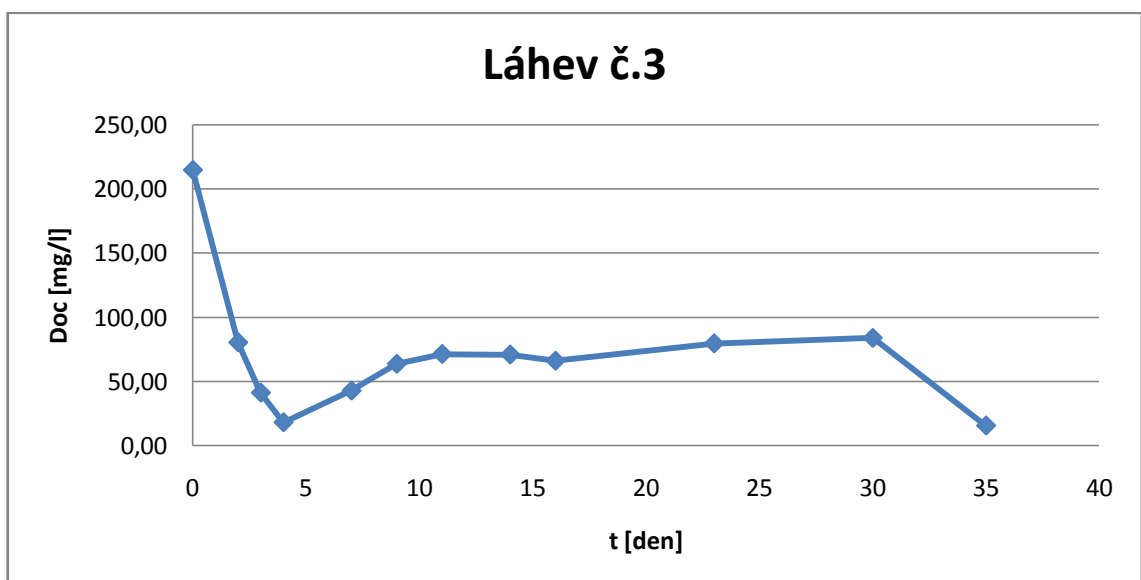
Datum stanovení	2. láhev	3. láhev	4. láhev	5. láhev	den
	DOC [mg/l]	DOC [mg/l]	DOC [mg/l]	DOC [mg/l]	
1.10.2012	208,60	215,00	204,80	/	0
3.10.2012	62,86	80,42	49,74	/	2
4.10.2012	33,28	41,14	40,54	/	3
5.10.2012	20,64	18,04	19,14	/	4
8.10.2012	27,60	42,72	18,46	/	7
10.10.2012	67,34	63,64	66,46	/	9
12.10.2012	71,78	71,36	59,58	/	11
15.10.2012	72,24	70,90	61,34	/	14
17.10.2012	68,60	66,04	51,88	/	16
24.10.2012	71,44	79,60	65,98	/	23
31.10.2012	72,58	83,90	72,12	/	30
5.11.2012	18,24	15,48	15,22	15,496	35

Z výsledků uvedených v tabulce číslo 9 je patrné, že průběh degradace NMP byl velice podobný ve všech 4 láhvích. V páté láhvi nebyl prováděn pravidelný odběr, protože láhev sloužila jako záložní a ke zjištění konečného DOC bez pravidelného zásahu a odběru vzorků.

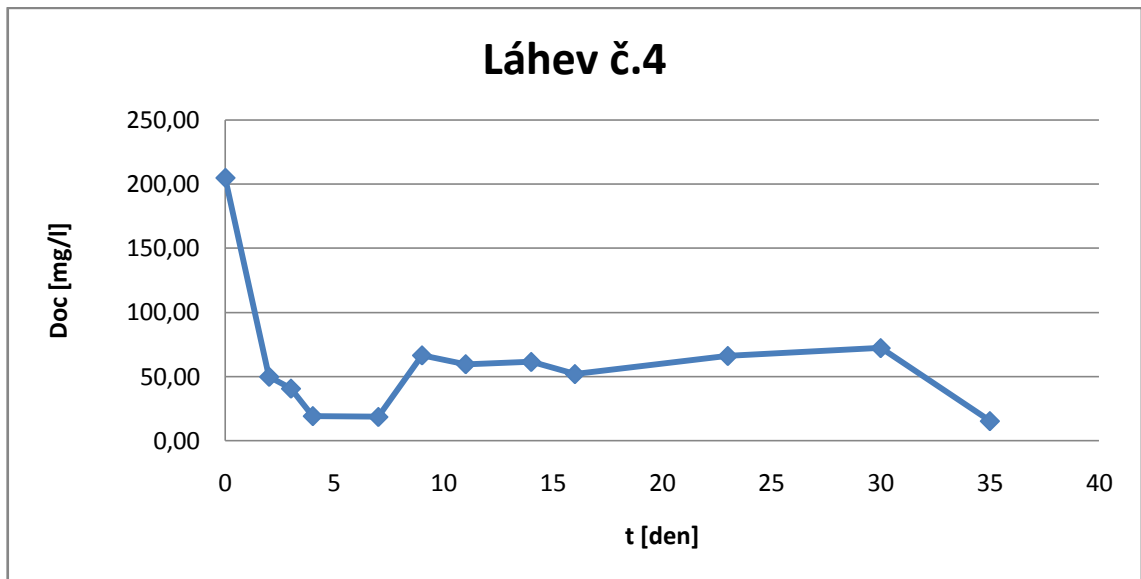
Data byla zpracována a zanesena do grafů. V grafech je znázorněna koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v mg/l v časovém období pokusu.



