

# Izolace mikroorganismů produkujících depolymerizační enzymy

Martina Martinková

---

Bakalářská práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2012/2013

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martina Martinková**  
Osobní číslo: **T10169**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Izolace mikroorganismů produkujících depolymerizační enzymy.**

Zásady pro vypracování:

- 1. Provedte literární rešerši na dané téma.**
- 2. Pokuste se izolovat relevantní mikroorganismy ze vzorků kompostů.**
- 3. Izolované mikroorganismy se pokuste identifikovat a konzervovat pro další práci.**
- 4. Výsledky přehledně zpracujte do formy BP.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Články v odborných periodících dostupných v databázích Web Of Science, Scopus, případně dalších.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

**18. února 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**24. května 2013**

Ve Zlíně dne 18. února 2013

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



  
doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Martinková Martina

Obor: TVTKD

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 21.5.2013

  
.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ABSTRAKT

Byla provedena izolace a identifikace mikroorganismů produkujících depolymerizační enzymy vybraných polymerů. Zdrojem zmíněných mikroorganismů byly vzorky kompostů, které byly naočkovány na kultivační půdy obsahující polyestery polybutylen adipát/tereftalát (PBAT) nebo kyselinu polymléčnou (PLA) v podobě submikročástic. Celkem bylo zkoumáno 5 vzorků kompostu, které byly dále charakterizovány dostupnými fyzikálně – chemickými vlastnostmi jako je pH, sušina a spalitelný podíl. Ze vzorků kompostů byla prováděna izolace bakterií schopných tvořit zóny hydrolyzovaného polymeru kolem svých kolonií, což bylo považováno za důkaz produkce extracelulárních depolymerizačních enzymů. V případě kultivační půdy s obsahem PLA nebyly zóny pozorovány, tudíž nebyla izolována žádná bakteriální kultura hydrolyzující PLA. Naopak v případě kultivační půdy s obsahem PBAT byly izolovány čtyři bakteriální kmeny, později identifikovány jako blízce příbuzné kmenům *Actinomadura rubrobrunea* DSM 43750, *Thermobispora bispora* DSM 43833 a *Thermomonospora curvata* DSM 43183. Pro identifikaci izolovaných bakterií byla použita metoda sekvenace genu 16S rRNA, byla izolována DNA mikroorganismu a po purifikaci vzorku byl tento odeslán k sekvenaci. Získaná sekvence nukleotidů DNA byla porovnána v databázi GenBank.

Klíčová slova: biodegradace, polybutylen adipát/tereftalát, kyselina polymléčná, biodegradace za termofilních podmínek, aktinomyceta

## ABSTRACT

Isolation and identification of microorganisms producing depolymerizing enzymes of selected polymers was performed. The source of these microorganisms were samples of compost that were inoculated into culture medium containing polyesters, polybutylene-adipate-co-butylene terephthalate (PBAT) or polylactic acid (PLA) in the form of sub-microparticles. A total of five samples of compost were examined and further characterized by available physico-chemical properties such as pH, solids and combustible portion. Samples of compost were performed isolation of bacteria capable of forming zone hydrolysed polymer around their colonies, which were considered as evidence of the production of extracellular depolymerizing enzymes. In the case of culture medium containing PLA, the zones were not observed, therefore, no PLA hydrolysing bacterial culture has been isolated. On the contrary, in the case of culture medium containing PBAT, four bacterial strains were isolated, which were later identified as closely related strains of *Thermomonospora curvata* DSM 43183, *Actinomadura rubrobrunea* DSM 43750 and *Thermobispora bispora* DSM 43833. The method of sequencing the 16S rRNA gene was used for identification of the isolated bacteria, DNA of the microorganism was isolated and after the purification of the sample, it has been sent to sequencing. The resulting DNA nucleotide sequence was compared to the GenBank database.

Keywords: biodegradation, polybutylene adipate-co-butylene terephthalate, polylactid acid, biodegradation in thermophilic condition, actinomycet

Na tomto místě děkuji vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a připomínky, které mi s ochotou v průběhu zpracovávání bakalářské práce poskytoval. Rovněž děkuji laborantkám mikrobiologické laboratoře Bc. Veronice Kučabové a Lence Machálkové a laborantce laboratoře ÚIOŽP paní Věře Zbrankové za jejich vstřícnou pomoc během mé práce v laboratořích. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během mého studia.

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



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY</b> .....	<b>13</b>
1.1 PLA .....	13
1.1.1 Charakterizace .....	13
1.1.2 Aplikace .....	14
1.2 PBAT.....	15
1.2.1 Charakterizace .....	15
1.2.2 Aplikace .....	15
<b>2 BIODEGRADACE ZA TERMOFILNÍCH PODMÍNEK</b> .....	<b>16</b>
2.1 KOMPOSTOVATELNOST .....	16
2.2 OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY PRO ČINNOST MIKROORGANISMŮ V KOMPOSTU .....	16
2.3 PRŮBĚH PROCESU KOMPOSTOVÁNÍ.....	17
<b>3 PŘEHLED MIKROORGANISMŮ SCHOPNÝCH BIODEGRADACE DANÝCH POLYESTERŮ</b> .....	<b>19</b>
3.1 PLA .....	19
3.2 PBAT.....	20
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>22</b>
<b>4 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>23</b>
<b>5 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>24</b>
5.1 VZORKY .....	24
5.2 PŘÍPRAVA MATERIÁLU .....	24
5.2.1 Suspenze PLA a PBAT .....	24
5.2.2 Minerální médium .....	25
5.2.3 Kultivační půda .....	26
5.2.4 Suspendační roztok .....	27
5.2.5 Agarózový gel na elektroforézu .....	27
5.3 IZOLACE DEGRADAČNÍCH MIKROORGANISMŮ .....	28
5.3.1 Očkování kultivační půdy s polyesterem .....	28
5.3.2 Izolace čisté bakteriální kultury .....	28
5.3.3 Roztěr pro nárůst biomasy mikroorganismů a její uchování .....	29
5.3.4 Gramovo barvení.....	29
5.3.5 Test pro pomnožení degradačních mikroorganismů .....	29
5.4 IDENTIFIKACE DEGRADAČNÍCH MIKROORGANISMŮ .....	30
5.4.1 Izolace DNA ze získaných mikroorganismů.....	30
5.4.2 Metoda PCR a kontrola produktů gelovou elektroforézou .....	32
5.4.3 Purifikace amplifikované DNA.....	33
5.4.4 Sekvence produktů amplifikované DNA .....	34
5.4.5 Vyhodnocení získané sekvence nukleotidů .....	34
5.5 CHARAKTERISTIKA KOMPOSTU .....	34
5.5.1 Stanovení sušiny.....	34
5.5.2 Stanovení spalitelného podílu .....	35
5.5.3 Stanovení pH .....	35

<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>36</b>
6.1	CHARAKTERISTIKA VZORKŮ KOMPOSTŮ .....	36
6.2	IZOLACE MIKROORGANISMŮ NA AGAROVÉ PŮDĚ S POLYESTEREM.....	37
6.2.1	Kultivační půda obsahující PLA .....	37
6.2.2	Kultivační půda obsahující PBAT .....	37
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>44</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>45</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>49</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>50</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>51</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>52</b>

## ÚVOD

Mikroorganismy účastníci se biodegradčních procesů jsou v posledních letech předmětem výzkumu hlavně pro schopnost některých z nich rozkládat polymerní látky, které se staly nepostradatelnou součástí života lidí. Polymery, které jsou prostřednictvím těchto mikroorganismů rozkládány, se označují jako biodegradabilní neboli biologicky rozložitelné. Mechanismus biodegradace polymerů je zkoumán.

Biodegradabilní polymery nacházejí čím dál častější uplatnění v různých odvětvích např. při výrobě obalových materiálů. Zdokonalováním nejen jejich mechanických vlastností by mohly zcela nahradit špatně rozložitelné konvenční polymery (např. polyetylen).

Polymery jsou zajímavými substráty, protože kvůli jejich hydrofobní povaze je obtížný přístup k esterovým vazbám v jejich struktuře. Z tohoto hlediska by mohly být zajímavé enzymy rozkládající polymery, např. polyestery. Tyto enzymy by mohly najít dále uplatnění např. při výrobě detergentních prostředků.

V bakalářské práci je studována izolace mikroorganismů produkujících extracelulární depolymerizační enzymy, a to kultivací mikroorganismů, jejichž zdrojem jsou vzorky kompostů, na živných půdách obsahujících suspenze submikročásteček polyesterů PBAT nebo PLA metodou tzv. projasněných zón. Tato metoda je běžně využívána při vědeckých výzkumech biodegradace polymerních materiálů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

Makromolekulární látky, skládající se z velkého počtu jednotek – monomerů, jsou označovány jako polymery. Vyskytuje-li se v makromolekule dva a více různých monomerů, jedná se o kopolymer.

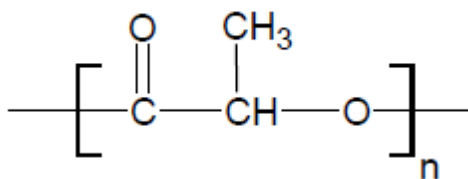
Degradace je děj, při kterém vlivem fyzikálním, chemickým či biologickým dochází ke změnám ve struktuře polymeru. Mezi hlavní změny patří snížení molekulové hmotnosti. Při biodegradaci je za primární mechanismus degradace považováno působení a metabolismus mikroorganismů, především bakterií a hub [1, s. 233]. Jedná se o enzymatické reakce závislé na okolním prostředí, molekulové hmotnosti, krystalinitě a chemické struktuře daného polymeru. Mezi biodegradabilní patří zejména polymery obsahující esterové či amidové skupiny v řetězci [2, s. 256].

V bakalářské práci byly použity biodegradabilní polyestery. Tyto se mohou vyskytovat přirozeně, mohou být syntetizovány z ropy nebo jsou získávány z obnovitelných zdrojů. Studie zabývající se biologickou rozložitelností a mechanismy biodegradace hrají významnou roli ve vývoji biodegradabilních polyesterů a jsou také velmi důležité pro minimalizování škodlivých vlivů při odstraňování polyesterů z životního prostředí [3, s. 259].

### 1.1 PLA

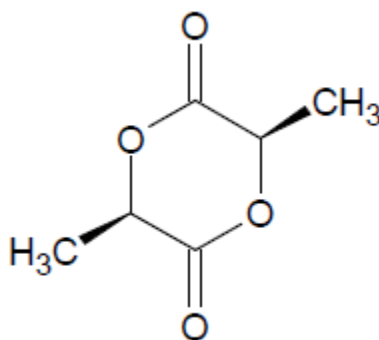
#### 1.1.1 Charakterizace

Kyselina polymléčná (PLA) patří do skupiny lineárních alifatických polyesterů odvozených od  $\alpha$ -hydroxy kyselin. Monomer PLA, kyselina mléčná, se může vyskytovat v opticky aktivním D- nebo L-enantiomeru. V závislosti na jejich poměrném zastoupení v makromolekule je možno vyrobit polymery PLA s různými materiálovými vlastnostmi [4, s. 821]. Přirozeně se vyskytují oba enantiomery, přičemž větší zastoupení má L- forma kyseliny mléčné nebo racemická směs obou forem [5, s. 113]. Kyselina mléčná (kyselina 2-hydroxypropanová) se vyrábí fermentací (kvašením) nebo chemickou syntézou. Využívanější cestou je výroba procesem mléčného kvašení, a to např. kvůli nižším výrobním nákladům. U chemické syntézy je také problémem výroba pouze žádaného L-enantiomeru kyseliny mléčné, aj. [6, s. 553]. Strukturální vzorec monomerní jednotky PLA je znázorněn na *Obr. 1*.



