

Vliv podmínek prostředí na biodegradaci polyvinylalkoholu

Bc. Martin Nedbálek

Diplomová práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin NEDBÁLEK**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Vliv podmínek prostředí na biodegradaci polyvinylalkoholu**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši s tematikou biodegradace polyvinylalkoholu, se zaměřením na antagonistické vztahy mezi mikroorganismy
2. Navrhněte pokus(y) pro objasnění příčin zpomalení rozkladu PVA za podmínek stálé přítomnosti snadno rozložitelných organických látek, na základě výsledků předchozí DP
3. Provedte experimentální ověření mikrobiální degradace PVA za podmínek stálé přítomnosti snadno rozložitelných organických látek a případně provedte i doplňkové testy
4. Získané výsledky přehledně zpracujte, dokumentujte tabelárně i graficky pomocí běžného softwaru (Word, Excel), s využitím základních statistických metod

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Přednostně vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

19. února 2008

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2008

Ve Zlíně dne 19. února 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
pověřený ředitel ústavu

ABSTRAKT

Abstrakt česky

Práce byla věnována rozkladu polyvinylalkoholu a některým vlastnostem degradačních bakteriálních kultur. Byly provedeny experimenty k vysvětlení příčin zpomalení degradace PVA aktivovaným kalem za podmínek trvalé přítomnosti tryptonu a sacharosu. Výsledky ukázaly, že tento jev není vyvolán substrátovou kompeticí ani nedostatkem minerálních látek ani účinkem metabolitů nedegradačních bakterií. Další pokusy ukázaly, že degradační schopnost studovaných bakterií je snížena při vyšší mineralizaci prostředí.

Klíčová slova: Biodegradace, polyvinylalkohol

ABSTRACT

This work was focused on biodegradation of polyvinyl alcohol and some features of degradation bacteria. Experiments were made for explanation the reasons of retardation of degradation polyvinyl alcohol by activated sludge under the conditions of permanent presence of tryptone and sucrose. Results showed that this phenomenon is not evoked by substrate competition, absence mineral substances or action of metabolites of undegradation germs. Another tests displayed that degradation ability of studied germs is reduced in case of higher mineralization of environment.

Keywords: Biodegradation, polyvinyl alcohol,

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu doc.RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. a také konzultantce Ing. Tereze Václavkové. Dále patří mé poděkování celému kolektivu Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za vytvoření výborných pracovních podmínek.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uveden jako spoluautor.

Ve Zlíně.14. 5. 2008

.....

OBSAH

ÚVOD	9
I LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
1 POLYVINYLALKOHOL	11
1.1 CHARAKTERISTIKA A VÝROBA.....	11
1.2 POUŽITÍ	12
2 BIODEGRADACE POLYVINYLALKOHOLU	13
2.1 MECHANISMUS ROZKLADU.....	13
2.2 BIODEGRADACE POLYVINYLALKOHOLU JEDNOU BAKTERIÁLNÍ KULTUROU	14
2.3 SYMBIOTICKÁ DEGRADACE POLYVINYLALKOHOLU	14
3 SYMBIOTICKÉ VZTAHY MEZI MIKROORGANISMY	16
4 ANTAGONISTICKÉ VZTAHY MEZI MIKROORGANISMY	17
4.1 KOMPETICE	17
4.1.1 Kompetice o živiny	17
4.1.2 Kompetice o prostor	18
4.2 AMENZALISMUS (ANTIBIÓZA).....	18
4.2.1 Antibiotika.....	19
4.2.2 Bakteriociny	20
Bakteriociny produkované G+ bakteriemi	21
Bakteriociny produkované G- bakteriemi	22
Syntéza bakteriocinů	23
Způsob účinku lanthibiotik	23
Způsob účinku kolicinů	24
Antibakteriální spektrum	24
Imunita producenta a rezistence vůči bakteriocinům.....	25
4.2.3 Parazitismus a predace	25
5 VÝSLEDKY PŘEDCHÁZEJÍCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE	27
II MATERIÁL A METODIKA	28
6 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MEDIA	29
6.1 CHEMIKÁLIE	29
6.2 ŽIVNÁ MÉDIA.....	34
6.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	35
7 PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY	36
7.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	36
7.2 LABORATORNÍ POMŮCKY	36
8 PRACOVNÍ POSTUPY	37

8.1	DEGRADAČNÍ LAHVOVÉ TESTY	37
8.2	STANOVENÍ KONCENTRACE PVA NA MIKROTTITRAČNÍ DESTIČCE	37
8.3	STANOVENÍ KONCENTRACE ROZPUŠTĚNÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU (DOC)	38
8.4	RŮSTOVÉ TESTY	39
8.5	PŘÍPRAVA SUPERNATANTU KALU KULTIVOVANÉHO S PŘÍDAVKY ŽIVIN	39
8.6	STANOVENÍ PH	39
9	ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI Ž-1 A OT-2	41
9.1	ÚVOD	41
9.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	41
9.3	VÝSLEDKY POKUSU	42
10	ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA PŘÍTOMNOSTI MINERÁLNÍCH LÁTEK	44
10.1	ÚVOD	44
10.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	44
10.3	VÝSLEDKY POKUSU	45
11	ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA PŘÍTOMNOSTI MINERÁLNÍCH LÁTEK II	47
11.1	ÚVOD	47
11.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	47
11.3	VÝSLEDKY POKUSU	48
12	ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI JK2 A OT2 V PROSTŘEDÍ SUPERNATANTU KALU ŽIVENÉHO PŘÍDAVKY ŽIVIN	51
12.1	ÚVOD	51
12.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	51
12.3	VÝSLEDKY POKUSU	52
13	POSOUZENÍ CITLIVOSTI PVA-DEGRADAČNÍCH KULTUR NA VYŠŠÍ KONCENTRACE FOSFOREČNANŮ	56
13.1	ÚVOD	56
13.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	56
13.3	VÝSLEDKY POKUSU	57
14	POSOUZENÍ CITLIVOSTI PVA-DEGRADAČNÍCH KULTUR NA VYŠŠÍ KONCENTRACE FOSFOREČNANŮ II	59

14.1	ÚVOD	59
14.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	59
14.3	VÝSLEDKY POKUSU	59
15	ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI OT2, JK2 A Ž1 V PROSTŘEDÍ SE ZVÝŠENOU KONCENTRACÍ FOSFOREČNANŮ	64
15.1	ÚVOD	64
15.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	64
15.3	VÝSLEDKY POKUSU	65
16	POSOUZENÍ CITLIVOSTI PVA-DEGRADAČNÍCH KULTUR NA VYŠŠÍ KONCENTRACE SOLÍ	70
16.1	ÚVOD	70
16.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	70
16.3	VÝSLEDKY POKUSU	71
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	80
	SEZNAM OBRÁZKŮ	81
	SEZNAM TABULEK.....	82

ÚVOD

Významným důsledkem lidských aktivit je bezesporu zanášení cizorodých látek do životního prostředí. Tato problematika se zdá být stále významnější neboť se vzrůstající životní úrovní narůstá i množství a rozmanitost látek, se kterými lidé zacházejí.

Polyvinylalkohol je cizorodou látkou a může patřit k významným kontaminantům vodních toků i mořských ekosystémů. Proto je významné studovat aspekty jeho biologické rozložitelnosti včetně podmínek, za kterých biodegradace nastává či nenastává.

Práce přímo navazuje na předchozí diplomovou práci, zaměřenou na vliv přídatných látek. Bylo zjištěno, že za podmínek trvalé přítomnosti lehce odbouratelných organických látek dochází ke zpomalení rozkladu PVA aktivovaným kalem.

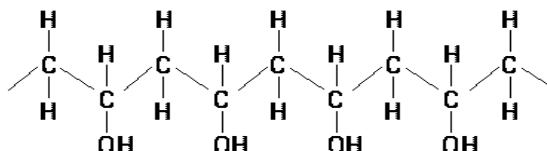
I. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1 POLYVINYLALKOHOL

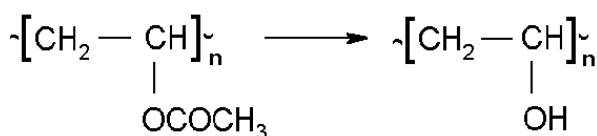
1.1 Charakteristika a výroba

Polyvinylalkohol (PVA) je syntetický polymer se strukturou 1,3-glykolu patrnou z obrázku (Obr.1). Bílý prášek rozpustný ve vodě, kyselinách a odolný organickým rozpouštědly. Není vyráběn polymerací odpovídajícího monomeru (vinylalkoholu) ale hydrolyzou polyvinylacetátu (PVAc). Stupeň této hydrolyzy a polymerační stupeň značně ovlivňují vlastnosti připraveného polymeru. Při 20% obsahu zbytkových acetátových skupin se jedná o orientovatelný termoplast s tendencí ke krystalizaci. Použití polyvinylalkoholu je možné v rozsahu teplot od -5°C do 140°C , nad 200°C se již rozkládá.[1, 2]

PVAc je vyráběn radikálovou polymerací suspenzní i emulzní. Monomer se získává adicí kyseliny octové na acetylen. Samotný PVA se připraví hydrolyzou PVAc rozpuštěného v methanolu za katalýzy hydroxidem sodným viz obrázek (Obr. 2). Vhodně zvoleným množstvím NaOH, reakční teplotou a časem lze dosáhnout požadovaný obsah zbytkových acetátových skupin [2, 3].



Obr. 1. Idealizovaná struktura PVA



Obr. 2. Mechanismus výroby PVA z PVAc

1.2 Použití

PVA má široké použití. Například výroba a úprava vláken v textilním průmyslu, úprava papíru, výroba barev, lepidel a kosmetiky. Zajímavé je také použití PVA jako chladící lázeň při zpracování kovů, dočasné pojivo při výrobě speciálních keramik, zahušťovač nebo stabilizátor suspenzí a na vnitřní výstelku benzínu-vzdorných hadic.

Jinou oblast využití představuje výroba polyvinylacetalů založená na polymeranalógické kondenzaci PVA s aldehydy v prostředí minerální kyseliny. Takto se připravují polyvinylformal a polyvinylbutyral, polymery významné svou adhezí [2].

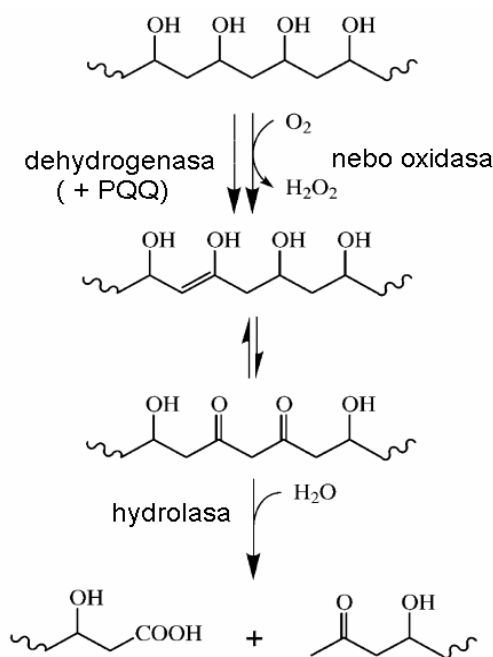
2 BIODEGRADACE POLYVINYLALKOHOLU

Polyvinylalkohol je jeden z mála syntetických polymerů s čistě uhlíkatou kostrou, který podléhá biodegradaci. Patří k významným kontaminantům vodních toků i mořských ekosystémů, což je dáno jeho rozpustností ve vodě a relativně širokým použitím.

2.1 Mechanismus rozkladu

Při biodegradaci PVA se uplatňuje enzymová výbava některých mikroorganismů. Rozklad může probíhat s využitím symbiosy i čistou bakteriální kulturou. Předpokládá se náhodné štěpení uhlíkaté kostry, které probíhá ve dvou krocích. První krok může být oxidační nebo dehydrogenační. Kdy enzymy oxidasa nebo dehydrogenasa katalyzují vznik beta-diketonových struktur ze sousedních hydroxylových skupin na řetězci polymeru.

Druhým krokem je hydrolytické rozštěpení řetězce katalyzované enzymem beta-diketon-hydrolasou. K rozštěpení dochází v místě mezi oběma keto-skupinami a vznikají dva kratší fragmenty, z nichž jeden je zakončen skupinou methylketonu a druhý karboxylovou skupinou. V případě, kdy je počáteční krok rozkladu katalyzován enzymem dehydrogenasou je zapotřebí kofaktor pyrrolochinolinchinon, který může být předmětem symbiotického vztahu [4].



Obr. 3. Mechanismus rozkladu PVA [4]

2.2 Biodegradace polyvinylalkoholu jednou bakteriální kulturou

Počáteční studie o mechanismu rozkladu PVA jsou publikovány od 70. let dvacátého století [4]. Práce Watanabeho a Suzukiho [5, 6] popisují rozklad PVA bakteriemi rodu *Pseudomonas*, které byly izolovány ze vzorku půdy a jsou schopné růstu za podmínek, kdy PVA je jediným zdrojem uhlíku. Degradace polymeru probíhá náhodným štěpením jeho uhlíkaté kostry v důsledku činnosti extracelulárně vylučovaného enzymu. V první fázi enzym oxidasa katalyzuje vznik β -diketonových struktur ze sousedních hydroxylových skupin na řetězci PVA, který má strukturu 1,3 glykolu. Činnost enzymů ze skupiny oxidas je spojena se spotřebou kyslíku a uvolňováním H_2O_2 . Následnou hydrolýzou, kterou katalyzuje enzym β -diketonhydrolasa, dojde k rozštěpení řetězce polymeru za vzniku dvou kratších fragmenů, které jsou zakončeny skupinou methylketonu a karboxylovou skupinou.

Jiný mechanismus rozkladu PVA představil Matsumura [7]. Kultura *Alcaligenes faecalis* izolovaná z říční vody je vybavena odlišným enzymem, dehydrogenasou, která v prvním kroku degradace PVA katalyzuje vznik β -hydroxyketonové struktury bez její další přeměny na β -diketon. Autor současně izoloval enzym aldolasu štěpící β -hydroxyketonové struktury. Porovnáním těchto dvou enzymů bylo zjištěno, že oba kroky rozkladu PVA katalyzuje jediný enzym, který obsahuje dehydrogenasové i aldolasové aktivní místo. Dehydrogenasová aktivita tohoto enzymu byla podmíněna specifickým kofaktorem pyrrolochinolinochinonem (PQQ) a Ca^{2+} ionty, které se podílejí na vazbě kofaktoru k enzymu [7, 8].

Další PVA dehydrogenasa, jejíž katalytickou aktivitu podmiňuje rovněž kofaktor PQQ, byla získána z kultury *Pseudomonas sp.* 113P3. Kultura byla schopná růstu v prostředí, kde PVA byl jediným zdrojem uhlíku. Autoři zjistili, že tato kultura nevyučovala enzym do prostředí. Tedy předpokládali, že vysokomolekulární řetězce PVA mohou být transportovány k membráně. PVA-dehydrogenasa byla určena jako membránově vázaná se schopností tvorby β -diketonových struktur [9].

2.3 Symbiotická degradace polyvinylalkoholu

Klíčové studie v oblasti symbiotické degradace PVA provedl Shima se svými spolupracovníky [10, 11]. Izolovali pár symbiotických partnerů se schopností rozkládat PVA.

Degradační bakterie byla identifikována jako *Pseudomonas sp.* VM15C. Tato bakterie byla schopna rozkladu PVA i v prostředí supernatantu jejího symbiotického partnera, identifikovaného jako *Pseudomonas putida* VM15A. Předmětem symbiosy byl přísun kofaktoru PQQ [11]. Symbiózu dvou bakterií, která je založená na přísunu kofaktoru PQQ, popsal také Kim se svými spolupracovníky. Identifikace této bakterie prokázala příslušnost k rodu *Sphingomonas*. Rozklad PVA touto bakterií probíhal pouze v přítomnosti symbionta nebo po přidavku PQQ $10 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ [12].

Symbiosa při rozkladu PVA nemusí být založena pouze na předávání PQQ. Například kultura *Pseudomonas vesicularis* var *povalolyticus* rozkládá PVA jen v přítomnosti thiaminu a tří aminokyselin (cystin, isoleucin, tyrosin). Tyto látky ji může poskytnout symbiotický partner.

3 SYMBIOTICKÉ VZTAHY MEZI MIKROORGANISMY

Symbioza při rozkladu cizorodých látek hraje pravděpodobně významnější roli než rozklad čistými kulturami mikroorganismů. Ve smyslu pozitivních vztahů existují dvě základní možnosti. První z nich je mutualistická symbióza prospěšná pro všechny zúčastněné organismy a bývá obvykle založena na vzájemné výměně nezbytných růstových faktorů (vitamíny, aminokyseliny...). Druhá, komensalistická symbióza, představuje vztah, kdy jeden organismus má jistou výhodu a druhý není tímto ovlivněn. Například odstraňování H_2O_2 z prostředí, spotřeba O_2 k umožnění růstu anaerobů a mnohé další.

K základním principům symbiosy lze zařadit spolupráci založenou na:

- Předávání růstových faktorů
- Odstraňování hromadících se toxických meziproductů
- Sekvenční biodegradace
- Spolupráce založená na shlukování
- Zvyšování přístupnosti mikroorganismů k degradované látce

Více informací k uvedeným možným principům symbiotických vztahů je uvedeno v předchozí diplomové práci [13].

4 ANTAGONISTICKÉ VZTAHY MEZI MIKROORGANISMY

Již v roce 1676 A. v Leeuwenhoek zdokumentoval antagonistické působení, ve kterém produkt jednoho mikroorganismu inhibuje růst jiných. Koncem devatenáctého století Louis Pasteur společně s J.F. Joubertem prokázali inhibiční působení běžných bakterií na růst kultury *Bacillus anthracis* [14].

Tyto procesy a jejich kombinace jsou v mikrobiálním světě rozšířené a jejich přítomnost lze předpokládat v přirozených společenstvech. Například studie, ve které bylo provedeno 51 různých bakterií izolovaných z organických agregátů mořské vody prokázala vzájemné inhibiční účinky po 11 dnech kultivace u více než 54 % z nich. Nejvyšší inhibiční aktivita byla zjištěna u bakterií z kmene Actinobacteria (80 %) [15].

Poznatky ze studia antagonistických vztahů mezi mikroorganismy mohou mít i průmyslový význam, např. v potravinářství. Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou využívány k potlačení růstu patogenních mikroorganismů přenášených potravou. BMK jsou mimořádně vhodné, inhibují růst patogenů několika různými způsoby bez nežádoucích senzoric- kých změn [16]. Jinou význačnou oblastí využití antagonistických vztahů představuje problematika ochrany rostlin před patogenními mikroorganismy [17].

Vedle symbiotických vztahů uvedených v předchozí části nalézáme tedy četné formy antagonistického působení mezi mikroorganismy, které může mít podobu kompetice (sou- těže o nezbytné živiny či prostor), amenzalizmu (antibióze), parazitismu nebo predace [18].

