

# Význam minerálních solí při biodegradaci polyvinylalkoholu

Bc. Kateřina Ošřádalová

---

Diplomová práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

\*\*\*nascannované zadání s. 1\*\*\*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, 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 14.5.2010

.....

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

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

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k 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.

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

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

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

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

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

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

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala svému vedoucímu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za ochotu a obětavost při vedení a práci. Poděkování patří také celému kolektivu Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za vytvoření výborných pracovních podmínek.

## ABSTRAKT

Práce je zaměřena především na degradaci polyvinylalkoholu vybranými druhy degradačních bakteriálních kultur. Na základě předchozích prací bylo hlavním úkolem sledování degradace polyvinylalkoholu v prostředích s různými koncentracemi fosforečnanů. Byly prováděny i testy v organickém prostředí, kde byla snížena koncentrace fosforečnanů natolik, aby byly dávkovány pouze jako zdroj fosforu pro růst bakteriální kultury.

Výsledky ukázaly, že vyšší koncentrace fosforečnanů zpomalují růst kultur i rozklad PVA, i když optimální složení média bylo pro každou kulturu odlišné. Pokusy dále ukázaly, že kromě fosforečnanů potlačují růst kultur i určité zvýšené koncentrace chloridů. Ze zkoumaných kultur vykázala nejvýznamnější degradační účinky kultura *Sphingomonas* sp. JK2.

Klíčová slova: polyvinylalkohol, degradace, bakterie, fosforečnany, chloridy

## ABSTRACT

This Diploma thesis is aimed above all to polyvinylalcohol degradation by selected bacterial cultures. On the base of previous works a study of degradation in environments with various phosphates concentrations was the main object of the work. Furthermore, another tests were performed in organic buffers, where phosphates concentrations was lowered to a level required as the phosphorus source for bacterial growth.

Results showed, that the higher phosphates concentrations inhibited the growth of bacteria and PVA biodegradation, even if optimal medium composition was for each culture different. Further tests showed, that in addition to phosphates increased chlorides concentrations limited bacterial growth as well. Strain *Sphingomonas* sp. JK2 proved to be the most effective bacterium of surveyed cultures.

Keywords: polyvinylalcohol, degradation, bacteria, phosphates, chlorides

**OBSAH**

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	<b>10</b>
<b>1 POLYVINYLALKOHOL (PVA)</b> .....	<b>11</b>
1.1 ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI PVA.....	11
1.2 STRUKTURA PVA.....	12
1.3 BIODEGRADACE PVA.....	12
1.3.1 Biodegradace PVA jedinými a symbiotickými kulturami.....	13
<b>2 BIODEGRADACE PVA JEDINÝMI A SYMBIOTICKÝMI KULTURAMI</b> ...16	
2.1 BIODEGRADACE PVA JEDINÝMI KULTURAMI.....	16
2.2 BIODEGRADACE PVA SYMBIOTICKÝMI KULTURAMI.....	17
<b>3 VÝSLEDKY PŘEDCHÁZEJÍCÍCH DIPLOMOVÝCH PRACÍ</b> .....	<b>21</b>
<b>4 PODMÍNKY LABORATORNÍCH TESTŮ BIODEGRADACE PVA</b> .....	<b>24</b>
4.1 SLOŽENÍ MINERÁLNÍCH MÉDIÍ PRO BIODEGRADACI PVA.....	24
4.2 PYRROLOCHINOLINCHINON (PQQ).....	25
4.3 CELKOVÁ MINERALIZACE.....	26
<b>II MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>28</b>
<b>5 CHEMIKÁLIE, ŽIVNÁ MÉDIA A ROZTOKY</b> .....	<b>29</b>
5.1 CHEMIKÁLIE.....	29
5.2 ŽIVNÉ AGARY.....	33
5.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	34
<b>6 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY</b> .....	<b>35</b>
6.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	35
6.2 LABORATORNÍ POMŮCKY.....	35
<b>7 PRACOVNÍ POSTUPY</b> .....	<b>36</b>
7.1 MOLEKULÁRNĚ- BIOLOGICKÁ IDENTIFIKACE BAKTERIÍ.....	36
7.2 DEGRADAČNÍ LAHVOVÉ TESTY.....	36
7.3 STANOVENÍ KONCENTRACE ROZPUŠTĚNÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU TOC.....	36
7.4 STANOVENÍ KONCENTRACE PVA NA MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE...37	
7.5 RŮSTOVÉ TESTY.....	38
7.6 STANOVENÍ pH.....	38
<b>III VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>39</b>

<b>8</b>	<b>MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ IDENTIFIKACE BAKTERIÍ.....</b>	<b>40</b>
8.1	ÚVOD.....	40
<b>9</b>	<b>ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI OT2 A JK2 ZA POUŽITÍ FOSFÁTOVÉHO PUFRU.....</b>	<b>44</b>
9.1	ÚVOD.....	44
9.2	ROZVRŽENÍ POKUSŮ 1 A 2.....	44
9.3	VÝSLEDKY POKUSU 1, S KULTUROU OT2.....	45
9.4	VÝSLEDKY POKUSU 2, S KULTUROU JK2.....	50
<b>10</b>	<b>ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI OT2 A JK2 ZA POUŽITÍ ORGANICKÉHO PUFRU.....</b>	<b>54</b>
10.1	ÚVOD.....	54
10.2	ROZVRŽENÍ POKUSŮ 3 A 4.....	54
10.3	VÝSLEDKY POKUSU 3, S KULTUROU OT2.....	55
10.4	VÝSLEDKY POKUSU 4, S KULTUROU JK2.....	60
<b>11</b>	<b>VLIV MINERÁLNÍCH SOLÍ A TYPU KATIONTŮ NA RŮST DEGRADAČNÍCH KULTUR ZA POUŽITÍ TRYPTONU.....</b>	<b>66</b>
11.1	ROZVRŽENÍ POKUSŮ.....	66
11.2	ROZVRŽENÍ POKUSU S KULTUROU OT2.....	67
11.3	VÝSLEDKY TESTU PRO KULTURU OT2 NA TRYPTONU.....	67
11.4	ROZVRŽENÍ POKUSU S KULTUROU OT3.....	68
11.5	VÝSLEDKY TESTU PRO KULTURU OT3 NA TRYPTONU.....	68
11.6	ROZVRŽENÍ POKUSU S KULTUROU JK2.....	69
11.7	VÝSLEDKY TESTU PRO KULTURU JK2 NA TRYPTONU.....	70
11.8	ROZVRŽENÍ POKUSU S KULTUROU Ž1.....	70
11.9	VÝSLEDKY TESTU PRO KULTURU Ž1 NA TRYPTONU.....	71
<b>12</b>	<b>VLIV MINERÁLNÍCH SOLÍ A TYPU KATIONTŮ NA RŮST DEGRADAČNÍCH KULTUR ZA POUŽITÍ PVA.....</b>	<b>72</b>
12.1	ROZVRŽENÍ POKUSU S KULTUROU OT2.....	72
12.2	VÝSLEDKY TESTU PRO KULTURU OT2 NA PVA.....	73
12.3	ROZVRŽENÍ POKUSU S KULTUROU OT3.....	73
12.4	VÝSLEDKY TESTU PRO KULTURU OT3 NA PVA.....	74
12.5	ROZVRŽENÍ POKUSU S KULTUROU JK2.....	75
12.6	VÝSLEDKY TESTU PRO KULTURU JK2 NA PVA.....	76
12.7	ROZVRŽENÍ POKUSU S KULTUROU Ž1.....	76

12.8 VÝSLEDKY TESTU PRO KULTURU ŽI NA PVA.....	77
<b>IV ZÁVĚR.....</b>	<b>78</b>
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>79</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>81</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>83</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>84</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>85</b>



## ÚVOD

Tak jak na Zemi vzrůstá počet obyvatelstva, tak narůstá i množství nebezpečných i množství nebezpečných cizorodých látek, kterými lidé zamořují prostředí. Ať už se jedná o látky známé, či teprve nově objevené, nutnost jejich odstranění z životního prostředí je na místě.

Polyvinylalkohol určitě patří k již známým kontaminantům, které už po nějakou dobu znečišťují životní prostředí. Jako jeden z mála syntetických materiálů je sice biologicky rozložitelný, je však žádoucí studovat vlivy a podmínky na jeho biodegradaci, neboť rychlost jeho rozkladu v přírodě je zřejmě nízká a v některých prostředích se pravděpodobně nerozkládá vůbec.

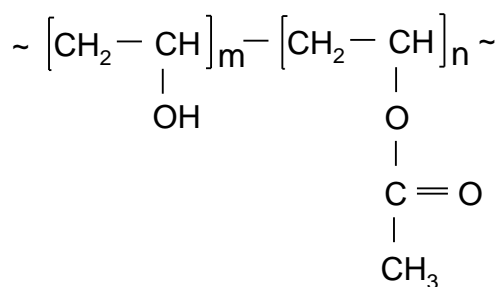
Moje práce navazuje na předchozí práce, zabývající se podobnou tematikou. Bylo zjištěno, že bakteriální kultury jsou do jisté míry citlivé na zvýšené koncentrace některých solí. Protože tyto skutečnosti mohou hrát významnou roli při čištění odpadních vod, stalo se zkoumání těchto vlivů náplní mé DP.

## **I. LITERÁRNÍ REŠERŠE**

# 1 POLYVINYLALKOHOL (PVA)

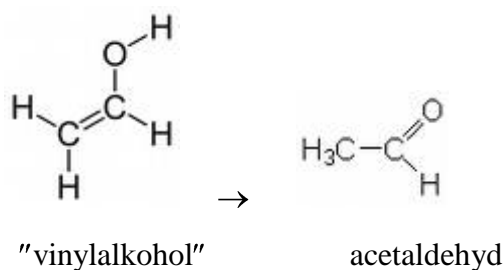
## 1.1 Základní vlastnosti PVA

Polyvinylalkohol (Obr. 1) je syntetický polymer, s uhlíkatým hlavním řetězcem, rozpustný ve vodě a v kyselinách a zároveň odolný vůči mnoha organickým rozpouštědlům. Nevyrábí se polymerací jemu odpovídajícímu monomeru (vinylalkoholu), protože ten isomeruje na stabilní acetaldehyd. Proto je PVA připravován alkalickou hydrolyzou polyvinylacetátu (PVAc) nahrazováním acetátových skupin hydroxylovými skupinami. Stupeň této hydrolyzy a dále také polymerační stupeň do jisté míry ovlivňují vlastnosti takto vzniklého polymeru [1].



Obr. 1. Chemická struktura polyvinylalkoholu [19]

Produktem všech reakcí, které by mohly vinylalkohol zdánlivě poskytnout, je acetaldehyd, neboť alkohol, jehož hydroxylová skupina by byla vázána na stejný uhlíkový atom, ze kterého vychází dvojná vazba, se přesmykem ještě ve stavu svého zrodu mění na příslušný aldehyd (Obr. 2). Polyvinylalkohol je v podstatě bílý prášek, jehož odolnost vůči rozpouštědlům závisí na obsahu nezhydrolyzovaného polyvinylacetátu, na střední molekulové hmotnosti a v neposlední řadě na teplotě [2].



Obr. 2. Vznik acetaldehydu z vinylalkoholu [2]

Polymer s více než pětiprocentním obsahem acetátových jednotek se rozpouští ve vodě jen při teplotách nad 65°C. Čím vyšší je jeho molekulová hmotnost, tím menší je jeho rozpustnost. V olejích není rozpustný ani při vyšších teplotách. V jednosytných alkoholech botná, ve vícesytných (např. v glycerolu) se rozpouští, zvláště za tepla. Z kyselin odolává organickým, ve vodných roztocích anorganických kyselin a jejich solí přechází při teplotách nad 160°C na viskózní až nerozpustnou hmotu. Je málo termoplastický, lze jej použít za teplot od -50°C do 130°C. Nad teplotou 200°C se rozkládá [2].

Díky mnohostranným vlastnostem je PVA používán zejména v textilním průmyslu a při úpravě papíru, v potravinářství pro přípravu ovocného želé, v chemickém průmyslu jako ochranný koloid pro suspenzní polymerace, dále jako zahušťovadlo pro nátěrové hmoty, k výrobě lepidel (v kombinaci se škrobem) a impregnačních hmot odolných olejům, tukům, benzínu a rozpouštědlům. Známé je také jeho použití jako separačního činidla při zpracování nenasycených polyesterových pryskyřic na lamináty. Vyrábějí se z něj obalové fólie, chirurgické nitě, textilní vlákna, různá těsnění, hadice a další výrobky [2].

## 1.2 Struktura PVA

Základní chemická struktura PVA se skládá převážně z 1,3-diolových jednotek, spojených hlava-pata. Nicméně ve struktuře PVA existuje také velmi malý počet 1,2-diolových jednotek spojených hlava-hlava (obvykle pod 1-2%). Obsah 1,2-diolových jednotek ovlivňuje některé vlastnosti PVA, dokonce včetně jeho biodegradability [1].

Z obecného hlediska můžeme říci, že struktura PVA je tvořena především uhlíky, hydroxyovými skupinami (-OH) a zbytkovými acetylovými skupinami.

## 1.3 Biodegradace PVA

Chiellini a kol. shrnuli účinky polymerního uspořádání na biodegradabilitu PVA následně: mezi faktory ovlivňující biodegradabilitu PVA se zahrnují:

- polymerizační stupeň
- stupeň zmýdelnění (hydrolýza)
- prostorové uspořádání hlavního řetězce
- obsah ethylenu
- 1,2-glykolový obsah

Obecně lze říci, že polymerizační stupeň a stupeň zmýdelnění nemají podstatný vliv na biodegradaci PVA, přinejmenším pro vzorky obsahující méně než 20% zbytkových acetylových skupin a majících polymerizační stupeň v rozsahu přibližně 10-2,000 [1].

Nižší stupeň zmýdelnění znamená přítomnost většího množství acetylových skupin. Aby mikroorganismy zužitkovaly PVA s nízkým stupněm zmýdelnění, musí mít enzym hydrolasu pro acetylové skupiny. Každý mikroorganismus, degradující PVA, nemusí mít tuto aktivitu dostatečnou pro svůj vlastní růst, což může mít za následek jeho snížený či zpožděný růst. Specifický enzym esterasa, jenž je schopný hydrolyzy acetylových skupin z PVA, byl vyčištěn z cytoplazmatické frakce z *Pseudomonas vesicularis* PD. Tento enzym dosahuje nejvyššího stupně hydrolyzy v přítomnosti vzorků PVA, které mají nejnižší molekulovou hmotnost a polymerizační stupeň [1].

### 1.3.1 Biodegradace PVA jedinými a symbiotickými kulturami

Biodegradace PVA je možná jak jednotlivými kulturami, tak kulturami v symbiotickém vztahu. Existuje řada mikroorganismů, které mají schopnost degradace PVA. Nejčastěji popisovanými degradéry PVA obecně jsou kmeny rodů *Pseudomonas* a *Sphingomonas*, jak je ukázáno v Tab.1. Některé kultury rodu *Pseudomonas* byly v posledních letech reklasifikovány jako *Sphingomonas* (Yabuuchi a kol. 1990), některé kultury rodu *Pseudomonas* mohou být zahrnuty mezi *Sphingomonas* ještě nyní. Skupina sfingomonád se původně sestávala jen z jednoho rodu - *Sphingomonas*, do té doby, než jej Takeuchi a kol. (2001) reklasifikoval na čtyři rody (*Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* a *Sphingopyxis*) [1].

Kromě již zmíněných bakterií rodů *Pseudomonas* a *Sphingomonas* existují také některé další Gram-negativní bakterie (*Alcaligenes faecalis* a  $\gamma$ -proteobacteria [3]) i některé Gram-pozitivní bakterie (*Bacillus megaterium* [4], *Paenibacillus amylolyticus* [5], *Microbacterium barkeri* [5] a *Streptomyces venezuelae* [6]), které byly popsány jako bakterie schopné rozkladu PVA.

Mimo bakterií byla schopnost degradace PVA popsána i u některých hub. Existují houby, které rozkládají dřevo, respektive celulózu (tzv. dřevokazné houby) a způsobují tak bílou hnilobu (ligninolytické houby) a hnědou hnilobu (celulolytické houby). Tyto houby, způsobující bílou a hnědou hnilobu a také *Penicillium* sp., byly potvrzeny za houby schopné degradace PVA, ačkoliv ligninolytické houby PVA jako substrát nevyužívají [1].

Metabolické cesty rozkladu PVA, popsané do současné doby, jsou založené na dvou krocích: prvním krokem je buď oxidace dvou přiléhajících hydroxylových skupin, vedoucí k  $\beta$ -diketonové struktuře nebo taktéž oxidace, ale jen jedné hydroxylové skupiny, poskytující monoketonovou strukturu. Podle produktů produkovaných prvním krokem degradace PVA, jsou zde možné dvě cesty pro druhý krok degradace PVA. Druhým krokem degradace PVA tak může být buď hydrolýza  $\beta$ -diketonové struktury oxidovaného PVA enzymem  $\beta$ -diketonhydrolasou nebo aldolázová reakce probíhající v monoketonové struktuře oxidovaného PVA. Zdá se, že *Penicillium* sp. provádí stejnou metabolickou cestu jako bakteriální degradéři PVA (Qian a kol. 2004). Ligninolytické houby mají ale jiné mechanismy degradace, které jsou založené na nemetabolických procesech (Larkin a kol. 1999, Mejia a kol. 1999) [1].

Tab. 1. Přehled mikroorganismů využívajících PVA

Mikroorganismus	Kultivace	Reference
<i>Pseudomonas</i> O-3	Jediná kultura	Suzuki a kol. 1973
<i>Pseudomonas vesicularis</i> PD	Jediná kultura	Watanabe a kol. 1975
<i>Pseudomonas</i> sp. VM15C	Kultura spolu s produkcí PQQ <i>Pseudomonas putida</i> VM15A	Sakazawa a kol. 1981
<i>Pseudomonas vesicularis</i> var. <i>povalolyticus</i> PH	Jediná kultura	Hashimoto a Fujita 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. kmen A-41	Jediná kultura	Fukae a kol. 1994
<i>Pseudomonas</i> sp. 113P3 (reidentifikována jako <i>Sphingopyxis</i> sp. 113P3)	Jediná kultura	Hatanaka a kol. 1995b
<i>Sphingomonas</i> sp. TJ7 a $\gamma$ -proteobakterie TK-2	Jediná kultura	Tokiwa a kol. 2001
<i>Sphingomonas</i> sp. SA3	Kultura spolu s růstovým faktorem (produkující asi PQQ) SA2	Kim a kol. 2003
<i>Sphingopyxis</i> sp. PVA3	Jediná kultura	Yamatsu a kol. 2006

Popisy degradérů PVA z rodu *Pseudomonas* se vztahují k 70.-80. létům, kdežto rody *Sphingomonas* a *Sphingopyxis* jsou popisovány až v pozdějších letech, přesněji kolem roku 2000 a po něm. Je tomu tak proto, že došlo k reklasifikaci jednotlivých rodů a jejich kmenů v rámci celého bakteriálního taxonomického systému.

## 2 BIODEGRADACE PVA JEDINÝMI A SYMBIOTICKÝMI KULTURAMI

### 2.1 Biodegradace PVA jedinými kulturami

Yamatsu a kol. studovali degradaci PVA kulturou *Sphingopyxis* sp. PVA3. Nejdříve provedli izolaci kmene, získaného z aktivovaného kalu ČOV místního barvírenského závodu. Tento PVA degradující bakteriální kmen byl později pojmenován jako PVA3. Autoři mimo jiné zjistili, že tento kmen může degradovat PVA bez symbiózy s jiným bakteriálním kmenem a že pro degradační aktivitu nebyl nutný přídavek PQQ. Kmen tvořil na PVA agarovém médiu kolonie bez přidání katalasy, tyto kolonie byly kulaté, bílé barvy, s hrubým povrchem a v průměru nepřesahovaly 1 mm. Bylo též zjištěno, že kmen PVA3 mohl růst i za anaerobních podmínek, pokud byl k živnému médiu přidán dusičnan [7].

K degradaci PVA došlo zhruba po 6 dnech, kdy bylo degradováno přibližně 90% PVA. Kmen PVA3 dále neprokázal relevantní enzymovou aktivitu v prostředí bez PVA. Bylo také zjištěno, že tento kmen byl schopný využít močovinu jako zdroj dusíku (namísto dusičnanu amonného) a některé jiné dostupné uhlíkaté zdroje, ne jenom PVA [7].

Hatanaka a kol. studovali degradaci PVA kulturou *Pseudomonas* sp. 113P3. Na základě mikrobiologické charakteristiky tohoto kmene zjistili, že se jedná o Gram-negativní kmen, tvarem odpovídající tyčkám, které jsou schopné pohybu, ale netvoří spóry. Kolonie tohoto kmene narostené na živném agaru byly žlutohnědé barvy, kruhového tvaru, vypuklé a hladké. Kmen 113P3 se vyznačoval produkcí kyseliny z glukosy a maltosy aerobně, při aerobních podmínkách ale netvořil plyn z laktosy, manitolu, sacharosy nebo xylosy. Byly stanoveny pozitivní výsledky na tvorbu acetoinu a na redukci dusičnanů a několik negativních výsledků, např. test na methyl červen, kyselinu citronovou, hydrolyzu škrobu, apod. Z těchto výsledků Hatanaka a kol. usuzovali, že se jedná o kmen náležící rodu *Pseudomonas*. Další provedené cytologické a biochemické testy ukázaly podobnosti ke kmenům *Pseudomonas vesicularis* a *Pseudomonas solanacearum* [8].