Obr. 1 Chemická struktura monomeru PLA

PLA je biologicky odbouratelný, biokompatibilní a kompostovatelný termoplast získávaný z obnovitelných rostlinných zdrojů jako je škrob a cukr [7, s. 865], [4, s. 821]. Obecně se jedná o lesklý, tuhý materiál s vlastnostmi podobnými polystyrenu (PS). Díky dobrým mechanickým vlastnostem, jako je pevnost v tahu v rozmezí 50 – 70 MPa nebo modul pružnosti 3 000 – 4 000 MPa, může kyselina polymlečná v řadě aplikací nahrazovat konvenční polymery (aplikace PLA viz kapitola 1.1.2) [8, s. 141]. PLA je možno připravit přímou polykondenzací kyseliny mléčné nebo prostřednictvím tzv. Ring opening polymeration (ROP), což je výroba založená na otevírání laktidového cyklu s následnou polymerací. V průmyslu je využívána spíše cesta výroby přes formaci laktidu (cyklický dimer znázorněný na Obr. 2) a to hlavně kvůli poskytnutí polymeru PLA o vysoké molekulové hmotnosti. Tato cesta výroby je však finančně náročnější než přímá polykondenzace [6, s. 553], [9, s. 15], [10, s. 3].



Obr. 2 Chemická struktura laktidu

### 1.1.2 Aplikace

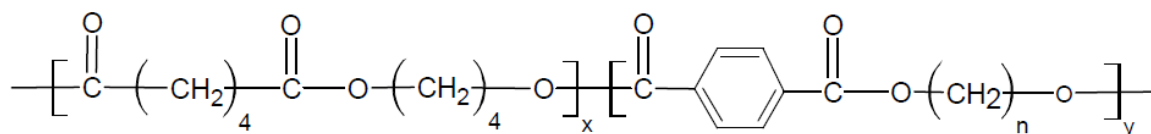
Kyselina polymlečná má uplatnění v mnoha různých odvětvích. Mezi hlavní oblasti využití patří výroba sáčků, obalů na potraviny a nápoje v potravinářském průmyslu, výroba folií a květináčů v zemědělství či výroba vláken textilií [6, s. 561], [9, s. 16].

Pro svou biokompatibilitu nachází PLA uplatnění také v biomedicíně při výrobě různých šroubů a čepů pro připevnění vazů nebo nápravě kostí, při výrobě chirurgického šicího materiálu či implantátů [6, s. 562]. Využívá se dále v automobilovém průmyslu (kryty náhradních pneumatik, podlahové rohože) a při výrobě elektroniky [11, s. 463, 466].

## 1.2 PBAT

### 1.2.1 Charakterizace

Jedním z polyesterů biologicky rozložitelných za termofilních podmínek, využívaný ke komerčnímu použití hlavně díky snadnému zpracování a podobným mechanickým vlastnostem nízkohustotnímu polyetylen (LD-PE) je polybutylen adipát/tereftalát (PBAT). Jedná se o lineární aromaticko-alifatický kopolyester skládající se ze dvou typů dimerů. Jednotka BT obsahuje aromatické jádro v podobě kyseliny tereftalové, na kterou je navázán 1,4-butandiol. Druhá jednotka BA je složená z monomerů 1,4-butandiolu a kyseliny adipové [12, s. 2641]. Chemická struktura PBAT je znázorněna na *Obr. 3*. Tento syntetický polyester je možné získat z fosilních zdrojů [12, s. 2641], [13, s. 361]. Mezi zmíněné mechanické vlastnosti patří vynikající houževnatost, měkkost a flexibilita. Relativně vysoké výrobní náklady a určitá omezení týkající se mechanických vlastností (např. nízká pevnost v tahu) jsou však důvodem ke snižování komerční výroby tohoto biologicky rozložitelného polymeru. Materiálu s dobrými vlastnostmi za využití nižších nákladů lze dosáhnout mísením PBAT s různými, snadně dostupnými, kompozity přírodního původu jako je např. sojová moučka [14, s. 1, 2], [15, s. 2387].



*Obr. 3 Chemická struktura PBAT*

### 1.2.2 Aplikace

Mezi hlavní uplatnění PBAT patří výroba folií a pytlů používaných v zemědělství a domácnostech. Je také vhodným materiálem pro balení potravin. Směs PBAT a PLA je materiálem, ze kterého jsou vyráběny nádoby používané v rychlém občerstvení (kelímky, tácky, talíře) [14, s. 2], [9, s. 16].

## 2 BIODEGRADACE ZA TERMOFILNÍCH PODMÍNEK

Biodegradace za termofilních podmínek je přírodní proces, při kterém je organický materiál rozkládán na látku podobnou půdě, na humus neboli kompost. Jedná se o nejrozšířenější způsob aerobního zpracování organických odpadů. Tento biotechnologický proces je založen na schopnosti mikroorganismů (zahrnující bakterie, houby a aktinomycety) a bezobratlých živočichů přeměňovat organické látky zejména cestou rozmělnění, mineralizace a humifikace [16, s. 28], [2, s. 256].

### 2.1 Kompostovatelnost

Jak již bylo uvedeno v první kapitole za biodegradabilní, je považován plast, který degraduje na základě činnosti přirozeně se vyskytujících mikroorganismů, jako jsou bakterie a houby. Kompostovatelný plast je plast, u kterého dochází k degradaci biologickými procesy při kompostování za vzniku srovnatelných látek jako v případě jiných kompostovaných materiálů, a to oxidu uhličitého, vody, anorganických sloučenin, biomasy a nezanechává vizuálně rozlišitelné nebo toxické zbytky. Pojmy biodegradace a kompostovatelnost nelze zaměňovat, jedná se o odlišné vlastnosti. Lze říci, že veškeré kompostovatelné plasty jsou biodegradabilní, ale ne naopak [2, s. 256].

### 2.2 Optimální podmínky pro činnost mikroorganismů v kompostu

Růst a aktivita mikroorganismů v kompostovaném materiálu jsou závislé na obsahu a vzájemném zastoupení využitelných makrobiogenních prvků (C, N, P, K, Mg). Mezi nejdůležitější prvky patří uhlík a dusík, jejichž vzájemný poměr by měl u zralého kompostu dosáhnout hodnot 25 – 30 : 1 (C:N) [16, s. 29].

Jeden z hlavních faktorů ovlivňující správnou činnost mikroorganismů v kompostu představuje vlhkost (obsah vody). Voda v kompostu slouží především k rozpouštění a transportu živin, enzymů a plynů. Její obsah v kompostu je ideální mezi 50 až 60 % [16, s. 30, 31]. Při nedostatku vody v kompostu dochází ke zpomalení biochemických pochodů, naopak její nadbytek může způsobit nežádoucí hnilobné procesy [17, s. 14].

Optimální hodnota pH pro činnost mikroorganismů, zabezpečujících proces kompostování, leží v rozmezí 6,0 – 8,0 [16, s. 31]. Během kompostování se pH mění v závislosti na metabolitech mikroorganismů, které jsou především kyselého charakteru. Za vhodných podmínek však dochází k vyrovnávání pH odbouráváním těchto metabolitů [18, s. 14].



Pro život aerobních organismů je nezbytně nutná přítomnost dostatečného množství kyslíku v kompostovaném materiálu. Celý objem kompostu by měl být dostatečně provzdušněn [9, s. 19], [17, s. 15].

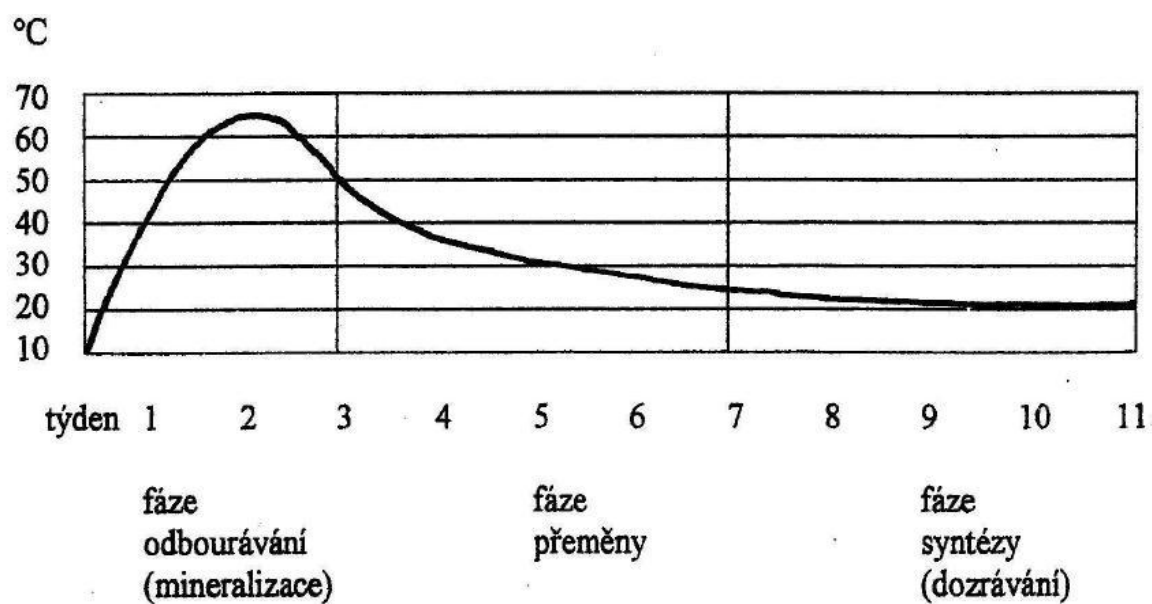
### 2.3 Průběh procesu kompostování

Během kompostování dochází v kompostovaném materiálu k mnoha biologickým a biochemickým přeměnám, jejichž průběh může být rozdělen do několika fází a to zejména: 1) fáze mineralizace, 2) fáze strukturní přeměny a 3) fáze syntézy (viz Obr. 4).

První fáze je založena převážně na vysoké aktivitě mikroorganismů rozkládajících jednoduché organické látky obsažené v kompostovaném materiálu (cukry, bílkoviny, aminokyseliny, mastné kyseliny). Toto je doprovázeno uvolňováním energie projevující se zvyšováním teploty v kompostu. Rychlost růstu teploty je přímo úměrná aktivitě mikroorganismů, která je však závislá i na jiných faktorech jako např. na chemickém složení kompostovaného materiálu, velikosti částic, poměru obsahu kyslíku a vody [16, s. 32, 33]. Na počátku procesu kompostování, je-li teplota kompostovaného materiálu nižší než 40 °C, se uplatňují především mezofilní bakterie a houby. Jakmile teplota převyšuje 40 °C, dominantní skupinou mikroorganismů se stávají termofilní bakterie a houby [9, s. 21, 22]. V průběhu první fáze teplota v kompostu za vhodných podmínek dosáhne 55 – 65 °C. Při této teplotě také dochází k částečné hygienizaci kompostu, tj. ke snížení počtů patogenních organismů, zejména bakterií [16, s. 35].

