

Studium bakteriálních kultur schopných rozkladu kosmetických sloučenin

Bc. Markéta Jelénková

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Jelénková**
Osobní číslo: **T14458**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium bakteriálních kultur schopných rozkladu kosmetických sloučenin**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na popis bakterií rozkládající vybrané kosmetické sloučeniny.
2. Experimentálně ověřte schopnost dříve získaných kultur rozkládat dané kosmetické sloučeniny.
3. Provedte sadu testů směřující k identifikaci získaných bakteriálních kultur.
4. Výsledky přehledně zpracujte požadovanou formou a diplomovou práci odevzdejte v písemné i elektronické podobě v předepsaném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Odborné práce získané z vědeckých databází, především z Web of Science, SCOPUS, Medline a dalších, dle aktuálních potřeb.

Předchozí DP vypracované na ÚIOŽP, zejména DP obhájené v r. 2015.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2016

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: ...*Markéta Jelencová*.....

Obor: ...*CHM/IOEP*.....

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně *16.5.2016*

Jelencová

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

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

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

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

¹⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-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 užit 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá mikrobiální degradací Cocamidopropyl Betaine a Ethylhexyl Salicylate. V teoretické části jsou popsány vlastnosti obou látek, jejich mikrobiální degradace a výskyt ve vodách. Praktická část je zaměřena na izolaci a identifikaci kultur schopných rozkladu těchto látek, míru a rychlost degradace sledovaných sloučenin. Kultury, které byly izolovány z aktivovaného kalu, byly sledovány z hlediska biochemických, růstových a degradačních vlastností. Identifikace kultur byla prováděna pomocí molekulárně biologické metody – polymerasové řetězové reakce s následnou sekvenací úseků genu pro 16S rRNA. Získané sekvence 16S rRNA byly porovnány s výsledky uloženými v databázi GenBank pomocí programu BLAST.

Klíčová slova: Cocamidopropyl Betaine, Ethylhexyl Salicylate, degradace, identifikace, bakterie

ABSTRACT

The diploma thesis deals with microbial degradation of Cocamidopropyl Betaine and Ethylhexyl Salicylat. Theoretical part describes properties of these two substances, their microbial degradation and occurrence in water. Practical part is focused on isolation and identification of cultures capable to decompose given substances, their extent and rate of degradation. Cultures, which were isolated from activated sediment, were monitored for biochemical, growth and degradation properties. Identification of cultures was realized by molecular biological methods - polymerase chain reaction followed by sequencing of segments 16S rRNA gene. Extracted sequences of 16S rRNA gene were compared with data from GenBank database with use of the programme BLAST.

Key words: Cocamidopropyl Betaine, Ethylhexyl Salicylate, degradation, identification, bacterium.

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému vedoucímu diplomové práce panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost, ochotu, vstřícnost a všestrannou pomoc při vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala paní laborantce mikrobiologické laboratoře Bc. Veronice Kučabové, za její pomoc při práci v laboratoři. Také mé poděkování patří rodině a přátelům za trpělivost, podporu a pomoc během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KOSMETICKÉ SLOUČENINY	12
1.1 COCAMIDOPROPYL BETAINE	12
1.1.1 Degradace CAPB	13
1.1.2 Použití CAPB	14
1.1.3 Toxicita CAPB	14
1.1.4 Výskyt CAPB ve vodách.....	15
1.2 ETHYLHEXYL SALICYLATE.....	15
1.2.1 Použití EHS.....	16
1.2.2 Degradace EHS	16
1.2.3 Výskyt EHS ve vodách.....	17
1.3 2-ETHYLHEXANOL	18
1.3.1 Použití 2-ethylhexanolu.....	18
1.3.2 Výskyt EhoL ve vodách	19
2 POPIS KULTUR	20
2.1 KULTURY EHS 1-4.....	20
2.2 KULTURY F1V A F1M.....	20
II PRAKTICKÁ ČÁST	21
3 MATERIÁL A METODY	22
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	22
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ	25
3.3 POSTUPY IDENTIFIKACE KULTUR A STUDIA JEJICH VLASTNOSTÍ	26
3.3.1 Ověření růstu izolovaných kultur při různých teplotách	26
3.3.2 Ověření růstu izolovaných kultur při různých koncentracích NaCl	26
3.3.3 Vlastnosti kultur	27
3.3.4 Ověření degradace CAPB kombinací kultur F1V a F1M	27
3.3.5 Pohyb kultur F1V a F1M s CAPB.....	28
3.3.6 Ověření společné i samostatné degradace CAPB kulturami F1V a F1M	28
3.3.7 Pohyb kultur EHS 1, EHS 2, EHS 3 a EHS 4	29
3.3.8 Růst kultur F1V a F1M při různých koncentracích CAPB	29
3.3.9 Adaptace aktivovaného kalu na 2-ethylhexyl salicylate a 2-ethylhexanol a izolace degradačních bakterií.....	30
3.3.10 Ověření růstu kultur EHS 11 až EHS 16 na salicylanu sodném	30
3.3.11 Stanovení buněčných bílkovin v bakteriální suspenzi při růstu čistých kultur na EHS	31
3.3.12 Ověření degradace betainu kulturami F1V a F1M.....	31
3.3.13 Posouzení rozkladu lauramidu na pevných agarech kulturami F1V a F1M	32
3.3.14 Ověření růstu kultur EHS 11 – 16 v přítomnosti 2-ethylhexanolu	34

3.3.15	Izolace DNA, PCR, Purifikace.....	34
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1	ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI KULTUR F1V A F1M	38
4.2	SPOLEČNÁ DEGRADACE CAPB KULTURAMI F1M A F1V.....	38
4.2.1	Studium podstaty společné degradace CAPB kulturami F1M a F1V	41
4.2.2	Degradace Lauramidu	42
4.2.3	Degradace Betainu	45
4.3	ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI KULTUR EHS 1-4 A EHS 11 - 16.....	48
4.4	DEGRADACE EHS	57
4.5	RŮST KULTUR EHS 11 – 16 NA 2-ETHYLHEXANOLU.....	59
4.6	IDENTIFIKACE KULTUR.....	60
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	67
	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
	SEZNAM TABULEK.....	70
	SEZNAM PŘÍLOH.....	71

ÚVOD

Kosmetické výrobky a různé sloučeniny v nich jsou nedílnou součástí života každého z nás. Každodenně, aniž bychom si to uvědomovali, spotřebujeme velké množství kosmetických sloučenin, ať už se jedná o kosmetické sloučeniny pro osobní péči či mycí prostředky. Ale co se s nimi děje v životním prostředí? Používáním se dostávají do odpadních vod a na čistírnách odpadních vod (ČOV) je nutné je odstranit. Odstranění probíhá převážně biologickým čištěním odpadních vod. Zájmovou oblastí je, zda mikroorganismy jsou schopny tyto látky z vod odbourat či ne a v jaké míře. Pro mou diplomovou práci byly vybrány dvě kosmetické sloučeniny, kterými jsou Cocamidopropyl Betaine a Ethylhexyl Salicylate. Obě látky jsou běžně používány v přípravcích pro osobní péči.

Problematika rozkladu látek Cocamidopropyl Betaine a Ethylhexyl salicylate byla rozpracována v loňském roce a tato práce ukázala, že obě látky podléhají bakteriálnímu rozkladu a byly získány kultury bez podrobnějšího popisu. Zkoumání těchto kultur a případné získání nových degradačních kultur se stalo náplní mé práce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

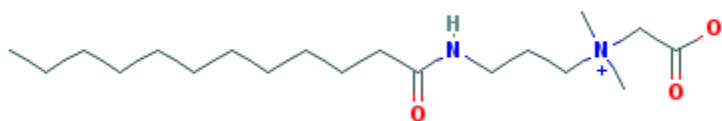
1 KOSMETICKÉ SLOUČENINY

1.1 Cocamidopropyl Betaine

Cocamidopropyl Betaine (CAPB) je amfoterní povrchově aktivní látka, která se získává dvoustupňovým procesem. Kokosový olej nebo mastné kyseliny, získané hydrolyzou kokosového oleje (C12 – C18), se nechají reagovat ve vodném roztoku s dimethylaminopropylaminem při teplotě cca 160 °C. Kokosový olej má různorodé složení mastných kyselin, ale převládající mastnou kyselinou je kyselina laurová. Ve druhém stupni se výsledný dimethylaminopropyl cocoamid nechá reagovat s monochloroctanem sodným za alkalických podmínek. CAPB se získává ve formě roztoku o koncentraci cca 30%. CAPB se skládá ze dvou částí. Jedna z nich je hydrofobní (nepolární) část, která je tvořena dlouhým uhlovodíkovým řetězcem mastné kyseliny obsažené v kokosovém oleji. Druhou částí je kvartérní amoniová sůl, jako polární část. CAPB má proto zwitteriontový charakter, což znamená, že v jedné molekule se nachází jak aniontová, tak i kationtová struktura. Oproti amfoterním látkám, které v zásaditém prostředí (médiu) formují soli, betainy v tomto prostředí anionické podmínky nevytváří. Bez ohledu na hodnotu pH, betainy vždy obsahují čtyřvazný atom dusíku. [1 – 3, 5] CAPB nepůsobí na některé bakterie baktericidně ani v koncentraci 200 mM (tj. 68,5 g/l). [11] Základní fyzikální a chemické vlastnosti jsou uvedeny v Tab. 1 a strukturální vzorec je uveden na Obr. 1.

Tabulka 1 - Vlastnosti Cocamidopropyl Betainu [4]

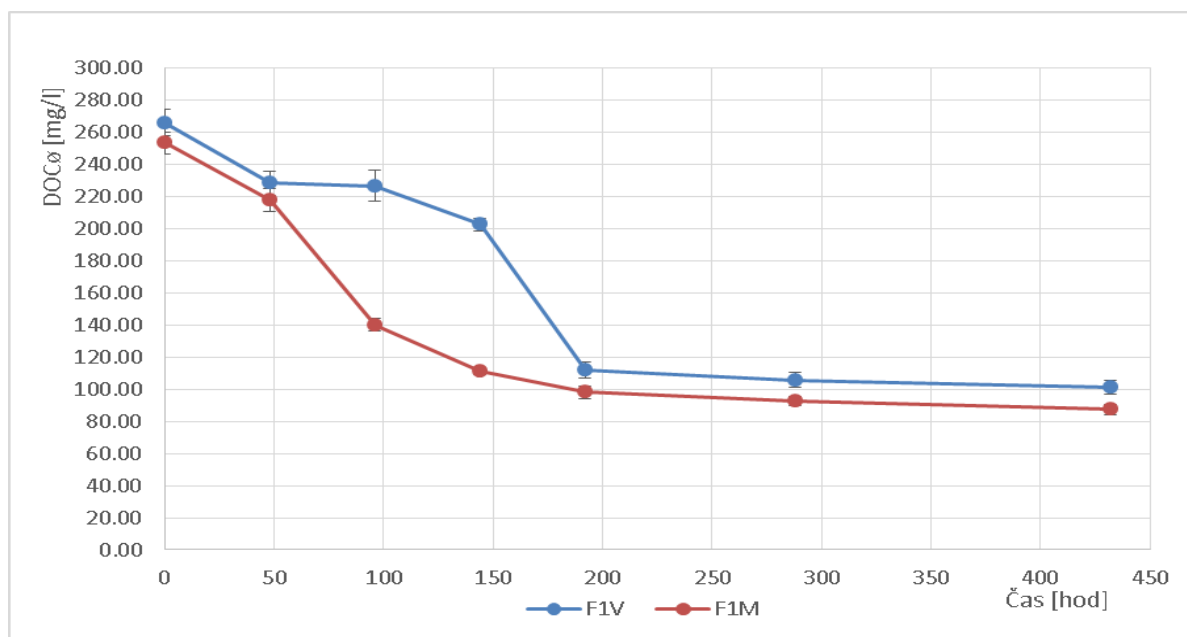
Cocamidopropyl Betaine	
Sumární vzorec	C ₁₉ H ₃₈ N ₂ O ₃
Molární hmotnost	342,52 g/mol
Hustota	1,043 g/ml (25 °C)
Bod varu	212 °C



Obrázek 1 - Chemická struktura Cocamidopropyl Betaine [4]

1.1.1 Degradace CAPB

Ringlová testovala biodegradabilitu CAPB v aktivovaném kalu a izolovala poté dvě bakteriální kultury (F1V a F1M), které byly schopny degradovat CAPB. Kultury F1V a F1M byly izolovány z kalové suspenze, která obsahovala 200 mg/l CAPB. Poté bylo provedeno ověření schopnosti jejich individuálního růstu s CAPB coby jediným substrátem. Inkubace trvala po dobu 7 dnů, kdy došlo k tvorbě zákalu. Jako vstupní hodnoty koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) bylo použito minerální médium s roztokem vitamínů a CAPB, bez zaočkování kulturami. Po 7 dnech byly u všech suspenzí změřeny koncentrace DOC. Porovnáním průměrných hodnot byl vidět pokles koncentrací DOC u naočkovaných médií, což ukázalo na degradační schopnost obou kultur. V dalším testu byly proto kultury F1V a F1M zkoumány podrobněji. Celkový pokus degradace CAPB trval 18 dní a v určitých intervalech byly odebírány vzorky pro stanovení DOC. Z obrázku 2 je patrné snížení koncentrace DOC u obou kultur v průběhu inkubace. U kultury F1V docházelo k největšímu snížení koncentrace DOC po 144 hodinách a dále se koncentrace snižovala již velmi pomalu až k hodnotám kolem 100 mg/l. U kultury F1M k degradaci docházelo po dobu 8 dnů a poté se hodnota DOC snižovala jen nepatrně. Z konečných hodnot DOC vyplynulo, že rozklad CAPB byl pravděpodobně jen částečný. [5]



Obrázek 2 - Závislost koncentrace DOC na době trvání pokusu degradace CAPB kulturami F1V a F1M [5]

1.1.2 Použití CAPB

CAPB se hojně používá v přípravcích osobní péče, například jako součást tekutých mýdel, antiseptik, zubních past či produktů péče o pleť, a to v důsledku jeho mírného dermatologického účinku, dobré biodegradaci a slučitelnosti s jinými povrchově aktivními látkami. Mimo jiné je používán i v čistících a pracích prostředcích. [3, 15]

1.1.3 Toxicita CAPB

Toxicita CAPB byla sledována u bakterie *Shewanella oneidensis* MR-1. Byly použity tři koncentrační úrovně, a to 20, 50 a 100 mM CAPB. Experiment byl rozdělen na 2 skupiny: stimulované a nestimulované pokusy. Stimulované experimenty, kde bylo přidáno 20 mM laktátu, byly použity k posouzení toxicity CAPB vůči kultuře *Shewanella oneidensis* MR-1 během jejího růstu. Nestimulované experimenty, kde laktát nebyl přidán, byly provedeny ke zjištění, zda jsou bakterie schopny využívat CAPB jako zdroj uhlíku a energie. Rychlost růstu stimulovaných kultur klesala se zvyšující se koncentrací CAPB v růstovém médiu, překvapivě však při koncentracích 20 a 50 mM měly kultury vyšší rychlost růstu než kontrolní vzorek. Výrazné snížení počtu buněk vůči kontrole pak bylo pozorováno u koncentrace 100 mM, a to v průběhu prvních 8 h experimentu. Po 24 h inkubace se u koncentrací 20 a 50 mM CAPB zvýšil počet buněk, zatímco počet buněk u 100 mM CAPB zůstal po dalších 48 hodin konstantní. [11]

U nestimulovaného experimentu měly všechny koncentrace CAPB nižší růstovou rychlost než kontrola. Počáteční nárůst buněk byl zaznamenán při koncentracích 20 a 50 mM CAPB v prvních 8 hodinách, ale poté se celkový počet buněk začal snižovat. Žádný růst nebyl zjištěn při koncentraci 100 mM CAPB a množství buněk se během prvních 8 hodin snížilo pod mez detekce. Po 24 hodinách však vzrostlo množství buněk mírně nad počáteční hodnotu a postupně klesalo po zbývajících část experimentu. [11]

Testování tedy celkově prokázalo, že koncentrace 100 mM CAPB je vůči bakterii toxická, významně zpomaluje její růst, avšak není baktericidní. Také bylo prokázáno, že CAPB není pro bakterii růstovým substrátem. [11]

1.1.4 Výskyt CAPB ve vodách

Xiao-Xia Sun a spol. provedli experimenty s cílem najít syntetické povrchově aktivní látky, které by zmírnily přemnožení řas v mořských vodách. CAPB prokazovala relativně vysokou inhibiční účinnost a rychlou biologickou rozložitelnost. Při koncentraci 10 mg/l vykazoval CAPB vůči řasám *Cochlodinium polycricoides* a *Alexandrium tamarense* inhibici 60% po 5 minutách. Při působení CAPB o koncentraci 10 mg/l došlo u *Cochlodinium polycricoides* k lýze buněk z 90% po 24 hodinách a při dávce 15 mg/l již po 4 hodinách. Zatímco u *Alexandrium tamarense* došlo k lýze buněk jen z 10% po 2 hodinách interakce s 50 mg/l CAPB. V mořské vodě degradace CAPB proběhla z 50% během jednoho dne a z 90% do pěti dnů. Počáteční koncentrace CAPB byla v těchto pokusech 100 mg/l při 25 °C. [6]

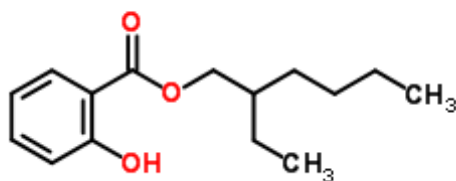
Ve studii Vonlanthen a spol. testovali vliv CAPB vůči zeleným řasám *Ulva lactuca*. Doba expozice trvala až 120 hodin, koncentrace CAPB byla 0 – 40 mg/l. Při působení 24 hodin CAPB začal již degradovat. Poškození buněčné membrány řas bylo přesto pozorováno po 48 hodinách, avšak pouze při koncentraci 40 mg/l CAPB. Po 120 hodinách působení CAPB na *Ulva lactuca* bylo poškození evidentní při koncentracích ≥ 10 mg/l. CAPB a případně jeho produkty tedy vyvíjí rychle a nevratně nepříznivé účinky vůči zeleným řasám *Ulva lactuca*, které byly považovány za relativně imunní vzhledem k působení chemických látek. [16, 17]

1.2 Ethylhexyl Salicylate

Ethylhexyl Salicylate (EHS), známý i pod názvem 2-Ethylhexyl Salicylate či Octyl Salicylate, se připravuje z 2-ethylhexanolu a kyseliny salicylové azeotropní esterifikací. EHS je čirá kapalina s charakteristickým zápachem, prakticky nerozpustná ve vodě. Akutní dermální toxicita LD_{50} EHS pro králíky a akutní orální toxicita pro krysy je vyšší než 5 g/kg. [8, 9] Základní fyzikální a chemické vlastnosti jsou uvedeny v Tab. 2 a strukturální vzorec je uveden na Obr. 3.

