

Vliv přídatných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu

Bc. Petr Zeman

Diplomová práce
2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

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

Téma práce: **Vliv přídavných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na novější práce o mikrobiálním rozkladu polyvinylalkoholu a na práce popisující symbiosu mikroorganismů při biodegradaci cizorodých látek. 2. Ověřte význam snadno rozložitelných substrátů při biodegradaci polyvinylalkoholu (PVA). 3. Ověřte vliv přídavků vybraných látek nebo směsí na rozklad PVA mikroorganismy. 4. Získané výsledky přehledně zpracujte a zhodnoťte význam dosažených výsledků pro technickou praxi.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí


Datum zadání diplomové práce:

5. února 2007

Termín odevzdání diplomové práce:

25. května 2007

Ve Zlíně dne 1. února 2007


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




doc. Ing. Jaromír Hoffmann, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

V práci byl studován vliv přítomnosti dalších látek na biodegradaci polyvinylalkoholu neadaptovaným aktivovaným kalem. Úbytek koncentrace PVA byl měřen jodometricky a pomocí měření koncentrace rozpuštěných organických látek. Nejrychleji probíhala biodegradace polyvinylalkoholu v případě, že byl polyvinylalkohol pro PVA degradační bakterie jediným dostupným substrátem. V přítomnosti dalších organických látek byla degradace polyvinylalkoholu zpomalena, pravděpodobně proto, že PVA degraduující kultury byly ovlivňovány jinými heterotrofními bakteriemi.

Klíčová slova: Biodegradace, polyvinylalkohol, neadaptovaný aktivovaný kal, trypton, sacharosa, sekundární alkoholy, PQQ.

ABSTRACT

Effect of additional materials on biodegradation of polyvinyl alcohol by unacclimated activated sludge has been studied. Decrease of PVA concentration has been measured by iodometric method and by measuring of dissolved organic carbon concentration. Biodegradation of polyvinyl alcohol proceeded the most quickly in case where PVA was the only substrate. Biodegradation has been slowed down when another organic compounds was present in blend. It was probably caused by the growth of heterotrophic bacteria influencing PVA degrading cultures.

Keywords: Biodegradation, polyvinyl alcohol, unacclimated activated sludge, tryptone, sucrose, secondary alcohols, PQQ.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat zvláště svému vedoucímu RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Tereze Václavkové za cenné rady a připomínky, které mi pomohly k vypracování této práce. Oba jsou to lidé, se kterými je radost pracovat. Dále patří mé poděkování celému kolektivu Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za vytvoření výborných pracovních podmínek, rodině, přátelům a kolegům za všestrannou pomoc při studiu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval.

Ve Zlíně dne 25. 5. 2007

.....

Petr Zeman

OBSAH

ÚVOD	9
I. LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
1 POLYVINYLALKOHOL	10
1.1 CHARAKTERISTIKA	10
1.2 VÝROBA	10
1.3 POUŽITÍ	11
2 BIODEGRADACE POLYVINYLALKOHOLU	12
2.1 MECHANISMUS BIODEGRADACE	12
2.2 BIODEGRADACE POLYVINYLALKOHOLU JEDINOU KULTUROU	14
2.3 SYMBIOTICKÁ BIODEGRADACE POLYVINYLALKOHOLU	15
2.4 PYRROLOCHINOLINOCINON (PQQ).....	15
2.5 KOMETABOLISMUS	18
3 SYMBIOTICKÁ BIODEGRADACE CIZORODÝCH LÁTEK	20
3.1 PŘEDÁVÁNÍ RŮSTOVÝCH FAKTORŮ.....	20
3.2 ODSTRAŇOVÁNÍ HROMADÍCÍCH SE TOXICKÝCH MEZIPRODUKTŮ	21
3.3 SEKVENČNÍ BIODEGRADACE	21
3.4 SPOLUPRÁCE ZALOŽENÁ NA SHLUKOVÁNÍ.....	22
3.5 ZVYŠOVÁNÍ PŘÍSTUPNOSTI MIKROORGANISMŮ K DEGRADOVANÉ LÁTCE.....	22
4 VÝSLEDKY PŘEDCHÁZEJÍCÍCH DIPLOMOVÝCH PRACÍ	23
5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	24
II. METODICKÁ ČÁST	25
6 ROZTOKY, ŽIVNÁ MEDIA, CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL	25
6.1 ROZTOKY	25
6.2 ŽIVNÁ MÉDIA.....	29
6.3 CHEMIKÁLIE	31
6.4 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	31
7 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY	33
7.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	33
7.2 LABORATORNÍ POMŮCKY	33
8 PRACOVNÍ POSTUPY	34

8.1	MĚŘENÍ PH VE VODNÝCH VZORCÍCH	34
8.2	ODSTRANĚNÍ BUNĚK CENTRIFUGACÍ.....	34
8.3	JODOMETRICKÉ STANOVENÍ KONCENTRACE PVA NA MIKROTITRAČNÍCH DESTIČKÁCH	34
8.4	MĚŘENÍ KONCENTRACE ROZPUŠTĚNÉHO UHLÍKU (DOC).....	35
8.5	DEGRADAČNÍ LAHVOVÉ TESTY	35
8.6	DEGRADAČNÍ TESTY VE VIALKÁCH.....	36
8.7	KONZERVACE BAKTERIÁLNÍCH KONSORCIÍ.....	36
8.8	IZOLACE KULTURY Ž1	37
8.9	PŘÍPRAVA PŮDNÍHO VÝLUHU.....	37
III.	VÝSLEDKY A DISKUSE	38
9	ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA TRVALÉ PŘÍTOMNOSTI DOSTUPNÝCH SUBSTRÁTŮ	38
9.1	DŮVOD NASAZENÍ	38
9.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	38
9.3	VÝSLEDKY POKUSU	39
10	ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK	42
10.1	DŮVOD NASAZENÍ	42
10.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	42
10.3	VÝSLEDKY POKUSU	43
11	ZKOUŠKY MOŽNOSTÍ URYCHLENÍ ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA PŘÍTOMNOSTI ŽIVIN	48
11.1	DŮVOD NASAZENÍ	48
11.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	48
11.3	VÝSLEDKY POKUSU	49
12	ZKOUŠKY Vlivu ŽIVIN TRYPTONU A SACHAROSY NA RŮST PVA DEGRADAČNÍCH KULTUR	54
12.1	DŮVOD NASAZENÍ	54
12.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	54
12.3	VÝSLEDKY POKUSU	54
13	ZKOUŠKY Vlivu PŘÍTOMNOSTI DALŠÍCH MIKROORGANISMŮ NA RŮST PVA DEGRADAČNÍCH KULTUR.....	56

13.1	DŮVOD NASAZENÍ	56
13.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	56
13.3	VÝSLEDKY POKUSU	56
14	ZKOUŠKY RŮSTU PVA DEGRADAČNÍCH KULTUR NA SUBSTRÁTECH PVA, SACHAROSE A TRYPTONU.....	57
14.1	DŮVOD NASAZENÍ	57
14.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	57
14.3	VÝSLEDKY POKUSU	57
15	ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK II	58
15.1	DŮVOD NASAZENÍ	58
15.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	58
15.3	VÝSLEDKY POKUSU	59
16	ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI Ž1 A OT2.....	62
16.1	DŮVOD NASAZENÍ	62
16.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	62
16.3	VÝSLEDKY POKUSU	63
17	BIODEGRADACE PVA PŮDNÍM VÝLUHEM.....	67
17.1	DŮVOD NASAZENÍ	67
17.2	ROZVRŽENÍ POKUSU	67
17.3	VÝSLEDKY POKUSU	68
IV.	ZÁVĚR.....	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	77
	SEZNAM OBRÁZKŮ	78
	SEZNAM TABULEK.....	79

ÚVOD

Dnešní společnost je závislá na neustálém technologickém pokroku, který přináší vyšší životní úroveň obyvatel Země a rozšiřuje poznání našeho okolního prostředí a vesmíru.

Rozvoj technologií jde však ruku v ruce s růstem množství vyprodukovaných odpadů, které jsou různými cestami znovu využívány nebo zpracovávány, přesto však množství a rozmanitost produkovaných odpadů neustále roste, a tak se různé odpadní látky hromadí v prostředí.

Jednou z cest zneškodnění těchto hromadících se odpadních látek, je použití mikroorganismů, které jsou schopny některé odpadní látky využívat ke svému životu jakožto zdroj uhlíku a/nebo energie a jsou tedy nejvýznamnějším prostředkem rozkladu materiálů. Tato skutečnost se dnes odráží na velkém zájmu o studium těchto mikrobiálních kultur a mechanismů biodegradace obecně.

Problematika biodegradability látek v různých prostředích je na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí již dlouhou dobu studována, přičemž velká pozornost je věnována zvláště studiu možností degradace polymerních látek, jejichž produkce a využívání celosvětově neustále stoupá.

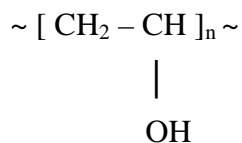
Cílem této diplomové práce je pokračovat ve zkoumání biodegradability polyvinylalkoholu (PVA), což je jeden z ve vodě rozpustných syntetických polymerů a soustředit se přitom na vliv přídavku dalších látek a zvláště pak živin k degrační směsi na biodegradaci polyvinylalkoholu.

I. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1 POLYVINYLALKOHOL

1.1 Charakteristika

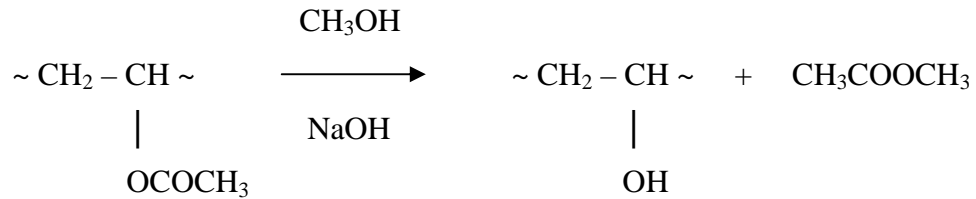
Polyvinylalkohol (PVA, PVAL, PVOH) je polární, syntetický polymer, rozpustný ve vodě a v kyselinách, nerozpustný v tucích či organických rozpouštědlech. Rozpustnost PVA ve vodě je závislá na jeho stupni polymerace a stupni hydrolyzy a obvykle se lépe rozpouští za vyšších teplot. Vyskytuje se ve formě prášku bílé barvy a jeho vlastnosti do značné míry ovlivňuje jeho čistota. Nejčastěji má strukturu 1,3-glykolu viz obrázek (Obr. 1) s obvykle minimálně cca 12 % acetátových skupin jakožto nečistot podle podmínek při jeho výrobě. Při obsahu 20 % acetátových skupin je to termoplast s tendencí ke krystalizaci použitelný na výrobu vláken. [1-3]



Obr. 1. Vzorec PVA

1.2 Výroba

Narozdíl od většiny vinyl polymerů není PVA připravován polymerací jemu odpovídajícího monomeru [1, 2], protože vinylalkohol isomeruje na stabilní acetaldehyd. Místo toho se vyrábí alkoholýzou polyvinylacetátu (PVAc) viz obrázek (Obr. 2). V kyselém prostředí reakce probíhá pomaleji než v zásaditém a navíc vznikají nežádoucí éterové vazby při reakci dvou sousedních -OH skupin. Při reakci se také dá ovlivnit stupeň přeměny acetátových skupin na -OH skupiny a tím ovlivňovat vlastnosti produktu.



Obr. 2. Mechanismus výroby PVA z PVAc [1]

1.3 Použití

Rozpustnosti PVA ve vodě se často využívá ke konečné úpravě vzhledu papíru a textilu (přičemž z těchto technologií odcházejí odpadní vody značně znečištěné PVA), při jeho použití jako zahušťovadlo, pro impregnaci, škrobíci přípravky či stabilizátory suspenzní polymerace.

Významné je také použití PVA na vlákna připravená zvlákňováním z vodního roztoku do roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a orientací. Vlákna PVA mají vysokou rozměrovou stálost, snadno se perou i suší, tepelnou stálost mají do cca 140 °C. Je také možno dosáhnout jejich nerozpustnosti ve vodě úpravou teplem či formaldehydem.

Kromě dalších možností použití např. na vlákna chirurgických nití apod. je PVA také surovinou pro výrobu polyvinylacetalů, z nichž polyvinylbutyral se používá jako mezivrstva bezpečnostních skel a polyvinylformal pro svou odolnost vůči oděru a stárnutí pro nátěrové hmoty a elektrolaky.

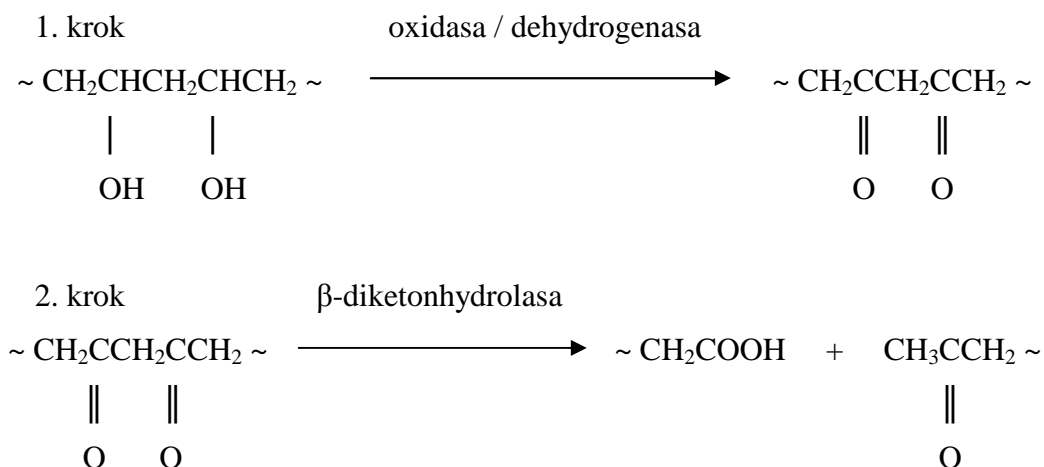
2 BIODEGRADACE POLYVINYLALKOHOLU

Z polymerů s čistě uhlíkatým řetězcem podléhá biodegradaci pouze PVA [4], ostatní polymery s uhlíkatým řetězcem jako polyethylen, polypropylén aj. jsou téměř mikrobiálně nerozložitelné. Pro rozklad PVA je klíčová přítomnost –OH skupiny na každém druhém uhlíku, ale i tak probíhá za specifických podmínek (téměř výhradně ve vodách, neprobíhá v půdách, velmi pomalý je rozklad v anaerobním prostředí a jen částečný při kompostování) a za účasti specifických mikroorganismů.

Lenz [5] udává, že na biodegradaci PVA se může podílet nejméně 55 druhů mikroorganismů – bakterií, hub, kvasinek i plísní. Mikroorganismy schopné degradovat PVA tedy existují, ale nejsou právě běžné.

2.1 Mechanismus biodegradace

Obecně se předpokládá [6], že mechanismem biodegradace PVA je náhodné štěpení uhlíkaté kostry, které probíhá ve dvou krocích. První krok představuje buď oxidační nebo dehydrogenační reakci dvou sousedních hydroxylových skupin v 1,3-glykolové struktuře PVA na β -diketon. Tato reakce je podle svého typu katalyzována buďto oxidasou nebo PVA-dehydrogenasou. Druhým krokem je rozštěpení řetězce PVA v místě mezi oběma ketonovými skupinami za vzniku dvou kratších polymerů. Tento druhý krok je katalyzován β -diketonhydrolasou - viz obrázek (Obr. 3).



Obr. 3. Mechanismus enzymatického rozkladu PVA [6]

Probíhá-li první krok biodegradace PVA za katalýzy oxidasou, spotřebovává se kyslík a uvolňuje se H_2O_2 , který je toxický. Kultura provádějící rozklad tedy potřebuje katalasu, aby mohla toxický H_2O_2 odstraňovat. Pokud však degradační kultura tento enzym nemá, je pro ni výhodné mít symbiotického partnera, který jí buďto katalasu poskytne nebo odstraní samotný H_2O_2 [7].

Při průběhu prvního degradačního kroku přes dehydrogenaci využívá PVA-dehydrogenasa většiny degradačních bakterií, které byly doposud popsány, jako koenzym pyrrolochinolinochinonu (PQQ), který se v průběhu reakce redukuje na PQQH₂ [8].

Lenz [5] udává, že oba kroky mohou také proběhnout čistě chemickou oxidací bez enzymové katalýzy, pokud jsou v prostředí dostupné hydroxylové radikály, jak to ukazuje obrázek (Obr. 4). Hydroxylové radikály mohou být produkovány buď peroxidasami rozkláda-

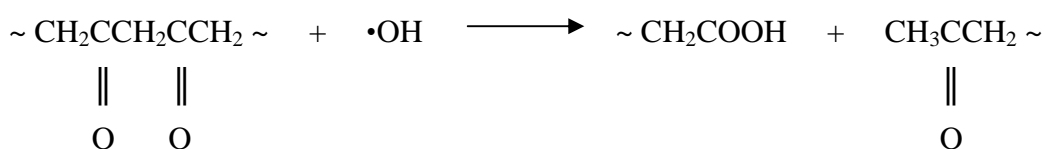
1. krok a)



1. krok b)



2. krok



Obr. 4. Mechanismus rozkladu PVA pomocí hydroxylových radikálů [6]

jícími H_2O_2 nebo za použití tzv. Fentonova činidla, tedy směsi FeSO_4 a H_2O_2 reagující podle rovnice na obrázku (Obr. 5) [9].



Obr. 5. Tvorba hydroxylových radikálů pomocí Fentonova činidla [9]

2.2 Biodegradace polyvinylalkoholu jedinou kulturou

Detailnější výzkumy cest biodegradace PVA začaly počátkem sedmdesátých let dvacátého století [10]. Suzuki a spolupracovníci [11-13] izolovali druh *Pseudomonas borealis* O-3 z půdy. Tato bakterie vytvářela a vylučovala enzym, který degradoval PVA a kultura O-3 následně mohla využívat produkty této degradace jako výhradní zdroj uhlíku. Tento enzym byl dále izolován a identifikován jako PVA-oxidasa. Byl také navržen mechanismus enzymatického rozkladu PVA viz obrázek (Obr. 3) - první krok katalyzován PVA-oxidasou.

Watanabe a spolupracovníci také publikovali několik prací [14-16] založených na studiu enzymatických reakcí degradace vysokomolekulárního PVA. Nakonec izolovali extracelulární PVA degradující enzym ze supernatantu kultury *Pseudomonas* získané z půdy. Podle spotřeby kyslíku, tvorby H_2O_2 a degradace některých nízkomolekulárních sekundárních alkoholů byl tento enzym identifikován jako oxidasa sekundárních alkoholů (SAO – secondary alcohol oxidase). Široké rozpětí nízkomolekulárních produktů degradace PVA bylo vysvětlováno náhodným štípáním polymerního řetězce. Takto získaná SAO byla také schopna katalyzovat oxidaci některých β -ketonů a oligomerů vinylalkoholu. Na základě experimentů byl odvozen mechanismus enzymatického rozkladu PVA hodně podobný tomu Suzukiho viz obrázek (Obr. 3) - první krok katalyzován SAO. Jediným rozdílem byla vlastně identifikace enzymu katalyzujícího první reakci.

