

Studium biotické a abiotické degradace polyesterů s využitím molekulárně biologických metod

Ing. Jana Šerá, Ph.D.

Teze disertační práce



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Teze 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, Ph.D.**

Studijní program: Chemie a technologie materiálů (P2808)

Studijní obor: Technologie makromolekulárních látek (2808V006)

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

Oponenti: prof. Ing. Ivan Chodák, DrSc.
doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Zlín, září 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

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7454-790-4

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 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 of nutrients and terminal electron acceptors supported the growth of some bacterial species that are potential degraders of BTEX. Application of terminal electron acceptors had also positive influence on the growth of some degraders of hydrocarbon petroleum, which is one of the components of aviation fuel.

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	3
OBSAH.....	4
ÚVOD.....	6
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	7
1.1 Biodegradabilní polymery	7
1.1.1. Polybutylen adipát tereftalát.....	7
1.1.2. Abiotická degradace polymerů.....	7
1.1.3. Fotodegradace.....	7
1.1.4. Hydrolýza	8
1.1.5. Biodegradace polymerů	8
1.1.6. Mikroorganismy degradující PBAT	9
1.1.7. Biodegradace polyesterů v půdě.....	9
1.1.8. Vliv přísavku škrobu na biodegradaci	10
1.2 Denaturační gradientová gelová elektroforéza	10
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	11
3. MATERIÁL A METODIKA.....	12
3.1 Testované polymery.....	12
3.2 Biodegradace aromatického alifatického kopolyesteru	12
3.2.1 Stanovení základních fyzikálně-chemických a mikrobiologických parametrů půd.....	12
3.2.2 Biodegradační testy	12
3.2.3 Příprava půdního reaktoru	13
3.2.4 Tahové zkoušky	13
3.2.5 Mikroskopické metody	13
3.2.6 Gelová permeační chromatografie	13
3.2.7 Kalorimetrie.....	13
3.3 Hydrolýza vybraných polyesterů ve vodném prostředí.....	13
3.3.1 Příprava degradačních testů.....	13
3.3.2 Stanovení rozpuštěného organického uhlíku a úbytku hmotnosti....	13
3.4 Analýza degradérů kopolyesteru pomocí molekulárně biologických metod	
14	
3.4.1 Získání kultur degradérů PBAT	14
3.4.2 Molekulárně biologická analýza degradérů PBAT	14

3.5	Molekulárně biologická analýza bakteriálních konsorcií na lokalitách kontaminovaných BTEX a ropnými uhlovodíky.....	15
3.5.1	Aplikace stimulačních roztoků a odběr vzorků	15
3.5.2	Molekulárně biologická analýza environmentálních vzorků.....	15
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	16
4.1	Biodegradace alifatického aromatického kopolyesteru	16
4.1.1	Fyzikálně-chemické a mikrobiologické parametry půd.....	16
4.1.2	Biodegradace PBAT.....	16
4.1.3	Změny mechanických vlastností během biodegradace.....	17
4.1.1	Změny na povrchu materiálu během biodegradace	18
4.1.2	Změny v molekulové hmotnosti a distribuci během biodegradace .	20
4.1.3	Krystalinita kopolyesteru a kopolyesteru ve směsi se škrobem	21
4.2	Hydrolytická degradace vybraných polyesterů ve vodném prostředí a úbytek hmotnosti.....	22
4.3	Analýza degradačních konsorcií kopolyesteru v půdách pomocí molekulárně biologických metod.....	23
4.3.1	Základní charakteristiky půd a kultivace degradérů kopolyesteru ..	23
4.3.2	Výsledky molekulárně biologické analýzy degradérů kopolyesteru	24
4.4	Využití molekulárně biologických metod při biodegradaci BTEX a ropných uhlovodíků <i>in situ</i>	27
4.4.1	Optimalizace PCR a DGGE pro vzorky s vysokou bakteriální diverzitou	27
4.4.2	Výsledky molekulárně biologické analýzy lokality kontaminované BTEX	27
4.4.3	Výsledky molekulárně biologické analýzy lokality kontaminované leteckým petrolejem.....	29
5.	ZÁVĚR.....	29
6.	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI	31
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	32
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	41
9.	SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ.....	42
2.	ODBORNÝ ŽIVOTOPIS.....	43
10.	PUBLIKAČNÍ AKTIVITY	45

ÚVOD

Polymerní materiály 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 (Ahmed a kol., 2018; Emadian a kol., 2017). Tyto materiály jsou využívány zejména na výrobu obalů, jednorázových zdravotnických prostředků, dále také v terapeutických, chirurgických a sterilních výrobcích. Jejich využití narůstá také v zemědělství, kde jsou využívány např. jako 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 roztrždit a recyklovat jednotlivé části odpadu. Pro úspěšné 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. 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 polymery, které vyhovují výše zmíněným standardům a s potenciálem nahradit konvenční plasty.

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 Biodegradabilní polymery

Biodegradabilní polymery mohou být mikroorganismy zcela přeměněny na oxid uhličitý, vodu, minerální látky a biomasu, bez negativního vlivu na životní prostředí nebo ekotoxického působení (Kyrikou a Briassoulis, 2007). 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. Většinu z biologicky odbouratelných polymerů lze také označit za kompostovatelné.

1.1.1. Polybutylen adipát tereftalát

Polybutylen adipát tereftalát je semikrystalický syntetický kopolyester, který je získáván z fosilních zdrojů polykondenzací 1,4-butandiolu a kyseliny tereftalové a adipové (Siegenthaler a kol., 2012; Witt a kol., 2001; Witt a kol., 1997). 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 podobný nízkohustotnímu polyethylenu (Herrera a kol., 2002; Siegenthaler a kol., 2012). Tento polymer 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).

1.1.2. Abiotická degradace polymerů

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

1.1.3. Fotodegradace

Expozice ultrafialovému záření (UV) způsobuje degradaci mnoha materiálů. Fotosenzitivní karbonylové skupiny, které jsou v biodegradabilních polyesterech přítomné ve velkém množství, způsobují jejich citlivost k fotodegradaci. Fotodegradace může způsobit náhodné štěpení hlavních polymerních řetězců, což vede ke ztrátě mechanických vlastností polyesteru. Dalším mechanismem fotodegradace je síťování uvnitř biodegradabilního filmu způsobené rekombinací volných radikálů. Síťování způsobuje ztrátu tažnosti polymeru a film se stane velmi křehkým (Kijchavengkul a kol., 2008; Rivaton a Gardette, 1998). Ve studii Stloukala a kol., (2012) bylo zaznamenáno síťování a vnik gelu 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.

1.1.4. Hydrolýza

Abiotická hydrolýza může být prvním degradačním krokem, který otevírá kostru polymeru a zpřístupňuje specifická místa po navázání enzymů (Kijchavengkul a kol., 2010). Hydrolýza uvolňuje polymerní řetězce štěpením hydrolytických vazeb v kostře polymeru pomocí náhodného štěpení řetězců (Foulc a kol., 2005; Gopferich, 1996; 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). Hydrolýza polyesterů probíhá v kyselém, bazickém i neutrálním prostředí (Jung a kol., 2006). Vysoká teplota hydrolýzu urychluje, je nejvýznamnějším faktorem prostředí, ve kterém dochází k hydrolytické degradaci, což je patrné z mnoha studií (Deroine a kol., 2014; Fukushima a kol., 2011; Kale a kol., 2007; Ndazi a Karlsson, 2011; Saadi, a kol., 2013).

Vlastností polymerů, která velmi ovlivňuje hydrolýzu, je jejich krystalinita. Amorfní část polymerů obecně podléhá degradaci lépe než krystalická (Ahmed a kol., 2018). Polymerní řetězce v amorfní části jsou více pohyblivé a mohou zpřístupnit místa, ve kterých dochází k hydrolýze. Naopak krystalická část je tvořena především aromatickými doménami, jejichž struktura hydrolýzu 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 hydrolýze lépe podléhá amorfní část polymeru, kterou tvoří k. adipová a při hydrolýze dochází ke štěpení esterové vazby (Kijchavengkul a kol., 2010). Důležitým faktorem je specifický povrch. Čím je větší, tím rychleji dochází k hydrolytické degradaci (Husarova a kol., 2014). 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

1.1.5. Biodegradace polymerů

Biodegradace je ovlivněna vlastnostmi polymeru, prostředím a aktivitou mikroorganismů. Mezi důležité vlastnosti polymerů, které ovlivňují biodegradaci, patří přítomnost postranních řetězců a heteroatomů, typy vazeb a jejich reaktivita, flexibilita řetězců, krystalinita, molekulová hmotnost a specifický povrch. Alifatické polymery jsou lépe biodegradabilní než aromatické. Se zvyšujícím se poměrem aromatických sekvencí se 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 tak podléhají degradaci, protože polymerní řetězec musí být dostatečně mobilní, aby enzymy dosáhly katalytického centra (Herzog a kol., 2006; Marten a kol., 2005). Biodegradace je podpořena přítomností heteroskupin ve struktuře polymeru (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 nepřímě 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).