Tabulka 2 - Vlastnosti Ethylhexyl Salicylate [4]

Ethylhexyl Salicylate	
Sumární vzorec	C ₁₅ H ₂₂ O ₃
Molární hmotnost	250,33 g/mol
Hustota	1,014 g/ml (25 °C)
Bod vzplanutí	127,8 °C
Bod varu	331,5 °C



Obrázek 3 - Chemická struktura Ethylhexyl Salicylate [7]

1.2.1 Použití EHS

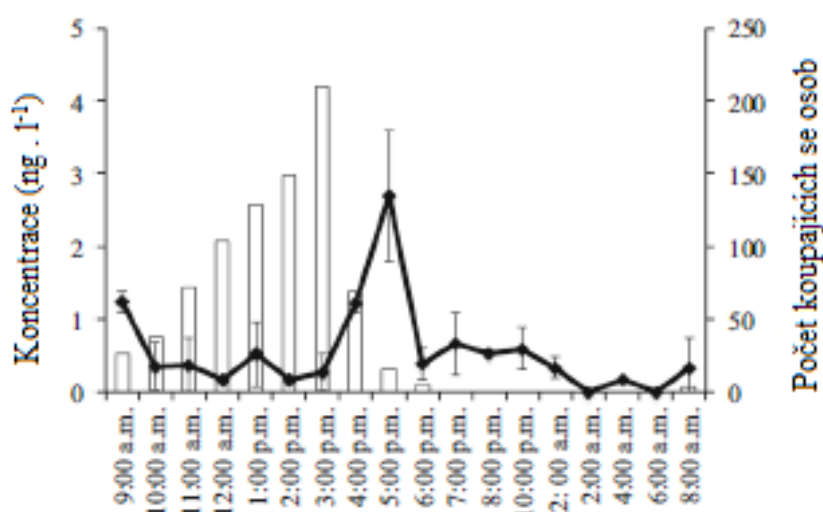
EHS je látkou používanou především jako organický UV filtr. Takové látky absorbují UV záření a používají se na ochranu pokožky proti škodlivému UV záření. EHS se proto používá v kosmetických přípravcích a v přípravcích pro osobní péči, především v opalovacích krémech a prostředcích, méně pak např. v šampónech, lacích na vlasy, rtěnkách atd., kde se používají jako vonné přísady. [8 - 10]

1.2.2 Degradace EHS

Biodegradaci EHS aktivovaným kalem zkoumala Ringlová, a to na základě spotřeby biologické spotřeby kyslíku a produkce CO₂ pomocí respirometru Micro-Oxymax. Naměřená spotřeba kyslíku (52,10 % teoretického množství) naznačila kompletní rozklad EHS, což potvrdila i produkce CO₂, která dosáhla 71,28 % teoretického množství. U čtyř izolovaných kultur (EHS 1, EHS 2, EHS 3 a EHS 4), které byly získány z kalové suspenze, bylo později prokázáno, že byly schopny využívat EHS pro svůj individuální růst. Současně však také vyplynulo, že kultury využívaly z EHS pouze část odpovídající salicylanu, neboť nebyly schopny růst v prostředí s 2-ethylhexanolem jako jediným organickým substrátem. 2-ethylhexanol tak pravděpodobně může po rozkladu EHS danými kulturami zůstat ve vodném prostředí. [5]

1.2.3 Výskyt EHS ve vodách

Ve studii Sankoda a spol. vědci zkoumali chování a výskyt organických UV filtrů ve vodách podél japonského pobřeží. Koncentrace UV filtrů byly sledovány v mořské vodě u čtyř rekreačních pláží (Magushi, Wakamija, Tsurugahama a Otachimisaki) ve dvou ročních obdobích, a to v létě od července do srpna, a v zimě v prosinci. EHS byl detekován ve všech vzorcích. Jeho koncentrace se v průběhu dne se zvyšujícím se počtem koupajících osob příliš nezvyšovala. Jak lze však vidět na obrázku č. 4., koncentrace dosáhla vrcholu ($2,7 \pm 0,9 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$) až kolem 17-té hodiny, kdy většina koupajících se osob již odešla. [10]



Obrázek 4 - Počet koupajících se osob a denní změny koncentrace EHS v mořské vodě v letním období 2011 [10]

Autoři tento jev vysvětlili poměrně rychlou fotodegradací EHS, ke které docházelo na hladině mořské vody.

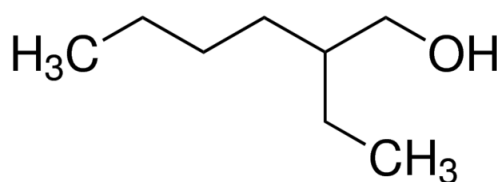
EHS byl v uvedené studii dále detekován kromě mořské vody také v řekách, jezerech, sedimentech, v studničních vodách a dokonce i ve vodě z vodovodu. V letním období byly koncentrace EHS v mořích mnohonásobně vyšší než v zimním období, takže autoři předpokládají, že jedním z hlavních zdrojů výskytu EHS v mořské vodě je právě rekreační koupání lidí. [10]

1.3 2-ethylhexanol

2-ethylhexanol (EhoL) je těkáva organická sloučenina (VOC) s aromatickým zápachem. EhoL je jen částečně rozpustný ve vodě a má nižší hustotu než voda. Může vyvolat dráždivé účinky kůže, očí, sliznice, a také může být toxický při požití, vdechnutí či absorpci kůží. Podílí se na zhoršení kvality vnitřního prostředí. Mikroorganismy jsou schopny 2-ethylhexanol produkovat a zároveň jej oxidovat na kyselinu 2-ethylhexanovou. Kyselina 2-ethylhexanová je následně štěpena na dvě molekuly kyseliny máselné a ty se dále metabolizují na acetát. *Pseudomonas putida* má tuto zajímavou β -oxidační schopnost využívat rozvětvené substráty. Mikrobiální degradace změkčovadel je nejpravděpodobnějším zdrojem 2-ethylhexanolu ve vzduchu v místnostech. [4, 14] Základní fyzikální a chemické vlastnosti jsou uvedeny v Tab. 3 a strukturní vzorec je uveden na Obr. 5.

Tabulka 3 - Vlastnosti 2-ethylhexanolu [4]

2-ethylhexanol	
Sumární vzorec	$C_8H_{18}O$
Molární hmotnost	130,23 g/mol
Hustota	0,833 g/ml (25 °C)
Bod tání	-76 °C
Bod varu	183 - 186 °C



Obrázek 5 - Chemická struktura 2-Ethylhexanolu [13]

1.3.1 Použití 2-ethylhexanolu

2-ethylhexanol je používán zejména při výrobě esterů, které jsou součástí změkčovadel, adheziv a dielektrických kapalin do kondenzátorů. Také je součástí struktury některých tzv. syntetických olejů, sestávajících z polyesterového řetězce s ethylhexylovými, estericky vázanými postranními skupinami. [18 - 20]

1.3.2 Výskyt EhoL ve vodách

Hromadění syntetických olejů v mnoha sladkovodních vodách způsobuje velké znepokojení, převážně ve velkých vnitrozemských vodstvech, jako např. Bondesee či Lac Lemán ve Švýcarsku. Zdrojem tohoto znečištění se nejvíce přisuzuje zvýšenému využívání rekreačních plavidel. Ve studii Wyatt a spol. izolovali dvě kultury (s pracovními názvy 20D a 30D) z jezerní vody, které jsou schopné růstu na komerčně vyráběných syntetických mazacích olejích a jsou schopné uvolňovat 2-ethylhexanol ze substrátu pomocí esteráz. Inkubace trvala po dobu 27 dnů. Po devíti denní inkubaci byla koncentrace EhoLu 0,8 mM, po 27 denní inkubaci koncentrace EhoLu vzrostla na 6 mM. Ačkoliv kultury 20D a 30D nejsou schopny EhoL degradovat, byla získána bakterie ze stejné jezerní vody, který byl schopen EhoL využít jako zdroj uhlíku a energie. Izolovaná bakterie byla identifikována jako druh *Pseudomonas*, nejbližším příbuzným druhem by mohla být *Pseudomonas putida*. [12, 20]

2 POPIS KULTUR

V práci Ringlové byly získány kultury EHS 1-4 z kalové suspenze, kde byl sledován rozklad Ethylhexyl salicylate, a poté byly testovány z pohledu jejich individuální degradace Ethylhexyl salicylate. Kultury F1V a F1M byly také získány z kalové suspenze, pocházející ovšem z pokusů rozkladu Cocamidopropyl betainu. U všech kultur bylo provedeno několik degradačních testů. [5]

2.1 Kultury EHS 1-4

Gramovým barvením byla kultura EHS 1 shledána jako gramvariabilní, ve tvaru mírně ohnutých zaoblených tyčinek. Pomocí KOH testu byla tato kultura potvrzena jako gramnegativní. Kultura EHS 2 byla gramnegativní, ve tvaru středně velkých tyčinek, a rovněž kultura EHS byla 3 vyhodnocena jako gramnegativní. Kultura EHS 4 byla určena jako grampozitivní, ve tvaru tyčinek. KOH test u všech kultur potvrdil grampozitivitu či gramnegativitu. [5]

2.2 Kultury F1V a F1M

Gramovým barvením byly kultury F1V a F1M hodnoceny jako gramnegativní, což potvrdil i KOH test. Obě kultury mají tvar zaoblených tyčinek, buňky F1M byly o něco kratší než buňky F1V. [5]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité chemikálie

FLAVOL KDA (Enapol a.s., Česká Republika)

Tento roztok obsahoval 30 hm. % CAPB a 5-7 hm. % chloridu sodného.

Zásobní roztok CABP

Příprava: Byl napipetován 1 ml FLAVOL KDA, zředěn 9 ml destilované vody. Roztok byl dokonale promíchán a poté filtrován přes sterilní ultrafiltr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22 μm do sterilní zkumavky.

Lauramide (TCI Europe N.V., Japonsko)

Betaine Anhydrous (TCI Europe N.V., Japonsko)

2-Ethylhexyl salicylate (Sigma Aldrich a.s., Německo)

Zásobní 10 %-tní roztok salicylanu sodného (SALNa)

Příprava: Byl navážen 1 g SALNa a rozpuštěn v 8 ml destilované vody. Poté byl roztok doplněn do 10 ml a poté filtrován přes sterilní ultrafiltr MILLIPORE MCE 0,22 μm do sterilní zkumavky.

2-ethylhexanol (Sigma Aldrich a.s., Německo)

R2A agar (HiMedia, Indie)

Složení R2A agaru:

– Enzymatický hydrolyzát kaseinu	0,125 g
– Pepton masový	0,125 g
– Hydrolyzát kaseinu	0,250 g
– Kvasničný extrakt	0,250 g
– Glukosa	0,250 g
– Škrob rozp.	0,250 g
– Hydrogenfosforečnan draselný	0,015 g

– Síran hořečnatý heptahydrát	0,250 g
– Pyrohroznán sodný	0,015 g
– Agar	7,500 g
– H ₂ O	500,0 ml

R2A agar s přídavkem NaCl

Příprava: Bylo naváženo 1,8 g R2A agaru/ 100 ml H₂O + patřičné množství NaCl. Lahvičky s agarem byly umístěny do autoklávu a sterilizovány při 121 °C po dobu 25 minut. Poté byly agary asepticky rozlity do plastových Petriho misek.

Sterilní fyziologický roztok

Příprava: Bylo naváženo 4,3 g chloridu sodného, rozpuštěno v 500 ml destilované vody a sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut.

Médium pro oxidačně-fermentační test

– Pepton	0,20 g
– Chlorid sodný	0,50 g
– Hydrogenfosforečnan draselný	0,03 g
– Bromthymolová modř	0,006 g
– Glukosa	1,00 g
– Čistý agar	0,30 g

Příprava: Všechny složky byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody a rozvařeny ve vodní lázni. Po rozvaření agaru bylo upraveno pH na hodnotu 7,2 – 7,4. Médium bylo rozlito do zkumavek a sterilizováno v autoklávu při 115 °C po dobu 35 minut.

Minerální médium:

– Roztok dihydrogenfosforečnanu draselného (9,07 g/l)	20,0 ml
– Roztok dihydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrát (23,90 g/l)	80,0 ml
– Destilovaná voda	858 ml

– Roztok stopových prvků	2,00 ml
– Roztok síranu hořečnatého heptahydrát (10 g/l)	10,0 ml
– Roztok síranu amonno železitého heptahydrát (3 g/l)	10,0 ml
– Roztok chloridu vápenatého dihydrát (1 g/l)	10,0 ml
– Roztok chloridu amonného (30 g/l)	10,0 ml

Příprava: Všechny výše uvedené složky byly postupně napipetovány a roztok byl důkladně promíchán. Roztok byl rozlit po určitých objemech do skleněných lahvíček. Poté proběhla sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut.

Složení roztoku stopových prvků:

– Kyselina boritá	0,750 g
– Síran železnatý heptahydrát	3,000 g
– Síran zinečnatý heptahydrát	0,100 g
– Síran manganatý tetrahydrát	0,500 g
– Skalice modrá	0,050 g
– Síran kobaltnatý heptahydrát	0,1813 g
– $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,050 g

Veškeré chemikálie byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

Roztok MEMs vitamínů:

Komerčně vyráběný roztok MEMs vitamínů (dodavatel PAA The Cell Culture Company) obsahoval následující látky.

– Pantothenát vápenatý	0,10 g/l
– Cholinchloride	0,10 g/l
– Kyselina listová	0,10 g/l
– Glukóza	0,20 g/l
– Nikotinamid	0,10 g/l
– Pyridoxal hydrochlorid	0,10 g/l

– Riboflavin	0,01 g/l
– Chlorid sodný	8,50 g/l
– Thiamin hydrochlorid	0,10 g/l

Minerální agar

Složení minerálního agaru:

Hydrogenfosforečnan draselný	0,10 g
Chlorid amonný	0,11 g
Síran hořečnatý heptahydrát	0,02 g
Síran železnatý heptahydrát	0,001 g
Chlorid vápenatý	0,001 g
Roztok stopových prvků	0,10 ml
Agar	1,70 g
Voda destilovaná	

Navážka 1,9 g byla suspendována ve 100 ml destilované vody a po případné úpravě pH na 7,5 byl agar sterilizován při 121 °C po dobu 20 minut.

Albumin (Sigma Aldrich a.s., Německo)

Byl použit hovězí albumin s obsahem bílkovin 98 %.

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Fluka Chemie GmbH, Švýcarsko)

Coomasie Brilliant Blue G250 (Fluka Chemie GmbH, Švýcarsko)

3.2 Použité přístroje a vybavení

Analyzátor TOC – 5000A Shimadzu Corporation (Japonsko)

Analytické váhy

Aparatura pro gelovou elektroforézu

Autokláv SanoClav (Merck, SRN)

Centrifuga Mr23i (JOUAN, Francie)

Laminární box BIO-II-A (Telstar, Španělsko)

Mikroskop Olympus CX41, s fotoaparátem Canon EOS 1100D a softwarem Quick PHOTO MICRO 3.1

Mikrovltná trouba Elektrolux

pH metr pH 730 WTW (Německo)

TECAN Infinite 200 PRO Tecan Trading (Švýcarsko)

UV transluminátor Syngene

UV-VIS spektrofotometr UNICAM

Laboratorní třepačky, inkubátory a další běžné vybavení mikrobiologické laboratoře

3.3 Postupy identifikace kultur a studia jejich vlastností

Testované kultury byly použity z předešlého výzkumu, provedený Ing. Evou Ringlovou, na Fakultě Technologické ve Zlíně. Tyto kultury byly získány z kalových suspenzí s CAPB a EHS a mají pracovní názvy, a to F1V, F1M, EHS 1, EHS 2, EHS 3 a EHS 4. Pozdějším testováním byly v rámci této práce získány nové kultury, také z kalové suspenze s obsahem EHS, a to s pracovními názvy EHS 11, 12, 14, 15 a 16.

3.3.1 Ověření růstu izolovaných kultur při různých teplotách

Kultury byly naočkovány na Petriho misky s R2A agarem. Byly zvoleny teploty: 5, 12, 25, 30, 37 a 42°C. Doba kultivace byla 3 – 14 dní.

3.3.2 Ověření růstu izolovaných kultur při různých koncentracích NaCl

Kultury (EHS 1-4, EHS 11-16, F1M, F1V) byly přeočkovány na Petriho misky s R2A agarem s přídatkem NaCl 0; 0,5; 3; 6,5; 10 a 15 %. Kultivace probíhala při 30°C po dobu 10 dní.

3.3.3 Vlastnosti kultur

Oxidačně-fermentační test

Po sterilizaci a zchladnutí média byla na vyžíhanou kličku nabrána zkoumaná kultura a poté byl touto kličkou proveden vpich do celého objemu zkumavky s médiem. Zkumavky byly inkubovány při 25 °C po dobu 8 dní.

Test na katalasu

Kultura byla nabrána na vyžíhanou kličku a rozmíchána v kapce 3% peroxidu vodíku. V případě přítomnosti katalasy docházelo k produkci bublinek kyslíku. V případě negativního výsledku nedocházelo k žádné viditelné reakci.

Test na cytochromoxidasu

Test byl prováděn pomocí komerčního testu OXI-test (Pliva-Lachema, Brno). Na speciální papírek bylo nanášeno inokulum. Pozitivní reakce se projevila zmodráním papírku. Při negativní reakci nedošlo k žádné barevné změně papírku.

Gramovo barvení

Byl připraven nativní preparát, kdy na podložním sklíčku v kapce fyziologického roztoku byla rozmíchána mikrobiální kultura vyžíhanou kličkou. Po zaschnutí suspenze byla provedena fixace preparátu v plameni. Fixovaný a zaschlý roztěr na podložním sklíčku byl převrstven krystalovou violetí po dobu 60 sekund. Barva byla slita a preparát převrstven Lugolovým roztokem opět po dobu 60 sekund. Poté byl preparát oplachován destilovanou vodou a odbarvován acetonem, dokud neodtékala barva, avšak maximálně 20 – 25 sekund. Preparát byl důkladně opláchnut destilovanou vodou a dobarven safraninem po dobu 60 sekund. Nakonec byl preparát důkladně opláchnut destilovanou vodou a ponechán usušit. Po uschnutí byl na preparát nanášen imerzní olej a mikroskopován při zvětšení 1000x.

3.3.4 Ověření degradace CAPB kombinací kultur F1V a F1M

Kultury byly suspendovány ve sterilním fyziologickém roztoku do vytvoření suspenze o hustotě 2. stupně McFarlandovy stupnice. Do 3 sterilních lahvíček bylo nadávkováno 40 ml sterilního minerálního média (MM), 40 µl sterilního roztoku MEM vitamínů, 300 µl sterilního zásobního roztoku CAPB a poté byly každá zaočkovány 80 µl suspenze kultury

F1M a 80 µl F1V. Lahve byly inkubovány na třepačce ve tmě při 25°C a postupně byly odebírány vzorky, filtrovány přes sterilní MILLIPORE MCE (0,22 µm) a případně ředěny destilovanou vodou, do vzorkovnic pro stanovení celkového organického uhlíku (TOC).

Pro abiotický pokus byly použity další 2 lahvičky, které byly připraveny stejným způsobem, avšak byly „zaočkovány“ 160 µl inaktivované (autoklávované) suspenze kultury F1V. Pokus trval 45 dnů. Vzorky byly odebrány na začátku a na konci pokusu a přefiltrovány do vzorkovnic pro stanovení TOC. Lahvičky byly inkubovány při 25°C.

3.3.5 Pohyb kultur F1V a F1M s CAPB

Dalším pokusem bylo sledování pohybu kultur F1V a F1M pod mikroskopem. Lahvičky s roztoky byly připraveny stejným způsobem jako při pokusu degradace CAPB. Pouze kultury nebyly dávkovány dohromady, ale každá zvlášť do jedné lahvičky. Lahvičky byly inkubovány při 25°C na třepačce, po třech dnech byl pozorován pohyb buněk, pomocí mikroskopu, při zvětšení 400 x.

3.3.6 Ověření společné i samostatné degradace CAPB kulturami F1V a F1M

Nejprve bylo připraveno MM, které bylo za častého míchání rozlito po 40 ml do 11 ks skleněných lahviček o objemu 250 ml. Poté byly tyto lahvičky sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut. Během sterilizace byly připraveny bakteriální suspenze kultur F1V a F1M, kdy každá kultura byla rozmíchána ve sterilním fyziologickém roztoku. Hustota suspenze dosahovala 2. stupně McFarlandovy stupnice. Po sterilizaci lahviček bylo do každé napipetováno 40 µl sterilního roztoku MEM vitamínů a 400 µl sterilního zásobního roztoku CAPB (tedy koncentrace 300 mg/l). Lahvičky 1-3 byly zaočkovány 800 µl suspenze s kulturou F1M, lahvičky 4-6 byly zaočkovány 800 µl suspenze s kulturou F1V, lahvičky 7-9 byly zaočkovány 400 µl suspenze s kulturou F1M a 400 µl suspenze s kulturou F1V. Lahvičky 10 a 11 nebyly zaočkovány suspenzí, sloužily jako kontroly. Kultivační lahvičky byly inkubovány při teplotě 25 °C na třepačce. Po promíchání lahviček byly v určitých intervalech odebrány 4 ml vzorku. 2 ml byly odstředěny při 10 000 g po dobu 12 min, při 4 °C. Poté bylo odebráno 1,5 ml supernatantu a ten byl zředěn 4,5 ml destilované vody. Roztok byl přelit do vzorkovnic pro automatický analyzátor uhlíku Shimadzu. Zbylé 2 ml sloužily ke změření absorbance na spektrofotometru při 600 nm.

3.3.7 Pohyb kultur EHS 1, EHS 2, EHS 3 a EHS 4

Do pěti lahvíček bylo nadávkováno 10 ml MM, 10 μ l sterilního roztoku MEM vitamínů, 5 μ l EHS a každá lahvíčka zaočkována jednou kulturou. Poslední lahvíčka bez zaočkování sloužila jako kontrola. Lahvičky byly inkubovány při 25°C na třepačce.

