



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Disertační práce

**Studium biotické a abiotické degradace polyesterů
s využitím molekulárně biologických metod**

**Study of biotic and abiotic degradation of polyesters using
molecular biology methods**

Autor: **Ing. Jana Šerá**

Studijní program: Chemie a technologie materiálů (P2808)

Studijní obor: Technologie makromolekulárních látek (2808V006)

Školitel: prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Zlín, 2018

© Jana Šerá

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.
Publikace byla vydána v roce 2018.

Klíčová slova: polyester, biodegradace, abiotická degradace, půda, molekulárně biologické metody, denaturační gradientová gelové elektroforéza, BTEX, ropné uhlovodíky

Key words: polyester, biodegradation, abiotic degradation, soil, molecular biology methods, denaturing gradient gel electrophoresis, BTEX, petroleum hydrocarbons

Práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

Motto:

„Science is part of the reality of living; it is the what, the how, and the why of everything in our experience.“

[Rachel Carson]

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, prof. Mgr. Markovi Koutnému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, ochotu a čas, který mi věnoval během celého doktorského studia. Dále děkuji také laborantkám, Ing. Olze Vlčkové, Lence Machálkové a především Bc. Veronice Kučabové za pomoc v laboratořích mikrobiologie a molekulární biologie. Poděkování patří také mým kolegům z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně za vytvoření pozitivního pracovního prostředí plného podpory a motivace. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině a všem blízkým za trpělivost a důvěru, kterou do mě po celou dobu studia vkládali.

ABSTRAKT

V rámci překládané disertační práce byla sledována biodegradace alifatického aromatického kopolyesteru a tohoto kopolyesteru ve směsi se škrobem v půdě za mezofilních podmínek. Měřením produkce CO₂ (GC/TCD), sledováním mechanických vlastností obou materiálů, měřením změn molekulových hmotností (GPC) i optickou a rastrovací elektronovou mikroskopií bylo dokázáno, že přítomnost škrobu podporuje biodegradaci PBAT. Pro získání celkového obrazu degradačních procesů studovaného kopolyesteru byl také sledován vliv teploty na rychlost abiotické hydrolýzy vybraných polyesterů (PBS, PBSA a PBAT). Výsledky ukázaly, že se zvyšující se teplotou rostla míra degradace materiálů. Pomocí molekulárně biologických metod (PCR-DGGE, sekvenování) byla identifikována degradační konsorcia PBAT izolovaná z půd. Nejčastěji byla v půdách zastoupena bakterie *Microbispora bispora*. Molekulárně biologické metody byly využity také při posouzení vlivu aplikace nutrientů a terminálních akceptorů elektronů na mikrobiální společenstva v anoxickém prostředí (lokality kontaminovány BTEX a leteckým petrolejem). Aplikace nutrientů a akceptorů terminálních elektronů podpořila růst několika bakteriálních druhů, které jsou potenciálními degradéry BTEX. Aplikace terminálních akceptorů elektronů také pozitivně ovlivnila růst některých degradérů ropných uhlovodíků, které jsou jednou ze složek leteckého petroleje.

ABSTRACT

The biodegradation of the aliphatic aromatic copolyester and this copolyester in the mixture with starch in the soil under mesophilic conditions was studied. Measurement of CO₂ production (GC/TCD), mechanical properties changes, molecular weight changes (GPC) and optical and scanning electron microscopy demonstrated that the presence of starch promotes biodegradation of PBAT. To obtain the overall image of the degradation processes of the studied copolyester, the effect of temperature on the rate of abiotic hydrolysis of selected polyesters (PBS, PBSA and PBAT) was also monitored. The results showed that the rate of degradation of materials increased with increasing temperature. Members of degrading PBAT consortium isolated from soils were identified by molecular biology methods (PCR-DGGE, sequencing). *Microbispora bispora* was the most frequently present bacterium in soils. Molecular biology methods were also used to assess the effect of application of nutrients and terminal electron acceptors on microbial communities in an anoxic environment (sites contaminated by BTEX and aviation fuel). The application nutrients and terminal electron acceptors has supported the growth of some bacterial species that are potential degradators of BTEX. Application of terminal electron acceptors has also positive influence on the growth of some degradators of hydrocarbon petroleum, which is one of the components of aviation fuel.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	4
OBSAH	5
ÚVOD	8
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
1.1 Biodegradabilní polymery.....	9
1.1.1 Biodegradabilní polyestery	10
1.1.2 Polybutylen adipát tereftalát	11
1.2 Abiotická degradace polymerů.....	11
1.2.1 Mechanická degradace.....	12
1.2.2 Fotodegradace	12
1.2.3 Termální degradace	12
1.2.4 Hydrolýza.....	13
1.3 Biodegradace polymerů	14
1.3.1 Princip biodegradace polymerů.....	14
1.3.2 Mikroorganismy degradující PBAT.....	16
1.3.3 Biodegradace polyesterů v půdě	18
1.3.4 Aditiva a jejich vliv na biodegradaci polymerů.....	20
1.4 Denaturační gradientová gelová elektroforéza	21
1.4.1 Úvod do metodiky DGGE	21
1.4.2 Polymerázová řetězová reakce.....	21
1.4.3 Výhody a nevýhody DGGE	23
1.4.4 Využití DGGE při identifikaci degradérů biodegradabilních polymerů	23
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	25
3. MATERIÁL A METODIKA	26
3.1 Laboratorní přístroje a pomůcky	26
3.2 Příprava roztoků, suspenze PBAT a živných médií.....	27
3.2.1 Suspendační roztok.....	27
3.2.2 Roztok stopových prvků	27
3.2.3 Minerální médium (MM).....	27
3.2.4 Suspenze PBAT.....	28
3.2.5 Tuhá živná média pro stanovení počtu mikroorganismů v půdách .	29
3.2.6 Tuhá živná média pro izolaci degradérů kopolyesteru	30
3.2.7 Roztoky antibiotik	31
3.2.8 Tween pro výluhy z půd	31
3.2.9 Psoralen.....	31

3.2.10	50× koncentrovaný TAE pufr.....	32
3.3	Biodegradace PBAT v půdě	32
3.3.1	Stanovení základních fyzikálně-chemických a mikrobiologických parametrů půd	32
3.3.2	Příprava biodegradačních testů.....	33
3.3.3	Stanovení mineralizace materiálu pomocí plynové chromatografie	33
3.3.4	Zpracování dat naměřených pomocí GC	34
3.3.5	Příprava bioreaktorů.....	35
3.3.6	Tahové zkoušky	36
3.3.7	Mikroskopické metody	36
3.3.8	Gelová permeační chromatografie.....	37
3.3.9	Kalorimetrie	37
3.4	Hydrolýza vybraných polyesterů ve vodném prostředí	38
3.4.1	Příprava degradačních testů	38
3.4.2	Stanovení rozpuštěného organického uhlíku	38
3.4.3	Zpracování dat naměřených pomocí analyzátoru TOC	39
3.4.4	Stanovení úbytku hmotnosti	39
3.5	Identifikace degradérů PBAT v půdách pomocí molekulárně biologických metod	39
3.5.1	Odběr vzorků půd	39
3.5.2	Charakteristika půd	39
3.5.3	Pre-inkubace degradérů PBAT.....	39
3.5.4	Získání kultur degradérů PBAT	40
3.5.5	Izolace DNA z kultur degradérů PBAT.....	40
3.5.6	Polymerázová řetězová reakce I.....	41
3.5.7	Denaturační gradientová gelová elektroforéza I	44
3.5.8	Následná polymerázová řetězová reakce a purifikace I	44
3.5.9	Sekvenace a vyhodnocení výsledků I	45
3.6	Molekulárně biologická analýza bakteriálních konsorcií na lokalitách kontaminovaných BTEX a leteckým petrolejem	46
3.6.1	Aplikace nutrientů a terminálních akceptorů elektronů	46
3.6.2	Odběr vzorků z vrtů a jejich značení	46
3.6.3	Izolace DNA ze vzorků z lokalit kontaminovaných BTEX a leteckým petrolejem	48
3.6.4	Polymerázová řetězová reakce II.....	48
3.6.5	Denaturační gradientová gelová elektroforéza II	48
3.6.6	Následná polymerázová řetězová reakce a purifikace II.....	48
3.6.7	Sekvenace a vyhodnocení výsledků II.....	48
4.	VÝSLEDKY	49
4.1	Biodegradace alifatického aromatického kopolyesteru	49

4.1.1	Základní fyzikálně-chemické a mikrobiologické parametry půd	49
4.1.2	Biodegradace PBAT	51
4.1.3	Změny mechanických vlastností během biodegradace	52
4.1.4	Změny na povrchu materiálu během biodegradace	56
4.1.5	Změny molekulové hmotnosti a její distribuce během biodegradace 62	
4.1.6	Krystalinita kopolyesteru a kopolyesteru ve směsi se škrobem	63
4.2	Hydrolytická degradace vybraných polyesterů ve vodném prostředí a úbytek hmotnosti	64
4.3	Analýza degradérů kopolyesteru v půdách pomocí molekulárně biologických metod.....	68
4.3.1	Základní charakteristiky půd, kultivace degradérů kopolyesteru a počty CFU	69
4.3.2	Optimalizace metodiky izolace DNA a PCR.....	71
4.3.3	Optimalizace denaturační gradientové gelové elektroforézy	77
4.3.4	Výsledky denaturační gradientové elektroforézy a identifikované mikroorganismy	78
4.3.5	Fylogenetická analýza	81
4.4	Využití molekulárně biologických metod při biodegradaci BTEX a ropných uhlovodíků <i>in situ</i>	83
4.4.1	Optimalizace polymerázové řetězové reakce pro vzorky s vysokou bakteriální diverzitou	83
4.4.2	Výsledky denaturační gradientové elektroforézy a bakterie identifikované ve vzorcích z lokality kontaminované BTEX	86
4.4.3	Výsledky denaturační gradientové elektroforézy a bakterie identifikované ve vzorcích z lokality kontaminované leteckým petrolejem	87
5.	ZÁVĚR.....	90
6.	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI	92
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	93
8.	SEZNAM TABULEK A GRAFŮ.....	112
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	115
10.	SEZNAM PŘÍLOH	116
11.	ODBORNÝ ŽIVOTOPIS	117
12.	PUBLIKAČNÍ AKTIVITY	119
13.	PŘÍLOHY	121

ÚVOD

Polymerní materiály, často nazývané plasty, jsou používány v každodenním životě. Syntetické polymery jsou odolné vůči degradaci, což umožňuje jejich využití po dlouhou dobu. Jejich perzistence v prostředí může být ale v některých případech nežádoucí. Snaha o zamezení akumulace konvenčních plastů v životním prostředí vede k stále vyšší produkci biodegradabilních polymerů (Emadian *a kol.*, 2017; Ahmed *a kol.*, 2018). Tyto materiály jsou používány zejména na výrobu obalů, balení potravin a jednorázových zdravotnických prostředků, dále také v terapeutických, chirurgických a sterilních výrobcích. Jejich využití narůstá také v zemědělství, např. mulčovací fólie (Kijchavengkul *a kol.*, 2008). Biologicky rozložitelné plasty by měly být aplikovány také tam, kde dochází k jejich bezprostřední difúzi do životního prostředí nebo pokud je náročné roztřídit a recyklovat jednotlivé části odpadu.

K úspěšnému používání biologicky rozložitelných plastů je potřebné zhodnotit a porozumět degradačním mechanismům a mikroorganismům, které jsou spojeny biodegradací. Z ekonomického pohledu jsou také velmi důležité mechanické, fyzikální a chemické vlastnosti biodegradabilních polymerů, které musí být podobné konvenčním plastům. Důležitá je i nízká cena materiálů a výroby (Emadian *a kol.*, 2017). Vzhledem ke vzrůstající poptávce po biodegradabilních plastech, a jejich významu v ochraně životního prostředí, je tedy velmi důležité tyto polymery studovat, stejně tak jako mechanismus jejich degradace za různých podmínek a v různých prostředích. Tak mohou být produkovány plasty, které vyhovují výše zmíněným standardům a potenciálně nahradí konvenční plasty.

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 Biodegradabilní polymery

Plně biodegradabilní polymer je dle Americké společnosti pro zkoušení a materiály (ASTM) definován jako polymer, který je kompletně konvertován mikroorganismy na oxid uhličitý, vodu, minerální látky a biomasu (při anaerobní biodegradaci je konvertován na oxid uhličitý a metan) bez zanechání jakýchkoliv potenciálně škodlivých látek. Podle definice Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) jsou odbouratelnými plasty takové, u kterých dochází k degradaci fragmentů s nízkou molekulovou hmotností, které vznikají působením přirozeně se vyskytujících mikroorganismů, jako jsou bakterie, houby a řasy. V praxi se mezi biodegradabilní polymery řadí ty, které jsou biodegradovány během určeného časového úseku, samotné polymery a produkty jejich degradace nevykazují ekotoxicitu a nemají negativní vliv na životní prostředí (Kyrikou a Briassoulis, 2007). Většinu z biologicky odbouratelných polymerů lze také označit jako kompostovatelné. Aby však byly skutečně kompostovatelné, musí splňovat další kritéria, jako je kompatibilita s procesem kompostování, rychlost degradace v souladu s jinými známými kompostovacími materiály, žádný negativní dopad na kvalitu kompostu a zanechání pozorovatelných nebo toxických zbytků. Kompostovatelné materiály by měly být během průmyslového kompostování degradovány během 12 týdnů při teplotě nad 50 °C (Song *a kol.*, 2009).

Z hlediska výroby lze biodegradabilní polymery rozdělit buď na polymery, které jsou primárně založeny na obnovitelných zdrojích, nebo na syntetické polymery, které jsou vyrobeny z fosilních zdrojů (Witt *a kol.*, 2001).

Mezi biologicky rozložitelné polymery vyrobené z obnovitelných zdrojů patří:

- kyselina polymléčná (PLA);
- polyhydroxyalkanoát (PHA);
- poly (β -hydroxybutyrát) (PHB) a polyhydroxyvalerát (PHV);
- termoplastický škrob (TPS).

Biologicky rozložitelné polymery vyrobené z ropy zahrnují:

- poly-e-kaprolakton (PCL);
- poly (vinylnalkohol) (PVA);
- Poly (esteramidy) (PEA);
- alifatické polyestery na bázi diolů a dikarboxylových kyselin;
- aromaticko-alifatické kopolyestery.

Biologicky rozložitelné polymery lze vyrábět třemi hlavními způsoby. Nejrozšířenější metodou je konvenční syntéza s použitím monomerů

z neobnovitelných zdrojů (PCL, kopolyestery) a monomerů pocházejících z obnovitelných zdrojů (PLA). Druhou možností je biotechnologická cesta, kdy mohou být polymery produkovány buď mikrobiální fermentací (PHB, xanthan atd.) nebo z geneticky modifikované kukuřice (PHA). Mohou být také přímo izolovány z biomasy (například škrobu), která může být následně modifikována pomocí plastifikačního činidla (TPS). Různé biologicky rozložitelné polymery jsou často míchány dohromady nebo s konvenčními plasty a jinými kompozity, aby bylo dosaženo optimálních vlastností materiálu nebo aby se zvýšila biologická rozložitelnost (Graulus *a kol.*, 2016).

Biodegradabilní polymery mají potenciál nahradit konvenční plasty v mnoha aplikacích, které jsou shrnuty v Tabulce 1.1 (Chandra a Rustgi, 1998; Shah *a kol.*, 2008). Tyto materiály jsou vyráběny a distribuovány pod různými komerčními názvy.

Tabulka 1.1: Aplikace významných biodegradabilních polymerů (Chandra a Rustgi, 1998; Shah *a kol.*, 2008).

Kyselina polyglykolová (PGA)	Vstřebatelné nitě, kontrolovatelné uvolňování léčiv, implantáty.
Kyselina polymléčná	Mulčovací fólie, kompostovatelné pytle, systém postupného uvolňování pesticidů a hnojiv.
Polykaprolakton	Mulčovací a jiné zemědělské fólie, nádoby pro sazenice, pro výrobu systému pomalu se uvolňujících léčiv.
Polyhydroxybutyrát	Lahve, sáčky, obalový materiál, pleny na jedno použití, nosič pro kontrolované uvolňování léčiv.
Polyhydroxyvalerát	Biochemické aplikace, systém pro kontrolované uvolňování léčiv a insekticidů.
Polyvinylalkohol	Vláčna, zahušťovač a stabilizátor suspenzí, chirurgické nitě, výroba barev a lepidel, apretace papíru a textilu.
Polybutylen adipát tereftalát	Kompostovatelné pytle, fólie pro zemědělské účely, pro průmysl rychlého občerstvení.

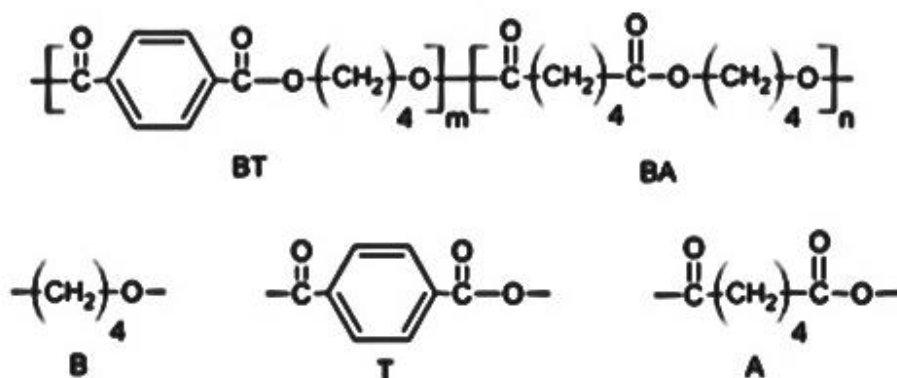
1.1.1 Biodegradabilní polyestery

Biodegradabilním plastům, které jsou šetrné k životnímu prostředí, je v posledních letech věnována velká pozornost. Jsou ekologickou alternativou ke konvenčním plastům, které již mohou v mnoha aplikacích nahradit. Mohou být například použity jako obalové materiály pro potraviny, jako mulčovací fólie v zemědělství nebo jako lékařský materiál (Song *a kol.*, 2009; Tokiwa *a kol.*, 2009; Fukushima *a kol.*, 2012; Peelman *a kol.*, 2013; Lubkowski *a kol.*, 2015).

Jednou ze skupin biodegradabilních polymerů jsou polyestery, ty se dělí na amorfní alifatické plasty (např. PLA), a semikrystalické polyestery, které obsahují také rigidní aromatickou část (např. PBAT). Mnoho semikrystalických polyesterů je svými vlastnostmi podobné konvenčním plastům jako polyethylen, polypropylen či polystyren, což je dělá komerčně zajímavými. V této práci je největší pozornost věnována polybutylen adipát tereftalátu.

1.1.2 Polybutylen adipát tereftalát

Polybutylen adipát tereftalát je semikrystalický syntetický kopolyester, který je získáván z fosilních zdrojů polykondenzací 1,4-butanediolu a kyseliny tereftalové a adipové (Witt *a kol.*, 1997; Witt *a kol.*, 2001; Siegenthaler *a kol.*, 2012). Jedná se o polymer s neuspořádanou strukturou se stupněm neuspořádanosti 0,97-1,02; vysokou flexibilitou a tuhostí. Bod tání PBAT je 104 °C a teplota skelného přechodu -30 °C. Svými vlastnostmi je PBAT podobný nízkohustotnímu polyethylenu (LDPE) (Herrera *a kol.*, 2002; Siegenthaler *a kol.*, 2012). Je klasifikován jako biodegradabilní, produkty degradace nevykazují toxicitu a nemají negativní efekt na životní prostředí (Muller *a kol.*, 2001; Witt *a kol.*, 2001). Je také certifikován jako kompostovatelný (EN 13432, ASTM 6400). Polybutylen adipát tereftalát je komerčně dostupný od více výrobců, např. jako Ecoflex (BASF, Německo). Často je také vyráběn ve směsi s jinými polymery, např. Ecovio (BASF, Německo), kde je smíchán s kyselinou polymléčnou nebo ve směsi se škrobem Mater-bi (Novamont, Itálie). Jeho struktura je patrná z Obrázku 1.1 (Kijchavengkul *a kol.*, 2010a).



Obrázek 1.1: Struktura PBAT a jeho monomerů 1,4 butanediolu (B), k. tereftalové (T) a k. adipové (A) (Kijchavengkul *a kol.*, 2010a).

1.2 Abiotická degradace polymerů

Abiotické faktory způsobující degradaci materiálu jsou velmi důležité zejména v první fázi degradace. Mohou přispívat k biodegradaci nebo mohou přímo zahájit štěpení polymerního řetězce. Abiotická degradace je dělena na mechanickou, foto, tepelnou a chemickou degradaci.

1.2.1 Mechanická degradace

Degradace polymerů mechanickým působením může být způsobena mnoha běžnými environmentálními faktory, jako například turbulence vzduchu a vody, tlak sněhu na polymer či působením půdních makroorganismů (žížaly). Mechanické faktory nejsou při degradaci dominantní, spíše přispívají k ostatním abiotickým faktorům (Lucas *a kol.*, 2008).

1.2.2 Fotodegradace

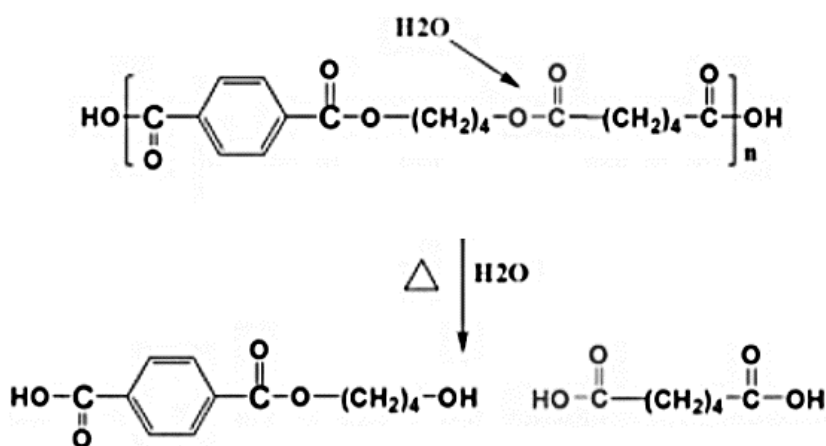
Expozice ultrafialovému záření (UV) způsobuje degradaci mnoha materiálů. Fotosenzitivní karbonylové skupiny, které jsou přítomné v biodegradabilních polyesterech, způsobují jejich citlivost k fotodegradaci. Biodegradabilní mulčovací fólie jsou umísťovány ve venkovním prostředí, kde dochází k formování volných radikálů v průběhu auto-oxidace, kterou následuje také sekundární fotooxidace (Kyrikou a Briassoulis, 2007). Fotodegradace může způsobit náhodné štěpení hlavních polymerních řetězců, což vede ke ztrátě mechanických vlastností polyesteru. Dalším mechanismem fotodegradace je síťování uvnitř polymeru, které je způsobené rekombinací volných radikálů. Síťování způsobuje ztrátu tažnosti polymeru a film se stane velmi křehkým (Rivaton a Gardette, 1998; Kijchavengkul *a kol.*, 2008). Fotodegradace ovlivňuje také abiotickou hydrolýzu a biodegradaci polyesterů. Snížení molekulové hmotnosti v důsledku štěpení hlavních polymerních řetězců vede ke zpřístupnění řetězce molekulám vody i mikroorganismům. Síťování může ale biodegradaci negativně ovlivnit tím, že snižuje mobilitu řetězců a vzniká nerozpustná gelovitá struktura (Hamid, 1992; Kijchavengkul *a kol.*, 2008; Kijchavengkul, *a kol.*, 2010a). V případě PBAT dochází vlivem UV především k síťování a tvorbě gelu. V práci Kijchavengkula *a kol.*, (2010a) vzrostl podíl gelové frakce mezi 2. a 4. týdnem inkubace PBAT filmu vlivem UV z 5,7 % na 22,3 % a filmy se staly křehčími. Zároveň ale docházelo ke štěpení řetězců, což způsobilo snížení pevnosti v tahu a změnu dalších mechanických vlastností. Ve studii Stloukala *a kol.*, (2012) bylo také zaznamenáno síťování a vnik gelovité frakce ve struktuře PBAT, ale tento fakt biodegradaci významně neovlivnil. Fotodegradace vedla k rozpadu materiálu na menší části s větším specifickým povrchem, což mělo naopak na biodegradaci pozitivní vliv.

1.2.3 Termální degradace

Vysoká teplota urychluje degradaci polymerů, obecně vede ke zrychlení reakcí. V přírodě není dosaženo teplot, které by samotné způsobily degradaci polymerů. Avšak například při kompostování je vyšší teplota důležitým faktorem degradace (Fukushima *a kol.*, 2011; Grivalský *a kol.*, 2018). Mechanismus a produkty oxidační reakce probíhající při tepelné degradaci jsou srovnatelné s mechanismy a produkty fotodegradace (Ammala *a kol.*, 2011). Hlavní rozdíl spočívá v iniciaci degradace teplem či světlem (R. Tyler, 2007).

1.2.4 Hydrolýza

Biodegradaci plastů často předchází chemická degradace. Velmi důležitým procesem je abiotická hydrolýza, která může určovat rychlost degradace polymerů (Husarova *a kol.*, 2014; Dvorackova *a kol.*, 2015). Abiotická hydrolýza může být prvním degradačním krokem, který otevírá kostru polymeru a zpřístupňuje specifická místa po navázání enzymů (Kijchavengkul *a kol.*, 2010a). Hydrolýza uvolňuje polymerní řetězce štěpením hydrolytických vazeb (obsahují je např. glykosidy, estery, orthoestery, anhydridy, amidy, uretany, uhličitany) v kostrě polymeru pomocí náhodného štěpení řetězců (Gopferich, 1996; Foulc *a kol.*, 2005; Kijchavengkul *a kol.*, 2010; Muthuraj *a kol.*, 2015). V případě PBAT je hydrolyticky štěpena esterová vazba, což zkracuje polymerní řetězce na velikost, která může být jednodušeji degradována mikroorganismy (Kijchavengkul *a kol.*, 2010). Hydrolytická degradace PBAT je znázorněna na Obrázku 1.2 (Muthuraj *a kol.*, 2015).



Obrázek 1.2: Hydrolytické štěpení esterové vazby v molekule PBAT (Muthuraj *a kol.*, 2015).

Hydrolýza polyesterů probíhá v kyselém, bazickém i neutrálním prostředí. Z výsledků studie zabývající se hydrolýzou PLA a PCL ve fosfátovém pufru je patrné, že vybrané polyestery jsou rychleji hydrolyzovány při pH 13 než při pH 1, což je dáno možností nukleofilního ataku hydrolyzovaných karbonylových skupin (Jung *a kol.*, 2006). Při srovnání účinku extrémního pH a extrémní teploty na hydrolytickou degradaci PBAT bylo pozorováno, že hydrolýza je výrazně více ovlivněna teplotou než pH. pH 2,3 mělo spíše mírný efekt na urychlení hydrolýzy, zatímco teplota 70 °C rychlost významně ovlivnila (Herrera *a kol.*, 2002). Vysoká teplota urychluje hydrolýzu polymerů, je nejvýznamnějším faktorem prostředí, ve kterém dochází k hydrolytické degradaci, což je patrné z mnoha studií (Kale *a kol.*, 2007; Fukushima *a kol.*, 2011; Ndazi a Karlsson, 2011; Saadi *a kol.*, 2013; Deroine *a kol.*, 2014). Teplota ovlivňuje nejen rychlost hydrolytické degradace, ale také tvorbu degradačních produktů. V práci Lindströma *a kol.*, byl měřen počet monomerů uvolňovaných do vody po 12 týdnech hydrolýzy PBS. Počet

monomerů byl 18× vyšší při 70 °C než při 37 °C (Ratto *a kol.*, 1999). Kromě teploty a pH hraje důležitou roli také vlhkost prostředí (Lindstrom *a kol.*, 2004). Vlastností polymerů, která velmi ovlivňuje hydrolyzu, je jejich krystalinita. Amorfni část polymerů obecně podléhá degradaci lépe než krystalická (Ahmed *a kol.*, 2018). Polymerní řetězce v amorfni části jsou více pohyblivé a zpřístupňují tak místa, kde dochází k hydrolyze. Naopak krystalická část je tvořena především aromatickými doménami, jejichž struktura hydrolyzu ztěžuje (Kijchavengkul *a kol.*, 2008; Kijchavengkul *a kol.*, 2010; Muthuraj *a kol.*, 2015). Z hlediska struktury PBAT je tedy velmi důležitý obsah kyseliny adipové. Studie sledující degradaci PBAT s poměrem adipové a tereftalové kyseliny 40/60, 50/50 a 60/40 uvádí, že hydrolyze lépe podléhá amorfni část polymeru, kterou tvoří k. adipová a při hydrolyze dochází ke štěpení esterové vazby (Kijchavengkul *a kol.*, 2010). Další z důležitých vlastností polymerů je jejich chemická struktura. Postranní řetězce, typy vazeb a jejich reaktivita, přítomnost heteroatomů, flexibilita řetězců a také molekulová hmotnost mění hydrolytické chování polymerů (Cho *a kol.*, 2001; Marten *a kol.*, 2005; Numata *a kol.*, 2007; Nakajima-Kambe *a kol.*, 2009). Důležitým faktorem je specifický povrch. Čím je větší, tím rychleji dochází k degradaci (Husarova *a kol.*, 2014).

1.3 Biodegradace polymerů

1.3.1 Princip biodegradace polymerů

Biodegradace je komplexní proces skládající se z několika fází: biodeteriorace, depolymerizace, asimilace a mineralizace.

- Biodeteriorace

Během biodeteriorace dochází ke snížení odolnosti a trvanlivosti materiálů působením mikroorganismů nebo/a abiotických faktorů prostředí (Lucas *a kol.*, 2008). Růst mikroorganismů na povrchu polymeru může způsobit tvorbu trhlin či zvýšit velikost pórů, což může dokonce vést k rozpadu materiálu na malé fragmenty (Bonhomme *a kol.*, 2003). Jako důsledek jsou polymerní řetězce částečně odkryté a tím jsou přístupnější k depolymeraci. Zvětšuje se také specifický povrch polymeru.

- Depolymerizace

Vzhledem k tomu, že řetězce polymeru jsou příliš velké a nerozpustné ve vodě, nemohou pronikat přes membrány do buněk mikroorganismů. Paralelně s biodeteriorací vylučují mikroorganismy extracelulární enzymy, které spolu s abiotickými faktory (světlo, teplo, a chemický atak) vyvolávají štěpení polymerních řetězců. Polymerní řetězce musí být před asimilací depolymerizovány, tedy převedeny na nízkomolekulární ve vodě rozpustné fragmenty (oligomery, dimery či monomery) (Mueller, 2006).

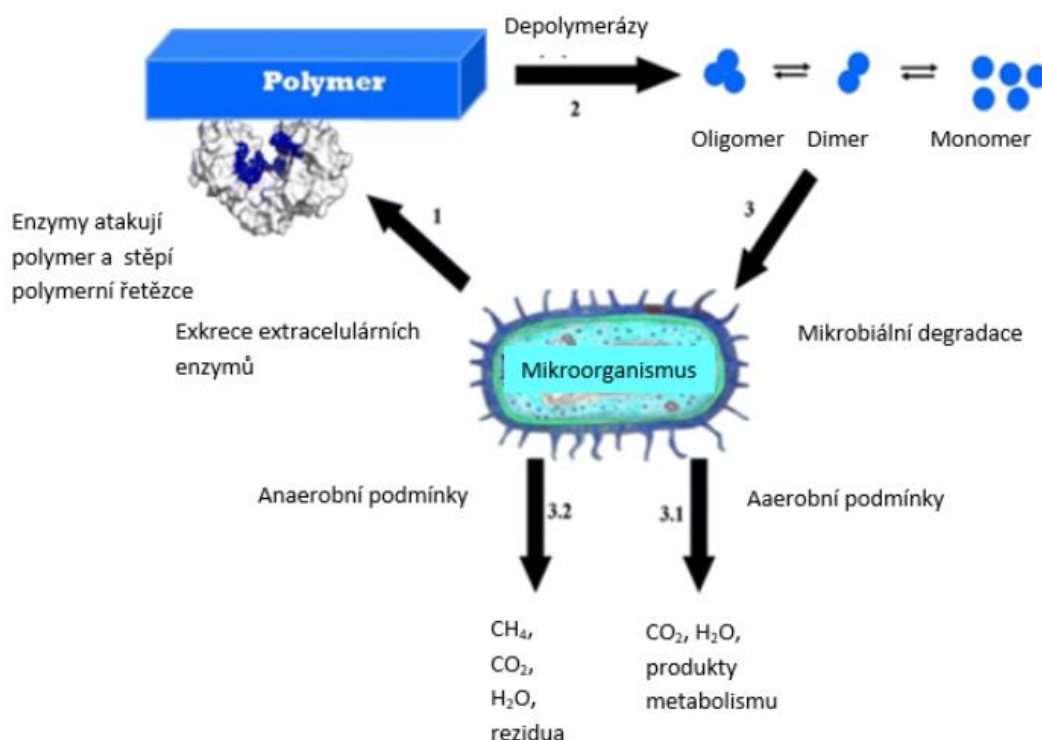
- Asimilace

Během asimilace pronikají ve vodě rozpustné meziproducty přes plazmatickou membránu do cytoplazmy mikroorganismů a jsou využity k výrobě energie, biomasy a primárních a sekundárních metabolitů (Kijchavengkul *a kol.*, 2010b).

- Mineralizace

V důsledku metabolických procesů se uvolňují konečné producty jako CO_2 , CH_4 (anaerobní biodegradace) a H_2O (Lucas *a kol.*, 2008).

Schéma biodegradace polymerů je patrné na Obrázku 1.3 (Ahmed *a kol.*, 2018).



Obrázek 1.3: Schéma biodegradace polymerů (Ahmed *a kol.*, 2018).

Biodegradace je ovlivněna vlastnostmi polymeru, prostředím a aktivitou mikroorganismů. Vlastnosti polymerů a prostředí ovlivňující biodegradaci mají vliv také na chemickou degradaci. Mezi důležité vlastnosti polymerů, které ovlivňují biodegradaci, patří přítomnost postranních řetězců a heteroatomů, typy vazeb a jejich reaktivita, flexibilita řetězců, krystalinita, molekulová hmotnost, specifický povrch a v případě některých polymerů také například takticita. Obecně je známo, že zatímco alifatické polymery jsou snadno biodegradovatelné, aromatické látky jsou téměř biologicky inertní (Tokiwa *a kol.*, 2009). V případě alifatických aromatických polymerů je biologická rozložitelnost ovlivněna mimo jiné mobilitou polymerních řetězců v krystalických doménách. Polymerní řetězec musí být dostatečně mobilní, aby enzymy dosáhly katalytického centra (Marten *a kol.*, 2005; Herzog *a kol.*, 2006). Mobilita může být v korelaci s obsahem aromatických sekvencí v alifatickém aromatickém kopolymeru (Marten *a kol.*,

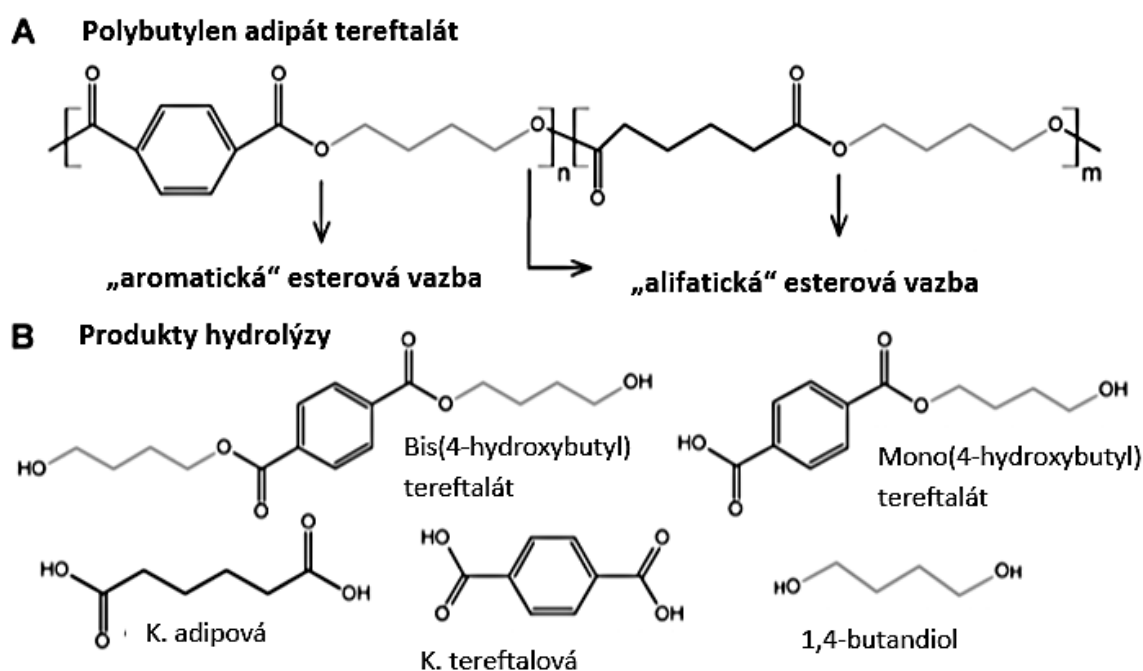
2005). Se zvyšujícím se poměrem aromatických sekvencí se lépe vytváří krystalické oblasti a dochází ke snížení mobility řetězců (Berti *a kol.*, 2008). Vzhledem k tomu, že mikroorganismy lépe degradují amorfní domény polymeru, je stupeň krystalinity důležitým faktorem ovlivňujícím biodegradaci. Molekuly v amorfní oblasti jsou volně zabalené a více náchylné k degradaci. Krystalická část polymerů je odolnější než amorfní oblast. V práci, věnující se enzymatické degradaci PLA, se uvádí, že řetězce v amorfní oblasti, která se nacházela mezi krystalickými oblastmi, byly spíše odolné vůči hydrolýze ve srovnání s řetězci ve volné amorfní oblasti (Tsuji a Miyauchi, 2001). Biodegradace je podpořena přítomností heteroskupin ve struktuře polymeru. Vzhledem k přítomnosti heteroskupin, jsou polymery jako polyestery, polyethery, polyamidy nebo polyurethany, náchylnější k biodegradaci než např. polyolefiny (Okada, 2002; Singh a Sharma, 2008). Další důležitou vlastností polymeru je velikost specifického povrchu, s vyšší absolutní plochou materiálu dochází k urychlení abiotické i enzymatické degradace a vyššímu nárůstu mikroorganismů na povrchu polymeru (Stloukal *a kol.*, 2012). Míra biodegradace je nepřímo úměrná molekulové hmotnosti polymeru. Fragmenty s molekulovou hmotností nižší než 10 000 jsou považovány za biodegradabilní a mohou být asimilovány mikroorganismy (Stloukal *a kol.*, 2012). Například PCL s vyšší molekulovou hmotností bylo lipázami izolovanými z *R. delemar* degradováno pomaleji než nízkomolekulární PCL (Tokiwa *a kol.*, 2009).

1.3.2 Mikroorganismy degradující PBAT

Dominantní skupiny mikroorganismů a degradační cesty spojené s rozkladem polymeru jsou často určeny podmínkami prostředí. V případě, že je k dispozici kyslík, dochází k biodegradaci pomocí aerobních mikroorganismů. Naproti tomu za anoxických podmínek (například na skládkách) se jedná o fakultativní nebo striktní anaeroby. Při enzymatické degradaci plastů dochází nejprve k přichycení mikroorganismů na povrchu plastů, po kterém následuje kolonizace exponovaného povrchu (Kumar *a kol.*, 2017). Enzymatická degradace polymerů hydrolýzou je dvoustupňový proces: nejprve se enzym váže na polymerní substrát a následně katalyzuje hydrolytické štěpení (Tokiwa *a kol.*, 2009). Polymery jsou degradovány na oligomery s nízkou molekulovou hmotností, dimery a monomery a nakonec jsou mineralizovány.

Degradace polyesterů pomocí enzymatické hydrolýzy byla poprvé sledována ve studii publikované v r. 1977 (Tokiwa a Suzuki, 1977). Od té doby byla publikována řada studií, které se zabývají identifikací, izolací a popisem degradérů polyesterů z řad bakterií i hub. Intenzivně jsou studovány také samotné enzymy, které jsou schopny štěpit polymerní řetězce. Tyto enzymy obsahují ve svém aktivním místě tzv. katalytickou triádu, která je typická pro serinové hydrolázy. Forma, hloubka a okolí katalytického centra se ale výrazně liší (Mueller, 2007). Mikroorganismy mohou pomocí extra a intracelulárních enzymů degradovat polymery až na monomery a následně je mineralizovat. Kasuya *a kol.*,

(2009) analyzoval produkty degradace po kultivaci PBAT filmů s kmenem NKCM1712, který je blízký houbě *Isaria fumosorosea*, po dobu 14 dní a pomocí kapalinové chromatografie zaznamenal přítomnost různých alifatických i aromatických oligomerů. Ve studii bylo zjištěno, že tento kmen je schopen využívat monomery z alifatické části rychleji než z aromatické, po konci testu byly v médiu detekovány pouze monomery s obsahem k. tereftalové. Kyselina adipová nebyla přítomná v kultivačním médiu po kultivaci s degradéry PBAT také v dalších studiích (Muller *a kol.*, 2001; Tan *a kol.*, 2008). Marten *a kol.*, (2005) došel k podobným výsledkům, dle studie je pro enzymy (konkrétně lipáza *T. fusca*) náročnější štěpit esterovou vazbu v blízkosti k. tereftalové než esterovou vazbu, která spojuje pouze alifatické části řetězce. Ve studii provedené Tanem *a kol.*, (2008) byl studován mechanismus biodegradace PBAT pomocí mezofilních bakterií. Bylo zjištěno, že hydrolýza PBAT probíhá tzv. exo-mechanismem, jsou štěpeny koncové části řetězce polymeru. Produkty enzymatické hydrolýzy jsou patrné z Obrázku 1.4 (Müller *a kol.*, 2017).



Obrázek 1.4: Chemická struktura PBAT (A) a možné produkty enzymatické hydrolýzy (B), poměr k. adipové a tereftalové 50/50 (Müller *a kol.*, 2017).

Významným degradérem PBAT je termofilní aktinomyceta *T. fusca*. Pokud je členem bakteriálního konsorcia, dochází k rychlé asimilaci vzniklých meziproduktů (Witt *a kol.*, 2001). Bakteriální společenstva jsou pravděpodobně při degradaci PBAT efektivnější než izolované kultury. V roce 2017 byla publikována studie zabývající se potenciálními degradéry PBAT spojenými s mechem *Sphagnum magellanicum*, který roste v rašeliníštích. Izolované degradační enzymy byly zařazeny do skupiny esteráz (Müller *a kol.*, 2017).