Další způsob degradace PVA popsali např. Matsumura s kolektivem [17]. Studie byla provedena na bakteriální kultuře *Alcaligenes faecalis* KK314 získané z říční vody. Autoři izolovali enzym PVA-dehydrogenasu (PVADH), která v přítomnosti kofaktorů PQQ a CaCl_2 katalyzovala přeměnu PVA na β -hydroxyketon bez jeho další přeměny na β -diketon. β -hydroxyketon byl následně pomocí aldolasy štěpen na další produkty.

2.3 Symbiotická biodegradace polyvinylalkoholu

První symbiotickou biodegradaci PVA popsal Shima o s kolektivem [18]. Výzkumy byly prováděny na dvojici PVA degradujících kultur rodu *Pseudomonas* – *Pseudomonas putida* VM15A a *Pseudomonas* VM15C. Bylo zjištěno, že jedna kultura produkuje degradační enzym a druhá dodává potřebný kofaktor, přičemž první kultura nebyla schopna rozkládat PVA samostatně, ale pouze v kontaktu s kulturou druhou. Další studie [8, 19] prokázaly, že principem symbiózy je cross-feeding PQQ z VM15A k VM15C.

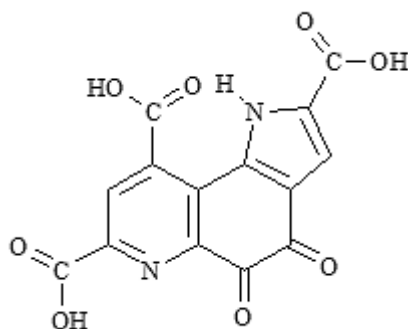
Jiný typ symbiózy zaznamenali Mori a spolupracovníci [20], kteří izolovali smíšenou kulturu obsahující *Bacillus megaterium* BX1 z aktivovaného kalu. Smíšená kultura prováděla degradaci PVA ve dvou oddělených krocích. Během první růstové fáze bylo PVA částečně degradováno, po následující lagové fázi následovala druhá růstová fáze, kdy kultura využila produktů degradace z první růstové fáze. V pokusech s čistou kulturou *Bacillus megaterium* BX1 docházelo pouze k jejímu omezenému růstu a minimální degradaci PVA, významná degradace nastala teprve v přítomnosti Gram pozitivní tyčinkovité bakterie získané z původní směsné kultury, tato bakterie samotná však nebyla schopna degradace PVA. PVA tedy byl degradován pouze v symbióze dvou bakteriálních druhů, symbiotický vztah však nebyl spojen s cross-feedingem PQQ, jehož přídavek neměl vliv na zvýšení biodegradability PVA samotnou kulturou *Bacillus megaterium* BX1.

Další PVA degradující enzym byl produkován do okolí kulturou *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH [21, 22] a to i bez přímého kontaktu s PVA. Tato bakterie byla izolována spolu se dvěma dalšími z aktivovaného kalu a vyžadovala pro svůj růst thiamin jako růstový faktor a aminokyseliny jako cystin, isoleucin a tyrosin k vyvolání PVA degradační aktivity. Tyto látky ji byla schopná zajistit kultura rodu *Flavobacterium*, která podpořila růst kultury *Pseudomonas*, avšak nebyla sama schopna degradovat PVA. Zvýšení produkce PVA degradujícího enzymu bylo s úspěchem provedeno přidavkem PVA ke kultuře.

2.4 Pyrrolochinolinochinon (PQQ)

PQQ (Obr. 6) je nekovalentně vázaná prostetická skupina mnoha chinoproteinů. Chinoproteiny byly ve větší míře zaznamenány v periplasmě Gram negativních bakterií (prakticky však jen u α -, β -, γ -Proteobakterií) [23, 24], kde většinou katalyzují oxidační reakce alko-

holů a sacharidů, mimo jiné se také podílí na katalýze přeměny PVA na β -hydroxyketon pomocí PVA-dehydrogenasy v prvním kroku biodegradace PVA [17].



Obr. 6. Chemická struktura PQQ

Pojem chinoprotein dříve souhrnně označoval početnou skupinu jak bakteriálních, tak savčích enzymů, které obsahovaly jako kofaktor PQQ [25]. Současné výzkumy [26] však přicházejí na to, že některé chinoproteiny mohou nést i jiné kofaktory než je PQQ. Dvě desetiletí zabralo, než byla identifikována chemická struktura PQQ [24], od té doby již bylo identifikováno více než dvacet enzymů, které nesou PQQ nebo podobný kofaktor jako svou prostetickou skupinu. Konkrétní příklady některých enzymů nesoucích PQQ jako svou prostetickou skupinu ukazuje tabulka (Tab. 1) [24].

Van Kleef a Duine [27] určili složení chinoproteinů a obsah PQQ pro několik bakterií a objevili několik faktorů významných pro tvorbu PQQ. Pro syntézu chinoproteinů a PQQ není pro bakterie podstatná přítomnost chinoproteinových substrátů, syntéza chinoproteinů nezávisí na tvorbě PQQ, naopak tvorba PQQ neprobíhá, pokud zároveň nenastane syntéza chinoproteinů. Syntéza chinoproteinů je závislá na nárůstu bakterií, avšak nejvyšších produkcí PQQ lze dosáhnout i za omezených růstových podmínek. Gram negativní methylotrófové nesyntetizují PQQ pouze k tomu, aby jím vybavili své chinoproteinové apoenzymy, ale také jej vylučují do prostředí viz tabulka (Tab. 2). Tento jev byl také pozorován u bakterií rostoucích na ethanolu jako jsou např. bakterie rodu *Pseudomonas* nebo octové bakterie, které jsou zodpovědné za značné množství PQQ v octu.

Tab. 1. Klasifikace a charakterizace některých chinoproteinů [24]

Enzym	Prostetická skupina	Kultura
Glukoso dehydrogenasa (s-GDH)	PQQ	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Methanol dehydrogenasa (MDH)	PQQ	Methylotrofové
Alkohol dehydrogenasa (Typ I ADH)	PQQ	rod <i>Pseudomonas</i>
Alkohol dehydrogenasa (Typ II ADH)	PQQ/hem c	rod <i>Pseudomonas</i> , např. <i>Pseudomonas putida</i> HK5 <i>Comamonas testosteroni</i> <i>Ralstonia eutropha</i> <i>Rhodopseudomonas acidophila</i>
Alkohol dehydrogenasa (Typ III ADH)	PQQ/hem c/3 hemy c	rod <i>Acetobacter</i> rod <i>Gluconobacter</i>

Podstatným faktem je pak také to, že přítomnost aminokyselin, popř. dalších zdrojů uhlíku a energie obsahujících aminokyseliny (jako pepton či kvasničný autolyzát) v prostředí kultivace vede ke snížení obsahu PQQ v systému vlivem transformace PQQ na biologicky neaktivní látku. Např. byla-li kultura rodu *Pseudomonas* kultivována na ethanolu v přítomnosti 1 % peptonu, bylo detekováno méně než 10 % očekávaného množství PQQ [28].

Tab. 2. Extracelulární produkce PQQ některými bakteriemi [27]

Kultura	Zdroj uhlíku	Typ chinoproteinů	Extracelulární produkce PQQ [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
<i>Pseudomonas stutzeri</i> *	Alkoholy	ADH	2
<i>Pseudomonas putida</i> biovar B*	Alkoholy	ADH	2-3
<i>Hyphomicrobium</i> X*	Methanol	MDH	3-6
<i>Methylobacterium organophilum</i> XX*	Methanol	MDH	2-8
<i>Pseudomonas stutzeri</i> **	Alkoholy	ADH	4-10
<i>Pseudomonas putida</i> biovar B**	Alkoholy	ADH	3-6
<i>Nocardia</i> druh 239**	Methanol	MDH	6

* - Vsádková kultivace; ** - Kontinuální kultivace; ADH - Alkohol dehydrogenasa; MDH - Methanol dehydrogenasa

2.5 Kometabolismus

PVA je syntetický polymer používaný od 20. století. Přesto existuje hodně mikroorganismů schopných PVA degradovat. To znamená, že se u nich buďto vytvořily zcela nové enzymy nebo tyto mikroorganismy využívají upravených nebo i neupravených alkohol oxidas popř. dehydrogenas, které jsou u bakterií široce rozšířené. Nabízí se tedy teoretická možnost urychlení degradace PVA pomocí jiných alkoholových substrátů, které by iniciovaly tvorbu potřebných enzymů.

Tab. 3. Substrátová specifita PVA-oxidasy izolované z kultury *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH [29]

Substrát	Relativní aktivita* [%]
PVA	100
methanol	0
ethanol	0
1,4-butandiol	3,3
heptanol	0
dekanol	0
2-hexanol	65,4
2-heptanol	75,1
3-heptanol	68,8
4-heptanol	96,6
2-oktanol	82,9
4-dekanol	100
cyklohexanol	41,8

* relativní procentuální aktivita vztažena k aktivitě vůči PVA

Kawagoshi a Fujita [21, 22] pozorovali, že kultura *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH během degradace PVA uvolňuje H_2O_2 . Tento fakt naznačoval existenci PVA-oxidasy, která byla autory následně [29] izolována a dále studována. Enzym obsahoval železo v poměru Fe:protein 1:1 (mol/mol) a byla prověřena jeho aktivita vůči čteným substrátům obsahujícím hydroxylové skupiny viz tabulka (Tab. 3). Enzym se vyznačoval aktivitou k několika sekundárním alkoholům, zvláště k sekundárním alkoholům s dlouhým

řetězcem jako 4-heptanol, 2-oktanol či 4-dekanol, vykazoval také relativně silnou aktivitu k cyklohexanolu.

Stejní autoři později [30] izolovali enzym 2,4-pentadion hydrolasu rovněž z kultury *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH. Tento enzym, když byl nasazen v kombinaci s PVA-oxidase, urychloval degradaci PVA hydrolyzou produktů vzniklých v prvním kroku biodegradace PVA oxidací PVA pomocí PVA-oxidasy.

Shimao a spolupracovníci [31] izolovali enzym PVA-dehydrogenasu z kultury *Pseudomonas* VM15C. Enzym vyžadoval pro dehydrogenaci PVA přítomnost PQQ a vykazoval aktivitu zvláště k sekundárním alkoholům, např. 101 % vůči 2-hexanolu a 91 % vůči 4-heptanolu (při porovnání s aktivitou vůči PVA).

Julinová s kolektivem [32] sledovala vliv přídavku Hykolu a sekundárních alkoholů (jmenovitě 2,4-pentadiolu) na biodegradaci PVA aktivovaným kalem adaptovaným na PVA. Největšího (až dvojnásobného) urychlení degradace PVA dosáhla autorka s nejnižší koncentrací přidaných sekundárních alkoholů v systému, kdy poměr jednotlivých složek PVA:Hykol:SA činil 1:1:1.

Dřímál a spolupracovníci [33] studovali biologickou rozložitelnost různě hydrolyzovaného PVA půdními mikroorganismy. Samotné půdní inokulum bylo schopno po šestnácti dnech degradovat PVA z desíti procent, avšak jediný přídavek PQQ a vybraných sekundárních alkoholů (2-hexanol, 2-heptanol, 2,4-pentadiol) o koncentraci každého $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ způsobil za osm dní testu nárůst degradace až na 33 % vlivem indukce oxidasy sekundárních alkoholů. Autor předpokládá, že by ještě vyšší biodegradace mohla být dosažena opakovaným přídavkem sekundárních alkoholů k degradační směsi.

3 SYMBIOTICKÁ BIODEGRADACE CIZORODÝCH LÁTEK

Vzhledem k tomu, že se nebiodegradovatelné látky hromadí v prostředí, projevuje se dnes tendence tomuto hromadění předcházet. Mikroorganismy jsou schopny některé odpadní látky využívat ke svému životu jako zdroj uhlíku a nebo energie a jsou tedy nejvýznamnějším prostředkem rozkladu materiálů, což se odráží na velkém zájmu o studium mikrobiálních kultur a mechanismů biodegradace sloučenin.

Některé látky mohou být (za určitých podmínek) rozkládány i čistými mikrobiálními kulturami, mnohem běžnější je však jev, kdy se na rozkladu podílí kultur více a mnohdy je to dokonce nutné [34]. Např. určité mikroorganismy mohou rozkládat rozličné druhy polyakrylátu sodného (PSA) a mnohé z nich jsou symbiotické nebo žijí v konsorciích [35]. Kultura s bakteriálním konsorciem s označením L7-B složená ze tří různých druhů bakterií je tak např. schopna za dva týdny degradovat 73 % PSA s průměrnou molární hmotností kolem 1000, 49 % PSA s průměrnou molární hmotností 1500 a 20 % PSA s průměrnou molární hmotností 4000 [36].

Studujeme-li symbiotickou biodegradaci PVA, je pravděpodobné, že některé principy symbiomy PVA degradujících bakterií dosud nebyly objeveny a tedy ani popsány. Dá se však předpokládat, že pokud takovéto neobjevené vztahy existují, nebude se jednat o zcela nový princip symbiomy, ale spíše se bude využívat některého principu pozorovaného u symbiotické degradace jiných cizorodých látek než je polyvinylalkohol. Z tohoto důvodu může být užitečné zmapovat možné principy symbiotických vztahů obecně a předpokládat jejich možné uplatnění i v případě biodegradace PVA.

Důvodů pro spolupráci mikroorganismů je více – od sdílení potřebných růstových faktorů, přes odstraňování toxických meziproduktů, až např. po sekvenční biodegradace, kdy každá kultura uskutečňuje jeden stupeň celkového rozkladu. V symbiotických vztazích také nemusí docházet pouze k uplatnění jen jednoho mechanismu spolupráce, organismy mohou naráz využít i kombinace dvou či více z nich.

3.1 Předávání růstových faktorů

Tato forma spolupráce se může projevit buď formou komenzalismu – jeden organismus produkuje růstový faktor (např. živiny, vitaminy, některé aminokyseliny či jiné růstové

faktory), který vyžaduje degradující organismus ke svému růstu nebo formou mutualismu, kdy je předávání růstových faktorů vzájemné. Předávání růstových faktorů (tzv. cross-feeding) mezi bakteriálními druhy se často uplatňuje v přirozených procesech či v aktivovaném kalu [34].

3.2 Odstraňování hromadících se toxických meziproductů

V průběhu biodegradčních procesů se často v prostředí hromadí meziproducty rozkladu [34]. Problém může nastat, pokud tyto vznikající meziproducty budou toxické – v takovém případě začíná nabývat na významu přítomnost další kultury, která je schopna tuto toxickou látku odbourat, přičemž se zvyšující se koncentrací toxické látky v prostředí také vzrůstá potřeba po symbiotickém organismu, který by tuto látku rozkládal, ale zároveň také může klesat schopnost takových mikroorganismů se s ní vypořádat. Jako příklad lze uvést rozklad polyethylen glykolu o vysoké molekulové hmotnosti (PEG 20 000) bakterií *Sphingomonas terrae* a jejími symbionty. Uvedený bakteriální druh je schopen uvolňování dvouuhlíkatých fragmentů od konců polymerních řetězců molekul PEG ve formě kyseliny glyoxylové. Ta je ovšem pro degradační kulturu nerozložitelná a toxická a proto rozklad uvedeného PEG je mnohem efektivnější při spoluúčasti symbiotických bakterií (*Rhizobium* sp., *Agrobacterium* sp. nebo *Methylobacterium* sp.) které dokáží tuto organickou kyselinu využít [4].

3.3 Sekvenční biodegradace

Mnohdy není jedna kultura samotná schopna provést kompletně celý rozklad dané látky [34], např. vzhledem k omezenému enzymovému vybavení nebo proto, že je schopna využít jen určitou část rozkládané molekuly látky. V takovém případě často nastupují sekvenční biodegradace, kdy buďto stejnou molekulu napadá několik různých druhů mikroorganismů v různých jejích částech, popř. jedna kultura provede první krok rozkladu, na ni naváže jiná kultura provádějící druhý krok rozkladu a celý proces probíhá tímto systémem dále až do doby, kdy je celá původní látka degradována nebo do doby, než vznikne dead-end produkt, tedy látka dále biologicky nerozložitelná. Příkladem sekvenční biodegradace je spolupráce plísně bílé hniloby (*Phanerochaete chrysosporium*) s půdními mikroorga-

nismy při rozkladu sesíťovaného polyakrylátu a kopolymeru polyakrylátu s polyakrylamidem v půdě [37]. Zatímco samotné půdní mikroorganismy nejsou schopny tyto dva polymery degradovat, tak naopak v přítomnosti plísně, která tyto polymery rozpouští a vytváří potřebné enzymy, jsou půdní mikroorganismy schopny tyto dva polymery a jejich degradační produkty významně mineralizovat.

3.4 Spolupráce založená na shlukování

Je to případ, kdy jedna kultura slouží jako nosič a další uskutečňuje biodegradaci. Příkladem této spolupráce je biodegradace polyethoxylovaných nonylfenolů, kterou provádějí společně tři druhy bakterií izolované z aktivovaného kalu dvou čistíren odpadních vod. Samotnou biodegradaci provádějí pouze dvě ze tří kultur a to *Acinetobacter* a *Stenothrophomonas*, třetí kultura (*Bacillus*) však v přítomnosti dvou předchozích navodí útvar nahromaděných buněk, čímž celou biodegradaci usnadní [38].

3.5 Zvyšování přístupnosti mikroorganismů k degradované látce

Příkladem tohoto symbiotického vztahu je biodegradace ropných sloučenin mikrobiálním konsorciem v přítomnosti rhamnolipidů, které produkuje *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Biodegradace ropných produktů je většinou limitovaná jejich nízkou mírou rozpustnosti ve vodě. Rhamnolipidy však způsobují emulgaci celé směsi a tím také zvyšují účinnost biodegradace celkových ropných uhlovodíků z 32 % na 61 % během desíti dnů, přičemž účinnost degradace některých konkrétních isoprenoidů vzrůstá ze 16 % na 70 % a u některých alkylovaných polyaromatických uhlovodíků z 9 % na 44 % [39].

4 VÝSLEDKY PŘEDCHÁZEJÍCÍCH DIPLOMOVÝCH PRACÍ

Autorka loňské diplomové práce, Martina Coufalíková [40], studovala podrobnosti o bakteriálním rozkladu PVA pomocí symbiotického páru bakterií OT3 a *Rhodococcus erythropolis*, z nichž kultura OT3 byla izolována v rámci jedné z předchozích diplomových prací Jiřím Riedlem z aktivovaného kalu čistírny odpadních vod v Otrokovicích a byla schopná degradovat PVA po přidavku PQQ a dalšího růstového faktoru obsaženého v kataláze, který jí dodávala kultura *Rhodococcus erythropolis*.