4.1 Kompetice

4.1.1 Kompetice o živiny

Kompetice o stejné živiny je ovlivněna kvalitou enzymové výbavy uvažovaných bakterií. Efektivnější využívání živin a schopnost rychlejšího růstu určité kultury mohou omezovat růst sousedních bakterií. Například rod *Staphylococcus* je znám citlivostí k vy- čerpání živin a během růstu může být ovlivněn celou řadou přítomných bakterií. Koliform- ní bakterie působí nedostupnost nezbytných aminokyselin, rod *Micrococcus* roste mnohem rychleji a streptokokové inhibují stafylokoky vyčerpáním některých vitamínů [19]. Kompe-

tice je tak závislá na růstové rychlosti, na požadavcích po růstových faktorech a toleranci k biotickým i abiotickým faktorům.

Předmětem kompetice mohou být také anorganické látky. Tato situace je dobře popsána v oblasti rhizosféry, kde dochází ke kompetici o železo. Za podmínek nedostatku železa některé bakterie (*Pseudomonas spp.*) produkují řadu komplexotvorných činidel, které mají vysokou afinitu k iontům železa. Takto nastává nedostupnost železa pro ostatní přítomné mikroorganismy a jejich růst je negativně omezen [17].

4.1.2 Kompetice o prostor

Další možný způsob je soutěž o prostor. Výhodu zde poskytuje přítomnost jistých struktur na povrchu buněk. Jedná se zejména o bičíky a fimbrie, které usnadňují adhezi k povrchu a tím zlepšují schopnosti buněk využívat látky obsažené v podkladu [20, 21].

4.2 Amenzalismus (antibióza)

Jedná se o interakci dvou mikroorganismů, z nich jeden (inhibitor) negativně působí na druhý (amenzál) a omezuje jeho vitalitu produkovanými látkami. Je vysoce pravděpodobné, že většina bakterií má schopnost produkce nějaké látky s protimikrobním účinkem [15, 22]. Tyto látky ovlivňují interakce v rámci jednoho bakteriálního druhu i mezidruhové interakce a jsou klíčovým faktorem při zachování rozmanitosti mikrobiálních společenstev [23]. Je možné rozlišit některé základní skupiny protimikrobních sloučenin::

- anorganické inhibitory (sulfan, peroxid vodíku, dusitany...)
- organické látky s malou ekologickou účinností (organické kyseliny a alkoholy...)
- organické látky s velkou ekologickou účinností (antibiotika, bakteriociny)

I zde je možné nalézt celou řadu praktických aplikací těchto jevů, zejména v zemědělství a v potravinářském průmyslu.

Jako příklad lze uvést aplikaci *Pseudomonas fluorescens*, která je schopná produkovat 2,4-diacetylphloroglucinol. Produkce této látky umožní potlačit hnilobu brambor působenou patogenem *Ervinia carotovora*. Komerčně je dále využívána také aplikace *Agrobacterium K84* produkující specifické antibiotikum agrocin 84 k potlačení patogenních kmenů *Agrobacterium tumefaciens* [17].

Další dobrý příklad poskytují bakterie mléčného kvašení aplikované v potravinářství, které jsou schopné inhibovat růst některých patogenů kyselým prostředím v důsledku produkce organických kyselin nebo produkcí různých protimikrobních látek (bakteriociny, reuterin, peroxid vodíku).

Organické kyseliny produkované BMK zahrnují kyselinu mléčnou, octovou a propionovou. Tyto látky ovlivňují membránový potenciál a aktivní transport. Inhibiční účinek peroxidu vodíku je dán jeho oxidační schopností vůči membránovým lipidům a buněčným proteinům. Reuterin (3-hydroxypropionaldehyd) produkovaný druhem *Lactobacillus reuteri* je širokospektrální protimikrobní látka. Biosyntéza reuterinu vychází z glycerolu a je schopen inhibovat bakterie, houby, viry i prvoky [16, 24].

Pozornost je třeba věnovat méně známé produkci bakteriocinů (viz. dále). Jejich význam spočívá v širokém rozšíření (Bacteria i Archaea) a ve schopnosti působit ve velmi nízkých koncentracích proti konkrétnímu bakteriálnímu druhu [14].

4.2.1 Antibiotika

K antibiotikům řadíme celou řadu látek, které lze získat z mikroorganismů, rostlin, živočichů i pomocí chemické syntézy. Tyto látky musí být chemicky stabilní a již v nízkých koncentracích vykazovat smrtící nebo inhibiční účinky bez nežádoucích efektů. Antibiotika uplatňují svoji aktivitu různými způsoby, kdy působí na různé cíle zasažené buňky - například poškozují buněčnou stěnu, destabilizují cytoplazmatickou membránu, mění strukturu nukleových kyselin, inhibují činnost mikrobiálních enzymů nebo zasahují do syntézy proteinů či nukleových kyselin [25].

Mezi klasickými (klinickými) antibiotiky a bakteriociny lze nalézt několik odlišností. Odlišnosti spočívají ve způsobu syntézy, ve způsobu účinku a v dalších aspektech uvedených v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1. Vybrané charakteristické aspekty bakteriocinů a tradičních antibiotik [25, 26]

Charakteristika	Bakteriociny	Antibiotika
Aplikace	Potravinářství, zemědělství	Klinika
Syntéza	Ribosomálně	Sekundární metabolismus
Aktivita	Limitované spektrum	Obvykle široké spektrum
Způsob působení	Především perforace membrány	Specifický cíl
Imunita producenta	Ano	Různá

4.2.2 Bakteriociny

Gratia v roce 1925 dokumentoval schopnost *E. coli* produkovat látku, která může inhibovat růst jiných taxonomicky příbuzných bakterií [25]. Následující pokusy, zaměřené na druh *E.coli* znamenaly zavedení termínu koliciny pro látky s podobným účinkem.

Další provedený výzkum odhalil, že produkce těchto látek je běžná u mnohých G- i G+ bakterií. V roce 1953 byl Jacobem a jeho spolupracovníky zaveden obecnější termín bakteriociny [22].

Bakteriociny jsou antibakteriální látky bílkovinné povahy. Jsou běžně produkovány mnohými bakteriemi a mají schopnost usmrtit nebo inhibovat růst jiných bakterií [26]. Základem všech bakteriocinů je různě dlouhý protein nebo více proteinů, popřípadě obsahují lipidické nebo sacharidické složky vázané k proteinu [14]. K základním charakteristikám patří také kladný náboj a hydrofobní povaha jisté části struktury bakteriocinu. Jsou také až na výjimky termostabilní, odolné vůči nízkému pH a slabým organickým rozpouštědlům. Významné je, že bakteriociny obecně působí v mnohem nižších koncentracích ve srovnání s jinou látkou produkovanou bakteriemi i ve srovnání s eukaryotními antibakteriálními

proteiny [27]. Například minimální inhibiční koncentrace pediocinu vůči *Listeria sp.* je uváděna $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [14].

Značně heterogenní skupina bakteriocinů může být rozdělena na produkty G- a G+ bakterií. Většina bakteriocinů G+ bakterií jsou složeny jen z několika desítek aminokyselin, jsou termostabilní a jejich antibakteriální spektrum je širší než u bakteriocinů G- bakterií [28]. Produkty G- rodů jsou charakteristické úzkým spektrem účinnosti, požadavkem receptorové molekuly a vyšší molární hmotností [22].

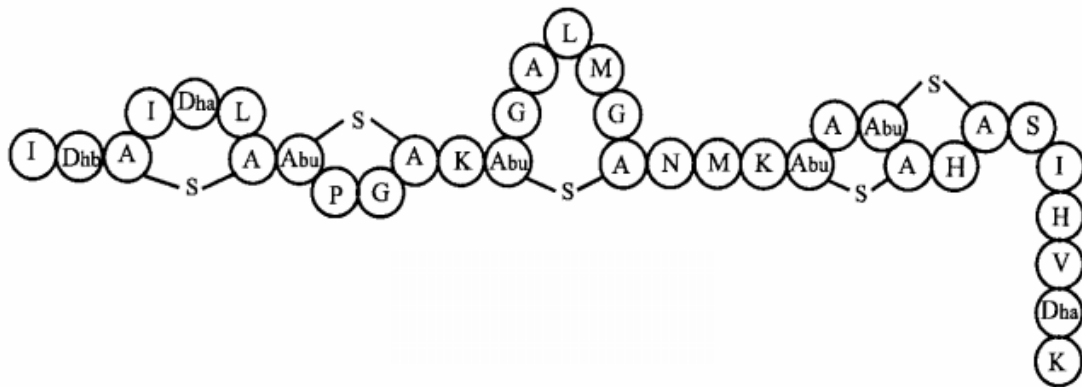
Bakteriociny produkované G+ bakteriemi

Například rody *Lactococcus* a *Lactobacillus* (a ostatní bakterie mléčného kvašení) jsou významnými producenty širokého spektra bakteriocinů. Jejich potenciál je řadu let využíván v potravinářství, kde zajišťují lepší trvanlivost produktů a potlačují rozvoj patogenních druhů.

V rámci této rozmanité skupiny bakteriocinů lze rozlišovat 2 základní skupiny.

První skupinu představují tzv. lanthibiotika, charakteristické posttranslační modifikací, kdy vzniká struktura lanthioninu z dehydrovaných zbytků některých aminokyselin [28]. Charakteristická je také přítomnost disulfidických vazeb. Například nisin produkovaný mléčnou bakterií *Lactococcus lactis* (studie 40 divokých kmenů *L.lactis* prokázala u 35 produkci nisinu [26]), je běžně nacházen v kyselém mléce i jiných potravinách. Je znám jeho účinek na některé G- bakterie na celou řadu G+ bakterií včetně spor, které napadá ve stádiu bobtnání před vyklíčením [14, 29].

Strukturu nisinu tvoří 34 aminokyselin a je možné rozlišit 6 různých forem, z nichž nejvyšší aktivitu má nisin A uvedený na obrázku (Obr. 4).



Obr. 4. Struktura nisinu A [30]

Druhá skupina zahrnuje mnoho různých bakteriocinů, které však neobsahují lanthionin. Můžou být dvouřetězcové, známy jsou i bakteriociny s kruhovou strukturou. Širší spektrum antibakteriální aktivity v rámci této skupiny bylo prokázáno u bakteriocinů s vyšším počtem disulfidických vazeb, avšak obecně nedosahuje schopností lanthibiotik [27].

Bakteriociny produkované G- bakteriemi

Nejstudovanější jsou koliciny produkované *E.coli*. Je to skupina asi 25 různých bakteriocinů, s relativně úzkým spektrem působnosti, které může být dáno potřebou specifického receptoru na cílové buňce [31, 32]. V následující tabulce (Tab. 2) jsou uvedeny konkrétní příklady G- producentů.

Tab. 2. Příklady G- producentů [33]

Bakteriální druh	Počet zkoumaných druhů	Producenti bakteriocinů
<i>Escherichia coli</i>	27	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	54	27
<i>Klebsiella oxytoca</i>	42	22
<i>Klebsiella spp.</i>	26	26
<i>Enterobacter spp.</i>	152	94
<i>Citrobacter freundii</i>	29	1
<i>Serratia spp.</i>	24	8
<i>Hafnia alvei</i>	42	10
Celkem	396	190

Syntéza bakteriocinů

Syntéza bakteriocinů se odehrává na ribozomech, čímž se zásadně odlišují od klasických antibiotik, které jsou sekundárními metabolity. Buňka producenta bakteriocinu vlastní geny kódující strukturní protein, proteiny působící při přípravě aktivní formy, transportní proteiny pro průchod membránou a proteiny zajišťující imunitu producenta [26]. Syntéza kolicinů nastává u malé části bakteriální populace. Je obvyklá za podmínek stresu (vyčerpání nutrientů, nedostatek prostoru) a může být indukována některými činiteli [31].

Bakteriociny G+ bakterií mohou být produkovány během různých růstových fází. *Streptococcus bovis* produkuje bovicin jen během stacionární fáze růstu [34]. Jiné studie uvádějí, že *Lactobacillus brevis* produkuje bakteriociny mezi časně exponenciální a časně stacionární fází růstu [35].

Způsob účinku lanthibiotik

Většina bakteriocinů G+ bakterií jsou membránově aktivní [22]. Konkrétně lanthibiotika inhibují cílovou buňku vytvořením porů v cytoplazmatické membráně. V důsledku proděravění membrány dojde k úniku nitrobuněčného materiálu.

První fáze účinku zahrnuje nescifické interakce mezi lanthibiotikem a membránou zasažené buňky. Tyto pochody jsou charakterizovány jako vratné a závislé na pH prostředí [25]. Může se uplatnit elektrostatická interakce opačných nábojů mezi kladně nabitým lanthibiotikem a záporně nabitou částí cytoplazmatické membrány. Proces je usnadněn přítomností tzv. přístavní molekuly (lipid 2-prekurzor peptidoglykanu) [26].

Během druhé fáze nastává silné přitažení hydrofobní části lanthibiotika k membráně, do které jsou vytvořeny póry asi 0,1 až 0,2 μm . Tímto je membrána depolarizována a dochází k rychlé ztrátě nezbytných iontů a látek z nitra buňky [25].

Způsob účinku kolicinů

Koliciny vyžadují pro svůj účinek specifický receptor lokalizovaný na vnější membráně G- buňky. Receptorem může být bílkovina umožňující vstup specifických nutrientů (nukleosidů, vitamínu B₁₂) [32]. Rozpoznání konkrétního kolicinu a jeho transport do buňky jsou vysoce specifické procesy, zodpovědné zřejmě za úzké antibakteriální spektrum těchto látek.

Po navázání na konkrétní receptor a po transportu do buňky (nebo k membráně) nastávají tři možnosti - tvorba pórů v membráně obdobná s působením lanthibiotik, degradace nukleových kyselin nebo inhibice proteosyntézy. Například kolicin s označením E₁ inhibuje syntézu všech makromolekul bez ovlivnění respirace, kolicin E₂ degraduje DNA a kolicin E₃ neumožní proteosyntézu [14, 32].

Antibakteriální spektrum

Může být definováno jako soubor bakterií, které jsou citlivé vůči uvažovanému bakteriocinu. Komplikace při hodnocení aktivity producenta bakteriocinu nastanou v případě syntézy několika druhů bakteriocinů jednou bakterií nebo v případě současného vlivu jiných látek. Citlivost může být ovlivněna skladbou buněčné stěny, nábojem, přítomností, dostupností nebo strukturou předpokládaného receptoru [27]. Významnou roli má také pH prostředí. Uvedené faktory působí především při počátečním kontaktu bakteriocinu s citlivou buňkou.

Například bakteriociny G+ bakterií inhibují mnohem více G- rodů, jejichž buněčná stěna je oslabena působením chemických činidel [22].

Výzkumy bakteriocinů v přírodních podmínkách se zástupci rodů *Lactobacillus*, *Escherichia* a *Streptococcus* předpokládají, že schopnost syntézy bakteriocinů je významnou kompetiční výhodou k eliminaci konkurence v rámci jedné ekologické niky. Naproti tomu většina G+ bakteriocinů eliminuje také bakteriální druhy, jejichž výskyt není pravděpodobný v nice prroducenta [14, 31].

Imunita producenta a rezistence vůči bakteriocinům

Producenti bakteriocinů z G+ i G- kultur syntetizují imunitní proteiny, eliminují vliv produktu na vlastní buňku [14, 25]. V případě lanthibiotik je imunita zajištěna součinností dvou proteinů. První z nich je kotven na vnější straně cytoplazmatické membrány a pravděpodobně zabrání jejímu proděravění. Druhý protein zřejmě účinkuje v procesu navrácení molekuly lanthibiotika zpět do okolního prostředí. Tímto je v prostoru membrány udržována pod-kritická koncentrace bakteriocinu [14].

Množství publikovaných prací ukázalo, že další typ rezistence vůči působení bakteriocinů G+ kultur je založen na fyziologických změnách membrány cílové buňky [26] a třetím způsobem rezistence je produkce degradačního enzymu - v případě nisinu byla prokázána schopnost některých bakterií (*Lactobacillus plantarum*) produkovat enzym nisinasu, který katalyzuje jeho rozklad [29].

4.2.3 Parazitismus a predace

Parazitismus je vztah dvou organismů, kde parazit získává živiny od hostitele, obvykle jej poškozují, ale obvykle bezprostředně nepůsobí smrt. Predace je usmrcení a požití jednoho organismu jiným [18].

Oba vztahy existují v různých podobách mezi mikroorganismy a jinými organismy (parazitace bakterií na rostlinách či živočíchích včetně člověka, predace bakterií prvoky nebo jinými mikroskopickými živočichy) a dá se předpokládat, že existují i na výhradně mikrobiální úrovni v bohatých společenstvech kalů, půd, kompostů či sedimentů. Jako příklady lze

uvést jednak parazitický druh bakterie *Bdellovibrio bacteriovorus*, který je znám svou schopností množit se v různých gramnegativních i grampozitivních buňkách, ale také predáční vlastnosti některých myxobakterií, které požírají živé i mrtvé bakteriální buňky nebo kvasinky [36]. Konkrétní znalosti o vlivu těchto procesů na degradační procesy však nejsou známy.

5 VÝSLEDKY PŘEDCHÁZEJÍCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Autor loňské diplomové práce zaměřené na vliv přídavných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu zjistil, že v neadaptovaném aktivovaném kalu probíhá nejrychleji degradace PVA za podmínek, kdy je PVA jediným substrátem – zde proběhla úplná degradace polymeru již za cca 15 dní. Jakýkoliv přídavek dalších látek do směsi biodegradaci PVA zpomaloval. Pokud byly v degradační směsi přítomny PQQ a sekundární alkoholy, trvala úplná degradace PVA 17 dní, v případě přítomnosti tryptonu a sacharosy ve směsi proběhla degradace PVA nehledě na současnou přítomnost nebo nepřítomnost PQQ a sekundárních alkoholů za cca 28 dní. Dále byl studován mechanismus ovlivnění degradačního procesu přítomností živin. Nejprve bylo zjištěno, že přítomnost tryptonu a sacharosy růst těchto PVA degradačních kultur neinhibuje, ba naopak jim prospívá. V dalších doplňkových testech bylo zjištěno, že tyto kultury prakticky nejsou schopny ke svému růstu využívat sacharosu, jsou schopny využívat PVA a velmi dobře trypton. V závěrečných degradačních testech s neadaptovaným kalem byl prokázán inhibiční účinek organických látek na degradaci PVA i v případě samotného tryptonu a samotné sacharosy.

II. MATERIÁL A METODIKA

6 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MEDIA

6.1 Chemikálie

Použité chemikálie byly čistoty p.a. Není-li uvedeno, jinak pocházejí od běžných dodavatelů jako jsou Lachema nebo Penta.

Polyvinylalkohol (PVA)

Byl použit práškový PVA s obchodním označením MOWIOL 5-88. Kde první číslo značí viskozitu 4% vodného roztoku a druhé procentuální obsah odstraněných acetátových skupin.