Mikroorganismy degradující tento kopolyester se tedy vyskytují také v extrémních prostředích. V roce 2016 byly poprvé publikovány také studie zabývající se anaerobní biodegradací (Biundo *a kol.*, 2016). Souhrn degradérů PBAT s odkazem na studii, která se jim věnovala je uveden v Tabulce 1.2.

Tabulka 1.2: Přehled mikroorganismů degradujících PBAT. Řazeno abecedně.

Mikroorganismus	Enzym	Typ mikroorganismu	Reference
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	Termofilní aerobní	(Grivalský <i>a kol.</i> , 2018)
<i>Clostridium botulinum</i>	Esteráza	Mezofilní anaerobní	(Perz, Baumschlager, <i>a kol.</i> , 2016)
<i>Clostridium hathewayi</i>	Esteráza	Mezofilní anaerobní	(Perz, Hromic, <i>a kol.</i> , 2016)
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	-	Termofilní aerobní	(Grivalský <i>a kol.</i> , 2018)
<i>Humicola insolens</i>	Esteráza	Termofilní anaerobní	(Perz, Bleymaier, <i>a kol.</i> , 2016)
Kmen NKCM 1712 (příbuzný s <i>I. fumosorosea</i>)	-	Mezofilní aerobní	(Muroi <i>a kol.</i> , 2016)
<i>Leptothrix</i> sp.	Esteráza	Mezofilní aerobní	(Nakajima-Kambe, Toyoshima, <i>a kol.</i> , 2009)
<i>Pelosinus fermentans</i>	Lipáza	Mezofilní anaerobní	(Biundo <i>a kol.</i> , 2016)
<i>Roseateles depolymerans</i>	Esteráza	Mezofilní aerobní	(Shah <i>a kol.</i> , 2013)
<i>Saccharomonospora viridis</i>	Kutináza	Termofilní aerobní	(Kawai <i>a kol.</i> , 2014)
<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	Esteráza	Termofilní aerobní	(Perz, Bleymaier, <i>a kol.</i> , 2016)
<i>Thermobifida fusca</i>	Kutináza	Termofilní aerobní	(Kleeberg <i>a kol.</i> , 2005)
<i>Thermomonospora fusca</i>	Lipáza	Termofilní aerobní	(Witt <i>a kol.</i> , 2001)

1.3.3 Biodegradace polyesterů v půdě

Biodegradace plastů během kompostování probíhá rychleji než v půdním prostředí (Kale *a kol.*, 2007). Kompostování však vyžaduje infrastrukturu zahrnující sběr materiálu a jeho zpracování, proto kompostování biodegradabilních polymerů v zemědělství není v porovnání s degradací přímo

v půdě příliš praktické (Diaz, 1999). Výhodou degradace v půdě je nižší cena, jelikož s použitým materiálem není nutno dále zacházet, pouze ho po použití zaorat spolu se zbytky rostlin (Kijchavengkul *a kol.*, 2008). Mezi další výhody patří pozitivní vliv na výnosy plodin a možnost inkorporovat do mulčovacích fólií hnojiva či přípravky na ochranu rostlin s kontrolovaným uvolněním do prostředí (Tachibana *a kol.*, 2009; Bilck *a kol.*, 2010). Vlastnosti půdního prostředí (například teplota, pH, vlhkost, struktura půdy, půdní vzduch, množství půdní organické hmoty) mají velký vliv na biodegradaci. Při nízké teplotě a vlhkosti dochází v půdě ke zpomalení hydrolytické degradace a také aktivity mikroorganismů (Kyrikou a Briassoulis, 2007). Koncentrace kyslíku má vliv na oxidativní degradaci a určuje, zda a v jakém poměru se v půdě vyskytují aerobní či anaerobní procesy. Velikost a počet pórů v půdě určuje množství půdního vzduchu, který je důležitý pro mikrobiální aktivitu (Schjonning *a kol.*, 2003). Vliv pH, vlhkosti a teploty je patrný např. ze studie provedené na dvou místech ve Vietnamu, která sledovala biodegradaci filmu vyrobeného z polyesteru řazeného mezi polyhydroxyalkanoáty. Na prvním místě došlo k degradaci přesahující 98 %, naopak na druhém místě byly filmy degradovány pouze ze 47 %. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben nízkým pH (5,48) na druhé lokalitě, rozdílnými povětrnostními podmínkami a různými mikrobiálními konsorciemi. Degradace byla na obou místech pozitivně ovlivněna vlhkým a horkým podnebím (Boyandin *a kol.*, 2013). Biodegradací experimenty v půdním prostředí reflektují podmínky, které mohou panovat při použití PBAT v zemědělství. Degradace PBAT v půdě za mezofilních podmínek je pomalý proces, který trvá několik měsíců. V následujících studiích byly inkubovány vzorky alifatického aromatického kopolyesteru v půdě při mezofilních podmínkách. Několik studií se zabývalo také degradací PBAT filmů na povrchu půdy. Hlavní vliv na jejich degradaci zde ale mělo UV záření a docházelo tak k fotodegradaci (Kijchavengkul *a kol.*, 2008; Kijchavengku, *a kol.*, 2010b).

Jednotlivé studie jsou řazeny chronologicky dle data publikování v odborném periodiku.

Studie sledující biodegradabilitu PBAT a jeho nanokompozitů s jílovými minerály a škrobem probíhala po dobu 34 týdnů. Úbytek hmotnosti PBAT na konci experimentu byl 1,7 % (Someya *a kol.*, 2007).

Kijchavengkul *a kol.*, (2008) po dobu 40 týdnů kultivoval filmy PBAT v reálné půdě. Molekulová hmotnost klesla o 48,5 %, autoři z výsledků vyvodili, že kompletní degradace filmů by byla možná po 52 týdnech.

Rychter *a kol.*, (2010) uvádí, že k biodegradaci PBAT v půdě za mezofilních podmínek dochází až po 4 měsících inkubace. Po 22 měsících byl úbytek hmotnosti vzorků 50 % a molekulová hmotnost klesla z 12000 na 7500.

Ve studii Morita *a kol.*, (2012) bylo dosaženo 15% poklesu hmotnosti při inkubaci v půdě po dobu 10 měsíců při 30 °C.

Ve studii Wenga a kol., (2013), který provedl elementární analýzu vzorků před a po čtyřměsíční kultivaci, kleslo množství organického uhlíku o 4,2 % a množství kyslíku stoupl o 4,6 %. Na povrchu filmů byly také po skončení experimentu pomocí SEM pozorovány trhliny.

V práci Wanga a kol., (2015) byla sledována biodegradace PBAT při průměrných teplotách 5-20 °C, po 3 měsících kultivace došlo k úbytku hmotnosti o 3 %. Ve směsích s 20% a 40% přídavkem plastifikovaného škrobu byl úbytek hmotnosti 12 a 35 %. Pevnost v tahu klesla u čistého kopolyesteru z 44,4 na 34,4 MPa.

1.3.4 Aditiva a jejich vliv na biodegradaci polymerů

Metody, které umožňují modifikovat biodegradabilní polymery, a tím rozšířit možnosti jejich využití bez negativního efektu na biodegradaci, jsou v současnosti intenzivně studovány. Vznikají tak směsi s jinými biodegradabilními polymery nebo plnivy (Muthuraj *a kol.*, 2014). Vhodné je také vytváření nanokompozitů, které vznikají mícháním polymerů s nanočásticemi (většinou jílové minerály, např. montmorillonit). Přítomnost částic jílových minerálů zlepšuje mechanické a termické vlastnosti výsledného materiálu (Fukushima *a kol.*, 2012; Mondal *a kol.*, 2013). Může ale dojít k mírnému zpomalení hydrolytické degradace v prvních stádiích rozkladu (Fukushima *a kol.*, 2013). Jako plniva mohou sloužit také biologické odpadní materiály např. upravený odpad skořápek podzemnice olejné či sisalová vlákna a jiné přírodní materiály (Wu, 2011; 2012). Jedním z nejrozšířenějších plniv je škrob. Přídavek škrobu ovlivňuje vlastnosti polymerů (snižuje hydrofobicitu, zvyšuje propustnost pro vodu a plyny a zlepšuje termické vlastnosti) (Shi *a kol.*, 2011; Mekonnen *a kol.*, 2013). Do směsí s polymery je vhodnější plastifikovaný, tzv. termoplastický škrob (TPS), jelikož přírodní škrob má omezenou termickou zpracovatelnost. Termoplastický škrob vzniká za zvýšené teploty a tlaku přídavkem molekul, které jsou schopny narušit jeho krystalickou strukturu, např. voda, glycerol, ethylen glykol či sorbitol. Při výrobě termoplastického škrobu se vlivem teplotní a mechanické degradace eliminuje krystalická složka struktury. Dochází ke snížení podílu krystalické složky jednak depolymerizací jednotlivých řetězců a dále narušením vodíkových vazeb mezi jednotlivými molekulami (Da Roz *a kol.*, 2006; Shanks a Kong, 2012; Nafchi *a kol.*, 2013). Termoplastický škrob tak může být zpracován do formy filmů a fólií. Škrob obecně podporuje biodegradabilitu polymerů, což je patrné z mnoha studií (Park *a kol.*, 2000; Ke *a kol.*, 2003; Wang *a kol.*, 2003; Ssiroth a Sangseethong, 2006; Shi *a kol.*, 2011; Chaleat *a kol.*, 2012). Byla např. sledována biodegradabilita směsí různých kopolyesterů a jiných biodegradabilních plastů s TPS či přírodním škrobem v půdě po dobu 6 měsíců. U všech vzorků došlo k výraznému úbytku hmotnosti, chemickým změnám a nárůstu mikrobiální aktivity v jejich okolí (Barragan *a kol.*, 2016). Filmy alifatického kopolyesteru PBSA s přídavkem až 30 % škrobu mohou být připraveny vyfukováním (stejnou metodou se připravují filmy z polyethylenu).

Tyto filmy byly po 60 dnech inkubace v půdě mineralizovány ze 70 %, což je významné urychlení oproti samotnému filmu PBSA, který má poločas rozpadu 231 dní. Přídavek pouhých 5 % škrobu snížil poločas rozpadu na 80 dní (Ratto *a kol.*, 1999). Velkou výhodou škrobu je také jeho snadná dostupnost a nízká cena (Wang *a kol.*, 2003).

1.4 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Jako první se na konci 70. let denaturační gradientové gelové elektroforéze (DGGE) věnovali Lerman a Fisher, kteří popsali princip metody, sestrojili aparaturu a stanovili základní parametry analýzy (Fischer a Lerman, 1979; Muyzer začal DGGE využívat v oboru mikrobiální ekologie v 90. letech (Muyzer *a kol.*, 1993; Mathys, 1995). V roce 2017 bylo v databázi Web of Science uloženo přes 8000 článků z různých odvětví, které obsahují heslo denaturační gradientová gelová elektroforéza. Tato metoda je tedy hojně využívána a dochází k jejímu rozmachu.

1.4.1 Úvod do metodiky DGGE

Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu je metoda umožňující separaci DNA fragmentů na základě jejich mobility v prostředí se vzrůstajícím denaturačním gradientem. Denaturace, tedy rozrušení sekundární a terciální struktury nukleových kyselin, je způsobena jejich vystavením extrémním podmínkám jako vysoké teploty, extrémní pH nebo denaturační činidla (např. močovina, formamid). Vodíkové můstky ve dvouřetězcové DNA (dsDNA) jsou odděleny a vytváří dvě samostatná vlákna jednořetězcové DNA (ssDNA). Směs dsDNA fragmentů různých sekvencí je separována pomocí elektroforézy v akrylamidovém gelu s lineárně vzrůstajícím gradientem denaturačních činidel. DNA fragmenty, bohatší na guanin (G) a cytosin (C), jsou stabilnější než fragmenty obsahující spíše adenin (A) a thymin (T) a denaturují až po dosažení vyšší koncentrace denaturačního činidla. Dvouřetězcové DNA fragmenty migrují v akrylamidovém gelu lépe, zatímco denaturované ssDNA molekuly zpomalí nebo se zastaví-DNA je tedy v gelu rozdělena do tzv. bandů na základě obsahu bází. Tuto metodu lze použít například k přímé vizualizaci bakteriální diversity, identifikaci členů bakteriálního konsorcia či monitoringu vývinu mikroflóry v čase (Muyzer *a kol.*, 1993; Schafer a Muyzer, 2001).

1.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Před samotným rozdělením DNA fragmentů pomocí DGGE je nutné DNA namnožit pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Tato metoda ale může vnést do výsledků několik chyb, které se při technikách spojených s PCR objevují. Mimo možnost kontaminace, které se dá předejít dodržením správně laboratorní praxe, se jedná především o vznik nespecifických produktů. Jejich výskyt ale lze omezit vhodnou úpravou metodiky. Následující

výčet shrnuje nejčastější typy nespecifických produktů, které mohou ovlivnit výslednou analýzu DGGE a navrhuje způsoby, jak potlačit jejich vliv na výsledky.

- Chiméry a heteroduplexy

V průběhu PCR může dojít k terminaci u amplikonu ještě před tím, než je kompletně dokončen. V dalším PCR cyklu se na nedokončené vlákno může navázat vlákno nové a vznikne tak sekvence, která se na gelu oddělí do bandu. Sekvence je tedy kombinací dvou různých organismů a nazývá se podle řecké mytologie chimérou (Wang a Wang, 1997). Odhalit chiméry je možné pomocí speciálních programů k tomu určených (např. ChimeraSlayer, UCHIME nebo DECIPHER). Heteroduplexy vznikají přímo rekombinací dvou ssDNA pocházejících z různých organismů či chromozomů.

- Degenerované primery

Degenerované primery jsou směsí podobných, ale ne zcela identických primerů, které je vhodné využít, pokud je amplifikován stejný gen, který se ale nachází v různých organismech. Při PCR může dojít k annealingu těchto primerů ke stejnému fragmentu DNA a jsou generovány kopie tohoto fragmentu s různými sekvencemi primerů. Pokud jsou sekvence dostatečně dlouhé, dojde na základě odlišností v části obsahující primery k separaci do samostatného bandu. Tento problém může vyřešit sekvenování nebo klonování DNA příslušného bandu (Thompson *a kol.*, 2002).

- Dimery

Dimery se skládají z primerů, které se díky komplementaritě svých bazí v průběhu PCR spojí a vytvoří tak samostatný fragment DNA o určité sekvenci. Vhodně navržené primery vnik dimerů eliminují. V průběhu DGGE migrují dimery z gelu, proto nejsou závažným problémem (Brownie *a kol.*, 1997; Shawcross *a kol.*, 1997).

- Dvojité a multi bandy

Pro vznik dvojitých bandů neexistuje jednoznačné vysvětlení. Tyto bandy vznikají jak při amplifikaci DNA směsných vzorků, čistých kultur či plasmidů a to i při použití nedegenerovaných primerů. Tyto dvojité bandy se na DGGE gelu vyskytují blízko u sebe a reprezentují stejnou sekvenci. Pro eliminaci těchto bandů je vhodné prodloužit elongační čas, snížit počet PCR cyklů, po poslední elongaci snížit koncentraci templátové DNA (Janse *a kol.*, 2004). Bandy, které reprezentují stejnou sekvenci, mohou být od sebe v gelu také značně vzdálené. Dle práce Neilsona a kol., to může být způsobeno tím, že individuální bandy reprezentují různé strukturní konformace amplikonu, který vzniká v průběhu PCR a tyto konformace vykazují různé denaturační chování (Neilson *a kol.*), které se liší v sekvenci, tzv. mikroheterogenita v rRNA (Marschner, 2007).

1.4.3 Výhody a nevýhody DGGE

Denaturační gradientová gelová elektroforéza je metoda, která je vhodná ke studiu bakteriálních konsorcií, jejich dynamiky a srovnání. Je základním nástrojem molekulární mikrobiální ekologie.

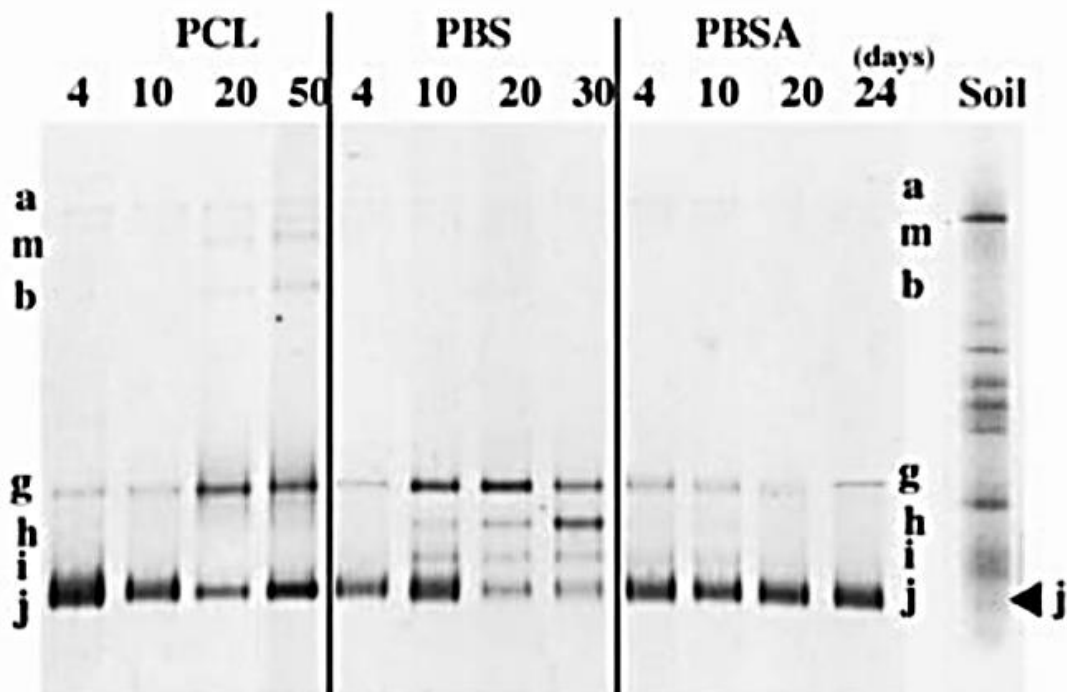
Vzhledem k tomu, že jednotlivé bandy, které reprezentují bakteriální druhy, mohou být vyřezány a sekvenovány, je DGGE metoda využívána ve fylogenetické analýze a identifikaci mikroorganismů (Muyzer a Smalla, 1998; Valaskova a Baldrian, 2009). Pro přesné taxonomické zařazení by ale měly být provedeny také mikrobiologické a biochemické testy. Pomocí DGGE lze společně analyzovat velké množství vzorků, ze kterých mohou být poté vybrány vzorky vhodné k dalšímu studiu (Neilson *a kol.*). Další výhodou DGGE je citlivost na variace v DNA sekvencích, díky kterým od sebe mohou být odděleny i fragmenty blízké příbuzných bakterií (Myers *a kol.*, 1987). Pro PCR, která předchází samotné DGGE je možno využít jak univerzálních, tak specifických primerů. Mohou být analyzována bakteriální společenstva, o kterých nejsou k dispozici žádné informace a DGGE tak slouží jako screeningová metoda. Použití specifických primerů je vhodné ke sledování vybraných skupin bakterií (např. na základě jejich metabolismu či příbuznosti).

Denaturační gradientová elektroforéza má také několik omezení. Nespecifické produkty PCR reakce mohou nadsadit bakteriální diverzitu. Naopak, fragmenty DNA s podobným denaturačním chováním se v gelu zastavují velmi blízko u sebe a nelze je tak od sebe vizuálně oddělit, což může diverzitu podhodnotit. Pokud je ve vzorku přítomno velké množství bakteriálních druhů, mohou výsledné gely vypadat rozmazaně a jednotlivé bandy nejsou ostré, pokud se jedná o méně zastoupené bakterie, bandy nemusí být vůbec patrné. Vzhledem k malým odchylkám, které vznikají při napouštění gelu a také při průchodu elektrického proudu gelem, není vždy možné výsledky reprodukovat mezi gely a laboratořemi. Délka sekvence, kterou lze pomocí DGGE separovat je max. 1000 bp. což snižuje přesnost taxonomického zařazení (Marschner, 2007). Navzdory limitům této metody ale převažují výhody, protože omezení spojená s DGGE lze regulovat.

1.4.4 Využití DGGE při identifikaci degradérů biodegradabilních polymerů

Denaturační gradientová elektroforéza byla využita při sestavení nové ISO metodiky týkající se vyhodnocení anaerobní biodegradace polymerů. Byla sledovaná dynamika bakteriálního konsorcia degradujícího PLA a celulózu v anaerobním kalu, který byl pre-inkubován při 55 °C a poté inkubován při 37 °C spolu s vybranými polymery. Na konci testu nebyl velký rozdíl mezi bandy vzorku s polymery a bez, což mohlo být způsobeno například tím, že bakteriální nárůst proběhl už během pre-inkubace kalu, což potvrdily výsledky analytických měření (Yagi *a kol.*, 2010). M. Kamiya a kol., (2007) využil DGGE pro porovnání

degradérů z řad hub PCL, PBS, PBSA v reálné půdě. Z fotky příslušného gelu je patrné, že na rozkladu těchto polymerů se podílí taxonomicky blízké houby (Obrázek 1.5) z oddělení *Ascomycota* (především *Chaetothyriales*).



Obrázek 1.5: DGGE gel zobrazující fragmenty DNA komunity hub vyskytující se na PCL, PBS, PBSA filmech inkubovaných 24 dní v půdě (Kamiya a kol., 2007).

V práci z roku 2016 byla denaturační gradientová elektroforéza využita pro sledování vlivu PBAT na půdní mikrobiotu-bakterie a houby. Půda s fólií PBAT byla kultivována při 30 °C po dobu 3 až 7 měsíců, pro porovnání byla kultivována také půda bez PBAT. Z těchto dvou půd byla izolována DNA, která byla rozdělena pomocí DGGE. Na povrchu fólie byl pozorován nárůst hub z oddělení *Ascomycota*. Bakteriální diverzita nebyla fólií PBAT výrazně ovlivněna. Přítomnost kopolyesteru ale zvýšila celkové množství bakterií a hub v půdě (Muroi a kol., 2016). Uvedené příklady dobře ilustrují možnosti využití této metody-od biotechnologie po fylogenetické studie.

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo studium degradace biodegradabilních polymerů, které představují ekologickou alternativu konvenčních plastů. Dále byly hodnoceny procesy biodegradace látek a materiálů pomocí molekulárně biologických metod.

Dílčí cíle disertační práce byly následovné:

- Studium biodegradace alifatického aromatického kopolyesteru v půdě v mezofilních podmínkách.
- Studium abiotické hydrolýzy vybraných polyesterů při různých teplotách.
- Zavedení a optimalizace metody PCR-DGGE v laboratoři molekulární biologie Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí pro širokou škálu environmentálních vzorků.
- Screening výskytu degradérů alifatického kopolyesteru v půdách ve Zlínském kraji.
- Využití molekulárně biologických metod, především PCR-DGGE, při identifikaci degradérů alifatického aromatického kopolyesteru izolovaných z půdy a analýze mikrobiálního konsorcia na lokalitách kontaminovaných BTEX a leteckým petrolejem.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

Analytické váhy SI – 64A (Denver Instrument, USA)
Analyzátor uhlíku TOC-5000A (Shimadzu, Japonsko)
Aseptický laminární box Telstar (Španělsko)
Breeze Chromatographic System (Waters, USA)
Centrifuga ROTANA 460R (Andreas Hettich, Německo)
Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Německo)
Centrifuga MR23i (ThermoScientific, USA)
Destičkový spektrofotometr Infinite M200 PRO (Tecan Group, Švýcarsko)
DGGE 2401-110 (C.B.S. Scientific Company, USA)
Dry block heating termostat, Bio TDB-100 (BioSan, Lotyšsko)
Elektroforetická aparatura HU10 Mini-Plus Horizontal (Scie-Plas, Velká Británie)
Homogenizátor Ultra Turrax T 10 basic (IKA, Německo)
Chladnička (ARDO, Itálie)
Kalorimetr Mettler Toledo DSC1 (Sartorius, Německo)
Kombinovaná chladnička (BEKO, Turecko)
Kulový mlýnek MM 301 (Retsch, Německo)
Laboratorní sterilizátor SANOclav (Wolf, Velká Británie)
Laboratorní váhy Adventurer Pro 500 (OHAUS, USA)
Mikroskop Olympus IX 53 (Olympus, Japonsko)
pH metr inoLab pH/ION 735 SenTix 81 (WTW, Německo)
Plynový chromatograf 7890A (Agilent Technologies, USA)
Rastrovací elektronový mikroskop VEGA LMU (Tescan, Česká republika)
Termocykler PIKO, Finnzymes, (Thermo Fisher Scientific, USA)
Termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)
Trhací přístroj 8871 (INSTRON, USA)
Třepačka laboratorní vratná (GFL, Německo)
Ultrazvukový homogenizátor SONOPULS HD 2200 (Bandelin, Německo)
UV transiluminátor In Genius (SynGene Imaging, Velká Británie)
Vysekávací stroj (Svit, Česká republika)

Dále byly používány běžné laboratorní pomůcky, jako dávkovače, pipety, zkumavky, kličky, běžné laboratorní sklo a další laboratorní pomůcky.

3.2 Příprava roztoků, suspenze PBAT a živných médií

V této kapitole byly popsány postupy přípravy použitých roztoků či jejich jednotlivých složek, dále pak příprava živných médií potřebných pro kultivaci bakterií a příprava suspenze PBAT.

3.2.1 Suspendační roztok

Roztok sloužící pro přípravu výluhů z půdy. Bylo naváženo 8,5 g NaCl a 1 g Tweenu do 1000 ml odměrné baňky a roztok byl doplněn destilovanou vodou na požadovaný objem. Připravený roztok byl rozlit po 45 ml do vzorkovnic a byla provedena sterilizace v autoklávu při 120 °C po dobu 20 minut.

3.2.2 Roztok stopových prvků

Pro přípravu 1 litru roztoku bylo naváženo:

MgSO ₄ · 5 H ₂ O	0,043 g
H ₃ BO ₃	0,057 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,043 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0,037 g
Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	0,025 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,040 g
Destilovaná voda	doplněno do 1000 ml

Látky byly naváženy na analytických vahách (d=0,0001 g), dále pak smíchány a doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem, roztok byl důkladně promíchán.

3.2.3 Minerální médium (MM)

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky potřebné pro přípravu minerálního média:

Roztok Na₂HPO₄ · 12 H₂O

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 23,9 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok KH₂PO₄

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 9,078 g KH₂PO₄ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok NH₄Cl

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 50 g NH₄Cl a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 10 g $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

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

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 3 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok NaCl

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 50 g NaCl a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Minerální médium je zde použito jako zdroj mikrobiogenních, makrobiogenních a stopových prvků potřebných pro životní pochody mikroorganismů.

K přípravě samotného minerálního média o objemu 1000 ml bylo odměřeno a naváženo:

Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	80 ml
Roztok KH_2PO_4	20 ml
Roztok NH_4Cl	10 ml
Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
Roztok NaCl	10 ml
Stopové prvky	1 ml
Kvasniční autolyzát	1 g
Destilovaná voda	doplněno do 1000 ml

Následně byla provedena sterilizace MM při 120 °C po dobu 20 minut.

3.2.4 Suspenze PBAT

Kopolymer kyseliny adipové, 1,4-butadiolu a kyseliny tereftalové byl zakoupen u EnPol (Irechemicals, Korea) pod obchodním názvem PBAT-G8060. Suspenze PBAT byla tvořena mikročásticemi daného kopolyesteru dispergovanými ve vodě. K její přípravě byla zvolena metoda Oil-in-water emulsion solvent evaporation method (Jeffery *a kol.*, 1991). Při této metodě bylo

využito polyvinyl alkoholu (PVA) jako emulgátoru, snižující povrchové napětí mezi nemísitelnými látkami-vodou a PBAT.

Byl připraven 10% roztok PBAT v chloroformu a 0,5% roztok PVA v destilované vodě. Roztoky spolu byly míchány pomocí vysokorychlostního homogenizátoru při 24 000 otáčkách po dobu 5 minut. Pro zmenšení velikosti mikročástic byl použit ultrazvukový homogenizátor (amplituda 35%) po dobu 5 minut. Po odpaření chloroformu bylo vymyto PVA. Výsledná koncentrace suspenze PBAT ve vodě byla 20 mg . ml⁻¹.

3.2.5 Tuhá živná média pro stanovení počtu mikroorganismů v půdách

Následující text uvádí použitá tuhá živná média a postup jejich přípravy. Všechny látky byly vždy rozmíchány v uvedeném množství destilované vody a byla provedena sterilizace v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 20 minut. Následně po ochlazení byla živná půda v aseptickém laminárním boxu rozlita na Petriho misky.

Tryptone yeast extract agar (TYA)

TYA agar se skládal z enzymatického hydrolyzátu kaseinu, kvasničného extraktu a agaru. Pro přípravu tuhého média bylo naváženo 6,3 g TYA agaru a odměřeno 300 ml destilované vody.

Glycerol – dusičnanový agar (GD agar)

Na tomto agaru byly kultivovány aktinomycety, je na něm ale možno kultivovat také jiné bakterie i plísně. Na přípravu 300 ml živného média bylo naváženo a odměřeno:

Glycerol	6,0 g
NaCl	0,3 g
KNO ₃	0,75 g
CaCO ₃	0,03 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,03 g
K ₂ HPO ₄	0,24 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	stopové množství
Agar	6,0 g
Destilovaná voda	doplněno do 300 ml

Půdní agar s bengálskou červení a chloramfenikolem

Půdní agar s bengálskou červení a chloramfenikolem byl použit se pro kultivaci půdních plísňů, jelikož inhibuje růst bakterií.

Na přípravu 300 ml bylo použito:

Bengálská červeň 1 %	2,1 ml
Glukosa	3,0 g
NaNO ₃	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Chloramfenikol	0,018 g
Agar	5,4 g
Destilovaná voda	doplněno do 300 ml

3.2.6 Tuhá živná média pro izolaci degradérů kopolyesteru

Všechna tuhá živná média byla připravena dle obecného postupu uvedeného v Kapitole 3.2.5.

Actinomycete Isolation Agar Médium

Toto médium sloužilo pro kultivaci půdních aktinomycet. Na přípravu 250 ml živného média bylo naváženo a odměřeno:

Actinomycete Isolation Agar	11 g
Glycerol	2,5 ml
Destilovaná voda	doplněno do 500 ml

Gym médium

Pro přípravu 500 ml živného média bylo naváženo a odměřeno:

D-glukóza monohydrát	2 g
Kvasniční extrakt	2 g
Sladový extrakt	5 g
CaCO ₃	1 g
Agar Typ I	6 g
Destilovaná voda	doplněno do 500 ml

R8 médium

Pro přípravu 500 ml živného média bylo naváženo a odměřeno:

Agar Typ I	11 g
Kvasniční extrakt	5 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2,6 g
L-prolin (20% wt/vol)	7,4 ml
1M NaOH	3,5 ml

5M CaCl ₂ · 2 H ₂ O	5 ml
Destilovaná voda	doplňeno do 500 ml

PBAT médium

Minerální médium bylo sterilizováno ve směsi spolu s agarem, zatímco suspenze PBAT musela být sterilizována zvlášť. Následně byly složky smíchány v aseptickém laminárním boxu. Důvodem byl vznik sraženiny polymeru v případě sterilizace všech složek v jedné vzorkovnici (čemuž bylo oddělenou sterilizací zamezeno). Výsledná koncentrace PBAT v tuhém médiu byla 25 g · l⁻¹. Po ochlazení byla živná půda v aseptickém laminárním boxu rozlita na Petriho misky.

Pro přípravu 120 ml PBAT média bylo naváženo a odměřeno:

MM	100 ml
Agar Typ I	2,2 g
Suspenze PBAT	20 ml

PBAT médium se škrobem

Připraveno ve dvou koncentracích rozpustného škrobu: 2 g nebo 200 mg rozpustného škrobu na jeden litr minerálního média.

MM	100 ml
Agar Typ I	2,2 g
Suspenze PBAT	20 ml
Rozpustný škrob	0,2 g nebo 20 mg

3.2.7 Roztoky antibiotik

Cykloheximid byl připraven ředěním ze zásobního roztoku o koncentraci 50 mg · ml⁻¹ v 90% methanolu na pracovní koncentraci 50 ng · ml⁻¹. Nystatin byl připraven ředěním dimethylsulfoxidem (DMSO) ze zásobního roztoku o koncentraci 5 mg · ml⁻¹ na pracovní koncentraci 50 ng · ml⁻¹.

3.2.8 Tween pro výluhy z půd

Bylo smícháno 0,5 ml zásobního roztoku Tweenu a 500 ml destilované vody.

3.2.9 Psoralen

Zásobní roztok psoralenu byl 25× koncentrovaný. Pracovní roztok (2,5× koncentrovaný) byl připraven smícháním 10 µl zásobního roztoku psoralenu a 90 µl dimethylsulfoxidu.

3.2.10 50× koncentrovaný TAE pufr

Pro přípravu 50× koncentrovaného TAE pufru bylo naváženo a odměřeno:

2M Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	242 g
1 M kyselina octová (CH_3COOH)	57,1 ml
50mM EDTA	100ml 0,5 M EDTA
Destilovaná voda	doplněno do 1000 ml

Padesátkrát koncentrovaný roztok TAE byl pro laboratorní účely ředěn destilovanou vodou v poměru 1:50.

3.3 Biodegradace PBAT v půdě

Stanovení základních fyzikálně-chemických a mikrobiologických parametrů půd a biodegradační experiment probíhaly ve spolupráci s diplomovou prací Ing. Jarmily Novákové.

3.3.1 Stanovení základních fyzikálně-chemických a mikrobiologických parametrů půd

Vzorky půdy byly spolu s informacemi o půdním druhu, obsahu částic, zrnitostní třídě, organickém podílu a obsahu těkavých látek dodány Mendelovou univerzitou v Brně.

U vzorků půd bylo stanoveno pH dle ČSN ISO 10390 (836221). pH bylo měřeno pomocí skleněné elektrody v suspenzi půdy v roztoku chloridu draselného s koncentrací $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (pH-KCl). Poměr půdy a suspenzní kapaliny byl 1:5. Sušina byla stanovena dle ČSN 72 1110.

Mikrobiologický rozbor půd a kompostu byl zaměřen na stanovení hlavních skupin chemoorganotrofních bakterií, termofilních bakterií, aktinomycet a plísní. Na Petriho misky byly rozlity připravené agary pro kultivaci vybraných mikroorganismů (TYA, GD agar a půdní agar s bengálskou červení a chloramfenikolem) a byly nadávkovány půdní suspenze mikroorganismů. Byl připraven výluh z půd, do 45 ml sterilního suspenzačního roztoku bylo naváženo vždy 5 g půdy, dále pak mícháno po dobu 10 minut na třepačce. Dalších 20 minut byla směs ponechána v klidu, aby došlo k sedimentaci pevných částic. Poté byl odebrán 1 ml suspenze a nadávkován na tuhé živné médium. Bylo dávkováno také ředění suspenze 10^{-1} a 10^{-2} . Daný objem byl rozetřen pomocí sterilní skleněné hokejky. Kultivace půdní suspenze mikroorganismů probíhala při 25 °C ve tmě po dobu 7 dní pro stanovení aktinomycet a plísní. U chemoorganotrofních bakterií kultivace probíhala 3 dny.

3.3.2 Příprava biodegradačních testů

Pro biodegradaci byly použity filmy vyrobené z kopolyesteru PBAT pod obchodním názvem Ecoflex (BASF, Německo) a škrobem plněného kopolyesteru (Limagrain, Francie). Kopolyester plněný škrobem obsahoval 70,8 % PBAT; 19,15 % škrobu; 5,7 % PLA a 4,35 % glycerolu. Oba materiály byly zpracovány vyfukováním a tloušťka filmů byla cca 40 μm . Obsah celkového uhlíku byl v Ecoflexu 62,5 % a v Ecoflexu s plnivem 53,67 %.

V testu byly použity skleněné lahve s objemem 500 ml (objem plynné fáze byl 580 ml). Lahve byly umyty a sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Všechny lahve byly opatřeny víčkem se septem, víčka byla sterilizována pomocí UV záření v aseptickém laminárním boxu 30 minut. Pro každou půdu byly připraveny 3 paralelní lahve se vzorky filmů Ecoflexu a Ecoflexu ve směsi se škrobem o velikosti 5×5 mm, dále byly připraveny 4 lahve bez přidání vzorku sloužící jako slepý pokus a 3 lahve se vzorky celulózy, která sloužila jako pozitivní kontrola. Do každé lahve bylo dávkováno 5 g přirozeně vlhké půdy, 5 g perlitu (AGRO CS) a 0,1 g vzorku. Směs byla ovlhčena minerálním médiem na 50 % a lahve byly inkubovány v 25 °C bez přístupu světla, plynná fáze byla odebírána každých 7 dní.

3.3.3 Stanovení mineralizace materiálu pomocí plynové chromatografie

K měření produkce CO₂ byl použit plynový chromatograf Agilent 7890, který měl v termostatu umístěné 2 náplňové sériově zapojené skleněné kolony o délce 1,829 m. Na první koloně docházelo k separaci oxidu uhličitého v náplni Porapak Q s částicemi o velikosti 80/100 MESH. Druhá kolona obsahovala molekulové síto 5A s velikostí částic 60/80 MESH a docházelo zde k separaci kyslíku. Ventily mezi kolonami byly přepínány pomocí tlakového přepínače napojeného na přívod dusíku, popřípadě vzduchu.

Po nástřiku vzorku plynovou injekční stříkačkou Hamilton o objemu 100 μl do inletu plynového chromatografu byla spuštěna analýza. V čase 0,65 minut docházelo k přepnutí ventilu na Porapak Q, na kterém se dělil CO₂. V čase 1,5 minut docházelo k přepnutí ventilu na druhou kolonu, na které se dělil O₂. Helium čistoty 4,6 sloužilo jako nosný plyn. V Tabulce 3.1 jsou uvedeny základní parametry GC analýzy.

Tabulka 3.1: Podmínky měření CO₂ na přístroji GC Agilent 7890.

Parametr		Hodnota
Teplota [°C]	Termostat	60
	Injektor	200
	TCD detektor	250
Nosný plyn	Typ	Helium
	Průtok (ml . min ⁻¹)	53
Přepínání ventilů	Čas (min)	0,65 CO ₂ ; 1,5 O ₂
	Plyn	Vzduch, N ₂

Tepelně vodivostní detektor (TCD) sloužil k detekci složek. Z nástřiku standardu byla odečtena plocha peaku a metodou přímého srovnání pomocí stavové rovnice byla dopočtena produkce CO₂ ve vzorku dle literatury (Muroi *a kol.*, 2016). Koncentrace CO₂ a O₂ byla odvozena z kalibrační křivky. Standard byl měřen po spuštění plynového chromatografu a po každém nástřiku jiného druhu vzorku. Ve standardu Linde Technoplyn byla analyzována směs CO₂ (0,8 %), CH₄ (4,0 %), N₂ (95,2 %).

Po analýze byly lahve provzdušněny pomocí silikonových hadiček napojených na vzduchové čerpadlo. Provzdušňovací zařízení bylo sestaveno z promývací lahve s roztokem 5 mol . l⁻¹ NaOH, ve které docházelo k odstranění atmosférického CO₂, z lahve s destilovanou vodou sloužící ke zvlhčování vzduchu a z promývací lahve s roztokem 0,05 mol . l⁻¹ Ba(OH)₂, která byla použita jako pojistka při vyčerpání veškerého roztoku NaOH vznikem sraženiny BaCO₃. Aby nedocházelo k vyčerpání roztoků, byly měněny 3× měsíčně.

3.3.4 Zpracování dat naměřených pomocí GC

Naměřená data byla zpracována s použitím následujících vzorců:

Denní produkce uhlíku ve formě CO₂

$$m_{(d)C} = \frac{M_C \times p}{R \times T} \times \frac{V_g}{1000} \times w(CO_2) \times \frac{V_{St}}{S_{St}} \times \frac{S_{Vz}}{V_{Vz}} \times 1000$$

kde:

$m_{(d)C}$ množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO₂ [mg]

M_C atomární hmotnost uhlíku; $M_C = 12$ [g . mol⁻¹]

p tlak v okamžiku provzdušňování [kPa]

R molární plynová konstanta; $R = 8,314$ [J . K⁻¹ . mol⁻¹]

T termodynamická teplota v okamžiku provzdušňování [K]

V_g plynný objem lahve; $V_g = 580$ [ml]

$w(CO_2)$ množství CO₂ v kalibračním plynu; $w = 0,008$ [-]

V_S ; V_{Vz} dávkovaný objem plynné fáze standardu resp. vzorku do plynového

chromatografu; V_{St} ; $V_{Vz} = 100$ [μ l]

S_{St} ; S_{Vz} plocha peaku u standardu resp. vzorku [μ V . s⁻¹]

Kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂

Pokud nedochází k provzdušňování bioreaktorů, je kumulativní produkce rovna produkci denní. Pokud je systém provzdušňován, je kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂ daná vztahem:

$$m_{(k)C_2} = m_{(k)C_1} + m_{(k)d_2}$$

kde:

$m_{(k)C_2}$	kumulativní produkce uhlíku z aktuálního měření; [mg]
$m_{(k)C_1}$	kumulativní produkce uhlíku z předchozího měření; [mg]
$m_{(k)d_2}$	denní produkce uhlíku z aktuálního měření; [mg]

Substrátová produkce uhlíku ve formě CO₂

Jedná se o denní produkci uhlíku ze systému se vzorky, sniženou o produkci uhlíku ze slepých pokusů, tj. o produkci ze samotných substrátů (půd, kompostu), je daná vztahem:

$$n_{(s)C} = m_{(k)CV_z} + m_{(k)CS_1}$$

kde:

$n_{(s)C}$	substrátová produkce uhlíku ve formě CO ₂ ; [mg]
$m_{(k)CV_z}$	kumulativní produkce uhlíku z lahve se vzorkem; [mg]
$m_{(k)CS_1}$	denní produkce uhlíku z lahve bez vzorku; [mg]

Procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO₂

$$D_C = \frac{m_{(s)C}}{m_C \times TC_{1,2}} \times 100$$

kde:

D_C	procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO ₂ ; [%]
$M_{(s)C}$	substrátová produkce uhlíku ve formě CO ₂ ; [mg]
m_C	hmotnost testovaného materiálu; [mg]
$TC_{1,2}$	obsah celkového uhlíku v Ecoflexu nebo Ecoflexu s plnivem;
$TC_{1,2} = 0,6254; 0,5367$	

3.3.5 Příprava bioreaktorů

V půdních reaktorech probíhala kultivace vzorků, u kterých byly v průběhu inkubace měřeny mechanické vlastnosti, změna distribucí molekulových hmotností a jejichž povrch byl mikroskopicky pozorován. Skladba reaktoru byla navržena dle literatury (Rizzarelli *a kol.*, 2004).