Autorka ve své práci prováděla růstové testy kultury OT3 a také hledala konkrétní látku, kterou jí kultura *Rhodococcus erythropolis* dodává ve formě katalázy. Postupně prováděla testy s různými složkami, z nichž je kataláza složena, tedy s aminokyselinami, NADPH a cytochromem c jakožto zdrojem hemu c. Autorce se podařilo vyloučit vliv aminokyselin i NADPH a potvrdit hem c jakožto hledaný růstový faktor.

V následující práci se autorka snažila nalézt kulturu OT3 symbiotického partnera, který by jí byl schopen dodávat oba potřebné růstové faktory – tedy jak PQQ, tak hem c. Autorka provedla sérii pokusů s mrtvou biomasou kultury *Acetobacter aceti* a zjistila, že i mrtvá biomasa této kultury je schopná kulturu OT3 dodat přírodní zdroj PQQ a hemu c - kultura OT3 byla ve směsi s mrtvou biomasou *Acetobacter aceti* srovnatelně účinná v degradaci PVA (PVA byl degradován z 64,5 % v průběhu 22 dní) jako kultura OT3 ve směsi s kulturou *Rhodococcus erythropolis* a přidavkem PQQ.

5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Testy biodegradace cizorodých látek jsou běžně prováděny za podmínek, kdy je zkoumaná cizorodá látka jediným dostupným substrátem. Prvním cílem této diplomové práce bylo ověřit, jak bude degradace PVA probíhat za přítomnosti jiných, mikroorganismům dobře dostupných substrátů, tedy za podmínek blíže odpovídajícím reálné čistírně odpadních vod (ČOV).

Druhým cílem bylo ověřit vliv některých dalších látek, jako např. sekundárních alkoholů, PQQ apod. na biodegradaci polyvinylalkoholu, v lepším případě nalézt způsob jejího urychlení.

Třetím cílem bylo ověřit kladný vliv přídavku PQQ a sekundárních alkoholů na biodegradaci polyvinylalkoholu v půdním výluhu a pokusit se opakovanými přídavky dosáhnout vyšší degradace.

II. METODICKÁ ČÁST

6 ROZTOKY, ŽIVNÁ MEDIA, CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Chemikálie použité v práci byly čistoty p.a. a není-li uvedeno jinak, pocházely od běžných dodavatelů laboratorních potřeb (LACHEMA, Penta).

6.1 Roztoky

Fyziologický roztok (FR)

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

Roztok A

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

Roztok B

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

Fyziologický roztok pufrovaný

Na 100 ml pufrovaného fyziologického roztoku bylo použito:

Fyziologický roztok.....	80 ml
Roztok A.....	2 ml
Roztok B.....	18 ml

Roztok stopových prvků

Bylo naváženo:

$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,043 g
H_3BO_3	0,057 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,043 g

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

Navážena množství látek byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody.

Minerální médium (MM)

Na přípravu 1000 ml minerálního média bylo použito:

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

Příprava jednotlivých složek minerálního média:

Roztoky solí

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

Každá sůl byla navážena zvlášť a rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

Minerální médium se zdvojenými a upravenými objemy roztoků fosforečnanů (MM2F)

Na přípravu 1000 ml MM2F bylo použito:

Roztok A.....	20 ml
Roztok B.....	180 ml

Destilovaná voda.....	750 ml
Roztok stopových prvků.....	2 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O (10 g·l ⁻¹).....	10 ml
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6 H ₂ O (3 g·l ⁻¹).....	10 ml
CaCl ₂ ·2 H ₂ O (1 g·l ⁻¹).....	10 ml
NaCl (50 g·l ⁻¹).....	10 ml
NH ₄ Cl (30 g·l ⁻¹).....	3 ml
KNO ₃ (56,7 g·l ⁻¹).....	7 ml

Příprava jednotlivých složek MM2F:

Roztoky solí

Stejně jako u MM, navíc:

KNO ₃	5,67 g
------------------------	--------

Sůl byla navážena a rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

Minerální médium se ztrojenými a upravenými objemy roztoků fosforečnanů (MM3F), dvakrát koncentrované

Na přípravu 100 ml MM3F bylo použito:

Roztok A.....	6 ml
Roztok B.....	54 ml
Destilovaná voda.....	30 ml
Roztok stopových prvků.....	0,4 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O (10 g·l ⁻¹).....	2 ml
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6 H ₂ O (3 g·l ⁻¹).....	2 ml
CaCl ₂ ·2 H ₂ O (1 g·l ⁻¹).....	2 ml
NaCl (50 g·l ⁻¹).....	2 ml
NH ₄ Cl (30 g·l ⁻¹).....	0,6 ml
KNO ₃ (56,7 g·l ⁻¹).....	1,4 ml

Zásobní roztok živin tryptonu a sacharosy (TS)

Bylo naváženo:

Trypton (HIMEDIA, Indie).....	6 g
Sacharosa.....	4 g

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

Zásobní roztok tryptonu (T)

Bylo naváženo:

Trypton (HIMEDIA, Indie).....	10 g
-------------------------------	------

Navážené množství tryptonu bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody a roztok byl vysterilizován při 125 °C po dobu 20 minut.

Zásobní roztok sacharosy (S)

Bylo naváženo:

Sacharosa.....	10 g
----------------	------

Navážené množství sacharosy bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody a roztok byl vysterilizován při 125 °C po dobu 20 minut.

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

PQQ (Methoxatin FLUKA).....	2 mg
------------------------------	------

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

Roztok kyseliny borité ($40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)

Bylo naváženo 40 g H_3BO_3 a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody.

Roztok jodu s jodidem draselným

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

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

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

6.2 Živná média***Agar pro kultivaci Acetobacter aceti***

Bylo naváženo:

Kvasničný extrakt.....	0,5 g
Trypton (HIMEDIA, Indie).....	0,3 g
Mannitol.....	2,5 g
Agar.....	1,8 g

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

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

Na přípravu 100 ml bylo použito:

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

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

PVA agar s PQQ a TS (koncentrace PVA 2 g*l⁻¹)

Na přípravu 100 ml bylo použito:

Základ pro minerální agar	1,9 g
Destilovaná voda.....	100 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
PVA.....	0,2 g
Zásobní roztok PQQ.....	0,02 ml
Zásobní roztok živin tryptonu a sacharosy.....	0,5 ml

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

PVA agar s PQQ a trojnásobným obsahem TS (koncentrace PVA 2 g*l⁻¹)

Na přípravu 100 ml bylo použito:

Základ pro minerální agar	1,9 g
Destilovaná voda.....	100 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
PVA.....	0,2 g
Zásobní roztok PQQ.....	0,02 ml
Zásobní roztok živin tryptonu a sacharosy.....	1,5 ml

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

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

Na přípravu 100 ml bylo použito:

Základ pro minerální agar1,9 g
Destilovaná voda.....100 ml
Roztok stopových prvků.....0,2 ml
Trypton (HIMEDIA, Indie).....0,2 g

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

*Agar se sacharosou (koncentrace sacharosy 2 g*l⁻¹)*

Na přípravu 100 ml bylo použito:

Základ pro minerální agar1,9 g
Destilovaná voda.....100 ml
Roztok stopových prvků.....0,2 ml
Sacharosa.....0,2 g

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

6.3 Chemikálie

Polyvinylalkohol (PVA)

Byl použit PVA s obchodním označením Poval 205 (KURARAY, Japonsko) a PVA s označením MOWIOL 5-88.

Sekundární alkoholy

2-hexanol (hustota 0,814 g*cm⁻³), 2-heptanol (hustota 0,818 g*cm⁻³), 2,4-pentadiol (hustota 0,96 g*cm⁻³) – vše FLUKA, SRN.

6.4 Biologický materiál

Aktivovaný kal z městské čistírny odpadních vod v Malenovicích

Kultura OT3 izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Otrokovice v roce 2004 v rámci DP Jiřího Riedla

Kultura OT2 izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Otrokovice v roce 2004 v rámci DP Jiřího Riedla

Kultura JK2 izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Malenovice na PVA agaru v roce 2006 Terezou Václavkovou

Kultura *Acetobacter aceti* CCM 3620 (Česká sbírka mikroorganismů Brno)

Kultura Ž1 izolovaná v rámci mojí DP na PVA agaru z láhve obsahující aktivovaný kal a PVA těsně před zdegradováním veškerého PVA.

7 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY

7.1 Přístrojové vybavení

Analytické váhy KERN 770.....	SRN
Předvážky KERN 440-47.....	SRN
Předvážky KERN EW.....	SRN
Chlazená centrifuga MR23i.....	Jouan, Francie
Stolní centrifuga EBA 20.....	Hettich, Švýcarsko
Elektromagnetická míchačka MM 2A.....	Laboratorní přístroje, ČR
Elektrická sušárna.....	MORA, ČR
Elektrický vaříč.....	ETA
Chladnička s mrazákem.....	Ardo, ČR
Hlubokomrazící box Chest Freezer.....	Bio Tech, Dánsko
Třepačka LT2.....	ČR
Třepačka 3018 GFL.....	SRN
Laboratorní autokláv.....	Sanoclav, St-MCS-203, SRN
Spektrofotometr TECAN, pro mikrotitrační destičky.....	Sunrise, USA
Analyzátor uhlíku 5000A.....	Shimadzu, Japonsko
pH metr OP – 208 + skleněná elektroda.....	Radelkis, Maďarsko
Aseptický laminární box.....	Telstar, Španělsko
Termobox na 25 °C.....	ÚIOŽP, FT

7.2 Laboratorní pomůcky

Standardní 96-jamková mikrodestička.....	Gama, Česká Republika
Mikrodávkoč (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml).....	Biohit, Finsko
Mikrodávkoč (10 µl , 20 µl).....	Plastomed, Polsko

8 PRACOVNÍ POSTUPY

8.1 Měření pH ve vodných vzorcích

Měření pH bylo prováděno pH-metrem se skleněnou elektrodou. Přístroj byl nejprve nakalibrován pomocí dvou tlumivých roztoků o pH menším a větším než předpokládané pH vzorku a následně bylo za stálého míchání proměřeno pH daného vzorku.

8.2 Odstranění buněk centrifugací

Před každým stanovením koncentrace PVA na mikrotitračních destičkách a/nebo stanovením rozpuštěného organického uhlíku (DOC) bylo nejprve nutno ze vzorků odstranit buňky mikroorganismů, zbytky kalu apod. Odstranění bylo prováděno centrifugováním. Odebrané vzorky byly centrifugovány v 1,5 ml mikrozkuvkách (ependorfkách) na centrifuze MR23i na rotoru 24x1,5 ml při 5000 g a 20 °C po dobu 10 min. K samotnému stanovení byl vždy použit pouze supernatant.

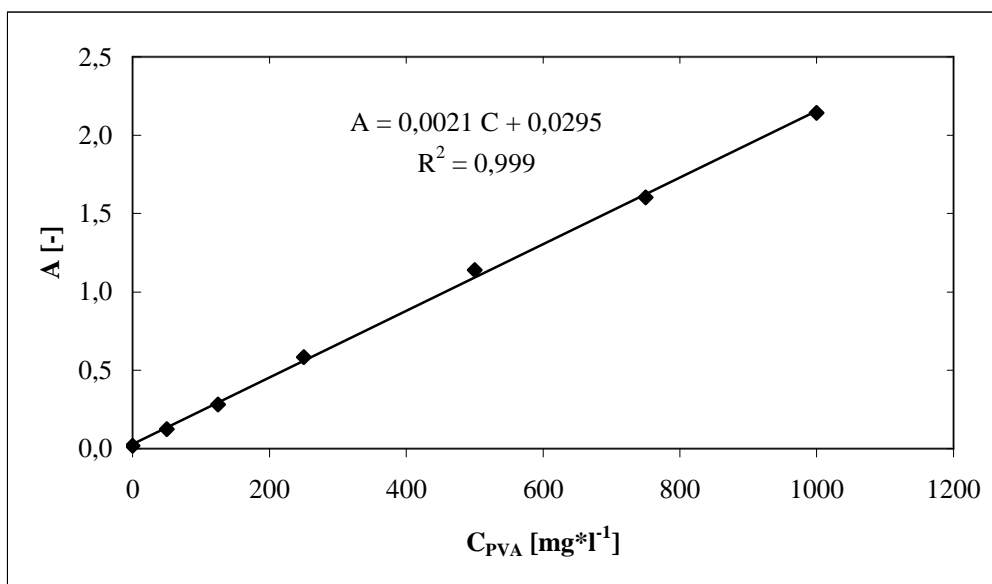
8.3 Jodometrické stanovení koncentrace PVA na mikrotitračních destičkách

Nejprve byla na přístroji Tecan proměřena absorbance prázdné destičky při vlnové délce 660 nm. Poté byly do destičky dávkovány zcentrifugované vzorky – jeden vzorek do jamek jednoho sloupce. Do každé jamky bylo nadávkováno 20 μ l vzorku, 42 μ l roztoku kyseliny borité a 10 μ l roztoku jodu s jodidem draselným. Takto nadávkovaná destička byla změřena na přístroji Tecan při vlnové délce 660 nm po 20 sekundách míchání a 5 sekundách stání. Od hodnoty absorbance každé plné jamky byla odečtena příslušná hodnota absorbance jamky prázdné. Hodnoty náležející k jednomu vzorku byly zprůměrovány a dosazeny do rovnice kalibrační přímky, čímž byla zjištěna koncentrace PVA.

Kalibrační přímka byla stanovena z naměřených hodnot absorbancí kalibračních roztoků viz tabulka (Tab. 4) a obrázek (Obr. 7).

Tab. 4. Naměřená absorbance v závislosti na koncentraci PVA

C_{PVA} [$mg \cdot l^{-1}$]	0	50	125	250	500	750	1000
A [-]	0,018	0,124	0,281	0,584	1,140	1,603	2,144



Obr. 7. Kalibrační přímka PVA

8.4 Měření koncentrace rozpuštěného uhlíku (DOC)

Ze vzorků pro stanovení koncentrace rozpuštěného uhlíku byly nejprve odstraněny buňky centrifugací a vzorky byly naředěny podle předpokládané koncentrace PVA (obvykle po stanovení koncentrace PVA jodometricky na mikrotitračních destičkách). Poté byly vzorky převedeny do vialek a stanoveny na analyzátoru uhlíku Shimadzu. Po stanovení koncentrace rozpuštěného uhlíku byly získané hodnoty vynásobeny použitým zředěním.

8.5 Degradáčn1 lahvové testy

Tyto testy byly prováděny v 500 ml lahvích, do nichž bylo dávkováno sterilní minerální médium s rozpuštěným PVA (výsledná koncentrace PVA 500-600 $mg \cdot l^{-1}$), dále aktivovaný kal nebo konkrétní bakteriální suspenze nebo půdní výluh (dle provedení experimentu) a případně další látky tak, aby celkový objem všech složek tvořil 100 ml.

Láhve byly uzavřeny a ponechány na třepače s konstantní frekvencí kmitů ve tmě při 25 °C. V pravidelných 2-3 denních intervalech byly odebírány vzorky pro stanovení koncentrace PVA, případně doplňovány přítomné substráty. Obvykle jednou za týden byly lahve provzdušňovány v laminárním boxu po dobu 20 minut a pravidelně bylo kontrolováno pH.

8.6 Degradční testy ve vialkách

Nejprve bylo připraveno dvakrát koncentrované MM3F s PQQ o koncentraci $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a s PVA o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto připravené minerální médium bylo sterilizováno v autoklávu při 125 °C, po dobu 20 minut a za stálého míchání rozplněno do šestnácti sterilních vialek po 1 ml. Potom bylo do vialek 1-8 přidáno 1 ml kalu o sušině $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a do vialek 9-18 bylo přidáno 1 ml sterilní destilované vody, čímž bylo dvakrát koncentrované MM3F zředěno na MM3F, PQQ na $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a PVA na koncentraci $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Všechny vialky byly zaočkovány 10 μl suspenze příslušné kultury koncentrované na půl stupně McFarlandovy stupnice (počet buněk cca $10^5 - 10^6$ v 1 ml). Vialky byly uzavřeny a ponechány na třepače s konstantní frekvencí kmitů ve tmě při 25 °C. Třikrát týdně bylo do vybraných vialek přidáváno 10 μl roztoku TS, do zbylých vialek 10 μl sterilního fyziologického roztoku.

8.7 Konzervace bakteriálních konsorcií

V rámci pokusu „Zkoušky možností urychlení rozkladu PVA neadaptovaným kalem za přítomnosti živin“ (viz kap. 11) byla pro případná další studia po úplné degradaci PVA zakonzervována PVA degradující bakteriální konsorcia. Pomocí moderní metody konzervace byla konzervována konsorcia z lahví č. 1 a 3 obsahujících jako jediný substrát PVA.

Nejprve byly vypláchnuty ethanolem dvě velké kyvety, které byly následně naplněny 30 ml kalové suspenze z lahví 1 a 3. Vzorky v kyvetách byly centrifugovány při 4 °C a 5000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl slit a biomasa seškrábána do sterilních 1,5 ml mikrozku-mavek (ependorfek). K biomase byl přidán glycerol v množství odpovídajícím 15 – 20 % z její hmotnosti, směs promíchána a zamražena v hlubokomrazícím boxu při -80 °C (takto připravená směs nezmrzne a je tedy rychle připravena k použití).

8.8 Izolace kultury Ž1

V jedenáctém dni pokusu „Zkoušky možností urychlení rozkladu PVA neadaptovaným kalem za přítomnosti živin“ (viz kap. 11), tedy těsně před ukončením biodegradace PVA v lahvích 1 a 3, byla z těchto dvou lahví vyočkována kalová suspenze na PVA agar.

Po čtrnáctidenní kultivaci vyrostly na misce pocházející z první láhve dvě kultury - žlutě a bíle pigmentované (označení Ž1 a B1) a na misce ze třetí láhve tři kultury – bíle, žlutě a žluto-bíle pigmentované (označení B3, Ž3 a ŽB3). Všech 5 kultur bylo přeočkováno na další misky s PVA agarem.

Po jedenáctidenní kultivaci bylo zjištěno, že kultury B1 a B3 rostou na PVA agaru jen velmi nepatrně, kultura Ž3 byla kontaminovaná a kultura ŽB3 byla směsí bíle a žlutě pigmentovaných kultur. Výrazně a čistě rostla tedy pouze kultura Ž1, která byla přeočkována na další misky s PVA agarem a použita pro další experimenty.

8.9 Příprava půdního výluhu

Byla použita směs dvou komerčních půd a jedné přírodní v poměru zahradní substrát : substrát na hroby : přírodní půda = 2 : 1 : 1. 80 g sušiny směsné půdy bylo dvě hodiny vytřepáváno na třepačce v 800 ml MM2F a zfiltrováno na předem promytém filtračním papíře červená páska. Promíchaný filtrát (= půdní výluh) byl použit pro degradační lahvové testy, kam se do 500 ml láhve dávkovalo vždy 50 ml půdního výluhu na 50 ml MM2F s rozpuštěným PVA.