Během druhé fáze kompostování probíhají procesy přeměn a částečného rozkladu hůře rozložitelných organických látek typu celulóza, hemicelulóza, tuků a ligninu. Rozklad je katalyzován mikrobiálními exoenzymy, především *celulasami*, *pektinasami* a *lipasami*. Dále dochází k částečnému mikrobiálnímu rozkladu proteinů a organických sloučenin fosforu a síry. Meziprodukty rozkladu jsou pak ve třetí fázi využity k syntéze humusových látek za účasti enzymů *fenoloxidas*. Druhou a třetí fázi zrání kompostu provází postupný pokles teploty a lze je také souhrnně nazvat jako fázi chladnutí a zrání, kde se opět začínají vyskytovat mezofilní bakterie a houby avšak s rozdílným druhovým zastoupením oproti mezofilním mikroorganismům uplatňujícím se na začátku kompostování. Ve druhé a třetí fázi se nacházejí především aktinomycety a protozoa [16, s. 36], [9, s. 22].

Kompostování je kontinuální proces, a tudíž výše uvedené fáze od sebe nejsou ostře ohraničeny [17, s. 20].



Obr. 4 Teplotní charakteristika biochemických přeměn kompostovaného materiálu [9, s. 21]

### 3 PŘEHLED MIKROORGANISMŮ SCHOPNÝCH BIODEGRADACE DANÝCH POLYESTERŮ

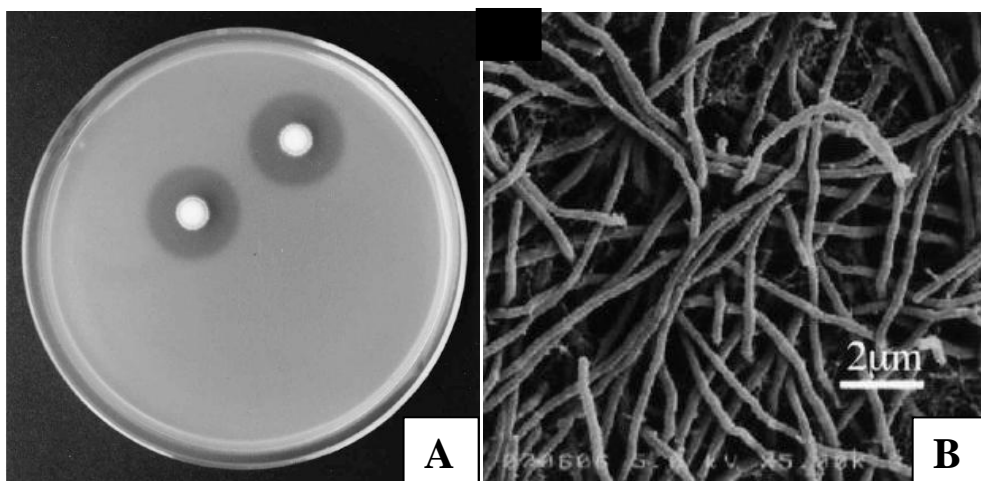
Mikroorganismy podílející se na degradaci polymerních materiálů nejsou všudypřítomné, prozatím byly izolovány především z různých zemin či kompostů. I kvůli tomuto faktu těchto mikroorganismů nebylo dosud zaznamenáno mnoho [19, s. 67].

#### 3.1 PLA

Většina z dosud izolovaných mikroorganismů schopných rozkládat kyselinu polymléčnou jsou aktinomycety, jako je *Amycolatopsis spp.* a *Saccharothrix spp.* [19, s. 67]. Aktinomycety jsou významným kmenem grampozitivních bakterií, morfologií však připomínají plísně. Vytvářejí dlouhá větvená vlákna splétající se v tzv. mycelium. Obsahují řadu enzymů, díky kterým jsou schopny rozkládat složité, obtížně rozložitelné organické látky jak přírodního, tak syntetického původu. Jsou součástí koloběhu uhlíku v přírodě a tvorby humusu [20, s. 16].

Pranamuda *et al.*(1997) ve své práci jako první uvedli mikrobiální degradaci PLA, a to aktinomycetou *Amycolatopsis sp.* HT-32. Tento kmen, izolovaný z půdního vzorku, byl schopen tvořit tzv. projasněné zóny („clear zone“, viz *Obr. 5 A*) na agarových plotnách obsahujících emulzi kyseliny polymléčné, což je běžně využívaný způsob hodnocení biodegradace polymerů. Od tohoto objevu byly izolovány i další kmeny aktinomycet spadající do rodu *Amycolatopsis*. Jsou jimi například *Amycolatopsis mediterranei* či *Amycolatopsis sp.* K104-1 (viz *Obr. 5 B*). Během dalších studií rodu *Amycolatopsis* byla prokázána schopnost 15 z 25 zkoumaných kmenů této aktinomycety vytvářet projasněné zóny na agarových plotnách obsahujících emulzi PLA, tudíž degradovat PLA [21, s. 424, 425], [22, s. 772, 773], [23, s. 1637].

Jarerat *et al.*(2002) ve své práci uvádí testování 105 kmenů aktinomycet ze sbírky kultur na degradaci kyseliny polymléčné metodou projasněné zóny, z nichž v tomto testu uspělo pouze 5 rodů, všechny z čeledi *Pseudonocardiaceae*. Jsou jimi výše zmíněný rod *Amycolatopsis*, dále pak rody *Kibdelosporangium*, *Saccharothrix*, *Lentzea* a *Streptoalloteichus*. Z celkového počtu zkoumaných 12 kmenů rodu *Saccharothrix* prokázalo schopnost degradace 9 kmenů, přičemž nejvyšší schopnost biodegradace prokázala aktinomyceta *Saccharothrix waywayandensis*. *Kibdelosporangium aridum* je aktinomycetou podílející se na rozkladu vysokomolekulární PLA [21, s. 424, 425], [22, s. 772, 773].

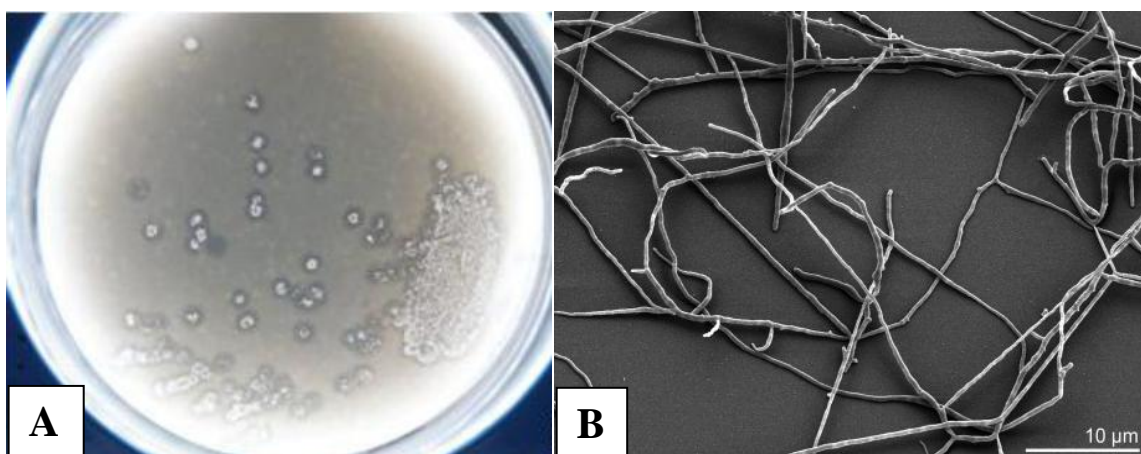


Obr. 5 Projasněné zóny kolem kolonií *Amycolatopsis* sp. HT-32 (A) [23, s. 1638]; snímek *Amycolatopsis* sp. K104-1 pořízený elektronovým mikroskopem (B) [24, s. 347]

Mezi další mikroorganismy schopné rozkládat PLA patří plíseň kmene *Tritirachium album*, termofilní bakterie *Brevibacillus* sp. (dříve *Bacillus brevis*), *Bacillus stearotherophilus* a *Geobacillus thermocatenulatus* [21, s. 425], [22, s. 773]. Kim *et al.* (2009) izolovali ze vzorků půdy gramnegativní bakterii vykazující 92% shodu v sekvenci nukleotidů DNA s *Bordetella petrii* schopnou degradace PLA [19, s. 70].

### 3.2 PBAT

Na degradaci aromaticko – alifatických kopolyesterů se podílejí především termofilní aktinomycety, např. druhy *Thermomonospora fusca* [25, s. 25], [26, s. 92].



Obr. 6 *Thermomonospora curvata*: A – kolonie s projasněnými zónami na kultivační půdě obsahující PBAT [9, s. 74]; B – snímek pořízený elektronovým mikroskopem [27, s. 4]

Na pracovišti ÚIOŽP fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně byla metodou projasněné zóny izolována aktinomyceta schopná biodegradace PBAT, vykazující 99% podobnost sekvence nukleotidů s organismem *Thermomonospora curvata*, jehož kolonie na kultivační půdě a snímek elektronovým mikroskopem je možné shlédnout výše na *Obr. 6* [9, s. 75].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo izolování mikroorganismů produkujících depolymerizační enzymy z různých vzorků kompostu, jejich identifikace a následné uchování pro další využití. Dalším úkolem byla charakteristika daných vzorků kompostů prostřednictvím stanovení sušiny, spalitelného podílu a hodnoty pH.

## 5 MATERIÁL A METODIKA

### 5.1 Vzorčky

Polyestery:

- PBAT G8060 (polybutyleneadipate-co-butyleneterephthalate), EnPol Irechemicals, Korea
- PLA 4042D (polylactide), Nature Works, USA

Komposty:

- kompost 1, domácí kompost tvořený běžným organickým odpadem ze zahrady
- kompost 2, domácí kompost tvořený běžným organickým odpadem ze zahrady
- kompost 3, organický materiál získaný ze skládky odpadů tvořený především suchým listím, větvemi a papírem
- kompost 4, komerční průmyslový kompost, výrobce Agro CS, Česká Skalice
- kompost 5, komerční organicko – humusové hnojivo, výrobce Rolnicke družstvo podielnikov Koš, Slovenská republika

### 5.2 Příprava materiálu

#### 5.2.1 Suspenze PLA a PBAT

Pro přípravu submikročástic byla použita metoda zvaná Oil-in-Water emulsion solvent evaporation method, při níž dochází k emulzifikaci organické a anorganické fáze a následnému odstranění rozpouštědla fáze organické.

Příprava roztoků:

Polyvinylalkohol (PVA) .....	0,5 g
Destilovaná voda.....	100 ml
Polyester (PLA, PBAT) .....	10 g
Chloroform.....	100 ml

PVA byl navážen a za mírného zahřívání rozpuštěn v destilované vodě. Roztok byl po vychladnutí kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Dále byl připraven roztok daného polyesteru (PLA, PBAT) v chloroformu



o koncentraci 100 mg/ml. Navážené množství polyesteru bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno chloroformem po rysku.

Ve směsi na přípravu emulze je obsaženo:

Roztok PVA..... 80 ml

Roztok polyesteru ..... 20 ml

80 ml roztoku PVA bylo smícháno v kádince s 20 ml roztoku polyesteru a tato směs byla homogenizována vysokorychlostním míchadlem při 24 000 otáčkách 5 – 10 min, kde docházelo k vytvoření emulze a PVA zde sloužil jako její stabilizátor. Pro zjemnění velikosti vytvořených micel byla použita ultrazvuková sonda (cyklus 0,5 a amplituda 35%) po dobu 5 min. Směs byla přelita do erlenmayerovy baňky a pomocí vývěvy byl za stálého míchání odpařen chloroform, což vedlo ke zhroucení kapiček emulze a vysrážení daného polyesteru. Směs byla dále ve zkumavce 10 min centrifugována při 8000 otáčkách/min. Vyčeřená tekutina obsahující PVA byla odlita do odpadní lahve. Pro odstranění zbytku PVA obsaženého v usazenině byla zkumavka doplněna destilovanou vodou a odstředována 10 min při 8000 otáčkách/min. Tento postup promytí byl proveden celkem dvakrát. Obsah zkumavky byl převeden do vzorkovnice, doplněn na objem 80 ml destilovanou vodou a suspenzi o koncentraci 20 mg/l bylo možné dále použít, jak je popsáno v kapitole 5.2.3.