1.1.6. Mikroorganismy degradující PBAT

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.

Významným degradérem PBAT je termofilní aktinomyceta *T. fusca*. Pokud je tato bakterie členem bakteriálního konsorcia, dochází k rychlé asimilaci vzniklých meziproductů (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 mechcem *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).

1.1.7. Biodegradace polyesterů v půdě

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 aktivity mikroorganismů (Kyrikou a Briassoulis, 2007). Vliv vlhkosti a teploty je patrný např. ze studie provedené ve Vietnamu, která sledovala biodegradaci filmu vyrobeného z polyesteru řazeného mezi polyhydroxyalkanoáty. Degradace byla pozitivně ovlivněna vlhkým a horkým podnebím (Boyandin a kol., 2013). 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).

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. Ve studii Morita a kol., (2012) bylo dosaženo 15% poklesu hmotnosti při inkubaci v půdě po dobu

10 měsíců při 30 °C. 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 %. Z dostupné literatury lze usoudit, že degradace PBAT v půdě za mezofilních podmínek je pomalý proces, který trvá několik měsíců. Biodegradční experimenty v půdním prostředí reflektují podmínky, které mohou panovat při použití PBAT v zemědělství.

1.1.8. Vliv přídavku škrobu na biodegradaci

Přídavek škrobu ovlivňuje mechanické a fyzikální vlastnosti polymerů (snižuje hydrofobicitu, zvyšuje propustnost pro vodu a plyny a zlepšuje termické vlastnosti)

(Mekonnen a kol., 2013; Shi a kol., 2011). Do směsí s polymery je vhodnější plastifikovaný, tzv. termoplastický škrob (TPS), jelikož přírodní škrob má omezenou termickou zpracovatelnost. Škrob obecně podporuje biodegradabilitu polymerů, což je patrné z mnoha studií (Chaleat a kol., 2012; Ke a kol., 2003; Shi a kol., 2011; Sriroth a Sangseethong, 2006; Wang a kol., 2003). 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). Výhodou škrobu je také jeho snadná dostupnost a nízká cena (Wang a kol., 2003).

1.2 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

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. Vzhledem k tomu, že jednotlivé bandy, které reprezentují bakteriální druhy, mohou být vyřezány a sekvenovány, je DGGE metoda vhodná pro fylogenetickou analýzu a přímou identifikaci mikroorganismů (Muyzer a Smalla, 1998; Valaskova a Baldrian, 2009). Pro přesné taxonomické zařazení na úrovni bakteriálních kmenů 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. Další výhodou DGGE je citlivost na variace v DNA sekvencích, díky které 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). Tuto metodu lze použít např. k přímé vizualizaci bakteriální diversity, identifikaci členů bakteriálního konsorcia či monitoringu vývinu mikroflóry v čase.

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

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

Dílčí cíle byly následovné:

- Studium biodegradace alifatického aromatického kopolyesteru v půdě v mezofilních podmínkách.
- Studium abiotické hydrolyzy 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 ropnými uhlovodíky.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Testované polymery

- Polybutylen adipát tereftalát

Pro biodegradční testy byly použity filmy o tloušťce 40 μm vyrobené z kopolyesteru PBAT pod obchodním názvem Ecoflex (BASF, Německo).

Pro selektivní izolaci degradérů kopolyesteru byl použit PBAT-G8060 (EnPol Irechemicals, Korea), jeho suspenze byla připravena metodou Oil-in-water emulsion solvent evaporation method (Jeffery a kol., 1991)

- Škrobem plněný kopolyester

Kopolyester plněný škrobem obsahoval 70,8 % PBAT; 19,15 % škrobu; 5,7 % k. polymléčné a 4,35 % glycerolu (Limagrain, Francie). Filmy měly tloušťku 40 μm .

- Další polyestery

V části práce, která se zabývala abiotickou hydrolyzou polyesteru, byly použity folie o tloušťce 140 μm . Pro výrobu folií byl použit polybutylen sukcinát (PBS) (IRE Chemicals, Jižní Korea), polybutylen adipát tereftalát (PBAT) (IRE Chemicals, Jižní Korea), polybutylen sukcinát adipát (PBSA) (Showa Denko, Japonsko) a polybutylen (PBT).

3.2 Biodegradace aromatického alifatického kopolyesteru

3.2.1 Stanovení základních fyzikálně-chemických a mikrobiologických parametrů půd

Vzorky půd klasifikovaných jako černozem, hnědozem a fluvisol byly odebrány z rurálních oblastí v okolí Brna. Bylo stanoveno pH dle dle ISO 10390:2005, sušina dle ISO 11465:1993 a vybrané mikrobiologické parametry dle standardní metodiky. Půdy a jejich vybrané fyzikálně-chemické charakteristiky byly poskytnuty Mendelovou univerzitou v Brně.

3.2.2 Biodegradční testy

Pro biodegradaci ve směsi půdy a perlitu byly použity filmy vyrobené z čistého kopolyesteru PBAT a škrobem plněného kopolyesteru. Dále byly připraveny lahve sloužící jako slepý pokus a pozitivní kontrola (celulóza). Směs byla ovlhčena na 50 %. Lahve byly inkubovány při 25 °C bez přístupu světla, plynná fáze byla odebírána každých 7 dní a analyzována pomocí plynové chromatografie (Agilent 7890). K detekci složek sloužil tepelně vodivostní detektor (TCD). Měření mineralizace uhlíku byla provedena ve spolupráci s Ing. Jarmilou Novákovou

3.2.3 Příprava půdního reaktoru

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). Kultivace probíhala při 25 °C, vlhkosti 50 % a bez přístupu světla.

3.2.4 Tahové zkoušky

Mechanické vlastnosti byly stanoveny pomocí trhacího přístroje INSTRON 8871 dle technické normy ČSN EN ISO 527-3.

3.2.5 Mikroskopické metody

Vzorky pro mikroskopická pozorování byly odebírány několikrát v průběhu inkubace. Pomocí optické mikroskopie (Olympus BX 53) byl sledován jednak úbytek škrobu ve vzorcích kopolyesteru plněného škrobem jednak změny na povrchu materiálu a bakteriální filamenta. Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) (VEGA IILMU) byla použita k detailním pozorováním. Pozorování pomocí SEM byla provedena ve spolupráci s Ing. Petrem Stloukalem, Ph.D.

3.2.6 Gelová permeační chromatografie

Změny molekulové hmotnosti byly sledovány pomocí Breeze Chromatographic System (Waters, Milford, MA) vybaveném UV detektorem. Měření byla provedena ve spolupráci s Ing. Petrem Stloukalem, Ph.D.

3.2.7 Kalorimetrie

Krystalinita vzorků byla měřena na přístroji Mettler Toledo DSC1 STAR systém.

3.3 Hydrolýza vybraných polyesterů ve vodném prostředí

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

3.3.1 Příprava degradačních testů

Degradační testy probíhaly ve fosfátovém pufru při 37, 58 a 70 °C. Dále byly připraveny lahve sloužící jako slepý pokus a pozitivní kontrola (celulóza).

3.3.2 Stanovení rozpuštěného organického uhlíku a úbytku hmotnosti

V pravidelných intervalech byly odebírány vzorky vodné fáze a na automatickém analyzátoru uhlíku Shimadzu TOC-5000A vybaveném nedisperzním infračerveným detektorem byl měřen obsah celkového organického uhlíku (TOC). Dále byl u vzorků polymerů v průběhu testu sledován úbytek hmotnosti.

3.4 Analýza degradérů kopolyesteru pomocí molekulárně biologických metod

3.4.1 Získání kultur degradérů PBAT

Bylo odebráno 41 vzorků půd z okolí Zlína se známou bonitní půdně ekologickou jednotkou a bylo změřeno jejich pH. Degradéři PBAT byli selektivně pomnoženi ve směsi půdy, perlitu a suspenze PBAT. Směs byla ovlhčena na 50 %. Vzorkovnice byly inkubovány po dobu 64 dní při 58 °C, poté byl připraven výluh z půd. Byl připraven také výluh přímo z testovaných půd bez selektivního pomnožení degradérů kopolyesteru. Výluhy byly pipetovány neředěné a v ředění 10^{-1} na tuhá živná média obsahující suspenzi alifatického-aromatického kopolyesteru. 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 počty kolonií degradérů a spočteny kolonie tvořící jednotky (CFU). Prosvětlené zóny signalizovaly degradaci polymeru, který tvořil v agaru mléčné zbarvení. Několikerým přeočkováním kolonií degradérů byla získána konsorcia degradérů PBAT, ze kterých byla izolována DNA.

Prvotním cílem bylo získat čistou mikrobiální kulturu. K izolaci čisté kultury aktinomycet, u kterých byl předpoklad degradace PBAT, bylo připraveno kromě tuhého živného média obsahujícího suspenzi PBAT 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.

