

# **Izolace a charakterizace mikrobiálních degradérů aromaticko-alifatických polyesterů**

Bc. Denisa Pavlíková

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Denisa Pavlíková**  
Osobní číslo: **T13364**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Izolace a charakterizace mikrobiálních degradérů  
aromaticko-alifatických polyesterů**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na dané téma.
2. Vyvíňte metodu izolace mikroorganismů degradující PBAT.
3. Izolované mikroorganismy identifikujte a charakterizujte.
4. Výsledky přehledně zpracujte do formy DP.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Články v odborných periodících dostupných v databázi WebOfScience, Scopus, případně dalších.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**15. května 2015**

Ve Zlíně dne 10. února 2015

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



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

Příjmení a jméno: Pavlíková Denisa

Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

## 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 .....14.5.2015.....

.....Pavlíková D. ....

<sup>21</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>22</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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>23</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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Práce se zaměřuje na kultivaci, identifikaci a charakterizaci mikrobiálních degradérů poly(butylen adipát-co-tereftalátu) (PBAT), přítomných ve svrchní části půdy vzorkované v okolí Zlína. Kultivace degradérů PBAT byla prováděna na tuhých živných médiích se submikročásticemi PBAT, degradéři byli určováni metodou prosvětlených zón. V rámci práce bylo využito molekulárně biologických metod. Izolace DNA byla prováděna pomocí metodiky s rozpouštědly chloroform/izoamylalkohol (24:1) a komerčních kitů. Jako nejvhodnější varianta polymerázové řetězové reakce (PCR) byla identifikována modifikace Touchdown protokolu, a použití specifických primerů pro aktinomycety S-C-Act-235 a S-C-Act-878. V rámci práce byly identifikovány tyto termofilní aktinomycety: *Thermobispora bispora*, *Actinomadura rubrobrunea* a *Thermomonospora sp.*. Dále byly identifikovány mikroorganismy vyskytující se v těsné blízkosti degradérů, příkladem jsou *Geobacillus sp.* a *Geobacillus thermoglucosidasius*. V práci byla využita metodika denaturační gelové gradientové elektroforézy (DGGE) pro charakterizaci směsné mikrobiální kultury vyskytující se v místě kolonií aktinomycet. V práci byla izolována bakterie s širokým teplotním růstovým optimem (25 °C až 58 °C) degradující PBAT. Práce dokazuje, že v reálné složce životního prostředí – půdě, je možné nalézt přirozeně se vyskytující degradéry PBAT, konkrétně termofilní aktinomycety.

Klíčová slova: PBAT, Aktinomycety, PCR, Izolace, Identifikace, Půda.

## **ABSTRACT**

Presented work aims on the cultivation, identification and characterization of microbial degraders of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) present in the upper layer of soils sampled in the vicinity of Zlín. Cultivation of PBAT degraders was carried out on solid nutrient media with submicro particles of PBAT, degraders were detected by clear-zone formation. Degraders were identified using molecular biological methods. Isolation of DNA was done by the method utilizing chloroform/ isoamylalcohol (24:1) and commercial isolation kits. A Touchdown protocol, using specific primers for actinomycetes S-C-Act 235 and S-C-Act 878 was evaluated as the most promising variant of polymerase chain reaction (PCR). Following thermophilic actinomycetes were identified: *Thermobispora bispora*, *Actinomadura rubrobrunea* and *Thermomonospora sp.*. Microorganisms occurring in close proximity of degraders were also identified, an example these are of *Geobacillus sp.* and *Geobacillus thermoglucosidasius*. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was also used to characterize the mixed microbial cultures occurring near the colonies of actinomycetes. A bacteria degrading PBAT with a wide temperature optimum of growth (25 °C to 58 °C) was also isolated. The work demonstrates that in the real components of the environment – i.e. soil, naturally occurring degraders of PBAT, thermophilic actinomycetes, can be found.

Keywords: PBAT, Actinomycetes, PCR, Isolation, Identification, Soil.

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu panu doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné připomínky a motivaci po celou dobu zpracovávání diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Janě Šeré za věcné připomínky, trpělivost a možnost konzultace po celou dobu práce. Také díky patří paní laborantce Bc. Veronice Kučabové za její vstřícnost a potřebné rady v rámci praktické částí této diplomové práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat mé rodině a příteli za podporu, kterou mi poskytli během celého studia.

## **Prohlášení**

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



## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
<b>1 BIODEGRADABILITA POLYMERŮ</b> .....	<b>14</b>
1.1 PROCES BIODEGRADACE.....	14
1.2 BIODEGRADACE AROMATICKO-ALIFATICKÝCH POLYESTERŮ .....	16
1.2.1 Biodegradace v půdě .....	19
<b>2 ZKOUMANÉ AROMATICKO -ALIFATICKÉ POLYESTERY</b> .....	<b>21</b>
2.1 POLY(BUTYLEN ADIPÁT-CO-TEREFTALÁT) .....	22
2.1.1 Vlastnosti.....	22
2.1.2 Zpracování.....	23
2.1.3 Využití.....	23
2.1.4 Směs škrobu a PBAT .....	24
<b>3 MIKROORGANISMY DEGRADUJÍCÍ AROMATICKO – ALIFATICKÉ POLYESTERY</b> .....	<b>25</b>
3.1 BAKTERIE.....	25
3.1.1 Bakteriální růst .....	26
3.2 MIKROORGANISMY V PŮDĚ .....	27
3.2.1 Aktinomycety .....	28
3.2.2 Média specializující se na růst aktinomycet.....	28
3.2.3 Studie biodegradace aromaticko-alifatického kopolyesteru mikroorganismy .....	29
<b>4 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE</b> .....	<b>31</b>
4.1 IZOLACE DNA.....	31
4.1.1 Vybrané metody izolace DNA .....	33
4.2 PCR .....	34
4.2.1 Hot start PCR .....	36
4.2.2 Nested PCR .....	36
4.2.3 Touchdown PCR .....	37
4.3 AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	37
4.4 DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (DGGE).....	39
4.4.1 Studie aktinomycet s využitím metody DGGE .....	41
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>43</b>
<b>5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>44</b>
<b>6 MATERIÁLY A METODIKA</b> .....	<b>45</b>
6.1 CHEMIKÁLIE.....	45
6.1.1 Primery .....	47
6.2 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	48
6.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A ŽIVNÝCH MÉDIÍ.....	49
6.3.1 Suspenzační roztok .....	49
6.3.2 Roztok stopových prvků .....	50
6.3.3 Minerální médium (MM) .....	50
6.3.4 Suspenze PBAT .....	52

6.3.5	Tuhá živná média .....	53
6.3.6	PBAT tekuté médium.....	55
6.3.7	Roztoky antibiotik .....	55
6.3.8	TWEEN pro výtřepy (0,1% v/v) .....	55
6.3.9	Psoralen .....	55
6.3.10	1x TAE pufr .....	56
6.4	VZORKY PŮDY .....	56
6.5	PRÁCE S MIKROORGANISMY PŘÍTOMNÝMI V PŮDĚ.....	56
6.6	MOLEKULÁRNÍ METODY VYUŽITÉ K IDENTIFIKACI MIKROORGANISMŮ .....	62
6.6.1	Lyze buněk .....	63
6.6.2	Polymerázová řetězová reakce .....	67
6.6.3	Agarózová elektroforéza .....	70
6.6.4	Purifikace DNA fragmentů .....	71
6.6.5	DGGE.....	72
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>77</b>
7.1	POČTY JEDNOTEK TVOŘÍCÍ KOLONIE (CFU) .....	77
7.2	KULTIVACE A IZOLACE ČISTÉ KULTURY .....	78
7.2.1	Shrnutí výsledků izolace čisté kultury termofilních aktinomycet.....	81
7.2.2	Kultivace mikroorganismů s širokým teplotním optimem růstu.....	82
7.3	OPTIMALIZACE METODY LYZE A PCR .....	85
7.3.1	Optimalizace lyze a PCR cyklu – použité primery FD1 a RD1 .....	85
7.3.2	Optimalizace lyze a PCR cyklu – použití kombinací primerů .....	95
7.3.3	Shrnutí výsledků optimalizace lyze a PCR pro termofilní aktinomycety .....	109
7.4	DGGE.....	111
7.5	CHARAKTERISTIKA IDENTIFIKOVANÝCH AKTINOMYCET DEGRADUJÍCÍCH PBAT.....	114
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>115</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>117</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>126</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>129</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>134</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>135</b>

## ÚVOD

Dnešní doba je dobou plastů – materiálů, v porovnání s ostatními surovinami jako je kov, sklo nebo dřevo levné, lehké a snadno zpracovatelné.

V celkovém měřítku v potřebě plastů dominují výrobky z polyetylénu. Zejména polyetylen s nízkou hustotou LDPE (low-density polyethylene) je nejrozšířenějším z nich. Právě díky jeho relativně dobrým mechanickým vlastnostem a ve srovnání s konkurenčními plasty na trhu, také kvůli jeho nízké ceně (BASTOLI, 2005, KYRIKOU 2007). Na druhou stranu, jde o polymer, který v půdě podléhá velmi pomalému rozkladu, ten může trvat až stovky let (GOHEEN, 2003).

Syntetické polymery byly v minulosti vyvíjeny i díky možnosti uplatnění těchto materiálů na výrobky s dlouhou životností, a to právě kvůli jejich odolnosti vůči všem formám degradace (CHIELLINI, 2003). Nicméně dnes z nich tento fakt vytváří nebezpečné plasty pro životní prostředí. Zvláště proto, že se zde se mohou hromadit a přetrvávat desítky až stovky let ve stavu, jenž může mít škodlivé účinky na živočichy a také na kvalitu prostředí v našem okolí.

Díky problému, kdy se plasty po ukončení své životnosti stávají odpadem, jsou vyvíjeny biologicky rozložitelné polymery, které podléhají řízené degradaci pomocí mikroorganismů. Například polyestery jako je kyselina polymléčná (PLA - polylactic acid) nebo polyhydroxybutyrát (PHB - polyhydroxybutyrate). Nicméně jejich zpracovatelské a materiálové vlastnosti pro průmysl nebyly dostačující. Proto byl v roce 1998 na trh uveden alifatico-aromatický kopolyester pod názvem Ecoflex<sup>®</sup>. Jako jeho hlavní využití můžeme uvést výrobu obalových materiálů či mulčovacích fólií používaných v zemědělství. (YAMAMOTO, 2005)

Plasty v tomto průmyslovém odvětví mají své místo a jejich využívání stále roste, právě díky možnosti navyšování rostlinné výroby zemědělců při jejich použití. Například již zmiňované mulčovací fólie umožňují bezproblémové pronikání vody, vzduchu i živin, čímž napomáhají rostlinám zdravěji růst. Dále účinně zabraňují růstu plevelů, což je dalším výhodným faktem pro lepší prospívání pěstovaných plodin. To vše vede k zvýšení rostlinné výroby - prodloužení výnosů, časnějších sklizní, menšího využívání herbicidů a pesticidů. (KYRIKOU, 2007)

Osud těchto výrobků z biodegradabilních plastů je často takový, že po skončení své funkce jsou zaorávány do půdy a zpracovávány biodegradačními pochody přímo v místě použití, tedy in – situ. Takto se tedy zvyšuje jejich obsah v prostředí a je nutné, aby bylo zajištěno jejich rozložení právě pomocí přítomného autochtonního mikrobiálního oživení dané půdy (KIJCHAVENGKUL, 2008).

Tato práce se proto zabývala izolací mikrobiálních degradérů daného kopolyesteru z půd odebraných v okolí Zlína. Dále pak za využití molekulárně biologických metod byli tito degradéři identifikováni, následně charakterizováni.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIODEGRADABILITA POLYMERŮ

Definovat biodegradabilní plasty se v minulosti snažilo více autorů. Ve studii provedené autory Kyrikou a kol. (2007) byly označeny za zcela biodegradabilní ty polymery, které lze pomocí mikroorganismů převést na oxid uhličitý, vodu, minerální látky a biomasu (v případě aerobního rozkladu). Přičemž polymery také musí splňovat podmínku, kdy nemají negativní účinek na životní prostředí (STLOUKAL, 2013).

Dle jiné studie provedené Rudnik a kol. (1998), můžeme za biodegradabilní plasty považovat ty, které lze za přítomnosti přirozeně se vyskytujících mikroorganismů, rozkládat na menší fragmenty s nižší molekulovou hmotností.

Nicméně také velmi důležitá pro pojem biodegradabilita a v dnešní době stále diskutována, je doba biodegradace, která by měla být přijatelná. Otázkou tedy je, co pojem přijatelnost označuje, protože z širšího hlediska jsou vlastně téměř všechny látky na bázi uhlíku rozložitelné (i tisíce let). To ale neznamená, že jsou automaticky považovány za biologicky degradovatelné. Dle mezinárodních standardů je biodegradabilita limitována dobou rozkladu, která je omezena (KYRIKOU, 2007; BASTIOLY, 2005).

Proces biodegradace je tedy hodnocen z více hledisek: časové náročnosti, vlivu na životní prostředí a v neposlední řadě také stupně rozkladu daného polymeru.

### 1.1 Proces biodegradace

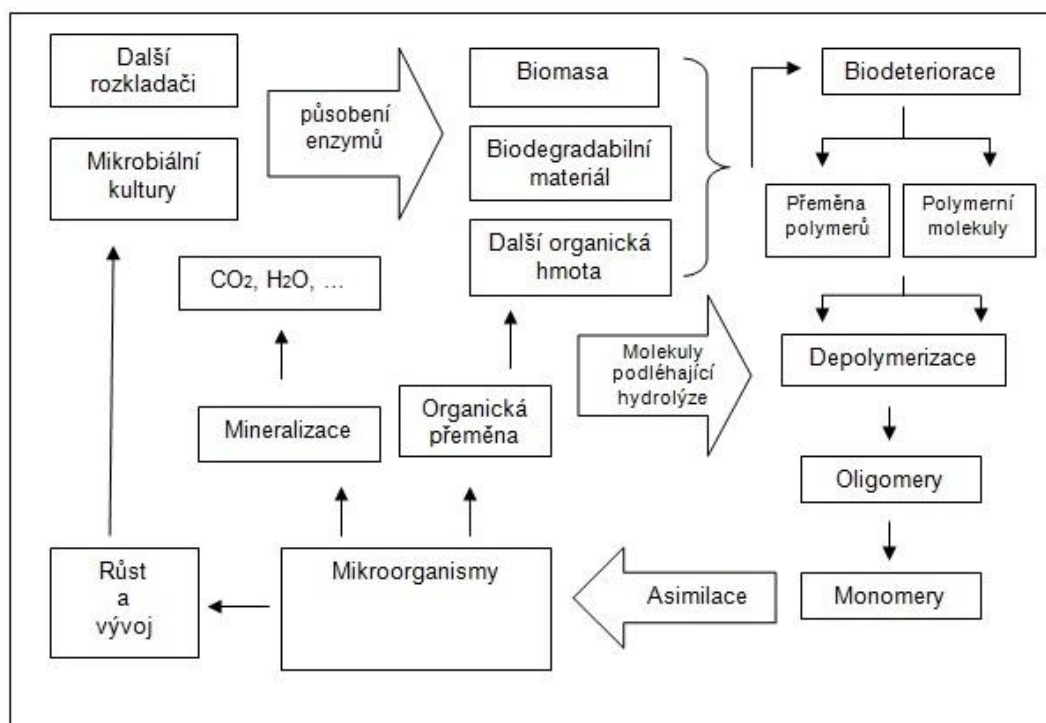
Samotný proces biodegradace je složitým systémem schematicky znázorněným na *Obr. 1*. Za jeho hlavní kroky můžeme považovat: biodeterioraci, depolymeraci, asimilaci a mineralizaci.

Biodeteriorace – proces při kterém působením mikroorganismů nebo abiotických faktorů dochází k narušení odolnosti a pevnosti materiálu. Například růstem mikroorganismů či fyzikálními procesy (sušení, chlazení a další) vznikají na povrchu trhliny nebo se materiál rozpadá na menší fragmenty. Tento krok je důležitý, protože dochází k odkrývání polymerních řetězců a může tedy nastat další krok – depolymerace. (ALLSOPP, 2004; STLOUKAL, 2013)

Depolymerace – jedná se o proces, při kterém jsou ve většině případů pomocí mikroorganismů vylučovány extracelulární enzymy<sup>1</sup> (molekuly polymeru jsou velké, často hydrofobní, tzn. mikroorganismy je nemohou zpracovávat uvnitř buňky). Procesu mohou také napomáhat abiotické faktory (světlo, vlhkost, teplo, pH,...). Dochází ke snižování molekulové hmotnosti meziproductů (ty jsou často také více rozpustné ve vodě než původní fragmenty). Vznikají oligomery a následně monomery (MUELLER, 2006).

Asimilace – takto vzniklé meziproducty již mohou pronikat přes membránu buňky mikroorganismů až do cytoplasmy, kde jsou zpracovávány na novou biomasu, energii nebo sekundární metabolity (LUCAS, 2008).

Mineralizace – díky metabolickým procesům daného mikroorganismu dochází k tvorbě konečných produktů, jako je H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> a biomasa (pro aerobní rozklad) (LUCAS, 2008).



Obr. 1: Schéma biodegradace polymerů (STLOUKAL, 2013).

<sup>1</sup> Extracelulární enzymy patří do skupiny hydrolázy – konkrétně lipázy a esterázy (MUELLER, 2006).

Mikroorganismy mají v procesu biodegradace hlavní roli. Nicméně nelze opomenout abiotické faktory, které mikrobiologickému rozkladu napomáhají. Uplatňují se hlavně v kroku biodeteriorace, převážně v počátku, kdy dochází k narušování povrchu. Jedná se o:

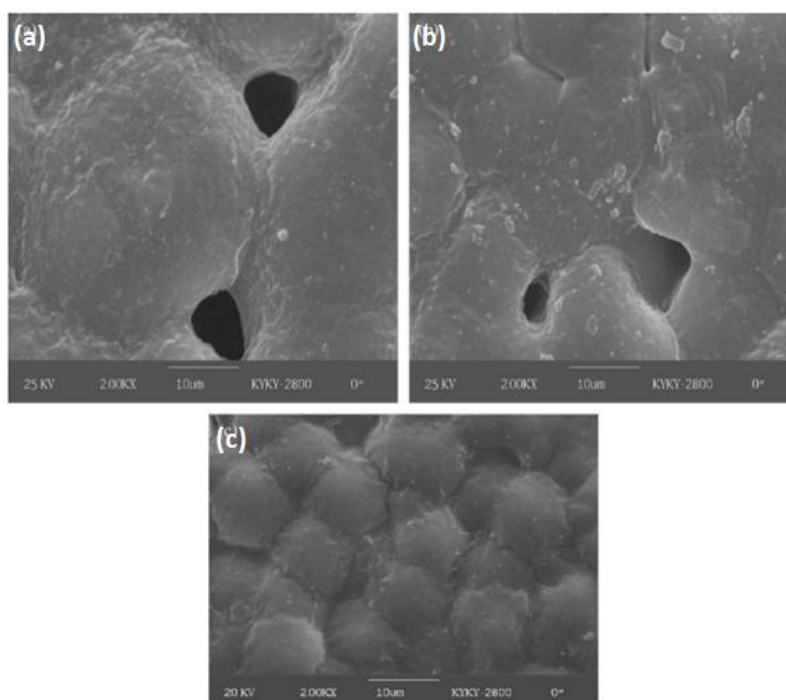
- mechanickou degradaci (komprese, napětí, aj.),
- fotodegradaci (pomocí UV záření a viditelného světla),
- teplotní degradace (vyšší teplota),
- chemická degradace (nejčastěji hydrolýza). (LUCAS, 2008)

## 1.2 Biodegradace aromaticko-alifatických polyesterů

Autoři Kyrikou a kol. (2007) vyhodnotili jako nejpříjemnější způsob likvidace biologicky rozložitelných polymerů kompostování. Nicméně v rámci mnoha studií zabývajících biodegradací PBAT (poly(butylene adipate-co-terephthalate)) jsou zkoumána i jiná prostředí biodegradace v závislosti na využití tohoto polymeru v praxi.

Studie Wang a kol. (2004) se zabývá biodegradací v prostředí aktivovaného kalu, kde byly porovnávány tři biologicky rozložitelné polymery - PHB (polyhydroxy butyrate), Ecoflex<sup>®</sup> a modifikovaný kopolymer PHBHHx (polyhydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate). Testované filmy polymerů o tloušťce 100  $\mu\text{m}$ . Kontrola biodegradace byla prováděna pomocí SEM (scanning electron microscopy) a stanovením molekulové hmotnosti pomocí HPLC (high performance liquid chromatography). Výsledkem studie je závěr, že biodegradace závisí na stupni krystalinity polymeru a vlastnostech povrchu filmu (drsnosti). Ecoflex<sup>®</sup> byl vyhodnocen jako nejpomaleji se rozkládající v prostředí aktivovaného kalu. Na *Obr. 2* lze vidět všechny filmy po proběhnutí experimentu, Ecoflex<sup>®</sup> vykazuje hladší povrch s menším počtem děr oproti dalším dvěma polymerům.





Obr. 2: Povrchová morfologie filmů zkoumaná SEM (2000x);  
(a) PHB, (b) PHBHHx, (c) Ecoflex<sup>®</sup>. (WANG, 2004)

Rozsáhlá studie Kijchavengkul a kol. (2008) se zabývá biodegradací PBAT, kdy se v první části věnuje laboratorním experimentům v prostředí kompostu. Na úvod byly simulovány podmínky, kterým je nejvyužívanější produkt z tohoto kopolymeru – mulčovací fólie, vystavován. Jednalo se o simulaci fotodegradčních procesů (dochází k síťování a štěpení polymerů), které byly zprostředkovány UV lampami (320–400 nm). Experimenty byly prováděny s fólií o tloušťce 35  $\mu\text{m}$ . Následná biodegradace v kompostu byla monitorována procentem mineralizace a SEM. Závěrem autoři uvádí, že biodegradace v kompostu byla ovlivněna tím, do jaké míry došlo u polymeru k síťování a štěpení vlivem fotodegradace – době a intenzitě vystavení fólií UV záření. Více zesíťované vzorky vykazovaly horší biodegradabilitu. (KIJCHAVENGGUL, 2008)

Studie provedená Kijchavengkul a kol. (2010) se zabývala biodegradací PBAT v prostředí běžného kompostu (listí, tráva, větve), potravinového kompostu (zbytky z restaurací, domácností) a dále hnoje (fekální odpad z chovu hospodářských zvířat). Byly použity filmy polymeru o tloušťce  $38,1 \pm 5,1 \mu\text{m}$ . Vyhodnocení bylo provedeno pomocí výsledků z průběhu hydrolýzy, úbytku molekulové hmotnosti a procentu celkové minerali-

zace. Závěrem autoři uvádí, že biodegradace PBAT je silně ovlivněna mikrobiálním oživením vyskytujícím se v daném prostředí. K nejúčinnějšímu rozkladu docházelo v prostředí hnoje, dále pak potravinového kompostu a nejméně účinný z testovaných prostředí byl rozklad v běžném kompostu. Dále autoři experimentem potvrzují obecné fakta, že alifatické části polymeru snadněji podléhají hydrolýze oproti aromatickým částem řetězce. (KIJCHAVENGKUL, 2010)

V následující tabulce (*Tab. 1*) jsou shrnuty výsledky studií biodegradace aromaticko-alifatického kopolyesteru v závislosti na odlišných prostředích.

*Tab. 1: Výsledky studií biodegradace aromaticko-alifatického polyesteru v závislosti na prostředí.*

<b>Studie</b>	<b>Prostředí biodegradace</b>	<b>Zkoumané polymery</b>	<b>Výsledky</b>
Wang a kol. (2004)	Aktivovaný kal	PHB, Ecoflex <sup>®</sup> , PHBHHx	Ecoflex <sup>®</sup> podléhal nejpomaleji procesu biodegradace.
Kijchavengkul a kol. (2008)	Kompost	PBAT	Biodegradace v kompostu probíhala - ovlivněno působením fotodegradace (více zesíťované vzorky vykazovaly horší biodegradabilitu).
Kijchavengkul a kol. (2010)	Kompost Potravinový kompost Hnůj	PBAT	K nejúčinnějšímu rozkladu docházelo v prostředí hnoje, dále pak potravinového kompostu a nejméně účinný z testovaných prostředí byl rozklad v běžném kompostu.

### 1.2.1 Biodegradace v půdě

Vzhledem k tomu, že zemědělská půda je primární potřeba sloužící k výrobě potravin pro lidstvo a hospodářská zvířata, je nutné, aby proces biodegradace plastů v samotné půdě neměl žádné negativní účinky v místě procesu. Půda je prostředí velmi rozmanité, může se značně lišit. To díky vlastnostem půdního prostředí jako je: teplota, vlhkost, pH, složení půdních plynů, chemickém složení (organické a anorganické sloučeniny), půdní struktura. Odlišnými kombinacemi těchto faktorů se vytváří různorodé prostředí, které mají vliv na autochtonní oživení půdy. Faktory prostředí lze také rozdělit do dvou hlavních kategorií: povrchové (pozemní) faktory a podzemních faktory (Tab. 2). Povrchové faktory lze sumarizovat jako působení klimatických podmínek, především však slunečního záření. Podzemní faktory zahrnují působení mikroorganismů v kombinaci s vlivem vlastností půdy. (BASTIOLY, 2005)

Tab. 2: Hlavní faktory působící v prostředí půdy a jejich možné dopady na degradaci polymeru. (BASTIOLY, 2005)

	Faktory prostředí	Přímý důsledek na polymer	Biotický efekt
Povrchové faktory	Sluneční záření (UV)	Fotodegradace (síťování) Snižování $M_w$ (štěpení)	Desinfekce - snížení počtu mikroorganismů na povrchu
	Sluneční záření (teplo)	Tání materiálu → Snížování $M_w$	Zvýšení aktivity termofilních mikroorganismů (MO)
	Srážky	Hydrolyza → Snížování $M_w$	Podpoření růstu MO
	Makroorganismy	Mechanické poškození povrchu	Exponování MO na větší plochu polymeru
Podzemní faktory	Půdní struktura	Abráze (mechanické poškození)	Množství půdního vzduchu a vody
	Teplota	Ovlivňuje abiotický rozklad	Vliv na složení populace MO → rychlost růstu MO → enzymovou aktivitu
	Vzduch	Abiotické oxidační reakce → Snížování $M_w$	Vliv na složení populace MO
	pH	Může vyvolat hydrolyzu → Snížování $M_w$	Vliv na složení populace MO → rychlost růstu MO → enzymovou aktivitu

Ve studii provedené Kijchavengkul a kol. v roce 2010, byla zkoumána biodegradabilita mulčovací fólie vyrobené z polymeru PBAT v tropické oblasti (Kostarika). Fólie byly sledovány 40 týdnů pomocí vizuálních změn, SEM, FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy), mechanických vlastností a zesíťování polymeru. Při experimentu byl zaznamenán biofilm na povrchu fólie po 20. týdnu experimentu. Na závěr autoři udávají, že mulčovací fólie vystavená slunečnímu svitu podléhá rozpadu po 8 týdnech, nicméně je odolnější při následné biodegradaci (vlivem zesíťování). (KIJCHAVENGGUL, 2010)

Řešením otázky, zda probíhá biodegradace PBAT v reálném půdním prostředí se zabývali Weng a kol. (2013). Testy probíhali u polymerů PBAT, PLA (polylactic acid), PBAT/PLA. Docházelo k pravidelnému odebrání vzorků, které byly umístěny 40 cm pod povrch půdy (Peking, Čína). Analýza vzorků byla prováděna pomocí SEM, diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC - differential scanning calorimetry) a infračervené spektrometrie (IR – infrared). Výsledky ukázali, že u PBAT dochází k biodegradaci i v reálném půdním prostředí. Nicméně existují různé mechanismy pro degradace PBAT a PLA.

## 2 ZKOUMANÉ AROMATICKO -ALIFATICKÉ POLYESTERY

Celková snaha vylepšovat mechanické vlastnosti u biodegradabilních polymerů, jako například pevnost v tahu u kyseliny polymléčná (PLA - polyactic acid) či polyhydroxybutyrátu (PHB - polyhydroxybutyrate), vedla až k vzniku zcela nového polymeru (GROSS, 2002).

Souhrnně, alifatické polymery jsou dobře biologicky rozložitelné, naproti tomu aromatické polymery mají dobré mechanické a zpracovatelské vlastnosti. Právě tato fakta dala v roce 1998 vzniknout kopolymeru s názvem Ecoflex<sup>®</sup>. Ten má vlastnosti obou výše uvedených skupin – tedy aromaticko-alifatický polyester. (WITT, 1996)

Na trhu je daný kopolymer možné nalézt pod více obchodními názvy uvedenými v Tab. 3, v závislosti na výrobci.

*Tab. 3: Obchodní názvy kopolymeru.  
(FUKUSHIMA, 2012)*

Název výrobku	Název firmy	Stát
Ecoflex <sup>®</sup>	BASF	Německo
PBAT	Ire Chemical	Jižní Korea
Eastar <sup>™</sup> Copolyester	Eastman Chemical	USA

Ve studii provedené Yamamoto a kol. (2005) zabývající se kopolymerem Ecoflex<sup>®</sup>, jsou jeho fyzikální vlastnosti srovnávány s LDPE (low-density polyethylene). Nízko hustotní polyetylen je brán jako srovnávací z hlediska jeho dobré odolnosti proti roztržení, dále dobré flexibilitě a také je odolný proti pronikání vlhkosti. Ecoflex<sup>®</sup> je tedy charakterizován ve srovnání s ním (Tab. 4), jako extrémně houževnatý proti roztržení, naproti tomu je méně odolný proti pronikání vody.

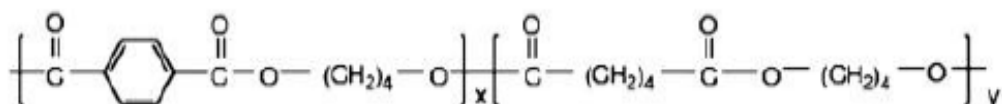
V práci provedené Gross a kol. (2002) je dále Ecoflex<sup>®</sup> srovnáván z hlediska fyzikálních vlastností i s dalšími biodegradabilními polymery (Tab. 4), jako jsou kyselina polymléčná a polyhydroxybutyrát.

Tab. 4: Fyzikální vlastnosti vybraných polymerů.  
(GROSS, 2002; YAMAMOTO, 2005)

Fyzikální veličiny	Vybrané polymery			
	PLA	PHB	Ecoflex <sup>®</sup>	LDPE
Bod tání [°C]	177-180	177	110-115	111
Mez pevnosti v tahu [MPa]	45	40	36	8-10
Protážení při přetržení [%]	3	6	820	15-600
Hustota [g·cm <sup>-3</sup> ]	1,21	1,25	1,25	0,992

## 2.1 Poly(butylen adipát-co-tereftalát)

Polyester známý pod zkratkou PBAT (poly (butylene adipate-co-terephthalate)). Jedná se o aromaticko-alifatický kopolymer na bázi kyseliny adipové, 1,4-butadiolu a dimethyltereftalátu. Struktura polymeru je složena z bloků x a y, schematicky znázorněných na Obr. 3, které jsou však v řetězci náhodně uspořádány (FUKUSHIMA, 2012).



Obr. 3: Schéma struktury PBAT. (FUKUSHIMA, 2012)

### 2.1.1 Vlastnosti

Vlastnosti polymeru jsou navrženy tak, aby splňovaly požadavky pro biologicky odbouratelné plasty a v ideálním případě, aby také vyhovovaly požadavkům pro dobrou technologickou zpracovatelnost.

Díky esterovým skupinám ve struktuře, které lze hydrolyticky štěpit, je daný polymer biodegradabilní. Dále pak možné větvení ve struktuře způsobuje výrazné prodloužení řetězce. Tím dochází ke zvýšení molekulární hmotnosti polymeru a v důsledku mohou být ovlivňovány zpracovatelské vlastnosti (YAMAMOTO, 2005).

Polymer splňuje evropskou normu EN 13432 pro kompostovatelné materiály, (tzn. doba degradace max. 180 dní, dále převedení 90 % organického uhlíku). (EN 13432, 2001)

Složení samotného polymeru je důležité z hlediska jeho výsledných vlastností, ty právě ovlivňuje poměr vstupních látek. Ve studii provedené Han a kol. (2009) bylo prokázáno, že například se zvyšujícím se obsahem kyseliny tereftalové, vůči ostatním složkám, dochází k výraznému snížení biodegradability vzniklého polymeru.

PBAT je také ve studiích označováno jako kompostovatelný materiál (RIEGER, 2012; KALE, 2007).

### 2.1.2 Zpracování

Studie Yamamoto a kol. (2005) uvádí, že zkoumaný aromaticko-alifatický kopolymer je možno zpracovávat běžnými technologiemi používanými pro LDPE (low-density polyethylene). Nejvhodnější metodou je vyfukování fólií, kdy není potřeba žádných speciálních úprav oproti technologii zpracování LDPE.

### 2.1.3 Využití

Aplikace zkoumaného kopolymeru se odvíjí od jeho zpracování, které je uvedeno výše. Fólie nebo filmy (tloušťka < 20  $\mu\text{m}$ , možno až 10  $\mu\text{m}$ ), kompostovatelné pytle na biologicky odpad, nátěry nebo laminace obalových materiálů na bázi škrobu. (YAMAMOTO, 2005)

Souhrnně:

- Zemědělství → mulčovací fólie, kompostovatelné pytle,
- Potravinářství → obalové materiály (kelímky, sáčky, boxy na jídlo).

Dále je PBAT možno využívat ve směsi s dalšími biodegradabilními polymery či plnivý. Je zde snaha o zvýšení biodegradability materiálu či o zlevňování výsledného produktu. Jednou z využívaných příměsí je škrob (YAMAMOTO, 2005).

#### 2.1.4 Směs škrobu a PBAT

Škrob je levná surovina, která je k dispozici ve velkém množství (YAMAMOTO, 2005). Výhodou je, že patří mezi materiály podléhající rychlé degradaci (SONG, 2009). Na druhou stranu se jedná o surovinu, která snadno absorbuje vodu (hydrofilní), což vede k omezenému použití.

Smíchání hydrofilního škrobu a hydrofobního polymeru PBAT umožní vznik nového výrobku s odlišnými vlastnostmi. Zvyšuje se biodegradabilita a snižuje absorpce vody materiálem (YAMAMOTO, 2005).

Škrob je charakterizován v technologickém procesu jako plnivo. Přičemž postup výroby takového materiálu podléhá patentům (NARAYAN, 2009). Základem je však použití anhydridu kyseliny maleinové, který se naváže na hlavní řetězec polymeru (v místě esterových vazeb), a pak na něj se dále navazuje termoplastický škrob. Ve studii Nayaka je uveden závěr, že tímto postupem je dosaženo vyšší biologické rozložitelnosti PBAT (NAYAK, 2010).

V diplomové práci provedené na Ústavu životního prostředí Univerzity Tomáše Bati v roce 2013 byla zkoumána biodegradace Ecoflexu<sup>®</sup> se škrobem v kompostu i půdě. Vyhodnocení biodegradace bylo prováděno pomocí plynové chromatografie, byla zaznamenávána produkce oxidu uhličitého a následně sledována závislost mineralizace uhlíku na čase. Na závěr práce bylo vyhodnoceno, že biodegradace u filmu Ecoflexu<sup>®</sup> se škrobem byla přibližně o 40 % vyšší oproti samotnému filmu Ecoflexu<sup>®</sup> (NOVÁKOVÁ, 2013).



### 3 MIKROORGANISMY DEGRADUJÍCÍ AROMATICKO – ALIFATICKÉ POLYESTERY

Jak již bylo řečeno v předcházejících kapitolách, biodegradace polymerů je přímo závislá na působení mikroorganismů. S ohledem na faktory prostředí biodegradace, musíme uvažovat přítomnost různorodých ba často i specifických mikroorganismů.

Studie provedená Gu a kol. (2003) sledovala vliv mikroorganismů na různorodé povrchy, které se mohou jevit jako substrát pro bakteriální adhezi či tvorbu biofilmu. Část práce je také věnována náchylnosti k tvorbě biofilmů na povrchu polymerů (polyimidů, poly- $\beta$ -hydroxybutyrátu, polyetylen glykolu) ve vlhkém prostředí. Růst mikroorganismů byl sledován pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Autoři vyvozují obecný závěr, kdy polymer může být brán jako potenciální substrát pro heterofylní mikroorganismy.

#### **Metoda prosvětlených zón**

Studie Shah a kol. (2008) uvádí mnoho metod pro vyhodnocení biodegradace polymerů. Jednou z nich je i semi-kvantitativní metoda, nazývaná metodou prosvětlených zón. Jedná se o jednoduchou metodu, kdy je v tenké vrstvě agaru je polymer rozdispergován ve formě velmi jemných částic v rámci syntetického média (dochází k zakalení agaru dle koncentrace polymeru). Po zaočkování tohoto média inokulem a následné kultivaci, dochází v případě biodegradace k vytvoření jasných zón (prosvětlených) v okolí vykultivovaných kolonií. Což vede autory k závěru, že organismy jsou alespoň schopné depolymerizovat polymer. Lze takto tedy rozeznat a následně izolovat mikroorganismy zodpovědné za biodegradaci dalšími metodami.

#### **3.1 Bakterie**

Bakterie jsou řazeny mezi prokaryontní organismy. Nachází se v různorodém prostředí, od běžného po extrémní. Jsou také charakterizovány jako jedny z nejčastějších a všudypřítomných organismů na Zemi. Základní dělení je na gram pozitivní a gram negativní bakterie dle typu jejich buněčné stěny. Obvykle bakteriální buňky neexistují samostatně, shlukují se do agregátů z více buněk, označovány jako bakteriální kolonie. Obecně

je jejich výskyt nejčastější v půdě, vodě a na površích materiálů. Kdy například, jeden gram půdy může obsahovat až  $10^{10}$  CFU bakterií (MAIER, 2000).

