

Studium denitrifikačních mikroorganismů při biodegradaci polymerů

Bc. Dana Svobodová

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Dana SVOBODOVÁ**
Osobní číslo: **T080320**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Studium denitrifikačních mikroorganismů při biodegradaci polymerů**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou převážně na způsoby izolace denitrifikačních bakterií s degradačními vlastnostmi.
2. Provedte namnožení denitrifikačních bakterií se schopností rozkladu polyvinylalkoholu.
3. Pokuste se izolovat druhy bakterií, klíčové pro tento proces a v případě jejich nálezu popište jejich základní vlastnosti.
4. Získané výsledky zpracujte v požadované formě a odevzdejte v řádném termínu v tištěné i elektronické podobě.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. Předcházející diplomové práce věnované mikrobiálnímu rozkladu polyvinylalkoholu.
2. Vědecká literatura získaná prostřednictvím databází Web of Science, ScienceDirect (zvláště SCOPUS), SpringerLink, Medline, WileyOnLine a SciFinder.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí


Datum zadání diplomové práce:

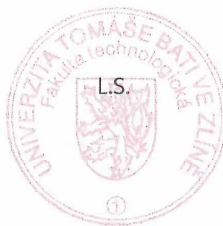
14. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

13. května 2011

Ve Zlíně dne 14. února 2011


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



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



PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 13.5.2011

.....
Svobodová Dana

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Na tomto místě bych především velice ráda poděkovala svému vedoucímu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za ochotu, obětavost a cenné rady, které mi v průběhu mé diplomové práce poskytoval. Poděkování patří také celému kolektivu Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za vytvoření dobrých pracovních podmínek.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývala izolací bakterií, schopných rozkladu polymeru – polyvinylalkoholu (PVA) za denitrifikačních podmínek. Výchozím vzorkem pro tuto izolaci byl denitrifikační kal adaptovaný na PVA. Samotnou izolaci kultur schopných rozkladu PVA předcházelo jejich namnožení pomocí lahvových pomnožovacích cyklů s polyvinylalkoholem jako hlavním substrátem. Poté bylo provedeno vyočkování získaných suspenzí na pevná živná média, kultivace za denitrifikačních podmínek, přeočkovávání a čištění vyrostlých kolonií. U jednotlivých izolovaných kultur bylo následně provedeno Gramovo barvení, které prokázalo, že téměř všechny izolované kultury jsou gramnegativní. Dále byly u kultur sledovány růstové podmínky, kde bylo zjištěno vhodné živné médium pro jejich růst a prostředí kultivace (aerobní, mikroaerofilní). Jednotlivé kultury byly následně podrobeny denitrifikačním testům, které ukázaly, že téměř všechny izolované kultury jsou schopné denitrifikace. V testu denitrifikace s využitím PVA byl zaznamenán mírný náznak degradace PVA u dvou kultur. Jednotlivé kultury byly zakonzervovány pro případ jejich dalšího studování.

Klíčová slova: polyvinylalkohol, denitrifikační bakterie, izolace, kultury

ABSTRACT

This Diploma thesis dealt with isolation of bacteria capable of degradation of polyvinylalcohol (PVA) under denitrifying conditions. Denitrifying sludge acclimated to the PVA was used as initial sample for the process. The isolation of cultures capable of PVA degradation was started by repeated multiplication of bacteria in several cycles using PVA as the only substrate. After that, obtained bacterial suspensions were inoculated onto solid agar media, incubated and the growing colonies were re-inoculated onto fresh media and purified. Isolated strains were then Gram-stained, which showed that almost all isolated bacteria were gramnegative. In all obtained strains optimal growing conditions as well as suitable agar type were also determined. Individual bacteria were subsequently subjected to denitrifying tests, which showed that almost all isolated microbes were capable of denitrification. The denitrification test using PVA as carbon source showed a slight level of PVA degradation in two strains. All the bacteria obtained in the study were maintained for further study.

Key words: polyvinyl alcohol, denitrifying microorganisms, isolation, strains

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 DENITRIFIKACE	12
1.1 BIOLOGICKÁ DENITRIFIKACE	12
1.1.1 Nitrifikace.....	13
1.1.2 Denitrifikace.....	13
2 ISOLACE DENITRIFIKAČNÍCH BAKTERIÍ S DEGRADAČNÍMI ÚČINKY	14
2.1 ISOLACE DENITRIFIKAČNÍCH BAKTERIÍ.....	14
3 DEGRADACE POLYMERU	21
3.1 BIODEGRADACE	21
3.1.1 Anaerobní rozklad	22
3.1.2 Aerobní rozklad.....	23
4 POLYVINYLALKOHOL	24
4.1 CHARAKTERISTIKA	24
4.2 VÝROBA	24
4.3 POUŽITÍ	25
4.4 BIODEGRADACE PVA.....	25
5 VÝSLEDKY PŘEDCHÁZEJÍCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
6 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA	30
6.1 CHEMIKÁLIE	30
6.2 ŽIVNÉ AGARY	32
6.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	34
7 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY	35
7.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	35
7.2 LABORATORNÍ POMŮCKY	35
8 PRACOVNÍ POSTUPY	36
8.1 POMNOŽOVACÍ CYKLY	36
8.1.1 Popis jednotlivých pomnožovacích cyklů.....	36
8.2 STANOVENÍ KONCENTRACE PVA NA MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE	39
8.3 PŘÍPRAVA ŽIVNÝCH PŮD.....	40
8.4 ZAOČKOVÁNÍ ŽIVNÝCH PŮD	40
8.4.1 Postup desetinného ředění.....	40

8.5	ISOLACE KULTUR	41
8.6	GRAMOVO BARVENÍ	41
8.6.1	Příprava fixovaného nativního preparátu	41
8.6.2	Vlastní Gramovo barvení	41
8.7	DENITRIFIKAČNÍ TESTY	42
8.7.1	Universální test na denitrifikaci	42
8.7.2	Test degradace PVA za denitrifikačních podmínek	43
8.8	STANOVENÍ RŮSTOVÝCH PODMÍNEK	43
8.9	ZAKONZERVOVÁNÍ ČISTÝCH KULTUR	43
8.9.1	Postup konzervace	44
8.10	PŘÍPRAVA ISOLOVANÝCH KULTUR NA TGGE	44
III	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
9	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	46
9.1	POMNOŽOVACÍ CYKLY	46
9.2	OČKOVÁNÍ ŽIVNÝCH PŮD	51
9.3	ISOLACE ČISTÝCH KULTUR	52
9.4	GRAMOVO BARVENÍ	53
9.5	DENITRIFIKAČNÍ TESTY	54
9.5.1	Universální test na denitrifikaci	55
9.5.2	Test na degradaci PVA za denitrifikačních podmínek	56
9.6	STANOVENÍ RŮSTOVÝCH PODMÍNEK	57
10	VLASTNOSTI ISOLOVANÝCH KULTUR	59
10.1	KULTURA U1	59
10.2	KULTURA U2	59
10.3	KULTURA U3	60
10.4	KULTURA U4	61
10.5	KULTURA U5	61
10.6	KULTURA U6	62
10.7	KULTURA U7	63
10.8	KULTURA U8	64
10.9	KULTURA U9	64
10.10	KULTURA U10	65
10.11	KULTURA U11	66
10.12	KULTURA U12	66
10.13	KULTURA U13	67

10.14 KULTURA U14.....	68
10.15 KULTURA U15.....	68
10.16 KULTURA U16.....	69
10.17 KULTURA U17.....	70
10.18 KULTURA U18.....	71
10.19 KULTURA U19.....	71
10.20 KULTURA U20.....	72
10.21 KULTURA D1.....	73
10.22 KULTURA D2.....	73
10.23 TGGE	75
ZÁVĚR	76
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	78
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	81
SEZNAM OBRÁZKŮ	82
SEZNAM TABULEK.....	84
SEZNAM PŘÍLOH.....	85

ÚVOD

Rozvoj výroby syntetických polymerů v minulém století zásadním způsobem ovlivnil technický vývoj moderní společnosti a přinesl nezpochybnitelné výhody využití těchto výrobků v široké škále průmyslových odvětví i v denní spotřebě každého z nás [1]. Na druhé straně je potřeba říct, že řada průmyslově vyráběných polymerů může též negativně působit na lidské zdraví.

V poslední době dochází ke každoročnímu nárůstu spotřeby polymerů. Aby lidstvo nebylo těmito materiály zahlceno, je velmi důležité tyto polymerní odpady recyklovat. Rozvíjejí se snahy o využití biologicky rozložitelného materiálu, který se za určitých podmínek může rozložit vlivem působení mikroorganismů. V současné době se vyrábí celá řada syntetických polymerů, které částečně splňují vlastnosti biodegradovatelnosti. Mezi nejvýznamnější patří poly- ϵ -kaprolakton a polyvinylalkohol.

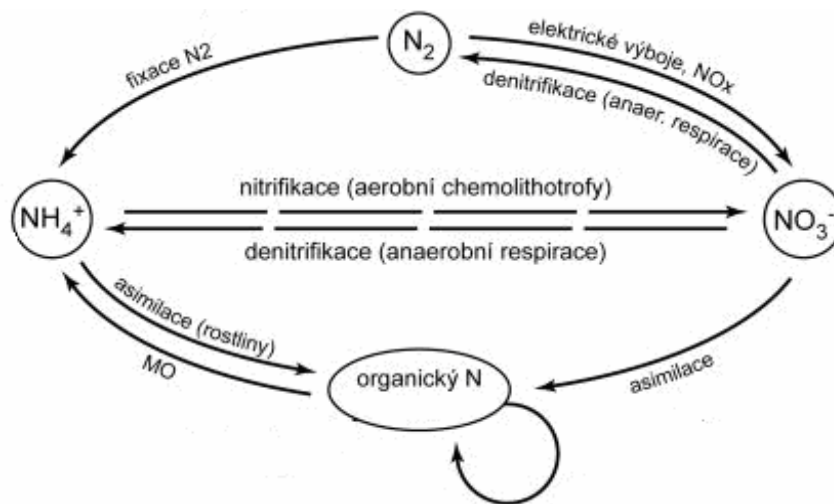
Polyvinylalkohol (PVA) patří mezi rozpustné syntetické polymery, které lze zařadit mezi zdroje znečištění vodních ekosystémů. Velká pozornost je věnována studiu biologické rozložitelnosti PVA. Je známa celá řada mikrobiálních kultur, které se podílejí na rozkladu PVA za aerobních podmínek například *Pseudomonas borelis* O-3, *Pseudomonas vesicularis* nebo *Sphingopyxis* sp. a řada dalších mikrobiálních kultur. Na ÚIOZP (viz. doktorská práce H. Marušincové [2]) bylo zjištěno, že PVA podléhá biodegradaci za denitrifikačních podmínek.

Cílem práce je pokusit se o izolaci bakterií, podílejících se na tomto procesu a v případě jejich nálezu popsat jejich základní vlastnosti.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 DENITRIFIKACE

Denitrifikace je proces, který probíhá v oblasti redoxních potenciálů mezi -50mV a $+50\text{mV}$, tedy v oblasti anoxické. Jedná se o postup, který se běžně využívá v procesech odstraňování dusíku z odpadních vod a patří k důležitým operacím na čistírnách odpadních vod. Během běžných čistících postupů se totiž dusík odstraňuje jen z části a proto je nutno denitrifikaci věnovat zásadní pozornost [3]. Denitrifikace jsou schopny nejen bakterie jako *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, ale i *Paracoccus denitrificans*, *Ralstonia eutropha*, *Rhodobacter sphaeroides*, ale i mnohá halofilní a hypertermofilní archea a dokonce některé houby. [4]



Obr. 1. Koloběh dusíku

1.1 Biologická denitrifikace

Tato denitrifikace je nejvíce používaným mikrobiálním procesem pro odstranění dusíku v odpadních vodách z čistíren. Proces navazuje na nitrifikaci, která spočívá v biochemické oxidaci amoniakálního dusíku na dusitany a dusičnany. Po nitrifikaci následuje vlastní denitrifikace, biochemická redukce na plynný dusík, při které denitrifikační bakterie využívají dusičnany a dusitany jako akceptory elektronů při anaerobní respiraci. Při této denitrifikaci je nutná přítomnost vhodného organického substrátu. Méně vhodné substráty pak představují vlastní znečištění. Bakterie charakteristické pro tento proces využívají substrát jako zdroj uhlíku a energie [3].

Khan a Hiraishi ve své práci představili novou biotechnologii odstranění dusíku použitím nerozpustných biopolymerů jako PBH a PBHV coby alternativu substrátu pro mikrobiologický růst a denitrifikaci [5].

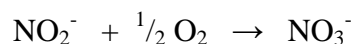
1.1.1 Nitrifikace

Jedná se o dvoustupňový pochod, který musí předcházet denitrifikaci. V prvním stupni (nitritace) se působením bakterií rodu *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* či *Nitrospira* amoniakální dusík oxiduje na dusitany a ve druhém stupni (nitratace) se vlivem bakterií rodu *Nitrobacter* a *Nitrocystis* vzniklé dusitany oxidují na dusičnany [3].

- Nitritace:



- Nitratace



1.1.2 Denitrifikace

Působením denitrifikačních bakterií rodu *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Denitrobacillus*, *Pseudomonas* a jiných dochází k redukci NO_2^- a NO_3^- na plynné produkty N_2 a N_2O . Denitrifikační bakterie vyžadují přítomnost organického substrátu jako zdroj uhlíku a energie. Využíván je zdroj endogenní (například zásoby v přítomné biomase) nebo exogenní zdroj například methanol. S exogenním substrátem je denitrifikace vždy rychlejší než je tomu s endogenním substrátem [3].

2 ISOLACE DENITRIFIKAČNÍCH BAKTERIÍ S DEGRADAČNÍMI ÚČINKY

2.1 Isolace denitrifikačních bakterií

V roce 2001 se Khan a Hiraishi [6] zabývali izolací nové denitrifikační chemoorganotrofní bakterie, která je schopná aerobní i anaerobní degradace poly-3-hydroxybutyrátu (PHB) a kopolymeru poly-3-hydroxybutyrátu-valerátu (PHBV). Tato bakterie byla izolována z aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod v Japonsku. Na základě fylogenetické analýzy byl identifikován nový mikroorganismus, který je členem podskupiny β -proteobakterií a představuje odlišnou řadu uvnitř čeledi *Comamonadaceae*. Nový izolovaný kmen NA10B je *Acidovorax sp.*

Pro předpěstování použili substrát označený PBY (pepton + hovězí extrakt + kvasničný extrakt) a PBYN médium (PBY + 0,2% KNO_3). Pro izolaci a kultivaci PHB-degradující denitrifikační bakterie byl použit základní substrát doplněný 2g PHB prášku, 2g KNO_3 a 0,1g kvasničným extraktem na 1 litr (pH 7,0). Kultivace byla provedena v testovacích zkumavkách o obsahu 20 ml a ve 100-500ml lahvích. Pro anaerobní růst byly testované zkumavky nebo lahve úplně naplněny roztokem a inkubovány při 28°C. Po 3-7 dnech inkubace byla kultura rozetřena na petriho misky a anaerobně inkubována další 2 týdny. Výsledkem izolace byl dobře rostoucí anaerobní bakteriální kmen NA10B, který byl identifikován jako *Acidovorax sp.*

O rok později Khan a Hiraishi [5] pokračovali ve svých studiích a isolovali opět z aktivovaného kalu tři denitrifikační bakterie schopné degradace PHB a PHBV. Všechny kmeny měly téměř stejné phenotypické vlastnosti. Byly to pohyblivé, gram-negativní tyčky s polárním bičíkem, které dobře rostly na jednoduchých organických sloučeninách, právě tak jako na PHB a PHBV za aerobních i anaerobních denitrifikačních podmínek. Na základě fylogenetické analýzy (sekvence 16S rDNA) patřily všechny izoláty do čeledi *Comamonadaceae*, významné skupiny β -proteobakterií. Na základě všech výsledků autoři usoudili, že PHBV-degradační denitrifikační bakterie by měly být klasifikovány jako nový rod i nový druh, pro který navrhli jméno *Diaphorobacter nitroreducens*.

Pro udržení, předpěstování a hlavní pěstování byl použit komplexní substrát označený jako PBY, který obsahoval 0,5% bacto-peptidu, 0,3% hovězího extraktu a 0,1% kvasničného extraktu. Pro studii PHBV degradaci byl použit minerální roztok doplněný 0,2% PHBV a 0,01% kvasničným extraktem. Pro anaerobní denitrifikační růst byla PBY a PHBV media doplněná 0,2% KNO₃. Kapalná kultura byla převedena do uzavíratelných zkumavek nebo lahví a inkubována při 28-30°C anaerobně třepáním na třepačce.

Mergaert a kolektiv [7] se v rámci své vědecké činnosti zaměřili na heterotrofní bakterie, které izolovali přímo z pevného lože kontinuálního průtokového reaktoru pro čištění pitné vody. Celkem izolovali 186 kolonií. Pevné lože bylo tvořeno z granulí PHBV. Pro izolaci heterotrofních bakterií byly odebrány dva vzorky resp. dvě granule z plně funkčního reaktoru. Jeden vzorek byl odebrán z dolní části reaktoru, v blízkosti oxické zóny, a druhý vzorek z horní (anoxické) části. Výsledky potvrdily vysoký počet heterotrofních bakterií přítomných v biomase na polymerních granulích. Většina izolovaných kultur byla schopna redukovat dusičnany na dusitany nebo denitrifikovat a využívat 3-hydroxybutyrátu coby jediného zdroje uhlíku. Všechny izolované bakterie byly gramnegativní. Dvě bakterie, nalezené pouze ve vzorku z horní části, byly schopny denitrifikace s využitím PHB. Na základě sekvence 16S rDNA byly tyto kultury identifikovány jako *Acidovorax facilis* a *Brevundimonas intermedia*. Ostatní izolované bakterie vyskytující se v dolní nebo horní části reaktoru byly na základě fylogenetické analýzy přiřazeny k *Brevundimonas*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Phyllobacterium*, nebo byly fylogeneticky příbuzné s *Afipia* nebo *Stenotrophomonas*.