3.4.2 Molekulárně biologická analýza degradérů PBAT

Po izolaci DNA byl pomocí nested PCR amplifikován fragment regionu V3-V5, který je součástí genu 16S rRNA. Provedení a nastavení izolace DNA, PCR i DGGE bylo upraveno v rámci optimalizací. Byla provedena série testů zahrnujících různé metody izolace DNA (lyze varem, pomocí lysozymu, proteinázy K, metodou chloroform-izoamylalkohol a komerčními kity High Pure PCR Template Preparation Kit a PowerSoil DNA Isolation Kit, izolace DNA pomocí směsi chloroform/izoamylalkohol. Izolace bakteriální DNA byla prováděna ve spolupráci s Ing. Denisou Pavlíkovou a Ing. Radkou Žákovou.

DNA byla amplifikována pomocí nested PCR. První PCR, jejíž průběh byl upraven na touchdown, byla provedena s vnějšími primery fD1, rD1. Druhá PCR byla provedená s vnitřními primery 341F GC a 907R. Primer 341F GC obsahoval tzv. GC svorku, což je úsek bohatý na GC páry, které zabraňují denaturaci DNA a udrží ji tak v polyakrylamidovém gelu. Po provedení PCR byla amplifikovaná DNA zkontrolována pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. DNA byla označena ethidium bromidem a vizualizována pomocí UV záření.

Pro charakterizaci konsorcia mikroorganismů byla po optimalizacích provedena denaturační gradientová gelová elektroforéza s gradientem denaturačních činidel 40-80 %. Při této koncentraci došlo k nejlepšímu a nejostřejšímu rozdělení jednotlivých bandů. Jako denaturační činidla byla použita urea a formamid. K polymeraci bylo využito tetramethylethylenediaminu (TEMED)

a peroxodisíranu amonného (APS). Při samotné elektroforéze bylo so aparatury vloženo napětí 90 V a elektroforéza probíhala po dobu 16,5 hodin při 60 °C.

DNA obsažená v příslušných bandech byla z gelu vyřezána, znovu amplifikována pomocí primerů 341F bez GC svorky a 907R a purifikována kitem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid). Byly připraveny sekvenační směsi a zaslány na sekvenaci do firmy SEQme s.r.o. Výsledné sekvence byly upraveny pomocí programu DNA Baser a Finch TV. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí databáze BLAST (National Library of Medicine). Pomocí programu Jalview byl na základě získaných sekvencí metodou neighbor joining sestaven fylogenetický strom (Troshin a kol., 2009). V rámci fylogenetické analýzy byla také provedena analýza hlavních komponent (Wold a kol., 1987)

3.5 Molekulárně biologická analýza bakteriálních konsorcií na lokalitách kontaminovaných BTEX a ropnými uhlovodíky

V rámci remediace postižených lokalit byly cíleně stimulovány autochtonní anaerobní mikroorganismy, a to pomocí aplikace nutrientů a vhodného terminálního akceptoru elektronů.

3.5.1 Aplikace stimulačních roztoků a odběr vzorků

Na lokalitě kontaminované benzenem, toluenem, ethylbenzenem a xylenem (BTEX) byly aplikovány nutrienty (dusík a fosfor) a terminální akceptor elektronů NO_3^- . Na lokalitě kontaminované ropnými uhlovodíky byly jako terminální akceptory elektronů aplikovány roztoky NO_3^- nebo komplexního činidla (NO_3^- , Fe^{3+} , SO_4^{2-}). Aplikace tzv. stimulačních roztoků by měla vést k podpoře degradérů a snížení koncentrace BTEX a ropných uhlovodíků. Pomocí molekulárně biologických metod byl na vybraných lokalitách analyzován stav bakteriálních konsorcií těsně před aplikací, v době aplikace a po aplikaci nutrientů a terminálních akceptoru elektronů. 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.

3.5.2 Molekulárně biologická analýza environmentálních vzorků

Vzorky odebrané z aplikačních vrtů byly nejprve centrifugovány a DNA byla izolována z pevného podílu pomocí kitu PowerSoil DNA Isolation Kit (Mobio). Koncentrace a čistota izolované DNA byla změřena na UV/VIS spektrometru TECAN Infinite 200 PRO NanoQuant. Byla provedena nested PCR s primery fD1, rD1 a 341F GC, 907R. Průběh první PCR byl upraven na touchdown. Tato nastavení PCR programu byla optimalizována pro amplifikaci DNA vzorků s velkou bakteriální diverzitou. 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. 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. Vybrané bandy byly vyřezány, DNA byla znovu amplifikována a purifikována kitem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid). Poté byly připraveny sekvenační směsi a zaslány na 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 A DISKUZE

4.1 Biodegradace alifatického aromatického kopolyesteru

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

4.1.1 Fyzikálně-chemické a mikrobiologické parametry půd

V Tabulka 4.1 a Tabulka 4.2 jsou shrnuty základní fyzikálně-chemické charakteristiky půd a celkové počty mikroorganismů patřících do hlavních zájmových skupin.

Tabulka 4.1: Vybrané fyzikálně chemické charakteristiky testovaných půd.

	Hnědozem	Černozem	Fluvizem
pH (KCl)	6,85	6,72	6,45
Sušina (%)	85,23	82,64	73,79
C_{ox} (%)	1,77	0,97	2,50
SOM (%)	3,05	1,67	4,30

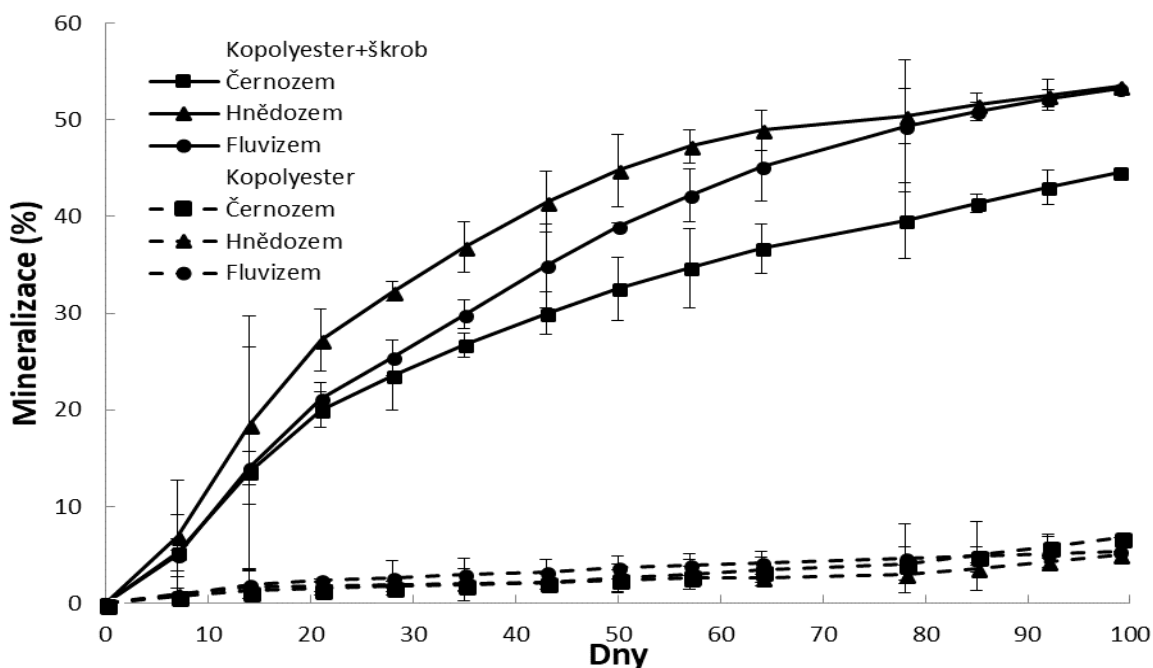
C_{ox}, oxidovatelný uhlík; *SOM*, půdní organická hmota (soil organic matter).

Tabulka 4.2: Stanovení celkových počtů hlavních skupin mikroorganismů.

Celkové počty mikroorganismů			
Typ půdy	Chemoorganotropní aerobní bakterie	<i>Actinobacteria</i>	Půdní vláknité houby
Hnědozem	4,22 · 10 ⁶	3,40 · 10 ⁶	4,34 · 10 ⁴
Černozem	3,87 · 10 ⁶	2,90 · 10 ⁶	4,96 · 10 ³
Fluvizem	6,50 · 10 ⁶	5,42 · 10 ⁶	3,93 · 10 ⁵

4.1.2 Biodegradace PBAT

Na Obrázek 4.1 je zaznamenána závislost mineralizace filmů Ecoflexu a Ecoflexu se škrobovým plnivem na čase v půdním prostředí.



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

Dle očekávání byla biodegradace čistého kopolyesteru velmi omezená, po 100 dnech inkubace byl degradován z cca 6 %. 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 (Nayak, 2010; Ssiroth a Sangseethong, 2006). 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 černozezem. 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).