III. VÝSLEDKY A DISKUSE

9 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA TRVALÉ PŘÍTOMNOSTI DOSTUPNÝCH SUBSTRÁTŮ

9.1 Důvod nasazení

Testy biodegradace cizorodých látek jsou běžně prováděny způsobem, kdy je daná cizorodá látka (v našem případě PVA Poval 205) jediným dostupným substrátem [41]. Cílem tohoto pokusu bylo věrněji simulovat podmínky na čistírnách odpadních vod (ČOV), kde je kromě dané cizorodé látky v odpadní vodě přítomno také velké množství jiných organických substrátů. Naším modelovým substrátem byl zásobní roztok živin s obsahem tryptonu a sacharosy (TS). Souběžně byly nasazeny i láhve bez degradace PVA, pro zjištění chování kalu (případné změny flokulace, barvy apod.) a také možné sorpce PVA na kal.

9.2 Rozvržení pokusu

V rámci tohoto pokusu byly provedeny čtyři série vždy dvakrát vedle sebe, podle rozpisu:

- 1) MM + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 2) MM + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 3) MM + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 4) MM + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 5) MM + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 6) MM + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 7) MM + PVA 500 mg·l⁻¹ + sterilní kal 1 g·l⁻¹
- 8) MM + PVA 500 mg·l⁻¹ + sterilní kal 1 g·l⁻¹

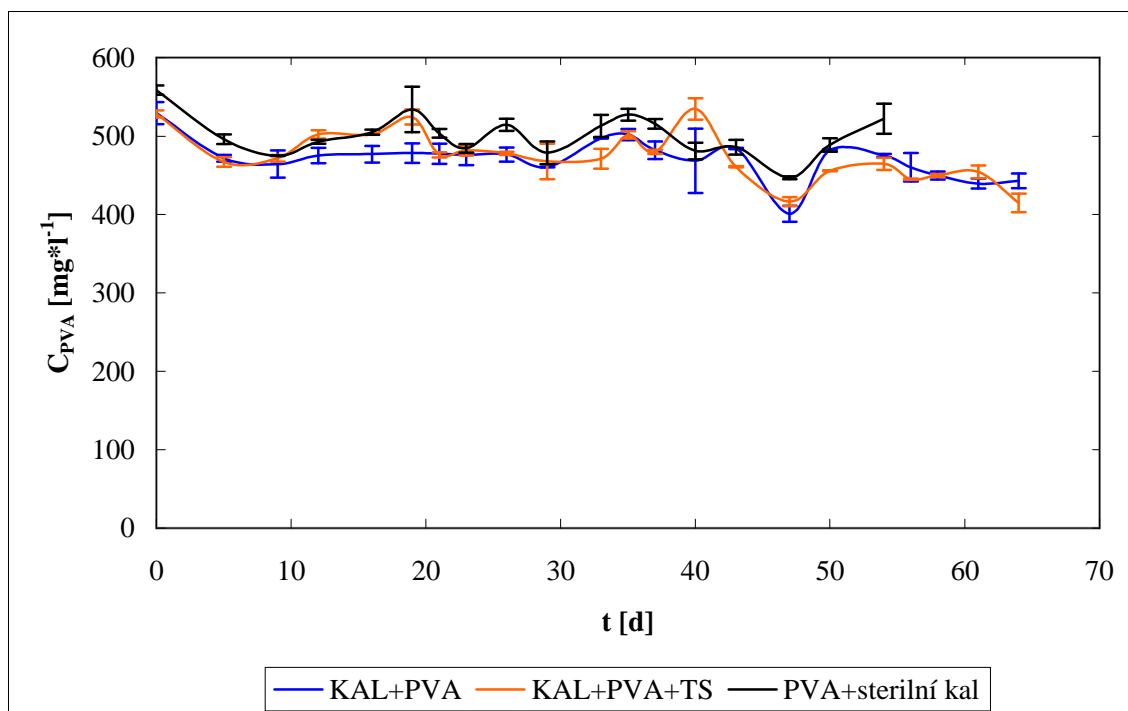
Vždy v pondělí, středu a pátek bylo odebráno 0,5 ml vzorků ze všech lahví a přidáno 0,5 ml sterilního fyziolog. roztoku do lahví 1,2,7,8 či 0,5 ml TS do lahví 3-6. V pravidelných intervalech byla měřena koncentrace PVA jodometricky na mikrotitračních destičkách.

9.3 Výsledky pokusu

Celý experiment trval 64 dnů. Když se degradace nerozběhla ani po devatenácti dnech, bylo do lahví s živým kalem přidáno 10 μ l suspenze degradační kultury OT3, totéž bylo provedeno ve 40. dni a v 51. dni, ve 26. dni bylo přidáno 10 μ l 10x zředěného kalu. Přes přidávky degradační kultury se degradace nerozběhla ani po 64 dnech viz obrázek (Obr. 8) a pokus byl ukončen bez jakéhokoliv náznaku rozkladu PVA. Hodnoty v grafu odpovídají průměrům ze dvou paralelních stanovení a chybové úsečky směrodatným odchylkám viz tabulka (Tab. 5).

Tab. 5. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu

T [d]	1	2	prům.	směr. odch.	3	4	prům.	směr. odch.	7	8	prům.	směr. odch.
0	515,4	543,4	529,4	13,99	523,9	533,0	528,5	4,52	552,7	564,5	558,6	5,89
5	476,0	467,4	471,7	4,29	460,7	473,0	466,9	6,13	502,3	489,8	496,1	6,25
9	481,4	446,7	464,0	17,32	475,7	467,4	471,5	4,14	474,5	474,7	474,6	0,13
12	465,2	484,8	475,0	9,76	507,7	497,0	502,4	5,35	495,4	490,6	493,0	2,38
16	465,8	487,7	476,8	10,95	501,9	503,0	502,4	0,54	508,4	501,9	505,1	3,24
19	490,8	465,4	478,1	12,71	515,1	533,8	524,4	9,37	562,9	505,2	534,0	28,81
21	464,5	490,4	477,4	12,98	472,4	479,2	475,8	3,39	509,0	498,2	503,6	5,42
23	462,8	488,5	475,6	12,83	474,9	487,7	481,3	6,40	490,0	478,5	484,3	5,74
26	467,3	485,7	476,5	9,20	476,0	479,8	477,9	1,93	522,3	506,7	514,5	7,77
29	459,7	460,7	460,2	0,51	445,0	490,5	467,7	22,74	493,2	464,0	478,6	14,59
33	498,2	496,8	497,5	0,68	458,3	483,6	471,0	12,65	527,2	498,9	513,1	14,19
35	495,1	509,3	502,2	7,14	506,1	497,1	501,6	4,52	534,8	519,9	527,4	7,47
37	470,4	493,2	481,8	11,38	477,0	482,2	479,6	2,62	509,7	521,9	515,8	6,10
40	427,4	509,7	468,5	41,16	521,1	548,4	534,7	13,68	491,8	470,1	481,0	10,89
43	485,3	483,2	484,3	1,03	459,8	461,3	460,5	0,77	495,4	476,3	485,8	9,52
47	410,8	390,6	400,7	10,13	410,8	422,0	416,4	5,60	444,7	448,6	446,7	1,95
50	480,1	483,1	481,6	1,52	454,9	456,2	455,5	0,65	497,4	479,9	488,7	8,72
54	477,1	473,1	475,1	2,02	472,1	456,5	464,3	7,80	541,5	503,2	522,3	19,17
56	441,8	478,2	460,0	18,18	445,7	443,8	444,7	0,92				
58	444,5	454,8	449,6	5,12	447,9	451,3	449,6	1,70				
61	433,0	445,5	439,2	6,25	446,0	462,3	454,1	8,18				
64	433,3	452,1	442,7	9,37	426,4	402,7	414,5	11,85				



Obr. 8. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem

Při likvidaci pokusu bylo změřeno pH, které se pohybovalo v rozpětí 4,2 – 4,5, což jsou hodnoty hodně odlišné od ideálního pH pro bakteriální degradace obecně, včetně degradace PVA (ideální jsou podmínky kolem pH = 7). Nerozběhnutí degradace bylo tedy pravděpodobně způsobeno právě snížením pH, kterému nezabránil ani v minerálním médiu přítomný fosforečnanový pufr. Možnou příčinou překonání fosforečnanového pufru mohla být přítomnost fosfor využívajících bakterií v aktivovaném kalu – tyto bakterie, pokud měly nahromaděny zásobní látky z čistírny, mohly pufr využít jako zdroj energie. Jakmile pak bakterie spotřebovaly dusík z NH_4Cl obsaženém v minerálním médiu jako zdroj dusíku, uvolňovaly se H^+ ionty, které při spotřebovaném pufru snižovaly pH. Proto byla pro následující pokus přijata tato opatření:

- pro experiment byl použit týden starý kal – pokud by byly v kalu přítomny fosfor využívající bakterie, měly by za tuto dobu již mít spotřebovány zásobní látky a neměly by tedy být schopné odbourat fosforečnanový pufr
- místo klasického minerálního média bylo použito MM2F, které mělo jednak upravený poměr fosforečnanů z 1:4 na 1:9 a obě složky byly použity ve dvojnásobné

koncentraci, a také byl použit kombinovaný zdroj dusíku – jen jedna třetina amon-
ného dusíku a dvě třetiny dusičnanového dusíku

- místo fyziologického roztoku byl použit pufrovaný fyziologický roztok
- byla kontrolována a v případě nutnosti i upravována hodnota pH pomocí roztoku NaOH

Pozitivními zjištěními byly v tomto pokusu pouze skutečnost, že PVA nebyl na aktivovaný kal sorbován ani po dlouhé době průběhu testu, a také skutečnost, že odběry malých obje-
mů vzorků a přídavky stejných objemů roztoků nevedou k zásadnímu poklesu koncentrací PVA (láhve č. 7 a 8) a nejsou tak metodickou překážkou obdobných pokusů.

10 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK

10.1 Důvod nasazení

Tento test byl proveden v návaznosti na test předchozí. K cíli předchozího experimentu, tedy ověřit vliv přítomnosti snadno dostupných substrátů na biodegradaci polyvinylalkoholu, přibyla snaha ověřit funkci změněných podmínek pomocí pravidelné kontroly pH, a také zjistit vliv sekundárních alkoholů v aktivovaném kalu na degradaci PVA.

10.2 Rozvržení pokusu

V rámci tohoto experimentu byly provedeny tři série s třemi paralelními lahvemi vedle sebe, pouze kontrolní lahve se sterilním kalem byly nasazeny jen duplicitně, podle rozpisu:

- 1) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 2) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 3) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 4) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + PQQ 20 μg·l⁻¹ + 3xSA po 20 μg·l⁻¹
- 5) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + PQQ 20 μg·l⁻¹ + 3xSA po 20 μg·l⁻¹
- 6) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + PQQ 20 μg·l⁻¹ + 3xSA po 20 μg·l⁻¹
- 7) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 8) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 9) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 10) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + sterilní kal 1 g·l⁻¹
- 11) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + sterilní kal 1 g·l⁻¹

Od tohoto pokusu včetně bylo pracováno s PVA MOWIOL 5-88. Sekundární alkoholy byly dávkovány na počátku - v nultý den, dále v šestý a desátý den po té, co již nebyly organolepticky zaznamenány. Vždy v pondělí, středu a pátek bylo provedeno stanovení koncentrace PVA jodometricky na mikrotitračních destičkách a doplněno 0,5 ml sterilního TS do

lahví 7-9 a 0,5 ml sterilního pufrovaného fyziologického roztoku do lahví 10 a 11. Jednou týdně bylo provedeno stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

10.3 Výsledky pokusu

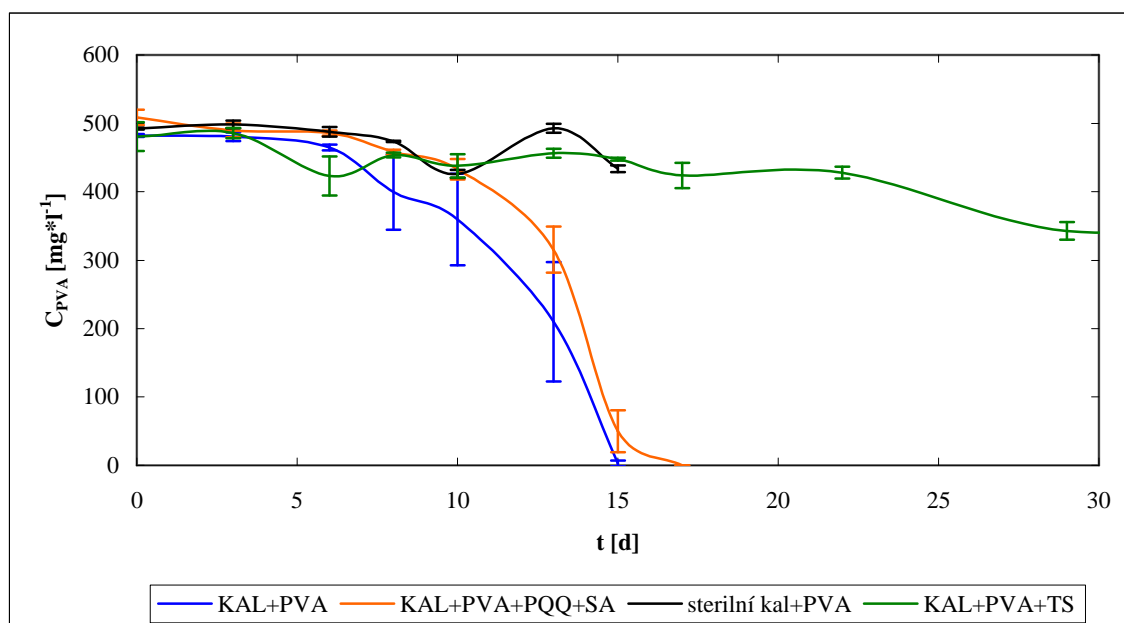
Experiment byl prováděn po dobu 43 dnů. Výsledky koncentrací PVA pomocí jodometrického stanovení na mikrotitračních destičkách jsou vidět na obrázku (Obr. 9) a výsledky rozpuštěného uhlíku na obrázku (Obr. 10). Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze tří paralelních stanovení (pouze u PVA se sterilním kalem ze dvou paralelních stanovení) a chybové úsečky směrodatným odchylkám viz tabulky (Tab. 6 a Tab. 7).

Tab. 6. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu (jodometrické stanovení)

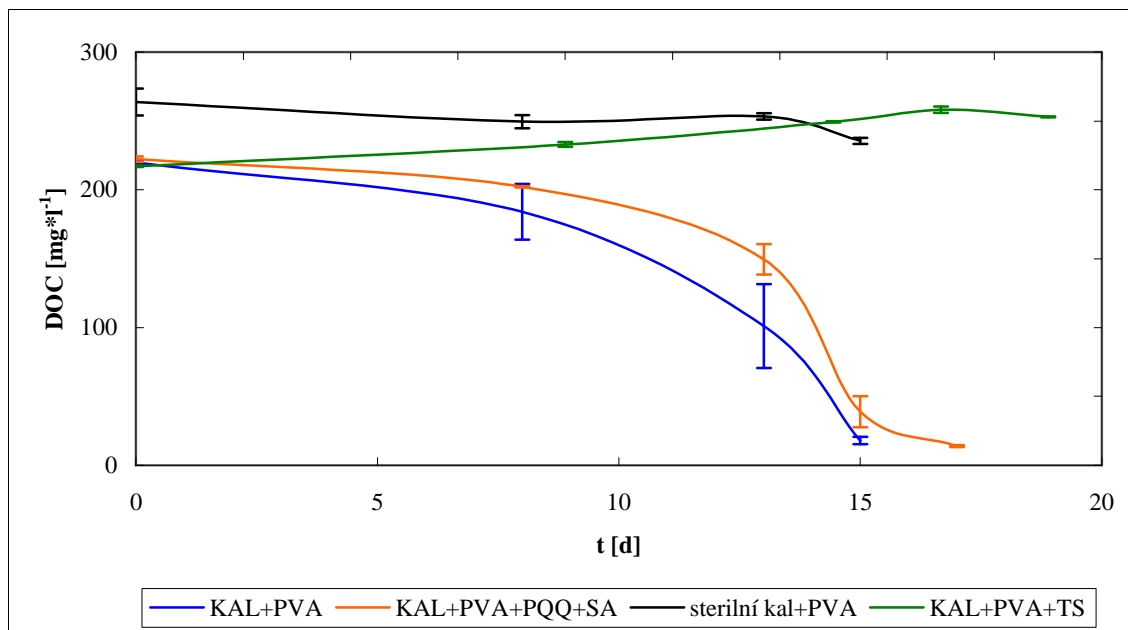
t [d]	1	2	3	prům.	směr. odch.	4	5	6	prům.	směr. odch.
0	485,3	481,7	479,7	482,2	2,31	496,5	523,9	506,3	11,33	508,87
3	478,0	473,9	489,3	480,4	6,52	492,7	476,0	501,0	10,4	489,86
6	463,2	460,2	470,1	464,5	4,16	490,2	487,0	481,1	3,773	486,14
8	451,0	323,4	424,9	399,7	55,02	453,4	458,7	461,8	3,497	457,96
10	422,6	266,8	389,2	359,5	66,95	417,4	453,2	428,0	15,01	432,84
13	281,5	87,3	261,9	210,3	87,30	324,0	351,9	270,3	33,86	315,41
15	0,0	0,0	8,8	2,917	4,12	26,6	92,7	30,0	30,39	49,75
17						0,0	0,0	0,0	0	0
t [d]	7	8	9	prům.	směr. odch.	10	11		prům.	směr. odch.
0	453,1	483,5	505,3	480,6	21,41	491,0	494,1		492,6	1,55
3	496,6	479,5	481,5	485,9	7,62	504,3	492,9		498,6	5,71
6	395,3	411,4	462,3	423,0	28,54	495,0	480,7		487,8	7,17
8	453,5	449,3	458,1	453,6	3,60	474,3	472,4		473,3	0,95
10	461,5	425,0	426,7	437,8	16,84	420,1	432,0		426,0	5,92
13	459,6	447,1	462,2	456,3	6,58	499,5	486,4		492,9	6,56
15	444,9	448,3	449,7	447,6	2,00	428,9	438,5		433,7	4,79
17	425,9	400,3	445,5	423,9	18,49					
22	422,1	421,3	440,3	427,9	8,78					
29	351,6	324,9	352,4	343,0	12,79					
36	356,5	364,5	369,6	363,6	5,37					
43	338,6	367,2	343,7	349,8	12,45					

Tab. 7. Hodnoty DOC a směrodatných odchylek v průběhu testu

t [d]	1	2	3	prům.	směr. odch.	4	5	6	prům.	směr. odch.
0	218,2	222,0	219,1	1,6	219,74	224,5	219,8	222,4	1,9	222,24
8	204,1	156,6	191,7	20,1	184,14	202,7	201,4	202,4	0,5	202,18
13	126,6	58,4	118,1	30,3	101,01	154,4	159,9	134,0	11,1	149,44
15	15,7	16,5	21,7	2,6	17,96	27,1	54,0	35,4	11,3	38,84
17						13,25	14,78	13,79	0,634	13,94
t [d]	7	8	9	prům.	směr. odch.	10	11		prům.	směr. odch.
0	217,7	216,8	216,5	0,5	217,02	254,2	273,6		9,7	263,88
8	233,6	230,4	234,6	1,8	232,86	244,9	254,3		4,7	249,63
13	249,0	250,1	249,3	0,5	249,47	251,1	255,7		2,3	253,41
15	254,9	259,6	260,3	2,4	258,29	233,1	237,8		2,3	235,44
17	252,9	252,7	253,6	0,4	253,06					



Obr. 9. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (jodometrické stanovení)



Obr. 10. Závislost DOC na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem

Vzhledem k tomu, že bylo provedeno stanovení koncentrace PVA pomocí dvou metod, je možno provést srovnání. PVA obsahuje cca 50 % uhlíku, proto musely hodnoty koncentrace rozpuštěného uhlíku vycházet zhruba poloviční, aby odpovídaly koncentraci PVA. Narozdíl od jodometrického stanovení, stanovení pomocí DOC nikdy neukazuje nulovou koncentraci PVA, to však neodporuje realitě – PVA již mohlo být zdegradováno, vzorek však stále mohl obsahovat produkty degradace PVA.