Obrázek 3 – Graf biodegradace NMP ve 2. láhvi

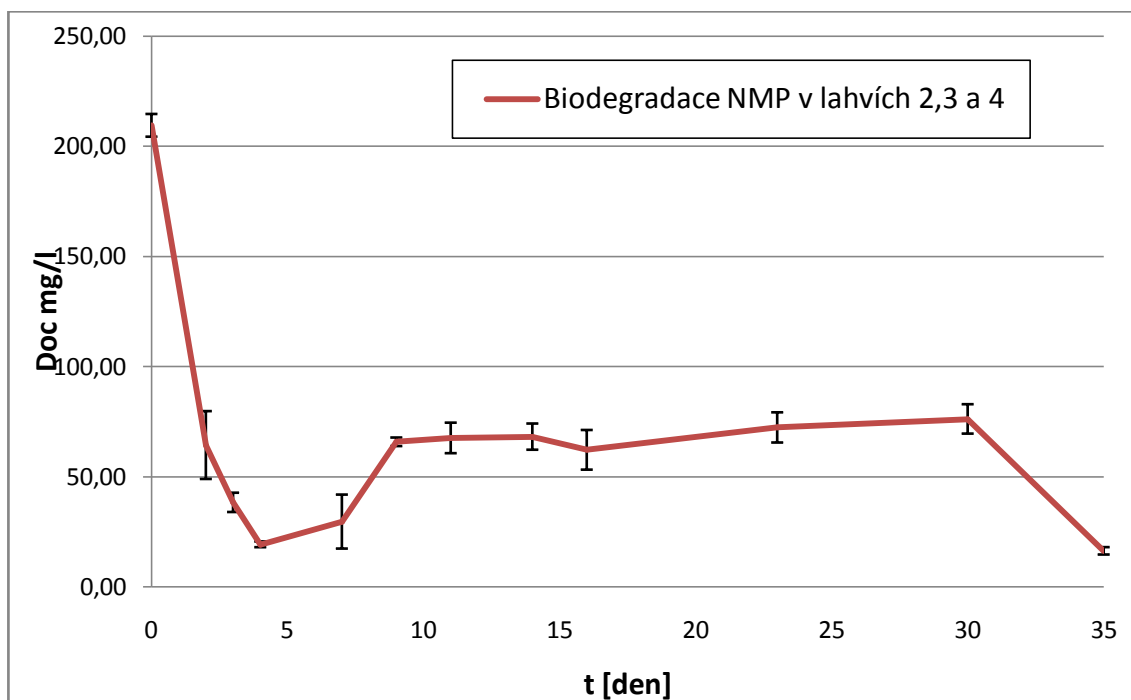


Obrázek 4 – Graf biodegradace NMP ve 3. láhvi



Obrázek 5 - Graf biodegradace NMP ve 4. láhvi

Pro porovnání průběhu biodegradace v těchto láhvích jsou všechny grafy zaneseny do jednoho, kde je patrné, že biodegradace probíhala ve všech lahvích prakticky totožně.



Obrázek 6 – Graf biodegradace NMP ve 2., 3. a 4. láhvi – průměr a chybové úsečky

Z grafů je zřetelné, že biodegradace probíhala nejrychleji v první 4 dny od zahájení pokusu. Poté začala DOC znovu narůstat k hodnotám v rozmezí 50 – 80mg/l. To bylo

pravděpodobně způsobeno odumíráním a rozkladem mikroorganismů, které spotřebovaly dostupný substrát, což bylo spojeno s uvolněním DOC do prostředí. Ovšem i tento DOC byl následně spotřebován a hodnoty se vrátily na původní minimum po 35 dnech pokusu.

#### **4.1.3 Isolace kultur bakterií schopných rozkladu N-methyl-2-pyrrolidonu**

Tato část byla zaměřena na izolaci kultur bakterií, které jsou schopny rozkládat N-methyl-2-pyrrolidon. Vzorky byly odebrány z lahví, které byly použity v předchozím pokusu, po ukončení kultivace, a to z důvodu, že se zde nacházely největší koncentrace bakterií, jež jsou schopny biodegradace N-methyl-2-pyrrolidonu. Tyto vzorky byly naočkovány na minerální agar s NMP a na čistý minerální agar a kultivovány. Následně z takto připravených kultur byly rozočkovány na další agary s NMP a byly vypěstovány dvě rozdílné kultury. Těmto se výrazně dařilo růst na agaru s NMP, zatímco na samotném minerálním agaru bez NMP téměř netvořily kolonie a jejich růst trval mnohem déle. Tyto kultury byly dále naočkovány na TYA agar pro zjištění, zda jsou schopny využívat i běžné organické látky. Takto izolované kultury byly následně podrobeny níže uvedeným testům za účelem jejich identifikace. Z prvního odběru a pokusu byly izolovány 2 kultury pod označením **MS 1** a **MS 2**. Z druhého odběru a pokusu byly izolovány 2 kultury pod označením **MS Y** a **MS Z** (viz příloha P IV).

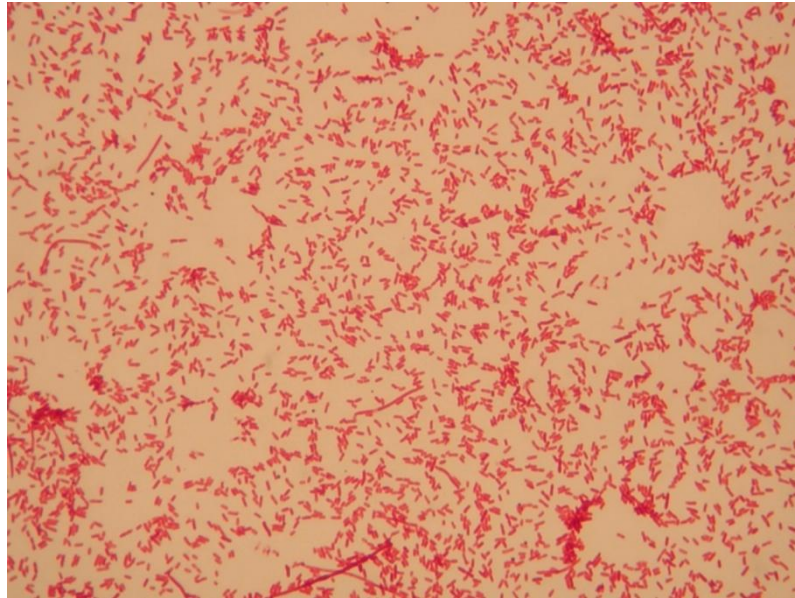
##### **4.1.3.1 Gramovo barvení**

Gramovo barvení bylo provedeno u všech 4 izolovaných kultur s těmito výsledky:

###### Kultura MS 1

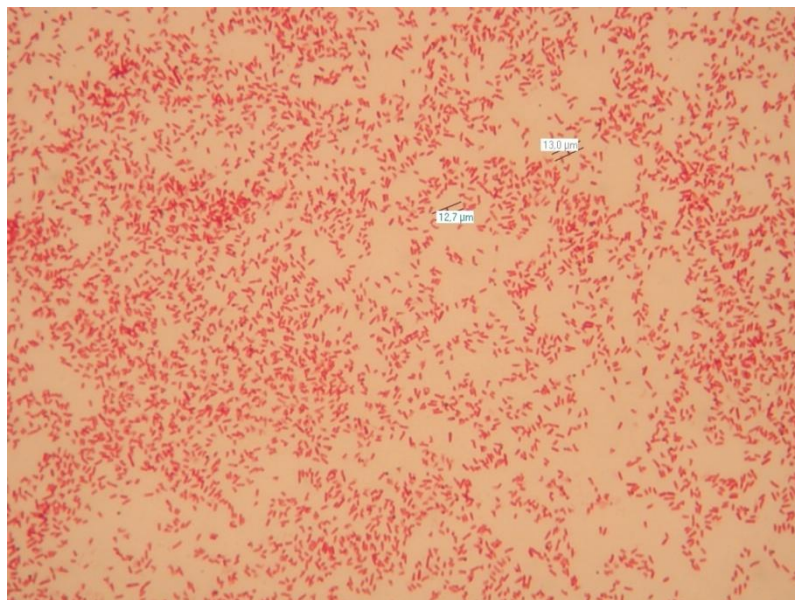
Popis: Gramnegativní tyčinky se zaoblenými konci, různé délky. Včetně krátkých vláken. Uspořádané jednotlivě nebo ve dvojicích.