Bakterie jsou studovány v souvislosti s koloběhem prvků v půdě, také jako původci chorob a organismy zajišťující biogeochemické procesy. Využití těchto mikroorganismů je rozmanité, od produkce antibiotik, přes bioremediaci až po zpracování biorozložitelné části odpadu (MAIER, 2000).

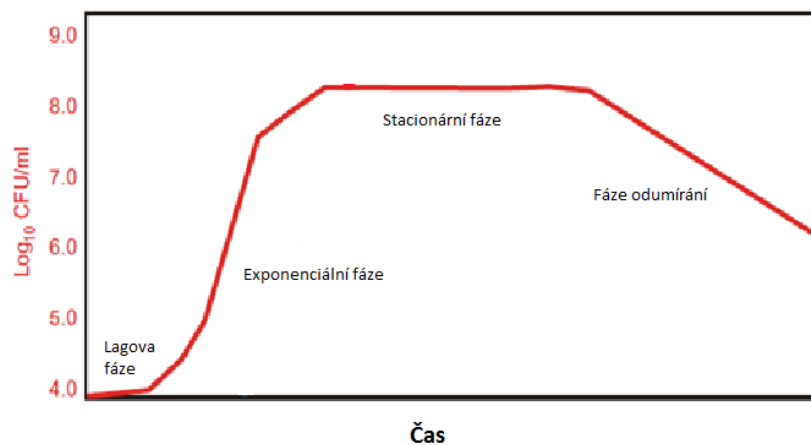
### 3.1.1 Bakteriální růst

Při laboratorních postupech s bakteriální kulturou je nutno sledovat její růst a dle něj přizpůsobit metodiku kultivace. Obecně je v tomto každá bakteriální kultura ve své podstatě specifická.

Bakteriální růst lze rozdělit do několika odlišných fází, které lze obecně odvodit od standardní růstové křivky vyobrazené na *Obr. 4*. Tyto fáze se nazývají lagová fáze, exponenciální fáze, stacionární fáze a fáze odumírání.

- Lagová fáze - inokulum umístěno na čerstvé médium, před růstem a dělením buňky musí dojít k její fyziologické adaptaci, vytváření enzymů a syntéza proteinů, trvá od několika minut až po hodiny.
- Exponenciální fáze – zvyšování rychlosti buněčného dělení, intenzivní množení bakterií, populace dosahuje exponenciálního růstu.
- Stacionární fáze - zpomalování rychlost množení buněk, až do stádia rovnováhy kde se počet buněk zhruba nemění.
- Fáze odumírání - vyčerpání živného média, hromadí metabolity buňky, převyšuje počet odumřelých buněk nad počtem buněk vzniklých.

(MAIER, 2000, PEPPER, 2015)



Obr. 4: Obecná růstová křivka bakterií. (PEPPER, 2015)

### 3.2 Mikroorganismy v půdě

Svrchní vrstva půdy je hojně osídlena populacemi bakterií, hub, řas a prvoků. Obecně můžeme říci, že největší zastoupení zde mají právě bakterie. Dnes také mikroorganismy cíleně zavádíme do půdy, kde mohou sloužit jako biodegradační faktor (MAIER, 2000).

#### Bakterie

Výskyt bakterií v půdě závisí především na půdní vlhkosti a teplotě. Mnohdy existují za nepříznivých podmínek. Pro jejich následnou kultivaci v laboratorních podmínkách to znamená, že mohou vyžadovat specifické podmínky kultivace (pokud by nebyly splněny, bakterie by byly životaschopné, ne však kultivovatelné). Předpokládá se, že 99 % bakterií z půdy zatím není možno kultivovat (MAIER, 2000). Nicméně jedná se pouze o předpoklad, obecně nebyl proveden dostatek studií na toto téma.

U bakterií počet CFU na jeden gram půdy může dosahovat až  $10^8$  (někdy může překročit i  $10^{10}$ ). V nenasycené zóně převládají počtem aerobní bakterie, obvykle o dva nebo tři řády nad anaerobními bakteriemi. Obecné odhady udávají, že ve svrchní část půdy se může vyskytovat až 10 000 jednotlivých druhů bakterií (PEPPER, 2015).

### 3.2.1 Aktinomycety

Mezi bakteriální oživení půdy patří také aktinomycety. Jedná se o prokaryontní organismy, blíže grampozitivní bakterie s vysokým procentuálním obsahem nukleových bází guanin a cytosin ve své DNA. Nicméně morfologicky se podobají houbám. Některé z aktinomycet jsou totiž schopny vytvářet větvená vlákna podobná myceliím mykotických organismů (na rozdíl od nich však postrádají diferencované jádro, mitochondrie, a chitin v buněčné stěně) (SCHARFEN ML., 2010). Jejich vlákna mohou být odlišena od houbových hyf na základní velikosti, kdy vlákna aktinomycet jsou průměrné délky 2  $\mu\text{m}$ , ve srovnání s průměrnou délkou 10 až 15  $\mu\text{m}$  u houbových hyf (MAIER, 2000).

Dále i citlivost na antibakteriální antibiotika je nevyhnutelně zařazuje mezi bakterie. Všeobecně jsou ale odolné proti antifungálním antibiotikům. Aktinomycety mohou být striktně aerobní, jiné chemoautotrofní (SEDLÁČEK, 2007).

Často se vyskytují v půdě za vyššího pH, vyšší teploty či nedostatku vody. Populace aktinomycet je početně zpravidla o jeden nebo dva řády menší než celková bakteriální populace. Jeden z charakteristických rysů této skupiny bakterií je, že jsou schopny využít velkou škálu přírodně se vyskytujících substrátů, nacházejících se v půdě. Zvláště některé ze špatně odbouratelných polymerních látek pocházejících z hmyzu a rostlin, jako je chitin, celulóza a hemicelulóza (MAIER, 2000).

#### **Taxonomie aktinomycet**

- Doména: *Bacteria*
- Kmen: *Actinobacteria*
- Třída: *Actinobacteria*
- Řád: *Actinomycetales* (SEDLÁČEK, 2007)

### 3.2.2 Média specializující se na růst aktinomycet

Výrobce HiMedia<sup>®</sup> dodává na trh agar vhodný pro izolaci aktinomycet z půd a vod, pod komerčním názvem Actinomycete Isolation Agar. Ten obsahuje kaseinát sodný a aminokyselinu asparagin jako zdroj dusíku, sírany jako zdroj síry a kovových iontů, dále pak pufrační složku hydrogenfosforečnan draselný. Agar na petriho miskách je možné využít

k dlouhodobému uskladnění kultur po jejich růstu. Naproti tomu při využití metody šikmého agaru je doporučováno udržování kultur po kratší dobu. (HIMEDIA<sup>®</sup>, 2011)

Ve studii provedené Tendler a Burkholder (1961) zabývající se izolací termofilních aktinomycet z kompostu jsou uvedena média pro kultivaci. Jako univerzální byla použita média Ia a VII. Autoři médium Ia využívali více jako udržovací médium, naproti tomu médiu VII bylo vyhodnoceno jako syntetické médium, na němž jsou termofilní aktinomycety schopny růstu. Autoři dále uvádí, že do příslušného média VII přidávali jako zdroj dusíku aminokyselinu asparagin.

Další studie Amner a kol. (1989) se zabývá termofilními aktinomycetami, konkrétně *Saccharomonospora viridis* izolovanými z kompostu a ze sena za pomoci média nazývaného R8. Toto médium bylo porovnáváno s dalšími v řadě. Výsledkem práce bylo zjištění vysoké efektivnosti média R8, kdy termofilní aktinomycety na něm nejvíce vytvářely kolonie. Dále byla na tomto médiu řešena kontaminace termofilními bacily, a to za pomoci přídavku 0,2% hydrolyzátu kaseinu (dojde k zlepšení růstu *Saccharomonospora viridis*, což autoři považují za selektivní účinek).

### 3.2.3 Studie biodegradace aromaticko-alifatického kopolyesteru mikroorganismy

Studie provedená Kleeberg a kol. (1998) se věnuje biodegradaci aromaticko-alifatického kopolyesteru syntetizovaného z 1,4-butandiolu, kyseliny adipové a kyseliny tereftalové (fólie o tloušťce 100  $\mu\text{m}$ ). Experiment byl proveden v prostředí kompostu (55 °C), s následnou izolací 20 mikrobiálních kmenů degradující daný polymer. Značná část těchto mikroorganismů byla charakterizována jako termofilní aktinomycety, z toho dva kmeny vykazovaly asi dvacetkrát vyšší míru degradace oproti ostatním kmenům. Následně byly tyto dva blíže identifikovány jako druh *Thermomonospora fusca*. Tyto kmeny vykazovaly nárůst bílého vzdušného mycelia. Na závěr autoři uvádí, že izolace provedená výluhem z kompostu a izolace provedená přímo z biofilmu na povrchu polymeru, neposkytla žádné významné rozdíly v izolovaných kmenech degradérů.

Ve studii provedené Witt a kol. (2001) byla zkoumána biologická rozložitelnost Ecoflexu<sup>®</sup> (film o tloušťce 50  $\mu\text{m}$ ). Byl použit termofilní druh aktinomycet, *Thermomonospora fusca*, izolovaný z prostředí kompostu a zakoupený z německé sbírky mikroorganismů (DSMZ, Braunschweig, Německo). Biodegradace polymeru byla provedena v defi-

novaném syntetickém médiu při 55 °C. Po 22 dnech experimentu došlo k více než 99,9% depolymeraci polymeru. Na závěr autoři uvádí, že *T. fusca* má vysoký potenciál pro depolymeraci Ecoflexu<sup>®</sup> v reálném kompostu, nicméně tento kmen dále pravděpodobně není schopný snadno metabolizovat vzniklé monomery a oligomery.

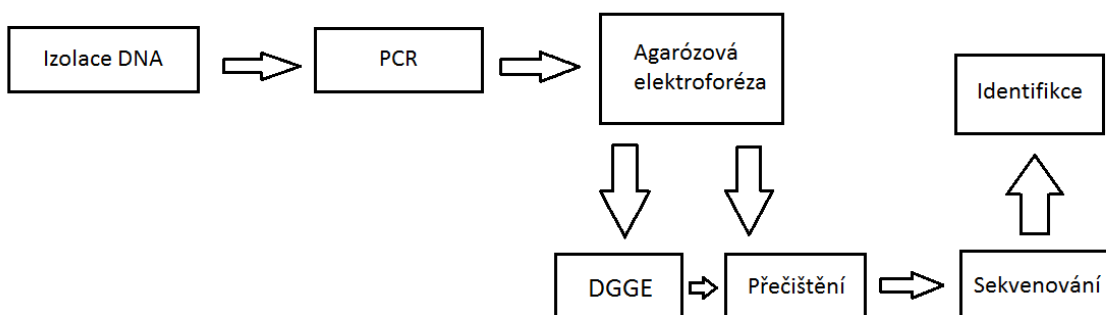
Ve studii Marten a kol. (2005) se autoři zabývali vlivem enzymů na biodegradaci polymerů, konkrétně i na kopolymer Ecoflex<sup>®</sup>. Termofilní aktinomycety (*Thermomonospora fusca*) působily na kopolymer pomocí extracelulárních enzymů ze skupiny hydroláz. Dále mikroorganismy *Pseudomonas sp.* působily konkrétně extracelulárním enzymem lipázou. Závěrem tedy autoři uváděli, že biodegradace probíhá i v půdním prostředí zahrnutém do experimentu. Převážná část studie byla věnována místům působení daných enzymů na strukturu kopolymeru.

Jako důvod vzniku studie uvádí Trinht Tan a kol. (2008) fakt, že dřívější práce zabývající se biodegradací aromaticko-alifatického kopolyesteru (v této studii Ecoflex<sup>®</sup>) probíhaly v kompostu za zvýšené teploty (závěry výše uvedené - *Thermomonospora fusca*, enzymaticky pomocí hydroláz). Autoři se tedy zabývali otázkou, zda biodegradace kopolymeru probíhá i za mírnějších (mezofilních) podmínek, které jsou bližší pro mírné pásmo životního prostředí. Byly studovány houby, kvasinky a bakterie, které se vyskytují běžně v půdě. Použité kultury mikroorganismů (20 kultur) byly zakoupeny ze sbírky American Type Culture Collection (ATCC, Spojené státy). Pokus probíhal 21 dní při 30 °C, kdy byly následně zhodnoceny viditelné změny na filmu kopolymeru. K biodegradaci pomocí bakterií došlo v přítomnosti kmene - *Bacillus subtilis*. Biodegradace pomocí hub a kvasinek proběhla v přítomnosti kmene - *Aspergillus niger*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium pinophilum*. Autoři studováním mechanismu degradace došli k závěru, že při působení mezofilních organismů dochází k pomalejší degradaci kopolymeru, nicméně nemohou s jistotou říci, zda dochází k jinému mechanismu (potvrdili však rychlejší degradaci vzniklých oligomerů).

## 4 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

S příchodem metod molekulární biologie nastala možnost vytvářet řadu nových metodik pro posuzování mikroorganismů v životním prostředí (MAIER, 2002). Konkrétně pro doménu bakterie je nejvýznamnější metoda sekvenace genu 16S rRNA. Tento gen je přítomen ve všech prokaryotech, je zde využito faktu, že v dané části jsou přítomny konzervativní úseky tohoto genu. Právě díky těmto stálým částem je možné navrhovat příslušné primery. Ty následně pomohou amplifikovat proměnlivé úseky genu. To vše za pomoci metody polymerázové řetězové reakce (PCR). Následnou sekvenací amplifikovaného fragmentu DNA určíme příbuznost zkoumaných prokaryot (KOMŽÁK, 2010).

Samotné metodě PCR předchází několik kroků, převážně sloužících k získání kvalitní a čisté DNA. Dále na PCR navazují metody, bez nich by se samotná PCR neobešla. Na Obr. 5 jsou jednotlivé kroky vyobrazeny formou schématu.



Obr. 5: Schéma jednotlivých kroků molekulárních metod.

### 4.1 Izolace DNA

Za první krok metod molekulární biologie se považuje izolace DNA. Například u izolace bakteriální kultury je potřeba ji oddělit od růstového média (ŠMARDA, 2010). Jedná se o velmi významnou část metodiky molekulární biologie, právě na kvalitě izolovaného materiálu často závisí úspěšnost dalších kroků. Samotnou izolaci lze rozdělit do dílčích částí: lyze buněk a purifikace DNA.

### **Lyze buněk**

Cílem je uvolnění DNA z bakteriální buňky, kdy musí dojít k lyzi (rozpuštění) buněčné stěny. Provedení závisí na typu buňky.

Bakteriální buňky se obvykle rozrušují enzymem lysozymem spolu s detergenty na solubilizaci cytoplazmatické membrány (např. dodecylsírán sodný) či chelatačními činidly (např. EDTA), která vážou dvoumocné kationty (destabilizace vnější bakteriální membrány). Často se také používají mechanické způsoby rozrušení buněčné stěny (pomocí například skleněných kuliček za intenzivního třepání) v kombinaci s přidavkem výše uvedených činidel (ŠMARDA, 2010).

### **Purifikace DNA**

Po provedení lyze buňky se v roztoku nachází degradační činidla spolu s vnitrobuněčnými složkami (DNA, RNA, proteiny, lipidy, sacharidy, uhlovodíky a případně další látky).

Právě velké množství nadbytečných příměsí může způsobovat problém při dalších krocích (např. u PCR). Přítomné enzymy mohou degradovat nukleonové kyseliny, dále se proteiny mohou vázat na DNA. Proto je nezbytná purifikace DNA. Tu je možno provést více způsoby, například:

- Extrakce směsí fenol-chloroform (odstranění proteinů),
- Srážení alkoholem (nukleonové kyseliny převedeny z velkého objemu do malého),
- Pomocí chromatografie (zachycení nukleových kyseliny na nosiči s následným vymytím). (ŠMARDA, 2010)

Takto izolovaná DNA je připravena k dalšímu zpracování metodami molekulární biologie. V následujícím textu jsou vybrány metody izolace DNA, které byly použity v této práci.

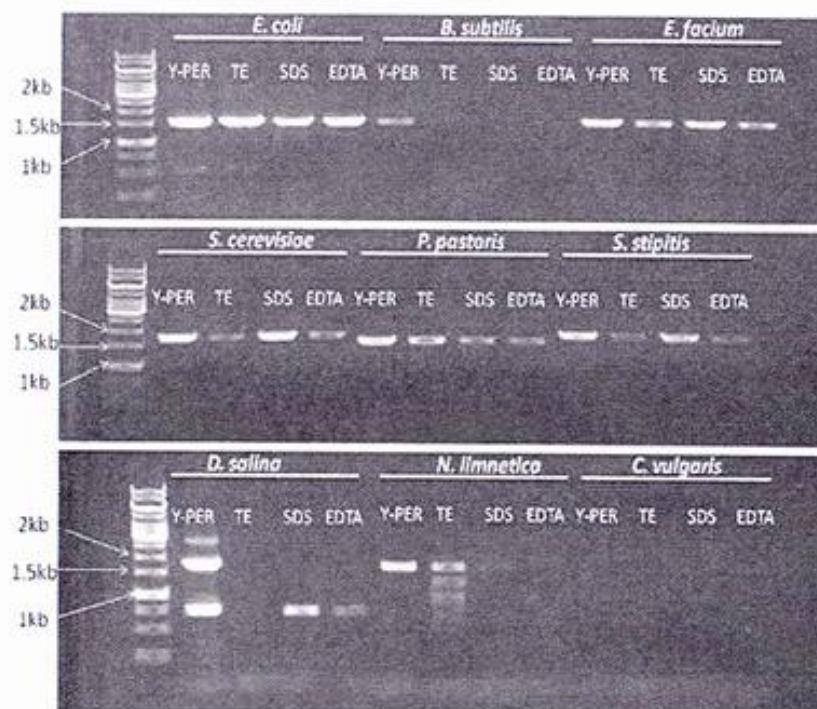


#### 4.1.1 Vybrané metody izolace DNA

Ve studii provedené Ruiz-Barbara a kol. (2005) bylo izolováno malé množství DNA bakterií a kvasinek, pro účely následné PCR reakce. Autoři použili směs sterilní deionizované vody a chloroformu/izoamylalkoholu (24:1). V posledním kroku, byla využita chlazená centrifugace při otáčkách 16 000g po dobu 5 min při 4 °C. Následně byla odebrána horní vodná vrstva, která obsahovala templátovou DNA, následně použitou pro PCR reakci.

V práci provedené na Ústavu životního prostředí Univerzity Tomáše Bati v roce 2013 byl k izolaci DNA půdních mikroorganismů použit komerčně dodávaný kit - Power Soil™ DNA Isolation Kit od firmy MO-BIO. Tento kit obsahuje rozbíjecí zkumavky s pufrem chránícím nukleové kyseliny před degradací, dále se zde používá anionický tenzid SDS spolu s dalšími činidly k lyzi buněčné stěny. Využívá se zde tedy mechanické a chemické denaturace. Dále jsou přítomny činidla k vysrážení kontaminantů z roztoku. Čistá DNA se po přidavku vysoce koncentrovaného solného roztoku naváže na křemičitou membránu. Posledním krokem před samotnou elucí DNA je promývání roztokem s přidavkem etanolu. Takto získaná DNA je připravena pro PCR reakci (MARTÍNKOVÁ, 2013). Výrobce kitu uvádí, že je vhodný pro grampozitivní i gramnegativní bakterie (tzn. i pro aktinomycety) a plísně. Kit je vhodný pro vzorky životního prostředí se zvýšeným obsahem huminových kyselin (MO BIO, 2014).

Ve studii provedené Packeiser a kol. (2013) bylo srovnáváno nové komerčně dostupné extrakční činidlo Y-PER s již známými a pro izolaci DNA běžně používanými extrakčními činidly (SDS, EDTA, Tris/EDTA = TE). Při použití Y-PER byla použita teplota 98 °C po dobu 5 minut a následné zvortexování směsi. Nicméně bylo autory doporučeno následné ředění supernatantu PCR vodou – 1:5 až 1:20. Z výsledků PCR reakce a následné agarózové elektroforézy uvedených na *Obr. 6* je vidět, že pro izolaci *B. subtilis* a *N. limnetico* je výhodné využít Y-PER a ani u ostatních mikroorganismů nevykazoval špatné výsledky.



Obr. 6: Porovnání Y-PER s běžně používanými činidly na devíti různých mikroorganismech po podrobení izolované DNA reakci PCR (PACKEISER, 2013).

## 4.2 PCR

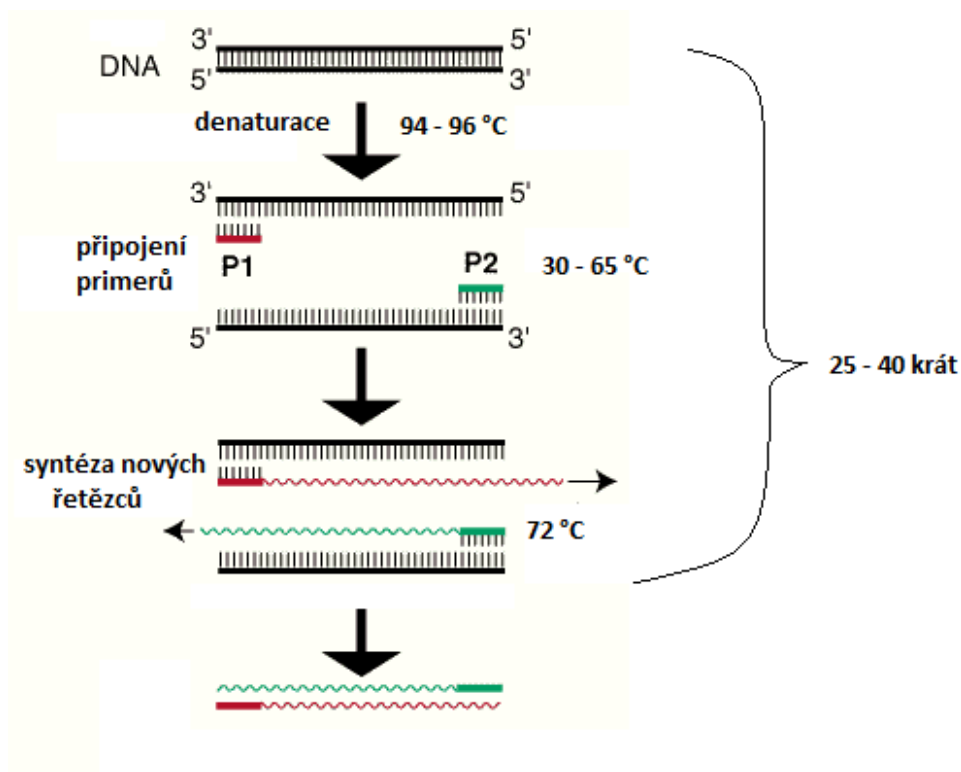
Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda sloužící k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*. Princip je založen na replikaci nukleonových kyselin, kdy se cyklicky opakuje enzymová syntéza nových řetězců vybraného úseků DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Daný úsek je vymezen připojením dvou vybraných primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují k sobě. Metoda poskytuje až  $10^6$  násobné pomnožení během 2 – 3 hodin. Tato metoda se také vyznačuje svou vysokou citlivostí, kdy je možné zjistit přítomnost velmi malé množství nukleonové kyseliny ve vzorku, teoreticky jedné jediné molekuly DNA. Velmi důležité je použít neporušený úsek DNA (který chceme amplifikovat). (RUMML, 2002; ŠMARDKA, 2010)

Samotný proces amplifikace se skládá z tří kroků, znázorněných schematicky na Obr. 7. Kroky probíhají v závislosti na teplotě reakční směsi (MEYER, 2005).

**Denaturace** – rozrušení dvouřetězcové molekuly DNA (vznik dvou samostatných řetězců), teplota: 94 – 96 °C dle použité DNA-polymerázy.

Připojení primerů – *annealing*, teplota: 30 – 65 °C → dle použitých primerů, literatura doporučuje vždy provést optimalizaci pro danou PCR. Dochází k nasedání primerů na komplementární místa oddělených řetězců DNA.

Syntéza nových řetězců – *extensit*, teplota: 65 až 75 °C (72 °C se považuje za optimální). Prodloužení primerů, uplatňuje se zde enzym DNA-polymeráza, ten prodlužuje pomocí přítomných nukleotidů nově vznikající řetězec (RUML, 2002; ŠMARDÁ, 2010).



Obr. 7: Schematické vyobrazení PCR reakce. (MEYER, 2005)

Správně fungující metoda PCR potřebuje vhodně zvolené zastoupení komponentů v reakční směsi, která se připravuje ještě pře započítáním amplifikace. Potřebné komponenty jsou:

- *DNA* → nazývaná obecně templátová. Jedná se o DNA, která pro nás slouží jako výchozí (celá, část či jen sekvence) pro následnou PCR reakci.
- *DNA-polymeráza* → enzym sloužící k syntéze nového řetězce DNA. Prodlužuje pomocí nukleotidů navázaný primer. Díky ní vzniká celistvá komplementární DNA.

- *Primery* → oligonukleotidy (každý asi 20 nukleotidů) komplementární k 3' koncovým sekvencím řetězce templátové DNA. Používají se dva do páru při amplifikaci, jeden nazýváme Forward primer a druhý Reverse primer dle místa navázání na řetězce výchozí DNA.
- *dNTP* → deoxinukleotid trifosfát, směs obsahující čtyři nukleotidy (Adenin, Cytosin, Thymin, Guanin), které jsou stavebními kameny nově vznikající řetězce DNA.
- *Pufř* → roztok zajišťující stabilní pH, důležité pro maximální enzymovou aktivitu DNA-polymerázy.
- *Ionty hořčíku* → plní funkci kofaktoru k DNA-polymeráze. Do reakční směsi jsou přidávány ve formě chloridu hořečnatého  $MgCl_2$ .
- *Voda* → jedná se o vodu v PCR kvalitě, redestilovanou vodu. (RUML, 2002; ŠMARDA, 2010; STEPHENSON, 2012)

#### 4.2.1 Hot start PCR

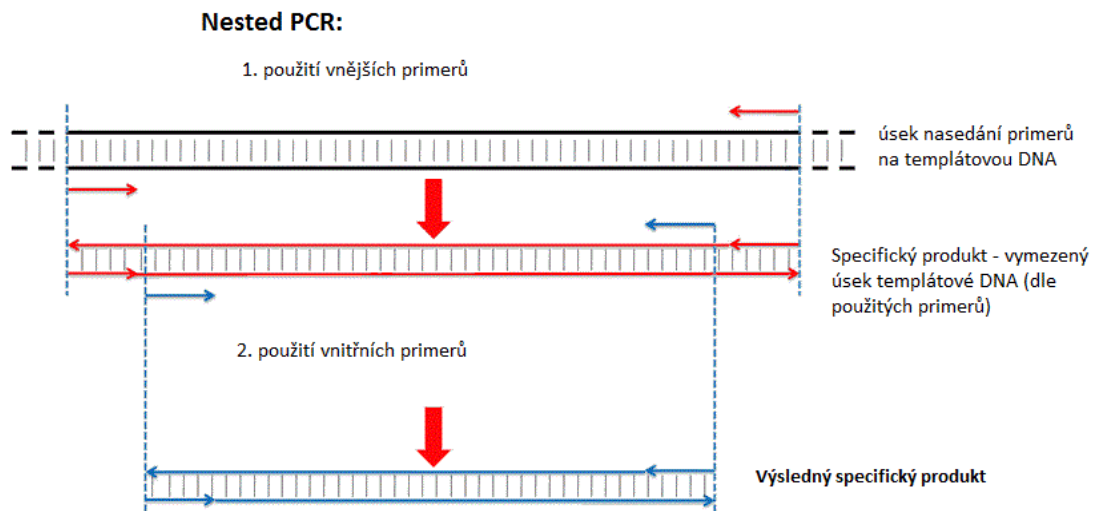
Jedná se o optimalizaci PCR metody. Je zde potlačena reaktivita alespoň jednoho z reaktantů v PCR směsi. A to právě do doby než se teplota v prvním cyklu dostane nad annealingovou teplotu primerů. Pokud by se tak nestalo, může docházet k nespecifickému nasedání primerů a vzniku dimerů (spárováním dvou primerů navzájem). (ROUX, 2009)

Je možné také použít komplex DNA-polymerázy s její specifickou termolabilní protilátkou. Díky přítomnosti protilátky nedojde k aktivaci enzymu až do doby, kdy vysoká teplota inaktivuje protilátku. Ve výsledku tedy nastane nejdříve annealing a následně se aktivuje DNA-polymeráza (ROUX, 2009).

#### 4.2.2 Nested PCR

Jedná se o odstupňovanou PCR neboli PCR využívajících vnějších a vnitřních primerů (*Obr. 8*). Tato optimalizace PCR metody zvyšuje její citlivost, umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA. Při obvyklém postupu se nested PCR provádí ve dvou krocích. V prvním kroku je použita sada vnějších primerů. Vzniká specifický produkt, který je následně převeden do nové mikrozkušavky. V druhém kroku je použita sada vnitřních primerů, které jsou vhodné právě pro vnitřní část specifického produktu z prvního kroku. Po dokončení celé nested PCR se výsledný specifický produkt detekuje elektroforé-

zou. Přenos produktu z první reakce do druhé umožní výhodu nařazení případných inhibitorů, nicméně je zde také negativum, možnost nové kontaminace. (ŠMARDA, 2010)



Obr. 8: Průběh nested PCR (Molecular and Cell Biology, 2015).

### 4.2.3 Touchdown PCR

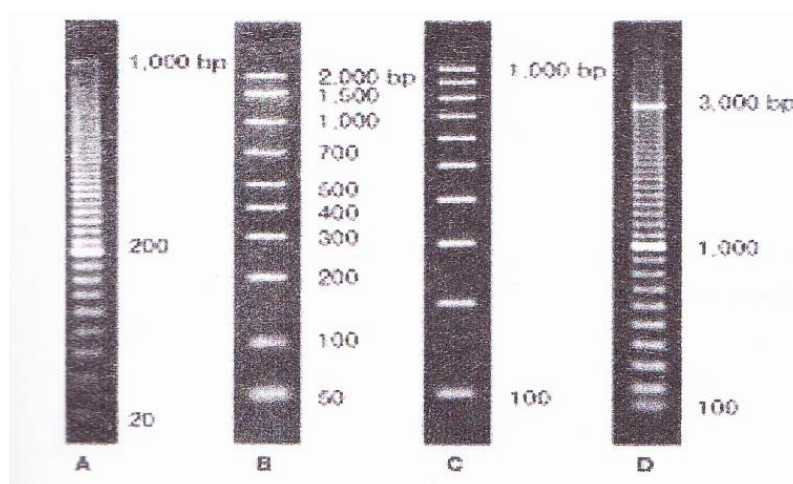
Jedná se o optimalizaci metody PCR prováděnou v jedné mikrozkušavce. Optimalizace spočívá v použití vyšší teploty v prvních cyklech annelingu, než která je potřeba pro nasedání primerů. Dochází tedy k velmi malému výtěžku PCR produktů v prvních cyklech, nicméně tyto produkty jsou velmi specifické. A dále je pak teplota postupně snižována až pod teplotu optimální pro anneling daných primerů. Zde může docházet k vniku dimerů či nespecifických produktů. Tato metoda napomůže k tomu, že hned od prvního cyklu dochází k pomnožování velmi komplementárních produktů. Ty by měli být ve velké míře zastoupeny v PCR produktu, oproti nespecifickým produktům. (ROUX, 2009)

## 4.3 Agarózová elektroforéza

Elektroforéza v agarózovém gelu se používá k identifikaci, separaci či purifikaci fragmentů DNA. Ty jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti (počtu bází). Metoda je vhodná až pro 1 ng DNA. Principem je tedy pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Kdy hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, proto se pohybují nukleové kyseliny v elektrickém poli k opačně na-

bité elektrodě (anodě). Rozdělené fragmenty lze také separovat přímo z gelu (takzvaným vyřezáním z gelu). Podmínky, které jsou optimální pro dané fragmenty, které nanášíme na gel, jsou zajišťovány volbou velikosti a koncentrace gelu. Dle polohy gelu rozlišujeme horizontální či vertikální deskovou gelovou elektroforézu. (RUMML, 2002; ŠMARDKA, 2010)

Pro posouzení velikosti jednotlivých fragmentů se používají markery molekulových hmotností, což jsou komerčně dostupné směsi fragmentů DNA o známé velikosti. Elektroforetické záznamy některých komerčně dostupných markerů, posouzení jejich vzájemné polohy po rozseparování na 1% koncentraci agarózy je zobrazeno na *Obr. 9*. Lze zde vidět často využívaný 100 bp marker pod písmenem C. Dále pod písmenem A můžeme vidět 20 bp marker, u B můžeme vidět hodnoty bp, D pak představuje marker až 3000 bp po 100 bp.



*Obr. 9: Elektroforetický záznam markerů v 1% gelu. (RUMML, 2002)*

Jako standardní agarózové gely můžeme dle publikace Rumla a kolektivu považovat ty, které snadno separují DNA velikosti 0,5 až 25 kb. Dělení větších molekul pro tuto metodu není vyhovující. Pro různá rozmezí molekulových hmotností separovaných molekul DNA (lineárních) jsou vhodné různé koncentrace agarózy (*Tab. 5*) dávkované pro přípravu gelu. (RUMML, 2002)

Tab. 5: Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v gelu o různé koncentraci agarózy (RUMML, 2002).

Koncentrace agarózy (% w/v)	Molekulové hmotnosti DNA (bp)
0,3	500 – 2 500
0,6	100 – 2 000
0,7	80 – 1 000
0,9	50 – 700
1,2	40 – 600
1,5	20 – 300
2,0	10 – 200

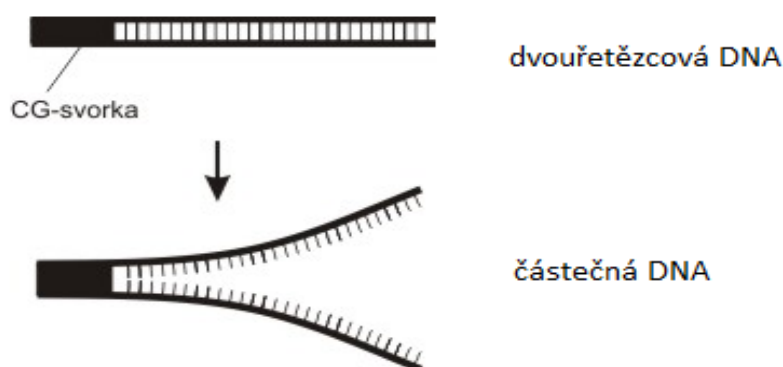
Po dokončení elektroforézy se určuje poloha separovaných molekul, nicméně ty nejsou okem viditelné. Je třeba tedy molekuly DNA obarvit vhodným barvivem. Nejčastěji používaný je ethidiumbromid, který se vmezeří mezi sousední páry bází v DNA. Takto vytváří komplex, jenž je viditelný po osvětlení UV světlem, kdy fluoreskuje červeně až fialově. Lze použít i například kyanidová barviva (komerční název – Sybr). (ŠMARDA, 2010)

#### 4.4 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Denaturační gradientová gelová elektroforéza je analytická metoda s využitím polyakrylamidového gelu obsahující lineární denaturační gradient, ten je zajištěn vzrůstající koncentrací denaturačního činidla v tomto gelu. Nejčastěji používaná denaturační činidla jsou močovina a formamid. Tato elektroforéza dokáže odhalit rozdíly v sekvenci krátkých úseků DNA o stejné délce, tedy separují se fragmenty DNA na základě rozdílné sekvence bází, nikoli na počtu bází. Je zde využíváno rozdílné elektroforetické mobility u částečně denaturované DNA a nedenaturované DNA, ty se pohybují ve vytvořeném elektrickém poli. Zvýšení rozlišovací schopnosti se dosáhne připojením GC-svorek na konce analyzovaných fragmentů, které zamezí úplné denaturaci až do jednořetězcové formy. Pokud jsou

vhodně zvoleny podmínky gradientu, DGGE umožní sekvenčně specifickou separaci směsi molekul stejné délky lišících se jediným párem bází. (ŠMARDA, 2010)

V praxi je tedy nejprve provedena PCR reakce, kdy jeden primer obsahuje tzv. GC svorku (Obr. 10). Primery s GC svorkou obsahující nukleotidy Guanin a Cytosin, ty jsou stabilnější (3 vodíkové můstky) oproti Adenin a Thimin (2 vodíkové můstky). (MUYZER, 1999)

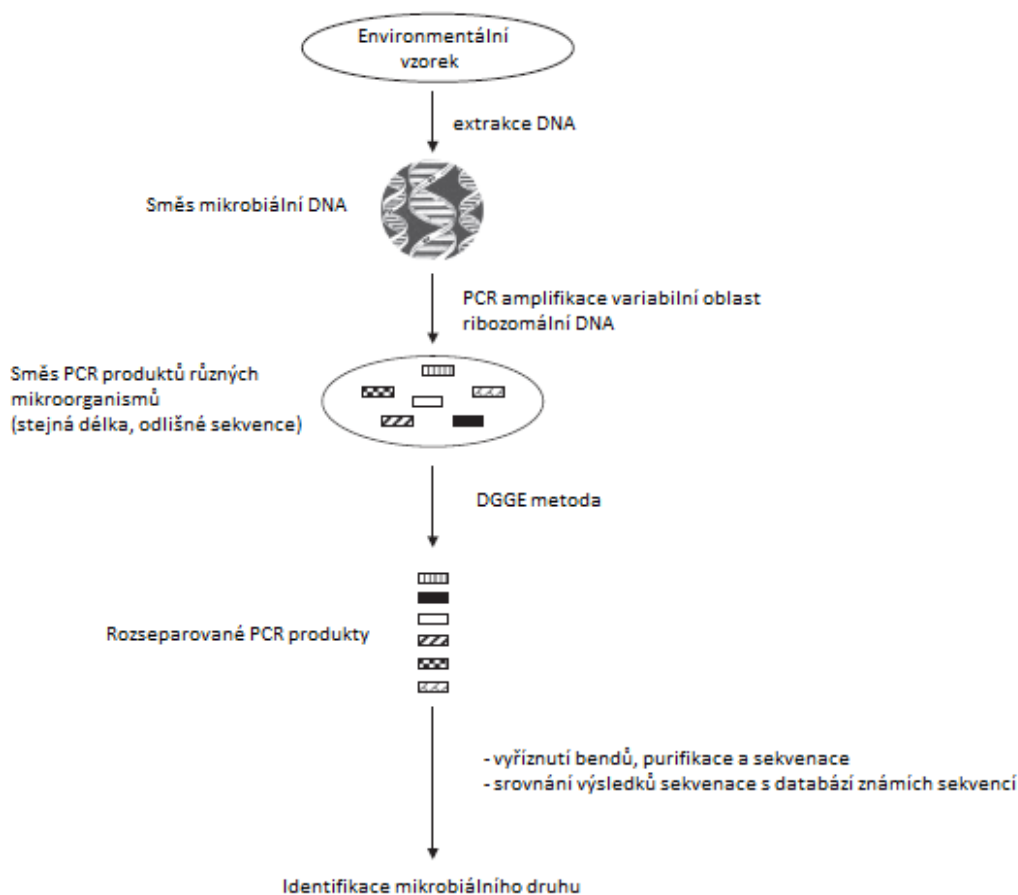


Obr. 10: Schematické znázornění GC svorky na dvouřetězcové DNA – horní nedenaturovaná, dolní denaturovaná (GREEN, 2005).