Fyziologický roztok (FR)

Bylo naváženo 8,5 g NaCl a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Roztok byl vysterilizován při 125°C po dobu 20 minut.

Zásobní roztok PQQ ($0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)

PQQ (FLUKA).....2 mg

2 mg PQQ byly rozpuštěny ve 20 ml fyziologického roztoku a vysterilizovány skleněnou injekční stříkačkou přes filtr značky MILLEX GP o průměru pórů 0,22 μm .

Roztok pufry A

Bylo naváženo 9,0788 g KH_2PO_4 a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody.

Roztok pufry B

Bylo naváženo 23,9032 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody.

Minerální médium (MM)

Na přípravu 1000 ml minerálního média bylo použito:

Roztok pufru A (KH_2PO_4 $0,0667 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).....	20 ml
Roztok pufru B (Na_2HPO_4 $0,0667 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).....	80 ml
Destilovaná voda.....	850 ml
Roztok stopových prvků.....	2 ml
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	10 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ($3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	10 ml
$\text{CaCl}_2\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	10 ml
NaCl ($50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	10 ml
NH_4Cl ($30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	10 ml

Příprava jednotlivých složek minerálního média:Roztoky solí

$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	1 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ($3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	0,3 g
$\text{CaCl}_2\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	0,1 g
NaCl ($50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	5 g
NH_4Cl ($30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	3 g

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

Roztok stopových prvků

Bylo naváženo:

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

Navážená množství látek byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody.

Minerální média s upravenými objemy roztoků fosforečnanů

Na přípravu 100 ml minerálního média bylo použito:

Roztok pufru A (KH_2PO_4 $0,0667 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).....	uvedeno v Tab. 3
Roztok pufru B (Na_2HPO_4 $0,0667 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).....	uvedeno v Tab. 3
Destilovaná voda.....	uvedeno v Tab. 3
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	1 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ($3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	1 ml
$\text{CaCl}_2\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	1 ml
NaCl ($50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	1 ml
NH_4Cl ($30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).....	1 ml

Tab. 3. Příprava minerálních médií s různou koncentrací fosforečnanového pufru

Minerální médium	Roztok A KH_2PO_4 [ml]	Roztok B Na_2HPO_4 [ml]	Destilovaná voda [ml]	Koncentrace fosforečnanů [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]
MM 1F	2	8	85	6.67
MM 1,5F	3	12	80	10.0
MM 2F	4	16	75	13.3
MM 2,5F	5	20	70	16.7
MM 3F	6	24	65	20.0

Minerální média se zvýšenou solností pomocí roztoků hydrogenuhličitanů

Na přípravu 100 ml minerálního média bylo použito:

Roztok pufru A (KH_2PO_4 $0,0667 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).....	20 ml
Roztok pufru B (Na_2HPO_4 $0,0667 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).....	80 ml
Roztok NaHCO_3 ($0,0667 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).....	uvedeno v Tab.4
Roztok KHCO_3 ($0,0667 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).....	uvedeno v Tab. 4

Destilovaná voda.....	uvedeno v Tab. 4
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O (10 g·l ⁻¹).....	1 ml
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6 H ₂ O (3 g·l ⁻¹).....	1 ml
CaCl ₂ ·2 H ₂ O (1 g·l ⁻¹).....	1 ml
NaCl (50 g·l ⁻¹).....	1 ml
NH ₄ Cl (30 g·l ⁻¹).....	1 ml

Tab. 4. Příprava minerálních médií se zvýšenou solností

Minerální médium	NaHCO ₃ [ml]	KHCO ₃ [ml]	destilovaná voda [ml]
1	-	-	85
2Na	10	-	75
2K	-	10	75
3Na	20	-	65
3K	-	20	65

Zásobní roztok živin tryptonu a sacharosy (TS)

Bylo naváženo:

Trypton (HIMEDIA).....6 g

Sacharosa.....4 g

Navážená množství látek byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody a roztok byl vysterilizován při 125 °C po dobu 20 minut.

Zásobní roztok živin se zvýšeným množstvím minerálních látek (MMTS)

Na přípravu 10 ml MMTS bylo použito:

Trypton	0,6 g
Sacharosa	0,4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6 H ₂ O	0,12 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,04 g
NaCl	2 g
NH ₄ Cl	1,2 g
Roztok stopových prvků	0,1 ml
Zásobní roztok PQQ (0,1 g·l ⁻¹)	1 ml

Uvedené látky byly postupně rozpuštěny a nakonec doplněny na objem 10 ml destilovanou vodou. Roztok byl sterilizován při 125 °C po dobu 20 minut.

Roztok kyseliny borité (40 g·l⁻¹)

Bylo naváženo 40 g H₃BO₃ a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody.

Roztok jodu s jodidem draselným

V třecí misce bylo spolu s malými přísadkami destilované vody důkladně rozmícháno 12,7 g I₂ s 40 g KI. Tato směs byla poté kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

Roztok hydroxidu sodného (cca 1 mol·l⁻¹)

Byly naváženy 4 g NaOH a rozpuštěny ve 100 ml destilované vody. Roztok NaOH byl využit při úpravě pH u degradačních lahvových testů.

Kyselina chlorovodíková (cca 1%)

Roztok byl připraven ředěním koncentrované HCl destilovanou vodou.

6.2 Živná média

PVA agar s PQQ (koncentrace PVA 2 g·l⁻¹)

Na přípravu 100 ml bylo použito:

Základ pro minerální agar	1,9 g
Destilovaná voda.....	100 ml
Roztok stopových prvků	0,2 ml
PVA.....	0,2 g
Zásobní roztok PQQ.....	0,02 ml

Daná množství látek byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody, pečlivě rozmíchána a vsterilizována při 125 °C po dobu 20 minut. Po sterilizaci a samovolném ochlazení na cca 50 °C byl agar asepticky rozlit do sterilních Petriho misek v laminárním boxu.

PVA agar s PQQ a kvasničným autolyzátem (koncentrace PVA 2 g·l⁻¹)

Na přípravu 100 ml bylo použito:

Základ pro minerální agar	1,9 g
Destilovaná voda.....	100 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
PVA.....	0,2 g
Zásobní roztok PQQ.....	0,02 ml
Kvasničný autolyzát.....	0,005 g

Daná množství látek byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody, pečlivě rozmíchána a vsterilizována při 125 °C po dobu 20 minut.

Trypton agar (koncentrace tryptonu 2 g·l⁻¹)

Na přípravu 100 ml bylo použito:

Základ pro minerální agar	1,9 g
Destilovaná voda.....	100 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
Trypton (HIMEDIA).....	0,2 g

Daná množství látek byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody, pečlivě rozmíchána a vysterylizována při 125 °C po dobu 20 minut. Po sterilizaci a samovolném ochlazení na cca 50 °C byl agar asepticky rozlit do sterilních Petriho misek v laminárním boxu.

6.3 Biologický materiál

Aktivovaný kal z městské čistírny odpadních vod v Malenovicích.

Kultura OT-2 izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Otrokovice v roce 2004 v rámci DP Jiřího Riedla.

Kultura JK-2 izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Malenovice v roce 2006 Terezou Václavkovou.

Kultura Ž-1 izolovaná rovněž z aktivovaného kalu v rámci předchozí DP Petra Zemana [13].

7 PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY

7.1 Přístrojové vybavení

Analytické váhy KERN 770.....	SRN
Předvážky KERN 440-47.....	SRN
Předvážky KERN EW.....	SRN
Chlazená centrifuga MR23i.....	Jouan, Francie
Elektromagnetická míchačka MM 2A.....	Laboratorní přístroje, ČR
Elektrická sušárna.....	MORA, ČR
Elektrický vaříč.....	ETA
Chladnička	Ardo, ČR
Hlubokomrazicí box Chest Freezer.....	Bio Tech, Dánsko
Třepačka 3018 GFL.....	SRN
Laboratorní autokláv.....	Sanoclav, St-MCS-203, SRN
Spektrofotometr TECAN, pro mikrotitrační destičky.....	Sunrise, USA
Analyzátor uhlíku 5000A.....	Shimadzu, Japonsko
pH metr OP – 208 + skleněná elektroda.....	Radelkis, Maďarsko
Aseptický laminární box.....	Telstar, Španělsko
Termobox na 25 °C.....	ÚIOŽP, FT

7.2 Laboratorní pomůcky

96-jamková mikrodestička.....	Gama, Česká Republika
Membránový filtr Pragopor 7, ϕ 50 mm, ϕ pórů 0,3 μ m.....	Pragochema

8 PRACOVNÍ POSTUPY

8.1 Degradční lahvé testy

Degradční testy byly prováděny ve skleněných lahvích s tekutým minerálním médiem, ve kterém byl rozpuštěn polyvinylalkohol (výsledná koncentrace okolo $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Lahve byly zaočkovány buďto konkrétní čistou kulturou PVA-degradéra nebo aktivovaným kalem. Objem plynné fáze v uzavřené láhvi zaujímal přibližně čtyřnásobek objemu fáze kapalné. Kultivace probíhala na reciproké třepačce s konstantní frekvencí kmitů ve tmě při 25°C . Ve zvolených intervalech byly odebírány vzorky pro stanovení koncentrace PVA nebo vzorky pro stanovení rozpuštěného organického uhlíku. Po dobu 20 minut po odběru vzorků byly lahve provzdušňovány v laminárním boxu. Dle potřeby bylo kontrolováno a případně upraveno pH pomocí roztoku NaOH.

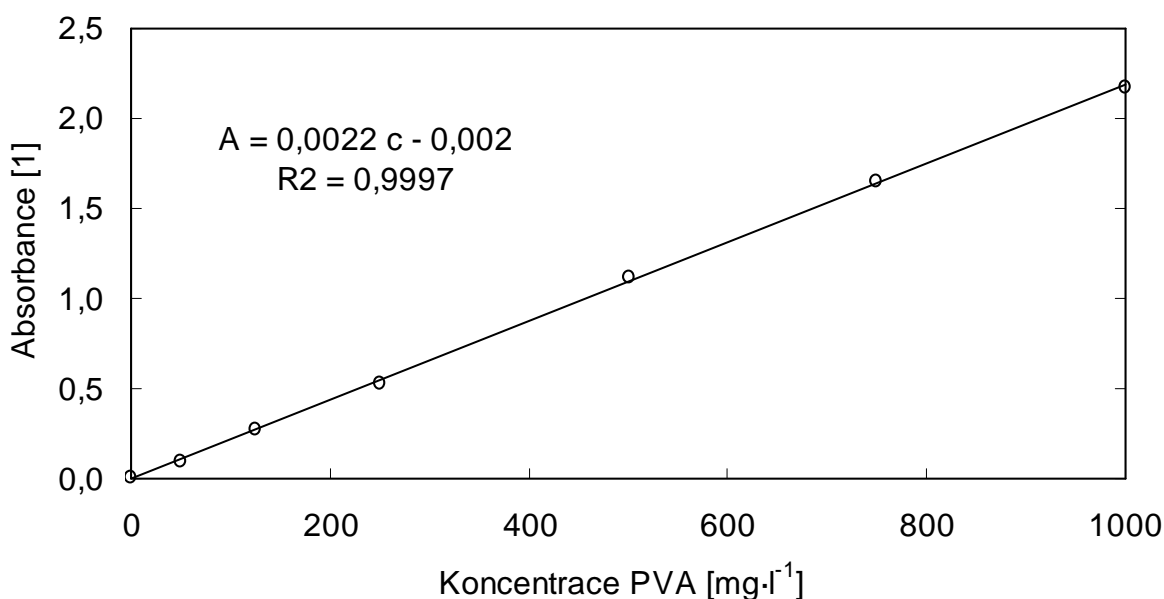
8.2 Stanovení koncentrace PVA na mikrotitrační destičce

Bylo prováděno spektrofotometricky na mikrotitrační destičce. Vždy do šesti jamek byly dávkovány centrifugované vzorky $20 \mu\text{l}$, dále $42 \mu\text{l}$ roztoku kyseliny borité a $10 \mu\text{l}$ roztoku jodu s jodidem draselným. Vzniká tmavě zelené zabarvení komplexu PVA s trijodidem, jehož absorbance byla měřena přístrojem TECAN při vlnové délce 660nm po 20 sekundách míchání a 5 sekundách klidu. Po odečtení absorbance prázdné destičky byly hodnoty absorbance vzorků zprůměrovány (u každého vzorku vždy provedeno minimálně 5 paralelních stanovení) a dosazeny do rovnice kalibrační přímky - viz obrázek 5. Takto byla stanovena koncentrace PVA v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Kalibrační závislost byla zjištěna proměřením připravených roztoků PVA v rozsahu koncentrací uvedených v tabulka (Tab. 5). Proložení přímkou pomocí programu Excel poskytlo rovnici uvedenou na obrázku (Obr. 5).

Tab. 5. Hodnoty absorbancí kalibračních roztoků PVA

c_{PVA} [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	0	50	125	250	500	750	1000
A [1]	0,0055	0,095	0,274	0,530	1,118	1,653	2,175
Směr.odch.	0,0022	0,0087	0,0082	0,0450	0,0373	0,0604	0,1000



Obr. 5. Kalibrační závislost absorpce na koncentraci PVA

8.3 Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC)

K tomuto stanovení bylo nutné ze vzorků odstranit buňky degradačních bakterií, což se provedlo centrifugací vzorku v režimu 5000 g, při 20°C, po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl zředěn podle předpokládané koncentrace PVA na úroveň koncentrace uhlíku pod 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (kalibrace analyzátoru uhlíku Shimadzu 5000A), ředění bylo později zohledněno.

Na přístroji Shimadzu byla stanovena koncentrace celkového uhlíku (TC v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a koncentrace anorganického uhlíku (IC v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Rozdíl těchto hodnot představoval kon-

centraci celkového organického uhlíku (TOC), vzhledem k centrifugaci vzorků však šlo o koncentraci rozpuštěného organického uhlíku.

8.4 Růstové testy

Byly provedeny ve sterilních mikrotitračních destičkách se 160 μl tekutého minerálního média. Jako substrát byl použit trypton (výsledná koncentrace 3 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Jamky byly inokulovány suspenzí PVA-degradačních kultur. Kultivace probíhala v klidu a tmě při 25 °C. Růst buněk byl sledován měřením absorbance kultivačního média při vlnové délce 600 nm.

8.5 Příprava supernatantu kalu kultivovaného s přidavky živin

Aktivovaný kal byl kultivován v minerálním médiu s pravidelnými přidavky roztoků živin tryptonu a sacharosy za stejných podmínek jako při degradačních testech. Po devíti dnech kultivace byl obsah lahví zbaven biomasy a jiných částic centrifugací v režimu 4000 ot/min, při 15°C, po dobu 11 minut. Supernatant byl dále asepticky přefiltrován přes převařený membránový filtr Pragopor číslo 7, ϕ 50 mm, ϕ pórů 0,3 μm .

Takto byl získán kalový supernatant s možným obsahem protimikrobních látek (antibiotika, bakteriociny), který byl použit k přípravě minerálního média pro růst PVA-degradérů.

8.6 Stanovení pH

Během pokusů byl používán pH-metr OP – 208 se skleněnou elektrodou. Před každým měřením byl přístroj kalibrován pomocí dvou pufrů o pH menším a větším než měřený vzorek. Měření bylo provedeno za stálého míchání.

III. VÝSLEDKY A DISKUSE

9 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI Ž-1 A OT-2

9.1 Úvod

Na základě výsledků předchozí diplomové práce [13], která zaznamenala zpomalení rozkladu PVA aktivovaným kalem v důsledku trvalé přítomnosti lehce odbouratelných živin bylo třeba posoudit vliv přítomnosti živin na degradační schopnosti vybraných čistých kultur PVA - degradérů OT-2 a Ž-1. Tyto byly kultivovány za podmínek degradačních lahvových testů (viz kapitola 8.1) v trvalé přítomnosti a nepřítomnosti živin - tryptonu a sacharosy (TS).

9.2 Rozvržení pokusu

V rámci tohoto pokusu byly nasazeny čtyři série s třemi paralelními lahvemi vedle sebe, podle rozpisu:

- 1) Kultura Ž1 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + FR 3x týdně
- 2) Kultura Ž1 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + FR 3x týdně
- 3) Kultura Ž1 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + FR 3x týdně
- 4) Kultura Ž1 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + živiny TS 3x týdně
- 5) Kultura Ž1 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + živiny TS 3x týdně
- 6) Kultura Ž1 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + živiny TS 3x týdně
- 7) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + FR 3x týdně
- 8) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + FR 3x týdně
- 9) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + FR 3x týdně
- 10) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + živiny TS 3x týdně
- 11) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + živiny TS 3x týdně
- 12) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + živiny TS 3x týdně

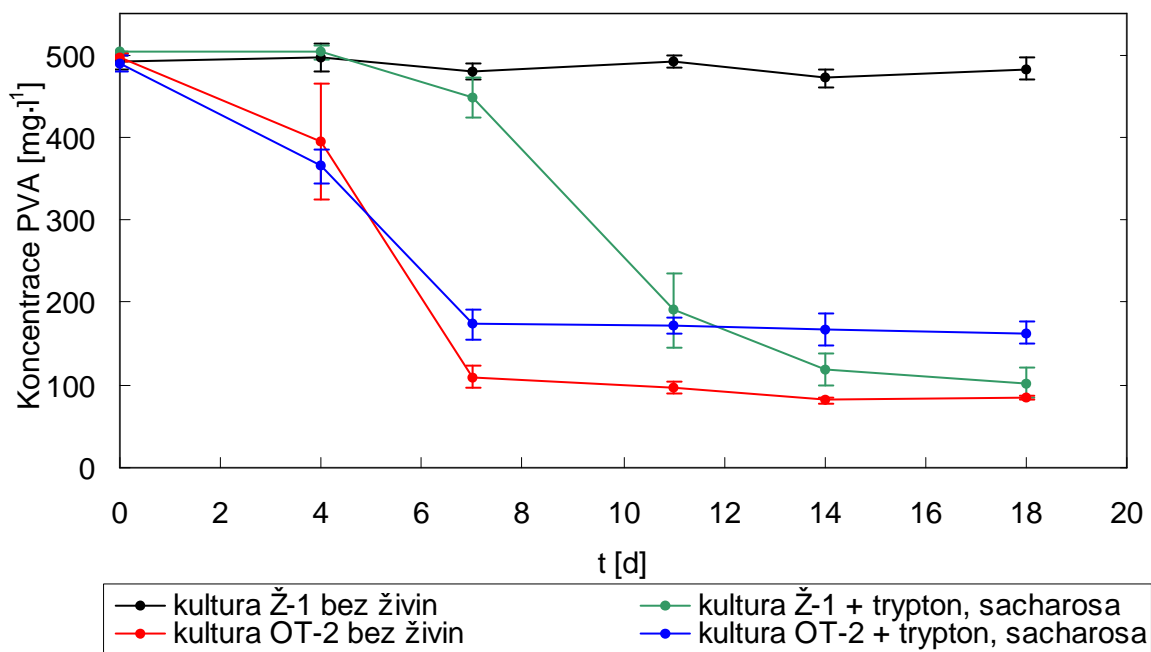
Vždy v pondělí, středu a pátek bylo odebráno 250 μl vzorků z každé láhve a doplněno 250 μl sterilního fyziologického roztoku (FR) nebo roztoku živin TS. Ve zvolených intervalech byla měřena koncentrace PVA spektrofotometricky.