3.3.8 Růst kultur F1V a F1M při různých koncentracích CAPB

Nejprve bylo připraveno 2x koncentrované MM a sterilní zásobní roztoky CAPB o koncentraci 10 g/l a 100 g/l. Do sterilní mikrotitrační destičky bylo do jamek sloupců 1+2, 4+5, 8+9 a 12 nejprve napipetováno 90 μ l minerálního média, objemy sterilní destilované vody (viz Tab. 4) a objemy zásobních roztoků CAPB (viz Tab. 5). Všechny jamky sloupců 1+2 byly naočkovány 10 μ l suspenze kultury F1M, sloupec 4+5 byly naočkovány 10 μ l suspenze kultury F1V a všechny jamky sloupců 8+9 byly naočkovány 5 μ l suspenze kultury F1M a 5 μ l suspenze kultury F1V. Žádná jamka sloupce 12 nebyla naočkována, sloupec sloužil jako kontrola sterility. V řádcích A až H tak byly získány koncentrace CAPB 0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7,5 a 10 g/l. Destička byla uzavřena víčkem a inkubována po dobu 14 dnů při teplotě 25°C. Na konci pokusu byl změřen zákal jednotlivých jamek pomocí spektrofotometru TECAN při 600 nm.

Tabulka 4 - Přídavek sterilní destilované vody do jednotlivých jamek (μ l)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100		100	100			100	100			100
B	90	90		90	90			90	90			90
C	80	80		80	80			80	80			80
D	60	60		60	60			60	60			60
E	40	40		40	40			40	40			40
F	0	0		0	0			0	0			0
G	85	85		85	85			85	85			85
H	80	80		80	80			80	80			80

Tabulka 5 - Přídavek zásobních roztoků CAPB o koncentraci 10 g/l nebo 100 g/l (μ l)

Zásobní roztok CAPB o koncentraci 10 g/l												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0		0	0			0	0			0
B	10	10		10	10			10	10			10
C	20	20		20	20			20	20			20
D	40	40		40	40			40	40			40
E	60	60		60	60			60	60			60
F	100	100		100	100			100	100			100
Zásobní roztok CAPB o koncentraci 100 g/l												
G	15	15		15	15			15	15			15
H	20	20		20	20			20	20			20

3.3.9 Adaptace aktivovaného kalu na 2-ethylhexyl salicylate a 2-ethylhexanol a izolace degradačních bakterií

Do dvou 500 ml lahví bylo nadávkováno 5 ml aktivovaného kalu se sušinou cca 5 g/l, 5 ml sterilního MM a 40 ml sterilní destilované vody. Po promíchání bylo přidáno do jedné lahve 50 μ l EHS a do druhé 31 μ l EhoLu. Po 3 týdnech inkubace ve tmě při 25°C byly 5 ml vzorky z každé suspence protřepány se sterilním mořským pískem, pro desintegraci vloček, a poté naočkovány v objemech 0,1 ml, 10 μ l a 2 μ l do 10 ml čerstvého sterilního MM v lahvích. K suspensím bylo pak přidáno 5 μ l EHS, resp. 3 μ l EhoLu. Po opětovné inkubaci po dobu 1 týdne byly obě suspence s nejmenším inokulem vyočkovány křížovým roztěrem na TYA agary a R2A agary. Kultivací při 25°C pak byly získány jednotlivé kultury, které byly postupně přeočkovány a vyčištěny. Čisté kultury byly zakonzervovány při -80°C v glycerolu.

3.3.10 Ověření růstu kultur EHS 11 až EHS 16 na salicylanu sodném

Bylo připraveno 15 lahvíček, do každé bylo přidáno 10 ml MM a při 121°C byly po dobu 25 min. vsterilizovány. Po sterilizaci bylo přidáno 10 μ l sterilního roztoku MEM vitamínů a 40 μ l 10 %-tního sterilního roztoku salicylanu sodného (SALNa). Poté byly vždy 2 lahvičky naočkovány jednou kulturou. Poslední 3 lahvičky nebyly očkované, sloužily pouze jako kontroly. Lahvičky byly kultivovány na třepačce při 25°C. V průběhu pokusu byl sledován růst kultur a na konci pokusu byl proveden odběr vzorků na stanovení DOC.

3.3.11 Stanovení buněčných bílkovin v bakteriální suspenzi při růstu čistých kultur na EHS

Do lahvíček bylo nadávkováno 40 ml MM, 40 μ l bakteriální suspenze, 20 μ l ESH a 40 μ l MEMs vitamínů. Každou kulturou byly zaočkovány 2 lahvičky a 2 lahvičky sloužily jako kontroly, tedy neobsahovaly žádnou bakteriální suspenzi. Poté byly z lahvíček v určitých intervalech odebírány vzorky a bylo provedeno stanovení buněčných bílkovin.

Byl připraven zásobní roztok činidla pro stanovení proteinů rozpuštěním 0,02 g barviva Coomasie Brilliant Blue G250 v 50 ml etanolu. Poté bylo přidáno 700 ml destilované vody a 20 ml 85%ní kyseliny fosforečné. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1000 ml. Pro získání kalibrační křivky byl připraven zásobní roztok (200 mg/l) rozpuštěním 102,1 mg albuminu v 500 ml destilované vody. Pracovní roztoky byly získány naředěním. Tris – HCl pufr byl připraven rozpuštěním 1,2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane v 58,4 ml 0,1 M HCl a směs byla doplněna do 200 ml destilovanou vodou.

Postup stanovení: Do zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml Tris – HCl pufru (pH = 8) a 0,5 ml vzorku. Poté byly zkumavky vloženy do vodní lázně a ponechány po dobu 10 minut temperovat při teplotě 37 °C. Pak bylo přidáno 5 ml činidla Coomassie Brilliant Blue G250 a zkumavky byly důkladně protřepány. Po 5 minutách byly zkumavky vloženy do vodní lázně s teplotou 21 °C po dobu 10 minut. Poté byly opět protřepány a byla měřena absorbance při 578 nm oproti destilované vodě. Obsah bílkovin byl odečten z kalibrační křivky, která byla sestavena pomocí roztoků hovězího albuminu v koncentracích 0 – 200 mg/l.

3.3.12 Ověření degradace betainu kulturami F1V a F1M

Nejprve bylo připraveno MM, které bylo za častého míchání rozlito po 25 ml do 8 ks skleněných lahvíček o objemu 250 ml. Poté byly tyto lahvičky sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut. Během sterilizace byly připraveny bakteriální suspenze kultur F1V a F1M, kdy každá kultura byla rozmíchána ve sterilním fyziologickém roztoku. Hustota suspenze dosahovala 2. stupně McFarlandovy stupnice. Také byl připraven zásobní roztok betainu (BET), kdy byl rozpuštěn 1 g v 8 ml destilované vody, roztok byl promíchán a doplněn do 10 ml. Poté byl sterilizován filtrací přes 0,22 μ m ultrafiltr do sterilní zkumavky. Po sterilizaci lahvíček bylo do každé asepticky napipetováno 25 μ l sterilního

roztoku MEM vitamínů a 75 μ l sterilního zásobního roztoku BET. Lahvičky 1-3 byly zaočkovány 25 μ l suspenze s obsahem kultury F1M, lahvičky 4-6 byly zaočkovány 25 μ l suspenze s obsahem kultury F1V. Do lahviček 7 a 8 nebyla přidána žádná suspenze, lahvičky sloužily jako kontroly. Kultivační lahvičky byly inkubovány při teplotě 25 °C na třepačce. Po promíchání lahviček bylo v určitých intervalech odebíráno po 3 ml vzorku. 2 ml byly odstředěny při 10 000 g po dobu 12 min, při 4 °C. Poté bylo odebráno 1,5 ml supernatantu a ten byl zředěn 4,5 ml destilované vody. Roztok byl přelit do vzorkovnic pro automatický analyzátor uhlíku Shimadzu. Zbylý 1 ml byl rozpipetován po 200 μ l do mikrotitrační destičky a byla změřena absorbance na spektrofotometru TECAN při 600 nm.

3.3.13 Posouzení rozkladu lauramidu na pevných agarech kulturami F1V a F1M

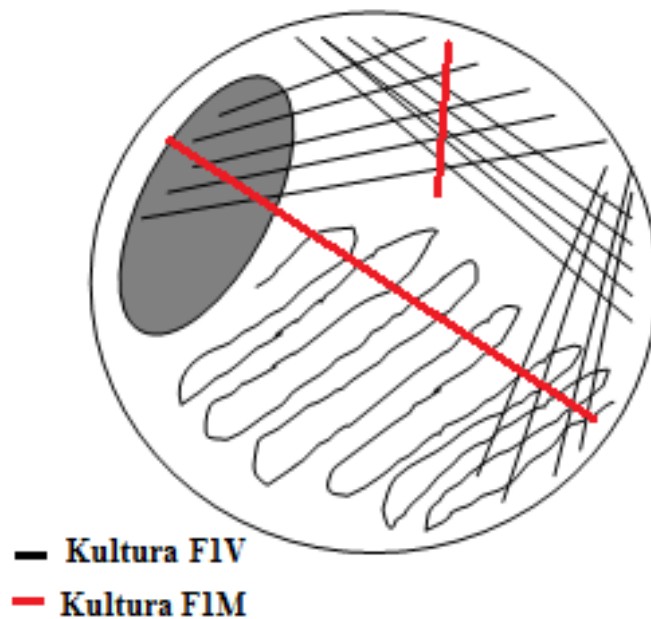
Byly připraveny 4 dávky minerálního agaru:

- 1) 1,9 g minerálního agaru + 200 μ l roztoku stopových prvků + 96 ml destilované vody
- 2) 1,9 g minerálního agaru + 200 μ l roztoku stopových prvků + 96 ml destilované vody + 50 mg tryptonu
- 3) 1,9 g minerálního agaru + 200 μ l roztoku stopových prvků + 96 ml destilované vody
- 4) 1,9 g minerálního agaru + 200 μ l roztoku stopových prvků + 96 ml destilované vody

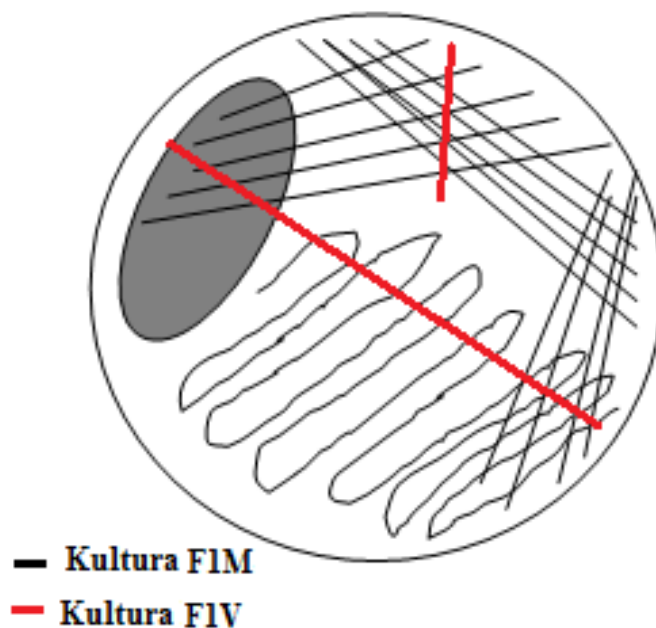
Tyto agary byly sterilizovány při 121 °C po dobu 25 minut. Během sterilizace byly připraveny suspenze obou kultur o hustotě 2. stupně McFarlandovy stupnice. Poté byl připraven zásobní roztok lauramidu (LA) (12,5 g/l), který byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO). Zásobní roztok LA v DMSO a paralelně i samotný DMSO byly sterilizovány filtrací, přes 0,22 μ m ultrafiltr GILLEX – GV (MILLIPORE) do sterilních zkumavek. Po sterilizaci agarů bylo do první i druhé dávky napipetováno 5 ml samotného DMSO, agary byl dokonale promíchány a rozlity do Petriho misek. Do třetí dávky byly za stálého míchání přidány 4 ml zásobního roztoku LA v DMSO, agar byl dokonale promíchán a rozlit do Petriho misek. Do čtvrté dávky bylo přidáno 100 μ l roztoku vitamínů, za stálého míchání 4 ml zásobního roztoku LA v DMSO, agar byl dokonale

promíchán a rozlit do Petriho misek. Každá kultura byla naočkováána křížovým roztěrem na všechny 4 typy agarů. Misky byly kultivovány při 25 °C v termostatu.

Poté byl ještě jednou připraven modifikovaný agar č. 3, kdy po sterilizaci byly přidány 4 ml zásobního roztoku LA v DMSO. Do prázdných Petriho misek bylo naváženo 100 mg čistého LA a tato navážka byla zalita připraveným agarem a promíchána. Poté na jedné misce byl proveden křížový roztěr kultury F1M, na druhé F1V. Třetí miska byla zaočkováána kulturami F1M a F1V společně v („pecce“) a poté byl proveden křížový roztěr. Na čtvrté misce byl proveden křížový roztěr kulturou F1V a kulturou F1M byly provedeny 2 čáry přes kulturu F1V (viz Obr. 6). Na páté misce byl proveden křížový roztěr kulturou F1M a kulturou F1V byly provedeny 2 čáry přes kulturu F1M (viz Obr. 7).



Obrázek 6 - Křížový roztěr (F1V + F1M)



Obrázek 7 - Křížový roztěr (F1M + F1V)

3.3.14 Ověření růstu kultur EHS 11 – 16 v přítomnosti 2-ethylhexanolu

Nejprve bylo připraveno MM, které bylo za častého míchání rozlito po 20 ml do 10 ks skleněných lahviček o objemu 250 ml. Poté byly tyto lahvičky sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut. Během sterilizace byly připraveny bakteriální suspenze kultur EHS 11 -16, kdy každá kultura byla rozmíchána ve sterilním fyziologickém roztoku. Hustota suspenze dosahovala 2. stupně McFarlandovy stupnice. Po sterilizaci lahviček bylo do každé asepticky napipetováno 20 µl sterilního roztoku MEM vitamínů a 12 µl roztoku EhoLu, kromě lahviček 9 a 10, které sloužily jako kontroly. Lahvičky 1-8 byly zaočkovány 20 µl suspenze s obsahem kultury EHS 11 – 16, každá kultura vždy do dvou paralelních lahviček. Kultivační lahvičky byly inkubovány při teplotě 25 °C na třepačce. Po promíchání lahviček bylo v určitých intervalech odebíráno po 1 ml vzorku, který byl rozpipetován po 200 µl do mikrotitrační destičky a byla změřena absorbance na spektrofotometru TECAN při 600 nm.

3.3.15 Izolace DNA, PCR, Purifikace

Identifikace kultur byla prováděna pomocí molekulárně biologické metody – polymerasové řetězové reakce s následnou sekvenací úseků genu pro 16S rRNA.

Isolace DNA ze získaných bakterií

Čerstvě narostlé kultury na R2A agaru byly kličkou umístěny do zkumavky s rozbíječnými kuličkami a poté proběhla rychlá a dokonalá homogenizace. K izolaci DNA byl používán Power SoilTM DNA Isolation Kit a byl použit postup dle pokynů výrobce. Ke kulturám bylo přidáno 60 μ l roztoku C1, zkumavky byly umístěny na Mo Bio Vortex a 10 minut vortexovány, poté 30 sekund centrifugovány při 14 100 RPM. Supernatant byl přenesen do čisté 1,5 ml zkumavky, bylo napipetováno 250 μ l roztoku C2, vortexováno 5 sekund a poté inkubováno 5 minut při 4 °C. Po inkubaci byla směs centrifugována při pokojové teplotě po dobu 1 minuty a kromě peletky bylo přeneseno maximálně 600 μ l supernatantu do čisté 1,5 ml zkumavky. Bylo přidáno 200 μ l roztoku C3, krátce vortexováno a opět inkubováno 5 minut při 4 °C. Poté byly zkumavky centrifugovány po dobu 1 minuty. Kromě peletky bylo přeneseno max. 750 μ l supernatantu do nové 1,5 ml zkumavky. Bylo přidáno 1200 μ l roztoku C4 a vortexováno 5 sekund. Přibližně 675 μ l bylo přeneseno do kolonky a centrifugováno 1 minutu. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a tento postup byl opakován ještě 2x. Poté bylo napipetováno 500 μ l roztoku C5 a centrifugováno 30 sekund. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a směs opět centrifugována po dobu 1 minuty. Kolonka byla opatrně přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky, bylo napipetováno 30 μ l roztoku C6 doprostřed bílé membrány uvnitř kolonky a ponecháno 5 minut stát. Poté byly zkumavky centrifugovány po dobu 30 sekund. Po vyjmutí kolonky byla DNA připravena k dalšímu zpracování.

Příprava směsi látek pro zmnožení dané DNA a samotný postup PCR

Jednotlivé složky uvedené v Tab. 6 byly napipetovány do mikrozkušavky a poté byly všechny připravené mikrozkušavky zcentrifugovány při 14 100 RPM po dobu 1 minuty. Byly použity primery (syntetické oligonukleotidy) – 341F (CCTACGGGAGGCAGCAG) a 907R (CCGTCAATTCCTTTGAGTTT). Vzorky byly připraveny jak neředěné, tak ředěné v poměru 1 : 9 a byl proveden i slepý pokus, kdy místo vzorku byla použita voda pro molekulární biologii.

Tabulka 6 - Roztoky pro přípravu reakční směsi

Voda pro mol. biologii	9,5 μ l
Roztok primeru 341F	1,0 μ l
Roztok primeru 907R	1,0 μ l
MasterMix	12,5 μ l
Vzorek	1,0 μ l

Následovalo vložení mikrozkušavek do termocyklu a spuštění programu s kroky, uvedenými v Tab. 7.

Tabulka 7 – Program PCR

95 °C	2 min	
95 °C	30 s	35 x opakování
61 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

Postup kontroly PCR gelovou elektroforézou

1% agarosový gel byl rozpuštěn ve 100 ml trisacetátového pufru, roztok byl rozvařen v mikrovlnné troubě. Gel byl samovolně zchlazen na 60 °C a poté byly přidány 4 kapky roztoku etidium bromidu. Gel byl rozlit na plotnu s hřebínkem. Po ztuhnutí byl vytažen hřebínek a gel byl vložen do elektroforetické vany a zalit trisacetátovým pufrem. Do jamek, které byly vytvořeny hřebínkem, byly dávkovány vzorky. Do první jamky byly napipetovány 4 μ l markru, do ostatních 4 μ l upravených vzorků. Elektroforéza probíhala 20 minut při konstantním napětí 90 V. Po skončení byl gel vyjmut a vložen do UV transluminátoru.

Purifikace amplifikované DNA

Purifikace byla provedena pomocí protokolu High Pure PCR Product Purification Kit. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 20 μ l PCR produktu a 100 μ l vazebného pufru a směs byla vortexována. Tato směs byla přenesena na kolonku, které byla vložena do čisté mikrozkušavky a centrifugována po dobu 60 sekund při 14 100 RPM. Přefiltrovaný roztok byl vylit a kolonka byla vložena zpět do stejné zkušavky. Bylo přidáno 500 μ l

promývacího pufru a centrifugováno po dobu 1 minuty. Roztok ve zkumavce byl opět vylit a bylo přidáno 200 μ l promývacího pufru a opět centrifugováno po dobu 1 minuty. Poté byla kolonka přenesena do čisté mikrozkuavky, bylo přidáno 30 μ l vymývacího pufru a ponecháno 15 minut stát. Mikrozkuavka byla centrifugována po dobu 1 minuty. Kolonka byla vyhozena a v mikrozkuavce byla přečištěná DNA.

Příprava na sekvenaci

Před odesláním vzorků DNA k sekvenaci bylo nutné k 8,5 μ l vzorku přidat 1,5 μ l roztoků primerů 341F a 907R. Mikrozkuavky byly poté poslány na externí pracoviště k sekvenaci.

