

STUDIUM BAKTERIÍ ROZKLÁDAJÍCÍCH POLYVINYL-ALKOHOL

Alexandra Vlčková

**Diplomová práce
2005**

**Univerzita Tomáše Bati Ve Zlíně
Fakulta technologická**

ABSTRAKT

Český text

Polyvinyl alkohol je jedním ze synteticky vyrobených, ve vodě rozpustných polymerů, široce používaných v průmyslu. V přírodě je rozložitelný jen velmi málo a pomalu. Proto jsou zkoumány biologické metody, biodegradace PVA mikroorganismy, které mohou být použity jako zdroj urychlení degradace PVA v biologickém systému čištění a úpravy odpadních vod. Ověřování degradace PVA kulturou OT3 za přídavku některých faktorů a symbiotický vztah této kultury s kulturou *Rhodococcus globerulus* bylo prvním cílem mé práce. Mezi faktory, které byly použity patří především inaktivní katalasa, methionin, hemin. Druhým cílem mé práce byla izolace čistých kultur z čistírenských kalů. A následné testování těchto získaných kultur, zda jsou schopny degradace PVA.

Text ve světovém jazyce, v angličtině

Polyvinylalcohol is one of the man-made soluble polymers widely used in some industrial fields. It is slowly degradable in the common environment so that the biological methods of their microbial degradation are studied. These methods may be used as the factor of the intensifying PVA degradation during the biological process of wastewater treatment. Studying of the PVA degradation by OT3 culture with the addition of some factors and finding of the principle of the its symbiosis with *Rhodococcus globerulus* were the main aims of the work. Inactive catalase, methionin and hemin were the main factors used in the tests. The isolation of pure bacterial cultures from activated sludges and their consequent testing for PVA degradation was the second aim of the work.

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení a poskytování cenných rad při vypracování této diplomové práce.

Děkuji celému kolektivu ústavu inženýrství životního prostředí za vytvoření velmi dobrých podmínek při práci. Ráda bych také upřímně poděkovala rodičům, přátelům a kolegům za podporu a povzbuzení při studiu.

Prohlášení

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo dle uvážení vedoucího diplomové práce a vedoucího ústavu. V případě publikací budu uvedena jako spoluautor.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně dne 17.května 2005

.....
Alexandra Vlčková

OBSAH

ÚVOD.....	7
1. LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	8
1.1 STRUKTURA, VLASTNOSTI A POUŽITÍ POLYVINYL-ALKOHOLU.....	8
1.2 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD PVA SMĚSNÝMI (ČISTÍRENSKÝMI) KULTURAMI-AKTIVOVANÝ KALEM.....	9
1.2.1 Stanovení produkce CO ₂ při biodegradaci PVA ve vodním prostředí.....	10
1.2.2 Biologická rozložitelnost PVA stanovena pomocí úbytku organického uhlíku.....	10
1.3 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD PVA ČISTÝMI KULTURAMI.....	11
1.3.1 Rozklad PVA jedinou bakteriální kulturou.....	11
1.3.2 Rozklad PVA symbiotickými bakteriálními kulturami.....	12
1.4 IZOLACE BAKTERIÁLNÍCH KULTUR ROZKLÁDAJÍCÍCH PVA.....	14
1.4.1 Popis izolace kmenů <i>Pseudomonas</i> Tokiwou a kol.....	14
1.4.2 Popis izolace kmenů <i>Sphingomonas</i> Kimem a kol.....	15
1.4.3 Popis izolace kmenů SB68+ SB69 Lee a kol.....	16
1.5 VÝZNAM BAKTERIÍ RODU <i>SPHINGOMONAS</i> PRO DEGRADACI PVA I JINÝCH POLYMERNÍCH LÁTEK.....	17
1.6 NÁVAZNOST NA PŘEDCHÁZEJÍCÍ DIPLOMOVÉ A JINÉ PRÁCE.....	20
2. NÁVAZNOST A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 ŽIVNÁ MEDIA, ROZTOKY A CHEMIKÁLIE PRO KULTIVACI BAKTERIÍ.....	24
3.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	27
3.3 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	28
3.4 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY.....	28
3.4.1 Provedení adaptace kalu.....	28
3.4.2 Postup při izolaci kultur.....	29
3.4.3 Stanovení PVA.....	30
3.4.4 Příprava roztoků pro růstové testy.....	32
3.4.5 Příprava fixovaného nativního preparátu	33
3.4.6 Gramovo barvení preparátu.....	33
3.4.7 Měření pH.....	33
3.4.8 Sterilizační techniky.....	33

4. VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST.....	34
4.1 RŮSTOVÉ TESTY.....	34
4.2 STUDIUM VLASTNOSTÍ KULTURY OT3.....	38
4.2.1 Test 1 – Základní pokus degradace PVA kulturou OT3.....	38
4.2.2 Test 2 - Ověření degradace PVA kulturou OT3.....	40
4.2.3 Test 3 – Ověření významu přítomnosti kultury <i>Rhodococcus globerulus</i>	43
4.2.4 Test 4 – Ověření vlivu předkultivace kultury OT3 na degradaci PVA.....	46
4.2.5 Test 5 - Další ověření degradace PVA při přidavku katalasy a látek v ní obsažených.....	50
4.3 ADAPTACE KALŮ A IZOLACE ČISTÝCH KULTUR, JEJICH TESTOVÁNÍ.....	53
4.3.1 Izolace kalu z ČOV Malenovice.....	53
4.3.2 Izolace kultur z kalu ČOV Bohumil.....	53
4.3.3 Izolace čistých kultur z kalu ČOV Frýdlant nad Ostravicí.....	54
4.3.4 Test degradace PVA získanými kulturami v tekutém prostředí.....	55
ZÁVĚR.....	58
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	60
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	62
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	63
SEZNAM TABULEK.....	64
SEZNAM PŘÍLOH.....	65
SOUHRN.....	66
SUMMARY.....	67
PŘÍLOHY.....	68

ÚVOD

Otázka životního prostředí a jeho znečištění je v dnešní době velmi diskutovaným problémem. Každý rok je vyprodukováno velké množství syntetických polymerů, tyto polymery jsou stálé a nesnadno se rozkládají. Především polymery rozpustné ve vodě jsou hlavním zdrojem znečištění vodních toků, řek, mořských ekosystémů. Tím, že jsou rozpustné, mohou narušovat přirozený životní cyklus vodních organismů i celých ekosystémů. Bylo zjištěno, že některé typy syntetických polymerů rozpustných ve vodě jsou biodegradovatelné a těmto výzkumům začala být věnována velká pozornost.

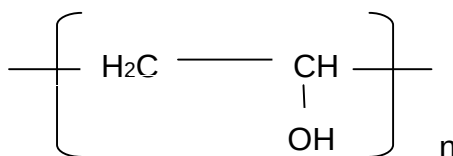
Výzkum o odstranění, tedy rozložení těchto materiálů z vodních toků, se ponejvíce zaměřuje na odstranění biologickými procesy, které jsou vykonávány mikroorganismy a jejich enzymy.

Jedním ze synteticky vyrobených, ve vodě rozpustných polymerů, je polyvinylalkohol (PVA). Je široce používán v průmyslových aplikacích jako adhezivum, v textilním průmyslu, při výrobě hlazeného papíru, zlepšuje povrchy filmů a používá se i k výrobě barev. PVA je v přírodě rozložitelný, ale jen velmi málo a pomalu. Proto jsou zkoumány biologické metody, biodegradace PVA mikroorganismy, které mohou být použity jako zdroj urychlení degradace PVA v biologickém systému čištění a úpravy odpadních vod. Rozšíření a počet mikroorganismů schopných degradovat PVA je však omezen, tyto mikroorganismy nejsou všudypřítomné, ale vyskytují se jen v určitých oblastech životního prostředí.

1. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1 Struktura, vlastnosti a použití polyvinylalkoholu

Polyvinylalkohol – PVA:



Obr. 1. Vzorec PVA

Polyvinylalkohol (PVA) je ve vodě rozpustný syntetický polymer, který se připravuje hydrolýzou polyvinylacetátu (PVAc). Je bílá práškovitá hmota krystalického charakteru. PVA má převážně strukturu 1,3- glykolu, je odolný proti benzínu, některým rozpouštědlům. PVA je jeden z mála polymerů s kostrou uhlík-uhlík, který je biodegradabilní.

Stupeň hydrolýzy a polymerační stupeň ovlivňují fyzikální, chemické, mechanické i zpracovatelské vlastnosti PVA. Tyto vlastnosti jsou závislé především na obsahu hydroxylových skupin –OH a zbytkových acetátových skupin. Při obsahu 70 až 80 % zbytkových acetátových skupin je polymer nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v aromatických uhlovodících a cyklických esterech. Je-li v polymeru 35 % zbytkových acetátových skupin je polymer rozpustný ve studené vodě, působením tepla se sráží. V případě že obsah zbytkových acetátových skupin je menší než 35 % PVA se rozpouští v teplé i studené vodě [1].

PVA získáváme hydrolýzou polyvinylacetátu (PVAc). Polymerizace vinylacetátu (VAc) nastane buď radikálovým mechanismem v alkoholu (metanolu, etanolu) [2] sloužícím jako rozpouštědlo, nebo suspenzní polymerací. Druhý způsob se využívá jen ve specifických případech [3].

Průmyslová výroba PVA je prováděna hydrolýzou PVAc v reaktoru. Různé druhy PVA jsou získávány v závislosti na stupni hydrolýzy. Polymerační reakce mohou probíhat

vsádkově, což představuje jednorázový proces, nebo v kontinuálních procesech. Kontinuálních procesů se využívá hlavně při velkovýrobách.

Při kontinuální průmyslové výrobě je prvním krokem radikálová polymerizace vinilacetátu, po které následuje alkalická alkoholýza PVAc. Molární hmotnost PVAc je ovlivňována nastavením vhodné doby zdržení PVAc v reaktoru, množstvím vinylacetátu, množstvím rozpouštědla, teplotou při polymerizaci a koncentrací radikálového iniciátoru. Stupeň hydrolyzy u PVA je závislý pouze na době zdržení PVAc v reaktoru, koncentraci katalyzátoru a teplotě. PVA se stupněm hydrolyzy v rozmezí 70 až 99% je běžně dostupný [4]. V laboratoři na FT UTB se pracuje s PVA se stupněm hydrolyzy 88%. V diplomové práci budu používat PVA 88-08.

PVA je vyráběn ve velkém množství. Je široce používán v průmyslových aplikacích jako adhezivum, v textilním průmyslu, při výrobě hlazeného papíru, výrobě barev, zlepšuje povrchy filmů. PVA je produkován ve větším množství než jiné ve vodě rozpustné syntetické polymery. Světová produkce PVA je 650000 tun za rok [5] a velké množství použitého a vyřazeného PVA se stalo znatelným odpadovým problémem. Může být jedním z důležitých polutantů v některých typech odpadních vod. V životním prostředí se PVA nerozkládá snadno. Proto jsou zkoumány biologické metody, biodegradace PVA.

Rozšíření a počet mikroorganismů schopných degradovat PVA je omezen ve srovnání s těmi, které mohou degradovat alifatické polyestery. Mikroorganismy schopné degradovat PVA nejsou všudypřítomné, ale vyskytují se jen v určitých oblastech životního prostředí.

Izolované druhy mohou být použity jako zdroj urychlení degradace PVA v biologickém systému čištění a úpravy odpadních vod. Na izolaci bakterií degradujících PVA bylo vynaloženo mnoho úsilí [5].

1.2 Bakteriální rozklad PVA směsnými (čistírenskými) kulturami-aktivovaným kalem

Biodegradace PVA aktivovaným kalem byla sledována řadou autorů. Jako příklad skutečnosti, že v aktivačních suspensích mikroorganismů se vyskytují bakterie schopné

rozkladu PVA, lze uvést výsledky diplomových prací z minulých let, ve kterých byla sledována biologická rozložitelnost PVA ve vodním prostředí několika metodami:

1.2.1 Stanovení produkce CO₂ při biodegradaci PVA ve vodním prostředí.

Test proveden s neadaptovaným kalem.

Z čistírny byl odebrán neadaptovaný kal, se kterým byl proveden tento test na sledování biodegradace PVA ve vodním prostředí. Z testu vyplývá, že zvýšení rychlosti biodegradace PVA bylo znatelné po překonání lagové fáze, tedy po 220 hodině testu. PVA se rozložil po 475 hodinách, kdy byl test ukončen. Biodegradace byla hodnocena na základě měření produkce CO₂, který vzniká mikrobiologickými pochody v kultivačním prostředí. Hodnota TOC v průběhu pokusu klesala, z hodnoty 118,6 mg.l⁻¹ na počátku pokusu na hodnotu 7,3 mg.l⁻¹ na konci pokusu. Došlo tedy k 99,2 % odstranění organického uhlíku.

Test proveden s neadaptovaným kalem i adaptovaným kalem.

V dalším testu byl použit adaptovaný kal (dávkováno 0,4 g.l⁻¹) a čerstvý neadaptovaný aktivovaný kal (dávkováno 0,5 g.l⁻¹).

Při testu měly bakterie lagovou fázi u adaptovaného kalu 20 hodin, u neadaptovaného aktivovaného kalu 130 hodin. Adaptovaný kal dosáhl rozkladu PVA limitních 81 % asi po 400 hodinách testu. PVA podléhající biorozkladu aktivovaným kalem byl odstraněn z 69%.

Hodnota TOC na počátku pokusu u adaptovaného kalu byla 111,6 mg.l⁻¹ u neadaptovaného aktivovaného kalu 115,2 mg.l⁻¹, a na konci pokusu u adaptovaného kalu byla 5,9 mg.l⁻¹, u neadaptovaného aktivovaného kalu 8,3 mg.l⁻¹ [7].

1.2.2 Biologická rozložitelnost PVA stanovena pomocí úbytku organického uhlíku

Princip tohoto testu spočívá ve sledování úbytku organického uhlíku z kultivačního prostředí způsobený aerobními mikroorganismy. Při pokusu byl sledován tzv. úplný rozklad anlyzou TOC ve filtrátu. V průběhu testu byly použity dva způsoby inokulace. Vzorek čistého PVA byl inokulován adaptovanou i neadaptovanou kulturou. U suspenze s adaptovanou kulturou, kde byl sledován PVA, byla lagová fáze asi 30 hodin, rozklad proběhl po cca 60 hodinách s 99 %ním odstraněním TOC. U suspenze s neadaptovanou kulturou byla lagová fáze asi 120 hodin, a rozklad byl ukončen po cca 240 hodinách [8].

Z těchto zkoušek vyplývá že degradace PVA probíhala u adaptovaného i u neadaptovaného kalu. U adaptovaného kalu probíhala degradace rychleji a měla výrazně kratší lagové fáze. To bylo způsobeno tím, že kal byl před testy adaptován v prostředí s PVA, tudíž bakterie byly již uzpůsobeny daným podmínkám a byly schopny rozkládat PVA rychleji.

1.3 Bakteriální rozklad PVA čistými kulturami

Do současné doby bylo v odborné literatuře publikováno několik vědeckých prací, dokládajících schopnost konkrétních druhů bakterií rozkládat PVA. Tyto práce jednak umožnily poznání principu a mechanismu této bakteriální degradace, jednak ukázaly na dvě existující varianty tohoto procesu. Bylo prokázáno (viz níže), že některé bakteriální kultury jsou schopny degradace PVA samy o sobě jako jediný činitel procesu, zatímco v jiných případech je k rozkladu PVA potřebná přítomnost dvou symbiotických bakteriálních kultur.

1.3.1 Rozklad PVA jedinou bakteriální kulturou

Bakteriální kulturu schopnou samostatné degradace PVA popsali Kawagoshi a kol. v roce 1997, kteří zjistili, že klíčový enzym degradující PVA byl produkován bakterií *Pseudomonas vesicularis var. povalolyticus PH* a hromaděn intracelulárně, když bakterie rostly v živném mediu s tryptonem a kvasničným extraktem bez PVA. Aktivita tohoto enzymu uvnitř buněk rostla úměrně s buněčným růstem a byla maximální, když byl růst maximální, zatímco mimobuněčná aktivita se zvyšovala i po ukončení množení buněk. Autoři proto vyvodili předpoklad, že vylučování enzymu z buněk bylo vyvoláno přítomností PVA v kultivačním mediu [9]. V následné studii se Kawagoshi a Fujita věnovali purifikaci a popisu zmíněného enzymu. Autoři uvádějí, že mezi zatím vyčištěné enzymy degradující PVA patří PVA oxidasa, oxidasy sekundárních alkoholů, PVA dehydrogenasa a také hydrolasa oxidovaného PVA. Zatím však bylo publikováno jen několik málo studií o těchto enzymech. V dřívější nepublikované studii bylo zjištěno, že bakterie degradující PVA *Pseudomonas vesicularis var. povalolyticus PH* v průběhu degradace uvolňuje peroxid vodíku, což svědčí o existenci enzymů oxidujících PVA.

V této studii byl enzym, oxidující PVA, vyčištěn z čisté kultury kmene PH. Vyčištěný enzym byl charakterizován, a byla prozkoumána jeho molekulární hmotnost, optimální pH a substrátová specifita. V enzymu bylo nalezeno železo v poměru 1:1 (kovový iont : proteinu). Jeho aktivita byla vysoká v rozmezí pH 7 – 10 a kromě PVA enzym transformoval i jiné alkoholy. Porovnání jeho aktivity vůči PVA (100%) s aktivitou vůči jiným alkoholům ukázalo, že sekundární alkoholy jsou vhodným substrátem, protože relativní aktivita proti 4-heptanolu dosahovala 96,6 %, vůči 4-decanolu 100 % a vůči 2-oktanolu 82,9 %. Autoři doporučují bakterie nebo enzymy degradující PVA pro čištění odpadních vod [10].

Rozklad PVA jedinou bakteriální kulturou popsali i Lee a kol., kteří isolovali kmen SB98, který degradoval PVA za nepřítomnosti jakéhokoliv růstového kofaktoru a byl později identifikován jako *Achromobacter cholinophagum* SB98. Bližší popis degradačních schopností této bakterie však autoři v dané práci neuvádějí [6].