9.3 Výsledky pokusu

Pokus byl prováděn po dobu 18 dnů. Průběh rozkladu PVA v jednotlivých sériích je patrný z obrázku (Obr. 6). Hodnoty v grafu odpovídají průměru ze tří stanovení a chybové úsečky směrodatným odchylkám, viz. tabulka (Tab. 6).

Tab. 6. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatných odchylek v průběhu pokusu

Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·
	1	2	3			4	5	6		
0	482,3	496,4	494,2	491,0	7,59	502,7	502,6	503,3	502,9	0,35
4	502,3	510,9	477,6	497,0	17,29	494,1	511,8	502,9	502,9	8,86
7	469,5	481,4	487,3	479,4	9,03	472,4	450,9	423,5	448,9	24,54
11	483,7	491,4	498,7	491,3	7,50	242,2	167,8	161,2	190,4	44,98
14	459,3	475,0	481,2	471,8	11,28	129,9	128,8	96,2	118,3	19,17
18	469,2	494,5	486,2	483,3	12,89	113,6	111,6	82,2	102,5	17,59
Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·
	7	8	9			10	11	12		
0	501,0	491,3	495,7	496,0	4,87	489,0	498,6	479,4	489,0	9,62
4	315,9	451,4	416,5	394,6	70,33	340,6	373,6	380,5	364,9	21,33
7	94,9	121,6	113,1	109,9	13,64	195,4	165,1	160,6	173,7	18,92
11	90,9	106,4	94,2	97,2	8,14	178,4	175,8	160,2	171,5	9,82
14	78,8	86,3	80,4	81,8	3,96	188,9	159,8	151,2	166,6	19,78
18	82,4	86,8	87,0	85,4	2,60	177,7	160,4	152,4	163,5	12,95



Obr. 6. Závislost koncentrace PVA na čase

Průběh rozkladu PVA ve všech lahvích je patrný z obrázku (Obr. 6). V případě kultury s označením OT-2 proběhla degradace polymeru bez ohledu na přítomnost živin již za 7 dnů a po této době se zbytková koncentrace PVA v lahvích jednotlivých sérií již neměnila. Kultura Ž-1 degradovala PVA pouze v přítomnosti živin a koncentrace PVA již neklesala po 14ti dnech pokusu. Nerozštěnutí degradace v lahvích první série mohlo být způsobeno tím, že kultura Ž-1 zřejmě potřebuje k úspěšnému rozkladu polymeru některou aminokyselinu obsaženou v tryptonu.

Na konci pokusu bylo změřeno pH v každé lávě. U kultury Ž-1 se pH ve všech lahvích pohybovalo okolo hodnoty 7,1. U kultury OT-2 kolem pH 6,7.

Závěrem pokusu je tedy, že přítomnost živin neovlivňuje degradační schopnosti použitých kultur. Tímto je potvrzeno, že zpomalení rozkladu PVA kalem v přítomnosti živin, zaznamenané v předchozí diplomové práci [13], není způsobeno upřednostněním rozkladu živin před PVA, ale jiným faktorem.

10 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA PŘÍTOMNOSTI MINERÁLNÍCH LÁTEK

10.1 Úvod

Dalším možným důvodem zpomalení rozkladu PVA kalem v přítomnosti živin by teoreticky mohl být nedostatek minerálních látek, vyvolaný množением jiných heterotrofních bakterií. Pokus byl nasazen s cílem vyloučit nebo prokázat nedostupnost minerálních látek PVA-degradérům v důsledku kompetice mezi pomalu rostoucími degradéry a ostatními mikroorganismy aktivovaného kalu, jejichž růst je umožněn přidávkou živin. Za podmínek degradačních testů (viz. kap. 8.1) byly nasazeny tři série lahví. V první sérii byl PVA jediným substrátem, v druhé sérii byla zajištěna trvalá přítomnost lehce odbouratelných živin pravidelnými přidávkami roztoku tryptonu se sacharosou. V poslední sérii byly vedle tryptonu a sacharosy pravidelně dodávány minerální látky obsažené v roztoku MMTS, jehož složení je uvedeno v kapitole 6.1 .

10.2 Rozvržení pokusu

V rámci tohoto pokusu připraveny tři série se třemi paralelními lahvemi vedle sebe, podle rozpisu:

- 1) MM + KAL 0,5 g·l⁻¹ + PVA 500 mg·l⁻¹ + FR 3x týdně
- 2) MM + KAL 0,5 g·l⁻¹ + PVA 500 mg·l⁻¹ + FR 3x týdně
- 3) MM + KAL 0,5 g·l⁻¹ + PVA 500 mg·l⁻¹ + FR 3x týdně
- 4) MM + KAL 0,5 g·l⁻¹ + PVA 500 mg·l⁻¹ + živiny TS 3x týdně
- 5) MM + KAL 0,5 g·l⁻¹ + PVA 500 mg·l⁻¹ + živiny TS 3x týdně
- 6) MM + KAL 0,5 g·l⁻¹ + PVA 500 mg·l⁻¹ + živiny TS 3x týdně
- 7) MM + KAL 0,5 g·l⁻¹ + PVA 500 mg·l⁻¹ + MMTS + K₂HPO₄ 3x týdně
- 8) MM + KAL 0,5 g·l⁻¹ + PVA 500 mg·l⁻¹ + MMTS + K₂HPO₄ 3x týdně
- 9) MM + KAL 0,5 g·l⁻¹ + PVA 500 mg·l⁻¹ + MMTS + K₂HPO₄ 3x týdně

Vždy v pondělí, středu a pátek bylo odebráno 250 µl vzorků z každé láhve a doplněno 250 µl sterilního fyziologického roztoku, roztoku živin, nebo roztoku živin a minerálních látek. Do lahví 7, 8 a 9 byl dále dávkován pevný K_2HPO_4 (100 mg/100 ml). Ve zvolených intervalech byla měřena koncentrace PVA spektrofotometricky.

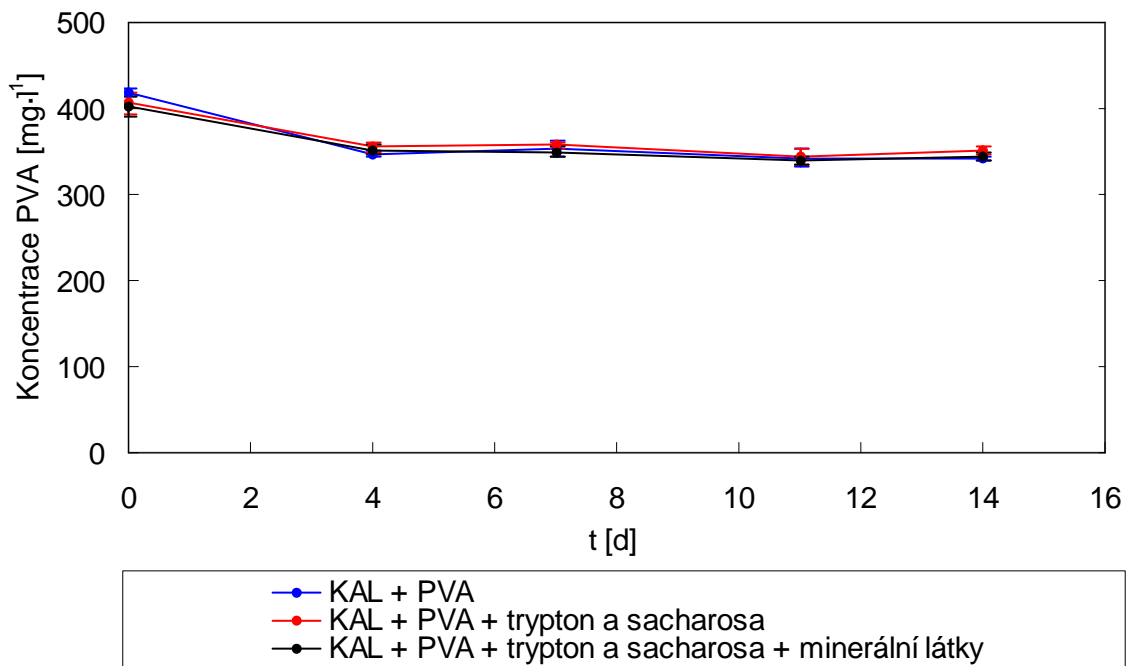
10.3 Výsledky pokusu

Pokus trval 14 dnů. Za celou dobu se rozklad PVA nestačil rozběhnout ani v jedné sérii lahví, jak je patrné z obrázku (Obr. 7). Hodnoty v grafu odpovídají průměru ze tří stanovení a chybové úsečky směrodatným odchylkám uvedeným v tabulce (Tab. 7).

Tab. 7. Hodnoty koncentrace PVA ($mg \cdot l^{-1}$) a směrodatných odchylek v průběhu pokusu

Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odch.	Láhev č.			Průměr	Sm.odch.
	1	2	3			4	5	6		
0	412,6	420,2	422,4	418,4	5,16	415,6	411,3	390,6	405,8	13,34
4	350,8	344,6	347,1	347,5	3,12	360,4	349,1	356,0	355,2	5,69
7	355,4	343,7	361,9	353,7	9,20	361,2	354,8	356,1	357,4	3,39
11	333,8	339,6	354,2	342,5	10,54	351,3	347,7	333,1	344,0	9,66
14	341,6	340,0	344,9	342,2	2,48	353,3	346,4	353,6	351,1	4,07

Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odch.
	7	8	9		
0	395,6	394,8	415,2	401,9	11,54
4	356,8	344,8	354,0	351,9	6,30
7	354,3	343,0	352,0	349,8	5,95
11	335,4	345,3	340,4	340,4	4,95
14	341,8	342,8	349,1	344,6	3,98



Obr. 7. Závislost koncentrace PVA na čase

Důvodem nerozběhnutí degradace byla zanedbaná kontrola pH v průběhu pokusu. Průměrná hodnota pH naměřená před likvidací, byla nejnižší v té sérii, kde byl PVA jediným substrátem (pH = 4,40), v sérii s přidávkou živin bylo zjištěno pH = 5,38 a v sérii s minerály pH = 5,92. Tento pokles pH lze vysvětlit přítomností fosfor akumulujících bakterií v použitém kalu, neboť v případě rozkladu PVA čistými kulturami nebyl tak výrazný pokles pH zaznamenán.

11 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA PŘÍTOMNOSTI MINERÁLNÍCH LÁTEK II

11.1 Úvod

Tento experiment byl v podstatě zopakováním předchozího, s cílem vyloučit nebo prokázat nedostupnost minerálních látek PVA-degradérům v důsledku kompetice mezi pomalu rostoucími degradéry a ostatními mikroorganismy aktivovaného kalu, jejichž růst je umožněn přidavky živin.

Byly nasazeny tři série lahví. V první sérii byl PVA jediným dostupným substrátem, v druhé sérii byla zajištěna trvalá přítomnost lehce odbouratelných živin pravidelnými přídávky roztoku tryptonu a sacharosy. V poslední sérii byly vedle tryptonu a sacharosy pravidelně dodávány minerální látky obsažené v roztoku MMTS, jehož složení je uvedeno v kapitole 6.1.

11.2 Rozvržení pokusu

V rámci tohoto pokusu byly připraveny tři série se třemi paralelními lahvemi, podle rozpisu:

- 1) MM + KAL $0,5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + FR 3x týdně
- 2) MM + KAL $0,5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + FR 3x týdně
- 3) MM + KAL $0,5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + FR 3x týdně
- 4) MM + KAL $0,5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + živiny TS 3x týdně
- 5) MM + KAL $0,5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + živiny TS 3x týdně
- 6) MM + KAL $0,5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + živiny TS 3x týdně
- 7) MM + KAL $0,5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + MMTS + K_2HPO_4 3x týdně
- 8) MM + KAL $0,5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + MMTS + K_2HPO_4 3x týdně
- 9) MM + KAL $0,5\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + MMTS + K_2HPO_4 3x týdně

Vždy v pondělí, středu a pátek bylo odebráno 250 μl vzorků z každé láhve a doplněno 250 μl sterilního fyziologického roztoku, roztoku živin, nebo roztoku živin a minerálních látek.

Do lahví 7, 8 a 9 byl dále průběžně přidáván pevný K_2HPO_4 (100 mg/100 ml). Ve zvolených intervalech byla měřena koncentrace PVA spektrofotometricky a po zkušenostech z předchozího pokusu bylo pravidelně kontrolováno a upravováno pH pomocí roztoku NaOH na hodnoty 7,5 - 7,7.

11.3 Výsledky pokusu

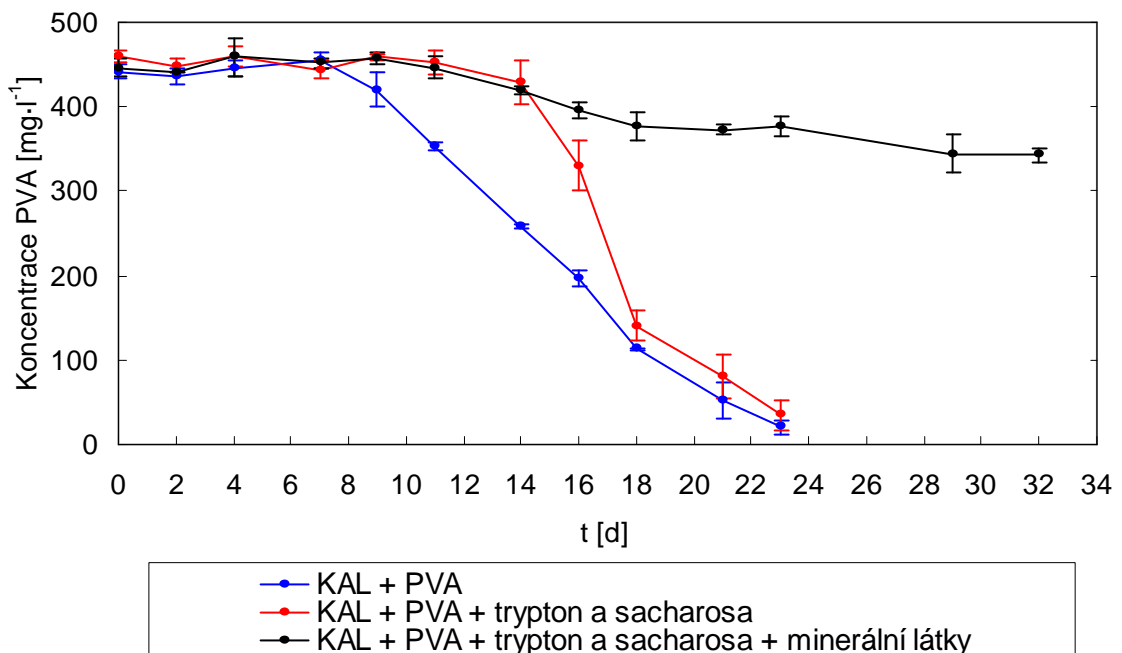
Pokus trval 32 dnů. Průběh rozkladu PVA v jednotlivých sériích je patrný z obrázku (Obr. 8). Hodnoty v grafu odpovídají průměru ze tří paralelních stanovení a chybové úsečky směrodatným odchylkám viz. tabulky (Tab. 8). Sedmý den pokusu došlo k rozbití láhve s číslem 1 a od tohoto dne výsledky první série lahví odpovídají jen dvěma stanovením.

Tab. 8. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatných odchylek v průběhu pokusu

Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·
	1	2	3			4	5	6		
0	434,2	449,8	441,1	441,7	7,86	464,9	451,1	463,4	459,8	7,56
2	435,6	428,3	447,3	437,0	9,59	451,1	454,8	439,6	448,5	7,93
4	435,5	453,7	449,1	446,1	9,46	448,3	472,4	458,5	459,7	12,09
7	464,5	454,1	445,5	454,7	9,47	430,9	451,6	448,2	443,6	11,09
9		405,8	434,3	420,1	20,13	457,8	457,0	462,3	459,0	2,89
11		349,7	356,7	353,2	4,98	454,8	436,1	465,2	452,0	14,74
14		260,7	257,4	259,1	2,34	416,5	412,4	459,0	429,3	25,80
16		189,9	204,0	196,9	9,93	330,7	301,2	359,4	330,4	29,11
18		114,2	111,0	112,6	2,30	121,8	157,4	140,9	140,0	17,84
21		66,8	36,1	51,4	21,75	57,3	109,9	74,7	80,6	26,81
23		26,5	14,7	20,6	8,31	17,2	53,7	33,6	34,8	18,28

Tab. 8. pokračování

Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odch.
	7	8	9		
0	451,1	454,2	433,9	446,4	10,90
2	440,4	441,1	441,1	440,8	0,39
4	470,1	473,9	433,2	459,1	22,49
7	453,2	457,6	446,1	452,3	5,81
9	454,2	453,6	465,5	457,7	6,68
11	431,8	455,2	451,7	446,3	12,63
14	412,7	421,9	421,4	418,7	5,17
16	387,0	397,0	405,4	396,4	9,22
18	363,1	393,8	373,1	376,6	15,66
21	376,2	365,5	377,7	373,2	6,66
23	366,6	375,2	388,4	376,7	10,96
29	319,5	363,0	350,5	344,3	22,38
32	340,3	351,6	336,5	342,8	7,85



Obr. 8. Závislost koncentrace PVA na čase

Podle očekávání nejrychleji byl PVA rozložen v sérii, kde byl jediným dostupným substrátem. Rozklad v sérii s pravidelnými přísadkami živin byl zpomalen, avšak toto zpomalení nebylo příliš výrazné. Pravidelné přísadky minerálních látek s živinami (MMTS) do lahví poslední série nevedly ke zlepšení rozkladu PVA v přítomnosti živin, ale naopak působily inhibičně. Z toho plyne, že nedostatek minerálních látek není příčinou zpomalení rozkladu PVA v přítomnosti živin.

Během tohoto pokusu bylo také pravidelně měřeno a upravováno pH degračních směsí. Nejvýraznější pokles hodnot pH byl zaznamenán mezi čtvrtým a sedmým dnem pokusu, kdy pH pokleslo z hodnoty 7,5 na hodnotu okolo $\text{pH} = 5,2$ v sérii kde byl PVA jediným substrátem i v sérii s přísadkami živin.