Již na první pohled je vidět, že závislosti na obou grafech mají obdobný průběh. Nejrychleji byl PVA degradován v lahvích, ve kterých byl PVA jediným dostupným substrátem, a to již za 15 dní. V přítomnosti libovolných dalších látek byla degradace PVA zpomalena – v lahvích s obsahem PQQ a sekundárních alkoholů bylo PVA kompletně zdegradováno po 18ti dnech, v přítomnosti živin tryptonu a sacharosy probíhala degradace ztelně pomaleji, až se nakonec zastavila na koncentraci PVA kolem $350 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, což odpovídá cca 30 % degradaci za 43 denní dobu pokusu.

Výsledky měření koncentrace PVA v poslední sérii, tj. v lahvích č. 10 a 11 se sterilním kalem, znovu potvrdily, že odběry malých objemů vzorků a přidávky stejných objemů roztoků nevedou k zásadnímu poklesu koncentrací PVA, nejsou tedy metodickou překážkou těchto degradačních pokusů a není tedy příště nutno tuto kontrolu nasazovat.

Vliv opatření navržených na konci minulého pokusu se ukázal jako pozitivní. Hodnotu pH bylo potřeba upravovat jen minimálně, protože se většinou pohybovala u všech lahví kolem $\text{pH} = 7$. Jediný problém byl v závěru pokusu zaznamenán s udržení pH u lahví s TS, kde se hodnota pH pohybovala na konci pokusu v rozmezí 4,6-5,0.

Závěrem pokusu byl tedy fakt, že přítomnost dalších látek a hlavně živin působí na biodegradaci PVA negativně, přičemž možným důvodem mohlo být ovlivnění degradačních organismů působením jiných mikroorganismů v přítomnosti živin, inhibice degradační kultury živinami nebo naopak přednostní využívání těchto živin degradační kulturou, ale nakonec také záporný vliv snížení hodnoty pH. Který z těchto mechanismů byl nakonec uplatněn bylo ještě nutno ověřit.

11 ZKOUŠKY MOŽNOSTÍ URYCHLENÍ ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA PŘÍTOMNOSTI ŽIVIN

11.1 Důvod nasazení

Tento experiment navazoval na předchozí a jeho účelem bylo zkusit za pomoci přísadků různých látek nalézt možnosti k urychlení degradace PVA mikroorganismy v přítomnosti živin. Byl testován možný kometabolický rozklad pomocí PQQ a sekundárních alkoholů, ale také přídavek mrtvé biomasy kultury *Acetobacter aceti*, která byla v loňské diplomové práci [40] vhodným zdrojem PQQ a hemu c pro degradační kulturu OT3 a mohla by tedy urychlit degradaci i v tomto případě.

11.2 Rozvržení pokusu

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

- 1) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 2) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 3) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 4) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + živiny TS
- 5) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + živiny TS
- 6) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + živiny TS
- 7) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS + PQQ 20 µg·l⁻¹ + 3xSA po 20 µg·l⁻¹
- 8) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS + PQQ 20 µg·l⁻¹ + 3xSA po 20 µg·l⁻¹
- 9) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS + PQQ 20 µg·l⁻¹ + 3xSA po 20 µg·l⁻¹
- 10) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS + biomasa *Acetobacter aceti* 70 mg
- 11) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS + biomasa *Acetobacter aceti* 70 mg
- 12) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS + biomasa *Acetobacter aceti* 70 mg

Sekundární alkoholy byly dávkovány na počátku - v nultý den, dále v sedmý, jedenáctý, šestnáctý, jedenadvacátý a pětadvacátý den, po té, co již nebyly organolepticky zaznamenány. Biomasa kultury *Acetobacter aceti* byla dávkována na počátku – tedy v nultý den a dále v jedenáctý a osmnáctý den. Vždy v pondělí, středu a pátek bylo provedeno stanovení koncentrace PVA jodometricky na mikrotitračních destičkách a doplněno 0,5 ml sterilního TS do lahví 4-12. Pravidelně bylo také prováděno stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

11.3 Výsledky pokusu

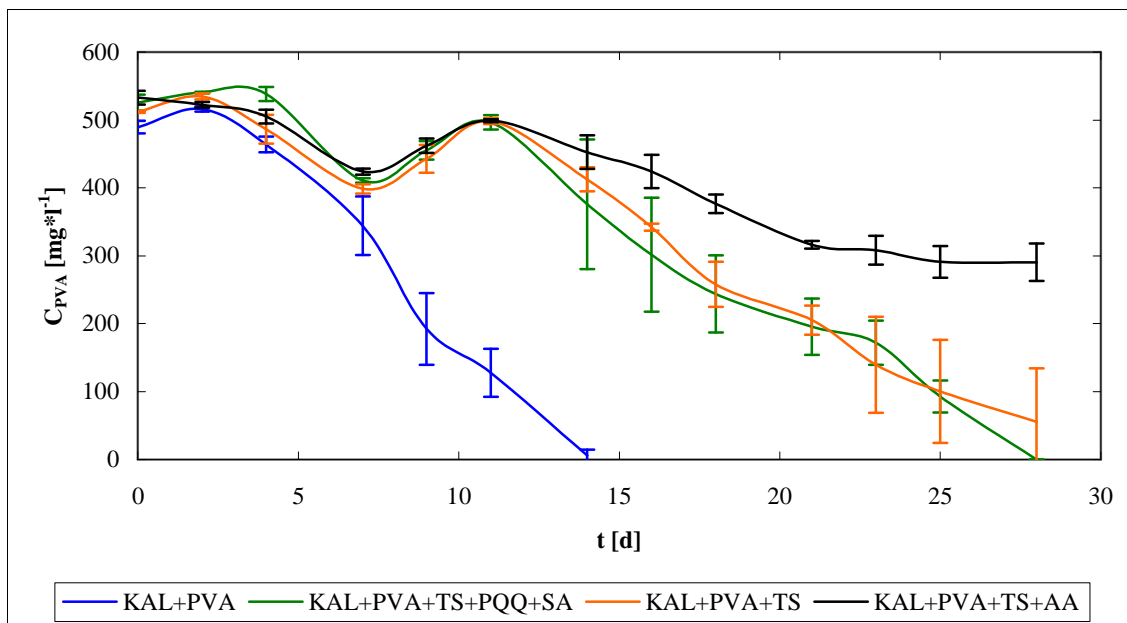
Experiment byl prováděn po dobu 49 dnů. Výsledky koncentrací PVA pomocí jodometrického stanovení na mikrotitračních destičkách jsou vidět na obrázku (Obr. 11) a výsledky rozpuštěného uhlíku na obrázku (Obr. 12). Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze tří paralelních stanovení a chybové úsečky směrodatným odchylkám viz tabulky (Tab. 8 a Tab. 9).

Tab. 8. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu (jodometrické stanovení)

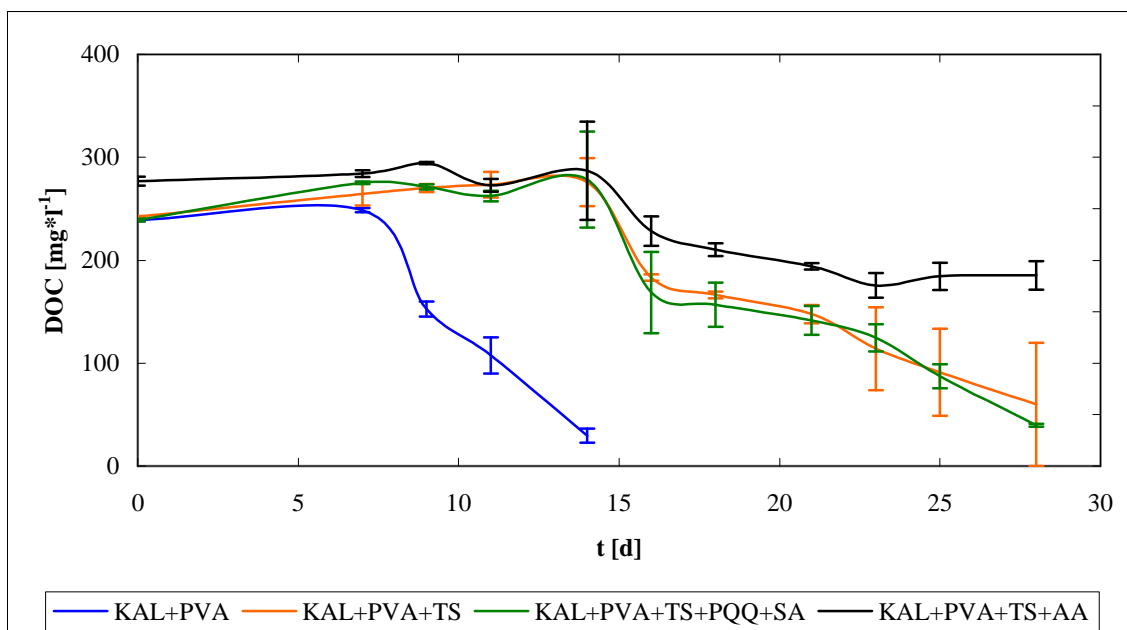
t [d]	1	2	3	prům.	směr. odch.	4	5	6	prům.	směr. odch.
0	476,5	495,0	497,1	489,5	9,26	513,6	512,3	510,4	512,1	1,32
2	519,4	511,2	518,6	516,4	3,69	528,3	538,3	537,1	534,6	4,46
4	455,2	456,7	480,8	464,2	11,74	465,2	478,8	515,5	486,5	21,26
7	292,0	342,7	397,9	344,2	43,22	407,9	396,0	391,2	398,4	7,04
9	123,0	201,8	251,9	192,2	53,04	471,0	421,5	435,9	442,8	20,78
11	85,2	171,6	125,4	127,4	35,31	500,1	503,2	492,5	498,6	4,48
14	0,0	18,3	0,0	6,1	8,64	434,5	411,7	391,1	412,4	17,75
16						334,8	346,6	345,1	342,2	5,27
18						211,1	278,4	284,4	258,0	33,24
21						176,1	228,2	211,4	205,2	21,73
23						39,5	196,5	182,6	139,5	70,97
25						0,0	182,9	118,0	100,3	75,71
28						0,0	166,4	0,0	55,5	78,46
35						0,0	120,7	0,0	40,2	56,91
43						0,0	83,1	0,0	27,7	39,17
49						0,0	82,7	0,0	27,6	39,00
t [d]	7	8	9	prům.	směr. odch.	10	11	12	prům.	směr. odch.
0	510,4	538,6	528,3	525,8	11,68	522,2	530,7	546,6	533,2	10,12
2	539,4	542,3	539,8	540,5	1,30	523,8	526,5	516,5	522,3	4,19
4	542,8	548,2	524,0	538,3	10,38	506,7	492,4	517,0	505,4	10,08
7	415,6	409,7	407,3	410,9	3,48	423,4	429,4	418,7	423,8	4,37
9	437,4	459,2	470,4	455,7	13,67	448,2	473,2	465,5	462,3	10,45
11	484,8	510,2	495,1	496,7	10,44	496,1	500,8	500,6	499,2	2,15
14	242,1	457,2	428,9	376,1	95,41	425,6	486,0	447,0	452,8	24,99
16	185,2	377,6	342,4	301,7	83,67	391,8	451,3	429,4	424,2	24,56
18	163,2	287,9	280,1	243,7	57,05	361,1	394,1	374,5	376,6	13,54
21	136,8	220,3	229,3	195,5	41,68	320,7	308,2	320,2	316,3	5,76
23	125,8	196,4	193,2	171,8	32,56	336,5	285,7	302,3	308,2	21,17
25	65,8	122,9	89,2	92,6	23,43	315,8	260,0	297,7	291,2	23,24
28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	310,1	251,7	309,8	290,5	27,49
35						308,1	198,8	295,2	267,3	48,79
43						296,1	26,9	275,7	199,5	122,36
49						307,8	4,5	310,5	207,6	143,60

Tab. 9. Hodnoty DOC a směrodatných odchylek v průběhu testu

t [d]	1	2	3	prům.	směr. odch.	4	5	6	prům.	směr. odch.
0	237,7	239,3	239,8	238,9	0,89	242,1	243,1	241,7	242,3	0,58
7	246,0	249,1	251,0	248,7	2,07	277,0	250,1	266,2	264,4	11,05
9	149,6	145,5	162,7	152,6	7,31	275,2	265,6	269,8	270,2	3,93
11	88,4	130,6	103,7	107,6	17,45	291,0	263,5	265,5	273,3	12,51
14	27,8	38,4	22,0	29,4	6,82	245,7	279,4	302,5	275,8	23,31
16						180,5	187,6	181,3	183,1	3,19
18						165,8	170,3	162,5	166,2	3,19
21						138,4	159,6	145,1	147,7	8,86
23						58,2	151,1	133,0	114,1	40,22
25						36,5	140,1	96,7	91,1	42,48
28						0,0	141,8	37,9	59,9	59,95
35						0,0	124,7	0,0	41,6	58,78
43						0,0	110,3	0,0	36,8	52,00
49						0,0	111,5	0,0	37,2	52,56
t [d]	7	8	9	prům.	směr. odch.	10	11	12	prům.	směr. odch.
0	241,0	238,2	238,2	239,1	1,30	283,0	273,2	274,5	276,9	4,33
7	276,9	274,1	274,7	275,3	1,19	281,5	288,8	282,3	284,2	3,30
9	268,4	274,3	270,8	271,2	2,41	293,9	295,9	293,3	294,4	1,08
11	258,0	269,5	259,7	262,4	5,07	277,9	264,1	276,4	272,8	6,18
14	250,4	344,2	240,9	278,5	46,60	245,6	354,1	261,7	287,1	47,79
16	113,9	205,6	186,7	168,7	39,55	208,6	241,4	235,1	228,4	14,20
18	126,4	174,7	169,0	156,7	21,55	202,2	216,9	212,1	210,4	6,13
21	121,8	150,2	152,7	141,5	14,00	198,6	191,0	193,0	194,2	3,24
23	106,1	132,8	135,0	124,6	13,14	163,6	171,2	191,7	175,5	11,89
25	75,0	103,1	84,2	87,4	11,71	196,7	165,7	190,3	184,2	13,38
28	38,7	38,5	41,4	39,5	1,34	195,5	165,4	194,5	185,1	13,96
35						200,1	158,7	204,0	187,6	20,48
43						216,3	78,4	210,8	168,5	63,78
49						210,1	0,0	213,7	141,3	99,90



Obr. 11. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (jodometrické stanovení)



Obr. 12. Závislost DOC na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem

Ani v tomto testu není vidět výrazná odlišnost mezi stanovením koncentrace PVA jodometricky a pomocí DOC. Stejně jako u minulého pokusu, i zde se ukázalo, že nejrychleji probíhá degradace tam, kde je PVA jediným dostupným substrátem – v této sérii byl PVA

degradován za 14 dní, což odpovídá pokusu předchozímu. Oproti tomu v sérii, kde byl PVA s kalem a živinami TS, proběhla nyní, když se podařilo pH udržet ve správných mezích, degradace během 25ti a 28 dnů, ve třetí láhvi však i po 49 dnech byla koncentrace PVA kolem $80 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Zde se nabízí zajímavé srovnání se sérií, která obsahovala živý kal s PVA, TS, PQQ a sekundárními alkoholy, kde došlo k úplné degradaci také po 28 dnech. Zdá se, že PVA je v aktivovaném kalu za přítomnosti TS zdegradován po 28 dnech nezávisle na tom, zda jsou přítomny PQQ a sekundární alkoholy. To by mohlo být způsobeno buď tím, že přítomnost sekundárních alkoholů nevedla k pomnožení bakterií schopných degradace PVA, nebo tím, že zde první krok degradace PVA neprobíhá za katalýzy PVA-dehydrogenasou, která zpravidla vyžaduje přítomnost PQQ, na což může mít vliv i možná přeměna PQQ na biologicky neaktivní látku vlivem aminokyselin z tryptonu, jak to popsal např. van Kleef s kolektivem [28]. V sérii s mrtvou biomasou kultury *Acetobacter aceti* byl PVA po 49 dnech ve dvou láhvích ze tří zdegradován zhruba ze 45 % (koncentrace PVA byla kolem $310 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), avšak v poslední láhvi byl PVA zdegradován stoprocentně. Tento velký rozdíl v pozorovaných výsledcích mohl být způsoben (stejně jako v případě jedné odlišné láhve ze série, která obsahovala pouze kal, PVA a TS) jistou heterogenitou použitého kalu, kdy ani neustálé promíchávání kalu při nasazení testu nemohlo zaručit dokonale stejné podmínky ve všech vzorcích.

Po úplné degradaci PVA v lahvích 1 a 3 (série, kde bylo PVA jediným substrátem), bylo bakteriální konsorcium z těchto dvou lahví zakonzervováno pro případná další studia. V jedenáctém dni byly také z lahví 1 a 3 vyočkovány kalové suspenze na Petriho misky s PVA agarem pro další testy. Postupem času byla pomocí přeočkovávání na další misky s PVA agarem z první misky izolována žlutě pigmentovaná kultura rostoucí na PVA agaru. Podle své žluté pigmentace a původu z první láhve byla označena jako kultura Ž1.

12 ZKOUŠKY VLIVU ŽIVIN TRYPTONU A SACHAROSY NA RŮST PVA DEGRADAČNÍCH KULTUR

12.1 Důvod nasazení

Tento experiment navazoval na dva předchozí testy, kde bylo zjištěno, že v přítomnosti živin tryptonu a sacharosy byla biodegradace PVA cca dvojnásobně zpomalena. Pokus měl přinést odpověď na otázku, zda samotná přítomnost živin neinhibuje růst PVA degradačních bakterií.