1.3.2 Rozklad PVA symbiotickými bakteriálními kulturami

Proces symbiotické degradace PVA byl popsán několika autory a je v přírodě pravděpodobně častější variantou než rozklad PVA jedinou bakteriální kulturou. Jako první popsal symbiotickou degradaci Shima, který v osmdesátých letech minulého století publikoval sérii prací, popisující jak izolaci párů degradačních bakterií, tak i hledání podstaty symbiotického vztahu. Podařilo se mu prokázat, že klíčovou roli hraje kofaktor zvaný pyrrolochinolin chinon (PQQ), který jedna kultura z každého páru poskytuje kultuře druhé, vybavené určitým typem dehydrogenasy. Teprve sestavením kompletního holoenzymu získává ona druhá kultura schopnost dehydrogenace PVA a tím i zahájení jeho rozkladu, z něhož jistým způsobem profituje i kultura poskytující PQQ [11,12,13].

Degradace PVA pomocí kmenů *Pseudomonas*, popsaná Tokiwa a kol.

Autoři Tokiwa a kol. popsali degradaci PVA pomocí izolovaných kmenů *Pseudomonas* TK2, TJ7. Zabývali se degradací PVA pomocí těchto izolovaných kmenů, která probíhala aerobně při 30 °C s 0,5 g PVA obsahujících 100 ml bazálního média anorganických solí s 40 µg PQQ/l. Zbytkový PVA v živné půdě byl měřen jodometrií (založené na zelené barvě vytvořené reakcí PVA s jodem za přítomnosti kyseliny borité), dále byl měřen ve vodě rozpustný organický uhlík (TOC) po filtraci kultury přes filtrační membránu 0,22 µm.

Polymery přítomné v živné kultuře před a po degradačním testu byly přímo stanoveny pomocí gelově permeační chromatografie. Na základě výsledků stanovení a na základě průběhů křivek poklesu koncentrace PVA a TOC dospěli autoři k názoru, že kultura TK-2 náhodně fragmentovala PVA, kdežto TJ-7 degradovala PVA od konce molekul.

A dále zkoumali degradaci PVA pomocí klidových (nerostoucích) buněk a kultivačním filtrátem. Buněčná suspenze byla odebrána z živné kultury pěstované na PVA centrifugací, 2x promyta fosfátovým pufrem. Buněčná suspenze byla aplikována na klidových buňkách. Živná kultura byla filtrována přes filtrační membránu, klidové buňky byly použity na PVA degradaci v reakční směsi. Vznik H_2O_2 byl sledován spektrofotometrickou metodou při 410 nm [5].

Degradace PVA pomocí symbiotické kultury *Sphingomonas*, popsaná Kim a kol.

Autoři Kim a kol. popsali degradaci PVA symbiotickou kulturou *Sphingomonas*. Degradace PVA byla prozkoumána u kmene SA2 a SA3 v čisté nebo smíšené kultuře. Čerstvá kultura kmenů SA2 a SA3 z LB prostředí byla očkovaná 1 % do PVA prostředí.

Čistá kultura SA2 nebo SA3 neprokázaly degradaci PVA, ale symbiotická kultura SA2 a SA3 prokázala vydatný růst a plnou degradaci PVA. Po 4 dnech vyočkování symbiotické kultury buňky rostly, dosáhly maxima a kolem 95 % PVA bylo degradováno.

Ve výsledku byl kmen SA3 označen jako biodegradátor PVA, a kmen SA2 jako producent růstového faktoru. Jedna bakterie degradující PVA potřebovala pyrrolochinolin chinon (PQQ, kofaktor mnoha dehydrogenačních reakcí) jako kofaktor pro růst a degradaci PVA v PVA prostředí. Bylo tedy prozkoumáno zda kmen SA3 potřebuje PQQ pro degradaci PVA. Kmen SA3 byl kultivován bez kmene SA2 v PVA prostředí obsahujícím PQQ (10 ng.ml^{-1}) a byl pozorován růst a degradace PVA. Pro bakteriální růst a degradaci PVA jsou optimální hodnoty pH 8, teplota 30- 35 °C [14].

Degradace PVA pomocí symbiotických kmenů SB68 a SB69, popsaná Lee a kol.

Obdobně autoři Lee a kol. [6] popsali degradaci PVA kmeny SB68+ SB69, SB98. Nejprve bylo izolováno devět kmenů z 22 různých zdrojů. Osm kmenů z devíti izolovaných nevytvářelo kruhový dvorec v jednotlivých čistých kulturách. Při párování, kombinacích těchto osmi kmenů byl pozorován kruhový dvorec. Je zde náznak, že sestavené páry v symbióze tvoří PVA degradující společenství. Jeden kmen z devíti byl schopný vytvořit jasný kruhový dvorec v čisté kultuře.

SB68+SB69 smíchaná kultura prokázala vysokou aktivitu pro degradaci PVA, mezi ostatními testovanými smíchanými kulturami a byla vybrána k identifikaci Micro Station Systémem. SB68 byla identifikována jako *Cardiobacterium* sp., ale kmen SB69 nebyl identifikován. Samostatný kmen SB98, který degraduje PVA bez přítomnosti růstového kofaktoru, byl označen jako *Achromobacter cholinophagum* SB98.

Smíšená kultura SB68+SB69 byla aklimatizována v základním agarovém prostředí obsahujícím 0,1 % PVA. Aklimatizace značně zvýšila aktivitu bakterií degradujících PVA.

Kultury SB68 a SB69 byly odděleny, a jako čisté kultury byly dány do prostředí obsahujícího 0,1 % PVA, kvasničný extrakt ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a $10 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ PQQ. SB68 bylo stále neschopno degradace PVA, dokonce i po přidavku PQQ. Naproti tomu biomasa SB69 značně narůstala v daném prostředí s přidavkem PQQ, pH v prostředí pokleslo přímo degradací PVA, což naznačilo že PQQ bylo růstovým faktorem pro SB69.

Další pokusy ukázaly, že míra mineralizace PVA u symbiotického páru SB68 a SB69 byla téměř nezávislá na stupni polymerizace PVA a dosáhla téměř 75 % po 46 dnech modifikovaného Sturm testu, když vstupní koncentrace PVA byla 0,01 % [6].

1.4 Izolace bakteriálních kultur rozkládajících PVA

Suzuki byl první, který izoloval bakterii degradující PVA *Pseudomonas* O-3. Později byl popsán pouze omezený počet mikroorganismů, které jsou schopny degradovat PVA, například: *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus megaterium* [6].

Různí autoři izolovali různé kmeny bakterií degradujících PVA pomocí relativně podobných postupů izolace:

1.4.1 Popis izolace kmenů *Pseudomonas* Tokiwou a kol.

Autoři Tokiwa a kol. [5] popsali izolaci kmenů TK2, TJ7. Izolace byla provedena modifikovanou metodou. Konsorcium mikroorganismů schopné degradace PVA bylo získáno opakovaným obohacením kultivačního tekutého média polyvinylalkoholem s následným vyočkováním na agarové medium s PVA. To se skládalo z 5 g PVA, 100 mg kvasnicového extraktu a $40 \mu\text{g}$ PQQ v 1 litru anorganického bazálního media. Před dávkováním obohacené kultury na agarové misky, byla každá miska pokryta 5 jednotkami katalasy a 0,3 jednotkami peroxidasy. Kultury na miskách byly inkubovány při 30 °C.

Po opakovaném obohacení kultury v tekutém médiu s PVA, mikroorganismy rostly na agarových miskách s PVA ve formě několika konsorcií, s rozdílnými vzhledy kolonií.

Přídavek katalasy nebo peroxidasy autoři odůvodnili vlastnostmi enzymů podílejících se na degradaci PVA. 2 enzymy účastníci se degradace PVA jsou:

a) PVA oxidasa, extracelulární enzym

b) PVA dehydrogenasa závislá na PQQ, intracelulární enzym

Reakce pomocí PVA oxidasy je doprovázena vznikem H_2O_2 . Ten je v určitých koncentracích toxický, takže autoři předpokládali, že inhibuje růst kolonií bakterií degradujících PVA.

Zajímavé je že kolonie bakterií degradujících PVA se tvořily, když byla do misky s PVA přidána katalasa. V případě, že misky byly doplněny stejným množstvím inaktivní katalázy na agarové misce, nebyla pozorována žádná kolonie.

Pro potvrzení inhibice tvorby kolonií díky H_2O_2 , byl proveden podobný experiment pomocí peroxidasy se stejným výsledkem.

Tímto postupem izolace autoři získali dvě kultury bakterií degradujících PVA, a to TK-2 a TJ-7 pro další studium. Oba izolované kmeny jsou gram negativní rody. Kmen TK-2 tvoří kruhovou bílou kolonii, kmen TJ-7 tvoří kruhovou žlutou kolonii. Autoři dále zjistili, že kmen TJ-7 má schopnost samoinhibice tvoření kolonií H_2O_2 , když byl kultivován na glukosovém agaru bez přídavku katalázy. Nejpříjemnějším vysvětlením bylo pravděpodobně, že bakterie TJ-7 vytvářela H_2O_2 nejen pomocí reakce PVA oxidasy, ale také vlastní metabolickou činností při růstu na glukose. Citlivost na H_2O_2 je tedy pravděpodobně jeden z důvodů, proč mikroorganismy degradující PVA jsou zřídka izolovány [5].

1.4.2 Popis izolace kmenů *Sphingomonas* Kimem a kol.

Dalšími izolovanými kmeny jsou SA2, SA3, popsány autory Kim a kol. Při izolaci bakterií degradujících PVA vycházeli autoři ze dvou modelů, které byly již dříve navrženy k vysvětlení symbiotické bakteriální degradace PVA. První model (vypracovaný Morim) [15] předpokládal symbiotickou degradaci dvěma kmeny, z nichž žádný neprodukoval růstový faktor. Druhý model (Sakazawa) [16] byl popsán jako degradace dvěma kmeny, u kterých jeden produkoval růstový faktor a druhý využíval toho růstového faktoru pro degradaci polymeru.

Z životního prostředí (půd, vod a kalů) bylo odebráno 800 vzorků, a ty byly v tekutém prostředí obohaceny PVA a ponechány 10 dní. Jeden ze vzorků s kalem (SA), prokázal degradaci PVA a růst bakterií. Namnoženou kulturou byl pokryt PVA agar, a nechal se kultivovat 6 dní při 30 °C. Na agarové misce s PVA se vytvořily malé bílé kolonie, všechny stejného tvaru, ale tyto bakterie nebyly schopny po izolaci degradovat PVA v tekutém prostředí. Proto část původní obohacené kultury SA byla naředěna ve sterilním tekutém prostředí a vhodně naředěné kultury byly naočkovány na universální agarové misky (LB médium). Po 4-8 dnech inkubace bylo izolováno 7 odlišných bakterií. Žádný z těchto kmenů SA1-SA7 neprokázal rozklad PVA samostatně. Ve smíšené kultuře však tyto kmeny PVA degradovaly. Další zkoušky ukázaly, že pro degradaci PVA v PVA prostředí byly zapotřebí kmeny SA2 a SA3.

Kmen SA2 tvořil bílou kolonii v průměru menší než 1mm. Na agarové misce s PVA byl po kultivaci 6 dní při 30 °C pozorován jen velmi nepatrný růst, a po přeočkování do tekuté kultury nebyl kmen schopen degradace PVA. Nepatrný růst kmene SA2, byl asi způsoben nečistotami, například acetátem sodným v PVA. PVA je vyroben z polyvinylacetátu náhradou acetátové skupiny hydroxylovou skupinou. A jak bylo zjištěno, acetát sodný je dobrým zdrojem uhlíku pro růst kmene SA2.

Kmen SA3 tvořil žlutou kolonii na LB agarové misce, ale nebyl pozorován růst na PVA agarové misce nebo v PVA tekuté kultuře.

Ve výsledku byl kmen SA3 identifikován jako *Sphingomonas* sp. Tento kmen nebyl dříve znám jako bakterie degradující PVA. Tento rod (*Sphingomonas*) obsahuje mnoho organismů odbourávajících xenobiotické sloučeniny, ale kmen SA3 byl první izolovaný, u kterého byla popsána schopnost degradace PVA [14].

1.4.3 Popis izolace kmenů SB68+ SB69 Lee a kol.

Dále byly izolovány kmeny SB68+ SB69, SB98. Jejich izolace byla popsána Lee a kol. Autoři zde uvádí, že počáteční krok biodegradace vyžaduje enzymatickou oxidaci sekundárních hydroxylových skupin v PVA na ketonové skupiny, které jsou následně hydrolyzovány, v důsledku čehož dochází ke štěpení řetězce.

V této studii byly PVA degradující organismy izolovány z různých zdrojů včetně aktivovaného kalu, odpadních vod průmyslu, který spotřebovává PVA, obdělávané půdy.

Vzorky aktivovaného kalu byly použity jako bakteriální zdroj. Byly adaptovány v základním prostředí s PVA a byly použity pro izolaci bakterií degradujících PVA.

Vzorky byly třepány a inkubovány při 28 °C po dobu 7-10 dní, opakovaně obohacovány kulturou v PVA-MM prostředí. Koncentrace PVA v PVA-MM médiu byla zvyšována krok za krokem, každým opakováním kultivace z 0,1 0,3 0,5 0,7 a nakonec 1 %.

Izolované mikroorganismy byly dále čištěny. Část obohacené kultury byla dostatečně zředěna sterilním fyziologickým roztokem a vyočkována na PVA-MM médium obsahující 0,1 % PVA a znovu se inkubovala při 28 °C po dobu 7-10 dní.

Jednotlivé kolonie byly odebrány z misky a byly uloženy do PVA-MM prostředí. Schopnost degradovat PVA při každé izolaci byla testována s využitím agarového difúzního testu. Kruhový sterilizovaný filtrační papír namočený v roztoku kultury byl umístěn ve středu agarového prostředí s PVA a kvasničným extraktem a byl inkubován při aerobních podmínkách, 28 °C po dobu 7 dní. Kolem kolonií se na misce vytvořil zřetelný dvorec (důkaz rozložení PVA) po přelití misek jodovým roztokem. Tento roztok byl připraven smícháním (1:1) z roztoku KI-12 (Lugolový roztok) a z 4 % vodného roztoku kyseliny borité a byl použit jako indikátor pro PVA degradující aktivitu [6].

1.5 Význam bakterií rodu *Sphingomonas* pro degradaci PVA i jiných polymerních látek

V úvodu autor [17] popisuje postupy bakteriální degradace polymerů. Syntetické polymery, které jsou biodegradabilní, jsou strukturou podobné přirozeným. Z toho vyplývá, že mikrobiální populace produkují enzymy, které nakládají obdobně s polymery podobných struktur. Mezi polymerní sloučeniny, které jsou biologicky rozložitelné, patří PVA, polyethery, polylaktidy, alifatické polyestery, polykaprolakton a polyamidy. Biodegradaci podléhají i oligomerní ethylen, styren, isopren, butadien, akrylonitril a akryláty. Prvořadými procesy probíhajícími při degradaci polymerů jsou hydrolyza a oxidace. Depolymerační procesy lze rozdělit do dvou skupin: na endogenní a exogenní. Polymery obsahující hydrolyzovatelné skupiny v polymerním řetězci jsou hydrolyzovány endogenně, čehož výsledkem je mnohem rychlejší depolymerace než u polymerů bez hydrolyzovatelných skupin. Příkladem mohou být polyestery, polykaprolaktan, polyamidy a polylaktidy – jsou hydrolyzovány esterasami a hydrolasami. Hydrolasy jsou produkovány extracelulárně a rozpouštějí pevné bloky syntetických polymerů s vysokou molekulární

hmotností na sloučeniny o nízké molekulární hmotnosti, které mohou být inkorporovány do buňky jako uhlíkový a energetický zdroj.

Polyethery jsou depolymerizovány oxidativně a exogenně uvolňováním dvouuhlíkatých jednotek.

PVA je specifický polymer, jehož degradace se uskutečňuje pomocí primární oxidace a sekundární hydrolýzy.

Hydrolytické procesy jsou katalyzovány hydrolasami, které jsou často přítomny extracelulárně, následuje snadné uvolnění (napadení) polymerů, bez ohledu na jejich molekulární rozměr. Na druhé straně, oxidační procesy jsou často spojeny s respiračními a energii produkujícími systémy degradujících bakterií. Respirační systémy jsou všeobecně u bakterií vázány na cytoplazmatickou membránu, z čehož vyplývá, že oxidoreduktasy, které jsou s nimi spojeny, jsou rovněž vázány na membránu. Polymery tak musí mít kontakt s membránově vázanými enzymy v periplasmatickém prostoru Gram-negativních bakterií. Skutečnost, že nejsou známy žádné Gram-positivní bakterie, které by byly schopny tohoto typu degradace, je pravděpodobně dána rozdíly struktur buněčného povrchu mezi Gram-negativními a pozitivními bakteriemi, stejně jako nepřítomnost některých katabolických enzymů u Gram-positivních druhů. Skutečnost, že *sphingomonady* jsou odpovědné za metabolismus xenobiotických hydrofobních sloučenin a některých polymerů, tedy výrazně naznačuje vztah mezi strukturou buněčné stěny bakterií a penetrací sloučeniny. *Sphingomonady* obsahují jedinečný sphingoglycolipid s dlouhým základním řetězcem (dihydrosphingosin) v buněčné stěně, místo lipopolysacharidů nalezených ve většině Gram negativních bakterií. Jelikož *sphingomonady* metabolizují polymery v jejich periplazmatickém prostoru, jejich specifické membránové struktury jsou pravděpodobně zainteresovány do přenosu xenobiotických polymerů skrz vnější membrány bakterie.

Autor se v této studii zabýval rozkladem PEG a PVA:

Mikrobiální degradace polyetylen glykolu (PEG).

Polyetylen glykoly jsou důležitou součástí průmyslových produktů a nacházejí se i v odpadních vodách. Vlastnosti PEGů vytváří značné překážky enzymovému rozkladu, protože jsou to velké hydrofilní molekuly, alifatické etherové vazby velmi stabilní (z chemického pohledu) a membrány organismů vytváří bariéru pro příjem takových substrátů. Velikost aktivního centra enzymu napadajícího PEG musí být proto značně

velká. *Sphingomonas terrae* má všechny enzymy potřebné pro metabolismus PEG, ale růst buněk je potlačen glyoxalátem, protože glyoxalát je konečným produktem - rozklad 1 molu PEG způsobí vyprodukování přibližně 200 molů glyoxylátu, který je akumulován v mediu a může být buňkám toxický. Proto pro účinnou degradaci PEG je potřebná přítomnost doprovodných druhů (*Methylobacterium* sp., *Rhizobium* sp., *Agrobacterium* sp.) přidávaných k bakterii *S. terrae*.