12 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI JK2 A OT2 V PROSTŘEDÍ SUPERNATANTU KALU ŽIVENÉHO PŘÍDAVKY ŽIVIN

12.1 Úvod

Cílem tohoto pokusu bylo ověřit, zda metabolity heterotrofních bakterií, množících se na tryptonu či sacharose, mohou ovlivňovat degradační schopnosti PVA-degradérů. Proto byl připraven supernatant kalu podle postupu uvedeného v kapitole 8.5 a tento byl použit jako prostředí degradačních testů v porovnání s rozkladem v prostředí minerálního média.

12.2 Rozvržení pokusu

V rámci tohoto pokusu byly nasazeny čtyři série s třemi paralelními lahvemi, podle rozpisu:

- 1) Kultura JK2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + supernatant kalu + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 2) Kultura JK2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + supernatant kalu + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 3) Kultura JK2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + supernatant kalu + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 4) Kultura JK2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 5) Kultura JK2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 6) Kultura JK2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 7) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + supernatant kalu + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 8) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + supernatant kalu + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 9) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + supernatant kalu + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 10) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 11) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 12) Kultura OT2 v MM s PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

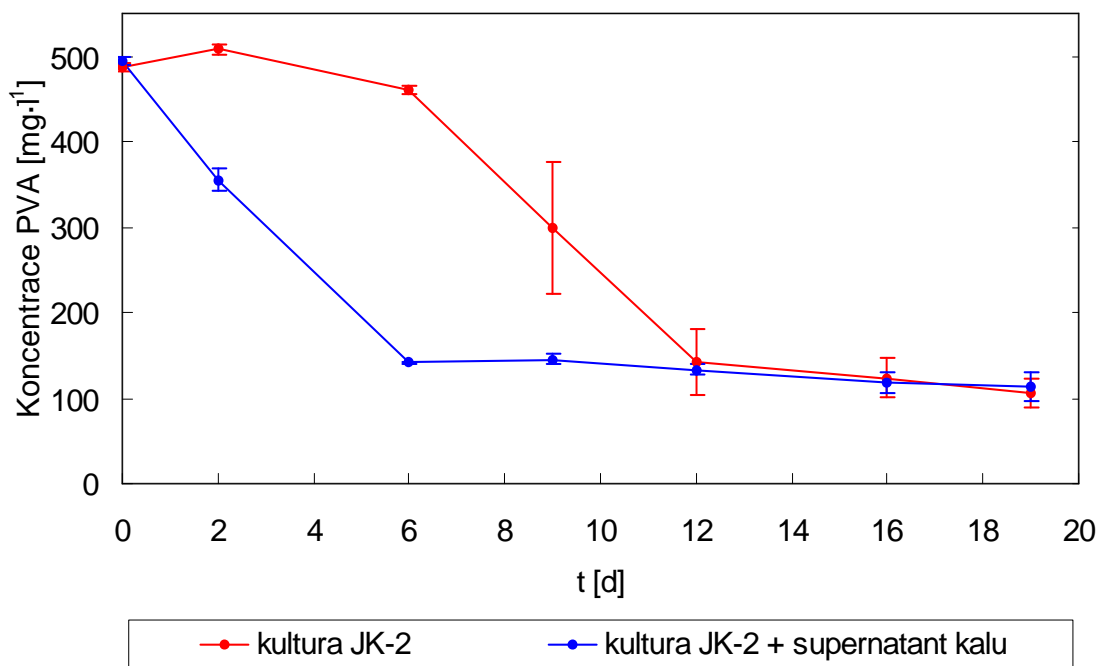
V průběhu pokusu byly odebírány vzorky ke stanovení koncentrace PVA a také koncentrace rozpuštěného organického uhlíku.

12.3 Výsledky pokusu

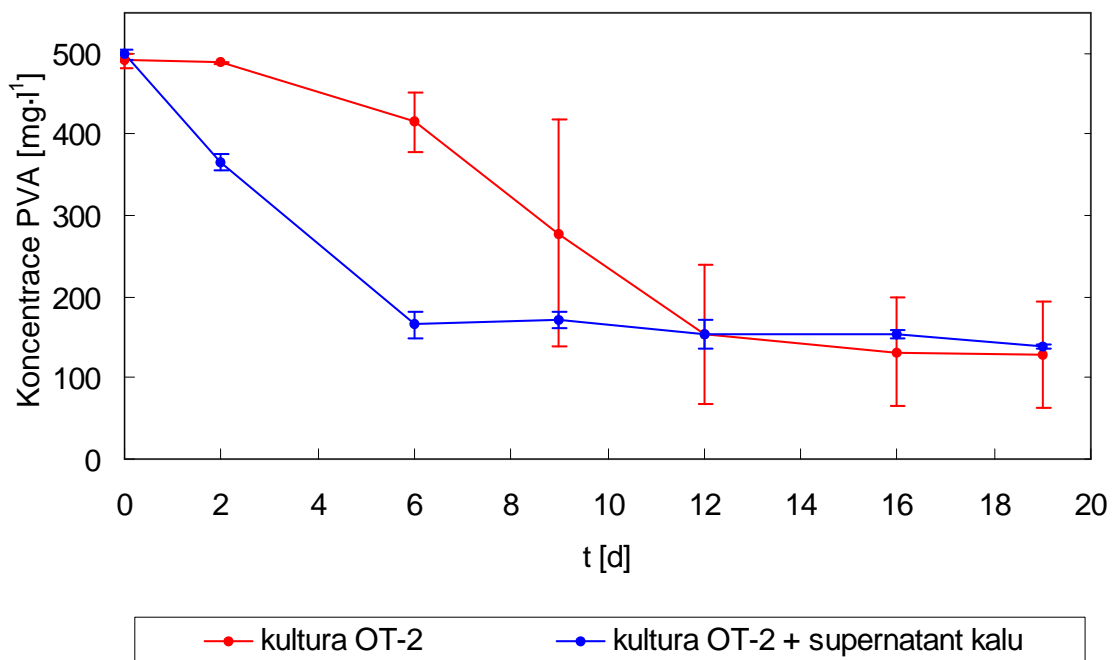
Pokus probíhal 19 dnů. Průběh rozkladu PVA pro jednotlivé degradační kultury je patrný z obrázků (Obr. 9 a Obr. 10). Hodnoty v grafech odpovídají průměrům ze tří paralelních stanovení a chybové úsečky směrodatným odchylkám - viz. tabulka 9. Pokles koncentrace PVA byl sledován také stanovením koncentrace DOC viz obrázky (Obr. 11 a Obr. 12), stanovené hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab. 10).

Tab. 9. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatných odchylek v průběhu pokusu

Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·
	1	2	3			4	5	6		
0	490,1	498,3	496,2	494,9	4,24	484,0	487,0	493,3	488,1	4,75
2	340,0	358,8	367,9	355,6	14,23	512,5	510,6	501,3	508,1	5,99
6	140,7	142,4	142,0	141,7	0,92	454,5	463,2	462,9	460,2	4,90
9	144,3	141,4	151,4	145,7	5,14	346,5	208,8	341,7	299,0	78,16
12	133,1	126,8	139,8	133,2	6,50	135,6	106,5	183,1	141,7	38,66
16	111,7	109,6	132,5	117,9	12,61	131,9	98,6	141,0	123,8	22,30
19	102,4	105,2	131,9	113,2	16,27	122,4	87,9	109,3	106,5	17,44
Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·	Láhev č.			Průměr	Sm.odch ·
	7	8	9			10	11	12		
0	496,2	506,6	495,1	499,3	6,35	497,6	493,7	481,6	491,0	8,36
2	376,2	362,5	357,3	365,3	9,76	490,1	486,5	489,4	488,7	1,89
6	183,6	150,4	164,6	166,2	16,65	416,5	379,2	450,8	415,5	35,84
9	181,6	171,6	160,8	171,3	10,41	366,9	116,4	351,1	278,1	140,32
12	175,0	144,1	141,9	153,7	18,51	231,7	61,6	168,5	154,0	85,98
16	155,4	157,7	149,5	154,2	4,21	187,5	58,4	149,5	131,8	66,37
19	141,6	136,5	140,8	139,6	2,74	189,3	57,4	139,3	128,7	66,59



Obr. 9. Závislost koncentrace PVA na čase pro rozklad kulturou JK-2

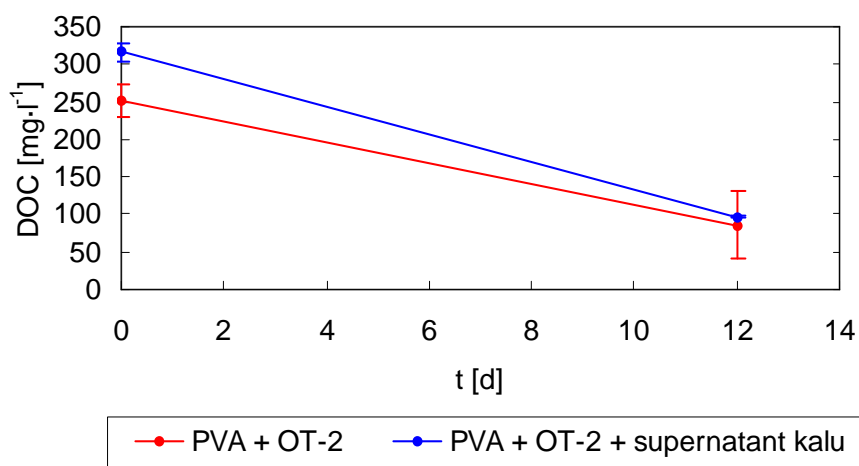


Obr. 10. Závislost koncentrace PVA na čase pro rozklad kulturou OT-2

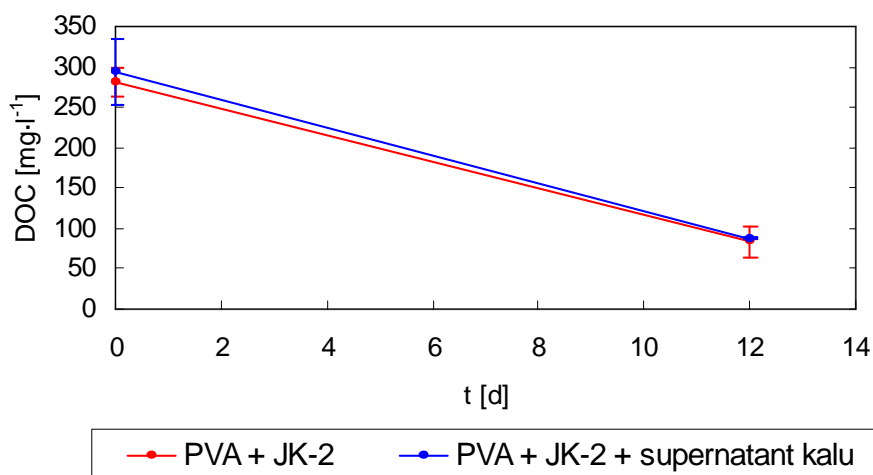
Tab. 10. Hodnoty DOC ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatných odchylek na počátku a ke konci testu

Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odc h	Láhev č.			Průměr	Sm.odc h
	1	2	3			4	5	6		
0	251,8	296,6	334,4	294,2	41,36	296,1	284,5	261,1	280,6	17,82
12	88,0	87,9	85,8	87,2	1,27	84,1	64,3	101,3	83,2	18,52

Doba [dny]	Láhev č.			Průměr	Sm.odc h	Láhev č.			Průměr	Sm.odc h
	7	8	9			10	11	12		
0	330,5	305,9	313,0	316,5	12,65	230,0	251,3	272,4	251,3	21,18
12	99,0	95,8	95,3	96,7	2,02	113,6	34,5	109,3	85,8	44,49



Obr. 11. Hodnoty DOC v průběhu pokusu (kultura OT-2)



Obr. 12. Závislost DOC v průběhu pokusu (kultura JK-2)

Uvedené grafy (Obr. 9 a Obr. 10) jasně ukazují, že u obou kultur proběhl rozklad PVA v prostředí kalového supernatantu již během 6 dnů, zatímco v prostředí minerálního média bylo zapotřebí k rozložení polymeru delšího času. Zde se rozklad zastavil přibližně po 12-ti dnech na poněkud rozdílných koncentracích zbytkového PVA (na rozdíl od lahví se supernatantem, kde se zbytkové koncentrace PVA v rámci jedné série lahví skoro vůbec nelišily). Největší rozdíly byly zaznamenány v lahvích 10 a 11, jak je vidět v tabulce (Tab. 9). Například v 9. dni pokusu byl rozdíl koncentrací v těchto lahvích roven $250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Na konci pokusu byla v láhvi 10 zbytková koncentrace PVA rovna $189 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (což odpovídá degradaci z 62 %) a v láhvi 11 zůstalo jen $57 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ PVA (což odpovídá degradaci z 88 %). Tento rozdíl mohl být způsoben kontaminací jedné z těchto lahví, za předpokladu, že přítomnost kontaminující bakterie podpořila nebo naopak negativně ovlivnila degradaci PVA.

V nultý a dvanáctý den pokusu bylo provedeno stanovení rozpuštěného uhlíku, k ověření výsledků spektrofotometrického stanovení koncentrace PVA a pro průkaz mineralizace degradovaného polymeru. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 10) a vyneseny v grafech (Obr. 11 a Obr. 12). Za předpokladu asi 50% obsahu uhlíku v PVA potvrzují výsledky spektrofotometrické metody.

Závěrem tohoto pokusu je, že přítomnost rozpuštěných metabolitů heterotrofních bakterií nevyvolala žádnou inhibici použitých degradačních kultur, ale vedla zejména na začátku testu k urychlení rozkladu PVA. Tímto byla prokázána malá nebo žádná role metabolitů, jako jsou antibiotika nebo bakteriociny.

13 POSOUZENÍ CITLIVOSTI PVA-DEGRADAČNÍCH KULTUR NA VYŠŠÍ KONCENTRACE FOSFOREČNANŮ

13.1 Úvod

Na základě výsledků předcházejících experimentů lze předpokládat, že zpomalení rozkladu PVA kalem v trvalé přítomnosti živin není způsobeno substrátovou kompeticí (upřednostnění živin před PVA), ani nedostatkem minerálních látek, ani účinkem rozpuštěných metabolitů heterotrofních bakterií. Proto se náplní zbývajících pokusů stalo posouzení citlivosti PVA-degradačních bakterií vůči zvýšeným koncentracím solí. Vedly k tomu určité zkušenosti z minulých prací s tematikou biodegradace PVA [37] a současně tomu napovídaly výsledky třetího experimentu.

Za podmínek růstových testů (viz.kap.8.4) byl sledován růst degradačních kultur (OT 2, JK 2) na tryptonu, v prostředích o pěti různých koncentracích fosforečnanů (viz 6.1, tab. 3). Schopnost růstu PVA-degradačních kultur na tryptonu byla již ověřena v předchozí diplomové práci [13].

13.2 Rozvržení pokusu

Jednotlivé typy minerálních médií, v pořadí s rostoucí koncentrací fosforečnanů, byly dávány vždy jeden typ do šesti jamek jednoho sloupce mikrotitrační destičky:

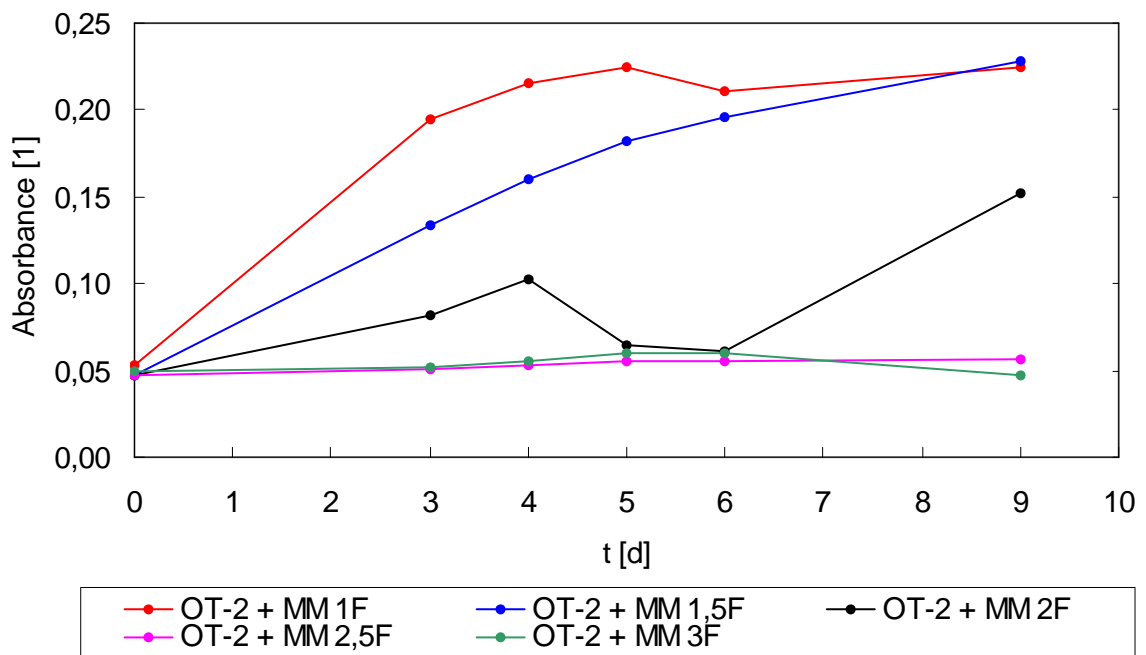
- 1) PVA-degradační kultura + MM 1F + trypton $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 2) PVA-degradační kultura + MM 1,5F + trypton $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 3) PVA-degradační kultura + MM 2F + trypton $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 4) PVA-degradační kultura + MM 2,5F + trypton $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 5) PVA-degradační kultura + MM 3F + trypton $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

13.3 Výsledky pokusu

Růst jednotlivých kultur byl sledován po dobu 9 dnů a je zaznamenán v grafech (Obr. 13 a Obr. 14). Hodnoty v grafech odpovídají průměrům z měření minimálně pěti jamek mikrotitrační destičky. V tabulkách (Tab. 11 a Tab. 12) jsou uvedeny i příslušné směrodatné odchylky.