Délka: u vláken 8,4 – 1,5 $\mu$ m a u malých buněk 1 – 1,5 $\mu$ m.

Obrázek 7 - G<sup>-</sup> kultura MS 1Kultura MS 2

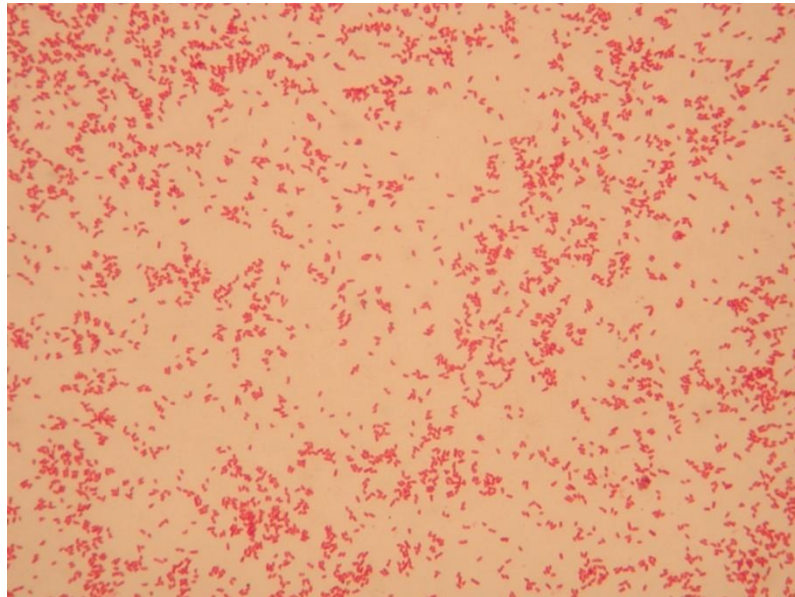
Popis: Gramnegativní krátké tyčinky, zaoblené konce, různé délky. Jednotlivě nebo v párech.

Délka: 0,5 - 0,7 $\mu$ m.

Obrázek 8 - G<sup>-</sup> kultura MS 2Kultura MS Y

Popis: Gramnegativní tyčinky se zaoblenými konci, různé délky. Včetně krátkých vláken. Uspořádané jednotlivě nebo ve dvojicích.

Délka: 1,1 – 1,4 $\mu$ m.

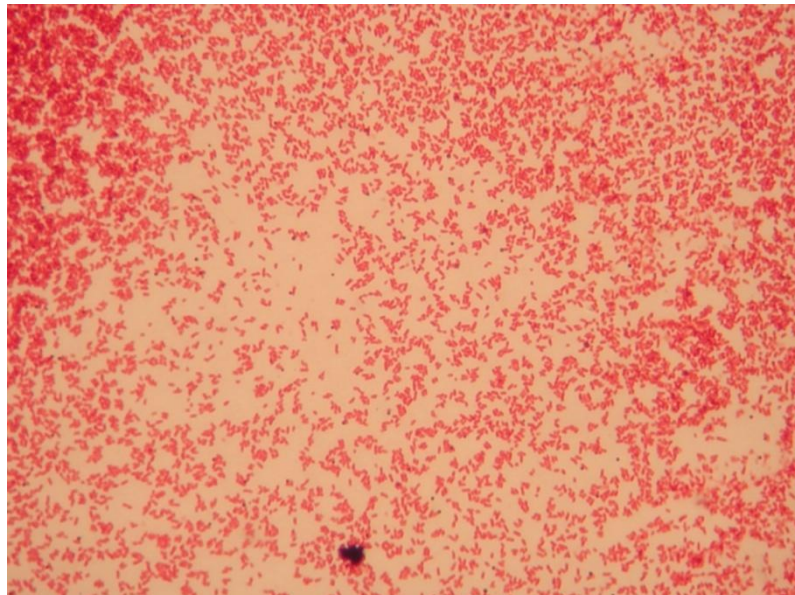


Obrázek 9 - G<sup>-</sup> kultura MS Y

#### Kultura MS Z

Popis: Gramnegativní tyčinky se zaoblenými konci, různé délky. Včetně krátkých vláken. Uspořádané jednotlivě nebo ve dvojicích.

Délka: 1,2 – 1,3 $\mu$ m.



Obrázek 10 - G<sup>-</sup> kultura MS Z

#### 4.1.3.2 Oxidačně-fermentační test

Test byl proveden u všech čtyř kultur a výsledky jsou uvedeny níže v tabulce č.10.

Tabulka 10 – oxidačně-fermentační test kultur

Kultura	Využití glukosy		Typ metabolismu
	Aerobní	Anaerobní	
MS 1	+	-	Nefermentující
MS 2	+	-	Nefermentující
MS Y	+	-	Nefermentující
MS Z	+	-	Nefermentující

U vzorků MS 1 a MS 2 byl pozorován intenzivnější rozklad glukosy, než u vzorků MS Y a MS Z, kde k rozkladu docházelo jen na úzkém povrchu.

#### 4.1.3.3 Test na katalasu

Test byl poměrně jednoduchý a jednoznačný: všechny kultury dokázaly rozkládat peroxid vodíku. Na podložním sklíčku bylo zřetelně vidět tvořící se bublinky kyslíku, které vznikají při rozkladu peroxidu vodíku. Výsledky jsou zahrnuty do tabulky č.11.

Tabulka 11 – Test na katalasu

Kultura	Katalasa
MS 1	Pozitivní
MS 2	Pozitivní
MS Y	Pozitivní
MS Z	Pozitivní



#### 4.1.3.4 Test na cytochrom-oxidázu

Komerčně zakoupené testy pro zjištění cytochrom-oxidázy (OXI-test LACHEMA) se při styku s kulturou zabarvily do modra. Dle přibaleného návodu takto zabarvené papírky potvrzují přítomnost cytochrom-oxidázy a výsledky jsou uvedeny v tabulce č.12.

Tabulka 12 – test na cytochrom-oxidázu

<b>Kultura</b>	<b>cytochrom-oxidáza</b>
<b>MS 1</b>	<b>Pozitivní</b>
<b>MS 2</b>	<b>Pozitivní</b>
<b>MS Y</b>	<b>Pozitivní</b>
<b>MS Z</b>	<b>Pozitivní</b>

#### 4.1.3.5 Sledování pigmentace a růstu při teplotách 43°C a 37°C

Další částí bylo zjistit, zda dané kultury tvoří fluorescentní pigment a zda jsou schopny růst ve vyšších teplotách, a to při 37 a 43°C.