Dalším důležitým faktorem je skutečnost, že sfingomonády nevytváří žádné extracelulární enzymy. PEG je tak vnášen do buněk a jeho degradace probíhá v periplazmatickém prostoru. Vlastnosti přenosu PEG přes vnější membránu (součást buněčné stěny) tedy s největší pravděpodobností stanovují maximální velikost PEG vstupujícího do metabolismu.

Bylo prokázáno, že PEG dehydrogenasa, PEG aldehyd dehydrogenasa i PEG karboxyl dehydrogenasa jsou enzymy membránově vázané, substráty skutečně musí projít přes vnější membránu aby s nimi navázaly kontakt. Dále bylo zjištěno, že žádný z těchto enzymů nepotřebuje ke svému účinku kofaktor PQQ, neboť nebyla pozorována žádná stimulace při přidavku PQQ bakteriím v degradačních směsích.

Mikrobiální degradace polyvinylalkoholu (PVA).

Pro rozklad PVA autor uvádí dvě rozdílné oxidačně degradační cesty.

a) Jedna z cest je kombinace oxidasy sekundárních alkoholů (PVA oxidasa) a β -diketon hydrolasy, oba enzymy byly vyčištěny a charakterizovány Sakaiem a ostatními. PVA oxidasa je extracelulární enzym a je schopný depolymerizovat PVA společně s β -diketon hydrolasou.

b) Druhou cestou degradace PVA u *Pseudomonas* sp. VM15C, je kombinace PVA dehydrogenasy závislé na PQQ a hydrolasy. PVA dehydrogenasa je membránově vázána, ale ještě nebyla vyčištěna [17].

V následující části článku se Kawai odvolává na další autory.

Nedávno Hatanaka a kol. [18] izolovali *Pseudomonas* sp. 113P3 jako bakterii využívající PVA, která vyžaduje PQQ jako nezbytný růstový faktor a vytváří značné množství PVA dehydrogenasy. Ta byla vyčištěna z bezbuněčných extraktů a bylo zjištěno, že enzym je rozpustný a periplazmický. Jelikož mikrob nevytvářel žádnou PVA oxidasu (extracelulární), která by přispěla k depolymerizaci PVA mimo buňky, vyplývá z toho, že

molekuly PVA musí vstoupit do periplazmatického prostoru, aby navázaly kontakt s enzymem.

Autor tuto skutečnost dále dokládá vlastnostmi synteticky připraveného PVA, který má ve svých strukturách zavedeny ethylenové bloky. Vůči takovému polymeru (se zvýšenou hydrofobicitou) má totiž PVA-DH vyšší afinitu.

Bakterie *Pseudomonas* sp. 113P3 byla znovu identifikována za pomoci stanovení homologie sekvencí 16S rRNA, a bylo zjištěno, že jde ve skutečnosti o druh *Sphingomonas chlorophenolica*. Zdá se pravděpodobné, že PVA dehydrogenasa u této *sphingomonady* prokázala větší afinitu k hydrofobním modifikacím PVA, než k PVA samotnému. Nárůst hydrofobicity PVA může tedy zvýšit průnik do periplazmatického prostoru skrz vnější membránu *sphingomonady*.

Matsumura a ostatní [19] izolovali *Alcaligenes faecalis* využívající PVA, který nevytvářel PVA oxidasu, ale vytvářel PVA dehydrogenasu v kultivačních filtrátech a membránových frakcích. Membránově vázané enzymy byly vyčištěny a bylo zjištěno, že jsou závislé na PQQ. Avšak, nečekaně, bez PQQ apoproteiny katalyzovaly aldosový typ štěpení PVA. Jeví se tedy, že je několik typů PVA oxidačních enzymů, které mohou být indukovány pomocí PVA použitého pro kultivaci.

Sphingomonady jako bakterie degradující PVA uvádí i jiní autoři. Se *Sphingomonas* označenou SA3 pracoval také Kim a kol [14].

Tyto skutečnosti vedou k závěru, že bakterie rodu *Sphingomonas* mohou mít klíčový význam pro biodegradaci PVA.

1.6 Návaznost na předcházející diplomové a jiné práce

I dříve se studenti ve svých diplomových pracích zabývali PVA a jeho degradací bakteriemi. Jiří Riedl [20] izoloval kultury OT I, OT II a kulturu OT III, která vykazovala odlišné vlastnosti. Ve své diplomové práci popsal jejich vlastnosti a schopnosti degradovat PVA. Z testů, které provedl u kultury OT III, lze uvést výsledky těchto zkoušek:

Nejprve provedl izolaci konsorcia OT III tímto postupem. Buňky z tekutého minerálního media podle Lee a kol. přenesl na misky PVA agaru obohaceného o KA a PQQ a provedl křížový roztěr. Po sedmidenní kultivaci při 25°C vytvořil z narostlých buněk suspenzi, kterou rozetřel na misku s PVA agarem obohaceným o PQQ. Po pětidenní kultivaci byly izolovány 2 kmeny. Tyto kmeny nazval kmen Ž a kmen B. Jejich název odvodil od charakteristického zbarvení kmenů (Ž-žluté zbarvení, B-bílé).

Dále sledoval vliv molekulové hmotnosti PVA na jeho rozklad v tekutém MM kombinací kmenů z konsorcia OT III a zjistil, že molekulová hmotnost PVA v rozsahu použitých molekulových hmotností nemá vliv na proces biodegradace PVA.

V další zkoušce se zabýval stanovením množství a z toho vyplývajícího poměru, ve kterém narůstají kmeny OT III/Ž a OT III/B z konsorcia v tekutém minerálním mediu s PVA a PQQ. V tomto testu také pozoroval pokles PVA a TOC v mediu, způsobený použitými kmeny. Z měření vyplynulo, že směs kmenů Ž+B je schopna za účasti PQQ rozkládat PVA, jeho množství se za 6 dní snížilo o více než polovinu.

Počty kolonií počítal na miskách s PVA agarem obohaceným KA a PQQ. Misky navíc potřel 100 µl roztoku katalasy (1 g/l). Po sedmi dnech kultivace při 25°C byly kolonie počítány. Z výsledků vyplynulo, že nárůst kmenů byl rozdílný. Kmen OT III/B rostl z počátku daleko rychleji. Růst pokračoval až do třetího dne a pak se růst buněk zastavil a dále se nezvyšoval. U kmene OT III/Ž byl nárůst pozvolný a trval dále. Na konci pokusu bylo množství buněk kmene Ž cca 28 x vyšší než u kmene B.

V této práci se také autor zaměřil na zjišťování vlastností směsi a samostatných kmenů OT III/Ž a OT III/B podílejících se na rozkladu PVA. V tomto pokusu prokázal, že samostatné kmeny Ž a B nejsou schopny rozkladu PVA. Rozklad byl zaznamenán jen u směsi použitých kmenů. I množství TOC se snižovalo jen u směsi kmenů Ž+B. Počty kolonií byly počítány na miskách s PVA agarem obohaceným KA a PQQ a katalasou a největší nárůst byl zaznamenán u směsi kmenů Ž+B. U čistého kmene B byl nárůst v řádech stovek tisíc, autor vyslovil předpoklad, že by kmen B mohl jako zdroj substrátu použít acetalové skupiny, které se u PVA vyskytují.

Tento test potvrdil, že kmeny jsou symbiotické a že PVA jsou schopny rozkládat pouze ve směsi.

Další zjištění ukázala, že kmen OT III/Ž nevytváří katalasu, kdežto kmen OT III/B ano, bylo proto navrženo vysvětlení, že kmen B odstraňuje toxický peroxid vodíku produkovaný při rozkladu PVA kmenem Ž [20].

V další navazující práci bylo zjištěno, že kultura OT III/B patří k druhu *Rhodococcus globerulus* [21] a bylo také prokázáno, že vlastním degradátorem PVA je kmen OT III/Ž, který je schopen rozkladu za přítomnosti aktivní i inaktivní katalasy (10 mg/l), avšak nikoliv za přítomnosti albuminu či kvasničného hydrolysátu [22]. Byla proto vyslovena domněnka, že kmen OT III/B dodává kultuře OT III/Ž růstový faktor obsažený v katalase, např. methionin nebo hem [22].

2. NÁVAZNOST A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Z testů, které byly provedeny v předcházejícím období, vyplynulo, že kmeny OT III/Ž a OT III/B symbioticky rozkládají polyvinylalkohol za účasti PQQ. Předběžné pokusy naznačily, že faktorem symbiotického vztahu je katalasa (a to i ve své inaktivní podobě), a že tedy odstraňování peroxidu vodíku při degradaci PVA není podstatou účasti obou kmenů při rozkladu tohoto polymeru.

Prvním cílem této diplomové práce se tedy stalo provedení řady experimentů směřující ke zjištění podstaty symbiotického vztahu v konsorciu OT III.

Druhým cílem byla souběžná izolace dalších bakteriálních kultur, schopných rozkladu PVA, z různých vzorků kalů. Tato část byla prováděna v rámci dlouhodobého výzkumu Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, zaměřeného na studium těchto doposud málo popsaných bakterií.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Živná média, roztoky a chemikálie pro kultivaci bakterií

Minerální agar

Základ pro minerální agar:

K ₂ HPO ₄	0,1 g
NH ₄ Cl.....	0,11 g
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O.....	0,02 g
FeSO ₄ .7 H ₂ O.....	0,005 g
CaCl ₂	0,002 g
Agar.....	1,8 g

To je složení „bílého“ agaru, v případě že bylo zapotřebí obohatit agar o indikátor pH, byl použit základ pro minerální agar, obohacený Bromthymolovou modří v množství 0,005 g/l.

Příprava minerálního agaru:

Bylo naváženo 2,05 g základu pro minerální agar na 100 ml destilované vody, přidáno 0,2 ml roztoku stopových prvků (na 100 ml) a vše dobře promícháno. Takto připravený minerální agar byl dán sterilizovat v uzavřené lahvi do autoklávu při 120 °C na 15 minut. Po zchladnutí asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do misek a ponechán ztuhnout.

PVA agar

Polyvinyl alkohol (výsledná koncentrace 0,5 g/l).....	0,05 g
Základ pro minerální agar.....	2,05 g
Destilovaná voda	100 ml
Stopové prvky.....	0,2 ml

Dané složky byly naváženy a doplněny na 100 ml destilované vody a byly přidány stopové prvky. Vše se promíchalo a dalo v uzavřené lahvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut. Po zchladnutí asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do misek a ponechán ztuhnout.

TYA agar

TYA agar.....	2,1 g
Destilovaná voda.....	100 ml

Daná složka byla navážena, do lahve bylo přidáno 100 ml destilované vody. Vše se promíchalo a dalo v uzavřené lahvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut. Po zchladnutí asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do misek a ponechán ztuhnout.

Tento živný agar obsahuje trypton a kvasničný hydrolysát a používá se jako universální živné médium pro kultivaci heterotrofních bakterií.

Kultura OT3 na tomto agaru téměř neroste, takže po vyočkování zjistíme případné kontaminace, které na tomto agaru vyrostou.

Fyziologický roztok

Používá se pro přípravu inokula.

Bylo naváženo 8,5 g NaCl a rozpuštěno v 1 l destilované vody. Roztok byl důkladně promíchán a dán sterilizovat do autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 15 minut.

Minerální medium (MM) pro kultivace, tekuté

K přípravě minerálního média bylo použito těchto zásobních roztoků:

Zásobní roztok A.....	2 ml / 100 ml
Zásobní roztok B.....	8 ml / 100 ml
Stopové prvky.....	0,2 ml / 100 ml
Destilovaná voda	85 ml / 100 ml
Soli	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (výsledná koncentrace 10 g/l).....	1 ml / 100 ml
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O (3 g/l).....	1 ml / 100 ml
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (1 g/l).....	1 ml / 100 ml
NaCl (50 g/l).....	1 ml / 100 ml
NH ₄ Cl (30 g/l).....	1 ml / 100 ml

Po napipetování těchto roztoků a doplnění na 100 ml destilovanou vodou, se vše důkladně promíchalo a bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 15 minut. Po zchladnutí dále použito.

Příprava jednotlivých složek MM:

Roztok A

Bylo naváženo 9,0788 g KH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan draselný) a toto množství bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody.

Roztok B

Bylo naváženo 23,9032 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ (hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát) a toto množství bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody.

Stopové prvky:

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

Byla navážena množství těchto látek, rozpuštěna v 1 l destilované vody a vše důkladně promícháno.

Příprava roztoků solí

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

Každá sůl byla připravena zvlášť. Vždy bylo naváženo dané množství soli doplněno 100 ml destilované vody a promícháno. Pak byly všechny soli dány sterilizovat do autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 15 minut.

Polyvinyl alkohol (PVA)

Obchodní označení SLOVIOL P88-08, prášková forma, stupeň hydrolyzy 88%.

Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok katalasy (výsledná koncentrace 1 mg/ml).....	100 mg
Zásobní roztok PQQ (0,1 g/l).....	10 mg
Zásobní roztok methioninu (0,5 g/l).....	50 mg
Zásobní roztok tryptofanu (0,5 g/l).....	50 mg
Zásobní roztok heminu v acetonu (cca. 0,5 g/l).....	50 mg

Tyto roztoky byly připraveny tak, že bylo naváženo dané množství roztoků, doplněno 100 ml destilované vody, byly dobře promíchány. Hemin byl navážen a rozpuštěn v acetonu. Dále byly tyto roztoky přefiltrovány přes sterilní filtr a uloženy v chladničce.

Roztoky byly přidávány do tekutého media ke kultuře OT3.

3.2 Biologický materiál

Kultura OT3, pochází z ČOV Otrokovice, izolována v rámci DP J. Riedla [20] jako OT III/Ž

Kultura *Rhodococcus globulus*, izolována v rámci DP J. Riedla [20]

Aktivovaný kal z městské čistírny odpadních vod v Malenovicích

Kal ČOV Bohumil, pochází z provozu, kde se zpracovávají splaškové vody a vody z farmaceutického průmyslu.

Kal ČOV Frýdlant nad Ostravicí z textilního provozu

3.3 Přístroje a zařízení

Analytické váhy KERN 770.....	SRN
Analytické váhy KERN 440-47.....	SRN
Analytické váhy KERN EW.....	SRN
Mikroskop CX41.....	Olympus, Japonsko
Chladnička.....	Ardo, ČR
Třepačka LT2.....	ČR
Třepačka 3018 GFL.....	SRN
Mikrodávkoč (2-20 µl, 1-5 ml, 20-200 µl, 100-1000 µl).....	Biohit, Finsko
Mikrodávkoč (10 µl , 20 µl , 50 µl, 200 µl).....	Plastomed, Polsko
Elektrická sušárna.....	MORA, ČR
Elektrický vaříč.....	ETA
Laboratorní autokláv.....	Sanoclav, St-MCS-203, SRN
Spektrofotometr TECAN, pro mikrotitrační destičky.....	Sunrise, USA
Aseptický laminární box.....	Telstar, Španělsko
Akvarijní motorek provzdušňovací.....	Chemopolis, ČR
Termobox na 25 °C.....	ÚTŽPCH, FT

3.4 Metodika a pracovní postupy

3.4.1 Provedení adaptace kalu

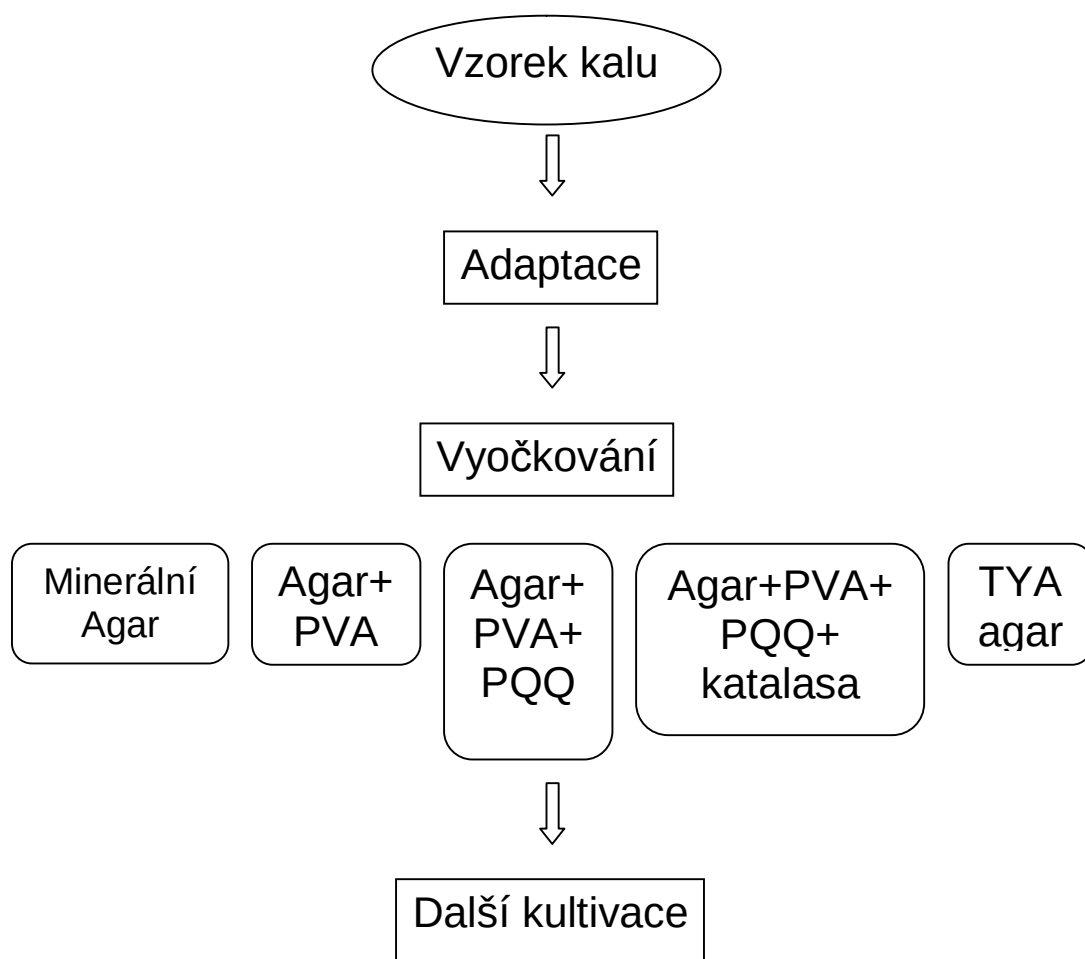
Dané množství odebraného kalu se nechalo stát. Poté se vrchní vodná část odlila a hustý kal se doplnil minerálním médiem opět na dané množství. Byl přidán PVA (výsledná koncentrace 0,5 g/l). Vše se promíchalo a dalo do děličky, která se připojila na čerpadlo. Kal tak byl provzdušňován. Takto byl kal ponechán po určitou dobu (obvykle 14 dní) a následně byl vyočkován.