Byla připravena směs 200 g perlitu a 200 g půdy (hnědozem, černozem, fluvizem), 100 ml MM. Na dno reaktoru byly umístěny silikonové hadičky

umožňující přívod vzduchu. Na ně byl položen rošt z inertního materiálu se sítkou, aby bylo zabráněno propadávání substrátu a nedošlo tím k ucpání hadiček. Půdní reaktor byl rozdělen na šest sektorů, jelikož byly testovány tři druhy půd. Na půdu byla rozložena tělíska kopolyesteru a zasypana připraveným substrátem. Tělíska byla vyseknuta pomocí vysekávacího stroje do tvaru oboustranných lopatek z fólií Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem o tloušťce 40 μm . Tělíska z kopolyesteru byla umístěna postupně na půdu ve třech vrstvách. Půdní reaktor byl překryt fólií z inertního materiálu, aby nedošlo k odpařování vody. Pomocí vzduchovacího motorku bylo zajištěno provzdušňování půd. Horní vrstva substrátu byla pravidelně zvlhčována rozprašovačem s destilovanou vodou. Půdní testy probíhaly v místnosti při teplotě 25 °C, vlhkosti cca 50 %, bez přístupu světla.

Po ukončení inkubace a změření mechanických vlastností testovaných materiálů byl připraven další pokus se vzorky, u kterých byly sledovány změny distribucí molekulových hmotností a změny na povrchu materiálu. Pokus byl připraven dle metodiky popsané v této kapitole. Byl připraven také doplňující experiment, během kterého byly vzorky Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem inkubovány pouze v hnědozemi a odběr vzorků pro měření mechanických vlastností probíhal v prvních dnech kultivace.

3.3.6 Tahové zkoušky

Mechanické vlastnosti byly stanoveny pomocí trhacího přístroje INSTRON 8871 dle technické normy: ČSN EN ISO 527-3. Tahové zkoušky byly provedeny při 25 °C a rychlost posunu čelistí byla 1 mm \cdot min⁻¹. Ve zkušebním stroji na zkušební tělíska působila pomalu se zvyšující síla až do přetržení materiálu. Byla zaznamenána závislost mezi deformací vzorků a působící silou.

3.3.7 Mikroskopické metody

Pomocí optické mikroskopie byl sledován úbytek škrobu ve vzorcích kopolyesteru plněného škrobem. Lugolův roztok barví škrob díky interakci aniontu I³⁻ se šroubovicovou strukturou polysacharidů (Lányi, 1988). Byly také sledovány trhliny v materiálu a zbytky bakteriálních filament (barveno safraninem. Safranin barví primárně kyselé látky jako nukleové kyseliny a polysacharidy (Alef a Nannipieri, 1995). Vzorky byly před samotným pozorováním obarveny, promyty a poté pozorovány pomocí optického mikroskopu Olympus IX 53 při různých zvětšeních.

Rastrovací elektronová mikroskopie (VEGA IILMU) byla použita k pozorování změn na povrchu filmů v průběhu biodegradace. Všechny použité vzorky byly potaženy tenkou vrstvou Au/Pd. Mikroskop pracoval ve vysokém vakuu a při napětí 5 kV. Pozorování pomocí SEM byla provedena ve spolupráci s Ing. Petrem Stloukalem, Ph.D.

3.3.8 Gelová permeační chromatografie

Na analytických vahách bylo s přesností $\pm 0,00001$ g naváženo 0,004 g vzorku a rozpuštěno v 1 ml tetrahydrofuranu. Rozpuštěním materiálu v tetrahydrofuranu došlo k separaci kopolyesteru od škrobu z jejich směsi a mohly tak být analyzovány změny molekulových hmotností samotného kopolyesteru v obou testovaných materiálech. Molekulová hmotnost a distribuce byly sledovány pomocí GPC na Breeze Chromatographic System (Waters) vybaveném kolonou PLgel Mixed-D (300×7,8 mm, 5 μ m, Polymer Laboratories, Ltd.) a detektorem Dual Absorbance Detector (Waters). Analýza probíhala při 25 °C, průtok kolonou byl 1 ml . min⁻¹. Data byla zpracována za použití Waters Breeze GPC software (Waters). Měření byla provedena ve spolupráci s Ing. Petrem Stloukalem, Ph.D.

3.3.9 Kalorimetrie

Na analytických vahách bylo do uzavřeného hliníkového kelímku přesností $\pm 0,0001$ g naváženo 0,007 g kopolyesteru a kopolyesteru ve směsi se škrobem. Krystalinita vzorků byla měřena na přístroji Mettler Toledo DSC1 systém. Měření probíhala v dusíkové atmosféře, průtok byl 50 cm³ . min⁻¹. Nejprve došlo k zahřátí vzorku z 20 °C na teplotu 200 °C, a to rychlostí ohřevu 10 °C . min⁻¹. Následně došlo k postupnému zchlazení vzorku z teploty 200 °C na 20 °C, rychlost chlazení 20 °C . min⁻¹. Poté byl vzorek chlazen na 0°C po dobu 5 minut a opětovně zahříván na 200 °C 10 °C . min⁻¹. Teplota tání a entalpie tání byly změřeny během prvního cyklu zahřívání vzorku. Procento krystalinity bylo vypočteno dle rovnice:

$$\chi_c = \left(\frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \right) \times 100$$

kde:

ΔH_m entalpie tání

ΔH_m^0 tabulková hodnota entalpie tání pro Ecoflex se 100 % krystalinitou (115 J.g⁻¹) (Morita *a kol.*, 2012).

Měření byla provedena ve spolupráci s Ing. Petrem Stloukalem, Ph.D.

3.4 Hydrolýza vybraných polyesterů ve vodném prostředí

Experimenty sledující hydrolytickou degradaci polyesterů ve vodném prostředí probíhaly ve spolupráci s diplomovou prací Ing. Jiřího Černohouse.

3.4.1 Příprava degradačních testů

Degradační testy probíhaly ve fosfátovém pufru. Bylo naváženo 6,805 g KH_2PO_4 s přesností 0,0001g a doplněno sterilní destilovanou vodou do 1 l. Puffer byl následně zneutralizován pomocí 10M NaOH na hodnotu $\text{pH} = 7$. Po zneutralizování byly do pufru přidány 2 g NaN_3 pro potlačení růstu mikroorganismů. Z takto připraveného pufru bylo do každé lahve o objemu 500 ml odměřeno 100 ml a naváženo 0,1 g testovaného materiálu. Přesné navážky polyesterů byly zaznamenány a sloužily k výpočtu úbytku hmotnosti na konci experimentu.

Pro experiment byly lisováním připraveny fólie PBS, PBSA, PBAT a polybutylenu (PBT). Teploty, při kterých probíhala lisování jednotlivých polymerů, byly zvoleny tak, aby byly o cca 30 °C vyšší než teploty tání jednotlivých polymerů. Hodnoty teplot tání byly dodány výrobcem (PBS=115 °C, PBSA=94 °C, PBAT=125 °C, PBT=225 °C). Tloušťka všech vyrobených polyesterových fólií byla 140 μm .

3.4.2 Stanovení rozpuštěného organického uhlíku

Vzorky fólií a filtrátů pufru po hydrolýze byly odebírány během 130 dnů inkubace. Analýza probíhala na přístroji Shimadzu 5000A. Filtráty byly do doby analýzy uchovány v mrazáku. S ohledem na teplotu, při které hydrolýza probíhala a dobu expozice vzorků byly pro analýzu celkového organického uhlíku (TOC) zvoleny vhodná ředění odebraných vzorků. Pro teplotu 37 °C bylo zvoleno ředění 1:1, pro teplotu 58 °C 1:2 a pro teplotu 70 °C 1:5. Celkový objem vzorku pro analýzu TOC činil v každé vialce 6 ml. Kapalný vzorek byl za pomoci dávkovače nastříknut do reaktoru o teplotě 680 °C opatřeným platinovým katalyzátorem, na kterém došlo k oxidaci organického a anorganického uhlíku (IC) na CO_2 . Oxid uhličitý byl následně unášen proudem kyslíku do infračerveného detektoru. V detektoru došlo k absorpci infračerveného záření o dané vlnové délce. Tato odezva byla registrována jako peak. Výška peaku byla přímo úměrná koncentraci TC (celkového uhlíku) ve vzorku. Při stanovení IC docházelo k tomu, že tentýž vzorek určený pro analýzu byl v proudu kyslíku nastříknut do kyseliny fosforečné, čímž došlo k vytěsnění CO_2 . TOC byl vypočítán z rozdílu TC a IC.

3.4.3 Zpracování dat naměřených pomocí analyzátoru TOC

Výpočet stupně hydrolyzy vzorků polyesterů

$$H = \frac{C_{TOC} \times V_l}{m \times w_C} \times 100$$

kde:

H = hydrolytický stupeň [%]

C_{TOC} = koncentrace celkového organického uhlíku obsaženého v kapalně fázi po hydrolyze [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]

m = hmotnost vzorku polyesteru použitého při hydrolyze [mg]

w_C = obsah uhlíku v testované polyesterové fólii [%]

V_l = celkový objem kapalné fáze v inkubační lahvi (tj. 100 ml) [l]

3.4.4 Stanovení úbytku hmotnosti

Fólie byly po skončení experimentu, vysušeny v exsikatoru a zváženy na analytických vahách ($d=0,0001$ g). Byl vypočítán úbytek hmotnosti.

3.5 Identifikace degradérů PBAT v půdách pomocí molekulárně biologických metod

Optimalizace izolace DNA a PCR byla provedena ve spolupráci s diplomovými pracemi Ing. Denisy Pavlíkové a Ing. Radky Žákové.

3.5.1 Odběr vzorků půd

Vzorky půd byly odebrány ze svrchní vrstvy v max. hloubce 20 cm. Vzorky byly odebrány ze 41 parcel z okolí Zlína a do doby analýzy uloženy v PE sáčcích při teplotě 6,6 °C.

3.5.2 Charakteristika půd

Byla provedena charakterizace vzorkovaných půd dle bonitové půdně ekologické jednotky (BPEJ). U vzorků půd bylo stanoveno pH dle ČSN ISO 10390 (836221). pH bylo měřeno pomocí skleněné elektrody v suspenzi půdy v roztoku chloridu draselného s koncentrací $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (pH-KCl). Poměr půdy a suspenzní kapaliny byl 1:5. Sušina byla stanovena dle ČSN 72 1110.

3.5.3 Pre-inkubace degradérů PBAT

V tomto testu byly použity skleněné lahve s objemem 500 ml. Lahve byly připraveny dle metodiky uvedené v Kapitole 3.3.2. Do každé lahve bylo dávkováno 15 g půdy proseté skrz 2 mm síto, 2 g perlitu, 2 ml suspenze PBAT

a směs byla ovlhčena na 50 %. Vzorkovnice byly inkubovány po dobu 64 dní v 58 °C.

3.5.4 Získání kultur degradérů PBAT

Suspenze mikroorganismů byla získána extrakcí vzorků půd před a po pre-inkubaci do suspenzačního roztoku. Daný objem byl rozetřen pomocí sterilní skleněné hokejky. Takto zaočkovaná živná média byla na 10 dní umístěna do termoboxu s udržovanou teplotou 58 °C. Po 10 dnech byly pomocí metody prosvětlených zón stanoveny kolonie degradérů kopolyesteru. Prosvětlené zóny signalizovaly degradaci polymeru, který tvořil v agaru mléčné zbarvení.

Z každé misky byla vybrána vhodná kolonie, která byla dále přeočkována na nové médium se suspenzí PBAT. Kolonie byly přeočkovány vždy minimálně 3× než bylo přistoupeno ke kultivaci většího množství biomasy pro izolaci DNA.

3.5.5 Izolace DNA z kultur degradérů PBAT

Bylo testováno více metod izolace DNA degradérů PBAT-komerční kity PowerSoil DNA Isolation Kit a High Pure PCR Template Preparation Kit, mechanická lyze, lyze pomocí lysozymu, proteinázy K či lyze varem.

Při použití PowerSoil DNA Isolation Kit byla bakteriální biomasa dávkována do rozbíjecích zkumavek s pufrům chránícím nukleové kyseliny před degradací. Působení anionického tenzidu dodecylsírany sodného (SDS) spolu s dalšími činidly a skleněnými kuličkami vedlo k lyzi buněčné stěny. Kit obsahoval také činidla pro vysrážení kontaminantů z roztoku. Čistá DNA se po přidavku vysoce koncentrovaného solného roztoku navázala na křemičitou membránu, poté byla promývána roztokem s přidavkem ethanolu. Posledním krokem byla samotná eluce DNA.

Při mechanické lyzi byly k suspenzi bakteriální biomasy v PCR vodě přidány sterilní skleněné kuličky, směs byla třepána na kulovém mlýnu a poté centrifugována. Supernatant byl přenesen do sterilní Eppendorfovy zkumavky.

Dále byl pro izolaci DNA použit enzym lysozym, který svým působením narušil buněčnou stěnu. Byl připraven zásobní roztok, 10 mg lysozymu na 1 ml sterilní vody. Poté byla do sterilní mikrozkušavky nadávkována PCR vody, do té byla následně kličkou přenesena biomasa degradérů PBAT. Směs byla promíchána na vortexu a bylo přidáno 30 µl zásobního roztoku lysozymu. Směs byla vortexována a centrifugována. Supernatant byl přenesen do sterilní Eppendorfovy zkumavky.

Při izolaci pomocí proteinázy K bylo do sterilní Eppendorfovy zkumavky nadávkováno 50 µl sterilní vody (dle doporučení výrobce proteinázy K), do té

byla následně kličkou přenesena biomasa degradérů PBAT. Směs byla promíchána na vortexu.

Následovaly dvě varianty provedení experimentu:

a) Bylo přidáno 2,8 μl zásobního roztoku proteinázy K (1 mg \cdot ml⁻¹) spolu s 10 sterilními skleněnými kuličkami. Směs byla zahřívána v termobloku při 70 °C po dobu 10 minut. Následně byla ochlazena na pokojovou teplotu. Směs byla poté třepána na kulovém mlýnu a centrifugována. Supernatant byl přenesen do Eppendorfovy zkumavky.

b) Bylo přidáno 5 μl zásobního roztoku proteinázy K (1 mg \cdot ml⁻¹) spolu s 10 sterilními skleněnými kuličkami. Směs byla zahřívána v suchém termobloku při 39,5 °C po dobu 1 hodiny a vortexována. Poté byla znovu inkubována, ale již při 70 °C po dobu 10 minut. Následně byla směs ochlazena na pokojovou teplotu. Poté byla směs třepána na kulovém mlýnu, centrifugována a supernatant byl přenesen do Eppendorfovy zkumavky.

Při lyzi varem bylo do sterilní Eppendorfovy zkumavky nadávkováno 20 μl Y-PER pufru, do té byla následně sterilní špičkou mikropipety nebo sterilním párátkem přenesena biomasa degradérů PBAT. Suspenze byla vortexována a následně inkubována při 98 °C po dobu 5 minut. Dále byla provedena centrifugace a supernatant byl přenesen do Eppendorfovy zkumavky.

K izolaci bakteriální DNA ze vzorků půdy byla použita metoda chloroform/izoamylalkohol v poměru 24:1 (Roux, 1995). Do sterilní mikrozkušavky byla nadávkována sterilní destilovaná voda, kličkou přenesena biomasa degradéru kopolyesteru, dále byl přidán chloroform/izoamylalkohol, směs byla vortexována a dále centrifugována při 4 °C. Bylo odebráno 20 μl supernatantu z horní vodné vrstvy, která obsahovala izolovanou DNA.

3.5.6 Polymerázová řetězová reakce I

Po izolaci bakteriální DNA byla provedena PCR, reakční směs obsahovala vzorek templátové DNA získané jednou z výše uvedených metod, sadu dvou primerů, sterilní vodu pro molekulární biologii, mastermix (GoTaq® Hot Start Green MasterMix) obsahující složky potřebné k amplifikaci DNA a případně přídavek psoralenu. PCR reakční směs byla připravována v reakčních objemech 20 μl dle následujícího rozpisu (Tabulka 3.2). Případně byl dále navyšován objem pro potřeby navazujících metod. Každá reakční směs byla připravována v aseptickém prostředí PCR boxu.

Tabulka 3.2: Složení PCR směsi.

Komponent	Objem (μl)
PCR voda	7
Master mix	10
Forward primer (5×ředěný zás. roztok)	1
Reverse primer (5×ředěný zás. roztok)	1
Templátová DNA	1

Pro první PCR byly použity vnější primery fD1, rD1, produkt byl dále amplifikován s využitím vnitřních primerů 341F GC a 907R. Primer 341F GC obsahoval tzv. GC svorku, což je úsek bohatý na páry guaninu a cytosinu, které zabraňují úplné denaturaci řetězce DNA a udrží ji tak v polyakrylamidovém gelu (Muyzer *a kol.*, 1993). Použití primerů fD1 a rD1, které zahrnují větší úsek DNA, vede k lepšímu výsledku než přímé použití primerů s GC svorkou. Takto provedená PCR se nazývá nested PCR. Primery použité v této práci jsou uvedeny v Tabulce 3.3.

Tabulka 3.3: Primery použité v disertační práci.

Název primeru	Sekvence	Výrobce
fD1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	SIGMA
rD1	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC	SIGMA
341F	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG	SIGMA
907R	5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	SIGMA
341F GC *	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG	SIGMA
518R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG	SIGMA
S-C-Act-235	5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	East Port
S-C-Act-878	5'-CCGTAGTCCCCAGGCGGGGG	East Port

* Primer obsahující v sekvenci GC svorku = CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG.

V této práci byly prováděny také optimalizace PCR, proto následující metodika obsahuje rámcový popis použitých metod. Nastavení PCR, které bylo po optimalizaci použito pro amplifikaci DNA degradérů kopolyesteru je popsáno ve výsledkové části práce.

U teplot a časů v rozpisu jednotlivých kroků PCR metod byl uveden rozsah hodnot. Tyto hodnoty uvádí oblast, ve které byly provedeny testy v rámci optimalizací (Tabulka 3.4 a Tabulka 3.5).

PCR metoda bez modifikací byla v této práci označena jako „klasická“ z důvodu odlišení od použitých modifikací v této práci, tedy lepší přehlednosti.

Tabulka 3.4: Nastavení klasické PCR.

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94-95 °C	4-7 min	
Denaturace	94-95 °C	1 min	20-35
Annealing	50-56 °C	1 min	
Elongace	72 °C	1– 1,5 min	
Závěrečná amplifikace	72 °C	10 min	1

V průběhu optimalizace byla využívána tzv. touchdown PCR. Při ní byla v prvních cyklech annealingu směs zahřívána na vyšší teplotu, než je ideální teplota pro annealing konkrétních primerů.

Tabulka 3.5: Nastavení touchdown PCR.

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94-95 °C	2 min	9
Denaturace	94-95 °C	30 s	
Annealing	57-61 °C	1 min	
Elongace	72 °C	1– 1,5 min	
Denaturace	94-95 °C	30 s	20-35 -0,5 °C/cyklus
Annealing	52-56 °C	30 s	
Elongace	72 °C	1– 1,5 min	
Závěrečná amplifikace	72 °C	10 min	1

Nastavení pro optimalizaci druhého kroku nested PCR s vnitřními primery byla upravena dle klasické PCR.

Po každé PCR byla pro kontrolu průběhu reakce a čistoty produktů provedena také agarosová gelová elektroforéza. Nejdříve byl připraven 1% agarosový gel s přídavkem Ethidiumbromidu (ETB), po ztuhnutí byly nadávkovány PCR produkty a elektroforetická soustava byla připojena k napětí 95 V po dobu 30 minut. Při každé elektroforéze byl pro odhad velikosti a koncentrace produktů použit marker BioTech1600bp. Dále byl gel vložen do UV-transluminátoru a osvětlen UV zářením. Ethidiumbromid interkalovaný mezi báze DNA emitoval po ozáření světlo, čímž byla vizualizována DNA. Výsledek byl zaznamenán pomocí digitální kamery a programu GeneShap ve formátu fotografie.

3.5.7 Denaturační gradientová gelová elektroforéza I

Pro sledování konsorcia mikroorganismů byly vzorky dávkovány do polyakrylamidového gelu s různou zvyšující se koncentrací denaturačních složek. Byly testovány koncentrace 30-60 %, 30-70 %, 40-70 %, 20-80 % a 40-80 %. Složení roztoků pro přípravu polyakrylamidového gelu je uvedeno v Tabulce 3.6. Pro polymeraci byly použity tetramethylethylenediamin (TEMED) a peroxodisíran amonný (APS).

Tabulka 3.6: Složení roztoků pro přípravu polyakrylamidového gelu.

Chemikálie	Gradient denaturačních činidel (%)					
	20	30	40	60	70	80
Močovina [g]	8,4	12,6	16,8	25,2	29,4	33,6
Formamid [ml]	8	12	16	24	28	32
50× TAE Pufř [ml]	2	2	2	2	2	2
40% Akrylamid [ml]	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8
Destilovaná voda [ml]	Pro doplnění každého do 100 ml					

Na soustavu byla v rámci optimalizace vkládána různá napětí (90, 120 a 130 V) a elektroforéza probíhala po různě dlouho dobu (8, 15, 16,5 hodin). Polyakrylamidový gel byl barven pomocí fluorescenčního barviva GelRed (Biotium). Do barvicí vany bylo připraveno 500 ml roztoku barviva v TAE pufřu o koncentraci $50\mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$. Polyakrylamidový gel byl vložen do polypropylenové vany s barvicím roztokem a míchán při $450 \text{ RPM} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 1 hodiny. K zobrazení a zachycení výsledku byl využit transluminátor. Barvivo GelRed je strukturálně úzce příbuzné s ethidiumbromidem, sestává ze dvou ethidových podjednotek. Toto barvivo je ve srovnání s Ethidiumbromidem méně toxické a citlivější (Huang *a kol.*, 2010). Výsledek byl zaznamenán pomocí digitální kamery a programu GeneShap ve formátu fotografie.

Bandy byly vyřezány z gelu a rozpouštěny přidavkem sterilní vody a skleněných kuliček. Směs byla vortexována a následně umístěna do lednice, kde došlo k volnému rozpouštění gelu a uvolnění DNA do roztoku.

3.5.8 Následná polymerázová řetězová reakce a purifikace I

Poté byla provedena PCR reakce s DNA získanou vyřezáním bandů z gelu po DGGE. Byly použity primery 341F a 907R. Vzhledem k tomu, že po PCR byla amplifikovaná DNA dávkována do 2% agarosového gelu, ve kterém došlo během elektroforézy k účinnému oddělení nespecifických produktů, mohly být PCR cykly opakovány až 40 ×. Tyto optimalizace jsou uvedeny v Tabulce 3.7.

Tabulka 3.7: Nastavení programu následné PCR.

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94-95 °C	4-7 min	1
Denaturace	94-95 °C	1 min	30 – 40
Annealing	50-56 °C	1 min	
Elongace	72 °C	1 min-1,5 min	
Závěrečná amplifikace	72 °C	10 min	1

Dále byla provedena elektroforéza. Vzhledem k výskytu nespecifických produktů byly příslušné bandy vyřezány z gelu a purifikovány pomocí komerčního kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid). Chaotropická sůl spolu s denaturačními enzymy rozpustila agarosový gel. Fragmenty DNA byly zachyceny na kolonce a kontaminanty odstraněny promývacím pufrem obsahujícím ethanol, který byl poté z kolonek odpařen pomocí centrifugace. Fragmenty DNA byly poté eluovány pufrem.

3.5.9 Sekvence a vyhodnocení výsledků I

Koncentrace a čistota (poměr absorbancí 260/280 nm = poměr nukleových kyselin ku proteinům) eluované DNA byla změřena na UV/VIS spektrometru TECAN Infinite® 200 PRO NanoQuant. Před přípravou sekvenační směsi byly vzorky odpařeny a doplněny PCR vodou na objem 10 µl. Sekvenační směs byla připravena smícháním 1,25 µl primeru 907R o koncentraci 20 ng · µl⁻¹ a 8,75 µl PCR vody s DNA o koncentraci minimálně 5 ng · µl⁻¹. Sekvenační směsi byly zaslány do firmy SEQme s.r.o. a sekvenovány pomocí Sangerova sekvenování. Výsledné sekvence byly upraveny pomocí programu DNA Baser a Finch TV. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí databáze BLAST (National Library of Medicine).

Byla také provedena fylogenetická analýza a pomocí programu Jalview. Metodou neighbor joining byl sestaven fylogenetický strom (Troshin *a kol.*; Waterhouse *a kol.*, 2009). Fylogenetický strom je grafické zobrazení připomínající strom, kterým jsou znázorněny příbuzenské vztahy mezi taxonomickými jednotkami. V této práci byl sestaven na základě fragmentů sekvencí genu 16S rRNA. Metoda neighbor joining vychází z hvězdicového fylogenetického stromu, kde mají všechny organismy stejnou vzdálenost od společného předka. V rámci fylogenetické analýzy byla také provedena analýza hlavních komponent. Analýza hlavních komponent je mnohovariační analýza, která konstruuje proměnné, jež mohou být použity při zkoumání variability mezi jedinci v daném souboru (Wold *a kol.*, 1987).

3.6 Molekulárně biologická analýza bakteriálních konsorcií na lokalitách kontaminovaných BTEX a leteckým petrolejem

Byla provedena molekulárně biologická analýza bakteriálních konsorcií na lokalitách, kde byly pro podporu růstu mikroorganismů aplikovány základní nutrienty a terminální akceptory elektronů. Aplikace tzv. stimulačních roztoků by měla vést k podpoře degradérů a snížení koncentrace benzenu, toluenu, ethylbenzenu a xylenů (BTEX) a ropných uhlovodíků.

Aplikace nutrientů a terminálních akceptorů elektronů na kontaminovaných lokalitách byla zajištěna firmou EPS biotechnology s.r.o., stejně tak odběr vzorků a jejich dodání k molekulárně biologické analýze.

3.6.1 Aplikace nutrientů a terminálních akceptorů elektronů

V rámci remediace postižených lokalit byly cíleně stimulovány autochtonní anaerobní mikroorganismy, a to pomocí aplikace nutrientů (dusík a fosfor) a vhodného terminálního akceptoru elektronů. Striktně anaerobní i fakultativně anaerobní mikroorganismy využívají při respiraci v prostředí bez kyslíku náhradní akceptory elektronů (NO_3^- , Fe^{3+} , Mn^{4+} , SO_4^{2-}), jejichž množství je spolu s nedostatkem základních nutrientů pro bakteriální konsorcia limitujícím faktorem.

Nutrienty i terminální akceptory elektronů byly na lokalitě kontaminované BTEX aplikovány pomocí aplikačních sond formou koncentrovaných roztoků. Fosfor byl aplikován ve formě PO_4^{3-} a dusík ve formě NH_4^+ . K aplikaci dusíku a fosforu bylo využito technických chemikálií NP-sol a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Poměr mezi základními nutrienty C:N:P byl 100:10:1. Jako zdroj terminálního akceptoru elektronů byly využívány ionty NO_3^- , které byly aplikovány ve formě KNO_3 . Na lokalitě byl zachován vhodný poměr terminálního akceptoru elektronů ku koncentraci zdroje uhlíku. Na 1 mol zdroje uhlíku bylo aplikováno 6 molů NO_3^- .

Během pilotních testů byla zjištěna odolnost autochtonních mikroorganismů ke změnám fyzikálně-chemických parametrů prostředí (teplota, pH). Důležitým limitujícím faktorem byl ale rozpuštěný kyslík, jehož koncentrace by neměla přesáhnout $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Na lokalitě kontaminované leteckým petrolejem bylo opět pro podporu růstu autochtonních anaerobních mikroorganismů využito terminálních akceptorů elektronů. Na rozdíl od lokality kontaminované BTEX, byly ale do dvou vrtů aplikovány samotné dusičnany a do dvou vrtů komplexní činidlo, které se skládalo z NO_3^- , SO_4^{2-} a Fe^{3+} .

3.6.2 Odběr vzorků z vrtů a jejich značení

Na odběrových místech na lokalitě kontaminované BTEX byl vyhodnocen stav bakteriálního společenstva těsně před aplikací (1), v době aplikace (2) týden po poslední aplikaci (3) a jeden měsíc po poslední aplikaci (4) nutrientů

a terminálního akceptoru elektronů. Vzorky byly odebírány v aplikačním období (červen, září) a také v post-sanačním období (listopad). Vrt **NK1** byl vybrán jako kontrolní, bez vlivu aplikace živin. Kontaminace BTEX ve vrtech stoupala v pořadí **(A)<(B)<(C)**. Toto pořadí bylo dodrženo při dávkování vzorků do polyakrylamidového gelu.

Na lokalitě kontaminované leteckým petrolejem bylo pro aplikaci terminálních akceptorů elektronů a odběr vzorků vybráno několik vrtů, **NK 2** (nekontaminované pozadí), dále **PK** (kontaminované pozadí), **N_A** a **N_B** (aplikace dusičnanů) a **KČ_A**, **KČ_B** (aplikace komplexního činidla). Byly připraveny 2 gely, první obsahoval DNA izolovanou ze vzorků NK 2, PK, N_A a KČ_A. Na druhý gel byla nanášena DNA NK 2, PK, N_B a KČ_B (značení v Tabulce 3.8).

Tabulka 3.8: Značení vzorků odebraných z lokalit kontaminovaných leteckým petrolejem.

	NK 2	PK	KČ_A	KČ_B	N_A	N_B
	Nekontam. pozadí	Kontam. pozadí	Aplikace komplexního činidla		Aplikace dusičnanů	
Pořadí na gelu	Datum odběru		Doba odběru			
1.	15. 6. 2017	15. 6. 2017	7 týdnů před aplikací 15. 6. 2017		5 týdnů před aplikací 15. 6. 2017	
2.	x	18. 7. 2017	x		Den aplikace 18. 7. 2017	
3.	31. 7. 2017	31. 7. 2017	Den aplikace 31. 7. 2017		2 týdny po aplikaci 31. 7. 2017	
4.	22. 8. 2017	22. 8. 2017	3 týdny po aplikaci 22. 8. 2017		5 týdnů po aplikaci 22. 8. 2017	
5.	18. 9. 2017	18. 9. 2017	7 týdnů po aplikaci 18. 9. 2017		9 týdnů po aplikaci 18. 9. 2017	

3.6.3 Izolace DNA ze vzorků z lokalit kontaminovaných BTEX a leteckým petrolejem

Vzorky odebrané z aplikačních vrtů byly nejprve centrifugovány a DNA byla izolována z pevného podílu pomocí kitu PowerSoil DNA Isolation Kit. Izolace tímto kitem byla popsána v Kapitole 3.5.5. Koncentrace a čistota izolované DNA byla změřena na UV/VIS spektrometru TECAN Infinite® 200 PRO NanoQuant.

3.6.4 Polymerázová řetězová reakce II

Izolovaná DNA byla amplifikována pomocí nested PCR. První PCR, jejíž průběh byl upraven na touchdown, byla provedena s vnitřními primery fD1, rD1. Druhá PCR byla provedena s vnitřními primery 341F GC a 907R. Optimální nastavení programu bylo vybráno pomocí testování nastavení uvedených v Kapitole 3.5.6. Tato nastavení PCR programu byla optimalizována pro amplifikaci DNA vzorků s velkou bakteriální diverzitou.

3.6.5 Denaturační gradientová gelová elektroforéza II

Pro polyakrylamidový gel byla po sérii pokusů zvolena jako nejvhodnější koncentrace denaturačních činidel 20-70 %. Při této koncentraci došlo k nejlepšímu a nejostřejšímu rozdělení jednotlivých bandů. Dále byly testovány koncentrace 30-70 % a 20-80 %, ale výsledné bandy byly buď neostré, nebo příliš tenké a nešly tedy z gelu vyřezat. Do soustavy bylo vloženo napětí 90 V a elektroforéza probíhala po dobu 16,5 hodin. DNA byla v gelu obarvena pomocí barviva Gel Red. Bakteriální diverzita ve vzorcích byla velmi vysoká, proto bylo problematické od sebe oddělit jednotlivé bandy, byly tedy vyřezány jen ty, u kterých došlo v období aplikace nutrientů a terminálního akceptoru elektronů ke změně intenzity. Tyto bandy byly třepány s PCR vodou a skleněnými kuličkami a přes noc ponechány v lednici.

3.6.6 Následná polymerázová řetězová reakce a purifikace II

Následná PCR reakce byla nastavena dle optimalizací uvedených v Kapitole 3.5.8. Bandy obsahující DNA byly poté vyřezány z 2% agarosového gelu, a purifikována pomocí Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid).

3.6.7 Sekvence a vyhodnocení výsledků II

Poté byly připraveny sekvenační směsi dle metodiky uvedené v Kapitole 3.5.9 a zaslány k sekvenaci do firmy SEQme s.r.o. Sekvence byly upraveny pomocí programu DNA Baser a Finch TV. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí databáze BLAST (National Library of Medicine).

4. VÝSLEDKY

V první části disertační práce byla sledována biodegradace alifatického aromatického kopolyesteru polybutylen adipát tereftalátu společně se směsí tohoto kopolyesteru se škrobem v půdě za mezofilních podmínek. Měřením produkce oxidu uhličitého byla charakterizována míra a rychlost mineralizace obou materiálů. Změny na povrchu materiálů byly sledovány mikroskopicky, byly také měřeny změny v mechanických vlastnostech a molekulové hmotnosti během biodegradace. Byla sledována také abiotická hydrolýza několika polyesterů (mj. PBAT) při různých teplotách, byla měřena produkce organického uhlíku v kultivačním médiu a stanoveny úbytky hmotnosti testovaných materiálů. Na tuto část práce bylo navázáno také využitím molekulárně-biologických metod. Bylo izolováno degradační konsorcium kopolyesteru a po optimalizaci izolace DNA a metody PCR-DGGE byly identifikovány jeho členové. V poslední části se práce zabývá především analýzou konsorcia bakterií na lokalitách kontaminovaných BTEX a leteckým petrolejem a optimalizací metody PCR-DGGE pro vzorky s vysokou bakteriální diverzitou.

4.1 Biodegradace alifatického aromatického kopolyesteru

V této části práce byla po dobu 100 dní sledována biodegradace fólií PBAT a směsi tohoto kopolyesteru se škrobem v půdních bioreaktorech při 25 °C.

4.1.1 Základní fyzikálně-chemické a mikrobiologické parametry půd

Testované půdy patřily mezi běžné půdy vyskytující se v České Republice. Půdy byly odebrány z lokalit využívaných k dlouhodobému a intenzivnímu zemědělství a je možné považovat je za typické zástupce zemědělských půd. pH testovaných půd bylo stanoveno v rozmezí 6,45-6,85. Sušina půd byla u fluvizemě cca 74 %; u černozemě 83 % a u hnědozemě 85 %. Obsah těkavých látek byl ve fluvizemi cca 26 %, u černozemě 24 % a u hnědozemě 21 %. Organický uhlík byl stanoven na 2,5 % ve fluvizemi; 1,8 % v hnědozemi a 1 % v černozemi. S množstvím organického uhlíku koreluje změřené množství půdní organické hmoty, které bylo 4,3 % ve fluvizemi, 3 % v hnědozemi a 1,7 % v černozemi. Obsah částic různých velikostí byl u testovaných půd podobný. Půdy obsahovaly nejvíce částic o velikosti 0,05-0,002 mm; v rozmezí 54-60 %. Dále bylo změřeno procento částic o velikosti 2-0,05 mm (12-20 %) a částic o velikosti $\leq 0,002$ mm (25-27 %).

Základní fyzikálně-chemické charakteristiky půd jsou shrnuty v Tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: Vybrané fyzikálně chemické charakteristiky testovaných půd.

		Hnědozem	Černozem	Fluvizem
Taxonomický klasifikační systém půd ČR		Hnědozem modální na spraši	Černozem modální na spraši	Fluvizem modální na nevápnitých aluviálních sedimentech
pH (KCl)		6,85	6,72	6,45
Sušina (%)		85,23	82,64	73,79
Obsah těkavých látek (%)		20,68	23,64	25,51
C_{ox} (%)		1,77	0,97	2,50
SOM (%)		3,05	1,67	4,30
Obsah částic (%)	2-0,05 mm	20,24	12,19	17,68
	0,05-0,002 mm	53,48	60,39	57,55
	≤ 0,002 mm	26,28	27,43	24,77

C_{ox}, oxidovatelný uhlík; *SOM*, půdní organická hmota (soil organic matter).

Mikroorganismy hrají významnou roli při rozkladu organických látek v půdním prostředí, proto bylo jejich stanovení provedeno na počátku biodegradačního experimentu. Půdy obsahovaly množství mikroorganismů srovnatelné s dalšími studii (Nasrabadí *a kol.*, 2013; Eugen *a kol.*, 2015) a byly považovány za mikrobiálně aktivní.

Na TYA agaru byly stanoveny chemoorganotrofní bakterie. Inkubace půdní suspenze mikroorganismů probíhala 3 dny při teplotě 26 °C, výsledky testovaných půd se od sebe navzájem příliš nelišily. Glycerol-dusičnanový agar byl použit ke kultivaci aktinomycet. Inkubace půdní suspenze probíhala 7 dní při teplotě 25 °C. Na paralelních miskách o vhodném ředění byly počítány kolonie buněk ve tvaru větvených vláken, tvořící často hustá mycelia. Výsledky jednotlivých vzorků půd byly mezi sebou srovnatelné. Na půdním agaru s bengálskou červení a chloramfenikolem byly kultivovány půdní vláknité plísňe. Inkubace probíhala při teplotě 25 °C 7 dní. Půdní vláknité plísňe byly pozorovány jako vláknité hyfy a vatovitá mycelia. Jejich počty se v jednotlivých půdách na rozdíl od bakterií lišily v řádech.

Výsledky mikrobiologického rozboru půd jsou shrnuty v Tabulce 4.2

Tabulka 4.2: Stanovení celkových počtů hlavních skupin mikroorganismů v půdě.

Celkové počty mikroorganismů			
Typ půdy	Chemoorganotropní aerobní bakterie	Aktinomycety	Půdní vláknité houby
Hnědozem	$4,22 \cdot 10^6$	$3,40 \cdot 10^6$	$4,34 \cdot 10^4$
Černozem	$3,87 \cdot 10^6$	$2,90 \cdot 10^6$	$4,96 \cdot 10^3$
Fluvizem	$6,50 \cdot 10^6$	$5,42 \cdot 10^6$	$3,93 \cdot 10^5$

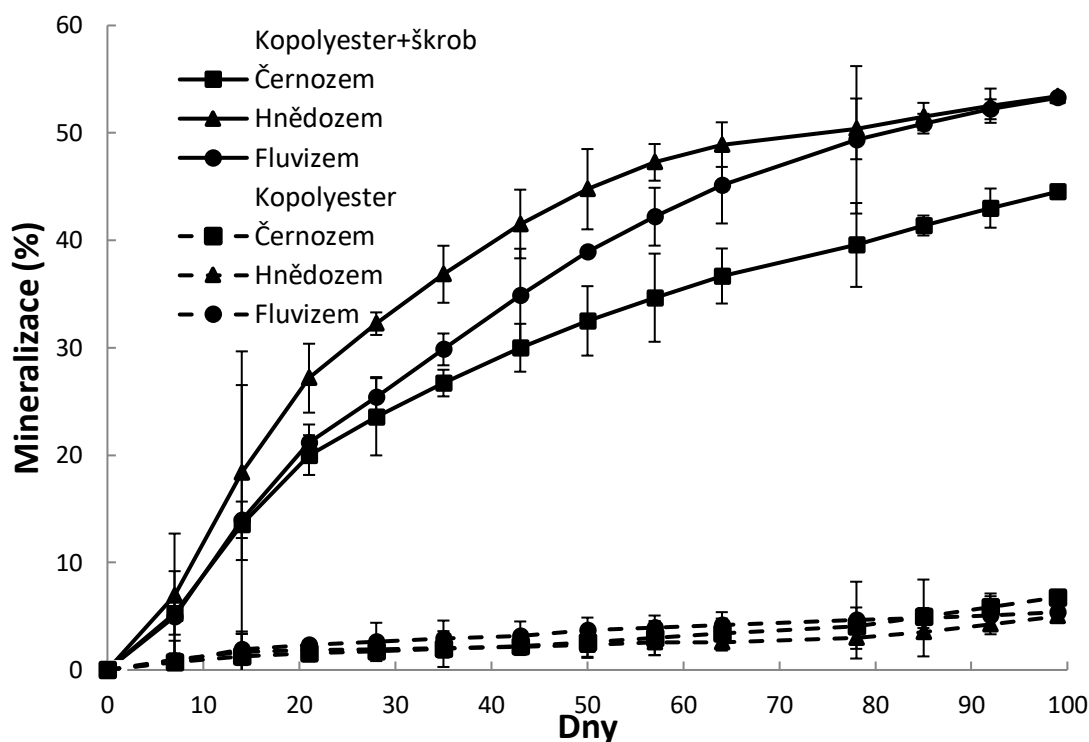
4.1.2 Biodegradace PBAT

Pokus probíhal po dobu 100 dní (14 týdnů). Plynná fáze z bioreaktorů byla odebírána v týdenních intervalech plynotěsnou injekční stříkačkou Hamilton o objemu 100 μ l a analyzována pomocí plynové chromatografie (GC/TCD). Biodegradace v půdním prostředí byla stanovena pomocí měření produkce oxidu uhličitého. Po odběru byly lahve provzdušňovány po dobu 20 minut. Oba srovnávané materiály byly kultivovány v půdách při 25 °C. Aby bylo možno statistické srovnání výsledků, k testu byly použity tři druhy půd, vždy ve třech opakováních, to umožnilo sledovat biodegradaci v širším spektru půdních prostředí a bylo tak částečně možné výsledky zobecnit.

Na Obrázku 4.1 je zaznamenána závislost mineralizace filmů Ecoflexu a Ecoflexu se škrobovým plnivem na čase v půdním prostředí. V případě čistého Ecoflexu probíhala do 40. dne pravděpodobně tzv. lag fáze, během které docházelo k pozvolnějšímu růstu produkce oxidu uhličitého. Po 40 dnech se začala rychlost biodegradace zvyšovat. Dle očekávání byla biodegradace čistého kopolyesteru omezená, po 100 dnech inkubace byl degradován z cca 6 %. Podobných výsledků bylo dosaženo i v jiných studiích, kde je popsána pouze limitovaná degradace testovaného kopolyesteru. Studie, ve které byla provedena elementární analýza PBAT, PLA a BPAT/PLA směsi po 4 měsících inkubace v reálném půdním prostředí při teplotě 23 °C uvádí, že obsah organického uhlíku klesl o 4,2 % u PBAT, o 3 % u PLA a 1,4 % u směsi PLA/PBAT (Weng *a kol.*, 2013). V další studii bylo PBAT degradováno o 10 % po 75 dnech v půdě při 30 °C (Saadi *a kol.*, 2013).