12.2 Rozvržení pokusu

Na Petriho misky s PVA agarem a PQQ, PVA agarem, PQQ a TS a PVA agarem, PQQ a trojnásobnou koncentrací TS (=3TS) byly kalibrovanou kličkou (objem 10 μ l) křížovým roztěrem vyočkovány suspenze PVA degradačních kultur JK2, Ž1 a OT2. Misky byly kultivovány v klidu ve tmě při 25 °C. Po sedmi dnech kultivace bylo provedeno pozorování.

12.3 Výsledky pokusu

Výsledky pozorování:

JK2

PVA agar s PQQ: velmi řídké drobné bílé kolonie

PVA agar s PQQ a TS: větší počet řádově větších žlutě zbarvených kolonií

PVA agar s PQQ a 3TS: velký počet jasně žlutých kolonií, některé až o průměru 4 mm

Ž1

PVA agar s PQQ: velký počet velmi drobných bílých kolonií s mírným nádechem do žluta

PVA agar s PQQ a TS: o trochu více nažloutlých o ne mnoho větších kolonií

PVA agar s PQQ a 3TS: největší a jasně žluté kolonie, průměr kolonií cca 5 mm

OT2

PVA agar s PQQ: jasně žluté drobnější kolonie o průměru cca 0,5 mm

PVA agar s PQQ a TS i PVA agar s PQQ a 3TS: shodně větší počet jasně žlutých kolonií o průměru až 1,5 mm. Nebyl pozorován rozdíl v růstu kultury OT2 mezi jedno- a trojnásobnou koncentrací TS.

Závěrem tohoto experimentu tedy bylo, že přítomnost směsi tryptonu a sacharosy koloniím všech druhů prospívala a vedla ke zvýraznění jejich žluté pigmentace. Pouze u kultury OT2 nebyl pozorovatelný rozdíl v nárůstu kultury mezi jedno- a trojnásobnou koncentrací TS, u ostatních dvou kultur byl zaznamenán trend, že čím větší byla koncentrace TS, tím bohatěji byly kolonie narostené.

Přítomnost TS tedy samotné degradační kultury neinhibuje, ba naopak jim prospívá. Z toho vyplývá, že zpomalení degradace PVA v přítomnosti živin bylo buď způsobeno působením jiných mikroorganismů v přítomnosti TS nebo přednostním využíváním TS PVA degradační kulturou.

13 ZKOUŠKY VLIVU PŘÍTOMNOSTI DALŠÍCH MIKROORGANISMŮ NA RŮST PVA DEGRADAČNÍCH KULTUR

13.1 Důvod nasazení

Tento test navazoval na předchozí experiment na Petriho miskách a měl jednoznačně potvrdit nebo vyvrátit možnost inhibice růstu PVA degradačních kultur pomocí dalších mikroorganismů přítomných v aktivovaném kalu.

13.2 Rozvržení pokusu

Na jednu polovinu Petriho misek s PVA agarem a PQQ, PVA agarem, PQQ a TS a PVA agarem, PQQ a 3TS byla nanesena suspenze aktivovaného kalu a na druhou polovinu Petriho misek byly v řádku příčně na kal očkované suspenze PVA degradačních kultur JK2, Ž1 a OT2 tak, aby bylo možno porovnat růst těchto kultur v přímém sousedství kalu ve srovnání s růstem těchto kultur ve větší vzdálenosti od kalu. Misky byly kultivovány v klidu ve tmě při 25 °C. Po šesti dnech kultivace bylo provedeno pozorování.

13.3 Výsledky pokusu

Výsledek kultivace tří PVA degradačních kultur vedle aktivovaného kalu byl bez ovlivnění. Všechny kultury rostly obdobně jako v minulém pokusu, nebyla však pozorována změna růstu mezi kulturou rostoucí v těsné přítomnosti kalu a růstem kultury ve větší vzdálenosti od kalu. Tyto výsledky naznačují, že ovlivnění růstu PVA degradačních kultur by případně mohlo být způsobeno pouze přímým kontaktem s jinými heterotrofními kulturami.

14 ZKOUŠKY RŮSTU PVA DEGRADAČNÍCH KULTUR NA SUBSTRÁTECH PVA, SACHAROSE A TRYPTONU

14.1 Důvod nasazení

Tento pokus nepřímo navazoval na zkoušky vlivu živin tryptonu a sacharosy na růst PVA degradačních kultur a měl lépe ozřejmit využívání samotných substrátů PVA, sacharosy a tryptonu těmito kulturami.

14.2 Rozvržení pokusu

Na Petriho misky s PVA agarem, trypton agarem a agarem se sacharosou byly očkovány kultury Ž1, OT2 a JK2. Misky byly kultivovány v klidu ve tmě při 25 °C. Po devíti dnech kultivace bylo provedeno pozorování.

14.3 Výsledky pokusu

Kultura Ž1 byla schopna jako substrát využívat PVA, na němž rostla bez pigmentace, a také trypton, na němž rostla o něco lépe než na PVA a barvila se výrazně do žluta. Sacharosu nebyla schopna kultura Ž1 využívat vůbec.

Kultura OT2 rostla dobře jak na PVA, tak na tryptonu (na tryptonu o něco lépe) v obou případech za výrazné žluté pigmentace a stejně jako kultura Ž1 nerostla na sacharose.

Kultura JK2 rostla jak na PVA, tak na sacharose jen slabě a bez pigmentace, na tryptonu hustě s výraznou žlutou pigmentací.

Souhrnně lze tedy říci, že skoro všechny kultury nejsou schopny ke svému růstu využívat sacharosu, jsou schopné využívat PVA a velmi dobře trypton. Pro naše degradační lahvové testy (z nichž byla izolována kultura Ž1) se tak nabízí vysvětlení zpomalení degradace PVA v přítomnosti TS. Vzhledem k tomu, že je tato kultura schopna využívat jako substrát PVA, ale ještě lépe trypton, mohl přídatek tryptonu vyvolat zpomalení degradace PVA pravděpodobně proto, že byl degradační kulturou částečně upřednostňován.

15 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA NEADAPTOVANÝM KALEM ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK II

15.1 Důvod nasazení

Tento test navazoval na předchozí degradační lahvové testy a byl nasazen skoro souběžně se zkouškami růstu PVA degradačních kultur na substrátech PVA, sacharosy a tryptonu. Měl přesněji ukázat vliv jednotlivých živin na biodegradaci PVA.

15.2 Rozvržení pokusu

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

- 1) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 2) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 3) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹
- 4) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 5) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 6) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + TS (trypton 300 mg·l⁻¹, sacharosa 200 mg·l⁻¹)
- 7) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + trypton 500 mg·l⁻¹
- 8) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + trypton 500 mg·l⁻¹
- 9) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + trypton 500 mg·l⁻¹
- 10) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + sacharosa 500 mg·l⁻¹
- 11) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + sacharosa 500 mg·l⁻¹
- 12) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 1 g·l⁻¹ + sacharosa 500 mg·l⁻¹

Vždy v pondělí, středu a pátek bylo odebráno 0,5 ml vzorků ze všech lahví pro jodometrické stanovení PVA na mikrotitračních destičkách a přidáno 0,5 ml roztoku substrátů - TS do lahví 4-6, tryptonu do lahví 7-9 a sacharosy do lahví 10-12. V pravidelných intervalech byla také měřena koncentrace rozpuštěného uhlíku.

15.3 Výsledky pokusu

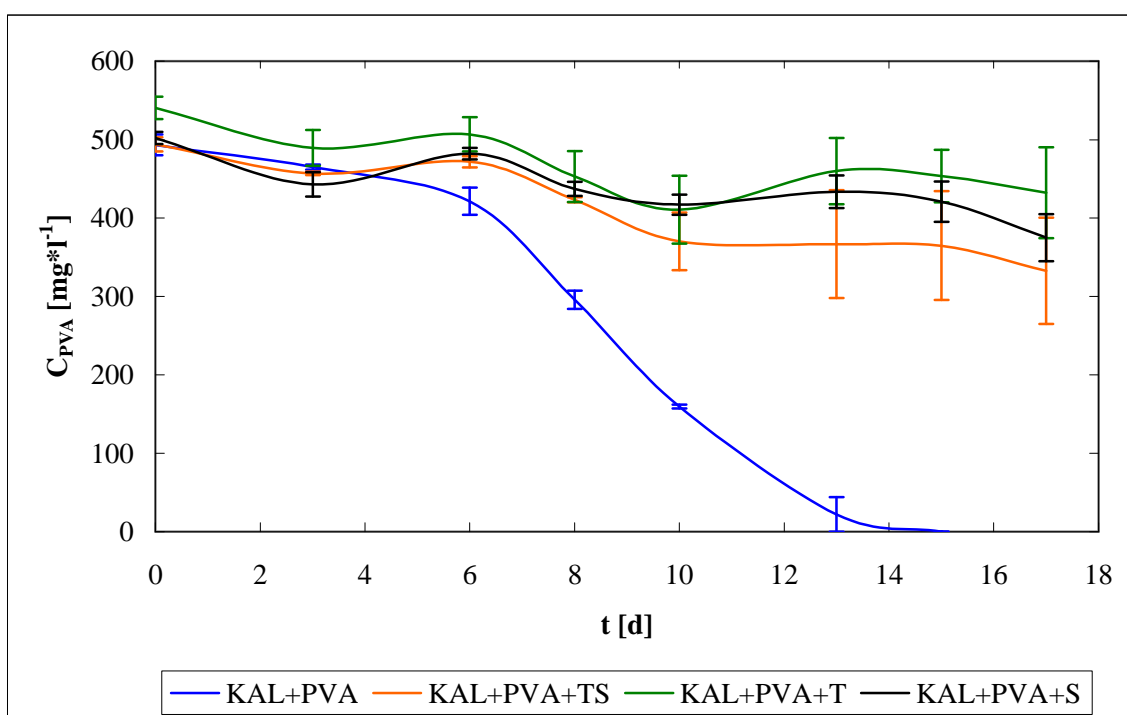
Experiment byl prováděn po dobu 17 dnů. Výsledky koncentrací PVA pomocí jodometrického stanovení na mikrotitračních destičkách jsou vidět na obrázku (Obr. 13) a výsledky rozpuštěného uhlíku na obrázku (Obr. 14). Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze tří paralelních stanovení a chybové úsečky směrodatným odchylkám viz tabulky (Tab. 10 a Tab. 11).

Tab. 10. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu (jodometrické stanovení)

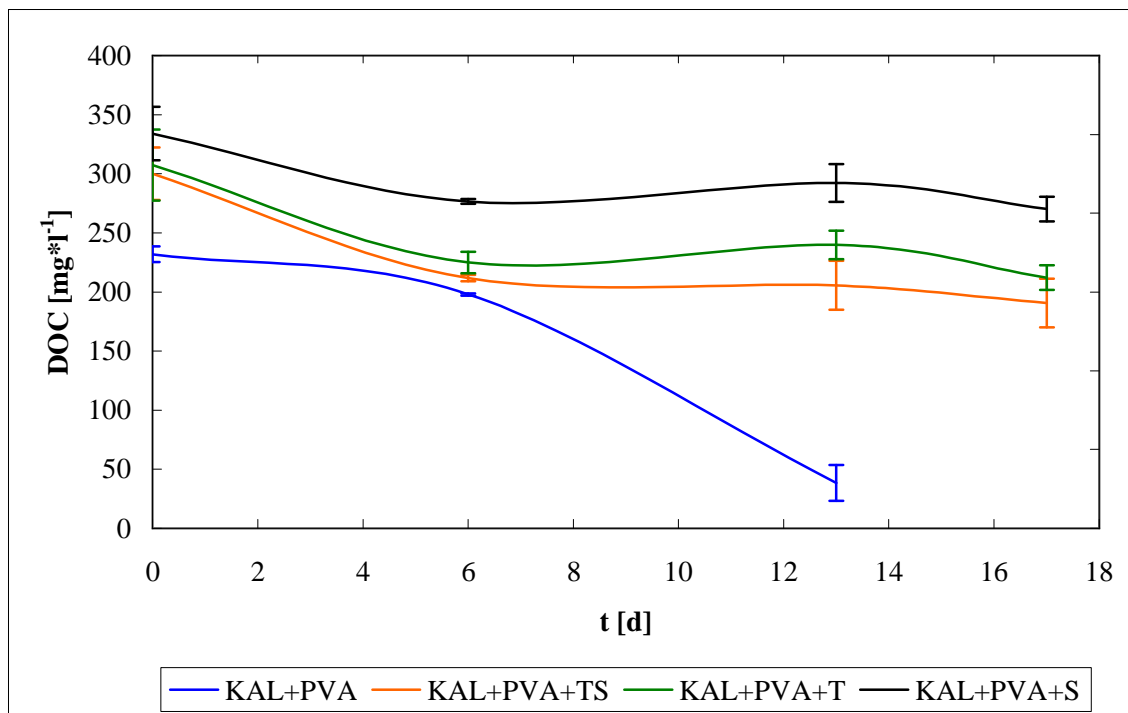
t [d]	1	2	3	prům.	směr. odch.	4	5	6	prům.	směr. odch.
0	474,3	500,8	504,5	493,2	13,44	497,4	503,2	482,0	494,2	8,972
3	460,2	467,0	467,0	464,7	3,213	455,2	455,1	459,8	456,7	2,176
6	405,1	413,5	445,5	421,4	17,42	473,5	479,3	462,0	471,6	7,201
8	296,6	280,6	309,6	295,6	11,88	418,7	426,6	424,0	423,1	3,299
10	158,7	157,4	162,8	159,6	2,288	325,1	414,6	370,8	370,2	36,55
13	13,9	0,0	52,1	22,0	22,02	304,2	462,7	333,3	366,7	68,89
15	0,0	0,0	0,0	0,0	0	307,9	462,4	323,6	364,6	69,44
17						283,5	428,7	286,0	332,7	67,88
t [d]	7	8	9	prům.	směr. odch.	10	11	12	prům.	směr. odch.
0	554,6	526,1	chyba	540,4	14,29	512,9	499,8	494,1	502,3	7,847
3	512,6	466,4		489,5	23,13	463,0	440,5	424,9	442,8	15,61
6	528,8	484,9		506,8	21,9	473,8	480,2	491,8	481,9	7,49
8	485,3	420,3		452,8	32,52	444,0	442,6	424,4	437	8,936
10	453,8	367,4		410,6	43,18	434,6	412,3	404,4	417,1	12,82
13	502,4	417,4		459,9	42,5	441,4	404,9	453,6	433,3	20,69
15	487,0	419,9		453,5	33,55	439,1	384,3	438,5	420,6	25,69
17	490,2	374,4		432,3	57,92	402,4	333,5	389,3	375,1	29,88

Tab. 11. Hodnoty koncentrace DOC a směrodatných odchylek v průběhu testu

t [d]	1	2	3	prům.	směr. odch.	4	5	6	prům.	směr. odch.
0	228,0	241,2	226,7	232,0	6,556	303,8	325,4	271,1	300,1	22,35
6	198,8	198,6	196,6	198,0	0,979	209,3	215,7	211,0	212	2,699
13	31,4	24,4	59,3	38,4	15,1	189,8	235,2	192,0	205,7	20,89
17						166,2	216,8	188,9	190,6	20,7
t [d]	7	8	9	prům.	směr. odch.	10	11	12	prům.	směr. odch.
0	337,4	277,3	chyba	307,4	30,06	254,2	269,2	228,2	250,5	16,96
6	234,1	215,9		225,0	9,09	209,5	206,6	206,1	207,4	1,512
13	252,0	227,8		239,9	12,09	222,8	202,9	231,5	219,1	11,95
17	201,9	222,7		212,3	10,38	210,4	192,0	205,5	202,6	7,753



Obr. 13. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (jodometrické stanovení)



Obr. 14. Závislost DOC na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem

Ani v tomto testu není vidět výrazná odlišnost mezi stanovením koncentrace PVA jodometricky a pomocí DOC. Stejně jako u předchozích experimentů, i zde se ukázalo, že nejrychleji probíhá degradace tam, kde je PVA jediným dostupným substrátem – v této sérii byl PVA degradován za 15 dní, což přesně odpovídá pokusům předchozím. Oproti tomu se degradace v přítomnosti daných živin po dobu testu ani nestačila rozběhnout, dokonce ani tam, kde byla v degradační směsi kromě PVA přítomna jen sacharosa. Ve světle výsledků s čistými kulturami degradačních bakterií nelze zpomalení degradace PVA v přítomnosti sacharosy vysvětlit upřednostněním tohoto substrátu bakteriemi před polyvinylalkoholem, ale zřejmě se zde uplatnil i jiný faktor – např. množení jiných heterotrofních bakterií, negativně ovlivňujících činnost bakterií degradačních. Pokus byl sice z časových důvodů ukončen po 17 dnech, ale přesto opětovně potvrdil výrazné zpomalení rozkladu polymeru za přítomnosti jiných organických látek.

16 ZKOUŠKY ROZKLADU PVA ČISTÝMI KULTURAMI Ž1 A OT2

16.1 Důvod nasazení

V tomto experimentu bylo cílem ověřit míru rozkladu PVA za podmínek se zvýšeným počtem degradačních bakterií na počátku pokusu. Byly použity kultury OT2 a Ž1, které v předchozích testech na miskách ukazovaly nejlepší růst na agaroch s PVA. Obě kultury byly použity samostatně i za přítomnosti aktivovaného kalu, v přítomnosti i v nepřítomnosti živin. Pro zabezpečení dokonalé pufrace degradačních směsí bylo zvoleno minerální médium se zvýšeným obsahem fosforečnanů (MM3F).