4.1.3 Změny mechanických vlastností během biodegradace

V rámci disertační práce byly sledovány změny mechanických vlastností obou materiálů během biodegradace. Film vyrobený z čistého kopolyesteru vykazoval během experimentálního období významné změny v mechanických vlastnostech ve všech testovaných pádech. Pevnost v tahu se 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. Kopolyester ve směsi se škrobem se v testovaných půdách rozpadl na drobné částice již po 20 dnech inkubace a jeho mechanické vlastnosti tak nemohly být dále sledovány, byl proveden doplňující experiment. Lopatky

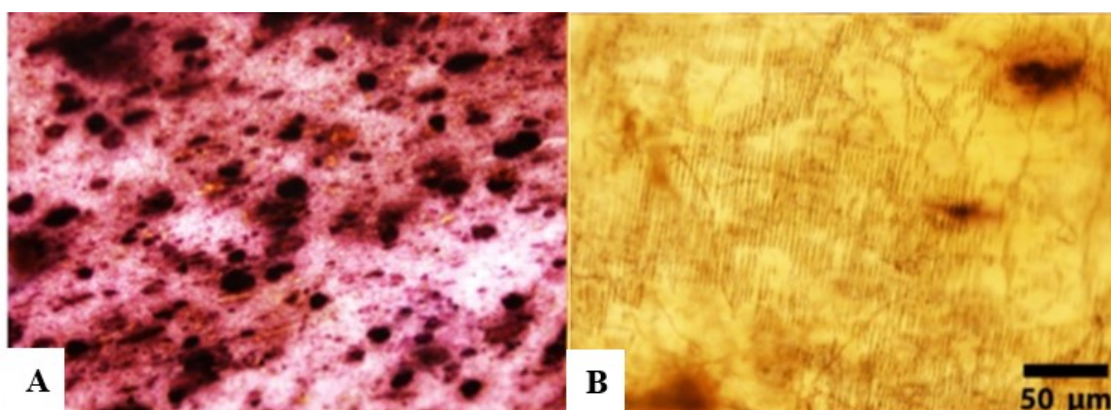
byly inkubovány v hnědozemi a odebírány během prvních 20 dní experimentu. Po 4 dnech se napětí při přetržení snížilo z 36,6 MPa na 27,3 MPa, 16. den na 1,2 MPa. Prodloužení při přetržení se po 4 dnech inkubace snížilo na 104,5 %, po 16 dnech inkubace došlo ke snížení na 16,5 %. Narušení materiálu je patrné také z Obrázek 4.2, v průběhu inkubace došlo ke křehnutí a ztrátě elasticity a vytvořily se trhliny. Po 70 dnech byl již materiál zčásti zcela rozložen.



Obrázek 4.2: 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.

4.1.1 Změny na povrchu materiálu během biodegradace

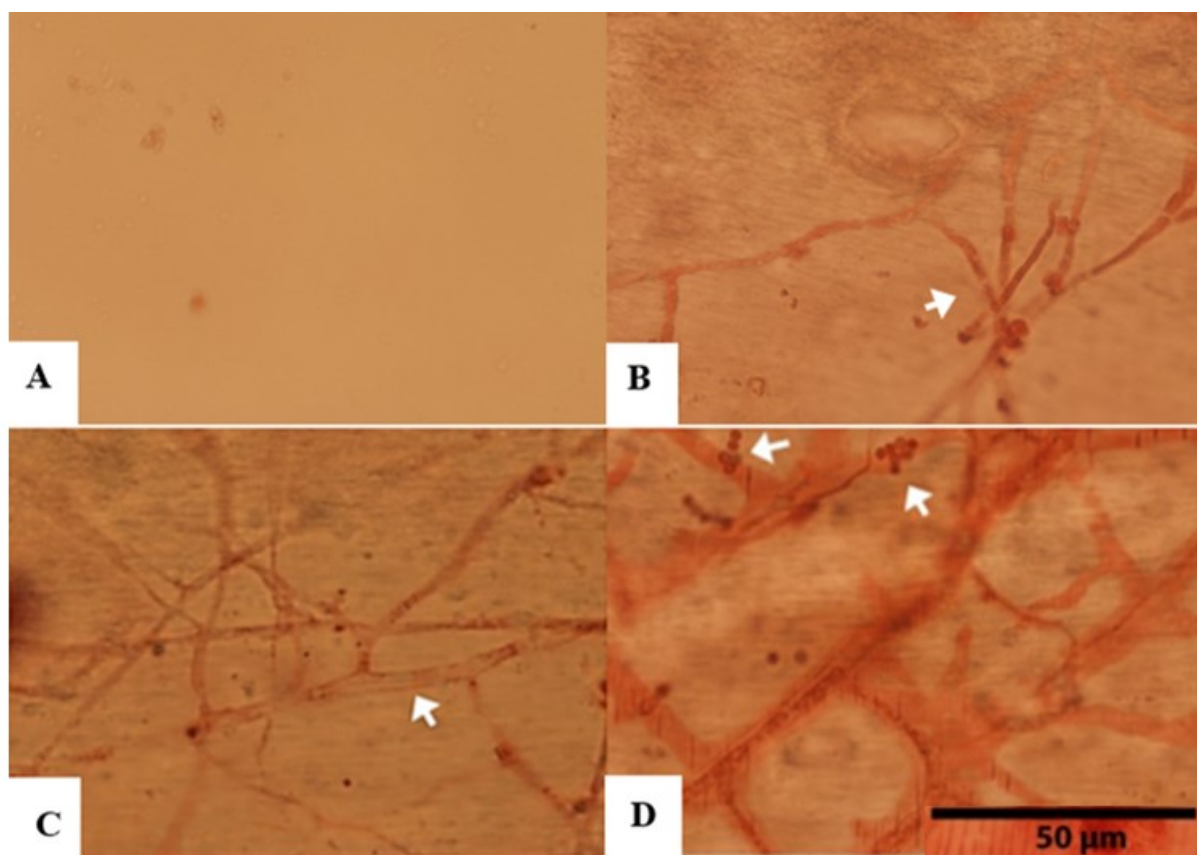
K pozorování změn na povrchu testovaných materiálů byla využita optická a rastrovací elektronová mikroskopie. Na vzorku kopolyesteru ve směsi se škrobem byly před biodegradací pozorovány části materiálu tvořené škrobem a také celá škrobová zrna. Významné změny v jejich struktuře bylo možno pozorovat již 20. den inkubace. Po uplynutí 50 a 70 dnů již narušená škrobová zrna postupně zmizela a ve struktuře vzorků byly viditelné paralelně uspořádané krátké trhliny (Obrázek 4.3). 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 4.3: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem, barveno Lugolovým roztokem. Škrob je zbarven fialově. A-před biodegradací, B-70. den biodegradace ve fluvizemi. Zvětšeno 200 ×.

Současně byl safraninem vizualizován vývoj biologických struktur na povrchu filmu (Obrázek 4.4). Na povrchu čistého kopolyesteru byl během inkubace v malé míře viditelný růst mikrobiálních vláken, ale změny ve struktuře polymeru nebyly téměř patrné. Na povrchu folie vyrobené ze směsi kopolyesteru a škrobu byla již 4. den inkubace pozorována vlákna, patrně bakteriálního původu. Tyto bakterie byly dle jejich rozměrů, morfologie a přítomností exospor určeny jako bakterie

patřící do kmene *Actinobacteria*. V průběhu inkubace 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.