Bylo zjištěno, že všechny kultury jsou schopny růstu při 37°C, nikoliv však při 43°C, viz. příloha IV.

Tabulka 13 – test na pigmentaci

<b>Vzorek</b>	<b>Pigmentace</b>
<b>MS 1</b>	<b>Negativní</b>
<b>MS 2</b>	<b>Pozitivní</b>
<b>MS Y</b>	<b>Negativní</b>
<b>MS Z</b>	<b>Pozitivní</b>

4.1.3.6 NEFERMtest 24

NEFERMtest 24 lze použít pouze pro gramnegativní nefermentující bakterie. Tuto podmínku splňovaly všechny 4 kultury. Každá kultura byla naočkována do vlastní části destičky NEFERMtestu a kultivována. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 14 –17.

Tabulka 14 – NEFERMtest 24 pro kulturu MS 1

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

Tabulka 15 – NEFERMtest 24 pro kulturu MS 2

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

Tabulka 16 – NEFERMtest 24 pro kulturu MS Y

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

Tabulka 17 – NEFERMtest 24 pro kulturu MS Z

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

Získané hodnoty z tabulek byly zadány do počítačového programu TNW, který na základě těchto údajů určil, o jaký druh bakterií se jedná.

Vyhodnocené výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 18.

Tabulka 18 – Vyhodnocení NEFERMtestu 24 pomocí programu TNW LITE

<b>Kultura</b>	<b>Druh</b>	<b>Pravděpodobnost</b>
<b>MS 1</b>	<i>P. fluorescens</i>	<b>100%</b>
<b>MS 2</b>	<i>P. putida</i>	<b>74,44%</b>
	<i>P. fluorescens</i>	<b>22,47%</b>
<b>MS Y</b>	<i>P. fluorescens</i>	<b>25,56%</b>
	<i>P. putida</i>	<b>74,44%</b>
<b>MS Z</b>	<i>P. fluorescens</i>	<b>28,72%</b>
	<i>P. putida</i>	<b>71,28%</b>

Výsledky ukazují, že všechny bakterie spadají pod rod *Pseudomonas*, pouze u kultury MS 1 byl 100% určen i druh – *Ps.fluorescens*. U ostatních kultur bylo tedy zapotřebí provést dodatečné testy pro rozlišení druhů *Ps. fluorescens* a *Ps. putida*.

#### **4.1.3.7 Stanovení růstu bakterií při 4°C**

Tento test byl proveden z důvodu, že při teplotě 4°C roste pouze druh *Ps. fluorescens*. Na rozdíl od druhu *Ps. putida*, který roste jen při vyšších teplotách. Proto byly kultury ještě jednou kultivovány a to při teplotě 4°C. Zde bylo potvrzeno, že vyrostla pouze kultura MS 1. Tím se potvrdilo, že kultury MS 2, MS Y a MS Z jsou druhu *Ps. putida*.

## ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala vytipováním běžné lokality tekoucí povrchové vody, kde byly provedeny odběry. V odebraných vzorcích byly hlavními cíly jednak stanovení celkových počtů psychofilních a mezofilních heterotrofních bakterií, jednak najít a identifikovat bakterie, které jsou schopny v daném prostředí rozkládat N-methyl-2-pyrrolidon (NMP).

Práce sestávala ze dvou pokusů.

V prvním pokusu, kdy byly vzorky odebrány 26.3.2012, byl stanoven celkový počet psychofilních a mezofilních heterotrofních bakterií takto: psychofilní  $8,6 \cdot 10^3$  KTJ/ml a mezofilní  $6,4 \cdot 10^2$  KTJ/ml. Dalším úkolem bylo sledování rozkladu NMP ve vzorcích. Vzorek byl nadávkován do kultivačních lahví, do nichž byl přidán NMP o koncentraci 300mg/l a minerální soli. Láhve se nechaly kultivovat při 25°C na třepačkách. V průběhu kultivace byl ve třetím dni pozorován zákal a to ve všech lahvích. To byla první známka rozkladu NMP. Bylo proto provedeno stanovení DOC, kde bylo potvrzeno významné spotřebování NMP poklesem koncentrace DOC na 42,42 – 53,2mg/l (z původní hodnoty kolem 170 mg/l).

V druhém pokusu probíhala práce podrobněji. Opět byl stanoven celkový počet psychofilních a mezofilních heterotrofních bakterií, které byly nalezeny ve vyšším počtu, a to: psychofilní  $1,2 \cdot 10^5$  KTJ/ml a mezofilní  $1,2 \cdot 10^5$  KTJ/ml. To bylo zřejmě způsobeno nárůstem biomasy v období teplých letních měsíců. Sledování rozkladu NMP ve vzorcích probíhalo sledováním koncentrací rozpuštěného organického uhlíku (DOC). V průběhu kultivace byly pravidelně odebírány vzorky, u kterých byly stanoveny DOC. Díky výsledkům se podařilo zjistit, že největší množství NMP bylo rozloženo již v prvních čtyřech dnech od zahájení kultivace. Po dalších třiceti dnech byl spotřebován i zbytek DOC na konečné minimum 15,22 – 18,24mg/l.

Bez prodlení byly po ukončení obou pokusů odebrány z použitých vzorků inokula, která byla kultivována na minerálním agaru s NMP. Zde se povedlo izolovat z prvního pokusu 2 kultury schopné rozkládat NMP, pod pracovním označením MS 1 a MS 2. Z druhého pokusu se taktéž podařilo izolovat 2 kultury, pod označením MS Y a MS Z.

Kultury byly podrobeny jednotlivým testům, kde se podařilo zjistit, že se jedná ve všech případech o gramnegativní nefermentující bakterie, tyčinkovitého tvaru, pozitivní na

cytochrom-oxidázu, katalasu. Při testu pigmentace se projevila schopnost produkce fluorescentního pigmentu jen u vzorků MS 2 a MS Z. Z těchto údajů nebylo stále možné identifikovat druh bakterií.

Proto byl proveden stěžejní NEFERMtest 24, který identifikoval kulturu MS 1 jako *Pseudomonasfluorescens*. U ostatních kultur bylo potřeba provést poslední kultivaci a to při 4°C, kde se podařilo potvrdit, že se jedná o *Pseudomonasputida*.