Dvouřetězcové fragmenty DNA migrují lépe v polyakrylamidového gelu, oproti denaturovaným DNA molekulám, ty zpomalují nebo zastavují v gelu. Tímto způsobem se fragmenty DNA lišící se v sekvenci separují (MUYZER, 1999).

DGGE se používá například pro analýzu mikrobiálních společenstev z environmentálních vzorků (Obr. 11). Maximální velikost fragmentů DNA je udávána 500-600 bp. (GREEN, 2005) Nicméně teoreticky je možné analyzovat vzorky o velikosti 150 – 1200 bp (ŠMARDA, 2010).



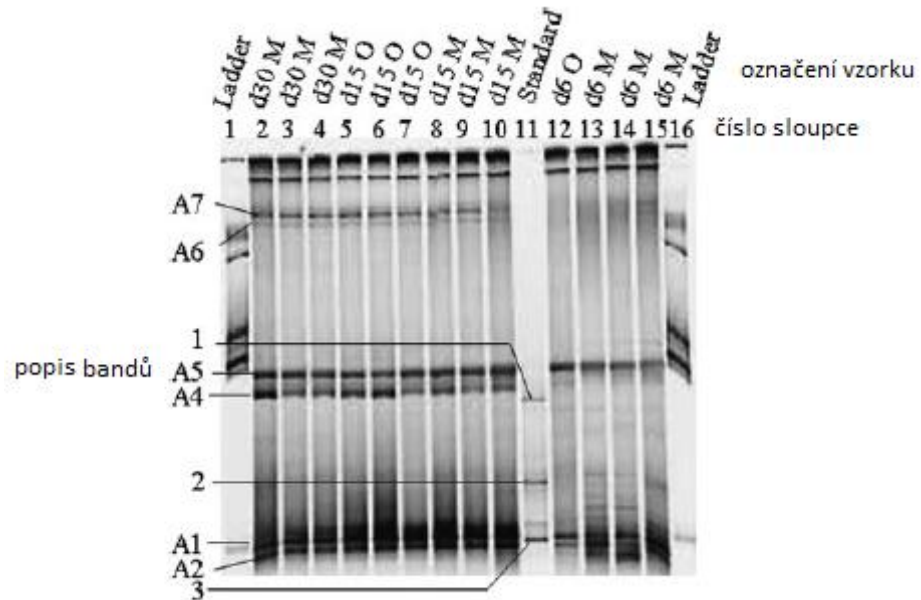


Obr. 11: Schéma použití DGGE analýzy na environmentálních vzorcích (ERCOLINI, 2004).

#### 4.4.1 Studie aktinomycet s využitím metody DGGE

Das a kol. (2007) provedli studii zaměřenou na identifikaci mikrobiálního společenstva v procesu rozkladu listů. Jejich cílem bylo zjistit, zda má na přítomné společenstvo vliv původ listů nebo právě doba rozkladu. Zaměřili se na houby, bakterie (zvláště pak na aktinomycety). Použili metodu DGGE k identifikaci mikroorganismů. Konkrétně pro aktinomycety zvolili sadu primerů: F243, F984GC, R1378. Výsledný gel zaměřený na analýzu DNA aktinomycet je zobrazen na Obr. 12, kdy sloupec 1 a 16 zobrazuje 100 bp DNA marker, sloupec 11 znázorňuje standard a zbylé sloupce znázorňují analyzované vzorky. Označení vzorků je dle dne odběru vzorků z procesu rozkladu listů – 6, 15 a 30 den. Dále pak písmena v označení vzorku udávají původ listů – O → dub, M → javor. Bandy popsané čísly 1 a 3 jsou purifikovaný PCR produkt z *E. coli* a band č. 2 je purifikovaný PCR produkt z *S. californicus*. Autoři dále nesespecifikovali ve své práci jednotlivé druhy aktinomycet.

Gradient gelu byl od 30% po 60%, kdy analýza probíhala 12 hodin, vložené napětí bylo použito 70 V. Autoři vyvozují závěr, že mikrobiální společenstvo se liší dle doby rozkladu listů.



Obr. 12: Gradientový denaturační gel s vyznačenými bandy dominantních aktinomycet A1 – A7. Sloupec 1, 16 - 100 bp DNA marker, sloupec 11 – standard, zbylé sloupce – analyzované vzorky (DAS, 2007).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Zpracovat literární rešerši na dané téma, uvést přehledně provedené studie související s daným tématem.
- Prakticky vyřešit izolaci čistých kultur mikrobiálních degradérů daného kopolymery. Nalézt nejvhodnější řešení kultivace pro jejich získání.
- Osvojit si metodiky molekulární biologie a na základě získaných poznatků zvolit jejich vhodné kombinace. Konkrétně vybrat vhodnou metodu izolace DNA, následně optimalizovat polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a využít metody denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE).
- Charakterizovat identifikované mikroorganismy (zaměřeno na termofilní aktinomyce) degradující PBAT.

## 6 MATERIÁLY A METODIKA

Následující text obsahuje seznam použitých přístrojů, materiálu a chemikálií. Dále postupy přípravy roztoků a živných médií. V další části pak jednotlivé metody použité v rámci této práce.

### 6.1 Chemikálie

Agar Agar, Type I (HiMedia)

Agarosa SeaKem LE Agaros (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>)

Aktinomycete Isolation Agar (HiMedia)

Ammonium persulfáte (APS) – electrophoresis grade (SERVA)

Cykloheximid (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>)

Destilovaná voda – Nuclease-FreeWater (Promega)

D-glukosa monohydrát p.a. (Lach-Ner)

Dimethylsulfoxid (Fluka biochemika)

D-manitol p.a. (PENTA)

DNA Marker – GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific)

Ethidiumbromid 10 mg/ml (SERVA)

Gel Star<sup>™</sup> Nucleic Acid Gel Stain (LONZA)

Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid)

Glycerol bezvodý p.a. (Ing. Petr Lukeš)

GoTaq<sup>®</sup> Hot Start Green MasterMix (Promega)

Hight Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)

Chloroform p.a., stab. (Lach-Ner)

Izoamylalkohol p.a. (Lach-Ner)

Kvasniční autolyzát (HiMedia)

Kvasniční extrakt (HiMedia)

L-prolin (Sigma Aldrich<sup>®</sup>)

Lysozym (SERVA)

Malt Extract Broth Base (HiMedia)

Methylalkohol p.a. (PENTA)

MgCl<sub>2</sub> 25 mM Stock Solution (Roche)

Močovina (Promega)

N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine (TEMED) – (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>)

Nanovlákná Ecoflexu (Spur)

Nystatin, Streptomyces noursei (Calbiochem)

Parafilm "M" (Bemis<sup>®</sup>)

PBAT - G8060 (EnPol Irechemicals, Korea)

Power Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio)

Primery /dále vyjmenovány v kapitole 6.1.1/

Proteináza K (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>)

Psoralen - 7H-Furo[3,2-g]benzopyran-7-one (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>)

PVA 205 – Poval<sup>®</sup>

Sacharóza, Extra pure (HiMedia)

Škrob rozpustný p.a. (PENTA)

TAE – Tris Acetate-EDTA buffer (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>)

TBE – Tris-Borate-EDTA buffer (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>)

Tween 80 (Lach-Ner)

Voda pro molekulárně biologické metody (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>)

Y-per<sup>TM</sup> buffer (Thermo Scientific)

CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O p.a. chlorid vápenatý dihydrát (PENTA)

CaCO<sub>3</sub> p.a. uhličitan vápenatý srážený (Lachema)

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a.	síran amonno-železnatý hexahydrát (Lachema)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a.	síran železnatý heptahydrát (Ing. Petr Lukeš)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ p.a.	hydrogenfosforečnan draselný (Lachema)
KCl p.a.	chlorid draselný (Lachema)
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a.	chlorid hořečnatý hexahydrát (PENTA)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a.	síran hořečnatý heptahydrát (Ing. Petr Lukeš)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ p.a.	hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner)
NaCl p.a.	chlorid sodný (Lach-Ner)
$\text{NaNO}_3$ p.a.	dusičnan sodný (PENTA)
NaOH p.a.	hydroxid sodný (Ing. Petr Lukeš)
$\text{NH}_4\text{Cl}$ p.a.	chlorid amonný (Lachema)

### 6.1.1 Primery

Zásobní roztok 100 pmol/ $\mu\text{l}$

Pracovní roztok 20 pmol/ $\mu\text{l}$

Tab. 6: Použité primery v této práci.

Označení primeru	Sekvence	Výrobce
FD1	5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	SIGMA
RD1	5' - AAGGAGGTGATCCAGCC	SIGMA
341F	5' - CCTACGGGAGGCAGCAG	SIGMA
907R	5' - CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	SIGMA
GC341F*	5' - CCTACGGGAGGCAGCAG	SIGMA
518R	5' - ATTACCGCGGCTGCTGG	SIGMA
S-C-Act-235	5' - CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	East Port
S-C-Act-878	5' - CCGTAGTCCCCAGGCGGGGG	East Port

\*Primer obsahující v sekvenci GC svorku = CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG.

Primery byly výrobcem dodány v lyofilizované formě. Pro získání požadované koncentrace 100 pmol/μl zásobních roztoků primerů, byly doplněny předepsaným objemem sterilní vody dle výrobce. Následovalo zahřátí roztoku primerů na 37 °C, kdy byly lyofilizované primery rozpuštěny a vortexovány po dobu 5 sekund.

## 6.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy d=0,0001 g, SI64A (DENVER INSTRUMENT)

Autokláv SN 98681104 (Varioklav<sup>®</sup> H+P)

Automatické pipety, Nicciipet (Eppendorf AG) - 2, 10, 20, 100, 200, 500 a 1000 μl

Běžné laboratorní sklo

Biological Thermostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha)

Box Aura PCR BIOAIR MP-300N (Major Science)

Centrifuga chlazená ROTANA 460R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG)

Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf AG)

DGGE – Cipher genetic analysis systém 2401-110 (C.B.S. Scientific Company)

Dry block heating termostat, Bio TDB-100 (Biotech)

Elektroforéza horizontální model 4, OWL Separation System Inc. (Thomas Scientific)

Homogenizátor Ultra Turrax T 10 basic (VERKON)

Kombinovaná chladnička (BEKO CSA34020)

Kulový mlýnek Retsch MM 301 (Retsch GmbH & Co. KG)

Laminární box MSC Advantage (Thermo Scientific)

Míchadlo s ohřevem Heidolph MR Hei-Tec (MERCIO)

Mikrovláková trouba (Electrolux)

Mikrozkumavky (Eppendorf AG)

Minifuga Hemle (Eppendorf AG)



Mrazák -80 °C (MO BIO)

Navážky d=0,01 g (KERN KB)

Nitrilové rukavice (Vasco)

PCR Tube Strips (Bio-Rad)

Skleněné kuličky 1,0 – 1,3 (1 ±0,15) mm (MERCİ)

Sterilní špičky různých velikostí (Bioplastic)

Sterilní špičky s filtrem ExpellPlus (CAPP Aps)

Stopky

Sušárna Memmert (VERKON)

Termocykler CFX 96 Real-Time, Systém BIO RAD (Bio-Rad)

Termocykler FINNZYMES PIKO (Thermo Scientific)

TGGE Maxi System (Biometra)

Třepačka Heidolph Titramax 100 (MERCİ)

Třepačka Kavalier LT2 (VERKON)

Ultrazvuk Sonorex Super Digital 10P (BANDELIN)

UV-Transiluminátor, InGeniusLHR (Syngene)

Vortex Genie<sup>®</sup> 2 Vortex (MO BIO)

Vortex V-1 plus (Biosan)

### **6.3 Příprava roztoků a živných médií**

V této kapitole byly popsány postupy přípravy použitých roztoků či jejich jednotlivých složek, dále pak přípravu živných médií potřebných pro kultivaci MO.

#### **6.3.1 Suspendační roztok**

Roztok sloužící pro přípravu výluhů z půdy. Na přípravu roztoku o objemu 1 litr bylo potřeba:

NaCl .....	8,5 g
Tween .....	1,0 g
Destilovaná voda .....	1000 ml

Látky byly naváženy do 1000 ml odměrné baňky a doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem. Následně dobře promíchány, připravený roztok byl rozlit po 45 ml do vzorkovnic. Byla provedena sterilizace v autoklávu při 120 °C po dobu 20 minut.

### 6.3.2 Roztok stopových prvků

Pro přípravu 1 litru roztoku bylo naváženo:

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

Látky byly naváženy na analytických vahách (d=0,0001 g), dále pak smíchány a doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem, důkladně promícháno.

### 6.3.3 Minerální médium (MM)

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky potřebné pro přípravu minerálního média:

- Roztok Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 23,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

- Roztok KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 9,078 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

- Roztok  $NH_4Cl$

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 50 g  $NH_4Cl$  a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

- Roztok  $Mg(SO_4) \cdot 7 H_2O$

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 10 g  $Mg(SO_4) \cdot 7 H_2O$  a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

- Roztok  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 3 g  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$  a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

- Roztok  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 1 g  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$  a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

- Roztok  $NaCl$

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 50 g  $NaCl$  a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Minerální médium je zde použito jako zdroj mikrobiogenních, makrobiogenních a stopových prvků potřebných pro životní pochody mikroorganismů.

K přípravě samotného minerálního média o objemu 500 ml bylo odměřeno a naváženo:

Roztok $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ .....	40 ml
Roztok $KH_2PO_4$ .....	10 ml
Roztok $NH_4Cl$ .....	5 ml
Roztok $Mg(SO_4) \cdot 7 H_2O$ .....	5 ml
Roztok $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$ .....	5 ml
Roztok $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ .....	5 ml
Roztok $NaCl$ .....	5 ml

Stopové prvky .....	0,5 ml
Kvasniční autolyzát .....	0,05 g
Destilovaná voda .....	425 ml

Následně byla provedena sterilizace MM při 120 °C po dobu 20 minut.

#### **6.3.4 Suspenze PBAT**

Kopolymer z kyseliny adipové, 1,4-butadiolu a kyseliny tereftalové byl zakoupen u EnPol Irechemicals, Korea pod obchodním názvem PBAT - G8060.

Suspenze PBAT byla tvořena mikročásticemi daného kopolymeru dispergovanými ve vodě. K jejímu samotnému vytvoření byla zvolena metoda: Oil-in-water emulsion solvent evaporation method. Při této metodě je využito PVA jako emulgátoru, snižující povrchové napětí mezi nemísitelnými látkami - vodou a PBAT. Dojde k emulzifikaci.

Obecně: 10g/100 ml - PBAT/chloroform

0,5 g/100 ml - PVA/destilovaná voda

Bylo naváženo potřebné množství PVA a přidána destilovaná voda. Následně se za neustálého míchání roztok zahříval (teplota nesměla překročit 100 °C – var) až do úplného rozpuštění PVA. Po vychladnutí byl roztok přidán ke směsi chloroformu a PBAT. Takto vytvořená směs byla míchána vysokorychlostním homogenizátorem, při 24 000 otáčkách po dobu 5 minut. Pro zmenšení velikosti mikročástic byl použit ultrazvuk (amplituda 35%) po dobu 5 min. Směs byla dále umístěna na míchadlo do digestoře pro volné odpaření chloroformu. Po jeho úplném odpaření následovalo vymývání PVA, kdy směs byla centrifugována při 10 000 RPM a teplotě 25 °C po dobu 5 min. Tekutina obsahující PVA byla slita, usazenina doplněna destilovanou vodou a znovu centrifugována. Tento postup byl opakován ještě dvakrát. V posledním kroku byla usazenina doplněna destilovanou vodou tak, aby výsledná koncentrace suspenze PBAT byla 20 mg/l.

Příprava suspenze mikročástic PBAT probíhala ve spolupráci s Ing. Janou Šerou a Ing. Petrem Stloukalem, Ph.D.

### 6.3.5 Tuhá živná média

Následující text uvádí použitá tuhá živná média a postup jejich přípravy. Přičemž u všech byl nezávisle na složení proveden následující postup: Všechny látky byly rozmíchány v uvedeném množství destilované vody a provedena sterilizace v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Následně po ochlazení byla živná půda v aseptickém laminárním boxu rozlita na petriho misky.

#### ➤ Aktinomycete Isolation Agar

Toto médium slouží pro kultivaci půdních aktinomycet. Na přípravu 250 ml živného média bylo naváženo a odměřeno:

Aktinomycete Isolation Agar .....	5,5 g
Glycerol .....	1,25 ml
Destilovaná voda .....	250 ml

#### ➤ Médium VII

Pro přípravu 200 ml živného média bylo naváženo a odměřeno:

D-mannitol .....	1,0 g
NaNO <sub>3</sub> .....	0,4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
KCl .....	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	2 mg
Sacharóza .....	2,0 g
Agar Typ I .....	4,0 g
Stopové prvky .....	0,5 ml
Destilovaná voda .....	200 ml

➤ *Gym médium*

Pro přípravu 1000 ml živného média bylo naváženo a odměřeno:

D-glukóza monohdrát .....	4 g
Kvasniční extrakt .....	4 g
Sladový extrakt .....	10 g
CaCO <sub>3</sub> .....	2 g
Agar Typ I .....	12 g
Destilované vody .....	1000 ml

➤ *R8 médium*

Pro přípravu 250 ml živného média bylo naváženo a odměřeno:

Agar Typ I .....	5,5 g
Kvasniční extrakt .....	2,5 g
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O .....	1,3 g
L-prolin (20% wt/vol) .....	3,75 ml
1M NaOH .....	1,75 ml
5M CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O .....	2,5 ml

➤ *PBAT médium*

Minerální médium bylo sterilizováno ve směsi spolu s agarem, zatímco suspenze PBAT musí být sterilizována zvlášť. Následně smíchány v aseptickém laminárním boxu. Důvodem byl vznik sraženiny polymeru v případě sterilizace všech složek v jedné vzorkovnici (čemuž bylo oddělenou sterilizací zamezeno).

MM .....	100 ml
Agar Typ I .....	2,2 g
Suspenze PBAT .....	20 ml

➤ PBAT médium se škrobem

Připraveno ve dvou koncentracích rozpustného škrobu: 2 g nebo 200 mg rozpustného škrobu na jeden litr minerálního média.

Rozpustný škrob ..... 0,2g nebo 20 mg

MM ..... 100 ml

Agar Typ I ..... 2,2 g

Suspenze PBAT ..... 20 ml

**6.3.6 PBAT tekuté médium**

MM ..... 100 ml

Suspenze PBAT ..... 20 ml

**6.3.7 Roztoky antibiotik**

Cykloheximid – zásobní roztok: 50 mg/ml v 90% metanolu, pracovní roztok: 50 ng/ml.

Nystatin – zásobní roztok: 5 mg/ml v DMSO, pracovní roztok: 50 ng/ml.

**6.3.8 TWEEN pro výtřepty (0,1% v/v)**

Tween ..... 0,5 ml

Destilovaná voda ..... 500 ml

**6.3.9 Psoralen**

Zásobní roztok 25x koncentrovaný.

Pracovní roztok 2,5x koncentrovaný – byl připraven následovně:

Zásobního roztoku ..... 10  $\mu$ l

Dimethylsulfoxid ..... 90  $\mu$ l

Oba roztoky skladovány při teplotě – 20 °C.

### **6.3.10 1x TAE pufr**

Přípraven z komerčně vyráběného 10x TAE pufru. K přípravě 1x TAE pufru je potřeba 100 ml 10x TAE pufru a 900 ml destilované vody.

## **6.4 Vzorky půdy**

Vzorky půdy byly zprostředkovány Ing. Janou Šerou. Svrchní část půdy byla odebrána v max. hloubce 20 cm. Vzorkováno přes 50 lokalit z okolí Zlína. Vzorky půd byly dále uloženy v PE sáčcích při teplotě 6,6 °C.

V PŘÍLOZE PIV byla provedena charakterizace vzorkovaných půd dle bonitové půdně ekologické jednotky (BPEJ).

## **6.5 Práce s mikroorganismy přítomnými v půdě**

Cílem práce bylo izolovat degradéry aromaticko-alifatických polyesterů, postupy pro získání mikrobiálních kultur byly popsány níže.

Veškeré práce s mikroorganismy byly prováděny v aseptickém prostředí laminárního boxu.

### **Příprava inkubačních vzorkovnic**

Vzorky půdy byly umístěny do inkubačních vzorkovnic (*Obr. 13*). K podpoření růstu potenciálních degradérů PBAT byla k vzorkům přidána suspenze PBAT. Dále pak u půdy upravena vlhkost, nutná k vytvoření optimálních podmínek pro množení mikroorganismů. Také byl přidán perlit, sloužící ve směsi z důvodu udržení potřebné vlhkosti a také napomáhání přístupu kyslíku do půdy.

Inkubace půdy ve vzorkovnicích probíhala v termostatu při 25 °C a 58 °C po dobu 64 dní.



Postup kultivace při 58 °C byl zvolen k podpoře růstu termofilních aktinomycet, které byly již ve studiích prokázány jako degradéři PBAT (případně Ecoflexu<sup>®</sup>). Takto byly simulovány právě podmínky pro jejich optimální růst a namnožení do té míry, kdy je bylo možné kultivovat na tuhém živném médiu obsahující PBAT.

Inkubace při 25 °C byla zvolena v průběhu experimentů z důvodu ucelení testu (zjišťování růstového optima mikrobiální kultury).

Obsah vzorkovnic:

Sušina půdy ..... 15 g

Suspenze PBAT ..... 2 ml

Perlit ..... 2g

50% vlhkost



*Obr. 13: Inkubační vzorkovnice.*

Perlit

Pórovitá hmota bílé barvy ve formě zrn. Napomáhá k udržení optimálních podmínek u vzorků půdy při inkubaci.

Před použitím byl perlit 3 krát promyt destilovanou vodou a vysušen při 105°C.

### **Výluhy z půd**

Do 45 ml sterilního suspenzačního roztoku bylo naváženo 5 g půdy, dále pak intenzivně mícháno po dobu 10 minut na třepačce. Dalších 15 minut byla směs ponechána v klidu, aby došlo k sedimentaci pevných částic.

### **Zaočkování živných médií**

Po provedení výluhu z půd byl odebrán 1 ml suspenze pomocí sterilní špičky automatického dávkovače a nadávkován na předem připravené tuhé živné média (ředění  $10^{-1}$ ). Dále byl rozetřen daný objem pomocí sterilní skleněné zahnuté tyčinky (hokejky). Takto zaočkovaná živná média byla umístěna do termoboxu s udržovanou teplotou 58 °C.

Výluhy byly zaočkovány vždy na výše uvedené tuhé živné médium - PBAT médium, aby bylo možné rozeznat degradéry kopolymeru PBAT metodou prosvětlených zón.

### **Počty jednotek tvořící kolonie (CFU)**

Mikroorganismy tvoří na tuhém živném médiu kolonie, přičemž jejich množství bude uváděno jako počet jednotek tvořících kolonie na jeden gram sušiny vzorku půdy (CFU/g sušiny vzorku). Počty CFU byly zjišťovány u výluhů z půd.

### **Izolace čisté kultury**

Pro získání čisté kultury ze směsných vzorků mikroorganismů a často ke kontrole čistoty kultury se používá křížový roztěr. Ten byl prováděn pomocí sterilní bakteriologické kličky na sterilním tuhém živném médiu. Každý krok z *Obr. 14* se provádí s novou sterilní kličkou. Výsledkem tohoto postupu po kultivaci by měl být nárůst mikroorganismů ve formě dobře separovaných kolonií v koncových částech křížového roztěru.



*Obr. 14: Postup křížového roztěru při izolaci čisté kultury.*

V této práci bylo cílem izolovat degradéry aromaticko-alifatického kopolyesteru PBAT. Proto vždy první přeočkování po kultivaci MO z výluhů, bylo znovu na PBAT médium, kdy byla ověřena schopnost izolovaných MO degradovat polymer formou prosvětlených zón v tuhém médiu (*Obr. 15*).



*Obr. 15: Určování degradérů pomocí metody prosvětlených zón.*

Izolace ověřených degradérů byli následně provedeny na všech připravených typech tuhých médií (kapitola 6.3.5), tyto experimenty proběhly z důvodu získání čisté kultury pokusem o omezení růstu ostatních MO.

*Izolace degradérů s využitím antibiotik:*

Pro eliminování fungálních MO vyskytujících se půdě byly v experimentu použity pracovní roztoky antibiotik, konkrétně nystatin a cykloheximid (studie je často uvádí pod označením antibiotika s anifungálním účinkem) (KUCHARSKI, 2004).

Nystatin je látka působící negativně na buněčnou stěnu hub, zatímco cykloheximid zabraňuje syntéze proteinů eukaryotických organismů (HĄC-WYDRO, 2006; DONATO, 2007).

*Izolace pomocí třepání s 0,1% (v/v) Tweenem:*

Pro snadnější oddělení jednotlivých MO byla použita povrchově aktivní látka Tween 80 ve formě 0,1% (v/v) roztoku pro výtřepy. V nižších koncentracích tyto neionogenní povrchově aktivní látky snižují shlukování buněk (TRÖGL, 2013). Což bylo využito pro izolaci čisté kultury.

Bylo provedeno ředění  $10^{-1}$  (k 1 ml 0,1% tweenu byla sterilní bakteriologickou kličkou přenesena biomasa ověřených degradérů), dále pak ředění  $10^{-5}$  až  $10^{-10}$ . Výtřep byl proveden na voretxu Genie 2 po dobu 20 min. Dále pak bylo provedeno zaočkování tuhého živného PBAT média 100  $\mu$ l výtřepu. Kultivace provedena při teplotě 58 °C po dobu 7 dní.

**Kultivace mikroorganismů**

Doba kultivace pro aktinomycety je optimálně 7 dní, přičemž pro větší nárůst biomasy byla doba kultivace prodloužena i na 10 dní. Ne však déle (například u výluhů by pak po této době došlo k přerůstání kolonií aktinomycet ostatními přítomnými MO).

Kultivace v této práci probíhala v různých teplotách (25, 58 °C).

**Skladování a využití mikroorganismů**

Biomasa kultivovaná potřebnou dobu na tuhém živném médiu byla sterilní kličkou přenesena do mikroskopů. A to jen pokud se biomasa jevila jako čistá kultura, bylo postupováno dvěma způsoby.

Čistou kulturu bylo možné uchovávat při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v malém množství glycerolu v mikrozkuhavce. Další z postupů bylo uchovávání petriho misek po kultivaci biomasy na tuhém živném médiu v uzavřených PE sáčcích při teplotě  $6,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Biomasa před nebo po skladování sloužila jako vzorek obsahující templátovou DNA pro metody molekulární biologie popsané v následujícím textu.

### Kultivace v tekutém médiu

Je známo, že růst většiny mikroorganismů v tekutých médiích je pro jejich výsledný počet výhodnější. Proto byl i v této práci proveden experiment možného růstu aktinomycet v tekutém médiu. Toto médium obsahovalo suspenzi daného polymeru PBAT, ta se vyznačuje mléčným zbarvením. Růst biomasy v tekutém médiu byl tedy sledován vizuálně, zda nedochází k úbytku mléčného zákalu. Také bylo sledováno, zda nedochází k vzniku shluků MO v tekutém médiu. Práce probíhala s čistou kulturou degradérů. Celý postup byl prováděn za aseptických podmínek.

*Provedení (Obr. 16):* Do 250 ml Erlenovy baňky byla nejprve nanášena sterilní kličkou biomasa na celý povrch dna baňky. Dále bylo do baňky nadávkováno 20 ml PBAT tekutého média, mírně promícháno. Baňka byla uzavřena sterilní gázovou zátkou (ta byla ještě obalena alobalem). Experiment byl proveden ve dvou paralelních pokusech. Tedy, byly vyhotoveny 4 baňky – 2 obsahovaly stejný vzorek biomasy a další 2 byly slepý vzorek (bez nanesení MO v prvním kroku). Baňky byly po celou dobu lehce promíchávány na třepačce. Pokus trval 10 dní při pokojové teplotě.

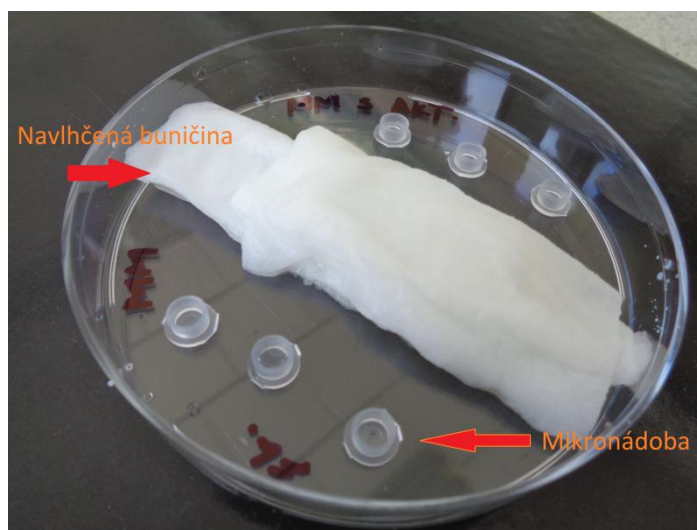


Obr. 16: Provedení kultivace aktinomycet v tekutém médiu PBAT.

### Kultivace v tekutém médiu v přítomnosti nanovláken Ecoflexu®

K zjištění reálného nárůstu degradérů PBAT na samotném polymeru, byl zvolen postup s použitím nanovláken Ecoflexu®. U tohoto experimentu lze posléze zvolit vyhodnocení pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Případný nárůst či výskyt v blízkosti nanovláken polymeru by byl zaznamenán. Celý postup byl prováděn za aseptických podmínek.

*Provedení (Obr. 17):* Do PE mikronádobky (víčko od stripu pro PCR metody) bylo nanášeno malé množství nanovláken, a dále pak bylo přidáno 20  $\mu$ l suspenze z MM a MO získané z již provedené kultivace na tuhém živném PBAT médiu. Mikronádobka byla následně umístěna do petriho misky spolu s navlhčenou buničinou (omezení odparu z mikronádobky). Petriho miska byla uzavřena a následně utěsněna pomocí parafinu "M". Experiment byl proveden ve 3 paralelních pokusech. 3 VZ - mikronádobky obsahující stejný vzorek MO (ze stejné kultivace) a dále 3 slepé pokusy (jen MM s nanovláknem, bez MO). Pokus trval 10 dní při teplotě 25 °C.



*Obr. 17: Provedení kultivace aktinomycet v tekutém médiu s nanovláknem Ecoflexu®.*

## 6.6 Molekulární metody využité k identifikaci mikroorganismů

Identifikovat degradéry aromaticko-alifatických polyesterů za pomoci molekulárně biologických metod lze v případě vhodné optimalizace všech kroků tohoto procesu. Ty jsou popsány v následujících kapitolách.

### 6.6.1 Lyze buněk

Lyzi buněk pro získání templátové DNA u degradérů PBAT bylo nutno optimalizovat, zvolit nejvhodnější postup, kdy bychom dostali vhodnou kvalitu i kvantitu DNA pro následné molekulární metody. Provedeno bylo tedy více metod lyze buněk:

#### **Komerční kit PowerSoil™ DNA Isolation Kit**

Jako vstupní materiál (vzorek) byla použita biomasa izolované čisté kultury degradérů polymeru PBAT. Postup byl proveden dle návodu k příslušnému kitu.

##### *Postup:*

Do rozbíjecí zkumavky byla přenesena všechna biomasa vyskytující se na tuhém živném médiu. Poté byl proveden rozkladný proces v rozbíjecích zkumavkách. Bylo přidáno 60 µl pufru (převážně aniontový detergent SDS - rozrušuje mastné kyseliny a lipidy v buněčné membráně) předehřátého na 70 °C, nutný pro rozklad buněčné stěny.

Rozbíjecí zkumavka byla vortexována (vortex Genie 2) po dobu 10 minut při střední rychlosti. Docházelo k celkové homogenizaci a buněčnému rozkladu působením chemických činidel a mechanického působení. Poté byla směs centrifugována při 14 000 RPM po dobu 30 sekund. Dále bylo přeneseno mikropipetou do sterilní mikrozkušavky 500 µl supernatantu. Následně bylo přidáno 250 µl komerční směsi obsahující složky srážející vnitrobuněčné látky (anorganické látky, proteiny a úlomky buněk, kyselinu a organický materiál, ne však DNA). Tyto látky je nutné odstranit z důvodu inhibice následných metod molekulární biologie.

Směs byla po dobu 5 sekund vortexována (vortex Genie 2) a inkubována 5 minut při teplotě 4 °C, poté byla 1 minutu za laboratorní teploty centrifugována při 14 000 RPM.

Dále bylo přeneseno maximálně 600 µl supernatantu do sterilní mikrozkušavky. K supernatantu bylo přidáno 200 µl komerční směsi (srážející anorganické a organické materiály, ne však DNA). Směs byla po dobu 5 sekund vortexována (vortex Genie 2) a inkubována 5 minut při teplotě 4 °C, poté byla 1 minutu za laboratorní teploty centrifugována při 14 000 RPM.

Do čisté zkumavky bylo přeneseno maximálně 750 µl supernatantu a přidáno 1200 µl koncentrovaného solného roztoku (vysrážení DNA). Směs byla po dobu 5 sekund vortexována. Dalším krokem bylo přenesení 675 µl směsi na komerční kolonku (křemičitá

membrána), a centrifugováno 1 minutu při 14 000 RPM. Přefiltrovaná kapalina byla vylita. Krok byl opakován 3x. Na membráně se zachytila pouze DNA. Dále bylo přidáno 500  $\mu$ l promývacího roztoku na bázi etanolu, díky němuž došlo k odstranění zbytků solí a ostatních nečistot navázaných na membráně. Směs byla centrifugována po dobu 30 sekund při 14 000 RPM a přefiltrovaná kapalina vylita. Kolonka byla dále centrifugována 1 minutu při 14 000 RPM a přenesena do sterilní mikroskopické kádinky. Na membránu kolonky bylo naneseno 100  $\mu$ l sterilního elučního pufru, (předehřátého na 37 °C) a DNA se nechala 30 minut eluovat při laboratorní teplotě.

Výsledná směs byla 30 sekund centrifugována při 14 000 RPM. Díky elučnímu pufru byla DNA z membrány převedena do roztoku.

### **Mechanická lyze**

Mechanická lyze je často používána k homogenizaci a rozsuspendování vzorků (např. pevných). Nicméně v této práci byla použita pro mechanické rozrušení samotných buněk MO. Byl použit následující způsob.

Do sterilní mikroskopické kádinky bylo nadávkováno 100  $\mu$ l sterilní vody, do ní byla následně kličkou přenesena biomasa degradérů PBAT. K suspenzi bylo přidáno 10 kusů sterilních skleněných kuliček. Směs byla dále třepána na kulovém mlýnu po dobu 10 minut, o frekvenci 24 (1/s). Dále byla provedena centrifugace 14 500 RPM po dobu 2 minut. Supernatant přenesen do sterilní mikroskopické kádinky.

### **Lysozym**

Dále byl použit enzym lysozym, který narušuje svým působením buněčnou stěnu. Byl vytvořen zásobní roztok, 10 mg lysozymu na 1 ml sterilní vody dle návodu přiloženým výrobcem (Sigma Aldrich®).

Do sterilní mikroskopické kádinky byl nadávkován 1 ml sterilní vody, do té byla následně kličkou přenesena biomasa degradérů PBAT. Směs promíchána po dobu 5 sekund na vortexu. Dále bylo přidáno 30  $\mu$ l zásobního roztoku lysozymu, konečná koncentrace lysozymu ve směsi 0,3 mg/ml. Směs vortexována 1 minutu. Dále byla provedena centrifugace 14 500 RPM po dobu 2 minut. Supernatant přenesen do sterilní mikroskopické kádinky.