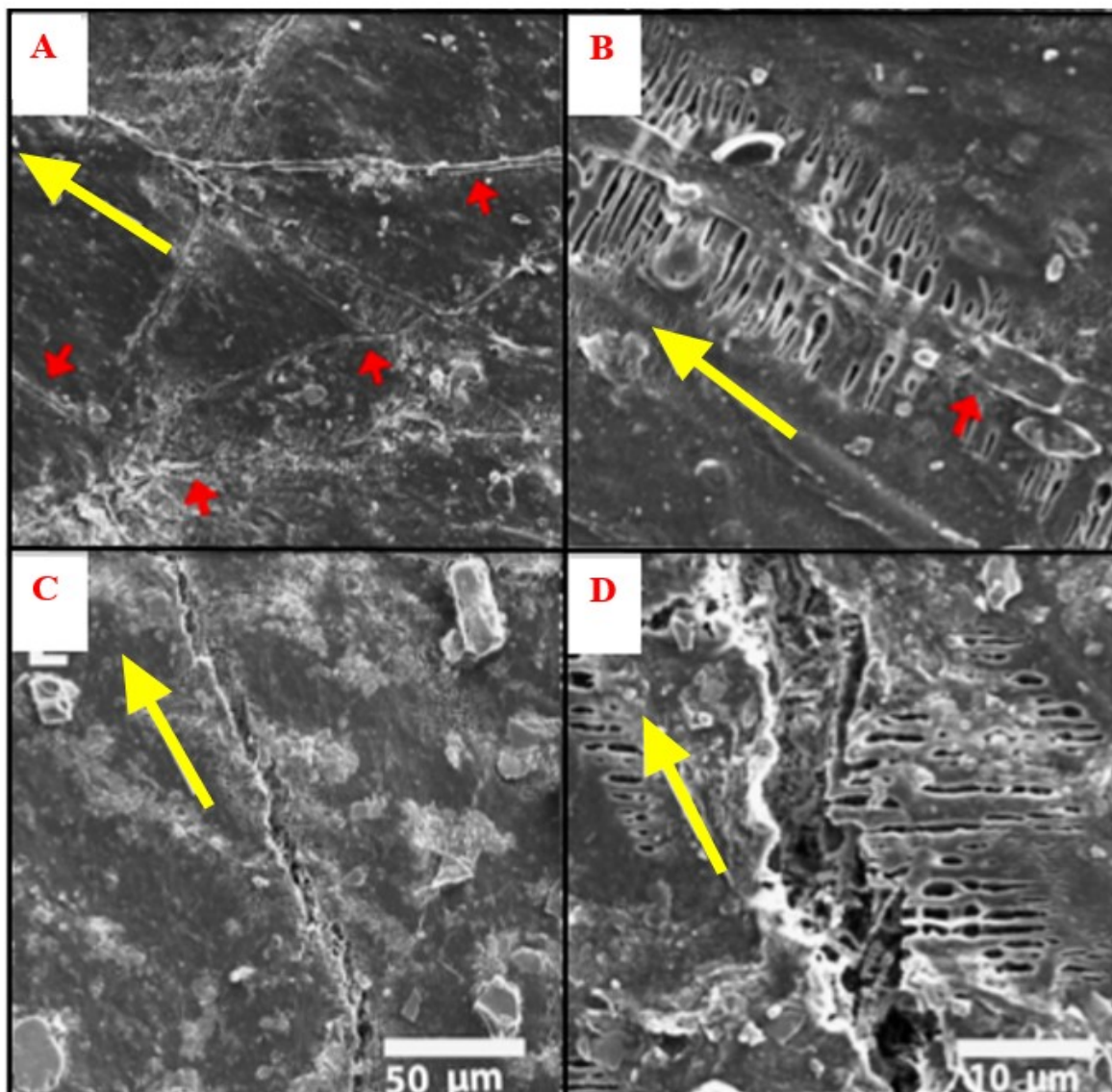


Obrázek 4.4: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem, barveno safraninem. A-0. den, B-2. den, C-4. den a D-16. den biodegradace ve fluzizemi. Filamenta a exospory jsou označeny bílými šipkami. Zvětšeno 600 ×.

Oba materiály byly detailně studovány pomocí SEM. Na povrchu čistého kopolyesteru nedošlo k téměř žádným změnám. Po 28 dnech inkubace kopolyesteru ve směsi se škrobem v půdě byl materiál pokryt bakteriálními vlákny a rozvíjejícím se systémem trhlín. 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 trhlín. 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. Změny na povrchu materiálu lze pozorovat na Obrázku 4.5

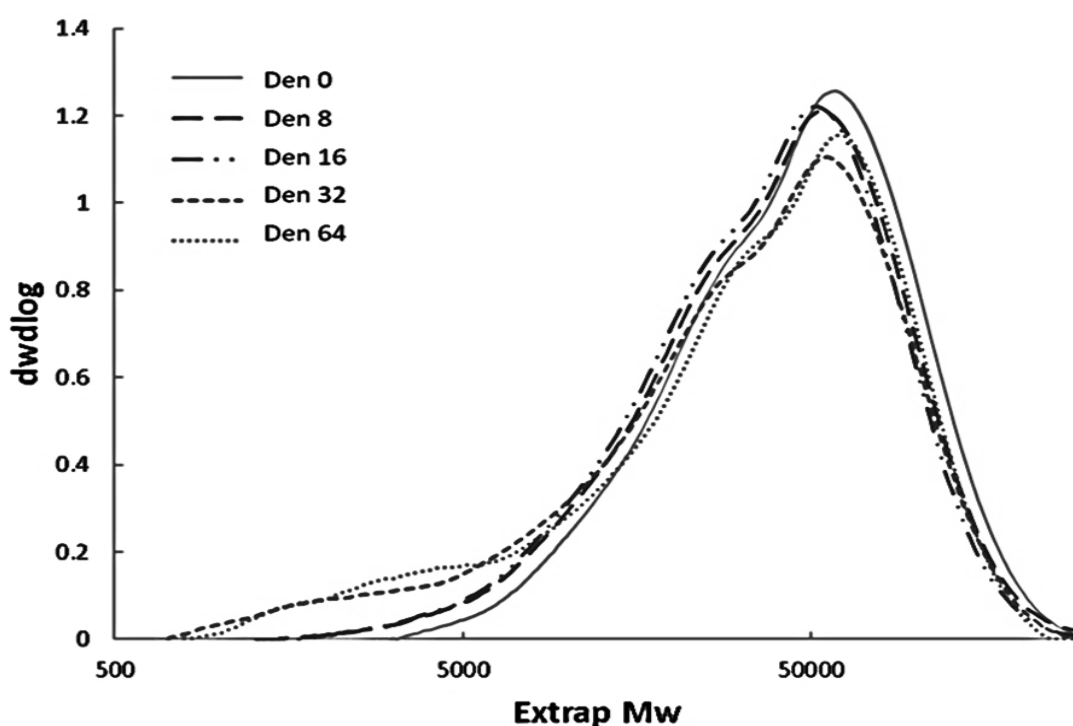


Obrázek 4.5: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem získané pomocí SEM. A, B-28 dní, C, D-78 dní biodegradace ve fluvizemi. Levá strana obrázku (A, C) zvětšeno 1000 ×, pravá strana (B, D) zvětšeno 5000 ×. Bakteriální filamenta jsou označena červenými šipkami. Žluté šipky značí orientaci při výrobě filmu.

4.1.2 Změny v molekulové hmotnosti a distribuci během biodegradace

Ve vzorku čistého kopolyesteru došlo k nepatrnému posunu distribučních křivek směrem k nižším molekulovým hmotnostem, ale M_w těchto fragmentů nebyla dostatečně nízká, 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.

V případě filmu, který obsahoval také škrob (Obrázek 4.6), bylo počáteční rozdělení M_w kopolyesteru posunuto k nižším hodnotám ve srovnání s čistým kopolyesterem. To zřejmě odráželo odlišnou historii vzorků včetně intenzivního termoplastického zpracování v případě směsi. 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 (Husarova a kol., 2014; Stloukal a kol., 2012; Stloukal a kol., 2015). Sledování vývoje distribučních křivek molekulových hmotností v kopolyesteru ve směsi se škrobem podpořilo výsledky biodegradčních experimentů.



Obrázek 4.6: Změna distribučních křivek molekulových hmotností v kopolyesteru se škrobem během inkubace v hnědozemi při 25 °C.

4.1.3 Krystalinita kopolyesteru a kopolyesteru ve směsi se škrobem

Krystalinita použitých vzorků byla pomocí kalorimetrie 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

Úbytky hmotnosti polyesterů a stupeň hydrolytické degradace po 128 dnech inkubace jsou uvedeny v Tabulka 4.3. Snížení hmotnosti a rostoucí množství rozpuštěného uhlíku ve fosfátovém pufru bylo zaznamenáno pro všechny testované vzorky a teploty, kromě PBT. Nízké hodnoty degradace PBT byly pravděpodobně způsobeny strukturou polybutylenu, která je tvořena zejména těžce hydrolyzovatelnou rigidní aromatickou složkou (Marten a kol., 2005).

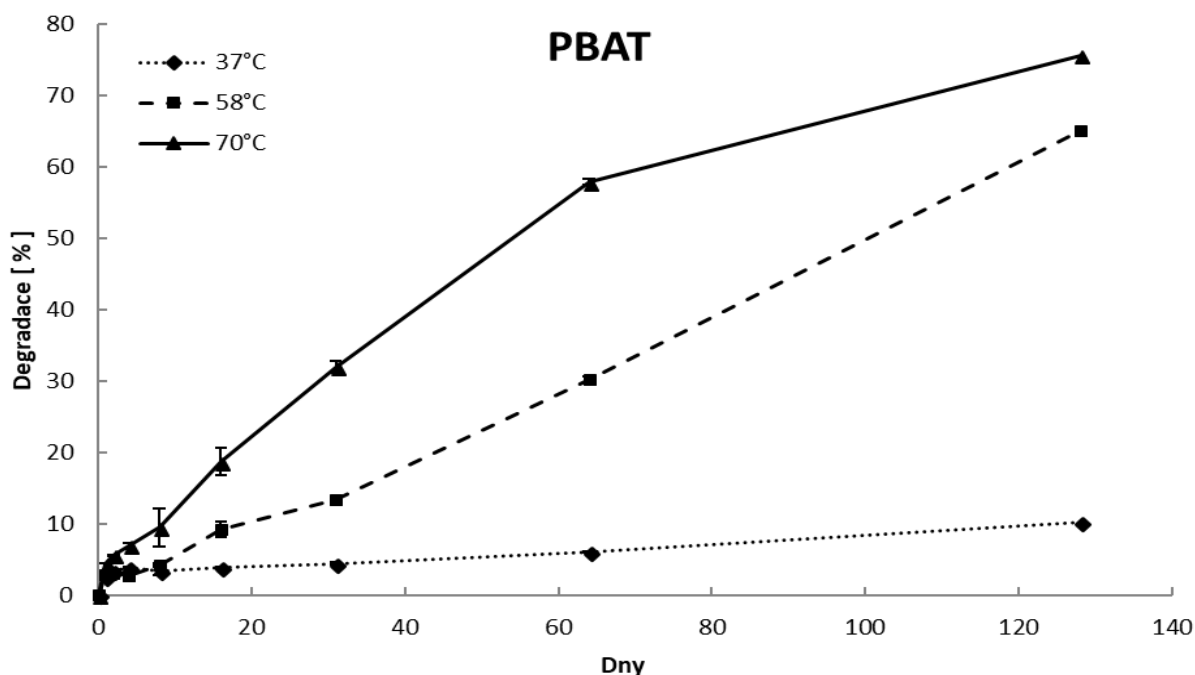
Z měření lze v souladu s literaturou odvodit, že zvýšení mobility polymerních řetězců, které je způsobeno vysokou teplotou, významně ovlivňuje kinetiku reakce. Akcelerace rychlosti hydrolytické hydrolyzy pomocí počátečního zvýšení teploty by tedy mohla značně urychlit degradaci polyesterů (Hakkarainen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