Kmen 113P3 rostl dobře v kapalném médiu, obsahujícím PVA jako jediný zdroj uhlíku. Při kultivaci kmene v PVA médiu zde nebyla pozorovaná žádná aktivita PVA-oxidasy, nebyla pozorovaná tvorba  $H_2O_2$  v supernatantu z kultury ani v extraktu buněk. Na druhou stranu byla objevena aktivita PVA-dehydrogenázy (PVADH) v extraktu buněk, ale



nebyla zjistitelná v supernatantu z kultury. Při inokulaci extraktu buněk s PVA bylo pozorováno snížení molekulové hmotnosti PVA. Polymer o vysoké molekulové hmotnosti byl včleněn do buněk a degradován enzymy, které degradují PVA v buňkách. Toto včlenění zůstalo bez vysvětlení [8].

## 2.2 Biodegradace PVA symbiotickými kulturami

Choi a kol. sledovali biodegradaci PVA kulturami *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 a *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508. Testovali syntetické odpadní vody, z nichž izolovali tyto dva kmeny, jejichž smíšená kultura byla schopná degradace PVA velkou rychlostí, dokonce i když byly kmeny použity jednotlivě. Procentuální úspěšnost degradace PVA byla prokázána u *Microbacterium barkeri* 98%, u *Paenobacillus amylolyticus* 96% a jejich smíšená kultura rozkládala PVA v 99%. Lze tedy říci, že tyto kultury mají vynikající schopnost degradace jak samotné, tak i ve smíšené kultuře. Choi a kol. také testovali účinek polymeračního stupně PVA na jeho degradaci a dospěli k závěru, že rychlost degradace PVA klesá s růstem polymeračního stupně. Podle jejich studie má tedy na rychlost degradace PVA a mikrobiální růst polymerační stupeň významný vliv [5].

Kim a kol. sledovali degradaci PVA kulturou *Sphingomonas* sp. SA3. Provedli kultivaci několika set vzorků v obohaceném PVA médiu. Pouze jeden vzorek, označený SA, byl schopný degradace PVA. Na PVA agaru tato kultura tvořila malé bílé kolonie, stejného tvaru. Tyto kolonie však nebyly schopné degradace PVA v kapalném PVA médiu. Proto byla část původní kultury, namnožená v PVA médiu, zředěná ve sterilním kapalném médiu a příslušné zředění bylo kultivováno na živném LB agaru. Po 4-8 dnech inkubace bylo izolováno 7 různých bakterií (SA1-SA7), žádný z těchto kmenů však neukázal rozklad PVA. Pokud se ale použila smíšená kultura těchto kmenů s SA3, byl rozklad PVA pozorován. Nejlepší symbióza pro rozklad PVA v PVA médiu byla pozorována u kmenů SA2 a SA3 [9].

Kmen SA2 tvořil bílé kolonie o průměru menším než 1 mm na PVA agaru a u tohoto kmene se projevil velmi mírný růst, který mohl být způsoben využitím zbytkových acetátových skupin v PVA. Kmen SA3 tvořil žluté kolonie na živném LB agaru, nebyl však pozorován žádný růst tohoto kmene na PVA agaru či v kapalných PVA kulturách. Kmen SA3 byl kultivován bez kmene SA2 v PVA médiu obsahujícím PQQ ( $10 \text{ ng.ml}^{-1}$ ), v tomto médiu byl pozorován růst tohoto kmene a degradace PVA [9].

Závěrem lze tedy říci, že čistá kultura kmene SA2 nebo SA3 PVA nedegraduje, ale jejich společná kultura ukázala dobrý růst a téměř kompletní degradaci PVA, bylo degradováno asi 95% PVA [9].

Matsumura a kol. pozorovali degradaci PVA kulturou *Alcaligenes faecalis* KK314 a *Pseudomonas* sp. 113P3. Bakteriální kmen asimilující PVA, *Alcaligenes faecalis* KK314, byl získaný z říční vody a použitý jako zdroj enzymu degradujícího PVA [11], zatímco porovnávací kmen *Pseudomonas* sp. 113P3 byl izolován jako mikroorganismus asimilující PVA skupinou Hatanaky [12], [13].

Růstové křivky obou těchto kmenů ukázaly téměř stejnou tendenci s rapidním růstem během 3. dne kultivace. Růst byl sledován na PVA-23000. V inkubačních médiích *Alcaligenes faecalis* žádná oxidázová aktivita pro PVA objevena nebyla, ale byla objevena aktivita PVADH v inkubačních médiích *Alcaligenes faecalis* [10].

Lee a kol. zkoumali degradaci PVA kulturami *Cardiobacterium* sp. a *Achromobacter cholinophagum*. Izovali 22 mikrobiálních kmenů z různých zdrojů. Provedli tzv. Sturm test neboli test rozkladu organických látek prostřednictvím sledování vzniku CO<sub>2</sub>. Autoři díky experimentu zjistili, že nejvyšší aktivitu pro degradaci PVA mezi smíšenými kulturami prokázala smíšená kultura bakterií označených jako SB68 a SB69. Bylo tak v případě cca 45 denní kultivace se vstupní koncentrací PVA 0,01%, kdy bylo rozloženo 80% PVA. Lze říci, že téměř všechen substrát byl v tomto případě rozložen, avšak se zvyšující se koncentrací PVA rozklad klesal. Tyto mikrobiální kultury byly identifikovány podle mikrobiologického systému Biolog (USA) a bylo zjištěno, že se u kultury s označením SB68 jednalo o bakteriální kmen *Cardiobacterium* sp., zatímco u kultury s označením SB69 nebyla identifikace možná. Mezi studovanými bakteriálními kulturami byla i kultura s označením SB98, která byla jako jediná schopná degradace PVA v nepřítomnosti určitých vnějších přidaných kofaktorů. Bylo zjištěno, že se jedná o kmen *Achromobacter cholinophagum*. U tohoto kmene byly zjištěny téměř stejné výsledky v případě degradace PVA jako u předchozí smíšené kultury [14].

Tokiwa a kol. se ve své práci zabývali degradací PVA kulturou *Sphingomonas* sp. V prvních pokusech o izolaci degradačních bakterií žádná z kolonií na agrech neprokázala schopnost rozkladu PVA v tekutém médiu, dokonce ani po přidání PQQ do živného

prostředí. Obecně existují dva enzymy spojené s oxidací PVA. Jedná se o extracelulární enzym PVA-oxidasa a intracelulární enzym, závislý na PQQ, PVA-dehydrogenasa. Reakce PVA-oxidasy je doprovázena vznikem  $H_2O_2$ , který je toxický a může být překážkou formace kolonií PVA degradujících bakterií. Proto autoři modifikovali postup izolace degradačních kultur a přidali katalasu na misky s PVA agarem, kde již poté vyrostly další kolonie. Naproti tomu nebyly pozorovány žádné takové kolonie na misce s PVA agarem a stejným množstvím inaktivní (neaktivní) katalasy (vařená 10 minut). Minimální množství katalasy, potřebné pro tvoření bakteriálních kolonií degradujících PVA, bylo asi  $0,016$  jednotek  $cm^{-2}$  agarové misky. Aby byla potvrzena inhibice utváření kolonií vlivem  $H_2O_2$ , provedli Tokiwa a kol. podobný experiment používající peroxidasu. Přidání peroxidasy způsobilo degradaci  $H_2O_2$ , podobně jak je tomu u katalasy. Na PVA agaru s nečinnou peroxidasou nebyly pozorované žádné kolonie bakterií. Z těchto výsledků můžeme předpokládat, že bakterie schopné rozkladu PVA degradují PVA pomocí PVA-oxidasy a přitom skutečně vzniká  $H_2O_2$ , který brání jejich vlastnímu růstu. V kapalně kultuře tyto kmeny rostly dobře, dokonce i bez přídavku katalasy. Je to pravděpodobně proto, že  $H_2O_2$  vytvořený v tomto médiu nebyl přítomný v bezprostředním okolí bakterií. Přídavek katalasy a peroxidasy, které opravdu rozloží  $H_2O_2$ , je považován za vhodnou metodu pro izolaci bakterií degradujících PVA [15].

Autorům se díky tomu podařilo izolovat dva kmeny schopné degradace PVA, označené TK-2 a TJ-7, oba tyto izolované kmeny byly Gram-negativní. Kmen TK-2 tvořil bílé kruhové kolonie, zatímco kmen TJ-7 tvořil žluté kruhové kolonie. Taxonomické studie a výsledky analýzy založené na zjištění sekvencí genu pro 16S rRNA odhalily, že kmen TK-2 náleží do podtřídy  $\gamma$ -proteobakterií, ale není blízce příbuzný žádným známým druhům, jen v 88% byla zjištěna podobnost k *Nitrosococcus* sp. Kmen TJ-7 byl klasifikován jako *Sphingomonas* sp., s 96% pravděpodobností [15].

Sakai a kol. zkoumali degradaci PVA kulturou *Pseudomonas vesicularis* PD. Zjistili, že nejvyšší aktivita P(VA-coVAc) esterasy byla nalezena v buněčném extraktu po osmotické šokové desintegraci. P(VA-coVAc) esterasa byla lokalizovaná v cytoplazmě a cytoplazmatické membráně *Pseudomonas vesicularis* PD. Na druhou stranu oxidasa sekundárních alkoholů a  $\beta$ -diketon hydrolasa, které jsou zapojené do degradace hlavního řetězce PVA molekul, byly nalezeny v supernatantu kultury. Při studiu substrátové specifity byl enzym P(VA-coVAc) esterasa aktivní vůči PVA500 a aromatickým acyl

esterům jako např. *p*-nitrofenyl acetát, *p*-nitrofenyl propionát a další. Nejvyšší stupeň hydrolýzy byl pak pozorován s *p*-nitrofenyl acetátem. Enzymová aktivita esterasy s *p*-nitrofenyl acetátem byla silně ovlivněna délkou řetězce acylové skupiny. Aktivita enzymu se snižuje, protože se zvyšuje délka řetězce, zvláště u esterů s více než C4. Studovaná enzymová aktivita vůči různým typům PVA byla ovlivněna polymeračním stupněm a hydrolýzou. Nejvyšší stupeň hydrolýzy byl pozorován u PVA180, mající nejnižší polymerační stupeň a stupeň zmýdelnění ze všech testovaných PVA. Byla studovaná enzymová aktivita vůči enzymatické degradaci PVA, protože enzym nalezený v cytoplazmatické frakci byl značně aktivní k nízké molekulární hmotnosti PVA, který byl včleněn do buněk po vnější degradaci [16].

### 3 VÝSLEDKY PŘEDCHÁZEJÍCÍCH DIPLOMOVÝCH PRACÍ

V předešlých letech se mimo jiné i problematikou rozkladu polyvinylalkoholu v mikrobiálním prostředí ve svých pracích zabývali i čeští autoři. Konkrétně se jednalo o diplomovou práci [17] Martina Nedbálka a disertační práci [18] Terezy Václavkové.

Martin Nedbálek posuzoval ve své diplomové práci, mimo jiných pokusů, i vliv koncentrací solí, konkrétně fosforečnanů, na rozklad PVA degradačními mikrobiálními kulturami. Degradačními kulturami v jeho případě byly kultury OT2 a JK2 a jako růstový substrát byl zvolen trypton, na němž byla již v dřívějších letech pozorována výborná růstová aktivita různých degradačních kultur polyvinylalkoholu [17].

Složení minerálního média, které použil pro degradaci PVA kulturami OT2 a JK2 bylo následující (na 1 litr destilované vody):

0,5 g PVA (MOWIOL 5-88); 0,1 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,03 g  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ; 0,01 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,5 g NaCl; 0,3 g  $NH_4Cl$ , 0,18 g  $K_2HPO_4$ ; 1,9 g  $Na_2HPO_4$ .

Toto základní minerální médium poté použil v pěti pokusech se stejnou koncentrací tryptonu ( $3 \text{ g.l}^{-1}$ ), ale s různými koncentracemi fosforečnanů, jdoucími od  $6,67 \text{ mmol.l}^{-1}$  až po  $20,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Růst jednotlivých kultur sledoval 9 dnů a dospěl k závěru, že nejlépe rostla jak kultura OT2, tak i kultura JK2 v prostředí s nejnižší koncentrací fosforečnanových solí. Z těchto výsledků usoudil, že zvýšené koncentrace fosforečnanů v prostředí mají negativní vliv na růst obou použitých degradačních kultur. Aby potvrdil výsledky předchozího pokusu, provedl ještě další experiment, kde použil na rozdíl od prvního pokusu tři degradační kultury. Zdvojnásobil množství inokula z  $5 \mu\text{l}$ , použitých v prvním experimentu, na  $10 \mu\text{l}$  inokula v každé jamce mikrotitrační destičky s objemem  $200 \mu\text{l}$ . Mimo již použitých kultur OT2 a JK2 použil ještě degradační kulturu Ž1. Koncentrace tryptonu i jednotlivé koncentrace fosforečnanových solí zůstaly nezměněny a růst degradačních kultur byl sledován 17 dní. Výsledkem bylo, že všechny tři kultury opět rostly nejlépe v prostředí minerálního média s nejnižší koncentrací fosforečnanů, čímž potvrdil výsledky předchozího pokusu [17].

Bylo nutné potvrdit negativní vliv zvýšené koncentrace fosforečnanů i na PVA-degradační schopnosti použitých kultur. Pokus probíhal 16 dnů a bylo zjištěno, že kultury OT2 a JK2 vykazují degradaci PVA obdobně, obě tyto kultury rozkládají PVA nejrychleji v prostředí s nejnižší koncentrací fosforečnanů. U kultury Ž1 došlo jen k částečnému

rozkladu PVA, ale i u této kultury je degradace v prostředí zvýšené koncentrace fosforečnanů zpomalena či úplně potlačena. Kultura OT2 byla, na základě výsledků analýzy založené na zjištění sekvencí 16S rRNA genu, pojmenována jako *Sphingomonas* sp. [17].

V posledním experimentu bylo posuzováno, zda-li existuje citlivost PVA-degradačních kultur jen k vyšším koncentracím fosforečnanů nebo zda jde o citlivost k vyšším koncentracím minerálních solí obecně. K obecnému posouzení vlivu minerálních solí byly vybrány hydrogenuhličitaný, neboť ty mohou vznikat mikrobiální mineralizací organického substrátu. Po dobu 14 dní byl sledován růst tří degradačních kultur v prostředích o třech různých koncentracích solí. Nejlepší růst u všech tří kultur byl pozorován v prostředí bez přídavku hydrogenuhličitanů, v jejich přítomnosti byl růst zpomalen. Nejvyšší inhibiční účinek mělo u všech tří kultur navýšení přídavku  $\text{NaHCO}_3$  na rozdíl od přídavku stejného množství  $\text{KHCO}_3$ . Dalo by se říci, že degradační kultury byly tedy více citlivé k sodným solím, než k solím draselným, ale toto tvrzení by muselo být ještě ověřeno rozsáhlejšími experimenty [17].

Tereza Václavková se ve své disertační práci zabývala stejnou problematikou, jako je tomu v případě DP Martina Nedbálka. Taktéž provedla experimenty, ve kterých zkoumala vlivy zvýšené koncentrace fosforečnanových solí na degradaci polyvinylalkoholu mikrobiálními kulturami. Použité minerální médium bylo také beze změny. Dospěla ke stejným závěrům, jako její předchůdce a to konkrétně, že u pozorovaných bakterií, označených OT2, JK2 a Ž1 byla zaznamenána jistá citlivost vůči vyšším koncentracím fosforečnanových solí v prostředí. Ve své práci navíc uvádí procentuelní biologickou rozložitelnost PVA, která byla po 16-ti denní kultivaci 95% u kultury JK2 a 82% u kultury OT2 ve dvou typech minerálních médií s nejnižším obsahem fosforečnanů [18].

Dále provedla ještě jeden stejný experiment, sledující vliv zvýšené koncentrace hydrogenuhličitanů na růst degradačních bakterií. Výsledek byl opět totožný s experimentem Martina Nedbálka, konkrétně se ukázalo, že všechny tři studované kultury jsou daným způsobem citlivé i na zvýšenou koncentraci hydrogenuhličitanů. Kultury OT2 a Ž1 rostly nejlépe v prostředí bez přídavku hydrogenuhličitanů, s jejich přídavkem byl růst těchto kultur zpomalen či úplně pozastaven. Kultura JK2 také rostla nejlépe v prostředí

bez hydrogenuhličitanů, avšak celková rozdílnost jejího růstu ve všech minerálních médiích nebyla tak znatelná jako tomu bylo u ostatních dvou kultur [18].

Autorka provedla ještě jeden pokus, kde byla sledována degradace PVA kulturami OT2 a JK2, v prostředí zvýšené koncentrace hydrogenuhličitanů. Rozložitelnost polyvinylalkoholu nastala již po 4 dnech kultivace v prostředí bez přídavku hydrogenuhličitanů a to z 97% u kultury JK2 a z 87% u kultury OT2. V prostředí se zvýšeným obsahem hydrogenuhličitanů byl pozorován úbytek koncentrace PVA po 10 dnech kultivace a jeho koncentrace byla snížena o 47% u kultury JK2 a o 44% u kultury OT2. V prostředí s nejvyšší koncentrací hydrogenuhličitanů degradace PVA nenastala vůbec. Bylo tedy prokázáno, že zvýšená koncentrace hydrogenuhličitanů v prostředí má za následek sníženou schopnost rozkladu PVA za pomoci použitých mikrobiálních degradačních kultur [18].

## 4 PODMÍNKY LABORATORNÍCH TESTŮ BIODEGRADACE PVA

### 4.1 Složení minerálních médií pro biodegradaci PVA

Různí autoři, zabývající se degradací PVA, prováděli rozklad PVA v prostředí minerálních médiích o různém složení.

Složení základního PVA média [7], které použil Yamatsu a kol. pro kulturu *Sphingopyxis* sp. PVA3, bylo následující (na 1 litr destilované vody):

1,0 g PVA (Aldrich, St. Louis, MO); 1,4 g  $K_2HPO_4$ ; 0,27 g  $KH_2PO_4$ ; 0,25 g  $MgSO_4$ ; 0,05 g  $CaCl_2$ ; 0,02 g  $FeSO_4$ ; 0,02 g NaCl; 0,2 g  $NH_4NO_3$  nebo močoviny.

Nutnou podmínkou bylo přidání PQQ o koncentraci  $40 \mu g.l^{-1}$  k tomuto základnímu PVA médiu.

Složení PVA média [8], které použil Hatanaka a kol. pro kulturu *Pseudomonas* sp. 113P3, bylo následující (na 1 litr destilované vody):

10 g PVA117; 1 g  $NH_4NO_3$ ; 2 g  $KH_2PO_4$ ; 10 g  $K_2HPO_4$ ; 10 g NaCl; 0,2 g  $MgSO_4$ ; 0,1 g  $CaCl_2$ ; 0,01 g  $FeSO_4$ ; 0,05 g peptonu a 0,5 g kvasničného extraktu.

Nutnou podmínkou bylo přidání PQQ o koncentraci  $1 g.l^{-1}$  k tomuto základnímu PVA médiu. Počáteční pH bylo nastaveno na 7,5.

Složení PVA média [9], které použil Kim a kol. pro kulturu *Sphingomonas* sp. SA3, je stejné jako to, které použil Suzuki a kol. [19] pro kulturu *Pseudomonas* O-3, a je následující (na 1 litr destilované vody):

5,0 g PVA (Japan); 1,0 g  $(NH_4)_2SO_4$ ; 1,0 g  $KH_2PO_4$ ; 8,0 g  $K_2HPO_4$ ; 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g NaCl; 0,02 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,01 g  $FeSO_4$ ; stopové prvky + vitamíny.

Stopové prvky a vitamíny se na tvorbě minerálních solí v médiu podílejí jen v minimální míře, pH PVA média bylo nastaveno na 7,5.

Složení PVA média [10], které použil Matsumura a kol. pro kulturu *Alcaligenes faecalis* KK314, bylo následující:

1 g PVA (23000); 1,0 g  $NH_4NO_3$ ; 0,2 g  $KH_2PO_4$ ; 1,0 g  $K_2HPO_4$ ; 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g NaCl; 0,1  $CaCl_2$ ; 0,01 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,05 g peptonu; 0,05 g kvasničného extraktu.



Finální koncentrace přidaného PQQ byla  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Počáteční pH bylo nastaveno na 7,5.

Složení PVA média [14], které použil Lee a kol. pro kultury *Cardiobacterium* sp. a *Achromobacter cholinophagum*, bylo následující:

1-10 g PVA; 2,5 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 2,2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,7 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g NaCl; 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; stopové prvky.

Počáteční pH bylo nastaveno na 7,2.

Složení PVA média [15], které použil Tokiwa a kol. pro kulturu *Sphingomonas* sp., bylo následující (na 1 litr základního média z anorganických solí):

5 g PVA; 100 mg kvasničného extraktu; 10 mg NaCl; 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; 1,6 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 10 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; stopové prvky.

Nutnou podmínkou bylo přidání PQQ o koncentraci  $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  k tomuto základnímu PVA médiu. Počáteční pH bylo nastaveno na 7,5.

Složení PVA média [5], které použil Choi a kol. pro kultury *Micobacterium barkeri* KCCM 10507 a *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508, bylo následující (na 1 litr destilované vody):

0,05-3,5 g PVA; 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3,2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g NaCl; 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g kvasničného extraktu.

Počáteční pH bylo nastaveno na 7,0. U tohoto minerálního média je zvláštní, že zde chybí zdroj vápníku, autor neuvádí z jakého důvodu ho nepoužil.

Složení PVA média [16], které použil Sakai a kol. pro kulturu *Pseudomonas vesicularis* PD, bylo následující:

0,1 g PVA500; 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,4 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,05 g NaCl; 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 g hovězího extarktu; 0,05 g peptonu; vitamíny.

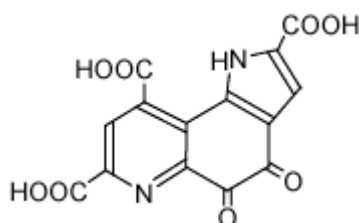
Počáteční pH bylo nastaveno na 7,0.