Postup izolace: Asepticky byly přeneseny 2 g mokrých granulí do zkumavek obsahující 9 ml sterilního fyziologického roztoku (0,86% NaCl). K uvolnění biomasy přítomné na granulích byly zkumavky protřepány na mixeru. Desetinné ředění bylo rozetřeno na R2A agar. Misky byly inkubovány aerobně při 20°C. Jednotlivé kolonie byly přeočkovávány v průběhu 6-8 dnů kultivace a identifikovány na základě sekvence 16S rDNA.

Shinoda a kolektiv [8] v roce 2004 izolovali z anaerobního kalu z čistírny odpadních vod toluen rozkládající denitrifikační bakterii, kmen DNT-1. Tento kmen byl schopný růstu na toluenu, benzaldehydu a benzoátu za aerobních i anaerobních podmínek. Bakteriální buňky byly krátké tyčky, na délku 2 – 2,5 μm a 1,5 μm v průměru, byly gram-negativní, katalasa-

negativní a oxidaso-pozitivní. Provedená fylogenetická analýza (sekvence 16S rDNA) ukázala, že kmen DNT-1 je zástupcem rodu *Thauera* sp. a že je blízce příbuzná s druhem *Thauera aminoaromatica* S2.

Pro pěstování daného kmene bylo použité živné médium obsahující 1,6 g Na₂HPO₄; 1,0 g KH₂PO₄; 0,5 g NH₄Cl; 0,06 g K₂SO₄; 0,025 g CaCl₂·2H₂O; 0,1 g MgCl₂·6H₂O; 0,42 g NaHCO₃; 15 mg EDTA · 2Na; 1,5 mg FeSO₄·7H₂O; 20 mg vitamínu B12; 10 mg D-biotin, vše v 1 litru destilované vody s hodnotou pH 7,0 - 7,1. Toluén (0,5 mM) byl přidán jako jediný zdroj uhlíku a KNO₃ (5 mM) bylo přidáno v případě potřeby.

Schie a Young [9] se zaměřili při své studii na izolaci třech kultur, které rozkládaly fenol za denitrifikačních podmínek. Kultury isolovali z anaerobních sedimentů z různých zeměpisných poloh. Kulturu PH002 isolovali z East River v New Yorku, kulturu FL05 isolovali z odvodňovacího příkopu ve Floridském lesíku podél silnice a poslední kultura CR23 byla izolována z malé říčky v deštném lese v Carara National Park v Kostarice. Všechny tři kultury byly pohyblivé gram-negativní tyčky, které byly schopné využít fenol jako jediný zdroj uhlíku a energie. Fylogenetická analýza na základě sekvence 16S rDNA ukázala, že kultury PH002, CR23 a FL05 jsou členem podskupiny β-proteobakterií, a přísluší k rodům *Azoarcus* a *Thauera*.

Vzorky z prostředí byly kultivovány ve 160 ml láhvích bez třepání při teplotě 30°C. Láhve obsahovaly 10 ml suspenze připravené z daného sedimentu a 90 ml minerálního média (Taylor, Campbell, Chinoy, r.1970). Láhve byly řádně utěsněny zátkou z neoprenové gumy. Byl sledován úbytek fenolu v závislosti na zákalu, který vznikal v důsledku růstu bakterií. Během 2 až 3 dnů došlo ke ztrátě fenolu. Koncentrace fenolu v láhvi byla měřena pomocí kapalinové chromatografie (HPLC).

Shinoda a kolektiv [10] se zabývali izolací nových denitrifikačních bakterií, které jsou schopné anaerobně rozkládat fenol. Isolovali dva druhy těchto degradačních bakterií, které byly na základě fylogenetické analýzy identifikovány jako *Azoarcus* sp. a *Magnetospirillum* sp.

V 2 litrové nádobě bioreaktoru bylo bakteriální společenstvo degradující fenol za denitrifikačních podmínek neustále obohacováno médiem obsahující 1mM fenol, 5mM NaHCO₃,

5mM KNO₃. Pracovní objem 1,5 litru s hodnotou pH mezi 7,2 - 7,4 a teplotou 30°C byl míchán při 500 otáčkách za minutu. Médium bylo naočkováno suspenzí z půdy získané při pěstování neloupané rýže a následně probubláno čistým dusíkem. V intervalu 2-6 měsíců se na povrchu tvořila biomasa, která se přenesla do čerstvého média a opět následně obohacována. Po 1 roce obohacování izolovali kmen CC-11 identifikovaný jako *Azoarcus sp* a po 3 letech kmen CC-26, identifikovaný jako *Magnetospirillum sp*.

Lu a kolektiv [11] zkoumali biodegradaci nonylfenol-polyethoxylátu (NPEOs) z denitrifikačního aktivovaného kalu, který byl získán z anoxické nádrže ČOV v Shanghai, (Čína). Výsledky ukázaly, že NPEOs byly snadno degradovány v procesu denitrifikace aktivovaného kalu. Velký vliv na biologickou rozložitelnost NPEOs v procesu denitrifikace měly organické látky, počáteční koncentrace a teplota. Zjistili, že biodegradace NPEOs byla výrazně potlačena v přítomnosti organických látek. Pokles teploty způsobil prudké snížení účinnosti odstraňování NPEOs. NPEOs byly biologicky rozloženy anaerobní cestou, kterou došlo k postupnému odstranění ethoxylových složek (jako acetaldehyd) na nonylfenol. Ve srovnání s upraveným anaerobním aktivovaným kalem měl denitrifikační AK mnohem vyšší účinnost odstranění nečistot NPEO.

V rámci celého experimentu používali striktně anaerobní mikrobiální proces. K vyhodnocení účinnosti odstraňování celkového NPEOs byla využita HPLC analýza.

Anaerobní médium obsahovalo NH₄Cl (1,5 g.l⁻¹), MgCl₂.6H₂O (0,1 g.l⁻¹), CaCl₂ (0,1 g.l⁻¹), KH₂PO₄ (0,6 g.l⁻¹) a dusičnany (30 mM). Médium bylo sterilizováno po dobu 20 minut a po následném ochlazení bylo přidáno FeCl₂ . 4H₂O (0,001 g.l⁻¹) a uhličitany (30mM). Dále bylo upraveno pH média na hodnotu 7,0 použitím 1M HCl.

Wang a Lee [12] se zabývali izolací denitrifikační bakterie se schopností rozkladu ε-kaprolaktamu z kalu, který pocházel z denitrifikační nádrže systému čištění odpadních vod s výroby akrylonitri-butadien-styrenové (ABS) pryskyřice. Nejprve provedli mikrobiální pomnožení v anorganickém minerálním médiu s obsahem tří roztoků (A, B, C) viz. níže. Na začátku mikrobiálního pomnožení každá ze 4 skleněných lahví obsahovala 3 ml kalu, 30 ml minerálního média a různé koncentrace ε-kaprolaktamu (125, 251, 502, 1003 mg.l⁻¹). Každá láhev byla naplněna a utěsněna skleněnou zátkou před umístěním

do kultivační místnosti. Kultivace probíhala 7 dnů při teplotě 30°C. Po vytvoření zákalu a tvorbě plynových bublin, byly odebrány 3 ml suspenze a dány do nové sterilní skleněné láhve a došlo k opakovanému mikrobiálnímu pomnožení. Po třetím opakování mikrobiálního pomnožení bylo odebráno 5 ml suspenze z každé láhve a provedeno desetinné ředění. Následně byla suspenze rozetřena na petriho misky s agarem s kvasničným extraktem. Misky se nechaly kultivovat při teplotě 30°C po dobu 24 hodin. Z každé misky byla přenesena plná klička jednotlivých kolonií na novou misku s čistým agarem s kvasničným extraktem ke kontrole čistoty. Po třetím cyklu byly tedy izolovány čisté kultury ABS ze směsné kultury. Veškeré kultury byly podrobeny testu denitrifikace z využitím ϵ -kaprolaktamu jako substrátu. Byly izolovány celkem tři kmeny, přičemž jen jeden využíval 1014 mg.l^{-1} ϵ -kaprolaktamu coby substrát pro svůj růst. Tento kmen byl označen jako MCD-3. Jednalo se o gram-negativní tyčky a oxidasový test ukázal pozitivní výsledek. Na základě fylogenetické analýzy (sekvence 16S rDNA) byl kmen MCD-3 identifikován jako *Paracoccus versutus*.

Roztok A byl složen: 0,66 g K_2HPO_4 ; 0,54 g KNO_3 ; 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na 1 litr destilované vody. Roztok B byl složen: 20g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ na 1 litru destilované vody. Roztok C byl složen: 2g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,1g $\text{NMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,1g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ na 1litr 0,1N HCl. Tyto roztoky byly sterilizovány odděleně za sterilních podmínek a posléze byl vytvořen 1 litr anorganického minerálního média. Toto médium bylo složeno z 10 ml roztoku B, 10 ml roztoku C a 980 ml roztoku A.

Složení agarů s kvasničným extraktem bylo na 1 litr destilované vody následující 3g kvasného výtěžku, 5 g peptonu, 10 g glycerolu, 9,8 g KNO_3 a 16,5 g agaru.

Ehrenreich [13] a kolektiv při svém studiu anaerobní oxidace alkanů izolovali tři nové alkan-degradující denitrifikační bakterie, které anaerobně využívaly nasycené uhlovodíky (alkany) o různé délce řetězce. Zdrojem pro izolaci první kultury HdN1 byl aktivovaný kal z čistírny odpadních vod v Osterholz-Scharmbecku. Zdrojem pro izolaci následujících 2 kultur HxN1 a OcN1 byl vzorek sedimentu z příkopu v Brémách. Výsledkem jejich zkoumání bylo, že izolovaný kmen HdN1 je schopen využívat hexadekan. Buňky tohoto kmene byly oválné a částečně pohyblivé a pocházely ze směsi obohacené alifatickým minerálním olejem. Isolovaný kmen HxN1 byl schopen využívat hexan a jeho buňky byly oválné a nepohyblivé a pocházely ze směsi obohacené ropou. Třetí izolovaný kmen OcN1 byl schopen

využívat oktan a jeho buňky jsou štíhlé pohyblivé tyčinky, které pocházely ze směsi obohacené ropou.

Obohacené kultury byly napěstovány v 500 ml skleněných lahvích. Čisté kultury byly poté pěstovány v 125 ml láhvi nebo ve 20 ml zkumavce, které byly uzavřeny pryžovou zátkou. Anoxické podmínky byly zajištěny probubláním čistým dusíkem. Všechny kultury byly kultivovány ve tmě při 28°C v přítomnosti hexanu, hexadekanu nebo oktanu. Rychlost procesu denitrifikace, tedy tvorby plynu, byla nejprve během 6-8 týdnů v přítomnosti dusičnanů stejná jako u kontrolních lahví (bez uhlovodíku), viditelný rozdíl v rychlosti procesu denitrifikace byl patrný až po dalších 6-8 týdnech kultivace, kdy v lahvích obsahující hexan, hexandekan nebo oktan byl proces podstatně rychlejší.

Franco a kolektiv [14] jeho spolupracovníků se pokusili izolovat bakterie degradující polymerní galloyl-ester z rizosféry rostlin, které rostly v oblasti vytékání odpadní vody z koželužny. Bylo analyzováno značné množství typů bakterií. Podařilo se jim izolovat celkem 54 aerobních, 27 denitrifikačních a 17 sulfát-redukujících bakteriálních kultur. Na základě sekvence 16S rDNA byly denitrifikační kultury identifikovány jako organismy úzce příbuzné s rodem *Serratia* a dále druhy *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella oxytoca*, *Herbaspirillum chlorophenicum*, a *Pseudomonas putida*.

Postup získání kultur byl následující: vzorek půdy (5 g) byl vložen do 95 ml Ringerova roztoku a třepán po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Vhodná ředění této suspenze byla rozetřena na tři misky s různým médiem (viz níže) pro počet aerobních, denitrifikačních nebo sulfát-redukujících bakterií. Misky byly inkubovány při teplotě 25°C po dobu 3 dnů pro celkové aerobní bakterie, 15 dní pro denitrifikační bakterie a 30 dní pro sulfát-redukující bakterie.

Médium ozn. NM (nitrate-medium) obsahovalo 5 g.l⁻¹ peptonu; 3 g.l⁻¹ hovězího extraktu; 1 g.l⁻¹ KNO₃ a 15 g.l⁻¹ agaru. Médium ozn. LM (lactate-medium) obsahovalo 12 g.l⁻¹ mléčnanu sodného; 4,5 g.l⁻¹ NaSO₄; 0,06 g.l⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 0,3g.l⁻¹ citronan sodný; 1 g.l⁻¹ NH₄Cl; 0,5 g.l⁻¹ KH₂PO₄; 2 g.l⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1 g.l⁻¹ kvasničného extraktu; 12 g.l⁻¹ agaru; 0,08 ml FeSO₄; 0.015 g.ml⁻¹ hydrosiřičitan sodný; 0.010 g.ml⁻¹ kyseliny askorbové.

Heylen a kolektiv [15] studovali v roce 2006 rozmanitost denitrifikačních bakterií v aktivovaném kalu z městských čistíren odpadních vod, a také zkoumali nejvhodnější složení isolačních živných médií. Výsledky ukázaly, že vhodnými organickými substráty pro získávání denitrifikačních bakterií byly ethanol nebo jantaran. V práci bylo izolováno celkem 199 denitrifikačních bakterií. Většina z nich patřila do kmene *Proteobakteria*, přičemž 36,8% patřilo do třídy *alphaproteobakteria*, 50,4% *betaproteobakteria*, 5,6% *gammaproteobakteria*, 2% *epsilonproteobakteria* a malou část zaujímaly bakterie kmene *Firmicutes* (4%). Byla izolována i jedna bakterie kmene *Bacteroidetes*. Jednotlivé bakterie byly izolovány z misek s různými typy živných agarových médií, na kterých byla rozetřena série ředění ($10^0 - 10^{-8}$). Misky byly kultivovány za anaerobních podmínek po dobu dvou týdnů. Isolované kultury z nejvyššího ředění byly poté v čisté podobě podrobeny denitrifikačním testům. Tato studie odhalila mnohem více rozmanitých denitrifikačních populací než bylo již dříve popsáno při výzkumech aktivovaného kalu.

3 DEGRADACE POLYMERU

Degradaci polymeru lze vysvětlit jako nežádoucí změnu, která se projeví v jeho vlastnostech. Obecně se tedy jedná o procesy, které způsobují změnu vlastností polymerních materiálů vnějšími a vnitřními vlivy. Vnějšími vlivy je například ozon, vzdušný kyslík, vlhkost, teplo, sluneční nebo ionizující záření, mikroorganismy a jiné. Za vnitřní vliv můžeme považovat např. termodynamickou nerovnováhu. Změny mohou být biologického, chemického, či fyzikálního rázu a nebo jejich kombinací [16].

Podle způsobu zahájení existují degradace [17]:

- Degradace mechanická a ultrazvukem je způsobena mechanickým namáháním (př. mletím) nebo ultrazvukem, kdy jsou polymery vystaveny vysokým vibracím.
- Fotodegradace je skupinou fyzikálních procesů. Fotochemické změny probíhají tehdy, pokud je absorbováno světelné záření o určité vlnové délce.
- Termická degradace je způsobena vlivem tepelné energie a dalších faktorů.
- Chemická degradace využívá chemických činidel reagujících s funkčními skupinami polymerů. Příkladem může být degradace vyvolaná ozonem.
- Katalytická degradace je v podstatě jistou formou degradace chemické s použitím katalýzy. Katalyzátor může být např. oxid siřičitý nebo některé kovy (nikl, železo, chrom aj.)

3.1 Biodegradace

Biodegradace je speciální případ rozpadu, kdy dochází k rozkladu organických látek působením biologických činitelů. Může probíhat v aerobních podmínkách, tedy za přístupu kyslíku, tak i v anaerobních podmínkách s absencí kyslíku. Biodegradace je ovlivňována zejména vlivy prostředí (př. světlo, teplo, živiny, pH, vlhkost). Většinou je zapříčiněna enzymy produkovanými mikroorganismy. V anaerobních podmínkách dochází většinou ke snížení pH vlivem organických kyselin produkovaných mikroorganismy. Naproti tomu v aerobním prostředí může pH i vzrůst (při kompostování dochází obvykle ke zvýšení pH na 8-9). Během aerobní biodegradace dochází k produkci oxidu uhličitého, vody a nové biomasy. Stejně tak jako při anaerobní biodegradaci, při které se ještě uvolňuje i metan.

Vlivem ohromných rozdílů v přírodních podmínkách biodegradabilita polymerů silně kolísá. Je to zapříčiněno i druhy mikroorganismů, které se vyskytují v dané lokalitě [17, 18].

Biodegradabilita prvních biodegradovatelných plastů byla testována metodami vyvinutými pro studium schopnosti plastů odolávat mikrobiálnímu napadení. Tyto testy byly později nahrazeny metodami, které stanovují konečné produkty mikrobiálního metabolismu [18].

Schopnost polymerů podléhat biologickému rozkladu nesouvisí s jejich původem, tedy s tím, zda byly vyprodukovány v přírodě nebo v chemickém reaktoru, ale s jejich chemickou strukturou. Na základě této struktury lze předpokládat hydrolytické nebo oxidační štěpení makromolekul [16].

V současné době se vyrábí řada syntetických polymerů, které splňují kritéria biodegradovatelnosti. K nejvýznamnějším patří kyselina polymléčná (PLA), poly- ϵ -kaprolakton (PCL), PVA a další. Spotřeba biologicky rozložitelných polymerů v posledních letech stoupá o zhruba 50% ročně.