Příprava suspenzí submikročásteček polyesterů probíhala ve spolupráci s ing. Petrem Stloukalem, Ph.D.

### 5.2.2 Minerální médium

Minerální médium je využíváno jako zdroj prvků nezbytných pro život mikroorganismů. Pro jeho přípravu byly použity zásobní roztoky látek navážením jejich příslušného množství, kvantitativním převedením do 1 l odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku. Použité sloučeniny a jejich navážky potřebné na přípravu 1 l zásobních roztoků:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 9 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ..... 24 g

$\text{CaCl} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ..... 1 g

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  ..... 3 g

$\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ..... 10 g

NaCl.....	50 g
NH <sub>4</sub> Cl.....	30 g
1 l roztoku stopových prvků byl připraven navážením:	
MnSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O .....	0,043 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,057 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	0,043 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O.....	0,037 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O .....	0,025 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O.....	0,040 g

Všechny navážky byly kvantitativně převedeny do 1 l odměrné baňky, doplněny destilovanou vodou po rysku a řádně promíchány.

Pro přípravu 100 ml minerálního média bylo použito:

Zásobní roztok KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2 ml
Zásobní roztok Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O.....	8 ml
Zásobní roztok CaCl · 2 H <sub>2</sub> O.....	1 ml
Zásobní roztok Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O .....	1 ml
Zásobní roztok Mg(SO <sub>4</sub> ) · 7 H <sub>2</sub> O .....	1 ml
Zásobní roztok NaCl.....	1 ml
Zásobní roztok NH <sub>4</sub> Cl .....	1 ml
Roztok stopových prvků .....	0,2 ml
Destilovaná voda.....	84,8 ml

Daná množství roztoků byla smíchána a doplněna destilovanou vodou na celkový objem 100 ml, bylo tedy použito 84,8 ml destilované vody.

### 5.2.3 Kultivační půda

Pro přípravu agarové půdy s polyesterem bylo použito:

Agar .....	2,2 g
------------	-------

Kvasničný autolyzát..... 4 mg

Minerální médium..... 100 ml

Roztok submikročástic polyesteru ..... 20 ml

Navážená množství agaru a kvasničného autolyzátu byla řádně smíchána s minerálním médiem a příslušným množstvím roztoku submikročástic polyesteru. Směs byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 min. Po ochladnutí byla živná půda rozlita v aseptickém laminárním boxu na Petriho misky.

#### 5.2.4 Suspendační roztok

Pro přípravu suspendačního roztoku bylo použito:

NaCl..... 0,85 g

Destilovaná voda..... 100 ml

Tween..... 0,1 g

Nejprve byl připraven fyziologický roztok kvantitativním převedením daného množství NaCl do 100 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl rozlit po 45 ml do vzorkovnic, bylo přidáno 0,1 g tweenu do každé vzorkovnice a vzniklý suspendační roztok byl vložen do autoklávu ke sterilizaci při 121 °C na 20 min.

#### 5.2.5 Agarózový gel na elektroforézu

Pro přípravu 1 % gelu bylo použito:

Agaróza..... 0,5 g

Pufr TAE (1× ředěný)..... 50 ml

Ethidium bromid..... 30 µl

Agaróza byla kvantitativně převedena daným pufrem do erlenmayerovy baňky. Po dokonalém rozpuštění směsi po ohřevu v mikrovlnné troubě, bylo přidáno 30 µl ethidium bromidu. Směs byla promíchána a vlita do formy, která byla po ztuhnutí gelu vložena do elektroforetické vany. Pro vytvoření jamek potřebných při elektroforéze, byl do formy se směsí před vznikem gelu upevněn tzv. hřebínek.

## 5.3 Izolace degradačních mikroorganismů

### 5.3.1 Očkování kultivační půdy s polyesterem

Pro naočkování degradačních mikroorganismů obsažených v kompostu, bylo provedeno jejich převedení do suspenzačního roztoku smícháním:

Vzorek kompostu..... 5 g

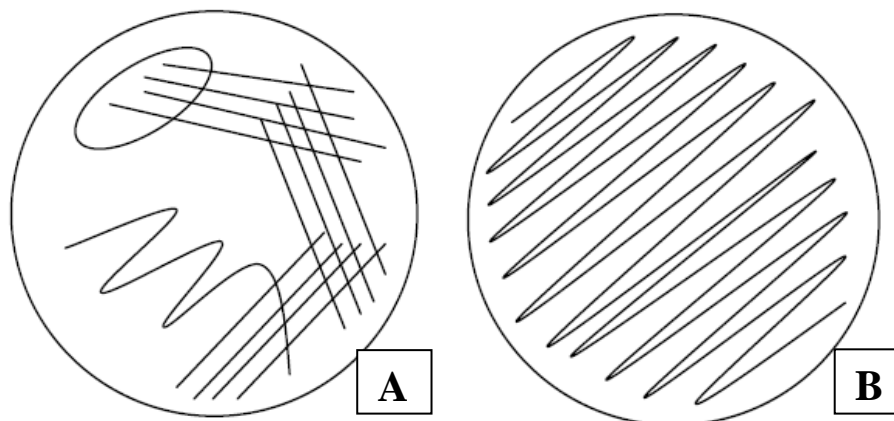
Suspenzační roztok..... 45 ml

Tato směs byla po dobu 10 min intenzivně míchána na třepačce. Připravené kultivační půdy s polyesterem byly touto suspenzí naočkovány nanesením daného množství mikropipetou na Petriho misky a rozetřením sterilní hokejkou po celé jejich ploše.

Mikroorganismy rostou na kultivační půdě ve formě kolonií, přičemž jejich množství je uvedeno jako počet jednotek tvořících kolonie na jeden gram sušiny vzorku kompostu (CFU/g sušiny vzorku).

### 5.3.2 Izolace čisté bakteriální kultury

Pro získání čisté bakteriální kultury byl proveden tzv. křížový roztěr. Při této metodě je pomocí vyžíhané, sterilní kličky nabrána vybraná kultura, která je dobře rozetřena u okraje nové misky. Při použití další sterilní kličky jsou z místa roztěru vedeny čáry po obvodu misky. Dále jsou vedeny čáry protínající již vytvořené čáry do kříže, také sterilní kličkou. Z nově vytvořených čar jsou opět sterilní kličkou vedeny čáry do kříže původních. Nakonec je z naposled vytvořených čar vedena čára ve tvaru hada. Postup křížového roztěru je znázorněn na *Obr. 7*.



*Obr. 7 Křížový roztěr (A); roztěr pro nárůst biomasy (B)*

### 5.3.3 Roztěr pro nárůst biomasy mikroorganismů a její uchování

Z misky, na které byla pomocí křížového roztěru získána čistá mikrobiální kultura, byla tato sterilní kličkou nanesa na novou živnou půdu způsobem uvedeným na *Obr. 7* v kapitole 5.3.2, pro získání co největšího množství biomasy mikroorganismu.

Biomasa z Petriho misky byla sterilní kličkou odebrána a opatrně přenesena do dvou sterilních zkumavek s víčkem. Obsah jedné zkumavky byl zakápnut glycerolem a vložen k uchování do mrazáku při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Druhá zkumavka obsahující mikroorganismy byla použita pro další postupy.

Veškeré práce s mikroorganismy uvedené v kapitolách 5.3.1, 5.3.2 a 5.3.3 byly prováděny ve sterilním prostředí laminárního boxu. Petriho misky s nanesenými mikroorganismy způsoby popsány v těchto kapitolách byly umístěny ke kultivaci v termostatu při  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu potřebnou k nárůstu hledaných mikroorganismů, obvykle 7 – 12 dní.

### 5.3.4 Gramovo barvení

Na podložní sklíčko byl nakápnut fyziologický roztok, v němž byl teplem zafixován vzorek dané bakterie, převrstven krystalovou violetí a po 60 s působení bylo barvivo slito a zbytek na sklíčko byl následně mořen Lugolovým roztokem po dobu 60 s. Dále bylo barvivo opět slito a krátce opláchnuto destilovanou vodou. Preparát byl opatrně, krátce odbarvován působením etanolu a na závěr dobarvován karbolfuchsinem po dobu 60 s. Preparát byl opláchnut destilovanou vodou, vysušen filtračním papírem a po doschnutí na vzduchu pozorován pod mikroskopem v imerzním oleji. Grampozitivní bakterie jsou po testu zbarveny modře, gramnegativní bakterie červeně. Tuto odlišnost způsobuje rozdílné složení buněčné stěny obou skupin bakterií.

### 5.3.5 Test pro pomnožení degradačních mikroorganismů

Pro pomnožení mikroorganismů schopných biodegradace polyesterů a tím zvýšení pravděpodobnosti jejich izolace, byl kompost po přidání urychlovače zrání kompostu, suspenze submikročástic PBAT a destilované vody v různých kombinacích kultivován v termostatu.

Směs A

Kompost..... 50 g

Suspenze PBAT ..... 1 ml

Destilovaná voda..... 5 ml

**Směs B**

Kompost.....	50 g
Destilovaná voda.....	6 ml
Urychlovač zrání kompostu .....	100 mg

**Směs C**

Kompost.....	50 g
Destilovaná voda.....	6 ml

**Směs D**

Kompost.....	50 g
Suspenze PBAT .....	1 ml
Destilovaná voda.....	5 ml
Urychlovač zrání kompostu .....	100 mg

Jednotlivé složky byly promíchány ve vzorkovnicích a vloženy do termostatu o teplotě 58 °C k inkubaci po dobu 3 týdnů. Po této době bylo provedeno převedení mikroorganismů obsažených v kompostu do suspenze a jejich naočkování na kultivační půdy obsahující polyester postupy uvedenými v kapitolách 5.3.1, 5.3.2 a 5.3.3.

## **5.4 Identifikace degradačních mikroorganismů**

Identifikace mikroorganismů produkujících depolymerizační enzymy byla prováděna pomocí molekulárně biologických postupů srovnáváním sekvencí nukleotidů v genu pro 16S rRNA.

### **5.4.1 Izolace DNA ze získaných mikroorganismů**

Izolace DNA byla provedena dle přesně stanoveného postupu pomocí Power Soil™ DNA Isolation Kit následujícím způsobem.

Obsah zkumavky, jehož příprava je popsána v kapitole 5.3.3, byl vložen pomocí mikropipety do rozbíjecí zkumavky přiložené v použité sadě. Součástí této rozbíjecí zkumavky je pufr chránící nukleové kyseliny před degradací a společně s rozbíjecími částicemi, napomáhající rozkladným a homogenizačním procedurám vzorku. Směs byla krátce promíchána na vortexu. Dále bylo přidáno 60 µl pufru obsahujícího SDS (anionický

tenzid) a další rozkladná činidla nezbytná pro celkový rozklad buňky, kde SDS kromě zmíněného rozkladu buňky dále rozbíjí mastné kyseliny a lipidy vázané na buněčnou membránu organismů. Směs byla ve vodorovné poloze vortexována při maximální rychlosti po dobu 10 min, přičemž se jedná o kritický bod celé homogenizace a buněčného rozkladu. Dochází k rozkladu spojením účinku chemických činidel a mechanického třepání. Promíchaná směs byla 30 s centrifugována.