3.4.2 Postup při izolaci kultur

Nejprve byly připraveny agary minerální, agar s PVA, agar s PVA a přísávkem PQQ, agar s PVA a přísávkem PQQ a katalasou. 100 μ l PQQ se přidávalo do agaru ještě před rozlitím do Petriho misek, 100 μ l katalasa bylo přidáváno na ztuhlý agar mikrodávkačím a po misce se rozetřelo sterilní skleněnou hokejkou.

Izolace byla provedena tak, že bylo odebráno 100 μ l adaptovaného kalu, ten byl dávkován na misky se všemi typy agarů a rozetřen hokejkou. Misky byly dány kultivovat do místnosti s 25 °C. Po nějaké době až byl na miskách viditelný růst kultur, byly připraveny nové Petriho misky s agary a vytipované kolonie byly přeočkovány.

Tyto vybrané kolonie byly nabrány na vyžíhanou kličku a rozetřeny křížovým roztěrem na misku. A dány opět kultivovat. Přeočkování bylo opakováno do doby, než nám na miskách vyrostly jen čisté kultury. Čisté kultury byly dále testovány v tekutém mediu.



Obr. 2. Schéma postupu adaptace a izolace kultur

3.4.3 Stanovení PVA

Stanovení PVA bylo prováděno více způsoby:

Stanovení PVA na mikrotitračních destičkách

Nejprve byla změřena prázdná destička na readeru mikrodestiček Tecan. Po stanovených časových intervalech byly odebírány vzorky ze zaočkovaných lahví. Vždy do pěti jamek na mikrotitrační destičce bylo napipetováno 20 μl každého vzorku a také destilovaná voda, do všech těchto jamek bylo přidáno 42 μl roztoku kyseliny borité, 10 μl roztoku jodidu s jodistanem draselným. Destička byla ponechána asi 15 minut v klidu (Příloha 1) a změřena na readeru mikrodestiček Tecan při vlnové délce 660 nm.

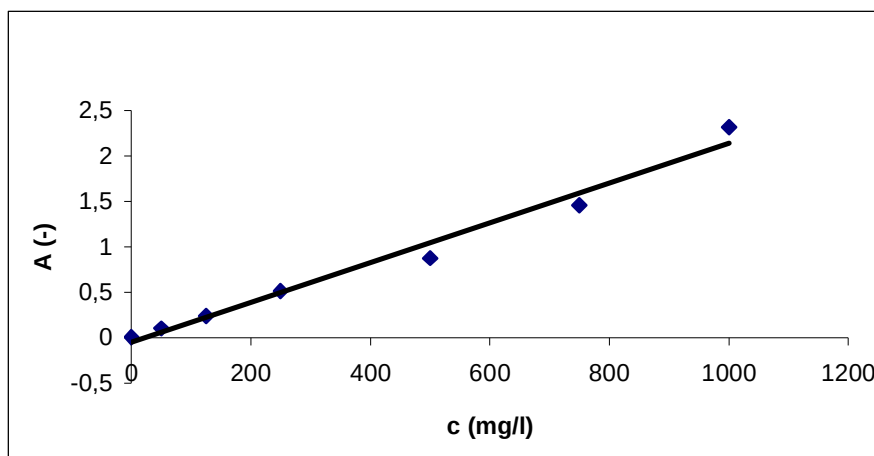
Tento způsob byl používán tehdy, když nedocházelo k vysrážení tekutého média v průběhu degradace.

Výsledné koncentrace vzorků byly vypočítány dosazením naměřených absorbancí na readeru mikrodestiček Tetan do rovnice kalibrační přímky.

Kalibrační přímka byla zpracována z hodnot koncentrací a naměřených absorbancí kalibračních roztoků.

Tabulka 1. Koncentrace PVA a naměřená absorbance

c (mg/l)	0	50	125	250	500	750	1000
A (-)	0,01	0,10	0,24	0,51	0,88	1,46	2,32



Obr. 3. Kalibrační přímka PVA

Rovnice kalibrační přímky: $y = 0,0022x - 0,0476$ (1)

$R^2 = 0,98$

Osa y- absorbance (-)

Osa x- koncentrace PVA (mg/l)

Stanovení PVA ve zkumavkách

Do 5 ml zkumavek bylo napipetováno 100 μ l suspenze vzorku, 750 μ l kyseliny borité a 150 μ l roztoku jodidu s jodistanem draselným a ponecháno 30 minut stát. Po té byly zkumavky doplněny na objem 5 ml destilovanou vodou. Vzorek byl tímto postupem 50x zředěn a změřen na UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 660 nm pomocí programu Vision.

Stanovení PVA s kyselou hydrolýzou

Toto stanovení bylo provedeno tehdy, když se v lahvích se vzorky vytvořily sraženiny. Ty se mohly vytvořit srážením PVA. Aby bylo možno změřit zbytkový PVA, tedy i ten sražený, byl provede tento test.

Do 20 ml vialek bylo napipetováno 5 ml vzorku a 5 ml 8 % HCl a ty byly uzavřeny septem.

Vialky byly dány do kádinky s destilovanou vodou a 15-20 minut povařeny. Po zchladnutí byly vzorky takto upraveny:

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml povařené suspenze

0,75 ml 4% H_3BO_3 (40 g/l)

0,15 ml KI + I_2

Po protřepání se zkumavky ponechaly 15 minut v klidu.

Po té do nich bylo přidáno 3,6 ml destilované vody na celkový objem 5 ml. Obsah zkumavek byl promíchán a ihned měřen na Spekolu při 660 nm. (měřeno proti destilované vodě).

3.4.4 Příprava roztoků pro růstové testy

Tyto testy byly provedeny, abychom zjistily druhy substrátů na kterých kultury OT1, OT2, OT3 rostou.

Nejprve bylo připraveno 20 lahví s roztoky substrátů.

Do lahví byly naváženy tyto látky:

1. Kvasničný autolyzát (výsledná koncentrace 300 mg/l).....	15 mg
2. Octan sodný(300 mg/l).....	15 mg
3. Mléčnan sodný (300 mg/l).....	25 mg
4. Citrát sodný (300 mg/l).....	0,15 ml
5. Glyoxylát sodný (300 mg/l).....	15 mg
6. Pyruvát sodný (300 mg/l).....	15 mg
7. Glycerol (300 mg/l).....	15 mg
8. Ethylenglycol (300 mg/l).....	15 mg
9. 1,2-propandiol (300 mg/l).....	15 mg
10. Trypton (300 mg/l).....	15 mg
11. Sojový pepton (300 mg/l).....	15 mg
12. Kontrola (MM + kvasničný autolyzát 20 mg/l).....	12 mg
13. PVA (500 mg/l).....	25 mg
14. Kvasničný autolyzát (500 mg/l).....	25 mg
15. Kvasničný autolyzát (1000 mg/l).....	50 mg
16. Trypton (500 mg/l).....	25 mg
17. Trypton (1000 mg/l).....	50 mg
18. Sojový pepton (500 mg/l).....	25 mg
19. Sojový pepton (1000 mg/l).....	50 mg
20. Glukosa (300 mg/l).....	15 mg

Každá z těchto lahví byla doplněna 50 ml minerálního media (připraveného ze základních složek s přídavkem 12 mg kvasničného autolyzátu (20 mg/l)). A do lahví číslo 9, 8, 13 bylo přidáno PQQ (výsledná koncentrace 20 µg/l).

Vše se dalo sterilizovat do autoklávu při režimu 115 °C na 20 minut. Po té se roztoky daly zchladnout.

Do jamek mikrotitrační destičky bylo dávkováno po 180 μ l roztoku substrátu a 20 μ l inokula zkoumané kultury. Každý z roztoků substrátu byl dávkován do 4 jamek (paralelní stanovení).

3.4.5 Příprava fixovaného nativního preparátu

Podložní sklíčko bylo položeno na čistý filtrační papír. Doprostřed sklíčka byla umístěna kapka fyziologického roztoku a bakteriologickou kličkou do ní bylo nanесeno malé množství mikrobiální kultury. Tato suspenze buněk byla dobře promíchána a rozetřena. Sklíčko bylo necháno vyschnout a pak bylo nátěrem vzhůru třikrát protaženo plamenem kahanu. Po vychladnutí bylo s preparátem dále pracováno.

3.4.6 Gramovo barvení preparátu

Připravený fixovaný preparát na podložním sklíčku byl převrstven roztokem krystalové violeti a ta působila 60 sekund. Po té byl preparát převrstven Lugolovým roztokem, který působil také 60 sekund. Preparát byl opláchnut destilovanou vodou a odbarven v šikmé poloze etanolem 20-25 sekund a opět opláchnut destilovanou vodou. Dále byl převrstven karbolfuchsinem na 60 sekund, opláchnut destilovanou vodou a ponechán uschnout. Mikroskopován byl pomocí inverzního objektivu, zvětšení 100x.

3.4.7 Měření pH

Meření pH bylo prováděno pH-metrem, se skleněnou elektrodou. pH-metr byl před měřením kalibrován pomocí příslušných pufrů.

3.4.8 Sterilizační techniky

Suchá sterilizace- vyžihání v plameni, takto byly sterilizovány mikrobiologické kličky, hokejky.

Vlhká sterilizace – v autoklávu, v němž byly sterilizovány živné půdy, minerální média, kultivační lahve při 120 °C na 15 minut.

4. VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST

4.1 Růstové testy

Tyto testy byly provedeny, abychom zjistily druhy substrátů na kterých kultury OT1, OT2, OT3 rostou a mohly dané substráty použít k dalším testům. Toto zjištění bylo důležité zejména u kultury OT3, se kterou byly provedeny další pokusy.

Růstové testy také sloužily k zapracování v laboratoři, k poznání přípravy roztoků, práce s přístroji.

Nejprve bylo připraveno 20 láhví s roztoky substrátů dle postupu uvedeného v metodické části.

1. Kvasničný autolyzát (300 mg/l)
2. Octan sodný (300 mg/l)
3. Mléčnan sodný (300 mg/l)
4. Citrát sodný (300 mg/l)
5. Glyoxylát sodný (300 mg/l)
6. Pyrohroznan sodný (300 mg/l)
7. Glycerol (300 mg/l)
8. Ethylenglycol (300 mg/l)
9. 1,2-propandiol (300 mg/l)
10. Trypton (300 mg/l)
11. Sojový pepton (300 mg/l)
12. Kontrola
13. PVA (500 mg/l)
14. Kvasničný autolyzát (500 mg/l)
15. Kvasničný autolyzát (1000 mg/l)
16. Trypton (500 mg/l)
17. Trypton (1000 mg/l)
18. Sojový pepton (500 mg/l)
19. Sojový pepton (1000 mg/l)
20. Glukosa (300 mg/l)

Kultury OT1, OT2, OT3 byly očkovány na mikrotitrační destičky na substráty uvedené výše o koncentraci 300 mg/l, některé i o vyšších koncentracích.

Kultura OT1

Průběh růstu kultury OT1 na daných substrátech byl zaznamenán v následujících tabulkách.

Tabulka 2. Stav v jamkách po 4 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-

Tabulka 3. Stav v jamkách po 7 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabulka 4. Stav v jamkách po 16 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

+ růst kultury (zákal nebo sediment)

- bez růstu kultury

Z výsledků vyplynulo, že kultura OT1 využívala ke svému růstu tyto substráty: Sojový pepton o koncentracích 300 mg/l, 500 mg/l i 1000 mg/l, na kterém projevila svůj růst hned po několika dnech. Rostla na PVA (500 mg/l) i na kvasničním autolýzátu, ale jen

ve vyšších koncentracích (500 mg/l i 1000 mg/l) a také na tryptonu o koncentracích 300 mg/l, 500 mg/l i 1000 mg/l.

Kultura OT2

Bylo sledováno které substráty kultura OT2 využívá a její růst byl zaznamenán v těchto tabulkách.

Tabulka 5. Stav v jamkách po 4 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabulka 6. Stav v jamkách po 7 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabulka 7. Stav v jamkách po 16 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

+ růst kultury (zákal nebo sediment)

- bez růstu kultury

Z pokusu vyplynulo, že kultura OT2 roste na těchto substrátech: Kvasničný autolyzát, na tomto substrátu, (ve všech jeho koncentracích 300, 500 i 1000 mg/l), projevila svůj růst již po několika málo dnech. Rovněž tak na tryptonu a sojovém peptonu o koncentracích 300, 500 i 1000 mg/l, narostla kultura OT2 již po několika málo dnech. A dále tato kultura využívala také substráty PVA (500 mg/l), octan sodný (300 mg/l), mléčnan sodný (300 mg/l).

Kultura OT3

Bylo sledováno které substráty kultura OT3 využívá a její růst byl zaznamenán v následujících tabulkách.

Tabulka 8. Stav v jamkách po 4 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabulka 9. Stav v jamkách po 7 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabulka 10. Stav v jamkách po 11 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabulka 11. Stav v jamkách po 18 dnech kultivace

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

+ růst kultury (zákal nebo sediment)

- bez růstu kultury

V tomto pokusu se ukázalo, že kultura OT3 využila ke svému růstu sojový pepton o těchto koncentracích 300, 500 i 1000 mg/l hned po několika málo dnech kultivace, rovněž

tak využila i kvasničný autolyzát. Rostla také na PVA (500 mg/l), na tryptonu jen ve vyšších koncentracích (500 i 1000 mg/l). Její růst se také projevil na octanu sodném (300 mg/l), glukose (300 mg/l) a mléčnanu sodném (300 mg/l)

4.2 Studium vlastností kultury OT3

4.2.1 Test 1 – Základní pokus degradace PVA kulturou OT3

Tento test byl proveden, abychom zjistili, zda má vliv na degradaci PVA to, zda je kultura OT3 očkovaná z pevného či kapalného živného prostředí - z Petriho misky nebo z tekutého média. Byla zde návaznost na růstové testy, kdy byl vzorek kultury OT3 brán z jamky mikrotitrační destičky, kde byl jako růstový substrát použit PVA.

Byly připraveny 2 lahve po 50 ml MM s PVA (500 mg/l), 10 µl zásobního roztoku PQQ (20 µg/l) a s 250 µl zásobního roztoku katalasy (10 mg/l). První láhev byla zaočkována kulturou OT3 z Petriho misky a druhá kulturou OT3 z jamky mikrodestičky. Lahve byly dány do místnosti s 25 °C a na třepačku s režimem 15 minut / 15 minut (pohyb / klid).

Tabulka 12. Koncentrace PVA v tekutém mediu

	Koncentrace PVA (mg/l)		%Odstranění
Láhev č.	0. den	5. den	
1	430,6	205,9	52,2
2	440,2	100,6	77,1

Z pokusu vyplynulo, že v lahvích k degradaci PVA proběhla.

Pro kontrolu kultury v lahvích bylo provedeno Gramovo barvení, a preparáty byly prozkoumány pod mikroskopem. Zjistili jsme, že kultura očkovaná z Petriho misky obsahuje skutečně jen kulturu OT3 (malé tenké gramnegativně barvené tyčinky). Ale kultura očkovaná z destičky obsahovala jak OT3, tak i buňky nějaké další kultury (silnější tyčinky). Aby byla tato druhá kultura identifikována, bylo provedeno vyočkování kultur na

Petriho misky. Byl připraven minerální agar i agar obohacený Bromthymolovou modří s PVA, PQQ, katalasou. Z každé lahve byly připraveny zkumavky s desetinným ředěním. 20 μ l OT3 očkované z destičky (OT3- D) z ředění 10^{-4} a 10^{-6} bylo vyočkováno na misku s agare bez i s Bromthymolovou modří. A také 20 μ l OT3 očkované z misky (OT3- M) z ředění 10^{-6} bylo takto vyočkováno. Byly také vyočkovány na TYA agar, křížovým roztěrem. Misky byly dány kultivovat do místnosti s 25 °C.

Třetí den po kultivaci vyrostly na miskách s TYA agarem různá konsorcia. Na misce očkované kulturou OT3- D vyrostly žluté a bílé kolonie a na misce očkované kulturou OT3- M vyrostly bílé kolonie. Byl připraven preparát a zkoumán pod mikroskopem. Bylo zjištěno že vše co narostlo na TYA agaru je kontaminace. U kultury OT3- D to byly žluté kolonie, Gram pozitivní koky a bílé Gram negativní koky. A u kultury OT3- M byly bílé kolonie zřejmě kvasinky.

Sedmý den po kultivaci byl na miskách s ředěním vidět růst, na některých miskách opět narostla i kontaminace. Jen miska s kulturou OT3- M a ředěním 10^{-6} (OT3- M, 10^{-6}) byla čistá, s narostlými koloniemi kultury OT3. Drobné, nažloutlé, samostatně rostoucí kolonie. Tato miska byla dána opět kultivovat a po čtrnácti dnech kultivace byly na misce OT3- M- 10^{-6} pozorovány větší a menší, nažloutlé samostatně rostoucí kolonie (Příloha 2).

Pro kontrolu bylo provedeno Gramovo barvení a preparáty těchto dvou kolonií byly prohlédnuty pod mikroskopem, a bylo zjištěno, že se jedná o tu samou bakterii OT3. Byly vidět typické malé drobné tyčinky.