Tato práce tedy potvrdila existenci bakterií, konkrétně *Ps.fluorescens* a *Ps. putida*, jež jsou schopny biodegradace 1-methyl-2-pyrrolidonu ve zvolené lokalitě povrchové tekoucí vody. Díky jim je možno předpokládat, že v běžných říčních vodách je 1-methyl-2-pyrrolidon biologicky odbouratelný během několika dnů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] IPCS INCHEM. *N-methyl-2-pyrrolidone*[online]. [cit. 2014-03-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0513.htm>>
- [2] B.A.G. Jonsson, B. A° kesson, *Determination of 5-hydroxy-N-methylpyrrolidone and N-methyl-2-pyrrolidone in human urine*. Department of Occupational and Environmental Medicine, University Hospital, S-221 85 Lund, Sweden. Received 22 November 1996; revised 19 February 1997; accepted 20 February 1997
- [3] Bezpečnostní list Šarm spol. s r.o. *N-methylpyrrolidon* [online]. [cit. 2014-03-05]. Dostupný z WWW: <[www.eurosarm.cz/web/umkatalogdoc/4220.pdf](http://www.eurosarm.cz/web/umkatalogdoc/4220.pdf)>
- [4] Bezpečnostní list PENTA. *N-methyl-2-pyrrolidon* [online]. [cit. 2014-03-06]. Dostupný z WWW: <[http://www.pentachemicals.eu/bezp\\_listy/m/bezplist\\_640.pdf](http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/m/bezplist_640.pdf)>
- [5] ECHA. *1-methyl-2-pyrrolidone* [online]. [cit. 2014-03-05]. Dostupný z WWW: <[http://echa.europa.eu/documents/10162/13638/svhc\\_supdoc\\_1-methyl-2-pyrrolidone\\_ec\\_212-828-1\\_en.pdf](http://echa.europa.eu/documents/10162/13638/svhc_supdoc_1-methyl-2-pyrrolidone_ec_212-828-1_en.pdf)>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DOC	Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku
LD <sub>50</sub>	Smrtečná dávka pro 50% pokusných jedinců
MA	Minerální agar
MO	Mikroorganismy
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
PM	Petriho miska
TOC	Koncentrace celkového organického uhlíku
TYA	Tryptoneyeastextract agar
UTB	Univerzita Tomáše Bati
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 – Struktura NMP .....	12
Obrázek 2 – Křížový roztěr na PM .....	20
Obrázek 3 – Graf biodegradace NMP ve 2. láhvi .....	27
Obrázek 4 – Graf biodegradace NMP ve 3. láhvi .....	27
Obrázek 5 - Graf biodegradace NMP ve 4. láhvi .....	28
Obrázek 6 – Graf biodegradace NMP ve 2., 3. a 4. láhvi – průměr a chybové úsečky .....	28
Obrázek 7 - G <sup>-</sup> kultura MS 1 .....	30
Obrázek 8 - G <sup>-</sup> kultura MS 2 .....	30
Obrázek 9 - G <sup>-</sup> kultura MS Y .....	31
Obrázek 10 - G <sup>-</sup> kultura MS Z .....	31

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Vlastnosti NMP .....	13
Tabulka 2 – Složení roztoku stopových prvků .....	16
Tabulka 3 – Složení zásobních roztoků solí .....	16
Tabulka 4 – Složení média pro oxidačně-fermentační test.....	20
Tabulka 5 – Počty bakterií v odebrané vodě na 1ml.....	23
Tabulka 6 – Koncentrace DOCpo 3 dnech kultivace. ....	24
Tabulka 7 – Koncentrace DOC po 5 dnech kultivace .....	24
Tabulka 8 – Počty bakterií v odebrané vodě na 1ml.....	25
Tabulka 9 – Koncentrace DOC ve vzorcích vody všech čtyř láhví.....	26
Tabulka 10 – oxidačně-fermentační test kultur .....	32
Tabulka 11 – Test na katalasu.....	32
Tabulka 12 – test na cytochrom-oxidázu .....	33
Tabulka 13 – test na pigmentaci .....	33
Tabulka 14 – NEFERMtest 24 pro kulturu MS 1 .....	34
Tabulka 15 – NEFERMtest 24 pro kulturu MS 2.....	34
Tabulka 16 – NEFERMtest 24 pro kulturu MS Y .....	35
Tabulka 17 – NEFERMtest 24 pro kulturu MS Z .....	35
Tabulka 18 – Vyhodnocení NEFERMtestu 24 pomocí programu TNW LITE.....	36