3.1.1 Anaerobní rozklad

Jedná se o biologický rozklad bez přístupu kyslíku, na kterém se podílí řada anaerobních mikroorganismů. Charakteristické jsou pro tento rozklad hodnoty redoxního potenciálu, který je pod -50 mV. Proces probíhá přirozeně v přírodě (př. močály, sedimenty, bahno, hluboké vrstvy půd, trávící trakt) nebo při zpracování anaerobního kalu na ČOV. Při procesu dochází k postupnému rozkladu organické hmoty za přítomnosti směsné kultury mikroorganismů. Konečným produktem rozkladu je methan, oxid uhličitý, minerální látky a nová biomasa. Průběh anaerobního rozkladu je ovlivňován tím, zda jsou v prostředí přítomny látky umožňující anaerobní respiraci. Příkladem těchto látek jsou např. dusičnany (denitrifikace) nebo sírany (desulfurikace) a za takových podmínek dochází k významné produkci CO_2 , neboť anaerobně respirující bakterie jsou obvykle schopny úplné mineralizace organického substrátu.

3.1.2 Aerobní rozklad

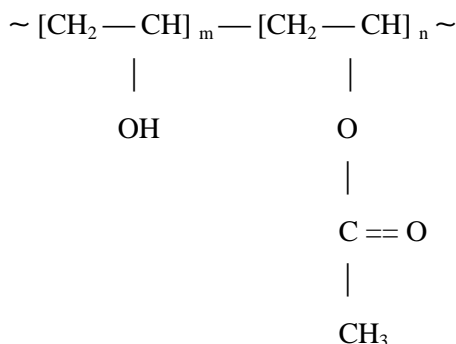
Předpokladem pro tento rozklad je přítomnost kyslíku v dostatečné koncentraci a samozřejmě přítomnost aerobních mikroorganismů, kteří využívají organické látky jako zdroj energie a k vytváření nových buněk. Rozklad tedy probíhá za přístupu kyslíku a jsou pro něj charakteristické hodnoty redox potenciálu nad +50mV. Substrát je částečně oxidován na oxid uhličitý, vodu a zbytek je převeden na tvorbu nové biomasy.

4 POLYVINYLALKOHOL

4.1 Charakteristika

Polyvinylalkohol (PVA) je polární syntetický polymer, který se vyskytuje ve formě bílého prášku rozpustného ve vodě i v kyselinách. PVA je odolný vůči organickým rozpouštědlům a jeho vlastnosti do značné míry ovlivňuje jeho čistota [16, 19].

Struktura PVA je tvořena uhlíky, hydroxylovými skupinami (-OH) a zbytkovými acetátovými skupinami (Obr. 2). Na obsahu těchto skupin potom závisí chemické, fyzikální, mechanické a zpracovatelské vlastnosti [20].

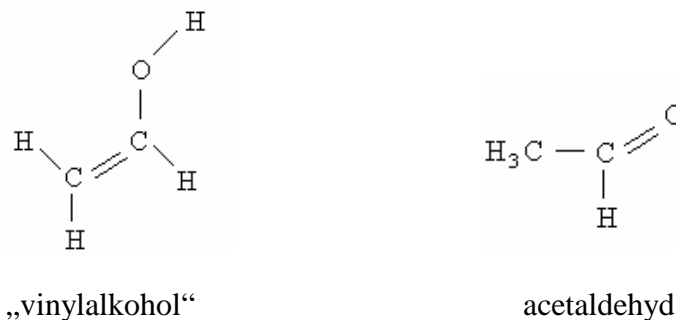


Obr. 2. Chemická struktura polyvinylalkoholu [20]

4.2 Výroba

Polyvinylalkohol není vyráběn polymerací odpovídajícího monomeru (vinylalkoholu), ale hydrolýzou polyvinylacetátu (PVAc). Stupeň této hydrolýzy a polymerační stupeň významně ovlivňují vlastnosti takto připraveného polymeru [16, 19]. Nejvíce se používá PVA se stupněm hydrolýzy v rozmezí 70 – 99% [20].

Produktem všech reakcí, které by mohly vinylalkohol zdánlivě poskytnout, je acetaldehyd, neboť alkohol, jehož hydroxylová skupina by byla vázána na stejný uhlíkový atom, ze kterého vychází dvojná vazba, se přesmykem ještě ve stavu svého zrodu mění na příslušný aldehyd (Obr. 3). [16]



Obr. 3. Vznik acetaldehydu z vinylalkoholu [16]

4.3 Použití

Na základě svých vlastností je PVA používán v potravinářství pro přípravu ovocného želé, a v chemickém průmyslu jako ochranný koloid pro suspenzní polymerace. Vyrábějí se z něj obalové fólie, chirurgické nitě, kontaktní čočky, textilní vlákna, různá těsnění, hadice a jiné výrobky [16]. Dále se využívá ke konečné úpravě vzhledu papíru a textilu nebo v kosmetice jako součást vlasových přípravků, krémů a deodorantů.

4.4 Biodegradace PVA

Problematikou rozkladu PVA v mikrobiálním prostředí se zabývalo ve svých pracích a stále zabývá při svém studiu celá řada nejen českých, ale i zahraničních autorů. Na ÚIOŽP je této problematice věnovaná značná pozornost.

V roce 2004 se problematikou rozkladu PVA zabýval ve své diplomové práci Jiří Riedl [21], který z aktivovaného kalu čistírny odpadních vod v Otrokovicích isoloval čtyři kultury degradující PVA. Autor se zaměřil na dvojici kultur Ž a B, které rozkládaly PVA pouze za přítomnosti PQQ. Tyto kmeny následně využil při degradačních testech PVA. Výsledkem testů bylo, že kmeny Ž a B jsou symbiotické a jsou schopny rozkládat PVA pouze ve směsi.

V návazné studii byla provedena identifikace kmene B, který patřil k druhu *Rhodococcus erythropolis*. Vlastnostmi kultury Ž se zabývala o rok později ve své diplomové práci A.Vlčková [1].

Dalším autorem zabývajícím se biodegradací PVA byl Petr Zeman [22]. Ten v rámci své DP studoval daný problém za přítomnosti dalších přídatných látek k degradační směsi.

Průběh biodegradace vyhodnocoval sledováním úbytku koncentrace PVA a rozpuštěného organického uhlíku po odcentrifugování buněk. Výsledkem bylo, že pokud je PVA jediným substrátem, pak proběhne úplná degradace polymeru. S dalším přidavkem látek do směsi se proces biodegradace zpomaloval. Studoval i mechanismus ovlivňující degradační proces v přítomnosti živin. Přítomnost tryptonu a sacharosy růst PVA degradačních kultur neinhiboval, ale naopak jim prospíval.

Rozkladem PVA čistými kulturami degradačních bakterií se zabýval v rámci své DP Martin Nedbálek [23]. Ke svému studiu využil neadaptovaný aktivovaný kal z čistírny odpadních vod v Malenovicích. Provedl řadu různých testů a posuzoval vliv koncentrací solí, konkrétně fosforečnanů, na rozklad PVA degradačními mikrobiálními kulturami (OT2, JK2). Jako růstový substrát použil trypton. Výsledkem byla skutečnost, že růst testovaných degradačních kultur OT2 a JK2 je negativně ovlivňován zvýšenou koncentrací fosforečnanů v prostředí, zvýšenou koncentrací hydrogenuhličitanu byla prokázána stejná citlivost.

O rok později se v rámci své disertační práce zabývala Tereza Václavková [1] stejným problémem jako Martin Nedbálek a při svých experimentech došla ke stejným závěrům. Václavková navíc uvádí v procentech biologickou rozložitelnost PVA. Uvádí, že po 16 denní kultivaci bylo dosaženo 95% biologické rozložitelnosti PVA kulturou JK2 a 82% u kultury OT2.

5 VÝSLEDKY PŘEDCHÁZEJÍCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Autorka loňské diplomové práce, Kateřina Ošřádalová [24], především studovala degradaci PVA čtyřmi vybranými druhy degradačních bakteriálních kultur. Kulturami v jejím případě byly kultury OT2 a OT3, které byly izolovány z aktivovaného kalu ČOV Otrokovice v rámci DP J. Riedla (2004), kultura JK2 izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Malenovice v rámci disertační práce T. Václavkové (2009) a kultura Ž1 byla izolována z aktivovaného kalu ČOV Malenovice v rámci DP P. Zemana (2007).

Složení minerálních médií, které v rámci svých experimentů použila bylo následující (na přípravu 1 000 ml minerálního média):

Minerální médium (MM1) :

20 ml roztoku pufru A (KH_2PO_4); 80 ml roztoku pufru B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); 850 ml destilované vody; 2 ml roztoku stopových prvků; 10 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); 10 ml NH_4Cl ($30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); 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 ($50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Minerální médium (MM2) se lišilo od MM1 v:

40 ml roztoku pufru A (KH_2PO_4); 160 ml roztoku pufru B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); 750 ml destilované vody.

Minerální médium (MM3) :

5 ml roztoku pufru A (KH_2PO_4); 45 ml roztoku pufru B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); 930 ml destilované vody; 2 ml roztoku stopových prvků; 5 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); 5 ml NH_4Cl ($30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); 5 ml $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); 5 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Minerální médium I (TRIS 0,05M) se lišilo od MM3 v:

0,7 ml roztoku pufru A (KH_2PO_4); 5,5 ml roztoku pufru B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); 961,8 ml TRIS pufr 0,05M; 5 ml NaCl ($3,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$); 5 ml KCl ($4,97 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Minerální médium II (TRIS 0,005M) se lišilo od Minerálního média I. v:

961,8 ml TRIS pufr 0,005M.

Výsledky její práce:

Médium MM1, MM2, MM3 byly použity na rozklad PVA čistými kulturami OT2 a JK2 za použití fosfátového pufru. Kulturu OT2 sledovala 46 dní a degradace PVA u MM1 byla z 80,3% účinná a u MM3 z 80,4%, u MM2 nenastaly žádné výrazné změny. Kulturu JK2 sledovala 15 dní a za tuto dobu proběhla v MM1 100% degradace PVA a u MM3 z 93%, v MM2 nenastala degradace vůbec.

Degradaci stejných kultur prováděla v médiu I. a II. Degradace PVA kulturou OT2 v médiu II. byla 74% účinná a v médiu I. byla degradace pomalejší 67,8%. Degradace kulturou JK2 proběhla ze 66,7% v mediu II a 100% v mediu I.

Dále posuzovala vliv minerálních solí a typu kationtů na růst degradačních kultur za použití tryptonu a PVA. Použila všechny 4 kultury. Minerálním médiem byly 4 roztoky NaCl a 4 roztoky KCl s různou koncentrací chloridů. Výsledky ukázaly, že kultury byly ve svém růstu zpomaleny či úplně zastaveny po přidání vyšší koncentrace chloridů do MM. Vhodnější jsou tedy pro růst MM s nižším obsahem chloridů.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA

6.1 Chemikálie

Použité chemikálie byly čistoty p.a. Není-li uvedeno jinak, pochází od standardních dodavatelů chemikálií jako např. firmy Penta nebo Lachema.

Polyvinylalkohol (PVA)

Vždy byl použit práškový PVA pod obchodním názvem POVAL 205 (viskozita 4% roztoku při 20°C je 4,6 - 5,4 mPa.s⁻¹, procentuální obsah odstraněných acetátových skupin je 86 - 89%) od firmy Kuraray, Japonsko.

Fyziologický roztok

Byl připraven navážením 8,5g NaCl a rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Roztok byl vysterilizován při teplotě 120°C po dobu 20 minut.

Zásobní roztok PQQ

Byl připraven navážením 1mg PQQ a rozpuštěním v 10 ml destilované vody. Roztok byl vysterilizován filtrací přes sterilní ultrafiltr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22 μm a uchováván při teplotě -18°C.

Zásobní roztok PVA (10 g.l⁻¹)

Byl připraven navážením 1g PVA a rozpuštěním ve 100 ml destilované vody.

Zásobní roztok KNO₃ (100 g.l⁻¹)

Byl připraven navážením 10 g KNO₃ a rozpuštěním ve 100 ml destilované vody.

Standardní roztok PVA (POVAL 205)

Byl navážen 1,00 g PVA a za tepla rozpuštěn v 1000 ml destilované vody.

Roztok stopových prvků

Bylo naváženo:

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

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

Zásobní roztoky solí

MgSO ₄ ·7H ₂ O (5 g.l ⁻¹)	1 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O (3 g.l ⁻¹)	0,6 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (1 g.l ⁻¹)	0,2 g
NH ₄ Cl (10 g.l ⁻¹)	2 g

Jednotlivé soli byly naváženy a rozpuštěny každá zvlášť ve 200 ml destilované vody.

6.2 Živné agary

Dané složky byly řádně rozpuštěny v tekutém minerálním médiu popřípadě v destilované vodě a sterilizovány při 125°C po dobu 30 minut. Po zchlazení byl agar asepticky rozlit na předem popsané sterilní Petriho misky v laminárním boxu.

PVA 3D

Na přípravu 300 ml agaru bylo použito:

Minerální médium.....	300 ml
PVA	0,3 g

Řasový (čistý) agar	5,4 g
Zásobní roztok PQQ	60μl
Kvasničný autolyzát	0,009 g

Univerzální U

Na přípravu 300 ml agaru bylo použito:

Minerální médium	300 ml
Řasový (čistý) agar	5,4 g
Kvasničný autolyzát	0,009 g
Ethanol	0,5 ml
Jantaran sodný	0,45 g

Sterilní ethanol byl přidán do láhve s půdou až po její sterilizaci v autoklávu a vychladnutí.

Slepý pokus SP

Na přípravu 300 ml agaru bylo použito:

Minerální médium	300 ml
Řasový (čistý) agar	5,4 g
Kvasničný autolyzát	0,009 g

Speciální agar US1

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

Minerální médium	100 ml
Řasový (čistý) agar	1,8 g
Kvasničný autolyzát	0,050 g

Speciální agar US2

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

Minerální médium	100 ml
------------------------	--------

Řasový (čistý) agar	1,8 g
Kvasničný autolyzát	0,020 g
Trypton	0,040 g
Sojový pepton	0,040 g

TYA agar

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

Destilovaná voda	100 ml
TYA agar (HIMEDIA)	2,1 g

6.3 Biologický materiál

Denitrifikační kal byl získán z městské čistírny odpadních vod ve Zlíně-Malenovice a adaptovaný na PVA (viz.doktorská práce H.Marušincová [2]).

7 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY

7.1 Přístrojové vybavení

Předvážky KERN EW	SRN
Analytické váhy KERN 770	SRN
Třepačka	GUL
Box laminární BIO IIA	TELSTAR, Španělsko
Chlazená centrifuga MR 23i	JOUAN, Francie
Laboratorní mikroskop	OLYMPUS CX 41, Japonsko
Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky	TECAN SUNRISE, USA
Elektrický vaříč	ETA
Laboratorní sterilizátor	SANO CLAV, SRN
Termostat TDB-120	BIOSAN
Minishaker MS1	IKA
Kultivační místnost 25°C	ÚIOŽP, FT
Anaerostat	MERCK
Exikátor	ČR
Chladnička	ARDO

7.2 Laboratorní pomůcky

96-jamková mikrotitrační destička	GAMA, ČR
---	----------

Běžné laboratorní potřeby jako kličky, dávkovače, zkumavky, kádinky a další laboratorní a mikrobiologické pomůcky, viz. mikrobiologická laboratoř ÚIOŽP.

8 PRACOVNÍ POSTUPY

8.1 Pomnožovací cykly

Tyto práce probíhaly ve skleněných lahvích, do kterých bylo dávkováno minerální médium s rozpuštěným PVA (výsledná koncentrace v rozmezí 100-200 mg.l⁻¹), dále denitrifikační adaptovaný kal nebo suspenze z předchozího cyklu a případně další látky tak, aby výsledný objem všech složek ve skleněné lahvičce byl 120 ml. Lahve byly probublány plynným dusíkem, uzavřeny a ponechány v kultivační místnosti na třepačce s konstantní frekvencí kmitů ve tmě při teplotě 25°C. V pravidelných intervalech byly odebírány vzorky pro stanovení koncentrace PVA. Na základě výsledků tohoto stanovení byly prováděny další cykly.

8.1.1 Popis jednotlivých pomnožovacích cyklů

Výchozím vzorkem pro I.cykus byl adaptovaný denitrifikační kal z ČOV Zlín-Malenovice, který byl získán v rámci doktorské práce H. Marušincové (adaptovaný na PVA). Bylo provedeno jeho desetinné ředění ($10^{-1} - 10^{-4}$) minerálním médiem a do jednotlivých ředění byl přidán polyvinylalkohol v koncentraci 100 mg.l⁻¹, každé ředění dvakrát vedle sebe. Po stanovení přesných koncentrací PVA byly lahve kultivovány v temnu při 25°C po dobu 14 dnů. Poté byly koncentrace PVA opět změřeny.

Pro II.cykus byla použita suspenze z I.cyklu, konkrétně ředění 10^{-1} . Opět bylo provedeno nové desetinné ředění (10^{-1} a 10^{-2}) s minerálním médiem (koncentrace PVA 150 mg.l⁻¹). Do jedné z paralelní lahve bylo přidáno 1,5 µl ethanolu (pro rychlé spotřebování případného zbytkového kyslíku). Kultivace lahví se uskutečnila stejným způsobem jako v I.cyklu.

V rámci III.cyklu byly použity paralelní láhve z II.cyklu s přídavkem ethanolu. Jedna z paralelní lahve z ředěním 10^{-1} byla použita na nové desetinné ředění ($10^{-1} + 1,5$ µl ethanolu, $10^{-2} +$ ethanol), koncentrace PVA 150 mg.l⁻¹. Druhá paralelní láhev (označena A) byla bez zředění dále kultivována, s přídavkem PVA do koncentrace 150 mg.l⁻¹ a přídavkem zásobního roztoku KNO₃ (koncentrace 1000 mg.l⁻¹). Stejný postup byl použit i pro ředění 10^{-2} , přičemž paralelní láhev s přídavkem PVA a KNO₃ byla označena jako B.