Velmi zajímavých výsledků bylo ale dosaženo při sledování biodegradace kopolyesteru se škrobem, intenzivní degradace této směsi začala již první dny experimentu, což bylo pravděpodobně způsobeno mineralizací nízkomolekulárních plastifikátorů a škrobu (Sriroth a Sangseethong, 2006; Nayak, 2010). Významným výsledkem je, že mineralizace intenzivně pokračovala i po dosažení 30 % (obsah škrobu+glycerolu byl 25 %). Po 100 dnech inkubace bylo dosaženo mineralizace filmů z 53 % pro hnědozem a fluvizem a 45 % pro černozem. Tyto výsledky dokazují, že významná frakce kopolyesteru byla mineralizována. Vzhledem ke známému složení materiálu bylo stanoveno, že PBAT byl degradován z 15-28 %. Biodegradace škrobu tedy

pravděpodobně zvětšila aktivní specifický povrch, což způsobilo větší mikrobiální aktivitu. Škrob mohl také pro degradéry kopolyesteru představovat doplňující živinu a proces mohl být formou kometabolismu. Tuto hypotézu potvrzuje fakt, že aktinomycety, které patří mezi důležité degradéry PBAT, jsou kultivovány na médiích obsahujících škrob (Kala a Chandrika, 1993; Vieira a Nahas, 2005; Du *a kol.*, 2008).



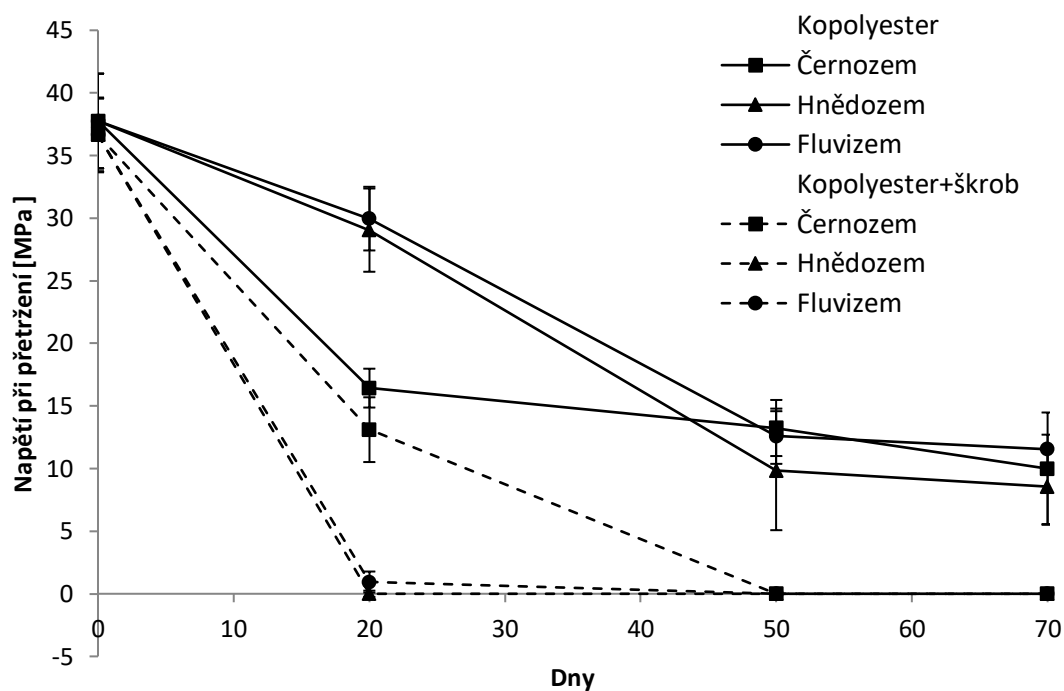
Obrázek 4.1: Mineralizace čistého Ecoflexu a Ecoflexu plněného škrobem v hnědozemi, černozemi a fluvizemi při 25 °C.

4.1.3 Změny mechanických vlastností během biodegradace

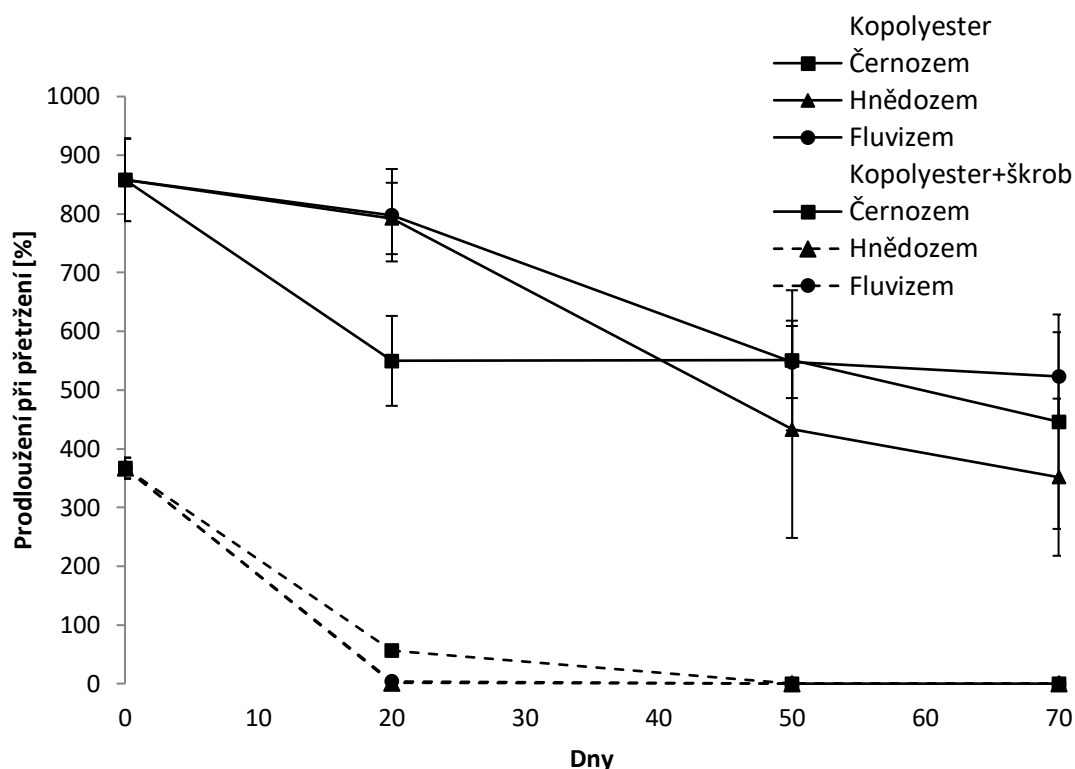
Mechanické vlastnosti materiálu a jejich změny během degradace patří mezi základní aspekty praktických aplikací. Testovaný polymer je velmi často používán v zemědělství, například jako mulčovací fólie, měl by tedy být stabilní v období použití, po kterém by měl být začleněn do půdy. V tomto období by již mechanické vlastnosti měly být výrazně ovlivněny degradací, aby došlo k rozpadu materiálu, který by měl proběhnout rychle a účinně, aby částice filmu negativně neovlivnily strukturu půdy. Za předpokladu, že z materiálu nejsou uvolňovány škodlivé látky nebo toxické produkty degradace, může další biodegradace probíhat poměrně pomalu až do dalšího sezónního použití filmů.

V rámci disertační práce byly změny mechanických vlastností sledovány během kultivace kopolyesteru PBAT a tohoto kopolyesteru ve směsi se škrobem ve vybraných půdách (Obrázek 4.2 a Obrázek 4.3). Film vyrobený z čistého kopolyesteru vykazoval během experimentálního období významné změny v mechanických vlastnostech. Pevnost v tahu se v různých půdách snížila

z 36,6 MPa na 8,5-11,5 MPa a prodloužení při přetržení kleslo z 858 % na 352-523 %, ale film si i na konci experimentu zachoval integritu a nebylo na něm patrné významné poškození. Tento výsledek souhlasí s výsledky sledování změn distribučních křivek molekulových hmotností. Kopolyester ve směsi se škrobem se v půdě rozpadl na drobné částice již po 20 dnech inkubace a jeho mechanické vlastnosti tak nemohly být dále sledovány.

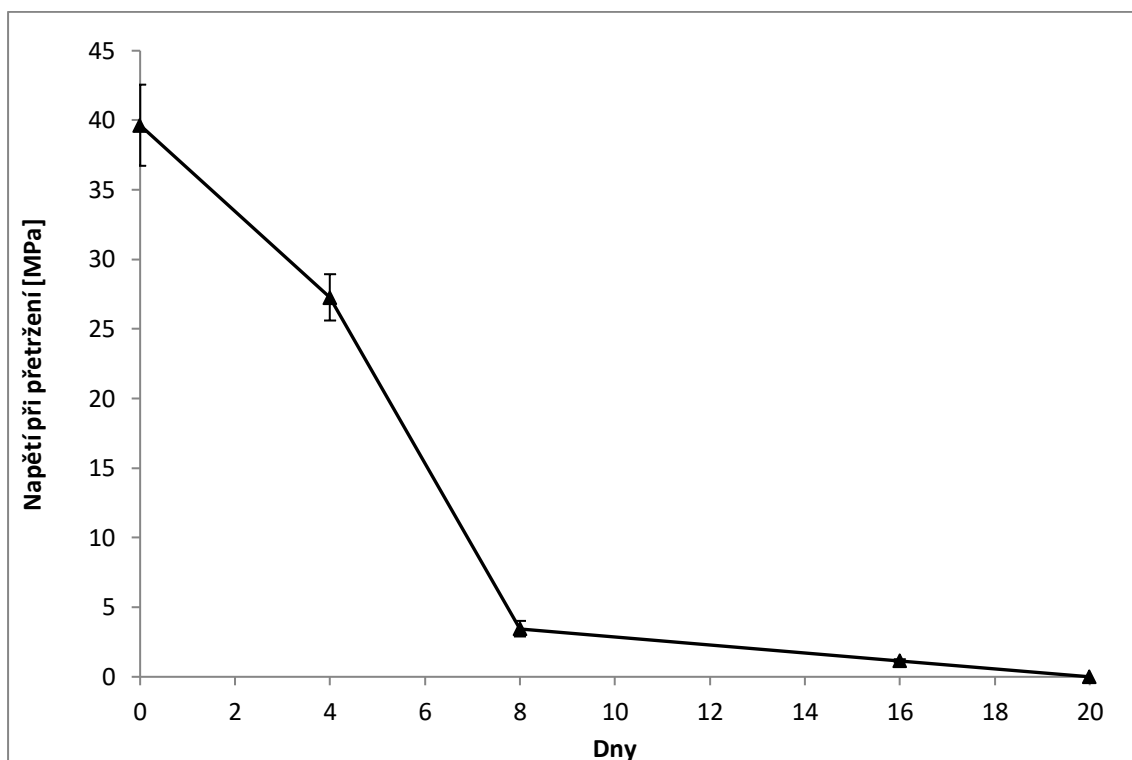


Obrázek 4.2: Vývoj napětí při přetržení čistého kopolyesteru a kopolyesteru se škrobovým plnivem během kultivace v půdě při 25°C.

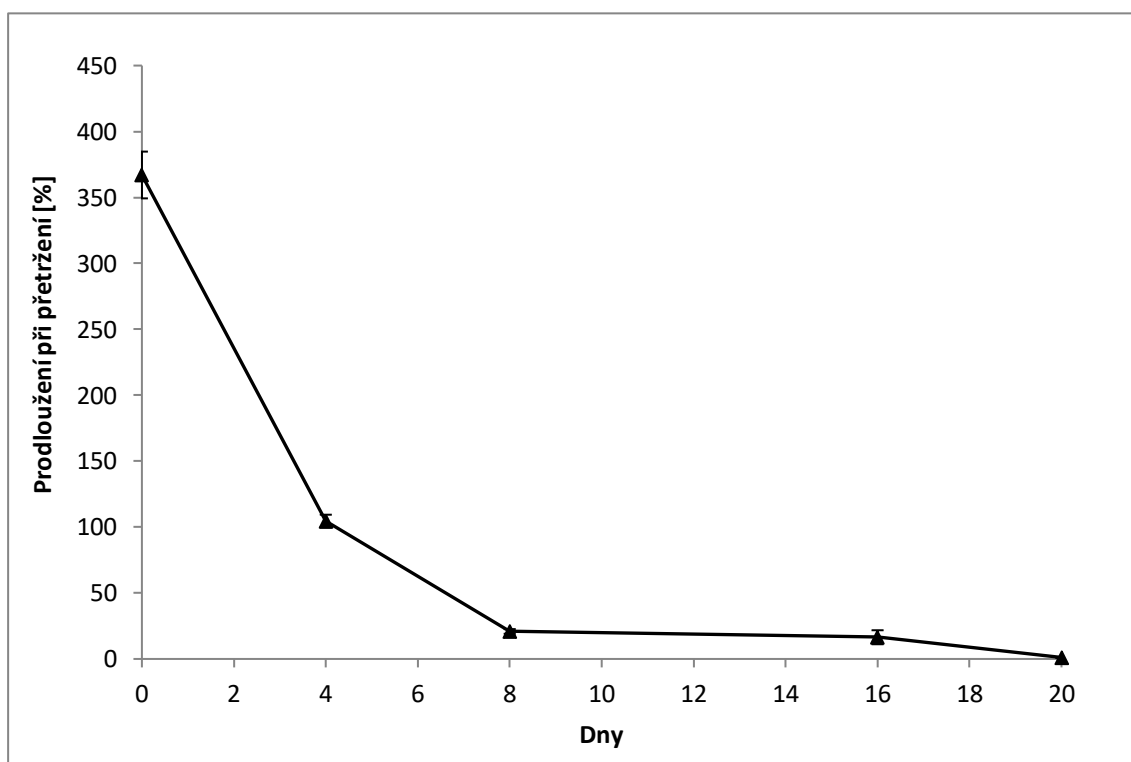


Obrázek 4.3: Vývoj prodloužení při přetržení čistého kopolyesteru a kopolyesteru se škrobovým plnivem během kultivace v půdě při 25°C.

Aby mohly být lépe a detailněji sledovány změny v mechanických vlastnostech kopolyesteru se škrobovým plnivem v prvních dnech inkubace, kdy došlo k výraznému narušení materiálu a změnám mechanických vlastností, byl proveden doplňující experiment. Lopatky Ecoflexu s plnivem byly inkubovány v hnědozemi a odebírány během prvních 20 dnů experimentu. Po 4 dnech se napětí při přetržení snížilo na 27,3 MPa, po 8 dnech na 3,5 MPa a 16. den na 1,15 MPa. Nejprudší snížení napětí při přetržení probíhalo mezi 4. a 8. dnem inkubace. Tento vývoj je patrný z Obrázku 4.4 rodložení při přetržení se po 4 dnech inkubace snížilo z 367 % na 104,5 % a po dalších 4 dnech na 20,8 %. Po 16 dnech inkubace došlo ke snížení na 16,45 %. Jak je patrné také z Obrázku 4.5, k prudkému poklesu prodloužení při přetržení došlo již během prvních 4 dnů inkubace.

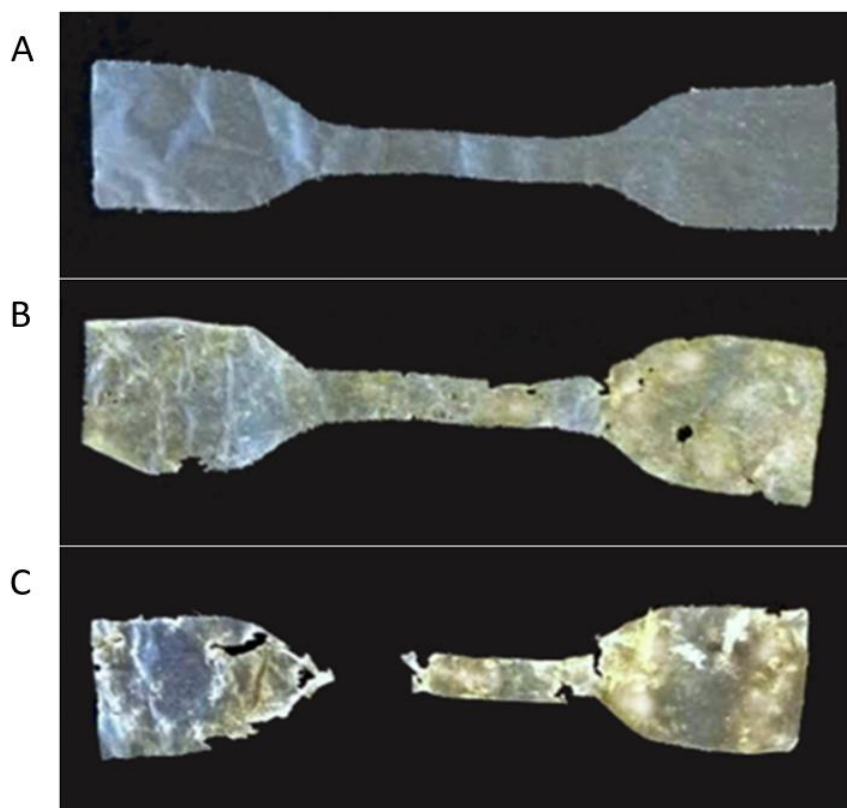


Obrázek 4.4: Vývoj napětí při přetržení kopolyesteru se škrobovým plnivem během kultivace v půdě při 25°C.



Obrázek 4.5: Vývoj prodloužení při přetržení kopolyesteru se škrobovým plnivem během kultivace v půdě při 25°C.

Při inkubaci kopolyesteru plněného škrobem došlo k rychlé změně mechanických vlastností již během prvních dní experimentu. Jeho praktické užití v zemědělství by tedy mělo být uzpůsobeno jeho rychlému rozpadu (použití při nízkých teplotách nebo po krátkou dobu). Narušení materiálu je patrné také z Obrázku 4.6 v průběhu inkubace došlo ke křehnutí a ztrátě elasticity a vytvořily se trhliny. Po 70 dnech byl již materiál v některých částech zcela rozložen.



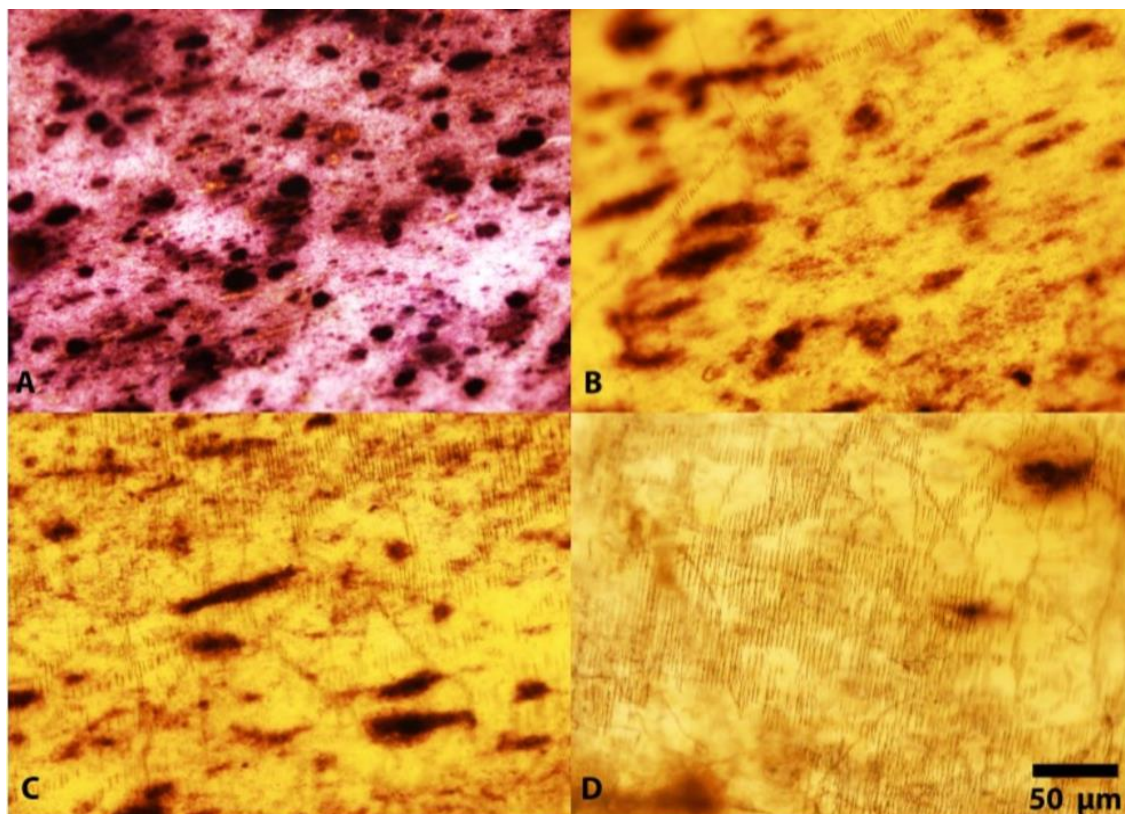
Obrázek 4.6: Fotografie lopatek vyražených z filmu kopolyesteru se škrobem. A – na začátku experimentu; B – po 20 dnech; C – po 70 dnech inkubace v půdě (hnědozem) při 25 °C.

4.1.4 Změny na povrchu materiálu během biodegradace

K pozorování změn na povrchu testovaných materiálů byla využita rastrovací elektronová mikroskopie. Vzhledem k rychlejší biodegradaci kopolyesteru ve směsi se škrobem, bylo předpokládáno, že na jeho povrchu budou patrné výraznější změny než na povrchu čistého kopolyesteru, film byl proto pozorován také pomocí optické mikroskopie.

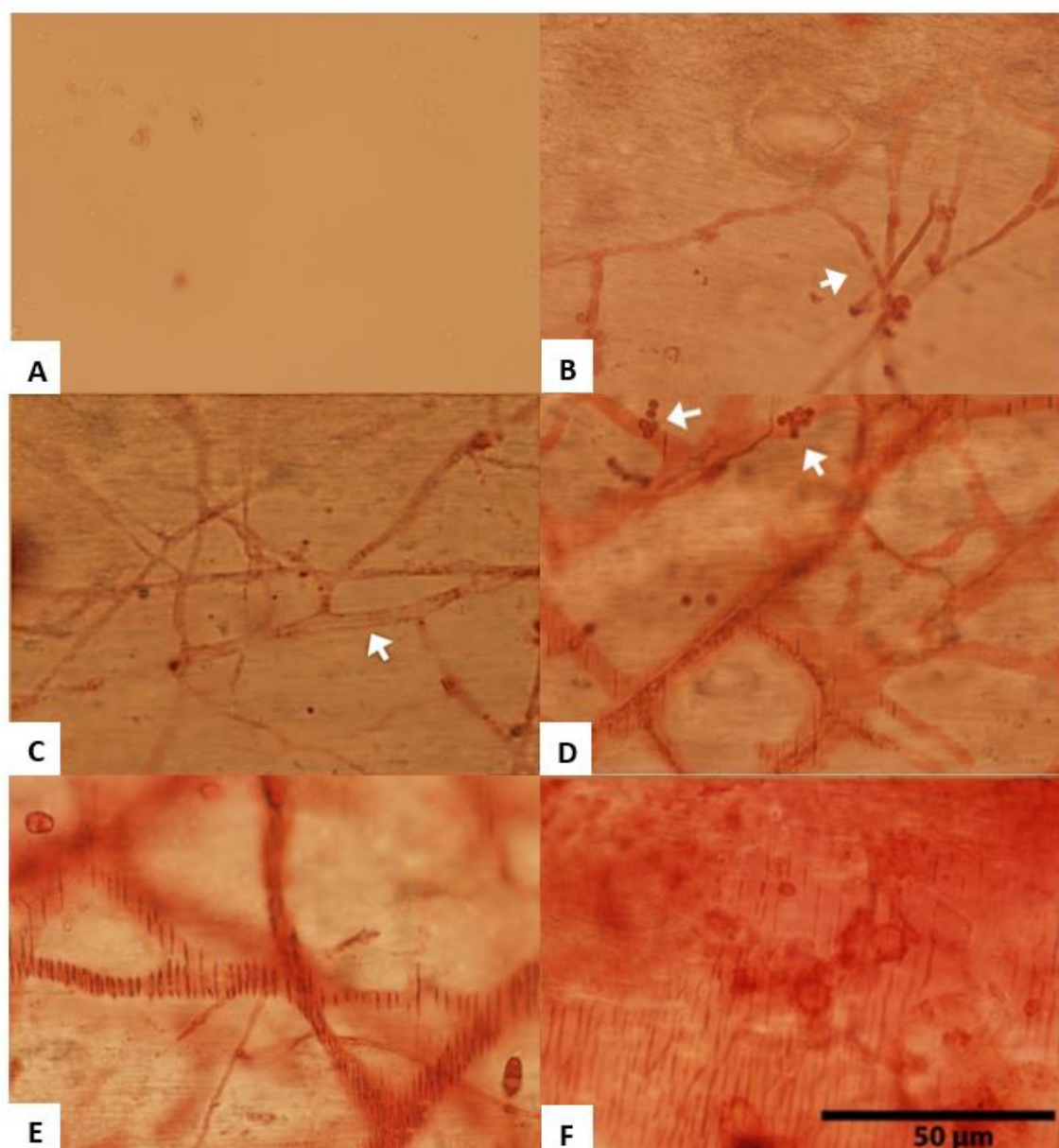
Škrobová zrna vytváří s Lugolovým roztokem fialově zbarvený komplex, mohla být proto po obarvení pozorována optickým mikroskopem (Obrázek 4.7). Na fotografii vzorku před biodegradací byly pozorovány části materiálu tvořené škrobem a také celá škrobová zrna. Významné změny v jejich struktuře bylo možno pozorovat již 20. den inkubace. Domény obsahující škrob nebyly na

fotografiích patrné, pravděpodobně podlely abiotické a biotické degradaci. Ve vzorcích byly stále viditelné tmavé skvrny, zřejmě pozůstatky kompaktních zrn. Po uplynutí 50 a 70 dnů tmavé skvrny postupně zmizely a ve struktuře vzorků byly viditelné paralelně uspořádané krátké trhliny. Tyto struktury byly dále detailně pozorovány pomocí SEM. Celkový vývoj změn ve struktuře materiálu byl v souladu s dřívějším předpokladem, že škrobová složka byla degradována již na začátku inkubace a její mineralizace probíhala poměrně rychle.



Obrázek 4.7: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem, barveno Lugolovým roztokem. Škrob je zbarven fialově. A-před biodegradací, B-20.den, C-50.den, D-70. den biodegradace ve fluvizemi. Zvětšeno 200 ×.

Současně byl barvením safraninem vizualizován vývoj biologických struktur na povrchu filmu. Na povrchu čistého kopolyesteru byl během inkubace v malé míře viditelný růst mikrobiálních vláken, ale změny ve struktuře polymeru nebyly téměř patrné. Na fotografiích směsi kopolyesteru se škrobem (Obrázek 4.8) lze pozorovat již 4. den inkubace vlákna, patrně bakteriálního původu. Tyto bakterie byly dle jejich rozměrů, morfologie a přítomností exospor určeny jako bakterie patřící do kmenu *Actinobacteria*. V průběhu inkubace (16. den) se síť vláken stávala hustší a začaly se objevovat také trhliny v materiálu. Tyto trhliny se tvořily především v okolí bakteriálních filament. Šedesátý čtvrtý den již nebyla patrná bakteriální vlákna a výrazné trhliny byly pozorovány na celém povrchu materiálu.

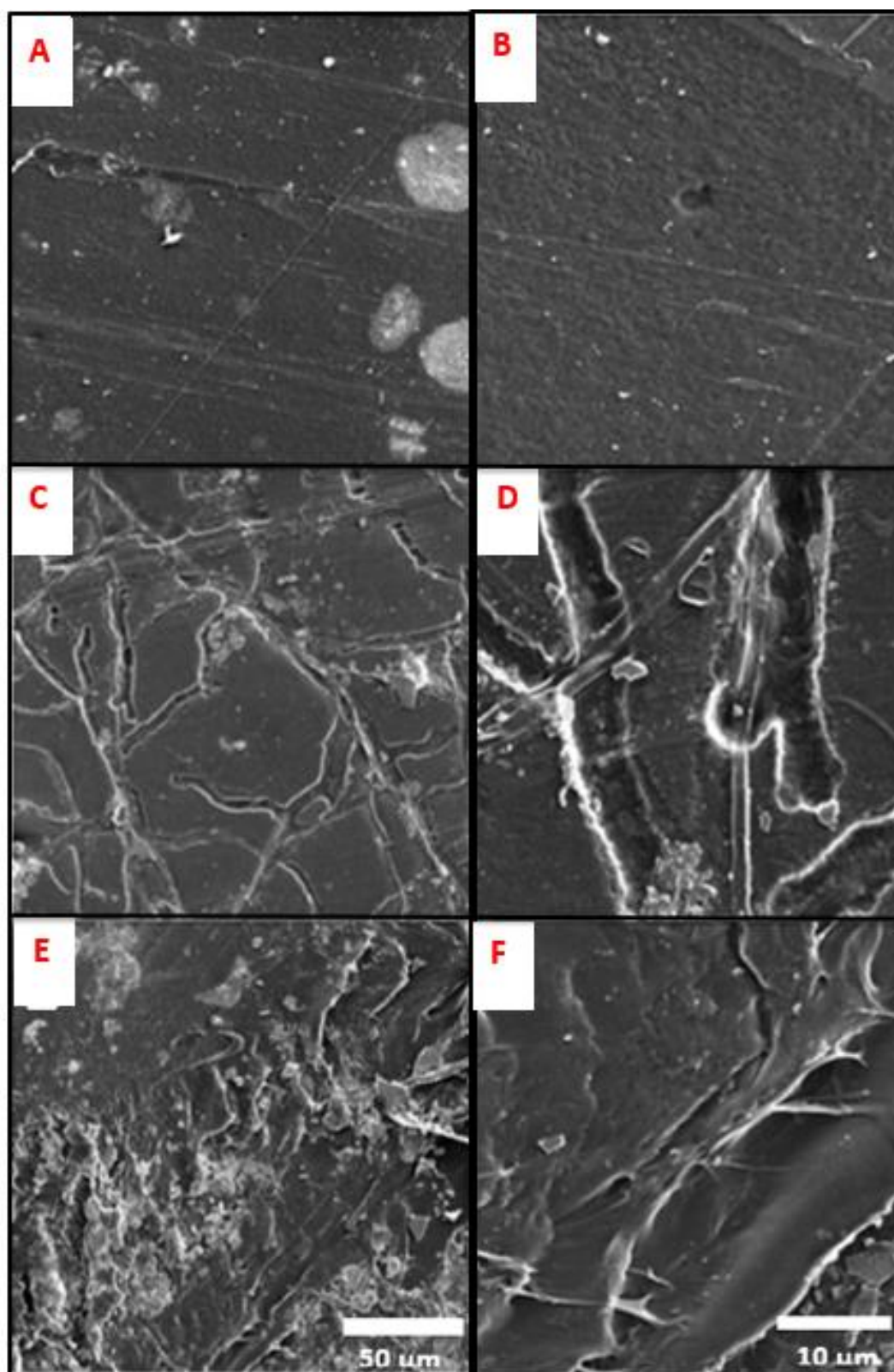


Obrázek 4.8: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem, barveno safraninem. A-před biodegradací, B-2. den, C-4. den, D-16. den, E-32. den a F-64. den biodegradace ve fluvizemi. Filamenta a exospory jsou označeny bílými šipkami. Zvětšeno 600 ×.

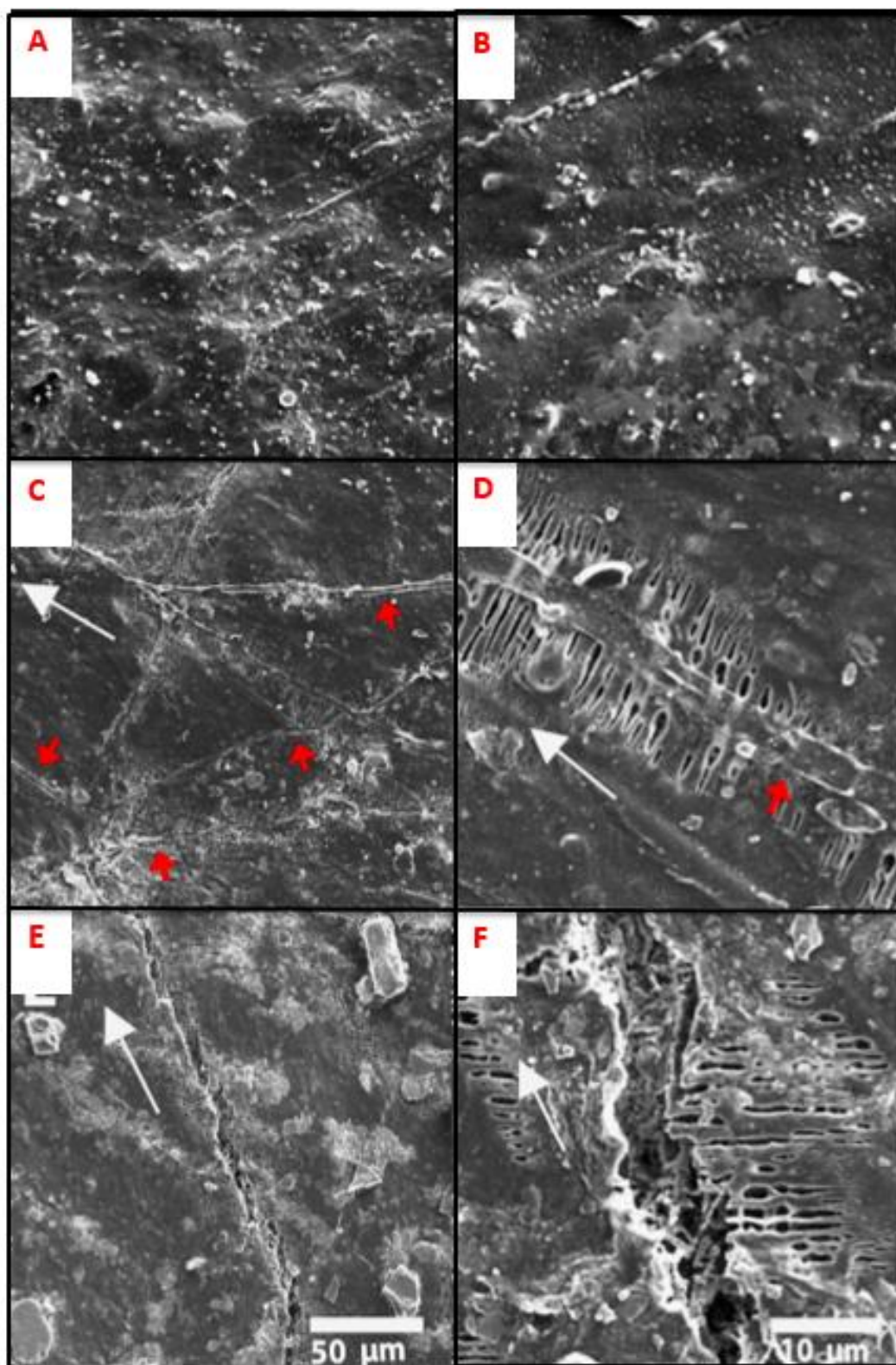
Jak již bylo uvedeno, oba materiály byly detailně pozorovány pomocí SEM. Na povrchu čistého kopolyesteru nedošlo k téměř žádným změnám (Obrázek 4.9). Z fotografie, která byla pořízena 28. den inkubace v půdě pomocí SEM, byla patrná mikrobiální filamenta, ale nedošlo k viditelnému poškození filmu. K viditelnému poškození nedošlo ani po 78 dnech inkubace. Toto pozorování je v souladu s výsledky biodegradačního pokusu, kde bylo po 99 dnech dosaženo cca 6 % degradace kopolyesteru.

Povrch kopolyesteru plněného škrobem byl před inkubací v půdě poměrně hrubý, s vystupujícími zrny škrobu (Obrázek 4.10). Po 28 dnech inkubace v půdě byl materiál pokryt bakteriálními vlákny a rozvíjejícím se systémem trhlin. Při větším zvětšení bylo zřejmé, že praskliny se objevily v bezprostřední blízkosti bakteriálních vláken. Je pravděpodobné, že bakterie produkovaly extracelulární enzymy, které začaly rozkládat polymer. Zajímavé je, že všechny praskliny na celém povrchu vzorku byly navzájem rovnoběžné a zároveň byly orientovány kolmo k mikrobiálním filamentům.

Po podrobném pozorování několika dalších mikroskopických vzorků bylo ověřeno, že praskliny byly orientovány ve směru kolmém ke směru zpracování filmu. Film byl zpracován vyfukováním, které zahrnuje roztažení plastu a poté jeho rychlé zchlazení. Tento proces zřejmě indukoval biaxiální orientaci polymerních řetězců, dominantní směr jejich orientace byl paralelní se směrem produkce materiálu. Štěpení polymerních řetězců v okolí bakteriálních filament vedlo k uvolnění celé soustavy, což se projevilo vytvořením paralelně orientovaných trhlin. Po 78 dnech byl vzorek hluboce erodován. Materiál v okolí bakteriálních filament byl již zcela degradován, což dokládá, že asimilována nebyla pouze škrobová složka, ale také kopolyester.



Obrázek 4.9: Fotografie filmů PBAT získané pomocí SEM. A, B před biodegradací, C, D-28 dní, E, F-78 dní biodegradace ve fluvizemi. Levá strana obrázku (A, C, E) zvětšeno 1000 ×, pravá strana (B, D, F) zvětšeno 5000 ×.

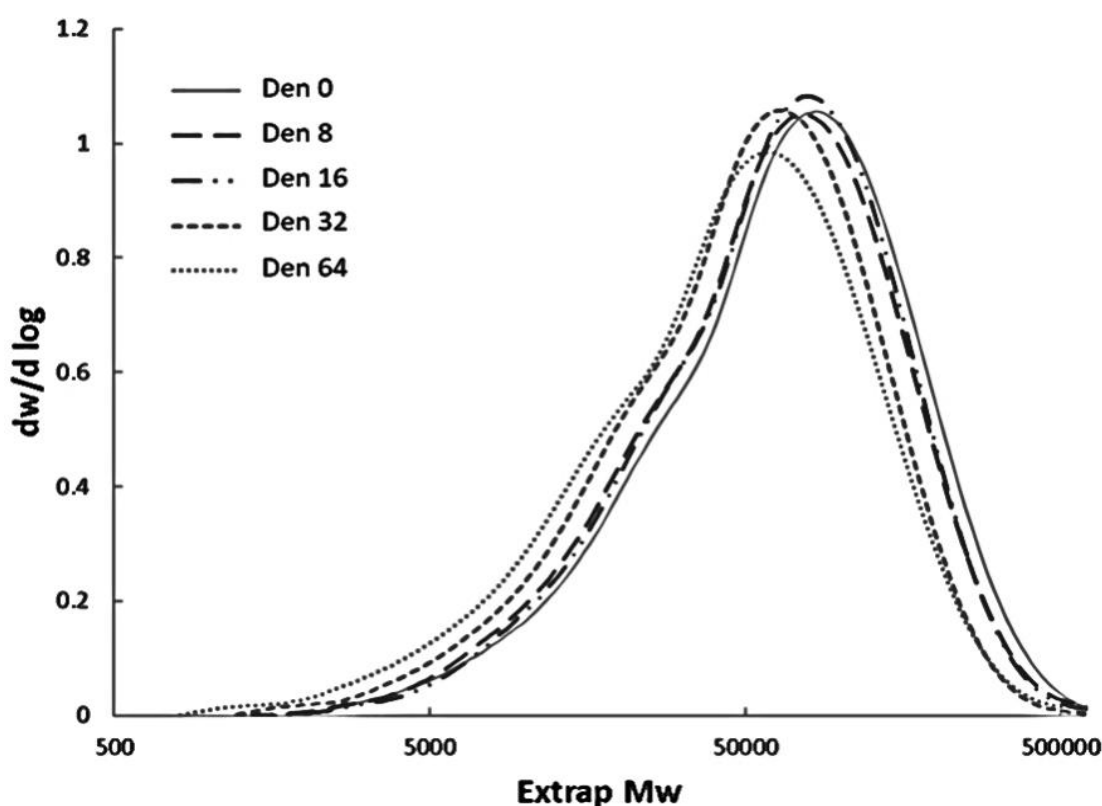


Obrázek 4.10: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem získané pomocí SEM. A, B před biodegradací, C, D-28 dní, E, F-78 dní biodegradace ve fluvizemi. Levá strana obrázku (A, C, E) zvětšeno 1000 ×, pravá strana (B, D, F) zvětšeno 5000 ×. Bakteriální filamenta jsou označena červenými šipkami. Bílé šipky značí orientaci při výrobě filmu.

4.1.5 Změny molekulové hmotnosti a její distribuce během biodegradace

Výsledky biodegradace kopolyesteru a kopolyesteru ve směsi se škrobem byly rozšířeny o sledování změn molekulové hmotnosti pomocí gelová permeační chromatografie. Data byla poté převedena do podoby distribučních křivek. Vzorky byly odebírány na začátku experimentu a v průběhu inkubace.

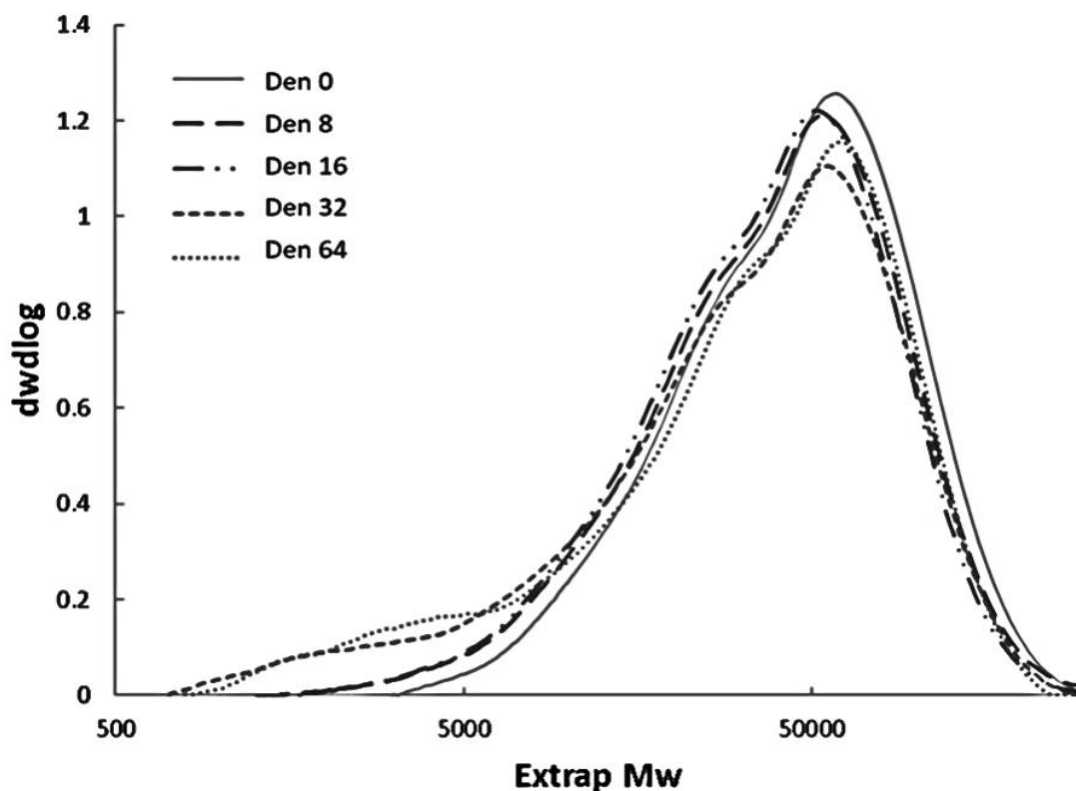
Ve vzorku čistého kopolyesteru byly pozorovány významné změny po pouhých 16 a 32 dnech inkubace (Obrázek 4.11). Došlo k nepatrnému posunu distribučních křivek směrem k nižším molekulovým hmotnostem, ale tyto fragmenty s nižší M_w nebyly dostatečně malé, aby podléhaly biodegradaci, byly mineralizovány a došlo k produkci CO_2 . Změny v M_w , které byly způsobené pravděpodobně hydrolytickým štěpením řetězců uvnitř polymeru, souvisely se změnami v mechanických vlastnostech filmu.