Tab. 11. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou OT 2

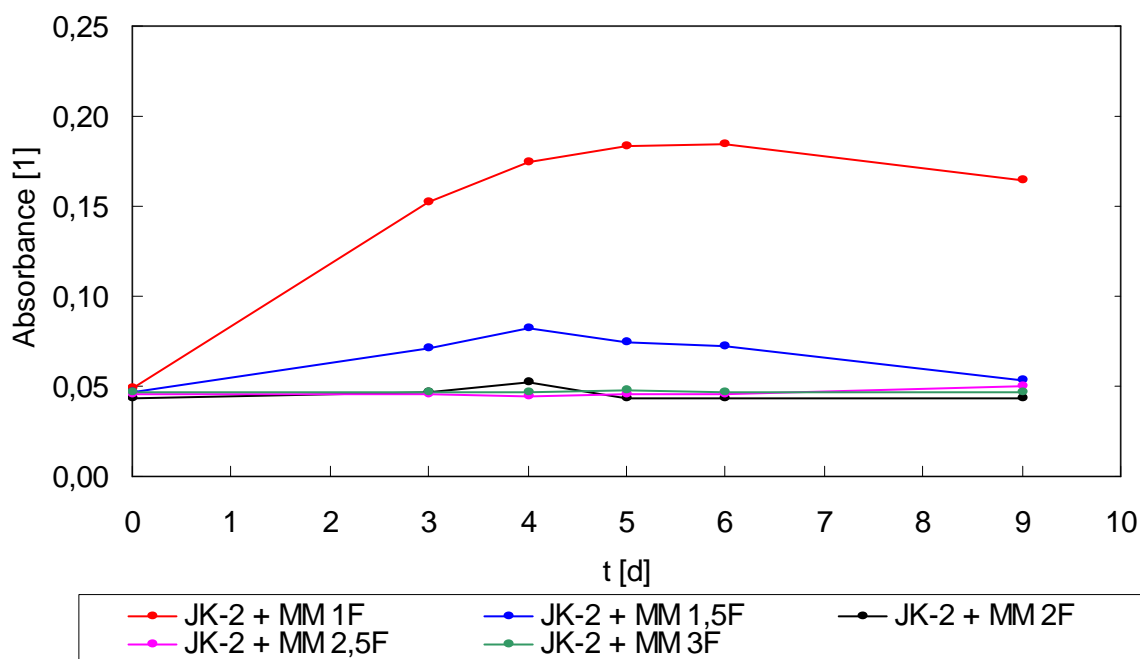
doba [dny]	MM 1F		MM 1,5F		MM 2F		MM 2,5F		MM 3F	
	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h
0	0,0530	0,0041	0,0472	0,0013	0,0477	0,0033	0,0472	0,0016	0,0492	0,0023
3	0,1942	0,0173	0,1338	0,0738	0,0823	0,0661	0,0505	0,0081	0,0513	0,0085
4	0,2152	0,0117	0,1607	0,0789	0,1027	0,0989	0,0532	0,0140	0,0552	0,0206
5	0,2247	0,0194	0,1823	0,0747	0,0648	0,0285	0,0558	0,0189	0,0597	0,0306
6	0,2108	0,0245	0,1960	0,0584	0,0610	0,0246	0,0553	0,0190	0,0597	0,0311
9	0,2250	0,0160	0,2278	0,0431	0,1520	0,1801	0,0570	0,0194	0,0476	0,0025



Obr. 13. Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura OT-2)

Tab.12. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou JK-2

Doba [dny]	MM 1F		MM 1,5F		MM 2F		MM 2,5F		MM 3F	
	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h
0	0,0488	0,0030	0,0463	0,0026	0,0438	0,0012	0,0454	0,0005	0,0462	0,0008
3	0,1375	0,0572	0,0663	0,0372	0,0453	0,0054	0,0452	0,0008	0,0467	0,0020
4	0,1642	0,0413	0,0752	0,0494	0,0500	0,0167	0,0448	0,0008	0,0467	0,0012
5	0,1792	0,0217	0,0770	0,0507	0,0555	0,0297	0,0458	0,0010	0,0473	0,0016
6	0,1768	0,0307	0,0718	0,0460	0,0588	0,0378	0,0458	0,0012	0,0468	0,0017
9	0,1800	0,0591	0,0707	0,0446	0,0614	0,0395	0,0454	0,0009	0,0468	0,0015



Obr. 14. Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura JK-2)

Z grafů je patrné, že zvýšené koncentrace fosforečnanů v prostředí negativně ovlivňují růst obou degradačních kultur. Kultury OT-2 a JK-2 byly schopné růst jen v prvních dvou typech minerálního média (o koncentracích fosforečnanů $6,67 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Růst v prostředích s koncentrací fosforečnanů $13,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a vyšší byl výrazně zpomalen nebo úplně znemožněn.

14 POSOUZENÍ CITLIVOSTI PVA-DEGRADAČNÍCH KULTUR NA VYŠŠÍ KONCENTRACE FOSFOREČNANŮ II

14.1 Úvod

Tento pokus byl proveden podobně jako pokus předchozí s tím rozdílem, že bylo pracováno se třemi kulturami degradérů, při dvojnásobné intenzitě inokulaci (10 μ l inokula místo 5 μ l, použitých v pokusu předchozím). Byl tedy sledován růst degradačních kultur na tryptonu, v prostředích o pěti různých koncentracích fosforečnanů (viz kap 6.1, Tab. 3). Opakování bylo provedeno z důvodu potvrzení výsledků pokusu předchozího.

14.2 Rozvržení pokusu

Jednotlivé typy minerálních médií, v pořadí s rostoucí koncentrací fosforečnanů, byly dávkovány vždy jeden typ do šesti jamek jednoho sloupce mikrotitrační destičky:

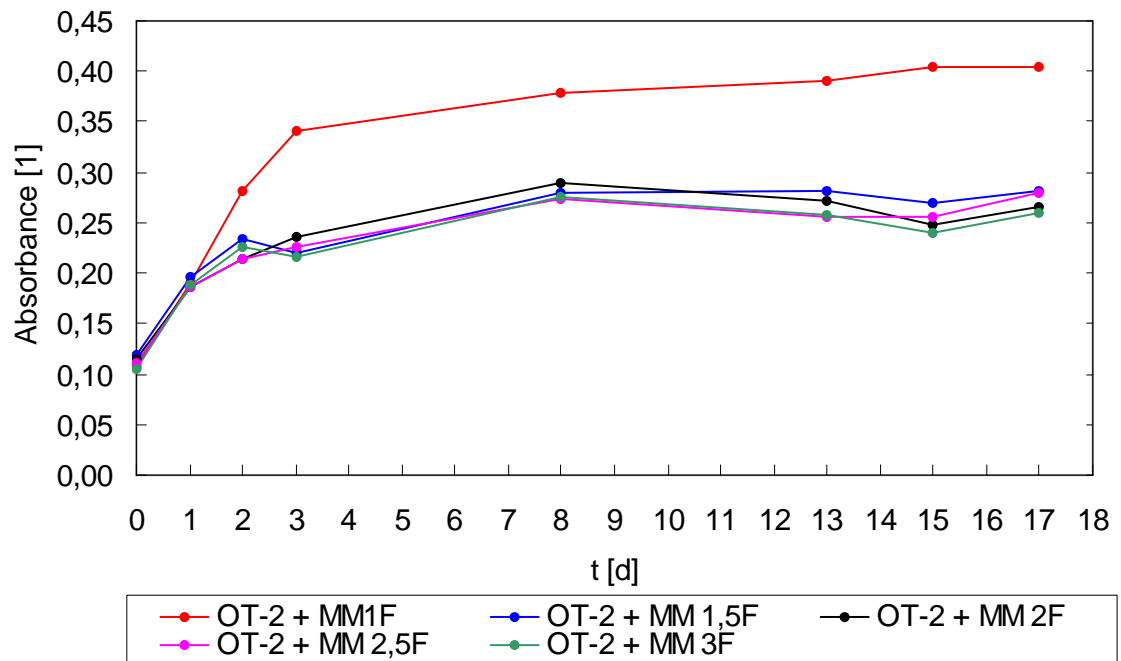
- 1) PVA-degradační kultura + MM 1F + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 2) PVA-degradační kultura + MM 1,5F + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 3) PVA-degradační kultura + MM 2F + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 4) PVA-degradační kultura + MM 2,5F + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 5) PVA-degradační kultura + MM 3F + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

14.3 Výsledky pokusu

Růst jednotlivých kultur byl sledován po dobu 17 dnů a byl zaznamenán v grafech (Obr. 15, Obr. 16 a Obr. 17). Hodnoty v grafech odpovídají průměrům z měření minimálně pěti jamek mikrotitrační destičky. V tabulkách (Tab. 13, Tab. 14 a Tab. 15) jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky.

Tab. 13. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou OT-2

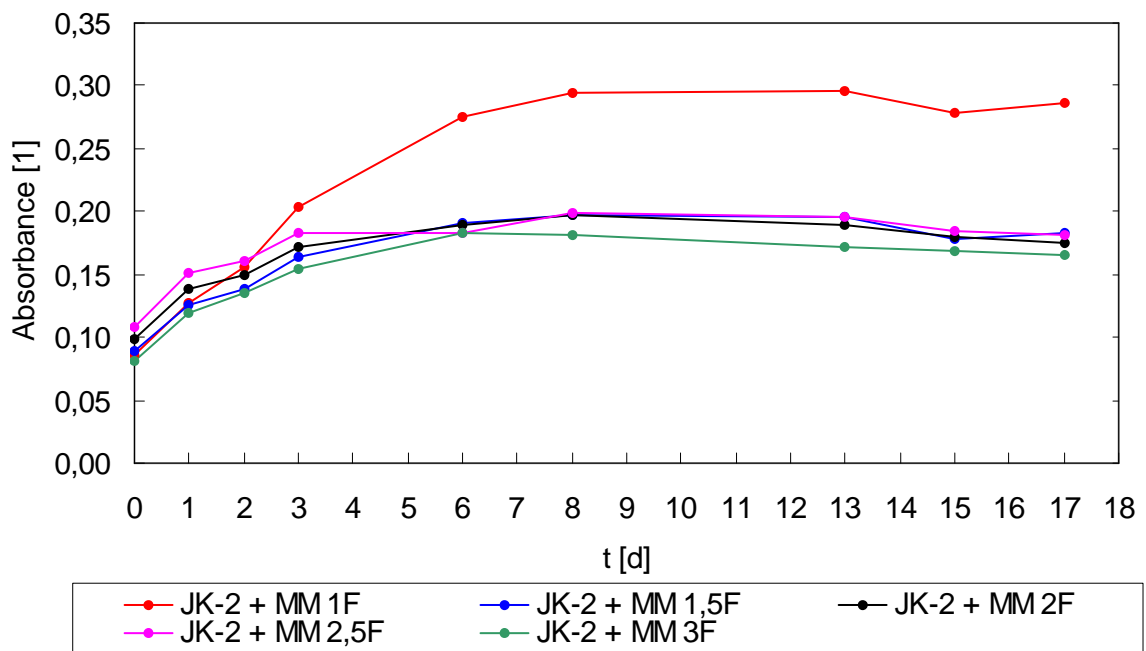
Doba [dny]	MM 1F		MM 1,5F		MM 2F		MM 2,5F		MM 3F	
	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch
0	0,1078	0,0160	0,1183	0,0228	0,1140	0,0243	0,1115	0,0318	0,1045	0,0283
1	0,1905	0,0193	0,1955	0,0296	0,1865	0,0316	0,1873	0,0318	0,1888	0,0332
2	0,2820	0,0293	0,2330	0,0450	0,2133	0,0341	0,2150	0,0390	0,2260	0,0407
3	0,3405	0,0556	0,2205	0,0110	0,2353	0,0381	0,2260	0,0321	0,2170	0,0428
6	0,2553	0,0304	0,2038	0,0140	0,2025	0,0178	0,1850	0,0226	0,1970	0,0224
8	0,3783	0,0316	0,2800	0,0171	0,2888	0,0208	0,2735	0,0162	0,2748	0,0270
13	0,3908	0,0330	0,2815	0,0106	0,2720	0,0221	0,2563	0,0158	0,2573	0,0318
15	0,4038	0,0300	0,2703	0,0167	0,2485	0,0271	0,2553	0,0218	0,2400	0,0296
17	0,4050	0,0447	0,2810	0,0119	0,2653	0,0179	0,2788	0,0382	0,2603	0,0373



Obr. 15. Závislost absorbance kultivačního média na době testu

Tab. 14. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou JK-2

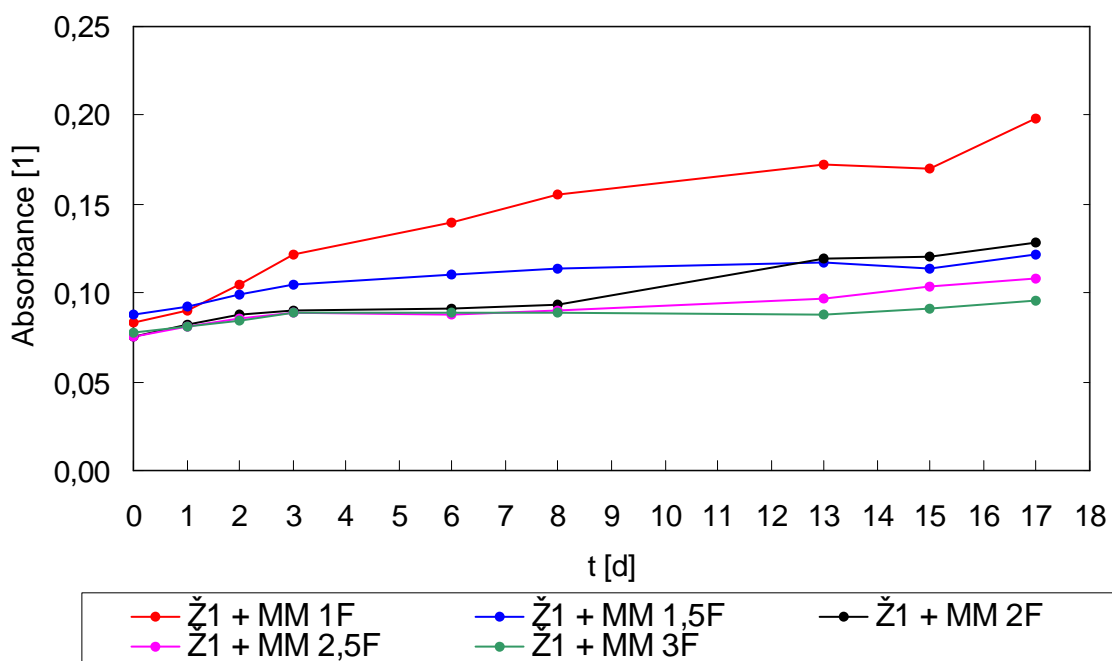
doba [dny]	MM 1F		MM 1,5F		MM 2F		MM 2,5F		MM 3F	
	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch
0	0,0858	0,0036	0,0893	0,0081	0,0993	0,0245	0,1078	0,0232	0,0810	0,0061
1	0,1273	0,0033	0,1250	0,0180	0,1383	0,0293	0,1508	0,0311	0,1200	0,0050
2	0,1560	0,0026	0,1388	0,0147	0,1493	0,0281	0,1603	0,0282	0,1345	0,0048
3	0,2035	0,0042	0,1640	0,0176	0,1720	0,0228	0,1823	0,0207	0,1543	0,0038
6	0,2758	0,0072	0,1915	0,0117	0,1888	0,0010	0,1835	0,0031	0,1825	0,0026
8	0,2945	0,0064	0,1980	0,0167	0,1970	0,0116	0,1993	0,0222	0,1820	0,0022
13	0,2958	0,0100	0,1953	0,0263	0,1890	0,0227	0,1955	0,0264	0,1718	0,0019
15	0,2783	0,0188	0,1788	0,0198	0,1800	0,0141	0,1843	0,0178	0,1683	0,0024
17	0,2870	0,0131	0,1830	0,0236	0,1748	0,0118	0,1808	0,0187	0,1648	0,0022



Obr. 16. Závislost absorbance kultivačního média na době testu

Tab. 15. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou Ž-1

doba [dny]	MM 1F		MM 1,5F		MM 2F		MM 2,5F		MM 3F	
	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch	průměr	sm.odch
0	0,0838	0,0049	0,0880	0,0210	0,0758	0,0046	0,0758	0,0115	0,0778	0,0050
1	0,0903	0,0041	0,0925	0,0217	0,0820	0,0052	0,0808	0,0136	0,0813	0,0043
2	0,1050	0,0027	0,0995	0,0173	0,0883	0,0056	0,0860	0,0130	0,0850	0,0042
3	0,1220	0,0018	0,1050	0,0154	0,0903	0,0053	0,0885	0,0133	0,0893	0,0043
6	0,1393	0,0033	0,1103	0,0127	0,0913	0,0059	0,0880	0,0118	0,0893	0,0039
8	0,1558	0,0053	0,1143	0,0127	0,0930	0,0061	0,0905	0,0126	0,0890	0,0036
13	0,1720	0,0231	0,1170	0,0176	0,1193	0,0226	0,0970	0,0076	0,0880	0,0032
15	0,1698	0,0193	0,1143	0,0139	0,1205	0,0210	0,1033	0,0085	0,0908	0,0070
17	0,1980	0,0483	0,1215	0,0125	0,1283	0,0222	0,1085	0,0077	0,0960	0,0145



Obr. 17. Závislost absorbance kultivačního média na době testu

průběhu tohoto pokusu byl zaznamenán nejlepší růst všech tří kultur v prostředí prvního typu minerálního média s nejnižší koncentrací fosforečnanů, tj. $6,67 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tímto byly

potvrzeny výsledky předchozího pokusu, že vyšší koncentrace fosforečnanů v prostředí negativně ovlivňují růst PVA-degradačních kultur.

15 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI OT2, JK2 A Ž1 V PROSTŘEDÍ SE ZVÝŠENOU KONCENTRACÍ FOSFOREČNANŮ

15.1 Úvod

Vzhledem k výsledkům předchozích dvou pokusů, ve kterých byl sledován růst PVA-degradačních kultur na tryptonu, bylo nutné potvrdit negativní vliv zvýšené koncentrace fosforečnanů i na PVA-degradační schopnosti těchto kultur.

Za podmínek degradačních testů (viz. Kap. 8.1) byl sledován rozklad PVA v prostředích o pěti různých koncentracích fosforečnanů. K tomuto účelu bylo připraveno pět druhů minerálních médií podle tabulky (viz. kap. 6.1, Tab. 3).