IV.cykus byl proveden opět desetinným ředěním (10^{-1} a 10^{-2} ozn. Z) z předchozího cyklu s přídavkem ethanolu. Pro toto ředění byla využita láhev 10^{-2} , koncentrace PVA v použitém minerálním médiu byla zvýšena na 200 mg.l^{-1} .

V rámci V.cyklu (koncentrace PVA 150 mg.l^{-1}) a VI.cyklu (koncentrace PVA 200 mg.l^{-1}) bylo přidáno do láhve 10^{-1} s ethanolem (z IV.cyklu) zásobní roztok PVA (koncentrace 10 g.l^{-1}) a KNO_3 (koncentrace 100 g.l^{-1}). Z Tab.1 je zřejmé jaká byla stanovená konečná koncentrace PVA v láhvi u V. a VI.cyklu a jaké přesné množství zásobních roztoků bylo dávkováno.

Tab. 1. Dávkování zásobních roztoků PVA a KNO_3 pro ředění 10^{-1}

Ředění	Cykus	Konečná koncentrace PVA v láhvi	Dávkování zásobního roztoku PVA	Dávkování zásobního roztoku KNO_3
10^{-1}	5.	25 mg.l^{-1}	1,5 ml	1,2 ml
	6.	$10,1 \text{ mg.l}^{-1}$	2,3 ml	1,2 ml

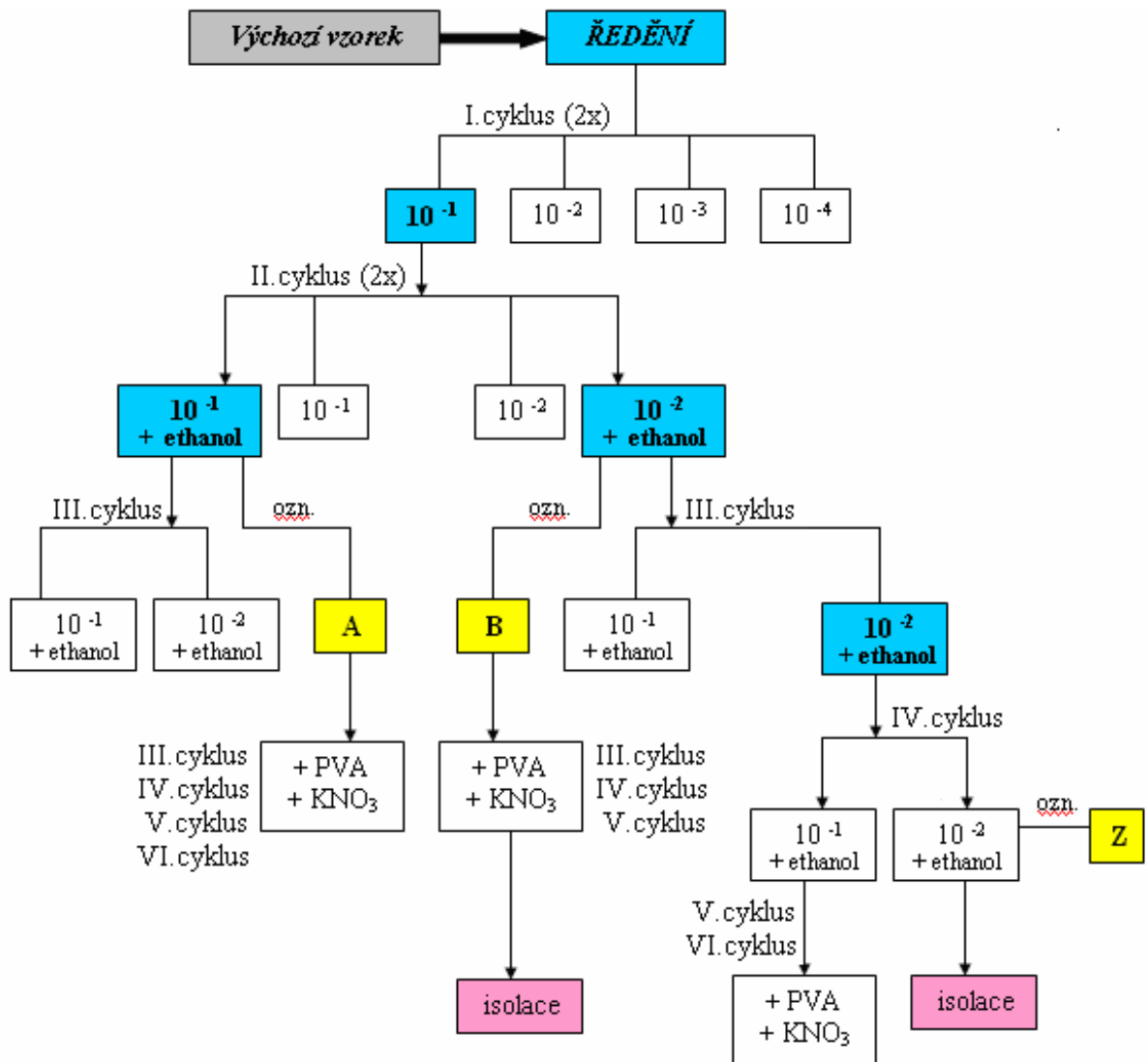
Do láhve A a B byl postupně v rámci IV.cyklu (koncentrace PVA 200 mg.l^{-1}), V.cyklu (koncentrace PVA 150 mg.l^{-1}) a VI.cyklu (koncentrace PVA 200 mg.l^{-1}) stále přidáván zásobní roztok PVA a KNO_3 (viz. Tab.2)

Tab. 2. Dávkování zásobních roztoků PVA a KNO_3 ředění A a B

Ředění	Cykus	Konečná koncentrace PVA v lahvi	Dávkování zásobního roztoku PVA	Dávkování zásobního roztoku KNO_3
A	4.	51 mg.l^{-1}	1,8 ml	1,2 ml
	5.	$31,8 \text{ mg.l}^{-1}$	1,4 ml	1,2 ml
	6.	25 mg.l^{-1}	2,1 ml	1,2 ml
B	4.	25 mg.l^{-1}	2,1 ml	1,2 ml
	5.	21 mg.l^{-1}	1,6 ml	1,2 ml

Kultivace lahví ve všech cyklech probíhala za stejných podmínek jako v rámci I. a II. cyklu, s výjimkou doby kultivace, která byla ve vyšších cyklech 3 – 4 týdny.

Pro lepší orientaci v jednotlivých cyklech byl vytvořen následující obrázek (obr. 4)



Obr. 4. Jednotlivé pomnožovací cykly

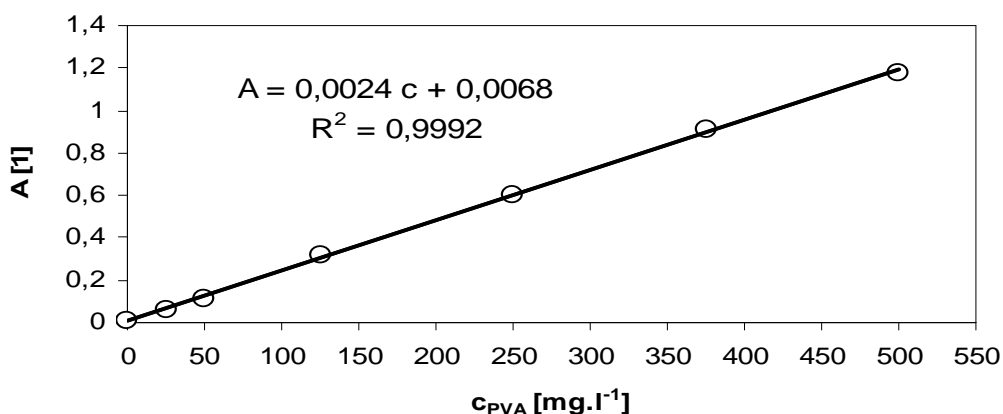
8.2 Stanovení koncentrace PVA na mikrotitrační destičce

Stanovení koncentrace PVA bylo prováděno jodometrickou resp. spektrofotometrickou metodou v mikrotitrační destičce. Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky byl dávkován centrifugovaný vzorek o objemu 20 μl . K němu bylo přidáno 42 μl roztoku kyseliny borité a 10 μl roztoku jodu s jodidem draselným. Vzniklo tmavě zelené zbarvení komplexu PVA s trijodidem, jehož absorbance byla měřena na přístroji TECAN při vlnové délce 660 nm, po 20 sekundách míchání v přístroji a 5 sekundách klidu. Po odečtení absorbance prázdné destičky byly hodnoty absorbance vzorků zprůměrovány a dosazeny do rovnice kalibrační přímky (viz. Obr.5). Tímto způsobem stanovíme koncentraci PVA v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Kalibrační závislost byla zjištěna změřením připravených standardních roztoků PVA v rozsahu koncentrací uvedených v Tab. 3. Výsledná kalibrační závislost byla proložena přímkou v programu Excel a tím se získala rovnice kalibrační přímky (Obr.5), která nám slouží k výpočtu koncentrace PVA.

Tab. 3. Hodnoty absorbancí kalibračních roztoků PVA

c_{PVA} [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	0	25	50	125	250	375	500
A [1]	0	0,0563	0,1154	0,3208	0,6055	0,9109	1,1784



Obr. 5. Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVA

8.3 Příprava živných půd

Základem všech použitých živných půd (3D, U, SP, US1 a US2) je tekuté minerální médium, které bylo použito při biologické degradaci PVA za denitrifikačních podmínek. Jediným typem živného agaru, kde toto médium bylo nahrazeno destilovanou vodou, byl TYA agar. Všechna uvedená živná média byla připravena navážením daného množství jednotlivých složek, které byly dokonale rozpuštěny v minerálním médiu popřípadě v destilované vodě. Následovala sterilizace v autoklávu při teplotě 125°C po dobu 30 minut. Po sterilizaci byly skleněné láhve s půdami položeny do vlažné lázně a ponechány k ochlazení na takovou teplotu, abychom láhve mohli uchopit holou rukou. V boxu s laminárním prouděním vzduchu byly jednotlivé půdy asepticky rozlity do předem popsanych Petriho misek a ponechány ztuhnout.

8.4 Zaočkování živných půd

Mnohé vzorky není možné přímo očkovat na živné půdy, proto je nutné daný vzorek mikrobiálně ředit. Poté lze výsledky snadněji vyhodnocovat, protože na Petriho miskách naroste počítatelné množství kolonií. Ředění se provádí u vzorků s vysokým obsahem mikroorganismů. Vlastní ředění se provádí desetinnou řadou, tzn. že původní vzorek se ředí postupně o řády 10x, 100x, 1000x atd. Tato ředění se označují zápornými exponenty.

Vzorky B a Z, získané v předcházejících pomnožovacích cyklech, byly naředěny desetinným ředěním do hodnot 10^{-2} až 10^{-4} . Tato ředění byla naočkována na pevná agarová média s přídavkem polyvinylalkoholu (3D agar), na universální typ agaru s ethanolem a jantarem sodným (U agar) a na agar pro slepé stanovení (SP agar), rozetřena po celé ploše misek a kultivována jednak za anaerobních podmínek a jednak za mikroaerofilních podmínek při 25°C, po dobu celkem 2 měsíců. Postupně byly tyto misky kontrolovány a narostené kolonie přeočkovávány a čištěny (viz níže).

8.4.1 Postup desetinného ředění

Určitý objem vzorku se asepticky přenese do zkumavky s 9-ti násobným objemem sterilního fyziologického roztoku a použitá pipeta se odloží do desinfekčního roztoku. Obsah ve zkumavce se opatrně, ale důkladně promíchá poklepáním zkumavky o ruku. Vezme se nová sterilní pipeta, kterou se odebere přesný objem a přenese do následující zkumavky opět

s 9-ti násobným objemem sterilního fyziologického roztoku. Tento postup se opakuje dle předpokládaného obsahu mikroorganismů ve vzorku tolikrát, aby se dosáhlo potřebného zředění. Z vhodných zkumavek se poté vyočkovává určitý objem (0,1 ml nebo 1 ml) na předem připravená živná média.

8.5 Isolace kultur

Pomocí sterilní laboratorní kličky byly z příslušného živného média odebrány jednotlivé kolonie na základě jejich velikosti, tvaru a zbarvení. Tyto byly naočkovány na čerstvé agary, jednak stejné, jednak i na TYA agar nebo US1 či US2 agar pro zjištění růstu.

8.6 Gramovo barvení

8.6.1 Příprava fixovaného nativního preparátu

Ožehněme podložní sklíčko a položíme ho na čistý filtrační papír. Doprstřed sklíčka nanese kapku fyziologického roztoku a bakteriologickou kličkou nabere malé množství mikrobiální kultury. Kulturu přeneseme do kapky na podložním sklíčku a dobře rozmícháme. Kličkou rozetřeme suspenzi buněk a necháme vyschnout na vzduchu, nebo opatrně odsušíme nad plamenem. Poté sklíčko nátěrem vzhůru třikrát protáhneme nesvítivým plamenem kahanu a necháme vychladnout.

8.6.2 Vlastní Gramovo barvení

Barvení podle Grama je jednou z nejdůležitějších a nejpoužívanějších diagnostických metod při určování bakterií. Buňky, které se působením rozpouštědel odbarví označujeme jako gramnegativní bakterie (**G-**). Pokud si buňky ponechávají modré zbarvení i po působení rozpouštědel jsou označovány jako grampozitivní bakterie (**G+**). Gramnegativní bakterie dobarvujeme v závěru Gramova barvení pro lepší viditelnost červenými barvivou, čímž vzniká barevný rozdíl mezi oběma skupinami. Podstatou rozdílného výsledku G+ a G- bakterií jsou při tomto barvení rozdíly ve složení a molekulární struktuře buněčné stěny obou skupin bakterií.

Postup Gramova barvení

Připravený fixovaný preparát na podložním sklíčku převrstvíme roztokem krystalové viole-
ti a necháme působit 60 vteřin. Poté bez oplachování barvu slijeme a převrstvíme preparát
Lugolovým roztokem a ponecháme opět 60 vteřin působit. Roztok slijeme a opatrně sklíč-
ko opláchneme destilovanou vodou a odbarvíme v šikmé poloze ethanolem. Odbarvujeme
tak dlouho, dokud odtéká barvivo (obvykle 20-25 vteřin, ne déle). Preparát dokonale
opláchneme destilovanou vodou a dobarvíme zředěným karbolfuchsinem po dobu 60 vte-
řin. Nakonec preparát důkladně opláchneme destilovanou vodou a ponecháme jej oschnout
nebo jej velmi opatrně usušíme vysoko nad plamenem.

Nabarvený preparát se mikroskopuje za pomoci imersního objektivu. Propojením mikro-
skopu s digitálním fotoaparátem je možné z každého pozorovaného preparátu vytvořit fo-
tografie.

8.7 Denitrifikační testy

Jednotlivé izolované kultury byly podrobeny universálnímu testu denitrifikace a testu de-
gradace PVA za denitrifikačních podmínek.

8.7.1 Universální test na denitrifikaci

Na přípravu 1 000 ml média bylo použito:

Minerální médium bez PVA	1 000 ml
Ethanol	3 ml
Kvasničný autolyzát	0,03 g
Jantaran sodný	3 g

Po navážení a rozpuštění všech složek bylo médium rozlito po 15 ml do velkých zkuma-
vek. Do každé zkumavky byla vložena předem naplněná plynovka dnem vzhůru. Zkumav-
ky byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 125°C po dobu 30 minut. Po sterilizaci byly
jednotlivé zkumavky asepticky zaočkovány 200 µl suspenze čisté kultury. Inkubace probí-
hala při 25°C ve tmě (normální podmínky), 1 – 4 týdny. Za pozitivní reakci byl považován
vznik výrazné plynové bubliny v plynovce.

8.7.2 Test degradace PVA za denitrifikačních podmínek

Na přípravu 1 000 ml média bylo použito:

Minerální médium bez PVA	1 000 ml
Kvasničný autolyzát	0,03 g
PVA	0,15 g
Zásobní roztok PQQ	200 µl

Po navážení a rozpuštění všech složek bylo do každé zkumavky se závitkem dávkováno 6 ml média. Zkumavky byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 125°C po dobu 30 minut spolu se zbytkem média v láhvi. Před samotným očkováním 200 µl suspenze čisté kultury bylo do každé zkumavky přidáno 6 ml sterilního média a 1 µl 10% ethanolu (vše asepticky). Inkubace probíhala při 25°C ve tmě na třepačce, 1 – 7 týdnů. Posuzování degradace PVA bylo na základě stanovení koncentrace PVA v daných intervalech.

8.8 Stanovení růstových podmínek

Jednotlivé izolované kultury ze vzorku B a vzorku Z byly postupně přeočkovány na různé typy živných agarů a kultivovány za různých podmínek s cílem zjistit nejvhodnější podmínky pro jejich růst. Kultury byly nejprve naočkovány na Petriho misky s univerzální živnou půdou a na misky s TYA agarem. Pokud byl růst kultur na těchto typech příliš pomalý a nebo kultury na zvoleném agaru nerostly vůbec, byly použity další typy (US1, US2, 3D). Následně byly naočkované misky kultivovány za aerobních (kultivační místnost s přístupem O₂) a mikroaerofilních (exsikátor bez přítomnosti O₂) podmínek. Podle schopnosti jejich růstu na určitém typu živného agaru a za určitých kultivačních podmínek byly stanoveny vhodné růstové podmínky všech izolovaných kultur.

8.9 Zakonzervování čistých kultur

Pro případ budoucího studování izolovaných kultur z denitrifikačního kalu z ČOV Zlín-Malenovice adaptovaného na PVA byly jednotlivé kultury zakonzervovány a dány do hlubokomrazícího boxu (-80°C).