Obrázek 4.11: Změna distribučních křivek molekulových hmotností v čistém kopolyesteru během inkubace v hnědozemi při 25 °C.

V případě filmu, který obsahoval také škrob, bylo počáteční rozdělení M_w kopolyesteru (Obrázek 4.12) posunuto k nižším hodnotám ve srovnání s čistým kopolyesterem. To zřejmě odráželo odlišnou historii vzorků včetně intenzivního termoplastického zpracování v případě směsi. Po 16 dnech inkubace zůstaly distribuční křivky M_w prakticky totožné. V počáteční fázi degradace došlo k relativně intenzivní mineralizaci uhlíku (o čemž svědčí produkce CO_2), ale primárním zdrojem tohoto uhlíku byla pravděpodobně škrobová složka

materiálu. Po delší době inkubace (32 a 64 dní) došlo ke snížení peaků distribučních křivek a křivky se posunuly směrem k nižším M_w . Byly formovány nízkomolekulární produkty v oblasti odpovídající M_w v řádu několika tisíců. Tyto fragmenty mohou již být asimilovány mikroorganismy (Stloukal *a kol.*, 2012; Husarova *a kol.*, 2014; Stloukal *a kol.*, 2015). Sledování vývoje distribučních křivek molekulových hmotností v kopolyesteru ve směsi se škrobem podpořilo výsledky biodegradačních experimentů a mechanických zkoušek.



Obrázek 4.12: Změna distribučních křivek molekulových hmotností v kopolyesteru se škrobem během inkubace v hnědozemi při 25 °C.

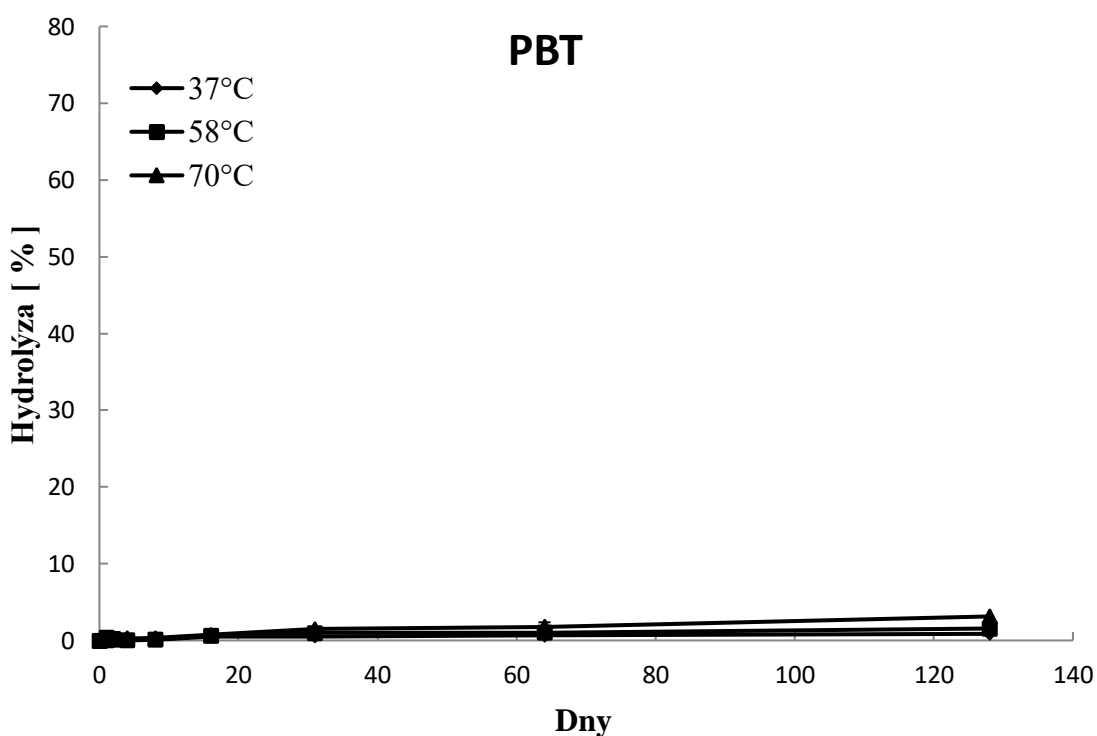
4.1.6 Krystalinita kopolyesteru a kopolyesteru ve směsi se škrobem

Krystalinita polymerů může ovlivnit jejich biodegradabilitu (Muthuraj *a kol.*, 2015). Obecně jsou kompaktnější krystalické domény méně náchylné k chemické i biologické degradaci. PBAT vykazuje nízkou krystalinitu (Kijchavengkul *a kol.*, 2008; Kijchavengkul *a kol.*, 2010). Krystalinita použitých vzorků byla pomocí kalorimetrie (DSC) stanovena na 9,0 % pro čistý kopolyester a 7,2 % pro kopolyester ve směsi se škrobem. Tyto hodnoty jsou srovnatelné a krystalinita samotná tedy nemohla ovlivnit zrychlenou biodegradaci PBAT ve směsi se škrobem.

4.2 Hydrolytická degradace vybraných polyesterů ve vodném prostředí a úbytek hmotnosti

Testované polyestery (PBT, PBS, PBSA a PBAT) jsou v životním prostředí degradovány především hydrolyticky, a to štěpením esterových vazeb nebo náhodným štěpením řetězců (Foulc *a kol.*, 2005; Muthuraj *a kol.*, 2015).

Snížení hmotnosti a rostoucí množství rozpuštěného uhlíku ve fosfátovém pufru bylo zaznamenáno pro všechny testované vzorky a teploty, kromě PBT (Obrázek 4.13). Nízké hodnoty degradace PBT byly pravděpodobně způsobeny strukturou polybutylenu, která je tvořena zejména těžce hydrolyzovatelnou rigidní aromatickou složkou (Marten *a kol.*, 2005).



Obrázek 4.13: Hydrolytická degradace PBT.

Obecně rychlost hydrolytické degradace polyesterů roste s teplotou (Kanerva a Euranto, 1982; Musiol *a kol.*, 2011). Stupeň hydrolýzy polyesterů inkubovaných v 37, 58 a 70 °C se dle předpokladu značně lišil. Výsledky měření produkce TOC byly v korelaci s úbytky hmotnosti polyesterů.

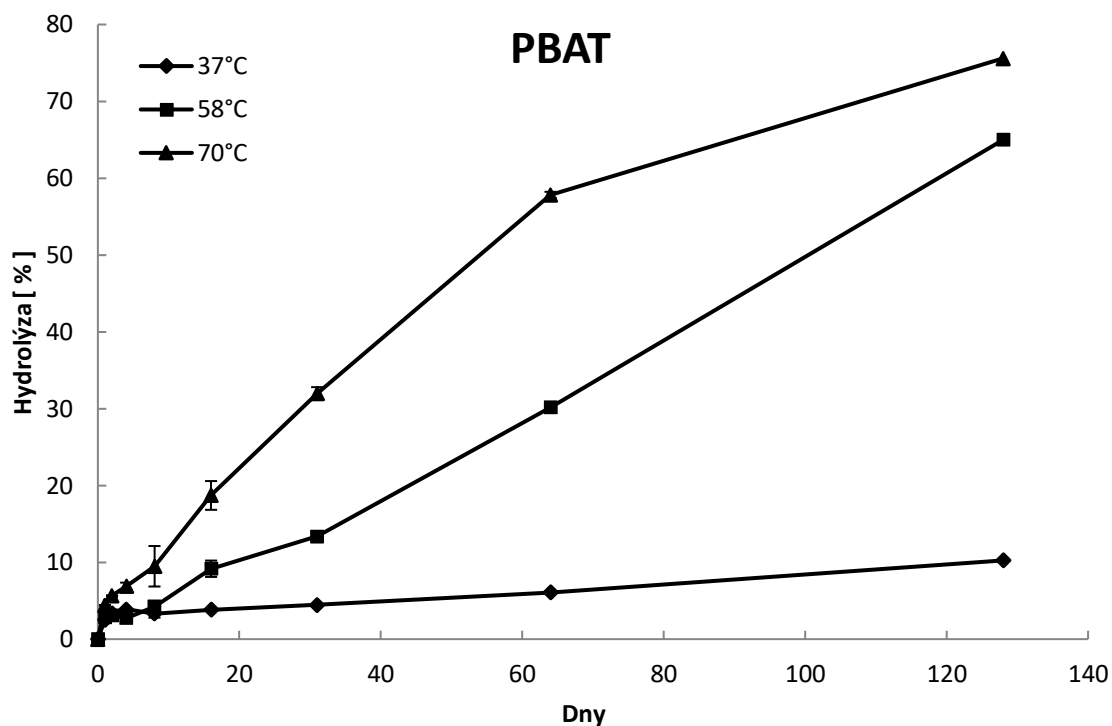
Nejvyšší snížení hmotnosti bylo zaznamenáno u PBAT v 70 °C, kde bylo dosaženo 83% úbytku hmotnosti a také nejvyšší hydrolytické degradace-75,6 %. Úbytek hmotnosti PBSA byl 78,1 % a stupeň hydrolýzy 71,5 %; hmotnost PBS klesla o 67,4 % a hydrolytický stupeň byl stanoven na 70 %. Hmotnost polybutylenu se snížila o 3,3 % a materiál byl degradován z 3,1 %.

Během inkubace polyesterů v 58 °C byl PBAT hydrolyzován z 65,0 % a úbytek hmotnosti byl stanoven na 62,0 %, PBSA degradoval z 51,3 %

a hmotnost se snížila o 53,88 %, degradace PBS dosáhla 30,7 % a hmotnost se snížila o 30,2 %. V případě PBT došlo za teplotních podmínek kompostování k degradaci z 1,56 % a úbytku hmotnosti o 1,1 %.

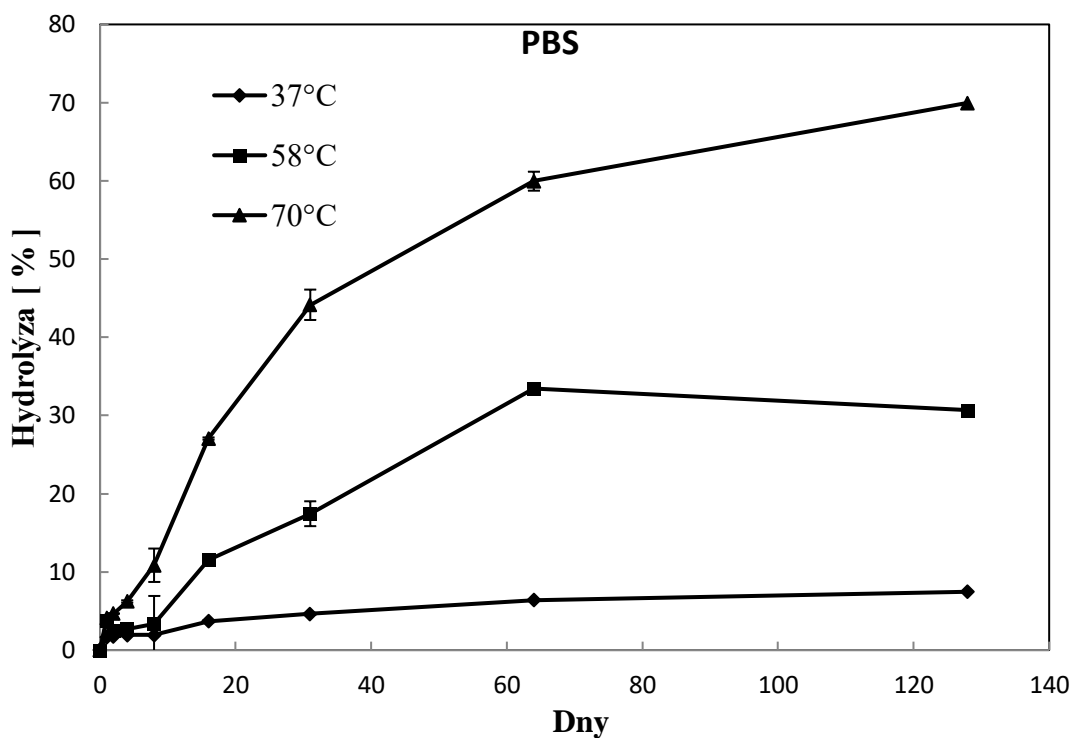
Rychlost degradace v 37 °C byla ve srovnání s vyššími teplotami nízká. Polybutylensukcinát byl degradován z 7,6 %, PBSA z 9,1 %, PBAT hydrolyzoval z 10,3 % a PBT o 0,9 %. Hmotnost PBS se snížila o 12,7 %, PBSA o 13,3 %, PBAT o 16 % a PBT o 1,8 %.

Hydrolytická degradace PBAT (Obrázek 4.14) probíhala rychleji a dosáhla vyšších hodnot než v některých dalších studiích (Dvorackova *a kol.*, 2015; Muthuraj *a kol.*, 2015). Rychlost degradace mohla být ovlivněna například větvením řetězců testovaného PBAT. Ve studii, která se věnovala hydrolytické degradaci polybutylen adipátu (PBA), bylo zjištěno, že množství monomerů, které vznikly v průběhu hydrolyzy větveného PBA, bylo 1,5 krát vyšší než množství monomerů formovaných v průběhu hydrolyzy lineárního PBA a 2,5-3 krát vyšší než množství monomerů vzniklých v průběhu degradace lineárního vysokomolekulárního PBA (Lindstrom *a kol.*, 2004). Dalším důvodem poměrně rychlé degradace PBAT mohla být jeho obecně nízká krystalinita. Stanovené procento krystalinity je shodné s hodnotami uvedenými v dalších pracích (Mohanty a Nayak, 2012; Li *a kol.*, 2015). V Kapitole 4.1.2 jsou uvedeny výsledky biodegradace PBAT v půdě v 25 °C, kopolyester dosáhl 7% mineralizace po 100 dnech inkubace. Po 100 dnech inkubace ve vodném prostředí fosfátového pufru v 37 °C byla tato fólie hydrolyzována z 8 %. Na základě těchto výsledků lze odvodit, že hlavním procesem degradujícím PBAT při mezofilní teplotě je abiotická hydrolyza. Biodegradace je pravděpodobně významnější spíše při vyšších teplotách, kterých je dosaženo během kompostování.

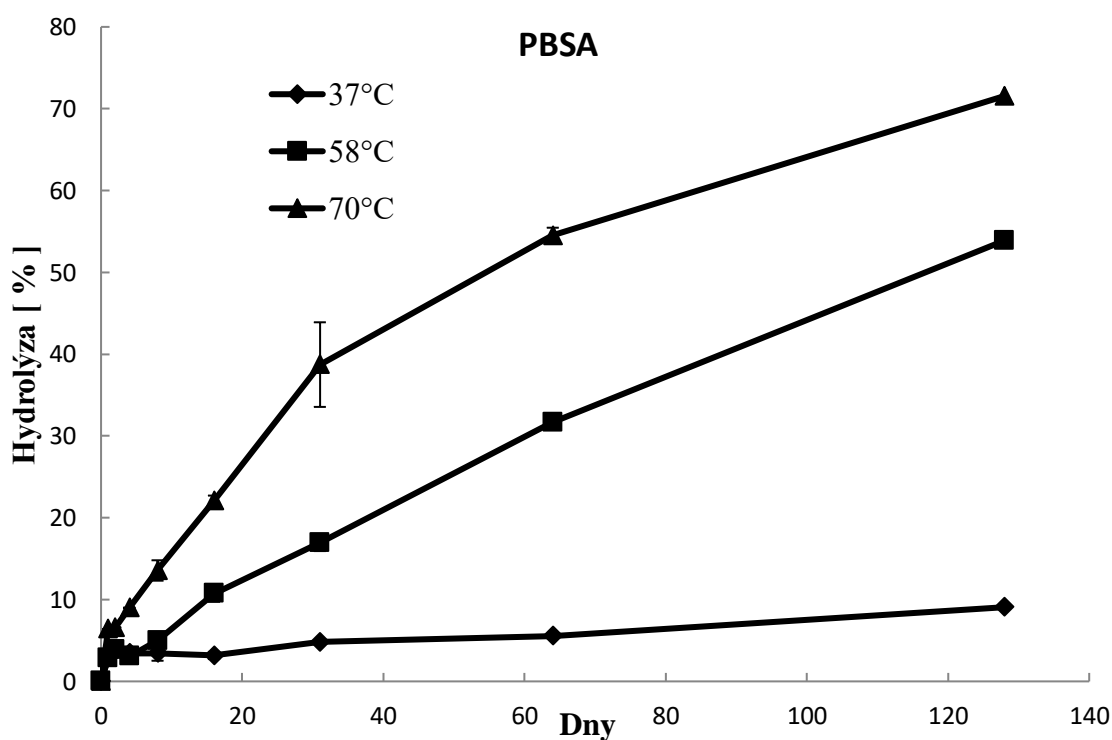


Obrázek 4.14: Hydrolytická degradace PBAT.

Významný rozdíl mezi rychlostí degradace testovaných alifatických polyesterů se projevil především při 58 °C. Vzhledem k nižší krystalinitě a flexibilnějším řetězcům, podléhá PBSA hydrolyze lépe než PBS (Cho *a kol.*, 2001; Musiol *a kol.*, 2011). Rychlost degradace obou alifatických polyesterů je patrná z Obrázků 4.15 a 4.16.



Obrázek 4.15: Hydrolytická degradace PBS.



Obrázek 4.16: Hydrolytická degradace PBSA.

Hydrolytická degradace během prvních dní probíhala pomalu, mezi 8 a 16 dnem ale došlo k jejímu výraznému zrychlení. Tento trend se projevil pouze při inkubaci v 37 a 58 °C, při 70 °C byla rychlost hydrolyzy vysoká již na začátku inkubace a po 64 dnech se mírně snížila.

Úbytky hmotnosti polyesterů a stupeň hydrolytické degradace po 130 dnech inkubace jsou uvedeny v Tabulce 4.3.

Tabulka 4.3: Shrnutí hydrolytické degradace při třech různých teplotách.

Materiál	Teplota [°C]	Stupeň hydrolýzy [%]	Úbytek hmotnosti [%]
PBS	37	7,46	12,7
	58	30,66	30,2
	70	69,98	67,4
PBSA	37	9,07	13,3
	58	53,88	51,3
	70	71,55	78,1
PBAT	37	10,25	16,0
	58	64,99	62,0
	70	75,60	83,5
PBT	37	0,86	1,8
	58	1,56	1,1
	70	3,13	3,3

Z měření lze v souladu s literaturou odvodit, že zvýšení mobility polymerních řetězců, které je způsobeno vysokou teplotou, významně ovlivňuje kinetiku reakce. Akcelerace rychlosti abiotické hydrolýzy počátečního zvýšení teploty by tedy mohla značně urychlit degradaci polyesterů (Hakkarainen *a kol.*, 1996; Lyu *a kol.*, 2007).

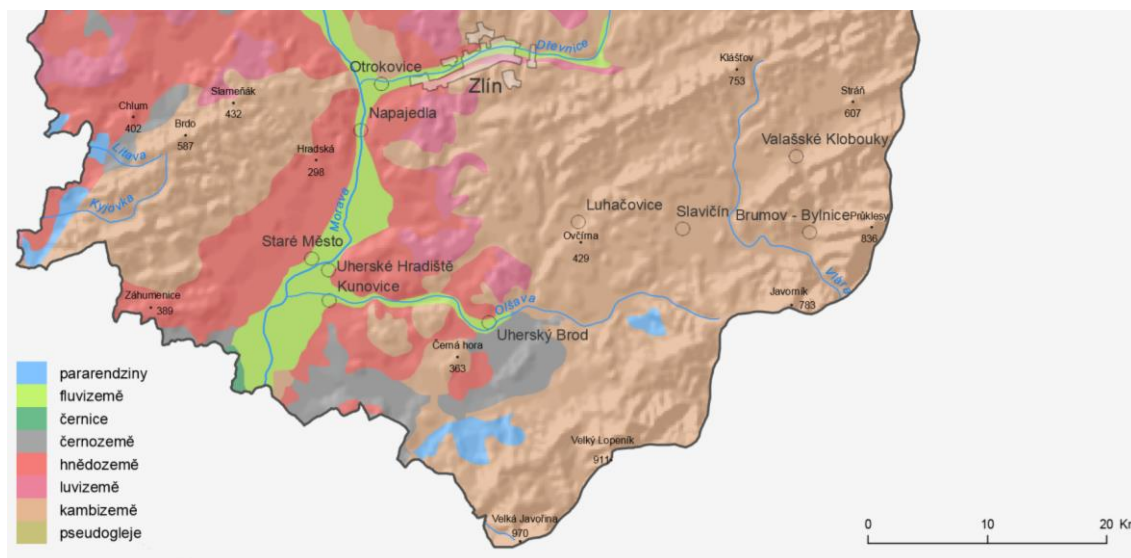
4.3 Analýza degradérů kopolyesteru v půdách pomocí molekulárně biologických metod

V další části se disertační práce zabývala především prokázáním přítomnosti termofilních degradérů polybutylen adipát tereftalátu v půdách, jejich identifikací pomocí molekulárně biologických metod a optimalizací metodiky PCR-DGGE.

Biodiverzita a výskyt mikroorganismů degradujících polymer se liší v závislosti na prostředí, jako je půda, moře, kompost, aktivovaný kal atd. Je proto nutné zkoumat distribuce a populace mikroorganismů, které rozkládají polymer v různých ekosystémech.

4.3.1 Základní charakteristiky půd, kultivace degradérů kopolyesteru a počty CFU

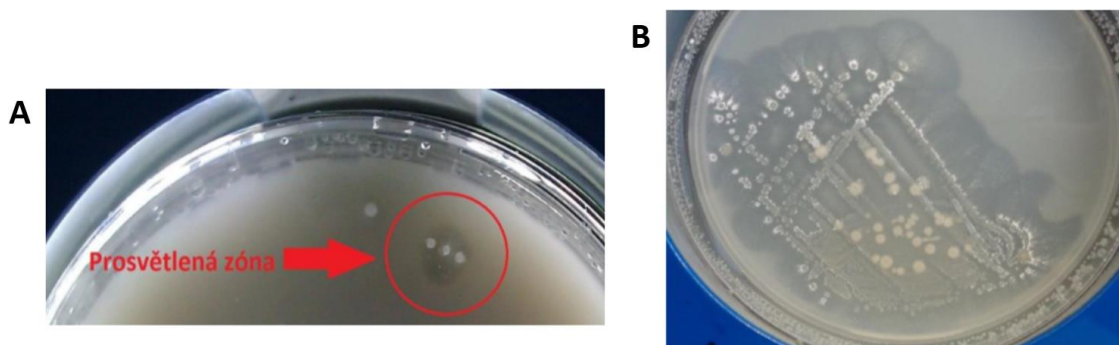
Půdy, ze kterých byly izolovány bakterie degradující PBAT, byly odebrány na podzim 2013 ve Zlínském kraji. Půdy byly odebírány z pozemkových parcel, které měly v katastru nemovitostí uvedenou bonitovanou půdně ekologickou jednotku (BPEJ). Jedná se o pětimístný číselný kód sloužící pro rozlišení klimatických podmínek zemědělsky využívané půdy v České republice. Bonitovaná půdně ekologická jednotka udává podrobnou informaci o půdně-produkční charakteristice území, ale zejména i o půdně-genetických, půdně-ekologických, půdně-retenčních, geologických, morfologických, klimatických a hydrologických vlastnostech stanoviště. Vzhledem k tomu, že čísla parcel, ze kterých byly odebírány vzorky, byla zaznamenána, bylo poté možno dohledat půdní typ a také obsah organického uhlíku. Půdní typy vyskytující se v oblasti, ze které byly vzorky odebírány, jsou uvedeny také na Obrázku 4.17. Jednalo se především o fluvizem, luvizem, hnědozem a kambizem. Několik vzorků bylo odebráno také z půd zařazených do kategorie pararendzina a černozem. Půdy byly odebrány z orné půdy (pole), z okolí potoků, sadů, lesa a trvalého travního porostu. pH půd bylo stanoveno v rozmezí 5,03-6,75. Konkrétní zařazení odebraných vzorků do půdní klasifikace, habitat a pH je uvedeno v PŘÍLOZE 1.



Obrázek 4.17: Půdní typy na odběrových místech vzorků půd, ze kterých byli izolováni degradéři kopolyesteru (Ministerstvo životního prostředí).

K detekci degradérů kopolyesteru byly využity živné půdy, ve kterých byl jediným zdrojem uhlíku právě PBAT (suspenze PBAT). Degradáční mikroorganismy byly detekovány pomocí metody prosvětlených zón vznikajících depolymerizací kopolyesteru, které se tvořily kolem jejich kolonií v jinak mléčně zbarveném médiu. Prosvětlené zóny kolem kolonií degradérů

PBAT jsou dobře pozorovatelné na Obrázku 4.18. Detekční limit metody byl 100 CFU . g⁻¹ sušiny půdy. Při kultivaci výluhu připraveného přímo z testovaných půd nebyl výskyt degradérů u většiny vzorků potvrzen nebo byly jejich počty těsně nad hranicí detekce. Výskyt degradačních mikroorganismů byl vyšší se stoupajícím pH vzorků půd (p=0,024).



Obrázek 4.18: A-určení degradérů kopolyesteru pomocí metody prosvětlených zón; B-kultura konsorcia degradérů na tuhém živném médiu se suspenzí PBAT.

Vzhledem k tomu, že se degradéři PBAT v půdách nacházeli v malém množství, byli pro další práci selektivně pomnoženi (směs půdy, suspenze PBAT a minerálního média byla inkubována v 58 °C po dobu 2 měsíců) a výluh byl opět kultivován na živné půdě s PBAT jako jediným zdrojem uhlíku. Po pomnožení byly degradační mikroorganismy přítomné ve většině testovaných půd v počtech 10² až 10⁴ CFU . g⁻¹ sušiny půdy. Nebyla zjištěna korelace mezi CFU a pH či CFU . g⁻¹ sušiny půdy před pomnožením. Počty degradérů PBAT před i po pomnožení jsou uvedeny v PŘÍLOZE 1. Z výsledků je patrné, že termofilní mikroorganismy degradiující PBAT se v půdě vyskytují a v případě zpracování odpadového materiálu s obsahem PBAT by za termofilních podmínek nebyly limitujícím faktorem biodegradace.

Na základě mikroskopického pozorování bakteriální mikroflóry v okolí projasněných zón byl zjištěn výskyt především vláknitých bakterií, patřících s nejvyšší pravděpodobností ke kmenu *Actinobacteria*. Dále se zde vyskytovaly tyčinkovité bakterie, později identifikované jako termofilní bakterie třídy *Bacilli*. Na miskách nebyly pozorovány žádné mikroskopické houby.

Prvotním cílem bylo získat čistou mikrobiální kulturu, ale ani po opakovaném přeočkování to nebylo možné. K izolaci čisté kultury aktinomycet, u kterých byl předpoklad degradace PBAT, bylo připraveno několik specifických médií (Actinomycete Isolation Agar, Gym médium, R8 médium), dále byly k médiu se suspenzí kopolyesteru přidány růstové faktory či sladový extrakt nebo škrob jako kosubstrát. Média Actinomycete Isolation Agar a R8 se neprokázala jako natolik selektivní, aby bylo výhodné je používat. Médium Gym mělo pravděpodobně

pro růst mikroorganismů vyskytujících se v půdě nevhodné složení. Bylo zjištěno, že přídavek škrobu či antibiotik mohl být využit jako alternativa média se suspenzí PBAT pro účely přeočkování čisté kultury degradérů z kmene *Actinobacteria*. Ve výsledku bylo tedy složení živného média obohaceno o škrob a antibiotika, ale nedošlo ke zjednodušení nebo urychlení metodiky, která by vedla k zisku čisté kultury. Z tohoto důvodu nebylo těchto látek dále využíváno. V případě přídavku škrobu také musela být navíc prodloužena doba kultivace, po kterou by došlo k vyčerpání škrobu mikroorganismy. Pak by mikroorganismy teprve začaly degradovat PBAT a degradéři mohli být určeni pomocí metody prosvětlených zón.

Pokusy o izolaci čisté kultury bakterií ze skupiny *Actinobacteria* nebyly úspěšné. Docházelo k vymizení aktinomycet, ztrátě jejich degradačních schopností nebo nebylo dosaženo izolace čisté kultury a na miskách se vyskytovala kontaminace bakteriemi ze třídy *Bacilli*. Směsná kultura byla po přeočkování stále schopná růstu na médiu obsahujícím PBAT, což bylo kontrolováno metodou prosvětlených zón. Růst degradérů probíhal poměrně pomalu, kolonie byly na miskách vždy patrně nejdříve po 10 dnech inkubace v 58 °C, což značně prodloužilo dobu experimentů. Bylo tedy usouzeno, že termofilní aktinomycety jsou nezbytnou složkou konsorcia degradujícího PBAT, ale nejsou na tomto médiu schopny samostatného růstu. Toto zjištění bylo v souladu s literaturou, ve které se uvádí, že aktinomyceta *T. fusca* izolovaná z kompostu není schopná využívat monomery, které vznikají degradací PBAT. Pokud je ale tato bakterie členem konsorcia, dochází k rychlé asimilaci vzniklých meziproductů (Witt *a kol.*, 2001). Bakteriální společenstva jsou pravděpodobně při degradaci PBAT efektivnější než izolované kultury. Dále bylo tedy kultivováno konsorcium degradérů PBAT. Biomasa z centra prosvětlené zóny byla přenesena na nové médium se suspenzí PBAT jako jediným zdrojem uhlíku. Tento postup byl opakován třikrát, aby bylo prokázáno zachování degradační aktivity mikroorganismů i při opakovaném přeočkování.

4.3.2 Optimalizace metodiky izolace DNA a PCR

K optimalizaci izolace DNA bylo na základě literatury vybráno více metod: lyze varem, pomocí lysozymu, proteinázy K, metodou chloroform/izoamylalkohol a komerčními kity High Pure PCR Template Preparation Kit a PowerSoil DNA Isolation Kit. Byly testovány různé uzpůsobení PCR, optimalizace PCR byly kontrolovány agarosovou gelovou elektroforézou. Tyto optimalizace byly prováděny pospolu. V disertační práci jsou uvedeny jen ilustrační výsledky z mnoha provedených izolací DNA a následných PCR a elektroforéz v agarosovém gelu. Cílem této části práce bylo zavést účinnou a robustní metodu izolace DNA degradérů kopolyesteru. Dále také optimalizovat PCR tak, aby bylo amplifikováno dostatečné množství DNA a přitom docházelo k minimálnímu vzniku nespecifických produktů.

Jako standard pro porovnávání velikosti fragmentů DNA byl použitý DNA Marker-GeneRuler 100 bp, DNA Ladder 0,5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (Thermo Scientific). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA identifikovaná jako termofilní aktinomyceta v rámci diplomové práce Martiny Martinkové na ÚIOŽP Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (2013). Jako negativní kontrola sloužila PCR směs bez přídavku templátové DNA.

K PCR směsi byly nejprve přidány Mg^{2+} ionty, které ale mohou snižovat specificitu reakce, proto byly používány jen omezeně v rámci optimalizace (Roux, 1995).

V prvotních fázích optimalizace byl k PCR směsi přidáván také psoralen, který inaktivoval amplifikační produkty kontaminující PCR. Psoralen, isopsoralen a jejich deriváty se interkalují mezi báze DNA a pokud jsou ozářeny UV zářením o vlnové délce 320-400 nm, dojde k jejich kovalentnímu navázání na nukleové kyseliny a blokadě reakce s polymerázou (Jinno *a kol.*). Vzhledem k tomu, že byly dodrženy podmínky sterilní práce v PCR boxu, nebyl dále psoralen do PCR reakce přidáván.

Izolace DNA degradérů kopolyesteru pomocí proteinázy K byla zcela nevhodná a k amplifikaci DNA docházelo jen ojediněle. Izolace povařením DNA se ukázala také jako nevhodná a nebyla izolována žádná DNA, stejně tak při izolaci pomocí lysozymu, mechanické lyze a komerčního kitu High Pure PCR Template Preparation Kit. K izolaci DNA byl použit také komerční kit PowerSoil DNA Isolation Kit, izolace tímto kitem vykazovala velmi dobré výsledky. Pozitivních výsledků bylo dosaženo také metodou chloroform/izoamylalkohol. Pro izolaci DNA degradérů kopolyesteru byl tedy vybrán komerční kit PowerSoil a také rychlá a levná metoda izolace pomocí směsi chloroform/izoamylalkohol. Vzhledem k rychlosti provedení a nižší ceně, byla dále pro izolaci DNA využívána metoda chloroform/izoamylalkohol.

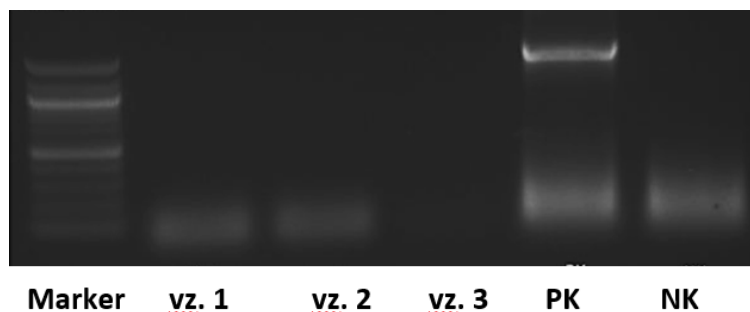
V první části této kapitoly jsou uvedeny výsledky amplifikace úseku genu 16S rRNA ohraničeného primery fD1 a rD1, pomocí tohoto setu byl amplifikován téměř celý úsek tohoto genu. PCR je pro přehlednost nazvaná jako klasická, jelikož dále jsou v práci uvedeny její modifikace, např. nested PCR a touchdown PCR.

PCR cyklus klasické PCR byl zvolen dle doporučení dodavatele primerů a Master mixu a byl částečně upraven. Byla použita tzv. hot start polymeráza s přídavkem teplotně nestabilních látek, které aktivitu polymerázy inhibují při pokojové teplotě a až při počáteční denaturaci se látky uvolní a polymeráza je aktivována. Toto uzpůsobení brání předčasné nespecifické amplifikaci DNA v průběhu přípravy reakční směsi. Počáteční denaturace byla zařazena na začátek cyklu, trvala 7 minut při teplotě 95 °C. Denaturace DNA poté probíhala po dobu 1 minuty při teplotě 95 °C. Annealing primerů k templátové DNA probíhal 1 minutu při 54 °C. Zvolená teplota annealingu byla poměrně nízká, aby došlo

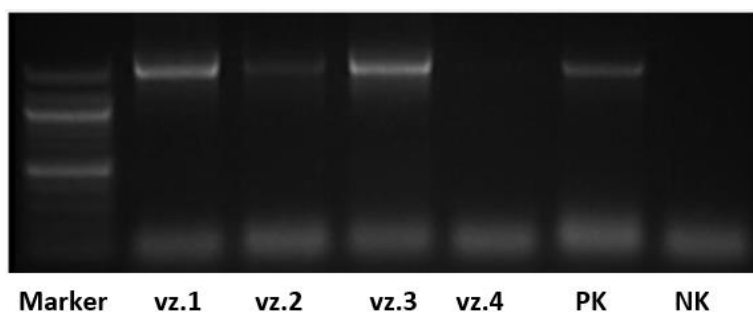
k co největší úspěšnosti nasednutí primerů. Obecně musí být teplota nasedání primerů dostatečně vysoká, aby nedošlo k nespecifickému navázání primerů k templátové DNA, pokud by ale byla příliš vysoká, primery by se nenavázaly vůbec. Vzhledem k tomu, že PCR směs byla zahřívána na nízkou teplotu, docházelo ke vzniku nespecifických produktů. Elongace DNA řetězce probíhala 1,5 minuty při 72 °C. Cyklus PCR byl opakován 35×. Závěrečná amplifikace sloužila k dokončení syntézy řetězců. Probíhala 10 minut při 72 °C. Teploty a délka jednotlivých kroků PCR jsou shrnuty v Tabulce 4.4. Obrázky agarosových gelů s PCR produkty jsou uvedeny souhrnně pod tabulkou.

Tabulka 4.4: PCR cyklus klasické PCR-DNA izolovaná z konsorcií degradérů kopolyesteru.

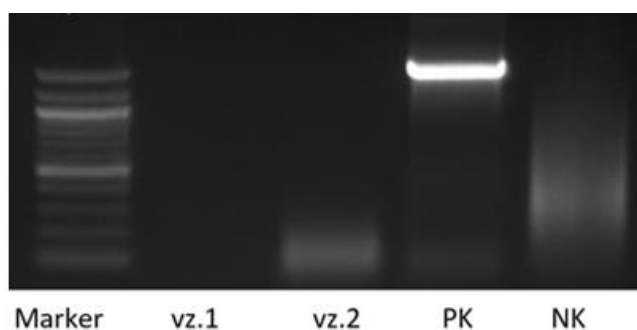
	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	7	1
Denaturace	95	1	35
Annealing	54	1	
Elongace	72	1,5	
Závěrečná extenze	72	10	1



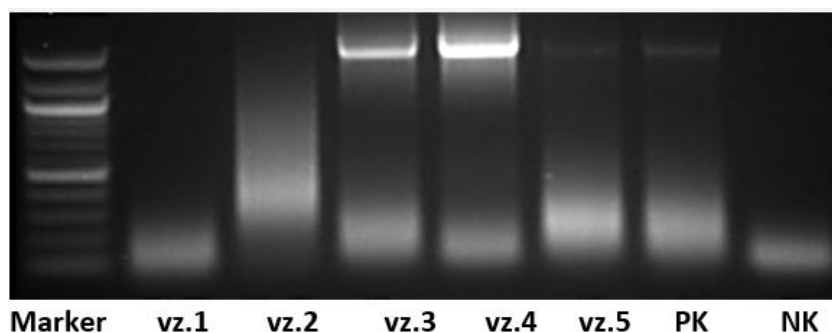
Obrázek 4.19: Kontrola klasické PCR pomocí agarosové elektroforézy. Vz. 1, 2 a 3-DNA izolovaná pomocí proteinázy K; PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.



Obrázek 4.20: Kontrola klasické PCR pomocí agarosové elektroforézy. Vz. 1-3 DNA izolovaná pomocí kitu PowerSoil; vz.4-3 DNA izolovaná pomocí proteinázy K;. PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.



Obrázek 4.21: Kontrola klasické PCR pomocí agarosové elektroforézy. Vz. 1-DNA izolovaná pomocí lysozymu; vz. 2-DNA izolovaná pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit; PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.



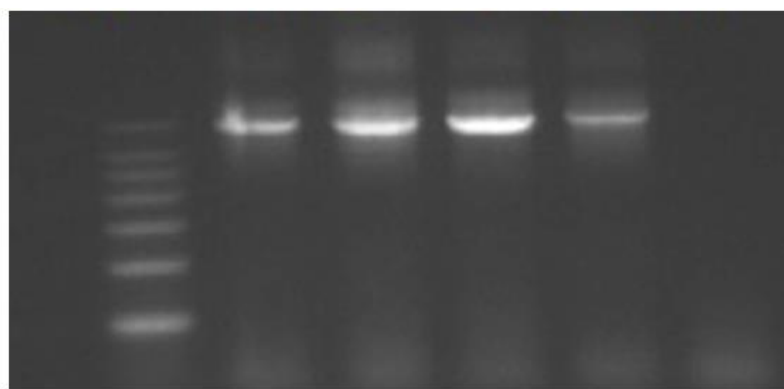
Obrázek 4.22: Kontrola klasické PCR pomocí agarosové elektroforézy. Vz. 1,2-DNA izolovaná varem; vz. 3, 4, 5-DNA izolovaná pomocí kitu PowerSoil; PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.

V průběhu optimalizace začala být využívána tzv. touchdown PCR. Při ní byla v prvních cyklech annealingu směs zahřívána na vyšší teplotu, než je ideální teplota pro annealing konkrétních primerů. Došlo tedy k velmi malému výtěžku PCR produktů v prvních cyklech, nicméně tyto produkty byly specifické. Dále pak byla teplota postupně snižována až pod teplotu optimální pro annealing použitých primerů, při které již mohlo docházet k vzniku nespecifických

produktů. Počáteční denaturace trvala 2 minuty při teplotě 95 °C, první i druhá denaturace probíhaly při 95 °C po dobu 0,5 minuty, teplota prvního annealingu byla 59 °C, druhého 54 °C a čas obou 1 minuta, první i druhá elongace probíhaly při 72 °C 1,5 minuty. Závěrečná extenze probíhala 10 min při 72 °C. První cykly PCR byly opakovány 10 ×, při každém došlo o snížení teploty o 0,5 °C. Druhá část PCR byla opakována 24×. Teploty a délky jednotlivých kroků PCR jsou shrnuty v Tabulce 4.5.

Tabulka 4.5: PCR program touchdown PCR-DNA izolovaná z konsorcií degradérů kopolyesteru.