### **Proteináza K**

Enzym proteináza K dokáže štěpit peptidové vazby u aminokyselin (rozklad proteinů). Ve studiích bylo zjištěno, že nejvyšší aktivita tohoto enzymu je při 70 °C, ale po krátký časový úsek (při dlouhodobé inkubaci v 70 °C, dochází k postupné denaturaci enzymu). (SAKAGUCHI, 2014)

Do sterilní mikrozkušavky byl nadávkován 50 µl sterilní vody (dle doporučení výrobce proteinázy K), do té byla následně kličkou přenesena biomasa degradérů PBAT. Směs promíchána po dobu 5 sekund na vortexu.

Následovaly dvě varianty provedení experimentu:

- Dále bylo přidáno 2,8 µl zásobního roztoku proteináza K (1 mg/ml) a 10 kusů sterilních skleněných kuliček (mechanická a chemická lyze). Směs byla zahřívána v suchém termobloku při 70 °C po dobu 10 minut. Následně ochlazená na pokojovou teplotu. Směs třepána na kulovém mlýnu po dobu 10 minutu, o frekvenci 24 (1/s). Dále byla provedena centrifugace 14 500 RPM po dobu 2 minut. Supernatant přenesen do sterilní mikrozkušavky.
- Dále bylo přidáno 5 µl zásobního roztoku proteináza K (1 mg/ml) a 10 kusů sterilních skleněných kuliček. Směs byla zahřívána v suchém termobloku při 39,5 °C po dobu 1 hodiny (dle doporučení výrobce proteinázy K). Vortexována 1 minutu. Znovu inkubována, ale již při 70 °C po dobu 10 minut. Následně ochlazená na pokojovou teplotu. Směs byla třepána na kulovém mlýnu po dobu 10 minutu, o frekvenci 24 (1/s). Dále byla provedena centrifugace 14 500 RPM po dobu 2 minut. Supernatant přenesen do sterilní mikrozkušavky.

### **Lyze varem**

Jedná se o postup degradace buněk pomocí vyšší teploty, kdy dochází k denaturaci proteinů, tedy poškození buněčné membrány. Experiment byl proveden dvěma způsoby:

- Do sterilní mikrozkušavky bylo nadávkováno 100 µl sterilní vody, do té byla následně kličkou přenesena biomasa degradérů PBAT. Suspenze byla po dobu 1 minuty vortexována a v suchém termobloku zahřívána na 95 °C po dobu 1 hodiny. Nutno po celou dobu mikrozkušavku sledovat, zda nedochází k samovolnému ote-

vření a následnému odpaření. Dále byla provedena centrifugace 14 500 RPM po dobu 2 minut. Supernatant přenesen do sterilní mikrokumavky.

- Do sterilní mikrokumavky bylo nadávkováno 10  $\mu$ l sterilní vody, do té byla následně sterilním párátkem či špičkou pipety přenesena biomasa degradérů PBAT. Suspenze byla po dobu 1 minuty vortexována a v mikrovlnné troubě ohřívána na maximální výkon (800W) po dobu 2 minut. Dále byla provedena centrifugace 14 500 RPM po dobu 2 minut. Supernatant přenesen do sterilní mikrokumavky.
- Další možností byla k těmto způsobům použít mechanickou lyzi pomocí skleněných kuliček a kulového mlýnu.

### **Y-PER buffer**

Do sterilní mikrokumavky bylo nadávkováno 20  $\mu$ l Y-PER bufferu, do té byla následně sterilní špičkou mikropipety nebo sterilním párátkem přenesena biomasa degradérů PBAT. Suspenze vortexována po dobu 10 sekund a následně inkubována při 98 °C po dobu 5 minut. Dále byla provedena centrifugace 14 500 RPM po dobu 2 minut. Supernatant byl přenesen do sterilní mikrokumavky. Templátová DNA byla dále používána v neředěné a 10 krát ředěné formě (sterilní vodou).

Také bylo využito mechanické lyze, kdy k samotnému postupu po inkubaci suspenze bylo přidáno 10 kusů sterilních skleněných kuliček, s následným třepáním na kulovém mlýnu po dobu 10 minutu, o frekvenci 24 (1/s).

### **Chloroform/izoamylalkohol (24:1)**

Do sterilní mikrokumavky bylo nadávkováno 100  $\mu$ l sterilní vody, do té byla následně kličkou přenesena biomasa degradérů PBAT. K suspenzi bylo přidáno 100  $\mu$ l sterilní vody. Směs vortexována 5 sekund. Dále pak centrifugována při 16 000g po dobu 5 minut při 4 °C (chlazená centrifuga). Jako zdroj templátové DNA bylo odebráno 20  $\mu$ l supernatantu z horní vodné vrstvy, umístěno do sterilní mikrokumavky.

### 6.6.2 Polymerázová řetězová reakce

Pro tuto práci bylo nutno optimalizovat samotnou metodu PCR, její složení reakční směsi, průběh samotné reakce a také další postup, zpracování PCR produktů.

#### Příprava PCR směsi

Reakční směs obsahovala vzorek templátové DNA získané jedním z výše uvedených metod, sadu dvou primerů, sterilní vodu pro molekulární biologii, mastermix (Go-Taq® Hot Start Green MasterMix) obsahující složky potřebné k správnému provedení replikace DNA a případně přídavek chloridu hořečnatého (je již obsažen v použitém master mixu, nicméně jeho navýšením v reakční směsi můžeme dosáhnout lepší polymerázové aktivity). PCR reakční směs byla připravována v reakčních objemech 20 a 30  $\mu\text{l}$  dle následujících rozpisů (Tab. 7, Tab. 8). Případně byl dále navyšován objem pro potřeby navazujících metod.

Tab. 7: Složení reakčních směsí pro PCR metodu – objem 20 a 30  $\mu\text{l}$ .

Reakční objem směsi	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	Koncentrace v reakční směsi
Komponenty	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	
Voda	7	10,5	-
Master mix	10	15	1x
Forward primer	1	1,5	1 $\mu\text{mol/l}$
Reverse primer	1	1,5	1 $\mu\text{mol/l}$
Templátová DNA	1	1,5	neznámá

Tab. 8: Složení reakčních směsí pro PCR metodu – objem 20 a 30  $\mu\text{l}$ , s přídatkem hořčičných iontů.

Reakční objem směsi	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	Koncentrace v reakční směsi
Komponenty	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	
Voda	6,75	10,25	-
Master mix	10	15	1x
MgCl <sub>2</sub>	0,25	0,25	0,3 mmol/l
Forward primer	1	1,5	1 $\mu\text{mol/l}$
Reverse primer	1	1,5	1 $\mu\text{mol/l}$
Templátová DNA	1	1,5	neznámá

Každá reakční směs byla připravována v aseptickém prostředí PCR boxu. Pro více vzorků se nejprve připravovala směs bez templátové DNA v jedné mikrozkuhavce, dále pak vortexována po dobu 5 sekund. Takto přichystaná směs se dále rozpipetovávala do stripů (PCR mikrozkuhavka, maximální objem: 200  $\mu\text{l}$ ) a dále se přidal chybějící objem templátové DNA. Opět promícháno vortexováním a centrifugováno. Vedle vzorků byla v jedné provedené PCR reakci stanovena pozitivní i negativní kontrola pro následné ověření správnosti výsledku reakce (odhalena případná kontaminace či nefunkčnost PCR).

### PCR cykly

V této práci byla prováděna také optimalizace PCR metody, proto následující metodika obsahuje jen popis rozsahu použitých metod.

U teplot a časů v rozpisu jednotlivých kroků PCR metod byl uveden rozsah hodnot. Tyto hodnoty uvádí oblast, ve které byly provedeny úpravy v rámci optimalizací.

Běžná PCR metoda byla označena v této práci jako „klasická“ z důvodu odlišení od použitých modifikací v této práci, tedy lepší přehlednosti.

Klasická PCR

Počáteční denaturace	94 - 95 °C	4 - 7 min	
Denaturace	94 - 95 °C	1 min	} 35 – 40x
Anealling	50 - 56 °C	1 min	
Elongace	72 °C	1 min - 1 min 45 s	
Závěrečná amplifikace	72 °C	10 min	
Uskladnění	4 °C	∞	

Touchdown PCR

Počáteční denaturace	94 - 95 °C	2 min	
Denaturace	94 - 95 °C	30 s	} 9x -0,5 °C/cyklus
Anealling	61 - 57 °C	1 min	
Elongace	72 °C	1 min - 1 min 30 s	
Denaturace	94 - 95 °C	30 s	} 24 – 34x
Anealling	52 - 56 °C	30 s	
Elongace	72 °C	1 min - 1 min 30 s	
Závěrečná amplifikace	72 °C	10 min	
Uskladnění	4 °C	∞	

Nested PCR a modifikace

V teorii je vysvětlen pojem Nested PCR, přičemž v této práci bylo využito jak samotné popisované metody (vnější a vnitřní primery), tak její modifikace.

Stejně jako u Nested PCR, se i modifikace skládá ze dvou kroků. Tento postup byl označen jako „opakovaná PCR“ a jde tedy o metodu, při níž byl v druhém kroku znovu proveden postup z prvního kroku PCR reakce (totožně). Opakovaly se zvolené cykly, re-

akční směsi a právě i použité primery. Stejně jako u Nested PCR je vložený vzorek templátové DNA pipetován z prvního kroku PCR reakce.

Cykly byly použity z rozpisu výše uvedených.

### 6.6.3 Agarózová elektroforéza

Kontrola samotné PCR reakce je provedena právě pomocí agarózové elektroforézy. Ta byla realizována pomocí elektroforetické soustavy.

Nejdříve byl připraven 1% agarózový gel, objem dle použité nalévací vany (50 ml nebo 100 ml) v závislosti na množství vzorků.

*Příprava agarózového gelu o objemu 50 ml:*

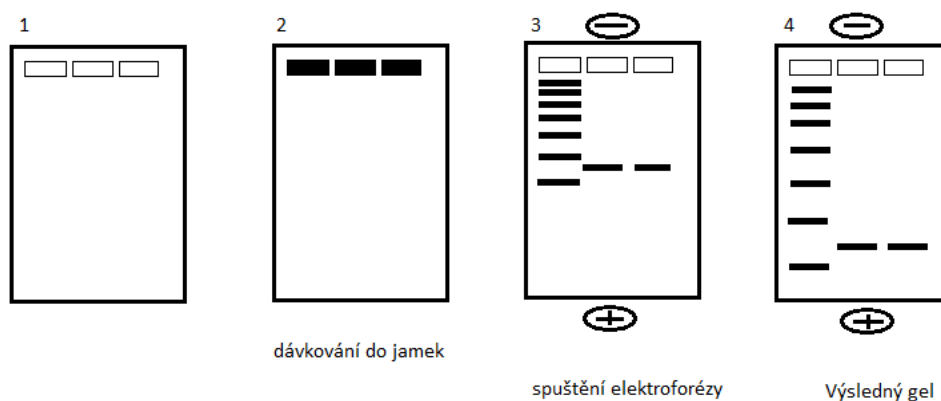
Bylo naváženo 0,5 g agarózy do 250 ml Erlenmayerovy baňky, přidáno 50 ml roztoku 1x TAE. Takto připravená směs byla přivedena k varu v mikrovlnné troubě, na max. výkon (800 W), přibližně po dobu 1 minuty a 30 sekund, až do úplného rozpuštění agarózy.

Do směsi bylo dále přidáno 30  $\mu$ l ethidiumbromidu a důkladně promícháno. Vše bylo převedeno do nalévací vany s umístěným hřebínkem (formuje jamky pro dávkování PCR produktů).

Po ztuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek a umístěn i s nalévací vanou do elektroforetické vany naplněné roztokem 1x TAE. Do první jamky byl nanesen automatickou pipetou DNA Marker (Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder), sloužící pro standardizaci postupu (stanovení přibližné velikosti fragmentů DNA). Do dalších jamek byl automatickou pipetou nadávkován objem 5  $\mu$ l PCR produktů.

Takto sestavena elektroforetická soustava byla připojena k napětí 95 V po dobu 30 minut.

Schéma agarózové elektroforézy na *Obr. 18* znázorňuje pod číslem 1 samotný připravený agarózový gel s ethidiumbromidem, číslo 2 znázorňuje nadávkování PCR produktů do jamek, číslo 3 znázorňuje průběh elektroforézy s vloženým napětím (fragmenty DNA se pohybují od anody ke katodě). Výsledný gel byl znázorněn pod číslem 4.



Obr. 18: Schéma průběhu agarózové elektroforézy.

Dále byl výsledný gel umístěn do UV-transluminátoru a osvětlen UV zářením. Ethidumbromid navázaný na fragmenty DNA emitoval světlo, tím pro nás zviditelnil výsledek PCR reakce. Tento gel byl dále zaznamenán pomocí digitální kamery a programu GeneShap ve formátu fotografie.

#### 6.6.4 Purifikace DNA fragmentů

Pokud výsledný gel z agarózové elektroforézy vykazoval možné výsledky (amplikony), bylo nutné dále pracovat s fragmenty DNA, které byli stále ve směsi se složkami reakční směsi pro PCR. To bylo možné dvěma způsoby.

Jako první byla možná purifikace fragmentů DNA přímo z PCR reakční směsi zbylé ve stripech (5  $\mu$ l bylo nadávkováno na agarózovou elektroforézu). Další možností bylo nadávkovat zbylou reakční směs na 1% agarózový gel a výsledné bandy (signály) vyřezat a provést purifikaci gelu (důvodem nanesení na gel před purifikací bylo odstranění možných nežádoucích fragmentů odlišných od těch požadovaných, na záznamu mohou tvořit tzv. šmouhy).

Oba dva způsoby se dále zpracovávaly pomocí komerčního kitu: Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit. Postupovalo se dle návodu (Clean Up protokol, Gel Extraction protokol).

### *Vyřezání bandů:*

Postup byl prováděn za pomoci UV-transluminátoru. Gel byl ozářen UV zářením a následně viditelné bandy vyřezány pomocí sterilního skalpelu (vždy na každý band sterilizován etanolem). Každý band byl umístěn do jednotlivých sterilních mikrokumavek. Proces musel být realizován v krátkém časovém úseku, UV záření degraduje DNA. Mikrokumavky s fragmenty DNA v gelu mohou být skladovány při teplotě -20 °C.

### **6.6.5 DGGE**

Metoda prováděná pomocí přístroje Cipher Genetic Analys System DTSK-2401-110 dle následujícího postupu.

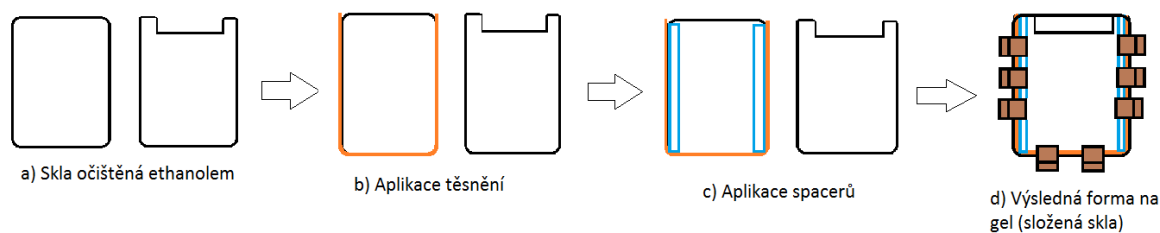
#### *Příprava vzorků na DGGE*

Samotná příprava vzorů byla provedena pomocí Nested PCR. Primery použité v prvním kroku byli následující – FD1 a RD1. PCR cyklus byl zvolen výše uvedený - Touchdown PCR. V dalším kroku byly zvoleny primery – GC341F a 907R, PCR cyklus zde byl zvolen dříve uvedený pod názvem – Klasická PCR. Pro doplnění: objem reakční směsi pro druhý krok Nested PCR byl zvolen 30  $\mu$ l. Takto zhotovené PCR produkty mohly být aplikovány pro zpracování pomocí DGGE metody.

#### *Příprava gelu*

Před samotnou přípravou gelu je velmi důležitým krokem správné sestavení skel (do podoby formy), komerčně dodávané právě pro přípravu litých kolmých gelů. Jako první bylo nutné očistění skel pomocí etanolu, ten byl následně ponechán volně odpařit. Nejdříve se na obdélníkové sklo připevnilo gumové těsnění ve tvaru "U", tento krok je kritický, pokud by byl proveden nesprávně, gel by mohl během plnění do formy ze skla vytéct. Dále byly vkládány spacers (1 mm), zajišťující tloušťku výsledného gelu. Na tyto spacers byla nanesena vazelína, pro snadnější oddělení od samotného gelu při vyjmutí z formy. Po aplikaci součástí na obdélníkové sklo bylo přiloženo druhé, atypické sklo. Zajištění skel proběhlo pomocí svorek umístěných po stranách. Schéma těchto kroků zobrazeno na *Obr. 19*.





Obr. 19: Schéma sestavení skel pro vytvoření formy na gel.

**Složení gelu:** (objem skla pro 1 mm spacerů → 30 ml)

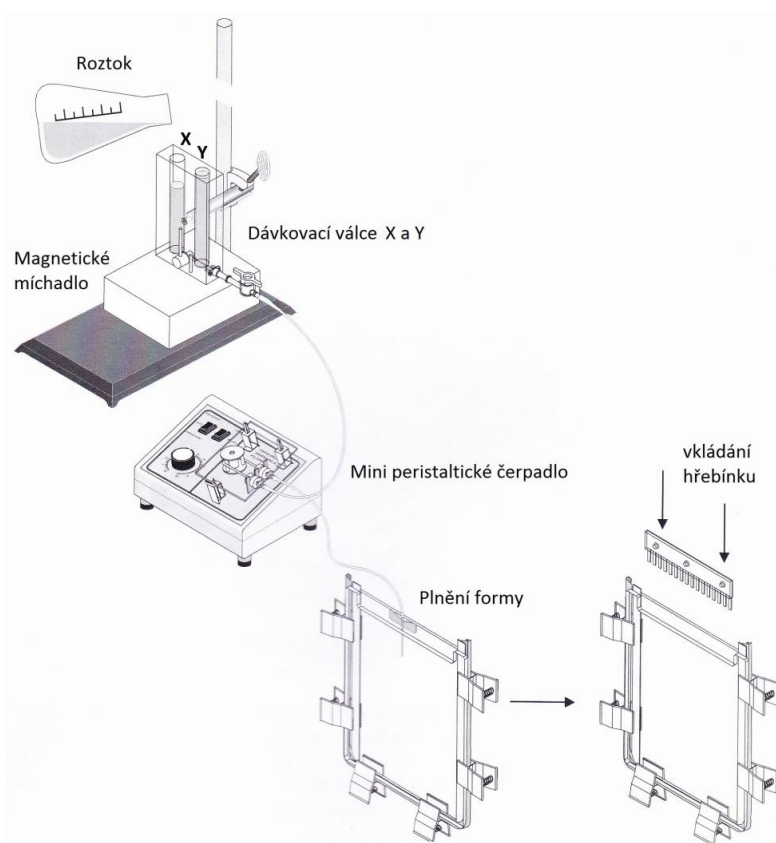
	<u>30%</u>	<u>70%</u>
Močovina [g]	3,6	8,4
Formamid [ml]	3,78	8,82
50x TAE Buffer [ml]	0,6	0,6
40% Akrylamid [ml]	5,64	5,64
Destilovaná voda [ml]	Pro doplnění každého na 30 ml.	

V této práci bylo využito polyakrylamidového gelu se zvyšující se koncentrací denaturačních složek (formamid a močovina). Byly připraveny dva roztoky – 30% a 70% dle výše uvedeného rozpisu (příprava roztoků se prováděla ve větším množství, než bylo potřebné k naplnění formy, z důvodu možného vytečení gelu z formy a opakování plnění). Jednotlivé roztoky byly převedeny do samostatných 50 ml centrifugačních zkumavek.

	<u>Zkumavka s 30% roztokem:</u>	<u>Zkumavka s 70% roztokem:</u>
Objem roztoku:	14,85 ml	14,85 ml
<hr/>		
Polymerační činidla:		
APS (10%) [μl]	104,5	104,5
TEMED [μl]	6,5	6,5
<hr/>		

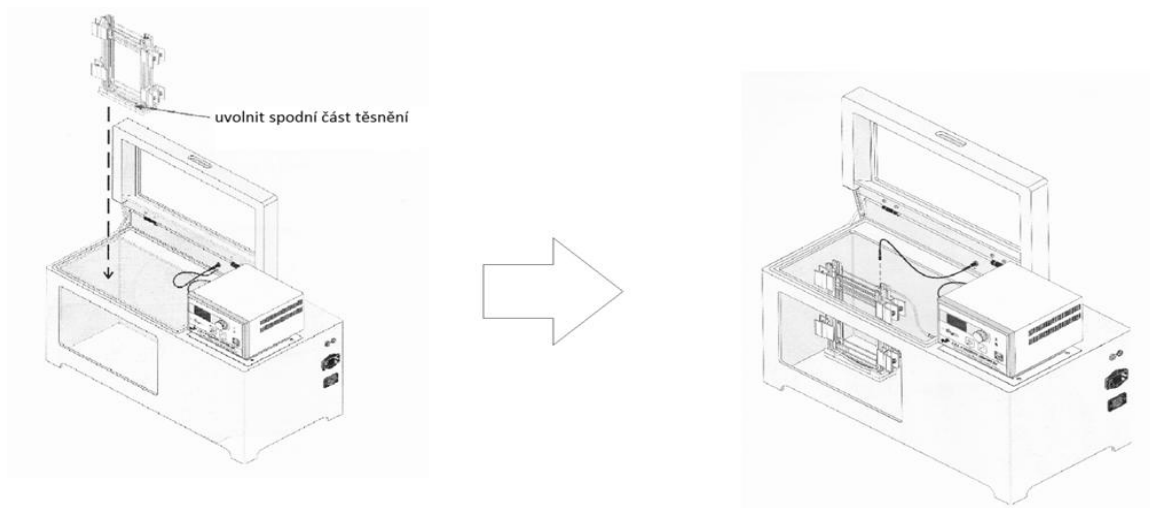
Po přidání polymeračního činidla (APS – amonium persulfát) a katalyzátoru reakce (TEMED – tetraethylethylendiamin) do roztoků dle výše uvedeného rozpisu, byly zkumavky uzavřeny a promíchány. Tento krok musel být prováděn velmi rychle, z důvodu možnosti předčasné polymerace gelu ve zkumavce.

Roztoky byly vlitý do dávkovacích válců. Do válce X dávkujeme 30% roztok, do válce Y dávkujeme 70% roztok (v tomto válci bylo také umístěno míchadélko pro homogenizaci směsi). K válcům byla napojena dávkovací hadička opatřena ventilem, zakončena jehlou (vložená mezi skla). Samotné čerpání roztoků bylo zajištěno mini peristaltickým čerpadlem. Po sestavení aparatury pro tvorbu gelu, dle *Obr. 20*, bylo nejprve spuštěno čerpadlo na střední stupeň, dále otevřen ventil za válci. Dávkování probíhalo 5 až 10 minut. Poté byla vyjmuta dávkovací jehla a zasunut hřebínek, pro tvorbu jamek. Takto připravený gel byl ponechán při laboratorní teplotě v klidu po dobu 2 hodiny, kdy bylo dosaženo úplné polymerace gelu.



*Obr. 20: Schéma aparatury potřebné k vytvoření gelu.  
(C.B.S. SCIENTIFIC COMPANY, 2015)*

Vyhotovený gel i s formou bylo nutné umístit do plastové kazety a připevnit pomocí svorek (nutné pro stabilitu gelu v kolmé poloze). Dále bylo důležité vyjmout ze spodní části formy (ze skel) těsnění, z důvodu kontaktu obou stran gelu s pufrem a vloženým napětím. Kazeta s gelem byla poté umístěna do termostatu přístroje. Další napojení kazety na přístroj bylo prováděno pomocí návodu. Tyto kroky byly zobrazeny na *Obr. 21*.



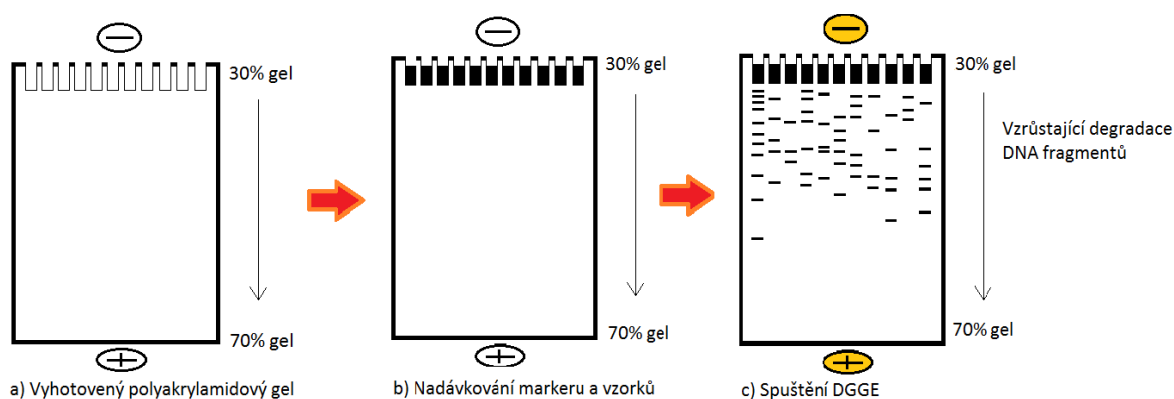
*Obr. 21: Schéma umístění kazety s gelem do termostatu. (C.B.S. SCIENTIFIC COMPANY, 2015)*

#### *Dávkování vzorků*

Po umístění kazety do prostoru termostatu byl vytažen hřebínek z gelu. Vytvořené jamky byly promyty pomocí mikrostříkačky Hamilton příslušným pufrem. Dále pomocí automatické pipety nadávkováno 20  $\mu$ l nejdříve markeru (Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder) a následně příslušných vzorků (PCR produktů). Schéma průběhu metody zobrazeno na *Obr. 22*.

#### Podmínky metody:

Vložené napětí:	120 V
Vložený proud:	36 mA
Doba:	900 minut
Teplota v termostatu:	60 °C
Použitý pufr:	1x TAE



Obr. 22: Schéma průběhu metody DGGE.

Po proběhnutí této elektroforézy byl gel s kazetou vytažen z pufu. Forma byla oddělena od kazety. Nejprve bylo odejmuto těsnění, dále pak spacery. Pomocí vstříkovaní destilované vody a tlakem vyvinutým vmezeřováním kopisti byli skla odděleny. Gel s obdélníkovým sklem dále umístěn do barvicího roztoku - 450 ml destilované vody, 50 ml 10x TAE a 50  $\mu$ l GelStar<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain. Následně došlo k barvení výsledného gelu po dobu 2 hodin za stálého třepání při 450 RPM/min.

K zobrazení a zachycení výsledného gelu byl využit transluminátor – UV záření. Stejně jako u PCR reakce. Dále pak došlo i k vyřezávání bandů z gelu a jejich umístění do mikrozkumavek.

Takto připravené vyříznuté bandy byly rozpouštěny přidavkem 200  $\mu$ l sterilní vody a přidáno 5 ks skleněných kuliček (napomáhající rozpouštění právě mechanickým působením na band). Směs byla vortexována (Vortex Genie 2) na střední výkon po dobu 10 minut. Následně umístěna do lednice (4 °C) a přes noc nechána k volnému rozpouštění.

Pro další práci se získanými fragmenty DNA z gelu bylo nutno provést opět PCR reakci. Použité primery – 341F a 907R (opakování druhého kroku před samotnou DGGE metodou, jen primer již bez GC svorky). PCR cyklus byl zvolen opět dle výše uvedené klasické PCR.

Vzniklé PCR produkty byly následně purifikovány pomocí komerčního kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit a zasílány na sekvenci.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce měla za cíl zvolit vhodnou metodu pro kultivaci termofilních aktinomyceť degradujících PBAT. Dále pak pomocí mikrobiologických a molekulárně biologických metod izolovat a identifikovat mikrobiální degradéry PBAT. V neposlední řadě provést základní charakteristiku těchto degradérů.

### 7.1 Počty jednotek tvořící kolonie (CFU)

Prvotní určení degradérů kopolymeru PBAT, přítomných v půdě probíhalo vizuálně. Degradéři museli tvořit v okolí kolonií prosvětlené zóny na tuhých živných médiích (obsahující submikročástice PBAT). Dále pak byly sčítány kolonie těchto degradérů. Sčítání bylo provedeno u výluhů z vzorků půd kultivaných při 58 °C po dobu 7 dní. Bylo využito ředění  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ , nicméně v *Tab. 9* byly uvedeny hodnoty přepočteny na ředění  $10^{-1}$ . Dále pak stanoveno jako počet jednotek tvořící kolonie na gram sušiny vzorku půdy. Pro přehlednost byly uvedeny jen půdy s nalezenými degradéry PBAT. Celkový souhrn sušin půd byl uveden v PŘÍLOZE PI.

*Tab. 9: Jednotky tvořící kolonie degradérů PBAT na gram sušiny vzorku půdy.*

Č. půdy	Počet kolonií (přepočet na ředění $10^{-1}$ )	CFU/g	Č. půdy	Počet kolonií (přepočet na ředění $10^{-1}$ )	CFU/g
2	$2,2 \cdot 10^3$	$9,9 \cdot 10^2$	30	$1,6 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^3$
4	$5,0 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^2$	31	$3,2 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$
6	$5,0 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	32	$2,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$
7	$4,4 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	33	$4,2 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$
8	5	3	34	$5,0 \cdot 10^2$	$2,8 \cdot 10^2$
13	$3,1 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	40	$6,0 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^3$
14	$4,0 \cdot 10^2$	$4,6 \cdot 10^2$	42	$2,0 \cdot 10^3$	$9,6 \cdot 10^2$
17	$1,0 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^2$	43	$4,0 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$
21	$2,0 \cdot 10^2$	93	46	$3,0 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$

Č. půdy	Počet kolonií (přepočítáno na ředění $10^{-1}$ )	CFU/g	Č. půdy	Počet kolonií (přepočítáno na ředění $10^{-1}$ )	CFU/g
24	$2,0 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^2$	47	$1,2 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^3$
26	$2,3 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^2$	48	$2,4 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$
27	$2,1 \cdot 10^3$	$8,7 \cdot 10^2$	50	$1,0 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^2$
28	$1,8 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^2$	51	$3,0 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
29	$1,0 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^3$	52	$3,0 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$

Celkem byl tedy zaznamenán výskyt degradérů PBAT u 28 půd. Experiment byl zaměřen na přítomnost termofilních aktinomycet degradujících PBAT (předběžně identifikovány metodou prosvětlených zón). S těmito půdami uvedenými v *Tab. 9* bylo dále pracováno v rámci této práce.

## 7.2 Kultivace a izolace čisté kultury

V této práci bylo prvním úkolem izolovat čistou mikrobiální kulturu. Původní kolonie z výluhu půdy vyskytující se na tuhém živném médiu s PBAT a tvořící prosvětlenou zónu, byla zaočkována metodou křížového roztěru opět na tuhé živné médium s PBAT. Metoda křížového roztěru byla použita i na další přeočkovávání a kultivování kultury, až do doby vizuálního vyhodnocení čisté kultury. Výsledné čisté kultury na tuhých živných médiích s PBAT ve formě obrázků jsou obsaženy v PŘÍLOZE PII. Popřípadě byla kontrola čistoty prováděna mikroskopicky při zvětšení 200x přímo na tuhém živném médiu. Bohužel mikroskopická kontrola měla omezení, způsobené nedostatečným prosvětlením celé kolonie.

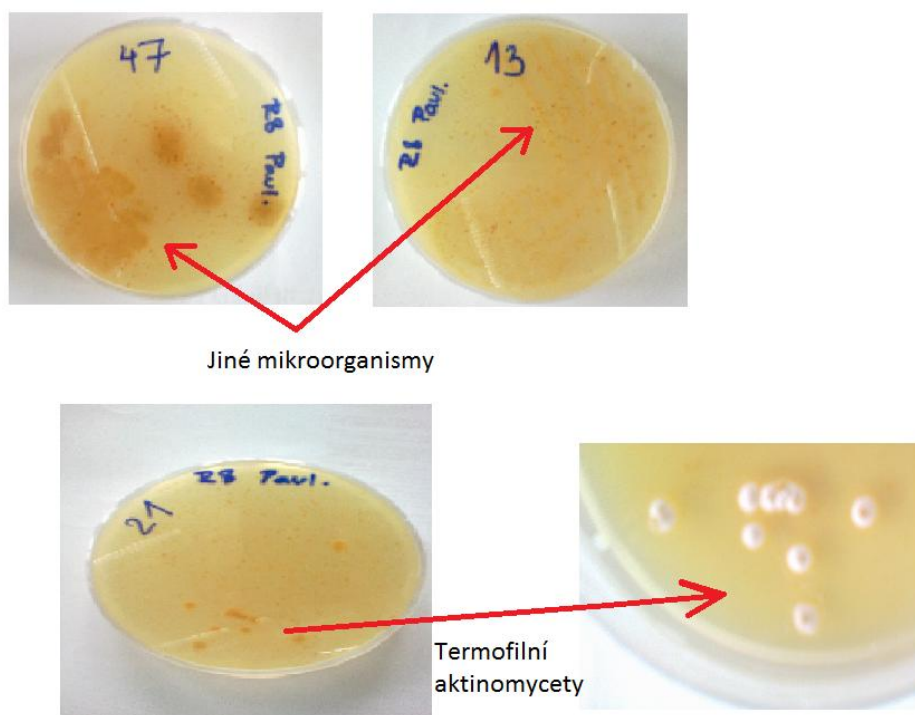
Nicméně metoda přeočkovávání byla velmi zdlouhavá, jelikož kultivace aktinomycet probíhá 7 až 10 dní a zisku čisté kultury bylo dosaženo často po třetím až čtvrtém přeočkování. Z tohoto důvodu bylo v literatuře vyhledáno několik tuhých živných médií, která byla udávána jako selektivní pro růst aktinomycet. A dále také vyzkoušeno použití antibiotik, přívlastku škrobu či pouhé výtřepy s Tweenem 80. Největší problém při získávání čisté

kultury, bylo v odstranění bakterie pravděpodobně rodu *Bacillus* (tvořící na tuhých médiích béžové až nahnědlé nepravidelné kolonie, často s lesklým povrchem).

Jednalo se o tyto selektivní tuhá živná média: Gym, R8, VII a komerční agar Aktinomycece Isolation Agar (AA) (kap. 6.3.5). Pro tyto média bylo vyčleněno 5 zkušebních půd (se zjištěnou přítomností degradérů PBAT) a pomocí jejich výluhů byla média zaočkována – půdy č. 2, 13, 21, 40, 47.

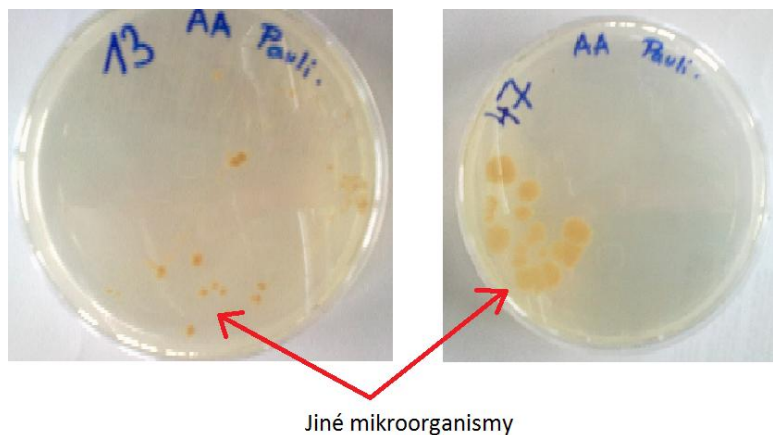
Médium Gym bylo doporučeno společností zabývající se MO, jako vhodné pro termofilní aktinomycece (DSMZ, 2015). Nicméně na tomto tuhém živném médiu, ani v jednom případě nebyl nalezen nárůst jakékoliv kolonie MO. To mohlo být způsobeno nedostačujícím složením z hlediska stopových prvků přítomných v tuhém živném médiu, důležitých pro růst buněk mikroorganismů.

Médium R8 bylo publikováno ve studii zabývající se izolací termofilními aktinomycetami právě jako izolační médium (AMNER, 1989). Z kultivovaných pěti půd, byly získány kolonie MO jen u tří půd (13, 21, 47). Tyto MO získané z půd číslo 13 a 47 nebyly určeny jako aktinomycece. Nicméně u MO z půdy číslo 21 (Obr. 23) byli patrné kolonie termofilních aktinomycet.



Obr. 23: Nárůst mikroorganismů na selektivním živném médiu R8.

Při použití komerčního *Aktinomycete Isolation Agar* (AA) byl nárůst kolonií MO jen u dvou vzorků půd, 13 a 47. Opět MO z těchto přeočkování nebyly určeny jako aktinomycety (Obr. 24).



Obr. 24: Nárůst mikroorganismů na komerčním selektivním živném médiu AA.

Dále byly provedeny experimenty s tuhým živným médiem PBAT obsahující navíc rozpustný škrob v koncentraci 200 mg/l a 2 g/l. Předpokladem byl fakt, že škrob podpoří růst aktinomycet do takové míry, kdy budou schopny tvořit větší a znatelnější kolonie. Tyto tuhá živná média se škrobem byla zaočkována výluhy z půd číslo 2, 8, 17, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33. Nicméně tento předpoklad se nám nepotvrdil, kolonie aktinomycet byly stále drobné, kolonie jiných MO se vyskytovaly hojně také. Navíc aktinomycety netvořily prosvětlené zóny (nebylo možné určit degradéry PBAT), pravděpodobně přednostně využívaly jako zdroj uhlíku rozpustný škrob.