## 4.2 Pyrrolochinolinchinon (PQQ)

Při degradaci PVA má u některých bakterií významnou roli přítomnost PQQ. Pyrrolochinolinchinon je nekovalentně vázaná prostetická skupina mnoha chinoproteinů.

Jednou z jeho hlavních úloh je jeho přítomnost při oxidaci PVA či jiných organických substrátů. Jedná se totiž o nezbytný faktor pro činnost dehydrogenas, které oxidují PVA. Výskyt chinoproteinů byl dosud zaznamenán v periplasmatickém prostoru některých Gram-negativních bakterií, kde slouží jako katalyzátory při oxidaci alkoholů nebo sacharidů. Důležitá je také přítomnost aminokyselin či bílkovinných sloučenin jako je např. pepton, kvasničný autolyzát, apod. v kultivačním médiu. Přítomnost aminokyselin nebo bílkovinných sloučenin je totiž příčinou snížení obsahu PQQ v systému vlivem transformace PQQ na biologicky neaktivní složku [18].

Chemická struktura pyrrolochinolinchinonu ukazuje, že jde o orthochinon a je ukázána na Obr. 3.



Obr. 3. Chemická struktura pyrrolochinolinchinonu [20]

### 4.3 Celková mineralizace

Pod pojmem celková mineralizace (nebo jen mineralizace) se rozumí koncentrace veškerých rozpuštěných anorganických látek. Poskytuje skutečný obraz o celkové koncentraci anorganických látek ve vodách a používá se především při rozborech vod. Celková mineralizace je dána součtem hmotnostních koncentrací všech základních aniontů a kationtů, včetně hmotnostních koncentrací anorganických neiontově rozpuštěných látek (především křemíku a u minerálních vod i boru). Je počítána z výsledků chemického rozboru. Výsledky celkové mineralizace se vyjadřují v  $\text{mg.l}^{-1}$ , někdy též v  $\text{g.l}^{-1}$  a méně často v  $\text{mg.kg}^{-1}$  nebo v  $\text{g.kg}^{-1}$ . Symbolem pro celkovou mineralizaci je  $\Sigma c_m$  [21].

Musíme brát v úvahu, že celková mineralizace, respektive její hodnota, neodpovídá experimentální hodnotě obsahu rozpuštěných látek (stanovených jako sušina). Toto tvrzení neplatí ani ve vodách s hmotnostně nepostižitelným obsahem organických látek. Vypočítaná hodnota celkové mineralizace bývá v přírodních vodách a především v podzemních vodách vyšší než stanovená sušina rozpuštěných látek. V takových vodách patří hydrogenuhličitaný mezi dominující anionty. Hydrogenuhličitaný se při sušení při teplotě  $105^\circ\text{C}$ , tedy při stanovení rozpuštěných látek jako sušiny, rozkládají a tímto

rozkladem ztrácejí asi polovinu své hmotnosti. Nedochází však ke ztrátě veškeré krystalové vody některých hydrátů (např.  $MgSO_4$ ,  $CaSO_4$  a  $CaCl_2$  zcela dehydratují až při teplotě  $200^\circ C$ ). Hydrogenuhličitany se na hodnotě výsledku projevují negativní chybou stanovení. Kvalitativní vztah mezi vypočítanou hodnotou celkové mineralizace a hodnotou sušiny anorganických látek závisí na kvalitativním složení vody a na poměrném zastoupení jednotlivých složek vody [21].

Stopové prvky a vitamíny se na tvorbě minerálních solí v médiu podílejí jen v minimální míře, proto nebudou do celkové mineralizace započítávány.

Tab. 2. Přehled mikroorganismů a celková mineralizace minerálních médií

<b>Autor</b>	<b>Použitá kultura</b>	<b>Celková mineralizace použitého média [<math>mg.l^{-1}</math>]</b>
Yamatsu a kol.	<i>Sphingopyxis</i> sp. PVA3	2 210
Hatanaka a kol.	<i>Pseudomonas</i> sp. 113P3	23 310
Kim a kol.	<i>Sphingomonas</i> sp. SA3	10 223
Matsumura a kol.	<i>Alcaligenes faecalis</i> KK314	2 504
Lee a kol.	<i>Cardiobacterium</i> sp. a <i>Achromobacter cholinophagum</i>	5 963
Tokiwa a kol.	<i>Sphingomonas</i> sp.	2 929
Choi a kol.	<i>Microbacterium barkeri</i> KCCM 10507 a <i>Paenibacillus amylolyticus</i> KCCM 10508	3 904
Sakai a kol.	<i>Pseudomonas vesicularis</i> PD	574
Nedbálek	OT2, JK2, Ž1	2 945
Václavková	OT2, JK2, Ž1	2 945

Z uvedených hodnot je patrné, že různí autoři, uvedení v Tab. 2, používali pro rozklad PVA nejen různé kmeny degradačních bakterií, ale též velmi rozdílná média co do obsahu minerálních složek a tím i osmotického tlaku. V případě srovnávání celkové mineralizace je proto nutné brát v úvahu, jaký bakteriální kmen byl při degradaci PVA použit a také jaká byla hodnota celkové mineralizace použitého média.

## **II. MATERIÁL A METODIKA**

## 5 CHEMIKÁLIE, ŽIVNÁ MÉDIA A ROZTOKY

### 5.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. Není-li uvedeno jinak, pocházejí od standardních dodavatelů chemikálií jako jsou např. firmy Penta, Merci nebo Fisher Scientific.

#### **Polyvinylalkohol (PVA)**

Ve všech provedených pokusech byl použit práškový PVA pod obchodním názvem MOWIOL 5-88. První číslo v názvu značí viskozitu 4% vodného roztoku a druhé označuje procentuální obsah odstraněných acetátových skupin.

#### **Fyziologický roztok (FR)**

Byl připraven navážením 8,5 g NaCl a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Roztok byl vysterilizován při 125°C po dobu 20 minut.

#### **Zásobní roztok PQQ**

Byl připraven navážením 1 mg PQQ a rozpuštěním v 10 ml destilované vody. Roztok byl vysterilizován filtrací přes sterilní ultrafiltr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$  a uchováván při -18°C.

#### **Roztok pufru A**

Byl připraven navážením 9,07 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

#### **Roztok pufru B**

Byl připraven navážením 23,90 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

#### **Minerální médium (MM1)**

Na přípravu 1000 ml minerálního média bylo použito:

Roztok pufru A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....	20 ml
Roztok pufru B ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ).....	80 ml
Destilovaná voda.....	850 ml

Roztok stopových prvků.....	2 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (10 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (3 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (1 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml
NH <sub>4</sub> Cl (30 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml
NaCl (50 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml

### Příprava jednotlivých složek minerálního média:

#### Roztok stopových prvků

Bylo naváženo:

MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,043 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,057 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,043 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	0,037 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	0,025 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,040 g

Navážená množství stopových prvků byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody.

#### Roztoky solí

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (10 g.l <sup>-1</sup> ).....	1 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (3 g.l <sup>-1</sup> ).....	0,3 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (1 g.l <sup>-1</sup> ).....	0,1 g
NH <sub>4</sub> Cl (30 g.l <sup>-1</sup> ).....	3 g
NaCl (50 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 g

Jednotlivé soli byly naváženy a rozpuštěny každá zvlášť ve 100 ml destilované vody.

### Minerální médium se zvýšenou koncentrací fosforečnanů (MM2)

Na přípravu 1000 ml minerálního média bylo použito:

Roztok pufru A (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	40 ml
Roztok pufru B (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O).....	160 ml
Destilovaná voda.....	750 ml
Roztok stopových prvků.....	2 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (10 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (3 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (1 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml
NH <sub>4</sub> Cl (30 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml
NaCl (50 g.l <sup>-1</sup> ).....	10 ml

### **Minerální médium se sníženou koncentrací fosforečnanů (MM3)**

Na přípravu 1000 ml minerálního média bylo použito:

Roztok pufru A (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	5 ml
Roztok pufru B (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O).....	45 ml
Destilovaná voda.....	930 ml
Roztok stopových prvků.....	2 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (10 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (3 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (1 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
NH <sub>4</sub> Cl (30 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml

### **Médium s organickým pufrem I (TRIS 0,05 M)**

Na přípravu 1000 ml média bylo použito:

Roztok pufru A (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	0,7 ml
Roztok pufru B (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O).....	5,5 ml
TRIS pufr 0,05 M.....	961,8 ml
Roztok stopových prvků.....	2 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (10 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (3 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (1 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
NH <sub>4</sub> Cl (30 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
NaCl (3,9 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
KCl (4,97 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml

### **Médium s organickým pufrem II (TRIS 0,005 M)**

Na přípravu 1000 ml média bylo použito:

Roztok pufru A (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	0,7 ml
Roztok pufru B (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O).....	5,5 ml
TRIS pufr 0,005 M.....	961,8 ml
Roztok stopových prvků.....	2 ml

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (10 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (3 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (1 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
NH <sub>4</sub> Cl (30 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
NaCl (3,9 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml
KCl (4,97 g.l <sup>-1</sup> ).....	5 ml

**Roztok kyseliny borité (40 g.l<sup>-1</sup>)**

Bylo naváženo 20 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a rozpuštěno v 500 ml destilované vody.

**Roztok jodu s jodidem draselným**

V třecí misce bylo spolu s malým množstvím destilované vody důkladně rozetřeno 6,35 g I<sub>2</sub> spolu s 20 g KI. Tato směs byla následně kvantitativně převedena do 500 ml odměrné baňky a doplněna po rysku destilovanou vodou.

**Roztok TRIS (0,1 M)**

Bylo naváženo 3,634 g TRIS [tris(hydroxymethyl aminomethanu)] a rozpuštěno ve 300 ml destilované vody.

**Kyselina chlorovodíková (0,1 M)**

Roztok byl připraven ředěním koncentrované HCl destilovanou vodou.

**Roztok TRIS pufru (0,05 M)**

50 ml roztoku TRIS se smíchá s 40,3 ml 0,1 M HCl a doplní destilovanou vodou na 100 ml.

**Roztok TRIS pufru (0,005 M)**

Roztok byl připraven ředěním TRIS pufru 0,05M v poměru 1:9 s destilovanou vodou.



## 5.2 Živné agary

### **PVA agar s PQQ (koncentrace PVA 3 g.l<sup>-1</sup>)**

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

Minerální agar.....	1,9 g
PVA (POVAL 205).....	0,3 g
Zásobní roztok PQQ (0,1 g.l <sup>-1</sup> ).....	0,02 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
Destilovaná voda.....	100 ml

Daná množství látek byla důkladným rozmícháním rozpuštěna ve 100 ml destilované vody a vysterilizována při 125°C po dobu 25 minut. Po sterilizaci a zchladnutí agaru byl tento agarový roztok rozlit do sterilních Petriho misek v laminárním boxu.

### **PVA agar s PQQ a s tryptonem (koncentrace PVA 3 g.l<sup>-1</sup>)**

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

Minerální agar.....	1,9 g
PVA (POVAL 205).....	0,3 g
Zásobní roztok PQQ (0,1 g.l <sup>-1</sup> ).....	0,02 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
Trypton.....	0,02 g
Destilovaná voda.....	100 ml

Daná množství látek byla důkladným rozmícháním rozpuštěna ve 100 ml destilované vody a vysterilizována při 125°C po dobu 25 minut. Po sterilizaci a zchladnutí agaru byl tento agarový roztok rozlit do sterilních Petriho misek v laminárním boxu.

### **Trypton agar (koncentrace tryptonu 0,2 g.l<sup>-1</sup>)**

Na přípravu 100 ml trypton agaru bylo použito:

Minerální agar.....	1,9 g
Trypton.....	0,02 g
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
Destilovaná voda.....	100 ml

Daná množství látek byla důkladným rozmícháním rozpuštěna ve 100 ml destilované vody a vysterilizována při 125°C po dobu 25 minut. Po sterilizaci a zchladnutí trypton agarů byl tento agarový roztok rozlit do sterilních Petriho misek v laminárním boxu.

### **Trypton agar (koncentrace PVA 2,5 g.l<sup>-1</sup>)**

Na přípravu 100 ml agarů bylo použito:

Minerální agar.....	1,9 g
Trypton.....	0,25 g
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
Destilovaná voda.....	100 ml

Daná množství látek byla důkladným rozmícháním rozpuštěna ve 100 ml destilované vody a vysterilizována při 125°C po dobu 25 minut. Po sterilizaci a zchladnutí trypton agarů byl tento agarový roztok rozlit do sterilních Petriho misek v laminárním boxu.

## **5.3 Biologický materiál**

Kultura OT2 – byla izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Otrokovice v rámci DP Jiřího Riedla (2004) [22].

Kultura JK2 – byla izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Malenovice v rámci disertační práce (2009) Terezy Václavkové [18].

Kultura Ž1 – byla izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Malenovice v rámci DP (2007) Petra Zemana [23].

Kultura OT3 – byla izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Otrokovice v rámci DP (2004) Jiřího Riedla [22].

## 6 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY

### 6.1 Přístrojové vybavení

Předvážky KERN 440-47.....	SRN
Váhy KERN WEW 1500-2M.....	SRN
Váhy KERN 770.....	SRN
Třepačka laboratorní vratná.....	GUL
Box laminární BIO IIA.....	TELSTAR
Kultivační místnost 25°C.....	ÚIOŽP, FT
Spektrofotometr Spekol 11.....	CARL ZEISS JENA
Centrifuga MR 23i.....	JOUAN
Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky.....	TECAN SUNRISE
Elektrický vaříč.....	ETA
Laboratorní sterilizátor.....	SANO CLAV
Analyzátor uhlíku 5000A.....	SHIMADZU
PH metr CPH 51SET-1.....	Radelkis

### 6.2 Laboratorní pomůcky

96-jamková mikrotitrační destička.....GAMA  
- běžné laboratorní potřeby (kličky, dávkovače, zkumavky, kádinky a další laboratorní a mikrobiologické pomůcky, viz. Mikrobiologická laboratoř ÚIOŽP)

## 7 PRACOVNÍ POSUPY

### 7.1 Molekulárně-biologická identifikace bakterií

Na základě zjištění sekvence genu pro 16S rRNA byla provedena molekulárně-biologická identifikace čtyř používaných kultur. Pro tuto identifikaci byly použity čisté kultury, narostené na Petriho miskách. Z misek byla odebrána biomasa, která byla rozmíchána ve sterilní destilované vodě ve sterilní mikrozkuhavce. Poté byly mikrozkuhavky se suspenzí biomasy zahřáty na teplotu 95°C po dobu 10 minut. Po zchladnutí byl uzávěr mikrozkuhavky zajištěn parafilmem a odeslán ke stanovení sekvence uvedeného genu, která byla provedena laboratoří molekulárních metod Státního veterinárního ústavu se sídlem v Praze. Vlastní identifikace byla provedena porovnáním zjištěných sekvencí se známými sekvencemi bakterií pomocí programu BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### 7.2 Degradční lahvové testy

Název degradační lahvové testy byl použit proto, že tyto testy probíhaly ve skleněných lahvích s příslušnými minerálními médii. V těchto médiích byl rozpuštěn PVA ve výsledné koncentraci cca 500 mg.l<sup>-1</sup> a byl přidán enzymový kofaktor PQQ ve výsledné koncentraci 20 µg.l<sup>-1</sup>. Do jednotlivých láhví byly naočkovány konkrétní degradační kultury. Kultivace médií probíhala na reciproké třepačce s konstantní frekvencí kmitů (105/min), při laboratorní teplotě 25°C, bez přístupu světla. Vzorky pro stanovení koncentrace PVA či pro stanovení rozpuštěného organického uhlíku byly odebírány ve zvolených intervalech. Po odběru vzorků byly láhve v proudícím laminárním boxu ponechány 20 minut otevřené, aby se v nich obměnila atmosféra.

### 7.3 Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku TOC

Aby bylo možné provést stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku, bylo nutné odstranění buněk degradačních bakterií ze zkoumaných vzorků. Toto odstranění bylo provedeno centrifugací jednotlivých vzorků na chlazené centrifuze Jouan při nastavení 10000 x g, po dobu 10 minut, při 4°C. Supernatant, získaný centrifugací jednotlivých vzorků, byl podle potřeby a předpokládané koncentrace PVA zředěn, tak aby výsledná koncentrace uhlíku byla pod 100 mg.l<sup>-1</sup> (z důvodu nakalibrování analyzátoru uhlíku Shimadzu 5000A). Následně byla na přístroji Shimadzu stanovena koncentrace

celkového uhlíku TC [ $\text{mg.l}^{-1}$ ] a koncentrace anorganického uhlíku IC [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]. Z jejich rozdílu pak byla stanovena koncentrace celkového organického uhlíku TOC.

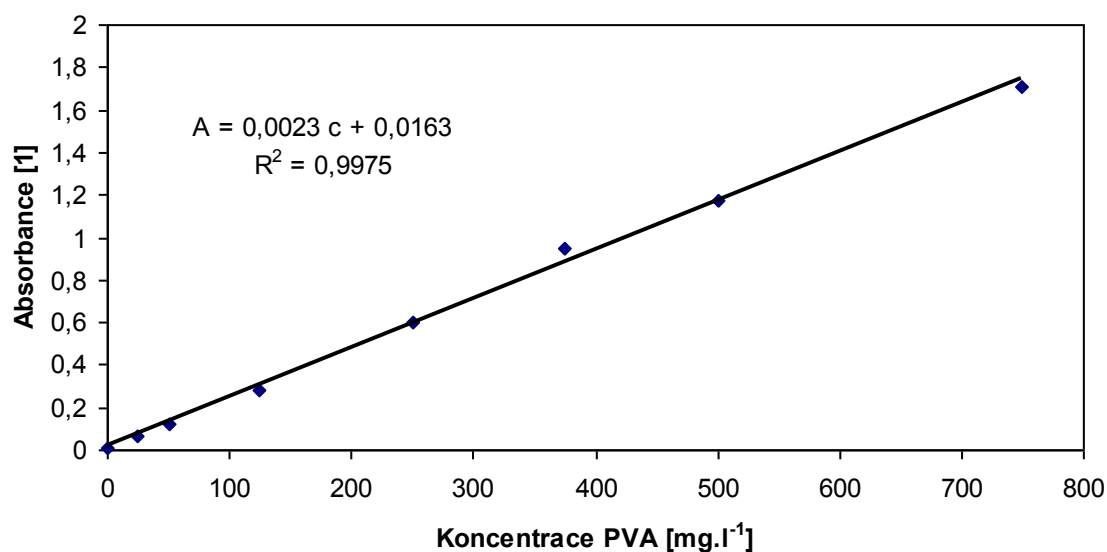
#### 7.4 Stanovení koncentrace PVA na mikrotitrační destičce

Stanovení PVA bylo prováděno spektrofotometrickou (jodometrickou) metodou v mikrotitrační destičce. Pokaždé byly do šesti jamek mikrotitrační destičky dávkovány centrifugované vzorky o objemu 20  $\mu\text{l}$ , dále 42  $\mu\text{l}$  roztoku kyseliny borité a 10  $\mu\text{l}$  roztoku jodu s jodidem draselným. Vzniklo tmavě zelené zbarvení směsi PVA s trijodidem, jehož absorbance byla měřena na přístroji TECAN při vlnové délce 660 nm, po 20 sekundách míchání a 5 sekundách klidu. Po odečtení absorbance prázdné mikrotitrační destičky byly hodnoty absorbance vzorků zprůměrovány a dosazeny do rovnice kalibrační přímky, viz. Obr. 4. Takto byla stanovována koncentrace PVA v  $\text{mg.l}^{-1}$ .

Kalibrační závislost byla zjištěna změřením připravených roztoků PVA v rozsahu koncentrací uvedených v Tab.3. Výsledná kalibrační závislost byla proložena přímkou v programu Excel a tím byla získána rovnice kalibrační přímky (Obr. 4), sloužící pro výpočet koncentrace PVA.

Tab. 3. Kalibrační závislost pro stanovení PVA

$C_{\text{PVA}}$ [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	0	25	50	125	250	375	500	750
A [1]	0,0096	0,0668	0,1211	0,284	0,603	0,951	1,169	1,712
Směr. odch.	0,00206	0,007851	0,010829	0,02525	0,044087	0,123808	0,071523	0,03661



Obr. 4. Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVA

## 7.5 Růstové testy

Byly provedeny ve sterilních mikrotitračních destičkách při použití 190  $\mu$ l sterilních médií. Jako růstový substrát byl použit trypton (výsledná koncentrace 3 g.l<sup>-1</sup>) nebo PVA (výsledná koncentrace 1 g.l<sup>-1</sup>) pro porovnání jednotlivých vlivů. Pro růst kultury OT3 byl nutný přídatek 5 mg katalasy (bovine liver catalase Sigma) do 100 ml média. Jednotlivé jamky s médii byly inokulovány 10  $\mu$ l suspenze s konkrétní PVA-degradační kulturou. Kultivace kultur probíhala ve sterilním prostředí, v klidu, při teplotě 25°C a bez přístupu světla. Růst buněk byl sledován měřením absorbance jamek mikrotitrační destičky s kulturačním médiem na přístroji Tecan při vlnové délce 600 nm, po 20 sekundách míchání a 5 sekundách klidu. V těchto testech byly sledovány vlivy zvýšených koncentrací chloridů a konkrétní podmínky jsou uvedeny ve výsledkové části.

## 7.6 Stanovení pH

Především při průběhu lahvových testů bylo měřeno pH vzorků za pomoci přístroje pH-metr OP – 208 se skleněnou elektrodou. Před každým prováděným měřením byl pH-metr kalibrován za pomoci dvou pufrů o větším a menším pH, než bylo předpokládáno pH měřeného vzorku. Měření pH bylo prováděno za stálého míchání měřených vzorků.