Tabulka 4.3: Shrnutí hydrolytické degradace při třech různých teplotách.

Materiál	Teplota [°C]	Stupeň hydrolyzy [%]	Úbytek hmotnosti [%]
PBS	37	7,46	12,7
	58	30,66	30,2
	70	69,98	67,4
PBSA	37	9,07	-
	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

Hydrolytická degradace PBAT (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) 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 polybutylenadipátu (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. V Kapitole 4.1.2 jsou uvedeny výsledky biodegradace PBAT v půdě při 25 °C, kopolyester dosáhl cca 6 % mineralizace po 100 dnech inkubace. Po stejné době inkubace ve vodném prostředí fosfátového pufru ve 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 4.7: Hydrolytická degradace PBAT.

4.3 Analýza degradačních konsorcií kopolyesteru v půdách pomocí molekulárně biologických metod

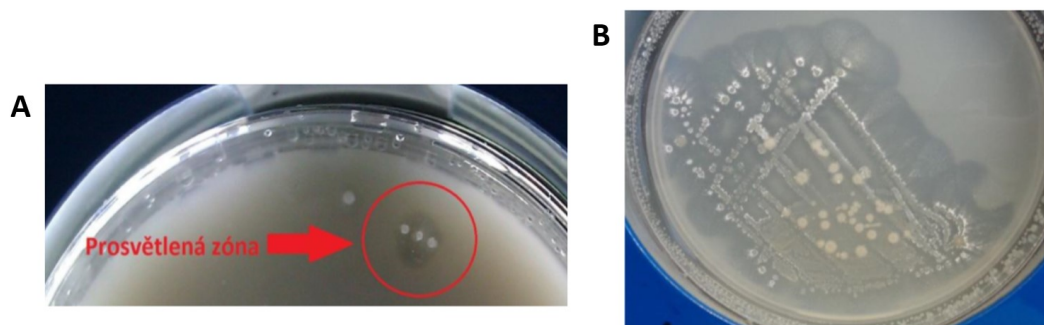
V další části se disertační práce zabývala především prokázáním přítomnosti termofilních degradérů polybutylen adipátu tereftalátu v půdách, jejich identifikací pomocí molekulárně biologických metod a optimalizací metodiky PCR-DGGE.

4.3.1 Základní charakteristiky půd a kultivace degradérů kopolyesteru

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). Vzhledem k tomu, že čísla parcel, ze kterých byly odebírány vzorky, byla zaznamenána, bylo poté možno dohledat půdní typ a také obsah organického uhlíku. Půdy patřily se především k půdním typům 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. Půdy obsahovaly organický uhlík v rozmezí 0,58-4,5 %, pH půd bylo stanoveno v rozmezí 5,03-6,75.

Degradační mikroorganismy byly detekovány pomocí metody prosvětlených zón vznikajících depolymerizací kopolyesteru, které se tvořily kolem bakteriálních kolonií v jinak mléčně zbarveném médiu. Prosvětlené zóny kolem kolonií degradérů PBAT jsou dobře pozorovatelné na Obrázek 4.8.

Detekční limit metody byl $100 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 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 ($p=0,024$). Po selektivním pomnožení byly degradující mikroorganismy přítomné ve většině testovaných půd v počtech 10^2 až $10^4 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ sušiny půdy. Nebyla zjištěna korelace mezi CFU a pH či $\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ sušiny půdy před pomnožením.



Obrázek 4.8: A-určení degradérů kopolyesteru pomocí metody prosvětlených zón; B-kultura konsorcia degradérů na tuhém živném médiu se suspenzí PBAT.

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*. Nebyly pozorovány žádné mikroskopické houby. 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 pomalu, kolonie byly na miskách patrné nejdříve po 10 dnech inkubace v $58 \text{ }^\circ\text{C}$, což značně prodloužilo dobu experimentů.

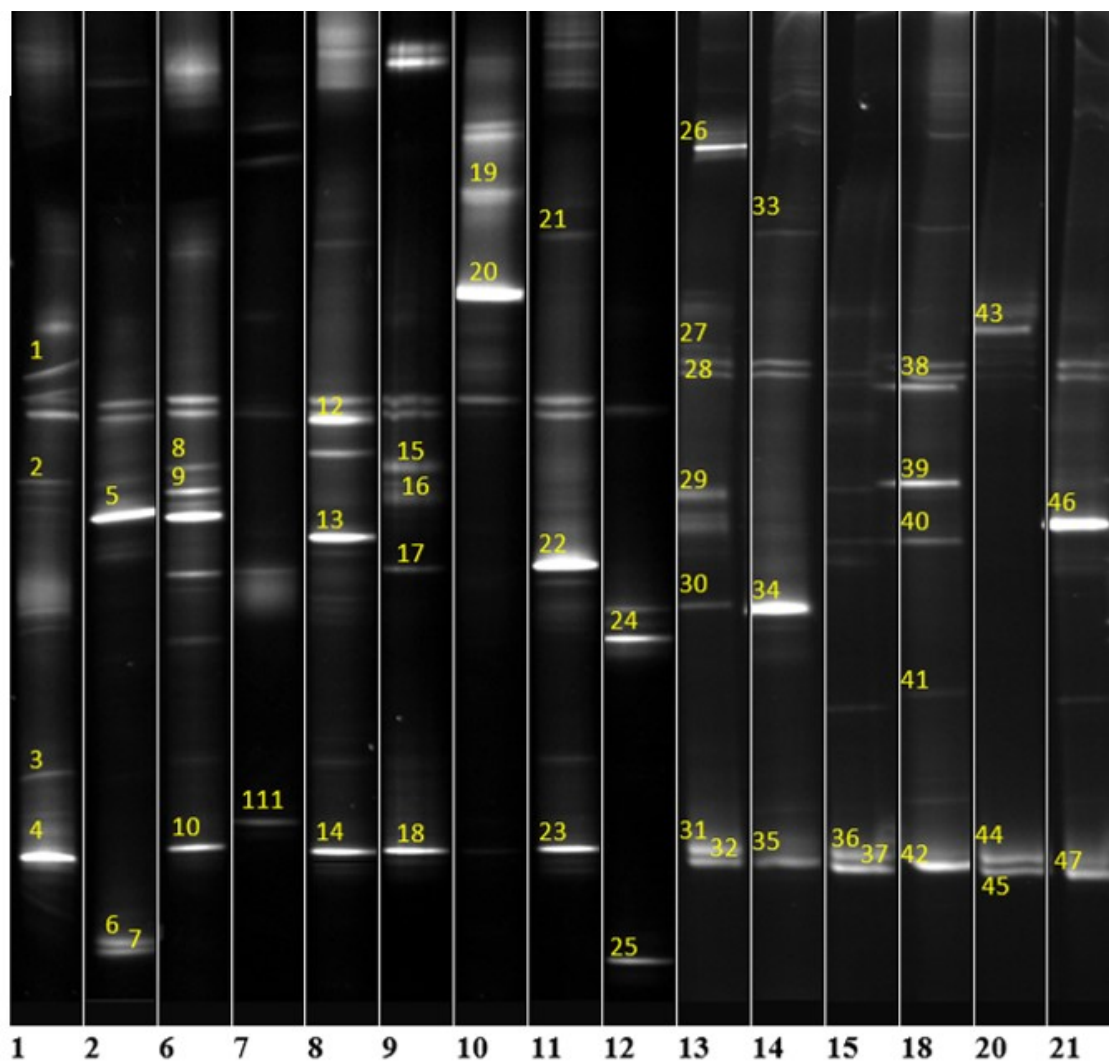
Bylo tedy usouzeno, že termofilní aktinomycety jsou nezbytnou složkou konsorcia degradujícího PBAT, ale nejsou na tomto médiu schopny samostatného růstu. Toto zjištění bylo v souladu s literaturou, ve které se uvádí, že aktinomycety izolované z kompostu nejsou schopné využívat monomery, které vznikají degradací PBAT. Pokud je ale tato bakterie členem bakteriálního konsorcia, dochází k rychlé asimilaci vzniklých meziproductů (Witt a kol., 2001). Bakteriální společenstva jsou pravděpodobně při degradaci PBAT efektivnější než izolované kultury.