Jeden z pokusů kultivace čisté kultury byl doporučen v rámci spolupráce se Slovenskou poľnohospodárskou univerzitou Nitra. Jednalo se o výtřepy vizuálně čisté kultury aktinomycet (27, 30, 33), kdy byla použita povrchově aktivní látka (PAL) Tween 80 (0,1%). Použité ředění v kapitole 6.5. Výsledkem tohoto postupu byly oddělené kolonie při ředění  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$ . Nicméně ani jedna z nich nebyla určena jako aktinomyceta, ale pravděpodobně jako bakterie rodu *Bacillus* (hnědavé lesklé kolonie). Menší ředění bylo nedostačující (kolonie byly ve velké blízkosti, často se přerůstaly) a naproti tomu při větším ředění než  $10^{-6}$  se kolonie již nevyskytovaly.

Poslední pokus pro získání čisté kultury bylo přidání antibiotik do tuhého živného média PBAT. Antibiotika byla za aseptických podmínek přidána do sterilního média



(ochlazeného), za využití stříkačkových filtrů. Očekávaný důsledek měl být, že antibiotika budou působit jako inhibitor růstu nežádoucích MO. Ve výsledku došlo jen k inhibici růstu hub na médiu (což bylo očekáváno, vzhledem k antifungálním vlastnostem antibiotik). MO jako aktinomycety či jiné bakterie (např. *Bacillus*) byly přítomny bez omezení.

### 7.2.1 Shrnutí výsledků izolace čisté kultury termofilních aktinomycet

Izolace termofilních aktinomycet (kultivovaných při 58 °C) byla výsledně prováděna jen za pomoci metody křížového roztěru. Kolonie vyznačující se jako degradér PBAT byla dále přeočkována a kultivována. Vše opakováno nejméně třikrát.

Média jako AA a R8 nebyla natolik selektivní, aby bylo výhodné je používat. Médium Gym se vyznačovalo pravděpodobně nevhodným složením pro růst mikroorganismů vyskytujících se v půdě.

Dále pak přídavek škrobu či antibiotik se neukázal jako nápomocný, nýbrž bychom ho mohli zařadit jako jinou alternativa média pro přeočkovávání, s využitím těchto látek pro podporu degradérů PBAT. Ve výsledku bylo tedy složení živného média jen obohacováno o tyto látky (škrob, antibiotika), které výrazně neovlivnily metodiku pro získání čisté kultury. Z tohoto důvodu nebylo těchto látek dále využíváno. U škrobu by také musela být navíc prodloužena doba kultivace, po kterou by došlo k vyčerpání škrobu mikroorganismy. Pak by mikroorganismy teprve začaly degradovat PBAT a my bychom byli teprve schopni určit degradéry pomocí metody prosvětlených zón.

Metoda za použití Tweenu 80 byla nevhodná, malé ředění způsobovalo ještě horší nepřehlednost kolonií než např. při běžných prvotních vyluzích. Při velkém zředění se naopak kolonie aktinomycet nevyskytovaly. To může být způsobeno tím, že půdní aktinomycety se často vyskytují ve shluku, a takto velmi dobře prospívají, je tedy předpoklad, že pokud se buňky půdních aktinomycet vyskytují osamoceně, může dojít k jejich velmi pomalému růstu (MAIER, 2000).

### 7.2.2 Kultivace mikroorganismů s širokým teplotním optimem růstu

Byl proveden experiment, sledující oblast teplotního růstového optima degradérů PBAT. Bylo vybráno 10 půd, u kterých byla zaznamenána přítomnost degradérů. Půda byla odebírána z inkubačních vzorkovnic kultivovaných při 58 °C po dobu 64 dní. Výluh z těchto půd byl zaočkován na tuhé živné médium PBAT. Takto připravené petriho misky byly umístěny do termostatů s rozdílnými teplotami: 25 °C, 35 °C a 68 °C.

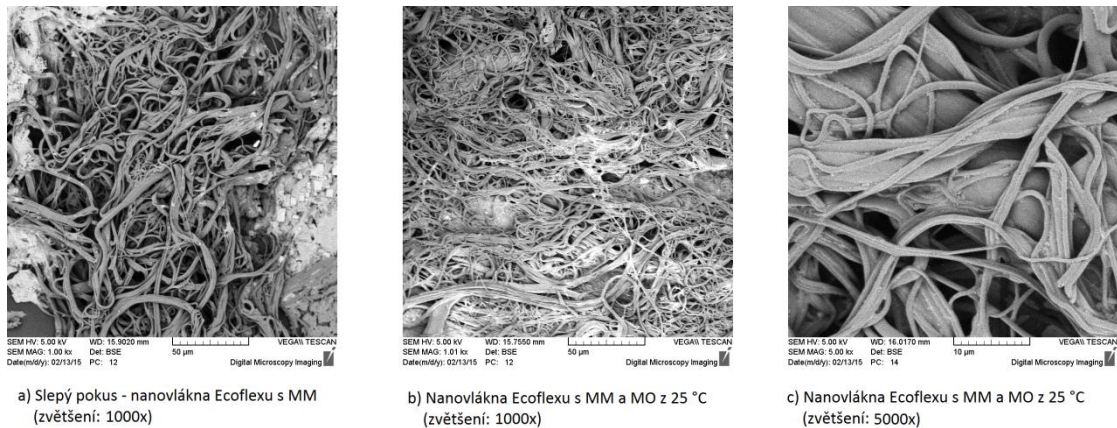
Kultivace při teplotě 68 °C měla za následek, že došlo k poškození plastové petriho misky (zkroucení) a také vyschnutí média. Nebyl patrný nárůst žádné kolonie MO.

U kultivace při teplotě 35 °C nedošlo u žádné z kolonií k vytvoření zón v okolí kolonií.

Kultivace při teplotě 25 °C měla pozitivní výsledek. Na tuhém médiu zaočkované výluhem z půdy číslo 26 byla přítomna prosvětlená zóna v okolí jedné kolonie (označení: MO z 25 °C). Tato kolonie byla dále přeočkována na tuhé živné médium PBAT a znovu kultivována při 25 °C. Stále tvořila prosvětlené zóny, a proto s touto kulturou byly prováděny další experimenty.

Danou kulturu bylo nutno také identifikovat, nicméně pro metody molekulární biologie je lépe, pokud pracujeme s větším množstvím biomasy, tím i větší koncentrací templátové DNA. Proto byl zvolen experiment *kultivace v tekutém médiu*. Tato metoda byla hodnocena pouze vizuálně, zda dochází k úbytku PBAT z média (snížením mléčného zákalu), či vytvořením viditelných shluků buněk. Pokus nebyl úspěšný, nepodařilo se nakultivovat mikrobiální kulturu degradující PBAT v tekutém médiu.

Pro potvrzení že růst v tekutém médiu není dostatečný, byl vytvořen systém s nanovlákný Ecoflexu<sup>®</sup> (kap. 6.5) umístěných do tekutého média obsahující MO z 25 °C. Výsledek této kultivace byl zaznamenán pomocí SEM na Obr. 25. Pod označením a) na Obr. 25 můžeme vidět nanovlákná Ecoflexu<sup>®</sup> jen za přítomností MM. Jelikož před zpracováním pomocí SEM byly vzorky vysušeny, došlo k vytvoření krystalků minerálních solí viditelných v krajních částech obrázku. Pod označením b) na Obr. 25 byly zaznamenány opět jen nanovlákná s krystalky solí, nedošlo k žádnému nárůstu MO. To bylo potvrzeno pod označením c) na Obr. 25 s větším zvětšením (5000x), nedochází zde k nárůstu žádné kultury MO. Práce na SEM byla prováděna ve spolupráci s ing. Petrem Stloukalem, Ph.D.



*Obr. 25* Systém nanovláken Ecoflexu<sup>®</sup> zachycený pomocí SEM po kultivaci.

Pro celistvost experimentu byly vytvořeny inkubační vzorkovnice, které byly kultivovány při 25 °C po dobu 64 dní. Pokus byl proveden pro všechny vzorkované půdy. Z těchto inkubovaných půd byla následovně zaočkována tuhá živná média PBAT, pomocí výluhů z těchto půd. Vše mělo za cíl nalézt možného degradéra, který zpracovává PBAT již při 25 °C (a nemusí dojít k jeho namnožení při 58 °C). To by mohlo znamenat, že se nejedná o termofilní aktinomycetu. Výsledkem kultivace byly mírně prosvětlené zóny na petriho miskách, ty se však vykazovaly jako velmi odlišné od zón, které tvořili aktinomycety (ostře ohraničené, zprůhlednění média). Tyto zóny měli jemné mléčné zbarvení, jen velmi málo patrné. Po přeočkování kolonie na nové petriho misky s tuhým médiem PBAT byly MO tvořící tyto zóny určeny jako plísňě (fungi), zobrazeno na *Obr. 26*. V literatuře lze nalézt také studie zabývající se degradací PBAT pomocí plísňí. Tímto tématem se v rámci mé práce nezabývám, proto nebyla tato skutečnost dále nerozváděna a test byl určen jako negativní z pohledu inkubace MO degradující PBAT při 25 °C (KASUYA, 2009).



*Obr. 26:* Růst kultury plísňí na tuhém živném médiu PBAT při 25 °C.

Dále byl proveden pokus, zda pro danou kulturu MO kultivovanou při 25 °C (ze vzorkovnic inkubovaných při teplotě 58 °C) lze použít selektivního média. Byla využita selektivní média již nalezená pro termofilní aktinomycety. Pozitivní výsledek byl nalezen u tuhého živného média VII. Nicméně na tomto médiu kultura MO tvořila zcela odlišné kolonie oproti koloniím na tuhém živném médiu s PBAT. Bylo tedy nutné kulturu následně přeočkovat z média VII znovu na tuhé živné médium s PBAT. Tím bylo ověřeno, že se jedná právě o kulturu degradující PBAT (vizuálním srovnáním kolonií vyskytujících se na původním tuhém živném médiu s PBAT). Na *Obr. 27* byla zaznamenána kultura rostoucí na médiu VII *a)*, tak i na médiu s PBAT *b)*. Výsledkem na tuhém živném médiu PBAT byla původní kultura MO, totožná s kulturou z výluhu půdy. Lze tedy o této kultuře říci, že vzhled kolonie je odlišný dle růstového živného média (médium VII – bílé pravidelné lesklé kolonie, médium s PBAT – drobné kolonie s větvením vrůstajícím do živného média).



a) Přeočkování na médium VII z média PBAT.



b) Přeočkování zpět z média VII na médium PBAT.

*Obr. 27: Kultivace MO z 25 °C na médiu VII a kontrolní přeočkování na médium PBAT.*

Byla tedy nalezena kultura MO degradující PBAT s širokou valencí teplotního optima růstu. Růst probíhal při 25 °C i při 58 °C. Jedním z dalších cílů bylo tedy identifikovat tuto specifickou kulturu.

### 7.3 Optimalizace metody lyze a PCR

V rámci této práce byla provedena optimalizace metod lyze buněk, pro získání potřebné templátové DNA. Dále byla provedena optimalizace samotné metody PCR a metody DGGE. Vše v rámci adaptace molekulárně biologických metod pro určení degradérů PBAT, konkrétně aktinomycet. Optimalizace lyze byla kontrolována pomocí PCR, zatímco optimalizace samotné PCR byla kontrolována agarózovou elektroforézou.

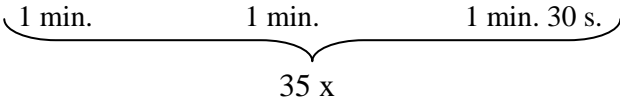
Tyto optimalizace bylo nejvýhodnější provádět pospolu, ve výše uvedeném pořadí, proto také následující soubor provedených PCR reakcí a jejich záznamů je obsáhlejší.

Pro kontrolu výsledných produktů PCR reakce (amplikonů) byla prováděna agarózová elektroforéza v 1% gelu. Popřípadě DGGE v polyakrylamidovém gelu (kap. 6.6.5, kap. 6.6.6). Následně byl pomocí transluminátoru, záznamového systému a programu GeneSnap from SynGene zaznamenán výsledek těchto metod (kap. 6.6.3).

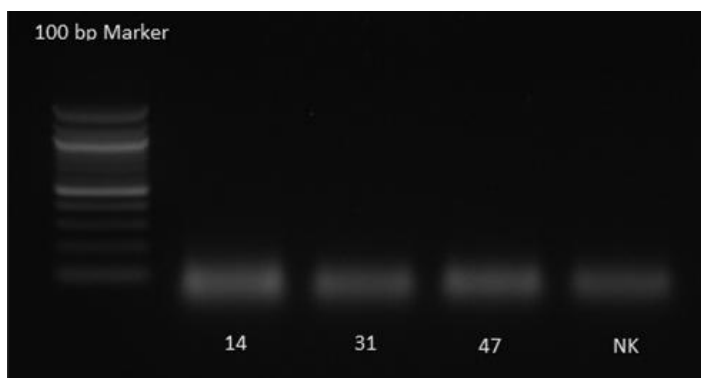
Jako standard pro porovnávání velikosti fragmentů DNA byl použitý DNA Marker – GeneRuler 100 bp, DNA Ladder 0,5 µg/µl (Thermo Scientific), v této práci označovaný jako 100 bp DNA Marker. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA identifikovaná jako termofilní aktinomyceta v rámci práce na UIOZP Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Negativní kontrola byla PCR směs bez přídavku templátové DNA. Pokud není v textu níže uvedeno jinak, je templátová DNA získávána z kultivace kultury při 58 °C.

#### 7.3.1 Optimalizace lyze a PCR cyklu – použité primery FD1 a RD1

Výslednému záznamu na *Obr. 28* předcházelo provedení lyze buněk degradérů PBAT pomocí roztoku lysozymu (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 20 µl bez přídavku hořčičných iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako klasická PCR (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
95 °C 7 min.	95 °C 1 min.	50 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30 s.	72 °C 10 min.
				

Na *Obr. 28* pod symboly označeny: 14 – půda č. 14, 31 – půda č. 31, 47 – půda č. 47, NK – negativní kontrola. Můžeme vidět, že výsledek nebyl uspokojivý, ve všech vzorcích se vyskytují jen bandy nezreagovaných primerů ve spodní části gelu. To může být způsobeno špatnou lyzí či špatnou volbou PCR programu (teplot při jednotlivých krocích, či délkou po kterou byla teplota udržována). Bohužel nebyla použita pozitivní kontrola, nejde tedy přibližně určit důvod negativního výsledku PCR reakce.



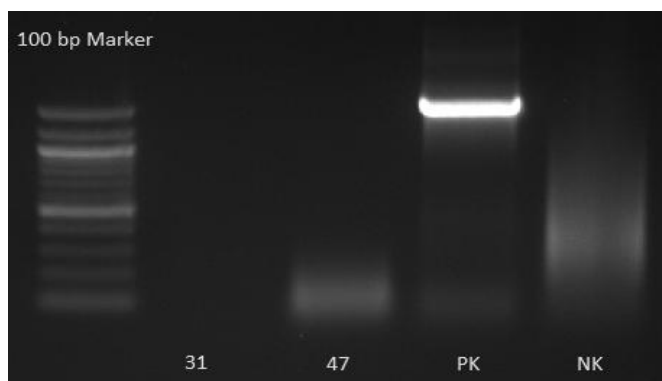
*Obr. 28: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí lysozymu, klasická PCR. 14 – půda č. 14, 31 – půda č. 31, 47 – půda č. 47, NK – negativní kontrola.*

Záznamu výsledku PCR reakce na *Obr. 29* předcházelo provedení lyze buněk degradérů PBAT, v případě vzorku půdy č. 31 pomocí roztoku lysozym (kap. 6.6.1) a u půdy č. 47 komerční kit High Pure PCR Template Preparation Kit (využívající lysozym a Tris HCl jako detergentů). Dále připravena PCR směs o objemu 20  $\mu$ l bez přídavku hořčičných iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako Touchdown PCR (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
95 °C 2 min.	95 °C 30 s.	57 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30 s.	95 °C 30 s.	52 °C 30 s.	72 °C 1 min. 30 s.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			24 x			

Na *Obr. 29* pod symboly označeny: 31 – půda č. 31, 47 – půda č. 47, PK - pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. Můžeme vidět, že výsledek nebyl uspokojivý, ve sloupci označeném 47 se vyskytují jen bandy nezreagovaných primerů ve spodní části gelu. Naproti tomu u PK vyšel amplikon s velikostí přibližně 1400 – 1500 bp. Negativní výsledek

může být způsobeno špatnou lyzí, ve formě znečištěné DNA jinými látkami nebo špatně či vůbec izolované DNA.

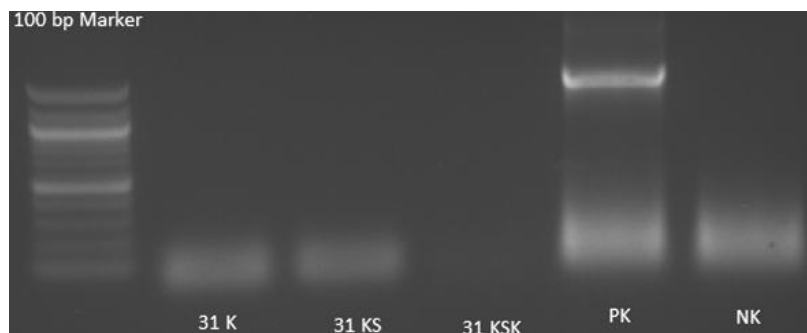


*Obr. 29: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí lysozymu (31) a komerčního kitu (47), Touchdown PCR. 31 – půda č. 31, 47 – půda č. 47, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.*

Výslednému záznamu na *Obr. 30* předcházelo provedení lyze buněk degradérů PBAT pomocí roztoku proteinázy K (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 20  $\mu$ l bez přídavku hořecnatých iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako klasická PCR (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
95 °C 7 min.	95 °C 1 min.	50 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30 s.	72 °C 10 min.
	} 35 x			

Na *Obr. 30* pod symboly označeny: 31K – půda č. 31 izolovaná roztokem proteinázy K, 31KS – půda č. 31 izolovaná roztokem proteinázy K a mechanickým působením skleněných kuliček, 31KSK – půda č. 31 izolovaná roztokem proteinázy K, mechanickým působením skleněných kuliček za použití kulového mlýnu, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. Můžeme vidět, že výsledek opět nebyl uspokojivý, ve sloupcích 31KS se vyskytují jen bandy nezreagovaných primerů ve spodní části gelu. Naproti tomu u PK vyšel amplikon opět s velikostí přibližně 1400 – 1500 bp. Negativní výsledek může být způsobeno špatnou lyzí, ve formě dalších příměsí k DNA (vnitrobuněčné látky) nebo špatně zvoleného lyzačního činidla či vůbec neizolovanou DNA.



Obr. 30: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí proteinázy K (modifikace postupu), klasická PCR. 31K – půda č. 31 (izolace proteináza K), 31KS – půda č. 31 (izolace proteináza K a skleněné kuličky), 31KSK – půda č. 31 (izolace proteináza K, skleněné kuličky a kulový mlýn), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

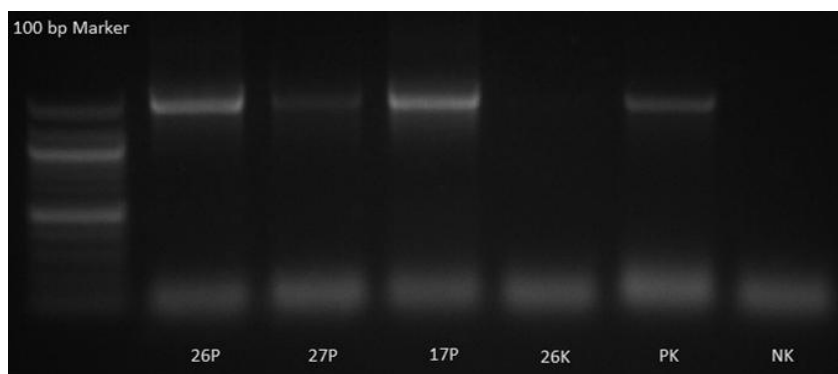
U výsledného záznamu zobrazeného na Obr. 31 předcházelo provedení lyze buněk degradérů PBAT pomocí roztoku proteinázy K a komerčního kitu (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 20  $\mu$ l bez přidavku hořčičných iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen klasická PCR (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
95 °C 7 min.	95 °C 1 min.	50 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30 s.	72 °C 10 min.
	35 x			

Na Obr. 31 pod symboly označeny: 26P – půda č. 26, 27P – půda č. 27, 17 – půda č. 17, u všech - 26P, 27P a 17P byla provedena izolace pomocí komerčního kitu PowerSoil Kit (kap. 6.6.1), 26K – půda č. 26 izolovaná pomocí roztoku proteinázy K (kap. 6.6.1), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. Můžeme sledovat, že stejně jako u PK se u vzorků ze sloupce 26P, 27P a 17P byli zaznamenány amplikony o velikosti 1400 až 1500 bp. Nicméně vzorek 27P vykazoval slabší odezvu, tzv. slabší band (vyjadřuje koncentraci amplifikovaných fragmentů DNA). Po zhodnocení PCR cyklu a PCR směsi byla pravděpodobně slabší koncentrace templátové DNA tohoto vzorku. Tyto tři PCR produkty (26P, 27P a 17P) byli následně purifikovány a odesláni na sekvenci do fy. SEQme Dobříš. Sekvence vzorků 26P a 17P nebyli dostačující pro jejich identifikaci. Organismus ve vzor-



ku 27P byl identifikován shodou sekvence 96 % jako *Geobacillus sp.*, což bylo považováno jako negativní výsledek z důvodu snahy o identifikaci termofilních aktinomycet degradující PBAT. Ukazuje nám to také na problém nedostatečné čistoty kultury degradérů PBAT, kdy vizuálně nebyla zjištěna kontaminace. Nicméně stále byla přítomna v blízkosti kolonie degradérů PBAT i jiná mikrobiální kultura než termofilní aktinomyceta.



Obr. 31: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí proteinázy K a komerčního kitu, klasická PCR. 26P – půda č. 26 (izolace Power SoilKit), 27P – půda č. 27 (izolace Power SoilKit), 17P – půda č. 17 (izolace Power SoilKit), 26K – půda č. 26 (izolace proteináza K), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

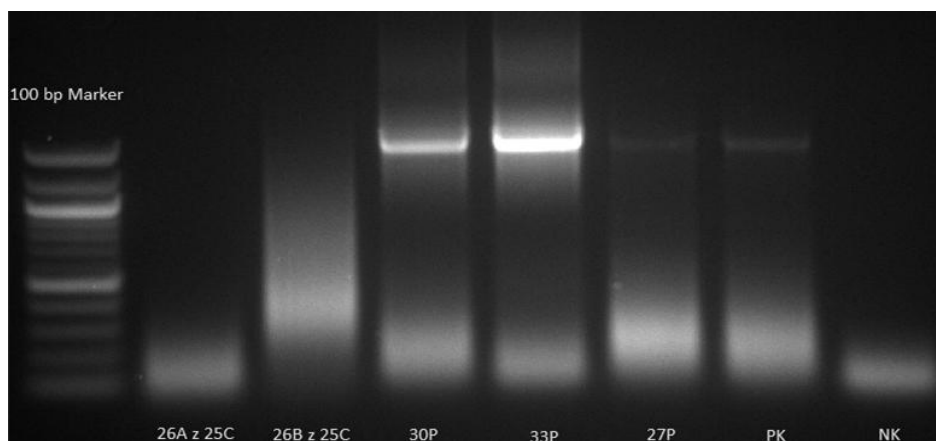
Na Obr. 32 byl zaznamenán výsledek PCR, kterému předcházelo provedení lyze buněk degradérů PBAT pomocí povaření a komerčního kitu (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 20  $\mu$ l bez přídavku hořčičných iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako klasická PCR (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 7 min.	94 °C 1 min.	50 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30 s.	72 °C 10 min.
} 35 x				

Na Obr. 32 pod symboly označeny: 26A z 25C – půda č. 26 kultivována při 25 °C (kap. 7.2.2) izolována povařením ve sterilní vodě po dobu 1 hod., 26A z 25C – půda č. 26 kultivována při 25 °C (kap. 7.2.2) izolována povařením ve sterilní vodě po dobu 10 min., u sloupců 30P, 33P, 27P byla templátová DNA izolována pomocí PowerSoil Kitu, 30P – půda č. 30, 33P – půda č. 33, 27P – půda č. 27, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní

kontrola. PK a 27 P se jeví jako amplikony s malou koncentrací amplifikovaných fragmentů DNA, nicméně to bylo dáno skutečností, že amplikony ze sloupce 30P a 33P vykazují silnou odezvu (vysoká koncentrace amplifikovaných fragmentů DNA). Velikost fragmentů u daných amplikonů byla určena přibližně 1400 až 1500 bp. Šmouhy vzniklé u sloupce 26B z 25C může být způsobeno špatnou templátovou DNA, která je rozrušena na fragmenty menší než měli být fragmenty amplifikovány pomocí použitých primerů. PCR produkty pro vzorky 30P, 33P i 27P byly následně purifikovány a odeslány na sekvenci do fy. SEQme Dobříš. Organismus ze vzorku 30P byl identifikován se shodou sekvence 97 % jako *Geobacillus sp.* a u vzorku 33P byl identifikován se shodou sekvence 93 % *Geobacillus thermoglucosidasius*. Opět tedy nebyla dostačující čistota kultivované kultury.

Naproti tomu sekvence u 27P byla identifikována pro organismus *Thermobispora bispora* se shodou sekvence 97%. Sekvence uvedena v příloze PIII. Jedná se o termofilní aktinomycetu.



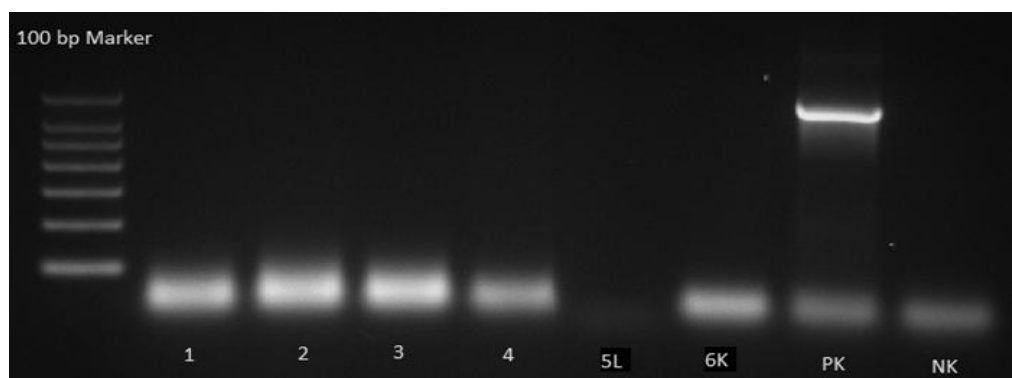
Obr. 32: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí povaření a komerčního kitu, klasická PCR. 26A z 25C – půda č. 26 kultivace při 25 °C (izolace povařením 1 hod.), 26A z 25C – půda č. 26 kultivace při 25 °C (izolace povařením 10 min..), 30P – půda č. 30 (izolace Power SoilKit), 33P - půda č. 33 (izolace Power SoilKit), 27P – půda č. 27 (izolace Power SoilKit), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Výslednému záznamu na Obr. 33 předcházelo provedení lyze buněk degradérů PBAT kultivovaných při 25 °C, pomocí mikrovlnné trouby, roztoku proteinázy K a roztoku lysozymu (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 20 µl bez přídavku hořčičných iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako klasická PCR (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 4 min.	94 °C 1 min.	52 °C 1 min.	72 °C 1 min. 45 s.	72 °C 10 min.
} 35 x				

Na *Obr. 33* byla amplifikována templátová DNA získána z biomasy kultury kultivované při 25 °C, izolována odlišnými způsoby. Označení sloupců: 5L – izolace roztokem lysozymu, 6K – izolace roztokem proteinázy K, 1 – biomasa umístěna do 10 µl sterilní vody a v uzavřené mikrozkuhavce umístěna do mikrovlnné trouby na 2 min. (výkon: 800W), u ostatních vzorků byly odlišné objemy sterilní vody a doba působení mikrovlnného záření, proto dále byly jen symbolicky uvedeny objemy a časy. 2 – 100 µl + 2 min., 3 – 10 µl + 4 min., 4 – 100 µl + 4 min.

Můžeme vidět, že výsledek nebyl uspokojivý, ve všech sloupcích (až na 5L) se vyskytují jen bandy nezreagovaných primerů ve spodní části gelu. Jak již bylo dříve uvedeno, to je pravděpodobně způsobeno špatně izolovanou templátovou DNA. PCR cyklus byl zvolen správně, protože výsledkem PK byl amplikon o velikosti 1400 až 1500 bp. Použitými teplotami či délkami cyklů u PCR reakce to tedy nemůže být zapříčiněno.

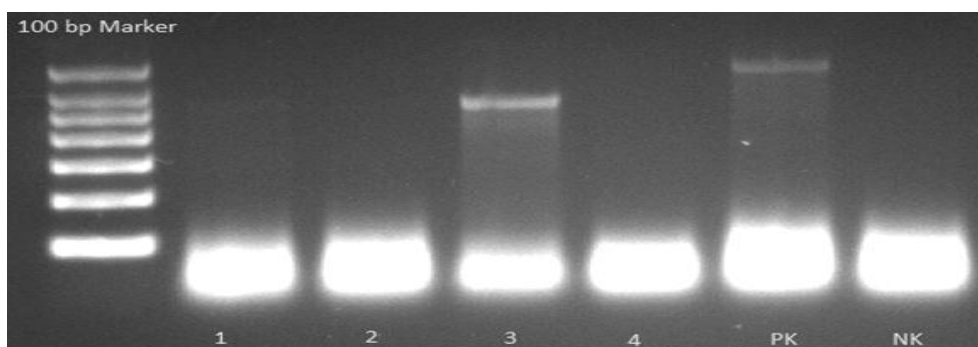


*Obr. 33: PCR reakce s DNA izolovanou více způsoby, klasická PCR. Všechny vzorky půda č. 26 kultivace při 25 °C. Izolace pomocí povaření v mikrovlnné troubě: 1 – 10 µl sterilní vody+2 min., 2 – 100 µl sterilní vody+2 min., 3 - 10 µl sterilní vody+4 min., 4 – 100 µl sterilní vody+4 min. Izolace pomocí lysozymu - sloupec 5L. Izolace pomocí proteinázy K – sloupec 6K. PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.*

K výslednému záznamu PCR na *Obr. 34* byla potřeba izolovaná templátová DNA, získaná v tomto případě mechanickou lyzí buněk (kap. 6.6.1). Bylo použito vortexování biomasy se skleněnými kuličkami ve sterilní vodě (odlišný objem vody i množství použité biomasy). Byli zkoumáni degradéři PBAT kultivovaní při 25 °C, konkrétně půda č. 26. Dále připravena PCR směs o objemu 20 µl bez přidavku hořčičných iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako klasická PCR (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 4 min.	94 °C 1 min.	52 °C 1 min.	72 °C 1 min. 45 s.	72 °C 10 min.
	} 35 x			

Na *Obr. 34* pod označením sloupců byly provedeny následující modifikace mechanické lyze, měnilo se množství použité biomasy a množství sterilní vody použité jako prostředí průběhu lyze, dále proto jen zkratkovitě (množství biomasy + objem sterilní vody): 1 - biomasa z celé plochy misky + 100 µl, 2 – biomasa z jedné kolonie + 100 µl. U sloupců 3 a 4 bylo použito 10x ředění vzorků templátové DNA pro sloupce 1 a 2, tedy 3 – 10x ředěn vzorek 1, 4 – 10x ředěn vzorek 2. Na *Obr. 34* byla zaznamenána PK amplikon s velikostí 1400 až 1500 bp. Dále pak amplikon u sloupce 3, nicméně zde byla velikost 1100 bp. PCR produkt ze vzorku označeného č. 3 byl následně purifikován a odeslán na sekvenci do fy. SEQme Dobříš. Sekvence nebyla dostačující pro jeho identifikaci.



*Obr. 34: PCR reakce s DNA izolovanou mechanickým působením skleněných kuliček ve sterilní vodě, klasická PCR. Všechny vzorky půda č. 26 kultivace při 25 °C. 1 – biomasa z celé misky do 100 µl, 2 – jedna kolonie do 100 µl, 3 - biomasa z celé misky do 100 µl (10x ředěno), 4 - jedna kolonie do 100 µl (10x ředěno), PK - pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.*

Výslednému záznamu na *Obr. 35* předcházelo provedení lyze buněk degradérů PBAT v *Tab. 10* popsané (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 20 µl bez přídavku hořčičných iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako klasická PCR (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 4 min.	94 °C 1 min.	52 °C 1 min.	72 °C 1 min. 45 s.	72 °C 10 min.
38 x				

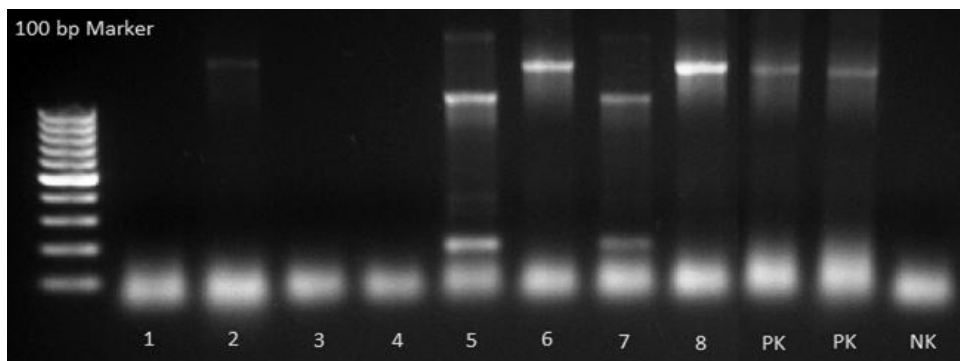
Bylo přiděleno označení sloupcům na *Obr. 35* podle vzorkům templátové DNA dodané do PCR směsi takto dle *Tab. 10*:

*Tab. 10: Popis sloupců pro provedenou PCR reakci na Obr. 38*

Označení sloupce	Vzorek půdy	Lyze buněk
<b>1</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	biomasa z jedné kolonie byla převedena do mikrozkuřavky s 10 µl sterilní vody a umístěna do mikrovlnné trouby (800W) po dobu 2 minut (kap. 6.6.1)
<b>2</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	
<b>3</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C (10x ředěno)	
<b>4</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C (10x ředěno)	
<b>5</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	pomocí komerčního kitu Power-Soil Kit (kap. 6.6.1)
<b>6</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	
<b>7</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C (10x ředěno)	
<b>8</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C (10x ředěno)	

Pro PCR reakci byly použity dvě stejné PK (jen jiné alikvoty) z důvodu ověření kvality příslušné skladované kontrolní DNA. Na obrázku došlo ke špatnému rozseparování DNA markeru, kde na obrázku chybí 1500 bp fragment DNA standardu. U sloupců 6 a 8 byl zaznamenán ampikon o velikosti v rozmezí 1000 až 1500 bp. Zatímco u sloupců 5 a 6 byly patrné nespecifické bandy ve spodní oblasti obrázku, ty byly pravděpodobně způsobeny nadměrným počtem cyklů při PCR reakci nebo nepřiměřeně dlouhou dobou elongace, pro tento očividně kratší ampikon o velikosti přibližně 1000 bp. Další možností by mohla

být kontaminace komponentů či vysoká koncentrace primerů, nicméně tato chyba způsobující nespecifické bandy se vztahoval jen ke dvěma sloupcům, tím byl tedy vyvozen závěr, že kontaminace v tomto případě není pravděpodobně příčinou nespecifických bandů.

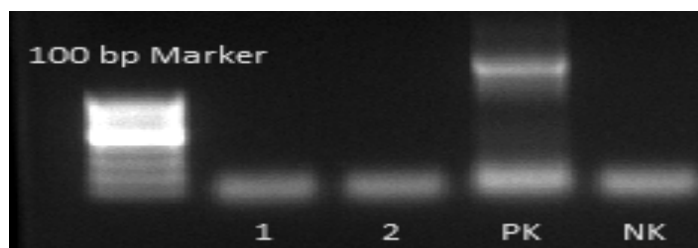


*Obr. 35: : PCR reakce s templátovou DNA získanou více způsoby, klasická PCR. Sloupce: 1, 3, 5 a 7 → půda č. 26 kultivace při 25 °C. Sloupce: 2, 4, 6 a 8 → půda č. 27 kultivace při 58 °C. Provedení lyze: 1, 2 – biomasa + 10 μl sterilní vody + 2 min. mikrovlnná trouba, 3,4 – biomasa + 10 μl sterilní vody + 2 min. mikrovlnná trouba (10x ředěno), 5,6 – PowerSoil Kit, 7, 8 – PowerSoil Kit (10x ředěno), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.*

Výslednému záznamu zobrazeného na *Obr. 36* předcházelo provedení lyze buněk degradérů PBAT pomocí chloroformu/izoamylalkoholu (24:1) (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 20 μl s přidavkem hořečnatých iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako Touchdown PCR (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 4 min.	94 °C 1 min.	57 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30 s.	94 °C 1 min.	52 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30 s.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			24 x			

Na *Obr. 36* byl zobrazen amplikon PK, nicméně výsledek pro vzorky ve sloupci 1 – půda č. 26 z kultivace při 25 °C a sloupci 2 - půda č. 26 z kultivace při 25 °C (50x ředěno) byly negativní, zobrazeny jen bandy nezreagovaných primerů ve spodní části sloupců. Pravděpodobně způsobeno nekvalitní templátovou DNA.