16.2 Rozvržení pokusu

V rámci tohoto experimentu bylo nasazeno osm sérií s dvěma paralelními vialkami vedle sebe, podle rozpisu:

- 1) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 0,5 g·l⁻¹ + Ž1 + FR
- 2) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 0,5 g·l⁻¹ + Ž1 + FR
- 3) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 0,5 g·l⁻¹ + Ž1 + TS
- 4) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 0,5 g·l⁻¹ + Ž1 + TS
- 5) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 0,5 g·l⁻¹ + OT2 + FR
- 6) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 0,5 g·l⁻¹ + OT2 + FR
- 7) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 0,5 g·l⁻¹ + OT2 + TS
- 8) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + kal 0,5 g·l⁻¹ + OT2 + TS
- 9) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + Ž1 + FR
- 10) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + Ž1 + FR
- 11) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + Ž1 + TS
- 12) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + Ž1 + TS
- 13) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + OT2 + FR
- 14) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + OT2 + FR

15) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + OT2 + TS

16) MM3F + PVA 500 mg·l⁻¹ + OT2 + TS

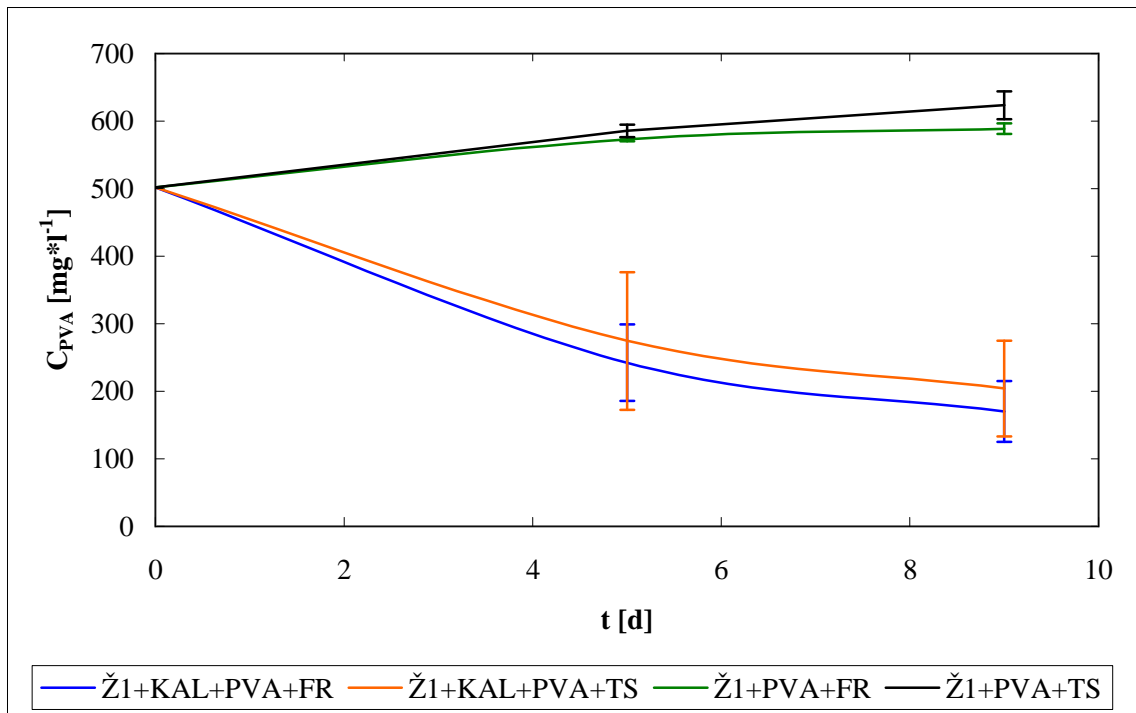
Vždy v pondělí, středu a pátek bylo přidáno 10 µl sterilního roztoku TS do vialek 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 a 16 a 10 µl sterilního fyziologického roztoku do ostatních vialek. V nultý, pátý a devátý den pokusu byla stanovena koncentrace PVA jodometricky v mikrotitračních destičkách. Vzhledem k nízkému celkovému objemu směsi ve vialkách (tj. 2 ml) nebylo možno vzorky před stanovením koncentrace PVA centrifugovat.

16.3 Výsledky pokusu

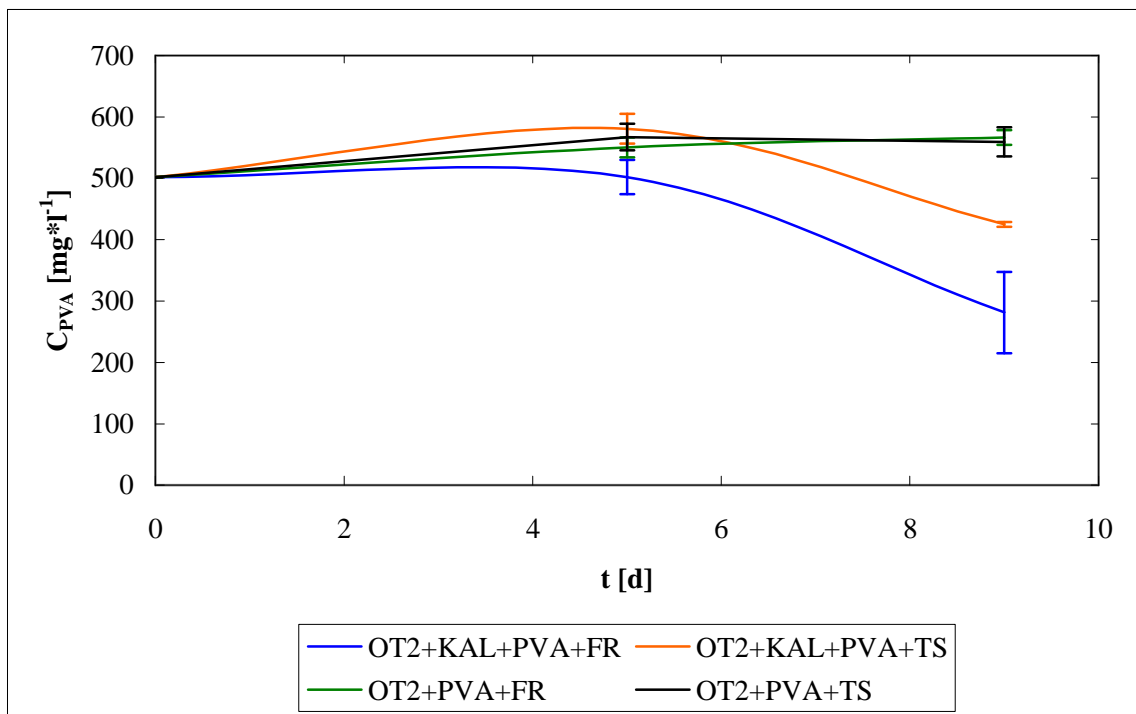
Experiment byl prováděn po dobu 9 dnů. Výsledky koncentrací PVA pomocí jodometrického stanovení na mikrotitračních destičkách jsou vidět na obrázcích (Obr. 15 a Obr. 16). Hodnoty v grafu odpovídají průměru ze dvou paralelních stanovení a chybové úsečky směrodatným odchylkám viz tabulka (Tab. 12).

Tab. 12. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu

t	1	2	prům.	směr. odch.	3	4	prům.	směr. odch.
[d]								
0	501,9	501,9	501,9	0,00	501,9	501,9	501,9	0,00
5	185,7	298,7	242,2	56,49	376,7	172,7	274,7	101,9 6
9	125,1	215,0	170,1	44,94	275,0	133,2	204,1	70,89
t	5	6	prům.	směr. odch.	7	8	prům.	směr. odch.
[d]								
0	501,9	501,9	501,9	0,00	501,9	501,9	501,9	0,00
5	473,9	529,9	501,9	27,98	605,4	556,7	581,0	24,35
9	214,8	347,9	281,3	66,55	421,2	428,8	425,0	3,81
t	9	10	prům.	směr. odch.	11	12	prům.	směr. odch.
[d]								
0	501,9	501,9	501,9	0,00	501,9	501,9	501,9	0,00
5	576,3	570,4	573,3	2,98	595,1	576,8	586,0	9,17
9	581,3	596,7	589,0	7,68	603,0	644,4	623,7	20,71
t	13	14	prům.	směr. odch.	15	16	prům.	směr. odch.
[d]								
0	501,9	501,9	501,9	0,00	501,9	501,9	501,9	0,00
5	567,0	534,2	550,6	16,43	588,9	545,5	567,2	21,73
9	554,8	578,9	566,8	12,08	583,6	535,5	559,5	24,05



Obr. 15. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (pro kulturu Ž1)



Obr. 16. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (pro kulturu OT2)

Jak je vidět z obou grafů, výsledky jsou celkem zajímavé. Zvláště pak fakt, že se za dobu pokusu degradace u obou kultur shodně rozběhla pouze ve vialkách, kde byl přítomen kal – v nepřítomnosti kalu degradace neprobíhala. To by mohlo nasvědčovat tomu, že obě kultury potřebovaly k provedení degradace nějaký faktor poskytovaný kalem, což je ovšem v rozporu s pozorováním provedeným na Petriho miskách (viz kap. 12 - Zkoušky vlivu živin tryptonu a sacharosy na růst PVA degradačních kultur), kde byly obě kultury schopny růst na PVA agaru v přítomnosti i nepřítomnosti živin tryptonu a sacharosy i bez přítomnosti kalu. Vysvětlením tak může být zvýšená koncentrace fosforečnanů v MM3F, která zřejmě množení degradačních bakterií výrazně zpomalovala – ve směsích s kalem mohly snížení koncentrace fosforečnanů zabezpečit bakterie schopné akumulace fosforu v buňkách.

Dalším důležitým zjištěním byl fakt, že degradace PVA kalem obohaceným degradačními bakteriemi byl v přítomnosti jiných organických látek sice poněkud zpomalen proti směsí, kde byl PVA jediným substrátem, toto zpomalení však bylo mnohem méně výrazné (zejména u obohacení kalu kulturou Ž1) než u předcházejících pokusů s neadaptovaným kalem (s nízkým množstvím degradačních bakterií). Tyto výsledky tak posilují domněnku, že výrazné zpomalení degradace PVA neadaptovaným kalem za přítomnosti jiných, snadno dostupných substrátů, je způsobeno růstem jiných heterotrofních bakterií a jejich negativním účinkem na množení bakterií degradačních.

17 BIODEGRADACE PVA PŮDNÍM VÝLUHEM

17.1 Důvod nasazení

Tento pokus navazoval na práci Pavla Dřímala a spolupracovníků [33], kteří studovali biologickou rozložitelnost PVA půdními mikroorganismy. Tento pokus měl tedy ověřit jejich závěry a pokusit se opakovanými přídávky sekundárních alkoholů dosáhnout vyšší degradace PVA.

17.2 Rozvržení pokusu

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

- 1) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + půdní výluh
- 2) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + půdní výluh
- 3) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + půdní výluh
- 4) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + půdní výluh + PQQ 20 µg·l⁻¹ + 3xSA po 20 µg·l⁻¹
- 5) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + půdní výluh + PQQ 20 µg·l⁻¹ + 3xSA po 20 µg·l⁻¹
- 6) MM2F + PVA 500 mg·l⁻¹ + půdní výluh + PQQ 20 µg·l⁻¹ + 3xSA po 20 µg·l⁻¹

Sekundární alkoholy byly dávkovány na počátku - v nultý den, dále v pátý a třináctý den, po té, co již nebyly organolepticky zaznamenány. Vždy v pondělí a pátek bylo odebráno 0,5 ml vzorků ze všech lahví pro jodometrické stanovení PVA na mikrotitračních destičkách. V pravidelných intervalech byla také měřena koncentrace rozpuštěného uhlíku. Kvůli tomu, že byl úbytek sekundárních alkoholů vždy sledován pouze organolepticky, byla souběžně z pokusnými lahvemi nasazena kontrolní láhev se 100 ml sterilního MM2F a přídávkem PQQ a sekundárních alkoholů, která měla sloužit k organoleptickému sledování samovolného úbytku sekundárních alkoholů vytěkáním.

17.3 Výsledky pokusu

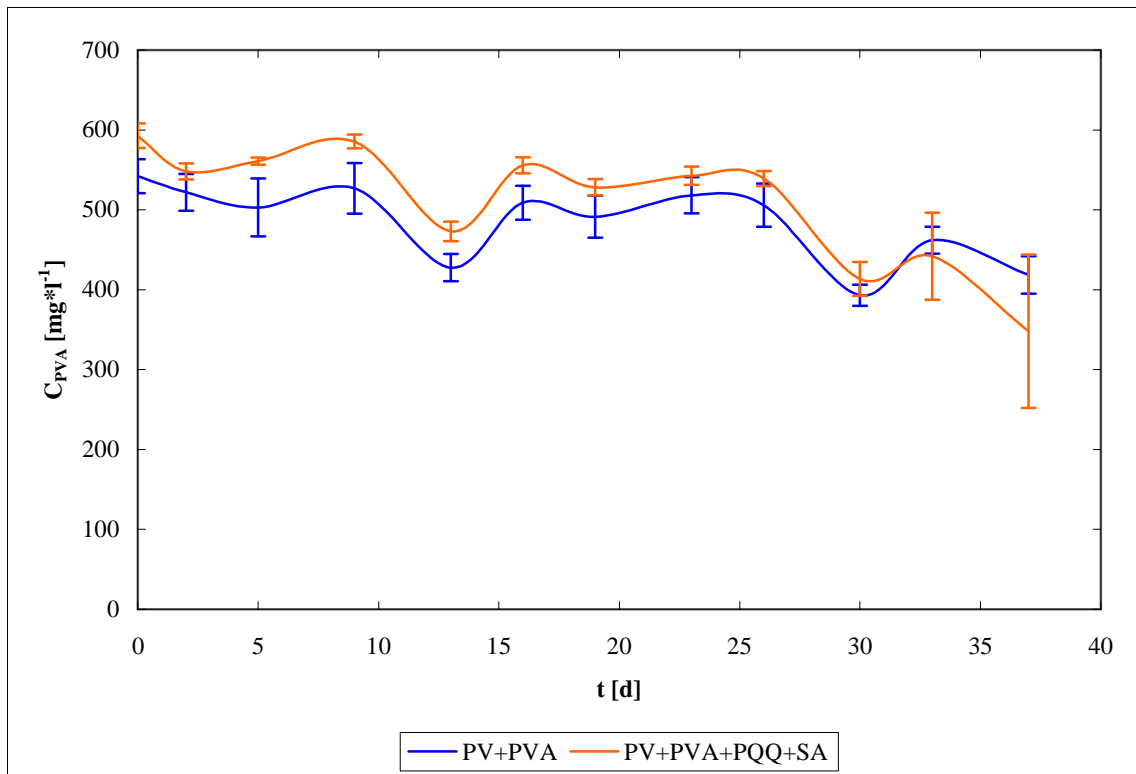
Experiment byl prováděn po dobu 33 dnů. Výsledky koncentrací PVA pomocí jodometrického stanovení na mikrotitračních destičkách jsou vidět na obrázku (Obr. 17) a výsledky rozpuštěného uhlíku na obrázku (Obr. 18). Hodnoty v grafech odpovídají průměru ze tří paralelních stanovení a chybové úsečky směrodatným odchylkám viz tabulky (Tab. 13 a Tab. 14).

Tab. 13. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu (jodometrické stanovení)

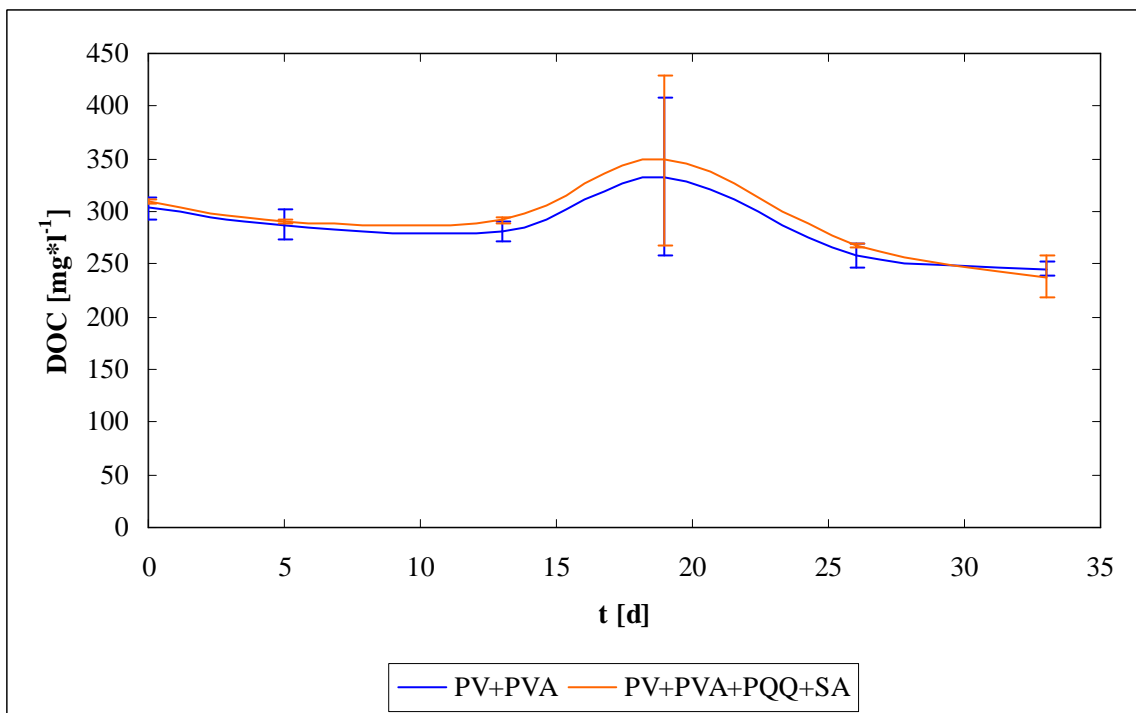
t [d]	1	2	3	prům.	směr. odch.	4	5	6	prům.	směr. odch.
0	512,0	556,4	557,5	542,0	21,22	571,7	599,9	607,1	592,9	15,28
2	489,5	535,7	540,5	521,9	23,02	535,1	559,3	549,6	548,0	9,98
5	452,0	523,2	533,4	502,8	36,21	554,7	563,2	564,3	560,7	4,29
9	482,4	544,8	553,2	526,8	31,59	575,2	596,1	586,0	585,7	8,53
13	409,1	424,2	450,1	427,8	16,91	462,9	465,9	490,4	473,1	12,29
16	479,0	519,0	527,8	508,6	21,21	541,7	560,5	564,4	555,5	9,93
19	455,8	499,7	518,6	491,4	26,32	523,8	518,3	542,2	528,1	10,22
23	487,8	524,3	542,1	518,1	22,60	550,7	526,5	550,5	542,6	11,36
26	468,7	516,1	532,5	505,8	27,06	528,2	538,0	551,1	539,1	9,36
30	385,0	382,9	411,8	393,2	13,19	439,1	387,0	414,9	413,7	21,27
33	438,3	472,4	475,0	461,9	16,74	486,2	474,1	365,5	441,9	54,29
37	448,5	416,0	391,4	418,6	23,41	446,8	379,0	217,9	347,9	96,04

Tab. 14. Hodnoty koncentrace DOC a směrodatných odchylek v průběhu testu

t [d]	1	2	3	prům.	směr. odch.	4	5	6	prům.	směr. odch.
0	290,1	302,5	316,9	303,2	10,96	309,2	312,6	308,6	310,1	1,75
5	268,6	302,0	291,4	287,3	13,92	287,3	290,8	293,8	290,6	2,62
13	268,0	285,2	290,7	281,3	9,67	289,6	296,4	288,4	291,5	3,53
19	270,2	438,6	289,0	332,6	75,33	284,9	297,4	463,6	348,6	81,44
26	241,9	264,8	267,2	258,0	11,41	266,1	269,4	266,5	267,3	1,48
33	236,8	248,9	251,9	245,9	6,51	248,2	255,8	209,3	237,8	20,35



Obr. 17. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (jodometrické stanovení)



Obr. 18. Závislost DOC na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem

Jak je vidět z obrázků, závislosti koncentrací na čase měly u obou metod podobný trend – u obou závislostí je vidět, že degradace PVA v půdním výluhu probíhala jen velice pomalu, přičemž nebyl pozorován žádný pozitivní vliv přítomnosti sekundárních alkoholů na urychlení biodegradace polyvinylalkoholu. Nepodařilo se tak potvrdit výsledky Dřímala a spolupracovníků [33], u nichž při použití výluhu z podobné směsi půd došlo v přítomnosti sekundárních alkoholů k 33 % degradaci PVA již v průběhu osmi dnů. Tato skutečnost mohla být způsobena jistou heterogenitou použitého půdního substrátu, kdy se nemuselo v obou případech podařit odebrat vzájemně si odpovídající vzorky.