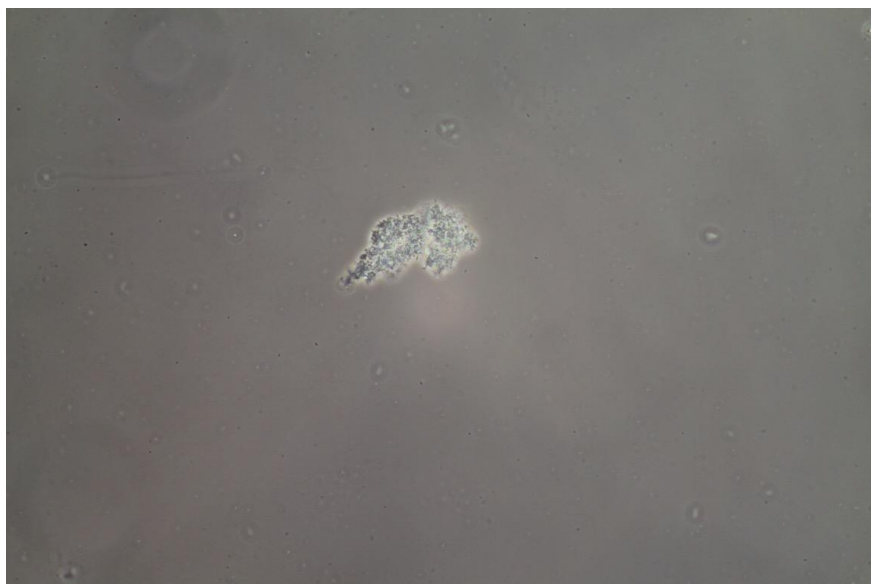
Vlastní identifikace

Získané sekvence 16S rRNA byly porovnány s výsledky uloženými v databázi GenBank pomocí programu BLAST. Sekvence po vyhodnocení jsou uvedeny v příloze I.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Základní vlastnosti kultur F1V a F1M

Kultura F1M byla schopna růst v teplotním rozmezí 12 – 42 °C a při přidavku max. 0,5% NaCl. Je tedy možné ji označit za mesofilní a za velmi citlivou k přítomnosti NaCl. V předešlé diplomové práci bylo prokázáno, že kultura je gramnegativní. Kultura je nefermentující a glukózu rozkládá pouze aerobně. Test na katalasu a cytochromoxidasu byl pozitivní, což znamená, že rozkládá 3% peroxid vodíku. Kultura po třech dnech inkubace vytvářela jemnou suspenzi s malým množstvím mikrovloček (Obr. 8). Mikroskopickým pozorováním se jevila jako pohyblivá.



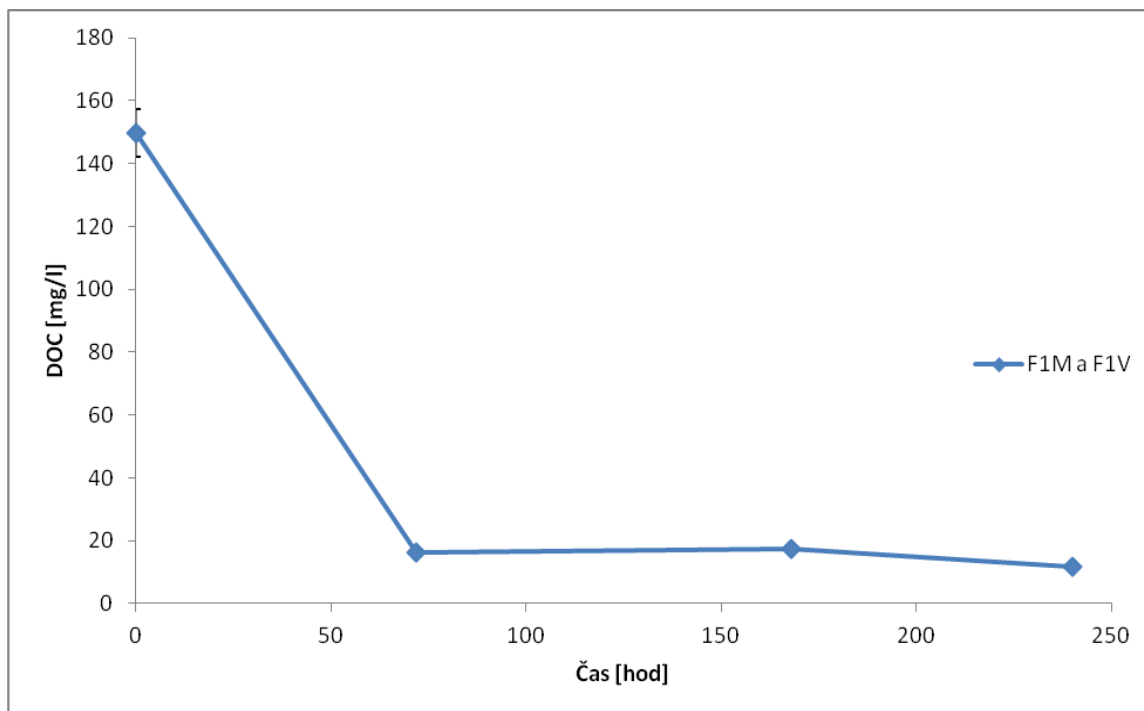
Obrázek 8 - Kultura F1M – vločka, zvětšení 400x

Kultura F1V byla schopna růstu při přidavku max. 3% NaCl a v teplotním rozmezí 12-37 °C, prokázala tedy poněkud odlišné vlastnosti od kultury F1M. Kultura je gramnegativní, nefermentující a glukózu rozkládá pouze aerobně. Test na katalasu a cytochromoxidasu byl pozitivní. Po 3 dnech inkubace kultura silně flokulovala. Pozorováním mikroskopem se kultura jevila jako nepohyblivé tyčinky.

4.2 Společná degradace CAPB kulturami F1M a F1V

Test degradace CAPB byl proveden za pomoci kultur F1V a F1M. Již v předešlé diplomové práci bylo prokázáno, že kultury F1M a F1V jsou individuálně schopny CAPB

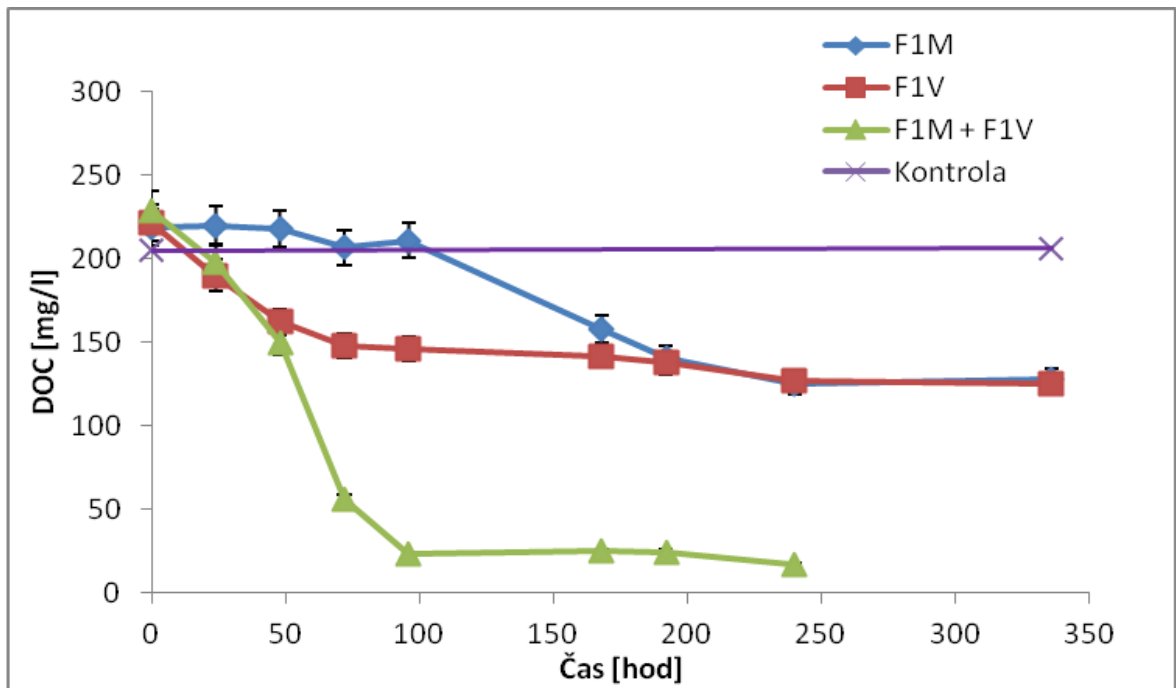
rozkládat, ale obě jen částečně. Na základě této informace byl proto proveden orientační test, kdy kultury F1M a F1V byly nasazeny společně. Popis přípravy a provedení testu je uveden v kapitole 3.3.4. V testu byl sledován úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC). Počáteční koncentrace CAPB byla 300 mg/l, po 10 denní inkubaci koncentrace DOC klesla na 23 mg/l. Z Obr. 9 je také zřetelné, že společným působením byly kultury schopné degradovat CAPB z 90 % již během 72 hod.



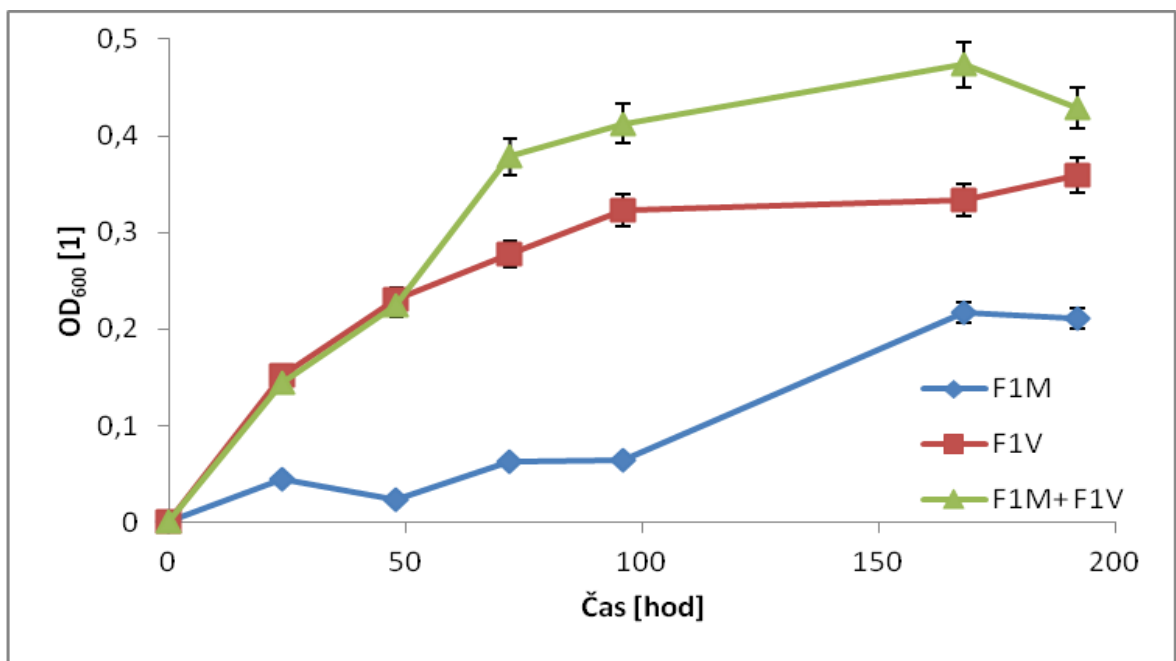
Obrázek 9 - Společná degradace CAPB kulturami F1M a F1V

V dalším, již podrobnějším testu byly kultury nasazeny jednak samostatně a jednak společně. Popis přípravy a provedení testu je uveden v kapitole 3.3.6. Opět se potvrdilo (Obr. 10), že společná degradace je rychlá a účinnější než samostatná. Kultura F1M zpočátku degradovala CAPB pomaleji než kultura F1V, ale ke konci pokusu byly obě kultury schopny individuálně odbourat přibližně stejné množství CAPB. Z Obr. 10 je zřetelné, že kultury F1V a F1M rozložily CAPB zhruba z 50 % za 14 dnů. Kultury při společném působení však opět dosáhly 90 % degradace za 96 hodin, do konce pokusu se hodnoty již příliš neměnily, po 10 denní inkubaci degradace CAPB dosahovala 92,5 %. Koncentrace v kontrolních lahvičkách (abiotický pokus) se v průběhu pokusu nijak neměnila. Zároveň byl kromě úbytku DOC měřen zákal suspensí při 600 nm. I zde bylo potvrzeno, že společný růst kultur na CAPB je rychlejší a účinnější. Kultura F1M měla

pomalejší nárůst zákalu, ale v intervalu od 4 do 7 dne měla velký nárůst zákalu (viz Obr. 11).



Obrázek 10 - Společná i samostatná degradace CAPB



Obrázek 11 - Optická densita při růstu kultur jednotlivě i společně

Další test byl prováděn v mikrotitrační destičce a byl zaměřen na zjištění maximální růstové koncentrace CAPB, jak individuálně, tak i při společném růstu obou kultur. Popis přípravy a provedení testu je uveden v kapitole 3.3.8. V průběhu 14 denní inkubace byl měřen zákal při 600 nm a konečné hodnoty, uvedené červenými čísly v Tab. 8 vypovídají o schopnosti růstu kultur na CAPB. Již při prvním odečtu zákalu, který proběhl po 3 dnech inkubace, sloupce 4+5 a 8+9 ve všech jamkách, kromě řádku A, byly pozitivní na zákal. Sloupce 1+2 byly pozitivní na zákal po 3 dnech v řádcích B - D. Změna proběhla až 10. den inkubace, kdy ve sloupci 1 se objevil i zákal v řádku E a 14. den inkubace i v řádku F. Celkově bylo možno shrnout, že kombinace kultur F1V a F1M i kultura F1V samotná jsou schopny růst i při koncentraci 10 g/l CAPB. Kultura F1M byla schopna růst při koncentracích CAPB 0,5 – 5 g/l, přičemž při koncentracích 3 a 5 g/l kultura F1M vyrostla jen v jediné paralelní jamce. Bylo proto provedeno kontrolní vyočkování jamek E1 a F1, zda nedošlo ke kontaminaci, což se nepotvrdilo. Je tedy pravděpodobné, že koncentrace 3 – 5 g/l jsou pro kulturu hraniční a o jejím růstu rozhodují zatím neznámé faktory.

Tabulka 8 - Růst kultur při koncentracích CAPB 0 – 10 g/l

	Koncentrace [g/l]	F1M		F1V		F1M + F1V		Kontrola 12
		1	2	4	5	8	9	
A	0	0,065	0,062	0,062	0,064	0,062	0,065	0,035
B	0,5	0,264	0,261	0,302	0,315	0,294	0,32	0,044
C	1	0,446	0,501	0,463	0,525	0,535	0,541	0,042
D	2	1,014	0,621	0,634	0,69	0,913	0,992	0,043
E	3	0,607	0,048	0,301	0,459	0,491	0,68	0,044
F	5	0,319	0,044	0,332	0,388	0,426	0,74	0,042
G	7,5	0,043	0,045	0,592	0,573	0,867	0,798	0,036
H	10	0,043	0,046	0,672	0,672	0,734	0,87	0,041

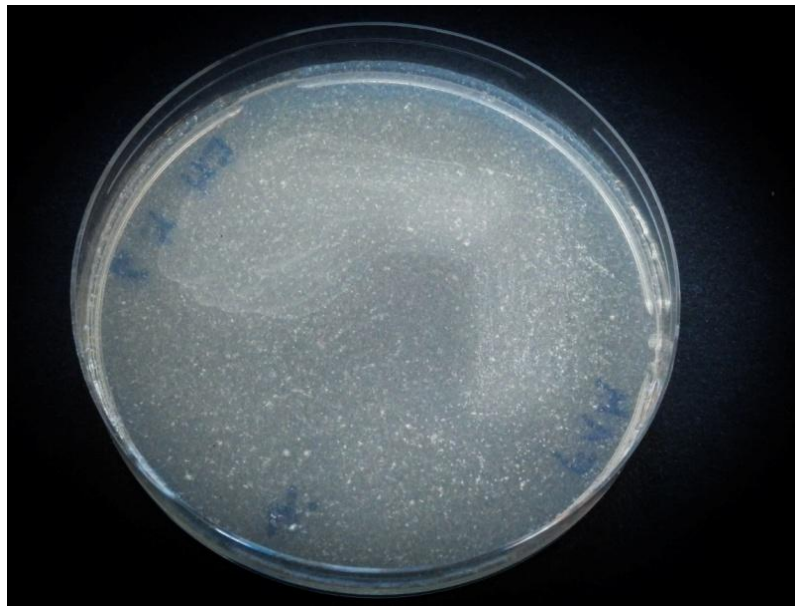
4.2.1 Studium podstaty společné degradace CAPB kulturami F1M a F1V

CAPB je tvořena především lauramidopropyl betainem a skládá se tedy ze 2 strukturně odlišných částí. Jednou z nich je lauramid a druhou částí je betain. Z předchozích výsledků nebylo zřejmé, kterou část kultury využívají k růstu a spotřebovávají ji tak. Proto bylo další testování zaměřeno na každou část CAPB zvlášť. Testy degradace betainu byly provedeny obdobným způsobem jako dosavadní degradační pokusy (sledování procesu rozkladu prostřednictvím úbytku DOC + sledování růstu kultur sledováním optické denzity

suspenzí), zkoušky degradace lauramidu však musely být vzhledem k jeho velmi omezené rozpustnosti provedeny na pevných živných agarech, kde byl sledován růst kultur a případné projasňování agarů se suspendovanými částicemi lauramidu (LA).

4.2.2 Degradace Lauramidu

Nejprve byly kultury naočkovány na živné agary s 500 mg/l. Vzhled misek po kultivaci je uveden na Obr. 12 a 13.



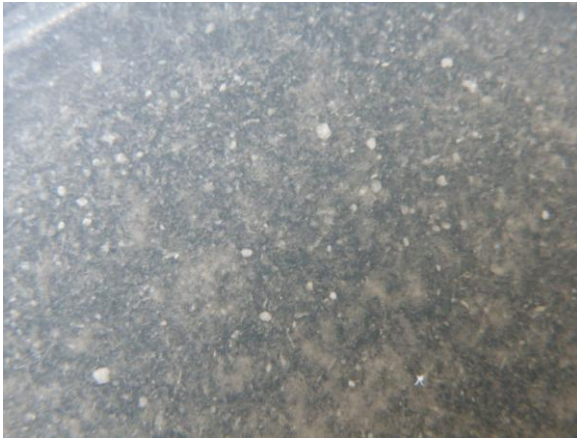
Obrázek 12 - Kultura F1M



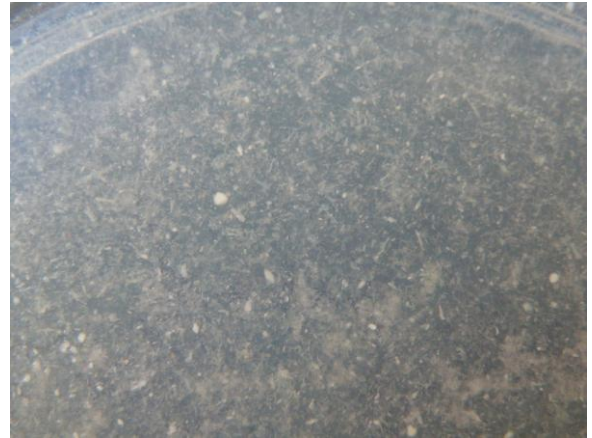
Obrázek 13 - Kultura F1V

Kultura F1M slabě rostla i na kontrolním minerálním agaru bez lauramidu a byla tedy schopná růst stejným způsobem na minerálním agaru s přidavkem LA. K žádnému projasňování agaru však při tom nedocházelo a bylo tak zřejmé, že kultura LA k růstu nevyužívala (viz Obr. 12). Kultura F1V na kontrolním minerálním agaru nerostla a růst kolonií nebyl zaznamenán ani na misce s LA, avšak dobře bylo projasnění agaru (viz Obr. 13). Znamenalo to tedy, že kultura F1V lauramid sice nevyužívá pro svůj růst, ale jistým způsobem jej přeměňuje nebo solubilizuje.

Byly proto připraveny nové agary, se zvýšenou koncentrací částic LA, a naočkovány jak jednotlivými kulturami, tak i jejich kombinacemi. Vzhled misek po kultivaci je uveden na Obr. 14 – 18.