K 400 – 500  $\mu\text{l}$  supernatantu (objem závisí na účinnosti procesu), přeneseného mikropipetou do čisté mikrozkušavky bylo přidáno 250  $\mu\text{l}$  směsi obsahující složky srážející organické (kromě DNA) a anorganické kontaminanty snižující čistotu DNA a inhibující následnou aplikaci DNA. Směs byla krátce promíchána na vortexu a následně inkubována 5 min při 4 °C, poté byla 1 min za laboratorní teploty centrifugována. Kromě sedimentu byl přenesen supernatant (maximálně však 600  $\mu\text{l}$ ) do čisté mikrozkušavky, přičemž bylo pro nejlepší kvalitu a výtěžnost DNA nutné se při odebírání důsledně vyhnout sraženině. K supernatantu bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  dalšího roztoku obsahující látky způsobující srážení organického (kromě DNA) a anorganického materiálu. Roztok byl krátce vortexován, inkubován při 4 °C a 1 min za laboratorní teploty centrifugován. Kromě sedimentu byl opět přenesen supernatant do čisté mikrozkušavky (maximálně však 750  $\mu\text{l}$ ). K tomuto bylo přidáno 1200  $\mu\text{l}$  vysoce koncentrovaného solného roztoku a směs byla krátce vortexována.

675  $\mu\text{l}$  této směsi bylo přeneseno na kolonku obsaženou v sadě, poté byla 1 min centrifugována. Přefiltrovaná kapalina byla vylita, na kolonku bylo přeneseno dalších 675  $\mu\text{l}$  směsi, která byla 1 min centrifugována. Zbytek směsi byl přefiltrován stejným způsobem. DNA je selektivně vázána na křemičitou membránu kolonky při vysoké solné koncentraci a téměř všechny kontaminující složky projdou přes membránu.

Pro odstranění zbytků solí a ostatních nečistot navázaných na membráně společně s DNA bylo použito 500  $\mu\text{l}$  promývacího roztoku na bázi etanolu nanesením na membránu kolonky. Po centrifugaci 30 s, byla přefiltrovaná tekutina vylita a kolonka byla pro odstranění zbytkového promývacího roztoku opět centrifugována, tentokrát 1 min. Kolonka byla opatrně přenesena do čisté mikrozkušavky a doprostřed membrány kolonky bylo naneseo 100  $\mu\text{l}$  sterilního elučního pufru, pomocí kterého je DNA z membrány po 30 s centrifugaci převedena do roztoku.

V celém postupu bylo centrifugováno rychlostí 12 000 otáček/min.

### 5.4.2 Metoda PCR a kontrola produktů gelovou elektroforézou

#### *Polymerázová řetězová reakce*

Polymerase chain reaction neboli PCR je metoda používaná pro amplifikaci vymezeného úseku DNA za pomoci enzymu, přičemž po přípravě potřebné směsi obsahující DNA a další složky, samotná reakce probíhá za přesně stanovených podmínek v přístroji, tzv. thermocykleru.

Pro přípravu směsi látek pro pomnožení dané DNA bylo použito:

Master mix (Promega GoTaq, obsahující <i>DNA-polymerasu</i> ).....	12,5 µl
Primer FD1 [28, s. 5] (5× ředěný) .....	1 µl
Primer RD1 [28, s. 5] (5× ředěný).....	1 µl
Destilovaná voda.....	9,5 µl
Vzorek DNA .....	1 µl

Jednotlivé složky byly mikropipetou přeneseny do mikrozkušavky a promíchány. Dále byla do druhé mikrozkušavky připravena stejná směs, avšak bez přídavku vzorku DNA. Tato směs má pouze kontrolní charakter. Mikrozkušavky byly vloženy do thermocykleru a byl spuštěn program s následujícími kroky:

Počáteční denaturace.....	7 min při 94 °C	
Denaturace .....	1 min při 94 °C	} 29 cyklů (= opakování těchto kroků 29×)
Annealing.....	1 min při 55 °C	
Elongace.....	1 min při 72 °C	
Závěrečná elongace.....	30 min při 72 °C	
Uložení.....	4 °C	

Syntetizovaný úsek DNA je nejprve denaturován při 94 °C, dochází tedy k rozplétání dvoušroubovice DNA a na vzniklá jednotlivá vlákna DNA přisedají primery FD1 (F-forward) a RD1 (R-reverse). Tento děj označován jako annealing je realizován při 55 °C. Následuje syntéza komplementárních vláken DNA, tzv. elongace, která je zajišťována *DNA-polymerasou* při 72 °C, přičemž k tomuto dochází v úseku ohraničeném primery. Jak je uvedeno v přehledu výše, dochází k opakování cyklu denaturace – annealing – elongace, a to celkem 29×, přičemž po 1. cyklu je replikovaný úsek DNA



zdvojnásoben, následuje další denaturace a celý cyklus je opakován. Množení daného úseku pokračuje geometrickou řadou.

### ***Kontrola produktů PCR gelovou elektroforézou***

Gelová elektroforéza je metoda, sloužící k separaci různě dlouhých úseků DNA, jejímž principem je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. Při elektroforéze slouží agarózový gel jako nosič a pufr jako elektrolyt. Z agarózového gelu, jehož příprava je uvedena v kapitole 5.2.5, byl po ztuhnutí odstraněn hřebínek a gel byl vložen do elektroforetické vany, do které byl následně nalit 1 % pufr TAE tak, aby pokryl celou plochu gelu. Do jamky v gelu byla opatrně mikropipetou nanесena směs 10  $\mu$ l amplifikované DNA s 2  $\mu$ l nanášecího pufru. Do další jamky bylo stejným způsobem nanесeno 12  $\mu$ l tzv. velikostního markeru, standardu sloužícího k odhadu velikosti pozorovaných fragmentů DNA. Elektroforéza probíhala 45 min při konstantním napětí 90 V a po skončení byl gel přenesen do dokumentačního systému UV-transluminátoru, kde byla pomocí UV záření a programu GeneSnap pořízena jeho fotografie.

### **5.4.3 Purifikace amplifikované DNA**

V získaném vzorku namnožené DNA po PCR jsou obsaženy látky (primery aj.), které by mohly způsobit komplikace při následné sekvenaci, tudíž bylo provedeno přečištění tohoto vzorku. Purifikace amplifikované DNA byla provedena pomocí Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit.

Do mikrozkušavky bylo mikropipetou vloženo 15  $\mu$ l amplifikované DNA a 75  $\mu$ l příslušného pufru, směs byla krátce promíchána na vortexu. Do čisté zkumavky byl vložen filtr, na který byla převedena směs pufru a DNA a zkumavka byla 30 s centrifugována. Přefiltrovaná tekutina byla vylita, na filtr bylo nanесeno 600  $\mu$ l promývacího pufru s obsahem etanolu, zkumavka byla ponechána v klidu po dobu 1 min a poté byla 30 s centrifugována. Přefiltrovaná kapalina byla opět vylita a zkumavka byla centrifugována 3 min pro odstranění zbytku promývacího pufru. Na filtr, který byl vložen do čisté mikrozkušavky bylo nanесeno 20  $\mu$ l elučního pufru. Po 10 min, což byl čas pro navázání DNA usazené na filtru do elučního pufru, byla mikrozkušavka pro převedení elučního pufru s DNA na její dno centrifugována 2 min.

V celém postupu bylo centrifugováno rychlostí 14 500 otáček/min.

#### 5.4.4 Sekvence produktů amplifikované DNA

Před odesláním vzorku DNA k sekvenaci bylo potřeba připravit vhodnou směs smícháním:

Vzorek purifikované DNA..... 5 µl

Primer 341f (20× ředěný) ..... 5 µl

Složky byly mikropipetou převedeny do mikrozkušavky a odeslány k sekvenaci do SEQme s.r.o., Dobříš. Při sekvenaci dochází pomocí biochemických metod ke zjišťování pořadí bazí dané DNA.

#### 5.4.5 Vyhodnocení získané sekvence nukleotidů

Sekvence nukleotidů DNA získaná prostřednictvím SEQme s.r.o., Dobříš byla zobrazena pomocí programu Sequence Scanner a následně porovnána v databázi GenBank dostupné online na <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> pomocí programu BLAST. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) je program srovnávající sekvence nukleotidů nebo proteinů se sekvencemi v databázi a statisticky zhodnocující význam nalezené shody.

### 5.5 Charakteristika kompostu

#### 5.5.1 Stanovení sušiny

Na předem vysušenou a zváženou Petriho misku byly naváženy 3 g kompostu, který byl sušen v sušárně při 105 °C do konstantní hmotnosti. Po vyndání misky s vysušeným kompostem byla tato vložena do exsikátoru pro zchladnutí na laboratorní teplotu a následně zvážena. Pro každý kompost byla vytvořena vždy 3 paralelní stanovení, vážení byla prováděna s přesností na 0,0001 g. Ze získaných hmotností byly vypočteny jednotlivé sušiny a dále pak průměrná hodnota sušiny pro každý vzorek dle rovnic 1 a 2.

$$S_x = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_3} \cdot 100 \quad (1)$$

$$S_{pr} = \frac{S_1 + S_2 + S_3}{3} \cdot 100 \quad (2)$$

Kde:

$S_x$	dílčí hodnoty sušiny z paralelních stanovení	[%]
$S_{pr}$	průměrná hodnota sušiny kompostu	[%]
$m_1$	hmotnost Petriho misky s čerstvým kompostem	[mg]

$m_2$	hmotnost Petriho misky s vysušeným kompostem	[mg]
$m_3$	hmotnost prázdné Petriho misky	[mg]

### 5.5.2 Stanovení spalitelného podílu

Do předem vyžíhaného a zváženého kelímku byly naváženy 3 g kompostu, které byly následně vloženy do muflové pece a žihány 2 hodiny při 550 °C. Po vyndání z pece byl kelímeček s kompostem vložen do exsikátoru do zchladnutí na laboratorní teplotu a poté kelímeček obsahující zbytek po spálení zvážen. Vážení se stanovovala s přesností na 0,0001 g. Dle rovnic 3 a 4 byly vypočteny dílčí hodnoty spalitelného podílu a průměrná hodnota spalitelného podílu vyjádřená v % ze sušiny. Pro každý vzorek kompostu byla provedena 3 paralelní stanovení.

$$S_{px} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (3)$$

$$S_{ppr} = \frac{S_{p1} + S_{p2} + S_{p3}}{3} \cdot 100 \quad (4)$$

Kde:

$S_{px}$	dílčí hodnoty spalitelného podílu z paralelních stanovení	[%]
$S_{ppr}$	průměrná hodnota spalitelného podílu	[% sušiny]
$m_1$	hmotnost vysušeného kompostu	[mg]
$m_2$	hmotnost spáleného kompostu	[mg]

### 5.5.3 Stanovení pH

Do kádinky obsahující 50 ml destilované vody bylo vloženo 10 g kompostu. U směsi bylo za stálého míchání magnetickým míchadlem stanoveno pH přístrojem InoLab 730.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Charakteristika vzorků kompostů

K dispozici pro bakalářskou práci bylo 5 druhů kompostů (viz kapitola 5.1), u kterých byla stanovena sušina, spalitelný podíl a hodnota pH. Všechny vzorky byly před použitím k příslušnému stanovení odděleny od hrubších částic přesetím.

Jak již bylo popsáno v kapitole 2.2 ideální hodnota pH pro činnost mikroorganismů vyskytujících se v kompostovaném materiálu a podílejících se na degradaci polymerů se pohybuje v rozmezí 6 – 8. Z tohoto hlediska vyhovují kompost 1 s hodnotou pH 6,98, kompost 2 s hodnotou pH 7,13 a kompost 5 s hodnotou pH 6,34. Komposty 3 a 4 vykazovaly pH nižší a to 5,23 a 5,71.