### **III. VÝSLEDKY A DISKUSE**

## 8 MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

### 8.1 Úvod

Podle postupu uvedeného v Kap. 7.1 jsem provedla přípravu bakteriálních kultur pro molekulárně-biologickou identifikaci. Všechny čtyři sledované kultury byly podle genové sekvence stanoveny s 98% pravděpodobností jako rod *Sphingomonas* sp. Jim nejbližší podobný záznam byl v genové bance uložen pod označením AY941088. S tímto záznamem mají naše kultury OT2, JK2 a Ž1 shodných 1430 nukleotidů z 1451 nukleotidů a kultura OT3 byla s AY941088 shodná ve 1431 nukleotidech z 1451 nukleotidů.

Jelikož tato 98% shoda nukleotidů neopravňuje ke druhovému zařazení jakékoliv neznámé bakteriální kultury, je v následující tabulce (Tab. 4) uvedeno, ke kterým druhům se naše kultury nejvíce blíží a také je provedeno srovnání s blízkými rody. Toto srovnání bylo provedeno programem Blast v on-line databázi MedLine. Naše kultury jsou zástupci rodu *Sphingomonas* sp., ač se blíží i k některým ostatním rodům. Současně můžeme říct, že všechny naše kultury budou patřit k neznámému, doposud nepopsanému druhu, neboť žádný záznam v databázi nebyl bližší než uvedených 98%. K potvrzení existence nového druhu by však bylo zapotřebí rozsáhlejších a náročnějších testů, vyžadovaných mezinárodní komisí pro taxonomii bakterií, než jen znalost sekvencí jednoho, byť významného genu.

Tab. 4. Procentuální shoda námi používaných kultur s kulturami zapsanými v celosvětové databázi

	OT2	OT3	JK2	Ž1
<i>Sphingomonas</i> sp. CC-LTTG	98%	98%	98%	98%
<i>Sphingopyxis</i> sp. LH21	92%	92%	92%	92%
<i>Sphingobium estrogenivorans</i>	94%	94%	94%	94%
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM12444	93%	93%	93%	93%

V následujících odstavcích jsou uvedeny získané genové sekvence námi sledovaných kultur a kultury AY941088, která je ze všech světově popsáných kultur našim sledovaným kulturám nejvíce podobná.



Stanovená sekvence genu pro 16S rRNA kultury označené AY941088:

AGTTTGATCCATGGCTCAGAATGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAA  
CGAAGGCTTCGGCCTTAGTGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGG  
TTCGGAATAACAGTGAGAAATTAAGTCTAATACCGGATGATGTCGTAAGACCAAAGAT  
TTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACC  
AAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA  
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCC  
TGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCC  
GGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATACGAGGGGAGCTAGCGTTATTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTA  
GGCGGCTTTGTAAAGTTAGAGGTGAAAGCCCAGAGCTCAACTCTGGAATTGCCTTTAAG  
ACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTC  
GTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCT  
GAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  
AACGATGATAACTAGCTGTCCGGGCACTTGGTGCTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTA  
AGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGG  
CCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAG  
CGTTTGACATGTCCGGGCGATTTCCAGAGATGGATTTCTTCCCTTCGGGGACTGGAAC  
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCA  
ACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTACCATCATTAGTTGGTACTCTAAAGGAACCG  
CCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACCGG  
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAACTACAGTGGGCAGCAATCCCGCGAGGGTG  
AGCTAATCTCCAAAAGTTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAA  
GGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCTT  
GTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTTGGGTTACCCGAAGGCGTTGCGCTAACT  
CGCAAGAGAGGCAGGCGACCACGGTGGGCTTAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG  
GTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGTG

Stanovená sekvence genu pro 16S rRNA kultury OT3:

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAATGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGT  
CGAACGAAGCCTTCGGGCTTAGTGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCT  
TGGGTTTCGGAATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGGATGATGTCGTAAGACCAA  
AGATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGCT  
CACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA  
GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA  
AGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTT

ACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTTCGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACGAGGGGAGCTAGCGTTATTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA  
CGTAGGCGGCTTTGTAAGTTAGAGGTGAAAGCCCAGAGCTCAACTCTGGAATTGCCTT  
TAAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGA  
AATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTG  
ACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  
CCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCTGGGTGCTTGGCACTTAGGTGGCGCAGCTAACG  
CATTAAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACG  
GGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGCAGAACCTT  
ACCAGCGTTTGACATGTCCGGACGATTTCCAGAGATGGATATCTTCCCTTCGGGGACT  
GGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTC  
CCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTACCATCATT CAGTTGGGTACTCTAAAGG  
AACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTT  
ACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGTGGGCAGCAATCCCGCGA  
GGGTGAGCTAATCTCCAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGC  
ATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCAG  
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTT CACCCGAAGGCGTTGCGC  
TAACTCGCAAGAGAGGCAGGCGACCACGGTGGGCTTAGCGACTGGGGTGAAGTCGTA  
ACAAGGTAGCCGTAG

Stanovená sekvence genu pro 16S rRNA kultur OT2, JK2 a Ž1:

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAATGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGT  
CGAACGAAGCCTTTGGGCTTAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCT  
TGGGTTTCGGAATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGGATGATGTCGTAAGACCAA  
AGATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGGTAGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAAGCT  
CACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA  
GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA  
AGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTT  
ACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTTCGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACGAGGGGAGCTAGCGTTATTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA  
CGTAGGCGGCTTTGTAAGTTAGAGGTGAAAGCCCAGAGCTCAACTCTGGAATTGCCTT  
TAAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGA  
AATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTG  
ACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG  
CCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCTGGGTGCTTGGCACTTAGGTGGCGCAGCTAACG  
CATTAAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACG  
GGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGCAGAACCTT

ACCAGCGTTTGACATGTCCGGACGATTTCCAGAGATGGATATCTTCCCTTCGGGGACT  
GGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTC  
CCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTACCATCATTTCAGTTGGGTACTCTAAAGG  
AACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTT  
ACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGTGGGCAGCAATCCCGCGA  
GGGTGAGCTAATCTCCAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGC  
ATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAG  
GCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGGTTACCCGAAGGCGTTGCGC  
TAACTCGCAAGAGAGGCAGGCGACCACGGTGGGCTTAGCGACTGGGGTGAAGTCGTA  
ACAAGGTAGCCGTAG

Samozřejmě rozdíly nejsou na první pohled viditelné, ale při podrobnějším průzkumu zjistíme rozdílnost v několika desítkách nukleotidů. Díky tomuto srovnání jsme dospěli k 98% shodě našich čtyř kultur s kulturou AY941088. Je zajímavé, že kultury JK2, OT2 a Ž1 jsou podle této dílčí genové sekvence naprosto identické, ačkoliv kultury JK2 a Ž1 byly izolovány z ČOV v Malenovicích, zatímco kultura OT2 byla izolována z ČOV v Otrokovicích. Kultura OT3 byla izolovaná z ČOV v Otrokovicích, stejně jako kultura OT2, ale přesto jsou obě tyto kultury odlišné, i když pouze v jednom nukleotidu.

## 9 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI OT2 A JK2 ZA POUŽITÍ FOSFÁTOVÉHO PUFRU

### 9.1 Úvod

Tyto testy byly prováděny na základě výsledků předcházejících prací [17], [18] a jejich hlavním úkolem bylo posouzení vlivu nižší koncentrace fosforečnanů na degradaci polyvinylalkoholu, než jaké byly použity v již zmíněných pracích. Byly použity dvě degradační kultury, konkrétně se jednalo o kulturu OT2 a JK2, které se pro rozklad PVA již v dřívějších letech ukázaly jako velice účinné. Tyto kultury byly testovány v podmínkách degradačních lahvových testů (viz. Kap. 7.2).

### 9.2 Rozvržení pokusů 1 a 2

V rámci těchto pokusů byly nasazeny vždy tři série minerálních médií se čtyřmi paralelními lahvemi vedle sebe (u MM3 se třemi paralelními lahvemi), do kterých byla zaočkována nejdříve degradační kultura OT2 (pokus 1) a po proběhnutí testu bylo totéž provedeno s kulturou JK2 (pokus 2), aby byl zjištěn vliv různých degradačních kultur na degradaci PVA při stejných kultivačních podmínkách. Rozpis každého pokusu byl následující:

#### Pokus 1:

- 1) Kultura OT2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 2) Kultura OT2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 3) Kultura OT2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 4) Kultura OT2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 5) Kultura OT2 v MM2 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 6) Kultura OT2 v MM2 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 7) Kultura OT2 v MM2 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 8) Kultura OT2 v MM2 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 9) Kultura OT2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 10) Kultura OT2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 11) Kultura OT2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 12) Kultura OT2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$

Pokus 2:

- 1) Kultura JK2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 2) Kultura JK2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 3) Kultura JK2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 4) Kultura JK2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 5) Kultura JK2 v MM2 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 6) Kultura JK2 v MM2 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 7) Kultura JK2 v MM2 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 8) Kultura JK2 v MM2 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 9) Kultura JK2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 10) Kultura JK2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 11) Kultura JK2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 12) Kultura JK2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$

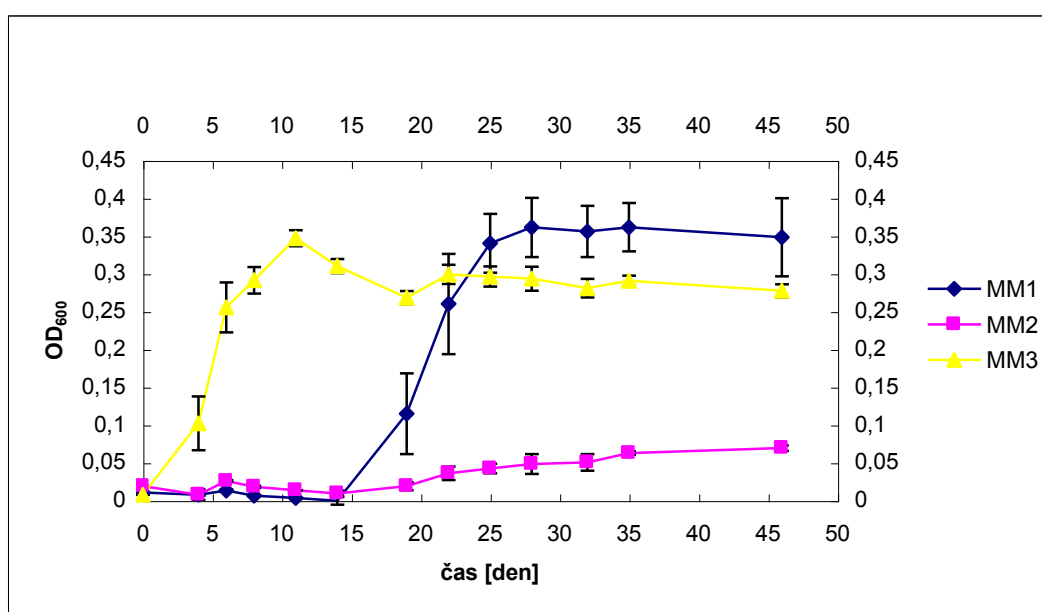
Minerální médium MM1 (s koncentrací fosforečnanů 6,68  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) bylo svým složením identické nejlepšímu minerálnímu médiu, zjištěnému v pracích [17] a [18], MM2 (s koncentrací fosforečnanů 13,37  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) představovalo minerální médium se zvýšenou koncentrací fosforečnanů a MM3 (s koncentrací fosforečnanů 3,39  $\text{mmol.l}^{-1}$ ) médium se sníženou, dosud netestovanou koncentrací fosforečnanů. V pravidelných intervalech bylo dvakrát týdně odebíráno 6 ml vzorku z každé láhve. V těchto vzorcích byla měřena nejprve optická hustota  $\text{OD}_{600}$ , poté byla po odstranění buněk centrifugací a případném zředění stanovena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) a nakonec byla stanovena koncentrace PVA spektrofotometrickou metodou.

### 9.3 Výsledky pokusu 1, s kulturou OT2

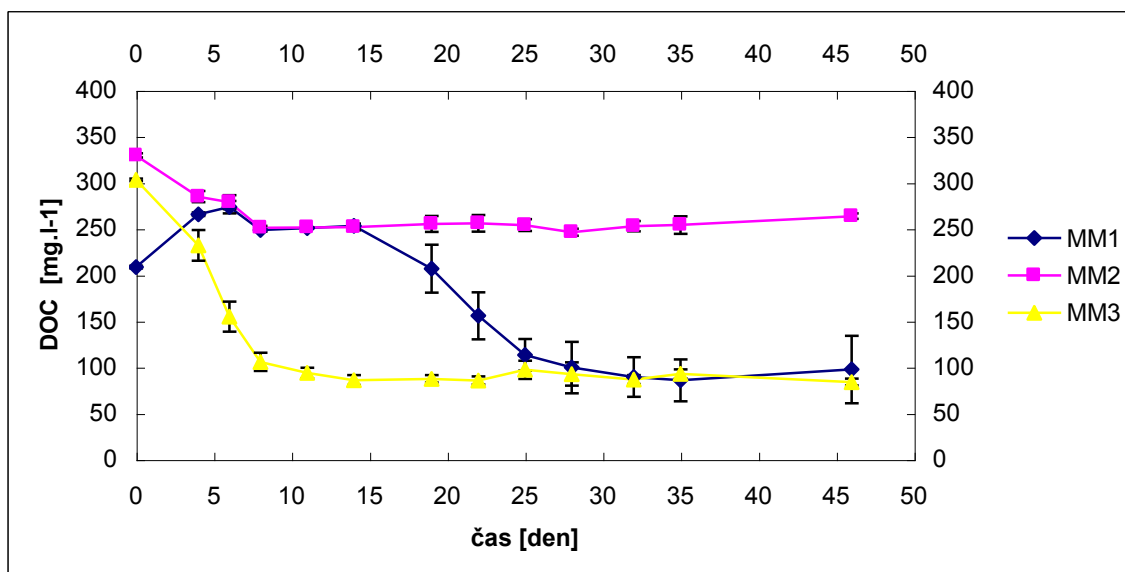
Pokus byl prováděn po dobu 46 dní. Průběh růstu degradačních kultur, měřený prostřednictvím optické hustoty, v jednotlivých médiích je viditelný z obrázku (Obr. 5), hodnoty v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení v jednotlivých lahvích, viz tabulka (Tab. 5). Stanovení koncentrací PVA v průběhu rozkladu PVA je patrné na obrázku (Obr. 7), hodnoty v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení, viz tabulka (Tab. 6). Průběh koncentrace rozpuštěného organického uhlíku je vidět z obrázku (Obr. 6), hodnoty zobrazené v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení, viz tabulka (Tab. 5). Chybové úsečky v grafech vyjadřují směrodatné odchylky měření.

Tab. 5. Hodnoty optické hustoty a koncentrace rozpuštěného organického uhlíku kulturou OT2 za použití fosfátového pufru

Doba [dny]	Láhev č.					
	OD <sub>600</sub>			DOC		
	1-4 MM1	5-8 MM2	9-12 MM3	1-4 MM1	5-8 MM2	9-12 MM3
0	0,0105	0,019	0,0075	208,44	329,46	303
4	0,0078	0,0075	0,102	265,77	284,75	232
6	0,013	0,026	0,2553	273,55	278,72	154,77
8	0,0065	0,0181	0,2913	248,5	251,13	105,71
11	0,0034	0,0137	0,347	250,82	251,49	93,79
14	-0,0003	0,0093	0,3102	253,14	251,85	86,01
19	0,1149	0,0189	0,2683	206,69	255,31	85,61
22	0,2601	0,036	0,2992	155,73	255,81	85,61
25	0,3402	0,0422	0,2963	113,39	253,94	97,17
28	0,3612	0,0484	0,2935	99,61	246,26	92,56
32	0,356	0,0502	0,2808	89,35	252,91	86,55
35	0,3616	0,0629	0,2907	85,76	254,13	92,91
46	0,3484	0,0694	0,2773	97,59	263,62	83,91



Obr. 5. Růstové křivky pro kulturu OT2 za použití fosfátového pufru



Obr. 6. Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) ve fosfátovém pufru pro kulturu OT2

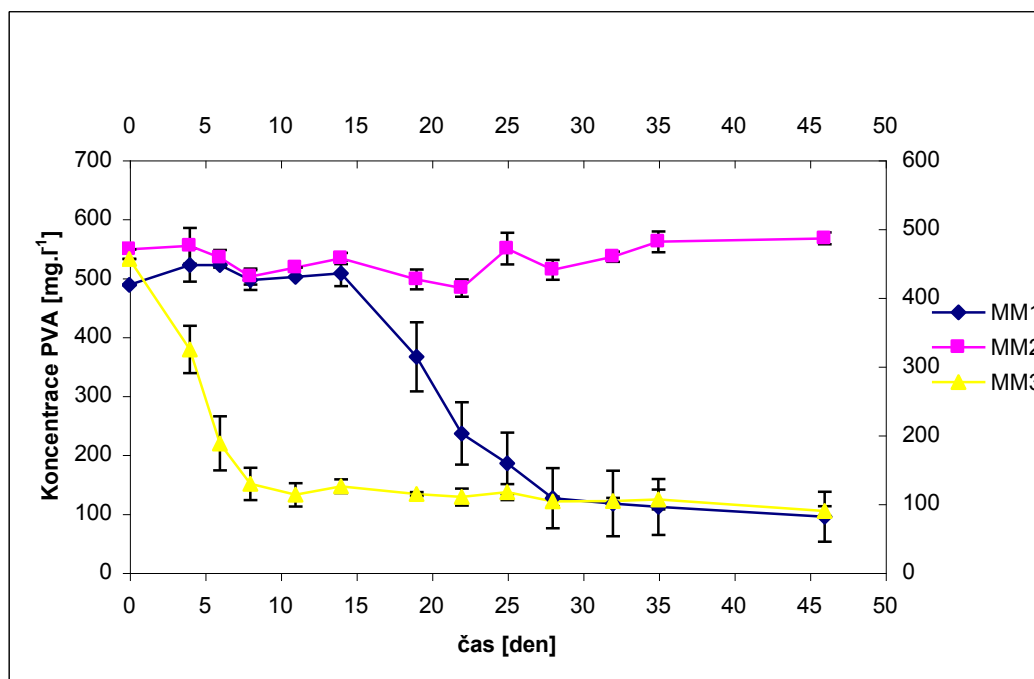
Tab. 6. Hodnoty koncentrace PVA [mg.l<sup>-1</sup>] pro kulturu OT2 za použití fosfátového pufru

Doba [dny]	Láhev č. MM1				Průměr	Směr. odch.
	1	2	3	4		
0	487,8	487,8	487,8	487,8	487,8	0
4	482,91	521,12	533,95	548,62	521,65	28,16
6	523,84	526,17	515,63	521,23	521,72	4,53
8	480,69	518,84	486,83	496,77	495,78	16,74
11	-	-	-	-	-	-
14	483,56	496,07	532,31	517,1	507,26	21,69
19	298,08	359,38	363,78	441,06	365,58	58,58
22	179,27	205,25	263,51	294,65	235,67	52,79
25	167,8	187,37	130,58	254,43	185,05	51,91
28	122,97	147,32	56,77	176,93	125,99	51,15
32	107,59	147,04	43,02	169,65	116,83	55,49
35	104,33	141,28	46,93	152,15	111,17	47,47
46	89,92	150,9	48,24	88,51	94,39	42,34

Tab. 6. Pokračování

Doba [dny]	Láhev č. MM2				Průměr	Směr. odch.
	5	6	7	8		
0	548,02	548,02	548,02	548,02	548,02	0
4	585,09	554,03	563,78	512,64	554,03	30,4
6	539	534,11	521,06	526,72	534,11	12,78
8	512,59	502,02	500,47	511,61	502,02	13,57
11	-	-	-	-	-	-
14	528,4	532,6	546,01	531,88	532,6	9,49
19	499,16	496,89	515,03	498,95	496,89	16,76
22	502,69	482,50	482,15	476,77	482,50	14,59
25	588,78	549,22	542,37	530,68	549,22	26,81
28	525,3	513,20	529,92	499,33	513,20	16,75
32	529,05	535,55	547,42	536,5	535,55	8,64
35	535,52	560,84	566,5	577,32	560,84	17,84
46	570,14	566,70	577,7	565,68	566,70	10,23
Doba [dny]	Láhev č. MM3			Průměr	Směr. odch.	
	9	10	11			
0	531,61	531,61	531,61	531,61	0	
4	386,17	414,09	334,87	378,38	40,18	
6	201,77	270,95	184,05	218,92	45,92	
8	142,7	180,41	127,37	150,16	27,3	
11	135,14	149,65	110,03	131,61	20,04	
14	146,83	157,26	134,11	132,78	11,59	
19	129	134,43	134,92	132,78	3,29	
22	116,5	144,11	123,4	128	14,37	
25	130,19	151,93	126,72	136,28	13,66	
28	121,34	128,18	111,83	120,45	8,21	
32	118,02	127,21	117,42	120,88	5,49	
35	121,28	141,99	108,67	123,98	16,82	
46	96,01	112,7	103,46	104,06	8,36	





Obr. 7. Průběh degradace PVA kulturou OT2 za použití fosfátového pufru

U minerálního média MM3 byly kultivovány pouze tři láhve (9,10,11), protože v poslední láhvi nezapočala degradace, jejímž nejpravděpodobnějším důvodem bylo nezaočkování této láhve suspenzí s danou kulturou.

Ze všech tří grafů je viditelné, že se průběhové křivky jednotlivých metod vzájemně doplňují. U média MM2 (s koncentrací fosforečnanů  $13,37 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) ve všech třech případech měření nastaly výrazné změny, můžeme tedy říct, že použitá koncentrace fosforečnanů byla pro kulturu inhibujícím faktorem a kultura v prostředí s takto vysokou koncentrací nebyla schopná růstu ani degradace PVA. Stejně minerální médium, se stejnou kulturou a koncentrací fosforečnanů použili ve svých pracích i Nedbálek [17] a Václavková [18] a jejich výsledky se od našich téměř nelišily.