4.3.2 Výsledky molekulárně biologické analýzy degradérů kopolyesteru

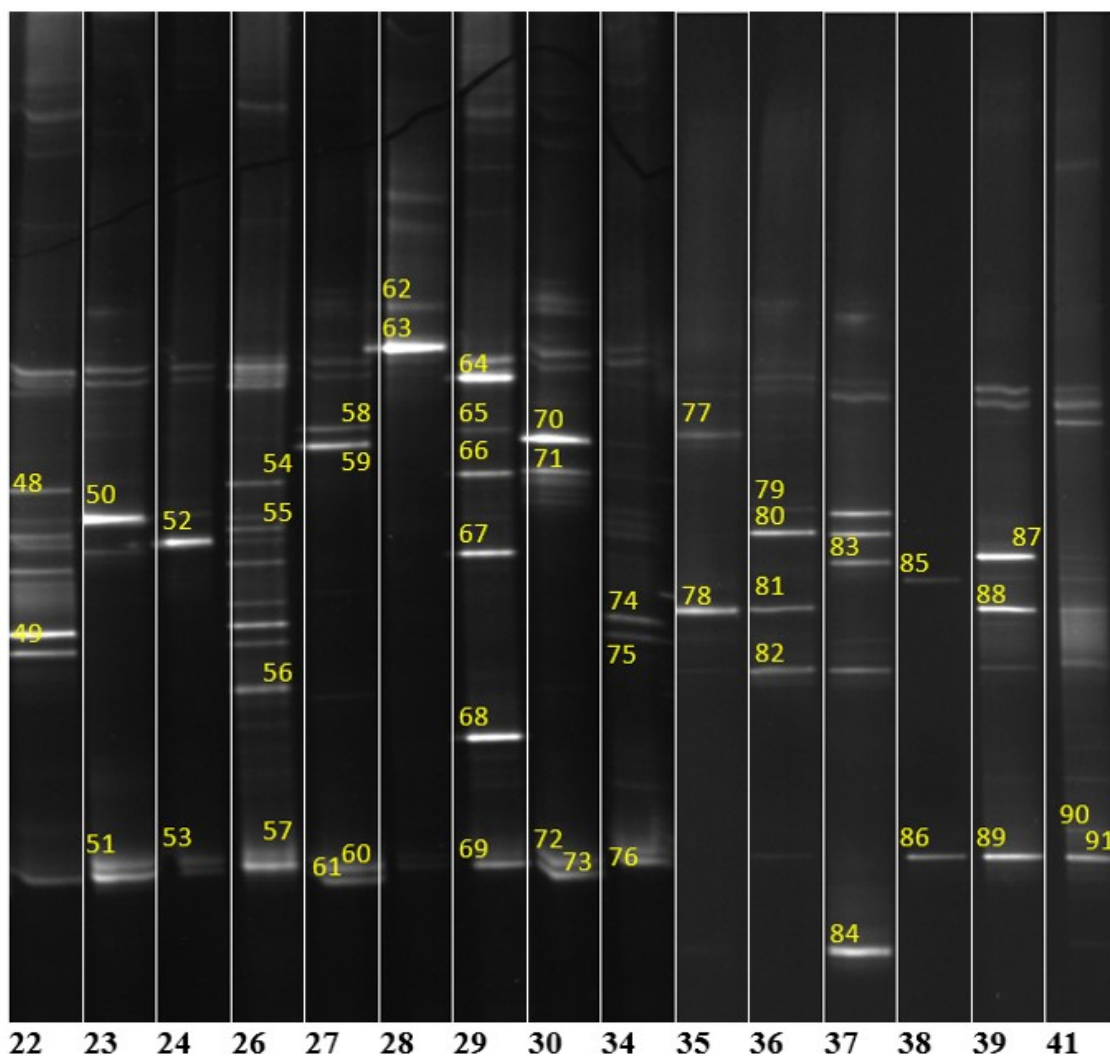
Po sérii testů různých metod izolace DNA byla jako nejvhodnější zvolena metoda chloroform/izoamylalkohol. Pro amplifikaci vybraného úseku genu 16S rRNA byly zvoleny vnější primery fD1 a rD1 a vnitřní 341F GC, 907R. Jako první byla provedena tzv. touchdown PCR. Po optimalizaci PCR byla amplifikovaná DNA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

metody na ÚIOŽP a nastavení nejvhodnějšího gradientu denaturačních činidel pro rozdělení fragmentů DNA degradérů kopolyesteru. Gradient denaturačních činidel měl významný vliv na ostrost a reprodukovatelnost bandů, které reprezentují konkrétní fragmenty DNA. Dále bylo optimalizováno napětí vkládané do soustavy při průběhu elektroforézy a doba, po kterou elektroforéza probíhala. Amplifikovaná DNA byla pomocí DGGE rozdělena do bandů na základě své mobility v gelu se stoupajícím denaturačním gradientem (Obrázek 4.9 A, B).

A)



B)



Obrázek 4.9 A; B.: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia degradérů PBAT. Čísla ve spodní části obrázku označují číslo půdy.

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., stanovena na 55 °C (Waldron a kol., 1986). *Microbispora bispora* produkuje extracelulární celulózu (endoglukanáza) s výtěžkem 5,9 U . ml⁻¹. Tento enzym je aktivní v širokém rozmezí pH a je termálně stabilní (Waldron a kol., 1986). *Microbispora bispora* byla zatím izolována pouze z kompostu (Henssen, 1957; Steger a kol., 2007; Waldron a kol., 1986). 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 bacili, především druh *Geobacillus* sp. Bakterie *Geobacillus kaustophilus* byla ve studii Grivalského a kol., (2018) zařazena k degradérům PBAT. 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 kmene *Proteobacteria*, bakterie tohoto kmene se v půdě vyskytují velmi hojně (Liu a kol., 2017; Pereira a kol., 2014). Analýza hlavních komponent potvrdila, *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 dále také *Proteobacteria*.

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

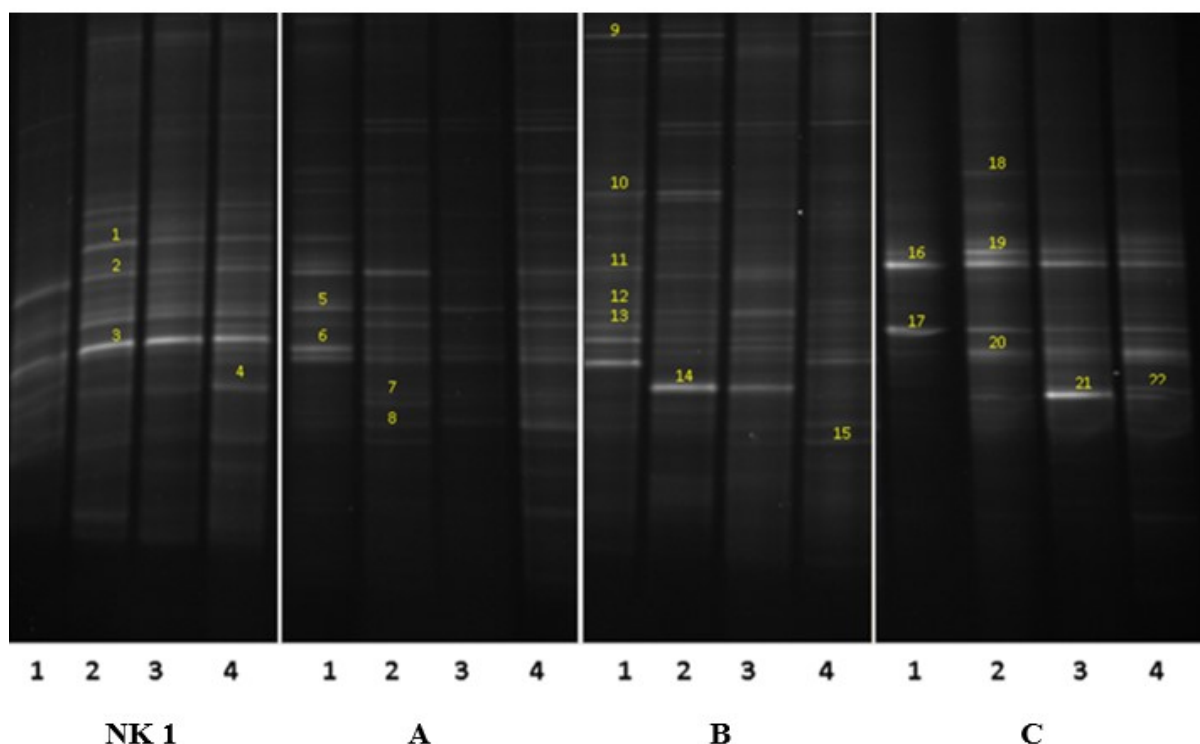
Byla sledována diverzita a vývoj bakteriálního společenstva na lokalitách s vysokou koncentrací BTEX a leteckého petroleje ve zvodnělé horninové vrstvě. Bylo vyhodnoceno, zda měla aplikace nutrientů a terminálního akceptoru elektronů přímo na vybraných lokalitách pozitivní vliv na diverzitu a množství potenciálních degradérů.