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím správnou činnost mikroorganismů v kompostovaném materiálu je vlhkost, jejíž hodnota by se měla pohybovat mezi 50 a 60 %. Z tohoto hlediska ideální podmínky pro růst a činnost mikroorganismů vykazuje kompost 3 s vlhkostí 56,01 %. Kompost 5 obsahoval 66,76 % vlhkost. Vzorky kompostu 1 s vlhkostí 33,41 %, kompost 2 s vlhkostí 41,84 % a kompost 4 s vlhkostí 11,83 % byly spíše suché.

Hodnoty naměřených a vypočtených spalitelných podílů kompostů jsou uvedeny v *Tab. 1* jako % ze stanovené sušiny. V této tabulce jsou shrnuty stanovené fyzikálně – chemické vlastnosti všech vzorků kompostů.

*Tab. 1 Stanovené fyzikálně – chemické vlastnosti daných kompostů*

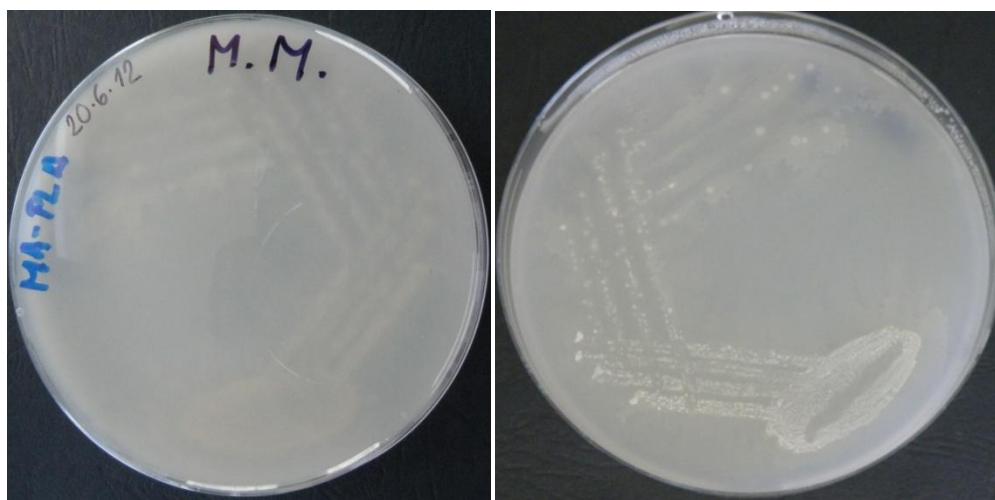
vzorek kompostu	pH	sušina [%]	aktuální vlhkost [%]	spalitelný podíl [% sušiny]
1	6,98	66,59	33,41	15,68
2	7,13	58,16	41,84	29,19
3	5,23	43,99	56,01	55,81
4	5,71	88,17	11,83	62,88
5	6,34	33,24	66,76	43,52

## 6.2 Izolace mikroorganismů na agarové půdě s polyesterem

Ze suspenze vzorku kompostu byly naočkovány dvě kultivační půdy a to nanesením 10  $\mu\text{l}$  suspenze na jednu půdu a 100  $\mu\text{l}$  suspenze na půdu druhou s výjimkou prvního testovaného kompostu, kde bylo nanášeno pouze 10  $\mu\text{l}$  suspenze obsahující mikroorganismy. Příprava suspenze kompostu je uvedena v kapitole 5.3.1.

### 6.2.1 Kultivační půda obsahující PLA

Po naočkování kompostů číslo 1 a 2 na kultivační půdu obsahující kyselinu polymléčnou na těchto nenarostly kultury bakterií vytvářející typické projasněné zóny hydrolyzovaného polyesteru kolem svých kolonií, které jsou považovány za důkaz produkce extracelulárních depolymerizačních enzymů. V důsledku toho s polyesterem PLA nebylo dále pracováno. Na *Obr. 8* je znázorněna Petriho miska s kultivační půdou obsahující PLA, na které byl proveden křížový roztěr pro oddělení čisté bakteriální kultury potenciálně se podílející na biodegradaci PLA.



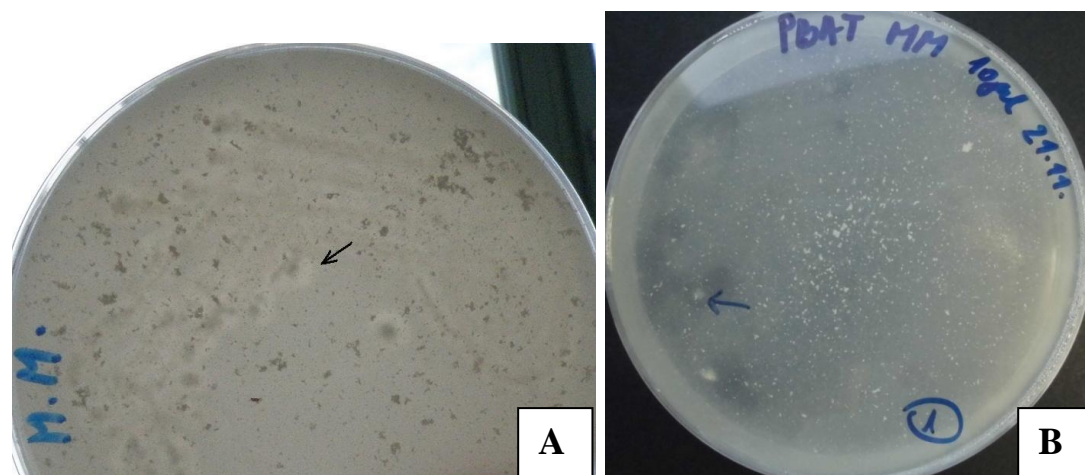
*Obr. 8 Kultivační půda obsahující PLA po křížovém roztěru*

### 6.2.2 Kultivační půda obsahující PBAT

#### *Izolace mikroorganismů z kompostu 1*

Po naočkování 10  $\mu\text{l}$  suspenze obsahující mikroorganismy vyskytující se v kompostu 1 a následné kultivaci po dobu 10 dnů na živné půdě s polyesterem PBAT se vytvořilo 8 projasněných zón s bílými koloniemi bakterií, což odpovídá  $1,2 \cdot 10^4$  koloniím na 1 g sušiny kompostu 1. Na půdě se vyskytovaly i jiné bakteriální kultury, kolem kterých však nebyly typické zóny.

Pro získání čisté bakteriální kultury byl proveden křížový roztěr a následný roztěr pro získání většího množství hledaných bakterií, jejichž postup je uveden v kapitolách 5.3.2 a 5.3.3. U těchto bakterií byla provedena izolace DNA, amplifikace DNA metodou PCR, kontrola PCR produktu gelovou elektroforézou a následná purifikace získaného roztoku (viz kapitoly 5.4.1, 5.4.2 a 5.4.3). Konečný produkt, roztok obsahující DNA, byl po upravení dle kapitoly 5.4.4 poslán k sekvenaci firmě SEQme s.r.o., Dobříš. Pomocí programu BLAST byla zjištěna 99% shoda sekvence nukleotidů získané DNA (viz Příloha PI) s bakterií *Thermomonospora curvata* kmen DSM 43183. Na Obr. 9 jsou znázorněny Petriho misky s příslušnou kultivační půdou, na níž po křížovém roztěru narostl kmen bakterií vytvářejících projasněnou zónu v jinak mléčně zakalené půdě. V případě části A tohoto obrázku se jedná o mikroorganismy, jejichž původem je kompost 1.



Obr. 9 Znáznornění projasněné zóny kolem kolonie bakteriálního druhu *Thermomonospora curvata*: izolované z kompostu 1 (A); izolované z kompostu 2 (B)

#### **Izolace mikroorganismů z kompostu 2**

Po naočkování 10 µl suspenze obsahující mikroorganismy vyskytující se v kompostu 2 a následné kultivaci při 58 °C po dobu 6 dnů na kultivační půdě s polyesterem PBAT bylo napočítáno 20 projasněných zón s bílými koloniemi bakterií. Tento údaj odpovídá  $3,4 \cdot 10^4$  koloniím na 1 g sušiny kompostu. Na půdě se vyskytovaly i jiné bakteriální kultury, kolem kterých však nebyly typické zóny.

Pro získání čisté bakteriální kultury a její následnou identifikaci byl proveden stejný postup jako v případě předchozího kompostu 1. Porovnáním získané sekvence nukleotidů DNA (viz Příloha PI) v databázi BLAST byla zjištěna její 99% shoda se sekvencí nukleotidů DNA bakterie *Thermomonospora curvata* kmen DSM 43183.

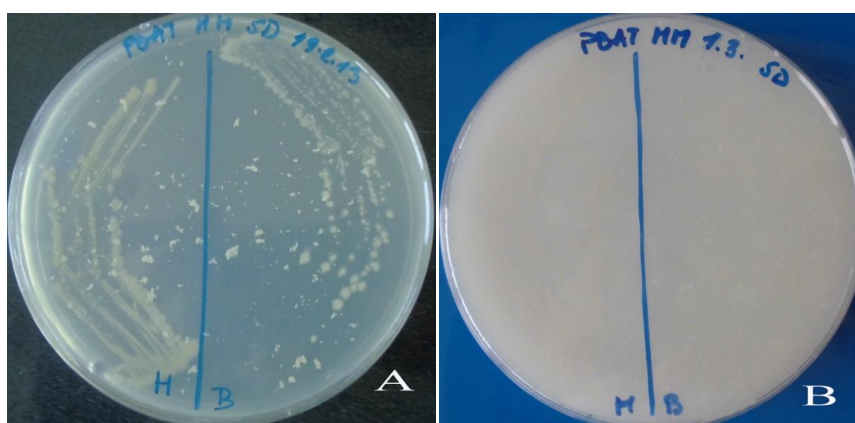
Po naočkování 100 µl suspenze na miskách nenarostly žádné kultury s typickými zónami. Na *Obr. 9* část B je znázorněna Petriho miska s příslušnou kultivační půdou, na níž je možno vidět kmen bakterií vytvářející projasněnou zónu v jinak zakalené půdě, přičemž se jedná o mikroorganismus izolovaný z kompostu 2.

Izolace a následná identifikace aktinomycet blízkce příbuzných druhu *Thermomonospora curvata* z kompostů 1 a 2 probíhala bez komplikací. Po naočkování či přeočkování bakteriálních kultur tyto vždy na živných půdách narostly a nebylo potřeba opakování postupů.

### ***Izolace mikroorganismů z kompostu 3***

Naočkováním suspenze kompostu 3 na kultivační půdu obsahující polyester PBAT nebylo dosaženo požadovaného výsledku. Na miskách nenarostly žádoucí mikroorganismy. Pokus o izolaci biodegradačních bakterií byl opakován dvakrát, avšak bezvýsledně.

Po první kultivaci bylo zjištěno, že růstu žádoucích mikroorganismů může bránit velikost částic PBAT v suspenzi, která se v důsledku dlouhodobého stání suspenze a agregace částic zvětšuje. Z tohoto důvodu byla dále suspenze polyesteru vždy před použitím řádně promíchána v homogenizátoru. Avšak i po naočkování suspenze kompostu 3 na nově vytvořené kultivační půdy nebyly získány požadované mikroorganismy. Na *Obr. 10* je možné vidět rozdíl mezi kultivační půdou, při jejíž přípravě byla použita usazená suspenze submikročásteček PBAT a kultivační půdou, při jejíž přípravě byla použita čerstvě homogenizovaná suspenze submikročásteček. Ani na jedné z misek však nejsou bakteriální kultury s projasněnými zónami, narostly zde bílé a hnědé kolonie bakterií bez zón.