Stejní autoři použili ještě minerální médium obdobné našemu MM1 (s koncentrací fosforečnanů  $6,68 \text{ mmol.l}^{-1}$ ), které se stejně jako v našem případě ukázalo jako výborné prostředí jak pro degradaci PVA, tak pro růst kultury OT2. Chtěli jsme zjistit, zda budou ještě nižší koncentrace fosforečnanů příznivější pro degradaci PVA, proto jsme použili ještě jedno minerální médium MM3 (s koncentrací fosforečnanů  $3,39 \text{ mmol.l}^{-1}$ ). Toto médium se ukázalo jako velmi vhodné pro rychlejší náběh jak degradace PVA, tak i pro růst dané kultury, ale v průběhu času došlo k obdobné degradaci PVA i v médiu MM1 a je možné říct, že MM1 i MM3 měly v konečné fázi přibližně stejnou účinnost.

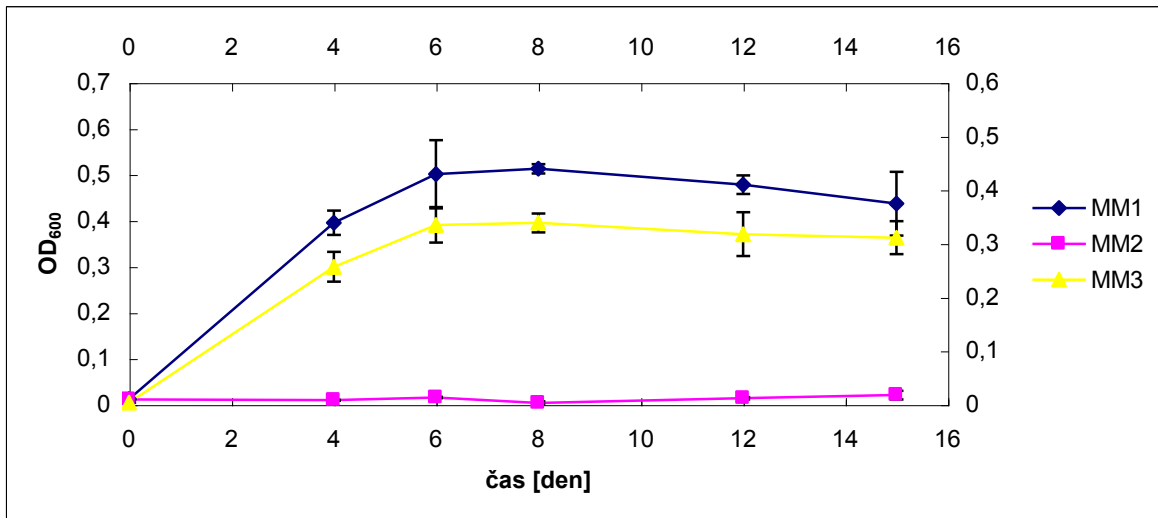
Po 46 denní kultivaci byla degradace PVA u MM1 (s koncentrací fosforečnanů  $6,68 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) 80,3% a u MM3 (s koncentrací fosforečnanů  $3,39 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) 80,4%.

#### 9.4 Výsledky pokusu 2, s kulturou JK2

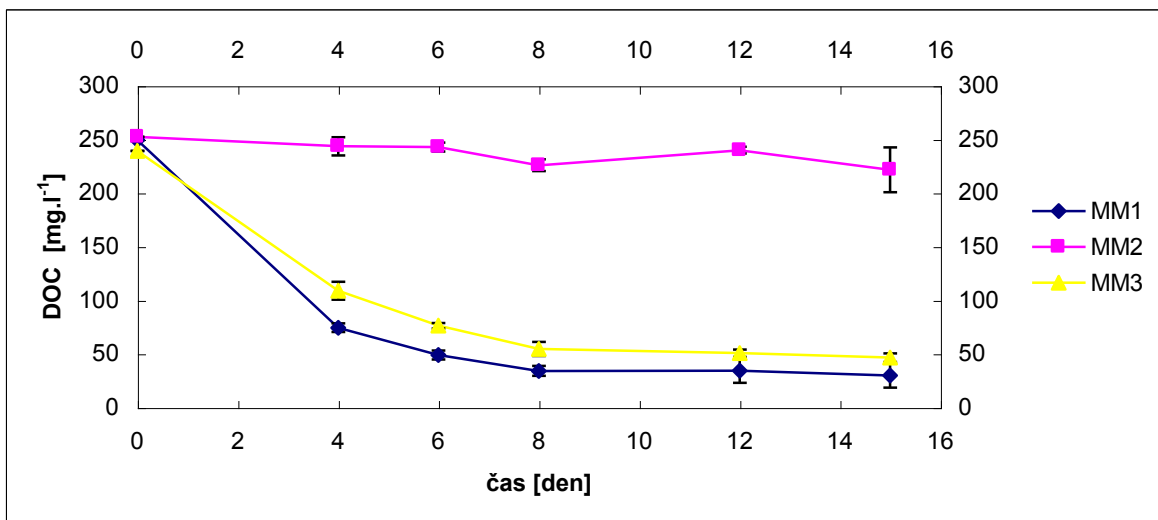
Pokus byl prováděn po dobu 15 dní. Průběh růstu degradační kultury, měřený prostřednictvím optické hustoty, v jednotlivých médiích je viditelný z obrázku (Obr. 8), hodnoty v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení v jednotlivých lahvích, viz tabulka (Tab. 7). Stanovení koncentrací PVA jako průběhu rozkladu PVA je patrné z obrázku (Obr. 10), hodnoty v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení, viz. tabulka (Tab. 8). Průběh koncentrace rozpuštěného organického uhlíku je vidět z obrázku (Obr. 9), hodnoty zobrazené v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení, viz. tabulka (Tab. 7). Chybové úsečky v grafech vyjadřují směrodatné odchylky měření.

Tab. 7. Hodnoty optické hustoty a koncentrace rozpuštěného organického uhlíku

Doba [dny]	Láhev č.					
	OD <sub>600</sub>			DOC		
	1-4 MM1	5-8 MM2	9-12 MM3	1-4 MM1	5-8 MM2	9-12 MM3
0	0,0115	0,011	0,004	249,2	252,4	239,24
4	0,3954	0,0096	0,2994	74,39	243,53	108,88
6	0,5008	0,0152	0,3905	48,91	242,74	76,2
8	0,5126	0,0034	0,395	34,07	225,88	54,62
12	0,4778	0,0139	0,3705	34,31	239,85	50,56
15	0,4367	0,0207	0,3627	29,75	221,61	46,46



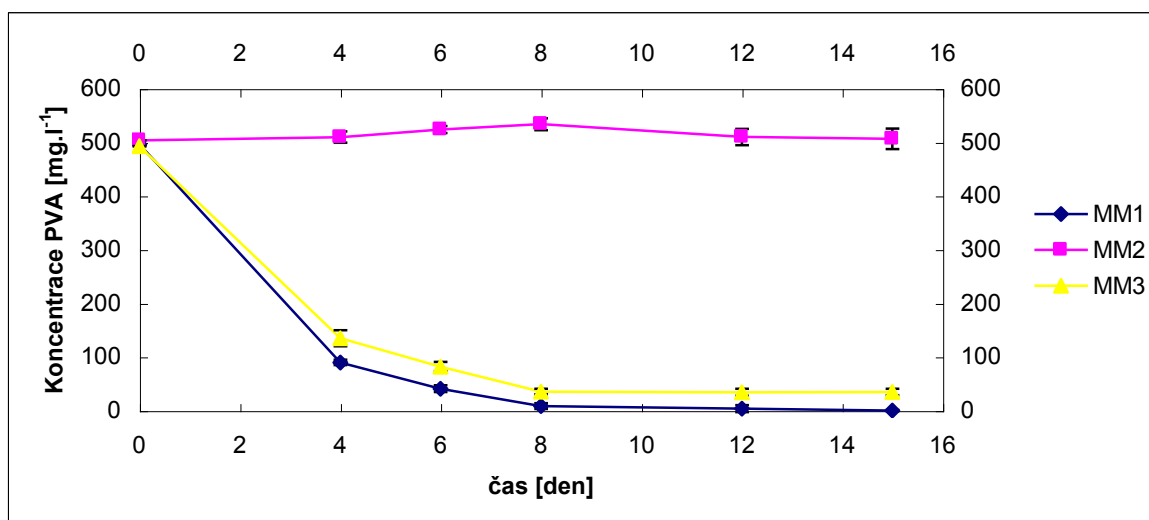
Obr. 8. Růstové křivky pro kulturu JK2 za použití fosfátového pufru



Obr. 9. Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku ve fosfátovém pufru pro kulturu JK2

Tab. 8. Hodnoty koncentrace PVA [ $\text{mg.l}^{-1}$ ] pro kulturu JK2 za použití fosfátového pufru

Doba [dny]	Láhev č. MM1				Průměr	Směr. odch.
	1	2	3	4		
0	496,28	496,28	496,28	496,28	496,28	0
4	83,51	93,9	94	87,3	89,68	5,17
6	33,02	44,71	47,32	38,13	40,79	6,47
8	1,88	14,65	10,03	6,83	8,35	5,38
12	-2,47	11,72	5,2	-1,27	3,29	6,55
15	-0,02	-2,09	-0,35	-0,57	-0,76	0,92
Doba [dny]	Láhev č. MM2				Průměr	Směr. odch.
	5	6	7	8		
0	503,35	503,35	503,35	503,35	503,35	0
4	512,42	522,59	503,95	498,95	509,48	10,36
6	529,82	523,18	514,71	527,04	523,69	6,57
8	519,22	531,17	545,03	538,95	533,59	11,34
12	500,8	507,53	499,22	531,93	509,87	15,14
15	515,09	515,96	516,45	477,75	506,31	19,05
Doba [dny]	Láhev č. MM3				Průměr	Směr. odch.
	9	10	11	12		
0	492,64	492,64	492,64	492,64	492,64	0
4	156,17	121,83	132,59	128,56	134,79	14,93
6	89,76	70,03	86,07	81,5	81,84	8,57
8	35,09	28,84	39,92	37,97	35,45	4,84
12	41,17	28,29	38,13	29,05	34,16	6,47
15	39,92	29,92	39,54	29,33	34,68	5,84



Obr. 10. Průběh degradace PVA kulturou JK2 za použití fosfátového pufru

Ve všech třech grafech je jako v předcházejícím pokusu s kulturou OT2 viditelné, že se průběhové křivky jednotlivých metod doplňují. Ani kultura JK2 nezaznamenala u média MM2 (fosforečnanů  $13,37 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) ve všech třech případech měření žádné změny, lze tedy říct, že stejně jako u kultury OT2 i kultura JK2 v prostředí s takto vysokou koncentrací fosforečnanů nebyla schopná růstu ani degradace PVA.

Zajímavé jsou opět průběhové křivky kultury JK2 v médiích MM1 (fosforečnanů  $6,68 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) a MM3 (fosforečnanů  $3,39 \text{ mmol.l}^{-1}$ ), kdy médium MM1 s vyšší koncentrací fosforečnanů vytvářelo lepší podmínky pro růst kultury a také pro výraznější degradaci PVA než médium MM3. Je tedy možné, že určitá koncentrace fosforečnanů má příznivý vliv pro růst kultury a degradaci PVA (pufrace média, osmotický tlak) a není pro ni inhibující. V případě kultury JK2 tedy neplatí, že čím nižší koncentrace fosforečnanů, tím vyšší degradace PVA a lepší růst kultury.

Degradace PVA kulturou JK2 nastala po 15 denním průběhu pokusu v médiu MM1 ze 100 % a v médiu MM3 z 93 %. U minerálního média MM2 nenastala degradace PVA vůbec. Minerální médium MM1 (fosforečnanů  $6,68 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) se tedy pro kulturu JK2 ukázalo jako optimální pro degradaci PVA, neboť během 6 dnů bylo odbouráno více než 95% vstupní koncentrace polyvinylalkoholu..

## 10 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI OT2 A JK2 ZA POUŽITÍ ORGANICKÉHO PUFRU

### 10.1 Úvod

Testy, kdy byl použit organický pufr (TRIS) na místo fosfátového, byly prováděny vzhledem k předcházejícím výsledkům, ač je fosfátový pufr nejběžněji používaným typem pufru v mikrobiologii, protože obsahuje látky vyskytující se běžně v přírodě. Na základě výsledků předcházejících pokusů však bylo možné konstatovat, že od určitých koncentrací fosfátový pufr kulturám škodí. Hlavním úkolem těchto testů oproti fosfátovým tedy bylo snížit koncentraci fosforečnanů natolik, abychom je dávkovali pouze jako zdroj fosforu, nikoliv jako pufrací sloučeniny. Bez pufrace by totiž docházelo k okyselování médií.

Opět byly použity dvě degradační kultury, jako v předcházejícím testu s fosfátovým pufrům (viz. Kap. 9), jednalo se o kulturu OT2 a JK2. Byly použity dva organické TRIS pufrů s nižší (TRIS 0,005M) a vyšší (0,05M) koncentrací organických složek a jeden pufr fosfátový (MM3 u kultury OT2 a MM1 u kultury JK2) jako porovnávací. Tyto testy byly také prováděny v podmínkách degradačních lahvových testů (viz. Kap. 7.2).

### 10.2 Rozvržení pokusů 3 a 4

V rámci tohoto pokusu byly opět nasazeny vždy tři série médií, každá se čtyřmi paralelními lahvemi, do kterých byla zaočkována příslušná degradační kultura. Pokus 3 byl proveden s kulturou OT2 a po proběhnutí testu bylo totéž provedeno s kulturou JK2 (pokus 4). Rozpis pokusů je následovný:

#### Pokus 3:

- 1) Kultura OT2 v TRIS 0,05M s PQQ  $20 \mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA  $500 \text{ mg.l}^{-1}$
- 2) Kultura OT2 v TRIS 0,05M s PQQ  $20 \mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA  $500 \text{ mg.l}^{-1}$
- 3) Kultura OT2 v TRIS 0,05M s PQQ  $20 \mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA  $500 \text{ mg.l}^{-1}$
- 4) Kultura OT2 v TRIS 0,05M s PQQ  $20 \mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA  $500 \text{ mg.l}^{-1}$
- 5) Kultura OT2 v TRIS 0,005M s PQQ  $20 \mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA  $500 \text{ mg.l}^{-1}$
- 6) Kultura OT2 v TRIS 0,005M s PQQ  $20 \mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA  $500 \text{ mg.l}^{-1}$
- 7) Kultura OT2 v TRIS 0,005M s PQQ  $20 \mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA  $500 \text{ mg.l}^{-1}$
- 8) Kultura OT2 v TRIS 0,005M s PQQ  $20 \mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA  $500 \text{ mg.l}^{-1}$

- 9) Kultura OT2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 10) Kultura OT2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 11) Kultura OT2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 12) Kultura OT2 v MM3 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$

#### Pokus 4:

- 1) Kultura JK2 v TRIS 0,05M s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 2) Kultura JK2 v TRIS 0,05M s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 3) Kultura JK2 v TRIS 0,05M s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 4) Kultura JK2 v TRIS 0,05M s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 5) Kultura JK2 v TRIS 0,005M s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 6) Kultura JK2 v TRIS 0,005M s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 7) Kultura JK2 v TRIS 0,005M s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 8) Kultura JK2 v TRIS 0,005M s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 9) Kultura JK2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 10) Kultura JK2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 11) Kultura JK2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- 12) Kultura JK2 v MM1 s PQQ 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$  + PVA 500  $\text{mg.l}^{-1}$

V přibližně pravidelných intervalech bylo cca dvakrát týdně odebíráno 6 ml vzorku z každé láhve. V těchto vzorcích byla měřena nejprve optická hustota  $OD_{600}$  jako vyjádření růstu kultury, poté byla po odstranění buněk centrifugací a případném zředění stanovena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku DOC a nakonec byla stanovena koncentrace PVA spektrofotometrickou metodou.

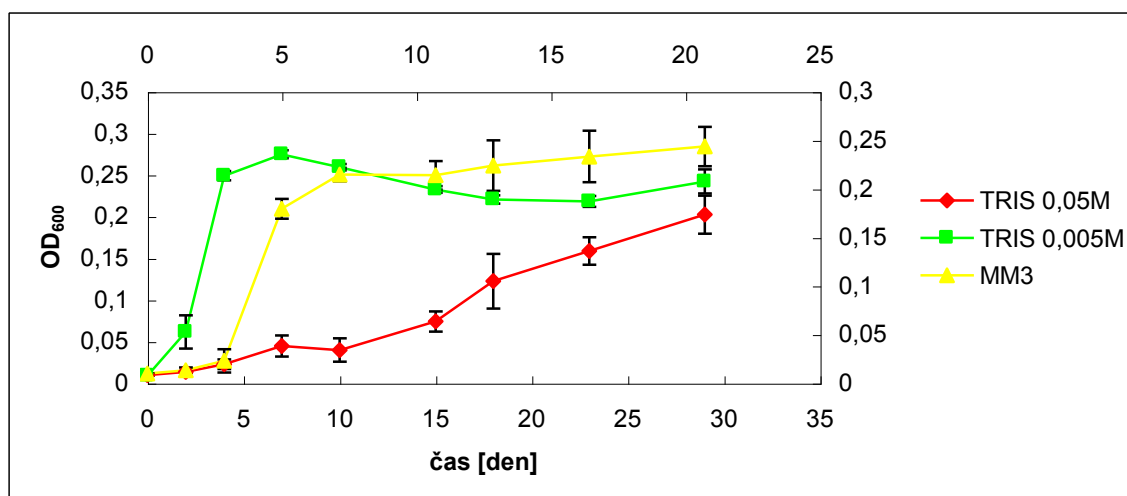
### **10.3 Výsledky pokusu 3, s kulturou OT2**

Pokus byl prováděn po dobu 29 dní. Průběh růstu degradačních kultur, měřený prostřednictvím optické hustoty, v jednotlivých médiích je viditelný na obrázku (Obr. 11), hodnoty v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení v jednotlivých lahvích, viz tabulka (Tab. 9). Stanovení koncentrace PVA jako průběhu rozkladu PVA je patrné obrázku (Obr. 13), hodnoty v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení, viz tabulka (Tab. 10). Průběh koncentrace rozpuštěného organického uhlíku je vidět z obrázku

(Obr. 12), hodnoty zobrazené v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení, viz. tabulka (Tab. 9). Chybové úsečky v grafech vyjadřují směrodatné odchytky měření.

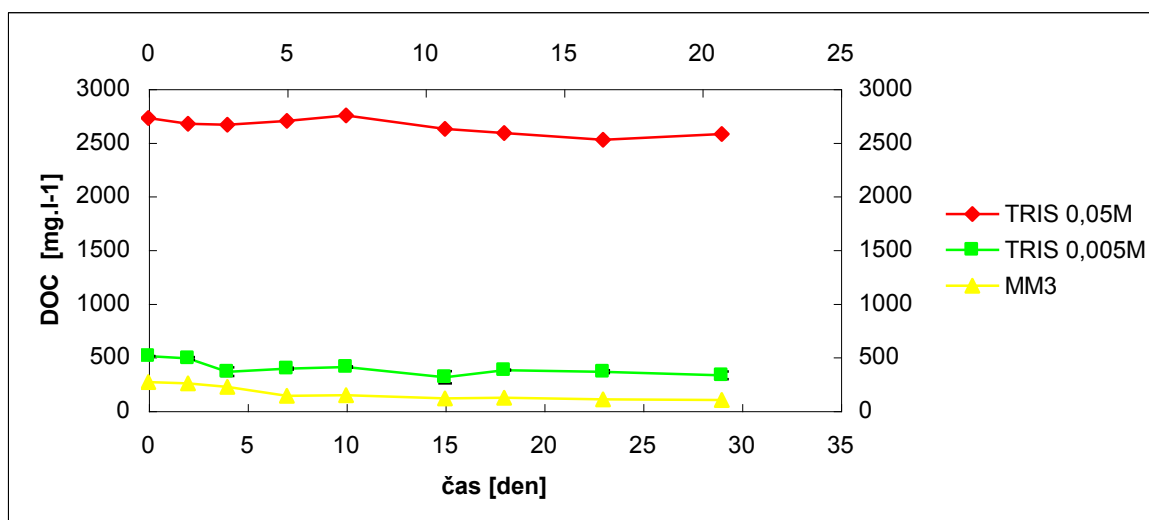
Tab. 9. Hodnoty optické hustoty a koncentrace rozpuštěného organického uhlíku kulturou OT2 za použití organického pufru

Doba [dny]	Láhev č.					
	OD <sub>600</sub>			DOC		
	1-4 TRIS 0,05M	5-8 TRIS 0,005M	9-12 MM3	1-4 TRIS 0,05M	5-8 TRIS 0,005M	9-12 MM3
0	0,0095	0,009	0,0115	2724,9	508,08	264,9
2	0,0135	0,0614	0,0155	2673	485,96	253,95
4	0,0226	0,249	0,0269	2663,63	361,82	220,4
7	0,0445	0,2749	0,2095	2698,65	390,5	138,45
10	0,0398	0,2594	0,2505	2748,23	405,39	143,58
15	0,0741	0,2325	0,2496	2625	310,31	112,26
18	0,1224	0,2204	0,2613	2585,63	377,025	118,14
23	0,1586	0,2183	0,2721	2523,68	361,91	103,07
29	0,2024	0,2421	0,2843	2575,5	329,31	97,73