8.9.1 Postup konzervace

Bylo provedeno mnohonásobné přeočkování jednotlivých kultur na živná média, která byla nejvhodnější pro jejich mikrobiální růst. Po důkladném vyčištění byla každá z izolovaných kultur konzervována.

Konzervace spočívá v napěstování dostatečného množství biomasy dané kultury, která je poté laboratorní lancetou opatrně seškrábnuta z živné půdy a v 1,5 ml sterilní mikroskopické ependorfce (ependorfky) řádně rozmíchána v pár kapkách sterilního glycerolu. Takto zpracované jednotlivé čisté kultury jsou uchovány v hlubokomrazícím boxu při -80°C .

8.10 Příprava izolovaných kultur na TGGE

Všechny izolované kultury byly postupně připraveny a předány ve formě lysátů ing. L. Husárové, která v rámci své probíhající doktorské práce [25] jednotlivé kultury zpracovala pomocí Gelové elektroforézy s teplotním gradientem (TGGE). Díky této metodě bylo předpokládáno, že bude možné zjistit, zda je některá ze získaných čistých kultur ze vzorků B a Z totožná s předpokládaným bakteriálním degradérem, nalezeným ve vzorcích z degračních testů rozkladu PVA za denitrifikačních podmínek v rámci doktorské práce ing. H. Marušincové [2].

Princip metody TGGE spočívá v separaci určitého úseku DNA ze vzorku. Aby bylo možné metodu provést, je nutné mít tento úsek DNA v mnoha kopiích. Tyto kopie lze získat pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Příprava kultur spočívala v napěstování biomasy dané kultury, která byla následně sterilní laboratorní kličkou opatrně přenesena z živné půdy do 1,5 ml sterilní mikroskopické ependorfky (ependorfky) a řádně rozmíchána v 50 – 200 μl sterilní destilované vody. Ependorfka byla poté vložena na 10 minut do termostatu při teplotě 93°C . Bylo nutné při práci používat rukavice, aby nedošlo k přenosu DNA do vzorku. Takto zpracované jednotlivé čisté kultury byly uchovány při teplotě -80°C v hlubokomrazícím boxu.

III. VÝSLEDKY A DISKUZE

9 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

9.1 Pomnožovací cykly

Cílem této práce bylo namnožit bakterie schopné degradace PVA za denitrifikačních podmínek z adaptovaného kalu. Podle postupu uvedeného v Kap. 8.1 jsem prováděla jednotlivé pomnožovací cykly. Pouze pro zahájení I. cyklu byl využitý kal adaptovaný na PVA, u ostatních cyklů byla použita suspenze z cyklu předchozího. U každého cyklu byla jodometricky stanovena vstupní a konečná koncentrace PVA v dané lahvičce. Tyto hodnoty jsou uvedeny v následující tabulkách, ve kterých je zároveň modrou barvou zvýrazněno ředění, které bylo použito pro následující cyklus. Délka I. cyklu byla ovlivněna opakováním II. cyklu.

I.cykus

10^{-1} 10 ml kalu + 90 ml MM + PVA 100 mg.l⁻¹

10^{-2} 1 ml kalu + 99 ml MM + PVA 100 mg.l⁻¹

10^{-3} 0,1 ml kalu + 99,9 ml MM + PVA 100 mg.l⁻¹

10^{-4} 1 ml z 10^{-2} + 99 ml MM + PVA 100 mg.l⁻¹

Tab. 4. Stanovení koncentrací PVA pro I.cykus

Délka cyklu	Ředění	Stanovená koncentrace PVA	
		vstupní hodnota	konečná hodnota
35 dnů	10^{-1}	79,73 mg.l ⁻¹	8,08 mg.l ⁻¹
	10^{-1}	80,98 mg.l ⁻¹	10,01 mg.l ⁻¹
	10^{-2}	81,61 mg.l ⁻¹	13,24 mg.l ⁻¹
	10^{-2}	80,54 mg.l ⁻¹	11,98 mg.l ⁻¹
	10^{-3}	81,93 mg.l ⁻¹	23,97 mg.l ⁻¹
	10^{-3}	80,26 mg.l ⁻¹	21,55 mg.l ⁻¹
	10^{-4}	77,12 mg.l ⁻¹	9,75 mg.l ⁻¹
	10^{-4}	78,65 mg.l ⁻¹	10,83 mg.l ⁻¹
	MM + PVA	81,89 mg.l ⁻¹	-

II. cyklus (z lahve 10^{-1} z I. cyklu)

10^{-1}	12 ml suspenze + 108 ml MM + PVA 150 mg.l ⁻¹
	12 ml suspenze + 108 ml MM + PVA 150 mg.l ⁻¹ + 1,5 µl ethanolu
10^{-2}	1,2 ml suspenze + 118,8 ml MM + PVA 150 mg.l ⁻¹
	1,2 ml suspenze + 118,8 ml MM + PVA 150 mg.l ⁻¹ + 1,5 µl ethanolu

Tab. 5. Stanovení koncentrací PVA pro II. cyklus

Délka cyklu	Ředění	Stanovená koncentrace PVA	
		vstupní hodnota	konečná hodnota
13 dnů	10^{-1}	110,67 mg.l ⁻¹	5,27 mg.l ⁻¹
	10^{-1}	118,96 mg.l ⁻¹	7,07 mg.l ⁻¹
	10^{-1} + ethanol	112,69 mg.l ⁻¹	1,01 mg.l ⁻¹
	10^{-1} + ethanol	117,22 mg.l ⁻¹	2,22 mg.l ⁻¹
	10^{-2}	127,79 mg.l ⁻¹	26,15 mg.l ⁻¹
	10^{-2}	126,57 mg.l ⁻¹	20,76 mg.l ⁻¹
	10^{-2} + ethanol	123,49 mg.l ⁻¹	2,93 mg.l ⁻¹
	10^{-2} + ethanol	125,56 mg.l ⁻¹	5,80 mg.l ⁻¹
	MM + PVA	134,99 mg.l ⁻¹	-

Z výsledků uvedených v Tab.5. je zřejmé, že přidavek ethanolu měl příznivý vliv na konečné koncentrace PVA. Lahvičky obsahující ethanol měly konečnou koncentraci PVA nižší než lahvičky bez přídavku. Přídavek ethanolu byl dáván pro spotřebování zbytkového kyslíku.

III. cyklus (z láhve 10^{-1} z II. cyklu)

Byly použity paralelní láhve s přídatkem ethanolu. Jedna z paralelní lahve, která měla nižší koncentraci PVA (viz Tab. 5) byla použita na nové desetinné ředění (10^{-1} a 10^{-2}) s přídatkem ethanolu, který byl přidán pro spotřebování zbytkového kyslíku v lahvičce. Druhá paralelní láhev (označena A) byla bez zředění dále kultivována s přídatkem PVA a KNO_3 .

10^{-1} 11 ml suspenze + 110 ml MM + PVA 150 mg.l^{-1} + 1,5 μl ethanolu

10^{-2} 1 ml suspenze + 120 ml MM + PVA 150 mg.l^{-1} + 1,5 μl ethanolu

A 2 ml zásobní roztok PVA (10 g.l^{-1}) + 1,2 ml zásobní roztok KNO_3 (100 g.l^{-1})

Tab. 6a. Stanovení koncentrací PVA pro III. cyklus

Délka cyklu	Ředění	Stanovená koncentrace PVA	
		vstupní hodnota	konečná hodnota
14 dnů	10^{-1} + ethanol	$119,99 \text{ mg.l}^{-1}$	$74,78 \text{ mg.l}^{-1}$
	10^{-2} + ethanol	$127,02 \text{ mg.l}^{-1}$	$101,49 \text{ mg.l}^{-1}$
	A	$254,96 \text{ mg.l}^{-1}$	$51,07 \text{ mg.l}^{-1}$
	MM + PVA	$134,57 \text{ mg.l}^{-1}$	-

III. cyklus (z láhve 10^{-2} z II. cyklu)

Byly použity paralelní láhve s přídatkem ethanolu. Jedna z paralelní lahve, která měla nižší koncentraci PVA (viz Tab. 5) byla použita na nové desetinné ředění (10^{-1} a 10^{-2}) s přídatkem ethanolu. Druhá paralelní láhev (označena B) byla bez zředění dále kultivována s přídatkem PVA a KNO_3 .

10^{-1} 11 ml suspenze + 110 ml MM + PVA 150 mg.l^{-1} + 1,5 μl ethanolu

10^{-2} 1 ml suspenze + 120 ml MM + PVA 150 mg.l^{-1} + 1,5 μl ethanolu

B 2 ml zásobní roztok PVA (10 g.l^{-1}) + 1,2 ml zásobní roztok KNO_3 (100 g.l^{-1})

Tab. 6b. Stanovení koncentrací PVA pro III.cyklus

Délka cyklu	Ředění	Stanovená koncentrace PVA	
		vstupní hodnota	konečná hodnota
14 dnů	10^{-1} + ethanol	121,01 mg.l ⁻¹	73,21 mg.l ⁻¹
	10^{-2} + ethanol	129,23 mg.l ⁻¹	68,00 mg.l ⁻¹
	B	165,75 mg.l ⁻¹	24,93 mg.l ⁻¹
	MM + PVA	134,57 mg.l ⁻¹	-

IV.cykus (z láhve 10^{-2})

Bylo provedeno opět nové desetinné ředění (10^{-1} a 10^{-2} ozn. Z) z cyklu předchozího s pří-
davkem ethanolu. Koncentrace PVA v použitém minerálním médiu byla zvýšena na
200 mg.l⁻¹. Láhve A a B byly bez zředění dále kultivovány s přídavkem PVA a KNO₃.

10^{-1} 12 ml suspenze + 108 ml MM + PVA 200 mg.l⁻¹ + 1,5 µl ethanolu

10^{-2} (Z) 1,2 ml suspenze + 118,8 ml MM + PVA 200 mg.l⁻¹ + 1,5 µl ethanolu

A 1,8 ml zásobní roztok PVA (10g.l⁻¹) + 1,2 ml zásobní roztok KNO₃ (100g.l⁻¹)

B 2,1 ml zásobní roztok PVA (10g.l⁻¹) + 1,2 ml zásobní roztok KNO₃ (100g.l⁻¹)

Tab. 7. Stanovení koncentrací PVA pro IV.cykus

Délka cyklu	Ředění	Stanovená koncentrace PVA	
		vstupní hodnota	konečná hodnota
27 dnů	10^{-1} + ethanol	157,85 mg.l ⁻¹	25,01 mg.l ⁻¹
	10^{-2} + ethanol	153,44 mg.l ⁻¹	13,95 mg.l ⁻¹
	A	175,17 mg.l ⁻¹	31,80 mg.l ⁻¹
	B	152,14 mg.l ⁻¹	21,01 mg.l ⁻¹
	MM + PVA	157,27 mg.l ⁻¹	-

V.cykklus

Láhve A, B a láhev 10^{-1} (ze IV.cyklu) byly bez zředění dále kultivovány s přidavkem PVA a KNO_3 .

A 1,4 ml zásobní roztok PVA (10g.l^{-1}) + 1,2 ml zásobní roztok KNO_3 (100g.l^{-1})

B 1,6 ml zásobní roztok PVA (10g.l^{-1}) + 1,2 ml zásobní roztok KNO_3 (100g.l^{-1})

10^{-1} 1,5 ml zásobní roztok PVA (10g.l^{-1}) + 1,2 ml zásobní roztok KNO_3 (100g.l^{-1})

Tab. 8. Stanovení koncentrací PVA pro V.cykklus

Délka cyklu	Ředění	Stanovená koncentrace PVA	
		vstupní hodnota	konečná hodnota
26 dnů	A	178,09 mg.l^{-1}	24,85 mg.l^{-1}
	B	152,67 mg.l^{-1}	16,54 mg.l^{-1}
	10^{-1} + ethanol	160,54 mg.l^{-1}	10,10 mg.l^{-1}

VI.cykklus

Láhev A a láhev 10^{-1} (ze IV.cyklu) byly opět bez zředění dále kultivovány s přidavkem PVA a KNO_3 .

A 2,1 ml zásobní roztok PVA (10 g.l^{-1}) + 1,2 ml zásobní roztok KNO_3 (100 g.l^{-1})

10^{-1} 2,3 ml zásobní roztok PVA (10 g.l^{-1}) + 1,2 ml zásobní roztok KNO_3 (100 g.l^{-1})

Tab. 9. Stanovení koncentrací PVA pro VI. cyklus

Ředění	Stanovená koncentrace PVA	
	vstupní hodnota	konečná hodnota
A	215,15 mg.l ⁻¹	-
10 ⁻¹ + ethanol	206,30 mg.l ⁻¹	-

Pro zaočkování živných půd a následnou izolaci bakteriálních kultur byl vybrán vzorek B, do kterého byl v rámci III. – V. cyklu přidáván zásobní roztok PVA a KNO₃ a vzorek Z (zřed'ovací), proto u provedeného VI. cyklu nebyla stanovena konečná koncentrace PVA. Lavičky byly pro případné opakované testy uschovány do ledničky.

9.2 Očkování živných půd

Pro vlastní zaočkování živných půd byl využit vzorek označený jako B (s přídatkem KNO₃ a PVA) a vzorek označený jako Z (zřed'ovací), viz. Obr. 4. Tyto vzorky byly desetinasobně ředěny a pomocí sterilních špiček automatických dávkovačů bylo nadávkováno 100 μl z každé desetinné řady na příslušné živné půdy (viz. Tab. 10 a Tab. 11.). Daný objem byl rozetřen pomocí sterilní skleněné zahnuté tyčinky. Poté byla z misek opatrně asepticky odsušena přebytečná vlhkost a misky byly kultivovány.

Tab. 10. Systém vyočkování vzorku B

Desetinasobné ředění	Ředění na misce	Živná půda	Kultivace
10 ⁻¹	10 ⁻²	3D, SP	Exsikátor
10 ⁻³	10 ⁻⁴	3D, SP, U	(MAF)

Tab. 11. Systém vyočkování vzorku Z

Desetinásobné ředění	Ředění na misce	Živná půda	Kultivace
10^{-1}	10^{-2}	3D, SP, U	Anaerostat (ANAE)
10^{-2}	10^{-3}	3D, SP, U	
10^{-3}	10^{-4}	3D, SP, U	

9.3 Isolace čistých kultur

Cílem této části práce bylo pokusit se izolovat bakteriální kultury se schopností rozkladu PVA za denitrifikačních podmínek z kalu, který pocházel z čistírny odpadních vod Zlín-Malenovice a byl adaptovaný na PVA. Tento kal prokázal degradační aktivitu (viz. [2]) a obsahoval tak bakteriální kmeny se schopností rozkladu PVA. V rámci pomnožovacích cyklů bylo provedeno namnožení těchto bakteriálních kmenů. Následně byla kalová suspenze ze vzorku B a vzorku Z vyočkována na příslušná živná média. V průběhu 48 dnů docházelo k postupnému izolování mikrobiálních kultur. Celkem bylo izolováno 23 čistých kultur, přičemž 11 kultur ze vzorku B (viz. Tab. 12) a 12 kultur ze vzorku Z (viz. Tab. 13). Samotná izolace probíhala na základě velikosti a tvaru jednotlivých narostlých kolonií na živném médiu. Téměř většina kultur byla izolována z univerzálního živného média (ozn.U).

Tab. 12. Isolované kultury ze vzorku B

Vzorek B			
Kultura	Isolace	Kultura	Isolace
U1	U, B 10^{-4}	U11	U, B 10^{-4}
U2	U, B 10^{-4}	U12	U, B 10^{-4}
U3	U, B 10^{-4}	U13	3D, B 10^{-2}
U6	U, B 10^{-4}	U17	U, B 10^{-4}
U7	U, B 10^{-4}	D1	3D, B 10^{-4}
U10	3D, B 10^{-2}		

Tab. 13. Isolované kultury ze vzorku Z

Vzorek Z			
Kultura	Isolace	Kultura	Isolace
U4	U, Z 10^{-4}	U16	U, Z 10^{-4}
U5	U, Z 10^{-4}	U18	U, Z 10^{-4}
U8	U, Z 10^{-4}	U19*	3D, Z 10^{-4}
U9	U, Z 10^{-4}	U19 Δ	3D, Z 10^{-4}
U14	U, Z 10^{-4}	U20	U, Z 10^{-3}
U15	U, Z 10^{-4}	D2	3D, Z 10^{-4}

9.4 Gramovo barvení

Na základě postupu uvedeného v Kap. 8.6 jsem prováděla postupně barvení všech izolovaných kultur. Nabarvené preparáty byly následně mikroskopovány pomocí imersního objektivu. Propojení mikroskopu s digitálním fotoaparátem umožnilo zhotovit fotografii každé nabarvené kultury. Isolované kultury ze vzorku B byly všechny gramnegativní (viz.Tab.14.) až na jednu kulturu (U10), která byla grampozitivní. Barvení kultur ze vzorku Z ukázalo, že z celkem 12 izolovaných kultur jsou čtyři kultury grampozitivní, zbytek gramnegativní (viz. Tab. 15.). Mikroskopický obraz ukázal, že téměř všechny z 23 kultur jsou kratší pravidelné kokovité tyčinky nebo koky až na tři kultury (U10, U19 a D2), které jsou již na první pohled výrazně delší tyčinky. Zajímavá byla kultura U6, která se při barvení kolonie narostené na U agaru ukázala jako drobné koky a při barvení kolonie narostené na US2 agaru se ukázala coby jemnější tyčinky. Podobné to bylo i s kulturou D2. Její nabarvený preparát z 3D agaru ukázal drobné koky, zatím co preparát z US2 agaru výrazně dlouhé tyčinky.