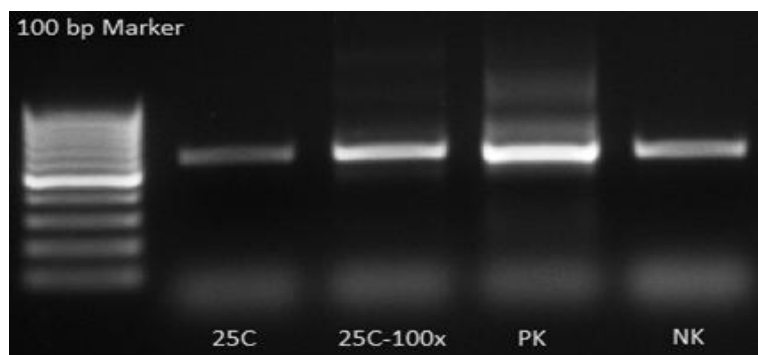
Obr. 36: PCR reakce s templátovou DNA získanou lyzí chloroform/izoamylalkoholem (24:1), Touchdown PCR. Sloupce: 1 – půda č. 26 kultivace při 25 °C 2 – půda č. 26 kultivace při 25 °C (50x ředěno), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

### 7.3.2 Optimalizace lyze a PCR cyklu – použití kombinací primerů

Díky výsledkům zjištěným z Obr. 35, kde byl zaznamenán amplicon o velikosti přibližně 1000 bp z půdy č. 26 kultivované při 25 °C, byla provedena PCR se vzorky templátové DNA znovu, s primery F341 a R907. Ty zajišťují průběh amplifikace kratšího úseku genu 16S rRNA na templátové DNA než primery FD1 a RD1. Byl také zvolen PCR cyklus Touchdown PCR (kap. 6.6.2). Reakční objem směsi s přidavkem hořečnatých iontů byl 30  $\mu$ l (kap. 6.6.2).

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 2 min.	94 °C 30 s.	61 °C 1 min.	72 °C 1 min.	94 °C 30 s.	56 °C 30 s.	72 °C 1 min.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			34 x			

Na Obr. 37 byl zobrazen výsledný záznam PCR. Lyze buněk byla provedena přenesením biomasy z jedné kolonie do sterilní mikrozkuřavky s 10  $\mu$ l sterilní vody. Dále pak povařením v mikrovlnné troubě (800W) po dobu 2 minut. Tato DNA byla použita do PCR reakční směsi sloupce 25C, dále pak naředěna 100x do sloupce 25C-100x. Byla použita PK – pozitivní kontrola a NK – negativní kontrola. Výsledkem ve sloupci 25C i 25C-100x bylo zaznamenání ampliconů o velikosti přibližně 600 až 700 bp. Produkty PCR směsi vzorků zastoupených těmito dvěma sloupci byly purifikovány a odeslány na sekvenci do fy. SEQme Dobříš. Sekvence nebyly dostačující pro identifikaci vzorků, z důvodu nízké koncentrace fragmentů DNA nebo nekvalitních fragmentů DNA.



Obr. 37: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí povaření v mikrovlnné troubě, Touchdown PCR. 25C – půda č. 26 kultivace při 25 °C, 25C-100x – půda č. 26 kultivace při 25 °C ředěno 100x, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Výslednému záznamu na Obr. 38 předcházelo provedení lyze buněk degradérů PBAT pomocí Y-PER bufferu a chloroformu/izoamylalkoholu (24:1) (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 30  $\mu$ l s přidavkem hořčičných iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako Touchdown PCR (kap. 6.6.2). Použité primery: F341 a R907.

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 2 min.	94 °C 30 s.	61 °C 30 s.	72 °C 1 min.	94 °C 30 s.	56 °C 30 s.	72 °C 1 min.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			34 x			

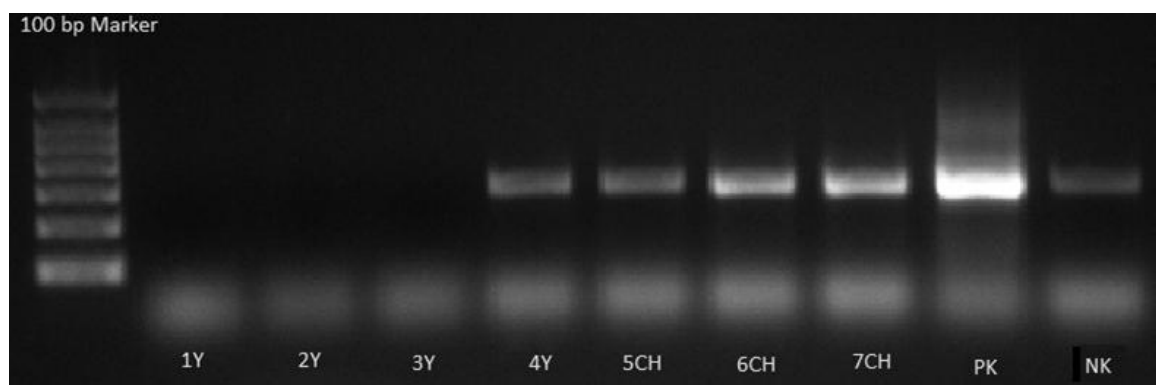
Na Obr. 38 byla templátová DNA pro sloupce získána následujícími metodami, kdy biomasa byla pro lyzi odebírána dvěma způsoby: pro 1Y, 3Y, 5CH, 7CH biomasa odebrána z jedné kolonie pomocí sterilní špičky automatické pipety, pro 2Y, 4Y, 6CH biomasa odebrána z jedné kolonie pomocí sterilního párátko. Původ vzorků a metoda lyze zaznamenána v Tab. 11. Dále pak PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.



Tab. 11: Popis sloupců pro provedenou PCR reakci na Obr. 38

Označení sloupce	Vzorek půdy	Lyze buněk
<b>1Y</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	Y-PER buffer (kap. 6.6.1)
<b>2Y</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	
<b>3Y</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	
<b>4Y</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	
<b>5CH</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	Chloroform/izoamylalkohol (24:1) (kap. 6.6.1)
<b>6CH</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	
<b>7CH</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	

Všechny amplikony (Sloupce 4Y, 5CH, 6CH a 7CH) na *Obr. 38* byly vyhodnoceny jako fragmenty o velikosti 300 až 400 bp. Byl zaznamenán band i u NK, což není standardní, může to být způsobeno kontaminací některé ze složek PCR směsi. Proto bylo provedeno opakování celé této PCR s použitím psoralenu, k zamezení vlivu případné kontaminace.



*Obr. 38: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí Y-PER bufferu nebo chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. 1Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, Y-PER), 2Y - půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, Y-PER), 3Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (špička, Y-PER), 4Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko, Y-PER), 5CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, chloroform/izoamylalkohol), 6CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, chloroform/izoamylalkohol), 7CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (špička, chloroform/izoamylalkohol), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.*

Výslednému záznamu na *Obr. 39* byl tedy opakováním předcházejícího PCR záznamu s použitím psoralenu do PCR směsi (0,3 µl na úkor objemu sterilní vody). Lyze buněk degradérů PBAT stejná, pomocí Y-PER bufferu a chloroformu/izoamylalkoholu (24:1) (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 30 µl s přidavkem hořčičných iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako Touchdown PCR (kap. 6.6.2). Použité primery: F341 a R907.

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 2 min.	94 °C 30 s.	61 °C 1 min.	72 °C 1 min.	94 °C 30 s.	56 °C 30 s.	72 °C 1 min.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			34 x			

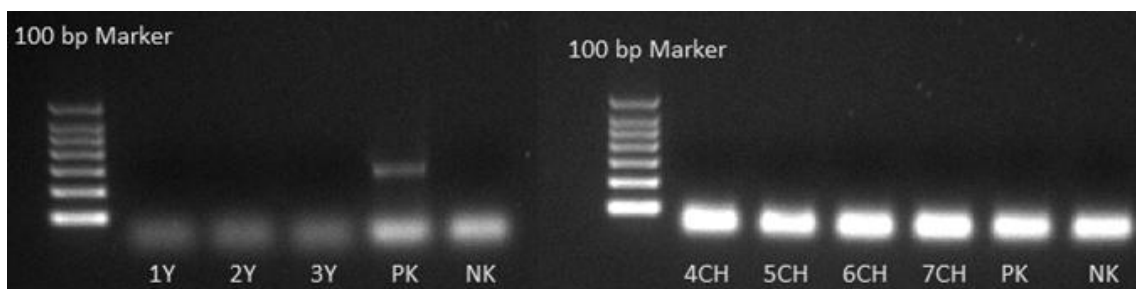
Na *Obr. 39* byla templátová DNA pro sloupce získávána dle následující *Tab. 12*:

*Tab. 12: Popis sloupců pro provedenou PCR reakci na Obr. 39.*

Označení sloupce	Vzorek půdy	Lyze buněk
<b>1Y</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	Y-PER buffer (kap. 6.6.1)
<b>2Y</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	
<b>3Y</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	
<b>4CH</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	Chloroform/izoamylalkohol (24:1) (kap. 6.6.1)
<b>5CH</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	
<b>6CH</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	
<b>7CH</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	

Biomasa byla pro tuto lyzi odebírána dvěma způsoby: pro 1Y, 3Y, 4CH, 6CH biomasa odebrána z jedné kolonie pomocí sterilní špičky automatické pipety, pro 2Y, 5CH, 7CH biomasa odebrána z jedné kolonie pomocí sterilního párátko. Dále pak PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. Na *Obr. 39* byl zaznamenán jen ampikon u PK v levé části obrázku. Pro PK v pravém byl použit jiný alikvot stejné DNA, pravděpodobně tato DNA již byla porušena a nedošlo k potřebné amplifikaci. Výsledek záznamu PCR reakce byl neuspokojivý. Příčina negativního výsledku pravděpodobně spočívala v templátové DNA použité do PCR směsi. Pro další PCR reakce bylo navrženo zředění templátové DNA získané lyzí pomocí Y-PER buffru a tím i zředění přítomných vnitrobuněčných ne-

čistot. U templátové DNA získané lyzí pomocí chloroform/izoamylalkoholu (24:1) bylo navrženo opakování PCR.



Obr. 39: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí Y-PER bufferu nebo chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. 1Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, Y-PER), 2Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, Y-PER), 3Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (špička, Y-PER), 4CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, chloroform/izoamylalkohol), 5CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, chloroform/izoamylalkohol), 6CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (špička, chloroform/izoamylalkohol), 7CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko, chloroform/izoamylalkohol), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Výslednému záznamu na Obr. 40 byl tedy opakováním předcházejícího PCR záznamu s použitím ředění templátové DNA do PCR směsi, také použit psoralen (0,3 μl na úkor objemu sterilní vody). Lyze buněk degradérů PBAT stejná, pomocí Y-PER bufferu a chloroformu/izoamylalkoholu (24:1) (kap. 6.6.1). Dále připravena PCR směs o objemu 30 μl s přidavkem hořčnatých iontů (kap. 6.6.2). PCR cyklus byl volen jako varianta Touchdown PCR (kap. 6.6.2). Použité primery: F341 a R907.

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 2 min.	94 °C 30 s.	61 °C 30 s.	72 °C 1 min.	94 °C 30 s.	56 °C 30 s.	72 °C 1 min.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			34 x			

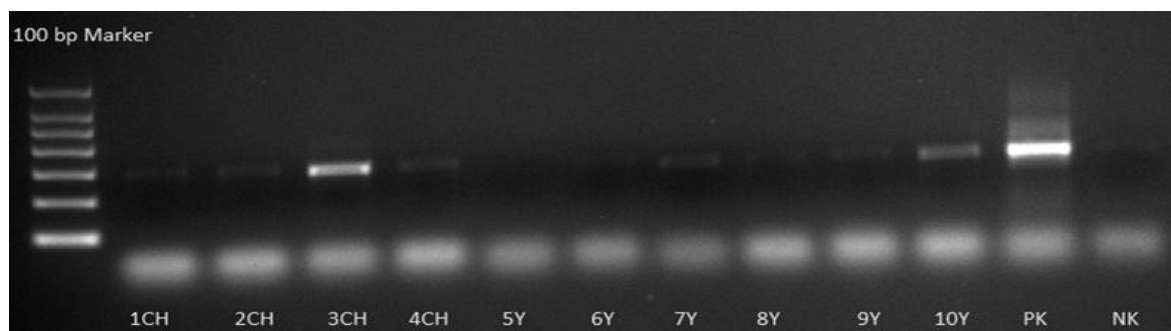
Na Obr. 40 byla templátová DNA pro sloupce získávána dle následující Tab. 13. Biomasa byla pro tuto lyzi odebírána dvěma způsoby: pro 1CH, 3CH, 5Y, 7Y, 8Y, 10Y biomasa odebrána z jedné kolonie pomocí sterilního párátka, pro 2CH, 4CH, 6Y, 9Y bio-

masa odebrána z jedné kolonie pomocí sterilní špičky automatické pipety. Dále pak PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Tab. 13: Popis sloupců pro provedenou PCR reakci na Obr. 40.

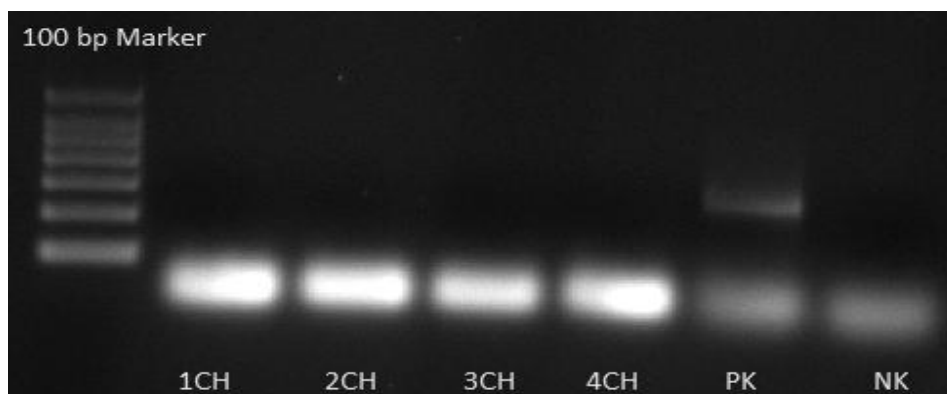
Označení sloupce	Vzorek půdy	Ředění	Lyze buněk
<b>1CH</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	1x	Chloroform/izoamylalkohol (24:1) (kap. 6.6.1)
<b>2CH</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	1x	
<b>3CH</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	1x	
<b>4CH</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	1x	
<b>5Y</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	10x	Y-PER buffer (kap. 6.6.1)
<b>6Y</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	10x	
<b>7Y</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	10x	
<b>8Y</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	100x	
<b>9Y</b>	č. 26 z kultivace při 25 °C	100x	
<b>10Y</b>	č. 27 z kultivace při 58 °C	100x	

Na Obr. 40 byl zaznamenán amplikon u PK o velikosti přibližně 400 až 500 bp. Dále byl zaznamenán pozitivní výsledek se silnou odezvou u sloupců 3CH a 10Y. U sloupců 1CH, 2CH, 4CH byli zaznamenány slabě, proto byla navržena opakovaná PCR.



*Obr. 40: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí Y-PER bufferu nebo chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. CH = chloroform/izoamylalkohol, Y=Y-PER buffer, 1CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko), 2CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička), 3CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko), 4CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (špička), 5Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, 10x ředěno), 6Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, 10x ředěno), 7Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko, 10x ředěno), 8Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, 100x ředěno), 9Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, 100x ředěno), 10Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko, 100x ředěno), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.*

Na *Obr. 41* byl proveden záznam modifikace Nested PCR - opakované PCR (kap. 6.6.2) k *Obr. 40*, jednalo se o metodu stejného PCR programu, stejně použitých primerů i stejného složení PCR směsi. Jako templátová DNA u opakované PCR byla volena směs ze stripů po provedeném 1. kroku PCR – z PCR produktu (vzorky: 1CH a 2CH). Sloupec 3CH zastupoval 10x ředěnou templátovou DNA z 1CH a sloupec 4CH zastupoval 10x ředěnou templátovou DNA z 2CH. Byl použit také roztok psoralenu (0,3 µl). Výsledný záznam nezobrazoval žádný amplikon, jen v případě pozitivní kontroly (přibližně 300 až 400 bp), což nasvědčuje správnosti PCR cyklu a volbě PCR směsi. Problém tedy spočíval pravděpodobně v templátové DNA.

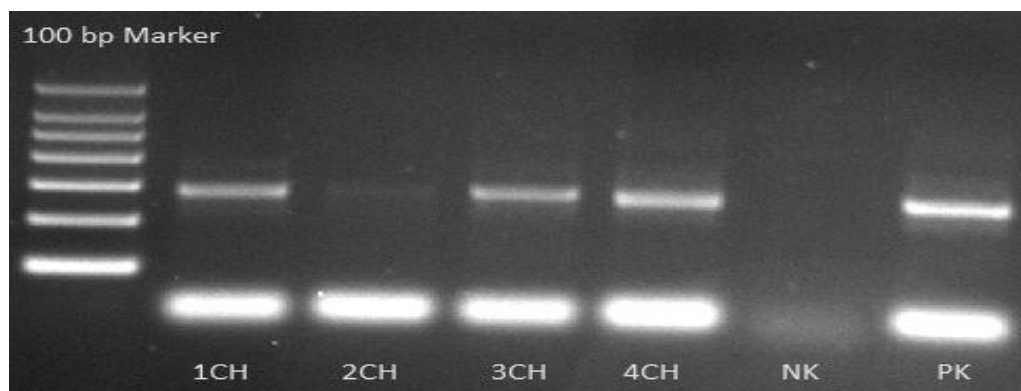


*Obr. 41: Modifikace Nested PCR – opakovaná PCR. Templátová DNA vzata z předchozího PCR produktu (Obr. 41). 1CH – 1CH produkt, 2CH – 2CH produkt, 3CH – 1CH produkt (ředěno 10x), 4CH – 2CH produkt (ředěno 10x), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.*

Byla znovu izolována templátová DNA z nové biomasy pomocí lyze buněk chloroform/izoamylalkoholem (24:1) (kap. 6.6.1). Výsledný záznam PCR produktů byl zobrazen na *Obr. 42*. Objem PCR směsi byl 20  $\mu$ l s přidavkem hořčičných iontů a také psoralenu (kap. 6.6.2). Jako PCR cyklus byl zvolen Touchdown PCR. Použité primery: F341 a R907.

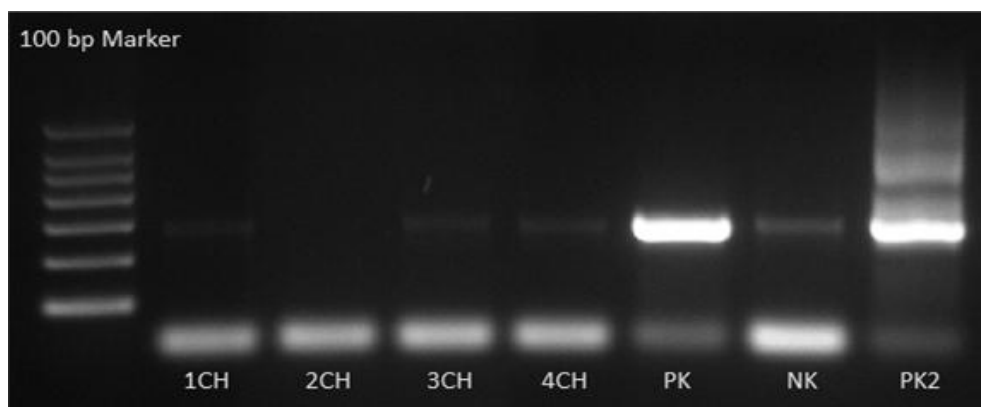
Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 2 min.	94 °C 30 s.	61 °C 1 min.	72 °C 1 min.	94 °C 30 s.	56 °C 30 s.	72 °C 1 min.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			34 x			

Pro sloupce *Obr. 42* byla použita templátová DNA do PCR směsi následovně: 1CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C, 2CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, 3CH – 10x ředění templátové DNA stejné jako u 1CH, 4CH – 10x ředění templátové DNA stejné jako u 2CH, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. Na *Obr. 42* byly zaznamenány amplikony u 1CH, 3CH, 4CH o velikosti přibližně 300 až 400 bp. PK vyšla také pozitivně. U sloupce 2CH tedy pravděpodobně došlo k nepřiměřenému naředění templátové DNA v PCR směsi. Zbylé produkty PCR byl dále purifikován a odeslán na sekvenci do fy. SEQme Dobříš. Sekvence nebyly dostačující pro identifikaci. Pravděpodobně z důvodu nekvalitní templátové DNA, kdy došlo k špatnému provedení amplifikace, tím byla tedy nekvalitní sekvence fragmentů DNA.



*Obr. 42: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. 1CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C, 2CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, 3CH – 10x ředění templátové DNA k 1CH, 4CH – 10x ředění templátové DNA k 2CH, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.*

Byl znovu proveden experiment modifikace Nested PCR – opakované PCR, s cílem zvýšení koncentrace amplikonů v PCR produktu. Vše bylo provedeno stejně jako u záznamu z *Obr. 42* (což byl 1. krok opakované PCR). Jako templátová DNA byl použit PCR produkt z 1. kroku. Výsledný záznam na *Obr. 43* vykazuje slabší amplikony než byly určeny u výchozích PCR produktů. Tento výsledek je neuspokojivý a nevede ke zlepšení samotné klasické PCR. Proto bylo také na dalším zhodnocení, zda tato metoda bude vhodná pro její další provádění. Z teorie fungování samotné Nested PCR a nasedání primerů, by měla tato metoda probíhat bez jakéhokoli problému. Vše nasvědčuje, že chyba byla již při prvním kroku PCR, kdy pravděpodobně nedošlo k vytvoření fragmentů o požadované kvalitě (proto také pravděpodobně probíhalo neúspěšné sekvenování fragmentů z jiných PCR).



*Obr. 43: Modifikace Nested PCR – opakovaná PCR. Templátová DNA vzata z předchozího PCR produktu (Obr. 43). 1CH – 1CH produkt, 2CH – 2CH produkt, 3CH – 3CH produkt, 4CH – 4CH produkt, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.*

Byla znovu izolována templátová DNA z nové biomasy pomocí lyze buněk chloroform/izoamylalkoholem (24:1) (kap. 6.6.1). Výsledný záznam PCR produktů byl zobrazen na *Obr. 44*. Objem PCR směsi byl 20  $\mu$ l s přidavkem hořčičných iontů a také psoralenu (kap. 6.6.2). Jako PCR cyklus byla zvolena varianta Touchdown PCR. Použité primery: FD1 a 518R, FD1 a 907R, 341F a RD1, 341F a 907R, 341F a 518R.

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 4 min.	94 °C 1 min.	60 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30s.	94 °C 1 min.	57 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30s.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			24 x			

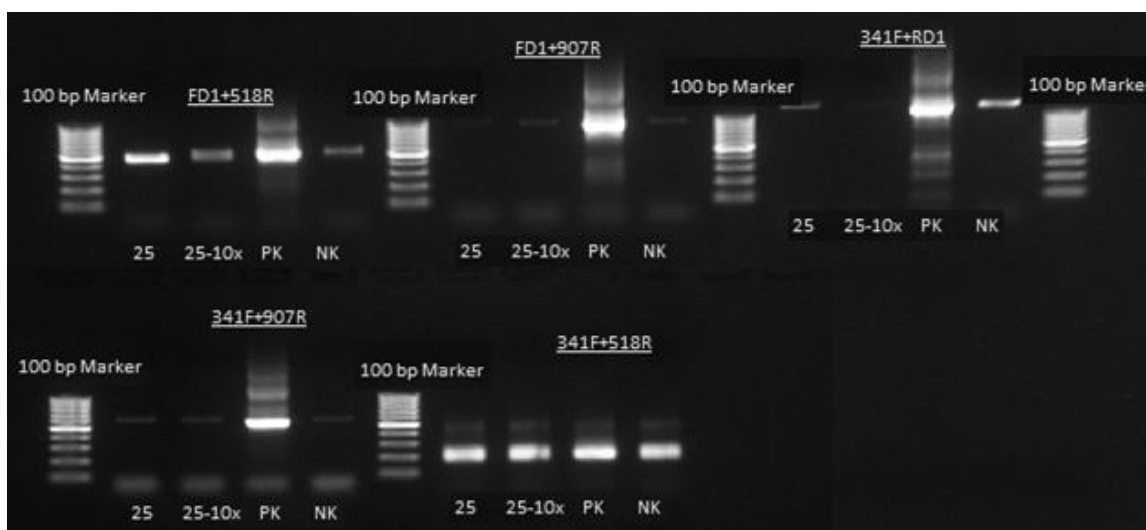
Do PCR směsi byla použita templátová DNA ze vzorku půdy č. 26 kultivované při 25 °C. Přičemž sloupec na záznamu z agarózové elektroforézy na *Obr. 44* označený 25 zastupoval neředěnou DNA a 25-10x zastupoval tuto DNA 10 krát ředěnou, dále pak PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Na *Obr. 44* byly zaznamenány amplikony při použití primerů FD1 a 518R o velikosti přibližně 500 bp. Nicméně zde byla i viditelná negativní kontrola, i přes použití psoralenu, který by měl případnou kontaminaci eliminovat. Použití primerů FD1 a 907R nemělo pozitivní výsledek, amplikony byly zanedbatelné. Stejně tak v případě použití primerů 341F a 907R. Kombinace primerů 341F a RD1 vykazovala výrazné amplikony jen u



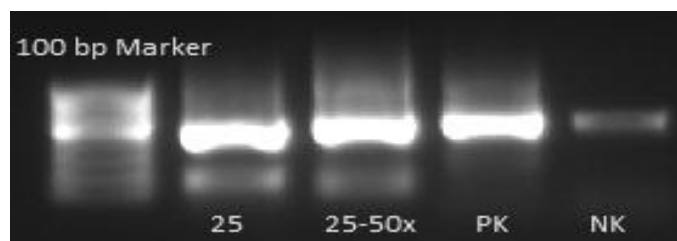
pozitivní a negativní kontroly. Amplikony vzorků byly zanedbatelné. Při použití primerů 341F a 518R byli výsledkem výrazné amplikony, nicméně také přítomné dimery. Tento výrazný amplikon byl přítomen i u negativní kontroly, proto tento výsledek není použitelný.

Ve výsledku byl využit PCR produkt s použitými primery FD1 a 518R, pro modifikaci Nested PCR – opakovanou PCR. Ostatní PCR produkty dle agarózové elektroforézy nevykazovaly pozitivní výsledek PCR, pravděpodobně příčina byla v nevhodné kombinaci primerů či špatném PCR cyklu.



Obr. 44: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. Použití kombinací primerů viz obrázek. 25 – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, 25-10x – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, ředěno 10x, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Na Obr. 45 byl proveden záznam modifikace Nested PCR - opakované PCR (kap. 6.6.2) k Obr. 44, jednalo se o metodu stejného PCR programu, stejně použitých primerů i stejného složení PCR směsi. Jako templátová DNA u opakované PCR byla volena směs ze stripů po provedeném 1. kroku opakované PCR s primery FD1 a 518R – z PCR produktu (vzorky: 25 a 25-10x). Výsledný záznam zobrazuje amplikony, o velikosti přibližně 400 až 500 bp. Produkty PCR směsi vzorků zastoupených těmito dvěma sloupci byly purifikovány a odeslány na sekvenci do fy. SEQme Dobříš. Sekvence nebyly dostačující pro identifikaci vzorků.



Obr. 45: Modifikace Nested PCR – opakovaná PCR. Templátová DNA vzata z předchozího PCR produktu (Obr. 44). 25 – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, 25-10x – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, ředěno 10x, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

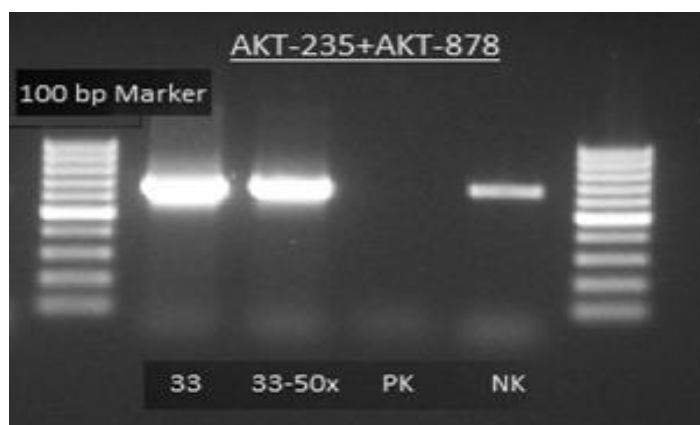
Byla izolována templátová DNA z biomasy mikrobiální kultury půdy č. 33 kultivované při 58 °C. Lyze buněk byla provedena chloroform/izoamylalkoholem (24:1) (kap. 6.6.1). Výsledný záznam PCR produktů byl zobrazen na Obr. 46. Objem PCR směsi byl 20  $\mu$ l s přidavkem hořčičných iontů (kap. 6.6.2). Jako PCR cyklus byl zvolen Touchdown PCR. Použité primery: S-C-Act-235 a S-C-Act-878.

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 4 min.	94 °C 1 min.	60 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30s.	94 °C 1 min.	57 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30s.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			24 x			

Do PCR směsi byla použita templátová DNA ze vzorku půdy č. 33 kultivované při 58 °C. Přičemž sloupec na záznamu z agarózové elektroforézy na Obr. 46 označený 33 zastupoval neředěnou DNA a 33-50x zastupoval tuto DNA 50 krát ředěnou, dále pak PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Na Obr. 46 byly zaznamenány amplikony ve sloupcích 33 i 33-50x o velikosti přibližně 600 až 700 bp. Ve sloupci pro PK nebyl zaznamenán žádný amplikon, to bylo vysvětleno špatným vzorkem templátové DNA použitou pro pozitivní kontrolu. Nicméně u NK byl zaznamenán amplikon o velikosti 600 až 700 bp. PCR produkty vzorků 33, 33-50x a NK (zjištění možné kontaminace) byli purifikováni a odesláni na sekvenci do fy. SEQ-me Dobříž. Výsledkem sekvenování bylo identifikování organismu se shodou sekvence 98% jako *Actinomadura rubrobrunea* pro vzorky 33 i 33-50x. Sekvence uvedena

v PŘÍLOZE PIII. Jedná se o termofilní aktinomycetu. Výsledek pro negativní kontrolu byl jen informativní, kdy byl identifikován organismus se shodou sekvence *Propionibacterium acnes* se shodou sekvence 95% (jedná se o grampozitivní bakterii, z řádu *Actinomycetales*, poškozující kůži).



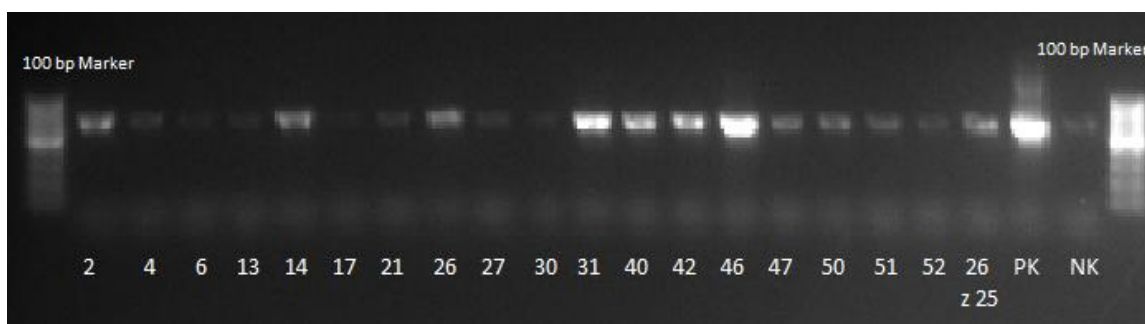
Obr. 46: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. Použití specifických primerů pro aktinomycety. 33 – půda č. 33 z kultivace při 58 °C; 33-50x – půda č. 33 z kultivace při 58 °C, ředěno 50x; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola.

Byla izolována templátová DNA z biomasy mikrobiálních kultur uschované v mikrozkušavkách v glycerolu při -80 °C z půd č. 2, 4, 6, 13, 14, 17, 21, 26, 27, 30, 31, 40, 42, 46, 47, 50, 51, 52 kultivované při 58 °C a dále pak půda č. 26 kultivovaná při 25 °C. Lyze buněk byla provedena chloroform/izoamylalkoholem (24:1) (kap. 6.6.1). Výsledný záznam PCR produktů byl zobrazen na Obr. 47. Objem PCR směsi byl 20 µl s přidavkem hořčičných iontů (kap. 6.6.2). Jako PCR cyklus byla zvolena varianta Touchdown PCR. Použité primery: S-C-Act-235 a S-C-Act-878.

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 4 min.	94 °C 1 min.	60 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30s.	94 °C 1 min.	57 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30s.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			24 x			

Označení sloupců na *Obr. 47* odpovídá číslům vzorkovaných půd a kultivovaných při 58 °C, jen sloupec 26 z 25 značí – půdu č. 26 z kultivace při 25 °C, dále pak PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Na *Obr. 47* byly zaznamenány výrazné amplikony ve sloupcích 2, 14, 26, 31, 40, 42, 46, 47, 50 a 26 z 25 o velikosti přibližně 600 až 700 bp. U NK byl zaznamenán také amplikon o velikosti 600 až 700 bp. Proto se všemi amplikony s koncentrací fragmentů DNA podobnou NK nebylo dále pracováno. PCR produkty vzorků s výraznými amplikony (výše uvedené) byly purifikovány a odeslány na sekvenci do fy. SEQme Dobříš. Výsledkem sekvenování bylo identifikování organismů degradující PBAT s určitou shodou sekvence (*Tab. 14*). Sekvence nebyla dostačující při identifikaci organismu ve vzorku 26 z 25.



*Obr. 47: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. Použití specifických primerů pro aktinomycety. Označení sloupců odpovídá číslům vzorkovaných půd a kultivovaných při 58 °C, jen sloupec 26 z 25 značí – půdu č. 26 z kultivace při 25 °C; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola.*

*Tab. 14: Identifikované mikroorganismy z půd s určitou shodou sekvence.*

Půda č.	Mikroorganismus	Shoda sekvence
2	<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	86%
14	<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	95%
26	<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	93%
31	<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	92%
40	<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	94%
42	<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	92%
46	<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	91%
47	<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833	96%
50	<i>Thermomonospora</i> sp. EBT10D-6	80%

### 7.3.3 Shrnutí výsledků optimalizace lyze a PCR pro termofilní aktinomycety

Ze všech výše uvedených experimentálních optimalizací lyze buněk a PCR, byla vyhodnocena jako nejlepší pro termofilní aktinomycety následující metodika. Lyze za použití rozpouštědel chloroform/izoamylalkohol (24:1). PCR za použití Touchdownu, reakční objem PCR směsi 20  $\mu$ l s přidavkem hořečnatých iontů a psoralenu. Nejvhodnější sada primerů S-C-Act 235 a S-C-Act 878.

Počáteční denaturace	Denaturace	Anealling	Elongace	Denaturace	Anealling	Elongace	Závěrečná amplifikace
94 °C 4 min.	94 °C 1 min.	60 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30s.	94 °C 1 min.	57 °C 1 min.	72 °C 1 min. 30s.	72 °C 10 min.
	9 x -0,5 °C/cyklus			24 x			

Lyze provedená jinými způsoby nebyla dostačující pro zavedení do výsledné metodiky. Enzym lysozym byl vyhodnocen jako zcela nevhodný. Pravděpodobně docházelo k narušování již samotných složek PCR směsi tímto enzymem. Na záznamu PCR reakce nebyli viditelné ani bandy s nezreagovanými primery. Enzym Proteináza K byl určen jako nevhodné lyzační činidlo, dle kontrolní PCR pravděpodobně nedocházelo k získání templátové DNA. Komerční kit PowerSoil Kit vykazoval ojediněle pozitivní výsledky na záznamu PCR (přítomné amplikony). Tento výsledek byl pravděpodobně způsoben tím, že do rozbíjecích zkumavek byla vkládána biomasa kultivována na tuhém živném médiu (výrobce kitu doporučuje použití samotné půdy). Termofilní aktinomycety rostou obecně pomaleji a ve formě drobných kolonií, proto koncentrace templátové DNA obsažená v tomto malém množství biomasy často nebyla dostačující. Nicméně pokud koncentrace dosáhla požadované hodnoty pro tento kit, došlo k identifikaci mikroorganismu. Použití velkého množství biomasy vzhledem k možnostem růstu aktinomycet nebylo vždy možné. Dalším způsobem lyze bylo získání templátové DNA působením vysokých teplot – lyze varem. Povaření po dobu 1 hodiny či 10 minut pravděpodobně způsobovalo úplnou denaturaci DNA. Povaření v mikrovlnné troubě (800 W) po dobu 2 a 4 minut mělo nespolehlivý výsledek, templátová DNA pravděpodobně nebyla vždy získána či nebyla potřebné kvality dle vyhodnocení PCR záznamů a případných sekvencí, které byly nedostačující. Mechanická lyze vykazovala pozitivní výsledky na záznamu PCR, kdy byly přítomny amplikony. Nicméně po provedení sekvence byla zjištěna špatná kvalita této sekvence, tedy fragmenty DNA nebyly dostačující z hlediska kvality. Pravděpodobně při této metodě docházelo

k poškození templátové DNA. Použití extračního činidla Y-PER bylo nespolehlivé, nicméně pokud došlo k pozitivnímu výsledku na záznamu PCR (zřetelný amplikon), bylo to jen v případě naředění lyzátu nejméně 50 krát pro použití do PCR směsi jako templátové DNA. Posledním experimentem lyze bylo použití rozpouštědel chloroform/izoamylalkohol (24:1). Zde bylo nutné pracovat velmi precizně, rozpouštědla nesměla zůstat v roztoku templátové DNA (rušení průběhu PCR). Dále pak pracovat jen s čerstvě izolovanou DNA. V celkovém souhrnu byla tato metodika nejúspěšnější. Pozitivní výsledky byly zaznamenány u PCR záznamů i při identifikaci mikroorganismů.