Obr. 11. Růstové křivky pro kulturu OT2 za použití organického pufru





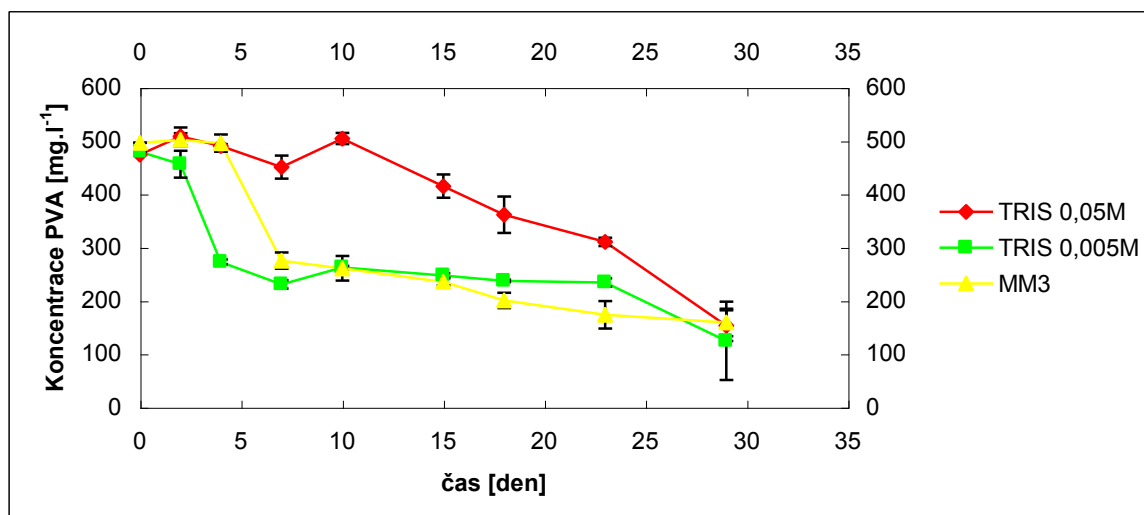
Obr. 12. Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v organickém pufru pro kulturu OT2

Tab. 10. Hodnoty koncentrace PVA [mg.l<sup>-1</sup>] pro kulturu OT2 za použití organického pufru

Doba [dny]	Láhev č. TRIS 0,05M				Průměr	Směr. odch.
	1	2	3	4		
0	473,89	473,89	473,89	473,89	473,89	0
4	506,23	489,38	530,58	512,64	508,26	16,94
6	493,02	490,79	491,99	484,54	490,09	3,81
8	475,52	423,57	456,55	446,39	450,51	21,64
11	496,39	493,57	513,56	512,87	504,1	10,59
14	384,82	432,48	412,15	429,65	414,78	21,9
19	314,38	393,95	359,71	376,28	361,08	34,13
22	304,16	303,43	312,59	320,25	310,11	7,94
25	165,21	186,61	121,92	137,53	152,82	28,77

Tab. 10. Pokračování

Doba [dny]	Láhev č. TRIS 0,005M				Průměr	Směr. odch.
	5	6	7	8		
0	479,27	479,27	479,27	479,27	479,27	0
4	440,36	434,65	458,89	490,2	456,03	25,02
6	267,42	271,77	272,8	278,13	272,53	4,4
8	234,49	238,18	220,3	228,08	230,26	7,84
11	258,29	259,82	265,14	264,82	262,02	3,48
14	241,83	247,7	247,53	251,99	247,26	4,17
19	235,79	236,83	234,98	240,25	236,96	2,32
22	224,38	230,58	240,47	239,82	233,81	7,74
25	87,74	211,62	154,43	44,2	124,5	73,68
Doba [dny]	Láhev č. MM3				Průměr	Směr. odch.
	9	10	11	12		
0	496,12	496,12	496,12	496,12	496,12	0
4	501,99	508,35	511,88	484,11	501,58	12,35
6	489,33	506,99	509,87	475,25	495,36	16,19
8	296,61	272,04	270,3	260,9	274,96	15,24
11	254,16	239,98	294,16	254,27	260,64	23,33
14	233,78	228,08	234,87	244	235,18	6,59
19	206,66	210,09	179,33	206,07	200,54	14,25
22	168,46	188,08	139,49	198,29	173,58	25,88
25	173,09	121,19	163,32	178,02	158,91	25,88



Obr. 13. Průběh degradace PVA kulturou OT2 za použití organického pufru

Z výsledků i uvedených grafů je vidět, že průběh degradace PVA za použití organických pufrů byl odlišný od průběhu za použití fosfátového pufru u MM3 (koncentrace fosforečnanů 3,39 mmol/l). Křivky degradace PVA v organickém TRIS pufru o nižší koncentraci (0,005 M) se svým průběhem blíží křivkám degradace kulturou OT2 za použití média MM3, avšak se zjevným uspišením začátku degradace cca o 2 dny. V konečném výsledku byla degradace v prostředí organického pufru s nižší koncentrací (TRIS 0,005M) 74%, zatímco výsledná degradace PVA v prostředí fosfátového pufru (MM3) byla 68%. Tato degradace ve výsledku odpovídá degradaci v organickém pufru s vyšší koncentrací (TRIS 0,05M), která byla 67,8%, kde však rychlost poklesu koncentrace PVA byla ale mnohem pozvolnější než u předchozích dvou médií. Můžeme tedy říci, že kultura OT2 vyšší koncentrace organických složek do jisté míry brání rychlé degradaci PVA, i když je i za těchto podmínek principiálně schopna využít polyvinylalkohol jako růstový substrát - potřebuje ale více času.

Pokles koncentrace PVA byl sledován také stanovením koncentrace DOC, tento pokles však není z grafu moc patrný, ale z tabulky můžeme vidět, že v médiích s nižší koncentrací organického pufru (TRIS 0,005M) a s fosfátovým pufrům (MM3) nastal pokles cca na polovinu oproti počátečnímu stavu. Pokles rozpuštěného organického uhlíku v médiu s vyšší koncentrací organických látek (TRIS 0,05M) nebyl tak velký jako u předchozích dvou médií, protože koncentrace organických látek byla i na počátku pokusu

vysoká. Pomocí sledování koncentrací DOC však bylo zjištěno, že degradační kultura sloučeninu TRIS nerozkládá.

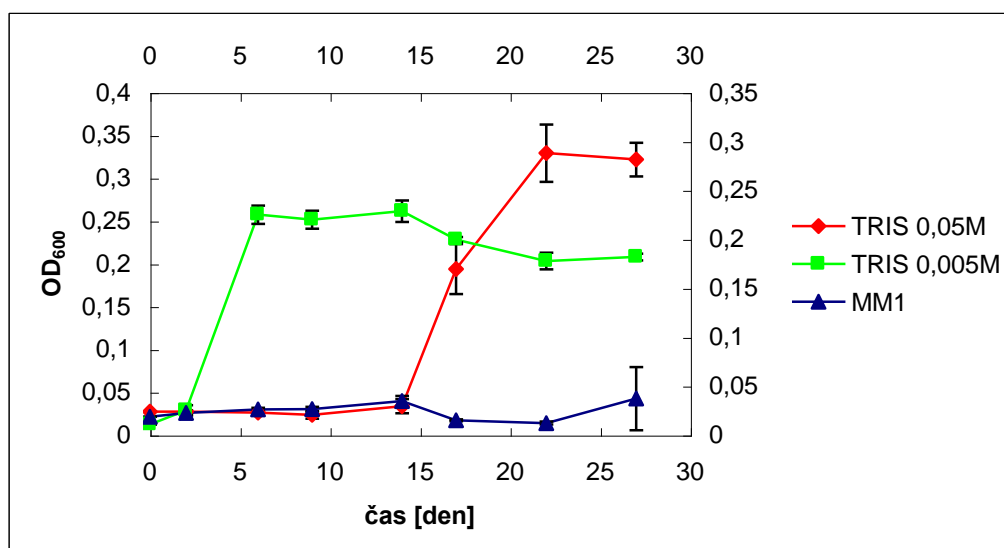
Růst degradační kultury OT2 v již zmíněných médiích je viditelný z obrázku Obr. 11, kultura roste různě, dle daných podmínek. Nejrychlejší náběh má v médiu s nižší koncentrací (TRIS 0,005M), ale v průběhu je stejný růst zaznamenán i v médiu s fosfáty MM3, které má však pozvolnější náběh. Růst kultury OT2 v médiu s vyšší koncentrací organických látek (TRIS 0,05M) nebyl tak výrazný jako u předchozích dvou médií, protože koncentrace organických látek byla na počátku pokusu vysoká a zpomalovala růst kultury.

#### **10.4 Výsledky pokusu 4, s kulturou JK2**

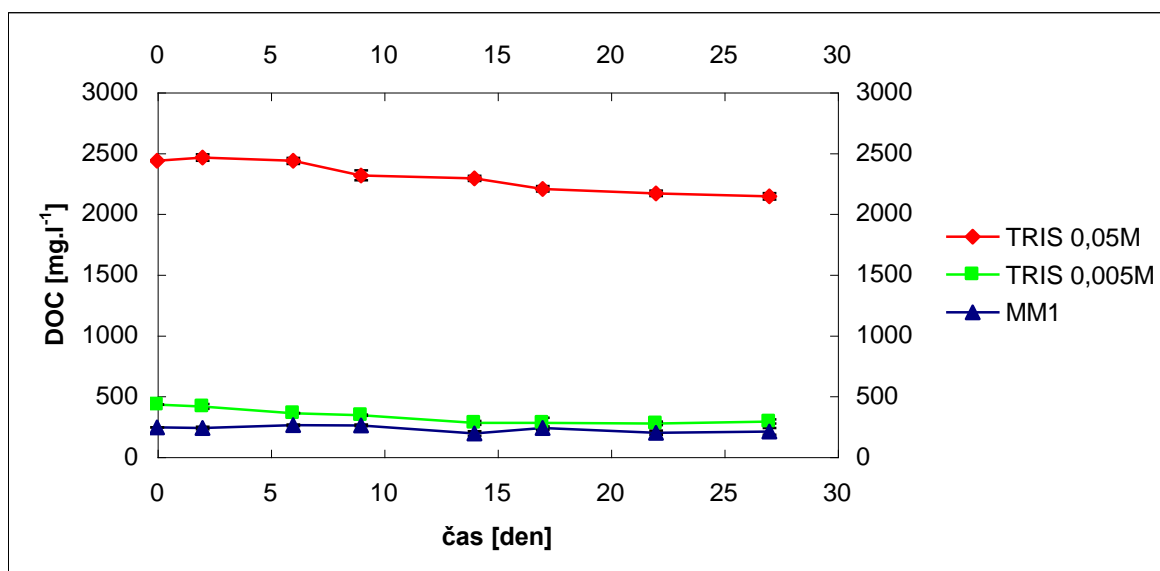
Pokus byl prováděn po dobu 27 dní. Průběh růstu degradační kultury, měřený prostřednictvím optické hustoty, v jednotlivých médiích je viditelný z obrázku (Obr. 14), hodnoty v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení v jednotlivých lahvích, viz tabulka (Tab. 11). Stanovení koncentrací PVA pro vyjádření průběhu rozkladu je patrné obrázku (Obr. 16), hodnoty v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení, viz tabulka (Tab. 12). Průběh koncentrace rozpuštěného organického uhlíku je vidět z obrázku (Obr. 15), hodnoty zobrazené v grafu odpovídají průměru z paralelních stanovení, viz tabulka (Tab. 11). Chybové úsečky v grafech vyjadřují směrodatné odchylky měření.

Tab. 11. Hodnoty optické hustoty a koncentrace rozpuštěného organického uhlíku kulturou JK2 za použití organického pufru

Doba [dny]	Láhev č.					
	OD <sub>600</sub>			DOC		
	1-4 TRIS 0,05M	5-8 TRIS 0,005M	9-12 MM1	1-4 TRIS 0,05M	5-8 TRIS 0,005M	9-12 MM1
0	0,0275	0,0125	0,0215	2432,1	427,2	239,34
2	0,0274	0,0289	0,0259	2458,95	412,43	234,65
6	0,0263	0,2573	0,0299	2432,93	357,15	257,6
9	0,0236	0,2514	0,0301	2312,48	339,96	256,91
14	0,0336	0,2615	0,0396	2287,95	276,57	190,74
17	0,1939	0,2281	0,0171	2202,53	277,1	233,93
22	0,3291	0,2031	0,014	2165,18	271,73	196,16
27	0,3216	0,208	0,0425	2139,98	288,21	206,51



Obr. 14. Růstové křivky pro kulturu JK2 za použití organického pufru



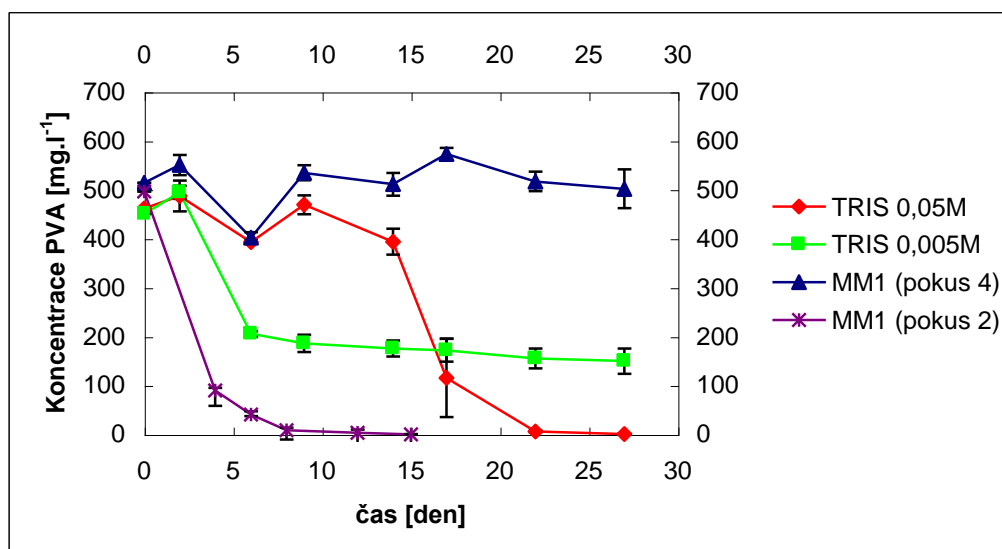
Obr. 15. Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v organickém pufru pro kulturu JK2

Tab. 12. Hodnoty koncentrace PVA [mg.l<sup>-1</sup>] pro kulturu JK2 za použití organického pufru

Doba [dny]	Láhev č. TRIS 0,05M				Průměr	Směr. odch.
	1	2	3	4		
0	461,88	461,88	461,88	461,88	461,88	0
2	497,59	440,25	500,79	509	486,91	31,47
6	392,7	390,47	391,28	398,13	393,15	3,45
9	483,24	442,75	483,02	467,86	469,22	19,06
14	421,61	357,75	397,86	397,26	393,62	26,47
17	219	28,46	85,47	129,11	115,51	80,36
22	4,76	6,23	5,09	8,46	6,14	1,67
27	1,66	0,09	0,85	0,3	0,73	0,7

Tab. 12. Pokračování

Doba [dny]	Láhev č. TRIS 0,005M				Průměr	Směr. odch.
	5	6	7	8		
0	450,36	450,36	450,36	450,36	450,36	0
2	484,71	497,37	512,32	483,4	494,45	13,48
6	210,14	206,55	207,42	197,15	205,32	5,65
9	165,74	192,59	178,84	207,21	186,1	17,84
14	151,23	184,87	182,42	183,29	175,45	16,18
17	137,37	186,99	177,26	185,68	171,83	23,37
22	126,5	168,4	154,54	170,79	155,06	20,34
27	131,23	167,04	124,22	176,66	149,79	25,93
Doba [dny]	Láhev č. MM3				Průměr	Směr. odch.
	9	10	11	12		
0	514,16	514,16	514,16	514,16	514,16	0
2	540,52	533,73	580,09	547,86	550,55	20,52
6	398,35	387,8	409,82	411,45	401,86	11,04
9	544,43	536,07	544,98	512,42	534,48	15,26
14	536,66	497,48	524,27	486,34	511,19	23,28
17	586,45	562,8	560,68	580,85	572,7	12,88
22	525,85	487,37	530,03	524,54	516,95	8,32
27	535,14	519,38	507,42	444,87	501,7	39,55



Obr. 16. Průběh degradace PVA kulturou JK2 za použití organického pufru

Z dosažených výsledků a jim odpovídajících grafů můžeme vidět, že pro růst kultury JK2 v prostředí organického pufru je ze začátku lepší médium s nižší koncentrací (TRIS 0,005M), které má rychlejší náběh, ale po šesti dnech se zastaví a stagnuje, nebo mírně klesá. Co se však týče celé délky pokusu, ve výsledku se jeví lepší médium s vyšší koncentrací (TRIS 0,05M), v němž začíná kultura růst až po 10. dni kultivace. Z tohoto výsledku usuzujeme, že kultuře JK2 tolik nevádí prostředí s vyšší koncentrací organických látek, nicméně není pro ni tak vhodné, jako prostředí MM1. Z grafu (Obr. 15) pro stanovení rozpuštěného organického uhlíku není vidět výrazný pokles v jeho koncentraci. Avšak podíváme-li se na výsledky uvedené v tabulce (Tab. 11), zjistíme že u všech tří médií byl pokles koncentrace DOC, s ohledem na výchozí koncentrace, odpovídající poklesu koncentrace PVA.

Zajímavý je opět pokles koncentrace PVA, který nejprve nastal u média s nižší koncentrací (TRIS 0,005M), kde bylo již po šesti dnech rozloženo 54,4% PVA a od té doby koncentrace PVA jen pozvolna klesala až na výslednou hodnotu degradace 66,7% po 27 dnech. U média s vyšší koncentrací (TRIS 0,05M) byl pokles koncentrace PVA zpočátku pozvolný a nepravidelný a k výraznému poklesu došlo až mezi 10. a 15. dnem. Ve výsledku bylo u tohoto média dosaženo rozkladu PVA téměř se 100% účinností. Srovnávací médium MM1 se v tomto pokusu neukázalo jako vhodné, protože v něm nedošlo ani k zahájení rozkladu, pravděpodobně došlo k chybě v přípravě. Pro porovnání byla do grafů doplněna křivka degradace PVA a růstu kultury v médiu MM1 z pokusu 2.



Na základě získaných výsledků můžeme říci, že vyšší koncentrace organických látek kultuře JK2 jistým způsobem nevadí, spíše naopak vyhovují jak pro dlouhodobější růst kultury, tak i pro rozklad PVA.

## 11 VLIV MINERÁLNÍCH SOLÍ A TYPU KATIONTŮ NA RŮST DEGRADAČNÍCH KULTUR ZA POUŽITÍ TRYPTONU

V dalších částech práce byly zkoumány degradační kultury bakterií z pohledu jejich citlivosti ke zvýšeným koncentracím jiných minerálních solí než fosforečnanů. Současně byl při tom posuzován i vliv kationů, neboť jisté náznaky vlivu kationu naznačila DP M. Nedbálka [17].

Pro zkoumání vlivu koncentrace chloridů a typu kationtů na použité degradační kultury byla použita dvě média, se zvyšujícími se koncentracemi chloridu sodného a draselného, jelikož tyto soli jsou běžně přítomné v přírodě. Jako růstový substrát byl použit trypton v koncentraci  $3 \text{ g.l}^{-1}$ , jednotlivé soli byly přidávány v koncentracích od nejnižší po nejvyšší, jak je uvedeno v tabulce Tab. 13. Opět zde bylo použito minerální médium s fosfátovým pufrům MM3, tedy médium s nejnižší použitou koncentrací fosforečnanů, aby bylo možno porovnat různé vlivy na degradační kultury.

Tab. 13. Koncentrace sodných a draselných kationtů

Minerální médium	Koncentrace chloridů [ $\text{mmol.l}^{-1}$ ]	Minerální médium	Koncentrace chloridů [ $\text{mmol.l}^{-1}$ ]
<b>NaCl 1</b>	3,328	<b>KCl 1</b>	3,333
<b>NaCl 2</b>	6,657	<b>KCl 2</b>	6,667
<b>NaCl 3</b>	13,315	<b>KCl 3</b>	13,335
<b>NaCl 4</b>	26,631	<b>KCl 4</b>	26,671

### 11.1 Rozvržení pokusů

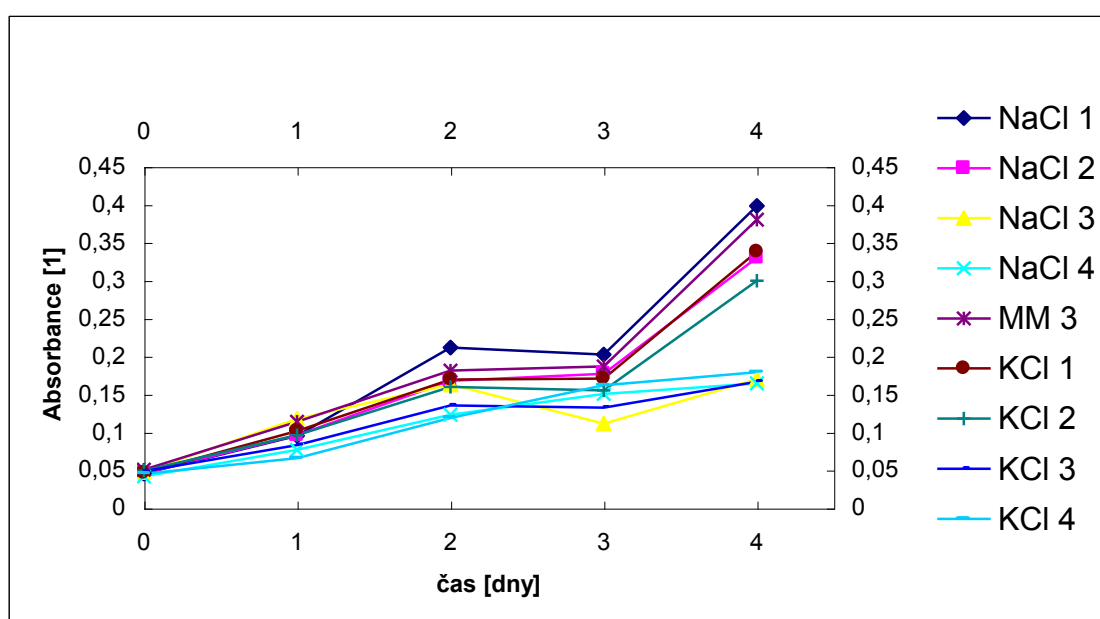
Všechny čtyři pokusy byly prováděny na mikrotitračních destičkách typu P ve sterilním prostředí. V rámci pokusu byly použity vždy čtyři média s různou koncentrací NaCl a čtyři s různou koncentrací KCl. Navíc bylo použito médium MM3, které sloužilo jako porovnávací. Růst byl sledován denně měřením absorbance jamek mikrotitrační destičky pomocí přístroje Tecan. Byl sledován růst všech čtyř degradačních kultur.