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2	
Denaturace	95	0,5	10 -0,5 °C/cyklus
Annealing	59	1	
Elongace	72	1,5	
Denaturace	95	0,5	24
Annealing	54	1	
Elongace	72	1,5	
Závěrečná extenze	72	10	1



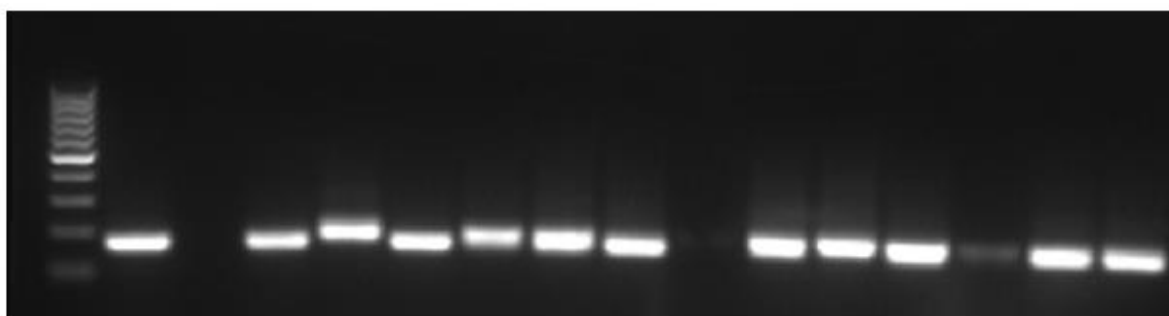
Marker vz. 1 vz. 2 vz. 3 PK NK

Obrázek 4.23: Kontrola touchdown PCR pomocí agarosové elektroforézy. DNA izolovaná metodou chloroform/izoamylalkohol; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola.

Po touchdown PCR byla provedena další PCR reakce, a bylo tedy použito metody nested PCR, která zvyšuje citlivost. V prvním kroku byla použita sada vnějších primerů fd1 a rd1. V druhém kroku byla použita sada vnitřních primerů,

341F GC a 907R, které nasedly na vnitřní část specifického produktu z prvního kroku. Přenos produktu z první reakce do druhé vedl k naředění případných inhibitorů a zvýšení konečného množství amplifikované DNA.

Vzhledem k předpokladu, že hlavním degradérem PBAT byla bakterie patřící ke skupině *Actinobacteria*, byly pro první PCR použity také specifické primery S-C-Act-235 a SC-Act-878. Výsledky PCR s těmito specifickými primery jsou patrné z Obrázku 4.24. Specifické primery oproti primerům fD1, rD1 (1500 bp) ohraničují kratší úsek (643 bp) genu 16S rRNA. Jako vnitřní primery pro druhé kolo PCR byly proto využity primery 341F GC a 518R, které ohraničují úsek dlouhý pouze 177 bp. Identifikace bakterií na základě sekvenace takto krátkého úseku by byla méně spolehlivá. Po několika experimentech byly tedy pro první PCR použity primery fD1 a rD1 a jako vnitřní primery 341F GC a 907R. Takto bylo dosaženo amplifikace úseku dlouhého 560 bp a mohly být identifikovány také bakterie nepatřící k aktinomycetám.



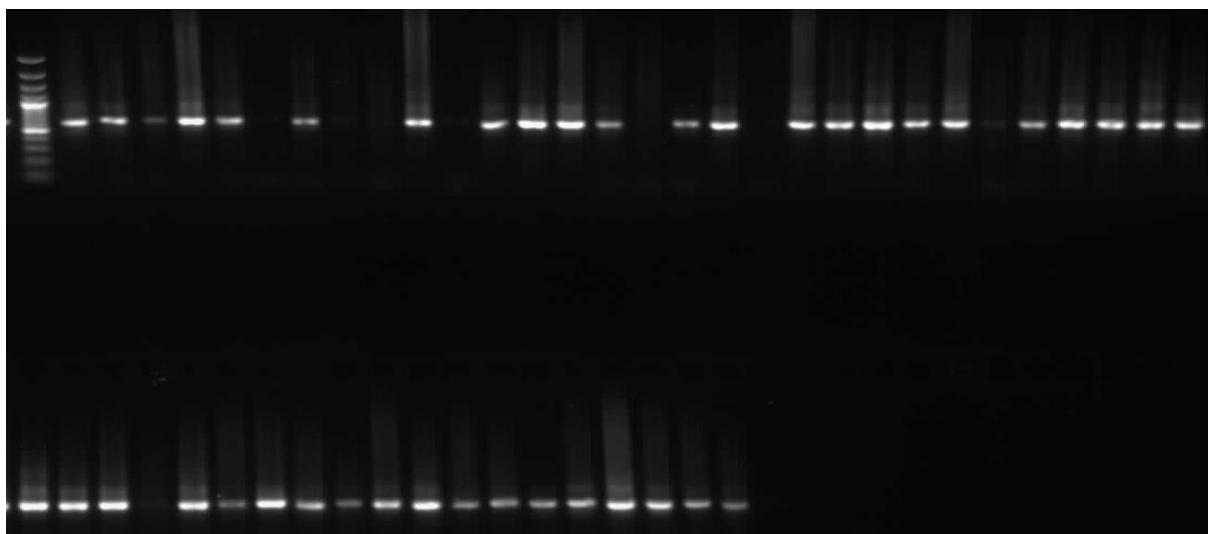
Marker PK NK vz.1 vz.2 vz.3 vz.4 vz.5 vz.6 vz.7 vz.8 vz.9 vz.10 vz.11 vz.12 vz.13

Obrázek 4.24: Kontrola touchdown PCR pomocí agarosové elektroforézy. DNA izolovaná metodou chloroform/izoamylalkohol; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola. Specifické primery pro skupinu *Actinobacteria*.

Nevýhodou nested PCR je vyšší riziko vzniku nespecifických produktů v průběhu reakce (Roux, 1995). Optimalizace tedy spočívala v nastavení vhodné teploty annealingu a počtu cyklů, tak, aby bylo amplifikováno dostatečné množství DNA a přitom minimalizován vznik nespecifických produktů. Teploty a délky jednotlivých kroků PCR 2 s vnitřními primery 341F GC a 907R jsou shrnuty v Tabulce 4.6. Výsledky optimalizace jsou patrné na Obrázku 4.25

Tabulka 4.6: PCR program PCR 2-DNA izolovaná z konsorcií degradérů kopolyesteru.

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10	1
Denaturace	95	1	25
Annealing	60	1	
Elongace	72	1,5	
Závěrečná extenze	72	10	1



Obrázek 4.25: Kontrola nested PCR (vnější primery *fD1*, *rD1* a vnitřní *341F GC*, *907R*) pomocí agarosové elektroforézy. DNA izolovaná metodou chloroform/izoamylalkohol; PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.

Po sérii testů různých metod izolace DNA byla jako nejvhodnější zvolena metoda chloroform/izoamylalkohol. Pro amplifikaci vybraného úseku genu 16S rRNA byly zvoleny vnější primery *fD1* a *rD1* a vnitřní *341F GC*, *907R*. Jako první byla provedena tzv. touchdown PCR. Po optimalizaci PCR byla amplifikovaná DNA v dostatečném množství a kvalitě, byl také minimalizován vznik nespecifických produktů.

4.3.3 Optimalizace denaturační gradientové gelové elektroforézy

Optimalizace DGGE spočívala jednak v zavedení metody na ÚIOŽP, jednak nastavení nejvhodnějšího gradientu denaturačních činidel pro rozdělení fragmentů DNA degradérů kopolyesteru. Gradient denaturačních činidel má významný vliv na ostrost a reprodukovatelnost bandů, které reprezentují konkrétní fragmenty DNA. Byly testovány gradienty 30-60 %, 30-70 %, 40-70 %, 20-80 % a 40-80 %. Poslední uvedený gradient poskytl nejlepší

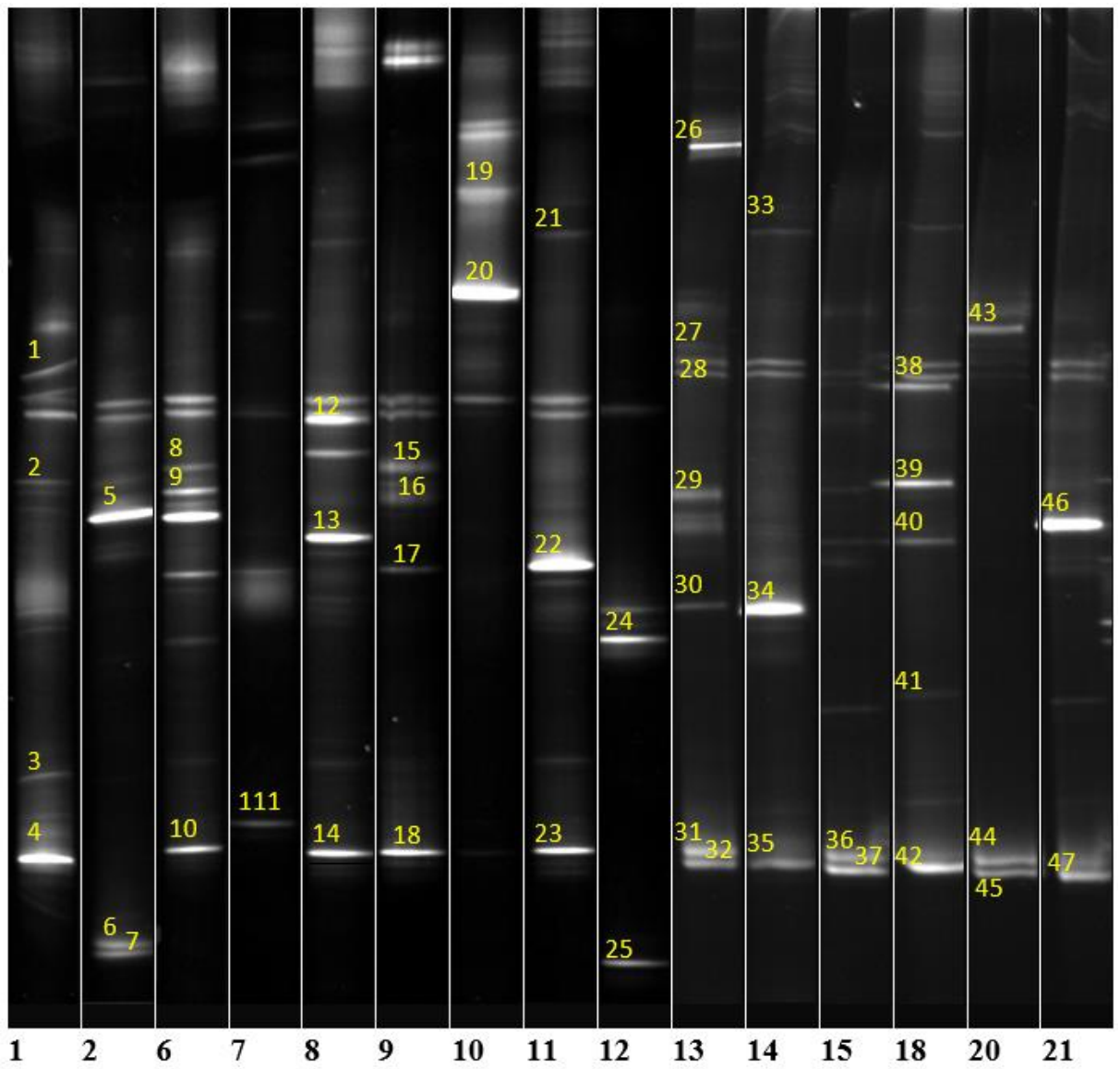
výsledky. Dále bylo optimalizováno napětí vkládané do soustavy při průběhu elektroforézy a doba, po kterou elektroforéza probíhala. Nejprve bylo testováno napětí 120 V, které na soustavu působilo 15 hodin. Bylo také testováno urychlení celé elektroforézy, kdy probíhala při 130 V po dobu 8 hodin, nedošlo ale k ostrému rozdělení bandů. Jako nejvhodnější napětí bylo vyhodnoceno 90 V. Elektroforéza probíhala přes noc po dobu 16,5 hodin.

4.3.4 Výsledky denaturační gradientové elektroforézy a identifikované mikroorganismy

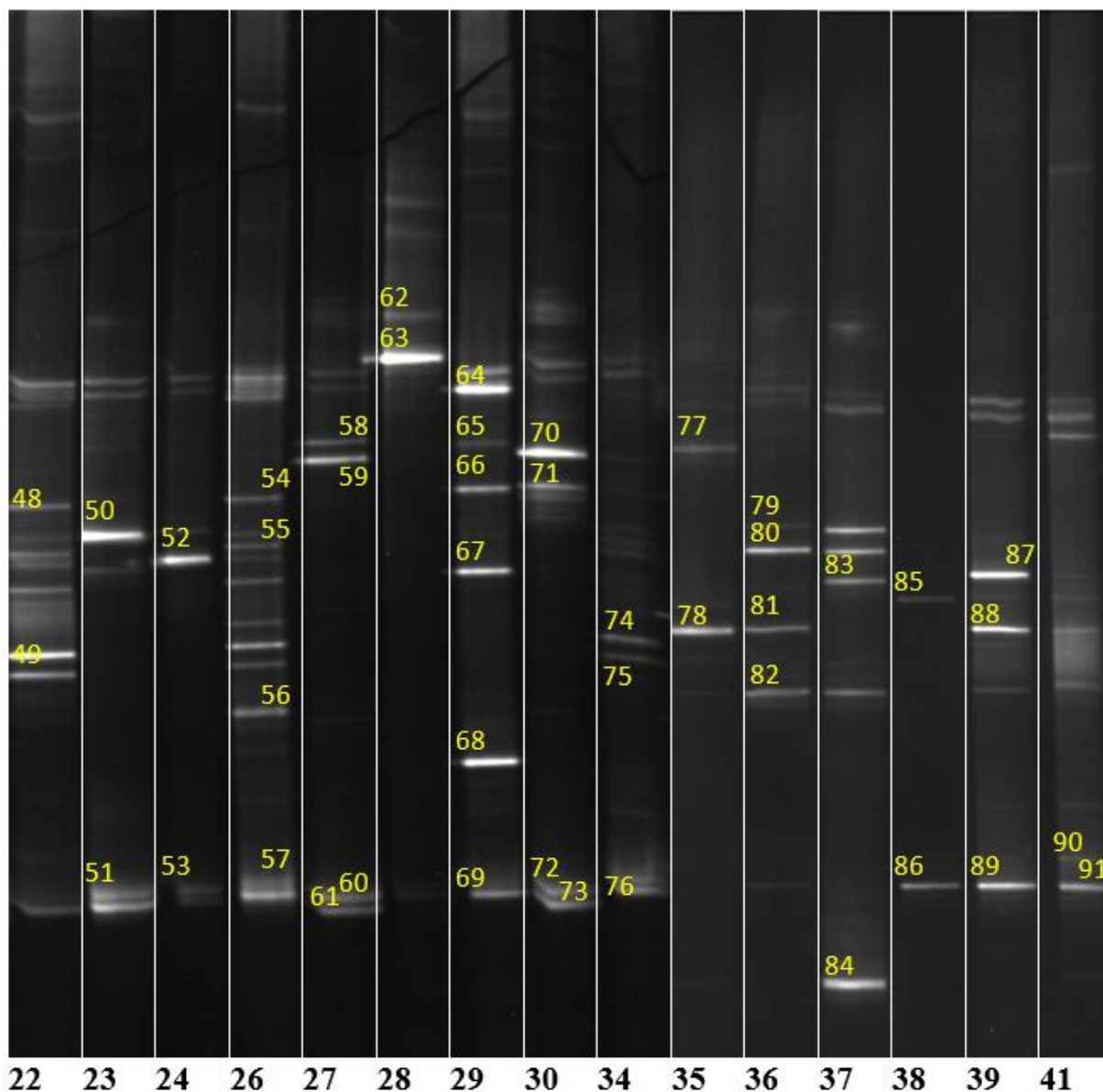
Metoda nested PCR následovaná DGGE byla využita pro analýzu bakteriálních konsorcií degradujících PBAT, která byla izolována z půdy. Po izolaci DNA byl amplifikován fragment regionu V3-V5, který je součástí genu 16S rRNA. Amplifikovaná DNA byla pomocí DGGE rozdělena do bandů na základě své mobility v gelu se stoupajícím denaturačním gradientem (Obrázek 4.26). Nejintenzivnější bandy byly z gelu vyřezány a po následné PCR a purifikaci sekvenovány firmou SEQme s.r.o. Sekvence DNA byly pak taxonomicky zařazeny.

Ve vzorcích půd lze pozorovat vždy více bandů, které reprezentují DNA různých skupin bakterií. Již z vizuálního posouzení lze tedy předběžně odvodit, že ve vzorcích se pravděpodobně nacházelo bakteriální konsorcium degradérů PBAT. Výskyt bakteriálních konsorcií degradujících PBAT v půdách byl potvrzen po vyhodnocení sekvencí a jejich přiřazení konkrétním bakteriálním taxonům.

a)



b)



Obrázek 4.26: a; b.: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia degradérů PBAT. Číslo ve spodní části obrázku označují číslo půdy. Číslo bandů jsou přiřazena identifikovaným bakteriím (PŘÍLOHA 2).

U většiny konsorcií byl přiřazen nejméně jeden signál (reprezentovaný bandem) druhu řadícímu se k aktinomycetám, nejčastěji k *Microbispora bispora*. Tato bakterie se jevila jako hlavní termofilní degradér PBAT, který je široce rozšířen v půdách ve sledované oblasti (východní Morava). V rámci disertační práce byla poprvé *Microbispora bispora* identifikována jako člen konsorcia degradérů biodegradabilního polymeru. Tato bakterie je známá pro svou celulólytickou aktivitu. Ideální teplota pro její růst byla ve studii Waldrona a kol., (1986) stanovena na 55 °C. *Microbispora bispora* produkuje extracelulární celulózu (endoglukanáza) s výtěžkem 5,9 U . ml⁻¹. Tento enzym je

aktivní v širokém rozmezí pH a je teplotně stabilní (Waldron *a kol.*, 1986). *Microbispora bispora* byla zatím izolována pouze z kompostu (Henssen, 1957; Waldron *a kol.*, 1986; Steger *a kol.*, 2007). V rámci disertační práce byla zjištěna také přítomnost této bakterie v půdách a v konsorciu degradujícím PBAT.

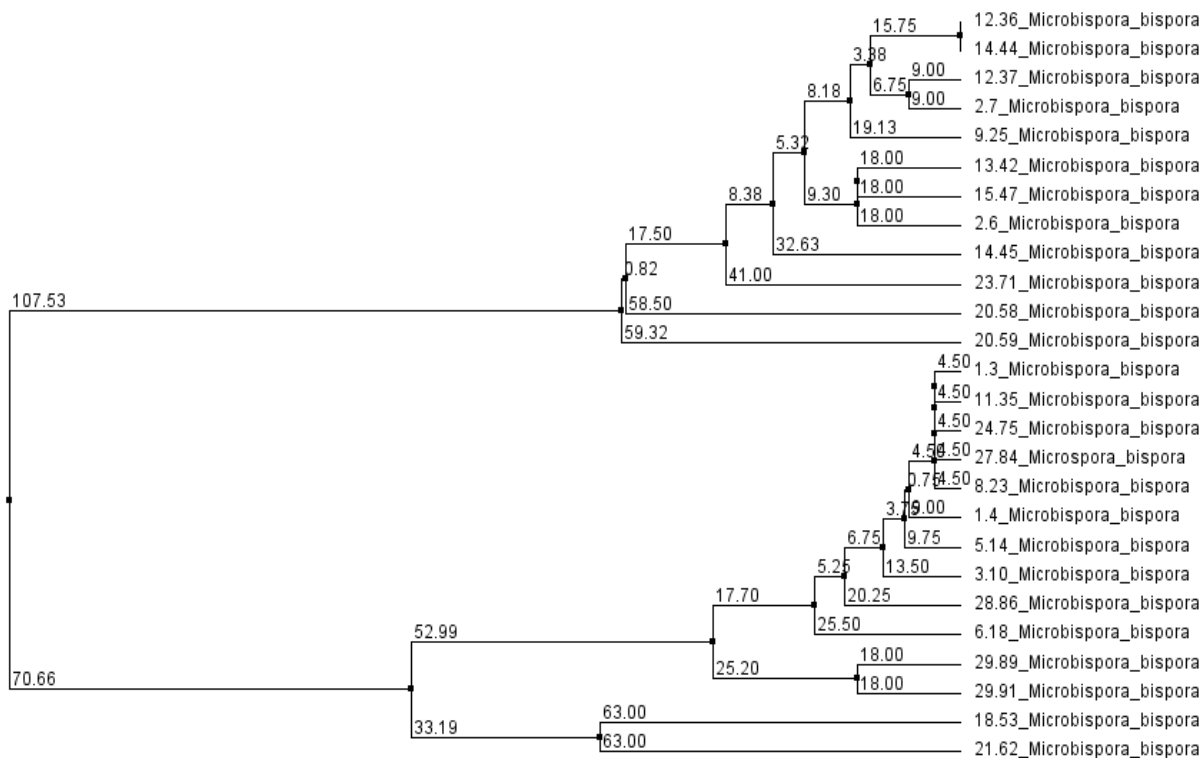
Mezi signály, které nepatřily zástupci aktinomycet *Microbispora bispora*, byly nejvíce zastoupeny bakterie řadící se mezi termofilní bacilli, především druh *Geobacillus* sp. Bakterie *Geobacillus kaustophilus* byla ve studii Grivalského *a kol.*, zařazena k degradérům PBAT (Grivalský *a kol.*, 2018). V několika dalších studiích byla popsána degradační aktivita bakterií rodu *Geobacillus*, bakterie byly schopné degradovat alifatické uhlovodíky s dlouhým řetězcem (Feng *a kol.*, 2007; Park *a kol.*, 2017), ropné uhlovodíky (Zhou *a kol.*, 2018) a také alifatické polymery Nylon-12 a Nylon-66 (Tomita *a kol.*, 2003). Bakterie rodu *Geobacillus* nebyly dosud v jiné práci sledovány v souvislosti s degradací alifatických-aromatických polyesterů. Ostatní bakterie se řadily do kmenu *Proteobacteria*. Identifikované bakterie a jejich taxonomické zařazení jsou uvedeny v PŘÍLOZE 2.

4.3.5 Fylogenetická analýza

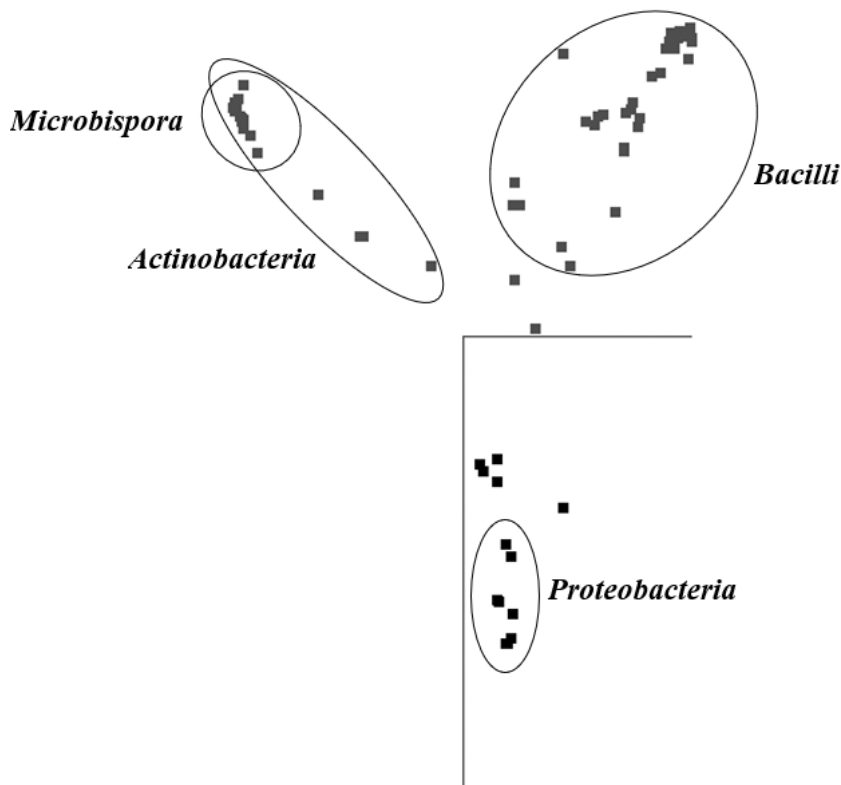
Studium vzájemných vztahů mezi různými taxonomickými skupinami lze provést pomocí fylogenetické analýzy. Příbuzenské vztahy lze posuzovat např. na základě genetické příbuznosti. Grafickým znázorněním fylogenetické analýzy je fylogenetický strom.

Ve fylogenetických stromech mohou místo taxonomických jednotek vystupovat přímo jednotlivé biologické druhy nebo i jednotlivé geny. V tomto případě byla ve fylogenetickém stromu vizualizována příbuznost mezi sekvencemi genu 16S rRNA aktinomycety *Microbispora bispora*. V programu Jalview byl pomocí metody neighbor joining sestrojen fylogenetický strom. Srovnáním získaných sekvencí bakterie *Microbispora bispora* bylo zjištěno, že tyto kmeny mohou být rozděleny do dvou skupin. Pokud bylo v jedné půdě přiřazeno více bandů bakterii *Microbispora bispora*, byly jejich sekvence velmi podobné, což ukazuje na blízkou příbuznost nalezených kmenů (Obrázek 4.27).

Z výsledků analýzy hlavních komponent je zřejmé, že *Microbispora bispora* spolu s různými zástupci třídy *Bacilli* byla mezi identifikovanými organismy nejvíce rozšířená. Další bakterie patřily, stejně jako *Microbispora bispora* do kmene *Actinobacteria* a také *Proteobacteria* které jsou v půdě hojně zastoupeny (Spain *a kol.*, 2009) (Obrázek 4.28).



Obrázek 4.27: Fylogenetický strom založený na získaných sekvencích *Microbispora bispora* úseku V3-V5 genu 16S rDNA.



Obrázek 4.28: Analýza hlavních komponent založená na sekvencích úseku V3-V5 genu 16S rDNA získaných z DGGE analýzy a sekvenování.

4.4 Využití molekulárně biologických metod při biodegradaci BTEX a ropných uhlovodíků *in situ*

Podstatou této bioremediační technologie byla podpora biodegradace BTEX a ropných uhlovodíků za anoxických podmínek. Byla sledována diverzita a vývoj bakteriálního společenstva na lokalitách s vysokou koncentrací BTEX a leteckého petroleje ve zvodnělé horninové vrstvě. Bylo vyhodnoceno, zda měla aplikace nutrientů a terminálního akceptoru elektronů přímo na vybraných lokalitách pozitivní vliv na diverzitu a množství potenciálních degradérů.

Testované vzorky byly charakteristické vysokou bakteriální diverzitou, proto bylo provedeno několik optimalizací PCR a DGGE, aby bylo možné spolehlivě vyhodnotit výsledky.

Dosažené výsledky byly prezentovány ve spolupráci s EPS biotechnology s.r.o. a Univerzitou Pardubice v rámci projektu Technologické agentury ČR Pokročilé technologie lithotrofní imobilizace a anaerobní bioremediace pro nápravu a prevenci škod na životním prostředí-„ANAREM“.

4.4.1 Optimalizace polymerázové řetězové reakce pro vzorky s vysokou bakteriální diverzitou

Využití molekulárně biologických metod při identifikaci bakteriálních konsorcií s vysokou diverzitou může být problematické. Během PCR může docházet k preferenční amplifikaci DNA některých bakteriálních skupin. V článku Gonzales *a kol.*, (2012) se uvádí, že relativní efektivita amplifikace různých bakteriálních druhů není úměrná jejich zastoupení ve vzorcích. Přítomnost bakteriálních skupin, které se vyskytují s nižší abundancí tak může být podceněna. S rostoucí teplotou amplifikace dle článku Sipos *a kol.*, (2007) rostla také preferenční amplifikace nejvíce zastoupených druhů. Při nízké teplotě ale během PCR vznikají nespecifické produkty (Friedrich *a kol.*, 2006). Proto bylo v této části práce optimalizováno nastavení PCR tak, aby bylo co nejvíce zamezeno vzniku nespecifických produktů a zároveň preferenčním amplifikacím. Cílem bylo analyzovat změny v diverzitě a abundanci bakterií, které se na lokalitě vyskytovaly po aplikaci základních živin a terminálních akceptorů elektronů a identifikovat bakteriální skupiny degradující vysokomolekulární uhlovodíky. Z toho důvodu byl kladen důraz na celkový obraz bakteriálního společenstva, který by nepodcenil přítomnost některého z důležitých druhů. V Tabulkách 4.7 a 4.8 je uvedeno nastavení PCR programu, které poskytovalo nejlepší výsledky.

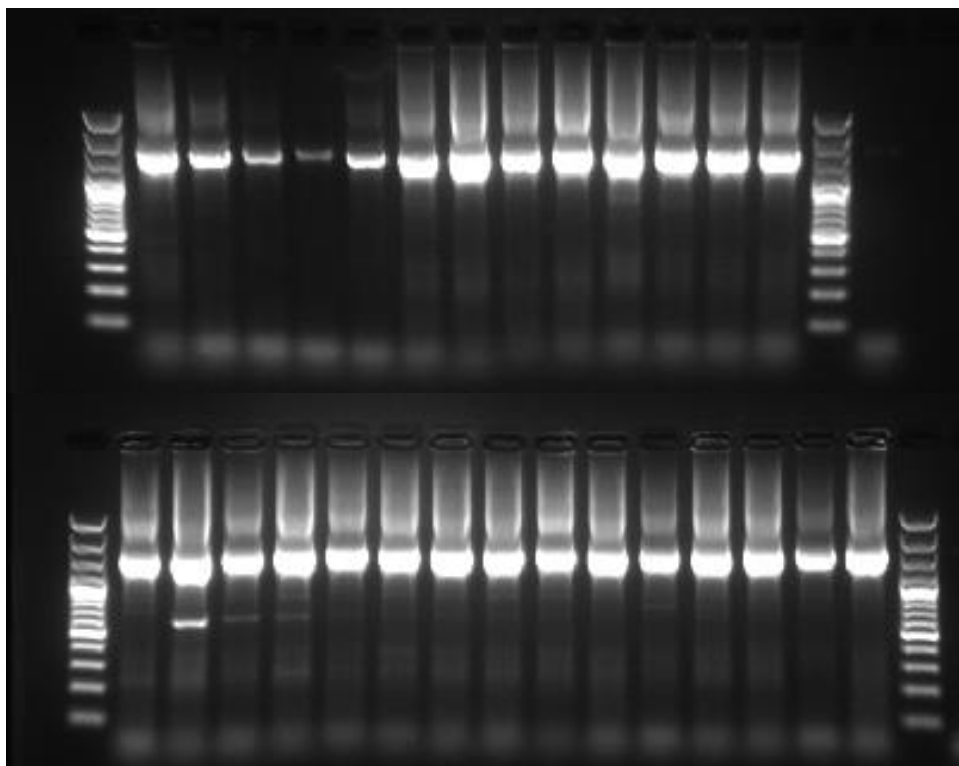
Tabulka 4.7: PCR program touchdown PCR-DNA izolovaná z kontaminovaných lokalit.

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2	1
Denaturace	95	0,5	10 -0,5 °C/cyklus
Annealing	58	1	
Elongace	72	1,5	
Denaturace	95	0,5	24
Annealing	53	1	
Elongace	72	1,5	
Závěrečná extenze	72	10	1

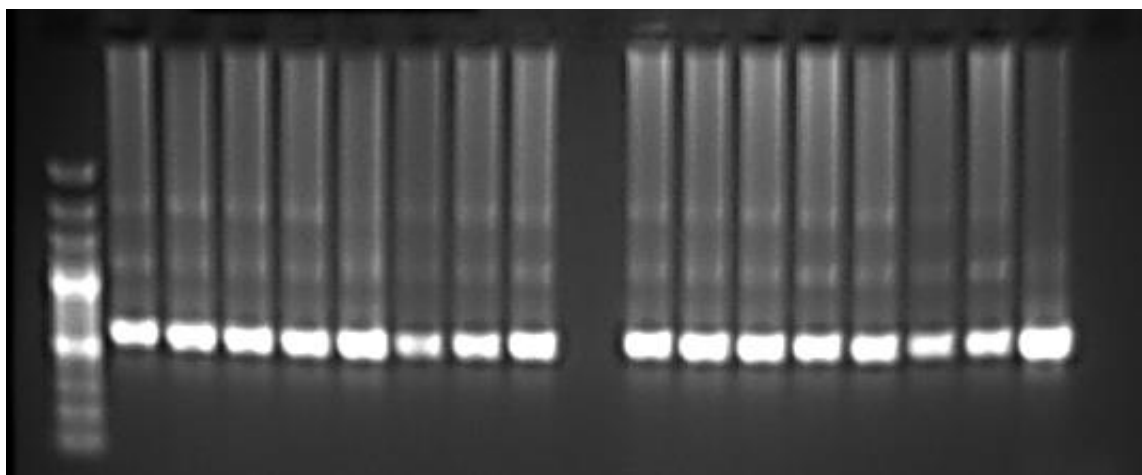
Tabulka 4.8: PCR program PCR 2 DNA izolovaná z kontaminovaných lokalit.

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10	1
Denaturace	95	1	25
Annealing	61	1	
Elongace	72	1,5	
Závěrečná extenze	72	10	1

Stejně jako v Kapitole 3.5.6 byla nejprve provedena touchdown PCR (Obrázek 4.29), ve které došlo k amplifikaci 1500 bp dlouhého fragmentu DNA. Poté následovala druhá PCR s vnitřními primery a byl amplifikován úsek DNA dlouhý 560 bp (Obrázek 4.30).



Obrázek 4.29: Kontrola TD PCR (vnější primery fD1 rD1) pomocí agarosové elektroforézy.

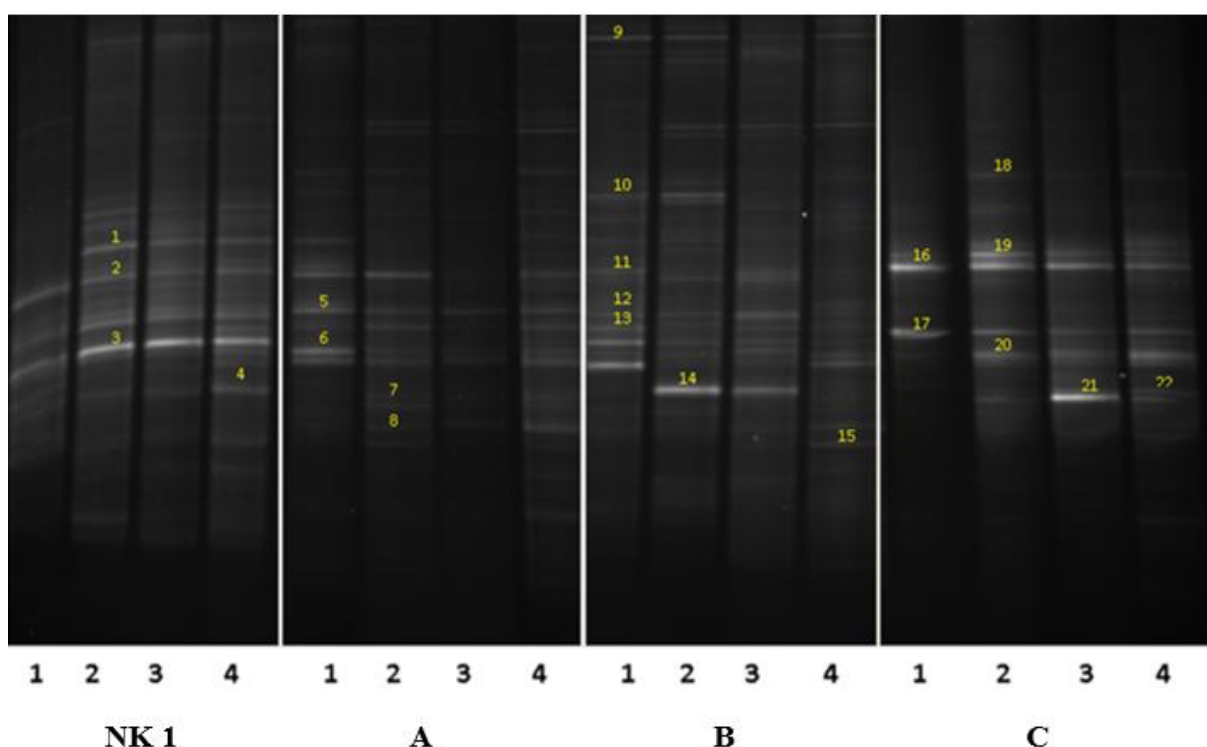


Obrázek 4.30: Kontrola nested PCR (vnější primery fD1, rD1 a vnitřní primery 341F GC, 907R) pomocí agarosové elektroforézy.

4.4.2 Výsledky denaturační gradientové elektroforézy a bakterie identifikované ve vzorcích z lokality kontaminované BTEX

Na lokalitě kontaminované BTEX byly odebrány ze zvodnělé horninové vrstvy vzorky, ze kterých byla izolována DNA a identifikováni členové bakteriálního konsorcia.

Vzhledem k tomu, že byly analyzovány environmentální vzorky s vysokou bakteriální diverzitou, a kompletní analýza tedy nebyla prakticky možná, byly primárně sekvenovány bandy, u kterých došlo v průběhu času ke změně intenzity. Změna intenzity značí rozvoj či úbytek konkrétního bakteriálního kmene. DNA každého vzorku byla do gelu dávkována dle data odběru a vzorky po sobě následovaly od nekontaminovaného pozadí až po vzorek, kde byla zjištěna nejvyšší kontaminace BTEX.



Obrázek 4.31: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia izolovaného z lokality kontaminované BTEX během aplikačního období nutrientů a akceptorů terminálních elektronů. Čísla ve spodní části obrázku označují posloupnost odběrů; NK 1-kontrolní vrt; A-B-C-vrty se vzrůstající kontaminací BTEX. Čísla bandů jsou přiřazena identifikovaným bakteriím (PŘÍLOHA 3).

Z výsledků lze usoudit, že u kontrolního vrtu **NK 1** došlo v průběhu vzorkování k mírnému zvýšení bakteriální diverzity a k pomnožení především bakterií rodu *Zooglea*, *Treponema* a *Dokdonella*. Bakterie rodu *Dokdonella* byly kromě kontrolního vrtu identifikovány také ve vrtech **B** a **C**. U těchto vrtů došlo u rodu *Dokdonella* pouze k mírným změnám v diverzitě. Vzhledem k jejich

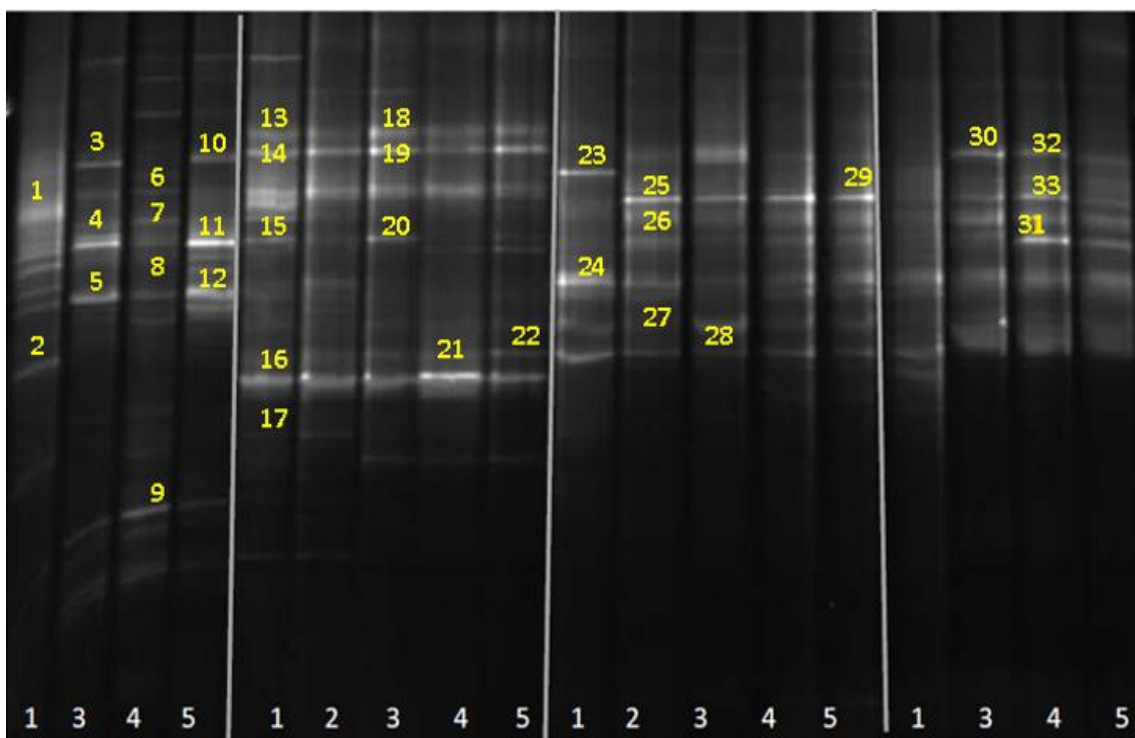
nárůstu v kontrolním vrtu, do kterého nebyly aplikovány živiny ani terminální akceptor elektronů, lze soudit, že jejich rozvoj byl ovlivněn také jinými faktory. Ve vrtu **B** byly aplikací nutrientů nejvíce ovlivněny bakterie rodu *Azoarcus* (band č. 14). Jedná se o anaerobní nebo fakultativně anaerobní denitrifikační bakterie degradující aromatické uhlovodíky (Rabus a Widdel, 1995; Springer *a kol.*, 1998). Jako terminální akceptor elektronů využívají v anaerobním prostředí dusičnany (Carmona *a kol.*, 2009; Zamarro *a kol.*, 2017). Ve vrtu **C** došlo po aplikaci nutrientů ke zvýšení množství bakterií *Geothrix fermentans* (band č. 21). Tato anaerobní bakterie je schopná redukce Fe^{3+} , byla u ní (nebo blízkce příbuzného druhu) také prokázána schopnost degradace BTEX (Coates *a kol.*, 1999; Rooney-Varga *a kol.*, 1999; Da Silva a Corseuil, 2012; Klueglein *a kol.*, 2013). *G. fermentans* může využívat jako akceptor terminálních elektronů Fe^{3+} , případně Mn^{4+} , dusičnany, 2,6-anthraquinone disulfonát a fumarát (Bond a Lovley, 2005; Coates *a kol.*, 1999). V nejméně kontaminovaném vrtu **A** neměla aplikace podpůrných látek velký vliv na změny v bakteriální diverzitě. Mezi potenciálně zajímavé identifikované bakterie, které se vyskytovaly v podzemní vodě odebrané z tohoto vrtu, se řadí také *Candidatus Nitrotoga arctica*. Jedná se o psychrofilní nitrifikační bakterii dříve identifikovanou ve vzorcích permafrostu (Alawi *a kol.*). Ve vodách byly kromě anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií identifikovány také bakterie aerobní (např. *Dokdonella* sp., *Acidovorax* sp., *Candidatus Nitrotoga arctica*), tyto bakterie pravděpodobně nebyly metabolicky aktivní. Na lokalitě byly identifikovány bakterie patřící do tříd *Bacilli*, *Betaproteobacteria*, *Clostridia*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Spirochaetia*. Identifikované bakterie a jejich taxonomické zařazení jsou uvedeny v PŘÍLOZE 3.