Práce s bakteriálními kulturami byla velmi náročná, což lze usoudit z tohoto pokusu. Bylo nutno dbát na sterilitu prostředí, pracovat v boxu. Ale i přesto snadno došlo ke kontaminaci. Je možno změnit některé postupy, ale ani to nemusí být zárukou, že nedojde ke kontaminaci. V následných pokusech byly proto pro kontrolu kontaminace vyočkovávány vybrané baňky na TYA – agary (kultura OT3 na tomto universálním agaru neroste).

4.2.2 Test 2 - Ověření degradace PVA kulturou OT3

Vzhledem ke kontaminaci v testu 1 jsme se pokusili ověřit schopnost kultury OT3 degradovat PVA tímto pokusem. Jako přídavky ke kultuře OT3 jsme použili PQQ, které se přidává, protože kultuře OT3 slouží jako nutný kofaktor. Přídavek katalasy se používá jako zdroj nějaké látky, která podporuje kulturu OT3 při degradaci. Methionin i hemin jsou látky obsažené v této katalase, proto jsme se je pokusili dodat kultuře OT3 zvlášť. A dále jsme také přidali kulturu *Rhodococcus*, protože kultura OT3 v symbiose s kulturou *Rhodococcus* velmi dobře rozkládá PVA. Jako zdroj vitamínů a kofaktorů byl použit kvasničný autolyzát.

Bylo připraveno 10 lahví s MM po 50 ml a PVA (500 mg/l), dále byly přidány látky podle rozpisu. S výjimkou lahve č. 5 tam bylo vše přidáno po sterilizaci.

- 1) OT3 + PQQ 20 µg/l
- 2) OT3 + PQQ 20 µg/l + inaktivní katalasa 10 mg/l
- 3) OT3 + PQQ 20 µg/l + inaktivní katalasa 50 mg/l
- 4) OT3 + PQQ 20 µg/l + methionin 4 mg/l
- 5) OT3 + PQQ 20 µg/l + methionin 4 mg/l (přídavek až po sterilizaci)
- 6) OT3 + PQQ 20 µg/l + hemin 2 mg/l (zásobní roztok v acetonu)
- 7) OT3 + PQQ 20 µg/l + methionin 4 mg/l + hemin 2 mg/l (zásobní roztok v acetonu)
- 8) OT3 + PQQ 20 µg/l + kvasničný autolyzát 100 mg/l + sojový pepton 100 mg/l
- 9) OT3 + PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus globerulus*
- 10) Bez zaočkování – kontrola

Lahve se daly sterilizovat s režimem 115 °C a 20 minut. Po zchladnutí byly lahve číslo 1-9 zaočkovány 20 µl suspenze s kulturou OT3, láhev č.9 i kulturou *Rhodococcus*. Láhev 10 byla nezaočkována, ta byla kontrolní.

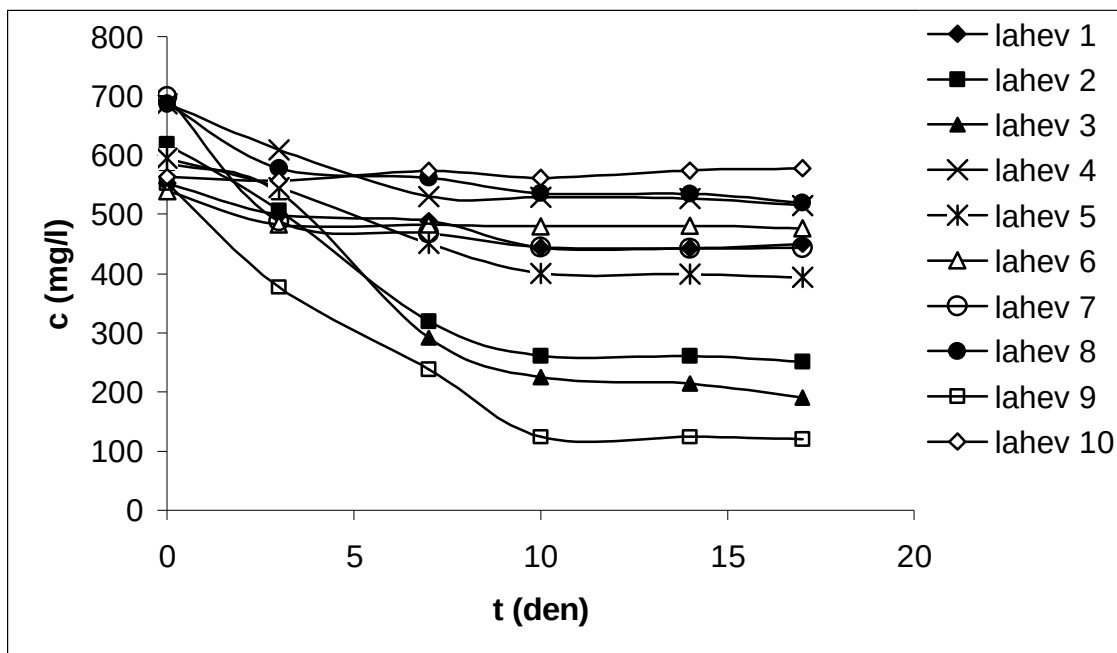
Lahve byly upevněny na třepačku s režimem 15 minut / 15 minut (pohyb / klid) v místnosti s 25 °C. Z lahví byly odebírány v daných intervalech vzorky a v nich byla stanovována koncentrace PVA pomocí spektrofotometrické mikrometody. Hodnoty koncentrace PVA byly uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13. Koncentrace PVA v průběhu testu (průměr a směrodatná odchylka)

Láhev č.	Koncentrace PVA (mg/l)				
	0. den	3. den	7. den	10. den	14. den
1	552,3 ± 28	499,1 ± 33,7	488,4 ± 44,1	443,4 ± 17,4	442,6 ± 37,5
2	617,9 ± 25,3	506,8 ± 18,5	319,9 ± 24,6	260,6 ± 24,1	260,8 ± 15
3	586,7 ± 38,3	537,3 ± 22,8	291,3 ± 19,6	225,2 ± 24,9	214,6 ± 18,6
4	686,3 ± 35,7	608,9 ± 25,5	530,3 ± 20,9	528,3 ± 16,9	526,4 ± 28,6
5	594,9 ± 42,4	545,5 ± 34,2	450,9 ± 35,3	400,4 ± 29,9	398,3 ± 40,5
6	539,4 ± 21,1	482,3 ± 34,1	481,9 ± 23,5	479,6 ± 11,7	480,5 ± 23,8
7	698,4 ± 26,7	488,6 ± 20,4	468,3 ± 12,4	444,7 ± 29,7	442,8 ± 31,2
8	686,6 ± 34,2	577,3 ± 18,8	561,7 ± 37,8	535,5 ± 33,4	534,6 ± 29,4
9	552,7 ± 38,2	376,7 ± 33,7	238,7 ± 41	124,1 ± 23,6	123,8 ± 16,9
10	562,9 ± 20,2	556,9 ± 42,4	572,8 ± 19,8	561,9 ± 22,1	573,9 ± 26,1

Tabulka 13. Koncentrace PVA v průběhu testu, pokračování
a procenta degradace

Láhev č.	Koncentrace PVA (mg/l)	Odstranění PVA (%)
	17. den	
1	449,7 ± 34,7	18,6
2	251,2 ± 18,2	59,3
3	190,9 ± 12,1	67,5
4	514,3 ± 38,6	25,1
5	393,4 ± 31,2	33,9
6	475,9 ± 26,8	11,8
7	443,9 ± 29,8	36,4
8	519,1 ± 35,7	24,4
9	120,9 ± 27,7	78,1
10	577,4 ± 14,3	-



Obr.4. Závislost koncentrace PVA na čase

Po 17. dnech kultivace a zhodnocení výsledků, jsme usoudili, že degradace je již u konce, test jsme tedy zastavili. Pro kontrolu byly vyočkovány vzorky z lahví číslo 2, 3, 9 křížovým roztěrem na misky s TYA agarem. Po několika dnech kultivace byly misky s TYA agarem a vzorkem z lahve číslo 2 a 3 čisté a se vzorkem z lahve číslo 9 porostlé pouze kulturou *Rhodococcus*. Tím bylo ověřeno, že obsahy lahví nebyly kontaminované a rozklad PVA v láhvích opravdu probíhal díky kultuře OT3.

Po zhodnocení výsledků lze říci, že degradace proběhla nejvíce při přidavku kultury *Rhodococcus*. PVA zde byl odstraněn ze 78,1 %. Také přidavek katalasy zvýšil degradaci na 67,5 % (oproti samotné kultuře OT3 jejíž degradace byla 18,6 %), ale nedosahovala hodnoty při přidavku kultury *Rhodococcus*. Dále je také zřejmé, že jen mírný vliv na degradaci mělo množství použité katalasy, což vyplývá ze srovnání, při přidavku katalasy 10 mg/l, kde proběhla degradace z 59,3 % a při přidavku katalasy 50 mg/l, kde proběhla degradace 67,5 %. Přidáním heminu se degradace nijak výrazně nezvýšila. U vzorků s přidavkem methioninu byla rozdílná degradace u přidavku před sterilizací 25,1 % a u přidavku po sterilizaci 33,9 %. V obou případech byla degradace mírně zvýšená oproti samotné kultuře OT3, ale sterilizace sama degradaci výrazně neovlivnila. Stejně tak přidáním kvasničného autolyzátu byla degradace ovlivněna velmi málo.

4.2.3 Test 3 – Ověření významu přítomnosti kultury *Rhodococcus globerulus*

V tomto testu byly ověřeny vlastnosti kultury OT3 degradovat PVA především za přítomnosti kultury *Rhodococcus* ve více formách a katalasy. Také jsme otestovali vliv kontaminací narostlých na TYA agaru v testu 1 (žluté kolonie, bílé kolonie).

Bylo připraveno 9 lahví s MM po 50 ml a PVA (500 mg/l), dále byly přidány látky podle rozpisu. Do lahve číslo 4 a 5 byl přidán před sterilizací *Rhodococcus globerulus*, aby byl po sterilizaci v mrtvém stavu.

- 1) OT3 + PQQ 20 µg/l
- 2) OT3 + PQQ 20 µg/l + inaktivovaná katalasa 10 mg/l
- 3) OT3 + PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus*, živé inokulum
- 4) OT3 + PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus*, mrtvé inokulum
- 5) OT3 + PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus*, mrtvá biomasa 0,2 g
- 6) OT3 + PQQ 20 µg/l + žlutá kolonie, živé inokulum
- 7) OT3 + PQQ 20 µg/l + bílá kolonie, živé inokulum
- 8) OT3 + PQQ 20 µg/l + inaktivovaná katalasa 10 mg/l + kvasničný autolýzát 50 mg/l
- 9) Bez zaočkování – kontrola

Po sterilizaci byl do lahve č. 3 přidán *Rhodococcus globerulus*, do lahve číslo 6 inokulum kontaminantu (žlutá kolonie), do lahve číslo 7 inokulum kontaminantu (bílá kolonie) a lahve číslo 1-8 byly zaočkovány 20 µl suspenze s kulturou OT3. Láhev 9 byla nezaočkována.

Lahve byly upevněny na třepačku s trvalým režimem třepání (125 kmitů za minutu) v místnosti s 25 °C. Z lahví byly odebrány a změřeny vzorky. Hodnoty koncentrací PVA jsou uvedeny v Tabulce 14.

Tabulka 14. Koncentrace PVA v průběhu testu (průměr a směrodatná odchylka)

	Koncentrace PVA (mg/l)				
Láhev č.	0. den	3. den	7. den	10. den	14. den
* 1	782,7 ± 11,4	722,4 ± 21,1	624,6 ± 30,7	536,1 ± 33,3	450,5 ± 19,1
2	872,3 ± 41,3	753,4 ± 7,3	672,9 ± 44,1	521,8 ± 19,9	469,1 ± 29
3	944,6 ± 20,7	804,3 ± 15,7	491,5 ± 35,3	405,1 ± 28,6	342,5 ± 18,9
4	879,3 ± 36,3	853,2 ± 26,3	660,7 ± 33,6	506,5 ± 12,4	511,1 ± 16
5	885,5 ± 45,5	851,7 ± 17,5	527,6 ± 36,4	471,9 ± 27,9	389,8 ± 26,4
6	980,1 ± 41,4	929,6 ± 28,4	859,1 ± 25,9	799 ± 29,2	711,7 ± 29,2
7	1044,2 ± 43,6	1046,1 ± 32,1	1042,3 ± 31,2	1037,2 ± 21,9	876,1 ± 37
8	920,1 ± 34,9	871,7 ± 25,2	688,9 ± 30,4	648,8 ± 34,3	624,5 ± 35,6
9	939,2 ± 21,7	899,5 ± 18,9	929,5 ± 35,6	900,6 ± 41,6	892,3 ± 26

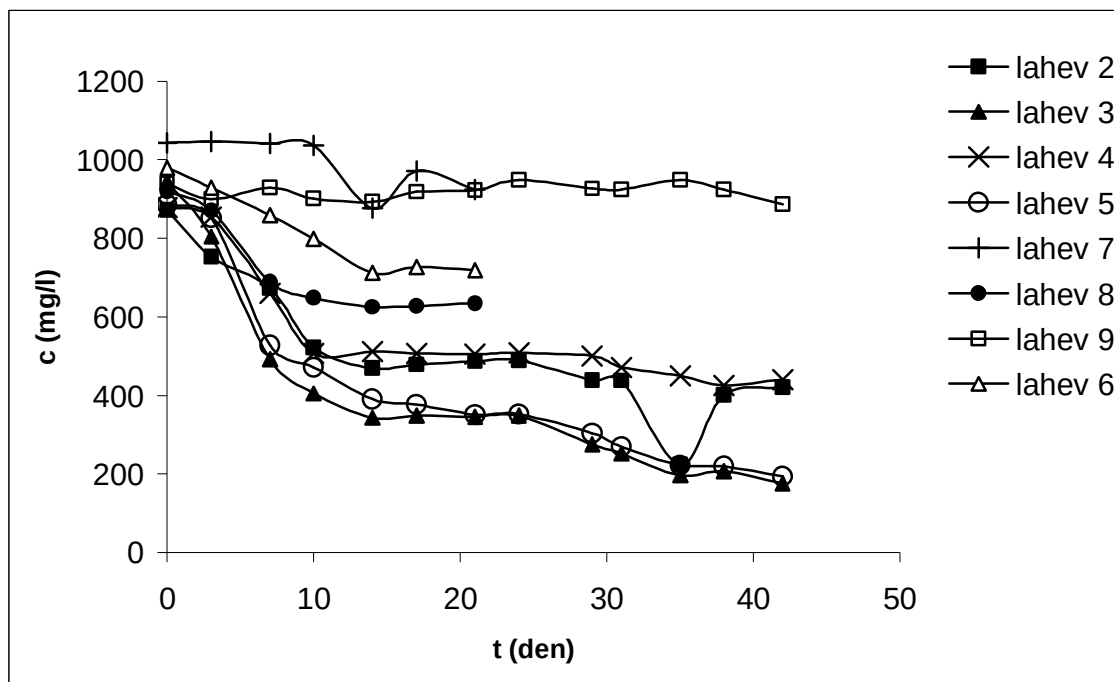
Tabulka 14. Koncentrace PVA v průběhu testu, pokračování

	Koncentrace PVA (mg/l)				
Láhev č.	17. den	21. den	24. den	29. den	31. den
* 1	452,1 ± 29,7	424,8 ± 29,8			
2	478 ± 23,1	486,8 ± 32,3	488,6 ± 26	438,7 ± 20,6	438 ± 29
3	348,1 ± 15,5	345,1 ± 19,2	348 ± 13,2	275,1 ± 27,2	251,2 ± 15,1
4	506,5 ± 35,8	506 ± 18,1	508,5 ± 18,5	500,6 ± 25,8	472,1 ± 35,7
5	376,1 ± 29,8	351 ± 31	351,5 ± 32	303,4 ± 26,7	269,5 ± 12,4
6	727,5 ± 32,8	719,5 ± 25,7			
7	971,4 ± 30,4	924,5 ± 28,6			
8	628,5 ± 31,9	635,3 ± 24,7			
9	918,2 ± 39,3	922,6 ± 13,5	948,8 ± 43,5	926,9 ± 27,5	924,7 ± 16

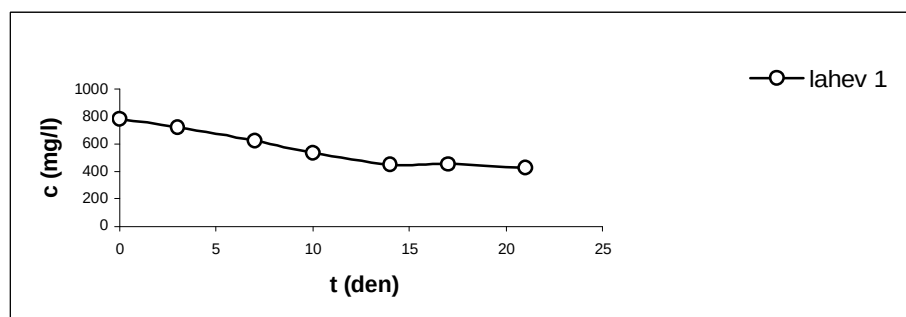
Tabulka 14. Koncentrace PVA v průběhu testu, pokračování a procenta degradace

	Koncentrace PVA (mg/l)			Odstranění PVA (%)
Láhev č.	35. den	38. den	42. den	
* 1				45,7
2	222,9 ± 28,1	400,7 ± 37,3	419,3 ± 32,1	51,9
3	196,1 ± 38,3	206,5 ± 9,3	174,9 ± 6,9	81,5
4	450,5 ± 28,7	425,7 ± 17,5	439,9 ± 26,6	50
5	222 ± 20,7	219,1 ± 18,4	193,6 ± 7,3	78,1
6				26,6
7				11,5
8				31
9	948,6 ± 35	924,6 ± 30,5	888,1 ± 42	-

* Vzorčky takto označené byly kontaminované.