4.4.1 Optimalizace PCR a DGGE 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. Dochází také ke vzniku nespecifických produktů. Proto bylo teplotní nastavení PCR optimalizováno tak, aby bylo co nejvíce zamezeno jak vzniku nespecifických produktů, tak preferenčním amplifikacím. Denaturační gradient DGGE byl vybrán tak, aby byly výsledné bandy dostatečně ostré a bylo je možno vyřezat z gelu. Byl kladen důraz na celkový obraz bakteriálního společenstva, který by nepodcenil přítomnost některého z důležitých druhů

4.4.2 Výsledky molekulárně biologické analýzy lokality kontaminované BTEX

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.



Obrázek 4.10: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia izolovaného z lokality kontaminované BTEX. Vzorky byly odebrány 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.

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 denitrifikační bakterii degradující aromatické uhlovodíky (Rabus a Widdel, 1995; Springer a kol., 1998). 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; da Silva a Corseuil, 2012; Klueglein a kol., 2013; Rooney-Varga a kol., 1999). V nejméně kontaminovaném vrtu **A** neměla aplikace podpůrných látek velký vliv na změny v bakteriální diverzitě. Na lokalitě byly identifikovány bakterie patřící do tříd *Bacilli*, *Betaproteobacteria*, *Clostridia*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Spirochaetia*.

4.4.3 Výsledky molekulárně biologické analýzy 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.

V případě aplikace dusičnanů nedošlo k výrazným změnám v diverzitě bakteriálního konsorcia. Ve vrtech, do kterých bylo aplikováno komplexní činidlo, byla mikroflóra ovlivněna výrazněji, zvýšila se především abundance *Sulfuricella denitrificans*. Jedná se o fakultativně anaerobní, síru oxidující bakterii. Dále byl pozitivně ovlivněn výskyt *Rhodanobacter* sp. Některé kmeny bakterií rodu *Rhodanobacter* mají potenciál při degradaci benzo[a]pyrenu, který je složkou motorové nafty (Kanaly a kol., 2002). Z výsledků identifikace bakterií přítomných na lokalitách byla patrná velká bakteriální diverzita. Byly identifikovány 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. (Chakraborty a kol., 2005; Chiu a kol., 2013; Meckenstock, 1999; Yang a kol., 2014). Nepodařilo se u nich ale prokázat jasnou pozitivní reakci na přidavek akceptorů terminálních elektronů.

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 adipátu tereftalátu probíhala při 25 °C ve 3 druzích půd dle očekávání poměrně pomalu. Paralelně probíhal biodegradační experiment s filmy vyrobenými ze směsi tohoto kopolyesteru se škrobem (termoplastický škrob). Výsledky dokumentují, že mineralizace směšného 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 biodegradačních 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.

Biodegradační experiment byl podpořen také výsledky měření abiotické hydrolýzy, experimenty byly provedeny s polyestery PBS, PBSA a PBAT, jako negativní kontrola sloužil PBT. Vzorke 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.

Z 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 BTEX.

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>

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:000373149000012BERTI,

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/S0014305708004424BI>

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: ISI://WOS:000369309000019

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

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: ISI://WOS:000318959800019CHIU,

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

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 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 DUIGOU, 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

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

FENG, Lu, Wei WANG, Jiansong CHENG, et al. Genome and proteome of long-chain alkane degrading emGeobacillus thermodenitrificans/em 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>

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

FUKUSHIMA, K., J. L. FEIJOO a M. C. YANG. Comparison of abiotic and biotic degradation of PDLLA, PCL and partially miscible PDLLA/PCL blend. *European Polymer Journal*. Mar, **49**(3), 706-717. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.011. ISSN 0014-3057. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000316515100012

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

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 A. C. ALBERTSSON. Degradation products of aliphatic and aliphatic-aromatic polyesters. *Chromatography for Sustainable Polymeric Materials: Renewable, Degradable and Recyclable*. 2008, **211**, 85-116. DOI: 10.1007/12_2007_128. ISSN 0065-3195. Dostupné také z: Go to ISI://WOS:000257692200004

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

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

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

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

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

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

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

STANGROOM, S. J., J. N. LESTER a C. D. COLLINS. Abiotic behaviour of organic micropollutants in soils and the aquatic environment. A review: I. Partitioning: I. Partitioning. *Environmental Technology*. Univ London Imperial Coll Sci Technol & Med, TH Huxley Sch Environm Earth Sci & Engn, Environm Proc & Water Technol Grp, London SW7 2BU, England, Aug, **21**(8), 845-863. ISSN 0959-3330. Dostupné také z: Go to ISI://000089149000001

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, T., R. AURAS, M. RUBINO, M. NGOUAJIO a R. T. 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

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

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

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

LIU, Yiqian, Qing CHANG, Xu GUO a Xinxin YI. Bacterial diversity and community structure in lettuce soil are shifted by cultivation time. *AIP Conference Proceedings*. 2017/07/31, **1864**(1), 020094. DOI: 10.1063/1.4992911. ISSN 0094-243X. Dostupné také z: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4992911>

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

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

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

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

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

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 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. 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/>

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

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).

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/S0079670001000399>

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>

PEREIRA, Leticia, Renato VICENTINI a Laura M M OTTOBONI. *Changes in the Bacterial Community of Soil from a Neutral Mine Drainage Channel*. 2014, **9**, e96605. DOI: 10.1371/journal.pone.0096605.

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

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

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

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

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, B., & Sharma, N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, **93**(3), 561-584.

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

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

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).

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

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, 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

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/>

WITT, U., T. EINIG, M. YAMAMOTO, I. KLEEBERG, 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/0169743987800849>

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

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 POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Adenin
APS	Peroxodisíran amonný
BPEJ	Bonitovaná půdně ekologická jednotka
BTEX	Benzen, toluen, ethylbenzen, xylen
C	Cytosin
CFU	Colony forming units
C _{ox}	Oxidovatelný uhlík
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Dvouřetězcová DNA
G	Guanin
GC	Plynová chromatografie
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
M _w	Molekulová hmotnost
PBAT	Polybutylen adipát tereftalát
PBA	Polybutylenadipát
PBS	Polybutylen sukcinát
PBSA	Polybutylen sukcinát adipát
PBT	Polybutylen
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální RNA
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie
SOM	Půdní organická hmota
ssDNA	Jednořetězcová DNA
T	Thymin
TCD	Tepelně vodivostní detektor
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TOC	Celkový organický uhlík
TPS	Termoplastický škrob
TYA	Tryptone yeast extract agar
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
UV	Ultrafialové záření

9. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tabulka 4.1: Vybrané fyzikálně chemické charakteristiky testovaných půd.....	16
Tabulka 4.2: Stanovení celkových počtů hlavních skupin mikroorganismů v půdě.....	16
Tabulka 4.3: Shrnutí hydrolytické degradace při třech různých teplotách.....	22
Obrázek 4.1: Mineralizace čistého Ecoflexu a Ecoflexu plněného škrobem v hnědozemi, černozemi a fluvizemi při 25 °C.....	17
Obrázek 4.2: Fotografie lopatek vyražených z filmu kopolyesteru se škrobem.	18
Obrázek 4.3: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem, barveno Lugolovým roztokem.....	18
Obrázek 4.4: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem, barveno safraninem.....	19
Obrázek 4.5: Fotografie filmů PBAT ve směsi se škrobem získané pomocí SEM.....	20
Obrázek 4.6: Změna distribučních křivek molekulových hmotností v kopolyesteru se škrobem během inkubace v hnědozemi při 25 °C.....	21
Obrázek 4.7: Hydrolytická degradace PBAT.....	23
Obrázek 4.8: A-určení degradérů kopolyesteru pomocí metody prosvětlených zón; B-kultura konsorcia degradérů na tuhém živném médiu se suspenzí PBAT.....	24
Obrázek 4.9 A; B.: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia degradérů PBAT.....	26
Obrázek 4.10: Fotografie polyakrylamidového gelu po DGGE analýze konsorcia izolovaného z lokality kontaminované BTEX.....	28

2. ODBORNÝ ŽIVOTOPIS

Osobní údaje:

Jméno a příjmení Jana Šerá
Titul Ing., Ph.D.
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

10. 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.

Ing. Jana Šerá, Ph.D.

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

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

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: autor

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2018

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7454-790-4