15.2 Rozvržení pokusu

V rámci tohoto pokusu byly nasazeny tři série po pěti lahvích podle rozpisu:

- 1) Kultura OT2 v MM 1F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 2) Kultura OT2 v MM 1,5F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 3) Kultura OT2 v MM 2F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 4) Kultura OT2 v MM 2,5F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 5) Kultura OT2 v MM 3F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 6) Kultura JK2 v MM 1F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 7) Kultura JK2 v MM 1,5F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 8) Kultura JK2 v MM 2F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 9) Kultura JK2 v MM 2,5F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 10) Kultura JK2 v MM 3F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 11) Kultura Ž1 v MM 1F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 12) Kultura Ž1 v MM 1,5F + PQQ 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

- 13) Kultura Ž1 v MM 2F + PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 14) Kultura Ž1 v MM 2,5F + PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- 15) Kultura Ž1 v MM 3F + PQQ $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ + PVA $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

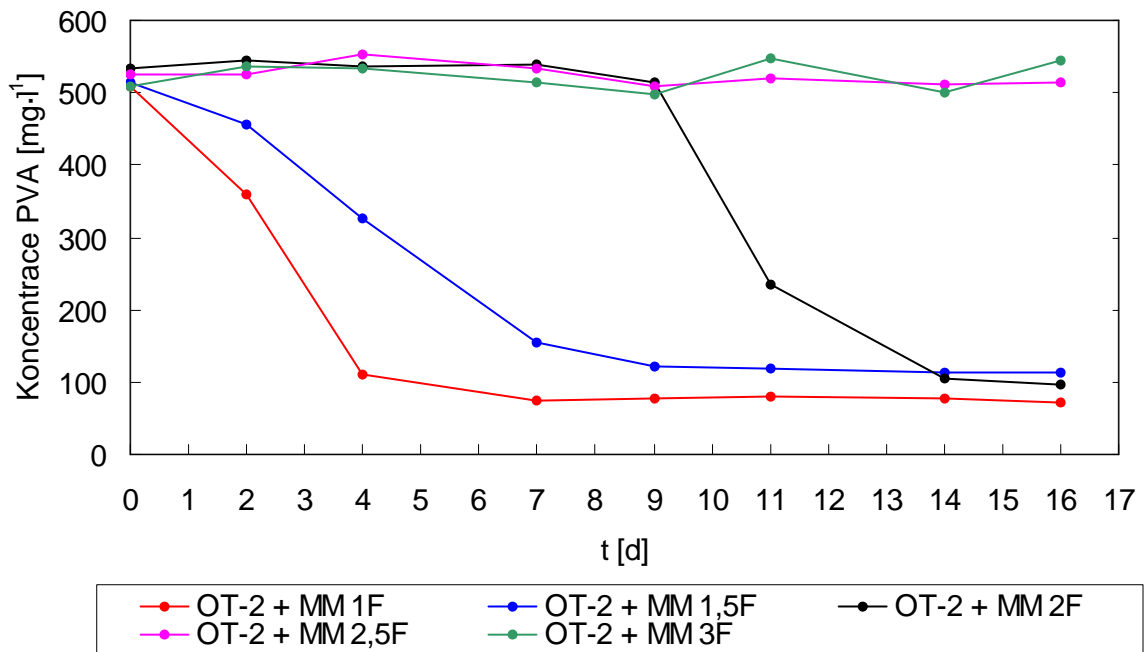
V průběhu pokusu byly ve zvolených intervalech odebírány vzorky ($250 \mu\text{l}$) pro stanovení koncentrace PVA. Na základě pozorování z prvního pokusu (viz. kap. 9) byl do lahví s kulturou Ž1 přidán trypton (výsledná koncentrace $300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) pro zabezpečení jejích potřeb. Toto bylo provedeno na počátku pokusu, ve čtvrtý a sedmý den.

15.3 Výsledky pokusu

Pokus probíhal 16 dnů. Průběh rozkladu PVA pro jednotlivé série lahví je patrný z obrázků (Obr. 18, Obr. 19 a Obr. 20). Hodnoty v grafech odpovídají průměru z pěti paralelních stanovení koncentrace PVA. Jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 16, Tab. 17 a Tab. 18).

Tab. 16. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v průběhu testu

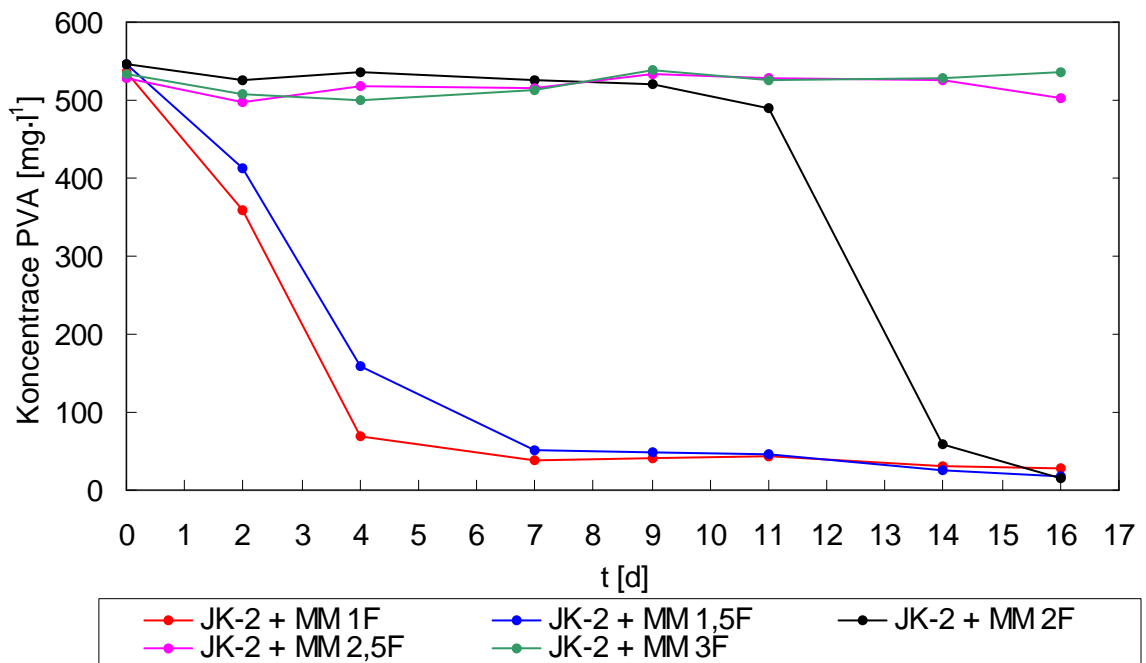
Doba [dny]	Kultura OT 2				
	MM 1F	MM 1,5F	MM 2F	MM 2,5F	MM 3F
0	509,4	513,9	534,6	524,9	507,5
2	358,3	456,8	545,4	524,8	535,9
4	111,1	326,7	537,1	552,7	532,4
7	73,7	155,0	538,4	532,6	515,5
9	75,8	127,1	512,9	512,6	513,3
11	81,1	117,7	234,1	520,9	546,7
14	77,3	112,3	104,2	512,0	501,2
16	72,1	113,5	98,1	515,2	544,9



Obr. 18. Závislost koncentrace PVA na čase (kultura OT-2)

Tab. 17. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v průběhu testu

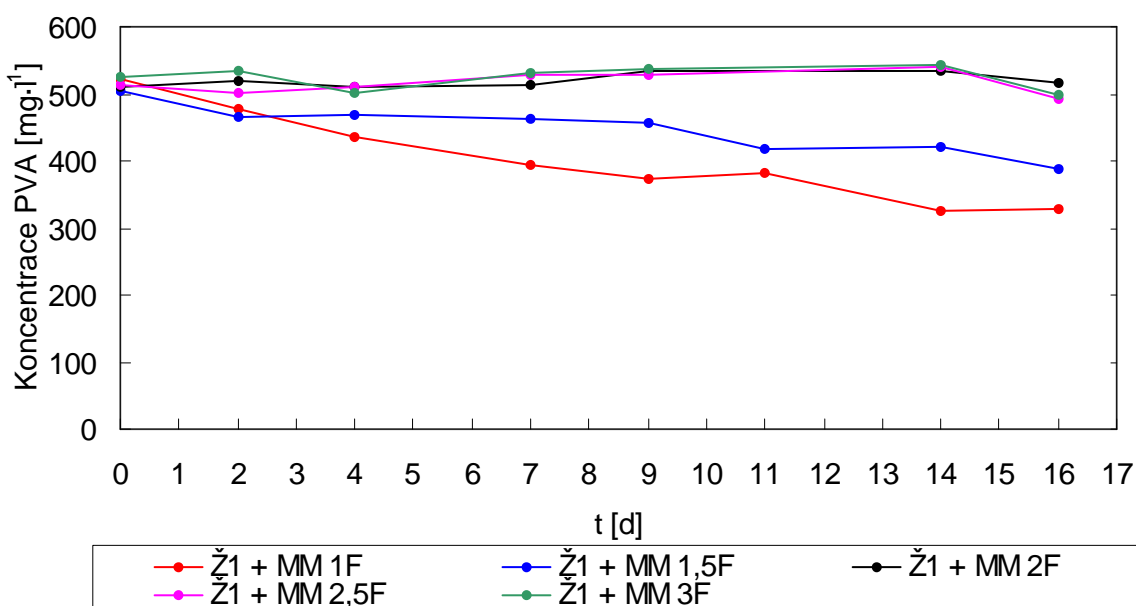
Doba [dny]	Kultura JK-2				
	MM 1F	MM 1,5F	MM 2F	MM 2,5F	MM 3F
0	537,0	546,4	545,4	527,4	532,3
2	360,1	412,2	526,0	497,0	506,5
4	68,9	159,7	535,1	518,6	500,8
7	39,5	51,5	524,8	514,4	512,3
9	39,9	49,6	534,0	525,3	530,8
11	44,4	46,7	489,9	527,9	525,2
14	29,8	25,7	58,2	526,1	528,3
16	27,5	18,7	16,6	501,8	534,6



Obr. 19. Závislost koncentrace PVA na čase (kultura JK-2)

Tab. 18. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v průběhu testu

Doba [dny]	Kultura Ž-1				
	MM 1F	MM 1,5F	MM 2F	MM 2,5F	MM 3F
0	521,5	503,5	509,9	513,6	524,7
2	476,4	464,9	518,6	503,0	533,3
4	434,4	467,8	511,3	511,5	500,8
7	392,7	463,5	512,7	529,4	531,5
9	372,2	457,4	533,4	527,5	538,6
11	381,1	416,8	-	-	-
14	325,3	420,8	533,8	539,3	543,4
16	328,8	389,2	515,8	491,8	498,3



Obr. 20. Závislost koncentrace PVA na čase (kultura Ž-1)

První dva uvedené grafy (Obr. 18 a Obr. 19), které odpovídají kulturám OT-2 a JK-2, nevykazují velké rozdíly. V obou případech byl PVA nejrychleji rozložen v prostředí s nejnižší koncentrací fosforečnanů ($6,67 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a s malým zpožděním také v druhém typu prostředí o koncentraci fosforečnanů $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po čase nastal také rozklad

v prostředí minerálního média s označením MM2F (o koncentraci fosforečnanů $13,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). V případě kultury OT-2 se rozklad rozběhl v 9. den pokusu a u kultury JK-2 kolem 11. dne.

V případě kultury Ž1 bylo zjištěno, že její degradační schopnosti v této fázi práce již nebyly příliš výrazné a že došlo jen k částečnému rozkladu polymeru. I v této situaci však bylo zřejmé, že degradace v prostředí zvýšených koncentrací fosforečnanů je zpomalena či potlačena.

16 POSOUZENÍ CITLIVOSTI PVA-DEGRADAČNÍCH KULTUR NA VYŠŠÍ KONCENTRACE SOLÍ

16.1 Úvod

Náplní posledního pokusu bylo posoudit, jestli zaznamenaná citlivost PVA-degradačních kultur představuje konkrétní citlivost k vyšším koncentracím fosforečnanů, nebo se jedná o obecnou citlivost vůči vyšším koncentracím minerálních solí. K uskutečnění pokusu byly vybrány hydrogenuhličitaný, neboť tyto soli mohou v prostředí vznikat mikrobiální mineralizací organických substrátů, jsou málo alkalické a patří k dostupným chemikáliím.

Byl sledován růst degradačních kultur v prostředích o třech různých koncentracích solí. K tomuto účelu bylo připraveno pět druhů minerálních médií podle tabulky (viz. kap. 6.1, Tab. 4). Díky výhodám mikrotitrační destičky (velký počet testů) bylo možné sledovat případné odlišnosti růstu v prostředí NaHCO_3 nebo KHCO_3 , tedy posoudit i vliv typu kationtu.

16.2 Rozvržení pokusu

Jednotlivé typy minerálních médií, v pořadí s rostoucím obsahem solí, byly dávkovány vždy jeden typ do šesti jamek jednoho sloupce mikrotitrační destičky:

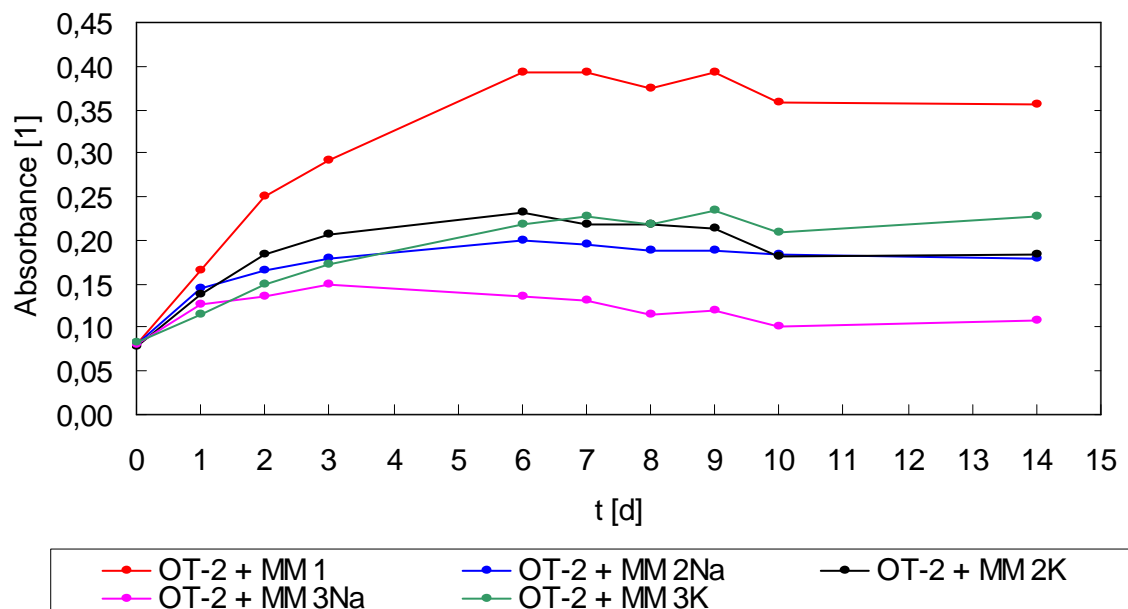
- 1) PVA-degradační kultura + MM 1 + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 2) PVA-degradační kultura + MM 2Na + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 3) PVA-degradační kultura + MM 2K + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 4) PVA-degradační kultura + MM 3Na + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
- 5) PVA-degradační kultura + MM 3K + trypton $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

16.3 Výsledky pokusu

Růst jednotlivých kultur byl sledován po dobu 14 dnů a byl zaznamenán v grafech (Obr. 21, Obr. 22 a Obr. 23). Hodnoty v grafech odpovídají průměrům z měření minimálně pěti jamek mikrotitrační destičky.

Tab. 19. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou OT-2

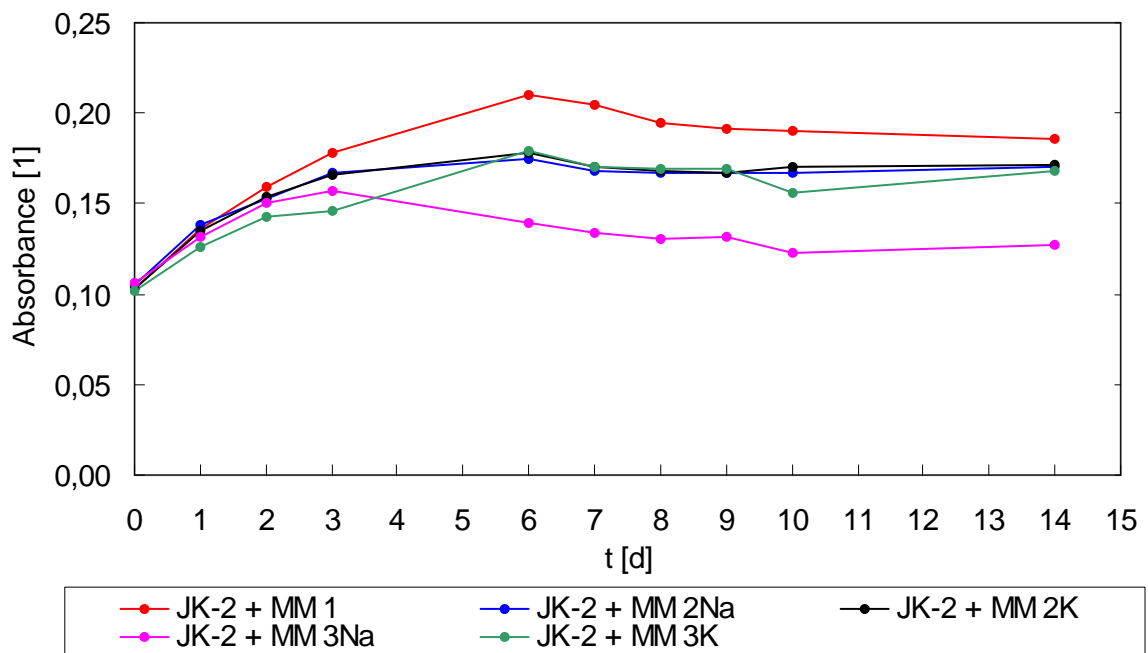
Do- ba [dny]	MM 1		MM 2Na		MM 2K		MM 3Na		MM 3K	
	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h
0	0,0808	0,0063	0,0805	0,0022	0,0783	0,0052	0,0815	0,0048	0,0833	0,0041
1	0,1645	0,0029	0,1442	0,0066	0,1383	0,0027	0,1253	0,0110	0,1155	0,0128
2	0,2502	0,0063	0,1642	0,0177	0,1836	0,0100	0,1344	0,0130	0,1486	0,0077
3	0,2913	0,0148	0,1795	0,0258	0,2058	0,0116	0,1482	0,0048	0,1726	0,0082
6	0,3918	0,0107	0,2003	0,0137	0,2313	0,0176	0,1350	0,0033	0,2190	0,0080
7	0,3928	0,0207	0,1943	0,0184	0,2193	0,0142	0,1300	0,0035	0,2278	0,0132
8	0,3738	0,0262	0,1883	0,0216	0,2175	0,0241	0,1148	0,0091	0,2180	0,0098
9	0,3926	0,0253	0,1880	0,0182	0,2146	0,0189	0,1185	0,0088	0,2346	0,0128
10	0,3590	0,0071	0,1830	0,0312	0,1810	0,0198	0,1012	0,0093	0,2082	0,0208
14	0,3552	0,0239	0,1800	0,0208	0,1835	0,0396	0,1075	0,0087	0,2262	0,0166



Obr. 21 Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura OT-2)