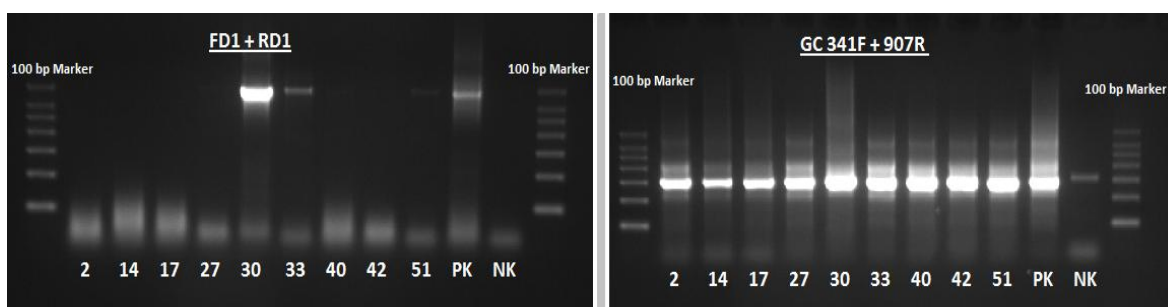
K nalezení vhodné PCR pro termofilní aktinomycey bylo nutné provést řadu optimalizací. Při klasické PCR docházelo v některých případech ke vzniku dimerů či nespecifických produktů, z tohoto důvodu byla zvolena Touchdown PCR. Dále do PCR směsi byly přidávány hořečnaté ionty, k zvýšení výtěžku reakce ( $Mg^{2+}$  kofaktor pro DNA polymerázu). Z důvodu častého výskytu bandu o určité velikosti bp u NK, byl do směsi přidáván psoralen. Tato látka působením UV záření vytváří kovalentní vazby ve struktuře DNA (zamezuje replikaci této DNA). Bylo vyzkoušeno více sad primerů, případně jejich kombinace. Univerzální primery vhodné pro aktinomycey FD1 a RD1 (BENSON, 1996) byly vyhodnoceny jako nevhodné. Důvodem byla nutnost kvalitního části templátové DNA (dle navržených primerů) o velikosti přibližně 1500 bp. Čehož nebylo často dosaženo a v rámci společné optimalizace lyze a PCR. Výsledné sekvence nebylo možné identifikovat. Proto byly provedeny experimenty s primery navrženými pro replikaci kratších úseků DNA. Nicméně žádná z použitých sad primerů nedosahovala takové úspěšnosti a spolehlivosti, aby byla metoda vyhodnocena jako vhodná. Posledním z optimalizací bylo použití specifických primerů navržených pro aktinomycey S-C-Act-235 a S-C-Act-878 (BRENTHOLT, 2008). Tato metoda byla vyhodnocena jako nejlepší a nejúspěšnější. Další metodou optimalizace byl experiment s využitím modifikace Nested PCR – opakovanou PCR pro zvýšení koncentrace amplifikovaných fragmentů DNA. Tato metoda neměla pozitivní výsledky, pravděpodobně způsobeno nekvalitní templátovou DNA v prvním kroku PCR. Dalším experimentem bylo provedení PCR z jedné kolonie. Zde byl zaznamenán pozitivní výsledek v případě metody lyze chloroform/izoamylalkohol (24:1).

Dále pro kulturu mikroorganismů kultivovanou při 25°C z vzorku půdy 26 bylo nutné používat zcela jiné optimalizace. V rámci práce byl vyzkoušen jen zlomek možných optimalizací. Nejedná se pravděpodobně o aktinomycet, specifické primery pro aktinomycey nejsou tedy vhodné, dále primery FD1 a RD1 se ukázaly také jako nevhodné.

## 7.4 DGGE

Při optimalizaci lyze a PCR bylo zjištěno, že často vizuálně určená čistá kultura degradérů PBAT ve výsledku obsahoval více mikroorganismů. Toto bylo odhaleno sekvenováním a následnou identifikací, kdy výsledkem nebyli termofilní aktinomycety, ale jednalo se například o mikroorganismus *Geobacillus sp.* či *Geobacillus thermoglucosidasius*. Proto byla zvolena metoda DGGE, kterou bylo možno použít pro směsné vzorky mikroorganismů.

Metodika byla prováděna dle kap. 6.6.5. Příprava PCR produktů používaných pro tuto metodiku byla pomocí Nested PCR, kdy v prvním kroku byly použity univerzální primery FD1 a RD1 (MUYZER, 1999). Druhý krok Nested PCR byl s použitím primerů obsahující GC svorku GC 341F a 907R (BEIER, 2007). Experiment byl proveden pro zkušebních 9 půd – 2, 14, 17, 27, 30, 33, 40, 42, 51 (Obr. 48).

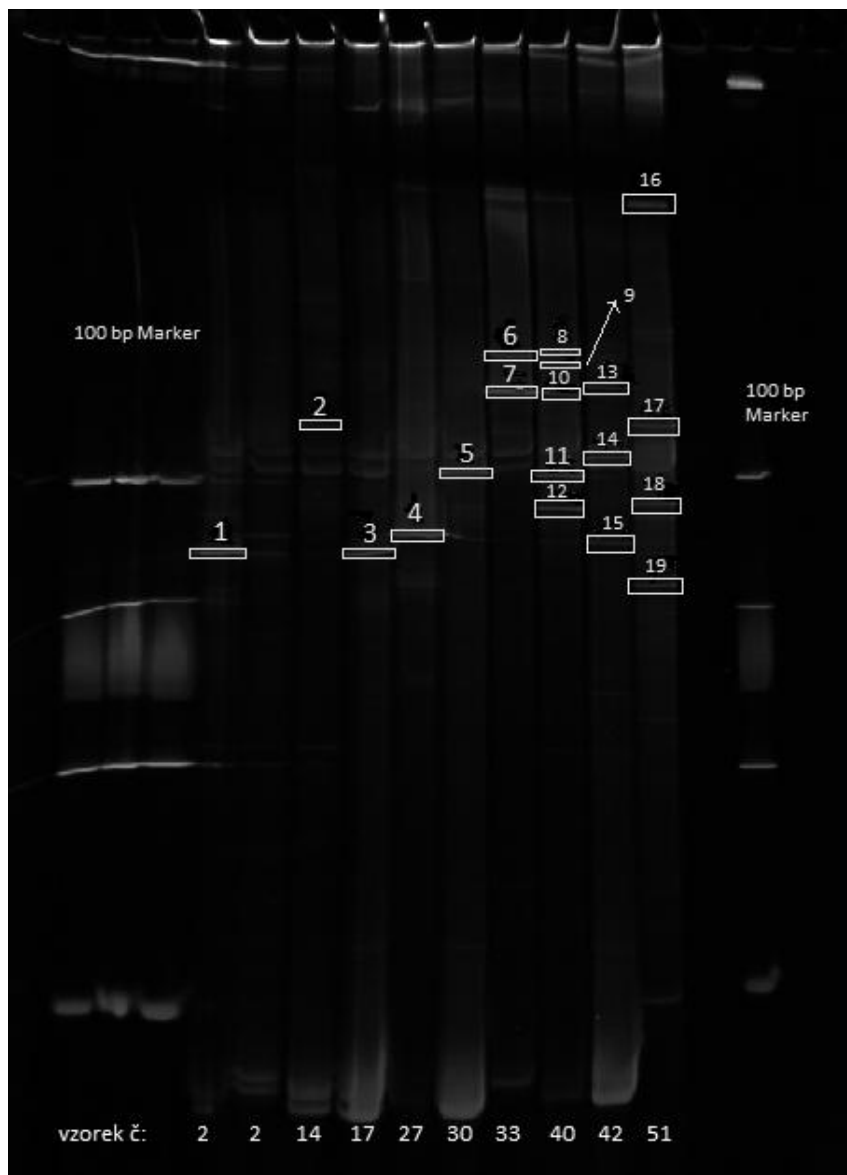


Obr. 48: Příprava PCR produktu pro metodiku DGGE. Nested PCR – 1. krok se sadou primerů FD1 a RD1, 2. krok se sadou primerů GC 341F a 907R. Označení sloupců odpovídá číslu vzorku půd. Izolace chloroform/izoamylalkoholem (24:1). PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola.

Na Obr. 49 byly vyznačeny amplikony, které byly vyřezány z gelu. Provedena znovu PCR pro DNA fragmenty s primery 341F a 907R (již bez GC svorky). PCR produkt byl purifikován a odeslán na sekvenci. Byly identifikovány mikroorganismy (Tab. 15). Nicméně ani jeden z mikroorganismů nebyl identifikován jako aktinomyceta. Pravděpodobně primery FD1 a RD1 nejsou vhodné pro amplifikaci templátové DNA aktinomycet (tento předpoklad byl potvrzen i při optimalizaci PCR). Z tohoto důvodu byl navržen postup využití specifických primerů pro aktinomycety (S-C-Act-235 a S-C-Act-878) pro první krok Nested PCR do metodiky DGGE, paralelně s použitím postupu výše uvedeného pro ostatní směsnou kulturu. Nicméně druhý krok pro oba PCR produkty z prvního kroku

Nested PCR bude s primery 341F a 518R (MUYZER, 1999). Následně na polyakrylamidový gel budou nanесeny oba PCR produkty, kde by měly být jasně rozeznatelné bandy pro aktinomycety a další mikroorganismy. Tím bude dosaženo identifikace směsné mikrobiální kultury přítomné v těsné blízkosti kolonií aktinomycet a také samotných aktinomycet.

Tento postup bude prováděn i nadále, po odevzdání této diplomové práce. Výsledky nebylo možné uvést s ohledem na časovou náročnost tohoto pokusu.



Obr. 49 Záznam polyakrylamidového gelu z provedené metody DGGE pro směsnou mikrobiální kulturu vyskytující se v blízkosti kolonie aktinomycet. Ohraničené bandy byly poslány na sekvenci a identifikovány (Tab. 15). Bandy odpovídaly příslušnému vzorku půdy.



Tab. 15: Výsledky identifikace mikroorganismů pomocí metodiky DGGE pro příslušné vzorky půd.

Band	Půda č.	Mikroorganismus	Shoda sekvence
1	2	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	98%
2	14	<i>Comamonadaceae bacterium</i>	93%
3	17	<i>Uncultured compost bacterium</i>	95%
4	27	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus strain</i>	93%
5	30	<i>Geobacillus caldoxylosilyticus strain</i>	94%
6	33	<i>Geobacillus sp. A412b</i>	98%
7	33	<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus strain</i>	96%
8	40	<i>Geobacillus thermoglucosidasius strain</i>	98%
10	40	<i>Geobacillus thermoglucosidasius strain</i>	93%
11	40	<i>Geobacillus thermoglucosidasius strain</i>	98%
12	40	<i>Geobacillus thermoglucosidasius strain</i>	98%
13	42	<i>Geobacillus thermoglucosidasius strain</i>	95%
14	42	<i>Comamonas koreensis strain</i>	86%
15	42	<i>Delftia tsuruhatensis strain</i>	94%
16	51	<i>Beta proteobacterium</i>	85%
17	51	<i>Sporanaerobacter sp.</i>	81%
18	51	<i>Clostridium sp.</i>	87%
19	51	<i>Acetomicrobium faecale strain DSM 20678</i>	86%

## 7.5 Charakteristika identifikovaných aktinomycet degradujících PBAT.

### *Thermobispora bispora:*

Jedná se o grampozitivní, aerobní organismus, obvykle termofilní. Vyskytují se u něj dva typy genu 16S rRNA (liší se v 98 polohách nukleotidů, což je 6,4% z celkového počtu nukleotidů). Je známo, že neumí hydrolyzovat škrob (WANG, 1997).

Taxonomie: *Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Pseudonocardineae; Pseudonocardiaceae; Thermobispora; Thermobispora bispora.*

### *Actinomadura rubrobrunea:*

Jedná se o grampozitivní, aerobní a termofilní organismus (růstové optimum 55°C). Často degraduje keratin. Vytváří rozvětvené mycelium. Buněčná stěna obsahuje diaminopimelovou kyselinu. Produkují mastné kyseliny. Tvar a barva kolonií je závislá na použitém růstovém substrátu (PUHL, 2009).

Taxonomie: *Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Streptosporangineae; Thermomonosporaceae; Actinomadura.*

### *Thermomonospora sp.:*

Jedná se o grampozitivní mikroorganismus. Termofilní aktinomycetu. Vyznačuje se rozvětveným vzdušným myceliem. Mohou produkovat ve vodě rozpustné antibiotikum, které je aktivní proti bakteriím (DEWEDAR, 1979).

Taxonomie: *Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Streptosporangineae; Thermomonosporaceae; Thermomonospora.*

## ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na kultivaci, identifikaci a charakterizaci degradérů PBAT přítomných v půdách vzorkovaných z okolí Zlína. V rámci práce bylo využito mikrobiologických a molekulárně biologických metod.

Ze získaných výsledků lze vyvodit následující závěry:

- Izolace čisté mikrobiální kultury byla prováděna pomocí opakovaného přeočkování na tuhá živná média se submikročásticemi PBAT. Počet přeočkování byl stanoven 3 krát až 4 krát. Doba kultivace optimálně 7 dní při teplotě 58 °C.
- Izolace DNA byla vyhodnocena jako nejvhodnější pomocí metodiky s použitím chloroform/izoamylalkoholu (24:1). PCR bylo nejvhodnější provádět pomocí modifikace Touchdown protokolu. Nejvhodnější bylo využití specifické sady primerů pro aktinomycety, S-C-Act-235 a S-C-Act-878. Dále pak pomocí metodiky DGGE byla prováděna identifikace směsné mikrobiální kultury, která se vyskytovala v místě kolonií degradérů PBAT.
- Samotná metodika DGGE byla optimalizována pro směsnou bakteriální kulturu, nicméně musela být navržena odlišná metodika pro paralelní stanovení aktinomycet v rámci metodiky DGGE. Na této optimalizaci je stále pracováno i po dokončení tohoto textu k diplomové práci.
- Termofilní aktinomycety degradující PBAT byly identifikovány následovně: *Thermobispora bispora*, *Actinomadura rubrobrunea* a *Thermomonospora sp.*. Dále byly identifikovány další mikroorganismy vyskytující se v těsné blízkosti degradérů, příkladem *Geobacillus sp.* a *Geobacillus thermoglucosidasius*. Při zpracování vzorků a izolaci čisté mikrobiální kultury bylo často obtížné odstranit tyto další mikroorganismy od aktinomycet pro jejich podobné podmínky růstu. Poté docházelo k tomu, že byly identifikovány za použití PCR tyto mikroorganismy a ne aktinomycety. Jedním z předpokladů je také názor, že může docházet k vzniku konzorcií mikroorganismů, které se částečně podílí na biodegradaci PBAT. Nicméně tato myšlenka by byla nutná ověřit do budoucna dalšími experimenty.
- Byla zjištěna kultura mikroorganismů, která byla schopna růstu, v širokém teplotním rozmezí (25 °C až 58 °C). Z provedených experimentů bylo vyhodnoceno, že se nejedná o aktinomycetu, proto optimalizace molekulárně biologických metod prováděná pro termofilní aktinomycety nebyla vyhovující. V rámci práce nebyla ta-

to pravděpodobně bakterie identifikována. Její identifikaci by bylo velmi přínosné do budoucna provést. Jelikož mikrobiální kultura byla také schopna degradace PBAT.

Závěrem lze konstatovat, že v reálné složce životního prostředí – půdě, je možné nalézt přirozeně se vyskytující degradéry PBAT, konkrétně termofilní aktinomycety.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- ALLSOPP, D, Kenneth J SEAL a Christine C GAYLARDE. Introduction to biodeterioration. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2004, xii, 237 p. ISBN 05-215-2887-9,
- AMNER, W., C. EDWARDS a A. J. MCCARTHY. Improved medium for recovery and enumeration of the farmer's lung organism, *Saccharomonospora viridis*. Appl. Environ. Microbiol. 1989, vol. 55, č. 10, s. 2669-2674. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2604405>,
- BASTIOLI, Catia. Handbook of Biodegradable polymers. Shrewsbury: Rapra Technology, 2005, xviii, 534 p. ISBN 978-185-9573-891. Dostupné z: [http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=r9pEs6NsGE4C&oi=fnd&pg=PA183&dq=chemical+economics+handbook+bohlmann&ots=Yb12olbHKt&sig=pGJisNp2F3zJK1bJgMb1FU7N4rM&redir\\_esc=y#v=onepage&q=chemical%20economics%20handbook%20bohlmann&f=false](http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=r9pEs6NsGE4C&oi=fnd&pg=PA183&dq=chemical+economics+handbook+bohlmann&ots=Yb12olbHKt&sig=pGJisNp2F3zJK1bJgMb1FU7N4rM&redir_esc=y#v=onepage&q=chemical%20economics%20handbook%20bohlmann&f=false),
- BEIER, S., K.-P. WITZEL a J. MARXSEN. 2007. Bacterial Community Composition in Central European Running Waters Examined by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. Applied and Environmental Microbiology. 74(1): 188-199. DOI: 10.1128/AEM.00327-07. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00327-07>,
- BENSON, David R., David W. STEPHENS, Michael L. CLAWSON a Warwick B. SILVESTER. 1996. Amplification of 16S rRNA Genes from Frankia Strains in Root Nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumosa*, *Discaria toumatou*, and *Purshia tridentata*. Applied and environmental microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 62(No. 8): 2904-2909. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/content/62/8/2904.full.pdf>,
- BREDHOLT, Harald. 2008. Actinomycetes from Sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. Marine Drugs. 6(1): 12-24. DOI: 10.3390/md0002. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2474955/>,
- C.B.S. SCIENTIFIC COMPANY, Inc. DTSK-2401-110: Cipher Genetic Analysis System Kit. USA, California, 2015. Dostupné z: <http://www.cbsscientific.com/dtsk-2401-110cipher.aspx?page=2>,

- DAS, M., T. V. ROYER a L. G. LEFF. Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007-01-29, vol. 73, issue 3, s. 756-767. DOI: 10.1128/AEM.01170-06. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01170-06>,
- DEWEDAR, A., F. E. MOURAD a H. SHEHA. 1979. Thermomonospora sp. T-SA-125 and its production of a growth promoting antibiotic. In: *Folia Microbiologica* [online]. s. 396-402 [cit. 2015-04-29]. DOI: 10.1007/bf02927122,
- DONATO, L.J., SUH, J.H., NOY, N., 2007. Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res*, 67, 609-15,
- DSMZ: Gym Streptomyces Medium. LEIBNIZ-INSTITUT DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH. DSMZ [online]. 2015 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: [http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium65.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium65.pdf),
- EN 13432. Proof of compostability of plastic products. Belgie: The European Standard, 2001. Dostupné z: <http://www.okcompost.be/data/pdf-document/Doc-09e-a-Requirements-of-norm-EN-13432.pdf>,
- ERCOLINI, Danilo. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, vol. 56, issue 3, s. 297-314. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016770120300321X>,
- GOHEEN, S. M. a R. P. WOOL. Degradation of polyethylene–starch blends in soil. *Journal of Applied Polymer Science*. 2003, vol. 42, č. 10, s. 2691-2701. DOI: 10.1002/app.1991.070421007. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.1991.070421007>,
- GREEN, Stefan J. A GUIDE TO DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS: DON'T PANIC [online]. vyd. 2. 2005 [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: <http://www.stefangreen.com/>,
- GROSS, Richard A.; KALRA, Bhanu. Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 2002, 297.5582: 803-807,

- GU, Ji-Dong. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration*. 2003, vol. 52, s. 69-91. DOI: 10.1016/s0964-8305(02)00177-4,
- HĄC-WYDRO, Katarzyna a Patrycja DYNAROWICZ-ŁĄTKA. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers—The role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action. *Biophysical Chemistry*. 2006, vol. 123, 2-3, s. 154-161. DOI: 10.1016/j.bpc.2006.05.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462206001748>,
- HAN L., Zhu G., ZHANG W., CHEN W. Composition, Thermal Properties, and Biodegradability of a New Biodegradable Aliphatic/Aromatic Copolyester. *Journal of applied polymer science* 113 (2009). Pg. 1298-1306,
- HIMEDIA®. HIMEDIA LABORATORIES. Technical Data: Actinomycete Isolation Agar [online]. Mumbai, India, 2011 [cit. 2015-03-18]. Dostupné z: <http://himedialabs.com/TD/M490.pdf>,
- CHIELLINI, Emo, Andrea CORTI a Graham SWIFT. Biodegradation of thermally-oxidized, fragmented low-density polyethylenes. *Polymer Degradation and Stability*. 2003, vol. 81, 119sme 2, s. 341-351. DOI: 10.1016/s0141-3910(03)00105-8,
- JANOŠOVÁ, Lenka. Sledování mikrobiologie biodegradačních pochodů pomocí molekulárně biologických metod [online]. 2014 [cit. 2015-03-09]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Marek Koutný. Dostupné z: <http://theses.cz/id/n8424a/>,
- KALE, Gaurav, Thitisilp KIJCHAVENGKUL, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Susan E. SELKE a Sher Paul SINGH. Compostability of Bioplastic Packaging Materials: An Overview. *Macromolecular Bioscience*. 2007-03-08, vol. 7, 119sme 3, s. 255-277. DOI: 10.1002/mabi.200600168. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200600168>,
- KASUYA, Ken-ichi, Nariaki ISHII, Yoshio INOUE, Koji YAZAWA, Tomoko TAGAYA, Taro YOTSUMOTO, Jun-ichiro KAZAHAYA a Daisuke NAGAI. Characterization of a mesophilic aliphatic–aromatic copolyester-degrading fungus. *Polymer Degradation and Stability*. 2009, vol. 94, issue 8, s. 1190-1196. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.04.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391009001256>,

- KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Edgar ALVARADO, José Roberto CAMACHO MONTERO a Jorge Mario ROSALES. Atmospheric and soil degradation of aliphatic–aromatic polyester films. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, vol. 95, issue 2, s. 99-107. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.048. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139100900411X>,
- KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Mathieu NGOUAJIO a R. Thomas FERNANDEZ. Assessment of aliphatic–aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: Field study. *Chemosphere*. 2008, vol. 71, issue 5, s. 942-953. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.10.074. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653507015287>,
- KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Mathieu NGOUAJIO a R. Thomas FERNANDEZ. Assessment of aliphatic–aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part II: Laboratory simulated conditions. *Chemosphere*. 2008, vol. 71, issue 9, s. 1607-1616. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.01.037,
- KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Susan SELKE, Mathieu NGOUAJIO a R. Thomas FERNANDEZ. Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, vol. 95, issue 12, s. 2641-2647. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391010003125>,
- KLEEBERG, Ilona, Claudia HETZ, Reiner Michael KROPPENSTEDT, Rolf-Joachim MÜLLER a Wolf-Dieter DECKWER. Biodegradation of Aliphatic-Aromatic Copolyesters by *Thermomonospora fusca* and Other Thermophilic Compost Isolates. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. May 1998, Vol. 64, No. 5. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/64/5/1731.full.pdf+html>,
- KOMŽÁK, Ondřej. Produkce sekundárních metabolitů u aktinomycet z rhizosféry brambor. Praha, 2010. Dostupné z: [120sme://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/79297/](https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/79297/). Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc,
- KUCHARSKI, J.; WYSZKOWSKA, J. Inter-relationship between number of microorganisms and spring barley yield and degree of soil contamination with copper. *PLANT SOIL AND ENVIRONMENT*., 2004, 50.6: 243-249,



- KYRIKOU, J., Briassoulis, D., Biodegradation of Agricultural Plastic Films: A Critical Review. *J Polym Environ* 2007, vol. 15, p. 125–150,
- LUCAS, N., Bienaime, CH., Belloy, CH., QUENEUDEC, M., SILVESTRE, F., NAVASAUDECO, J.-E., Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere* 2008, vol. 73, p. 429–442,
- MAIER, Raina M, Ian L PEPPER a Charles P GERBA. *Environmental Microbiology*. San Diego: Academic Press, c2000, xix, 585 p. ISBN 01-249-7570-4,
- MARTEN, Elke, Rolf-Joachim MÜLLER a Wolf-Dieter DECKWER. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic–aromatic copolyesters. *Polymer Degradation and Stability*. 2005, vol. 88, issue 3, s. 371-381. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391004003970>,
- MARTINKOVÁ, Martina. Izolace mikroorganismů produkujících depolymerizační enzymy. Zlín, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D,
- MEYER, Chris. Cowrie Genetic Database Project: CGDP. UNIVERSITY OF FLORIDA. Florida Museum of Natural History[online]. 2005 [cit. 2014-12-18]. Dostupné z: <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>,
- MO BIO Laboratories. MO BIO LABORATORIES. PowerSoil® DNA Isolation Kit [online]. 2011, 2014 [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: <http://www.mobio.com/soil-dna-isolation/powersoil-dna-isolation-kit.html>,
- Molecular and Cell Biology. UNIVERSITY OF CAPE TOWN. PCR Cycling [online]. Rondebosch, South Africa, 2012, 2015 [cit. 2015-02-06]. Dostupné z: <http://www.mcb.uct.ac.za/>,
- MUELLER, R.-J. Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry* 2006, vol. 41, p. 2124–2128,
- MUYZER, Gerard, Michael ETSCHIED, Detlev RIESNER, Michael ETSCHIED a Detlev RIESNER. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 1999, vol. 2, issue 3, s. 147-148. DOI: 10.1007/978-94-009-0019-6\_27,

- NARAYAN a Sunder BALAKRISHNAN. Starch-polyester biodegradable graft copolymers and a method of preparation thereof [patent]. United States. Patent, US 7629405 B2. Uděleno 8. Prosince 2009. Dostupné z: <https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US7629405.pdf>,
- NAYAK, S. K. Biodegradable PBAT/Starch Nanocomposites. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. 2010-11-23, vol. 49, 122sme 14, s. 1406-1418. DOI: 10.1080/03602559.2010.496397. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03602559.2010.496397>,
- NOVÁKOVÁ, Jarmila. Biodegradace polyesterů a kopolyesterů s biodegradabilními plnivy. Zlín, 2013. Dostupné z: [https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/25217/nov%C3%A1kov%C3%A1\\_2013\\_dp.pdf?sequence=1](https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/25217/nov%C3%A1kov%C3%A1_2013_dp.pdf?sequence=1). Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Mgr. Petra Jančová, Ph.D.,
- PACKEISER, Heiko, Chanyuen LIM, Balaji BALAGURUNATHAN, Jinchuan WU a Hua ZHAO. An Extremely Simple and Effective Colony PCR Procedure for Bacteria, Yeasts, and Microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, vol. 169, issue 2, s. 695-700. DOI: 10.1007/s12010-012-0043-8,
- PEPPER, Ian L, Charles P GERBA a Terry J GENTRY. *Environmental microbiology*. Third edition. United States of America, 2015, xxii, 705 pages. ISBN 01-239-4626-3,
- PUHL, A. A., L. B. SELINGER, T. A. MCALLISTER a G. D. INGLIS. *Actinomadura keratinilytica* sp. nov., a keratin-degrading actinobacterium isolated from bovine manure compost. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 2009-04-01, vol. 59, issue 4, s. 828-834. DOI: 10.1099/ijs.0.003640-0. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.003640-0>,
- RIEGER, Bernhard a M AMANN. *Synthetic biodegradable polymers*. New York: Springer, c2012, xiii, 364 p. *Advances in polymer science*, 245. ISBN 978-3-642-27153-3,

- ROUX, K. H. Optimization and Troubleshooting in PCR. Cold Spring Harbor Protocols. 2009-04-01, vol. 2009, issue 4, pdb.ip66-pdb.ip66. DOI: 10.1101/pdb.ip66. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.ip66>,
- RUDNIK, E. Compostable polymer materials. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 211 p. ISBN: 978-0-08-045371-2,
- RUIZ-BARBA, José Luis, Antonio MALDONADO, Rufino JIMÉNEZ-DÍAZ, Jinchuan WU a Hua ZHAO. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. Analytical Biochemistry. 2005, vol. 347, issue 2, s. 333-335. DOI: 10.1016/j.ab.2005.09.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269705006937>,
- RUML, Tomáš. Genové inženýrství. 1. Vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 270 s. ISBN 80-708-0499-8,
- SAKAGUCHI, Masayoshi, Kanae OSAKU, Susumu MAEJIMA, Nao OHNO, Yasusato SUGAHARA, Fumitaka OYAMA a Masao KAWAKITA. Highly conserved salt bridge stabilizes a proteinase K subfamily enzyme, Aqualysin I, from *Thermus aquaticus* YT-1. AMB Express. 2014, vol. 4, issue 1, s. 59-. DOI: 10.1186/s13568-014-0059-2. Dostupné z: <http://www.amb-express.com/content/4/1/59>,
- SEDLÁČEK, Ivo. Taxonomie prokaryot. 1. Vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9,
- SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances. 2008, vol. 26, issue 3, s. 246-265. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975008000141>,
- SCHARFEN ML., Josef. Mikroaerofilní aktinomycety a aktinomykóza. 1. Vyd. Hradec Králové: Nucleus HK, 2010. ISBN 978-808-7009-697,
- SONG, J. H., R. J. MURPHY, R. NARAYAN a G. B. H. DAVIES. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2009-06-14, vol. 364, 123sme 1526, s. 2127-2139. DOI: 10.1098/rstb.2008.0289. Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2008.0289>,

- STEPHENSON, F. H., and M. C. ABILOCK, 2012. PCR Optimization Student Guide Fall 2012: Optimizing the Polymerase Chain Reaction. In: Applied Biosystems: BABEC [online]. [cit. 2013-11-19]. Dostupné z: [http://www.babec.org/files/PCR\\_2012/PCR\\_Optimization\\_Student\\_Guide\\_2012.pdf](http://www.babec.org/files/PCR_2012/PCR_Optimization_Student_Guide_2012.pdf),
- STLOUKAL. Studium vlastností biodegradabilních materiálů na bázi polyesteru. Zlín, 2013. Dostupné z: [124sme://dspace.k.utb.cz/handle/10563/27303](http://dspace.k.utb.cz/handle/10563/27303). Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D,
- ŠMARDA, Jan. Metody molekulární biologie. 1. Vyd., 2. Dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7,
- TENDLER, M. D. a P. R. BURKHOLDER. Studies on the Thermophilic Actinomycetes: I. Methods of Cultivation. Appl Microbiol. 1961 Sep., vol. 9, č. 5, s. 394-399,
- TGGEMAXISystem, BIOMETRA. 2012. Instruction Manual Ver. 05/12 [online]. 65 s. Dostupné z: <http://www.ld.ru/PCR/ilist-3455.html>,
- THATCHER, David R. a Benjamin HODSON. Denaturation of proteins and nucleic acids by thermal-gradient electrophoresis. Biochem. J. 1980, č. 197, s. 105-109. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/197/0105/1970105.pdf>,
- TRINH TAN, Frederick, David G. COOPER, Milan MARIĆ a James A. NICELL. Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms. Polymer Degradation and Stability. 2008, vol. 93, issue 8, s. 1479-1485. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.05.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139100800147X>,
- TRÖGL, Josef Trögl. Fyziologie mikroorganismů: Povrchově aktivní látky. UNIVERZITA JANA EVANGELISTY PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM. Informace o studiu mikrobiologie: Informace pouze pro Mostecké studenty [online]. 2008, 25.09.2013 [cit. 2015-02-08]. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~trogl/6Fyziologie.pdf>,
- VLKOVÁ. Česká zemědělská univerzita v Praze: Fakulta agrobiologie, přírodních a potravinových zdrojů. VLKOVÁ, Eva. Česká zemědělská univerzita v Praze: Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky [online]. 2009 [cit. 2014-11-24]. Dostupné z: [http://kmvd.agrobiologie.cz/randova/AMA73\\_3\\_vlkova.pdf](http://kmvd.agrobiologie.cz/randova/AMA73_3_vlkova.pdf),

- WANG, Ya-Wu, Weike MO, Huilan YAO, Qiong WU, Jinchun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2004, vol. 85, issue 2, s. 815-821 [cit. 2015-01-18]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.02.010,
- WANG, Yue, Zhenshui ZHANG a Narendrakumar RAMANAN. The Actinomycete *Thermobispora bispora* Contains Two Distinct Types of Transcriptionally Active 16S rRNA Genes. *Journal of bacteriology*. New York: Johnson Reprint Corp, 1997, Vol. 179, No. 10, s. 3270-3276. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/179/10/3270.full.pdf+html>,
- WENG, Yun-Xuan, Yu-Juan JIN, Qing-Yang MENG, Lei WANG, Min ZHANG a Yu-Zhong WANG. Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polymer Testing*. 2013, vol. 32, issue 5, s. 918-926. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2013.05.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941813000962>,
- WITT, U, T EINIG, M YAMAMOTO, I KLEEGERG, W.-D DECKWER a R.-J MÜLLER. Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere*. 2001, vol. 44, issue 2, s. 289-299. DOI: 10.1016/S0045-6535(00)00162-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653500001624>,
- WITT, U., MÜLLER, R.J., DECKWER, W.-D. J. Evaluation of the biodegradability of copolyesters containing aromatic compounds by investigations of model oligomers. *J. Environ. Polym. Degrad.* Vol.4, No.1 1996, pp. 9-20,
- YAMAMOTO, Motonori, Uwe WITT, Gabriel SKUPIN, Dieter BEIMBORN, Rolf-Joachim MÜLLER, Yoshiharu DOI a Alexander STEINBÜCHEL. Biodegradable Aliphatic-Aromatic Polyesters: “Ecoflex ®”. *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005-01-15. DOI: 10.1002/3527600035.bpol4011. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600035.bpol4011>.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

®	Registrovaná ochranná známka.
A	Adenin.
AA	Actinomycete Isolation Agar.
APS	Peroxodisíran amonný (amonium persulfát).
ATCC	Sbírka mikroorganismů (United Kingdom).
bp	Párů bází.
BPEJ	Bonitová půdně ekologická jednotka.
C	Cytosin.
CFU	Počet jednotek tvořící kolonie.
D	Relativní odchylka.
DGGE	Denaturační gelová gradientová elektroforéza.
DMSO	Dimethylsulfoxid.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie.
DSMZ	Sbírka mikroorganismů (Deutsche Sammlung von Microorganismen).
FTIR	Infračervená spektrometrie s furierovou transformací.
G	Guanin.
GC svorka	Sekvence přibližně 20 nukleotidů Guanin a Cytosin.
GC/TCD	Plynová chromatografie s teplotně vodivostní detekcí.
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.
IR	Infračervená spektrometrie.
Kap.	Kapitola.
kb	Kilo bází (100 krát báze).
Konc.	Koncentrace.

---

kx	Zvětšení na skenovacím elektronovém mikroskopu – $10^3$ krát.
LDPE	Nízkohustotní polyetylen.
Max.	Maximální.
Min	Minuta.
MM	Minerální médium.
MO	Mikroorganismy.
$M_w$	Molekulová hmotnost.
NK	Negativní kontrola.
PAL	Povrchově aktivní látka.
PBAT	Poly(butylen adipát-co-tereftalát).
PBAT/PLA	Směs poly(butylen adipát-co-tereftalátu) a kyseliny polymléčné.
PCR	Polymerázová řetězová reakce.
PE	Polyetylen.
PHB	Polyhydroxybutyrát.
PHBHHx	Modifikovaný kopolymer polyhydroxybutyrátu (Polyhydroxybutyrát-co-hydroxyhexanoát).
PK	Pozitivní kontrola.
PP	Polypropylen.
PR	Pracovní roztok.
RPM	Otáčky za minutu (ot./min.).
s	Sekunda.
SDS	Dodecyl síranu sodného.
SEM	Skenovací elektronový mikroskop.
T	Thymin.
TEMED	NNN'N'-tetraethylethylendiamin.
$T_m$	Teplota tání.

UV	Ultrafialové záření.
VZ	Vzorek.
ZR	Zásobní roztok.