Obr.5. Závislost koncentrace PVA na čase



Obr.6. Závislost koncentrace PVA na čase- kontaminované vzorky

Z důvodu kontaminace byly pro kontrolu vyočkovány na TYA agary vzorky z lahví číslo 1, 2, 4, 5, křížovým roztěrem. U vzorku číslo 1 byl pozorován výrazný růst nějaké bakterie, což znamená že obsah v lahvi byl kontaminovaný, jelikož OT3 na TYA agaru roste jen nepatrně. Vzorky 2,4,5 kontaminované nebyly. U vzorku číslo 5 bylo tedy ověřeno, že láhev není kontaminovaná a také že *Rhodococcus* je ve stavu mrtvé biomasy, jelikož on na TYA agaru roste.

Dvacátý první den byl test u vzorků číslo 1, 6, 7, 8 ukončen. Vzorek 1 byl kontaminovaný. U vzorků 6, 7 a 8 jsme se domnívali, že degradace již skončila. Ostatní byly ukončeny 42. den.

Z výsledků vyplývá, že degradace proběhla opět nejvíce u vzorku s kulturou *Rhodococcus* a to jak ve formě živého inokula (degradace 81,5 %) tak i u mrtvé biomasy (degradace 78,1 %). Z výsledku, že kultura OT3 degraduje PVA za přítomnosti živé i mrtvé formy kultury *Rhodococcus*, se můžeme domnívat, že *Rhodococcus* dodával kultuře OT3 při degradaci nějakou látku nebo faktor, nikoliv enzym. Z tvaru křivky u přidavku kultury *Rhodococcus* lze říci, že degradace probíhala do devátého dne rychle, křivka zde strmě klesala, v rozmezí devátého a dvacátého dne byla degradace pomalejší, jako by se zastavovala. A po dvacátém dnu opět probíhala rychleji. Při pokusu s přidavkem katalasy, byla dosažena degradace zhruba poloviny substrátu což je 51,9 %.

Žlutá kolonie a bílá kolonie neprokázaly příznivý vliv na degradaci PVA kulturou OT3. Z čehož vyplývá, že ne každá bakterie dodává kultuře OT3 to, co jí dodává *Rhodococcus*.

4.2.4 Test 4 – Ověření vlivu předkultivace kultury OT3 na degradaci PVA

V tomto testu jsme se zaměřili na ověření vlivu předkultivace kultury OT3 na degradaci PVA v tekutém mediu. Jednotlivé lahve byly očkovány kulturou OT3 buď pocházející z misky s PVA agarem, nebo z tekutého média s PVA, nebo z agarové misky s kvasničným autolyzátem (tedy bez růstu na PVA). Kvasničný autolyzát jsme zvolili v návaznosti na růstové testy, při kterých kultura OT3 projevila růst na tomto substrátu.

Bylo připraveno 10 lahví s MM po 50 ml a PVA (500 mg/l), dále byla přidána katalasa podle rozpisu.

- 1) OT3 + PQQ 20 µg/l + inokulum pocházející z petriho misky s PVA
- 2) OT3 + PQQ 20 µg/l + inokulum pocházející z tekutého média s PVA
- 3) OT3 + PQQ 20 µg/l + inokulum pocházející z petriho misky bez PVA
- 4) OT3 + PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus* + inokulum pocházející z petriho misky s PVA
- 5) OT3 + PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus* + inokulum pocházející z tekutého média s PVA
- 6) OT3 + PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus* + inokulum pocházející z petriho misky bez PVA
- 7) PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus globerulus*

- 8) OT3 + PQQ 20 µg/l + inaktivní katalasa 10 mg/l + inokulum pocházející z petriho misky s PVA
- 9) OT3 + PQQ 20 µg/l + inaktivní katalasa 10 mg/l + inokulum pocházející z tekutého media s PVA
- 10) Bez zaočkování – kontrola (slepý pokus)

Lahve byly dány sterilizovat s režimem 115°C a 20 minut. Po zchladnutí byly lahve dle rozpisu zaočkovány 20 µl suspenzí s kulturou OT3, pocházející z petriho misky s PVA, pocházející z tekutého media s PVA, pocházející z petriho misky bez PVA a suspenzí s kulturou *Rhodococcus globerulus*. Láhev 10 byla nezaočkována.

Lahve byly upevněny na třepačku s režimem 15 minut / 15 minut (pohyb / klid) v místnosti s 25 °C. Z lahví byly odebrány v daných intervalech vzorky, byla stanovena koncentrace PVA pomocí spektrofotometrické mikrometody. Hodnoty koncentrace PVA jsou uvedeny v Tabulce 15.

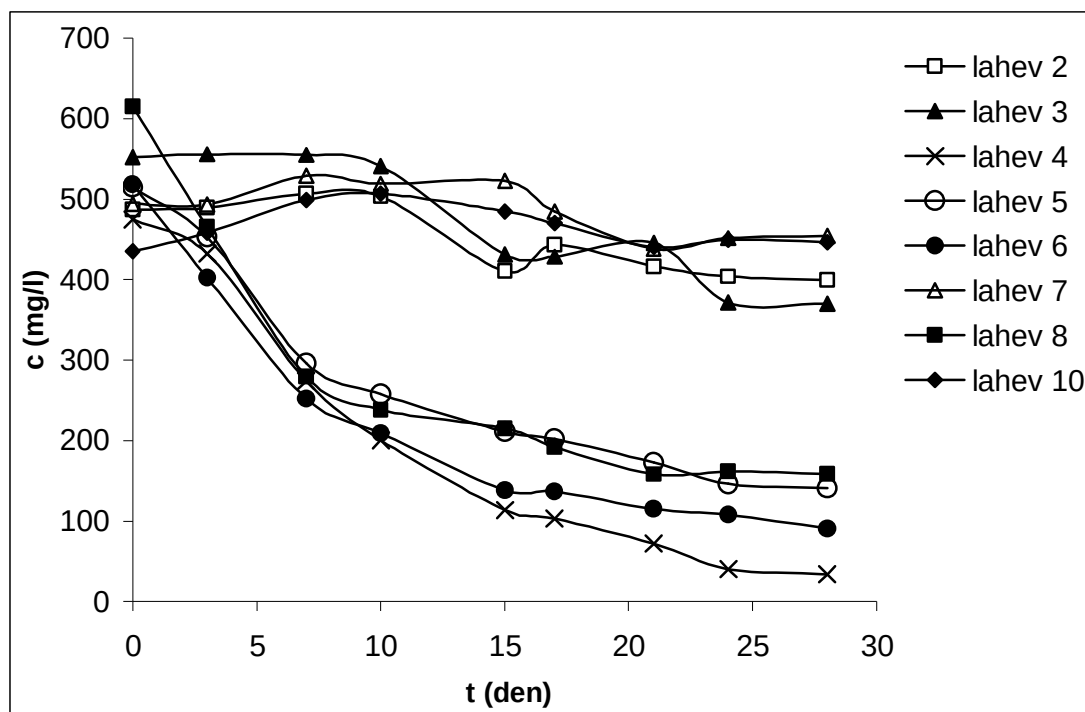
Tabulka 15. Koncentrace PVA v průběhu testu (průměr a směrodatná odchylka)

Láhev č.	Koncentrace PVA (mg/l)				
	0. den	3. den	7. den	10. den	15. den
* 1	465,7 ± 30,9	466,4 ± 28,7	414,7 ± 22,7	408,7 ± 32,7	242,2 ± 28,2
2	486,8 ± 29,1	489,2 ± 34,6	506,9 ± 41,6	503,5 ± 43	410,7 ± 31,6
3	552,1 ± 20,5	555,9 ± 24,6	554,7 ± 25,9	541 ± 23,5	430,9 ± 29,2
4	475 ± 37,4	432,5 ± 33,3	274,1 ± 16	200,6 ± 6,5	114 ± 9,2
5	514,9 ± 5,2	453,1 ± 25,1	296,3 ± 14,9	257,5 ± 22	211,2 ± 33,9
6	518,8 ± 27,4	402,8 ± 21,6	252,5 ± 18,1	209,3 ± 23,7	138,5 ± 8,8
7	493,9 ± 34,3	493,7 ± 17,9	528,9 ± 14,9	519,5 ± 21,3	522,3 ± 40,3
8	615,4 ± 9,6	465,3 ± 23	279,5 ± 18,8	238,6 ± 11	215,3 ± 36,3
* 9	571,5 ± 10,8	442,9 ± 23,3	296,7 ± 16,6	129,8 ± 4,3	121,7 ± 20,3
10	435,4 ± 21	458,5 ± 9,4	498,8 ± 25,6	506,8 ± 19,6	484,5 ± 45,9

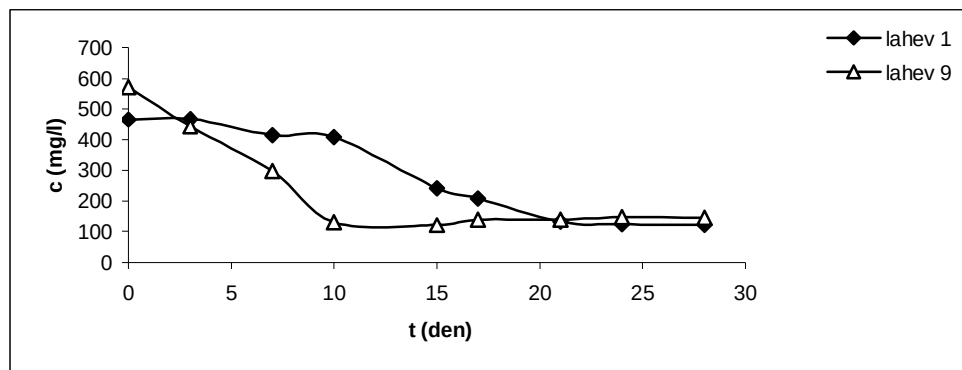
Tabulka 15. Koncentrace PVA v průběhu testu, pokračování a procenta degradace

Láhev č.	Koncentrace PVA (mg/l)				Odstranění PVA (%)
	17. den	21. den	24. den	28. den	
* 1	207,7 ± 9,3	131,3 ± 23,5	125,3 ± 15,3	122,1 ± 5,6	73,8
2	442,8 ± 25,1	416,5 ± 27	404,3 ± 33,7	399,2 ± 34,6	18
3	428,8 ± 32,3	445,4 ± 26,9	371,5 ± 36,1	370,5 ± 34,8	32,9
4	103,3 ± 6,6	72,4 ± 2,7	40,2 ± 1,5	33,8 ± 4	92,9
5	201,8 ± 35,2	172,7 ± 20,3	146,3 ± 6,4	141,3 ± 7	72,6
6	137,1 ± 8	115,1 ± 6,6	107,7 ± 10,4	90,5 ± 5,6	82,6
7	484,9 ± 30,4	438,4 ± 11	451,7 ± 12,1	454,6 ± 26,5	8
8	192,3 ± 5,7	158,4 ± 10,3	161,3 ± 10,5	159,2 ± 22,3	74,1
* 9	138,5 ± 2,6	139,8 ± 28,3	147,2 ± 31,3	145,9 ± 7,9	74,5
10	470,4 ± 9,7	440,7 ± 20,7	450 ± 19,6	446,4 ± 13,1	-

* Vzorky takto označené byly kontaminované.



Obr.7. Závislost koncentrace PVA na čase



Obr.8. Závislost koncentrace PVA na čase- kontaminované vzorky

Na TYA agar byly vyočkovány vzorky číslo 1,2,3,8,9 a dány kultivovat. Po 7 dnech kultivace na misce č. 1 narostl *Rhodococcus*, z čehož lze usoudit proč probíhala tak výrazná degradace. Samotná OT3 PVA nerozkládá v takovém množství. Vzorek číslo 9 byl kontaminován. Misky číslo 2,3,8 byly čisté.

Z laboratorního pokusu vyplývá že není nutný předchozí kontakt kultury OT3 s PVA v průběhu předkultivace, degradace u obou kultur vykázala jen mírný rozdíl. Dokonce bylo zjištěno, že kultura OT3 narostená v tekutém mediu s PVA degradovala PVA z 18 %, kdežto kultura OT3 pocházející z petriho misky bez PVA degradovala PVA ze 32,9 %. Zjistili jsme, že při přidavku kultury *Rhodococcus* probíhala degradace nejlépe, s tím, že byly zjištěny mírné rozdíly dle původu inokula kultury OT3 (degradace probíhala v rozmezí 72,6- 92,9 %). Nejlépe tedy degradace proběhla z 92,9 % v případě kultury OT3 pocházející z Petriho misky s PVA. Zanedbatelný rozklad PVA prokázal pokus při kterém byla použita samotná kultura *Rhodococcus*, degradace činila v tomto případě pouze 8 %. Při přidání katalasy k inokulu pocházejícímu z Petriho misky s PVA byla degradace 74,1 %, což nám ukazuje, že katalasa má pozitivní význam pro kulturu OT3, ale jen částečně nahrazuje kulturu *Rhodococcus*, kde degradace byla 92,9 %.

4.2.5 Test 5 - Další ověření degradace PVA při přidavku katalasy a látek v ní obsažených

Tento test byl proveden, abychom znovu ověřili schopnost kultury OT3 degradovat PVA s přidavkem katalasy, methioninu i heminu, a také s jejich opakovanými přídávky devátý den degradace. Byl zde opět prověřen i přídavek kultury *Rhodococcus* v mrtvé i živé formě.

Bylo připraveno 10 lahví s MM po 50 ml a PVA (500 mg/l), dále byly přidány látky podle rozpisu. Katalasa a *Rhodococcus* (do lahve číslo 7) byly přidány před sterilizací.

- 1) OT3 + PQQ 20 µg/l
- 2) OT3 + PQQ 20 µg/l + inaktivní katalasa 10 mg/l
- 3) OT3 + PQQ 20 µg/l + inaktivní katalasa 10 mg/l + přídavek inaktivní katalasy 10 mg/l 9. den
- 4) OT3 + PQQ 20 µg/l + methionin 4 mg/l
- 5) OT3 + PQQ 20 µg/l + methionin 4 mg/l + přídavek methioninu 4 mg/l 9. den
- 6) OT3 + PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus globerulus*
- 7) OT3 + PQQ 20 µg/l + *Rhodococcus globerulus* mrtvá biomasa 0,25 g
- 8) OT3 + PQQ 20 µg/l + methionin 4 mg/l + hemin 10 mg/l práškový
- 9) OT3 + PQQ 20 µg/l + inaktivní katalasa 10 mg/l + methionin 4 mg/l
- 10) Bez zaočkování – kontrola

Po sterilizaci byl do lahve č. 4,5,8,9 přidán methionin, do lahve č. 8 hemin a lahve číslo 1-9 byly zaočkovány 20 µl suspenze kultury OT3, láhev č.6 i kulturou *Rhodococcus*.

Lahve byly upevněny na třepačku s režimem 15 minut / 15 minut (pohyb / klid) v místnosti s 25 °C. Experiment byl vyhodnocován stejně jako pokusy předchozí a výsledky jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16. Koncentrace PVA v průběhu testu (průměr a směrodatná odchylka)

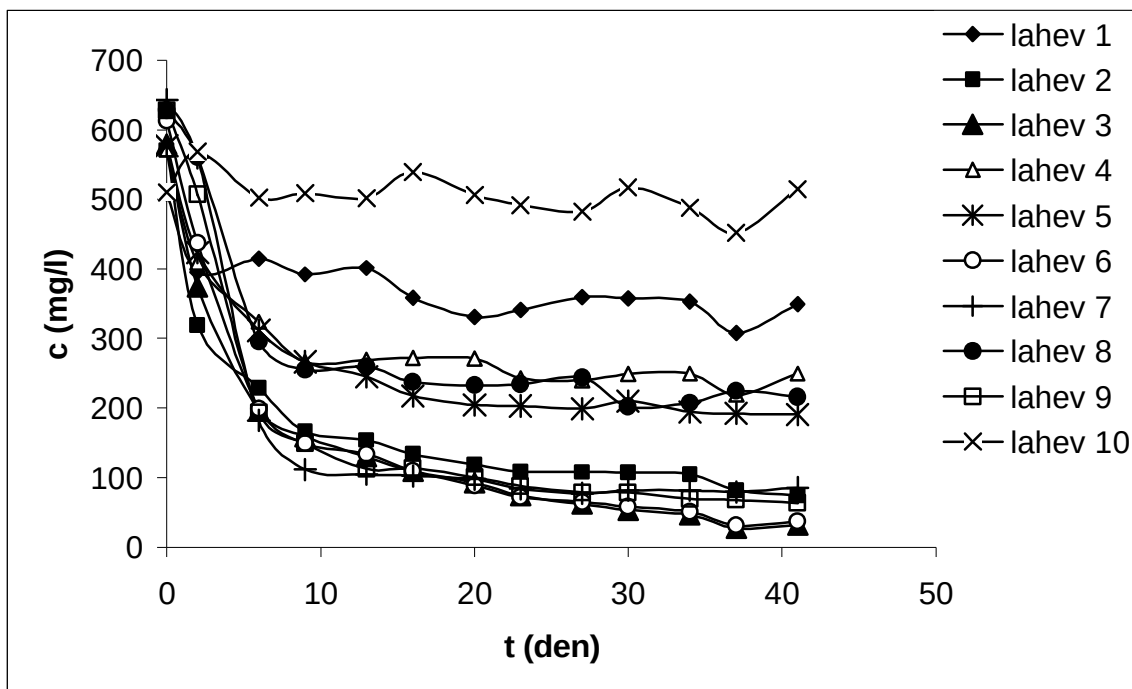
	Koncentrace PVA (mg/l)				
Láhev č.	0. den	2. den	6. den	9. den	13. den
1	507,5 ± 34,8	395 ± 27,7	414,5 ± 33,1	392,4 ± 17,8	401,6 ± 27,7
2	570,9 ± 10,7	319,7 ± 27,8	229,3 ± 26,5	166 ± 19,8	153,8 ± 17,9
3	579,3 ± 37,3	374,6 ± 6,1	197 ± 12,9	159,5 ± 24	130 ± 9,2
4	571 ± 13,1	408,9 ± 27,9	324 ± 37,3	266,7 ± 24,2	269,5 ± 13
5	577 ± 30	423,8 ± 31,6	311,6 ± 24,4	266,7 ± 32,8	244,7 ± 22,5
6	612,5 ± 12,9	437,3 ± 32,6	199,2 ± 14,2	149,4 ± 9	134,3 ± 33
7	642,9 ± 29,4	559,5 ± 21,8	182,5 ± 16,2	111,5 ± 10	104,6 ± 32,3
8	628,1 ± 31,2	560,4 ± 32,8	295,4 ± 28	255 ± 19,6	259,9 ± 23,4
9	627,5 ± 28,8	506,9 ± 11,7	192,9 ± 15,9	149,5 ± 10,3	112,4 ± 11
10	510,3 ± 30,3	568,1 ± 30	502,4 ± 24,6	508,5 ± 27	501,9 ± 34