*Obr. 10* Kultivační půda obsahující usazenou suspenzi PBAT (A);  
kultivační půda obsahující homogenizovanou suspenzi PBAT (B)

#### *Izolace mikroorganismů z kompostu 4*

Protože testy u kompostů 3 a 4 probíhaly paralelně, došlo u očkování suspenze kompostu 4 také k přípravě nevhodné kultivační půdy s použitím starší, před použitím nezhomogenizované suspenze submikročástic PBAT. Po naočkování suspenze mikroorganismů na tuto půdu nebyl zaznamenán nárůst hledaných mikroorganismů.

Po vytvoření nových kultivačních půd s obsahem homogenizované suspenze submikročástic PBAT byly tyto opět naočkovány. Na půdě s naočkovanými 10  $\mu\text{l}$  suspenze kompostu bylo spočteno 15 projasněných zón s bakteriemi odpovídající  $1,7 \cdot 10^4$  CFU/g sušiny kompostu. Po naočkování 100  $\mu\text{l}$  suspenze kompostu bylo spočteno 20 projasněných zón s bakteriemi odpovídající  $2,3 \cdot 10^3$  CFU/g sušiny kompostu. Na kultivační půdě se vyskytovaly i jiné bakteriální kultury, kolem kterých však nebyly typické zóny, a proto s nimi nebylo dále pracováno.

Pro získání čisté bakteriální kultury byl proveden křížový roztěr podle kapitoly 5.3.2, který však musel být několikrát opakován, protože po inkubaci živných půd po tomto roztěru nedošlo k nárůstu kolonií bakterií produkujících extracelulární depolymerizační enzymy.

Vzhledem k problémům s izolací hledaných bakterií u kompostu 4, byl u tohoto proveden pokus o pomnožení mikroorganismů 3týdenní kultivací kompostu v termostatu po přidání urychlovače zrání kompostu, suspenze submikročástic PBAT a destilované vody v různé kombinaci. Jednalo se o směs A (PBAT, kompost, destilovaná voda), směs B (urychlovač zrání kompostu, kompost, destilovaná voda), směs C (kompost, destilovaná voda) a směs D (PBAT, urychlovač zrání kompostu, kompost, destilovaná voda), jejichž přesný poměr jednotlivých složek je uveden v kapitole 5.3.5.

Po inkubaci v termostatu bylo provedeno převedení mikroorganismů obsažených v kompostu do suspenze (viz kapitola 5.3.1) a jejich naočkování stejně jako v předchozích případech.

Přehled počtu kolonií hledaných bakterií vyskytujících se na kultivační půdě po naočkování jednotlivých směsí a kultivaci, je uveden v *Tab. 2*. Pro výpočet CFU/g sušiny kompostu byly vybrány kultivační půdy, na kterých bylo možné počty jednotlivých kolonií nejlépe spočítat. V případě směsí A, B a C byla použita půda s ředěním  $10^{-3}$ , u směsi D půda s ředěním  $10^{-2}$ .

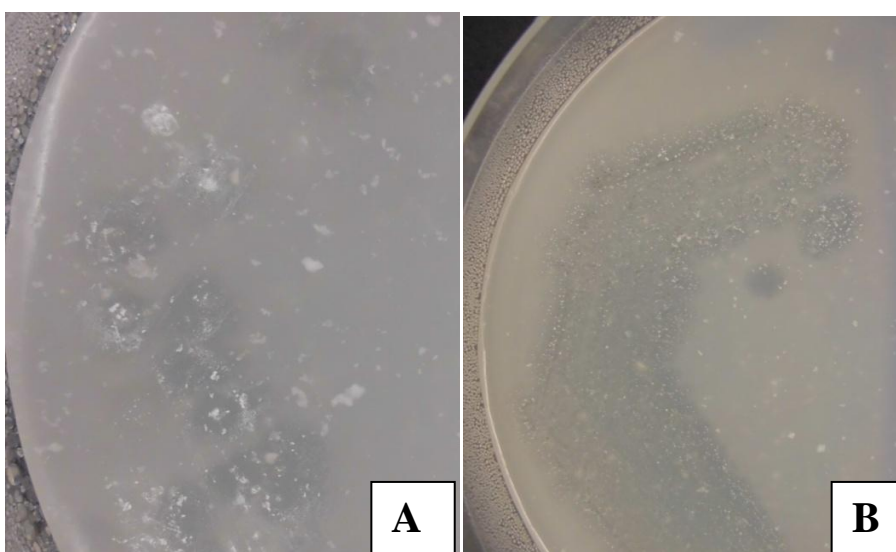


Tab. 2 Přehled počtu zaznamenaných kolonií s projasněnými zónami u různých směsí kompostu 4

Druh směsi	Počet kolonií na kultivační půdě		CFU/g sušiny vzorku kompostu
	Při ředění $10^{-3}$	Při ředění $10^{-2}$	
A	216	260	$2,5 \cdot 10^5$
B	148	200	$1,7 \cdot 10^5$
C	144	264	$1,6 \cdot 10^5$
D	6	18	$2,0 \cdot 10^3$

Pro získání čistých bakteriálních kultur byl proveden křížový roztěr, který bylo potřeba pro získání bakteriální kultury schopné rozkladu PBAT opět několikrát opakovat.

Vizuálním porovnáním všech kolonií získaných přeočkováním pomocí křížového roztěru u kompostu 4 bylo pozorováno, že se pravděpodobně celkově jedná o dvě odlišné kultury bakterií. Jedna tvořící bílé kolonie (viz Obr. 11 A) a druhá s koloniemi hnědé barvy obklopenými bílými útvary, zřejmě sporami bakterií (viz Obr. 11 B). U mikroorganismů na těchto obrázcích byla provedena identifikace postupy popsány v kapitole 5.4.



Obr. 11 Bakteriální kultury izolované z kompostu 4 – bílé kolonie (A); hnědé kolonie (B)

V případě bakteriální kultury na *Obr. 11 A* byla zjištěna její blízká příbuznost kmeni *Thermobispora bispora* DSM 43833, a to z 99 %. Získaná sekvence nukleotidů bakteriální kultury na *Obr. 11 B* vykazovala 99% shodu sekvence nukleotidů DNA s kmenem *Actinomadura rubrobrunea* DSM 43750. Získané sekvence nukleotidů DNA izolovaných mikroorganismů viz Příloha PI.

U těchto mikroorganismů bylo dále provedeno Gramovo barvení popsané v kapitole 5.3.4. Z výsledného zabarvení bakterií však nebylo možné určit, zda se jedná o bakterie grampozitivní nebo gramnegativní.

### ***Izolace mikroorganismů z kompostu 5***

Po naočkování 10  $\mu\text{l}$  suspenze obsahující mikroorganismy vyskytující se v kompostu 5 a následné kultivaci po dobu 7 dnů, na kultivační půdě s polyesterem PBAT narostlo  $1,3 \cdot 10^5$  kolonií/g sušiny tohoto kompostu. V případě naočkování 100  $\mu\text{l}$  suspenze kompostu po kultivaci narostlo  $8,1 \cdot 10^4$  kolonií/g sušiny kompostu. Na půdách se vyskytovaly i jiné bakteriální kultury, kolem kterých však nebyly typické projasněné zóny svědčící o produkci extracelulárních depolymerizačních enzymů bakteriemi.

Jelikož práce s komposty 4 a 5 probíhala paralelně, bylo provedeno vizuální porovnání čistých bakteriálních kultur získaných křížovým roztěrem u obou kompostů. Tímto bylo zjištěno, že se v případě kolonií izolovaných z kompostu 5 pravděpodobně jedná o stejné kolonie jako v případě kompostu 4. K identifikaci byly vybrány bakterie izolované z kompostu 4 uvedené na *Obr. 11*.

V *Tab. 3* jsou shrnuty údaje počtu jednotlivých kolonií při dvou různých ředění vyskytujících se na kultivačních půdách s obsahem PBAT. Jsou zde také uvedeny hodnoty po přepočtu na CFU/g sušiny příslušného vzorku kompostu, přičemž pro výpočet byla vždy použita hodnota počtu kolonií při ředění  $10^{-3}$ , kde bylo možné lépe spočítat počet jednotlivých kolonií na kultivačních půdách.

Tab. 3 Počty kolonií degradačních mikroorganismů jednotlivých vzorků kompostů

Druh kompostu	Počet kolonií na kultivační půdě		CFU/g sušiny vzorku kompostu
	Při ředění $10^{-3}$	Při ředění $10^{-2}$	
1	8	–	$1,2 \cdot 10^4$
2	20	0	$3,4 \cdot 10^4$
3	0	0	0
4	15	20	$1,7 \cdot 10^4$
5	44	268	$1,3 \cdot 10^5$

## ZÁVĚR

Hlavním cílem bakalářské práce byla izolace, identifikace a uchování mikroorganismů produkujících depolymerizační enzymy vybraných syntetických polymerů. Potencionálním zdrojem těchto mikroorganismů bylo 5 vzorků kompostu, u kterých byly stanoveny fyzikálně – chemické vlastnosti, jakožto podmínky prostředí ovlivňující činnost a aktivitu degradačních mikroorganismů. Těmito vlastnostmi byly hodnota pH, sušina a spalitelný podíl.

Z těchto 5 vzorků kompostů byly izolovány a následně identifikovány 4 kultury bakterií produkující extracelulární depolymerizační enzymy, a tím hydrolyzující polyester obsažený v kultivační půdě. Dvě bakteriální kultury izolované z kompostů 1 a 2 byly identifikovány jako blízce příbuzné kmeni *Thermomonospora curvata* DSM 43183. Bakteriální kultury izolované z kompostů 4 a 5 byly identifikovány jako blízce příbuzné kmenům aktinomycet *Actinoadura rubrobrunea* DSM 43750 a *Thermobispora bispora* DSM 43833. Na kultivačních půdách rostly i jiné mikroorganismy, avšak k izolaci byly vybírány pouze kultury bakterií, kolem jejichž kolonií se tvořily tzv. projasněné zóny hydrolyzovaných polyesterů. V případě identifikovaných aktinomycet se jednalo o degradaci polyesteru PBAT. V případě kultivační půdy s obsahem polyesteru PLA nebyly izolovány žádné bakteriální kultury.

Izolované mikroorganismy by mohly být předmětem dalšího výzkumu zaměřeného na studium extracelulárních depolymerizačních enzymů, které dané aktinomycety produkují.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] JAYASEKARA, Ranjith, Ian HARDING, Ian BOWATER a Greg LONERGAN. Biodegradability of a Selected Range of Polymers and Polymer Blends and Standard Methods for Assessment of Biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2005, vol. 13, issue 3, s. 231-251 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1007/s10924-005-4758-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-005-4758-2>.
- [2] KALE, Gaurav, Thitisilp KIJCHAVENGKUL, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Susan E. SELKE a Sher Paul SINGH. Compostability of Bioplastic Packaging Materials: An Overview. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2007-03-08, vol. 7, issue 3, s. 255-277 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1002/mabi.200600168. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200600168>.
- [3] TOKIWA, Yutaka, Buenaventurada P. CALABIA, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Susan E. SELKE a Sher Paul SINGH. Biodegradability and Biodegradation of Polyesters: An Overview. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2007, vol. 15, issue 4, s. 259-267 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1007/s10924-007-0066-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-007-0066-3>.
- [4] LIM, L.-T., R. AURAS, M. RUBINO, Maria RUBINO, Susan E. SELKE a Sher Paul SINGH. Processing technologies for poly(lactic acid): An Overview. *Progress in Polymer Science* [online]. 2008, vol. 33, issue 8, s. 820-852 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670008000373>.
- [5] FAMBRI, L. a C. MIGLIARESI. Crystallization and Thermal Properties, v *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, Hoboken, New Jersey, John Wiley & sons, Inc., 2010, s. 113-123.
- [6] JAMSHIDIAN, Majid, Elmira Arab TEHRANY, Muhammad IMRAN, Muriel JACQUOT a Stéphane DESOBRY. Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2010, vol. 9, issue 5, s. 552-571 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x>.