Molekulárně-biologickými metodami byly stanoveny změny ve složení bakteriálního konsorcia, byly identifikovány bakterie přítomné na lokalitě, mezi nimi také potenciálně zajímavé, které nejvíce reagovaly na aplikaci nutrientů a mohou mít potenciál při degradaci BTEX.

Aplikace nutrientů a akceptorů terminálních elektronů tedy podpořila růst bakteriálních druhů, které jsou potenciálními degradéry BTEX, z literatury byla potvrzena přítomnost dvou druhů degradérů na lokalitách kontaminovaných aromatickými uhlovodíky. Podpora růstu těchto bakterií mohla být použita jako součást sanačních prací, které na lokalitě probíhaly.

4.4.3 Výsledky denaturační gradientové elektroforézy a bakterie identifikované ve vzorcích z lokality kontaminované leteckým petrolejem

Byla provedena molekulárně-biologická analýza vlivu aplikace dusičnanů a komplexního činidla na bakteriální diverzitu a vývoj konsorcia bakterií na lokalitě dlouhodobě kontaminované leteckým petrolejem. Bakteriální diverzita byla velmi vysoká, a proto byly sekvenovány jen vybrané bandy.

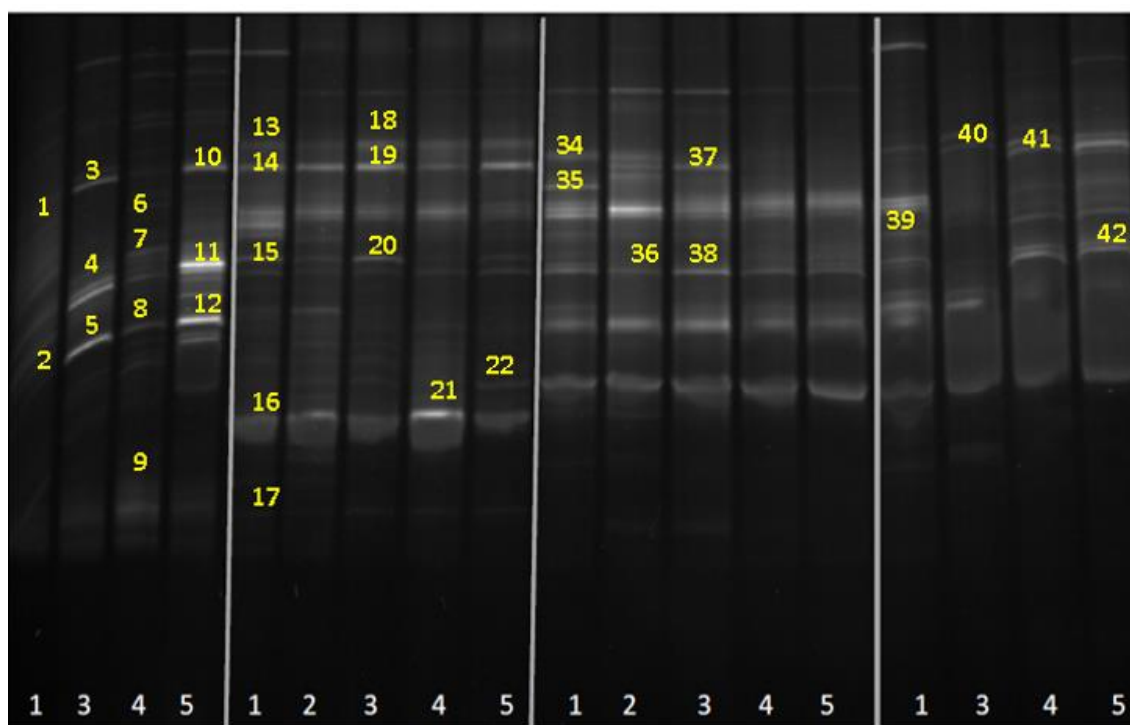


NK 2

PK

N_A

KČ_A



NK 2

PK

N_B

KČ_B

Obrázek 4.32: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia izolovaného z lokality kontaminované leteckým petrolejem během aplikačního období akceptorů terminálních akceptorů elektronů. Čísla ve spodní části obrázku označují posloupnost odběrů; NK 2-nekontaminované pozadí; PK-kontaminované pozadí, N_A, N_B-aplikace dusičnanů, NČ_A, NČ_B-aplikace komplexního činidla. Čísla bandů jsou přiřazena identifikovaným bakteriím (PŘÍLOHA 4).

V případě aplikace dusičnanů nedošlo k výrazným změnám v diverzitě bakteriálního konsorcia. K nejvýraznější změně intenzity došlo 2 týdny po aplikaci u bandu 37, který patřil *Saccharofermentans acetigenes*, při dalším vzorkování již nebyl band patrný.

Ve vrtech, ve kterých bylo aplikováno komplexní činidlo, byla mikroflóra ovlivněna výrazněji, k zesílení bandu, které reprezentuje zvýšení množství DNA, došlo po aplikaci komplexního činidla především u bandů označených jako 31 a 42. DNA v bandu 31 patřila *Sulfuricella denitrificans*. Jedná se o fakultativně anaerobní, síru oxidující bakterii (Watanabe *a kol.*, 2014). DNA, která byla přítomná v bandu 42 byla identifikována jako *Rhodanobacter* sp. Některé kmeny bakterií rodu *Rhodanobacter* mají potenciál při degradaci benzo[a]pyrenu, který je složkou motorové nafty (Kanaly *a kol.*, 2002). Jako terminální elektron jsou využívány především dusičnany, dusitany N_2O a Fe^{3+} (Prakash *a kol.*, 2011).

V nekontaminovaném (kontrolním) vrtu byli identifikováni zástupci tříd *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* a *Betaproteobacteria*. Ve vrtu s kontaminovaným pozadím byly identifikovány bakterie patřící do tříd *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Clostridia*, *Acidobacteria*, *Betaproteobacteria*. Mikroflóra vrtů, ve kterých proběhla aplikace komplexního činidla, se skládala ze zástupců tříd *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* a *Spirochaetia*. Ve vrtech, do kterých byly aplikovány dusičnany, se vyskytovaly bakterie patřící do tříd *Betaproteobacteria*, *Spirochaetia* a *Clostridia*.

Z výsledků identifikace bakterií přítomných na lokalitách je patrná velká bakteriální diverzita. Vyskytují se zde také bakterie, u kterých je z literatury známá schopnost degradovat látky přítomné v leteckém petroleji, např. bakterie *Syntrophus* sp., *Dechloromonas* sp., *Curvibacter* sp. nebo *Albidiferax* sp. (Meckenstock, 1999; Chakraborty *a kol.*, 2005; Chiu *a kol.*, 2013; Yang *a kol.*, 2014). Nepodařilo se ale prokázat pozitivní reakci na přídavek akceptorů terminálních elektronů.

Stejně jako ve vzorcích odebraných z lokality kontaminované BTEX, i na lokalitě kontaminované leteckým petrolejem se vyskytovaly aerobní bakterie (např. *Hydrocarboniphaga daqingensis*, *Granulicella paludicola*, *Dokdonella* sp.). Jednalo se pravděpodobně o metabolicky neaktivní bakterie.

5. ZÁVĚR

Disertační práce se věnovala problematice biodegradace polymerů a dále také využití molekulárně biologických metod pro analýzu environmentálních vzorků. Ze získaných výsledků lze odvodit následující závěry:

Biodegradace filmů komerčně vyráběného alifatického aromatického kopolyesteru polybutylen adipát tereftalátu probíhala při 25 °C ve 3 druzích půd dle očekávání poměrně pomalu. Paralelně probíhal biodegradací experiment s filmy vyrobenými ze směsi tohoto kopolyesteru se škrobem (termoplastický škrob). Výsledky dokumentují, že mineralizace směsného filmu začala již v prvních dnech a intenzivně pokračovala po celou dobu experimentu. Přítomnost škrobu v materiálu podpořila biodegradaci samotného kopolyesteru.

Film vyrobený z čistého kopolyesteru vykazoval změny v mechanických vlastnostech, ale film si i na konci experimentu zachoval integritu bez významného poškození. Kopolyester ve směsi se škrobem se v půdě rozpadl na drobné částice již po 20 dnech inkubace. Dalšími experimenty bylo prokázáno, že pevnost v tahu i napětí při přetržení se výrazně snížily již na začátku experimentu.

Měření změn molekulových hmotností obou materiálů a sledování vývoje distribučních křivek molekulových hmotností podpořilo výsledky biodegradčních experimentů a mechanických zkoušek a prokázali, že kopolyester byl skutečně biodegradován a asimilován půdními mikroorganismy.

Pomocí barvení Lugolovým roztokem a optické mikroskopie byl v průběhu degradace pozorován rapidní úbytek škrobových zrn ve směsi škrobu a kopolyesteru. Barvením safraninem byl vizualizován vývoj biologických struktur na povrchu filmu. Rastrovací elektronová mikroskopie ukázala, že na povrchu materiálu vyrobeného ze směsi se škrobem vznikaly v průběhu biodegradace paralelně orientované trhliny a byly zde také přítomny bakteriální filamenta a spory.

Biodegradací experiment byl podpořen také výsledky měření abiotické hydrolýzy, experimenty byly provedeny s polyestery PBS, PBSA a PBAT, jako negativní kontrola sloužil PBT. Vzorky ve vodném prostředí byly inkubovány při 30, 58 a 70 °C. Teplota měla na degradaci významný vliv, se zvyšující se teplotou rostla míra degradace materiálů.

Ze 30 vzorků půd se podařilo po selektivním pomnožení izolovat termofilní degradační konsorcia (biodegradace kopolyesteru PBAT) a stanovit počty CFU.

Pomocí metody PCR-DGGE a sekvenace byli identifikováni členové konsorcií. Nejčastěji byla v půdách zastoupena bakterie *Microbispora bispora*.

Ve spolupráci s firmou EPS biotechnology s.r.o. bylo provedeno posouzení vlivu nutrientů a akceptorů terminálních elektronů na vývin bakteriálních konsorcií a identifikace jednotlivých bakterií ve zvodnělé horninové vrstvě na lokalitách kontaminovaných BTEX a leteckým petrolejem. Práce byly provedeny v rámci sanací kontaminovaných lokalit.

Aplikace nutrientů a akceptorů terminálních elektronů na lokalitě kontaminované BTEX podpořila růst bakteriálních druhů, které jsou potenciálními degradéry těchto polutantů.

V případě lokality kontaminované leteckým petrolejem byly jako terminální akceptory elektronů aplikovány dusičnany a také komplexní činidlo (NO_3^- , SO_4^{2-} a Fe^{3+}). Po aplikaci dusičnanů nedošlo k výrazným změnám v diverzitě bakteriálního konsorcia. Ve vrtech, ve kterých bylo aplikováno komplexní činidlo, byla mikroflóra ovlivněna výrazněji.

6. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Přínosem pro vědu je zjištění, že:

1. Přítomnost škrobu podporuje biodegradaci PBAT v půdě v mezofilních podmínkách.
2. Analýzou 41 vzorků půd byla prokázána přítomnost degradérů PBAT v životním prostředí.
3. Metoda DGGE potvrdila hypotézu, že biodegradace PBAT se účastní bakteriální konsorcia, která jsou efektivnější než izolované kolonie.
4. Na ÚIOŽP byla zavedena a optimalizována metoda PCR-DGGE, která je v současnosti široce využívána v dalších vědeckých experimentech.

Přínosem pro praxi je to, že:

1. Studium biodegradace polyesterů v reálných půdách za mezofilních podmínek může pomoci docílit efektivního rozkladu polymerů po jejich užití na zemědělských plochách či na skládkách.
2. Získané poznatky mohou přispět k výzkumu a vývoji v oblasti výroby a použití například biodegradabilních mulčovacích fólií.
3. Molekulárně biologická analýza kontaminovaných lokalit může být aplikována do environmentální praxe a využita v rámci sanací.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHMED, Temoor, Muhammad SHAHID, Farrukh AZEEM, et al. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018/03/01, 25(8), 7287-7298. DOI: 10.1007/s11356-018-1234-9. ISSN 1614-7499. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1234-9>

ALAWI, M., Tina LIPSKI A FAU - SANDERS, Eva Maria SANDERS T FAU - PFEIFFER, Eva PFEIFFER EM FAU - SPIECK a E. SPIECK. Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. Department of Biology, Biocenter Klein Flottbek, University of Hamburg, Hamburg, Germany. FAU - Lipski, Andre, (1751-7362 (Print).

ALEF, Kassem a Paolo NANNIPIERI. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London: Academic Press, 1995, 576 s. ISBN 0-12-513840-7.

AMMALA, Anne, Stuart BATEMAN, Katherine DEAN, et al. An overview of degradable and biodegradable polyolefins. *Progress in Polymer Science*. 2011, 36(8), 1015-1049. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.12.002>. ISSN 0079-6700. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670010001267>

BARRAGAN, D. H., A. M. PELACHO a L. MARTIN-CLOSAS. Degradation of agricultural biodegradable plastics in the soil under laboratory conditions. *Soil Research*. 2016, 54(2), 216-224. DOI: 10.1071/sr15034. ISSN 1838-675X. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000373149000012

BERTI, Corrado, Annamaria CELLI, Paola MARCHESE, Giancarlo BARBIROLI, Francesco DI CREDICO, Vincent VERNEY a Sophie COMMEREUC. Novel copolyesters based on poly(alkylene dicarboxylate)s: 1. Thermal behavior and biodegradation of aliphatic–aromatic random copolymers: 1. Thermal behavior and biodegradation of aliphatic–aromatic random copolymers. *European Polymer Journal*. 2008, 44(11), 3650-3661. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.08.039>. ISSN 0014-3057. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305708004424>

BILCK, A. P., M. V. E. GROSSMANN a F. YAMASHITA. Biodegradable mulch films for strawberry production. *Polymer Testing*. [Bilck, Ana Paula, Jun, 29(4), 471-476. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2010.02.007. ISSN 0142-9418. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000278286300009

BIUNDO, A., A. HROMIC, T. PAVKOV-KELLER, et al. Characterization of a poly(butylene adipate-co-terephthalate)-hydrolyzing lipase from *Pelosinus fermentans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Feb, 100(4), 1753-1764. DOI: 10.1007/s00253-015-7031-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000369309000019

BOND, D. R. a D. R. LOVLEY. Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*, 2005. Department of

Microbiology, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, USA. dbond@umn.edu FAU - Lovley, Derek R, (0099-2240 (Print). Dostupné také z: <http://aem.asm.org/content/71/4/2186.full>

BONHOMME, S., A. CUER, A. M. DELORT, J. LEMAIRE, M. SANCELME a G. SCOTT. Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*. 2003, 81(3), 441-452. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00129-0). ISSN 0141-3910. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391003001290>

BOYANDIN, A. N., S. V. PRUDNIKOVA, V. A. KARPOV, et al. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Sep, 83, 77-84. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.04.014. ISSN 0964-8305. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000322287100011

BROWNIE, J., S. SHAWCROSS, J. THEAKER, D. WHITCOMBE, R. FERRIE, C. NEWTON a S. LITTLE. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research*. 1997, 25(16), 3235-3241. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146890/>

CARMONA, Manuel, María Teresa ZAMARRO, Blas BLÁZQUEZ, et al. Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View: a Genetic and Genomic View. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. 2009, 73(1), 71-133. DOI: 10.1128/MMBR.00021-08. ISSN 1092-2172. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2650882/>

CHAKRABORTY, R., S. M. O'CONNOR, E. CHAN a J. D. COATES. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology*. Dec, 71(12), 8649-8655. DOI: 10.1128/aem.71.12.8649-8655.2005. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000234417600125

CHALEAT, C. M., M. NIKOLIC, R. W. TRUSS, I. TAN, S. A. MCGLASHAN a P. J. HALLEY. Thermoplastic Starch Polymer Blends and Nanocomposites. *Biobased Monomers, Polymers, and Materials*. 2012, 1105, 323-334. ISSN 0097-6156. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000318959800019

CHANDRA, R. a R. RUSTGI. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. 1998, 23(7), 1273-1335. DOI: 10.1016/s0079-6700(97)00039-7. ISSN 0079-6700. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000077043000004

CHIU, H. Y., A. HONG, S. L. LIN, R. Y. SURAMPALLI a C. M. KAO. Application of natural attenuation for the control of petroleum hydrocarbon plume: Mechanisms and effectiveness evaluation: Mechanisms and effectiveness evaluation. *Journal of Hydrology*. Nov, 505, 126-137. DOI: 10.1016/j.jhydrol.2013.09.027. ISSN 0022-1694. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000328806400011

CHO, K., J. LEE a K. KWON. Hydrolytic degradation behavior of poly(butylene succinate)s with different crystalline morphologies. *Journal of*

Applied Polymer Science. Feb7, 79(6), 1025-1033. ISSN 0021-8995. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000166230000005

COATES, J. D., D. J. ELLIS, C. V. GAW a D. R. LOVLEY. Geothrix fermentans gen. nov., sp nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. International Journal of Systematic Bacteriology. Oct, 49, 1615-1622. ISSN 0020-7713. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000083450800034

DA ROZ, A. L., A. J. F. CARVALHO, A. GANDINI a A. A. S. CURVELO. The effect of plasticizers on thermoplastic starch compositions obtained by melt processing. Carbohydrate Polymers. Mar, 63(3), 417-424. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.09.017. ISSN 0144-8617. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000236166200017

DA SILVA, M. L. B. a H. X. CORSEUIL. Groundwater microbial analysis to assess enhanced BTEX biodegradation by nitrate injection at a gasohol-contaminated site. International Biodeterioration & Biodegradation. Feb, 67, 21-27. DOI: 10.1016/j.ibiod.2011.11.005. ISSN 0964-8305. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000301405800004

DEROINE, Morgan, Antoine LE DUGOU, Yves-Marie CORRE, Pierre-Yves LE GAC, Peter DAVIES, Guy CESAR a Stephane BRUZAUD. Accelerated ageing of polylactide in aqueous environments: Comparative study between distilled water and seawater: Comparative study between distilled water and seawater. Polymer Degradation and Stability. Oct, 108, 319-329. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.01.020. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000343380800037

DIAZ, L. F. The science of composting. Waste Management & Research. Feb, 17(1), 66-66. ISSN 0734-242X. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000079747500011

DU, Yan-Li, Yu CAO, Fang LU, Fang LI, Yi CAO, Xiu-Li WANG a Yu-Zhong WANG. Biodegradation behaviors of thermoplastic starch (TPS) and thermoplastic dialdehyde starch (TPDAS) under controlled composting conditions. Polymer Testing. Dec, 27(8), 924-930. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2008.08.002. ISSN 0142-9418. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000261370900003

DVORACKOVA, M., P. SVOBODA, L. KOSTKA a S. PEKAROVA. Influence of biodegradation in thermophilic anaerobic aqueous conditions on crystallization of poly(butylene succinate). Polymer Testing. Oct, 47, 59-70. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2015.08.006. ISSN 0142-9418. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000362859000010

EMADIAN, S. M., T. T. ONAY a B. DEMIREL. Biodegradation of bioplastics in natural environments. Waste Management. Jan, 59, 526-536. DOI: 10.1016/j.wasman.2016.10.006. ISSN 0956-053X. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000390503000053

EUGEN, Ulea, Florin LIPȘA, Bălău ANDREEA MIHAELA, Filipov FEODOR a Morari EVELINA CRISTINA. Diversity of soil bacteria as indicators of soils pollution in Moldavia region, Romania. 2015.

FENG, Lu, Wei WANG, Jiansong CHENG, et al. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007, 104(13), 5602. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/content/104/13/5602.abstract>

FISCHER, S. G. a L. S. LERMAN. LENGTH-INDEPENDENT SEPARATION OF DNA RESTRICTION FRAGMENTS IN 2-DIMENSIONAL GEL-ELECTROPHORESIS. Cell. 1979, 16(1), 191-200. DOI: 10.1016/0092-8674(79)90200-9. ISSN 0092-8674. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1979GG25500019

FOULC, M. P., A. BERGERET, L. FERRY, P. IENNY a A. CRESPIY. Study of hygrothermal ageing of glass fibre reinforced PET composites. Polymer Degradation and Stability. Sep, 89(3), 461-470. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.01.025. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000230805500009

FRIEDRICH, V. Wintzingerode, B. GÖBEL ULF a Erko STACKEBRANDT. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews. 1997/11/01, 21(3), 213-229. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x. ISSN 0168-6445. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x>

FUKUSHIMA, K., A. RASYIDA a M. C. YANG. Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. Applied Clay Science. [Fukushima, Kikku, Aug, 80-81, 291-298. DOI: 10.1016/j.clay.2013.04.015. ISSN 0169-1317. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000325039100038

FUKUSHIMA, K., D. TABUANI, M. DOTTORI, I. ARMENTANO, J. M. KENNY a G. CAMINO. Effect of temperature and nanoparticle type on hydrolytic degradation of poly(lactic acid) nanocomposites. Polymer Degradation and Stability. Dec, 96(12), 2120-2129. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.09.018. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000297877100012

FUKUSHIMA, Kikku, Meng-Hsiu WU, Sergio BOCCHINI, Amaliya RASYIDA a Ming-Chien YANG. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications. Aug1, 32(6), 1331-1351. DOI: 10.1016/j.msec.2012.04.005. ISSN 0928-4931. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000306030900004

GONZALEZ, Juan M., Maria C. PORTILLO, Pedro BELDA-FERRE a Alex MIRA. Amplification by PCR Artificially Reduces the Proportion of the Rare

Biosphere in Microbial Communities. PLoS ONE. 01/11n. 1., 7(1), e29973. DOI: 10.1371/journal.pone.0029973. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3256211/>

GOPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. Biomaterials. Jan, 17(2), 103-114. DOI: 10.1016/0142-9612(96)85755-3. ISSN 0142-9612. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1996TY45800004

GRAULUS, G. J., T. BILLIET, S. VAN VLIERBERGHE, H. THIENPONT, H. OTTEVAERE a P. DUBRUEL. Biodegradable Polyesters: From Monomer to Application: From Monomer to Application. Handbook of Sustainable Polymers: Processing and Applications. 2016, , 753-802. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000376353500022

GRIVALSKÝ, Tomáš, Jozef RYCHLÝ, Lyda RYCHLÁ, Mária BUČKOVÁ, Lucia KRAKOVÁ, Andrea PUŠKÁROVÁ, Ľubomír OROVČÍK a Domenico PANGALLO. Aerobic Biodegradation of Aromatic Aliphatic Copolyester Induced by Bacteria Obtained from Different Environments. Journal of Polymers and the Environment. 2018/02/01, 26(2), 680-690. DOI: 10.1007/s10924-017-0980-y. ISSN 1572-8900. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s10924-017-0980-y>

HAKKARAINEN, M., A. C. ALBERTSSON a S. KARLSSON. Weight losses and molecular weight changes correlated with the evolution of hydroxyacids in simulated in vivo degradation of homo- and copolymers of PLA and PGA. Polymer Degradation and Stability. 1996, 52(3), 283-291. DOI: 10.1016/0141-3910(96)00009-2. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1996VA70500009

HAMID, S. Halim. Handbook of polymer degradation. Handbook of polymer degradation. New York: Marcel Dekker, 1992, s. 169–217.

HENSSEN, A. Beiträge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten. Archiv für Mikrobiologie. 1957/12/01, 26(4), 373-414. DOI: 10.1007/BF00407588. ISSN 1432-072X. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/BF00407588>

HERRERA, R., L. FRANCO, A. RODRIGUEZ-GALAN a J. PUIGGALI. Characterization and degradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate)s. Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry. Dec, 40(23), 4141-4157. DOI: 10.1002/pola.10501. ISSN 0887-624X. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000179149200003

HERZOG, K., R. J. MULLER a W. D. DECKWER. Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases. Polymer Degradation and Stability. Oct, 91(10), 2486-2498. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2006.03.005. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000239536200030

HUANG, Qing, Larry BAUM a Wei-Ling FU. Simple and Practical Staining of DNA with GelRed in Agarose Gel Electrophoresis. 2010, 56, 149-52.

HUSAROVA, Lucie, Silvie PEKAROVA, Petr STLOUKAL, Pavel KUCHARCZYK, Vincent VERNEY, Sophie COMMEREUC, Audrey RAMONE a Marek KOUTNY. Identification of important abiotic and biotic factors in the biodegradation of poly(L-lactic acid). *International Journal of Biological Macromolecules*. Nov, 71, 155-162. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.050. ISSN 0141-8130. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000345722700023

JANSE, Ingmar, Jasper BOK a Gabriel ZWART. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, 57(2), 279-281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.12.006>. ISSN 0167-7012. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701203003543>

JEFFERY, H., S. S. DAVIS a D. T. OHAGAN. THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLY(LACTIDE-CO-GLYCOLIDE) MICROPARTICLES .1. OIL-IN-WATER EMULSION SOLVENT EVAPORATION. *International Journal of Pharmaceutics*. Nov, 77(2-3), 169-175. DOI: 10.1016/0378-5173(91)90314-e. ISSN 0378-5173. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1991GT92700009

JINNO, Y., N. YOSHIURA K FAU - NIIKAWA a N. NIIKAWA. Use of psoralen as extingisher of contaminated DNA in PCR. Department of Human Genetics, Nagasaki University School of Medicine, Japan. FAU - Yoshiura, K, (0305-1048 (Print)).

JUNG, J. H., M. REE a H. KIM. Acid- and base-catalyzed hydrolyses of aliphatic polycarbonates and polyesters. *Catalysis Today*. Jun, 115(1-4), 283-287. DOI: 10.1016/j.cattod.2006.02.060. ISSN 0920-5861. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000238416100039

KALA, R. R. a V. CHANDRIKA. EFFECT OF DIFFERENT MEDIA FOR ISOLATION, GROWTH AND MAINTENANCE OF ACTINOMYCETES FROM MANGROVE SEDIMENTS. *Indian Journal of Marine Sciences*. Dec, 22(4), 297-299. ISSN 0379-5136. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1993MQ93900014

KALE, Gaurav, Rafael AURAS a Sher Paul SINGH. Comparison of the degradability of poly(lactide) packages in composting and ambient exposure conditions. *Packaging Technology and Science*. Jan-Feb, 20(1), 49-70. DOI: 10.1002/pts.742. ISSN 0894-3214. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000244806000005

KALE, Gaurav, Thitisilp KIJCHAVENGKUL, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Susan E. SELKE a Sher Paul SINGH. Compostability of bioplastic packaging materials: An overview: An overview. *Macromolecular Bioscience*. Mar8, 7(3), 255-277. DOI: 10.1002/mabi.200600168. ISSN 1616-5187. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000245364800001

KAMIYA, M., S. ASAKAWA a M. KIMURA. Molecular analysis of fungal communities of biodegradable plastics in two Japanese soils. *Soil Science and*

Plant Nutrition. Oct, 53(5), 568-574. DOI: 10.1111/j.1747-0765.2007.00169.x. ISSN 0038-0768. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000249828000005

KANALY, R. A., S. HARAYAMA a K. WATANABE. Rhodanobacter sp strain BPC1 in a benzo a pyrene-mineralizing bacterial consortium. Applied and Environmental Microbiology. Dec, 68(12), 5826-5833. DOI: 10.1128/aem.68.12.5826-5833.2002. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000179500700005

KANERVA, Liisa T. a Erkki K. EURANTO. Temperature dependence of the neutral ester hydrolysis of chloromethyl dichloroacetate in 2-butoxyethanol-water mixtures over a wide temperature range. Journal of the American Chemical Society. 1982/10/01, 104(20), 5419-5421. DOI: 10.1021/ja00384a029. ISSN 0002-7863. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1021/ja00384a029>

KASUYA, Ken-ichi, Nariaki ISHII, Yoshio INOUE, Koji YAZAWA, Tomoko TAGAYA, Taro YOTSUMOTO, Jun-ichiro KAZAHAYA a Daisuke NAGAI. Characterization of a mesophilic aliphatic-aromatic copolyester-degrading fungus. Polymer Degradation and Stability. Aug, 94(8), 1190-1196. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.04.013. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000267964900002

KAWAI, F., M. ODA, T. TAMASHIRO, et al. A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. Applied Microbiology and Biotechnology. Dec, 98(24), 10053-10064. DOI: 10.1007/s00253-014-5860-y. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000345331700012

KE, T. Y., S. X. Z. SUN a P. SEIB. Blending of poly(lactic acid) and starches containing varying amylose content. Journal of Applied Polymer Science. Kansas State Univ, Dept Grain Sci & Ind, Manhattan, KS 66506 USA, Sep, 89(13), 3639-3646. DOI: 10.1002/app.12617. ISSN 0021-8995. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000184411200030

KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Edgar ALVARADO, José Roberto CAMACHO MONTERO a Jorge Mario ROSALES. Atmospheric and soil degradation of aliphatic-aromatic polyester films. Polymer Degradation and Stability. 2010, 95(2), 99-107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.048>. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014139100900411X>

KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Mathieu NGOUAJIO a R. Thomas FERNANDEZ. Assessment of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: Field study: Field study. Chemosphere. Mar, 71(5), 942-953. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.10.074. ISSN 0045-6535. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000254827000016

KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Mathieu NGOUAJIO a R. Thomas FERNANDEZ. Assessment of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part II: Laboratory simulated conditions:

Laboratory simulated conditions. *Chemosphere*. Apr, 71(9), 1607-1616. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.01.037. ISSN 0045-6535. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000255714900001

KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Susan SELKE, Mathieu NGOUAJIO a R. Thomas FERNANDEZ. Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. *Polymer Degradation and Stability*. Dec, 95(12), 2641-2647. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.018. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000285851800053

KLEEBERG, I., K. WELZEL, J. VANDENHEUVEL, R. J. MULLER a W. D. DECKWER. Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. *Biomacromolecules*. Jan-Feb, 6(1), 262-270. DOI: 10.1021/bm049582t. ISSN 1525-7797.

KLUEGLEIN, N., T. LOSEKANN-BEHRENS, M. OBST, S. BEHRENS, E. APPEL a A. KAPPLER. Magnetite Formation by the Novel Fe(III)-reducing *Geothrix fermentans* Strain HradG1 Isolated from a Hydrocarbon-Contaminated Sediment with Increased Magnetic Susceptibility. *Geomicrobiology Journal*. Nov, 30(10), 863-873. DOI: 10.1080/01490451.2013.790922. ISSN 0149-0451. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000322865500002

KUMAR, Ashutosh, Anwar ALAM, Mamta RANI, Nasreen Z. EHTESHAM a Seyed E. HASNAIN. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2017, 307(8), 481-489. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016>. ISSN 1438-4221. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422117300280>

KYRIKOU, I. a D. BRIASSOULIS. Biodegradation of agricultural plastic films: A critical review: A critical review. *Journal of Polymers and the Environment*. Apr, 15(2), 125-150. DOI: 10.1007/s10924-007-0053-8. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000246111600007

LI, Gaobin, Shiv SHANKAR, Jong-Whan RHIM a Bong-Yun OH. Effects of preparation method on properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films. *Food Science and Biotechnology*. 2015/10/01, 24(5), 1679-1685. DOI: 10.1007/s10068-015-0218-5. ISSN 2092-6456. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0218-5>

LINDSTROM, A., A. C. ALBERTSSON a M. HAKKARAINEN. Quantitative determination of degradation products an effective means to study early stages of degradation in linear and branched poly(butylene adipate) and poly(butylene succinate). *Polymer Degradation and Stability*. Mar, 83(3), 487-493. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2003.07.001. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000189214900017

LUBKOWSKI, Krzysztof, Aleksandra SMOROWSKA, Barbara GRZMIL a Agnieszka KOZLOWSKA. Controlled-Release Fertilizer Prepared Using a

Biodegradable Aliphatic Copolyester of Poly(butylene succinate) and Dimerized Fatty Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Mar18, 63(10), 2597-2605. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00518. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000351420400003

LUCAS, Nathalie, Christophe BIENAIME, Christian BELLOY, Michele QUENEUDEC, Françoise SILVESTRE a Jose-Edmundo NAVA-SAUCEDO. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques: Mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere*. Sep, 73(4), 429-442. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064. ISSN 0045-6535. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000259793500001

LYU, S. P., J. SCHLEY, B. LOY, D. LIND, C. HOBOT, R. SPARER a D. UNTEREKER. Kinetics and time-temperature equivalence of polymer degradation. *Biomacromolecules*. Jul, 8(7), 2301-2310. DOI: 10.1021/bm070313n. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000247820000038

LÁNYI, B. 1 Classical and Rapid Identification Methods for Medically Important Bacteria. *Methods in Microbiology*. Academic Press, 1988, 19, s. 1-67. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70407-0](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70407-0). ISSN 0580-9517. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951708704070>

MARSCHNER, P. Soil Microbial Community Structure and Function Assessed by FAME, PLFA and DGGE — Advantages and Limitations. *Advanced Techniques in Soil Microbiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, s. 181-200. DOI: 10.1007/978-3-540-70865-0_12. ISBN 978-3-540-70865-0. Dostupné také z: https://doi.org/10.1007/978-3-540-70865-0_12

MARTEN, E., R. J. MULLER a W. D. DECKWER. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters. *Polymer Degradation and Stability*. Jun, 88(3), 371-381. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.001. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000228789700003

MATHYS, W. INVESTIGATIONS ABOUT THE CHEMICAL-COMPOSITION AND WAYS OF REUSE OF ACTIVATED CARBON SLUDGES FROM SURFACE-WATER TREATMENT PLANTS. *Zentralblatt Fur Hygiene Und Umweltmedizin*. MATHYS, W (reprint author), UNIV MUNSTER, INST HYG, ROBERT KOCH STR 41, D-48149 MUNSTER, GERMANY, Jun, 197(5), 420-440. ISSN 0934-8859. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1995RG90000007

MECKENSTOCK, R. U. Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *Fems Microbiology Letters*. Aug, 177(1), 67-73. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13715.x. ISSN 0378-1097. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000081777600011

MEKONNEN, T., P. MUSSONE, H. KHALIL a D. BRESSLER. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *Journal of Materials Chemistry*

A. 2013, 1(43), 13379-13398. DOI: 10.1039/c3ta12555f. ISSN 2050-7488. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000325991700001

MOHANTY, S. a S. K. NAYAK. Biodegradable Nanocomposites of Poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and Organically Modified Layered Silicates. *Journal of Polymers and the Environment*. Mar, 20(1), 195-207. DOI: 10.1007/s10924-011-0408-z. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000300588300024

MONDAL, D., B. BHOWMICK, M. M. R. MOLLICK, D. MAITY, A. MUKHOPADHYAY, D. RANA a D. CHATTOPADHYAY. Effect of clay concentration on morphology and properties of hydroxypropylmethylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*. Jul, 96(1), 57-63. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.03.064. ISSN 0144-8617. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000320486000008

MORITA, R. Y., F. S. RICHART, R. V. BARBOSA, M. MUNARO a J. R. KLOSS. Influence of Organophilic Ammonium-Free Nanoclay Incorporation on Mechanical Properties and Biodegradability of Biodegradable Polyester. *Macromolecular Symposia*. Sep, 319(1), 108-113. DOI: 10.1002/masy.201100185. ISSN 1022-1360. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000208946000014

MUELLER, Rolf-Joachim. Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry*. 2006, 41(10), 2124-2128. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.018>. ISSN 1359-5113. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511306002200>

MUELLER, R. J. Mechanism of polyester degradation by enzymes. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. Mar, 233. ISSN 0065-7727. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000207723100449

MULLER, R. J., I. KLEEBERG a W. D. DECKWER. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of Biotechnology*. Mar30, 86(2), 87-95. DOI: 10.1016/s0168-1656(00)00407-7. ISSN 0168-1656. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000167749500002

MUROI, F., Y. TACHIBANA, Y. KOBAYASHI, T. SAKURAI a K. KASUYA. Influences of poly(butylene adipate-co-terephthalate) on soil microbiota and plant growth. *Polymer Degradation and Stability*. Jul, 129, 338-346. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.05.018. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000379372200036

MUSIOL, M. T., J. RYDZ, W. J. SIKORSKA, P. R. RYCHTER a M. M. KOWALCZUK. A preliminary study of the degradation of selected commercial packaging materials in compost and aqueous environments. *Polish Journal of Chemical Technology*. 2011, 13(1), 55-57. DOI: 10.2478/v10026-011-0011-z. ISSN 1509-8117. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000288542000011

MUTHURAJ, R., M. MISRA a A. K. MOHANTY. Biodegradable Poly(butylene succinate) and Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends:

Reactive Extrusion and Performance Evaluation: Reactive Extrusion and Performance Evaluation. *Journal of Polymers and the Environment*. Sep, 22(3), 336-349. DOI: 10.1007/s10924-013-0636-5. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000340399900008

MUTHURAJ, Rajendran, Manjusri MISRA a A. K. MOHANTY. Hydrolytic degradation of biodegradable polyesters under simulated environmental conditions. *Journal of Applied Polymer Science*. Jul15, 132(27). DOI: 10.1002/app.42189. ISSN 0021-8995. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000353232800012

MUYZER, Gerard, Ellen DE WAAL a A. G. UITTERLINDEN. Profiling complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. 1993, 59, 695-700.

MUYZER, Gerard a Kornelia SMALLA. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998/01/01, 73(1), 127-141. DOI: 10.1023/A:1000669317571. ISSN 1572-9699. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1023/A:1000669317571>

MYERS, Richard M., Tom MANIATIS a Leonard S. LERMAN. [31] Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1987, 155, s. 501-527. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55033-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55033-9). ISSN 0076-6879. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987550339>

MÜLLER, Christina Andrea, Veronika PERZ, Christoph PROVASNEK, Felice QUARTINELLO, Georg M. GUEBITZ a Gabriele BERG. Discovery of Polyesterases from Moss-Associated Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 02/01n. 1., 83(4), e02641-16. DOI: 10.1128/AEM.02641-16. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5288828/>

MŽP: Ministerstvo životního prostředí [online]. ©2008-2018 [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pudni_mapy/\\$FILE/OOOPK-zlinsky_kraj-20140311.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pudni_mapy/$FILE/OOOPK-zlinsky_kraj-20140311.pdf)

NAFCHI, A. M., M. MORADPOUR, M. SAEIDI a A. ALIAS. Thermoplastic starches: Properties, challenges, and prospects: Properties, challenges, and prospects. *Starch-Starke*. Jan, 65(1-2), 61-72. DOI: 10.1002/star.201200201. ISSN 0038-9056. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000312999200008

NAKAJIMA-KAMBE, T., F. ICHIHASHI, R. MATSUZOE, S. KATO a N. SHINTANI. Degradation of aliphatic-aromatic copolyesters by bacteria that can degrade aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*. [Nakajima-Kambe, Toshiaki, Nov, 94(11), 1901-1905. DOI:

10.1016/j.polymdegradstab.2009.08.006. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000271603900001

NAKAJIMA-KAMBE, T., K. TOYOSHIMA, C. SAITO, et al. Rapid monomerization of poly(butylene succinate)-co-(butylene adipate) by *Leptothrix* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Dec, 108(6), 513-516. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.05.018. ISSN 1389-1723. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000273836600011

NASRABADI, Reza, Ralf GREINER, Hossein ALIKHANI, Javad HAMEDİ a Bagher YAKHCHALI. Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. 2013, 13, 223-236. DOI: 10.4067/S0718-95162013005000020.

NAYAK, S. K. Biodegradable PBAT/Starch Nanocomposites. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. 2010, 49(14), 1406-1418. DOI: 10.1080/03602559.2010.496397. ISSN 0360-2559. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000284642600003

NDAZI, B. S. a S. KARLSSON. Characterization of hydrolytic degradation of polylactic acid/rice hulls composites in water at different temperatures. *Express Polymer Letters*. Feb, 5(2), 119-131. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2011.13. ISSN 1788-618X. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000285847000004

NEILSON, J. W., Raina M. JORDAN FL FAU - MAIER a R. M. MAIER. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. Department of Soil, Water and Environmental Science, The University of Arizona, Tucson AZ 85721, USA. jneilson@email.arizona.edu FAU - Jordan, Fiona L, (1872-8359 (Electronic).

NUMATA, Keiji, Rajiv K. SRIVASTAVA, Anna FINNE-WISTRAND, Ann-Christine ALBERTSSON, Yoshiharu DOI a Hideki ABE. Branched poly(lactide) synthesized by enzymatic polymerization: Effects of molecular branches and stereochemistry on enzymatic degradation and alkaline hydrolysis: Effects of molecular branches and stereochemistry on enzymatic degradation and alkaline hydrolysis. *Biomacromolecules*. Oct, 8(10), 3115-3125. DOI: 10.1021/bm700537x. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000250009900020

OKADA, Masahiko. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. 2002, 27(1), 87-133. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00039-9). ISSN 0079-6700. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007967000100039>

PARK, Chulwoo, Bora SHIN, Jaejoon JUNG, Yunho LEE a Woojun PARK. Metabolic and stress responses of *Acinetobacter oleivorans* DR1 during long-chain alkane degradation. *Microbial Biotechnology*. 2017, 10(6), 1809-1823. DOI: 10.1111/1751-7915.12852. ISSN 1751-7915. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12852>

PARK, J. W., S. S. IM, S. H. KIM a Y. H. KIM. Biodegradable polymer blends of Poly(L-lactic acid) and gelatinized starch. *Polymer Engineering and Science*.

Dec, 40(12), 2539-2550. DOI: 10.1002/pen.11384. ISSN 0032-3888. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000166661800008

PEELMAN, N., P. RAGAERT, B. DE MEULENAER, D. ADONS, R. PEETERS, L. CARDON, F. VAN IMPE a F. DEVLIEGHERE. Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. Aug, 32(2), 128-141. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.06.003. ISSN 0924-2244. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000323872000005

PERZ, V., A. BAUMSCHLAGER, K. BLEYMAIER, et al. Hydrolysis of synthetic polyesters by *Clostridium botulinum* esterases. *Biotechnology and Bioengineering*. May, 113(5), 1024-1034. DOI: 10.1002/bit.25874. ISSN 0006-3592. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000373476700011

PERZ, V., K. BLEYMAIER, C. SINKEL, U. KUEPER, M. BONNEKESSEL, D. RIBITSCH a G. M. GUEBITZ. Substrate specificities of cutinases on aliphatic-aromatic polyesters and on their model substrates. *New Biotechnology*. Mar, 33(2), 295-304. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.11.004. ISSN 1871-6784. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000366665500005

PERZ, V., A. HROMIC, A. BAUMSCHLAGER, et al. An Esterase from Anaerobic *Clostridium hathewayi* Can Hydrolyze Aliphatic-Aromatic Polyesters. *Environmental Science & Technology*. Mar, 50(6), 2899-2907. DOI: 10.1021/acs.est.5b04346. ISSN 0013-936X. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000372392100017

PRAKASH, O., Puja GREEN SJ FAU - JASROTIA, Will A. JASROTIA P FAU - OVERHOLT, Andy OVERHOLT WA FAU - CANION, David B. CANION A FAU - WATSON, Scott C. WATSON DB FAU - BROOKS, Joel E. BROOKS SC FAU - KOSTKA a J. E. KOSTKA. *Rhodanobacter denitrificans* sp. nov., isolated from nitrate-rich zones of a contaminated aquifer, 2009. Earth, Ocean, and Atmospheric Science Department, Florida State University, Tallahassee, FL, USA. FAU - Green, Stefan J, (1466-5034 (Electronic).