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Dřevnice – místo odběru

Příloha P II: TYA agar

Příloha P III: Pozorování zákalu

Příloha P IV: Isolované kultury

Příloha P V: NEFERMTEST 24

## PŘÍLOHA 1: DŘEVNICE – MÍSTO ODBĚRU



Příloha 1 Letecký snímek místa odběru



Příloha 2 Detailní záběr řeky

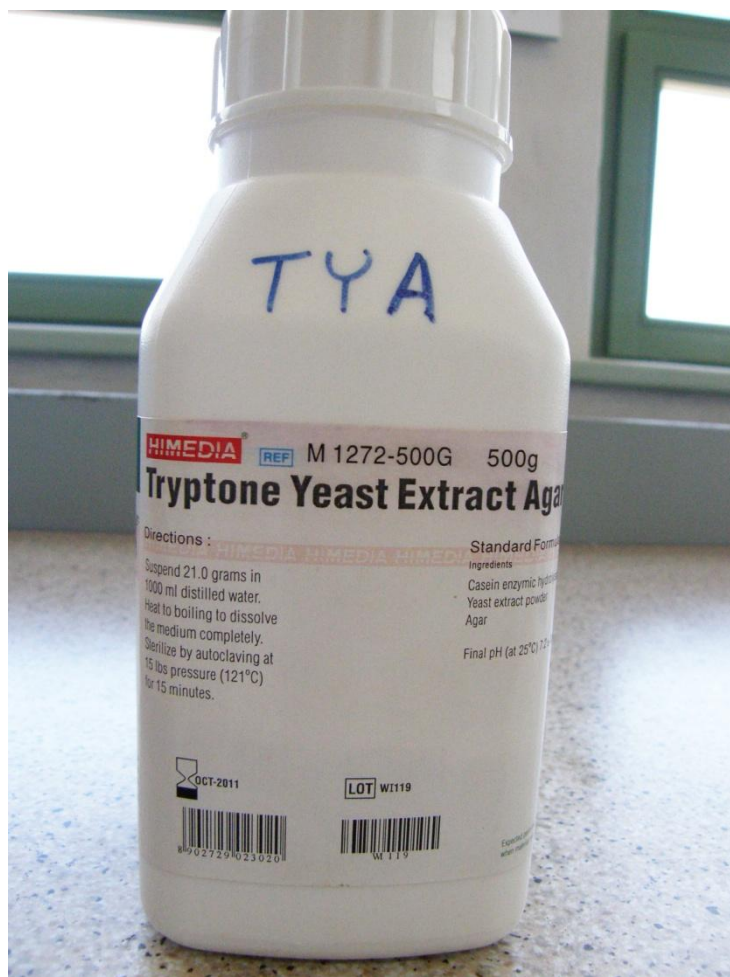


Příloha 3 Přítomnost živočichů v řece



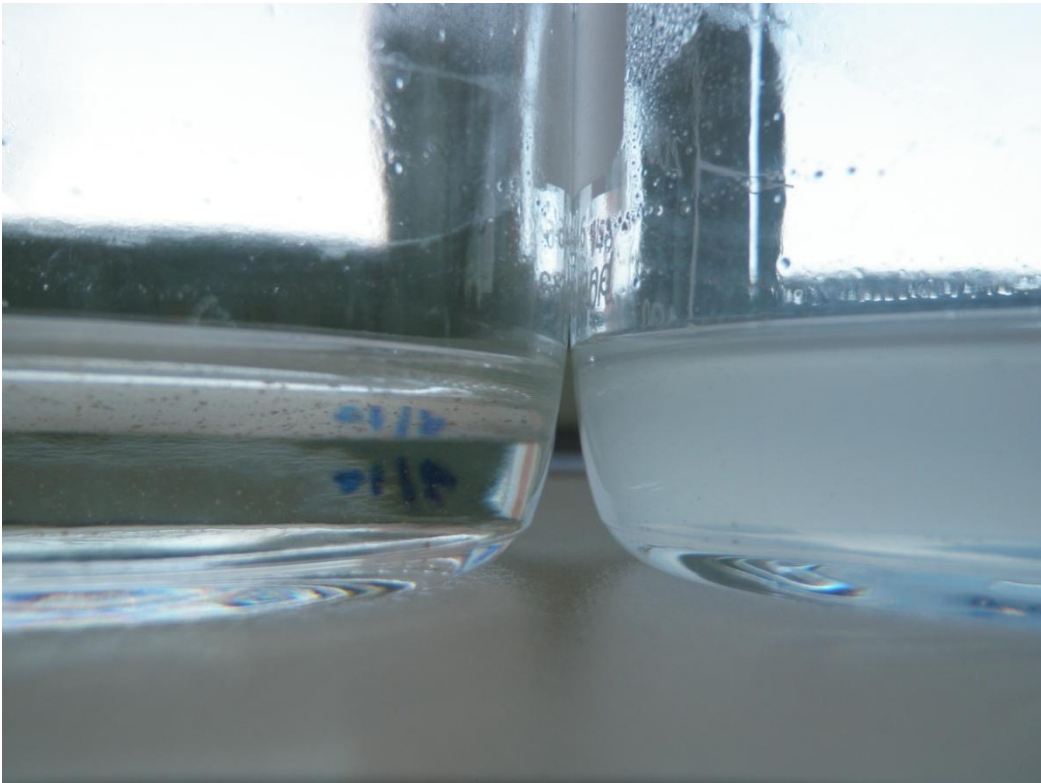
Příloha 4 Láhve s odebranými vzorky

## PŘÍLOHA P II: TYA AGAR



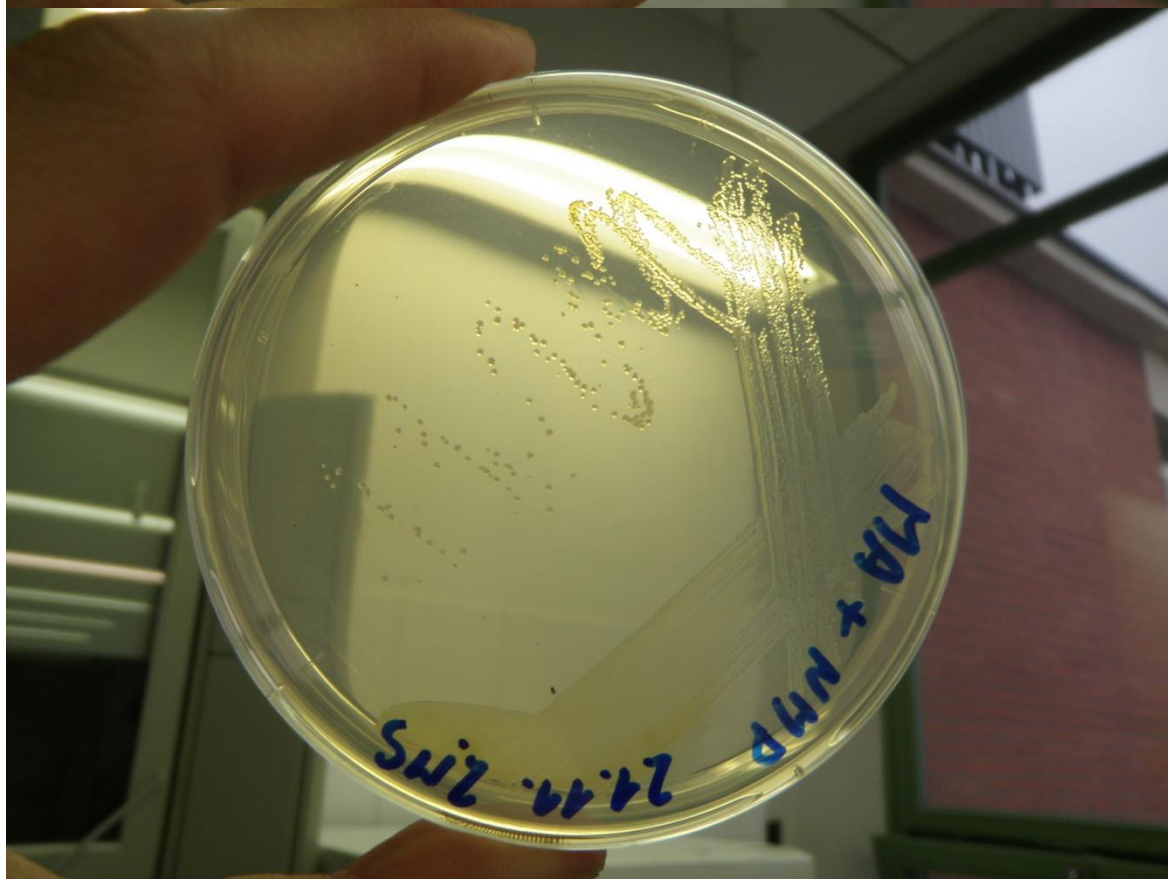
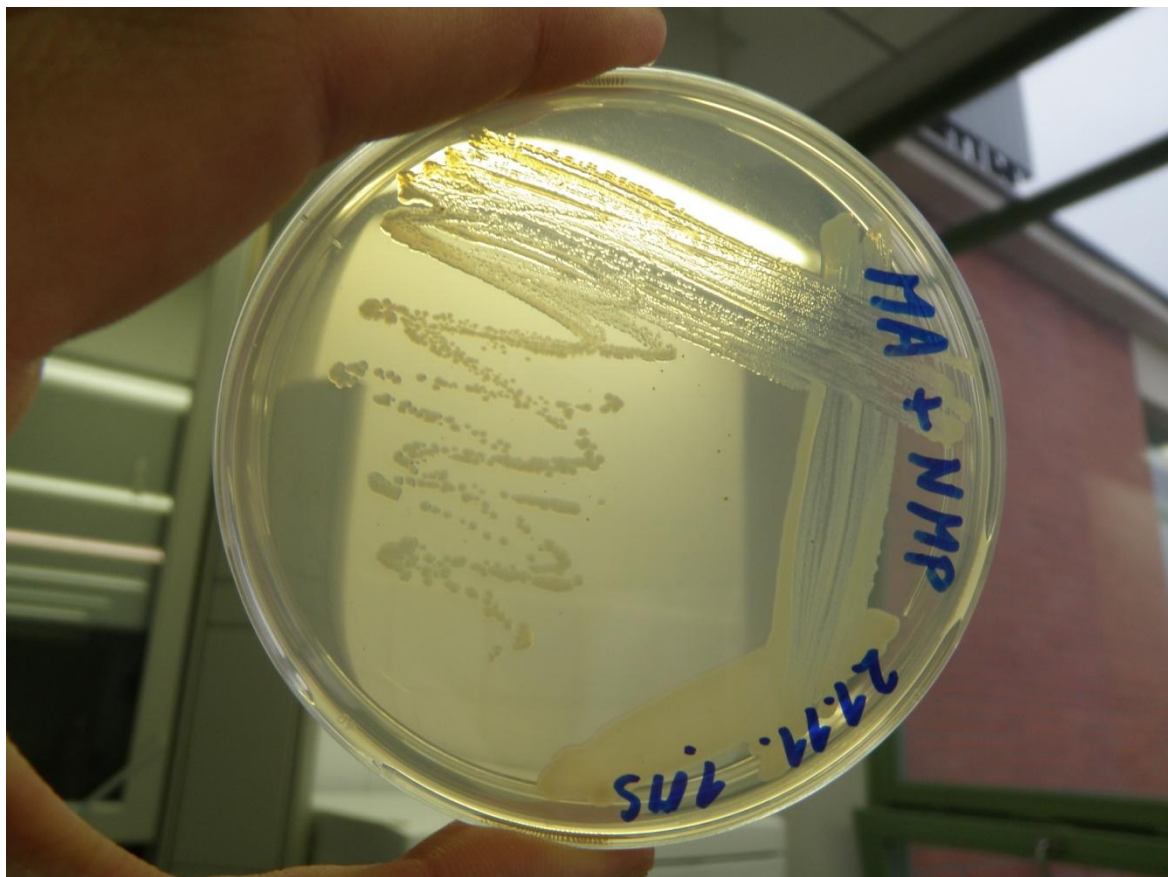
Příloha 5 TYA agar