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Schéma biodegradace polymerů (STLOUKAL, 2013).</i>	15
<i>Obr. 2: Povrchová morfologie filmů zkoumaná SEM (2000x); (a) PHB, (b) PHBHHx, (c) Ecoflex®. (WANG, 2004)</i>	17
<i>Obr. 3: Schéma struktury PBAT. (FUKUSHIMA, 2012)</i>	22
<i>Obr. 4: Obecná růstová křivka bakterií. (PEPPER, 2015)</i>	27
<i>Obr. 5: Schéma jednotlivých kroků molekulárních metod.</i>	31
<i>Obr. 6: Porovnání Y-PER s běžně používanými činidly na devíti různých mikroorganismech po podrobení izolované DNA reakci PCR (PACKEISER, 2013).</i>	34
<i>Obr. 7: Schematické vyobrazení PCR reakce. (MEYER, 2005)</i>	35
<i>Obr. 8: Průběh nested PCR (Molecular and Cell Biology, 2015).</i>	37
<i>Obr. 9: Elektroforetický záznam markerů v 1% gelu. (RUMML, 2002)</i>	38
<i>Obr. 10: Schematické znázornění GC svorky na dvouřetězcové DNA – horní nedenaturovaná, dolní denaturovaná (GREEN, 2005).</i>	40
<i>Obr. 11: Schéma použití DGGE analýzy na environmentálních vzorcích (ERCOLINI, 2004).</i>	41
<i>Obr. 12: Gradientový denaturační gel s vyznačenými bandy dominantních aktinomycet A1 – A7. Sloupec 1, 16 - 100 bp DNA marker, sloupec 11 – standard, zbylé sloupce – analyzované vzorky (DAS, 2007).</i>	42
<i>Obr. 13: Inkubační vzorkovnice.</i>	57
<i>Obr. 14: Postup křížového roztěru při izolaci čisté kultury.</i>	59
<i>Obr. 15: Určování degradérů pomocí metody prosvětlených zón.</i>	59
<i>Obr. 16: Provedení kultivace aktinomycet v tekutém médiu PBAT.</i>	61
<i>Obr. 17: Provedení kultivace aktinomycet v tekutém médiu s nanovláknou Ecoflexu®.</i>	62
<i>Obr. 18: Schéma průběhu agarózy elektroforézy.</i>	71
<i>Obr. 19: Schéma sestavení skel pro vytvoření formy na gel.</i>	73
<i>Obr. 20: Schéma aparatury potřebné k vytvoření gelu. (C.B.S. SCIENTIFIC COMPANY, 2015)</i>	74
<i>Obr. 21: Schéma umístění kazety s gelem do termostatu. (C.B.S. SCIENTIFIC COMPANY, 2015)</i>	75
<i>Obr. 22: Schéma průběhu metody DGGE.</i>	76
<i>Obr. 23: Nárůst mikroorganismů na selektivním živném médiu R8.</i>	79

- Obr. 24: *Nárůst mikroorganismů na komerčním selektivním živném médiu AA*..... 80
- Obr. 25 *Systém nanovláken Ecoflexu<sup>®</sup> zachycený pomocí SEM po kultivaci*..... 83
- Obr. 26: *Růst kultury plísní na tuhém živném médiu PBAT při 25 °C*..... 83
- Obr. 27: *Kultivace MO z 25 °C na médiu VII a kontrolní přeočkování na médium PBAT*..... 84
- Obr. 28: *PCR reakce s DNA izolovanou pomocí lysozymu, klasická PCR. 14 – půda č. 14, 31 – půda č. 31, 47 – půda č. 47, NK – negativní kontrola*..... 86
- Obr. 29: *PCR reakce s DNA izolovanou pomocí lysozymu (31) a komerčního kitu (47), Touchdown PCR. 31 – půda č. 31, 47 – půda č. 47, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola*..... 87
- Obr. 30: *PCR reakce s DNA izolovanou pomocí proteinázy K (modifikace postupu), klasická PCR. 31K – půda č. 31(izolace proteináza K), 31KS – půda č. 31(izolace proteináza K a skleněné kuličky), 31KSK – půda č. 31(izolace proteináza K, skleněné kuličky a kulový mlýn), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola*..... 88
- Obr. 31: *PCR reakce s DNA izolovanou pomocí proteinázy K a komerčního kitu, klasická PCR. 26P – půda č. 26 (izolace Power SoilKit), 27P – půda č. 27 (izolace Power SoilKit), 17P - půda č. 17 (izolace Power SoilKit), 26K – půda č. 26 (izolace proteináza K), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola*..... 89
- Obr. 32: *PCR reakce s DNA izolovanou pomocí povaření a komerčního kitu, klasická PCR. 26A z 25C – půda č. 26 kultivace při 25 °C (izolace povařením 1 hod.), 26A z 25C – půda č. 26 kultivace při 25 °C (izolace povařením 10 min..), 30P – půda č. 30 (izolace Power SoilKit), 33P - půda č. 33 (izolace Power SoilKit), 27P – půda č. 27 (izolace Power SoilKit), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola*..... 90
- Obr. 33: *PCR reakce s DNA izolovanou více způsoby, klasická PCR. Všechny vzorky půda č. 26 kultivace při 25 °C. Izolace pomocí povaření v mikrovlnné troubě: 1 – 10 µl sterilní vody+2 min., 2 – 100 µl sterilní vody+2 min., 3 - 10 µl sterilní vody+4 min., 4 – 100 µl sterilní vody+4 min. Izolace pomocí lysozymu - sloupec 5L. Izolace pomocí proteinázy K – sloupec 6K. PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola*..... 91
- Obr. 34: *PCR reakce s DNA izolovanou mechanickým působením skleněných kuliček ve sterilní vodě, klasická PCR. Všechny vzorky půda č. 26 kultivace při 25 °C*.

- 1 – biomasa z celé misky do 100  $\mu$ l, 2 – jedna kolonie do 100  $\mu$ l, 3 - biomasa z celé misky do 100  $\mu$ l (10x ředěno), 4 - jedna kolonie do 100  $\mu$ l (10x ředěno), PK - pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 92
- Obr. 35: : PCR reakce s templátovou DNA získanou více způsoby, klasická PCR. Sloupce: 1, 3, 5 a 7 → půda č. 26 kultivace při 25 °C. Sloupce: 2, 4, 6 a 8 → půda č. 27 kultivace při 58 °C. Provedení lyze: 1, 2 – biomasa + 10  $\mu$ l sterilní vody + 2 min. mikrovlnná trouba, 3,4 – biomasa + 10  $\mu$ l sterilní vody + 2 min. mikrovlnná trouba (10x ředěno), 5,6 – PowerSoil Kit, 7, 8 – PowerSoil Kit (10x ředěno), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 94
- Obr. 36: PCR reakce s templátovou DNA získanou lyzí chloroform/izoamylalkoholem (24:1), Touchdown PCR. Sloupce: 1 – půda č. 26 kultivace při 25 °C 2 – půda č. 26 kultivace při 25 °C (50x ředěno), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 95
- Obr. 37: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí povaření v mikrovlnné troubě, Touchdown PCR. 25C – půda č. 26 kultivace při 25 °C, 25C-100x – půda č. 26 kultivace při 25 °C ředěno 100x, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 96
- Obr. 38: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí Y-PER bufferu nebo chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. 1Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, Y-PER), 2Y - půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, Y-PER), 3Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (špička, Y-PER), 4Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko, Y-PER), 5CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, chloroform/izoamylalkohol), 6CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, chloroform/izoamylalkohol), 7CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (špička, chloroform/izoamylalkohol), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 97
- Obr. 39: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí Y-PER bufferu nebo chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. 1Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, Y-PER), 2Y - půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, Y-PER), 3Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (špička, Y-PER), 4CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, chloroform/izoamylalkohol), 5CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, chloroform/izoamylalkohol), 6CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, chloroform/izoamylalkohol), 7CH –

- půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko, chloroform/izoamylalkohol), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 99
- Obr. 40: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí Y-PER bufferu nebo chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. CH = chloroform/izoamylalkohol, Y=Y-PER buffer, 1CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko), 2CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička), 3CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko), 4CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (špička), 5Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, 10x ředěno), 6Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, 10x ředěno), 7Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko, 10x ředěno), 8Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (párátko, 100x ředěno), 9Y – půda č. 26 z kultivace při 25 °C (špička, 100x ředěno), 10Y – půda č. 27 z kultivace při 58 °C (párátko, 100x ředěno), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 101
- Obr. 41: Modifikace Nested PCR – opakovaná PCR. Templátová DNA vzata z předchozího PCR produktu (Obr. 41). 1CH – 1CH produkt, 2CH – 2CH produkt, 3CH – 1CH produkt (ředěno 10x), 4CH – 2CH produkt (ředěno 10x), PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 102
- Obr. 42: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. 1CH – půda č. 27 z kultivace při 58 °C, 2CH – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, 3CH – 10x ředění templátové DNA k 1CH, 4CH – 10x ředění templátové DNA k 2CH, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 103
- Obr. 43: Modifikace Nested PCR – opakovaná PCR. Templátová DNA vzata z předchozího PCR produktu (Obr. 43). 1CH – 1CH produkt, 2CH – 2CH produkt, 3CH – 3CH produkt, 4CH – 4CH produkt, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 104
- Obr. 44: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. Použití kombinací primerů viz obrázek. 25 – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, 25-10x – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, ředěno 10x, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 105
- Obr. 45: Modifikace Nested PCR – opakovaná PCR. Templátová DNA vzata z předchozího PCR produktu (Obr. 44). 25 – půda č. 26 z kultivace při 25 °C,

- 25-10x – půda č. 26 z kultivace při 25 °C, ředěno 10x, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 106
- Obr. 46: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. Použití specifických primerů pro aktinomycey. 33 – půda č. 33 z kultivace při 58 °C; 33-50x – půda č. 33 z kultivace při 58 °C, ředěno 50x; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola. .... 107
- Obr. 47: PCR reakce s DNA izolovanou pomocí chloroformu/izoamylalkoholu (24:1), Touchdown PCR. Použití specifických primerů pro aktinomycey. Označení sloupců odpovídá číslům vzorkovaných půd a kultivovaných při 58 °C, jen sloupec 26 z 25 značí – půdu č. 26 z kultivace při 25 °C; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola. .... 108
- Obr. 48: Příprava PCR produktu pro metodiku DGGE. Nested PCR – 1. krok se sadou primerů FD1 a RD1, 2. krok se sadou primerů GC 341F a 907R. Označení sloupců odpovídá číslu vzorku půd. Izolace chloroform/izoamylalkoholem (24:1). PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola. .... 111
- Obr. 49 Záznam polyakrylamidového gelu z provedené metody DGGE pro směsnou mikrobiální kulturu vyskytující se v blízkosti kolonie aktinomycet. Ohraničené bandy byly poslány na sekvenci a identifikovány (Tab. 15). Bandy odpovídaly příslušnému vzorku půdy. .... 112

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1: Výsledky studií biodegradace aromaticko-alifatického polyesteru v závislosti na prostředí. ....</i>	18
<i>Tab. 2: Hlavní faktory působící v prostředí půdy a jejich možné dopady na degradaci polymeru. (BASTIOLY, 2005) .....</i>	19
<i>Tab. 3: Obchodní názvy kopolymeru. (FUKUSHIMA, 2012).....</i>	21
<i>Tab. 4: Fyzikální vlastnosti vybraných polymerů. (GROSS, 2002; YAMAMOTO, 2005) .....</i>	22
<i>Tab. 5: Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v gelu o různé koncentraci agarózy (RUMML, 2002).....</i>	39
<i>Tab. 6: Použité primery v této práci. ....</i>	47
<i>Tab. 7: Složení reakčních směsí pro PCR metodu – objem 20 a 30 <math>\mu</math>l.....</i>	67
<i>Tab. 8: Složení reakčních směsí pro PCR metodu – objem 20 a 30 <math>\mu</math>l, s přídavkem hořčičných iontů. ....</i>	68
<i>Tab. 9: Jednotky tvořící kolonie degradérů PBAT na gram sušiny vzorku půdy. ....</i>	77
<i>Tab. 10: Popis sloupců pro provedenou PCR reakci na Obr. 38.....</i>	93
<i>Tab. 11: Popis sloupců pro provedenou PCR reakci na Obr. 38.....</i>	97
<i>Tab. 12: Popis sloupců pro provedenou PCR reakci na Obr. 39. ....</i>	98
<i>Tab. 13: Popis sloupců pro provedenou PCR reakci na Obr. 40. ....</i>	100
<i>Tab. 14: Identifikované mikroorganismy z půd s určitou shodou sekvence. ....</i>	108
<i>Tab. 15: Výsledky identifikace mikroorganismů pomocí metodiky DGGE pro příslušné vzorky půd. ....</i>	113

## SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA PI: Stanovení sušiny u vzorků půd.

PŘÍLOHA PII: Kultury degradérů PBAT na tuhém živném médiu s PBAT.

PŘÍLOHA PIII: Identifikované kultury mikroorganismů – sekvence definovaného úseku genu 16S rRNA.

PŘÍLOHA PIV: Charakterizace vzorkovaných půd dle bonitové půdně ekologické jednotky (BPEJ).

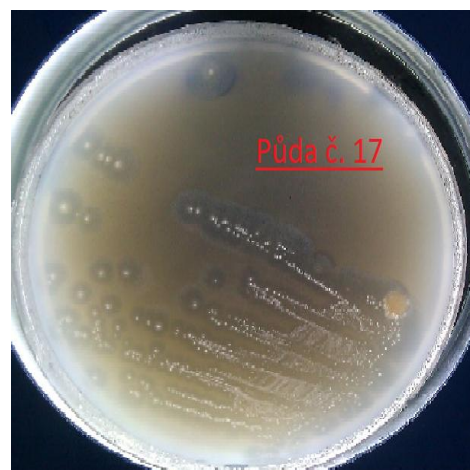
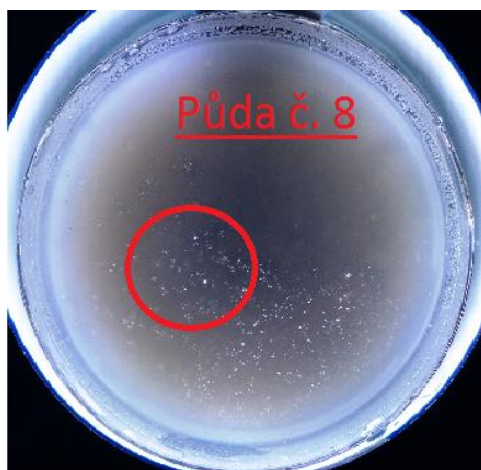
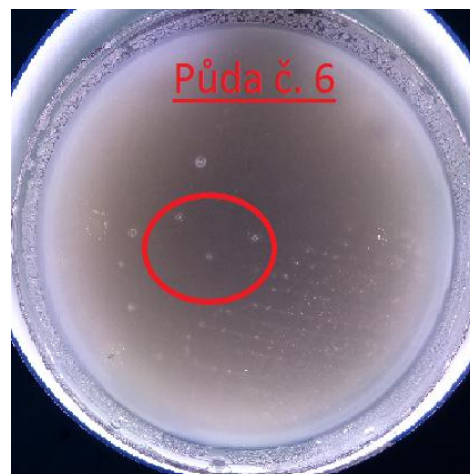
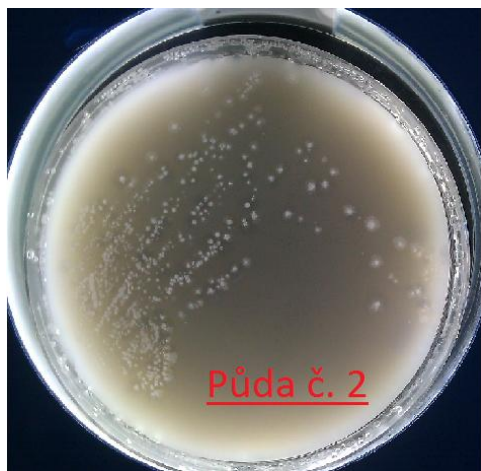
## PŘÍLOHA P I: STANOVENÍ SUŠINY U VZORKŮ PŮD.

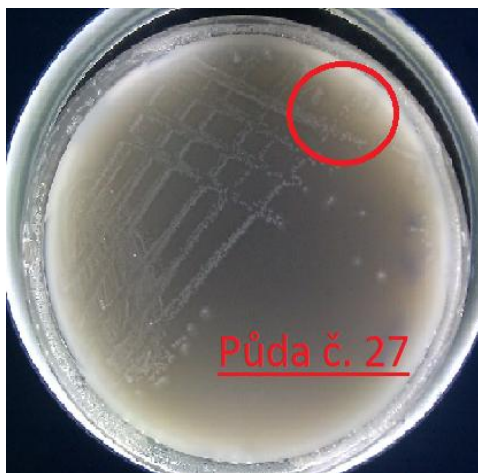
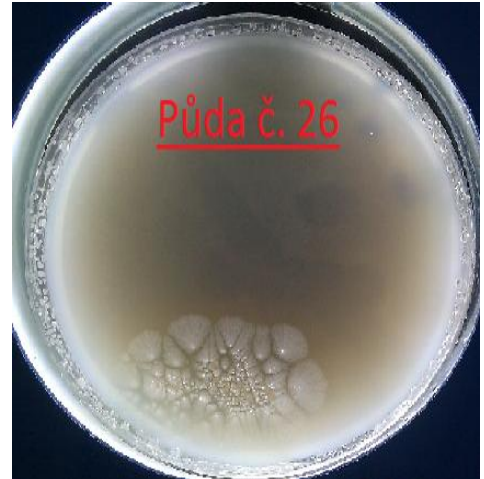
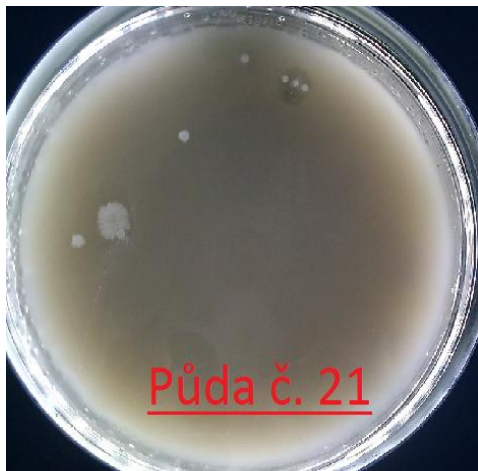
Č. půdy	Navážka půdy [g]	Sušina půdy [g]	Zastoupení sušiny v půdě [%]	Vlhkost půdy [%]	Přídavek vody pro úpravu na 50% vlhkost [ml]
1	1,92	1,63	84,89	15,11	0,96
2	2,71	2,23	82,11	17,89	1,36
4	2,70	2,28	84,48	15,52	1,35
6	4,24	3,46	81,54	18,46	2,12
7	2,05	1,76	85,81	14,19	1,02
8	2,33	1,90	81,21	18,79	1,17
11	2,36	1,99	84,26	15,74	1,18
12	2,07	1,73	83,79	16,21	1,03
13	2,36	2,06	87,24	12,76	1,18
14	1,06	0,88	82,33	17,67	0,53
15	3,22	2,79	86,65	13,35	1,61
16	1,90	1,59	83,94	16,06	0,95
17	3,63	3,02	83,24	16,76	1,81
21	2,41	2,15	89,29	10,71	1,20
24	2,29	1,55	67,79	32,21	1,14
25	1,97	1,76	89,56	10,44	0,99
26	3,05	2,62	85,88	14,12	1,52
27	2,84	2,42	85,22	14,78	1,42
28	2,78	2,35	84,80	15,20	1,39
29	3,65	3,19	87,39	12,61	1,83
30	2,13	1,74	81,83	18,17	1,06
31	2,38	2,11	88,67	11,33	1,19
32	2,35	1,98	84,22	15,78	1,18

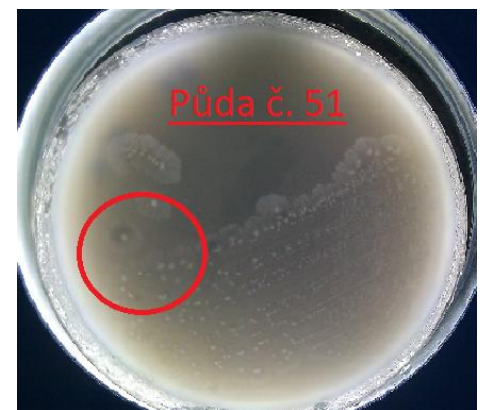
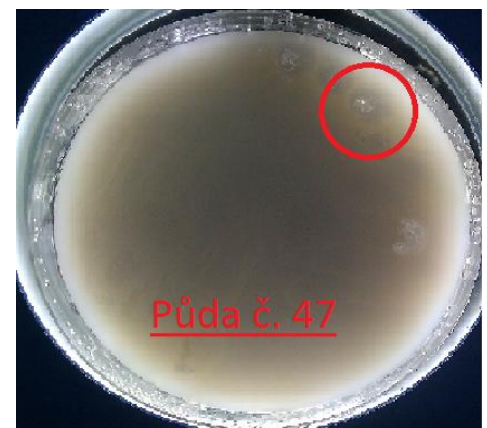
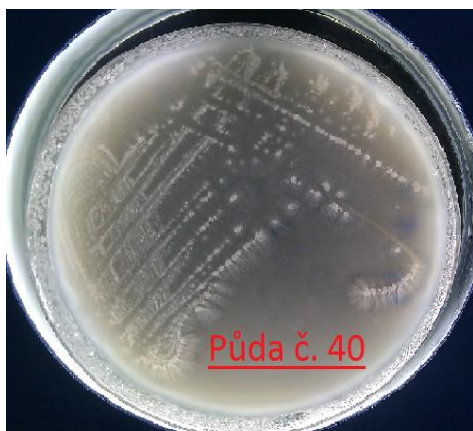


<b>Č. půdy</b>	<b>Navážka půdy [g]</b>	<b>Sušina půdy [g]</b>	<b>Zastoupení sušiny v půdě [%]</b>	<b>Vlhkost půdy [%]</b>	<b>Přídavek vody pro úpravu na 50% vlhkost [ml]</b>
33	2,23	1,88	84,18	15,82	1,12
34	2,08	1,77	85,11	14,89	1,04
35	2,11	1,81	85,52	14,48	1,06
38	1,95	1,67	85,70	14,30	0,97
39	3,15	2,55	80,97	19,03	1,57
40	2,14	1,86	87,09	12,91	1,07
41	3,01	2,45	81,48	18,52	1,50
42	2,40	2,09	87,11	12,89	1,20
43	2,55	2,43	95,38	4,62	1,27
45	2,21	1,91	86,74	13,26	1,10
46	1,89	1,69	89,52	10,48	0,95
47	2,00	1,72	85,82	14,18	1,00
48	2,09	1,74	83,02	16,98	1,05
49	2,60	2,28	87,72	12,28	1,30
50	2,28	1,96	85,99	14,01	1,14
51	2,09	1,86	88,79	11,21	1,05
52	1,86	1,52	81,51	18,49	0,93
53	1,43	1,16	81,11	18,89	0,71
54	2,84	2,47	87,04	12,96	1,42
55	2,63	2,26	85,91	14,09	1,31
56	2,68	2,30	85,94	14,06	1,34
57	2,20	1,98	90,01	9,99	1,10

**PŘÍLOHA P II: KULTURY DEGRADÉRŮ PBAT NA TUHÉM ŽIVNÉM MÉDIU S PBAT.**







**PŘÍLOHA P III: IDENTIFIKOVANÉ KULTURY**  
**MIKROORGANISMŮ – SEKvence DEFINOVANÉHO ÚSEKU**  
**GENU 16S rRNA**

půda č. 2 – 86% shoda sekvence *Thermobispora bispora* DSM 43833:

CCGTACCCCCCTCCCCAGGCGGGGCGGTTAATGCTTTAGCTACGGCACGG  
GGAACAGTGTAACCCACCCACACCAGCGCCCGCAACCTGTACGGCGTGGCAA  
AACAAAGGTATCCTAATCCTGCTTCGCTCCCCACGCTTCCCTCCTTCAACCTCC  
AGGAACGGCCAAGAAACGCTGCCTTCCCCACCGGTGTTCCCTCACGAAATCAGT  
GCACATTCACCGCCTACACCAGGAATTCCACCTCCCCCTACCATCCATTCGAA  
CCCGCCCGAAACCACCGCAAACCCACGGCTCAGCCGAGGGCTTTCACGGCCGA  
CGAACAAGCCGCCTACGAGCCATTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTCG  
CGCCCTATCGTATTACCGCGGCTGCAGGCACGTAGTTGGCCGGTGC GTTCATTC  
AGCAAGTACACGTAAACTTCCTCCCTGCTGAAAGAAGTTTACAACCCAAAGGC  
CTTCATCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTCCGCCATTGCGCAATATT  
CACTCACTGCTGCCTCCCGTACGAATCTGGGCCGGTGTCTAACTCCCAGTGTGG  
CCGTCACCGGTCTCTCAGGCCGGCTACAGCTATCATCCAATGATTGGTAATCA  
CCCACCAACAAACTGGGGAGGGGAGGGGAGG

půda č. 14 – 95% shoda sekvence *Thermobispora bispora* DSM 43833:

CCCGGCCACAGCTTGTTGGTGGGGTGAAGGCCTACCAAGGCGATGACGGGTAG  
CCGGCCTGAGAGGGGCGGTCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCA  
GCGACGCCGTGTGGGGGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGG  
GACGAAGGTGACGTGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGA  
GCTCGTAGGCGGCTGTCCGCTCTGCCGTGAAAGCCCGCGGCTTAACCGTGGGT  
CTGCGGTGGATACGGGCGGGCTTGAGGTGGTAGGGGCAAGTGAATTCCTGGT  
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCT  
TGCTGGGCCATTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT  
AGATACCCTGGGAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGCTTT  
CCACGTTCCCGTGCCGTAGCTAACGCATGTAAGACGATCCCCGCCTGGGGGAG  
TAGG

půda č. 26 – 93% shoda sekvence *Thermobispora bispora* DSM 43833:

ACGCATCAAGCGATGACGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGGTTCGGCCCACTGGG  
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCGCA  
ATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGCCTTCGGG  
TTGTAAACCTCTTTCACAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGCAGAAGAAGCGC  
CGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCC  
GGATATGGGCGTAAAGGCTCGTAGGCGGCTGCGCGTCTGCGTGAAGCCCACG  
GCTAACCGTGGTGC GGGATACGGGCGGCTGAGGGGAGGGAGGGAATTCCGGT

GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCT  
GCTGGGCCCCCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTGGTGTGGGGCTTGTCCCGT  
GCCGTAGCTAACGCTTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGA

půda č. 27 – 97% shoda sekvence *Thermobispora bispora* DSM 43833:

GTACAAATTGTACCTGCTCAGCGTCACCTCCTTAGAGTTTGACCTGGCAGGTAC  
GGTGAGAAACACGCGAACAACCTGCCCTGGCTTGGATACCTCTGGGAAACCG  
GGATTAATACCGGATATGACCGCTGCTCGGGGGGTGGTGGTGGAGGTTCCCC  
TGGGGGGGTTCGGGCCGGGGGTGGGCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGT  
GAGGCCTACCAGGCGATGACGGGTACCCGGCCGGGGAGGGTGTTCGGCCCCCTG  
GAACTGAACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGGGGTGGGTAATATTGGG  
AAAAGGGCGGAACCGGAGCCCGACCCCGCGGGGGGGATGACGCCTCCGGGTG  
GTAACCCCTTTCGAGGACAAATTAACGTGTACTGCACTGCGCCGGCCAATACG  
GGGGGGGGCCCC

půda č. 31 – 92% shoda sekvence *Thermobispora bispora* DSM 43833:

TCTACTCCCCCGGCGGGGGCGCTTAATGCGTGTAGACTACGGCACGGGAATCTG  
AAAGCCCCCACACCTAGCGCCCAACGTTTTACAGCGTGGGACTACCAGGGTA  
TCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGTTTCGCTCCTCAGCGTCAGGAGGCCAGAG  
CCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAG  
GAATTCCAATTGCCCTCCCCTCAGCCCGCCCGTATCCACCGCAGACCACGGTTA  
AGCCCGGGCTTTCACGGCAGACGCGACAGCCGCCTACGAGCCTTACGCCCAA  
TAAATCCGGACAACGCTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT  
TAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACACGTCACCTTCGTCCCTGCTGAAAGAGGT  
TTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCCACACGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTCCGC  
CCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAAGAGTCTGGGCCGTGTCTC  
AGTCCCAGTGTGGCCGACCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCATCGCCTTGGT  
AGACCATCACCCACCAACAAGCTGGGCCGCGAG

půda č. 33 – 98% shoda sekvence *Actinomadura rubrobrunea* DSM 43750:

CGACGGGTACCGGCCTGAGAGGGCGACCGGTCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCGCAATGGGCGGAAGC  
CTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCCTTTC  
GCGGGGACGAAGCCTCTTGGGGTGACGGTACCTGAAAGAAGCGCCGGCTAAC  
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATT  
GGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTGCGGATGTGAAAGCCCACGGC  
TTAACTGTGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGACTAAGGCAGGTAGGGGAGCAT  
GGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAATATCGGGAGGAACACCGGTGG  
CGAAGGCGGTGCTCTGGGCCTTGCTGACGCAGGAGCAAACGTGGGGAGCGA  
ACAGGATTATATACCCTGGTATCCACGCCGTAAATTGGGCGCTAGGTGTGGGG  
TCTTCCCGGATTCCCCGCTAACCATTACCCGCCCCCGTGGGGGAGTGGGGGC  
A

půda č. 40 – 94% shoda sekvence *Thermobispora bispora* DSM 43833:

TACTCCCCAGGCGGGGCGCTTAATACGTCTCAGACTACGGCACGGGAACTGG  
AAAGCCCCCACACATAGCGCCCAACGTTTACAGGCGTGGACTACCAGGGTAT  
CTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGATGGCCCAGAGC  
CGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAG  
GAATTCCACTTGCCCCTCCACCTCAAGCCCCCGTATCCACCGCAGACCCACG  
GTTAAGCCGCGGGCTTTCACGGCAGACGCGACAGCCGCCTACGAGCTCTTTAC  
GCCCAATAAATCCGGACAACGCTCGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC  
ACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACACGTACCTTCGTCCCTGCTGA  
AAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCCACACGGCGTCGCTGCGTCAG  
GCTTCCGCCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC  
CGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGACCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCATC  
GCCTTGGTATGTGCCATCACCCACCAACAAGCTGTGGGCCGCAAG

půda č. 42 – 92% shoda sekvence *Thermobispora bispora* DSM 43833:

TCCGTA TCCCCAGGCGGGGCGAATTAAGGAACGTTTCAGCTACGGCACGGAA  
CTGAAGCCCCACACCCAGCGCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATC  
TAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGGGGCCAGCAGCC  
GCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCNGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGG  
AATTCCTTGCCCTCCACCTCAGCCGCCCGTATCCCCGAAACCCACGGTTGA  
GCCGTGGGCTTTCACGCGACGCGCAGCCGCCTACGAGCCTTTACGCCCAATAT  
CCGGACAACGCTCGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGC  
CGGCGCTTCTTCTGCAGGTACACGTCAACTTCGTCCCTGCTGAAAGAGGTTTAC  
AACCCGAAGGCCTTCATCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTCCGCCA  
TTGCGCAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC  
CCAGTGTGGCCGACCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCATCGCCTTGATGCTAG  
GCCGTACCCCCAACAAGCTGATAGGCCGCGA

půda č. 46 – 91% shoda sekvence *Thermobispora bispora* DSM 43833:

TCCGTACCCCCAGCGGGGCGCTTAAGGTCCGTTAGCTACTGGCACGGGAACTG  
GAAAGCCCCCACACCTAGCGCCCAACGTTTTACAGCGTGGGACTACCAGGGTA  
TCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGAGGCCAGCAA  
GCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCG  
GAATTCCACTCCCTCCCCTCAGCCCCCGTATCCACGCAGACCGGTTAGCCCGG  
GCTTTCACGCAGACGCGACAGCCGCCTACGAGCCTTTACGCCAATAATCCGG  
ACAACGCTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCG  
CTTCTTCTGCAGGTACACGTACCTTCGTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCC  
GAAGGCCTTCATCCCCACACGGCGTCGCTGCGTCAGGCTTCCGCCCATGCGC  
AAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGT  
GTGGCCGACCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCATCGCCTTGGTAGGCCTACC  
CCACCAACAAGCTGTAGGGCCGGAG

půda č. 47 – 96% shoda sekvence *Thermobispora bispora* DSM 43833:

CCGTA CTCCCCAGGCGGGGCGCTTAACGCGTTGGCTACGGCACGGGATACGTG  
AAAGCCCCACACCCAGCGCCCAACGTTTACAGCGTGGACTAACAGGGTATAT  
AATCCTGTTAGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGGAAGGCCAGCAA  
GCCGCCTTCGCCACCGGAGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACC  
AGGAATTCCACTTGCCCCTACCACCTCAAGCCCGCCCGTATCCACCGCAAACC  
CACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACGCGACGCGCAGCCGCCTACGAGCCCTTTA  
CGCCAATGAATCCGGACAACGCTCGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG  
CACGTAGTTGGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACACGTACCTTCGTCCCTGCTG  
AAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCCACGCGGCGTCGCTGCGTCA  
GGCTTCCGCCCATTTGCGCAAGATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGAGTCTGGGC  
CGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGACCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCATCG  
CCTTGGTCGAGCCGTCACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCAAG

půda č. 50 – 80% shoda sekvence *Thermomonospora* sp.:

TGCGGCCACATGGGACTGAGAACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATTTGCCAATGGGCGGAAGCCTGAGCAGCACGCCGGTGGGGATGAGGC  
CTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCGGGACGAAGGTAGTGAGTGGATAACCCC  
GCTAGCTACTGCCTGCCCCCGTAATAGATACGGCGCGAGCGTTCTTTGGATTA  
TTGCGTAAACTCGTACGCAGGTTGTTGCGTCGCCGTGAAAGCCCCGGCTTACC  
AGGGTCTGCGGTGGATACGGCGGGCTTAATGGTGGAAAGGGGAGTGAAATTC  
CTGGTGGGTGGGTGAAATGAATGCATATCATATAGAACACCGTGGCAACGCGC  
TTGTTGCTGGGTTCTTTCCTGTGACGAAGGACGATGCGTGGGGACGAATTAG  
CTACCCTGGTAGGTA CTCTGCCTTGGGCGGGTACTGTGTGTGCTTTCCATTCT  
CGTTCCGTGCCAAGCTTACTCCCGCCTGGGCTGGGGGGTACGG



**PŘÍLOHA P IV: CHARAKTERIZACE VZORKOVANÝCH PŮD DLE  
BONITOVÉ PŮDNĚ EKOLOGICKÉ JEDNOTKY (BPEJ).**

Č. půdy	Genetický půdní představitel dle BPEJ
1	Fluvizemě modální eubazické až mezobazické, fluvizemě kambické, koluvizemě modální.
2	Fluvizemě modální eubazické až mezobazické, fluvizemě kambické, koluvizemě modální.
4	Půdy se sklonitostí vyšší než 12 stupňů, kambizemě, rendziny, pararendziny, rankery, regozemě, černozemě, hnědozemě.
6	Fluvizemě glejové.
7	Fluvizemě modální eubazické až mezobazické, fluvizemě kambické, koluvizemě modální.
8	Luvizem modální, hnědozem luvická - včetně slabě oglejených variet.
11	Pseudogleje modální, pseudogleje luvické, kambizemě oglejené.
12	Fluvizemě glejové.
13	Hnědozemě luvické, luvizemě oglejené.
14	Fluvizemě glejové.
15	Fluvizemě glejové.
16	Hnědozemě luvické oglejené, luvizemě oglejené.
17	Luvizemě modální, hnědozemě luvické včetně slabě oglejených.
21	Pelozemě modální, vyluhované a melanické, regozemě pelické, kambizemě pelické i pararendziny pelické.
24	Fluvizemě glejové.
25	Fluvizemě pelické a kambické eubazické až mezobazické.
26	Fluvizemě psefitické, arenické stratifikované, černice arenické i pararendziny arenické, kambizemě eubazické až mezobazické.
27	Fluvizemě psefitické, arenické stratifikované, černice arenické i pararendziny arenické.
28	Hnědozemě luvické oglejené, luvizemě oglejené, kambizemě oglejené, rendziny kambické oglejené, pararendziny kambické oglejené a pseudogleje modální.
29	Hnědozemě luvické oglejené, luvizemě oglejené.
30	Fluvizemě glejové, kambizemě oglejené, rendziny kambické oglejené, pararendziny kambické oglejené a pseudogleje modální.
31	Fluvizemě glejové.
32	Hnědozemě luvické, luvizemě oglejené, fluvizemě glejové, gleje modální.
33	Půdy se sklonitostí vyšší než 12 stupňů, kambizemě, rendziny, pararendziny, rankery, regozemě, černozemě, hnědozemě a další, kambizemě oglejené, rendziny kambické oglejené.

Č. půdy	Genetický půdní představitel dle BPEJ
34	Fluvizemě glejové.
35	Černozemě modální a černozemě pelické, hnědozemě, luvizemě, popřípadě i kambizemě luvické.
38	Fluvizemě glejové.
39	Černozemě modální a černozemě pelické, hnědozemě, luvizemě, popřípadě i kambizemě luvické.
40	Luvizemě modální, hnědozemě luvické včetně slabě oglejených.
41	Luvizemě modální, hnědozemě luvické včetně slabě oglejených.
42	Luvizemě modální, hnědozemě luvické včetně slabě oglejených.
43	Luvizemě modální, hnědozemě luvické včetně slabě oglejených.
45	Černozemě modální a černozemě pelické, hnědozemě, luvizemě, popřípadě i kambizemě luvické.
46	Černozemě modální a černozemě pelické, hnědozemě, luvizemě, popřípadě i kambizemě luvické.
47	Luvizemě modální, hnědozemě luvické včetně slabě oglejených, Luvizemě modální, hnědozemě luvické včetně slabě oglejených.
48	Luvizemě modální, hnědozemě luvické včetně slabě oglejených.
49	Luvizemě modální, hnědozemě luvické včetně slabě oglejených.
50	Pelozem modální, pelozem vyluhovaná, regozem pelická, kambizem pelická, pararendzina pelická - včetně slabě oglejených variet.
51	Kambizem oglejená, pararendzina kambická oglejená, pseudoglej modální.
52	Luvizem modální, hnědozem luvická - včetně slabě oglejených variet.
53	Kambizem oglejená, pararendzina kambická oglejená, pseudoglej modální.
54	Půdy se sklonitostí vyšší než 12 stupňů, kambizemě, rendziny, pararendziny, rankery, regozemě, černozemě, hnědozemě a další, kambizemě oglejené, rendziny kambické oglejené, pararendziny kambické oglejené a pseudogleje modální, fluvizemě glejové.
55	Fluvizemě modální eubazické až mezobazické, fluvizemě kambické, koluvizemě modální
56	Fluvizemě glejové.
57	Fluvizemě glejové, Kambizemě oglejené.