## 11.2 Rozvržení pokusu s kulturou OT2

Pokus byl prováděn dle výše uvedených podmínek. Výsledky testu pro kulturu OT2 jsou uvedeny v Tab. 14., těmito hodnotám odpovídá Obr. 17.

Tab. 14. Výsledky absorbancí při růstu OT2 na tryptonu (průměry z osmi měření)

Doba [dny]	NaCl 1	NaCl 2	NaCl 3	NaCl 4	MM 3	KCl 1	KCl 2	KCl 3	KCl 4
0	0,046	0,046	0,048	0,042	0,050	0,047	0,049	0,048	0,045
1	0,095	0,096	0,118	0,077	0,114	0,102	0,096	0,083	0,066
2	0,211	0,168	0,163	0,123	0,181	0,169	0,159	0,135	0,119
3	0,202	0,177	0,111	0,150	0,187	0,171	0,155	0,132	0,162
4	0,398	0,330	0,170	0,164	0,380	0,338	0,299	0,167	0,179



Obr. 17. Růstové křivky pro kulturu OT2 na tryptonu

## 11.3 Výsledky testu pro kulturu OT2 na tryptonu

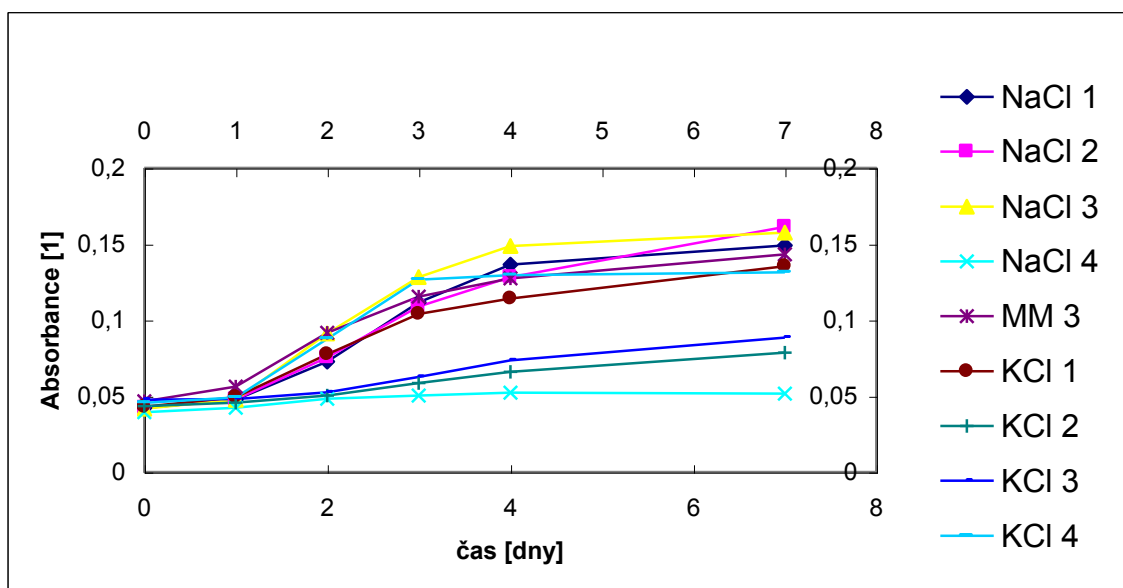
Test s kulturou OT2 probíhal 4 dny, z obrázku Obr. 17 je patrné, že na tryptonu roste kultura lépe v médiích obsahujících nejnižší přidané koncentrace NaCl či KCl a samozřejmě i v médiu MM3 s tryptonem. Můžeme tedy říct, že kultura OT2 je za přítomnosti vyšších koncentrací chloridů v růstu částečně zpomalena, přičemž rozdíl v působení chloridu sodného a draselného není příliš významný.

## 11.4 Rozvržení pokusu s kulturou OT3

Pokus byl prováděn dle podmínek uvedených v Kap. 11.1. Výsledky testu pro kulturu OT3 jsou uvedeny v Tab. 15, těmito hodnotám odpovídá Obr. 18.

Tab. 15. Výsledky absorbancí při růstu OT3 na tryptonu (průměry z osmi měření)

Doba [dny]	NaCl 1	NaCl 2	NaCl 3	NaCl 4	MM 3	KCl 1	KCl 2	KCl 3	KCl 4
0	0,042	0,042	0,042	0,039	0,047	0,043	0,043	0,047	0,046
1	0,048	0,048	0,048	0,042	0,056	0,049	0,046	0,048	0,049
2	0,073	0,075	0,091	0,048	0,092	0,077	0,050	0,052	0,088
3	0,112	0,109	0,128	0,050	0,115	0,104	0,059	0,062	0,127
4	0,136	0,128	0,149	0,052	0,127	0,114	0,066	0,074	0,129
5	0,149	0,161	0,158	0,052	0,143	0,135	0,079	0,089	0,131



Obr. 18. Růstové křivky pro kulturu OT3 na tryptonu

## 11.5 Výsledky testu pro kulturu OT3 na tryptonu

Test probíhal 7 dní, na obrázku Obr. 18 můžeme vidět, že kultuře OT3 pro růst vyhovují skoro všechna použitá média, kromě nejvyšší koncentrace NaCl 4 a draselných kationtů se středními koncentracemi KCl 2 a KCl 3. Z obrázku je patrné, že u média KCl 4,

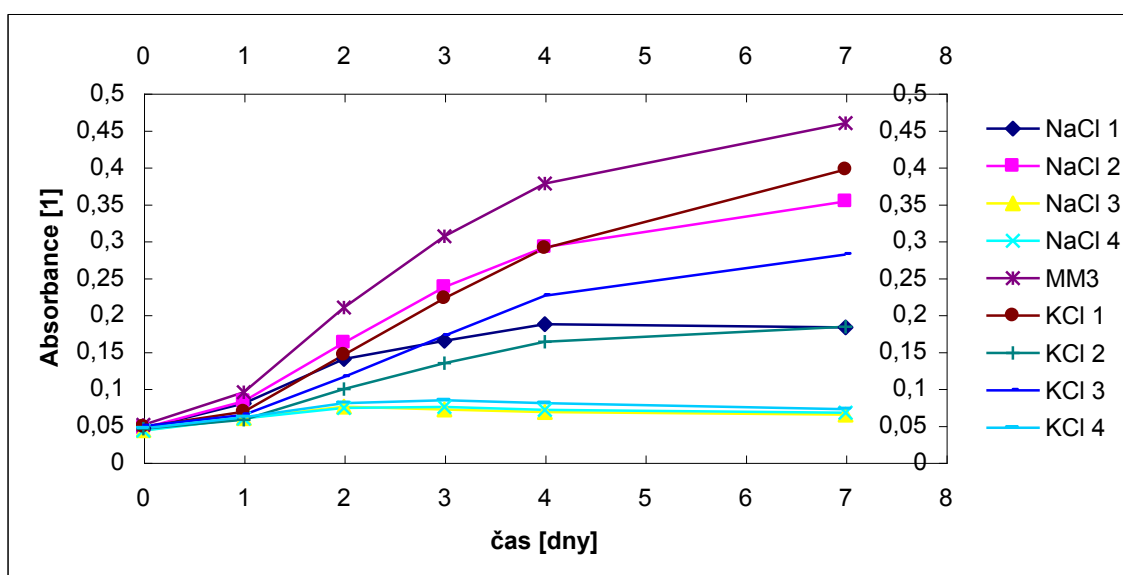
došlo k výraznému růstu, což je ale nelogické při výsledcích s médii KCl 2 a KCl 3, je tedy možné, že došlo ke kontaminaci média, která mohla absorpční ovlivnit.

## 11.6 Rozvržení pokusu s kulturou JK2

Pokus byl prováděn dle podmínek uvedených v Kap. 11.1. Výsledky testu pro kulturu JK2 jsou uvedeny v Tab. 16, těmito hodnotám odpovídá Obr. 19.

Tab. 16. Výsledky absorpční při růstu JK2 na tryptonu (průměry z osmi měření)

Doba [dny]	NaCl 1	NaCl 2	NaCl 3	NaCl 4	MM 3	KCl 1	KCl 2	KCl 3	KCl 4
0	0,046	0,046	0,043	0,043	0,051	0,048	0,046	0,049	0,046
1	0,080	0,083	0,059	0,059	0,095	0,069	0,057	0,064	0,061
2	0,14	0,162	0,076	0,074	0,209	0,145	0,099	0,116	0,080
3	0,164	0,237	0,071	0,075	0,306	0,222	0,134	0,171	0,084
4	0,187	0,292	0,068	0,071	0,378	0,290	0,163	0,226	0,080
5	0,183	0,353	0,064	0,067	0,459	0,397	0,184	0,282	0,072



Obr. 19. Růstové křivky pro kulturu JK2 na tryptonu

### 11.7 Výsledky testu pro kulturu JK2 na tryptonu

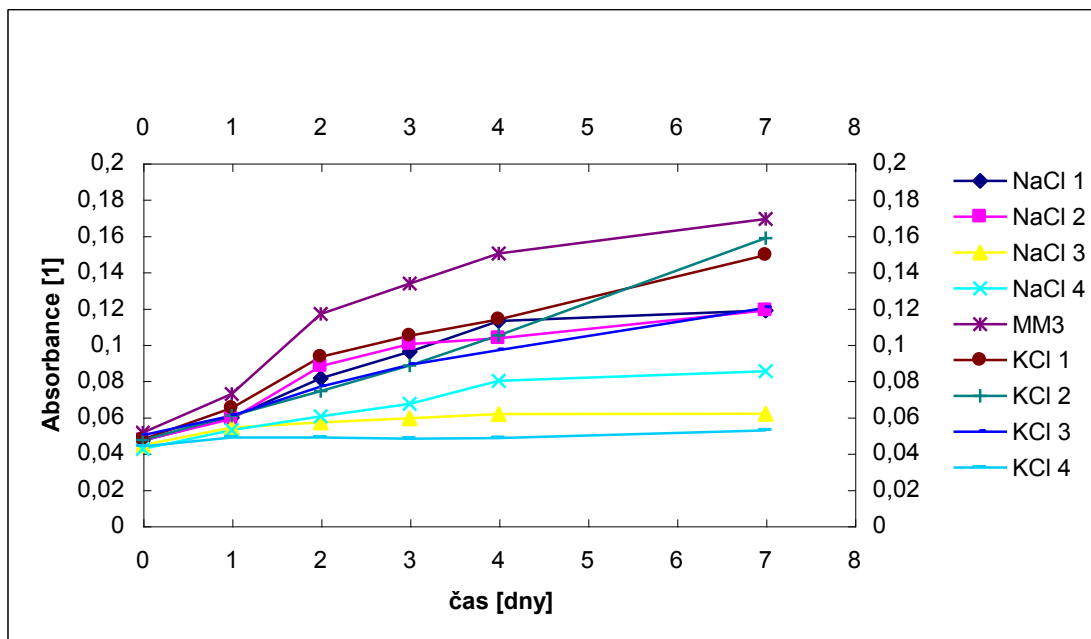
Test probíhal 7 dní. Z Obr. 19 jsou patrné výsledky, které nám říkají, že pro růst kultury je nejlepší médium MM3, dále jsou v pořadí opět nejdříve nízké koncentrace obou druhů chloridů. Je ale zajímavé, že nejnižší koncentrace NaCl 1 inhibuje v tomto případě růst kultury a NaCl 2 nikoliv. Důvod tohoto jevu nebylo možné vysvětlit a bylo tak rozhodnuto o opakování růstových testů, ale s použitím PVA jako substrátu.. V případech přidavků vyšších koncentrací solí jak sodných tak draselných je inhibice růstu kultury nezpochybnitelná.

### 11.8 Rozvržení pokusu s kulturou Ž1

Pokus byl prováděn dle podmínek uvedených v Kap. 11.1. Výsledky testu pro kulturu Ž1 jsou uvedeny v Tab. 17, těmto hodnotám odpovídá Obr. 20.

Tab. 17. Výsledky absorbancí při růstu Ž1 na tryptonu (průměry z osmi měření)

Doba [dny]	NaCl 1	NaCl 2	NaCl 3	NaCl 4	MM 3	KCl 1	KCl 2	KCl 3	KCl 4
0	0,047	0,047	0,045	0,042	0,051	0,048	0,047	0,05	0,044
1	0,060	0,059	0,054	0,053	0,073	0,065	0,061	0,061	0,048
2	0,081	0,088	0,057	0,060	0,117	0,093	0,074	0,077	0,049
3	0,096	0,100	0,059	0,067	0,134	0,105	0,088	0,089	0,048
4	0,113	0,103	0,061	0,080	0,150	0,114	0,105	0,097	0,048
5	0,119	0,119	0,062	0,085	0,169	0,149	0,159	0,120	0,053



Obr. 20. Růstové křivky pro kulturu Ž1 na tryptonu

## 11.9 Výsledky testu pro kulturu Ž1 na tryptonu

Test probíhal opět 7 dní, z obrázku Obr. 20 je opět viditelné, že nejlepší médium pro růst této kultury je MM3 s tryptonem. Růst kultury probíhá v médiích s nízkými koncentracemi použitých solí (1,2). V prostředích se zvýšenými koncentracemi - NaCl 3 a NaCl 4 a KCl 4 - je viditelné zpomalení či téměř zastavení růstu kultury.

Ve výsledku by se tedy dalo říci, že podle provedených růstových testů, všem kulturám vyhovují spíše média o nižší koncentraci chloridů, jak sodných tak draselných a při vyšších koncentracích těchto solí je růst kultury, až na malé výjimky (způsobené nejpravděpodobněji kontaminací média či chybou v přípravě), zpomalen či úplně zastaven.

## 12 VLIV MINERÁLNÍCH SOLÍ A TYPU KATIONTŮ NA RŮST DEGRADAČNÍCH KULTUR ZA POUŽITÍ PVA

Tento pokus byl proveden za stejných podmínek, jako je uvedeno v Kap. 11. Jediným rozdílem bylo použití polyvinylalkoholu v koncentraci  $1 \text{ g.l}^{-1}$ , jako růstového substrátu, namísto tryptonu. Polyvinylalkohol je sice dobrým zdrojem uhlíku pro růst degradačních kultur, ale zároveň se jedná o syntetický materiál s dlouhými řetězci, které neumožňují kulturám tak rychlý růst jako trypton, který je navíc komplexním zdrojem živin. Použití PVA jako substrátu však mohlo omezit zkreslování výsledků, neboť PVA představuje velmi specifický substrát využitelný jen naočkovanými degradačními kulturami a neumožňuje růst mikrobů jiných. Testy byly prováděny opět se všemi čtyřmi degradačními kulturami. Koncentrace minerálních médií s chloridem sodným a chloridem draselným zůstaly od předchozího pokusu nezměněny (viz. Tab. 13).

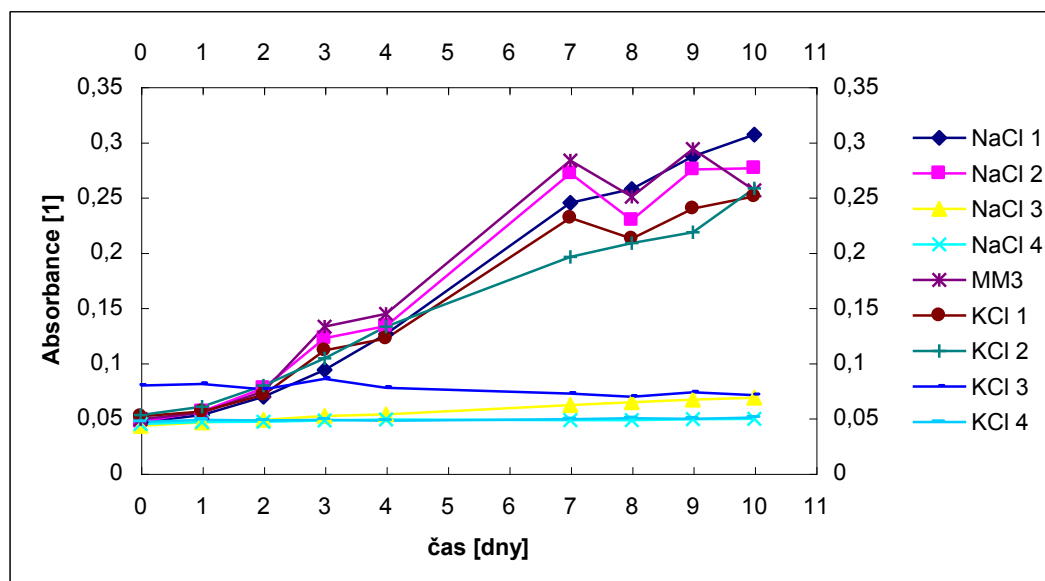
### 12.1 Rozvržení pokusu s kulturou OT2

Pokus byl prováděn za stejných podmínek jako v případě použití tryptonu (viz. Kap. 11.1). Výsledky testu pro kulturu OT2 jsou uvedeny v Tab. 18., těmto hodnotám odpovídá Obr. 21.

Tab. 18. Výsledky absorbancí při růstu OT2 na PVA (průměry z osmi měření)

Doba [dny]	NaCl 1	NaCl 2	NaCl 3	NaCl 4	MM 3	KCl 1	KCl 2	KCl 3	KCl 4
0	0,046	0,047	0,043	0,045	0,049	0,052	0,053	0,079	0,046
1	0,053	0,056	0,046	0,047	0,055	0,056	0,060	0,080	0,049
2	0,069	0,077	0,048	0,047	0,074	0,071	0,079	0,076	0,048
3	0,094	0,122	0,052	0,048	0,133	0,111	0,104	0,086	0,048
4	0,126	0,133	0,053	0,049	0,144	0,122	0,133	0,078	0,047
7	0,245	0,271	0,062	0,048	0,283	0,231	0,196	0,072	0,049
8	0,257	0,229	0,064	0,048	0,250	0,212	0,208	0,069	0,050
9	0,287	0,275	0,067	0,049	0,293	0,240	0,218	0,073	0,049
10	0,307	0,276	0,068	0,049	0,256	0,251	0,258	0,071	0,050





Obr. 21. Růstové křivky pro kulturu OT2 na PVA

## 12.2 Výsledky testu pro kulturu OT2 na PVA

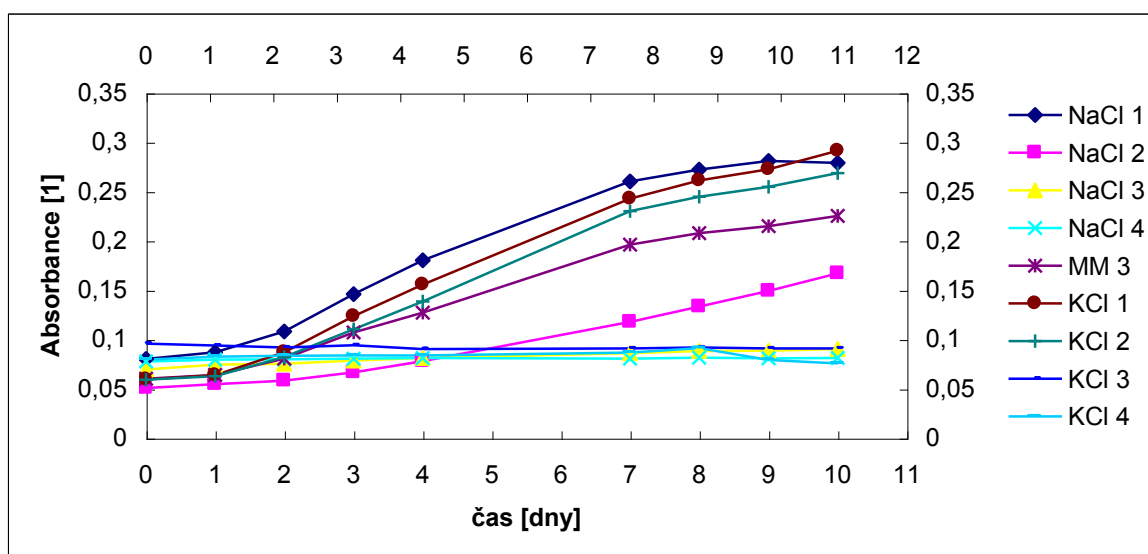
Test probíhal 10 dní, z obrázku Obr. 21 je dobře viditelné, jak jednotlivé koncentrace chloridů ovlivňují růst kultury. Je vidět, že vyšší koncentrace chloridů (jak NaCl tak KCl) inhibují růst kultury a ta roste lépe v prostředích s nižšími koncentracemi těchto chloridů. Jak je patrné z obrázku, délka těchto testů se poněkud lišila od těch s tryptonem, je tomu tak proto, že PVA neumožňuje kulturám tak rychlý růst jako je tomu v případě tryptonu.

## 12.3 Rozvržení pokusu s kulturou OT3

Pokus byl prováděn za stejných podmínek jako v případě použití tryptonu (viz. Kap. 11.1). Výsledky testu pro kulturu OT3 jsou uvedeny v Tab. 19, těmto hodnotám odpovídá Obr. 22.