Tab. 14. Gramovo barvení kultur ze vzorku B

Vzorek B			
Kultura	Gram	Kultura	Gram
U1	G -	U11	G -
U2	G -	U12	G -
U3	G -	U13	G -
U6	G -	U17	G -
U7	G -	D1	G -
U10	G +		

Tab. 15. Gramovo barvení kultur ze vzorku Z

Vzorek Z			
Kultura	Gram	Kultura	Gram
U4	G -	U16	G -
U5	G -	U18	G +
U8	G -	U19*	G -
U9	G +	U19 Δ	G -
U14	G -	U20	G +
U15	G -	D2	G +

9.5 Denitrifikační testy

Tyto testy byly provedeny podle postupu uvedeného v Kap. 8.7 a měly zjistit, zda námi izolované kultury ze vzorku B a vzorku Z jsou schopné denitrifikace a degradace PVA za denitrifikačních podmínek.

9.5.1 Universální test na denitrifikaci

Výsledky testu ukázaly, že z 23 izolovaných čistých kultur pouze 8 kultur není schopných denitrifikace (viz.Tab.16. a Tab.17). Kromě dvou kultur (U11, U17) se jednalo o izolované kultury ze vzorku Z. Výsledky testu byly patrné po 7 dnech kultivace. Výjimkou byly kultury U7 a U10, kdy po 7 dnech kultivace byl výsledek testu negativní. Změna nastala až po 11 dnech kultivace. Test obecné denitrifikace byl proveden i pro směs všech kultur ze vzorku B a směs kultur ze vzorku Z. Pro obě tyto směsi byl test pozitivní.

Tab. 16. Universální denitrifikační test kultur ze vzorku B

Vzorek B			
Kultura	Test	Kultura	Test
U1	+	U11	-
U2	+	U12	+
U3	+	U13	+
U6	+	U17	-
U7	+	D1	+
U10	+	směs	+

Tab. 17. Universální denitrifikační test kultur ze vzorku Z

Vzorek Z			
Kultura	Test	Kultura	Test
U4	+	U18	-
U5	+	U19 Δ	+
U8	+	U19*	-
U9	-	U20	-
U14	+	D2	-
U15	-	směs	+
U16	+		

9.5.2 Test na degradaci PVA za denitrifikačních podmínek

Výsledky testu ukázaly, že ani jedna z celkem 23 izolovaných čistých kultur není schopná celého degradačního procesu. Koncentrace PVA byla stanovována po 25-30 dnech kultivace od nasazení kultury do testu. Jak je patrné z Tab. 18. a Tab. 19., mírný náznak degradace se projevil u směsi kultur ze vzorku B a pak také u dvou čistých kultur a to u D2 (vzorek Z) a kultury U17 (vzorek B). Tyto kultury (směs B, D2 a U17) byly ponechány k další kultivaci. V Tab. 18 a 19 jsou uvedeny hodnoty koncentrace PVA na začátku testu, resp. po 20 – 30 dnech kultivace od nasazení kultur do testu a hodnoty na konci testu, resp. po celkové době kultivace 35 – 50 dní od doby, kdy byla kultura nasazena do testu.

Tab. 18. Test s využitím PVA pro kultury ze vzorku B

Vzorek B					
Kultura	Koncentrace PVA (mg.l ⁻¹)		Kultura	Koncentrace PVA (mg.l ⁻¹)	
	začátek	konec		začátek	konec
U1	137,10	126,27	U11	125,86	128,61
U2	127,54	124,60	U12	135,19	128,27
U3	130,17	126,58	U13	124,26	125,10
U6	136,67	131,14	U17	128,05	104,55
U7	135,19	132,73	D1	127,54	125,53
U10	136,38	135,33	směs	134,68	119,01

Tab. 19. Test s využitím PVA pro kultury ze vzorku Z

Vzorek Z					
Kultura	Koncentrace PVA (mg.l ⁻¹)		Kultura	Koncentrace PVA (mg.l ⁻¹)	
	začátek	konec		začátek	konec
U4	127,7	124,64	U18	120,69	121,47
U5	130,80	130,59	U19Δ	130,11	131,06
U8	136,67	134,8	U19*	129,21	130,08
U9	123,01	125,12	U20	125,51	126,84
U14	131,03	125,31	<i>D2</i>	133,39	118,00
U15	124,06	117,68	směs	125,73	123,62
U16	119,69	121,81			

9.6 Stanovení růstových podmínek

Jak je uvedeno v Kap. 8.8, byly jednotlivé kultury nejprve naočkovány na U agar a TYA agar. Pokud se tyto typy živných půd neosvědčily v důsledku pomalého růstu nebo žádného růstu, následovalo přeočkování kultury na jiný typ živného agaru. Jednotlivé misky byly kultivovány v kultivační místnosti při 25°C a přístupu kyslíku nebo v exsikátoru bez přístupu kyslíku. Na základě schopnosti a rychlosti růstu jednotlivých kultur na určitém typu živné půdy a za daných podmínek byly stanoveny optimální růstové podmínky.

Jak uvádí Tab.20 a Tab.21 z celkem 23 izolovaných kultur rostlo nejlépe 15 kultur za mikroaerofilních podmínek (exsikátor), 7 kultur za aerobních podmínek (kultivační místnost) a jedna kultura (U8) rostla stejně dobře za aerobních i mikroaerofilních podmínek. Dále je z tabulky patrné, že pro 9 kultur byl nejvhodnějším živným médiem TYA agar, pro 6 kultur U agar, pro 3 kultury US1 a pro 3 kultury US2. Jedna kultura (U8) rostla stejně dobře na TYA agaru jako na U agaru. Dále pak jedna kultura (U18) rostla jak na US1 živné půdě, tak i na US2 agaru.

Tab. 20. Růstové podmínky pro kultury ze vzorku B

Vzorek B					
Kultura	Růst		Kultura	Růst	
	půda	podmínky		půda	podmínky
U1	TYA	MAF	U11	AE	U
U2	TYA	MAF	U12	TYA	MAF
U3	TYA	MAF	U13	TYA	MAF
U6	AE	U	U17	US1	MAF
U7	AE	U	D1	U	MAF
U10	TYA	MAF			

Tab. 21. Růstové podmínky pro kultury ze vzorku Z

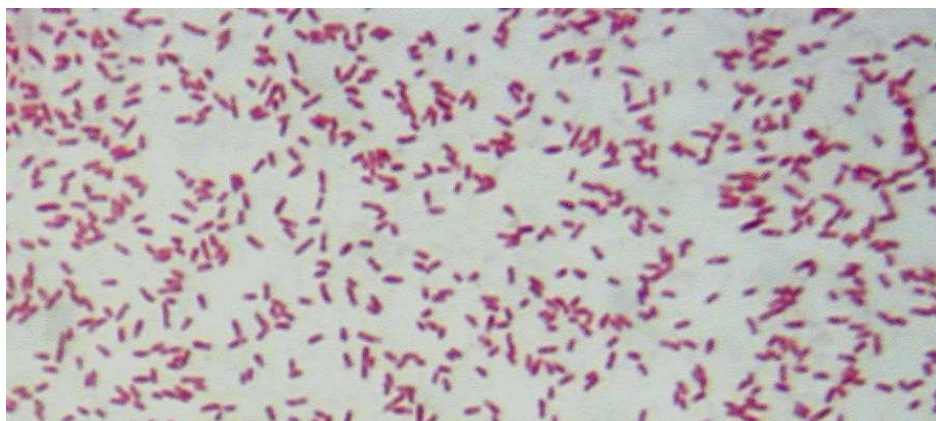
Vzorek Z					
Kultura	Růst		Kultura	Růst	
	půda	podmínky		půda	podmínky
U4	U	AE	U16	TYA	MAF
U5	U	AE	U18	US1 / US2	AE
U8	TYA / U	MAF / AE	U19*	US1	MAF
U9	TYA	MAF	U19 Δ	US1	MAF
U14	TYA	MAF	U20	US2	MAF
U15	US2	AE	D2	US2	MAF

10 VLASTNOSTI ISOLOVANÝCH KULTUR

Tato kapitola zahrnuje souhrnný popis jednotlivých izolovaných kultur z aktivovaného denitrifikačního kalu ČOV Zlín-Malenovice adaptovaného na PVA.

10.1 Kultura U1

Kultura U1 byla izolována po 6 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře a rychle roste na TYA agaru za mikroaerofilních (MAF) podmínek. Na U agaru roste celkem dobře, ale už poněkud pomaleji. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou velmi krátké a pravidelné tyčinky (viz. Obr. 6.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U1 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.

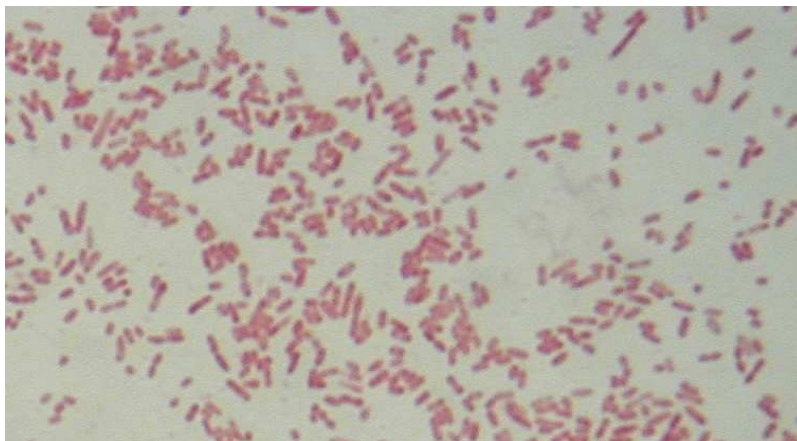


Obr. 6. Mikroskopický pohled na kulturu U1

10.2 Kultura U2

Kultura U2 byla izolována po 6 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře a rychle roste na TYA agaru za mikroaerofilních (MAF) podmínek. Na U agaru roste celkem dobře, ale poněkud pomaleji. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou kratší kokovité tyčinky (viz. Obr. 7.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U2 je schop-

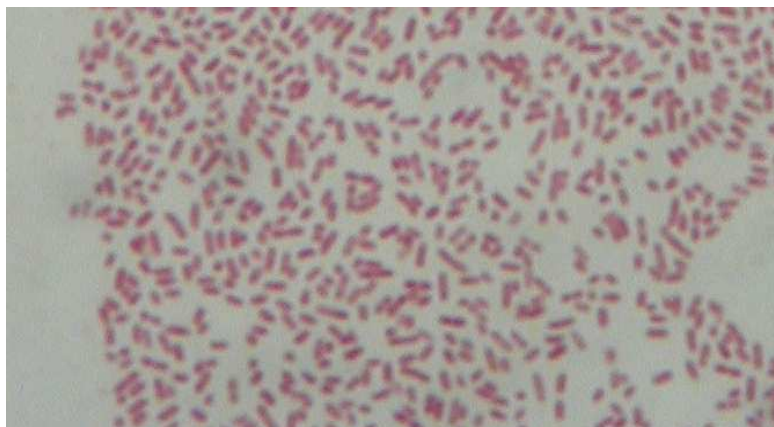
ná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 7. Mikroskopický pohled na kulturu U2

10.3 Kultura U3

Kultura U3 byla izolována po 6 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která dobře roste na TYA agaru za mikroaerofilních (MAF) podmínek a o něco hůře na U agaru. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou kratší kokovité tyčinky (viz. Obr. 8.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U3 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 8. Mikroskopický pohled na kulturu U3

10.4 Kultura U4

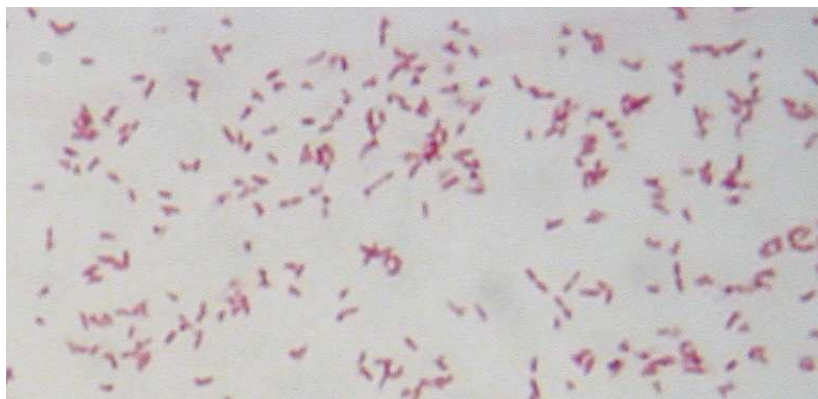
Kultura U4 byla izolována po 6 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která celkem dobře roste na TYA agaru za aerobních (AE) podmínek. Na U agaru roste také celkem dobře. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou silnější tyčinky (viz. Obr. 9.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U4 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 9. Mikroskopický pohled na kulturu U4

10.5 Kultura U5

Kultura U5 byla izolována po 6 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře roste na U agaru za aerobních (AE) podmínek. Na TYA agaru roste také poměrně dobře. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou kratší kokovité tyčinky (viz. Obr. 10.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U5 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 10. Mikroskopický pohled na kulturu U5

10.6 Kultura U6

Kultura U6 byla izolována po 8 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi pomalu roste na U agaru za aerobních (AE) podmínek. Na TYA agaru roste poměrně hůře. Kultura byla přeočkována i na US1 a US2 agary, přičemž růst byl srovnatelný s U agarem. Problémem při izolaci a následném přeočkovávání bylo, že kultura U6 je velmi pomalu rostoucí kulturou, která vrůstá do pevného živného média. Pro případ další studie této kultury by bylo vhodnější zvážit její kultivaci v jiném typu živného média. Na základě Gramova barvení preparátu s U agaru bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky mají charakter koku (viz. Obr. 11a.) a barvený preparát s US2 agaru má charakter delších tyčinek (viz. Obr. 11b.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U6 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



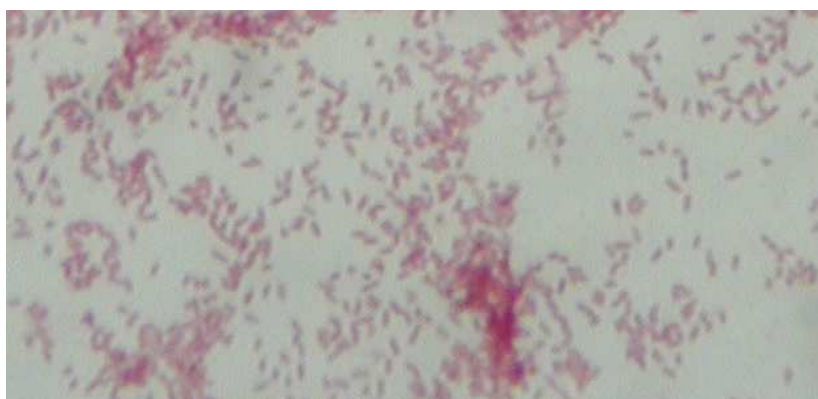
Obr. 11a. Mikroskopický pohled na kulturu U6



Obr. 11b. Mikroskopický pohled na kulturu U6

10.7 Kultura U7

Kultura U7 byla izolována po 8 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která poměrně dobře roste na U agaru za aerobních (AE) podmínek. Na TYA agaru neroste vůbec. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou kratší kokovité tyčinky (viz. Obr. 12.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U7 je schopná denitrifikace až po 11 dnech kultivace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degra-dačního procesu.



Obr. 12. Mikroskopický pohled na kulturu U7

10.8 Kultura U8

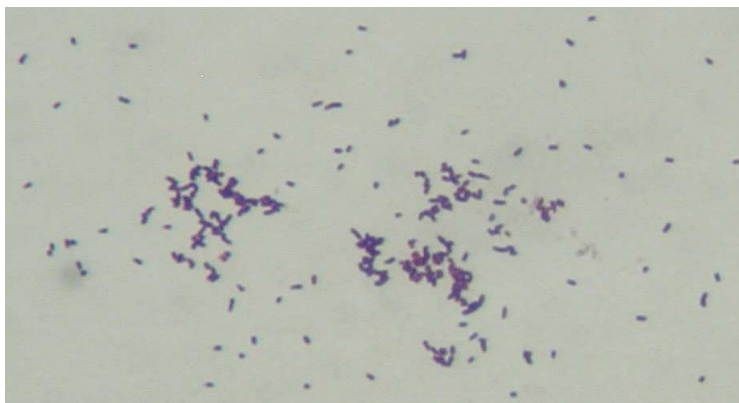
Kultura U8 byla izolována po 8 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře roste na U agaru i na TYA agaru a to za AE i MAF podmínek. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou kokovité tyčinky (viz. Obr. 13.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U8 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 13. Mikroskopický pohled na kulturu U8

10.9 Kultura U9

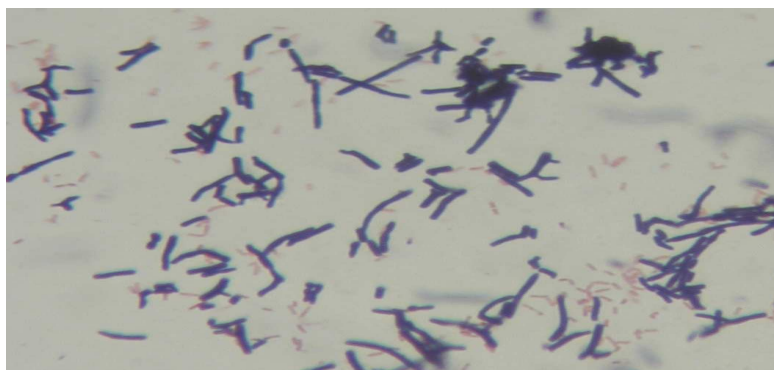
Kultura U9 byla izolována po 13 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře roste na TYA agaru za MAF podmínek. Uspokojivě roste i na U agaru AE podmínek. Tato kultura je zprvu průhledná (podobá se sněhové vločce) a později se na TYA agaru (MAF) změnila na mléčnou. Na U agaru zůstává stále průhledná. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o grampozitivní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou koky (viz. Obr. 14.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U9 není schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 14. Mikroskopický pohled na kulturu U9