R. TYLER, David. Mechanistic Aspects of the Effects of Stress on the Rates of Photochemical Degradation Reactions in Polymers. 2007, 44, 351-388. DOI: 10.1081/MC-200033682.

RABUS, R. a F. WIDDEL. ANAEROBIC DEGRADATION OF ETHYLBENZENE AND OTHER AROMATIC-HYDROCARBONS BY NEW DENITRIFYING BACTERIA. *Archives of Microbiology*. Feb, 163(2), 96-103. DOI: 10.1007/bf00381782. ISSN 0302-8933. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1995QK49900003

RATTO, J. A., P. J. STENHOUSE, M. AUERBACH, J. MITCHELL a R. FARRELL. Processing, performance and biodegradability of a thermoplastic aliphatic polyester/starch system. *Polymer*. Nov, 40(24), 6777-6788. DOI: 10.1016/s0032-3861(99)00014-2. ISSN 0032-3861. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000082267700015

RIVATON, A. a J. L. GARDETTE. Photo-oxidation of aromatic polymers. *Angewandte Makromolekulare Chemie*. Dec, 262, 173-188. ISSN 0003-3146. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000077914600017

RIZZARELLI, P., C. PUGLISI a G. MONTAUDO. Soil burial and enzymatic degradation in solution of aliphatic co-polyesters. *Polymer Degradation and Stability*. CNR, Ist Chim & Tecnol Polimeri, I-95125 Catania, Italy. Univ Catania, Dipartimento Sci Chim, I-95125 Catania, Italy, Aug, 85(2), 855-863. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.03.022. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000223254300014

ROONEY-VARGA, J. N., R. T. ANDERSON, J. L. FRAGA, D. RINGELBERG a D. R. LOVLEY. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*. Jul, 65(7), 3056-3063. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000081199000036

ROUX, K. H. OPTIMIZATION AND TROUBLESHOOTING IN PCR. *Pcr-Methods and Applications*. Apr, 4(5), S185-S194. ISSN 1054-9803. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1995RM62900014

RYCHTER, P., M. KAWALEC, M. SOBOTA, P. KURCOK a M. KOWALCZUK. Study of Aliphatic-Aromatic Copolyester Degradation in Sandy Soil and Its Ecotoxicological Impact. *Biomacromolecules*. [Kawalec, Michal, Apr, 11(4), 839-847. DOI: 10.1021/bm901331t. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000276557300002

SAADI, Z., G. CESAR, H. BEWA a L. BENGUIGUI. Fungal Degradation of Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) in Soil and in Compost. *Journal of Polymers and the Environment*. [Saadi, Zoubida, Dec, 21(4), 893-901. DOI: 10.1007/s10924-013-0582-2. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000326933700001

SCHAFER, H. a G. MUYZER. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology*, Vol 30: Marine Microbiology. 2001, 30, 425-468. DOI: 10.1016/s0580-9517(01)30057-0. ISSN 0580-9517. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000169406600022

SCHJONNING, P., I. K. THOMSEN, P. MOLDRUP a B. T. CHRISTENSEN. Linking soil microbial activity to water- and air-phase contents and diffusivities. *Soil Science Society of America Journal*. Jan-Feb, 67(1), 156-165. ISSN 0361-5995. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000181886100019

SHAH, A. A., T. EGUCHI, D. MAYUMI, S. KATO, N. SHINTANI, N. R. KAMINI a T. NAKAJIMA-KAMBE. Purification and properties of novel aliphatic-aromatic co-polyesters degrading enzymes from newly isolated *Roseateles depolymerans* strain TB-87. *Polymer Degradation and Stability*. Feb, 98(2), 609-618. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.11.013. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000315131600017

SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. Biological degradation of plastics: A comprehensive review: A comprehensive

review. *Biotechnology Advances*. May-Jun, 26(3), 246-265. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005. ISSN 0734-9750. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000255700600006

SHANKS, R. a I. KONG. Thermoplastic Elastomers. *Thermoplastic Elastomers*. 2012, , 137-154. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000387426000009

SHAWCROSS, S., H. N. HUGHES a S. LITTLE. Primer dimer formation in the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Genetics*. Sep, 34, 1304-1304. ISSN 0022-2593. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1997XX12500219

SHI, B., M. SHLEPR a D. PALFERY. Effect of Blend Composition and Structure on Biodegradation of Starch/Ecoflex-Filled Polyethylene Films. *Journal of Applied Polymer Science*. [Shi, Bo, May, 120(3), 1808-1816. DOI: 10.1002/app.33309. ISSN 0021-8995. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000288142700073

SIEGENTHALER, K. O., A. KUNKEL, G. SKUPIN a M. YAMAMOTO. Ecoflex (R) and Ecovio (R): Biodegradable, Performance-Enabling Plastics: Advances in Polymer Science. *Synthetic Biodegradable Polymers*. [Siegenthaler, K. O: Springer-Verlag Berlin, 2012, 245, s. 91-136. DOI: 10.1007/12_2010_106. ISSN 0065-3195. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000301550100004

SINGH, Baljit a Nisha SHARMA. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*. 2008, 93(3), 561-584. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391007003539>

SIPOS, R., Marton SZEKELY AJ FAU - PALATINSZKY, Sara PALATINSZKY M FAU - REVESZ, Karoly REVESZ S FAU - MARIALIGETI, Marcell MARIALIGETI K FAU - NIKOLAUSZ a M. NIKOLAUSZ. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targetting bacterial community analysis, 2007. Department of Microbiology, Eotvos Lorand University of Science, Budapest, Hungary. FAU - Szekely, Anna J, (0168-6496 (Print). Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17343679>

SOMEYA, Y., N. KONDO a M. SHIBATA. Biodegradation of poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate)/Layered-Silicate nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*. Oct, 106(2), 730-736. DOI: 10.1002/app.24174. ISSN 0021-8995. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000248891200002

SONG, J. H., R. J. MURPHY, R. NARAYAN a G. B. H. DAVIES. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*. Jul27, 364(1526), 2127-2139. DOI: 10.1098/rstb.2008.0289. ISSN 0962-8436. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000267281600013

SPAIN, A. M., Mostafa S. KRUMHOLZ LR FAU - ELSHAHED a M. S. ELSHAHED. Abundance, composition, diversity and novelty of soil

Proteobacteria, 2009. Department of Botany and Microbiology and Institute for Energy and the Environment, University of Oklahoma, Norman, OK, USA. FAU - Krumholz, Lee R, (1751-7370 (Electronic). Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19404326>

SPRINGER, N., W. LUDWIG, B. PHILIPP a B. SCHINK. *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Jul, 48, 953-956. ISSN 0020-7713. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000075590500038

SRIROTH, K. a K. SANGSEETHONG. Biodegradable plastics from cassava starch. *Proceedings of the IInd International Symposium on Sweetpotato and Cassava: Innovative Technologies for Commercialization*. Kasetsart Univ, Fac Agro Ind, Dept Biotechnol, Bangkok, Thailand, 2006, (703), 145-151. ISSN 0567-7572. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000237639700016

STEGER, Kristin, Åsa JARVIS, Tuija VASARA, Martin ROMANTSCHUK a Ingvar SUNDH. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. *Research in Microbiology*. 2007, 158(7), 617-624. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.05.006>. ISSN 0923-2508. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250807001258>

STLOUKAL, P., S. PEKAROVA, A. KALEDOVA, et al. Kinetics and mechanism of the biodegradation of PLA/clay nanocomposites during thermophilic phase of composting process. *Waste Management*. Aug, 42, 31-40. DOI: 10.1016/j.wasman.2015.04.006. ISSN 0956-053X. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000357348500006

STLOUKAL, P., V. VERNEY, S. COMMEREUC, J. RYCHLY, L. MATISOVA-RYCHLA, V. PIS a M. KOUTNY. Assessment of the interrelation between photooxidation and biodegradation of selected polyesters after artificial weathering. *Chemosphere*. [Stloukal, Petr, Aug, 88(10), 1214-1219. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.03.072. ISSN 0045-6535. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000307143800011

TACHIBANA, Yuya, Takuya MAEDA, Osamu ITO, Yasukatsu MAEDA a Masao KUNIOKA. Utilization of a Biodegradable Mulch Sheet Produced from Poly(Lactic Acid)/Ecoflex (R)/Modified Starch in Mandarin Orange Groves. *International Journal of Molecular Sciences*. Aug, 10(8), 3599-3615. DOI: 10.3390/ijms10083599. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000269191800018

TAN, F. T., D. G. COOPER, M. MARIC a J. A. NICELL. Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms. *Polymer Degradation and Stability*. Aug, 93(8), 1479-1485. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.05.005. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000259388900010

THOMPSON, J. R., L. A. MARCELINO a M. F. POLZ. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by

'reconditioning PCR': formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research*. May, 30(9), 2083-2088. DOI: 10.1093/nar/30.9.2083. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000175591100027

TOKIWA, Y., B. P. CALABIA, C. U. UGWU a S. AIBA. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. [Tokiwa, Yutaka, Sep, 10(9), 3722-3742. DOI: 10.3390/ijms10093722. ISSN 1661-6596. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000270197800003

TOKIWA, Y. a T. SUZUKI. HYDROLYSIS OF POLYESTERS BY LIPASES. *Nature*. 1977, 270(5632), 76-78. DOI: 10.1038/270076a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:A1977DZ49900056

TOMITA, Kosuke, Noritoshi IKEDA a Ayumi UENO. Isolation and characterization of a thermophilic bacterium, *Geobacillus thermocatenulatus*, degrading nylon 12 and nylon 66. *Biotechnology Letters*. 2003/10/01, 25(20), 1743-1746. DOI: 10.1023/A:1026091711130. ISSN 1573-6776. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1023/A:1026091711130>

TROSHIN, P. V., Geoffrey J. PROCTER JB FAU - BARTON a G. J. BARTON. Java bioinformatics analysis web services for multiple sequence alignment--JABAWS:MSA: MSA. *Biological Chemistry and Drug Discovery*, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, UK. FAU - Procter, James B, (1367-4811 (Electronic).

TSUJI, Hideto a Shinya MIYAUCHI. Poly(l-lactide): VI Effects of crystallinity on enzymatic hydrolysis of poly(l-lactide) without free amorphous region: VI Effects of crystallinity on enzymatic hydrolysis of poly(l-lactide) without free amorphous region. *Polymer Degradation and Stability*. 2001, 71(3), 415-424. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(00\)00191-9](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(00)00191-9). ISSN 0141-3910. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391000001919>

VALASKOVA, V. a P. BALDRIAN. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *Plant Soil and Environment*. Oct, 55(10), 413-423. ISSN 1214-1178. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000271288700001

VIEIRA, F. C. S. a E. NAHAS. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. *Microbiological Research*. 2005, 160(2), 197-202. DOI: 10.1016/j.micres.2005.01.004. ISSN 0944-5013. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000228928700012

WALDRON, C. R., C. A. BECKER-VALLONE a D. E. EVELEIGH. Isolation and characterization of a cellulolytic actinomycete *Microbispora bispora*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1986/09/01, 24(6), 477-486. DOI: 10.1007/BF00250327. ISSN 1432-0614. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/BF00250327>

WANG, G. C. Y. a Y. WANG. Frequency of formation of chimeric molecules is a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed

bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology*. Dec, 63(12), 4645-4650. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: [Go to ISI://WOS:A1997YK70900004](#)

WANG, H., D. F. WEI, A. N. ZHENG a H. N. XIAO. Soil burial biodegradation of antimicrobial biodegradable PBAT films. *Polymer Degradation and Stability*. Jun, 116, 14-22. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.03.007. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: [Go to ISI://WOS:000355348800002](#)

WANG, X. L., K. K. YANG a Y. Z. WANG. Properties of starch blends with biodegradable polymers. *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews*. 2003, C43(3), 385-409. DOI: 10.1081/mc-120023911. ISSN 1532-1797. Dostupné také z: [Go to ISI://WOS:000185404100002](#)

WATANABE, T., H. KOJIMA a M. FUKUI. Complete genomes of freshwater sulfur oxidizers *Sulfuricella denitrificans* skB26 and *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H: Genetic insights into the sulfur oxidation pathway of betaproteobacteria: Genetic insights into the sulfur oxidation pathway of betaproteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. Sep, 37(6), 387-395. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.05.010. ISSN 0723-2020. Dostupné také z: [Go to ISI://WOS:000341616500001](#)

WATERHOUSE, Andrew M., James B. PROCTER, David M. A. MARTIN, Michèle CLAMP a Geoffrey J. BARTON. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 01/16n. 1., 25(9), 1189-1191. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp033. ISSN 1367-4803. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2672624/>

WENG, Yun-Xuan, Yu-Juan JIN, Qing-Yang MENG, Lei WANG, Min ZHANG a Yu-Zhong WANG. Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polymer Testing*. Aug, 32(5), 918-926. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2013.05.001. ISSN 0142-9418. Dostupné také z: [Go to ISI://WOS:000322099000013](#)

WITT, U., T. EINIG, M. YAMAMOTO, I. KLEEGERG, W. D. DECKWER a R. J. MULLER. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere*. Jul, 44(2), 289-299. DOI: 10.1016/s0045-6535(00)00162-4. ISSN 0045-6535. Dostupné také z: [Go to ISI://WOS:000169537800023](#)

WITT, U., R. J. MULLER a W. D. DECKWER. Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. Apr, 5(2), 81-89. DOI: 10.1007/bf02763591. ISSN 1064-7546. Dostupné také z: [Go to ISI://WOS:A1997XT17000003](#)

WOLD, Svante, Kim ESBENSEN a Paul GELADI. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1987, 2(1), 37-52. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9). ISSN 0169-7439.

Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830516304656>

WU, Chin-San. Process, Characterization and Biodegradability of Aliphatic Aromatic Polyester/Sisal Fiber Composites. *Journal of Polymers and the Environment*. Sep, 19(3), 706-713. DOI: 10.1007/s10924-011-0318-0. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000294182700015

WU, Chin-San. Utilization of peanut husks as a filler in aliphatic-aromatic polyesters: Preparation, characterization, and biodegradability: Preparation, characterization, and biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*. Nov, 97(11), 2388-2395. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.07.027. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000310655000036

YAGI, H., F. NINOMIYA, M. FUNABASHI a M. KUNIOKA. Bioplastic biodegradation activity of anaerobic sludge prepared by preincubation at 55 degrees C for new anaerobic biodegradation test. *Polymer Degradation and Stability*. Aug, 95(8), 1349-1355. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.023. ISSN 0141-3910. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000280384000013

YANG, S. Z., X. WEN, L. ZHAO, Y. L. SHI a H. J. JIN. Crude Oil Treatment Leads to Shift of Bacterial Communities in Soils from the Deep Active Layer and Upper Permafrost along the China-Russia Crude Oil Pipeline Route. *Plos One*. May, 9(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0096552. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000336655700112

ZAMARRO, María Teresa, María J. L. BARRAGÁN, Manuel CARMONA, José Luis GARCÍA a Eduardo DÍAZ. Engineering a bzd cassette for the anaerobic bioconversion of aromatic compounds. *Microbial Biotechnology*. 07/24n. 1., 10(6), 1418-1425. DOI: 10.1111/1751-7915.12746. ISSN 1751-7915. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5658619/>

ZHOU, Jie-Fang, Pei-Ke GAO, Xiao-Hui DAI, Xiao-Yu CUI, Hui-Mei TIAN, Jun-Jie XIE, Guo-Qiang LI a Ting MA. Heavy hydrocarbon degradation of crude oil by a novel thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain A-2. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, 126, 224-230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.031>. ISSN 0964-8305. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830516304656>

8. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1.1: Aplikace významných biodegradabilních polymerů (Chandra a Rustgi, 1998; Shah a kol., 2008).</i>	10
<i>Tabulka 1.2: Přehled mikroorganismů degradujících PBAT. Řazeno abecedně.</i>	18
<i>Tabulka 3.1: Podmínky měření CO₂ na přístroji GC Agilent 7890.</i>	34
<i>Tabulka 3.2: Složení PCR směsi.</i>	42
<i>Tabulka 3.3: Primery použité v disertační práci.</i>	42
<i>Tabulka 3.4: Nastavení klasické PCR.</i>	43
<i>Tabulka 3.5: Nastavení touchdown PCR.</i>	43
<i>Tabulka 3.6: Složení roztoků pro přípravu polyakrylamidového gelu.</i>	44
<i>Tabulka 3.7: Nastavení programu následné PCR.</i>	45
<i>Tabulka 3.8: Značení vzorků odebraných z lokalit kontaminovaných leteckým petrolejem.</i>	47
<i>Tabulka 4.1: Vybrané fyzikálně chemické charakteristiky testovaných půd.</i>	50
<i>Tabulka 4.2: Stanovení celkových počtů hlavních skupin mikroorganismů v půdě.</i>	51
<i>Tabulka 4.3: Shrnutí hydrolytické degradace při třech různých teplotách.</i>	68
<i>Tabulka 4.4: PCR cyklus klasické PCR-DNA izolovaná z konsorcií degradérů kopolyesteru.</i>	73
<i>Tabulka 4.5: PCR program touchdown PCR-DNA izolovaná z konsorcií degradérů kopolyesteru.</i>	75
<i>Tabulka 4.6: PCR program PCR 2-DNA izolovaná z konsorcií degradérů kopolyesteru.</i>	77
<i>Tabulka 4.7: PCR program touchdown PCR-DNA izolovaná z kontaminovaných lokalit.</i>	84
<i>Tabulka 4.8: PCR program PCR 2 DNA izolovaná z kontaminovaných lokalit.</i>	84

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1.1: Struktura PBAT a jeho monomerů 1,4 butanediolu (B), k. tereftalové (T) a k. adipové (A) (Kijchavengkul a kol., 2010a).</i>	11
<i>Obrázek 1.2: Hydrolytické štěpení esterové vazby v molekule PBAT (Muthuraj a kol., 2015).</i>	13
<i>Obrázek 1.3: Schéma biodegradace polymerů (Ahmed a kol., 2018).</i>	15
<i>Obrázek 1.4: Chemická struktura PBAT (A) a možné produkty enzymatické hydrolýzy (B), poměr k. adipové a tereftalové 50/50 (Müller a kol., 2017).</i>	17

<i>Obrázek 1.5: DGGE gel zobrazující fragmenty DNA komunity hub vyskytující se na PCL, PBS, PBSA filmech inkubovaných 24 dní v půdě (Kamiya a kol., 2007).</i>	24
<i>Obrázek 4.1: Mineralizace čistého Ecoflexu a Ecoflexu plněného škrobem v hnědozemi, černozemi a fluvizemi při 25 °C.</i>	52
<i>Obrázek 4.2: Vývoj napětí při přetržení čistého kopolyesteru a kopolyesteru se škrobovým plnivem během kultivace v půdě při 25°C.</i>	53
<i>Obrázek 4.3: Vývoj prodloužení při přetržení čistého kopolyesteru a kopolyesteru se škrobovým plnivem během kultivace v půdě při 25°C.</i>	54
<i>Obrázek 4.4: Vývoj napětí při přetržení kopolyesteru se škrobovým plnivem během kultivace v půdě při 25°C.</i>	55
<i>Obrázek 4.5: Vývoj prodloužení při přetržení kopolyesteru se škrobovým plnivem během kultivace v půdě při 25°C.</i>	55
<i>Obrázek 4.6: Fotografie lopatek vyražených z filmu kopolyesteru se škrobem.</i>	56
<i>Obrázek 4.7: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem, barveno Lugolovým roztokem.</i>	57
<i>Obrázek 4.8: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem, barveno safraninem.</i>	58
<i>Obrázek 4.9: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem získané pomocí SEM.</i>	61
<i>Obrázek 4.10: Fotografie filmů PBAT získané pomocí SEM.</i>	60
<i>Obrázek 4.11: Změna distribučních křivek molekulových hmotností v čistém kopolyesteru během inkubace v hnědozemi při 25 °C.</i>	62
<i>Obrázek 4.12: Změna distribučních křivek molekulových hmotností v kopolyesteru se škrobem během inkubace v hnědozemi při 25 °C.</i>	63
<i>Obrázek 4.13: Hydrolytická degradace PBT.</i>	64
<i>Obrázek 4.14: Hydrolytická degradace PBAT.</i>	66
<i>Obrázek 4.15: Hydrolytická degradace PBS.</i>	67
<i>Obrázek 4.16: Hydrolytická degradace PBSA.</i>	67
<i>Obrázek 4.17: Půdní typy na odběrových místech vzorků půd, ze kterých byli izolováni degradéři kopolyesteru.</i>	69
<i>Obrázek 4.18: A-určení degradérů kopolyesteru pomocí metody prosvětlených zón; B-kultura konsorcia degradérů na tuhém živném médiu se suspenzí PBAT.</i>	70
<i>Obrázek 4.19: Kontrola klasické PCR pomocí agarosové elektroforézy. Vz. 1, 2 a 3-DNA izolovaná pomocí proteinázy K; PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.</i>	73
<i>Obrázek 4.20: Kontrola klasické PCR pomocí agarosové elektroforézy. Vz. 1-3 DNA izolovaná pomocí kitu PowerSoil; vz.4-3 DNA izolovaná pomocí proteinázy K; PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.</i>	74
<i>Obrázek 4.21: Kontrola klasické PCR pomocí agarosové elektroforézy. Vz. 1-DNA izolovaná pomocí lysozymu; vz. 2-DNA izolovaná pomocí kitu High</i>	

<i>Pure PCR Template Preparation Kit; PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.</i>	74
<i>Obrázek 4.22: Kontrola klasické PCR pomocí agarosové elektroforézy. Vz. 1,2-DNA izolovaná varem; vz. 3, 4, 5-DNA izolovaná pomocí kitu PowerSoil; PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.</i>	74
<i>Obrázek 4.23: Kontrola touchdown PCR pomocí agarosové elektroforézy. DNA izolovaná metodou chloroform/izoamylalkohol; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola.</i>	75
<i>Obrázek 4.24: Kontrola touchdown PCR pomocí agarosové elektroforézy. DNA izolovaná metodou chloroform/izoamylalkohol; PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontrola. Specifické primery pro skupinu Actinobacteria.</i>	76
<i>Obrázek 4.25: Kontrola nested PCR (vnější primery fD1, rD1 a vnitřní 341F GC, 907R) pomocí agarosové elektroforézy. DNA izolovaná metodou chloroform/izoamylalkohol; PK-pozitivní kontrola; NK-negativní kontrola.</i>	77
<i>Obrázek 4.26: a; b.: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia degradérů PBAT.</i>	80
<i>Obrázek 4.27: Fylogenetický strom založený na získaných sekvencích Microbispora bispora úseku V3-V5 genu 16S rDNA.</i>	82
<i>Obrázek 4.28: Analýza hlavních komponent založená na sekvencích úseku V3-V5 genu 16S rDNA získaných z DGGE analýzy a sekvenování.</i>	82
<i>Obrázek 4.29: Kontrola TD PCR (vnější primery fD1 rD1) pomocí agarosové elektroforézy.</i>	85
<i>Obrázek 4.30: Kontrola nested PCR (vnější primery fD1, rD1 a vnitřní primery 341F GC, 907R) pomocí agarosové elektroforézy.</i>	85
<i>Obrázek 4.31: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia izolovaného z lokality kontaminované BTEX během aplikačního období nutrientů a akceptorů terminálních elektronů.</i>	86
<i>Obrázek 4.32: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia izolovaného z lokality kontaminované leteckým petrolejem během aplikačního období akceptorů terminálních akceptorů elektronů. Čísla ve spodní části obrázku označují posloupnost odběrů; NK 2-nekontaminované pozadí; PK-kontaminované pozadí, N_A, N_B-aplikace dusičnanů, NČ_A, NČ_B-aplikace komplexního činidla. Čísla bandů jsou přiřazena identifikovaným bakteriím</i>	88

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Adenin
APS	Peroxodisíran amonný
ASTM	Americká společnost pro zkoušení a materiály
BPEJ	Bonitovaná půdně ekologická jednotka
BTEX	Benzen, toluen, ethylbenzen, xylene
CFU	Colony forming units
C _{ox}	Oxidovatelný uhlík
C	Cytosin
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
dsDNA	Dvouřetězcová DNA
EN	Evropská norma
ETB	Ethidiumbromid
GC	Plynová chromatografie
GD agar	Glycerol – dusičnanový agar
GPC	Gelová permeační chromatografie
G	Guanin
IC	Anorganický uhlík
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
LDPE	Nízkohustotní polyethylen
MM	Minerální médium
M _w	Molekulová hmotnost
PBAT	Polybutylen adipát tereftalát
PBA	Polybutylen adipát
PBS	Polybutylen sukcinát
PBSA	Polybutylen sukcinát adipát
PBT	Polybutylen
PCL	Poly-ε-kaprolakton
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PE	Polyethylen
PEA	Poly (esteramidy)
PHA	Polyhydroxyalkanoát

PHB	Poly (β -hydroxybutyrát)
PHV	Polyhydroxyvalerát
PLA	Kyselina polymléčná
PVA	Poly (vinylalkohol)
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální RNA
SDS	Dodecylsíran sodný
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie
SOM	Půdní organická hmota
ssDNA	Jednořetězcová DNA
T	Thymin
TC	Celkový uhlík
TCD	Tepelně vodivostní detektor
PCR	Touchdown PCR
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TOC	Celkový organický uhlík
TPS	Termoplastický škrob
TYA	Tryptone yeast extract agar
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
UV	Ultrafialové záření
ΔH_m	Entalpie tání

10. SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1	Hlavní charakteristiky půd a počty CFU.
PŘÍLOHA 2	Identifikování degradéři kopolyesteru.
PŘÍLOHA 3	Výsledek identifikace mikroorganismů přítomných ve vzorcích odebraných z lokality kontaminované BTEX.
PŘÍLOHA 4	Výsledek identifikace mikroorganismů přítomných ve vzorcích odebraných z lokality kontaminované leteckým petrolejem.

11. ODBORNÝ ŽIVOTOPIS

Osobní údaje:

Jméno a příjmení: Jana Šerá
Titul: Ing.
Datum narození: 28. 6. 1988
Kontaktní adresa: Boršice u Blatnice 177, 687 63
E-mail: sera@utb.cz

Vzdělání:

- 2013 – dosud Prezenční doktorské studium
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
Fakulta technologická,
Obor: Technologie makromolekulárních látek
- 2011 – 2013 Prezenční navazující magisterské studium
Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Získaný titul: Ing.
- 2008 – 2011 Prezenční bakalářské studium
Masarykova univerzita
Přírodovědecká fakulta
Obor: Obecná biologie – Ekotoxikologie
Získaný titul: Bc.

Zahraniční studijní a pracovní pobyty

- 2012 Kaunas University of Technology
Faculty of Chemical Technology
Environmental Engineering
Výměnný studijní pobyt, 6 měsíců
- 2014 Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand
Ensemble scientifique des Cézeaux
Pracovní stáž, 1 měsíc

Znalosti:

Jazykové znalosti: AJ-dosažená úroveň C1, NJ – dosažená úroveň A2

Počítačové znalosti: programy pro analýzu a úpravu sekvencí (DNA Baser, Finch TV, Python, ChimeraCheck), MS Office

Řidičský průkaz: sk. B

Účast na grantových projektech:

IGA/FT/2013/013

Nepříznivé látky a faktory v životním prostředí a v potravinách

IGA/FT/2014/005

Pokročilé chemické a biochemické metody v ochraně životního prostředí

IGA/FT/2015/012

Výzkum procesů ovlivňujících kvalitu potravin a stav životního prostředí

IGA/FT/2016/012

Výzkum procesů ovlivňujících kvalitu potravin a stav životního prostředí

TA04020258

Pokročilé technologie lithotrofní imobilizace a anaerobní bioremediace pro nápravu a prevenci škod na životním prostředí

12. PUBLIKAČNÍ AKTIVITY

Příspěvky v odborných periodikách

Šmídová, K., Šerá J., Bielská L., Hofman J., Influence of feeding and earthworm density on compound bioaccumulation in earthworms *Eisenia andrei*. *Environmental Pollution*, 2015. 207: p. 168-175. (IF 4,84)

Šerá, J., Stloukal P., Jančová P., Verney V., Pekařová S., Koutný M., Accelerated Biodegradation of Agriculture Film Based on Aromatic-Aliphatic Copolyester in Soil under Mesophilic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016. 64(28): p. 5653-5661. (IF 3,154)

Pekařová S., Dvořáčková M., Stloukal P., Ingr M., Šerá J., Koutný M., Quantitation of the Inhibition Effect of Model Compounds Representing Plant Biomass Degradation Products on Methane Production. *www.biosources.com*, 2017. (IF=1,33)

Nevoralová M., Koutný M., Ostafińska A., Kruliš Z., Horák P., Pekařová S., Šerá J., Růžek L., Růžičková M., Krejčíková S., Šlouf M., Controlled biodegradability of thermoplastic starch based materials. *Carbohydrate polymers*, 2018. (IF 4,81) V recenzním řízení.

Šerá J., Koutný M., Kučabová V., 2018. Poly(butylene adipate-co-terephthalate) degrading microorganisms in agricultural temperate zone soils. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018. (IF 2,8) V recenzním řízení.

Konferenční příspěvky

Šerá J., Koutný M., Stloukal P., Verney V., Biodegradation of aromatic aliphatic co-polyester/starch blend, (Poster). 5th International Conference on BIOdegradable and BIObased POLymers (BIOPOL 2015), 2015, San Sebastian. <http://www.biopol-conf.org/>

Šerá J., Koutný M., Využití denaturační gradientové gelové elektroforézy ke stanovení diverzity mikrobiálních konsorcií a vlivu aplikace nutrientů na lokalitě kontaminované organickými polutanty, Tomáškovy dny 2016: XXV. konference mladých mikrobiologů. Brno, Masarykova univerzita, 2016. Sborník ISBN 97880-210-8255-7.

Měrková M., Šerá J., Jelénková M., Proislová A., Ringlová E., Julinová M., Růžička J., Microbial degradation of 2-ethylhexyl salicylate in waste and river water. 27. kongres ČSSM Praha, 2016., Praha. Sborník ISBN 978-80-270-0136-1.

Šerá J., Koutný M. Identification of PBAT degraders isolated from soil by molecular biology methods. Biotech 2017 and 7th Czech-Swiss Symposium with Exhibition, Prague, 2017, ISBN: 978-880-7080-989-1.

13. PŘÍLOHY

PŘÍLOHA 1

Hlavní charakteristiky půd a počty CFU.

Č.	CO _x * (%)	Habitat	Půdní typ	pH	CFU1×10 ² / g sušiny půdy	CFU2×10 ² / g sušiny půdy
1	0,87-1,74	Sad	Fluvizem	6,60	2	44
2	0,87-1,74	Potok	Fluvizem	5,85	<1	9,9
3	1,5-3	Pole	Luvizem	6,2	0	0
4	1,5-4,5	Pole	Fluvizem	6,41	0	0
5	1,5-4,5	Pole	Fluvizem	6,59	0	0
6	0,58-1,10; >1,16	Travní porost	Luvizem	6,10	<1	5,7
7	0,58-1,10; >1,16	Potok	Fluvizem	5,90	<1	25
8	0,87-1,74	Potok	Fluvizem	6,05	1	15
9	0,87-1,74	Pole	Luvizem	6,12	<1	4,6
10	0,87-2,61	Travní porost	Fluvizem	5,40	<1	4,3
11	1,45-2,03	Pole	Luvizem	6,43	2	12
12	0,87-2,61	Les	Luvizem	5,30	<1	3,3
13	0,58-1,45	Les	Pararendzina	5,24	<1	1,3
14	0,58-1,45	Pole	Pararendzina	5,45	<1	93
15	0,87; >1,45	Pole	Kambizem	5,80	<1	8,8
16	1–1,9; > 2	Potok	Fluvizem	6,27	0	0
17	1,5; >2,5	Pole	Kambizem	5,97	0	0
18	0,87; >1,45	Pole	Kambizem	6,4	<1	8,7
19	1,5-3	Pole	Fluvizem	6,42	0	0
20	0,87; >1,45	Travní porost	Fluvizem	5,93	<1	7,7
21	0,87; >1,45	Pole	Fluvizem	5,30	<1	92
22	0,87-2,61	Potok	Fluvizem	6,25	<1	15
23	0,87-2,61	Potok	Fluvizem	5,57	1	140

Č.	CO _x * (%)	Habitat	Půdní typ	pH	CFU1×10 ² / g sušiny půdy	CFU2×10 ² / g sušiny půdy
24	0,87-2,61	Sad	Kambizem	6,10	1	22
25	2-3; > 3	Pole	Černozem	5,75	0	0
26	0,87-1,74	Les	Kambizem	5,03	<1	32
27	0,58-1,10; >1,16	Travní porost	Kambizem	6,50	<1	24
28	0,87; >1,45	Les	Kambizem	5,23	<1	9,6
29	0,87; >1,45	Travní porost	Černozem	6,65	<1	89
30	1,45-2,03	Travní porost	Černozem	6,77	<1	18
31	1,5-4,5	Pole	Fluvizem	5,81	0	0
32	1 – 2,5	Travní porost	Luvizem	6,12	0	0
33	1 – 2,5	Travní porost	Luvizem	6,14	0	0
34	1,16-1,74; >1,74	Pole	Luvizem	6,72	<1	70
35	1,16-1,74; >1,74	Pole	Luvizem	5,90	0	140
36	0,58-1,45	Pole	Pararendzina	6,10	1	5,1
37	0,58-1,45	Potok	Kambizem	6,19	1	16
38	0,87; >1,45	Potok	Černozem	6,61	<1	31
39	1,45-2,03	Pole	Fluvizem	6,7	2	31
40	1,5-4,5	Les	Fluvizem	5,59	0	0
41	1,45-2,03	Pole	Fluvizem	6,75	2	13

^a C_{org}, obsah organického uhlíku; hodnoty poskytnuty Výzkumným ústavem meliorací a ochrany půdy, Žabovreská 250, 156 27 Praha 5 – Zbraslav, ČR.

^b CFU1, počty degradérů před pomnožením.

^c CFU2, počty degradérů po pomnožení.

PŘÍLOHA 2

Identifikování degradéři kopolyesteru.

Č. půdy	Č. bandu	Třída	Nejbližší příbuzný v databázi	Shoda (%)
1	1.1	<i>Bacilli</i>	<i>Saccharococcus</i> sp.	97
	1.2	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus</i>	92
	1.3	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	97
	1.4	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	97
2	2.5	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	99
	2.6	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	97
	2.7	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	97
3	-		-	-
4	-		-	-
5	-		-	-
6	6.8	<i>Bacilli</i>	<i>Aeribacillus</i> sp.	96
	6.9	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i>	99
	6.10	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
7	7.11		<i>Actinomadura rubrobrunea</i>	98
8	8.12	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	77
	8.13	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus caldisaponilyticus</i>	99
	8.14	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	96
9	9.15	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i> sp.	99
	9.16	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Diaphorobacter</i> sp.	93
	9.17	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium</i> sp.	95
	9.18	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	96
10	10.19	<i>Bacilli</i>	<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i>	99
	10.20	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	99
11	11.21	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	99
	11.22	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	99
	11.23	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	97
12	12.24	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacterium</i>	100
	12.25	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
13	13.26	<i>Bacilli</i>	<i>Flectobacillus</i> sp.	99
	13.27	<i>Bacilli</i>	<i>Flectobacillus roseus</i>	99
	13.28	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	94
	13.29	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i> sp.	99
	13.30	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium</i> sp.	97
	13.31	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	96
	13.32	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	88

Č. půdy	Č. bandu	Třída	Nejbližší příbuzný v databázi	Shoda (%)
14	14.33	<i>Bacilli</i>	<i>Flectobacillus</i> sp.	99
	14.34	<i>Bacilli</i>	<i>Flectobacillus roseus</i>	99
	14.35	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	94
		<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
15	15.36	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
	15.37	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
16	-		-	-
17	-		-	-
18	18.38	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	93
	18.39	<i>Bacilli</i>	<i>Thermobacillus</i> sp.	95
	18.40	<i>Bacilli</i>	<i>Aeribacillus</i> sp.	99
	18.41	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Blastochloris</i> sp.	87
	18.42	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
19	-		-	-
20	20.43	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	99
	20.44	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
	20.45	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
21	21.46	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus debilis</i>	99
	21.47	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
22	22.48	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	88
	22.49	<i>Bacilli</i>	<i>Alicyclobacillus</i>	90
23	23.50	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i>	99
	23.51	<i>Actinobacteria</i>	<i>caldoxylosilyticus</i> <i>Microbispora bispora</i>	99
24	24.52	<i>Bacilli</i>	<i>Aeribacillus</i> sp.	99
	24.53	<i>Bacilli</i>	<i>Aeribacillus</i> sp.	95
25	-		-	-
26	26.54	<i>Bacilli</i>	<i>Alicyclobacillus</i>	97
	26.55	<i>Bacilli</i>	<i>Thermobacillus</i> sp.	95
	26.56	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Blastochloris</i> sp.	96
	26.57	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomadura</i> sp.	96
27	27.58	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	96
		<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	97
	27.59	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i>	96
	27.60	<i>Bacilli</i>	<i>thermoglucosidasius</i>	99
	27.61		<i>Parageobacillus thermoglucosidans</i>	
28	28.62	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
	28.63	<i>Bacilli</i>	<i>Kyrpidia tusciae</i>	96

Č. půdy	Č. bandu	Třída	Nejbližší příbuzný v databázi	Shoda (%)
29	29.64	<i>Bacilli</i>	<i>Caenibacillus caldisaponilyticus</i>	99
	29.65	<i>Bacilli</i>	<i>Thermobacillus</i> sp.	91
	29.66	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	89
	29.67	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	94
	29.68	<i>Bacilli</i>	<i>Anoxybacillus caldicaldiproteolyticus</i>	99
	29.69	<i>Bacilli</i>		99
30	30.70	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
	30.71	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
	30.72	<i>Bacilli</i>	<i>Parageobacillus thermoglucosidans</i>	99
	30.73	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i> sp.	80
31	-		-	-
32	-		-	-
33	-		-	-
34	34.74	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Dokdonella</i> sp.	97
	34.75	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
	34.76	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
35	35.77	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus ehimensis</i>	93
	35.78	<i>Clostridia</i>	<i>Thermoanaerobacterium</i>	87
36	6.79	<i>Thermoanaerobacteriales</i>	<i>Caldicellulosiruptor</i> sp.	97
	36.80	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Pelomonas aquatica</i>	99
	36.81	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium</i> sp.	98
	36.82	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacterium</i> sp.	99
37	37.83	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i> bacterium	99
	37.84	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	99
38	38.85	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	98
	38.86	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	98
39	39.87	<i>Bacilli</i>	<i>Aeribacillus</i> sp.	99
	39.88	<i>Bacilli</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	100
	39.89	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	96
40	-		-	-
41	41.90	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Pelomonas</i> sp.	95
	41.91	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbispora bispora</i>	98

PŘÍLOHA 3

Výsledek identifikace mikroorganismů přítomných ve vzorcích odebraných z lokality kontaminované BTEX.

Band č.	Třída	Čeleď	Nejbližší příbuzný v databázi	Identita (%)
1	<i>Spirochaetia</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i> sp.	91
2	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella</i> sp.	90
3	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Zooglea</i> sp.	97
4	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella immobilis</i>	98
5	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfobulbaceae</i>	83
6	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	94
7	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Gallionellaceae</i>	<i>Candidatus Nitrotoga arctica</i>	99
8	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i> sp.	91
9	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	93
10	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp.	93
11	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i> sp.	100
12	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella immobilis</i>	98
13	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Malikia</i> sp.	99
14	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Azoarcus</i> sp.	99
15	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	87
16	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	89
17	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella immobilis</i>	97
18	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella immobilis</i>	98
19	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	81
20	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella immobilis</i>	98
21	<i>Holophagae</i>	<i>Holophagaceae</i>	<i>Geothrix fermentans</i>	99
22	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	88

PŘÍLOHA 4

Výsledek identifikace mikroorganismů přítomných ve vzorcích odebraných z lokality kontaminované leteckým petrolejem.

Band č.	Třída	Čeleď	Nejbližší příbuzný v databázi	Identita (%)
1	Gammaproteobacteria	<i>Sinobacteraceae</i>	<i>Hydrocarboniphaga daqingensis</i>	91
2	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Zavarzinia compransoris</i>	99
3	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Rugamonas rubra</i>	92
4	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rhodoferax</i> sp.	84
5	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Curvibacter</i> sp.	99
6	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rhodoferax</i> sp.	99
7	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Albidiferax</i> sp.	99
8	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Curvibacter</i> sp.	96
9	Neuvedeno	Neuvedeno	<i>Candidatus Methylomirabilis</i> sp.	93
10	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i> sp.	98
11	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rhodoferax</i> sp.	82
12	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Curvibacter</i> sp.	92
13	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophaceae</i>	<i>Syntrophus</i> sp.	96
14	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophaceae</i>	<i>Syntrophus</i> sp.	92
15	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Azonexaceae</i>	<i>Dechloromonas</i> sp.	87
16	<i>Clostridia</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Pelotomaculum propionicicum</i>	98
17	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Undibacterium</i> sp.	95
18	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Syntrophaceae</i>	<i>Syntrophus</i> sp.	95
19	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriaceae</i>	<i>Granulicella paludicola</i>	91
20	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Azonexaceae</i>	<i>Dechloromonas</i> sp.	89
21	<i>Clostridia</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Pelotomaculum propionicicum</i>	97
22	<i>Clostridia</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Pelotomaculum propionicicum</i>	96
23	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	91
24	<i>Spirochaetia</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i> sp.	94

Band č.	Třída	Čeleď	Nejbližší příbuzný v databázi	Identita (%)
25	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Gallionellaceae</i>	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	98
26	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rhodoferax</i> sp.	85
27	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Frateuria</i> sp.	96
28	<i>Spirochaetia</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i> sp.	93
29	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Herbaspirillum</i> sp.	95
30	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Herminiimonas</i> sp.	86
31	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Gallionellaceae</i>	<i>Sulfuricella denitrificans</i>	98
32	Neuvedeno	Neuvedeno	Delta proteobacterium MLMS-1	85
33	<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	79
34	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Saccharofermentans acetigenes</i>	97
35	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcaceae bacterium</i>	91
36	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i> sp.	82
37	<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Saccharofermentans acetigenes</i>	94
38	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i> sp.	88
39	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Azonexaceae</i>	<i>Dechloromonas</i> sp.	94
40	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella immobilis</i>	96
41	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dokdonella</i> sp.	86
42	<i>Spirochaetia</i>	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Rhodanobacter</i> sp.	97