Tab. 20. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou JK-2

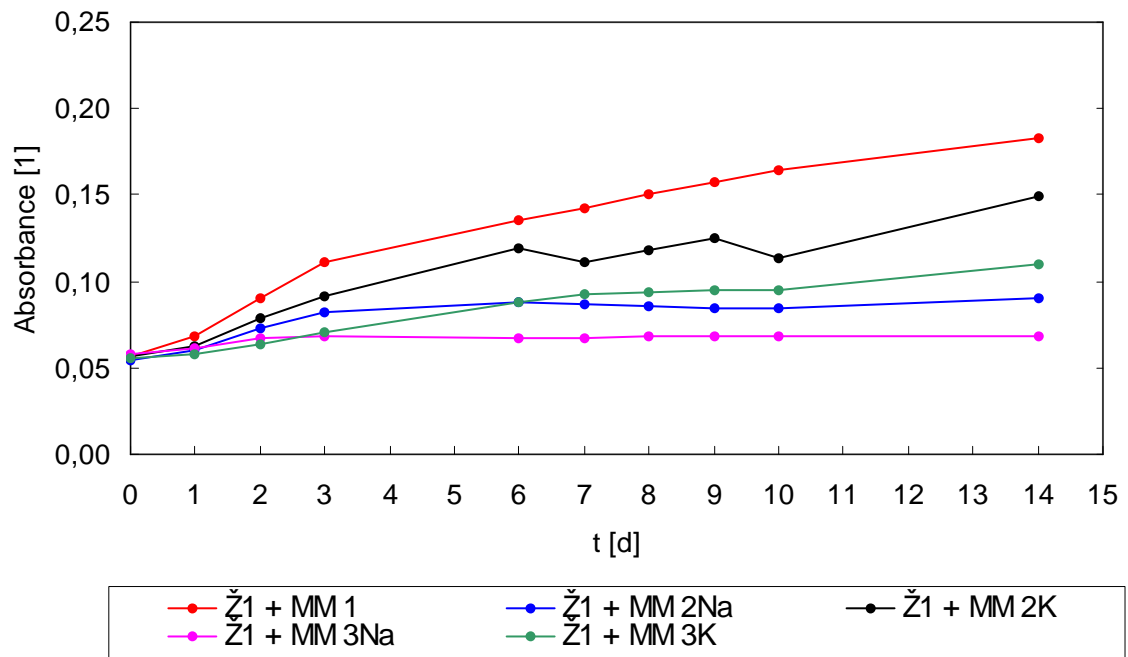
doba [dny]	MM 1		MM 2Na		MM 2K		MM 3Na		MM 3K	
	prů- měr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h
0	0,1028	0,0068	0,1048	0,0102	0,1025	0,0081	0,1057	0,0074	0,1018	0,0026
1	0,1357	0,0060	0,1387	0,0092	0,1345	0,0057	0,1320	0,0076	0,1266	0,0027
2	0,1588	0,0082	0,1532	0,0061	0,1537	0,0065	0,1500	0,0024	0,1426	0,0060
3	0,1783	0,0077	0,1670	0,0072	0,1658	0,0085	0,1570	0,0048	0,1455	0,0031
6	0,2106	0,0039	0,1746	0,0084	0,1782	0,0083	0,1392	0,0048	0,1796	0,0081
7	0,2044	0,0043	0,1678	0,0111	0,1707	0,0065	0,1340	0,0047	0,1708	0,0054
8	0,1947	0,0098	0,1666	0,0045	0,1677	0,0072	0,1307	0,0047	0,1693	0,0097
9	0,1913	0,0080	0,1668	0,0075	0,1668	0,0041	0,1316	0,0030	0,1695	0,0087
10	0,1904	0,0089	0,1670	0,0063	0,1700	0,0082	0,1228	0,0042	0,1558	0,0053
14	0,1860	0,0107	0,1706	0,0097	0,1713	0,0096	0,1267	0,0039	0,1677	0,0107



Obr. 22 Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura JK-2)

Tab. 21. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou Ž-1

doba [dny]	MM 1		MM 2Ma		MM 2K		MM 3Na		MM 3K	
	prů- měr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h	průměr	sm.odc h
0	0,0566	0,0044	0,0548	0,0015	0,0564	0,0048	0,0578	0,0053	0,0560	0,0056
1	0,0686	0,0046	0,0604	0,0019	0,0622	0,0045	0,0608	0,0047	0,0582	0,0050
2	0,0906	0,0048	0,0730	0,0025	0,0782	0,0044	0,0668	0,0047	0,0636	0,0053
3	0,1110	0,0048	0,0816	0,0040	0,0914	0,0043	0,0680	0,0045	0,0706	0,0054
6	0,1354	0,0039	0,0877	0,0088	0,1192	0,0313	0,0677	0,0063	0,0884	0,0054
7	0,1418	0,0112	0,0864	0,0044	0,1114	0,0089	0,0674	0,0083	0,0922	0,0057
8	0,1506	0,0192	0,0858	0,0057	0,1180	0,0210	0,0680	0,0118	0,0934	0,0061
9	0,1570	0,0261	0,0850	0,0053	0,1252	0,0367	0,0680	0,0129	0,0946	0,0070
10	0,1648	0,0302	0,0840	0,0035	0,1133	0,0156	0,0682	0,0124	0,0952	0,0078
14	0,1832	0,0391	0,0908	0,0080	0,1497	0,0585	0,0682	0,0078	0,1105	0,0289



Obr. 23 Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura Ž-1)

Z uvedených grafů je zřejmé, že nejlepší růst všech tří kultur nastal v prostředí bez přídavku uvedených hydrogenuhličitanů. V přítomnosti těchto solí byl růst do jisté míry zpomalen.

Největší inhibiční účinek byl zaznamenán u všech tří kultur, kde byl navýšen obsah solí vyšším přídavkem NaHCO_3 . Růst v takto upraveném prostředí nebyl téměř zaznamenán u kultury Ž-1 a jen v malé míře byl zjištěn u zbývajících bakterií, na rozdíl od prostředí s přídavkem stejného množství KHCO_3 . Odtud plyne závěr, že kultury degradérů jsou více citlivé vůči sodným solím než k draselným. Vzhledem k tomu, že v případě kultur OT-2 a Ž-1 byl zaznamenán lepší růst s přídavky 20 ml roztoku KHCO_3 než s přídavky polovičního množství NaHCO_3 , je možné, že citlivost vůči sodným iontům může být významnější než obecná citlivost degradérů k vyšší solnosti. Tyto závěry by však musely být ověřeny rozsáhlejšími sériemi experimentů.

ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zabýval rozkladem polyvinylalkoholu (PVA) čistými kulturami degradačních bakterií a také jeho rozkladem v prostředí neadaptovaného aktivovaného kalu, který pocházel z městské čistírny odpadních vod. Byly provedeny dva druhy experimentů. Vedle degradačních lahvových testů, ve kterých byl PVA buď jako jediný substrát nebo jako jeden z několika substrátů, jsme provedli také růstové testy v prostředí tryptonu. Degradační testy byly vyhodnocovány na základě sledování úbytku koncentrace PVA nebo úbytku koncentrace rozpuštěného organického uhlíku. Koncentrace PVA byla stanovována spektrofotometrickou mikrometodou, rozpuštěný uhlík byl stanoven v centrifugovaných vzorcích na analyzátoru uhlíku a růst bakterií v růstových testech byl hodnocen na základě měření absorbance kultivačního média.

Počáteční pokusy byly směřovány tak, aby vysvětlily příčiny zpomalení degradace PVA aktivovaným kalem, za podmínek trvalé přítomnosti lehce odbouratelných substrátů (tryptonu a sacharosy). Získané výsledky ukázaly, že tento jev není vyvolán substrátovou kompeticí (upřednostněním využívání tryptonu či sacharosy před využíváním PVA), ani nedostatkem minerálních látek, ani účinkem rozpuštěných metabolitů rychle rostoucích heterotrofních bakterií. Naopak určité indicie ukázaly na citlivost degradačních bakterií vůči zvýšeným koncentracím fosforečnanů a proto byly další pokusy směřovány k prokázání nebo vyvrácení těchto jejich vlastností. Výsledky ukázaly, že skutečně růst všech tří testovaných degradačních kultur (OT-2, JK-2 a Ž-1) je negativně ovlivňován zvýšenou koncentrací fosforečnanů v prostředí. Stejná citlivost byla prokázána také vůči zvýšeným koncentracím hydrogenuhličitanů, což naznačilo obecnější nároky těchto bakterií na nižší iontovou sílu prostředí.

V návaznosti na dosažené výsledky by bylo do budoucna zapotřebí detailněji prostudovat vlastnosti PVA-degradačních bakterií (i jiných kultur než zde použitých) ve smyslu jejich obecné citlivosti k minerálním látkám v prostředí, a také ověřit možné urychlení procesu degradace PVA v prostředí se sníženou koncentrací minerálních solí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DUCHÁČEK, V. *Polymery-výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Praha, 2006. 77 p. ISBN 80-7080-616-6.
- [2] ZÁMORSKÝ, Z. *Nauka o polymerech II*. 1980. 235 p.
- [3] Mowiol – příručka výrobce
- [4] CHIELLINI, E.; CORTI, A; D'ANTONE, S.; SOLARO, R. Biodegradation of poly(vinylalcohol) based materials. *Prog.Polym.Sci.*, **2003**, 28, 963-1014.
- [5] SUZUKI, T. Some characteristics of Pseudomonas O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agric Biol Chem*, **1973**, 37, 747-756.
- [6] WATANABE, Y. Purification and properties of a polyvinylalcohol-degrading enzyme produced by a strain of Pseudomonas. *Arch Biochem Arch Biochem 1389-91. Biophys*1976;174:575-81., **1976**, 174, 575-581.
- [7] MATSUMURA, S., et al. Novel poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism. *In Macromolecules*, **1999**, 32, 7753-7761.
- [8] COUFALÍKOVÁ, M. *Symbiotická degradace polyvinylalkoholu*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. 89 p.
- [9] HATANAKA, T., et al. Purification and characterization of a poly(vinyl-alcohol) dehydrogenase from Pseudomonas sp. 113P3. *Biosci Biotechnol Biochem*, **1995**, 59, 1813-1816.
- [10] SAKAZAWA, C.; SHIMAO, M. ;TANIGUCHI, Y. Symbiotic utilization of poly(vinyl alcohol) by mixed cultures. *In Appl Environ Microbiol*, **1981**, 41, 261-267.
- [11] SHIMAO, M. , et al. Enhancement of pyrroloquinoline quinone production and polyvinyl alcohol utilization in mixed continuous cultures of Pseudomonas putida VM15A and Pseudomonas sp. strain VM15C with mixed carbon sources. *In Appl Environ Microbiol*, **1985**, 49, 1389-1391.
- [12] KIM, B. ;SOHN, C. ; LIM, S. ; LEE, J. ; PARK, W. Degradation of polyvinyl alcohol by Sphingomonas sp. SA3 and its symbiote. *J Ind Microbial Biotechnol*, **2003**, 30, 70-74.

- [13] ZEMAN, P. *Vliv přídavných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu*. Fakulta technologická : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. 80 p.
- [14] CHEN, H.; HOOVER, D. Bacteriocins and their Food Applications. *Food Science And Food Safety*, **2003**, 2,
- [15] GROSSART, H.; SCHLINGLOFF, A.; BERNHARD, M. Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, **2004**, 47 (3), 387-396.
- [16] KOSTRZYNSKA, M.; BACHAND, A. Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products. *Can.J.Microbiol.*, **2006**, 52, 1017-1026.
- [17] WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **2001**, 52, 485-511.
- [18] KUPEC, J. *Základy ekologie*. 2.nd ed. 2003. ISBN 80-7318-159-2.
- [19] Factors that Influence Microbial Growth. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2003**, 2 (2), 21-32.
- [20] WATNICK, P.; KOLTER, R. Biolm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, **2000**, 182 (10), 2675-2679.
- [21] SCHINDLER, J. Mikrobiální biofilm. *Vesmír*, **2001**, 80, 203-206.
- [22] JACK, R.; TAGG, J.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*, **1995**, 59 (2), 171-200.
- [23] GORDON, D.; O'BRIEN, C. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Food Science and Food Safety*, **2006**, 152, 3239-3244.
- [24] TALARICO, T.; DOBROGOSZ, W. Chemical Characterization of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **1989**, 33 (5), 674-679.
- [25] SOUZA, E.; SILVA, C.; SOUSA, C. Bacteriocins: Molecules of Fundamental Impact on the Microbial Ecology and Potential Food Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **2005**, 48 (4), 559-566.

- [26] CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.; NES, I.; CHIKINDAS, M. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. Journal of Food Microbiology*, **2001**, *71*, 1-20.
- [27] DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L.; PRÉVOST, H. The Continuing Story of Class II Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2006**, *70* (2), 564-582.
- [28] NES, I.; DIEP, D.; HOLO, H. Bacteriocin Diversity in Streptococcus and Enterococcus. *Journal of Bacteriology*, **2007**, *189* (4), 1189-1198.
- [29] KYZLINK, V. *Teoretické základy konzervace potravin*. SNTL 1988.
- [30] HINDRÉ, T.; DIDELOT, S.; LEPENNEC, J. Bacteriocin Detection from Whole Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **2003**, *69* (2), 1051-1058.
- [31] RILEY, M.; GORDON, D. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, **1999**, *7* (3), 129-133.
- [32] CASCALES, E.; BUCHANAN, S.; DUCHÉ, D.; Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2007**, *71*, 158-229.
- [33] RILEY, M.; GOLDSTONE, C.; WERTZ, J. A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *J. Evol. Biol.*, **2003**, *16*, 690-697.
- [34] XAVIER, B.; RUSSELL, J. Bacterial competition between a bacteriocin-producing and a bacteriocin-negative strain of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture. *FEMS Microbiol Ecol*, **2006**, *58*, 317-322.
- [35] OGUNBANWO, S.; SANNI, A.; ONILUDE, A. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, **2006**, *2* (7), 179-184.
- [36] ROSYPAL, S. *Obecná Bakteriologie*. 1981. 749 p
- [37] RŮŽIČKA – osobní sdělení

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
DP	Diplomová práce
FR	Fyziologický roztok
FT	Fakulta technologická
PVA	Polyvinylalkohol
PVAc	Polyvinylacetát
PQQ	Pyrolochinolinochinon
MM	Minerální médium
MMTS	Roztok minerálních látek s tryptonem a sacharosou
TS	Zásobní roztok živin - tryptonu a sacharosy
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Idealizovaná struktura PVA.....</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 2. Mechanismus výroby PVA z PVAc.....</i>	<i>11</i>
<i>Obr. 3. Mechanismus rozkladu PVA</i>	<i>13</i>
<i>Obr. 4. Struktura nisinu A.....</i>	<i>22</i>
<i>Obr. 5. Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVA.....</i>	<i>38</i>
<i>Obr. 6. Závislost koncentrace PVA na čase.....</i>	<i>43</i>
<i>Obr. 7. Závislost koncentrace PVA na čase.....</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 8. Závislost koncentrace PVA na čase.....</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 9. Závislost koncentrace PVA na čase pro rozklad kulturou JK-2.....</i>	<i>53</i>
<i>Obr. 10. Závislost koncentrace PVA na čase pro rozklad kulturou OT-2.....</i>	<i>53</i>
<i>Obr. 11. Hodnoty DOC v průběhu pokusu (kultura OT-2)</i>	<i>54</i>
<i>Obr. 12. Závislost DOC v průběhu pokusu (kultura JK-2)</i>	<i>54</i>
<i>Obr. 13. Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura OT-2)</i>	<i>57</i>
<i>Obr. 14. Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura JK-2)</i>	<i>58</i>
<i>Obr. 15. Závislost absorbance kultivačního média na době testu.....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 16. Závislost absorbance kultivačního média na době testu.....</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 17. Závislost absorbance kultivačního média na době testu.....</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 18. Závislost koncentrace PVA na čase (kultura OT-2)</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 19. Závislost koncentrace PVA na čase (kultura JK-2)</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 20. Závislost koncentrace PVA na čase (kultura Ž-1)</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 21 Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura OT-2)</i>	<i>72</i>
<i>Obr. 22 Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura JK-2)</i>	<i>73</i>
<i>Obr. 23 Závislost absorbance kultivačního média na době testu (kultura Ž-1)</i>	<i>74</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Vybrané charakteristické aspekty bakteriocinů a tradičních antibiotik.....</i>	<i>20</i>
<i>Tab. 2. Příklady G- producentů</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 3. Příprava minerálních médií s různou koncentrací fosforečnanového pufru</i>	<i>31</i>
<i>Tab. 4. Příprava minerálních médií se zvýšenou solností.....</i>	<i>32</i>
<i>Tab. 5. Hodnoty absorbancí kalibračních roztoků PVA.....</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 6. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatných odchylek v průběhu pokusu...42</i>	
<i>Tab. 7. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatných odchylek v průběhu pokusu...45</i>	
<i>Tab. 8. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatných odchylek v průběhu pokusu...48</i>	
<i>Tab. 9. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatných odchylek v průběhu pokusu...52</i>	
<i>Tab. 10. Hodnoty DOC ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a směrodatných odchylek na počátku a ke konci testu.....54</i>	
<i>Tab. 11. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou OT 2.....57</i>	
<i>Tab.12. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou JK-2.....58</i>	
<i>Tab. 13. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou OT-2.....60</i>	
<i>Tab. 14. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou JK-2.....61</i>	
<i>Tab. 15. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou Ž-1.....62</i>	
<i>Tab. 16. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v průběhu testu.....66</i>	
<i>Tab. 17. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v průběhu testu.....67</i>	
<i>Tab. 18. Hodnoty koncentrace PVA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) v průběhu testu68</i>	
<i>Tab. 19. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou OT-2</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 20. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou JK-2.....</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 21. Hodnoty absorbancí kultivačního média v průběhu testu s kulturou Ž-1.....</i>	<i>74</i>

<i>Místo uložení práce:</i> Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
<i>Autor práce:</i> Bc. Martin Nedbálek
<i>Název práce</i> česky: Vliv podmínek prostředí na biodegradaci polyvinylalkoholu anglicky: Effect of environmental conditions on biodegradation of polyvinyl alcohol
<i>Vedoucí práce:</i> doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
<i>Vysoká škola (název a adresa):</i> Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Mostní 5139, 760 01 Zlín Fakulta technologická, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
<i>Rok obhájení práce:</i> 2008
<i>Počet stran, obrázků, tabulek:</i> 82, 23, 21
<i>Předmětová hesla:</i> česky: Biodegradace, polyvinylalkohol anglicky: Biodegradation, polyvinyl alcohol
<i>Souhrn</i> česky: Práce byla věnována rozkladu polyvinylalkoholu a některým vlastnostem degradačních bakteriálních kultur. Byly provedeny experimenty k vysvětlení příčin zpomalení degradace PVA aktivovaným kalem za podmínek trvalé přítomnosti tryptonu a sacharosy. Výsledky ukázaly, že tento jev není vyvolán substrátovou kompeticí ani nedostatkem minerálních látek ani účinkem metabolitů nedegradačních bakterií. Další pokusy ukázaly, že degradační schopnost studovaných bakterií je snížena při vyšší mineralizaci prostředí. anglicky: This work was focused on biodegradation of polyvinyl alcohol and some features of degradation bacteria. Experiments were made for explanation the reasons of retardation of degradation polyvinyl alcohol by activated sludge under the conditions of permanent presence of tryptone and sucrose. Results showed that this phenomenon is not evoked by substrate competition, absence mineral substances or action of metabolites of undegradation germs. Another tests displayed that degradation ability of studied germs is reduced in case of higher mineralization of environment.