10.10 Kultura U10

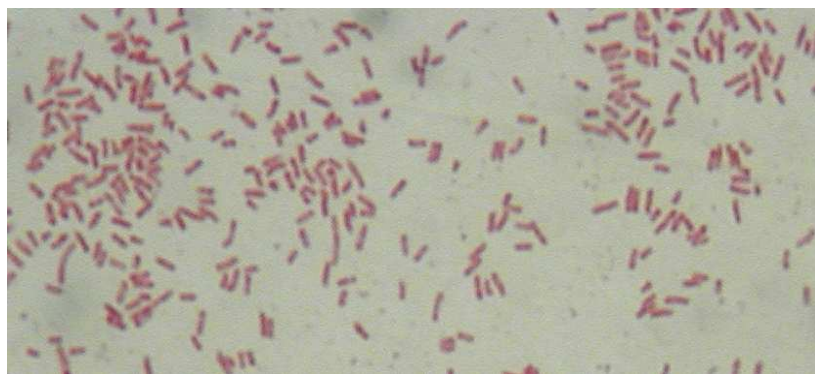
Kultura U10 byla izolována po 13 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s 3D agarrem, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-2}). Jedná se o kulturu, kterou jsme izolovali v domněnání, že izolujeme jen jednu kulturu. Po 3 dnech kultivace přeočkované, údajně čisté U10 bylo okem patrné, že se jedná o dvě rozdílné kultury. Což potvrdilo i Gramovo barvení, kde se objevily grampozitivní velké tyčky a gramnegativní jemné tyčky (viz. Obr. 15). Čistá kultura U10 byla izolována z TYA agarů po 7 dnech kultivace misky se smíšenou kulturou. Čistá U10 velmi dobře roste na TYA agaru za MAF podmínek. Uspokojivě roste i na U agaru. Tato čistá kultura je sytě oranžové barvy. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o grampozitivní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou poměrně dlouhé velké tyčinky (viz. Obr. 15.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná čistá kultura U10 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 15. Mikroskopický pohled na smíšenou kulturu U10

10.11 Kultura U11

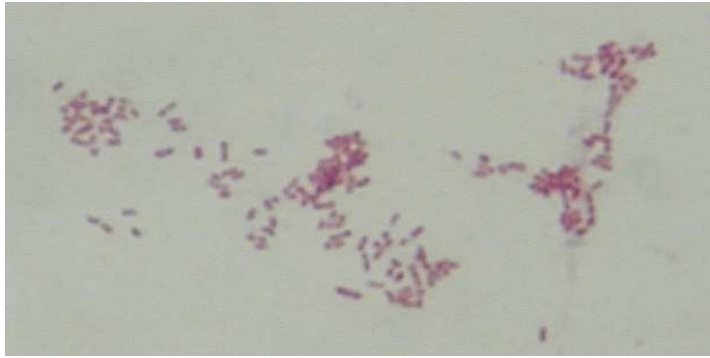
Kultura U11 byla izolována po 13 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s U agarrem, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která dobře roste na U agaru za AE podmínek. Uspokojivě roste i na agaru US1 i US2. Na TYA agaru neroste vůbec. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou pravidelné tyčinky (viz. Obr. 16.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U11 není schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 16. Mikroskopický pohled na kulturu U11

10.12 Kultura U12

Kultura U12 byla izolována po 13 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s U agarrem, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře roste na TYA agaru za MAF podmínek. Poměrně dobře roste i na U agaru. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou pravidelné tyčinky (viz. Obr. 17.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U12 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 17. Mikroskopický pohled na kulturu U12

10.13 Kultura U13

Čistá kultura U13 byla izolována po 3 dnech kultivace z TYA agaru z přeočkované údajně čisté kultury U10. Čistá U13 velmi dobře roste na TYA agaru za MAF podmínek. Poměrně dobře roste i na U agaru. Tato čistá kultura je bílé resp. mléčné barvy. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou kokovité tyčinky (viz. Obr. 18.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná čistá kultura U13 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 18. Mikroskopický pohled na čistou kulturu U13

10.14 Kultura U14

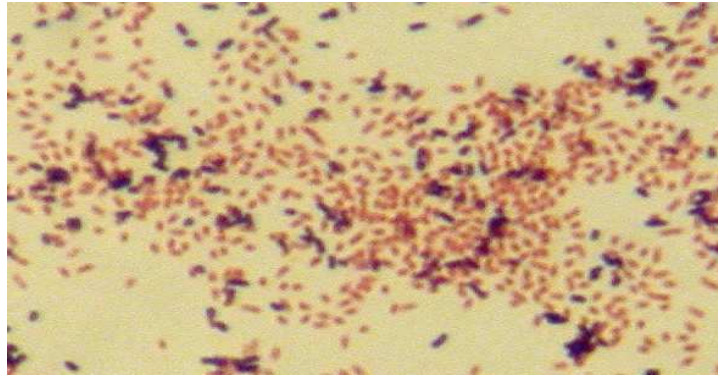
Kultura U14 byla izolována po 20 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře roste na TYA agaru za MAF podmínek. Poměrně dobře roste i na U agaru. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou větší pravidelné tyčinky (viz. Obr. 19.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U14 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 19. Mikroskopický pohled na kulturu U14

10.15 Kultura U15

Kultura U15 byla izolována po 20 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s U agarem, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, kterou jsme izolovali v domněnání, že izolujeme jen jednu kulturu. Po 27 dnech kultivace přeočkované údajně čisté U15 byly z misky s U agarem přeočkovány dvě kultury U15 a U18 (viz. Obr. 20.). Čistá U15 velmi dobře roste na agaru US1 za MAF podmínek. Dobře roste i na US2 agaru. Naopak vůbec neroste na TYA agaru. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou krátké kokovité tyčinky (viz. Obr. 21.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná čistá kultura U15 není schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 20. Mikroskopický pohled na smíšenou kulturu U15



Obr. 21. Mikroskopický pohled na čistou kulturu U15

10.16 Kultura U16

Kultura U16 byla izolována po 20 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s U agar, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře roste na TYA agaru za MAF podmínek. Poměrně dobře roste i na U agaru. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou kokovité tyčinky (viz. Obr. 22.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U16 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 22. Mikroskopický pohled na kulturu U16

10.17 Kultura U17

Kultura U17 byla izolována po 27 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s U agar-em, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře roste na US1 agaru za MAF podmínek. Poměrně dobře roste i na US2 a TYA agaru. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o smíšenou kulturu obsahující gramnegativní koky a grampozitivní tyčinky. Pouhým okem od sebe nešly tyto dvě kultury rozpoznat. Zkusila jsem tedy přeočkovat dvě různé kolonie na živné půdy. Opět bylo provedeno Gramovo barvení, které potvrdilo, že jsem isolovala jednu čistou kulturu (G-). Grampozitivní se ale nepodařilo izolovat. Čistá kultura U17 je tedy na základě Gramova barvení gramnegativní bakterie. Bakteriální buňky jsou koky (viz. Obr. 23.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že čistá izolovaná kultura U17 není schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní s mírným náznakem degradace. Kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu. Láhev byla ponechána další kultivaci.



Obr. 23. Mikroskopický pohled na kulturu U17

10.18 Kultura U18

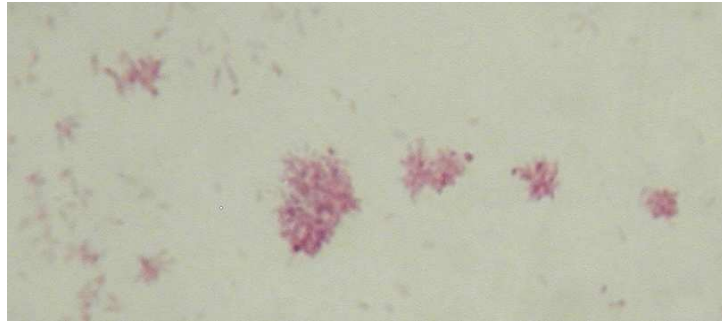
Čistá kultura U18 byla izolována po 27 dnech kultivace z TYA agaru z přeočkované údajně čisté kultury U15. Čistá U18 velmi dobře roste na agarech US1 i US2 AE podmínek. Dobře roste i na U agaru. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o grampozitivní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou kokovité tyčinky (viz. Obr. 24.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná čistá kultura U18 není schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 24. Mikroskopický pohled na čistou kulturu U18

10.19 Kultura U19

Kultura U19 byla izolována po 48 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s 3D agarem, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-4}). Jedná se o pomalu rostoucí kulturu, která dobře roste na agaru US1 za MAF podmínek. Dobře roste i na US2, U a TYA agaru, ale mnohem pomaleji. Po 15 dnech kultivace přeočkované kultury U19 na agar US1 bylo pouhým okem viditelné, že na misce jsou narosteny dvě odlišné kultury (U19 Δ a U19*). Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kultury, jejíž bakteriální buňky jsou tyčinky (viz. Obr. 25a., 25b). Kultura U19 Δ byla hůře rozmíchatelná a tyčinky tvořily shluky. Naopak u kultury U19* byly vidět jednotlivé tyčinky připomínající vlákna. V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U19 Δ je schopná denitrifikace a kultura U19* není. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



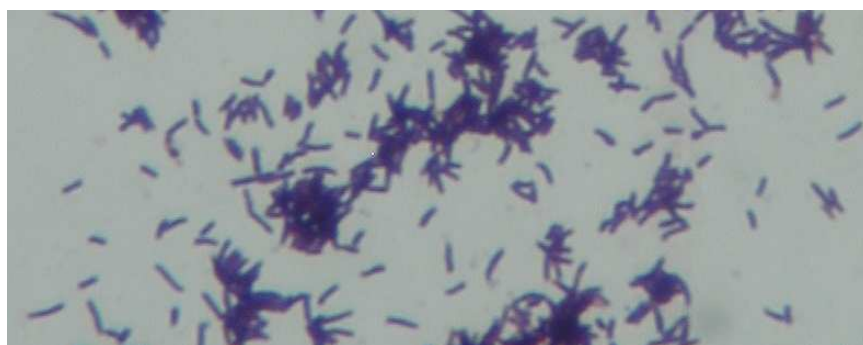
Obr. 25a. Mikroskopický pohled na kulturu U19Δ



*Obr. 25b. Mikroskopický pohled na kulturu U19**

10.20 Kultura U20

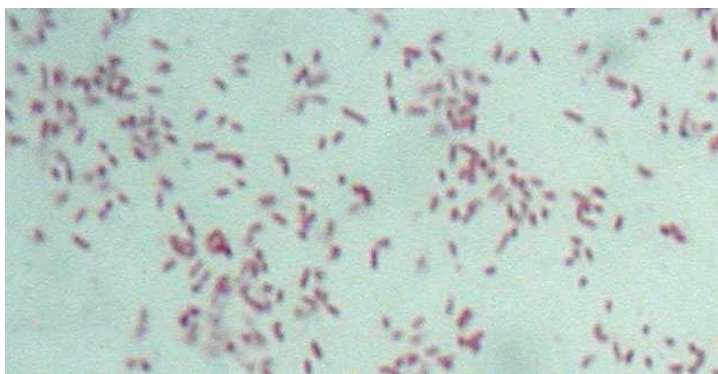
Kultura U20 byla izolována po 48 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s U agar, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-3}). Jedná se o kulturu, která dobře roste na agaru US2 za MAF podmínek. Poměrně dobře roste i na US1 a U agaru. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o grampozitivní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou delší tyčinky (viz. Obr. 26.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura U20 není schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 26. Mikroskopický pohled na kulturu U20

10.21 Kultura D1

Kultura D1 byla izolována po 27 dnech kultivace v exsikátoru z Petriho misky s 3D agarrem, na který byl zaočkován vzorek B (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře roste na U agaru za MAF podmínek. Srovnatelně dobře roste i na agaru US1 a US2, méně pak na TYA agaru. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o gramnegativní kulturu, jejíž bakteriální buňky jsou velmi drobné kokovité tyčinky (viz. Obr. 27.). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura D1 je schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní, kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu.



Obr. 27. Mikroskopický pohled na kulturu D1

10.22 Kultura D2

Kultura D2 byla izolována po 29 dnech kultivace v anaerostatu z Petriho misky s 3D agarrem, na který byl zaočkován vzorek Z (ředění 10^{-4}). Jedná se o kulturu, která velmi dobře roste na US2 agaru za MAF podmínek. Dobře roste i na US1 a U agaru. Na TYA agaru neroste téměř vůbec. Překvapivě celkem dobře roste i na 3D za AE podmínek. Na základě Gramova barvení bylo zjištěno, že se jedná o směšnou kulturu grampozitivních koků a gramnegativních tyčinek (viz. Obr. 28). Pouhým okem od sebe tyto dvě kultury šlo velmi těžko rozpoznat. Zkusila jsem tedy přeočkovat dvě různé kolonie na živné půdy. Opět bylo provedeno Gramovo barvení, které potvrdilo, že jsem isolovala čistou kulturu (G+). Gramnegativní se ale nepodařilo izolovat. Čistá kultura D2 je tedy na základě Gramova barvení grampozitivní bakterie. Bakteriální buňky nabarveného preparátu s agaru US2 mají charakter delších tyčinek (viz. Obr. 29a) a buňky z preparátu s 3D agaru byly koky (viz. Obr. 29b). V rámci obecného denitrifikačního testu bylo potvrzeno, že izolovaná kultura D2

není schopná denitrifikace. Test na denitrifikaci s využitím PVA byl negativní s mírným náznakem degradace. Kultura tedy nebyla schopná celého degradačního procesu. Láhev byla ponechána další kultivaci.



Obr. 28. Mikroskopický pohled na směsnou kulturu D2



Obr. 29a. Mikroskopický pohled na čistou kulturu D2



Obr. 29b. Mikroskopický pohled na čistou kulturu D2

10.23 TGGE

Na základě získaných výsledků práce H. Marušincové [2], podle postupu v Kap. 8.10 a ve spolupráci s L. Husárovou [25] bylo na základě Gelové elektroforézy při teplotním gradientu zjištěno, že kultury U1, U8, U13, U14, U16 a U17 jsou možnými kandidáty na hledaný bakteriální kmen se schopností rozkladu PVA za denitrifikačních podmínek. Poloha proužku vybraného úseku DNA těchto několika kultur po separaci pomocí TGGE byla identická poloze proužku předpokládaného bakteriálního degradačního kmene, nalezeného v testech degradace PVA denitrifikačním kalem z čistírny odpadních vod.

Fotografie gelů ze separací DNA jednotlivých kultur pomocí TGGE [25] jsou uvedeny v Příloze 1, 2, 3 a současně jsou i na daných gelech zařazeny i vzorky separací úseků DNA, izolovaných ze vzorků B a Z (které dokumentují namnožení předpokládaného degradačního kmene v průběhu pomnožovacích cyklů) a také vzorky 15 a 23 ze základních testů degradace PVA denitrifikačním kalem. Všechny separace TGGE byly provedeny a obrázky gelů TGGE získány probíhající doktorskou prací ing. L. Husárové [25].

ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zabývala především izolací bakteriálních kultur schopných rozkládat polyvinylalkohol za denitrifikačních podmínek a jejich následným popisem. Výchozím vzorkem pro tuto izolaci byl denitrifikační kal z čistírny odpadních vod Zlín-Malenovice, který byl již adaptovaný na polyvinylalkohol.

V úvodu jsem se zaměřila na pomnožení degradačních bakterií, pro zvýšení pravděpodobnosti úspěšné izolace. Pomocí těchto testů došlo k namnožení bakterií, které jsou schopné rozkládat polyvinylalkohol za denitrifikačních podmínek. Celkem bylo provedeno 6 pomnožovacích cyklů, přičemž se postupně zvyšovala koncentrace polyvinylalkoholu z výchozí koncentrace 100 mg.l^{-1} až na konečnou koncentraci 200 mg.l^{-1} . Po skončení posledního cyklu byla kalová suspenze v desetinné řadě vyočkována na předem připravená pevná živná média. Jednalo se o universální typ agaru s etanolem a jantaranem sodným, agar s přídavkem polyvinylalkoholu a agar pro slepé stanovení. Naočkované Petriho misky byly kultivovány v anaerostatu za anaerobních podmínek a v exsikátoru za mikroaerofilních podmínek.

Další část mé práce byla věnována samotné izolaci jednotlivých kultur schopných rozkladu polyvinylalkoholu za denitrifikačních podmínek. Je nutné zdůraznit, že izolace PVA degrádujících bakteriálních kultur není snadná. Podařilo se izolovat celkem 23 čistých bakteriálních kultur z kalu adaptovaného na PVA, konkrétně ze vzorku B a vzorku Z.

Podstatnou část této práce tvoří popis základních vlastností všech izolovaných kultur. U jednotlivých izolovaných kultur bylo provedeno Gramovo barvení, které prokázalo větší podíl gramnegativní kultur. Dále byly u kultur stanoveny růstové podmínky. V rámci stanovení byly kultury přeočkovávány na různé typy pevných živných půd a následně kultivovány za přístupu resp. nepřístupu kyslíku. Na základě získaných poznatků bylo zvoleno vhodné živné médium pro jejich optimální růst a prostředí kultivace (aerobní, mikroaerofilní). Kultury byly posléze podrobeny denitrifikačním testům, které ukázaly, že většina izolovaných kultur je schopna denitrifikace, výjimkou šesti kultur. V testu denitrifikace s využitím PVA byl zaznamenán mírný náznak degradace PVA u dvou čistých a jedné směsné kultury. Všechny kultury byly zakonzervovány pro případ jejich dalšího studování.

Nejdůležitějším výsledkem celé diplomové práce je, že se podařilo izolovat kultury, které jsou geneticky velmi blízké či totožné předpokládané degradační kultuře, podílející se na

rozkladu PVA. Identifikace těchto kmenů není prozatím dokončena, ale v rámci pokračující doktorské práce ing.L.Husárové lze předpokládat, že se podaří identifikaci uskutečnit.