Tabulka 16. Koncentrace PVA v průběhu testu, pokračování

	Koncentrace PVA (mg/l)				
Láhev č.	16. den	20. den	23. den	27. den	30. den
1	358,8 ± 19,4	330,5 ± 32,7	341,1 ± 12,2	359,1 ± 20,6	357,6 ± 17,5
2	133,7 ± 6	118,8 ± 7,5	108,9 ± 5,4	108 ± 5,7	107 ± 6,2
3	109,9 ± 9,4	92,8 ± 4,8	74,4 ± 1,2	62,2 ± 3,8	53,9 ± 4,2
4	271,7 ± 24,5	270,9 ± 19,4	242,5 ± 8,1	239,5 ± 15,6	249,1 ± 7,9
5	217,5 ± 14,3	204,8 ± 29	203,1 ± 15	199,1 ± 8,6	209,9 ± 14,6
6	109,4 ± 5,2	89 ± 4,1	72,2 ± 3	65 ± 3,4	58,5 ± 4,1
7	103 ± 8,7	97,8 ± 15,8	84,2 ± 2,4	77,4 ± 4,3	82,1 ± 7,7
8	237,7 ± 11,1	232,5 ± 19	234,5 ± 14,7	243,7 ± 19	201,9 ± 19,8
9	113,5 ± 6,2	100,4 ± 4,6	88,3 ± 4,2	78,8 ± 5,4	79 ± 19,1
10	539 ± 45,4	506,6 ± 37,4	491,6 ± 41,8	482,7 ± 33,8	516,9 ± 11,2

Tabulka 16. Koncentrace PVA v průběhu testu, pokračování a procenta degradace

	Koncentrace PVA (mg/l)			Odstranění PVA (%)
Láhev č.	34. den	37. den	41. den	
1	353,2 ± 24,1	308,2 ± 27	349,1 ± 16,3	31,2
2	105,1 ± 5,6	81,8 ± 7,8	74,6 ± 7,4	86,9
3	46,8 ± 4,2	27,9 ± 0,9	32,2 ± 1	94,4
4	249,5 ± 14,5	219,3 ± 9,2	249,7 ± 16,5	56,3
5	194,8 ± 8,5	192,1 ± 10	191 ± 3,2	66,9
6	51,5 ± 1,9	31,1 ± 1,7	37,3 ± 1,3	93,9
7	81,9 ± 5,6	79,8 ± 4,3	85,4 ± 1,6	86,7
8	207,5 ± 12,5	224,3 ± 11,3	216,1 ± 10	65,6
9	69,5 ± 3,2	67,8 ± 4,7	63,2 ± 3,6	89,9
10	487,5 ± 33,8	452,1 ± 37	514,5 ± 10,4	-



Obr.9. Závislost koncentrace PVA na čase

Pro kontrolu byly vyočkovány na TYA agar lahve číslo 2,3,4,5,7,9. Ukázalo se, že vzorky nejsou kontaminované, TYA agary byly čisté.

Kultura OT3 v symbiose s kulturou *Rhodococcus* skutečně rozkládala PVA velmi dobře, degradace zde proběhla z 93,9 %, což bylo opět potvrzeno i v tomto pokusu. Také mrtvá biomasa kultury *Rhodococcus* napomáhala kultuře OT3 k velmi dobré degradaci (86,7 %). V tomto pokusu se také ukázalo, že přidavek katalasy ke kultuře OT3 měl velký význam, kdy při opakovaném přidavku proběhla degradace z 94,4 %, a při přidavku katalasy jen na začátku byla degradace 86,9 %, ve srovnání se samotnou kulturou OT3, u které proběhla degradace z 31,2 %. Z tvaru křivek grafu, lze také vidět, že u přidavku kultury *Rhodococcus* a katalasy, probíhala degradace do devátého dne rychle, křivky nejprve strmě klesaly a pak se postup degradace zpomalil, pokles křivek byl menší. Přídavek methioninu ke kultuře OT3 zvýšil degradaci PVA více jak o polovinu, ale ne tak mnoho jako přídavek kultury *Rhodococcus* a přídavek katalasy. Lze říci, že opakovaný přídavek methioninu oproti přidavku methioninu jen na začátku, nemá výrazný vliv na degradaci. Účinek heminu, který byl přidán ke kultuře OT3 společně s methioninem vliv na degradaci PVA neprokázal.

4.3 Adaptace kalů a izolace čistých kultur, jejich testování

Souběžně se studiem vlastností kultury OT3 byly prováděny pokusy izolací nových bakteriálních kultur degradujících PVA ze vzorků několika čistírenských kalů. Byly použity 3 druhy kalu. První pocházel z ČOV Malenovice, druhý z ČOV Bohumil a třetí z ČOV Frýdlant nad Ostravicí. Vzorky kalu byly adaptovány v děličkách s přídavkem PVA (500mg/l) a provzdušňovány. Asi po 10 až 11 dnech byly vyočkovány na živné agarové půdy, a to na agary s PVA, PQQ a katalasou. Z kalu ČOV Bohumil byly izolovány tři kultury B41, B42, B5 a z kalu z ČOV Frýdlant nad Ostravicí se nám podařilo izolovat 4 kultury P1, P21, P22, P31.

4.3.1 Izolace kalu z ČOV Malenovice

Kal byl adaptován. Desátý den adaptace byl kal vyočkován na Petriho misky s minerálním agarem a s přídavkem PVA a PQQ. Na dvě misky bylo dáno i 100 μ l katalasy. Kal byl vždy napipetován na misku s katalasou a bez ní. Misky byly dány kultivovat do místnosti s 25 °C. Z tohoto kalu se nám nepodařilo izolovat žádné kultury.

O izolaci těchto bakterií jsme se pokusili v únoru 2x a neúspěšně. Mysleli jsme, že na jaře budou příznivější podmínky a o izolaci jsme se pokusili znovu v průběhu března. Opět neúspěšně. Lze tedy vyslovit domněnku, že příslušné bakterie z malenovického kalu vymizely, snad jako následek určitého toxického stavu, jehož příznaky byly pracovníky ÚTŽPCH pozorovány na podzim 2004 (Růžicka, Julinová, osobní sdělení).

4.3.2 Izolace kultur z kalu ČOV Bohumil

Uvedený vzorek kalu pocházel z provozu, kde se zpracovávají splaškové vody a vody z farmaceutického průmyslu.

Postupem izolace, který je popsán v metodice, a tedy přeočkováváním bylo získáno několik kultur pro další testování, a to B41, B42, B5.

Kultura B41 vytvořila drobné kolonie 1-2 mm velké, světlé, lehce nažloutlé, na všech miskách s PVA agarem, PVA+PQQ, PVA+PQQ+Katalasa stejně. Čtrnáctý den kultivace byl růst ještě výraznější na všech třech miskách. Usoudili jsme, že B41 tedy nepotřebuje pro svůj růst PQQ ani katalasu, jelikož rostla na misce s PVA stejně jako na miskách s PQQ a katalasou. Na čistém minerálním agaru byl pozorován jen nepatrný růst této kultury, proto byla kultura uschována pro následné ověřovací testy.

Kultura B42 vytvořila kolonie 1 mm velké, drobné bezbarvé, průsvitné, na všech miskách s PVA, PVA+PQQ, PVA+PQQ+katalasou přibližně stejné. A také tedy nevyžadovala pro svůj růst PQQ ani katalasu. Na čistém agaru projevila jen nepatrný růst.

Kultura B5 vytvořila nažloutlé kolonie s vroubkovaným okrajem, na misce s čistým agarem opět rostla jen nepatrně. Na miskách s PVA, s PVA+PQQ, s PVA+PQQ+katalasou kultura rostla pěkně (Příloha 3).

4.3.3 Izolace čistých kultur z kalu ČOV Frýdlant nad Ostravicí

Tento kal pocházel z ČOV Frýdlant nad Ostravicí z textilního provozu.

Nejprve byla provedena adaptace kalu na PVA. Jedenáctý den adaptace byl kal vyočkován podle postupu uvedeného v metodice. Pro další pokusy byly získány 4 kultury a to: P1, P21, P22, P31.

Kultura P1 rostla i na samotném agaru, projevila jen nepatrně výraznější růst na misce s PVA.

Kultura P31 rostla na miskách s minerálním agarem, s PVA, s PVA+PQQ, s PVA+PQQ+katalasou i na TYA agaru.

Kultura P21 projevila svůj růst na miskách s minerálním agarem, s PVA, s PVA+PQQ přibližně stejný a na misce s katalasou tvořila trochu větší kolonie.

Kultura P22 rostla na všech miskách přibližně stejně, tak jako kultura P31.

Tyto kultury, projevily svůj růst i na samotném minerálním agaru. Jejich schopnost degradovat PVA byla tedy ověřena v následujícím testu.

4.3.4 Test degradace PVA získanými kulturami v tekutém prostředí

Tento test byl proveden pro ověření schopnosti degradace PVA izolovanými, čistými kulturami B41, B42, B5, P1, P21, P22, P31. Provedení testu v tekutém prostředí umožnilo kvantitativní vyhodnocení degradačních schopností těchto kultur.

Bylo připraveno 10 lahví s MM po 50 ml a PVA (500 mg/l), a podle rozpisu přidáno PQQ.

- 1) B41
- 2) B42
- 3) B5
- 4) B5 + PQQ 20 µg/l
- 5) P1
- 6) P21 + PQQ 20 µg/l + aktivní katalasa 10 mg/l
- 7) P22 + PQQ 20 µg/l + aktivní katalasa 10 mg/l
- 8) P31 + PQQ 20 µg/l + aktivní katalasa 10 mg/l
- 9) B41 + B42 + B5
- 10) Bez zaočkování – kontrola

Lahve byly sterilizovány s režimem 115°C a 20 minut. Po zchladnutí byla do lahve číslo. 6,7,8 přidána aktivní katalasa, pro zajištění co nejlepších podmínek pro kultivaci. Lahve byly zaočkovány 20 µl suspenzí s připravenými kulturami dle rozpisu. Láhev 10 byla kontrolní.

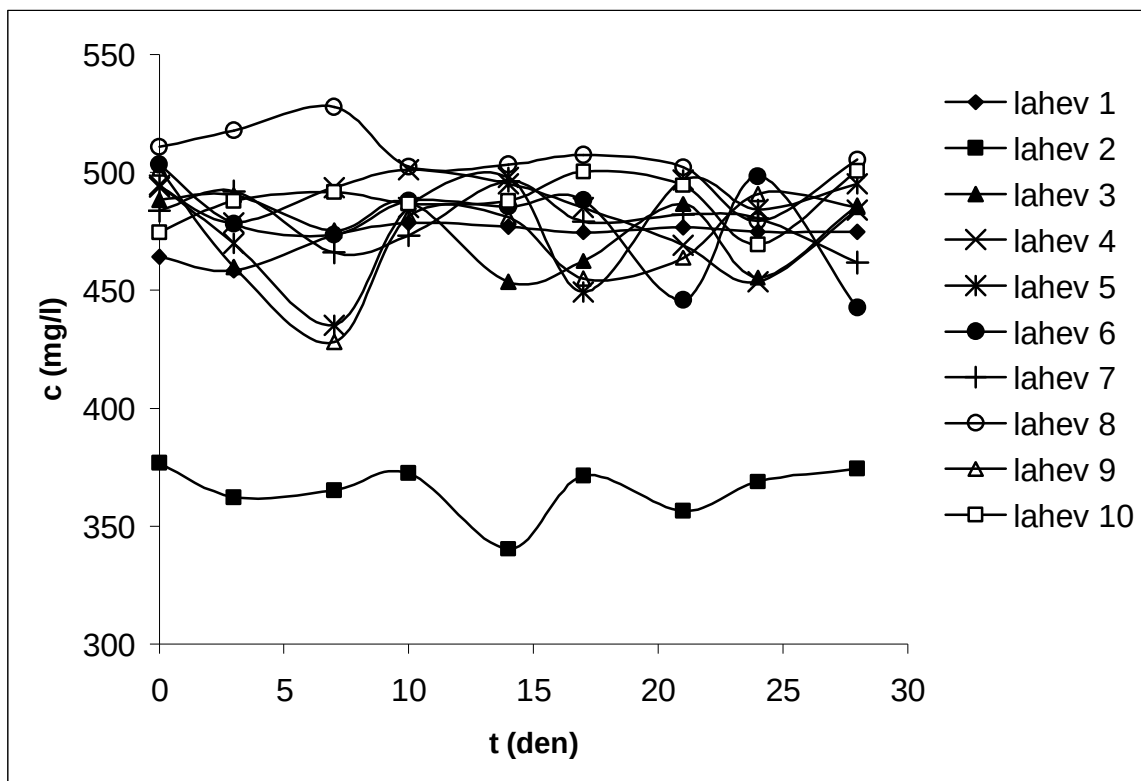
Lahve byly upevněny na třepačku s režimem 15 minut / 15 minut (pohyb / klid) v místnosti s 25 °C. Z lahví byly odebrány v daných intervalech vzorky, u nich byla stanovena koncentrace PVA a tyto hodnoty byly uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 17. Koncentrace PVA v průběhu testu (průměr a směrodatná odchylka)

Láhev č.	Koncentrace PVA (mg/l)				
	0. den	3. den	7. den	10. den	14. den
1	464,3 ± 32,6	458,5 ± 20,4	473,3 ± 24	478,6 ± 20,2	477,1 ± 11,3
2	376,9 ± 23,9	362,5 ± 20,2	365,3 ± 15,9	372,5 ± 32,7	340,4 ± 30,7
3	488,6 ± 24,5	490,6 ± 29,1	475,4 ± 27	487,7 ± 30,1	453,8 ± 25,2
4	493,9 ± 19,3	478,8 ± 36,8	493,7 ± 24,5	501,2 ± 32,8	495,4 ± 18,7
5	494,6 ± 28,4	470 ± 31	435,5 ± 23,5	485,3 ± 23	498,1 ± 29
6	503,5 ± 20,9	478,3 ± 40,5	473,7 ± 39,9	488 ± 23,7	485,6 ± 26,5
7	483,7 ± 28,4	492,2 ± 17,7	466,1 ± 34,8	473,4 ± 24,8	496,5 ± 26,2
8	510,9 ± 22,3	518 ± 43,4	527,8 ± 25,9	502,5 ± 28,5	503,5 ± 37,8
9	501,8 ± 21,1	395,3 ± 23,6	428,2 ± 30,9	481,5 ± 19,8	481 ± 8,5
10	474,7 ± 26	488 ± 16,1	491,6 ± 43,4	487 ± 18,9	488 ± 39,8

Tabulka 17. Koncentrace PVA v průběhu testu, pokračování a procenta degradace

Láhev č.	Koncentrace PVA (mg/l)				Odstranění PVA (%)
	17. den	21. den	24. den	28. den	
1	474,8 ± 15,5	476,7 ± 23,5	475 ± 21,9	475 ± 24,1	-2,3
2	371,5 ± 29,2	356,5 ± 10,3	369 ± 22,1	374,5 ± 16,6	0,6
3	462,5 ± 11,9	486,8 ± 22,1	455,5 ± 31,1	486,1 ± 30,6	0,5
4	485,2 ± 28,6	469,3 ± 19	453,7 ± 25,4	484,3 ± 25,2	1,9
5	449,5 ± 21	496,8 ± 29,7	484,5 ± 30,9	495,3 ± 21,2	-0,1
6	488,4 ± 38,6	446,1 ± 29,1	498,5 ± 39,8	442,9 ± 28,4	12
7	479,3 ± 11,9	482,2 ± 22,9	480,7 ± 26,6	461,9 ± 12,6	4,5
8	507,4 ± 18,9	502,3 ± 31,9	479,4 ± 20,6	505,4 ± 31,8	1,1
9	455 ± 19,2	463,9 ± 7,9	490,9 ± 21,7	485,4 ± 12,5	3,3
10	500,5 ± 37,3	494,7 ± 26,6	469,6 ± 14,7	500,8 ± 27,3	-



Obr.10. Závislost koncentrace PVA na čase

Z výsledků tohoto testu jsme usoudili, že tyto kultury PVA nedegradují. Na žádné z křivek grafu není viditelný výrazný pokles koncentrace PVA. Křivky se spíše s mírnými výkyvy drží hodnoty počáteční koncentrace.

Vzhledem k výsledkům růstových testů na agarových živných půdách a k závěrům tohoto experimentu je možné se domnívat, že kultury buď využívají zbytkové acetátové skupiny, přítomné v PVA, nebo využívají malý podíl nízkomolekulárního PVA, nezachytitelný použitou spektrofotometrickou metodou. Je však zřejmé, že vysokomolekulární polymerní řetězec neatakuje.

ZÁVĚR

Má diplomová práce měla za cíl ověřit a zhodnotit biodegradaci polyvinyl alkoholu kulturou OT3 v tekutém mediu. Průběh biodegradace PVA byl vyhodnocován sledováním úbytku PVA. Koncentrace PVA byla stanovena pomocí spektrofotometrické metody. Zaměřila jsem se na studování podstaty rozkladu PVA kulturou OT3 v symbiose s kulturou *Rhodococcus*. Byly provedeny testy, které zjistily vliv různých faktorů na proces degradace PVA v tekutém minerálním mediu.

A cílem bylo také pokusit se izolovat další čisté kultury ze vzorků kalů z ČOV Malenovice, Bohumil a Frýdlant nad Ostravicí, dále tyto izolované kultury testovat v tekutém minerálním mediu s PVA. Je třeba zdůraznit, že izolace PVA degradujících kmenů není jednoduchá, vzhledem k podmínkám, kdy je nutno dbát na sterilitu při práci, připravit ty nejlepší podmínky ke kultivaci, ale také z důvodu, že výskyt kultur degradujících PVA je velmi omezen.