Tab. 19. Výsledky absorbancí při růstu OT3 na PVA (průměry z osmi měření)

Doba [dny]	NaCl 1	NaCl 2	NaCl 3	NaCl 4	MM 3	KCl 1	KCl 2	KCl 3	KCl 4
0	0,080	0,051	0,069	0,078	0,060	0,060	0,059	0,096	0,079
1	0,087	0,055	0,074	0,079	0,064	0,064	0,063	0,094	0,082
2	0,108	0,058	0,076	0,080	0,081	0,087	0,082	0,092	0,083
3	0,146	0,067	0,079	0,081	0,107	0,124	0,110	0,094	0,084
4	0,180	0,078	0,081	0,081	0,127	0,156	0,139	0,090	0,084
7	0,260	0,118	0,086	0,080	0,196	0,243	0,230	0,091	0,087
8	0,272	0,133	0,088	0,082	0,208	0,261	0,245	0,092	0,091
9	0,281	0,149	0,089	0,081	0,215	0,273	0,255	0,091	0,079
10	0,279	0,167	0,090	0,081	0,225	0,292	0,269	0,091	0,076



Obr. 22. Růstové křivky pro kulturu OT3 na PVA

## 12.4 Výsledky testu pro kulturu OT3 na PVA

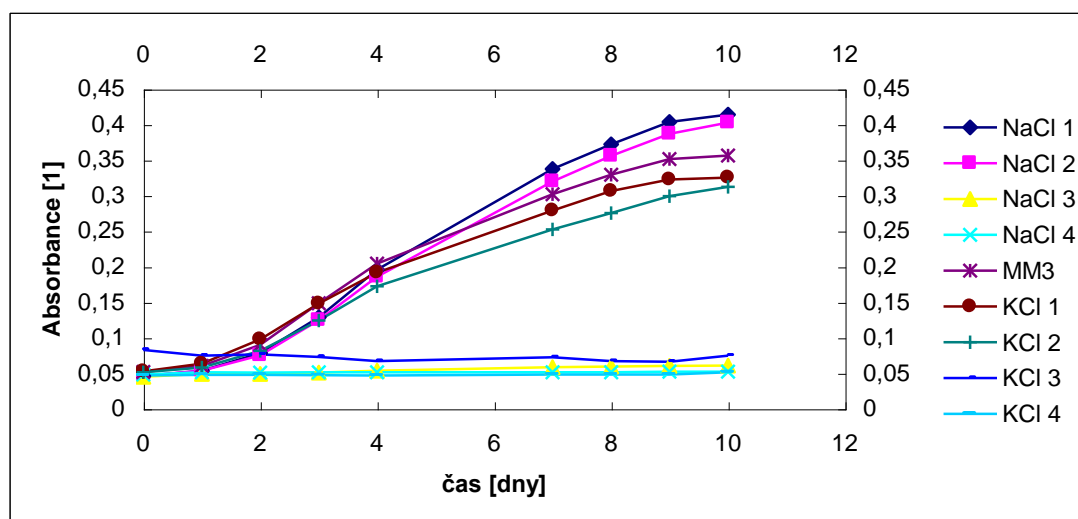
Test probíhal také 10 dní, na obrázku Obr. 22 jsou vidět obdobné výsledky jako u kultury OT2. Opět vyšší koncentrace jak sodných tak i draselných chloridů inhibují růst kultury a prostředí s nižšími koncentracemi těchto chloridů jí naopak vyhovuje lépe, co se týče růstu. Bylo tedy dosaženo obdobných výsledků jako v případě kultury OT2.

## 12.5 Rozvržení pokusu s kulturou JK2

Pokus byl prováděn za stejných podmínek jako v případě použití tryptonu (viz. Kap. 11.1). Výsledky testu pro kulturu JK2 jsou uvedeny v Tab. 20, těmito hodnotám odpovídá Obr. 23.

Tab. 20. Výsledky absorbancí při růstu JK2 na PVA (průměry z osmi měření)

Doba [dny]	NaCl 1	NaCl 2	NaCl 3	NaCl 4	MM 3	KCl 1	KCl 2	KCl 3	KCl 4
0	0,046	0,047	0,045	0,048	0,052	0,053	0,052	0,083	0,047
1	0,054	0,054	0,049	0,050	0,060	0,064	0,058	0,075	0,048
2	0,079	0,075	0,049	0,051	0,090	0,098	0,081	0,077	0,048
3	0,123	0,125	0,051	0,051	0,148	0,148	0,124	0,073	0,047
4	0,196	0,186	0,054	0,051	0,204	0,192	0,173	0,067	0,047
7	0,337	0,320	0,059	0,051	0,302	0,279	0,253	0,072	0,048
8	0,372	0,356	0,059	0,052	0,330	0,306	0,276	0,067	0,048
9	0,404	0,387	0,060	0,052	0,352	0,323	0,299	0,066	0,048
10	0,414	0,403	0,061	0,052	0,357	0,325	0,312	0,075	0,051



Obr. 23. Růstové křivky pro kulturu JK2 na PVA

## 12.6 Výsledky testu pro kulturu JK2 na PVA

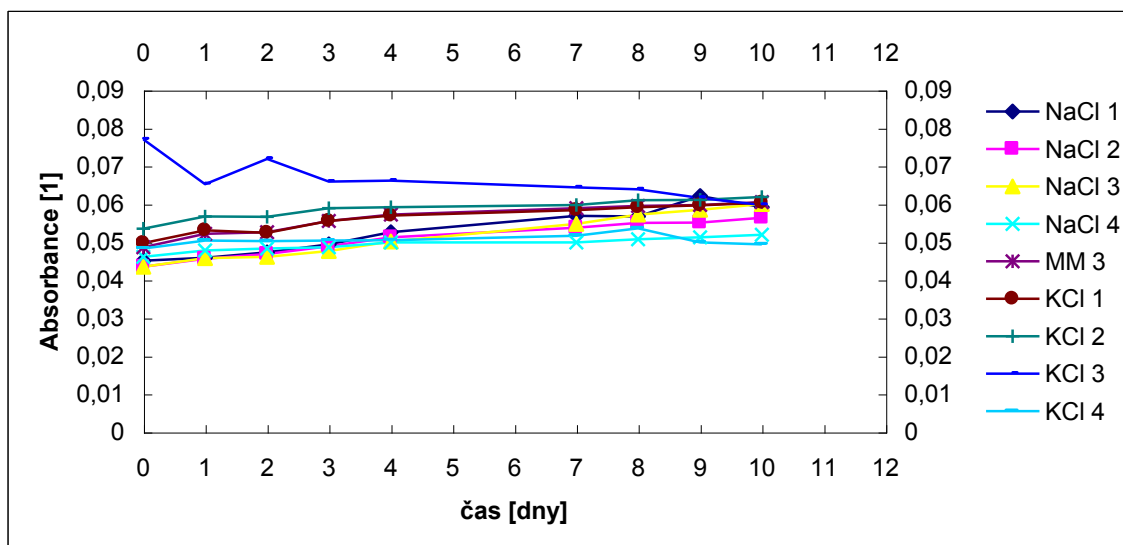
Test probíhal také 10 dní, na obrázku Obr. 23 je dobře viditelné, že kultuře JK2 pro růst vyhovují nižší koncentrace chloridů, zatímco vyšší koncentrace těchto chloridů kulturu inhibují v růstu.

## 12.7 Rozvržení pokusu s kulturou Ž1

Pokus byl prováděn za stejných podmínek jako v případě použití tryptonu (viz. Kap. 11.1). Výsledky testu pro kulturu Ž1 jsou uvedeny v Tab. 21, těmto hodnotám odpovídá Obr. 24.

Tab. 21. Výsledky absorbancí při růstu Ž1 na PVA (průměry z osmi měření)

Doba [dny]	NaCl 1	NaCl 2	NaCl 3	NaCl 4	MM 3	KCl 1	KCl 2	KCl 3	KCl 4
0	0,045	0,044	0,044	0,046	0,048	0,050	0,054	0,077	0,048
1	0,046	0,046	0,046	0,048	0,052	0,053	0,057	0,065	0,050
2	0,047	0,047	0,046	0,048	0,053	0,052	0,057	0,072	0,050
3	0,049	0,049	0,048	0,049	0,056	0,055	0,058	0,066	0,050
4	0,053	0,051	0,050	0,050	0,057	0,057	0,059	0,066	0,051
7	0,057	0,054	0,055	0,050	0,058	0,058	0,060	0,064	0,052
8	0,057	0,055	0,057	0,051	0,059	0,059	0,061	0,064	0,054
9	0,062	0,055	0,059	0,051	0,060	0,060	0,061	0,062	0,050
10	0,059	0,056	0,060	0,052	0,061	0,060	0,062	0,060	0,049



Obr. 24. Růstové křivky pro kulturu Ž1 na PVA

## 12.8 Výsledky testu pro kulturu Ž1 na PVA

Test probíhal opět v 10. denní intervalu, na obrázku Obr. 24 jsou uvedeny výsledky pokusu. Kultura Ž1 se už v předchozích testech ukázala jako pomalu rostoucí. Proto se výsledky ve všech médiích téměř shodují. Při bližším pohledu můžeme opět říci, že kulturu v růstu inhibují vyšší koncentrace chloridů a naopak nižší koncentrace chloridů ji vyhovují, tak jako v předchozích testech. Kultura Ž1 by potřebovala delší dobu na to, aby nám poskytla lepší výsledky. U média KCl3 pravděpodobně došlo ke kontaminaci nebo nějaké chybě v přípravě, chová se totiž odlišně od ostatních médií i u dalších kultur.

## **IV. ZÁVĚR**

## ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zabývala zkoumáním 4 degradačních kultur, které byly izolované na pracovišti Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí UTB ve Zlíně již v dřívějších letech. V první části práce jsem zjistila, že všechny čtyři degradační kultury byly molekulárně-biologickou identifikací určeny jako rod *Sphingomonas*. Toto stanovení bylo provedeno srovnáním sekvencí genu pro 16S rRNA, zároveň bylo zjištěno, že zkoumané kultury nenáleží žádnému známému druhu a až na kulturu OT3 jsou si v tomto genu identické.

V další části práce jsem provedla jednak testy v mikrotitračních destičkách a jednak lahvové degradační testy. Destičkové testy byly zaměřeny na sledování růstu všech čtyř kultur, jednak na tryptonu a poté také na polyvinylalkoholu (PVA) za přítomnosti různých koncentrací chloridů. Výsledky ukázaly, že kultury byly ve svém růstu výrazně zpomaleny či zastaveny, zejména jestliže byly do minerálního média přidány vyšší koncentrace (13,3–26,6 mmol.l<sup>-1</sup>) chloridů. Při přidání nižších koncentrací (3,3–6,6 mmol.l<sup>-1</sup>) chloridů nebylo pozorováno výrazné ovlivnění kultur v růstu. Závěrem lze tedy říci, že použitým kulturám brání v růstu vyšší koncentrace chloridů, jak sodných tak draselných a vhodnější jsou pro ně tedy média s nižším obsahem těchto chloridů.

Dalšími pokusy byly již zmíněné lahvové degradační testy, kde byly použity dvě média, jednak fosfátové minerální médium ve třech koncentracích a jednak médium s organickým TRIS pufrem ve dvou koncentracích. Tyto testy ukázaly, že se sledované kultury ve svých degradačních vlastnostech od sebe výrazně liší, byť patří ke stejnému rodu. Kultura OT2 rostla i degradovala PVA nejlépe v médiích MM1 (celková mineralizace 2945g.l<sup>-1</sup>) a MM3 (celková mineralizace 913 g.l<sup>-1</sup>), s degradací 80,3%, respektive 80,4% po 46. denní kultivaci. Po provedení testu v prostředí organických látek bylo zjištěno, že pro degradaci PVA i růst kultury je pro kulturu OT2 nejvhodnější MM3. Degradace v médiu (TRIS 0,005M), tedy s nižší koncentrací, byla 74% a u média s vyšší koncentrací (TRIS 0,05M) byla degradace sice pomalejší, ale po 29. denní kultivaci dospěla na 67,3%.

Kultura JK2 rostla opět nejlépe v prostředích médií MM1 a MM3, s degradací PVA 93%, respektive 100% již po 15. denní kultivaci. Za zmínku stojí říci, že u média MM1 nastala degradace 95% již za 6 dní. Na rozdíl od kultury OT2 se jako nejlepší médium, jak pro růst tak pro degradaci, ukázalo médium MM1. V prostředí organického pufru kultura JK2 rostla lépe v médiu (TRIS 0,005M), ale po 5. dni se projevila její stagnace, u média (TRIS

0,05M) začala růst až po 10. dni, ale za to byl její nárůst velký. Co se týče degradace PVA kulturou JK2, tak proběhla po 27. denní kultivaci z 66,7%, respektive se 100% účinností. Závěrem práce je tedy možné shrnout, že použitým degradačním kulturám nevadí v růstu nižší koncentrace fosforečnanů či chloridů, avšak jisté zvýšené koncentrace těchto solí je zpomalují či úplně zastavují, jednak v jejich růstu a také v degradaci. Je tedy zřejmé, že koncentrace těchto solí významným způsobem ovlivňují rozklad polyvinylalkoholu v životním prostředí.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] KAWAI F., HU X.: Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* **2009**, Vol. 84, p. 227-237
- [2] DUCHÁČEK V.: Polymery – výroba, vlastnosti, zpracování, použití. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, **2006**, ISBN 80-7080-617-6
- [3] MATSUMURA S. ET AL.: *Alcaligenes faecalis* KK314. **1994a**
- [4] MORI T. ET AL.: *Bacillus megaterium* BX1, a bacterial strain PN19. **1996a**
- [5] CHOI K. ET AL.: Polyvinyl Alcohol Degradation by *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 in Dyeing Wastewater. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, Vol. 14, No.5, p. 1009-1013
- [6] ZHANG Y.F. ET AL.: *Streptomyces venezuelae* GY1. **2006**
- [7] YAMATSU A. ET AL.: Isolation and characterization of a novel poly(vinyl alcohol)-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp. PVA3. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, Vol. 72, p. 804-811
- [8] HATANAKA T. ET AL.: Purification and Characterization of Poly(vinyl alcohol) Dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. 113P3. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, Vol. 59, No.10, p. 1813-1816
- [9] KIM B.C. ET AL.: Degradation of polyvinyl alcohol by *Sphingomonas* sp. SA3 and its symbiote. *J Ind Microbio. Biotechnol* **2003**, Vol. 30, p. 70-74
- [10] MATSUMURA S. ET AL.: Novel Poly(vinyl alcohol)-Degrading Enzyme and the Degradation Mechanism. *Macromolecules* **1999**, Vol. 32, p. 7753-7761
- [11] MATSUMURA S. ET AL.: *Biotechnol. Lett.* **1994**, Vol. 16, p. 1205-1210
- [12] HATANAKA T. ET AL.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, Vol. 59, p. 1229-1231
- [13] HATANAKA T. ET AL.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, Vol. 59, p. 1813-1816
- [14] LEE J.A., KIM M.N.: Isolation of new and potent poly(vinyl alcohol)-degrading strains and their degradation activity. *Polymer Degradation and Stability* **2003**, Vol. 81, p. 303-308
- [15] TOKIWA Y., KAWABATA G., JARERAT A.: A modified method for isolating poly(vinyl alcohol)-degrading bacteria and study of their degradation patterns. *Biotechnology Letters* **2001**, Vol. 23, p. 1937-1941

- [16] SAKAI K. ET AL.: Purification and Characterization of an Esterase Involved in Poly(vinyl alcohol) Degradation by *Pseudomonas vesicularis* PD. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, Vol. 62, No.10, p. 2000-2007
- [17] NEDBÁLEK M.: Vliv podmínek prostředí na biodegradaci polyvinylalkoholu. Diplomová práce, UTB Zlín, **2008**
- [18] VÁCLAVKOVÁ T.: Studium mikroorganismů významných při rozkladu polyvinylalkoholu. Disertační práce, UTB Zlín, **2009**
- [19] SUZUKI T. ET AL.: Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agric Biol Chem* **1973**, Vol. 37, p. 747-756
- [20] Dostupné on-line: [HTTP://WWW.MOLPORT.COM/BUY-chemicals/moleculelink/about-this-molecule/6168906?gclid=CLWM-9LysJ8CFRaazAodMHDP0A](http://www.molport.com/buy-chemicals/moleculelink/about-this-molecule/6168906?gclid=CLWM-9LysJ8CFRaazAodMHDP0A), 14.1.2010
- [21] HORÁKOVÁ M., LISCHKE P., GRUNWALD A.: Chemické a fyzikální metody analýzy vod. SNTL, Praha **1986**
- [22] RIEDL J.: Biodegradaci polyvinylalkoholu. Diplomová práce, UTB Zlín, **2004**
- [23] ZEMAN P.: Vliv přídavných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu. Diplomová práce, UTB Zlín, **2007**

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DP	Diplomová práce
PVA	Polyvinylalkohol
MM	Minerální médium
PVAc	Polyvinilacetát
ČOV	Čistírna odpadních vod
PQQ	Pyrolochinolinchinon
PVADH	Polyvinylalkoholdehydrogenáza
LB-agar	Luria Bertone agar
P(VA-coVAc)	Polymer s vinylalkoholovými a vinylacetátovými jednotkami
FR	Fyziologický roztok
TRIS	Tris(hydroxymethyl aminomethan)

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Chemická struktura polyvinylalkoholu [19].</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 2. Vznik acetaldehydu z vinylalkoholu [2].</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 3. Chemická struktura pyrrolochinolinchinonu [20].</i>	<i>26</i>
<i>Obr. 4. Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVA.</i>	<i>38</i>
<i>Obr. 5. Růstové křivky pro kulturu OT2 za použití fosfátového pufru.</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 6. Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) ve fosfátovém pufru pro kulturu OT2.</i>	<i>47</i>
<i>Obr. 7. Průběh degradace PVA kulturou OT2 za použití fosfátového pufru.</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 8. Růstové křivky pro kulturu JK2 za použití fosfátového pufru.</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 9. Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) ve fosfátovém pufru pro kulturu JK2.</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 10. Průběh degradace PVA kulturou JK2 za použití fosfátového pufru.</i>	<i>53</i>
<i>Obr. 11. Růstové křivky pro kulturu OT2 za použití organického pufru.</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 12. Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v organickém pufru pro kulturu OT2.</i>	<i>57</i>
<i>Obr. 13. Průběh degradace PVA kulturou OT2 za použití organického pufru.</i>	<i>59</i>
<i>Obr. 14. Růstové křivky pro kulturu JK2 za použití organického pufru.</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 15. Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v organickém pufru pro kulturu JK2.</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 16. Průběh degradace PVA kulturou JK2 za použití organického pufru.</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 17. Růstové křivky pro kulturu OT2 na tryptonu.</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 18. Růstové křivky pro kulturu OT3 na tryptonu.</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 19. Růstové křivky pro kulturu JK2 na tryptonu.</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 20. Růstové křivky pro kulturu Ž1 na tryptonu.</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 21. Růstové křivky pro kulturu OT2 na PVA.</i>	<i>73</i>
<i>Obr. 22. Růstové křivky pro kulturu OT3 na PVA.</i>	<i>74</i>
<i>Obr. 23. Růstové křivky pro kulturu JK2 na PVA.</i>	<i>75</i>
<i>Obr. 24. Růstové křivky pro kulturu Ž1 na PVA.</i>	<i>77</i>

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Přehled mikroorganismů využívajících PVA.....	14
Tab. 2 Přehled mikroorganismů a celková mineralizace minerálních médií.....	27
Tab. 3 Kalibrační závislost pro stanovení PVA.....	37
Tab. 4. Procentuální shoda námi používaných kultur s kulturami zapsanými v celosvětové databázi.....	40
Tab. 5. Hodnoty optické hustoty a koncentrace rozpuštěného organického uhlíku kulturou OT2 za použití fosfátového pufu.....	46
Tab. 6. Hodnoty koncentrace PVA [ $\text{mg.l}^{-1}$ ] pro kulturu OT2 za použití fosfátového pufu.....	47
Tab. 7. Hodnoty optické hustoty a koncentrace rozpuštěného organického uhlíku.....	50
Tab. 8. Hodnoty koncentrace PVA [ $\text{mg.l}^{-1}$ ] pro kulturu JK2 za použití fosfátového pufu.....	52
Tab. 9. Hodnoty optické hustoty a koncentrace rozpuštěného organického uhlíku kulturou OT2 za použití organického pufu.....	56
Tab. 10. Hodnoty koncentrace PVA [ $\text{mg.l}^{-1}$ ] pro kulturu OT2 za použití organického pufu.....	57
Tab. 11. Hodnoty optické hustoty a koncentrace rozpuštěného organického uhlíku kulturou JK2 za použití organického pufu.....	61
Tab. 12. Hodnoty koncentrace PVA [ $\text{mg.l}^{-1}$ ] pro kulturu JK2 za použití organického pufu.....	62
Tab. 13. Koncentrace sodných a draselných kationů.....	66
Tab. 14. Výsledky absorbancí při růstu OT2 na tryptonu (průměry z osmi měření).....	67
Tab. 15. Výsledky absorbancí při růstu OT3 na tryptonu (průměry z osmi měření).....	68
Tab. 16. Výsledky absorbancí při růstu JK2 na tryptonu (průměry z osmi měření).....	69
Tab. 17. Výsledky absorbancí při růstu Ž1 na tryptonu (průměry z osmi měření).....	70
Tab. 18. Výsledky absorbancí při růstu OT2 na PVA (průměry z osmi měření).....	72
Tab. 19. Výsledky absorbancí při růstu OT3 na PVA (průměry z osmi měření).....	74
Tab. 20. Výsledky absorbancí při růstu JK2 na PVA (průměry z osmi měření).....	75
Tab. 21. Výsledky absorbancí při růstu Ž1 na PVA (průměry z osmi měření).....	76