V návaznosti na získané výsledky by bylo do budoucna vhodné detailnější prostudování vlastností izolovaných bakteriálních kmenů ve smyslu jejich schopnosti degradace PVA v kooperaci s jinými bakteriálními kulturami, např. těmi, které jsou schopny úvodních kroků rozkladu polyvinylalkoholu, konkrétně dehydrogenace PVA.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VÁCLAVKOVÁ, T.: Studium mikroorganismů významných při rozkladu polyvinyl alkoholu. Disertační práce, UTB Zlín, 2009
- [2] MARUŠINCOVÁ H., RŮŽIČKA J., HOUSER J.: Biodegradation of polyvinylalcohol under denitrifying condition. 25. Kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí. Stará Lesná, SR, 15 -18. 9. 2010. ISBN 970-80-970-477-8-8
- [3] KUPEC, J.: Zpracování odpadních vod a kalů. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická ES, Zlín 2002.
- [4] MARA D, HORAN N.: Handbook of Water and Wastewater Microbiology. School of Civil Engineering, University of Leeds, UK, Academic press, 2003.
- [5] KHAN, ST, and A HIRAISHI.: Diaphorobacter Nitroreducens Gen. Nov., Sp Nov., a Poly(3-hydroxybutyrate)-degrading Denitrifying Bacterium Isolated from Activated Sludge. *Journal of General and Applied Microbiology* 48, 2002, 299-308.
- [6] KHAN, ST, and A HIRAISHI.: Isolation and Characterization of a New Poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, Denitrifying Bacterium from Activated Sludge. *Fems Microbiology Letters* 205, 2001, 253-257.
- [7] MERGAERT, J., et al.: Identity and potential functions of heterotrophic bacterial isolates from a continuous-upflow fixed-bed reactor for denitrification of drinking water with bacterial polyester as source of carbon and electron donor. *Systematic and applied microbiology* [online]. 2001, 24, [cit. 2010-12-02]. Dostupný z WWW: <urbanfisher.de/journals/sam>.
- [8] SHINODA, Y et al.: Aerobic and Anaerobic Toluene Degradation by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium, Thauera Sp Strain DNT-1. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2004, 1385-1392.

- [9] VAN SCHIE, PM, and LY YOUNG.: Isolation and Characterization of Phenol-degrading Denitrifying Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1998, 2432-2438.
- [10] SHINODA, Y, Y SAKAI, A HIRAISHI, and N KATO.: Isolation and Characterization of a New Denitrifying Spirillum Capable of Anaerobic Degradation of Phenol. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2000, 1286-1291.
- [11] LU, JIAN et al.: Biodegradation of Nonylphenol Polyethoxylates by Denitrifying Activated Sludge. *Water Research* 42, 2008, 1075-1082.
- [12] WANG, CHUN-CHIN, and CHI-MEI LEE.: Isolation of the ϵ -caprolactam Denitrifying Bacteria from a Wastewater Treatment System Manufactured with Acrylonitrile-butadiene-styrene Resin. *Journal of Hazardous Materials* 145, 2007, 136-141.
- [13] EHRENREICH, P, A BEHRENDTS, J HARDER, and F WIDDEL.: Anaerobic Oxidation of Alkanes by Newly Isolated Denitrifying Bacteria. *Archives of Microbiology* 173, 2000, 58-64.
- [14] FRANCO, AR et al.: Isolation and Characterization of Polymeric Galloyl-ester-degrading Bacteria from a Tannery Discharge Place. *Microbial Ecology* 50, 2005, 550-556.
- [15] HEYLEN, K et al.: Cultivation of Denitrifying Bacteria: Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2006, 2637-2643.
- [16] DUCHÁČEK, V.: Polymery – výroba, vlastnosti, zpracování, použití. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006, ISBN 80-7080-617-6
- [17] MARUŠINCOVÁ, H.: Studie možností biologického odstraňování polyvinylpyrrolidonu. Diplomová práce, UTB Zlín, 2009

- [18] SLEJŠKA, A.: Testování biodegradability. *Biom* [online]. 1997, [cit. 2011-01-14].
Dostupný z WWW: <http://stary.biom.cz/clen/as/biodegr_test.html>.
- [19] ZÁMORSKÝ, Z.: Nauka o polymerech II. 1980. 235 p.
- [20] KOVÁČIČ, L.: Plasty. Alfa Bratislava, 1974.
- [21] RIEDL, J.: Biodegradace polyvinylalkoholu. Diplomová práce, UTB Zlín, 2004
- [22] ZEMAN, P.: Vliv přídavných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu. Diplomová práce, UTB Zlín, 2007
- [23] NEDBÁLEK, M.: Vliv podmínek prostředí na biodegradaci polyvinylalkoholu. Diplomová práce, UTB Zlín, 2008
- [24] OŠŤÁDALOVÁ, K.: Význam minerálních solí při biodegradaci polyvinylalkoholu. Diplomová práce, UTB Zlín, 2010
- [25] HUSÁROVÁ L.: doktorská práce (probíhající) – nepublikované výsledky

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABS	Akrylonitri-butadien-styren
AE	Aerobní
ANAE	Anaerobní
AK	Aktivovaný kal
ČOV	Čistírna odpadní vody
DP	Diplomová práce
HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
MAF	Mikroaerofilní
MM	Minerální médium
NPEOs	Nonylfenol polyethoxylát
NP	Nonylfenol
PBH	Poly-3-hydroxybutyrát
PBHV	Ko-poly-3-hydroxybutyrát-valerát
PCL	Poly- ϵ -kaprolakton
PCR	Polymerázové řetězová reakce
PLA	Kyselina polyléčná
PQQ	Pyrolochinolinchinon
PVA	Polyvinylalkohol
PVAc	Polyvinylacetát
TGGE	Gelová elektroforéza v teplotním gradientu
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Koloběh dusíku</i>	12
<i>Obr. 2. Chemická struktura PVA</i>	24
<i>Obr. 3. Vznik acetaldehydu z vinylalkoholu</i>	25
<i>Obr. 4. Jednotlivé pomnožovací cykly</i>	38
<i>Obr. 5. Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVA</i>	39
<i>Obr. 6. Mikroskopický pohled na kulturu U1</i>	59
<i>Obr. 7. Mikroskopický pohled na kulturu U2</i>	60
<i>Obr. 8. Mikroskopický pohled na kulturu U3</i>	60
<i>Obr. 9. Mikroskopický pohled na kulturu U4</i>	61
<i>Obr. 10. Mikroskopický pohled na kulturu U5</i>	62
<i>Obr. 11a. Mikroskopický pohled na kulturu U6</i>	62
<i>Obr. 11b. Mikroskopický pohled na kulturu U6</i>	63
<i>Obr. 12. Mikroskopický pohled na kulturu U7</i>	63
<i>Obr. 13. Mikroskopický pohled na kulturu U8</i>	64
<i>Obr. 14. Mikroskopický pohled na kulturu U9</i>	65
<i>Obr. 15. Mikroskopický pohled na smíšenou kulturu U10</i>	65
<i>Obr. 16. Mikroskopický pohled na kulturu U11</i>	66
<i>Obr. 17. Mikroskopický pohled na kulturu U12</i>	67
<i>Obr. 18. Mikroskopický pohled na čistou kulturu U13</i>	67
<i>Obr. 19. Mikroskopický pohled na kulturu U14</i>	68
<i>Obr. 20. Mikroskopický pohled na smíšenou kulturu U15</i>	69
<i>Obr. 21. Mikroskopický pohled na čistou kulturu U15</i>	69
<i>Obr. 22. Mikroskopický pohled na kulturu U16</i>	70
<i>Obr. 23. Mikroskopický pohled na kulturu U17</i>	70

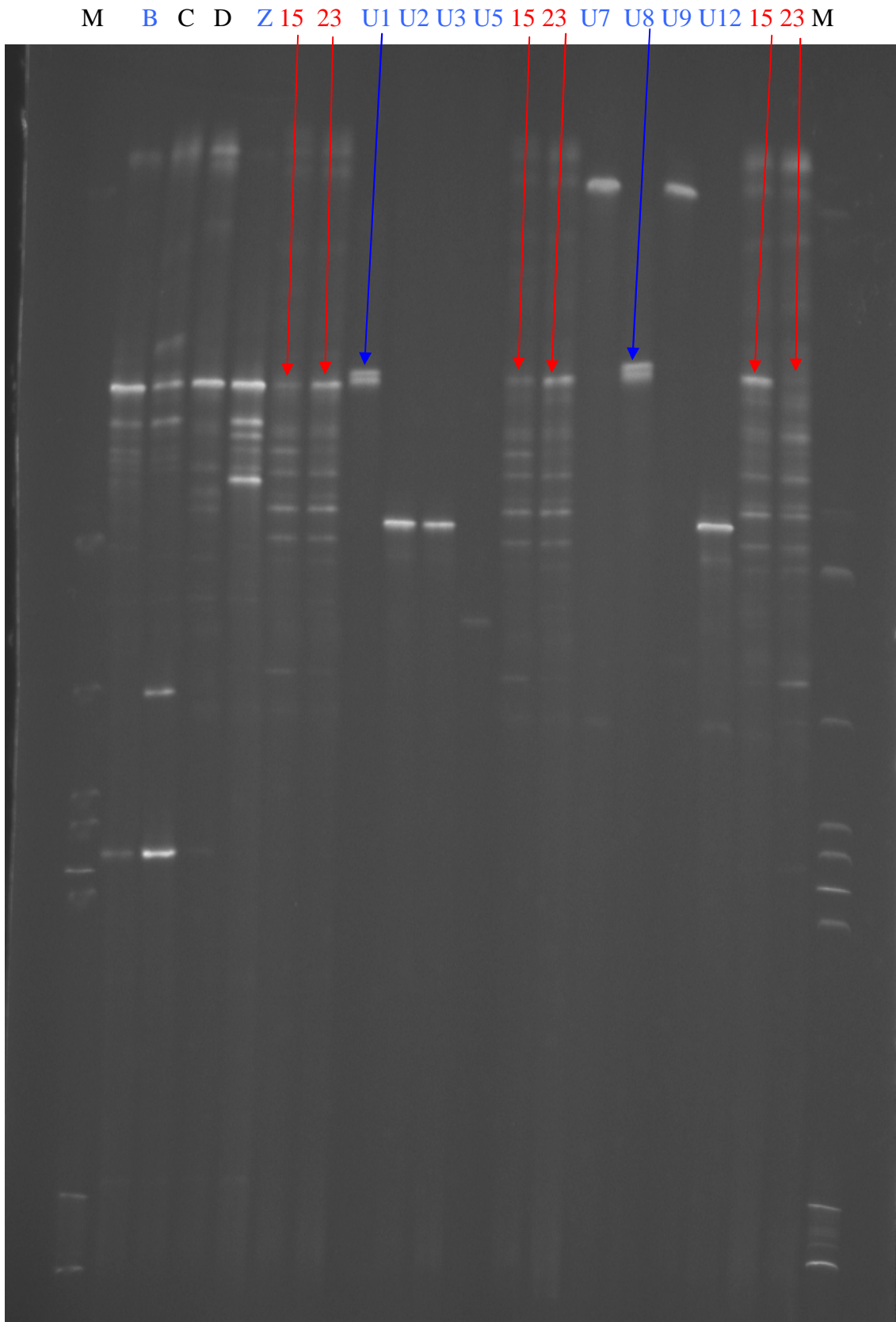
<i>Obr. 24. Mikroskopický pohled na čistou kulturu U18</i>	71
<i>Obr. 25a. Mikroskopický pohled na kulturu U19A</i>	72
<i>Obr. 25b. Mikroskopický pohled na kulturu U19*</i>	72
<i>Obr. 26. Mikroskopický pohled na kulturu U20</i>	72
<i>Obr. 27. Mikroskopický pohled na kulturu D1</i>	73
<i>Obr. 28. Mikroskopický pohled na směsnou kulturu D2</i>	74
<i>Obr. 29a. Mikroskopický pohled na čistou kulturu D2</i>	74
<i>Obr. 29b. Mikroskopický pohled na čistou kulturu D2</i>	74

SEZNAM TABULEK

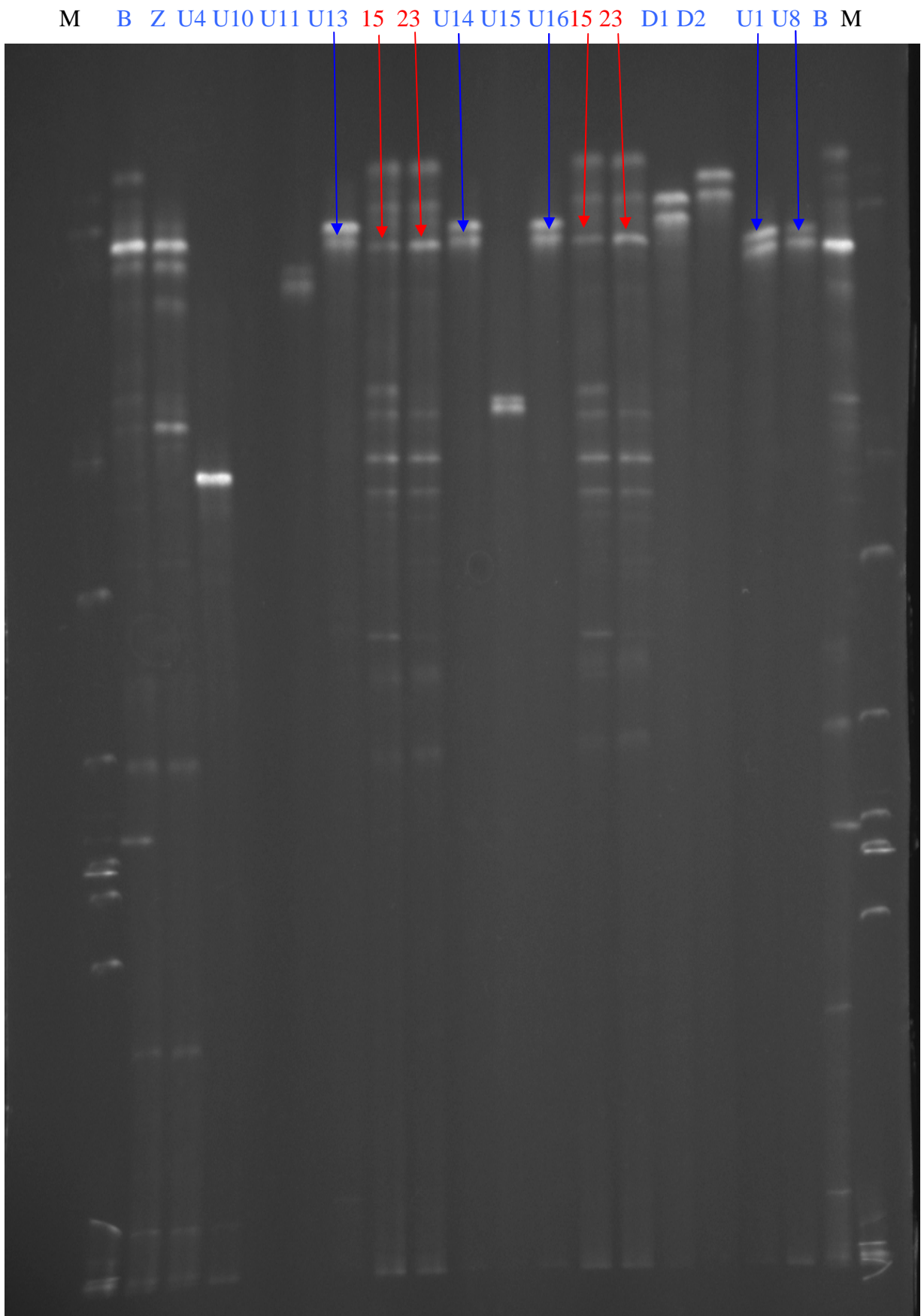
<i>Tab. 1. Dávkování zásobních roztoků PVA a KNO₃ pro ředění 10⁻¹</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 2. Dávkování zásobních roztoků PVA a KNO₃ pro ředění A a B</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 3. Hodnoty absorbancí kalibračních roztoků PVA</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 4. Stanovení koncentrací PVA pro I.cyklus</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 5. Stanovení koncentrací PVA pro II.cyklus</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 6a. Stanovení koncentrací PVA pro III.cyklus</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 6b. Stanovení koncentrací PVA pro III.cyklus</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 7. Stanovení koncentrací PVA pro IV.cyklus</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 8. Stanovení koncentrací PVA pro V.cyklus</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 9. Stanovení koncentrací PVA pro VI.cyklus</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 10. Systém vyočkování vzorku B</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 11. Systém vyočkování vzorku Z</i>	<i>52</i>
<i>Tab. 12. Izolované kultury ze vzorku B</i>	<i>52</i>
<i>Tab. 13. Izolované kultury ze vzorku Z</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 14. Gramovo barvení kultur izolovaných ze vzorku B</i>	<i>54</i>
<i>Tab. 15. Gramovo barvení kultur izolovaných ze vzorku Z</i>	<i>54</i>
<i>Tab. 16. Universální denitrifikační test kultur ze vzorku B</i>	<i>55</i>
<i>Tab. 17. Universální denitrifikační test kultur ze vzorku Z</i>	<i>55</i>
<i>Tab. 18. Test s využitím PVA pro kultury ze vzorku B</i>	<i>56</i>
<i>Tab. 19. Test s využitím PVA pro kultury ze vzorku Z</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 20. Růstové podmínky pro kultury ze vzorku B</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 21. Růstové podmínky pro kultury ze vzorku Z</i>	<i>58</i>

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1. Výsledky TGGE ze dne 5.4.2011 [25]



PŘÍLOH 2. Výsledky TGGE ze dne 15.4.2011 [25]



PŘÍLHA 3. Výsledky TGGE ze dne 4.5.2011 [25]