Pozitivním zjištěním bylo, že sekundární alkoholy obsažené v kontrolní láhvi byly i po 33 dnech pokusu organolepticky jasně zaznamatelné. To znamená, že úbytek sekundárních alkoholů v testovaných lahvích nebyl způsoben jejich vytěkáním, ale naopak jejich spotřebáním, že tedy půdní mikroflóra má jistou schopnost tyto sloučeniny využít.

IV. ZÁVĚR

Prvním cílem mé diplomové práce bylo zjistit, jak bude probíhat biodegradace PVA v přítomnosti jiných, mikroorganismům dobře dostupných substrátů. Druhým cílem bylo ověřit vliv přísad některých dalších látek k degradační směsi na biodegradaci polyvinylalkoholu. V obou případech byl průběh biodegradace vyhodnocován sledováním úbytku koncentrace PVA a rozpuštěného organického uhlíku po odcentrifugování buněk.

V první fázi jsem se zaměřil na srovnání degradace PVA v systému, kde byl PVA pro degradační bakterie jediným dostupným substrátem, se systémem, kam byl dávkován modelový směsný substrát - trypton a sacharosa. Hned v prvním testu byl zaznamenán velký problém s neschopností degradačních směsí udržet požadované pH. Dobré výsledky byly zaznamenány po úpravě podmínek ve druhém pokusu, a to použitím týden starého kalu a minerálního média s odlišným zdrojem dusíku a se změněným poměrem a dvojnásobnou koncentrací fosforečnanů. Pak již bylo zjištěno, že v neadaptovaném aktivovaném kalu probíhá nejrychleji degradace PVA za podmínek, kdy je PVA jediným substrátem – zde proběhla úplná degradace polymeru již za cca 15 dní. Jakýkoliv přísadek dalších látek do směsi biodegradaci PVA zpomaloval. Pokud byly v degradační směsi přítomny PQQ a sekundární alkoholy, trvala úplná degradace PVA 17 dní, v případě přítomnosti tryptonu a sacharosy ve směsi proběhla degradace PVA nehlédě na současnou přítomnost nebo nepřítomnost PQQ a sekundárních alkoholů za cca 28 dní. Urychlení degradace v přítomnosti živin nezpůsobil ani přísadek mrtvé biomasy kultury *Acetobacter aceti*.

V návaznosti na tyto výsledky byl dále studován mechanismus ovlivnění degradačního procesu přítomností živin. Ze směsi aktivovaného kalu s PVA jakožto jediným substrátem, kde byl PVA již z větší části zdegradován, byla izolována PVA degradační kultura s označením Ž1 a s ní, stejně jako s dalšími dvěma kulturami (OT2 a JK2) izolovanými na ÚIOŽP v předchozích letech, byla provedena sada dalších testů. Nejprve bylo zjištěno, že přítomnost tryptonu a sacharosy růst těchto PVA degradačních kultur neinhibuje, ba právě naopak jim prospívá. V dalších doplňkových testech bylo zjištěno, že tyto kultury prakticky nejsou schopny ke svému růstu využívat sacharosu, jsou schopny využívat PVA a velmi dobře trypton.

V závěrečných degradačních testech s neadaptovaným kalem byl prokázán inhibiční účinek organických látek na degradaci PVA i v případě samotného tryptonu a samotné sacharosy, a protože experimenty rozkladu PVA kalem obohaceným o degradační kultury ukázaly

menší míru zpomalení degradace PVA než u kalu neadaptovaného, je možné vyslovit předpoklad, že přítomnost jiných organických látek v degradační směsi inhibuje rozklad polyvinylalkoholu tím, že stimuluje rozvoj jiných heterotrofních bakterií, které pak ovlivňují množení bakterií degradačních. Tento předpoklad však bude muset být potvrzen v dalších experimentech, stejně jako výsledky zpomalení degradace cizorodé látky v přítomnosti běžných organických látek. Bylo by tedy potřebné tyto závěry ověřit také na jiném kalu než z ČOV Malenovice a také pro jinou cizorodou látku než je PVA, neboť zobecnění těchto výsledků by znamenalo zásadní změnu pohledu na biodegradabilitu cizorodých látek v čistírenských systémech.

Dalším cílem mé diplomové práce bylo ověřit kladný vliv přídatku PQQ a sekundárních alkoholů na biodegradaci polyvinylalkoholu v půdním výluhu, jak ji popsal Dřímala a kol. [33] a pokusit se opakovanými přídatky PQQ a sekundárních alkoholů dosáhnout vyšší degradace. Pokus degradace PVA půdním výluhem byl prováděn po dobu 37 dnů. Za tuto dobu se PVA degradovalo pouze minimálně, přičemž v lahvích, do nichž byly přidávány PQQ a sekundární alkoholy nebylo pozorováno žádné urychlení biodegradace. Výsledky Dřímala a spolupracovníků tedy potvrzeny nebyly.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] RYBNÍKÁŘ, František. *Makromolekulární chemie II*. 1. vyd. Brno Vysoké učení technické v Brně 1987. 91 s.
- [2] *Wikipedia : The Free Encyclopedia* [online]. 2007 , 5 January 2007 01:21 UTC [cit. 2007-01-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.the-innovation-group.com/ChemProfiles/Polyvinyl%20Alcohol.htm>>.
- [3] RYBNÍKÁŘ, František. *Makromolekulární chemie*. 1. vyd. Zlín : FT VUT, 2000. 105 s. ISBN 8021415568.
- [4] KAWAI, F. Sphingomonas involved in the biodegradation of xenobiotic polymers. In *J Ind Microbiol Biotechnol* 23. [s.l.] : [s.n.], 1999. s. 400-407.
- [5] LENZ, R.W. Advances in Polymer Science. In PEPPAS, N.A., LANGER, R.S. *Biopolymers I*. Berlin : Springer-Verlag, 1993. s. 1-40.
- [6] JAYASEKARA, Ranjith, et al. Biodegradability of a Selected Range of Polymers and Polymer Blends and Standard Methods for Assessment of Biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment, Vol. 13, No. 3*. [s.l.] : [s.n.], 2005. s. 231-251.
- [7] TOKIWA, Y., IWAMOTO, A. *Establishment of biodegradability evaluation for plastics of PVA series*. [s.l.] : Proceedings of the Annual Meeting '92 of the Fermentation and Bioengineering Society, 1992. p. 158 s.
- [8] SHIMAO, M., et al. Pyrroloquinoline quinone as an essential cofactor for a poly(vinyl alcohol)-degrading symbiont, Pseudomonas sp. VM15C. In *Agric Biol Chem*. Vol. 48. [s.l.] : [s.n.], 1984. s. 2873-2876.
- [9] HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd edition. New York : Oxford University Press, 1993. 85 s.
- [10] CHIELLINI, Emo, et al. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. In *Progress in Polymer Science*. Vol. 28. [s.l.] : [s.n.], 2003. s. 963-1014 .
- [11] SUZUKI, T., et al. Some characteristics of Pseudomonas O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. In *Agric Biol Chem*. Vol. 37. [s.l.] : [s.n.], 1973. s. 747-756.
- [12] SUZUKI, T. *Agric Biol Chem*. Vol. 40. [s.l.] : [s.n.], 1976. s. 497-504.

- [13] SUZUKI, T. Degradation of poly(vinyl alcohol) by microorganisms. In *J Appl Polym Sci, Appl Polym Symp*. Vol. 35. [s.l.] : [s.n.], 1979. s. 431-437.
- [14] WATANABE, Y., et al. Formation of hydrogen peroxide by a polyvinyl alcohol degrading enzyme. In *Agric Biol Chem*. Vol. 39. [s.l.] : [s.n.], 1975. s. 2447-2448.
- [15] SAKAI, K., HAMADA, N., WATANABE, Y. Studies on the poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme. Part VI. Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and β -diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp. In *Agric Biol Chem*. Vol. 50. [s.l.] : [s.n.], 1986. s. 989-996.
- [16] WATANABE, Y., et al. Purification and properties of a polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain of *Pseudomonas*. In *Arch Biochem Biophys*. Vol. 174. [s.l.] : [s.n.], 1976. s. 575-581.
- [17] MATSUMURA, S., et al. Novel poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism. In *Macromolecules*. Vol. 32. [s.l.] : [s.n.], 1999. s. 7753-6177.
- [18] SAKAZAWA, C., et al. Symbiotic utilization of poly(vinyl alcohol) by mixed cultures. In *Appl Environ Microbiol*. Vol. 41. [s.l.] : [s.n.], 1981. s. 261-267.
- [19] SHIMAO, M., et al. Enhancement of pyrroloquinoline quinone production and polyvinyl alcohol utilization in mixed continuous cultures of *Pseudomonas putida* VM15A and *Pseudomonas* sp. strain VM15C with mixed carbon sources. In *Appl Environ Microbiol*. Vol. 49. [s.l.] : [s.n.], 1985. s. 1389-1391.
- [20] MORI, T., et al. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades poly(vinyl alcohol). In *Biosci Biotechnol Biochem*. Vol. 60. [s.l.] : [s.n.], 1996. s. 330-332.
- [21] HASHIMOTO, S., FUJITA, M. Isolation and some properties of poly(vinyl alcohol) degrading bacteria. In *Gesuido Kyokaishi*. Vol. 23. [s.l.] : [s.n.], 1986. s. 44-51.
- [22] KAWAGOSHI, Y., et al. Production and recovery of an enzyme from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH that degrades polyvinyl alcohol. In *World J Microbiol Biotechnol*. Vol. 13. [s.l.] : [s.n.], 1997. s. 63-67.

- [23] GOODWIN, P.M., ANTHONY, C. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. In *Adv Microb Physiol*. Vol. 40. [s.l.] : [s.n.], 1998. s. 1-80.
- [24] MATSUSHITA, M., et al. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. In *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 58. [s.l.] : [s.n.], 2002. s. 13-22.
- [25] OSHIRO, Yoshiki, ITOH, Shinobu. Modeling of quinoprotein functions. In *Puree & Appl Chem*. Vol. 66. [s.l.] : [s.n.], 1994. s. 753-758.
- [26] *Principles and Applications of Quinoproteins*. V. L. Davidson. New York : Marcel Dekker, Inc., 1993.
- [27] VAN KLEEF, M. A. G., DUINE, J. A. Factors relevant in bacterial pyrroloquinoline quinone production. In *Appl Environ Microbiol*. Vol. 55. [s.l.] : [s.n.], 1989. s. 1209-1213.
- [28] VAN KLEEF, M. A. G., JONGEJAN, J. A., DUINE, J. A. Factors relevant in the reaction of pyrroloquinoline quinone with amino acids. Analytical and mechanistic implications. In *European Journal of Biochemistry*. Vol. 183. [s.l.] : [s.n.], 1989. s. 41-47.
- [29] KAWAGOSHI, Y., FUJITA, M. Purification and properties of polyvinyl alcohol oxidase with broad substrate range obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH. In *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 13. [s.l.] : [s.n.], 1997. s. 273-277.
- [30] KAWAGOSHI, Y., FUJITA, M. Purification and properties of the polyvinyl alcohol-degrading enzyme 2,4-pentanedione hydrolase obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH. In *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 14. [s.l.] : [s.n.], 1998. s. 95-100.
- [31] SHIMAO, M., et al. Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinone-dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. In *Appl Environ Microbiol*. Vol. 51. [s.l.] : [s.n.], 1986. s. 268-275.

- [32] JULINOVÁ, M., RŮŽIČKA, J., HOFFMANN, J. Biodegradace polyvinylalkoholu za přítomnosti pyrrolochinolinchinonu a specifických substrátů. *Plasty a kaučuk*. Sv. 5-6. [s.l.] : [s.n.], 2006. s. 9-13.
- [33] DŘÍMAL, P., HOFFMANN, J., RŮŽIČKA, J. Biologická rozložitelnost polyvinylalkoholu (PVA) půdními mikroorganismy. *Plasty a kaučuk*. [s.l.] : [s.n.], 2007. V tisku.
- [34] MARA, Duncan, HORAN, Nigel. Recalcitrant organic compounds. In: *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Leeds : Academic Press, 2003, s. 562-563.
- [35] IWAHASHI, Masahide, et al. Mechanism for Degradation of Poly(Sodium Acrylate) by Bacterial Consortium No. L7-98. In *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 95, No.5. [s.l.] : [s.n.], 2003. s. 483-487.
- [36] HAYASHI, T., et al. Microbial degradation of poly(sodium acrylate). In *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58. [s.l.] : [s.n.], 1994. s. 444-446.
- [37] STAHL, J. D., et al. Biodegradation of superabsorbent polymers in soil. *Environmental Science and Pollution Research* 7 (2). [s.l.] : [s.n.], 2000. s. 83-88. 0944-1344
- [38] DI GIOIA, D., et al. Aggregation-based cooperation during bacterial aerobic degradation of polyethoxylated nonylphenols. *Research in Microbiology* 155 (9). [s.l.] : [s.n.], 2004. s. 761-769. 0923-2508
- [39] ABALOS, A., et al. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15 (4). [s.l.] : [s.n.], 2004. s. 249-260. 0923-9820
- [40] COUFALÍKOVÁ, Martina. *Symbiotická biodegradace polyvinylalkoholu*. [s.l.], 2006. 89 s. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [40] ASTM D 5209-92 (1992) Standard Test Method for Determining the Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in the Presence of Municipal Sewage Sludge

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADH	Alkohol dehydrogenasa
ČOV	Čistírna odpadních vod
DP	Diplomová práce
FR	Fyziologický roztok
FT	Fakulta technologická
MDH	Methanol dehydrogenasa
MM	Minerální médium
MM2F	Minerální médium se zdvojenými a upravenými objemy roztoků fosforečnanů
MM3F	Minerální médium se ztrojenými a upravenými objemy roztoků fosforečnanů
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát – redukována forma
PEG	Polyethylen glykol
PQQ	Pyrrlochinolínchinon
PSA	Polyakrylát sodný
PV	Půdní výluh
PVA	Polyvinylalkohol
PVAc	Polyvinylacetát
PVADH	PVA-dehydrogenasa
S	Zásobní roztok sacharosy
SA	Sekundární alkohol(y)
SAO	Secondary alcohol oxidase = oxidasa sekundárních alkoholů
T	Zásobní roztok tryptonu
TS	Zásobní roztok živin - tryptonu a sacharosy
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Vzorec PVA.....</i>	10
<i>Obr. 2. Mechanismus výroby PVA z PVAc [1]</i>	11
<i>Obr. 3. Mechanismus enzymatického rozkladu PVA [6]</i>	12
<i>Obr. 4. Mechanismus rozkladu PVA pomocí hydroxylových radikálů [6]</i>	13
<i>Obr. 5. Tvorba hydroxylových radikálů pomocí Fentonova činidla [9]</i>	14
<i>Obr. 6. Chemická struktura PQQ</i>	16
<i>Obr. 7. Kalibrační přímka PVA</i>	35
<i>Obr. 8. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem</i>	40
<i>Obr. 9. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (jodometrické stanovení)</i>	45
<i>Obr. 10. Závislost DOC na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem.....</i>	46
<i>Obr. 11. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (jodometrické stanovení)</i>	52
<i>Obr. 12. Závislost DOC na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem.....</i>	52
<i>Obr. 13. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (jodometrické stanovení)</i>	60
<i>Obr. 14. Závislost DOC na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem.....</i>	61
<i>Obr. 15. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (pro kulturu Ž1).....</i>	65
<i>Obr. 16. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (pro kulturu OT2).....</i>	65
<i>Obr. 17. Závislost koncentrace PVA na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem (jodometrické stanovení)</i>	69
<i>Obr. 18. Závislost DOC na čase ve vzorcích s neadaptovaným kalem.....</i>	69

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Klasifikace a charakterizace některých chinoproteinů [24]</i>	<i>17</i>
<i>Tab. 2. Extracelulární produkce PQQ některými bakteriemi [27].....</i>	<i>17</i>
<i>Tab. 3. Substrátová specifita PVA-oxidasy izolované z kultury Pseudomonas vesicularis var. povalolyticus PH [29]</i>	<i>18</i>
<i>Tab. 4. Naměřená absorbance v závislosti na koncentraci PVA</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 5. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 6. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu (jodometrické stanovení)</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 7. Hodnoty DOC a směrodatných odchylek v průběhu testu.....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 8. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu (jodometrické stanovení)</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 9. Hodnoty DOC a směrodatných odchylek v průběhu testu.....</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 10. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu (jodometrické stanovení)</i>	<i>59</i>
<i>Tab. 11. Hodnoty koncentrace DOC a směrodatných odchylek v průběhu testu</i>	<i>60</i>
<i>Tab. 12. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu</i>	<i>64</i>
<i>Tab. 13. Hodnoty koncentrace PVA a směrodatných odchylek v průběhu testu (jodometrické stanovení)</i>	<i>68</i>
<i>Tab. 14. Hodnoty koncentrace DOC a směrodatných odchylek v průběhu testu</i>	<i>68</i>

EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

Místo uložení práce: Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Autor práce: Bc. Petr Zeman
Název práce česky: Vliv přídavných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu anglicky: Effect of additional matterials on biodegradation of polyvinyl alcohol
Vedoucí práce: RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
Vysoká škola (název a adresa): Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Mostní 5139, 760 01 Zlín Fakulta technologická, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení práce: 2007
Počet stran, obrázků, tabulek: 80, 18, 14
Předmětová hesla: česky: Biodegradace, polyvinylalkohol, neadaptovaný aktivovaný kal, trypton, sacharosa, sekundární alkoholy, PQQ. anglicky: Biodegradation, polyvinyl alcohol, unacimated activated sludge, tryptone, su-crose, secondary alcohols, PQQ.
Souhrn česky: V práci byl studován vliv přítomnosti dalších látek na biodegradaci polyvinylalkoholu neadaptovaným aktivovaným kalem. Úbytek koncentrace PVA byl měřen jodometricky a pomocí měření koncentrace rozpuštěných organických látek. Nejrychleji probíhala biodegradace polyvinylalkoholu v případě, že byl polyvinylalkohol pro PVA degradační bakterie jediným dostupným substrátem. V přítomnosti dalších organických látek byla degradace polyvinylalkoholu zpomalena, pravděpodobně proto, že PVA degradující kultury byly ovlivňovány jinými heterotrofními bakteriemi. anglicky: Effect of additional materials on biodegradation of polyvinyl alcohol by unacimated activated sludge has been studied. Decrease of PVA concentration has been measured by iodometric method and by measuring of dissolved organic carbon concentration. Biodegradation of polyvinyl alcohol proceeded the most quickly in case where PVA was the only substrate. Biodegradation has been slowed down when another organic compounds was present in blend. It was probably caused by the growth of heterotrophic bacteria influencing PVA degrading cultures.