Obrázek 14 - Kultura F1M



Obrázek 15 - Kultura F1V



Obrázek 16 - Miska č. 3 (F1M + F1V)



Obrázek 17 - Miska č. 4 (F1V + F1M)



Obrázek 18 - Miska č. 5 (F1M + F1V)



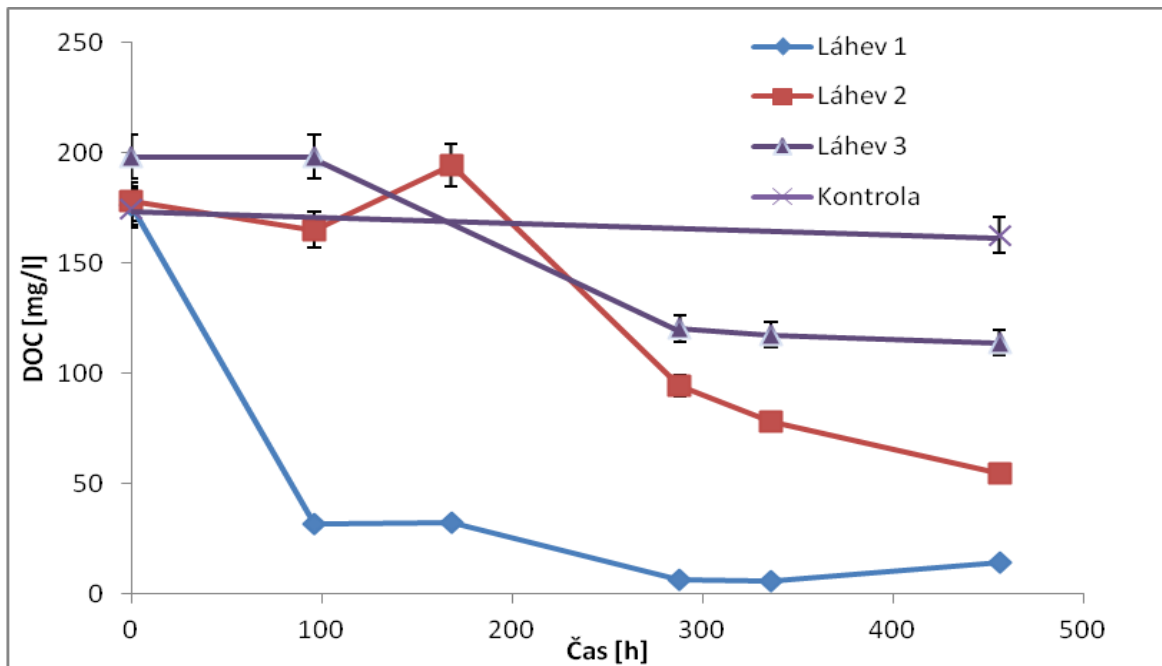
Obrázek 19 – Miska č. 5 (F1M + F1V)

Ani v tomto pokusu, kde byl LA navážen na Petriho misky a zalit agarem, kultury F1M (Obr. 14) ani F1V (Obr. 15) samostatně nerostly. Bílé tečky na obrázcích 14 a 15 nejsou kolonie bakterií, ale zrníčka LA. Naproti tomu na misce, kde byly kultury naočkovány společně v křížovém roztěru, byl zaznamenán výrazný růst kolonií, a to zejména v koncových částech křížového roztěru (Obr. 16). Na misce, kde křížový roztěr byl proveden kulturou F1V a kulturou F1M čáry přes něj, byl zaznamenán nárůst biomasy pouze v provedených čarách a růst křížového roztěru byl velmi slabý (Obr. 17). Naopak na páté misce, kde křížový roztěr byl proveden kulturou F1M a kulturou F1V čáry přes něj, byl růst biomasy v čarách velmi nepatrný (Obr. 18), zatímco růst křížového roztěru kultury F1M byl velmi zřetelný, opět nejlépe v koncových částech roztěru (Obr. 19).

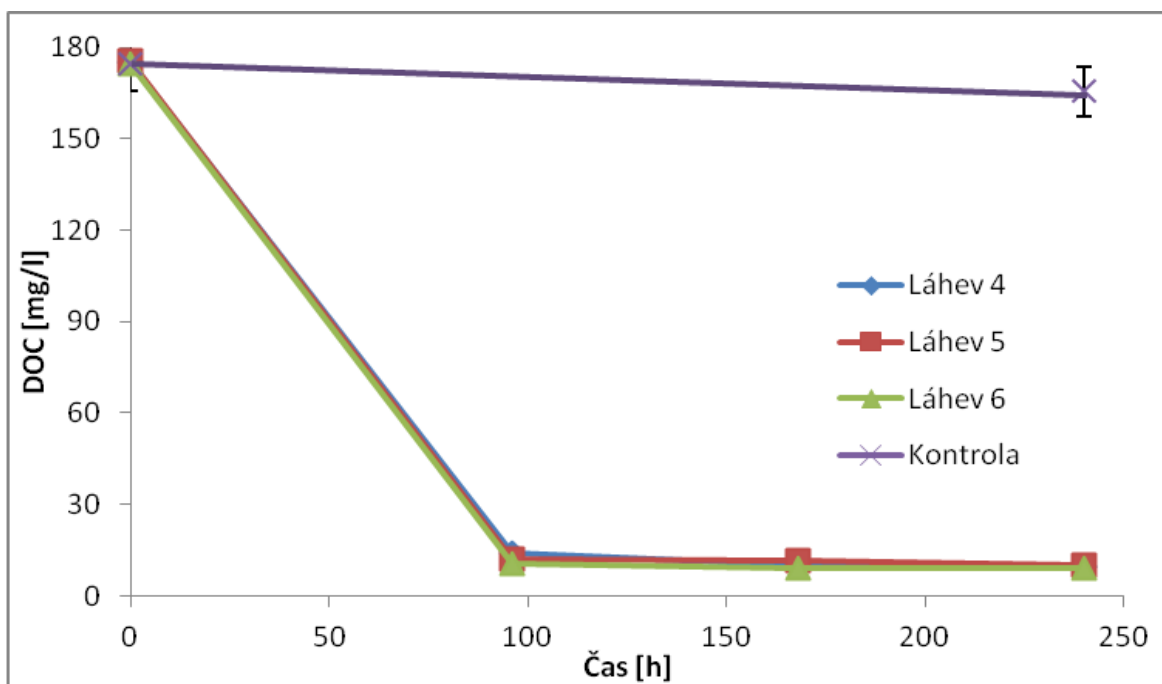
Kultura F1V tedy s největší pravděpodobností zahájí degradaci LA, ale není schopna vzniklý produkt (či produkty) dále využívat. Tento produkt (či produkty), které F1V vytvoří, však využívá kultura F1M pro svůj růst, té velmi pravděpodobně chybí enzymy pro primární degradaci nebo není schopna transportu LA do buněk.

4.2.3 Degradace Betainu

Každá kultura byla nasazena do tří lahviček s MM a zásobním roztokem betainu. Popis přípravy a provedení testu je uveden v kapitole 3.3.12. Výsledky jsou graficky dokumentovány na Obr. 20 a 21.



Obrázek 20 - Degradace betainu pomocí kultury F1M

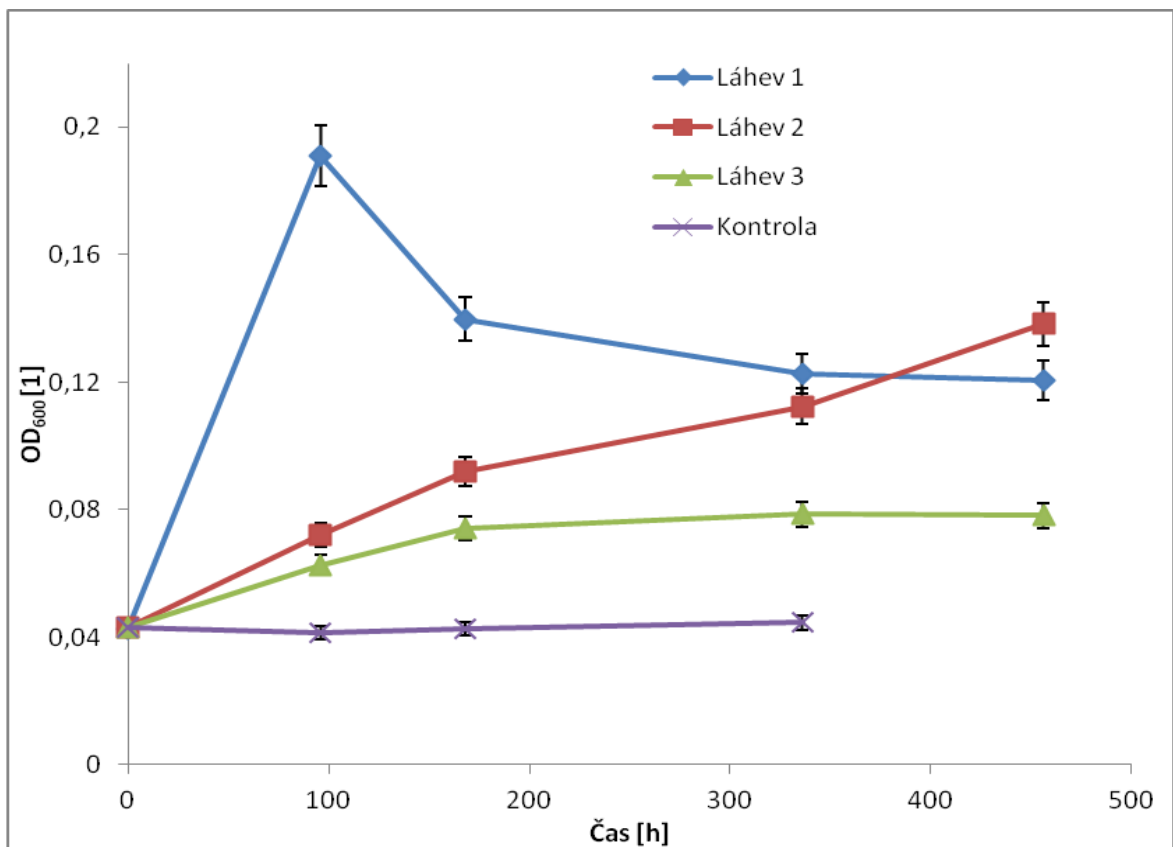


Obrázek 21 - Degradace betainu pomocí kultury F1V

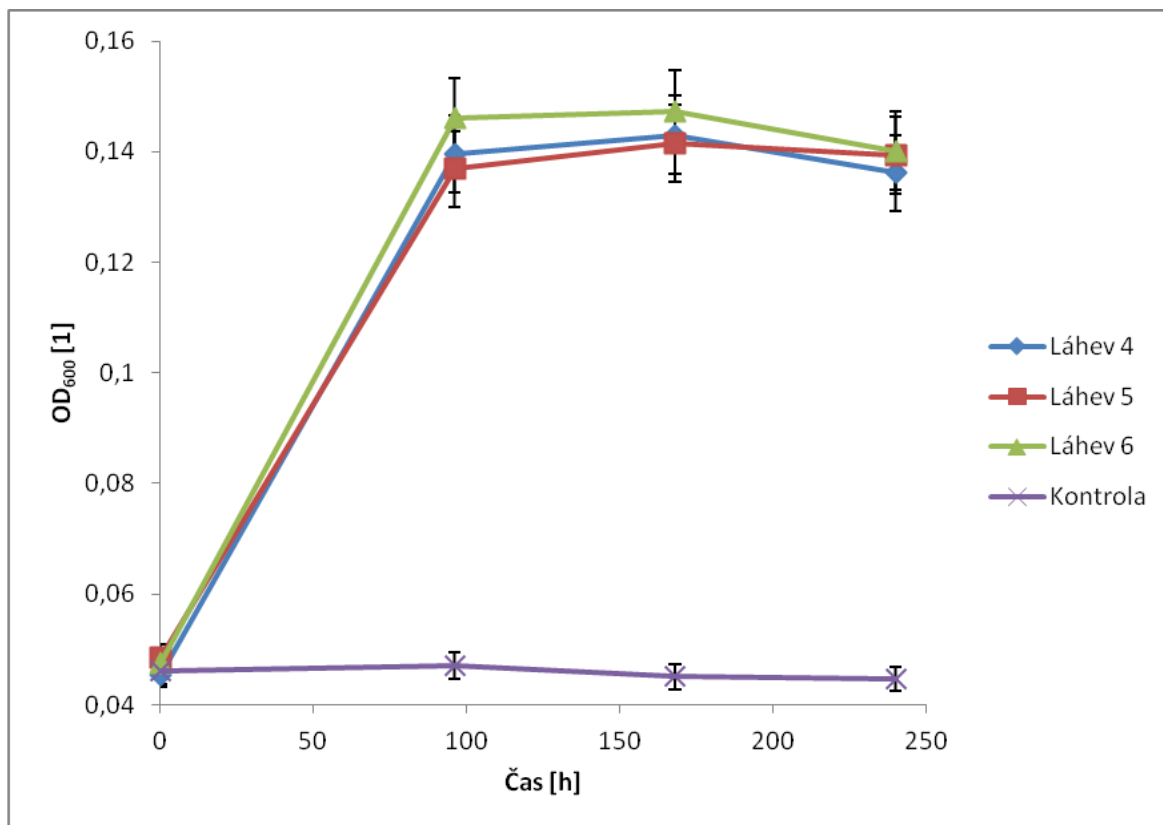
Obrázek 20 zobrazuje degradaci BET kulturou F1M. Kultura F1M se chovala velmi zvláště, jelikož v každé paralelní lahvičce spotřebovávala BET rozdílnou rychlostí. Z toho důvodu bylo z každé lahvičky vyočkováno inokulum na R2A agar, zda nedošlo ke kontaminaci testu. Kontaminace však zjištěna nebyla, v lahvičkách se vyskytovala pouze kultura F1M. V lahvičce 1. došlo k degradaci BET z cca 92 % za 19 dnů, většina substrátu

však již byla rozložena 4. den. Proces v lahvičce 2. zpočátku stagnoval, ale po 19 dnech inkubace došlo k poklesu koncentrace ze 69,5 %. V lahvičce 3. proběhla degradace BET pouze ze 43 %. Příčinu takového rozdílného chování kultury F1M se nepodařilo objasnit, bylo však dobře patrné, že tato kultura využívá BET podstatně pomaleji než kultura F1V, která byla schopna spotřebovat přibližně 93 % betainu za 96 hodin (Obr. 21). Výsledky dobře korespondují s výsledky degradace celého CAPB jednotlivými kulturami (viz. Obr. 10).

Zároveň byla měřena při pokusech degradace BET optická denzita při 600 nm, jejíž výsledky jsou graficky dokumentovány na Obr. 22 a 23.



Obrázek 22 - Optická denzita růstu kultury F1M v přítomnosti BET



Obrázek 23 - Optická denzita růstu kultury F1V v přítomnosti BET

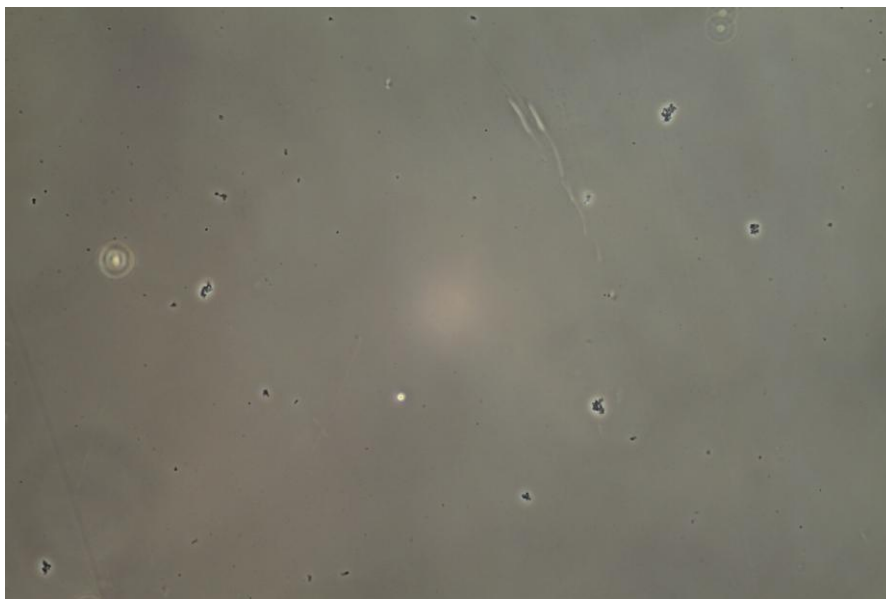
Měření optické denzity potvrdilo, že kultura F1M byla schopná růst na BET, s různou rychlostí v každé lahvičce (viz. Obr. 22). V první lahvičce došlo během 96 hodin k rychlému nárůstu zákalu. V druhé lahvičce byl zpočátku nárůst zákalu pomalejší, avšak na konci pokusu dosahovala přibližně stejných hodnot jako lahvička 1. Ve třetí lahvičce došlo pouze k mírnému zákalu.

Růst kultury F1V byl rychlý a odpovídal poklesu DOC (viz. Obr. 23).

4.3 Základní vlastnosti kultur EHS 1-4 a EHS 11 - 16

V této části práce byly studovány vlastnosti jak kultur pocházejících z DP Ringlové (EHS 1 - 4), tak i kultury, které byly získány v rámci této práce (EHS 11 - 16).

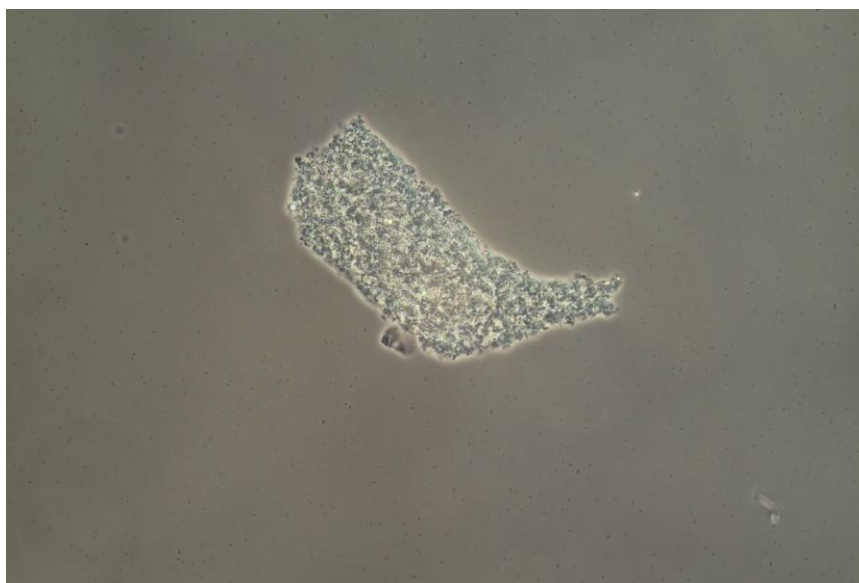
Kultura EHS 1 byla schopna růst v teplotním rozmezí 12 – 37 °C a při přidavku max. 0,5% NaCl. V předešlé diplomové práci bylo prokázáno, že kultura je gramnegativní. Kultura je nefermentující a glukózu nerozkládá vůbec. Test na katalasu a cytochromoxidasu byl pozitivní, což znamená, že rozkládá 3% peroxid vodíku.



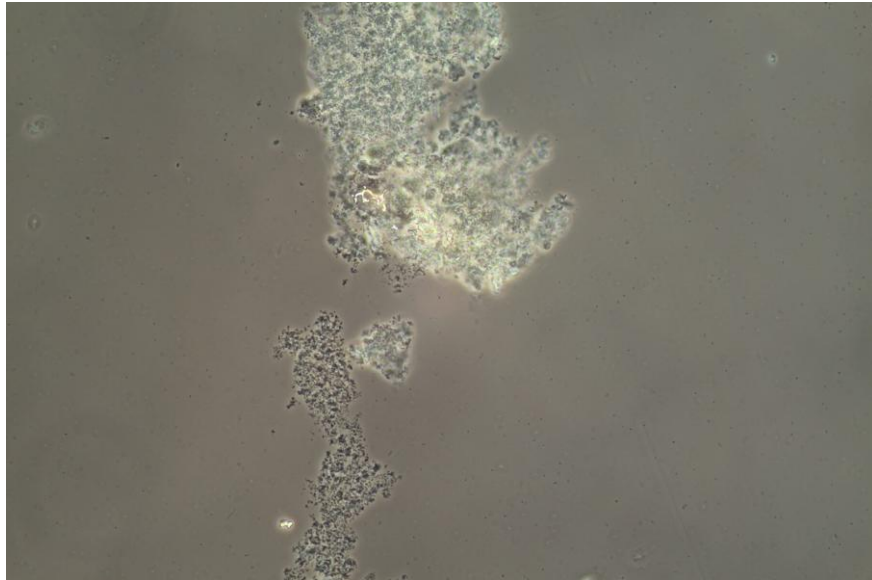
Obrázek 24 - Kultura EHS 1 – mikrovločky, zvětšení 400x

Kultura po 21 dnech inkubace v tekutém médiu vytvářela jemnou suspenzi, s malým množstvím mikrovloček (Obr. 24). Pomocí mikroskopu se jevila jako pohyblivá.