- [7] ARENA, Maria, Cristina ABBATE, Kikku FUKUSHIMA, Mara GENNARI a Stéphane DESOBRY. Degradation of poly (lactic acid) and nanocomposites by *Bacillus licheniformis*: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2011, vol. 18, issue 6, s. 865-870 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1007/s11356-011-0443-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-011-0443-2>.
- [8] PEREGO, G. a G. D. CELLA. Mechanical Properties, v *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, Hoboken, New Jersey, John Wiley & sons, Inc., 2010, s. 141-153.
- [9] PIŠ, Vladimír. *Biodegradace nových syntetických materiálů*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [10] GROOT, W., J. v. KRIEKEN, O. SLIEKERSL a S. d. VOS. Production and Purification of Lactid acid and Lactid, v *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, Hoboken, New Jersey, John Wiley & sons, Inc., 2010, s. 3-18.
- [11] OBUCHI, S. a S. OGAWA. Packaging and other commercial applications, v *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, s. 457-467.
- [12] KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Susan SELKE, Mathieu NGOUAJIO a R. Thomas FERNANDEZ. Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2010, vol. 95, issue 12, s. 2641-2647 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391010003125>.
- [13] LI, Weili, David R. COFFIN, Tony Z. JIN, Nicolas LATONA, Cheng-Kung LIU, Bo LIU, Jinwen ZHANG a LinShu LIU. Biodegradable composites from polyester and sugar beet pulp with antimicrobial coating for food packaging. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2012-10-25, vol. 126, S1, E362-E373 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1002/app.36885. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.36885>.
- [14] ZHOU, Xiaobo, Amar MOHANTY, Manju MISRA, Nicolas LATONA, Cheng-Kung

- LIU, Bo LIU, Jinwen ZHANG a LinShu LIU. A New Biodegradable Injection Moulded Bioplastic from Modified Soy Meal and Poly (butylene adipate-co-terephthalate): Effect of Plasticizer and Denaturant. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2012-10-25, vol. 126, S1, s. - [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1007/s10924-013-0578-y. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-013-0578-y>.
- [15] WU, Chin-San, Amar MOHANTY, Manju MISRA, Nicolas LATONA, Cheng-Kung LIU, Bo LIU, Jinwen ZHANG a LinShu LIU. Utilization of peanut husks as a filler in aliphatic–aromatic polyesters: Preparation, characterization, and biodegradability. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, vol. 97, issue 11, s. 2388-2395 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.07.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139101200290X>.
- [16] TESAŘOVÁ, Marta. *Biologické zpracování odpadů*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010, 129 s. ISBN 978-80-7375-420-4.
- [17] KALINA, Miroslav. 2., upr. vyd. Praha: Grada, 2004, 116 s. Česká zahrada. ISBN 80-247-0907-4.
- [18] FILIP, Jaroslav. *Sledování aerobního rozkladu polymerních směsí na bázi PCL/PHB a na bázi PLA*. Zlín, 2009. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [19] KIM, Mal Nam a Sang Tae PARK. Degradation of poly(L-lactide) by a mesophilic bacterium. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2010, [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1002/app.31950. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.31950>.
- [20] HOLIŠOVÁ, Dana. *Studium termofilních mikroorganismů schopných rozkladu xanthanu a gellanu*. Zlín, 2008. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [21] CALABIA, B. P., Y. TOKIWA, C. U. UGWU a S. AIBA, Biodegradation, v *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, s. 423-430.
- [22] TOKIWA, Yutaka a Amnat JARERAT. Biodegradation of poly(l-lactide). *Biotechnology Letters* [online]. 2004, vol. 26, issue 10, s. 771-777 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1023/B:BILE.0000025927.31028.e3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:BILE.0000025927.31028.e3>.

- [23] PRANAMUDA, H., Y. TOKIWA a H. TANAKA, Polylactide Degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Applied and environmental microbiology*. 1997, vol. 63, issue 4, s. 1637–1640.
- [24] NAKAMURA, K., T. TOMITA, N. ABE a Y. KAMIO. Purification and Characterization of an Extracellular Poly(L-Lactic Acid) Depolymerase from a Soil Isolate, *Amycolatopsis* sp. Strain K104-1. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001-01-01, vol. 67, issue 1, s. 345-353 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1128/AEM.67.1.345-353.2001. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.67.1.345-353.2001>.
- [25] ZUZANA, Konečná. *Mikrobiologie biodegradace materiálu na bázi polyesteru*. Zlín, 2009. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [26] MÜLLER, Rolf-Joachim, Ilona KLEEBERG a Wolf-Dieter DECKWER. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of Biotechnology* [online]. 2001-03-30, vol. 86, issue 2, s. 87-95 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00407-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600004077>.
- [27] CHERTKOV, Olga et al. Complete genome sequence of *Thermomonospora curvata* type strain (B9T). *Standards in Genomic Sciences* [online]. 2011-02-20, vol. 4, issue 1, s. 13-22 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.4056/sigs.1453580. Dostupné z: <http://www.standardsingenomics.org/index.php/sigen/article/view/sigs.1453580>.
- [28] H. Marušincová, L. Husárová, J. Růžička, M. Ingr, V. Navrátil, L. Buňková a M. Koutný, „Polyvinyl alcohol biodegradation under denitrifying conditions“.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

PLA	Poly(lactid acid)
ROP	Ring opening polymeration
PBAT	Polybuthyleneadipe-co-terephthalate
PVA	Polyvinylalkohol
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
DNA	Deoxyribonucleic acid
CFU	Colony-forming unit
TAE	Tris-acetate-EDTA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
PCR	Polymerase chain reaction
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
UV	Ultraviolet
PS	Polystyren
SDS	Sodium dodecyl sulfate
LD-PE	Low density polyetylen

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1 Chemická struktura monomeru PLA</i> .....	14
<i>Obr. 2 Chemická struktura laktidu</i> .....	14
<i>Obr. 3 Chemická struktura PBAT</i> .....	15
<i>Obr. 4 Teplotní charakteristika biochemických přeměn kompostovaného materiálu [9, s. 21]</i> .....	18
<i>Obr. 5 Projasněné zóny kolem kolonií <i>Amycolatopsis sp. HT-32 (A)</i> [23, s. 1638]; snímek <i>Amycolatopsis sp. K104-1</i>pořízený elektronovým mikroskopem (B) [24, s. 347]</i> .....	20
<i>Obr. 6 <i>Thermomonospora curvata</i>: A – kolonie s projasněnými zónami na kultivační půdě obsahující PBAT [9, s. 74]; B – snímek pořízený elektronovým mikroskopem [27, s. 4]</i> .....	20
<i>Obr. 7 Křížový roztěr (A); roztěr pro nárůst biomasy (B)</i> .....	28
<i>Obr. 8 Kultivační půda obsahující PLA po křížovém roztěru</i> .....	37
<i>Obr. 9 Znázornění projasněné zóny kolem kolonie bakteriálního druhu <i>Thermomonospora curvata</i>: izolované z kompostu 1 (A); izolované z kompostu 2 (B)</i> .....	38
<i>Obr. 10 Kultivační půda obsahující usazenou suspenzi PBAT (A); kultivační půda obsahující homogenizovanou suspenzi PBAT (B)</i> .....	39
<i>Obr. 11 Bakteriální kultury izolované z kompostu 4 – bílé kolonie (A); hnědé kolonie (B)</i> .....	41

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1 Stanovené fyzikálně – chemické vlastnosti daných kompostů .....</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 2 Přehled počtu zaznamenaných kolonií s projasněnými zónami u různých směsí kompostu 4.....</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 3 Počty kolonií degradačních mikroorganismů jednotlivých vzorků kompostů .....</i>	<i>43</i>

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I

## PŘÍLOHA P I: SEKVENCE NUKLEOTIDŮ DNA IZOLOVANÝCH MIKROORGANISMŮ

- sekvence nukleotidů DNA mikroorganismu izolovaného z kompostu 1  
(vykazujícího blízkou příbuznost druhu *Thermomonospora curvata*)

GGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCTTGT  
CGCGTCTGTTCGTGAAAGCCCACGGCTTAACCGTGGGTTTGCGGTGGATACGGG  
CAGGCTAGAGGCAGGTAGGGGAGCATGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG  
CGCAGATATCGGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTGCTCTGGGCCTGTTCT  
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
TCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTTCTTCCACGGATTCCGCG  
CCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA  
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATT  
CGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCACCCGAAAACCTGCAG  
AGATGCAGGGTCCCTTCGGGGGCGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAG  
CTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCC  
ATGTTGCCAGCGGGTTATG

- sekvence nukleotidů DNA mikroorganismu izolovaného z kompostu 2  
(vykazujícího blízkou příbuznost druhu *Thermomonospora curvata*)

GAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCCCTTTCAGCACCGACGAATGAAGGACGGTAG  
GTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCTTGT  
CGCGTCTGTTCGTGAAAGCCCACGGCTTAACCGTGGGTTTGCGGTGGATACGGG  
CAGGCTAGAGGCAGGTAGGGGAGCATGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG  
CGCAGATATCGGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTGCTCTGGGCCTGTTCT  
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
TCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTTCTTCCACGGATTCCGCG  
CCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA  
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGGAGCATGTTGCTTAAT  
TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCACCCGAAAACCTGCA  
GAGATGCAGGGTCCCTTCGGGGGCGGGTG

- sekvence nukleotidů DNA mikroorganismu izolovaného z kompostu 4  
(vykazujícího blízkou příbuznost druhu *Thermobispora bispora*)

AAGTTGACGTGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACACTACGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTCATTGGGCGTAAAG  
AGCTCGTAGGCGGCCTGCCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT  
GGGTCTGCGGCGGATACGGGCGGGCTTGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAA  
TTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC  
GAAGGCGGCTTGCTGGGCCAGTCCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG  
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCT  
GGGTGTGGGGGCTTTCCGCGGTTCCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGCGC  
CCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACACTCAAAGGAATTGACGGG  
GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGATGCAACGCGAAGA  
ACCTTACCAAGGTTTGACATGCTGGGAAATCCCGCAGAGATGCGGGGTGCC  
TTCGGGCGCCTGGCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA  
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGTAACCC

- sekvence nukleotidů DNA mikroorganismu izolovaného z kompostu 4  
(vykazujícího blízkou příbuznost druhu *Actinomadura rubrobrunea*)

GCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCA  
GCGGGGACGAAGCCTCTTTTGGGGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCG  
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCC  
GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCGGATGTGA  
AAGCCCACGGCTTAACTGTGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGACTAGAGGC  
AGGTAGGGGAGCATGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC  
GGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTGCTCTGGGCCTTGCCTGACGCTG  
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  
GCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTTCTTCCACGGATTCCGCGCCG  
TAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA  
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTA  
ATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCACCCGAAAACC  
TGCAGAGATGTGGG