V první části jsme se zaměřila na ověřování vlastností již dříve získané kultury OT3. Studovala jsem tedy vliv přísad kultury *Rhodococcus*, katalasy, heminu, methioninu, kvasničného autolyzátu, ke kultuře OT3, na degradaci PVA. Kultura OT3 sama rozkládá PVA jen velmi málo (18 - 30 %), v průběhu tří až šesti týdnů. Kultura *Rhodococcus* nerozkládá PVA sama téměř vůbec. Z výsledků vyplývá, že nejlépe PVA degraduje kultura OT3 v symbiotickém vztahu s kulturou *Rhodococcus*, kdy jejich degradace dosahovala vždy 80- 90 %. Provedla jsem také pokus, kdy jsem ke kultuře OT3 přidala kulturu *Rhodococcus* v podobě mrtvé biomasy, zde degradace také dosahovala kolem 80 %. Což naznačuje, že kultura *Rhodococcus* dodávala kultuře OT3 při degradaci nějakou látku nebo faktor, nikoliv enzym. Domníváme se, že kultura *Rhodococcus* dodává faktor obsažený v katalase, protože přidavek inaktivní katalasy vedl k obdobným výsledkům jako degradace s kulturou *Rhodococcus*. Při testování vlivu přísady inaktivní katalasy, bylo zjištěno, že kultura OT3 také velmi dobře degradovala PVA kolem 70 %, v porovnání s 18 % degradace samotnou kulturou OT3, ale nedosahovala výsledků s kulturou *Rhodococcus*. Až při testu, kdy jsme provedly opakovaný přísadek katalasy tak degradace proběhla z 90 %. Bylo studováno zda faktorem je methionin či hemin, látky které jsou obsažené v katalase. Kultura OT3 s přísadkem methioninu degradovala kolem 50 %, takže přísadek methioninu plně nenahradil přísadek katalasy. Přísadek heminu neprokázal na degradaci

PVA kulturou OT3 vliv. Experimentální práce ukázala na vysokou náročnost ve smyslu biologické čistoty, kontaminace může velmi výrazně ovlivnit výsledky.

Paralelně byla věnována pozornost izolaci čistých kultur, pokusili jsme se izolovat kultury z kalu z ČOV Malenovice, tento pokus byl neúspěšný. Dále jsme věnovali pozornost kalu z ČOV Bohumil, podařilo se nám izolovat tři kultury B41, B42, B5. Tyto kultury rostly na miskách s PVA, na miskách s minerálním agarem projevily jen nepatrný růst. Dále jsme izolovali čtyři kultury z kalu z ČOV Frýdlant nad Ostravicí. Tyto kultury P1, P21, P22, P31 projevily růst na všech agarech. Všechny izolované kultury byly testovány v tekutém minerálním mediu s PVA. Z výsledků lze říci, že tyto kultury PVA nedegradovaly, neboť koncentrace PVA v tomto testu zůstávala konstantní.

Tato druhá část práce ukazuje, že přítomnost bakterií skutečně degradujících PVA není všeobecná v životním prostředí. O to více musí být věnována pozornost bakteriím, které degradovat PVA dokáží.

POUŽITÁ LITERATURA:

1. Kováčič L., Bína J.: Plasty, Alfa Bratislava, 30-32, 1974
2. Marten F.L., Zvanut C.W. In: Finch CA, editor. Polyvinylalcohol development. Chichester: Wiley, 1992. chapters 2 and 3.
3. Sato T., Yamuchi J., Okaya T.: Process for producing polyvinyl ester and polyvinyl alcohol having a high degree of polymerization. Eur Patent Appl EP 250, 607, 1988. CA 108: 205283.
4. Doležal V.: Plastické hmoty. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1965
5. Tokiwa Y., Kawabata G., Jareret A.: A modified Metod for isolating poly(vinyl alcohol) –degrading bakteria and study of their degradation patterns. *Biotechnology Letters*, Vol. 23, p. 1937-1941, 2001
6. Lee J.A., Kim M.N.: Isolation of new and potent poly(vinyl alcohol)- degrading strains and their degradation aktivty. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 81, p. 303-308, 2003
7. Kozáková J.: Testy biorozkladu produktů zpracování bílkovinných odpadů. Diplomová práce, UTB Zlín, 2001.
8. Rozsypalová L.: Chování polyvinylalkoholu modifikovaného hydrolyzátem kolagenu v aerobním prostředí. Diplomová práce, UTB Zlín, 2001.
9. Kawagoshi Y., Mitihiro Y., Fujita M., Hashimoto S.: Production and recovery of an enzyme from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH that degrades polyvinyl alcohol. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 13, p. 63-67, 1997
10. Kawagoshi Y., Fujita M.: Purification and properties of polyvinyl alcohol oxidace with broad substrate range obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 13, p. 273-277, 1997
11. Shimao M., Taniguchi Y., Shitaka S., Kato N., Sakazawa C.: Production of Polyvinyl Alcohol Oxidase by a Symbiotic Mixed Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 44, No. 1, p. 28-32, 1982
12. Shimao M., Saimoto H., Kato N., Sakazawa C.: Properties and Roles of Bacterial Symbionts of Polyvinyl Alcohol-Utilizing Mixed Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 46, No. 3, p. 605-610, 1983

13. Shimao M., Ninomiya K., Kuno O., Kato N., Sakazawa C.: Existence of a Novel Enzyme, Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Polyvinyl Alcohol Dehydrogenase, in a Bacterial Symbiont, *Pseudomonas* sp. Strain VM15C. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 51, No. 2, p. 268-275, 1986
14. Kim B.C., Sohn C.K., Lim S.K., Lee J.W., Park W.: Degradation of polyvinyl alcohol by *Sphingomonas* sp. SA3 and its symbiote. *J Ind Microbiol Biotechnol*, Vol. 30, p. 70-74, 2003
15. Mori T., Sakimoto M., Kagi T., Sakai T.: Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades poly(vinyl alcohol). *Biosci Biotechnol Biochem*, Vol. 60, p. 330-332, 1996
16. Sakazawa C., Shimao M., Taniguchi Y., Kato N.: Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *Appl Environ Microbiol*, Vol. 41, p. 261-267, 1981
17. Kawai F.: *Sphingomonads* involved in the biodegradation of xenobiotic polymers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol. 23, p. 400-407, 1999
18. Hatanaka T., Asahi N., Tsuji M.: Purification and characterization of poly(vinyl alcohol) dehydrogenase from *Pseudomonas* sp 113P3. *Biosci Biotech Biochem*, Vol. 59, p. 1813-1816, 1995
19. Matsumura S., Shimura Y., Terayama K., Kiyohara T.: Effects of molecular weight and stereoregularity on biodegradation of poly(vinyl alcohol) by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol Lett*, Vol. 16, p. 1205-1210, 1994
20. Riedl J.: Biodegradace polyvinylalkoholu. Diplomová práce, UTB Zlín, 2004
21. Koutný M., Růžička J., Riedl J.: Isolation of polyvinyl alcohol degrading strains from municipal sewage plant and new features of symbiotic biodegradation of polyvinyl alcohol. 23. kongres Československé společnosti mikrobiologické, Brno, září 2004
22. Koutný M.: Osobní sdělení

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK:

PVA	– polyvinyl alkohol
PVA-DH	- polyvinyl alkohol dehydrogenasa
H ₂ O ₂	– peroxid vodíku
KA	– kvasničný autolyzát
MM	– minerální medium
PEG	– polyethylenglykol
PQQ	– pyrrolochinolin chinon
PVAc	– polyvinyl acetát
VAc	- vinyl acetát
TOC	– celkový organický uhlík
UV-VIS	– ultrafialová-viditelná oblast
LB	- univerzální agar
SA	- označení bakterie rodu <i>Sphingomonas</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ :

Obr. 1. Vzorec PVA.....	8
Obr. 2. Schéma postupu adaptace a izolace kultur.....	29
Obr. 3. Kalibrační přímka PVA.....	30
Obr.4. Závislost koncentrace PVA na čase.....	42
Obr.5. Závislost koncentrace PVA na čase.....	45
Obr.6. Závislost koncentrace PVA na čase- kontaminované vzorky.....	45
Obr.7. Závislost koncentrace PVA na čase.....	48
Obr.8. Závislost koncentrace PVA na čase- kontaminované vzorky.....	49
Obr.9. Závislost koncentrace PVA na čase.....	52
Obr.10. Závislost koncentrace PVA na čase.....	57

SEZNAM TABULEK :

Tabulka 1. Koncentrace PVA a naměřená absorpance.....	30
Tabulka 2. Stav v jamkách po 4 dnech kultivace, kultura OT1.....	35
Tabulka 3. Stav v jamkách po 7 dnech kultivace, kultura OT1.....	35
Tabulka 4. Stav v jamkách po 16 dnech kultivace, kultura OT1.....	35
Tabulka 5. Stav v jamkách po 4 dnech kultivace, kultura OT2.....	36
Tabulka 6. Stav v jamkách po 7 dnech kultivace, kultura OT2.....	36
Tabulka 7. Stav v jamkách po 16 dnech kultivace, kultura OT2.....	36
Tabulka 8. Stav v jamkách po 4 dnech kultivace, kultura OT3.....	37
Tabulka 9. Stav v jamkách po 7 dnech kultivace, kultura OT3.....	37
Tabulka 10. Stav v jamkách po 11 dnech kultivace, kultura OT3.....	37
Tabulka 11. Stav v jamkách po 18 dnech kultivace, kultura OT3.....	37
Tabulka 12. Koncentrace PVA v tekutém mediu, kapitola 4.2.1.....	38
Tabulka 13. Koncentrace PVA v průběhu testu, kapitola 4.2.2.....	41
Tabulka 14. Koncentrace PVA v průběhu testu, kapitola 4.2.3.....	44
Tabulka 15. Koncentrace PVA v průběhu testu, kapitola 4.2.4.....	47
Tabulka 16. Koncentrace PVA v průběhu testu, kapitola 4.2.5.....	51
Tabulka 17. Koncentrace PVA v průběhu testu, kapitola 4.3.4.....	56

SEZNAM PŘÍLOH :

Příloha I. Stanovení koncentrace PVA na mikrotitrační destičce.

Příloha II. Růst kmene OT3 na misce s PVA agarem, PQQ a katalasou.

Příloha III. Růst kmene B5 na misce s PVA agarem, PQQ a katalasou.

SOUHRN:

Ověřování degradace PVA kulturou OT3 za přídavku některých faktorů a zjištění podstaty symbiotického vztahu této kultury s kulturou *Rhodococcus globerulus* bylo prvním cílem mé práce. Biodegradace PVA probíhala v tekutém mediu. Koncentrace PVA byla stanovena pomocí spektrofotometrické metody. Mezi faktory, které byly použity, patří především inaktivní katalasa, methionin, hemin. Z výsledků vyplývá, že nejlépe PVA degraduje kultura OT3 v symbiotickém vztahu s kulturou *Rhodococcus*. Byl proveden také pokus, kdy byla ke kultuře OT3 přidána kultura *Rhodococcus* v podobě mrtvé biomasy, zde degradace také dosahovala vysoké hodnoty, což naznačuje, že kultura *Rhodococcus* dodává kultuře OT3 při degradaci nějakou látku nebo faktor, nikoliv enzym. Zvláště opakované přídavky inaktivní katalasy ke kultuře OT3 vedly k obdobným výsledkům jako degradace s kulturou *Rhodococcus*. Kultura OT3 s přídavkem methioninu degradovala zhruba na polovinu, takže plně nenahradila přídavek katalasy. Přídavek heminu degradaci PVA neovlivnil.

Druhým cílem mé práce byla izolace čistých kultur z čistírenských kalů. Podařilo se nám izolovat tyto kultury B41, B42, B5, P1, P21, P22, P31, které byly následně testovány v tekutém minerálním mediu s PVA. Z výsledků lze říci, že tyto kultury PVA nedegradují, v průběhu testu nedošlo k žádnému výraznějšímu poklesu koncentrace PVA.

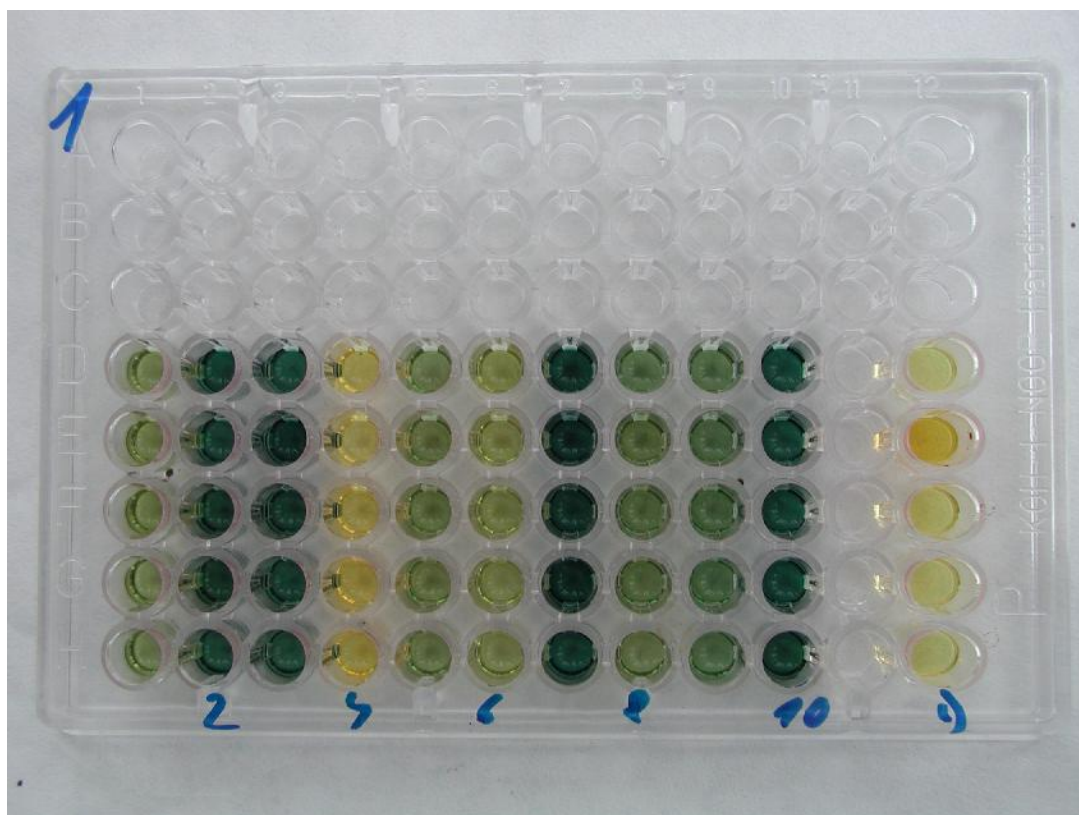
SUMMARY:

Studying of the PVA degradation by culture OT3 with the addition of some factors and finding of the principle of the its symbiosis with *Rhodococcus globerulus* were the main aims of the work. Biodegradation tests were performed in the liquid media and PVA concentrations were measured by spectrophotometric method. Inactive catalase, methionin and hemin were the main factors used in the work. Results showed that the OT3 culture degraded PVA at the highest level during symbiosis with *Rhodococcus globerulus*. Another tests showed that *Rhodococcus globerulus* functioned in the form of dead biomass too, suggesting that *Rhodococcus globerulus* supplied some agent or factor, not enzyme, for OT3 culture. Repeating additions of the inactive catalase to the OT3 culture resulted in the similar level of PVA degradation as in the symbiosis with *Rhodococcus globerulus*. Addition of methionin to OT3 led to the higher level of PVA degradation than in test with OT3 alone, but to the lower PVA degradation than in OT3 symbiosis with *Rhodococcus globerulus*. Addition of hemin had no effect on PVA degradation by OT3.

The isolation of pure bacterial cultures from activated sludges was the second aim of the work. The cultures B41, B42, B5, P1, P21, P22 and P31 were isolated and they were consequently tested in the liquid media. Results showed that no culture was able of PVA degradation because of PVA concentrations remained constant during all the tests.

PŘÍLOHY

Příloha I. Stanovení koncentrace PVA na mikrotitrační destičce.



Příloha II. Růst kmene OT3 na misce s PVA agarem, PQQ a katalasou.



Příloha III. Růst kmene B5 na misce s PVA agarem, PQQ a katalasou.



EVIDENČNÍ LIST MAGISTERSKÉ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Místo uložení práce: Ústřední knihovna UTB ve Zlíně	
Autor práce: VLČKOVÁ Alexandra	
Název práce česky: Studium bakterií rozkládajících polyvinyl-alkohol anglicky: Study of the bacterial cultures degrading polyvinylalcohol	
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: 2005	
Počet stran, obrázků, tabulek: 70, 10, 17	
Předmětová hesla: česky: polyvinyl-alkohol, biodegradace, bakterie, izolace anglicky: polyvinyl alcohol, biodegradation, bacteria, isolation	
Souhrn česky: Ověřování degradace PVA kulturou OT3 za přídavku některých faktorů a zjištění podstaty symbiotického vztahu této kultury s kulturou <i>Rhodococcus globerulus</i> bylo prvním cílem mé práce. Biodegradace PVA probíhala v tekutém mediu. Koncentrace PVA byla stanovena pomocí spektrofotometrické metody. Mezi faktory, které byly použity patří především inaktivní katalasa, methionin, hemin. Z výsledků vyplývá, že nejlépe PVA degraduje kultura OT3 v symbiotickém vztahu s kulturou <i>Rhodococcus</i>. Druhým cílem mé práce byla izolace čistých kultur z čistírenských kalů, tyto kultury byly následně testovány v tekutém minerálním mediu s PVA. Z výsledků lze říci, že tyto kultury PVA nedegradují, v průběhu testu byla koncentrace PVA konstantní. anglicky: Studying of the PVA degradation by culture OT3 with the addition of some factors and finding of the principle of the its symbiosis with <i>Rhodococcus globerulus</i> were the main aims of the work. Biodegradation tests were performed in the liquid media and PVA concentrations were measured by spectrophotometric method. Inactive catalase, methionin and hemin were the main factors used in the work. Results showed that the OT3 culture degraded PVA at the highest level during symbiosis with <i>Rhodococcus globerulus</i>. The isolation of pure bacterial cultures from activated sludges was the second aim of the work. The cultures were consequently tested in the liquid media. Results showed that no culture was able of PVA degradation because of PVA concentrations remained constant during all the tests.	