## **PŘÍLOHA P III: POZOROVÁNÍ ZÁKALU**

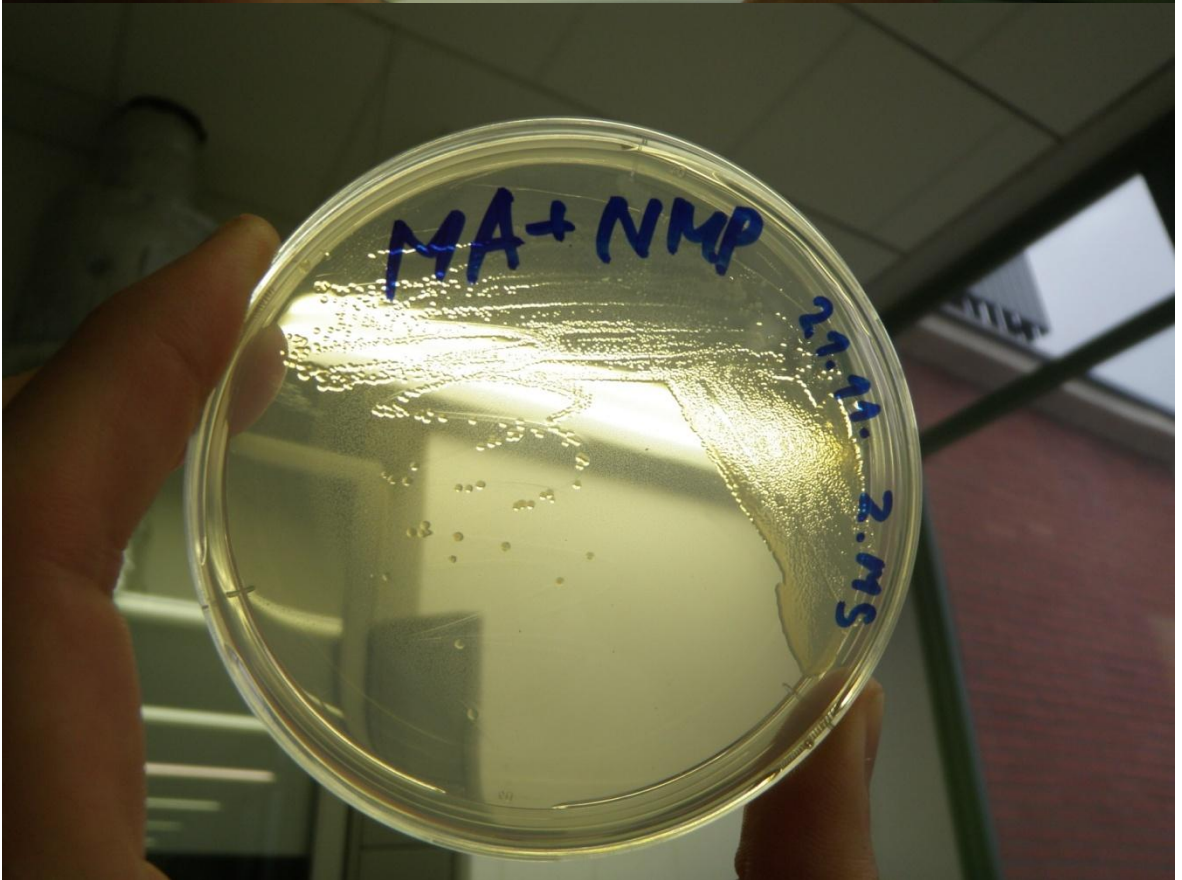
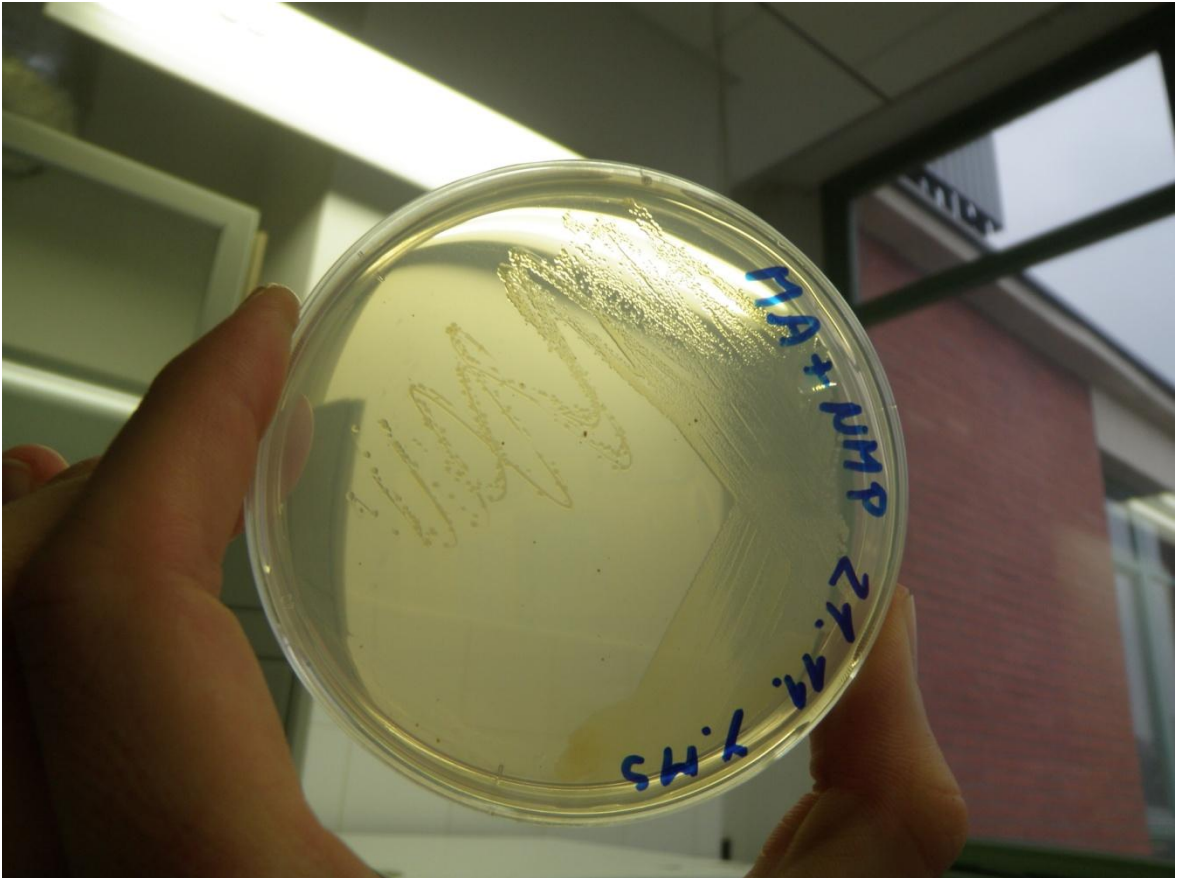