Kultura EHS 2 byla schopna růst v teplotním rozmezí 12 – 42 °C a při přídavku max. 3% NaCl. V předešlé diplomové práci bylo prokázáno, že kultura je gramnegativní. Kultura je nefermentující a glukózu rozkládá jen aerobně. Test na katalasu a cytochromoxidasu byl pozitivní, což znamená, že rozkládá 3% peroxid vodíku.



Obrázek 25 - Kultura EHS 2 – vločka, zvětšení 400x



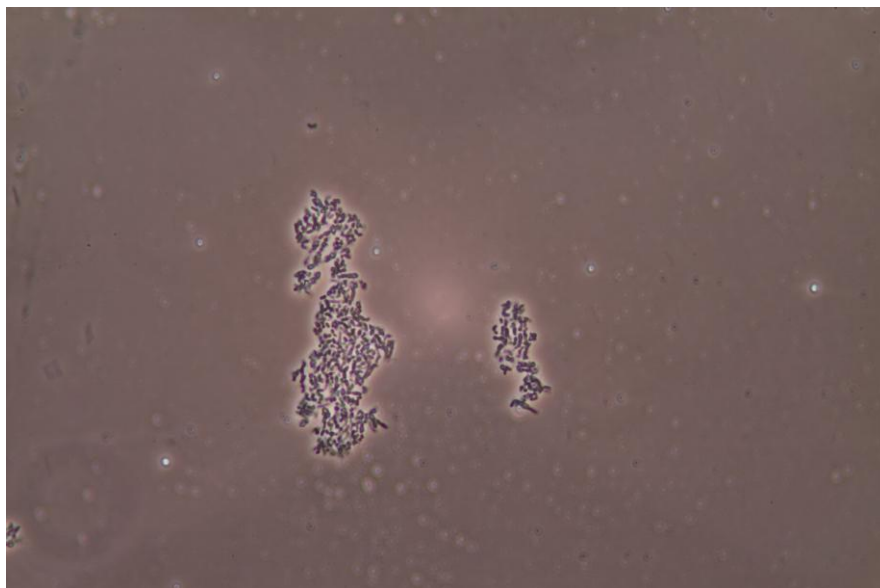
Obrázek 26 - Kultura EHS 2 – vložka, zvětšení 400x

Kultura EHS 2 po 17 dnech silně flokulovala a vytvářela vložky (Obr. 25, Obr. 26). Pod mikroskopem se jevila jako pohyblivé, poněkud zaoblené tyčinky.

Kultura EHS 3 byla schopna růst v teplotním rozmezí 12 – 37 °C a při přidavku max. 3% NaCl. Kultura je grampozitivní, nefermentující a glukózu nerozkládá vůbec. Test na katalasu byl pozitivní, což znamená, že rozkládá 3% peroxid vodíku. Test na cytochromoxidasu byl negativní.



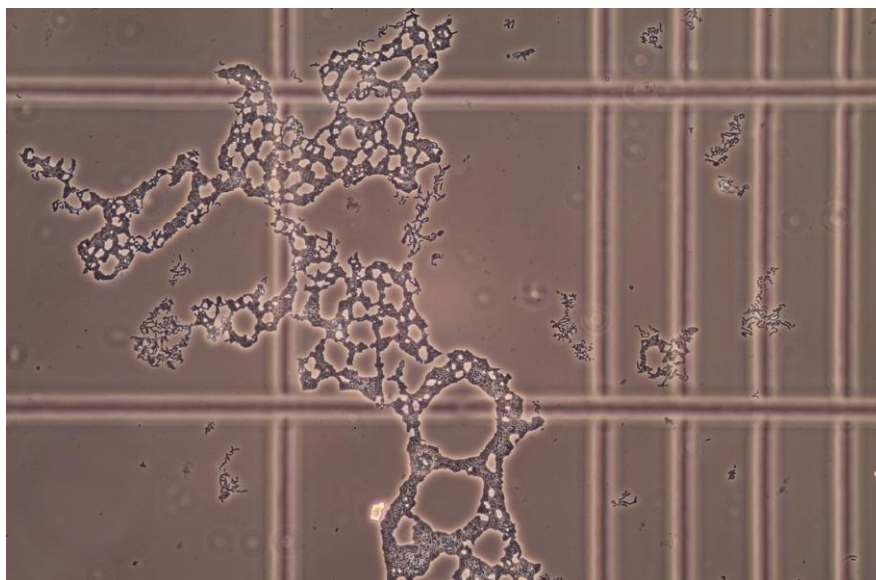
Obrázek 27 - Kultura EHS 3 – zvětšení 400x



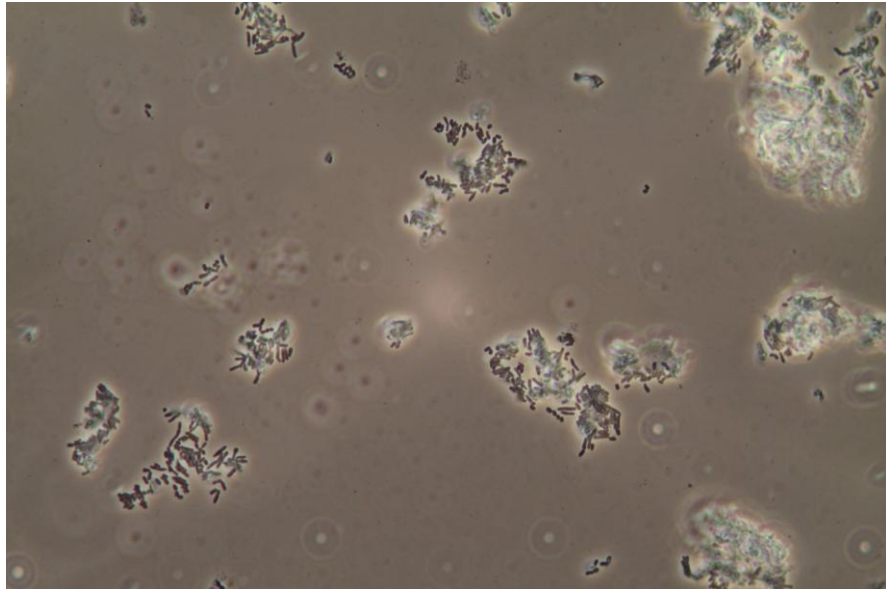
Obrázek 28 - Kultura EHS 3 – zvětšení 1000x

Kultura EHS 3 po 3 dnech inkubace vytvářela jemnou suspenzi s malým množstvím mikrovloček (Obr. 28). Pod mikroskopem kultura vypadala jako nepohyblivé, silně až esovitě zprohýbané tyčinky (Obr. 27).

Kultura EHS 4 byla schopna růst v teplotním rozmezí 12 – 42 °C a při přidavku max. 3% NaCl. V předešlé diplomové práci bylo prokázáno, že kultura je grampozitivní. Kultura je nefermentující a glukózu nerozkládá vůbec. Test na katalasu byl pozitivní, což znamená, že rozkládá 3% peroxid vodíku. Test na cytochromoxidasu byl negativní.



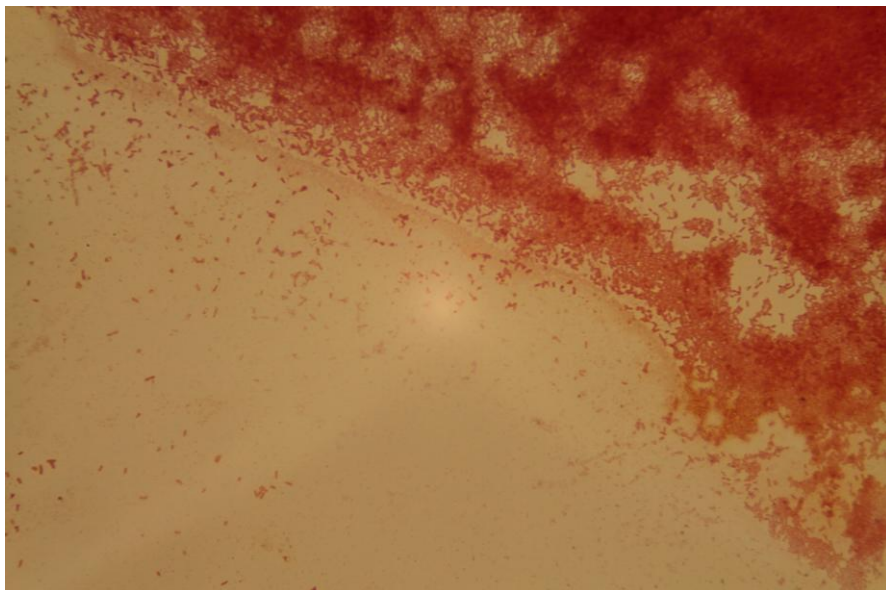
Obrázek 29 - Kultura EHS 4 – zvětšení 400x



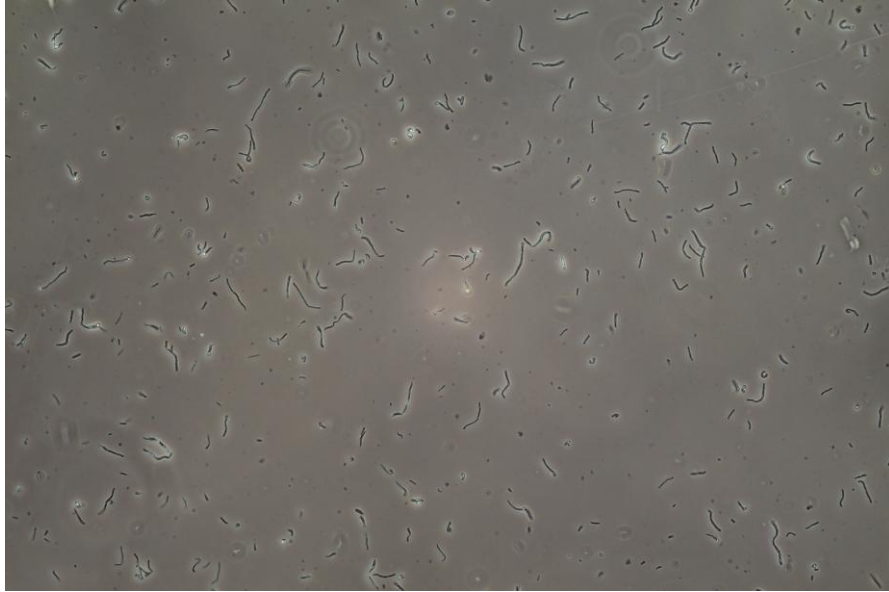
Obrázek 30 - Kultura EHS 4 – zvětšení 1000x

Kultura EHS 4 po 3 dnech inkubace silně flokulovala a vytvářela vločky (Obr. 29, Obr. 30). Pod mikroskopem se kultura jevila jako nepohyblivé kratší tyčinky, rovné se zaoblenými konci, občas mírně prohnuté.

Kultura EHS 11 byla schopna růst v teplotním rozmezí 12 – 30 °C a při přidavku max. 0,5% NaCl. Kultura je gramnegativní (Obr. 31). Kultura je nefermentující a glukózu nerozkládá vůbec. Test na katalasu byl negativní, což znamená, že nerozkládá 3% peroxid vodíku. Test na cytochromoxidasu byl negativní.



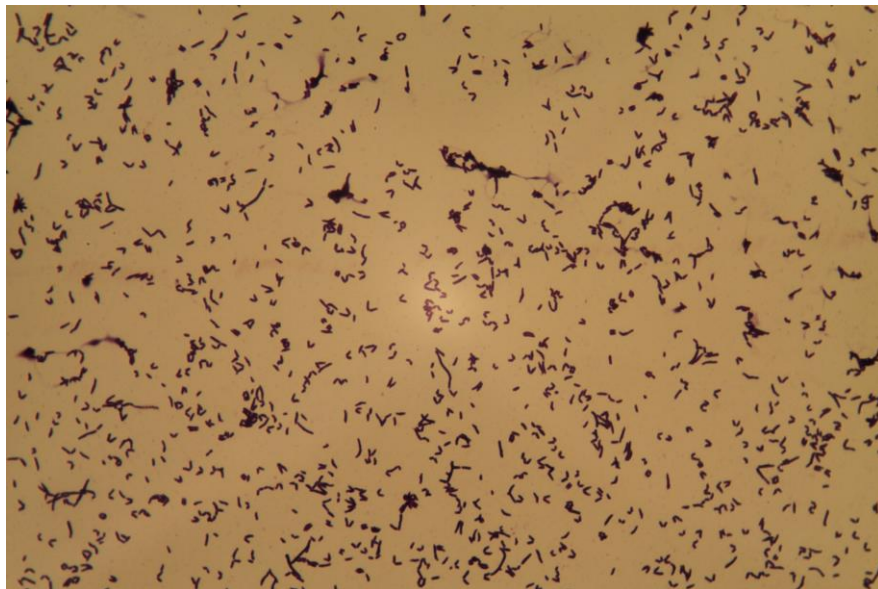
Obrázek 31 - Gramovo barvení – EHS 11



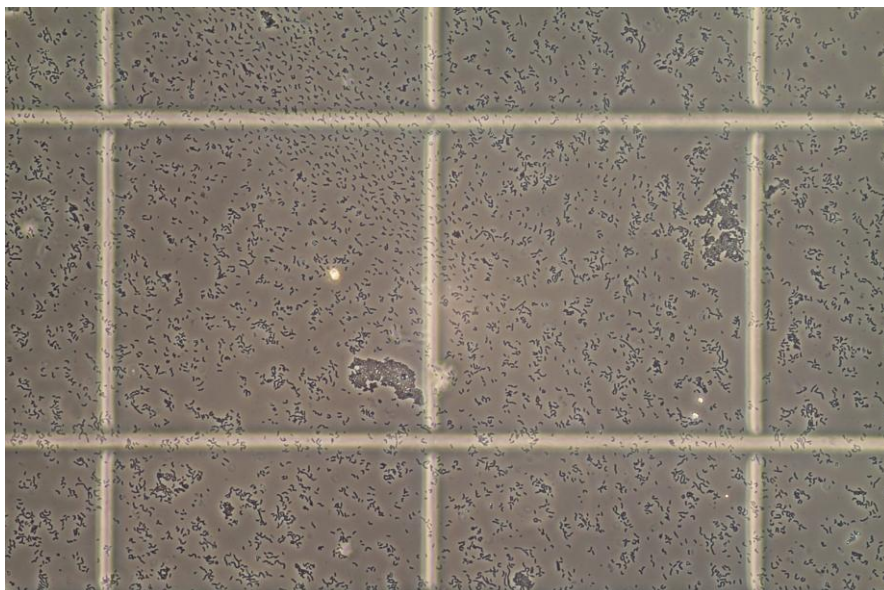
Obrázek 32 - Kultura EHS 11 – zvětšení 400x

Kultura EHS 11 po 3 dnech inkubace silně flokulovala a vytvářela vločky. Pod mikroskopem kultura vypadala jako pohyblivé esovitě prohnuté tyčinky (Obr. 32).

Kultura EHS 12 byla schopna růst v teplotním rozmezí 5-30 °C a při přidavku max. 6,5% NaCl. Kultura je grampozitivní (Obr. 33). Kultura je nefermentující a glukózu nerozkládá vůbec. Test na katalasu byl pozitivní, což znamená, že rozkládá 3% peroxid vodíku. Test na cytochromoxidasu byl negativní.



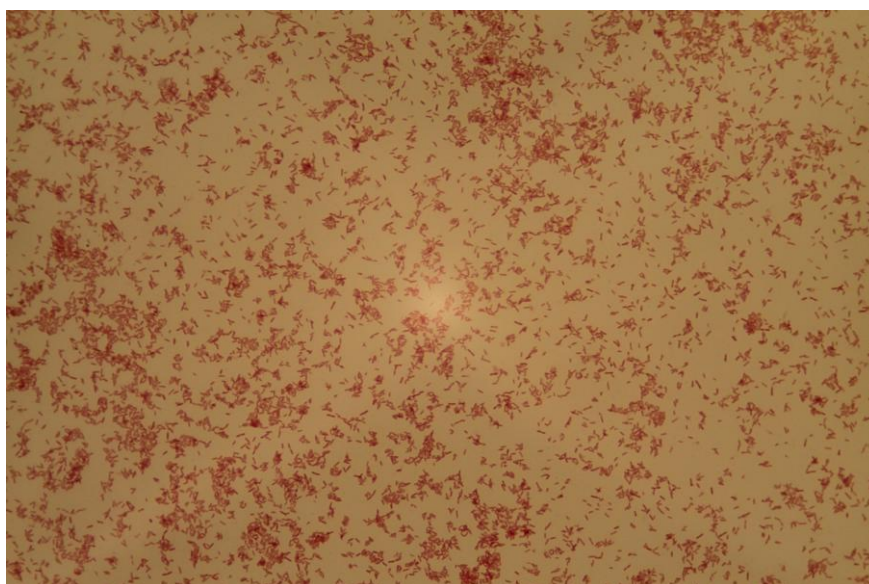
Obrázek 33 - Gramovo barvení – EHS 12



Obrázek 34 - Kultura EHS 12 – zvětšení 400x

Kultura EHS 12 po 3 dnech inkubace vytvářela volnou suspenzi a tvořila i mikrovločky. Pod mikroskopem kultura vypadala jako nepohyblivé mírně prohnuté tyčinky (Obr. 34).

Kultura EHS 14 byla schopna růst v teplotním rozmezí 12-37 °C a při přidavku max. 0,5% NaCl. Kultura je gramnegativní (Obr. 35). Kultura je nefermentující a glukózu nerozkládá vůbec. Test na katalasu byl negativní, což znamená, že nerozkládá 3% peroxid vodíku. Test na cytochromoxidasu byl pozitivní.



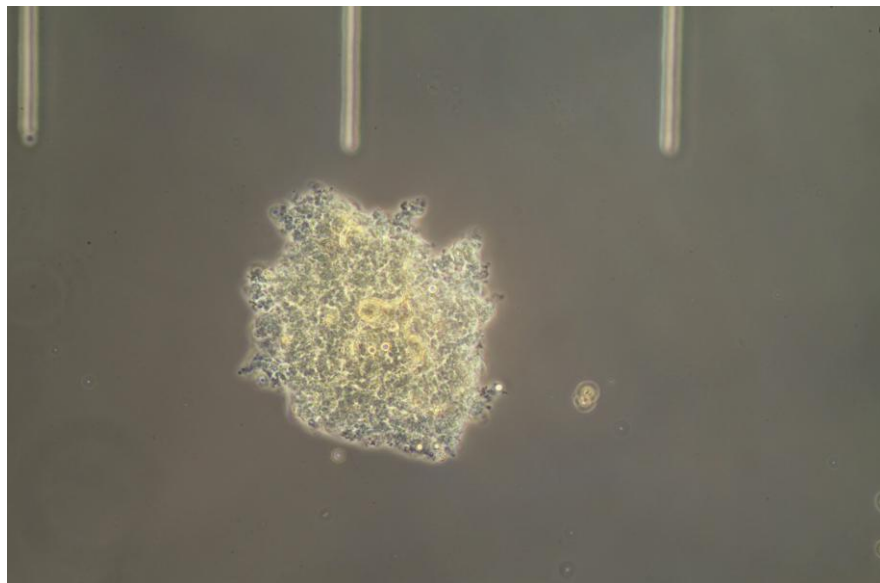
Obrázek 35 - Gramovo barvení – EHS 14



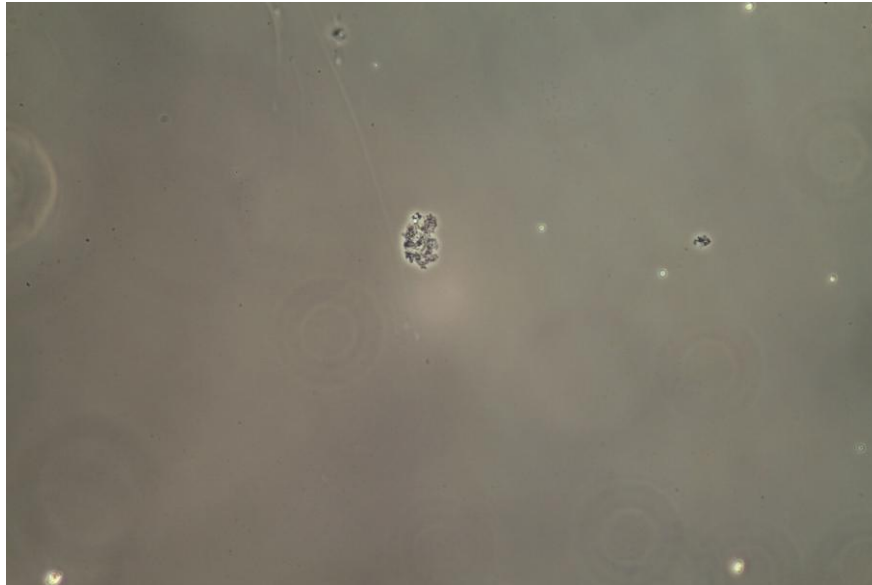
Obrázek 36 - Kultura EHS 14 – zvětšení 400x

Kultura EHS 14 po 3 dnech inkubace silně flokulovala a vytvářela mikrovločky (Obr. 36). Pod mikroskopem se kultura jevila jako pohyblivá, tvar kulovitý až oválný.

Kultura EHS 15 po 14 dnech inkubace vytvářela vločky (Obr. 37, Obr. 38). Kultura je nefermentující a glukózu nerozkládá vůbec. Test na katalasu i cytochromoxidasu byl negativní. Pod mikroskopem se kultura jevila jako nepohyblivá. Jelikož tato kultura byla velmi citlivá, i přes to, že při prvním testování rostla na EhoLu, později na miskách i při konzervaci nepřežila.

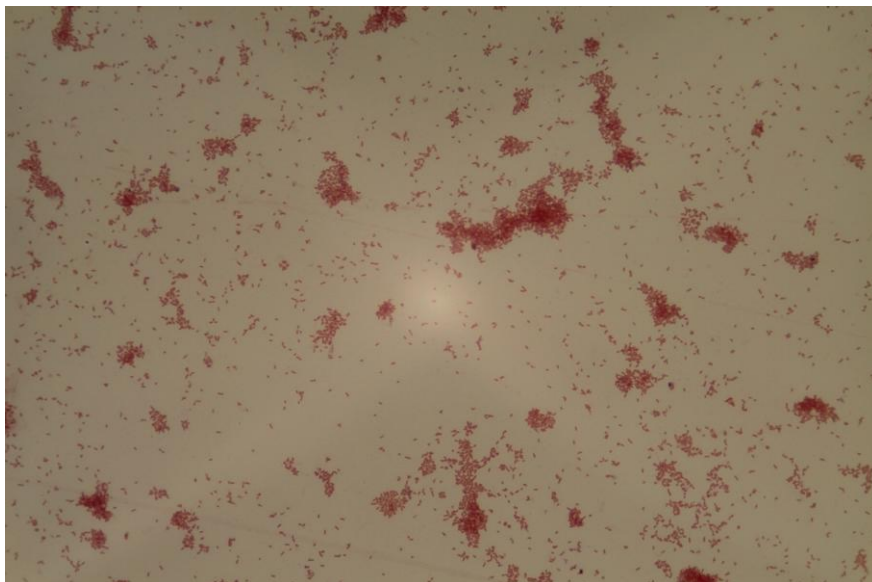


Obrázek 37 - EHS 15 – vločka, zvětšení 400x

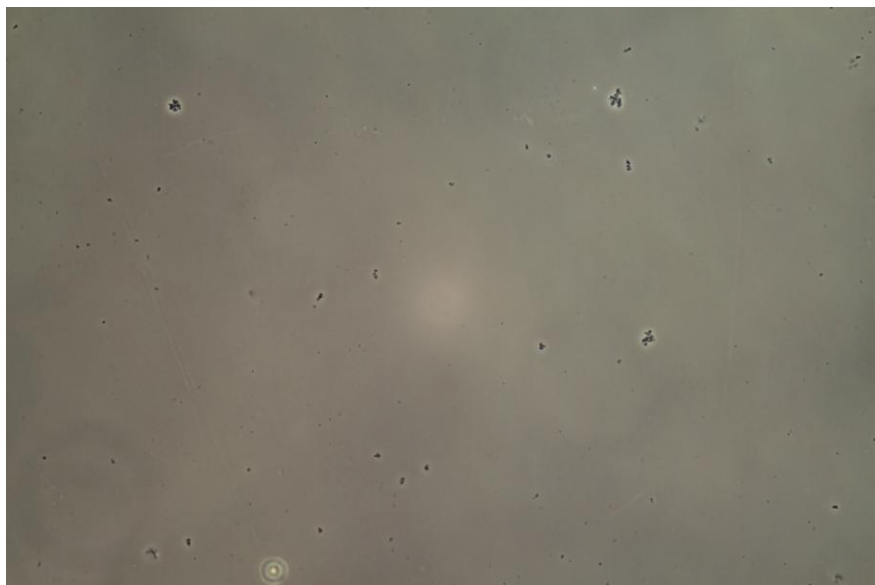


Obrázek 38 - Kultura EHS 15, zvětšení 400x

Kultura EHS 16 byla schopna růst v teplotním rozmezí 12-37 °C a při přidavku max. 0,5% NaCl. Kultura je gramnegativní (Obr. 39). Kultura je nefermentující a glukózu rozkládá aerobně. Test na katalasu byl pozitivní, což znamená, že rozkládá 3% peroxid vodíku. Test na cytochromoxidasu byl negativní.



Obrázek 39 - Gramovo barvení – EHS 16



Obrázek 40 - Kultura EHS 16 – zvětšení 400x

Kultura EHS 16 po 14 dnech inkubace silně flokulovala a vytvářela mikrovločky (Obr. 40). Pod mikroskopem se kultura jevila jako nepohyblivá.

4.4 Degradace EHS

Z předešlé diplomové práce vyplývá, že kultury EHS 1 – 4 jsou schopny růst pouze na salicylanu sodném, a proto byl nejprve orientačně testován růst i nových kultur EHS 11 – 16 na SALNa. Popis postupu stanovení je uveden v kapitole 3.3.10. Vstupní koncentrace SALNa byla 400 mg/l. Po 7 – 10 denní inkubaci byl stanoven DOC – viz Tab. 9.

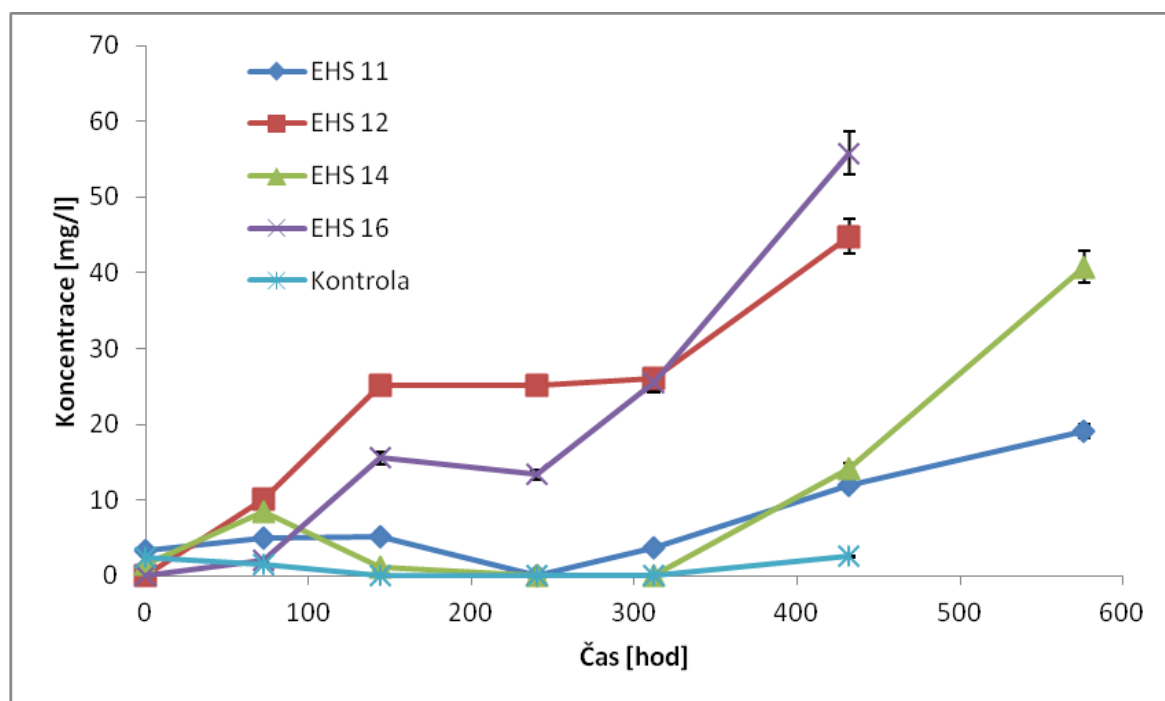
Tabulka 9 - Hodnoty DOC po inkubaci kultur v MM se SALNa

Kultura	DOC [mg/l]
EHS 11	71,53
EHS 12	26,48
EHS 14	33,99
EHS 15	305,7
EHS 16	88,29
Kontrola	307,52

Kromě kultury EHS 15 byly všechny kultury schopné na SALNa růst. Největší úbytek koncentrace substrátu byl zaznamenán u kultury EHS 12, který dosahoval cirká 81%.

Ostatní kmeny degradovaly SALNa z větší poloviny, tedy kromě kultury EHS 15, která SALNa nespotebovala (viz Tab. 9).

Další test byl již zaměřen na ověření, zda jsou jednotlivé kultury schopny růst na EHS jako jediném zdroji uhlíku a energie. Ke sledování růstu kultur bylo použito stanovení buněčných bílkovin. Toto bylo prováděno vzhledem k nerozpustnosti EHS a tedy vzhledem k nemožnosti využít ke sledování rozkladu EHS ani přístrojového stanovení DOC ani měření optické denzity. V průběhu inkubace, která trvala 24 dnů, byly odebírány vzorky a v nich stanovována koncentrace bílkovin, dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.11. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 41.

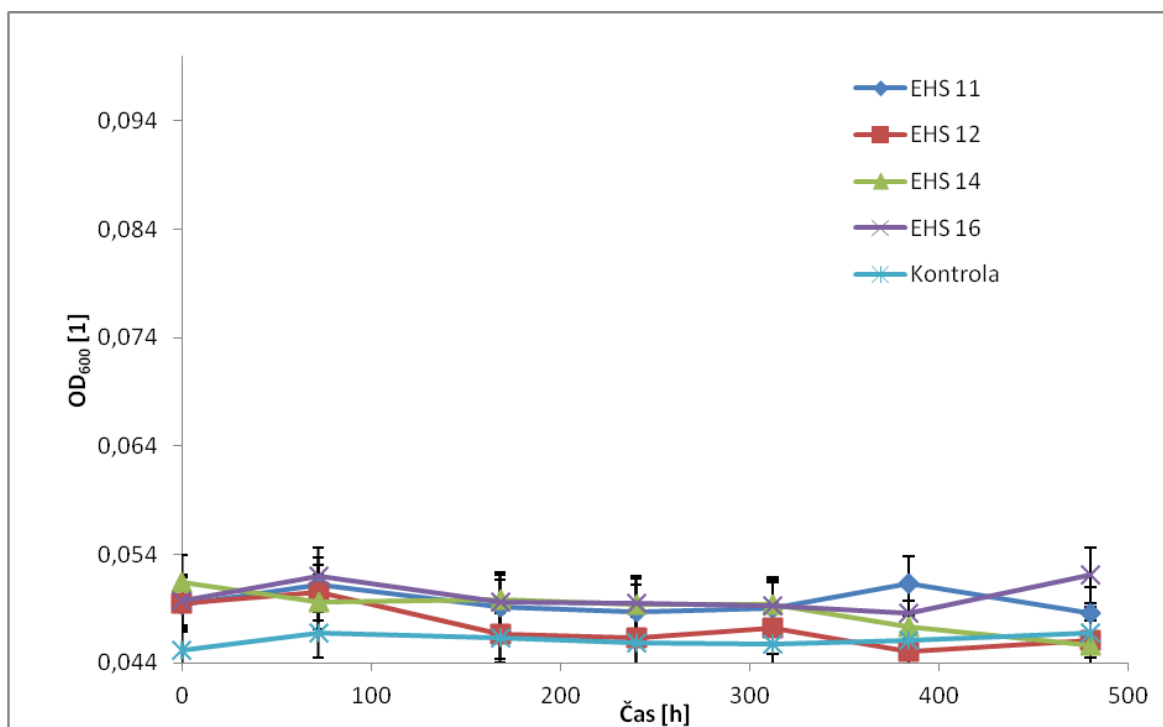


Obrázek 41 - Koncentrace bílkovin při růstu kultur EHS 11 – 14 na EHS

Míra koncentrace bílkovin se postupně u všech kultur zvyšovala, avšak největší nárůst koncentrace bílkovin u všech kultur započal 13. dnem inkubace. V lahvičce s kulturou EHS 16 na konci pokusu, který trval 18 dnů, bylo přítomno 55,79 mg/l bílkovin, což bylo největší množství ze všech kultur. V lahvičce s kulturou EHS 14 tomu bylo 40,79 mg/l po 24 denní inkubaci. V lahvičce s kulturou EHS 12 bylo po 18 denní inkubaci přítomno 44,80 mg/l bílkovin. Nejnižší koncentrace bílkovin, po 24 denní inkubaci, byla v lahvičce s kulturou EHS 11. Koncentrace bílkovin dosahovala 19,09 mg/l. Pokus tak dokumentoval, že kultury EHS 11, 12, 14 a 16 jsou schopné využít EHS jako jediný zdroj pro svůj růst, neboť v kontrolních vzorcích koncentrace bílkovin naměřeny nebyly.

4.5 Růst kultur EHS 11 – 16 na 2-ethylhexanolu

Byly připraveny lahvičky s MM a EhoL, a poté byly zaočkovány kulturami EHS 11 - 16, vždy samostatně. Inkubace trvala po dobu 20 dnů. V průběhu inkubace byly odebrány vzorky a byla měřena optická denzita při 600 nm. Podrobný popis a postup stanovení je popsán v kapitole 3.3.14.



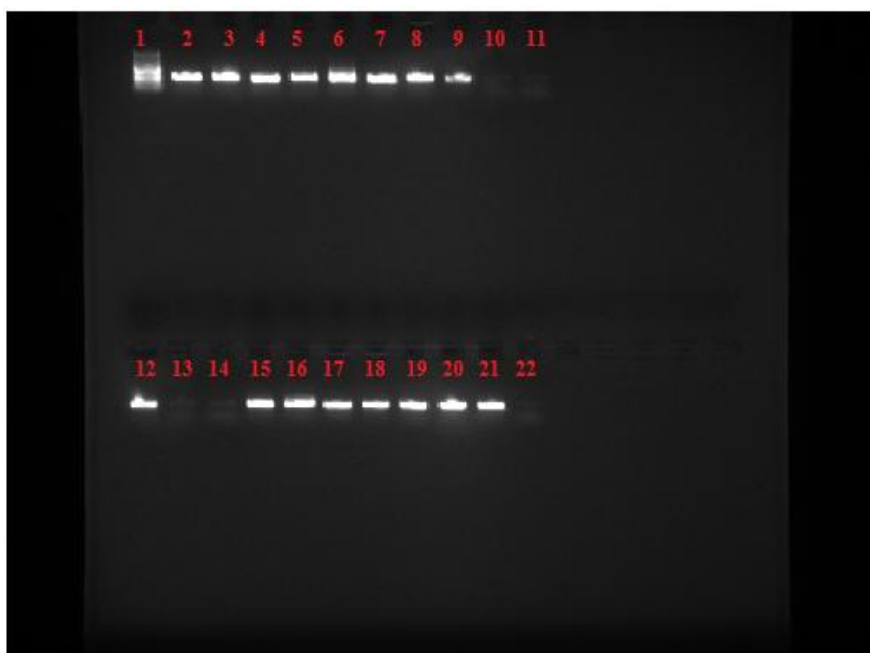
Obrázek 42 - Optická denzita kultur EHS 11 – 16 v přítomnosti EhoL

V obrázku 42 je vyobrazen průběh pokusu, kdy je zřetelné, že kultury nejsou schopny růst na EhoLu jako jediném zdroji uhlíku a energie. Hodnoty absorbance suspensí, které obsahovaly kultury, se pohybovaly na stejné úrovni jako suspence bez zaočkování kulturami. Těmi byly kontroly. Kultury EHS 11 – 16 tedy nevyužívají EhoL ke svému růstu, což tedy vyzdvihuje význam testu růstu těchto kultur na SALNa. Je pravděpodobné, že kultury při růstu na EHS degradují tuto látku na salicylanovou část a část ethylhexanolovou, ale ke svému růstu využijí pouze salicylanovou část.

4.6 Identifikace kultur

Identifikace kultur byla uskutečněna amplifikací části genu pro 16S rRNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s následnou sekvenací získaných ampliconů.

Nejdříve byla izolována DNA všech kultur, poté byla provedena PCR, kontrola PCR gelovou elektroforézou, purifikace amplifikované DNA a poté byla DNA připravena na sekvenaci. Popis přípravy a provedení testů je uvedeno v kapitole 3.3.15.



Obrázek 43 - Kontrola provedené PCR – po separaci v agarosovém gelu (1 - marker, 2 – EHS 1, 3 – EHS 2, 4 – EHS 3, 5 – EHS 4, 6 – F1V, 7 – F1M, 8 – EHS 11, 9 – EHS 12, 10 – EHS 14, 11 – EHS 16, 12 – EHS 1, 13 – EHS 2, 14 – EHS 3, 15 – EHS 4, 16 – F1V, 17 – F1M, 18 – EHS 11, 19 – EHS 12, 20 – EHS 14, 21 – EHS 16, 22 – slepé stanovení)

Po izolaci DNA, přípravě vzorků na PCR a samotné PCR byla provedena kontrola čistoty PCR gelovou elektroforézou. Na Obr. 43 jsou vyobrazeny vzorky z UV transluminátoru. Číslo 1 představuje marker, čísla 2 – 11 představují vzorky neřaděné, čísla 12 – 21 vzorky řaděné 1 : 9. Číslo 22 je slepé stanovení. K purifikaci a následné sekvenaci byly použity neřaděné vzorky s čísly 3, 4, a řaděné vzorky s čísly 12 a 15 – 21.

Tabulka 10 – Vlastní identifikace kultur

Kultura	Výsledek	Shoda
EHS 1	Neidentifikováno	-
EHS 2	Neidentifikováno	-
EHS 3	<i>Rhodococcus</i> sp.	100%
	<i>Nocardia</i> sp.	100%
EHS 4	<i>Brevibacterium</i> sp.	100%
	<i>Bacillus</i> sp.	100%
EHS 11	<i>Xenophillus</i> sp.	97%
	<i>Variovorax</i> sp.	97%
EHS 12	<i>Rhodococcus</i> sp.	99%
	<i>Nocardia</i> sp.	99%
EHS 14	<i>Acidovorax</i> sp.	99%
EHS 16	<i>Caulobacter</i> sp.	99%
F1M	<i>Rhizobium</i> sp.	97%
F1V	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%

V Tab. 10 jsou uvedeny pravděpodobné identifikace studovaných kultur. Kultury EHS 1 a EHS 2 se nepodařilo identifikovat. Kultura EHS 3 byla 100% shodná s několika druhy rodů *Rhodococcus* a *Nocardia*. Kultura EHS 4 byla identifikována buď jako *Brevibacterium* sp. nebo *Bacillus* sp., se 100% shodou. Kultura EHS 11 byla na 97% shodná s bakteriemi rodu *Xenophillus* a *Variovora*. Kultura EHS 12 byla na 99% shodná s bakteriemi rodu *Rhodococcus* a *Nocardia*. Tato kultura je s největší pravděpodobností shodná s kulturou EHS 3. Kultura EHS 14 byla na 99% shodná s bakterií rodu *Acidovorax*. Kultura EHS 16 byla na 99% shodná s bakterií rodu *Caulobacter*. Kultura F1M byla na 97 % shodná s bakterií rodu *Rhizobium*. Nejbližším příbuzným druhem by mohla být bakterie *Rhizobium daejeonense*. Kultura F1V byla na 100 % shodná s bakterií rodu *Pseudomonas*. V úvahu připadají tři druhy bakterií, a to *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas citronellolis* a *Pseudomonas delhiensis*.