Příloha 6 Porovnání láhve s NMP a bez NMP, po kultivaci

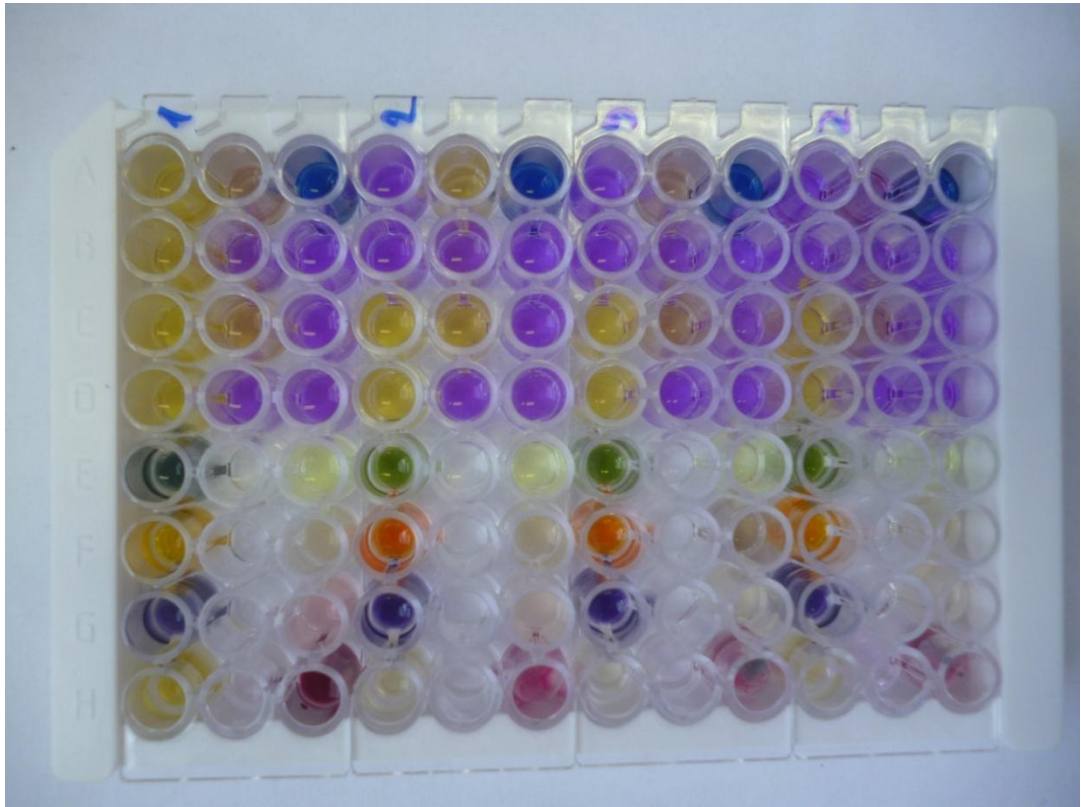
**Příloha P IV: IZOLOVANÉ KULTURY**







**Příloha P V: NEFERMTEST 24**



Příloha 7 Naočkované destičky po kultivaci

<b>MIKRO-LA-TEST®</b>		Datum/Dátum/Date/Дата	Zprac./Ref./Идент. провөл	PLIVA - Lachema a.s. Karásek 1 621 33 Brno CZECH REPUBLIC																					
<b>NEFERMtest 24</b>		Kmen č./Кмеї ч./Strain No./Но. анализа <div style="text-align: center; font-size: 2em;">1</div>		Poznámky/Notes/Отметки																					
Proužek Průžok Strip Полоска <b>OXI 1</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>C</b>	<b>B</b>	<b>A</b>																	
I N1 D	-	A R1 G	+	U R1 E	-	L Y1 S	-	G L1 U	+	F R1 U	+	I N O	+	S U C	+	1									
P H2 S	-	b G2 A	-	b G2 L	-	N A2 G	-	M A2 N	-	X Y2 L	+	C E L	-	G A L	+	2									
N O4 3	+	N O4 2	+	E S4 L	-	G G4 T	+	L A4 C	-	M L4 T	-	T R E	-	S C I	+	3									
=Profil/Profile/Профиль																									
Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты										Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация															
<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </table>																				Ps. fluorescens					

Příloha 8 Zaznamenání výsledků z NEFERMtestu 24