Je tedy vidět, že u většiny kultur je možná „pouze“ rodová identifikace a že výsledky ukazují na několik možných druhů. Rozhodnutí by tak musely přinést další sady testů (u každé kultury zřejmě jiné), které z časových i věcných důvodů již nebylo možné v rámci této DP provést.

Kultura EHS 15, která není v Tab. 10 uvedena, byla izolována, byla i ověřena z hlediska možného růstu na salicylanu sodném, ale její růst na 2-ethylhexanolu byl již dále ověřován

v rámci doktorské práce M. Měrkové. V průběhu dalších týdnů z ní bylo v rámci práce M. Měrkové izolováno několik dalších subkultur, a to kultury EHS 15 MB1, EHS 15 MB2 a EHS 15 M. Tyto tři kultury jsou v současnosti testovány z hlediska rozkladu 2-ethylhexanolu v rámci uvedené doktorské práce a v rámci mé diplomové práce byla u těchto kultur provedena práce směřující k molekulárně biologické identifikaci. Kultury EHS 15 M a EHS 15 MB 1 se však identifikovat nepodařilo, kultura EHS 15 MB 2 byla shodná na 99 % s bakterií druhu *Zooglea resiniphila*.

ZÁVĚR

Základním cílem práce bylo studium dříve získaných kultur rozkládajících dvě významné sloučeniny používané při výrobě kosmetických prostředků, a to CAPB a EHS. Druhým cílem bylo získat vlastní kultury, degradující EHS, z aktivovaného kalu.

Studium kultur F1M a F1V ukázalo, že rozklad CAPB v aktivovaném kalu zabezpečuje společný účinek těchto 2 mikrobiálních kultur, přičemž společný účinek je nutný pro rozklad Lauramidu, což je nepolární část CAPB. Obě kultury byly naopak schopny využívat betainovou část molekuly CAPB jako jediný zdroj uhlíku a energie, i když každá s různou rychlostí. Kultury byly identifikovány jako *Rhizobium* sp. (F1M) a *Pseudomonas* sp. (F1V).

Další část práce byla věnována kulturám degradujícím EHS. Ze vzorku kalu bylo poměrně snadné získat další kultury schopné tohoto procesu, nicméně jak ukázaly testy rozkladu salicylanu sodného a 2-ethyl hexanolu, většina získaných kultur využívá ke svému růstu pouze část EHS odpovídající kyselině salicylové. Jak ukázaly identifikační práce, na rozkladu EHS se podílí jak gramnegativní, tak i grampozitivní bakterie rodů *Rhodococcus* a *Nocardia* (EHS 3), *Brevibacterium* nebo *Bacillus* (EHS 4). Kultury EHS 1 a EHS 2 nebyly identifikovány. Dále kultury byly identifikovány jako bakterie rodů *Xenophilus* a *Variovora* (EHS 11), *Rhodococcus* a *Nocardia* (EHS 12), *Acidovorax* (EHS 14) a *Caulobacter* (EHS 16). Kultura EHS 15 byla izolována a v rámci doktorské práce M. Měrkové bylo izolováno několik dalších subkultur a to kultury EHS 15 MB1, EHS 15 MB2 a EHS 15 M. Kultury EHS 15 M a EHS 15 MB 1 se však identifikovat nepodařilo, kultura EHS 15 MB 2 byla identifikována jako *Zooglea resiniphila*.

U většiny kultur byla možná „pouze“ rodová identifikace a výsledky ukazovaly na několik možných druhů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PAVLIĆ, Želimira, Željka VIDAKOVIĆ-CIFREK a Dinko PUNTARIĆ. Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. *Chemosphere* [online]. 2005, **61**(8), 1061-1068 [cit. 2016-05-12]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.03.051. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653505004649>
- [2] GARCIA, M. Teresa, Encarna CAMPOS, Agustí MARSAL a Isabel RIBOSA. Fate and effects of amphoteric surfactants in the aquatic environment. *Environment International* [online]. 2008, **34**(7), 1001-1005 [cit. 2016-05-12]. DOI: 10.1016/j.envint.2008.03.010. ISSN 01604120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412008000391>
- [3] HUNTER, J. Edward; FOWLER, Joseph F. Safety to human skin of cocamidopropyl betaine: A mild surfactant for personal-care products. *Journal of Surfactants and Detergents*, 1998, 1.2: 235-239.
- [4] PubChem. *Open chemistry database* [online]. USA, 2005 [cit. 2016-01-18]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cocamidopropyl_betaine#section=Top
- [5] RINGLOVÁ, Eva. Biodegradace vybraných kosmetických sloučenin v aktivovaném kalu [online]. Zlín, 2015 [cit. 2016-01-19]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Jan Růžička. Dostupné z: <http://theses.cz/id/7sjo03/>.
- [6] SUN, Xiao-Xia, Kyung-Nam HAN, Joong-Ki CHOI a Eun-Ki KIM. Screening of surfactants for harmful algal blooms mitigation. *Marine Pollution Bulletin* 48 [online]. **2004** [cit. 2016-01-19]. Dostupné z: www.sciencedirect.com
- [7] ChemSpider. *Royal Society of Chemistry* [online]. [cit. 2016-01-19]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com>
- [8] EDITORS RENAE CANTERBURY PEPE, John A. Wenninger. *International cosmetic ingredient dictionary and handbook*. 9th ed., editors, John A.

- Wenninger, Renae Canterbury Pepe, G.N. McEwen, Jr. Washington, D.C: Cosmetic, Toiletry, and Frangrance Association, 2001. ISBN 1882621298.
- [9] LAPCZYNSKI, A., D. MCGINTY, L. JONES, C.S. LETIZIA a A.M. API. Fragrance material review on ethyl hexyl salicylate. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2007, **45**(1), S393-S396 [cit. 2016-01-20]. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.041. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507003791>
- [10] SANKODA, Kenshi, Kotaro MURATA, Mai TANIHATA, Kengo SUZUKI, Kei NOMIYAMA a Ryota SHINOHARA. Seasonal and Diurnal Variation of Organic Ultraviolet Filters from Personal Care Products Used Along the Japanese Coast. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2015, **68**(2), 217-224 [cit. 2016-01-20]. DOI: 10.1007/s00244-014-0106-7. ISSN 0090-4341. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00244-014-0106-7>
- [11] BAILEY, Kathryn L., Fred TILTON, Danielle P. JANSIK, Sarina J. ERGAS, Matthew J. MARSHALL, Ann L. MIRACLE a Dawn M. WELLMAN. Growth inhibition and stimulation of *Shewanella oneidensis* MR-1 by surfactants and calcium polysulfide. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2012, **80**, 195-202 [cit. 2016-01-20]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.02.027. ISSN 01476513. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014765131200067X>
- [12] WYATT, J. M., R. B. CAIN a I. J. HIGGINS. Formation form synthetic two-stroke lubricants and degradation of 2-ethylhexanol by lakewater bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. UK, 1987.
- [13] SIGMA - ALDRICH [online]. [cit. 2016-04-07]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w315109?lang=en&ion=CZ&gclid=COfSwfjL_MsCFUKZGwod9xYIcA
- [14] NALLI, Sandro, Owen J. HORN, Adam R. GROCHOWALSKI, David G. COOPER a Jim A. NICELL. Origin of 2-ethylhexanol as a VOC. *Environmental Pollution* [online]. 2006, **140**(1), 181-185 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.06.018. ISSN 02697491. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749105003568>

- [15] IVANOV, R. A., O. A. SOBOLEVA, S. A. SMIRNOV a P. A. LEVASHOV. Effect of surfactants of different types on the bacteriolytic activity of lysozyme. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* [online]. 2015, **41**(3), 260-265 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1134/S1068162015020053. ISSN 1068-1620. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1068162015020053>
- [16] HAN, Young-Seok, Murray T. BROWN, Gyoung Soo PARK a Taejun HAN. Evaluating Aquatic Toxicity by Visual Inspection of Thallus Color in the Green Macroalga *Ulva*: Testing a Novel Bioassay. *Environmental Science & Technology* [online]. 2007, **41**(10), 3667-3671 [cit. 2016-05-12]. DOI: 10.1021/es062158a. ISSN 0013-936x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es062158a>
- [17] VONLANTHEN, Sofie, Murray T. BROWN a Andrew TURNER. Toxicity of the amphoteric surfactant, cocamidopropyl betaine, to the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology* [online]. 2011, **20**(1), 202-207 [cit. 2016-05-12]. DOI: 10.1007/s10646-010-0571-3. ISSN 0963-9292. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10646-010-0571-3>
- [18] CAIN, RB, AG CALLELY, CF FORSTER a DA STAFFORD. Treatment of industrial effluents. London, 1977, 283-326 [cit. 2016-05-12].
- [19] FALL, RB, JL BROWN a TI SCHAEFFER. Enzyme recruitment allows biodegradation of recalcitrant hydrocarbons by *Pseudomonas Citronellolis*. 1979, 715-722 [cit. 2016-05-12].
- [20] HIGGINS, IJ, PD GILBERT a JM WYATT. Microbial degradation of oil in the environment. *Studies in environmental science* [online]. 1981, 65-77 [cit. 2016-05-12].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BET	Betain
bp	Páry bází (base pair)
CAPB	Cocamidopropyl Betaine
ČOV	Čistírna odpadních vod
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
EhoL	2-ethylhexanol
EHS	Ethylhexyl Salicylate
LA	Lauramid
LD ₅₀	Dávka působící 50% úmrtnost
MM	Minerální médium
OD ₆₀₀	Optická denzita měřena při 600 nm
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonukleová kyselina
RPM	Otáčky za minutu (round per minute)
SALNa	Salicylan sodný
TOC	Celkový organický uhlík
VOC	Těkavá organická látka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Chemická struktura Cocamidopropyl Betaine [4].....	12
Obrázek 2 - Závislost koncentrace DOC na době trvání pokusu degradace CAPB kulturami F1V a F1M [5]	13
Obrázek 3 - Chemická struktura Ethylhexyl Salicylate [7]	16
Obrázek 4 - Počet koupajících se osob a denní změny koncentrace EHS v mořské vodě v letním období 2011 [10]	17
Obrázek 5 - Chemická struktura 2-Ethylhexanolu [13].....	18
Obrázek 6 - Křížový roztěr (F1V + F1M).....	33
Obrázek 7 - Křížový roztěr (F1M + F1V).....	34
Obrázek 8 - Kultura F1M – vložka, zvětšení 400x.....	38
Obrázek 9 - Společná degradace CAPB kulturami F1M a F1V	39
Obrázek 10 - Společná i samostatná degradace CAPB.....	40
Obrázek 11 - Optická densita při růstu kultur jednotlivě i společně.....	40
Obrázek 12 - Kultura F1M.....	42
Obrázek 13 - Kultura F1V	42
Obrázek 14 - Kultura F1M Obrázek 15 - Kultura F1V.....	44
Obrázek 16 - Miska č. 3 (F1M + F1V) Obrázek 17 - Miska č. 4 (F1V + F1M).....	44
Obrázek 18 - Miska č. 5 (F1M + F1V) Obrázek 19 – Miska č. 5 (F1M + F1V)	44
Obrázek 20 - Degradace betainu pomocí kultury F1M.....	46
Obrázek 21 - Degradace betainu pomocí kultury F1V	46
Obrázek 22 - Optická denzita růstu kultury F1M v přítomnosti BET	47
Obrázek 23 - Optická denzita růstu kultury F1V v přítomnosti BET.....	48
Obrázek 24 - Kultura EHS 1 – mikrovložky, zvětšení 400x	49
Obrázek 25 - Kultura EHS 2 – vložka, zvětšení 400x	49
Obrázek 26 - Kultura EHS 2 – vložka, zvětšení 400x	50
Obrázek 27 - Kultura EHS 3 – zvětšení 400x.....	50
Obrázek 28 - Kultura EHS 3 – zvětšení 1000x.....	51
Obrázek 29 - Kultura EHS 4 – zvětšení 400x.....	51
Obrázek 30 - Kultura EHS 4 – zvětšení 1000x.....	52
Obrázek 31 - Gramovo barvení – EHS 11	52
Obrázek 32 - Kultura EHS 11 – zvětšení 400x.....	53

Obrázek 33 - Gramovo barvení – EHS 12	53
Obrázek 34 - Kultura EHS 12 – zvětšení 400x.....	54
Obrázek 35 - Gramovo barvení – EHS 14.....	54
Obrázek 36 - Kultura EHS 14 – zvětšení 400x.....	55
Obrázek 37 - EHS 15 – vločka, zvětšení 400x	55
Obrázek 38 - Kultura EHS 15, zvětšení 400x.....	56
Obrázek 39 - Gramovo barvení – EHS 16.....	56
Obrázek 40 - Kultura EHS 16 – zvětšení 400x.....	57
Obrázek 41 - Koncentrace bílkovin při růstu kultur EHS 11 – 14 na EHS	58
Obrázek 42 - Optická denzita kultur EHS 11 – 16 v přítomnosti EhoL.....	59
Obrázek 43 - Kontrola provedené PCR – po separaci v agarosovém gelu (1 - marker, 2 – EHS 1, 3 – EHS 2, 4 – EHS 3, 5 – EHS 4, 6 – F1V, 7 – F1M, 8 – EHS 11, 9 – EHS 12, 10 – EHS 14, 11 – EHS 16, 12 – EHS 1, 13 – EHS 2, 14 – EHS 3, 15 – EHS 4, 16 – F1V, 17 – F1M, 18 – EHS 11, 19 – EHS 12, 20 – EHS 14, 21 – EHS 16, 22 – slepé stanovení).....	60

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Vlastnosti Cocamidopropyl Betainu [4].....	12
Tabulka 2 - Vlastnosti Ethylhexyl Salicylate [4]	16
Tabulka 3 - Vlastnosti 2-ethylhexanolu [4]	18
Tabulka 4 - Přídavek sterilní destilované vody do jednotlivých jamek (μ l)	29
Tabulka 5 - Přídavek zásobních roztoků CAPB o koncentraci 10 g/l nebo 100 g/l (μ l)	30
Tabulka 6 - Roztoky pro přípravu reakční směsi	36
Tabulka 7 – Program PCR	36
Tabulka 8 - Růst kultur při koncentracích CAPB 0 – 10 g/l.....	41
Tabulka 9 - Hodnoty DOC po inkubaci kultur v MM se SALNa.....	57
Tabulka 10 – Vlastní identifikace kultur	61

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I Získané sekvence izolovaných kultur (primer 341F)

PŘÍLOHA P I: ZÍSKANÉ SEKVENCE IZOLOVANÝCH KULTUR (PRIMER 341F)

Kultura EHS 1 – neidentifikováno

Kultura EHS 2 – neidentifikováno

Kultura EHS 3 (bp 483)

GTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCACGCTTTTCG
TTCCTCAGCGTCAGTTACTGCCAGAGACCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCC
TGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTGCAGTAC
TCAAGTCTGCCC GTATCGCCTGCAAGCCAGCAGTTGAGCTGCTGGTTTTCA
CAAACGACGCGACAAACCGCCTACGAACTCTTTACGCCAGTAATTCCGGACAACG
CTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGGTGCTTCTT
CTGCAGGTACCGTCACTTGCGCTTCGTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGA
AGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAA
TATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGCCCCCCCGTGCCCCCGCCCCGCCCCGCC

Kultura EHS 4 (bp 578)

TGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGC
ACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCAC
GCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTG
TTCCTCCAAATCTCTACGCATTTCACCGCTACACTTGGAATTCCAATTTCTCTT
CTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTT
TCACATCAGACTTAAGGAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGG
ACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTG
GCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCAGCAGTTACTCTGGTACTTGTTCTT
CCCTAACAAACAGAACTTTACGACCCGAAGGCCTTCTTCGTTACGCGGCGTTGC
TCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGC
CCCCCGTGCCCCCGCCCCGCCCCGCCGCGCGCGGGCG

Kultura F1V (bp 531)

CCAGGCGGTTCGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCA
ACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
GCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTTCG

CCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACACCGCTACACAGGAAATTCCA
CCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGGCAGTTATGGATGCAGTTCCCAGGTTGAG
CCCGGGGATTTACATCCATCTTACCAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAG
TAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGT
TAGCCGGTGCTTATTCTGTTGGTAACGTCAAACAGCAAGGTATTAACCTACTG
CCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGC
GGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACT

Kultura F1M (bp 514)

GCGGATGTTTATGCGTTAGCTGCGCCACCGAACAGTCAACTGCCCGACGGCTA
ACATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC
ACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTAATGGACCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTG
GTGTTCCCTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCCACTTACC
TCTTCCATACTCAAGATACCCAGTATCAAAGGCAGTTCAGAGTTGAGCTCTG
GGATTTACCCCTGACTTAAATATCCGCCTACATGCGCTTTACGCCAGTAATT
CCGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGC
CGGGGCTTCTTCTCCGGTTACCGTCATTATCTTCACCGGTGAAAGAGCTTTGGA
CCCTGAGGCCTTCGTGGCTCACCCGACGTGGCTGGATTGCCTGGCGAGTACG
GTCGCAATTWACAAASTCGAAAWYYYGRAGGGA

Kultura EHS 11 (bp 469)

GCGGTCACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGAAAGTGAATTCCCAACAACC
AGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCC
CACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTGCAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATC
GGTGTTCCCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCCATCCCC
CTCTGCCGCACTCCAGCGATGCAGTCACAGATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCG
GGGATTTACAACGTGCTTACATCACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAAT
TCCGATTAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGC
CGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCGTGAACCTCTTTATTAGAAAGAACCTTT
TCGTTCKTACAAGAGCGGTTTAAAATCCCAAGGCCTTA

Kultura EHS 12 (bp 512)

GCGGGGCGCTTATGCGTTAGCTACGGCACGGATTCCGTGGAAGGAACCCACAC
CTAGCGCCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTA

CCCACGCTTTCGTTCCCTCAGCGTCAGTTACTGCCAGAGACCCGCCTTCGCCAC
CGGTGTTCCCTCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCT
CCCCTGCAGTACTCAAGTCTGCCCGTATCGCCTGCAAGCCAGCAGTTGAGCTG
CTGGTTTTACAAACGACGCGACAAACCGCCTACGAACTCTTTACGCCAGTA
ATTCCGGACAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGTAGTTA
GCCGGTGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTGCCTTCGTCCCTGCTGAAAGAG
GTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTC
GCCATTGTGCAATAGTCCCCACTGCTGC

Kultura EHS 14 (bp 527)

GCGGTCACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGTGAAGACCCAACAACC
AGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCC
CACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATC
GGTGTTCCCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCCATCCCC
CTCTGCCGTA CTACTAGCTATACAGTCACAAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGG
GGATTTACATCTGTCTTATATAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATT
CCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGACGTAGTTAGCC
GGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGGACCCCAGGTATTAACCAGAGTCTTTT
CGTTCCGTACAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCTGCACGCGGCAT
GGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTG

Kultura EHS 15 M – neidentifikováno

Kultura EHS 15 MB1 - neidentifikováno

Kultura EHS 15 MB2 (bp 579)

CCCAGGCGGTCACTTCACGCGTTAGCTGCGTTACTCAATGAGTCTCCTCACCGA
ACA ACTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
GCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTACTGGCCCAGGAGGCTGCCTTCG
CCATCGGTGTTCCCTCCGCATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCCA
CCTCCCTCTGCCGTA CTGAGTGATGCAGTCACAAACGTCAGTTCCCAGGTTGA
GCCCGGGGATTTACATCTGTCTTACATCACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCA
GTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGTAG
TTAGCCGGTGCTTCTTCTTACGGTACCGTCATCCTCCCGGGGTATTAGCCCAGA
AGATTTCTTTCCGTCTGAAAGAGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACTCACG

CGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCT
CCCGTAGGCCCCCCGTGCCCCCGCCCCGCCCGCCGCGGCG

Kultura EHS 16 (bp 510)

CCCATGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGTCACCGACAGGCATGCCTGCCG
ACAAC TAGCACTCATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
GCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTAACGGACCAGTATGTCGCCTTCG
CCTACTGGTGTTCTTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAGTTCCA
CATACTCTTCCGTA CTCAAGACTGCCAGTATCAAAGGCAATTCCAAGGTTGA
GCCCTGGGCTTTCACCTCTGACTAAACAGTCCGCCTACGCTCCCTTTACGCCCA
GTAATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAA
GTTAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGGTACCGTCATTATCGTCCCCGGTGAAAGAAT
TTTACAATCCTAAGACCTTCATCATTACGCGGCATGGCTGCGTCAGGCTTTCG
CCCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTG