

Disertační práce

# **Mikrobiální odstraňování syntetických polymerů z odpadních vod**

**Microbial removal of synthetic polymers from wastewater**

Autor: **Ing. Hana Dostálková (roz. Marušincová)**  
Studijní program: P2808 Chemie a technologie materiálů  
Studijní obor: 2808V006 Technologie makromolekulárních látek  
Školitel: doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Zlín, březen 2017

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně v edici Doctoral Thesis Summary.  
Publikace byla vydána v roce 2017.

Klíčová slova: Polyvinylalkohol (PVA), denitrifikace, biodegradace, dusičnany, bakterie

Key words: Poly(vinyl alcohol), denitrification, biodegradation, nitrates, bacteria

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

ISBN 978-80-.....

*Motto:*

„Nikdy nerezignuj na to, co chceš opravdu dělat. Člověk s velkými sny je mocnější než ten se všemi fakty.“ (Albert Einstein)

*Poděkování:*

Touto cestou bych velice ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, čas, který mi věnoval v průběhu práce a za umožnění studia při zaměstnání.

Z celého svého srdce také děkuji svým rodičům, za jejich trpělivost, energii a motivaci, dále také své rodině a přátelům za jejich podporu během studia a cenné rady.

## **ABSTRAKT**

Předložená disertační práce byla zaměřena na zhodnocení biologické rozložitelnosti polyvinylalkoholu (PVA) za aerobních, anaerobních a zejména denitrifikačních podmínek, a to s využitím čistírenských mikrobiálních kultur. Denitrifikační podmínky byly zabezpečeny odstraněním kyslíku z degradačních suspenzí a přidavkem dusičnanů, které sloužily přítomným mikroorganismům jako akceptory elektronů při anaerobní respiraci. Studium biodegradace PVA za uvedených podmínek bylo zvoleno z důvodu zcela nedostatečného prozkoumání této oblasti.

Disertační práce se zabývala studiem kinetiky mikrobiální degradace PVA za denitrifikačních podmínek, která byla porovnána s rychlostí biologického rozkladu za anaerobních i aerobních podmínek. Biodegradace polyvinylalkoholu byla hodnocena na základě úbytku jeho koncentrace v průběhu pokusů, dále byly sledovány změny v koncentraci dusičnanů a také hodnoty redox potenciálů kalových suspenzí.

Součástí disertační práce byl i podrobný výzkum směřující k poznání klíčových mikroorganismů v mikrobiálním společenstvu rozkládající polyvinylalkohol za denitrifikačních podmínek a řada experimentů byla věnována možnostem izolace degradačních bakterií.

## **ABSTRACT**

This doctoral thesis was focused on the evaluation of the polyvinyl alcohol (PVA) biodegradation under aerobic, anaerobic and especially denitrifying conditions, with the use of sludge inoculums originated from the common wastewater treatment plant. Denitrifying conditions were ensured by an oxygen absence and by nitrates addition at the beginning of the tests; the nitrates served as electron acceptors for anoxic respiration of present microorganisms. The main reason for this doctoral study was very poor scientific knowledge concerning PVA biodegradation under denitrifying conditions. Biodegradation kinetic under denitrifying conditions was compared with the processes proceeding under aerobic and anaerobic conditions.

The degree of PVA biodegradation in the tests was evaluated by the direct spectrophotometric measurement of PVA concentration, determination of dissolved organic carbon and changes in nitrate ions concentration. The values of redox potentials were checked in all the tests.

The important part of the doctoral thesis was focused on the observation of composition of the microbial community degrading polyvinyl alcohol under denitrifying conditions and on the many attempts to isolation of key bacterial degrader.

# OBSAH

<b>1. SEZNAM ILUSTRACÍ.....</b>	<b>8</b>
<b>2. SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>9</b>
<b>3. SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....</b>	<b>10</b>
<b>4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>11</b>
4.1 Biodegradace plastů.....	11
4.1.1 <i>Procesy biologické degradace</i> .....	12
4.1.2 <i>Aerobní rozklad</i> .....	13
4.1.3 <i>Anaerobní rozklad</i> .....	13
4.2 Denitrifikace .....	14
4.3 Polyvinylalkohol (PVA) .....	18
4.3.1 <i>Popis a výroba</i> .....	18
4.3.2 <i>Využití</i> .....	19
4.3.3 <i>Mechanismus biodegradace PVA</i> .....	19
<b>5. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>6. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ.....</b>	<b>26</b>
6.1 Stanovení sušiny inokula .....	26
6.2 Potenciometrické metody .....	26
6.2.1 <i>Stanovení obsahu dusičnanů</i> .....	26
6.2.2 <i>Stanovení redox potenciálu</i> .....	27
6.2.3 <i>Stanovení pH</i> .....	28
6.3 Spektrofotometrická metoda stanovení koncentrace PVA.....	28
6.3.1 <i>Příprava roztoku jodu s jodidem draselným</i> .....	29
6.3.2 <i>Příprava zásobního roztoku kyseliny borité</i> .....	29
6.4 Stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC) .....	29
6.5 PCR a TGGE metody .....	29
6.6 Gramovo barvení .....	30
6.6.1 <i>Příprava Lugolova roztoku dle Utermöhl</i> .....	30
6.6.2 <i>Příprava roztoku krystalové violeti</i> .....	31
6.6.3 <i>Příprava roztoku karbofuchsinu</i> .....	31
6.7 Mikrobiální degradace PVA v kalu za různých podmínek .....	31
6.8 Isolace mikroorganismů využívající PVA.....	32
<b>7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>34</b>
7.1 Použité chemikálie.....	34
7.2 Příprava minerálních médií a roztoků .....	34
7.2.1 <i>Základní minerální médium (MM1)</i> .....	34
7.2.2 <i>Minerální médium s přísadkou <math>\text{NO}_3^-</math> (MM2)</i> .....	35
7.2.3 <i>Minerální médium s přísadkou PVA a <math>\text{NO}_3^-</math> (MM3)</i> .....	35
7.2.4 <i>Zásobní roztok pyrrolochinolochinonu (PQQ)</i> .....	35
7.2.5 <i>Minerální médium s přísadkou PVA, <math>\text{KNO}_3</math> a PQQ (MM4)</i> .....	36

7.2.6 Minerální médium s přísávkem PVA, KNO <sub>3</sub> a vitamíny (MM5) .....	36
7.2.7 Inokulum s přísávkem MM1/ MM2/ MM3 .....	36
7.2.8 Fysiologický roztok (FR) .....	36
7.2.9 Živné médium s kvasničným autolyzátem, jantaranem sodným a etanolem (ŽM) .....	36
7.3 Příprava ztužených živných půd .....	36
7.4 Biologický materiál .....	38
7.5 Použité přístrojové vybavení .....	39
<b>8. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>40</b>
8.1 Hodnocení mikrobiální degradace PVA v kalu za denitrifikačních podmínek .....	40
8.1.1 První experiment .....	40
8.1.2 Druhý experiment .....	44
8.1.3 Třetí experiment .....	47
8.1.4 Vliv dusičnanů na mikrobiální degradaci PVA za aerobních podmínek .....	51
8.1.5 Kinetika mikrobiální degradace PVA s různou koncentrací adaptovaného kalu .....	52
8.1.6 Vliv koncentrace PVA na jeho mikrobiální rozklad .....	54
8.2 Studium bakterií degradujících PVA za denitrifikačních podmínek a pokusy o jejich izolaci .....	55
8.2.1 Prvotní pokus izolace degradačních bakterií .....	56
8.2.2 Isolace kultur na živných půdách ŽP 4, ŽP 5 a ŽP 6 .....	57
8.2.3 Nekultivační metody .....	60
8.2.4 Pokusy izolací na živných agaroch s přísávkem kalové suspenze .....	64
8.2.5 Získání nevyvločkových konsorcií .....	64
8.2.6 Isolace kultur na živných půdách s gellanem a při prodloužené kultivaci .....	68
8.2.7 Kultivace na živných půdách při extrémně prodloužené kultivaci .....	70
8.2.8 Diskuse k rodu <i>Steroidobacter</i> .....	72
<b>9. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI .....</b>	<b>74</b>
<b>10. ZÁVĚR .....</b>	<b>75</b>
<b>11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>76</b>
<b>12. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA .....</b>	<b>84</b>
<b>13. CURRICULUM VITEA .....</b>	<b>85</b>

# 1. SEZNAM ILUSTRACÍ

<i>Obr. 4.1</i>	<i>Proces aerobní degradace [5].</i>	13
<i>Obr. 4.2</i>	<i>Proces anaerobní degradace.</i>	14
<i>Obr. 4.3</i>	<i>Částečně hydrolyzovaný PVA [35].</i>	18
<i>Obr. 4.4</i>	<i>Úplně hydrolyzovaný PVA [35].</i>	18
<i>Obr. 4.5</i>	<i>Schéma mikrobiální degradace PVA za aerobních podmínek.</i>	20
<i>Obr. 4.6</i>	<i>Mechanismus mikrobiální degradace PVA [7, 42].</i>	21
<i>Obr. 6.1</i>	<i>Příklad kalibrační závislosti <math>EMS = f(\log c_{NO_3^-})</math>.</i>	27
<i>Obr. 6.2</i>	<i>Kalibrační křivka pro výpočet koncentrace PVA.</i>	28
<i>Obr. 8.1</i>	<i>Průběh koncentrace PVA za denitrifikačních podmínek – 1. experiment.</i>	41
<i>Obr. 8.2</i>	<i>Průběh koncentrací <math>NO_3^-</math> v 1. experimentu.</i>	42
<i>Obr. 8.3</i>	<i>Průběh koncentrací DOC v 1. experimentu.</i>	42
<i>Obr. 8.4</i>	<i>Průběh pH v 1. experimentu.</i>	43
<i>Obr. 8.5</i>	<i>Průběh koncentrací PVA v 2. experimentu.</i>	45
<i>Obr. 8.6</i>	<i>Průběh koncentrací DOC v 2. experimentu.</i>	46
<i>Obr. 8.7</i>	<i>Závislost pH na čase v 2. experimentu.</i>	46
<i>Obr. 8.8</i>	<i>Průběh koncentrací PVA v 3. experimentu.</i>	49
<i>Obr. 8.9</i>	<i>Průběh koncentrací DOC u vzorků v 3. experimentu.</i>	49
<i>Obr. 8.10</i>	<i>Průběh koncentrací <math>NO_3^-</math> v 3. experimentu.</i>	50
<i>Obr. 8.11</i>	<i>Závislost mikrobiální degradace PVA na koncentraci dusičnanových iontů.</i>	52
<i>Obr. 8.12</i>	<i>Kinetika degradace PVA v ředěném adaptovaném kalu.</i>	53
<i>Obr. 8.13</i>	<i>Mikrobiální degradace PVA v koncentracích 100, 500 a 1000 mg l<sup>-1</sup>.</i>	54
<i>Obr. 8.14</i>	<i>Pomnožovací cykly [18].</i>	59
<i>Obr. 8.15</i>	<i>Záznam z elektroforetické separace amplikonů pomocí TGGE (dny odběru, B, D – konsorcia dle textu výše, M = marker).</i>	61
<i>Obr. 8.16</i>	<i>TGGE záznam konsorcií „B“ a „Z“.</i>	63
<i>Obr. 8.17</i>	<i>Průběh rozkladu PVA konsorcii KO1 a KO2 za denitrifikačních podmínek.</i>	68



## 2. SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 4.1</b> Přehled mikroorganismů degradujících PVA [47].....	22
<b>Tab. 7.1</b> Přehled složení ztužených živných půd ŽP 1 – ŽP 5. ....	37
<b>Tab. 7.2</b> Přehled složení ztužených živných půd ŽP 6 – ŽP 11. ....	37
<b>Tab. 7.3</b> Přehled složení ztužených živných půd ŽP 12 – ŽP 14. ....	38
<b>Tab. 8.1</b> Konečné koncentrace PVA po provedení II. pomnožovacího cyklu (výchozí koncentrace 150 mg.l <sup>-1</sup> ).....	58
<b>Tab. 8.2</b> Konečné koncentrace PVA po provedení posledních pomnožovacích cyklů (výchozí koncentrace 200 mg.l <sup>-1</sup> ).....	59
<b>Tab. 8.3</b> Podíl rodu <i>Steroidobacter</i> v celkovém zastoupení bakterií kalu v průběhu denitrifikační degradace PVA .....	64
<b>Tab. 8.4</b> Koncentrace PVA v průběhu degradace zředěnými desintegrovanými suspenzemi (výchozí koncentrace 280,9 mg.l <sup>-1</sup> ) .....	65
<b>Tab. 8.5</b> Koncentrace PVA po degradaci v tekutém médiu získanými kulturami a konsorcií (výchozí koncentrace 280 mg.l <sup>-1</sup> ) .....	67
<b>Tab. 8.6</b> Konečné koncentrace PVA při degradačním testu (6. týden degradace; výchozí koncentrace PVA 284.7 mg.l <sup>-1</sup> ) .....	69
<b>Tab. 8.7</b> Rodová identifikace získaných kultur a koncentrace PVA v degradačních zkouškách, kultury Z1 – Z4 (výchozí koncentrace PVA 276.7 mg.l <sup>-1</sup> ) .....	70

### 3. SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ČOV	Čistička odpadních vod
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
EMN	Elektromotorické (rovnovážné) napětí
EMS	Elektromotorické napětí (síla)
FR	Fyziologický roztok
IC	Anorganický uhlík
IČ	Infračervené záření
kol.	kolektiv
MA	Minerální agar
MALDI MSI	Zobrazovací hmotnostní spektrometrie
MM	Minerální médium
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Dusičnanové ionty
PCL	Poly-ε-kaprolakton
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PEG	Polyetylenglykol
PHA	Polyhydroxyalkanoát(y)
PHB	Polyhydroxybutyrát
PHBV	Ko-poly-3-hydroxybutyrát-valerát
PLA	Polymléčná kyselina
PQQ	Pyrolochinolinchinon
PVA	Polyvinylalkohol
POVAL 205	Polyvinylalkohol se stupněm hydrolyzy 88 % (obchodní název)
PVA-DH	Polyvinylalkohol dehydrogenasa
RNA	Ribonukleová kyselina
RPM	Počet otáček za minutu
TC	Celkový uhlík
TGGE	Gelová elektroforéza v teplotním gradientu
TOC	Celkový organický uhlík
TYA agar	Tryptonový agar s kvasničným autolyzátem
UV	Ultrafialové záření
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
ŽM	Živné médium
ŽP	Živná půda

## 4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 4.1 Biodegradace plastů

Statistika udává, že světová produkce plastů se od roku 1950 do roku 2013 vyšplhala ze 1,5 milionu tun na 299 milionů tun vyprodukovaných plastů ročně, přičemž roční produkce plastů v Evropě se v roce 2013 pohybovala na 57 milionech tun. Největším světovým producentem plastů je udávána Čína [1, 2]. Syntetické plasty se po svém použití stávají odpady, jejichž většina je akumulována v ekosystémech a způsobují tak znečištění životního prostředí, a to ve velkém rozsahu. Celosvětový problém přiměl vědeckou i politickou komunitu k hledání možností, které by vedly k snižování množství plastových odpadů. Jednou z cest těchto hledání je i poznávání biodegradability stávajících syntetických polymerních sloučenin za různých podmínek vnějšího prostředí.

Biodegradabilní polymery lze obecně dělit na přírodní a syntetické [3]. Syntetické polymery mají díky svým vlastnostem velmi široké využití v různých odvětvích (například ve stavebnictví, v potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém průmyslu a další), včetně domácností. Jejich rezistence vůči mikrobiální degradaci, díky níž se akumulují v ekosystémech, však představuje vážnou hrozbu pro životní prostředí.

Na počátku 20. století bylo zahájeno zkoumání možností biodegradace nejen syntetických, ale také přírodních polymerů a jejich kombinací, a to za použití určitých druhů mikroorganismů či izolovaných enzymů [3, 4]. Cílená mikrobiální degradace syntetických polymerů tak představuje jednu z cest výzkumu, vedoucí k redukci množství odpadů z těchto materiálů, a také dopadů na životní prostředí [4]. Proces biodegradace je obecně závislý na vlastnostech polymeru, typech mikroorganismů a také na podmínkách okolního prostředí [5].

Vzhledem k velikosti objemu výroby plastů a se zvyšujícími se požadavky na ochranu prostředí bylo na přelomu tohoto tisíciletí uvedeno na trh několik druhů biodegradabilních plastů, vyrobených ze surovin z obnovitelných zdrojů. Příkladem mohou být kombinace syntetických polymerů s materiály na bázi škrobu, derivátů celulózy nebo s polymery produkovanými mikroorganismy, jako je především poly- $\beta$ -hydroxymáselná kyselina (PHB) [6]. Tyto materiály se však nenesetkaly s velkým rozšířením na trhu [4, 7]. Tento problém je spojen se strukturou těchto biodegradabilních polymerů, která ovlivňuje jejich chemické, fyzikální a mechanické vlastnosti [8, 9], a tak tyto materiály obvykle nevykazují stejné zpracovatelské ani užitné vlastnosti jako dnes nejpoužívanější syntetické materiály. Rozšíření a širší aplikaci biologicky rozložitelných plastů nenapomáhá

ani jejich výrazně vyšší cena. Dnes se proto jen v určité míře používají k výrobě běžného spotřebního zboží s krátkou životností nebo jsou součástí výrobků na jednorázové použití. Proto je zapotřebí se i nadále věnovat výzkumu možností mikrobiálních degradací těch syntetických polymerů, které určitou tendenci k biodegradaci vykazují, abychom jejich chování a osud ve vnějším prostředí znali velmi podrobně a zhodnotili tak co nejlépe jejich potenciální dopad na životní prostředí.

#### **4.1.1 Procesy biologické degradace**

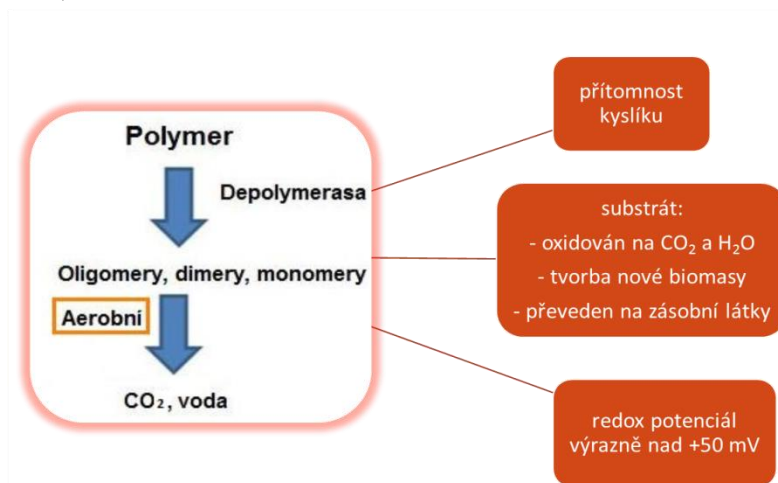
Biologická degradace je typ degradace, která vyžaduje biologickou aktivitu. Biodegradace polymerů je proces, při kterém dochází k rozkladu vysokomolekulárních látek obvykle působením mikroorganismů. Přírodní polymery (např. proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny) jsou po chemické stránce v biologických systémech degradovány především procesy hydrolýzy a oxidace [7]. Biodegradace může probíhat za aerobních (za přístupu kyslíku) nebo anaerobních podmínek (bezkyslíkaté prostředí). Během aerobní biodegradace je obvykle produkován oxid uhličitý, voda a biomasa. Pokud dochází k rozkladu anaerobnímu, je uvolňován oxid uhličitý, voda a především metan a je produkováno menší množství biomasy. Kinetika biologického rozkladu je ovlivňována celou řadou faktorů, které zahrnují zejména charakteristické rysy polymeru (například jeho molekulovou hmotnost, délku a rozvětvení řetězců, obsah krystalické fáze, přítomnost heteroatomů a vícenásobných vazeb, stupeň zesíťování polymeru, typ reaktivních skupin a substituentů ve struktuře polymeru, typ změkčovadla, přísad a jiné), dále druhové zastoupení přítomných mikroorganismů, charakter prostředí (teplota, pH, oxidačně redukční potenciál, dostupnost živin) a také druh předběžného zpracování [10, 11].

Proces biodegradace probíhá u biodegradabilních polymerů v několika krocích. V prvním stupni bývá polymer zpravidla zkracován na menší fragmenty nebo depolymerován (případně až na monomery), vzniklé produkty jsou poté buňkami přijímány a většinou v cytoplasmě mineralizovány. Čím je molekulová hmotnost polymeru vyšší, tím je obvykle biologický rozklad složitější, což vede k poklesu rychlosti a míry biodegradace [5]. Na úvodních fázích rozkladu biodegradabilních polymerů se často podílí enzymy zvané depolymerasy, které rozkládají vysokomolekulární řetězce na krátké fragmenty, které mohou být transportovány přes semipermeabilní membránu bakterií a mohou pak být případně asimilovány v cytoplasmě a využity jako zdroj energie a uhlíku [12]. Je popsána řada typů depolymeras, např. PHA-depolymerasa, PHB-depolymerasa, poly(3-

hydroxyvalerat) depolymerasa, a další [13]. V některých případech je rozklad polymeru zahajován jinými enzymy, jako jsou např. dehydrogenasy (PEG-dehydrogenasa, PVA-dehydrogenasa aj.) nebo také lipasy (např. PLA-lipasa, PCL-lipasa), a jiné [14].

#### 4.1.2 Aerobní rozklad

Aerobní rozklad je biologický proces rozkladu organických látek za přítomnosti kyslíku. Aerobní mikroorganismy využívají organické látky jako zdroj energie a uhlíku, čímž je umožněn jejich růst a tvorba nových buněk. Substrát je proto zčásti oxidován na oxid uhličitý a vodu a zčásti je využit k tvorbě nové biomasy; případně může být částečně převeden na zásobní látky. Charakteristická hodnota redox potenciálu je pro aerobní procesy výrazně nad +50 mV (Obr. 4.1).



Obr. 4.1 Proces aerobní degradace [5].

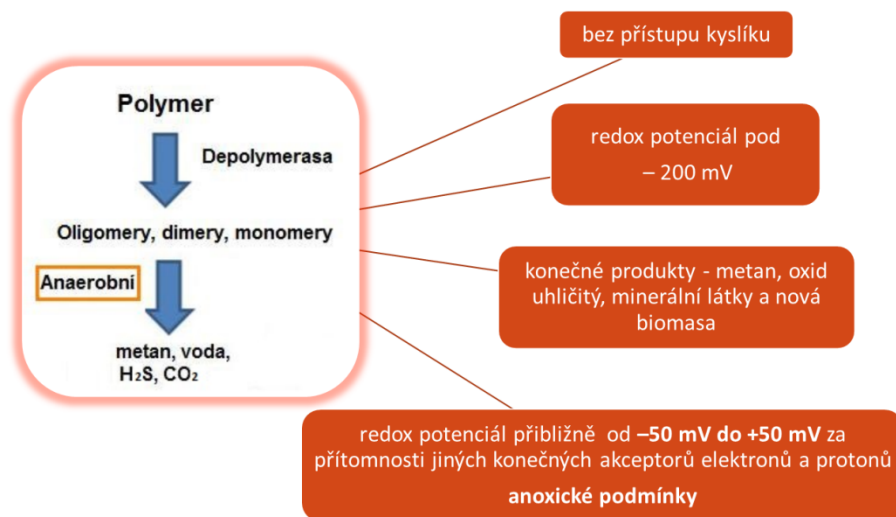
Díky diversitě aerobních mikroorganismů a jejich enzymovému vybavení probíhá nejvíce kompletních biodegradací většiny organických látek právě za aerobních podmínek [10].

#### 4.1.3 Anaerobní rozklad

Anaerobní rozklad je biologický proces rozkladu organických látek bez přístupu kyslíku, na kterém se podílí řada skupin anaerobních mikroorganismů. Probíhá přirozeně v přírodě, zejména v sedimentech na dně jezer, řek, v močálech, v hlubších vrstvách půd a skládek komunálního odpadu, ale také v trávicím traktu živočichů, v čistírnách odpadních vod (zejména při zpracování kalů) a samozřejmě v cíleně vytvořených bioplynových stanicích. Potřebná hodnota redox potenciálu pro anaerobní rozklad leží pod -200 mV. Konečnými

produkty anaerobního rozkladu jsou metan, oxid uhličitý, minerální látky a nová biomasa (Obr. 4.2) [10].

V případě, že rozklad probíhá v rozmezí hodnot redox potenciálů přibližně od  $-50$  mV do  $+50$  mV a určité druhy mikroorganismů jsou schopny respirace za přítomnosti jiných akceptorů elektronů a protonů, než je kyslík (jako jsou například dusičnany, dusitany, siřičitany, sírany a některé jiné), je někdy tento děj označován za anoxický. Metan v takových případech obvykle nevzniká.



*Obr. 4.2 Proces anaerobní degradace.*

## 4.2 Denitrifikace

Termín „denitrifikace“ byl poprvé použit v roce 1886 ve Francii a popisuje využití dusičnanů bakteriemi při degradaci organických substrátů. Proces denitrifikace je důležitou součástí biologického cyklu dusíku. Ten patří mezi makrobiogenní prvky, a je součástí stavebních kamenů obou biopolymerů klíčových pro pozemský život - proteinů a nukleových kyselin [15].

Proces denitrifikace probíhá jak v půdách a sedimentech, tak i v podzemních vodách a v hlubších vrstvách povrchových vod, včetně mořských. Během tohoto procesu dochází k odstraňování dusičnanů a dusitanů redukcí, pomocí mikrobiálních kultur v anoxickém prostředí. Při účasti směsných kultur jsou plynnými produkty především dusík (při  $\text{pH} > 7,3$ ) nebo oxid dusný (při  $\text{pH} < 7,3$ ) [16]. Denitrifikace je spolu s nitrifikací a amonizací klíčovou součástí procesu odstraňování dusíkatého znečištění z odpadních vod. Nitrifikace a denitrifikace mohou buď probíhat v oddělených nádržích, nebo může být denitrifikace s aerobní nitrifikací provozována společně, v jedné kalové suspenzi; protože však denitrifikace vyžaduje anoxické podmínky, musí být v takovém případě spotřebovávání kyslíku jistým způsobem zajištěno – například je kyslík dávkován

v nízké koncentraci a je spotřebováván na povrchu vloček, přičemž denitrifikace pak probíhá ve vnitřních částech vloček.

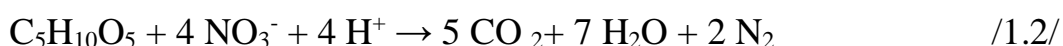
Optimální hodnota pH pro denitrifikaci je 7,0 – 7,5, avšak s průběhem denitrifikace pH výrazně vzrůstá. Se zvyšující se teplotou se proces denitrifikace obvykle zrychluje a se snižující se teplotou dochází ke zpomalování. Pokud má odpadní voda teplotu nižší než 5°C, proces denitrifikace je značně zpomalen [17].

Při denitrifikaci v odpadních vodách jsou za anoxických podmínek dusičnanové i dusitanové ionty využity denitrifikačními bakteriemi k dýchání, což jim umožňuje získávat energii oxidačním rozkladem organických látek [18]. Tyto bakterie jsou však zpravidla fakultativně anaerobní, a tedy kromě dusičnanů a dusitanů mohou pro dýchání využívat volný molekulový kyslík. Pokud je tedy v systému volný molekulový kyslík dostupný, bakterie jej preferují a využívají jej k aerobní respiraci, čímž zrychlují svůj růst a množení. Pokud je tak koncentrace rozpuštěného kyslíku vyšší než 1,0 mg.l<sup>-1</sup>, denitrifikace je obvykle inhibována [17].

Jak již bylo uvedeno výše, bakteriální degradace organických sloučenin probíhá v buňkách respirujících bakterií anaerobně nebo aerobně. Aerobní respiraci lze za přítomnosti kyslíku a glukosy vyjádřit sumární rovnicí /1.1/ [17]:



Anaerobní respiraci, s využitím dusičnanových iontů, je možné vyjádřit rovnicí /1.2/ [17]:



Vzniklý dusík, případně oxid dusný, uvolňují denitrifikační mikroorganismy do prostředí. Využití dusičnanů (či dusitanů) k získávání energie je při rozkladu organických látek někdy označováno za disimilační utilizaci. Jiným procesem je asimilační utilizace, při které určité mikroorganismy využívají dusičnany jako zdroj dusíku pro svou vlastní biosyntézu, a při níž jsou tyto ionty rovněž redukovány a dusík je ponejvíce v podobě aminoskupin zabudováván do biomasy [18, 19].

Denitrifikační bakterie se obvykle nacházejí v půdním a ve vodném prostředí, významně se vyskytují i v odpadních vodách. Nejznámější denitrifikační bakterie jsou zástupci rodů *Pseudomonas* a *Paracoccus*, např. *Ps. stutzeri*, *Ps. aeruginosa*, *Paracoccus denitrificans*, a dále pak řada druhů jak gramnegativních, tak i

grampozitivních bakterií [20]; tyto druhy obvykle využívají dusičnany i dusitany jako akceptory elektronů při anaerobní respiraci. Poněkud odlišný je v tomto směru například rod *Alcaligenes*, který využívá pouze dusičnanové ionty [21]. Počet popsáných rodů a druhů denitrifikačních bakterií neustále roste.

Studium a izolace denitrifikačních bakterií nabývá stále na významu, zejména ve smyslu poznávání jejich degradačních schopností, jak vůči polymerům, tak i vůči dalším syntetickým látkám a polutantům. Například Khan a Hiraishi zjistili, že kmen *Acidovorax* sp. je schopný degradace poly-3-hydroxybutyrátu (PHB) a kopolymeru poly-3-hydroxybutyrátu-ko-valerátu (PHBV) za aerobních i denitrifikačních podmínek [22].

Shinoda a kol. [23] isolovali z anaerobního kalu z čistírny odpadních vod denitrifikační bakterii, pracovně označenou jako DNT-1, která byla později identifikována jako zástupce rodu *Thauera*, která rozkládala za denitrifikačních podmínek toluen [23].

Heylen a kol. [24] realizovali rozsáhlou práci, která se zabývala rozmanitostí denitrifikačních bakterií v aktivovaném kalu z městských čistíren odpadních vod, a také zkoumali nejvhodnější složení isolačních živných médií. Výsledky ukázaly, že nejlepšími organickými substráty pro získávání denitrifikačních bakterií byly etanol a jantaran. V práci pak isolovali celkem 199 kultur různých denitrifikačních bakterií. Většina z nich patřila do kmene *Proteobacteria* [24].

Bonartseva a kol. [25] syntetizovali PHB pomocí bakterie *Azotobacter chroococcum*, a poté sledovali mikrobiální degradaci tohoto polymeru za aerobních, mikroaerobních a anaerobních podmínek, a to jak v přítomnosti dusičnanů, tak také bez nich. Byla použita směsná mikrobiální kalová kultura z denitrifikační nádrže a také z půdy a z kalového sedimentu. Nejrychlejší mikrobiální degradace PHB (3 – 7 dní) proběhla za bezkyslíkatých podmínek s přidavkem dusičnanů v kalové a půdní suspenzi [25].

Harder a Probian [26] ve své práci isolovali novou denitrifikační bakterii pracovně označenou 72 *Chol*, degradující cholesterol za anoxických podmínek. Cholesterol byl jediný donor elektronů a zdrojem uhlíku. Během anaerobního rozkladu byly dusičnany nejprve redukovány na dusitany a poté na plynný dusík, cholesterol byl mineralizován až na oxid uhličitý [26].

Další významná práce Kniemeyera a kol. [27] se zabývala anaerobní degradací dimethylmalonátu. K degradaci byla použita směsná mikrobiální kultura získaná z kalu čistírny odpadních vod a dále ze sedimentu sladkovodního jezera. Kultivace probíhala v temnu za anoxických podmínek s přidavkem dusičnanů. Degradace dimethylmalonátu mikrobiální kalovou kulturou proběhla během 16



dnů, kdy také došlo ke spotřebě dusičnanů, zatímco degradace mikroorganismy, získanými ze sedimentu sladkovodního jezera, probíhala pomaleji. Kniemeyer a kol. ve své práci isolovali pět druhů denitrifikačních bakterií, mineralizujících dimethylmalonát – dva zástupce rodu *Paracoccus* (blízké *Paracoccus denitrificans*), získané z kalové odpadní vody, a zbylé druhy patřící k zástupcům  $\beta$ -Proteobakterií (blízké *Herbaspirillum seropedicae* a *Acidovorax facilis*) [27].

Anaerobní degradace polyaromatických uhlovodíků (PAHs) byla také zkoumána za denitrifikačních podmínek. Ambrosoli a kol. [28] pro svou studii použili směsnou mikrobiální kulturu získanou z rýžového pole, z které bylo po úpravách vytvořeno inokulum, sloužící pro sledování degradace směsi PAHs (bifenyl, fenantren, fluoren a pyren), a to jak s přidavkem dusičnanů, tak také bez nich. K některým vzorkům byla také přidána glukosa nebo octan sodný. Všechny experimenty probíhaly za anaerobních podmínek v testovacím boxu, ve kterém byla atmosféra tvořena ze 70 % dusíkem, 10 % vodíkem a 20 % oxidem uhličitým. Výsledky ukázaly, že pokud byly při anaerobní degradaci PAHs přítomny i jiné zdroje uhlíku (tedy glukosa nebo octan sodný) a akceptory elektronů (dusičnany), docházelo k mikrobiální degradaci PAHs podstatně snadněji [28].

Chang a kol. [29, 30] dosáhli ve svých studiích podobných výsledků. S přidavkem nízkomolekulární látky jako dalšího zdroje uhlíku (kosubstrátu), probíhala degradace PAH mnohem lépe. Tyto kosubstráty pravděpodobně podporovaly růst některých mikroorganismů, významných pro vlastní degradaci [29, 30].

Rivas a kol. [31] sledovali degradaci povrchů tuhých polymerů ve vodném prostředí za aerobních a denitrifikačních podmínek. Pro degradaci polykaprolaktonu byla použita směsná mikrobiální kultura získaná z kalu čistírny odpadních vod. Po 7 dnech byly vzorky odebrány a sledován jejich povrch. Naměřená data pomocí zobrazovací techniky MALDI-TOF MS Imaging ukázala změny chemického složení povrchů materiálů, a to včetně významných změn povrchu polyesteru po jeho degradaci za denitrifikačních podmínek [31].

Paulo a kol. ve své studii isolovali dvě denitrifikační bakterie, jejichž substrátem byl dodecylsíran sodný [32]. Dodecylsíran sodný je povrchově aktivní látka, jenž je používána v detergentech [33]. Jako inokulum byl použit aktivovaný kal z čistírny odpadních vod, experimenty probíhaly při 30 °C přibližně 50 hodin. Degradace probíhala v anaerobním prostředí s přidavkem dusičnanů. Získané denitrifikační kultury SN1 a SN2 byly identifikovány na základě sekvencí

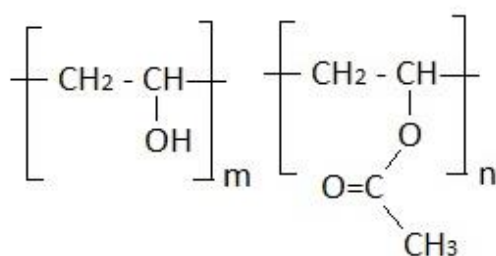
16S rDNA a ukázaly se být blízké příbuzné druhům rodu *Pseudomonas*, konkrétně SN1 *Pseudomonas stutzeri* a SN2 *Pseudomonas nitroreducens* [32].

### 4.3 Polyvinylalkohol (PVA)

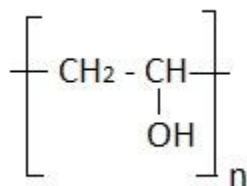
#### 4.3.1 Popis a výroba

Polyvinylalkohol (PVA) je transparentní, bílý nebo krémově zbarvený zrnitý prášek, který je bez chuti a zápachu, rozpustný v horké vodě a v polárních organických rozpouštědlech. Jeho rozpustnost v rozpouštědlech závisí na obsahu nehydrolyzovaných vinyl acetátových jednotek a na molekulární hmotnosti. Čím vyšší je molekulární hmotnost polymeru, tím hůře se rozpouští [34, 35].

Polyvinylalkohol byl poprvé připraven v roce 1924 hydrolyzou polyvinylacetátu v etanolu s hydroxidem draselným [34]. Monomer vinylalkoholu neexistuje [35], proto se polyvinylalkohol vyrábí polymerací vinylacetátu a jeho následnou hydrolyzou. Proces hydrolyzy je založený na (částečném) nahrazení postranního esteru vinylacetátu v přítomnosti vodného roztoku alkalicky reagujícího hydroxidu. PVA je vyráběn v několika formách, které se liší stupněm hydrolyzy – jedná se o částečně hydrolyzované (Obr. 4.3) a úplně hydrolyzované formy (Obr. 4.4). Přidavkem vodného činidla dochází k vysrážení PVA, který je následně vyprán a vysušen. Tento termoplastický polymer se používá v teplotním rozsahu od -50 °C do 130 °C, nad 200 °C se rozkládá. Bod tání polyvinylalkoholu se pohybuje v rozmezí teplot od 180 °C do 190 °C [34, 36].



**Obr. 4.3** Částečně hydrolyzovaný PVA [35].



**Obr. 4.4** Úplně hydrolyzovaný PVA [35].

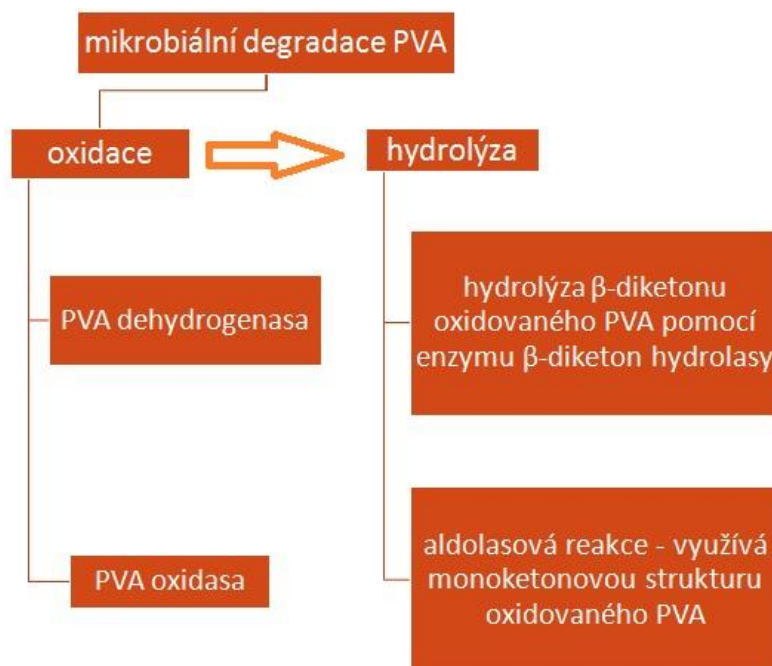
### 4.3.2 Využití

Vlastnosti PVA a jeho využití jsou závislé na jeho molekulární hmotnosti a také na obsahu zbytkových acetylových skupin [36]. PVA se vyznačuje výbornými fyzikálně chemickými vlastnostmi, jako jsou například viskozita, flexibilita, schopnost vytváření emulzí a filmů, a dále také pevností v tahu a přilnavostí [37]. Díky těmto vlastnostem má velmi široké využití v průmyslu. Používá se v potravinářském průmyslu, například při výrobě ovocného želé, ponejvíce však v chemickém průmyslu jako ochranný koloid pro suspenzní polymerace, jako zahušťovadlo do nátěrových hmot, k výrobě impregnačních hmot a lepidel (při výrobě lepidel se používá buď samostatně anebo společně s plnidly nebo modifikátory), dále se využívá ve stavebním průmyslu anebo ve formě hydrogelů pro biomedicínské účely [38, 39] a jiné. Dále také slouží k výrobě obalových materiálů, chirurgických nití, textilií, hadic, trubek, rukavic a řadě dalších výrobků [36, 40].

### 4.3.3 Mechanismus biodegradace PVA

Vzhledem k dobré rozpustnosti ve vodě se PVA může dostávat ve velké míře do různých vodních i půdních ekosystémů, včetně systémů čištění odpadních vod. Je produkován převážně z papírenského a textilního průmyslu, ale může být obsažen i v městských odpadních vodách, díky jeho přítomnosti ve výrobcích denní či občasné potřeby (potraviny, léky, kosmetika, obaly pro přípravky na WC apod.). Ačkoliv PVA není akutně toxický pro organismy, jeho přítomnost ve vodním prostředí může způsobit závažné ohrožení jak vodních organismů, tak také lidské populace [19]. Někteří autoři považují PVA v přírodním prostředí za obtížně degradovatelný a doporučují jeho odstraňování z odpadních vod ještě před jejich samotným vypouštěním do vodního recipientu [35].

Mechanismus mikrobiální degradace PVA je znám jen u aerobního rozkladu a tam probíhá ve dvou hlavních krocích (Obr. 4.5) - oxidací a následnou hydrolýzou [37].

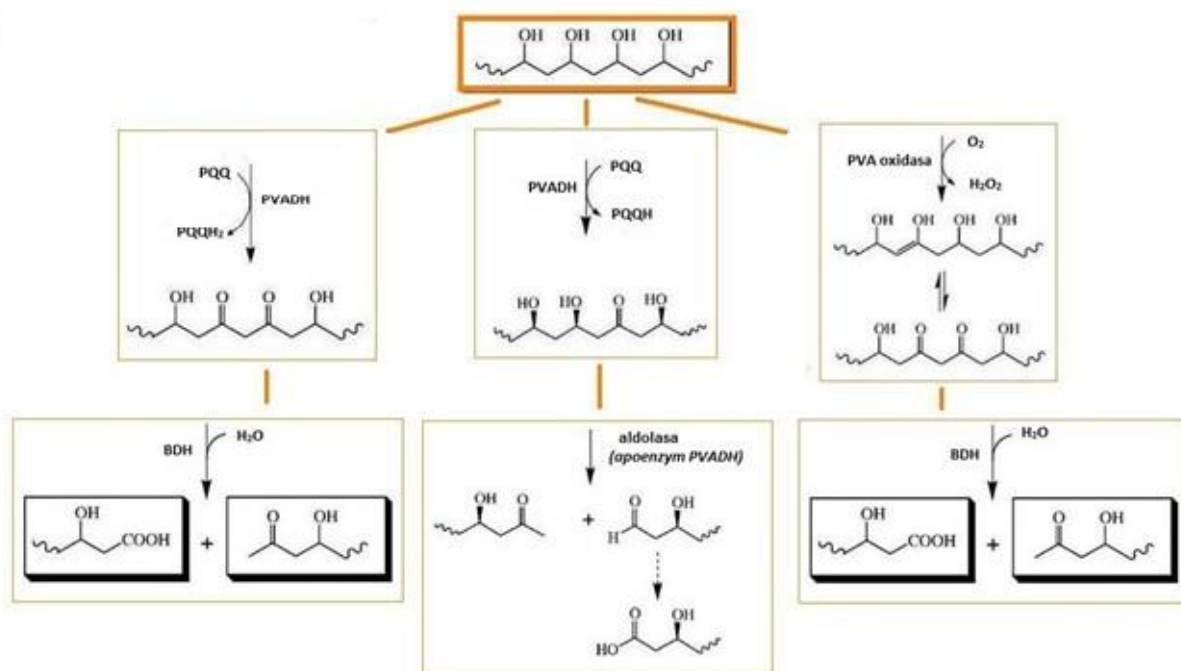


**Obr. 4.5** Schéma mikrobiální degradace PVA za aerobních podmínek.

První krok (oxidace) může probíhat dvěma způsoby – za katalýzy PVA dehydrogenasou (PVA-DH) nebo PVA oxidasou. První z nich spočívá v přeměně 1,3 - glykolové struktury dvou sousedních hydroxylových skupin, které jsou enzymově oxidovány na  $\beta$ -diketonovou strukturu pomocí náhodné dehydrogenace (Obr. 4.5). Tato reakce je katalyzována PVA-DH a dochází přitom k odejmutí vodíku (bez účasti kyslíku), který je navázán na koenzym pyrrolochinolochinon (PQQ). PQQ byl prokázán u řady PVA-dehydrogenas různých druhů bakterií. PVA-DH je účinná jako dehydrogenasa pouze v přítomnosti PQQ jako nutného kofaktoru dané biochemické reakce [41].

Jak znázorňuje také Obr. 4.6, druhý způsob oxidace PVA však může probíhat za účasti PVA oxidasy, která se řadí do skupiny oxidas sekundárních alkoholů [7, 42]. Tento enzym odnímá ze substrátu elektrony a přenáší je na kyslík, čímž vzniká peroxid vodíku. Může tak docházet k oxidaci i jen jedné hydroxylové skupiny, takže je vytvářena monoketonová struktura.

V druhém kroku degradace dochází k narušení vazby uhlík – uhlík a k přeměně jedné z ketonových skupin na karboxylovou skupinu. Podle výsledných produktů prvního kroku degradace PVA jsou v druhém kroku možné další dvě reakce. Jedna z možností je hydrolýza  $\beta$ -diketonu oxidovaného PVA pomocí  $\beta$ -diketon hydrolasy, při druhé dochází k aldolasové reakci, která využívá monoketonovou strukturu oxidovaného PVA [7, 42].



**Obr. 4.6** Mechanismus mikrobiální degradace PVA [7, 42].

V řadě prací byla sledována biodegradace jak čistého polymeru, tak také kombinace směsí PVA s různými přírodními polymery [42].

PVA je v aerobním prostředí biodegradabilní jen v přítomnosti určitých mikroorganismů; může to být jak adaptovaná směsná kultura, tak i čistě, zejména bakteriální, kultury [43]. Biodegradace PVA byla poprvé objevena v roce 1936, kdy byl popsán rozklad PVA fytopatogenní houbou *Fusarium lini* [7]. Další práce však také ukázaly, že pro účinné odstranění PVA z odpadních vod potřebují aerobní mikroorganismy delší čas inkubace, aby byly schopny dostatečného rozkladu [44]. Později bylo objeveno cca 55 druhů různých mikroorganismů (zahrnující bakterie, kvasinky a vláknité houby) se schopností podílet se na degradaci PVA [7].

První izolované mikroorganismy z půdního prostředí, které byly schopny asimilovat PVA, byly identifikovány jako druhy rodu *Pseudomonas* [44, 45]. Pozdější studie doložily, že degradace PVA jsou schopny smíšené symbiotické kultury i jednotlivé mikroorganismy dalších rodů [42], například aerobní zástupci rodů *Alcaligenes* [21] a *Bacillus* [46]. Většina doposud známých mikroorganismů degradujících PVA patří mezi gramnegativní bakterie [47], byly však také popsány i bakterie grampozitivní, jako například *Paenibacillus amylolyticus*, *Microbacterium barkeri* [48] a *Streptomyces venezuelae* [49]. Tabulka 4.1 uvádí přehled získaných bakteriálních kultur se schopností degradace PVA, které byly popsány od roku 1973 [47].

**Tab. 4.1** Přehled mikroorganismů degradujících PVA [47].

Název mikroorganismu	Kultivace	Reference
<i>Pseudomonas</i> O-3	Jediná kultura	Suzuki a kol., 1973
<i>Pseudomonas vesicularis</i> PD	Jediná kultura	Watanabe a kol., 1975
<i>Pseudomonas</i> sp. VM15C	Spolu s produkcí PQQ kulturou <i>Pseudomonas putida</i> VM15A	Sakazawa a kol., 1981
<i>Pseudomonas vesicularis</i> var. <i>povalolyticus</i> PH	Jediná kultura	Hashimoto a Fujita, 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. kmen A-41	Jediná kultura	Fukae a kol., 1994
<i>Pseudomonas</i> sp. 113P3 (reidentifikován jako <i>Sphingopyxis</i> sp.113P3)	Jediná kultura	Tokiwa a kol., 2001
<i>Sphingomonas</i> sp. SA3	Kultura spolu s růstovým faktorem kultury SA2	Kim a kol., 2003
<i>Sphingopyxis</i> sp. PVA3	Jediná kultura	Yamatsu a kol., 2006
<i>Alcaligenes</i> sp.	Ve směsné kultuře	Matsumura a kol., 2004
<i>Bacillus</i> sp.	Ve směsné kultuře	Kawai a kol., 2009
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Jediná kultura	Choi a kol., 2004
<i>Microbacterium barkeri</i>	Jediná kultura	Choi a kol., 2004
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Jediná kultura	Zhang a kol., 2006

Mikrobiální degradace PVA byla studována v různých podmínkách prostředí – v půdách a vodách, většinou za aerobních podmínek, kde bylo obvykle dosaženo kompletní biodegradace [50].

Studie Julinové a kol. [51] se zaměřila na biologický rozklad PVA ve vodném aerobním prostředí v aktivovaném kalu. Bylo zjištěno, že vlastnosti PVA, charakterizované viskozitou jeho 4% vodného roztoku a stupněm hydrolýzy, mají významný vliv na biologickou rozložitelnost PVA. S růstem těchto hodnot docházelo ke zhoršování biologické rozložitelnosti [51].

Zeman a Nedbálek [52, 53] zjistili, že mikrobiální degradace PVA v přítomnosti jiných látek, např. zvýšených koncentrací fosforečnanů, se zpomaluje. Václavková [54] ve svém pozorování degradace PVA použila mikrobiálně stejné kultury jako Nedbálek. Navíc prezentuje, že mikrobiální

degradace PVA těmito kulturami probíhala více jak 2 týdny [54]. Tyto studie ukazují, že mikrobiální degradace PVA může být vícedenní až několikátýdenní proces, z čehož vyplývá, že by PVA mohl v jisté míře projít čistírnou odpadních vod až do recipientu.

Dřímál a kol. [41] se zaměřili na sledování biodegradace PVA směsným mikrobiálním společenstvem z půdního výluhu. Byla potvrzena velmi omezená schopnost rozkladu PVA půdními mikroorganismy [41].

Biodegradace PVA za anaerobních podmínek byla doposud velmi málo prozkoumána [55]; jedna z významných prací je studie Matsumury a kol. [56], která jako první biodegradaci PVA za anaerobních podmínek testovala. Degradace byla sledována jak v upraveném aktivovaném kalu za anaerobních podmínek, tak i v anaerobním říčním sedimentu, a byl zkoumán rozklad dvou typů PVA, lišící se molekulovou hmotností (2 000 Da a 14 000 Da). Sledováním koncentrací TOC autoři zjistili, že nízkomolekulární PVA byl za anaerobních podmínek v říčním sedimentu téměř úplně rozložen po 125 dnech, zatímco biodegradace PVA s molekulovou hmotností 14 000 Da dosáhla za stejné období jen 60 %. Podstatně horší rozklad byl zaznamenán v anaerobně kultivovaném kalu, neboť tam biodegradace dosáhla po více než 150 dnech procesu cca 50 % [56].

Problematikou biodegradace PVA za anaerobních podmínek se zabývali i Pšeja a kol. [55]. Zjistili, že rozklad PVA v mesofilním anaerobním kalu dosáhl po 500 hodinách jen 6,5 %. Biologický rozklad však byl příznivě ovlivněn přidávkou polysacharidů, neboť se zvýšila míra biodegradace směsné folie PVA s polysacharidy; byl však současně zaznamenán pokles mechanických vlastností takové folie [55].

Gartiser a kol. [57] rovněž zjistili velmi nízkou úroveň biodegradace PVA v prostředí anaerobního čistírenského kalu, jimi nalezené hodnoty rozkladu PVA byly 0% a 12% za 77 dní [57].

Julinová a kol. [58] se zabývali sledováním vlivu potenciálních modifikátorů na rozklad PVA směsnou mikrobiální kulturou získanou z aktivovaného kalu. Výsledky ukázaly, že přidávek samotného PQQ nevedl ke zkrácení lagové fáze, po zahájení rozkladu PVA se však mírně zvýšila rychlost degradace i míra respirace mikroorganismů [58]. Další studie Julinové a kol. [59], stejně jako Pšeji a kol. [55], týkající se biodegradace PVA a jeho směsí s přípravky na bázi škrobu, potvrdila degradaci těchto směsí za aerobních i anaerobních podmínek. U zkoušek rozkladu PVA s přípravky xanthanu nebo gellanu (bakteriální polysacharidy) v anaerobním i v aktivovaném kalu a také v půdě byla biodegradace prokázána

Kopčilovou a kol., v anaerobním prostředí však docházelo jen k rozkladu jiných komponent než PVA [60].

Ze studií biodegradace PVA ve vodném prostředí tak celkově vyplývá, že čistý polymer je za určitých podmínek mikrobiálně kompletně rozložitelný za aerobních podmínek, podstatně hůře je rozkládán za podmínek anaerobních [56, 61]. V případě rozkladu PVA směsnými kulturami je významným faktorem degradace adaptace těchto kultur, to znamená jejich předcházející pomnožení na PVA jako substrátu. Biodegradace PVA za denitrifikačních podmínek nebyla doposud cíleně studována žádnou vědeckou prací a stala se tak hlavní náplní doktorské práce.



## 5. CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce bylo studium mikrobiální degradace polyvinylalkoholu ve vodách za denitrifikačních podmínek, s využitím směsných čistírenských kultur. Práce se zabývala kinetikou mikrobiálního rozkladu PVA za denitrifikačních podmínek, i určitým porovnáním míry degradace polymeru za denitrifikačních, aerobních a anaerobních podmínek.

Disertační práce se dále zaměřila na sledování vlivu koncentrace dusičnanů, přítomných ve vodném prostředí, i na posouzení vlivu adaptace směsné kultury na rozklad tohoto polymeru.

Významným cílem práce se stalo poznání klíčových mikroorganismů, podílejících se na degradaci PVA, pomocí nekultivačních metod, a značné úsilí bylo rovněž věnováno pokusům o jejich izolaci.

## 6. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

V této kapitole je uvedený souhrnný přehled metod včetně postupů, které byly použity pro zpracování získaných dat, uvedených v Kapitole 7.

### 6.1 Stanovení sušiny inokula

Pro stanovení sušiny kalu bylo po úpravě kalu (Kapitola 7.4) odebráno 10 ml suspenze tohoto kalu a vakuově zfiltrováno přes filtrační papír s červenou páskou, předem vysušený při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti a zvážený na analytických vahách. Filtrační papíry se vzorky byly ponechány v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti, poté vloženy do exsikátoru a po jejich ochlazení váženy. Stanovení bylo vždy provedeno triplicitně. Koncentrace sušiny kalu byla vyjadřována v g.l<sup>-1</sup>.

### 6.2 Potenciometrické metody

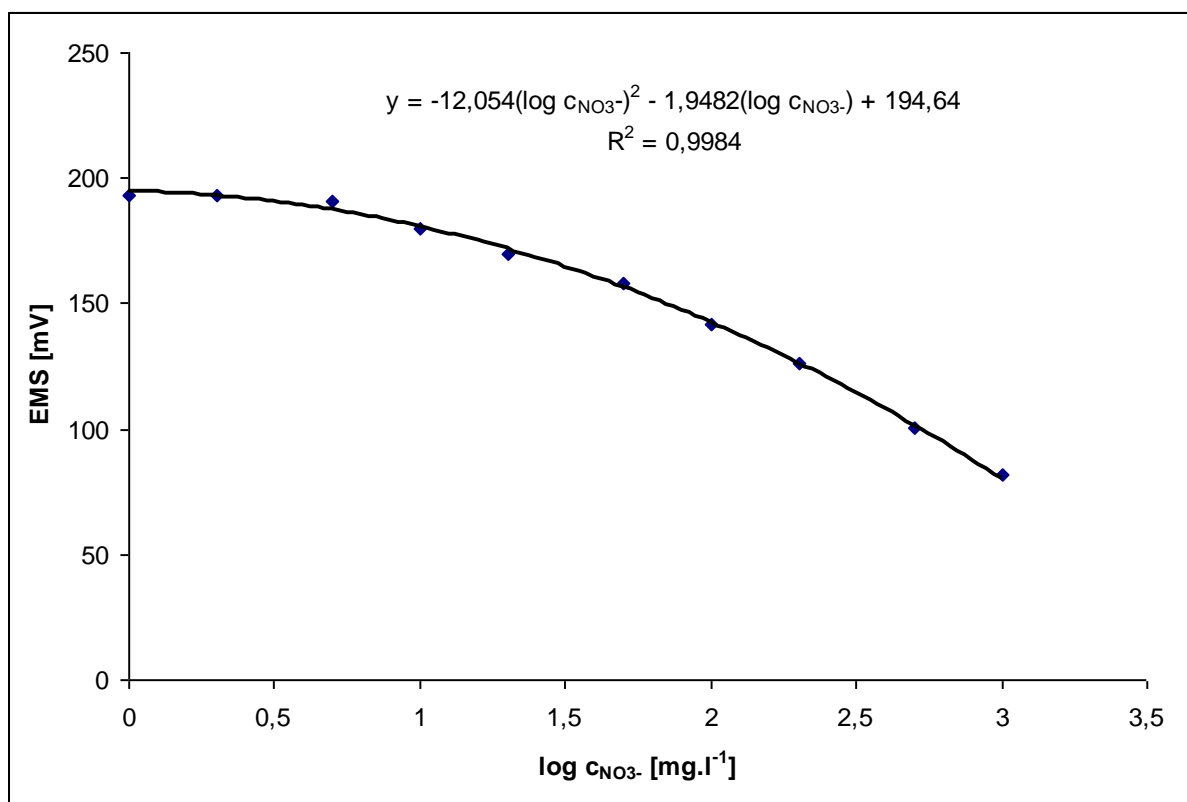
#### 6.2.1 Stanovení obsahu dusičnanů

Vodné roztoky vzorků byly odebírány z průběhu degračních testů a poté upraveny centrifugací (podmínky centrifugace byly 4 °C, 10 000 g, 20 minut) pro odstranění pevné fáze. Supernatant (kapalná fáze vzorku) byl odebrán a v něm stanoven obsah dusičnanů pomocí iontově selektivní elektrody (ISE) - typ Crytur 07-35, v některých testech byla použita elektroda Perfection NO<sub>3</sub> combination (Mettler Toledo).

ISE byla nejprve kalibrována na standardní roztoky a ze získané kalibrační závislosti byla poté vypočítána koncentrace dusičnanů v roztocích vzorků.

Zásobní roztoky standardů s koncentracemi 1000 mg.l<sup>-1</sup> a 200 mg.l<sup>-1</sup> byly připraveny rozpuštěním dusičnanu draselného v destilované vodě. Ze zásobních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky s koncentracemi 1000 mg.l<sup>-1</sup>, 500 mg.l<sup>-1</sup>, 200 mg.l<sup>-1</sup>, 100 mg.l<sup>-1</sup>, 50 mg.l<sup>-1</sup>, 20 mg.l<sup>-1</sup>, 10 mg.l<sup>-1</sup>, 5 mg.l<sup>-1</sup>, 2 mg.l<sup>-1</sup> a 1 mg.l<sup>-1</sup>. Dále byl připraven přídatný roztok, který slouží k omezení rušících iontů. Ten byl připraven z 52,85 g síranu amonného a 30,00 g kyseliny amidosulfonové, které byly rozpuštěny v nasyceném roztoku síranu stříbrného (10 g.l<sup>-1</sup>) a stejným roztokem se doplnily na objem 1000 ml.

Do 50 ml odměrné baňky se vždy odpipetovalo 15 ml standardu a 1,5 ml přídatného roztoku. Do takto připraveného roztoku se vložila dusičnanová a referentní elektroda a za stálého míchání byla po cca 3 minutách odečtena hodnota EMS (mV).



**Obr. 6.1** Příklad kalibrační závislosti  $EMS = f(\log c_{\text{NO}_3^-})$ .

Vzorky s neznámou koncentrací dusičnanových iontů ( $\text{NO}_3^-$ ) se měřily stejným způsobem jako roztoky standardů [62]. Ze získané kalibrační závislosti (příklad na Obr. 6.1) byla vypočítána koncentrace dusičnanů ve vzorcích. Tento postup pro přípravu standardů včetně jejich měření byl opakován při každém měření vzorků s dusičnany.

### 6.2.2 Stanovení redox potenciálu

Redoxní (oxidačně redukční) procesy jsou založeny na principu přenosu elektronů, probíhající v systémech, kde je přítomno redukční činidlo (donor elektronů) a oxidační činidlo (akceptor elektronů). Látky, které přijímají elektrony, se redukují, zatímco látky, které elektrony uvolňují, se oxidují. Redox potenciál je hodnota intenzity všech redoxních reakcí měřeného systému [63, 64].

Měřením hodnoty redox potenciálu bylo kontrolováno anoxické, respektive anaerobní prostředí během pokusů za denitrifikačních i anaerobních podmínek. Jak již bylo uvedeno dříve, anoxické podmínky jsou zachovány, pokud jsou dodrženy hodnoty redox potenciálu v rozmezí  $-50$  mV až  $+50$  mV.

K měření byla použita elektroda typu SHCOTT Blue Line 31 RX. Dvacet mililitrů odebraného kalu, případně připraveného inokula, bylo nadávkováno do kádinky, do níž byla ponořena elektroda a odečtena hodnota redox potenciálu.

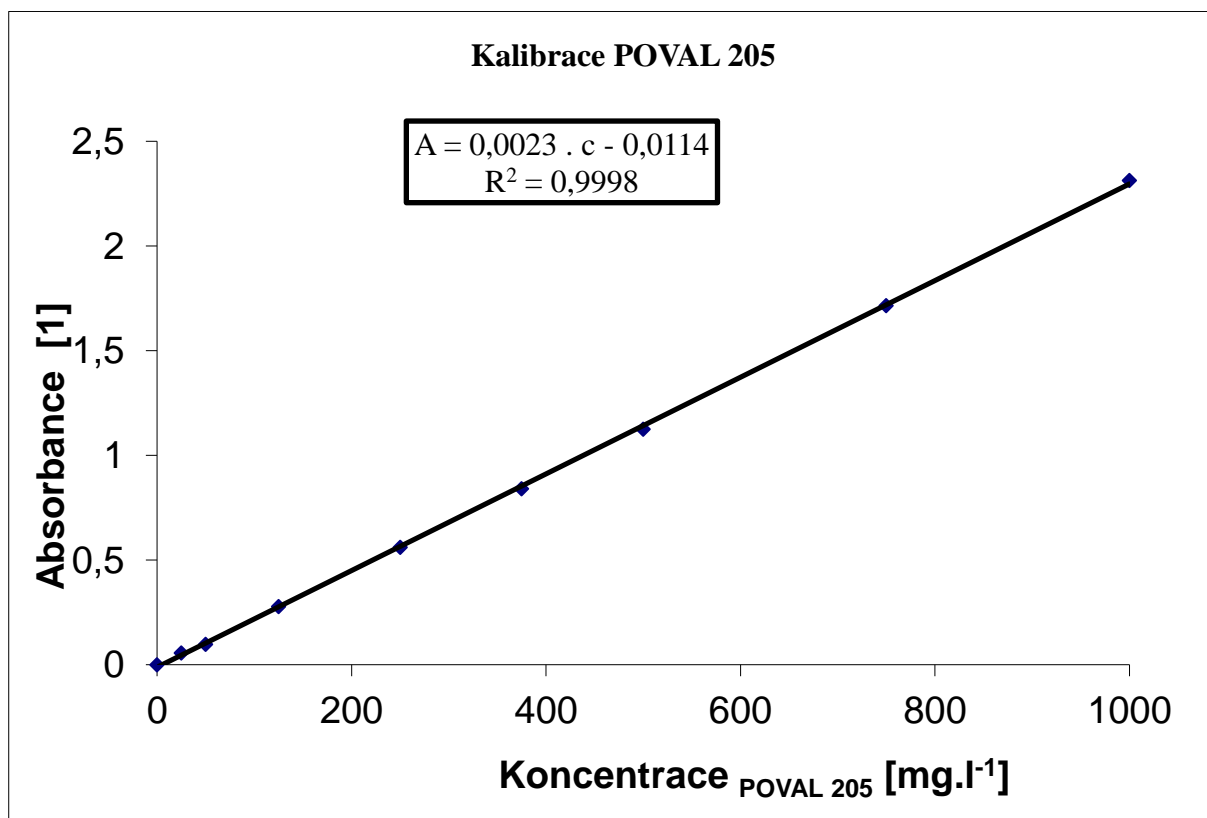
### 6.2.3 Stanovení pH

Hodnota pH, která je vyjádřena jako záporný logaritmus aktivity vodíkových iontů, byla měřena skleněnou elektrodou. Ta byla kalibrována pomocí dvou standardních pufrů s hodnotou pH 4,0 a 7,0 za konstantní laboratorní teploty. Poté bylo měřeno pH jednotlivých roztoků.

### 6.3 Spektrofotometrická metoda stanovení koncentrace PVA

Jedná se o spektrofotometrickou metodu spočívající v měření absorbance světelného záření v analyzovaném roztoku. Metoda je založena na reakci roztoků polyvinylalkoholu s jodidem draselným v přítomnosti kyseliny borité, při které dochází k tvorbě zeleného zbarvení [65].

Koncentrace PVA ve vodném roztoku byla měřena v mikrotitračních destičkách jodometrickou metodou. Do jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku standardu nebo vzorku (upravený centrifugací nebo filtrováním), poté 42  $\mu\text{l}$  roztoku kyseliny borité (příprava Kapitola 6.3.2) a 10  $\mu\text{l}$  roztoku jodu s jodidem draselným (příprava Kapitola 6.3.1). Po cca 5 minutách byla proměřena absorbance při vlnové délce 660 nm na přístroji Tecan.



Obr. 6.2 Kalibrační křivka pro výpočet koncentrace PVA.

Koncentrace PVA byla vypočítána z rovnice kalibrační přímky, dle Obr. 6.2. Kalibrační přímka byla získána proměřením připravené série roztoků standardů o koncentracích 0 mg.l<sup>-1</sup>, 25 mg.l<sup>-1</sup>, 50 mg.l<sup>-1</sup>, 125 mg.l<sup>-1</sup>, 250 mg.l<sup>-1</sup>, 375 mg.l<sup>-1</sup>, 750 mg.l<sup>-1</sup> a 1000 mg.l<sup>-1</sup>, které byly připraveny ze zásobního roztoku PVA o koncentraci 1 g.l<sup>-1</sup>.

### **6.3.1 Příprava roztoku jodu s jodidem draselným**

V třetí misce bylo spolu s malým množstvím destilované vody důkladně rozmícháno 12,7 g I<sub>2</sub> a 40 g KI. Rozpuštěné množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku.

### **6.3.2 Příprava zásobního roztoku kyseliny borité**

Bylo naváženo 40 g kyseliny borité. Toto množství bylo následně rozpuštěno v 1000 ml destilované vody.

## **6.4 Stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC)**

Stanovení DOC bylo využíváno pro sledování koncentrace substrátu (PVA) v degradačních testech, a to pomocí analyzátoru uhlíku Shimadzu, model 5000A. Po odběru degradačních suspenzí byly vzorky centrifugovány pro odstranění pevné fáze (podmínky centrifugace byly 4 °C, 10 000 g, 20 minut) a stanovení koncentrace DOC bylo provedeno pomocí uvedeného automatického analyzátoru, po okyselení, metodou vysokoteplotního spalování při teplotě 670 °C v proudu kyslíku. Vzniklý oxid uhličitý je v přístroji analyzován infračerveným detektorem (IČ). Přístroj stanovuje nejprve koncentraci celkového uhlíku (TC) a poté měří koncentraci uhlíku anorganického (IC). Měření je prováděno v nádobce s kyselinou fosforečnou, kde je vytěsněný oxid uhličitý opět měřen IČ. Výsledná koncentrace organického uhlíku je získávána odečtem.

## **6.5 PCR a TGGE metody**

Polymerová řetězová reakce (PCR) je cyklická reakce, při které dochází k amplifikaci určitého úseku molekuly DNA pomocí DNA-polymerasy. PCR se provádí způsobem *in vitro* [66, 67]. Tato reakce probíhá v několika teplotních fázích – po počáteční denaturaci dále následují opakované cykly denaturace, připojení primerů a prodlužování primerů [67].

Gelová elektroforéza v teplotním gradientu (TGGE) je molekulárně biologická separační metoda, používaná k určování genetické rozmanitosti bakteriálních společenstev. Tato metoda je založena na separaci molekul DNA, se stejnou či podobnou délkou fragmentů, lišících se však svou sekvencí nukleotidů. Během separace dochází ke snížení elektroforetické mobility, schopnosti rozvíjení (denaturace) dvouřetězcových molekul DNA na částečně jednořetězcové struktury působením teploty tzv. přechodu denaturace, přičemž částečná denaturace fragmentů ovlivní jejich elektroforetickou pohyblivost [68, 69].

Mikrobiální biomasa byla pro tyto práce získávána centrifugací kalových suspenzí, odebraných z degradačních testů za denitrifikačních podmínek. Z jednotlivých vzorků byla izolována DNA a byla podrobena PCR pro amplifikaci genu pro 16S rRNA. Získané produkty byly separovány pomocí TGGE. Tato část výzkumu byla provedena ve spolupráci s doktorskou prací L. Husárové, Ph.D. [70].

## **6.6 Gramovo barvení**

Z vybrané kolonie se kličkou odebere přiměřeně malé množství biomasy. Plamenem se ožehne podložní sklíčko a doprostřed sklíčka se nanese fyziologický roztok a bakteriologickou kličkou se přenese mikrobiální kultura do kapky na podložním sklíčku a rozmíchá. Kličkou se rozetře suspenze buněk a nechá vyschnout na vzduchu, nebo se opatrně dosuší pomocí plamenu. Zaschlý nátěr se na sklíčku fixuje třikrát protažením plamenem. Na vychladlý preparát se navrství krystalová violet a nechá se působit 60 vteřin. Poté se spláchne Lugolovým roztokem a Lugolův roztok se ještě nechá působit 60 vteřin. Poté se roztok opatrně sleje a preparát se opláchne destilovanou vodou a odbarvuje se 96% etanolem tak dlouho, dokud odtéká barvivo (maximálně 25 vteřin). Preparát se opět opláchne destilovanou vodou a dobarví se zředěným karbofuchsinem po dobu 60 vteřin. Preparát se opět opláchne destilovanou vodou a usuší. Takto připravený preparát se mikroskopuje pomocí imersního objektivu [71].

### **6.6.1 Příprava Lugolova roztoku dle Utermöhl**

Do 100 ml odměrné lahve se ve 20 ml destilované vody rozpustí 20 g KI, po jeho rozpuštění se přidá 10 g krystalického jódu. Roztok se doplní destilovanou vodou po rysku a přidá se 5 g octanu sodného.

### **6.6.2 Příprava roztoku krystalové violeti**

Připraví se roztok A rozpuštěním 25 g krystalové violeti v 1000 ml 96 % ethanolu a dále roztok B, kdy se rozpustí 10 g šťavelanu amonného v 1000 ml destilované vody. Smíchá se 20 ml roztoku A a 80 ml roztoku B, zfiltruje se.

### **6.6.3 Příprava roztoku karbofuchsinu**

V třecí misce se rozetře 1 g fuchsinu s 10 ml 96% ethanolu a ke směsi se přidá 100 ml vodného 5% roztoku fenolu. Nechá se stát do druhého dne a pak se přefiltruje. Uchovává se v tmavých lahvích se zabroušenou zátkou.

## **6.7 Mikrobiální degradace PVA v kalu za různých podmínek**

Biodegradace PVA za aerobních podmínek byla uskutečňována za přístupu kyslíku do testovacích lahví, zatímco anaerobní degradace probíhala v uzavřených testovacích lahvích bez přístupu kyslíku i bez dodání dusičnanů. Denitrifikační podmínky byly zajištěny přidávkem dusičnanů (koncentrace 500 mg.l<sup>-1</sup> nebo 1000 mg.l<sup>-1</sup>) na začátku testů. Kinetika biodegradace byla sledována z průběžně odebíraných vzorků.

Experimenty sledování mikrobiální degradace PVA za denitrifikačních a anaerobních podmínek probíhaly v reakčních lahvích o objemu 320 ml a testy sledování degradace za aerobních podmínek v reakčních lahvích o objemu 1000 ml, které byly před použitím z důvodu mikrobiálního znečištění vymyty 1% roztokem kyseliny chlorovodíkové, poté destilovanou vodou a vysterilizovány. Do každé reakční lahve bylo dávkováno 150 ml připraveného inokula s minerálním médiem pracovně označené jako MM1, MM2 nebo MM3 (příprava a složení v Kapitole 7.2.7) a přidáno magnetické míchadlo.

Pro vytěsnění přebytečného kyslíku z reakčních lahví byl u testů denitrifikační a anaerobní degradace použit plynný dusík (5 minut/láhev) a láhve byly následně plynotěsně uzavřeny pryžovým septem. Takto připravené testovací láhve byly uchovány ve vytemperované místnosti při teplotě 25 °C ± 1 °C a směs byla kontinuálně míchána při otáčkách 100 ot.min<sup>-1</sup>. Paralelně byly připraveny testovací láhve se slepým pokusem (inokulum pouze s MM1) a láhve s referenční látkou, kterou byla glukosa. Z každé testovací láhve před jejich uzavřením bylo odebráno 20 ml vzorku na stanovení počátečních hodnot množství TOC a koncentrace NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Experimenty sledující mikrobiální degradaci PVA za aerobních podmínek byly provedeny v reakčních lahvích o objemu 1000 ml, aby bylo zabezpečeno dostatečné množství kyslíku.

Před vlastní analýzou vzorků bylo nutné odebranou suspenzi z reakčních lahví centrifugovat. Podmínky pro odstředění byly 10 000 g, 20 minut, 4° C. Četnost odběrů vzorků byla volena 1x – 2x týdně, a to dle zjištěného úbytku koncentrace PVA. Odběry (po cca 20 ml) byly provedeny pomocí injekční stříkačky s jehlou přes pryžové septum, které bylo následně velmi rychle utěsněno lepidlem na pryž.

Mikrobiální degradace PVA byla sledována vyhodnocením hodnot koncentrací PVA, DOC, redox-potenciálu, pH a koncentrací  $\text{NO}_3^-$  (postupy popsány v Kapitole 6.).

## 6.8 Isolace mikroorganismů využívající PVA

Jistá část disertační práce se zabývala pokusy o izolaci mikroorganismů degradujících PVA za denitrifikačních podmínek. Po proběhlé mikrobiální degradaci PVA bylo odebíráno směsné mikrobiální společenstvo z reakčních lahví a bylo několikrát provedeno jeho pomnožení. Toto mikrobiální společenstvo bylo přeneseno do testovacích lahví s minerálním médiem obsahujícím PVA o koncentraci 100 - 200  $\text{mg.l}^{-1}$  a dusičnany s max. koncentrací 1000  $\text{mg.l}^{-1}$ . Lahve byly kultivovány při teplotě 25 °C ± 1 °C. Úbytek koncentrace PVA byl stanoven jodometricky.

Po proběhlé mikrobiální degradaci PVA byly suspenze vyočkovány křížovým roztěrem na pevné agary nebo byly zředěny desetinnou řadou sterilním fyziologickým roztokem a plošně naočkovány na celý povrch ztužených živných půd. Bylo použito jak minerálních médií (MM2) s PVA jako jediným organickým substrátem, tak i komplexních živných médií s běžnými organickými látkami. Složení živných médií bylo vícekrát upravováno, aby média svými fyzikálně chemickými podmínkami co nejlépe odpovídala požadavkům hledaných mikroorganismů [72]. Anaerobní kultivace mikroorganismů byla prováděna v anaerostatu za použití soupravy Anaerocult A (Merck), zatímco mikroaerofilní kultivace probíhala v exsikátoru, s částečným odstraněním kyslíku plamenem. Ztužená živná média byla inkubována při teplotě 25 °C ± 1 °C, po dobu několika týdnů či měsíců, v některých případech až 1 rok.

Vedle testů probíhajících na pevných živných agarech byly také provedeny testy mikrobiální degradace PVA získanými čistými kulturami. Tyto kultury byly asepticky odebrány a přeneseny do sterilních mikrozkušavek nebo vialek, do nichž byla plně nadávkována sterilní tekutá minerální média MM4 (Kapitola



7.2.5) nebo MM5 (Kapitola 7.2.6), obsahující mimo jiné také rozpuštěný PVA ( $100 - 250 \text{ mg.l}^{-1}$ ), dusičnany, vitamíny, případně pyrrolochinolinochinon (PQQ). Před zahájením testů byly čisté mikrozkušavky (vialky) sterilizovány při teplotě  $122 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 25 minut, septa a víčka byla sterilizována v laminárním boxu pomocí UV záření po dobu 1,5 hodiny. Kultivace připravených vzorků probíhala v temnu při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  s kontinuálním mícháním po dobu cca 4 - 5 týdnů. Úbytek spotřebovaného PVA byl poté sledován spektrofotometrickou metodou (dle Kapitoly 6.3).

Analogickým způsobem byly také prováděny testy degradace PVA v tekutých médiích definovanými směsnými kulturami nebo pomnoženými konsorciemi.

## 7. Experimentální část

Disertační práce se skládá ze dvou základních studií, které probíhaly v několika krocích a vzájemně se prolínaly.

První část disertační práce byla zaměřena na sledování mikrobiální degradace PVA probíhající v odpadních vodách, a to jak za denitrifikačních, tak také za aerobních a anaerobních podmínek, s využitím vzorků kalů z denitrifikační nádrže ČOV. Biodegradace PVA za aerobních podmínek byla uskutečňována za přístupu kyslíku do testovacích lahví, anaerobní degradace probíhala v uzavřených testovacích lahvích bez přístupu kyslíku i bez dodání dusičnanů. Denitrifikační podmínky byly zajištěny přidavkem dusičnanů na začátku testů. Experimenty probíhaly při teplotě  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kinetika biodegradace byla sledována z průběžně odebíraných vzorků. Na počátku a v průběhu experimentů byly odebírány vzorky pro stanovení koncentrace DOC, hodnot redox potenciálu, pH a především koncentrací PVA a  $\text{NO}_3^-$ .

Druhá část disertační práce byla zaměřena na izolaci mikroorganismů degradujících PVA za denitrifikačních podmínek. Směsná mikrobiální společenstva byla po denitrifikační biodegradaci PVA odebírána z testovacích lahví, pomnožována a následně očkována na sterilní živné půdy nebo do tekutého média.

### 7.1 Použité chemikálie

Pro experimenty byly použity uvedené chemikálie analytické čistoty p. a. získané od firem - Lachema, ČR; Penta, ČR a Fluka, SRN. Pro studium byl použit polyvinylalkohol (PVA) s obchodním značením POVAL 205,  $M_w = 37\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a se stupněm hydrolyzy 88 mol %, od firmy Kuraray, Japonsko.

### 7.2 Příprava minerálních médií a roztoků

#### 7.2.1 Základní minerální médium (MM1)

Pro přípravu 1000 ml základního minerálního média bylo použito:

Roztok $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (koncentrace $9,07\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).....	10 ml
Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\ \text{H}_2\text{O}$ (koncentrace $23,90\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).....	40 ml
Roztok stopových prvků (viz níže).....	2 ml
Zásobní roztoky solí (viz níže).....	každý po 10 ml
Destilovaná voda.....	918 ml

#### a) Roztok stopových prvků

Byly naváženy jednotlivé složky: 0,043 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,057 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,043 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,037 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 g  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,040 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a postupně rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

#### b) Zásobní roztoky solí

Jednotlivé soli - 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,3 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  byly naváženy a rozpuštěny každá zvlášť v 100 ml destilované vody.

Takto připravené MM1 bylo odkysličeno kontinuálním probubláním  $\text{N}_2$  po dobu cca 20 min. V případě potřeby bylo pH připraveného MM1 upraveno roztokem zředěné  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na hodnotu  $7,4 \pm 0,2$ .

### **7.2.2 Minerální médium s přidavkem $\text{NO}_3^-$ (MM2)**

Pro přípravu 1000 ml MM2 bylo použito 1000 ml MM1 (Kapitola 7.2.1) s přidavkem 500 nebo 1000 mg  $\text{NO}_3^-$  iontů ve formě  $\text{KNO}_3$ .

Takto připravené MM2 bylo odkysličeno kontinuálním probubláním  $\text{N}_2$  po dobu cca 20 min. V případě potřeby bylo pH připraveného MM2 upraveno roztokem zředěné  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na hodnotu  $7,4 \pm 0,2$ .

### **7.2.3 Minerální médium s přidavkem PVA a $\text{NO}_3^-$ (MM3)**

Pro přípravu 1000 ml MM3 bylo použito 1000 ml MM1 (Kapitola 7.2.1) s přidavkem 500 mg nebo 1000 mg  $\text{NO}_3^-$  iontů ve formě  $\text{KNO}_3$  a 100 mg nebo 250 mg PVA (POVAL 205).

Takto připravené MM3 bylo odkysličeno kontinuálním probubláním  $\text{N}_2$  po dobu cca 20 min. V případě potřeby bylo pH připraveného MM3 upraveno roztokem zředěné  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na hodnotu  $7,4 \pm 0,2$ .

### **7.2.4 Zásobní roztok pyrrolochinolochinonu (PQQ)**

Zásobní roztok PQQ (koncentrace  $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) byl připraven navážením 1 mg PQQ, který byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody. Připravený roztok byl přefiltrován přes sterilní membránový filtr MILLEX GP (MILLIPORE) s velikostí pórů  $0,22 \mu\text{m}$  a poté uchováván v mrazničce při teplotě  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **7.2.5 Minerální médium s přidavkem PVA, KNO<sub>3</sub> a PQQ (MM4)**

Pro přípravu 1000 ml MM4 bylo použito 1000 ml MM 1 (Kapitola 7.2.3), s přidavkem roztoku PQQ (0,1 g.l<sup>-1</sup>) v množství 200 µl. Připravené MM4 bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 122 °C a době 25 minut. Poté bylo MM4 pomocí sterilní jehly odkysličeno kontinuálním probubláním N<sub>2</sub> po dobu cca 20 minut.

### **7.2.6 Minerální médium s přidavkem PVA, KNO<sub>3</sub> a vitamíny (MM5)**

Pro přípravu 1000 ml MM5 bylo použito 1000 ml MM3 (Kapitola 7.2.3), které bylo sterilizováno v autoklávu při 121°C po dobu 25 minut. Po ochlazení (při teplotě cca 50 °C) byl do roztoku asepticky přidán roztok MEMs vitamínů (Biotech, a.s.) v množství 4 ml. Poté bylo MM5 pomocí sterilní jehly odkysličeno kontinuálním probubláním dusíkem po dobu cca 20 minut.

### **7.2.7 Inokulum s přidavkem MM1/ MM2/ MM3**

Pro přípravu kalového inokula bylo potřeba odebrat takový objem upraveného kalu (Kapitola 7.4), aby výsledný obsah sušiny inokula v testovacích lahvích byl cca 1 g.l<sup>-1</sup>. Potřebný objem čistírenského kalu byl odstředěn při 4600 ot.min<sup>-1</sup> při 20 °C po dobu 10 minut. Po odstředění byl supernatant slit a získaný sediment byl resuspendován v MM1 (Kapitola 7.2.1) nebo v MM2 (Kapitola 7.2.2), případně v MM3 (Kapitola 7.2.3). Takto připravená inokula byla odkysličena probubláním dusíkem po dobu cca 20 minut.

### **7.2.8 Fysiologický roztok (FR)**

Fysiologický roztok byl připraven rozpuštěním 8,5 g chloridu sodného v 1 l destilované vody. Roztok byl důkladně promíchán a sterilizován v autoklávu při 125 °C po dobu 20 minut.

### **7.2.9 Živné médium s kvasničným autolyzátem, jantaranem sodným a etanolem (ŽM)**

Na přípravu 1000 ml ŽM bylo použito 3 ml ethanolu, 0,03 g kvasničného autolyzátu, 3 g jantaranu sodného a 997 ml MM1 (Kapitola 7.2.1).

## **7.3 Příprava ztužených živných půd**

Níže popsané ztužené živné půdy byly připraveny navážením jednotlivých složek, které byly důkladně rozpuštěny v určitém množství základního

minerálního média MM1, připraveného dle Kapitoly 7.2.1. Potřebná množství složek jsou uvedena na 100 ml finálního objemu. Takto připravené půdy byly sterilizovány v autoklávu při 125 °C po dobu 25 minut. Jakmile byly živné půdy vysterilizovány a ochlazeny, v laminárním boxu byly těsně před rozlitím médií přidány termolabilní složky (vitamíny, PQQ), půdy byly asepticky rozlity do sterilních Petriho misek a ponechány ztuhnout.

Níže uvedené tabulky (Tabulka 7.1 až Tabulka 7.3) popisují složení a množství složek, potřebných k přípravě 15 typů ztužených živných půd, označených jako „ŽP 1 až ŽP 15“.

**Tab. 7.1** Přehled složení ztužených živných půd ŽP 1 – ŽP 5.

Složka	ŽP 1	ŽP 2	ŽP 3	ŽP 4	ŽP 5
řasový agar	1,8 g	1,8 g	1,8 g	1,8 g	1,8 g
MM1	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g
PVA	-	0,05 g	0,05 g	0,05 g	-
zásobní roztok PQQ (0,1 g.l <sup>-1</sup> )	-	-	20 µl	20 µl	-
kvasničný autolyzát	-	-	-	0,05 g	0,05 g

**Tab. 7.2** Přehled složení ztužených živných půd ŽP 6 – ŽP 11.

Složka	ŽP 6	ŽP 7	ŽP 8	ŽP 9	ŽP 10
řasový agar	1,8 g	1,8 g	1,8 g	1,8 g	1,8 g
MM1	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,1 g	0,1 g	0,1 g	-	0,1 g
PVA	-	-	0,075 g	0,075 g	0,075 g
zásobní roztok PQQ (0,1 g.l <sup>-1</sup> )	-	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
kvasničný autolyzát	0,05 g	3 mg	3 mg	3 mg	-
jantaran sodný	0,15 g	-	-	-	-
etanol	0,15 g	-	-	-	-
MEMs vitamíny, roztok	-	-	-	-	0,5 ml
denitřif. kalová suspenze	-	5 ml	5 ml	5 ml	-

**Tab. 7.3** Přehled složení ztužených živných půd ŽP 12 – ŽP 14.

Složka	ŽP 11	ŽP 12	ŽP 13	ŽP 14	ŽP 15
řasový agar	1,8 g	-	-	-	1,1 g
MM1	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
PVA	-	-	-	0,075 g	-
zásobní roztok PQQ (0,1 g.l <sup>-1</sup> )	-	-	-	20 µl	-
kvasničný autolyzát	0,025 g	-	-	-	-
roztok vitamínů (MEMs)	-	-	-	0,5 ml	0,3 ml
trypton	0,025 g	-	-	-	-
soja pepton	0,025 g	-	-	-	-
R2A agar (HIMEDIA)	-	1,8	0,18 g	-	0,6
gellan	-	-	1,5 g	1,6 g	-
octan sodný	-	-	-	-	30 mg
glutamát sodný	-	-	40 mg	-	-

#### 7.4 Biologický materiál

Pro testování biologické degradace za denitrifikačních, aerobních a anaerobních podmínek byl použit kal odebraný z denitrifikační nádrže z čistírny odpadních vod (ČOV) Zlín – Malenovice. Odebraný kal byl upraven odstraněním hrubých nečistot pomocí síta. K odstranění přebytečného množství kyslíku byl kal probublán dusíkem po dobu cca 20 minut. U upraveného kalu byly stanoveny hodnoty pH a redox-potenciálu a sušina kalu (případně ztráta žiháním). Během manipulace s denitrifikačním kalem bylo dbáno na co nejkratší kontakt se vzduchem.

## 7.5 Použité přístrojové vybavení

- Laboratorní sušárna UM200 - Memmert, Německo
- Laboratorní pec LH09MT LAC - LAC, Německo
- Analyzátor celkového organického uhlíku TOC-5000 A - Shimadzu Corp., Rakousko
- Chlazená centrifuga Rotanta 460R, Hettich, Německo
- Analytické váhy SARTORIUS, Satorius AG, Německo
- Laboratorní pH metr InoLab pH 735, WTW, Německo
- Míchačka elektromagnetická STIRRER OP-913/3, HANNA INSTRUMENTS Canada, Kanada
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky TECAN Sunrise, USA
- Laboratorní autokláv Sanoclav St-MCS-2, Wolf, Německo
- Laminární box BIO-IIA, Telstar, Španělsko
- Třepačka 3018 GFL, Německo
- Mikrodávkače (2–20  $\mu$ l, 20–200  $\mu$ l, 100–1000 $\mu$ l) Biohit, Finsko
- Temperační místnost o teplotě  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Laboratorní mikroskop OLYMPUS CX 41, Japonsko

## 8. Výsledky a diskuse

### 8.1 Hodnocení mikrobiální degradace PVA v kalu za denitrifikačních podmínek

Pro hodnocení mikrobiální degradace PVA za denitrifikačních podmínek byla provedena řada experimentů, při kterých byl použit čistírenský kal, odebraný z denitrifikační nádrže v ČOV Zlín – Malenovice (Kapitola 7.4).

Vstupní hodnota koncentrace PVA v testovacích lahvích byla ve většině experimentech cca 100 mg.l<sup>-1</sup>. Použitá koncentrace dusičnanů byla 0 mg.l<sup>-1</sup>, 500 mg.l<sup>-1</sup> nebo 1000 mg.l<sup>-1</sup>. Sušina připraveného kalového inokula byla cca 1 g.l<sup>-1</sup>. Příprava inokula a podmínky pro průběh experimentů jsou již popsány v předchozích kapitolách.

Pro srovnání byl použit slepý pokus, bez přídavku PVA. V průběhu pokusu byly v určitých časových intervalech odebírány vzorky ke stanovení koncentrací PVA jodometrickou metodou, rozpuštěného organického a anorganického uhlíku, dusičnanů a také vzorky ke stanovení pH odebraných suspenzí a hodnoty redox potenciálu.

#### 8.1.1 První experiment

Cílem prvního orientačního experimentu bylo ověřit, zda je PVA mikrobiálně degradovatelný v kalu odebraném z denitrifikační nádrže za denitrifikačních podmínek.

Pro experimenty bylo připraveno inokulum s minerálním médiem MM3 obsahující PVA (Kapitola 7.2.3). Podmínky pro průběh pokusu byly popsány již výše. Paralelně byly připraveny testovací lahve se slepými pokusy bez PVA, tedy inokulum pouze s MM2 (Kapitola 7.2.2), a lahve s referenční látkou, kterou byla glukosa v koncentraci 200 mg.l<sup>-1</sup>.

Vstupní hodnota koncentrace PVA v testovacích lahvích byla cca 100 mg.l<sup>-1</sup>. Použitá koncentrace dusičnanů v prvním testu byla 500 mg.l<sup>-1</sup>. Počáteční hodnota redox potenciálu denitrifikačního kalu byla -55,4 mV a hodnota pH byla 7,38. Uvedená hodnota redox potenciálu dokazovala nastavení denitrifikačních podmínek při zahájení pokusu.

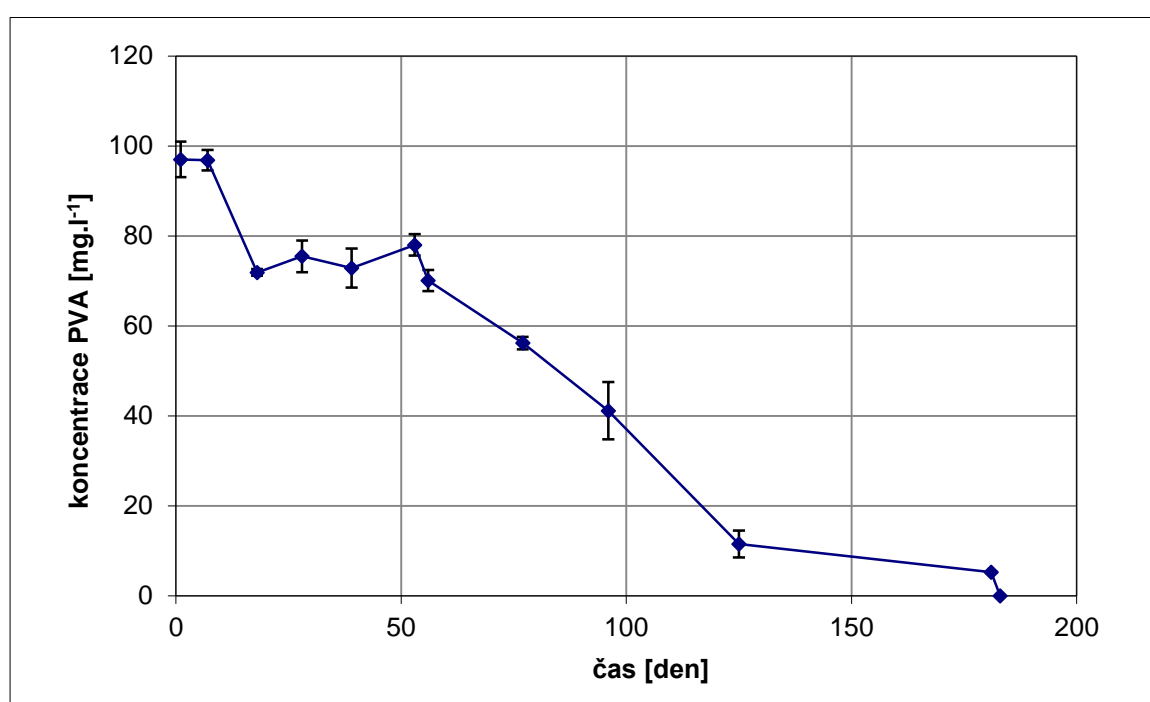
Kinetika mikrobiální degradace PVA za denitrifikačních podmínek byla sledována jodometricky, vzorky byly odebírány v určitých časových intervalech. Z naměřených hodnot byly vyhodnoceny koncentrace PVA, množství



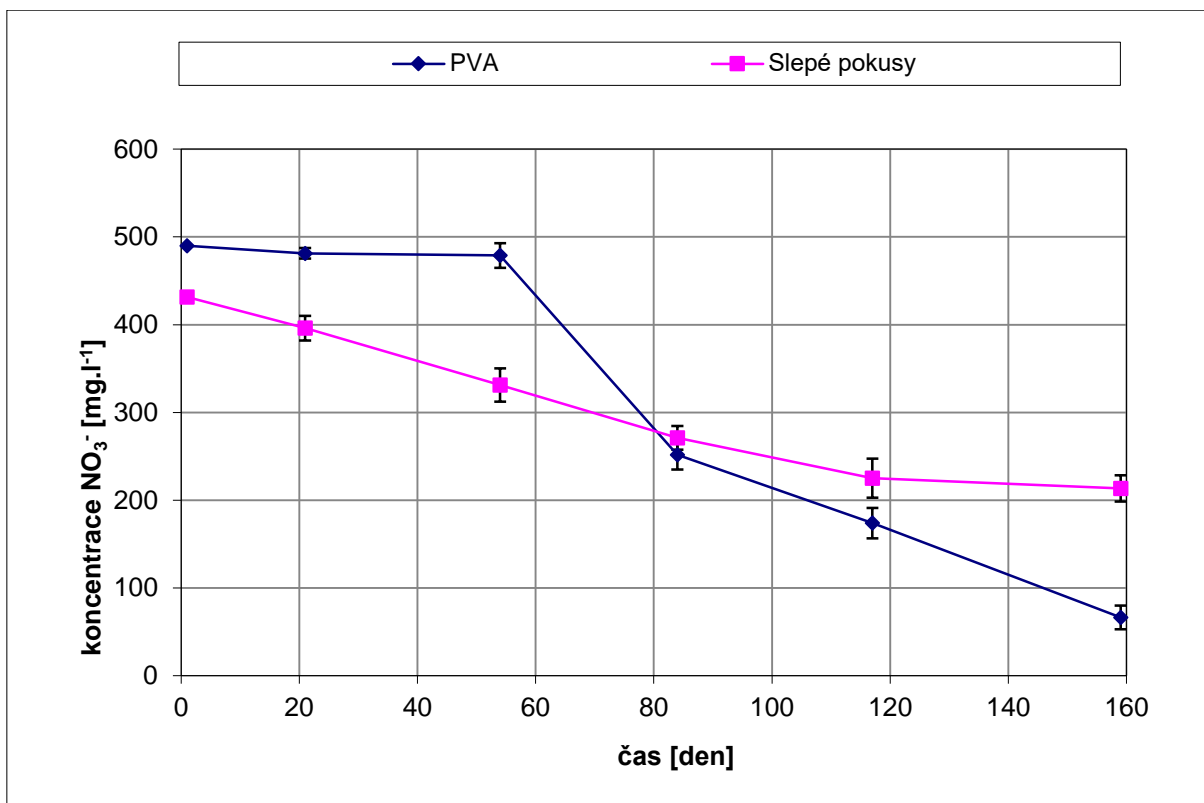
rozpuštěného organického a anorganického uhlíku, dusičnanů a také stanovení pH odebraných vzorků a hodnota redox potenciálu.

Získané výsledky jsou uvedeny na Obr. 8.1, 8.2, 8.3 a 8.4, kde výsledky jsou uvedeny vždy jako průměr ze tří paralelních kultivačních lahví, s uvedením směrodatných odchylek coby chybových úseček.

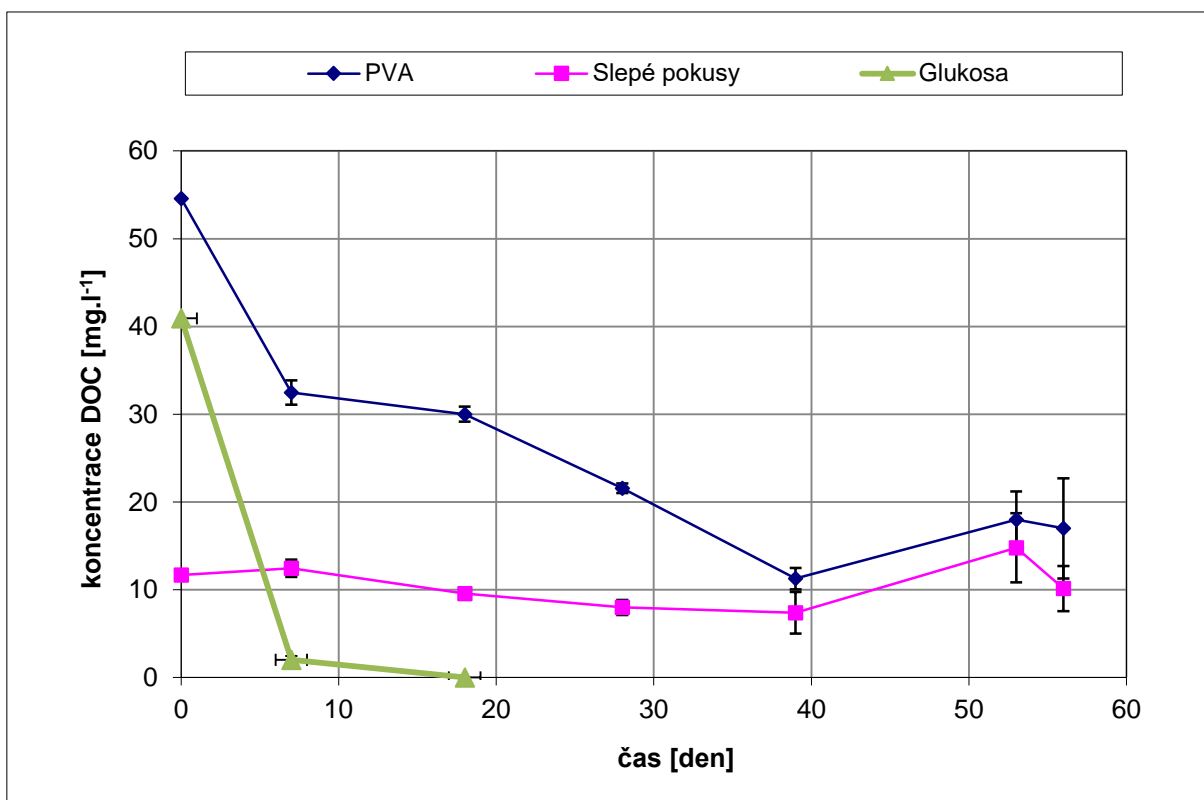
Vzorky s PVA a vzorky ze slepých pokusů pro stanovení hodnot DOC a pH byly odebrány do cca 180. dne (u vzorků s glukosou do 18. dne vzhledem k celkové degradaci glukosy). Odběr vzorků pro stanovení koncentrace dusičnanových iontů probíhal až do 159. dne experimentu. Na Obr. 8.1 až 8.4 jsou graficky uvedeny získané výsledky.



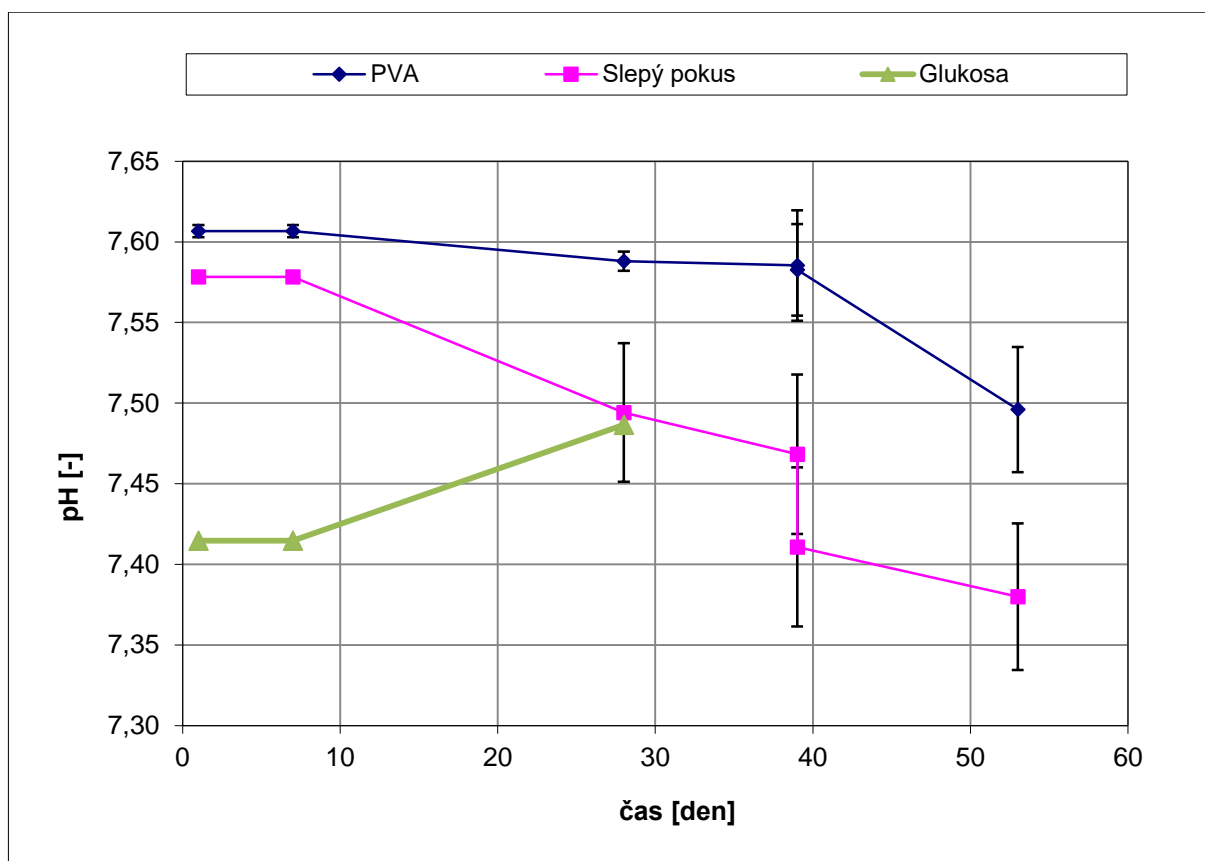
*Obr. 8.1 Průběh koncentrace PVA za denitrifikačních podmínek – 1. experiment.*



*Obr. 8.2 Průběh koncentrací NO<sub>3</sub><sup>-</sup> v 1. experimentu.*



*Obr. 8.3 Průběh koncentrací DOC v 1. experimentu.*



*Obr. 8.4 Průběh pH v 1. experimentu.*

Jak znázorňuje Obr. 8.1, již tento první orientační pokus ukázal, že denitrifikační čistírenský kal je schopen rozkladu PVA bez přítomnosti kyslíku a polymer byl tak směsnou mikrobiální kulturou spotřebován během cca 180 dní za denitrifikačních podmínek.

Počáteční koncentrace dusičnanových iontů byla  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  ve všech vzorcích. Na Obr. 8.2 lze pozorovat, že koncentrace dusičnanů u slepých pokusů pravidelně mírně klesala, zatímco u vzorků s PVA byla téměř konstantní. Cca od 54. dne byl zaznamenán rychlý pokles koncentrace dusičnanových iontů u vzorků s PVA. Tento rozdíl lze přisuzovat tomu, že mikroorganismy začaly rychle spotřebovávat polymerní substrát až po uvedené prodlevě, zatímco u slepých pokusů již od počátku pozvolna využívaly jako substrát zřejmě biomasu kalových vloček; proto se lišil i průběh spotřeby dusičnanů.

Průběh křivek rozpuštěného organického uhlíku (DOC) u vzorků s PVA a referenčních vzorků s glukosou je znázorněný na Obr. 8.3, s odečtenými hodnotami DOC slepých pokusů. Z Obr. 8.3 je patrné, že glukosa byla velmi rychle spotřebována, a to cca do 10 dní. Koncentrace DOC u vzorků s PVA začala strmě klesat od 18. dne po 39. den, kdy opět došlo k mírnému nárůstu DOC. Tento mírný nárůst lze také zaznamenat u slepých pokusů, a lze jej přisuzovat

skutečnosti, že se určité množství organických látek začalo uvolňovat z rozpadajících se vloček, v nichž již mikroorganismy neměly dostatek rychle dostupného substrátu; tím došlo k mírnému navýšení koncentrací DOC.

U vzorků obsahujících PVA a u slepých pokusů byla na začátku experimentu hodnota pH cca 7,6, zatímco u glukosy činila 7,4. V průběhu experimentu, jak zobrazuje Obr. 8.4, docházelo u vzorků s PVA, stejně jako u slepých pokusů, k nepatrnému snižování hodnoty pH, zatímco u vzorků s glukosou se tato hodnota zvyšovala. Změny pH však nebyly nijak významné a hodnoty nadále zůstávaly v oblasti optima pro většinu bakteriálních procesů.

Jak již bylo uvedeno, v prvním experimentu bylo ze získaných výsledků zjištěno, že PVA je směsnou kalovou mikrobiální kulturou za denitrifikačních podmínek degradabilní, avšak že tento proces je značně pomalý.

Zbývající suspenze kalu byla na konci pokusu po úspěšně proběhlé degradaci PVA uchována v temnu při teplotě  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  a použita pro další experiment. Tato suspenze byla označena jako „adaptovaný kal I“. Tento kal byl pro další experimenty upravován stejnými způsoby jako kal neadaptovaný (Kapitola 7.2.7).

### 8.1.2 Druhý experiment

Kalová suspenze z prvního experimentu (adaptovaný kal I) byla použita pro dílčí provedení druhého experimentu, ve kterém byla porovnávána kinetika mikrobiální degradace PVA v neadaptovaném kalu a kalu směsném (neadaptovaný a adaptovaný kal I v poměru 1 : 1). Pro další srovnání byla dále sledována degradace PVA v neadaptovaném kalu za aerobních podmínek. Jako neadaptovaný kal byl použit nově odebraný čistírenský kal z denitrifikačního stupně čistění odpadní vody, tedy ze stejného odběrového místa jako neadaptovaný kal pro první experiment. Použití adaptované kalové suspenze bylo motivováno snahou o zjištění, zda předpokládané vyšší zastoupení degradačních mikroorganismů ve směsném inokulu vyvolá urychlení rozkladu PVA za denitrifikačních podmínek.

Vstupní hodnota koncentrace PVA v testovacích lahvích byla cca  $100\text{ mg.l}^{-1}$ . Použitá koncentrace dusičnanových iontů byla  $1000\text{ mg.l}^{-1}$ . Koncentrace sušiny připraveného inokula byla  $0,9\text{ g.l}^{-1}$ . Počáteční hodnota redox potenciálu u neadaptovaného denitrifikačního kalu byla  $-28,9\text{ mV}$ , u adaptovaného kalu I použitého z prvního experimentu byla  $-98,4\text{ mV}$ . Hodnota redox potenciálu směsného inokula (adaptovaný I a neadaptovaný kal) pak byla  $-48,2\text{ mV}$ . Počáteční hodnota pH připravených inokul v minerálním médiu byla 7,2.

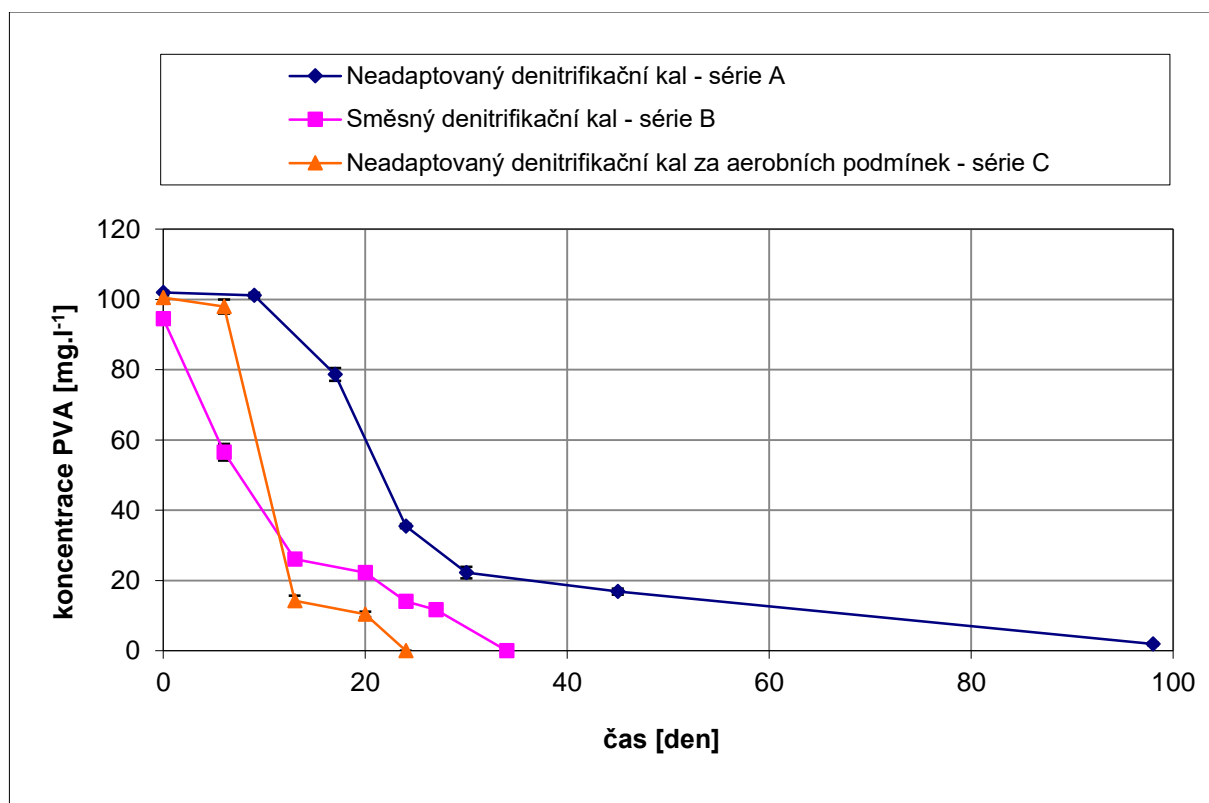
Byly připraveny tři série pokusů rozkladů PVA, nazvané jako série A, série B a série C a také byly nasazeny slepé pokusy bez PVA. Série A obsahovala nově odebraný neadaptovaný čistírenský kal z denitrifikační nádrže (Kapitola 7.4), upravený minerálním médiem MM3 obsahující PVA a dusičnany (Kapitola 7.2.3).

V sérii B byl k neadaptovanému kalu přidán adaptovaný kal I z prvního pokusu v poměru 1:1. Tento pokus probíhal také za denitrifikačních podmínek. U obou sérií byly testovací lahve (o objemu 320 ml) probublány dusíkem a ihned uzavřeny pryžovým septem. Vzorčky byly odebírány asepticky injekční stříkačkou přes pryžové septum.

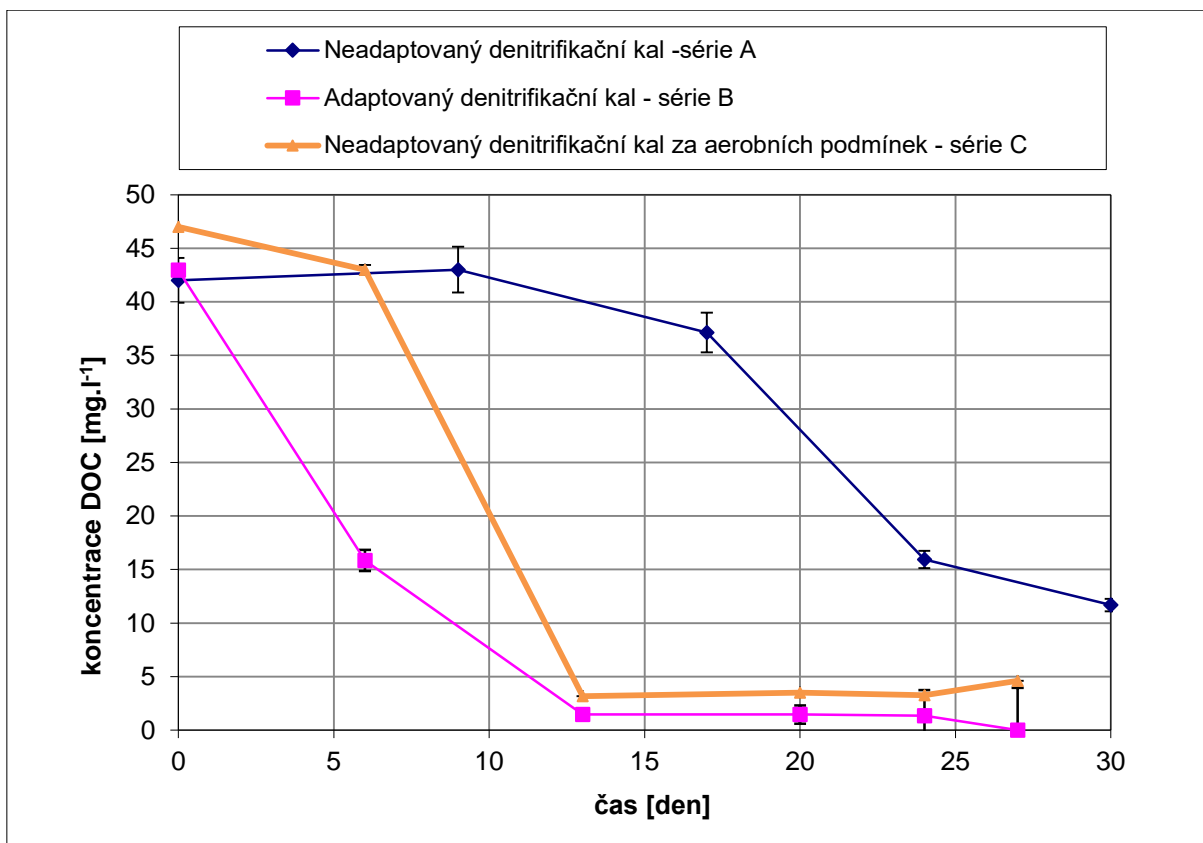
Série C se lišila od sérií A a B tím, že probíhala za aerobních podmínek. Tyto pokusy probíhaly v reakčních lahvích o objemu 1000 ml bez pryžového septa, a velký objem plynné fáze zajišťoval dostatečné množství kyslíku.

Jelikož pro stanovení koncentrací dusičnanových iontů, DOC a pH bylo zapotřebí odebírat velký objem vzorků, tato měření byla prováděna do cca 30. dne mikrobiální degradace.

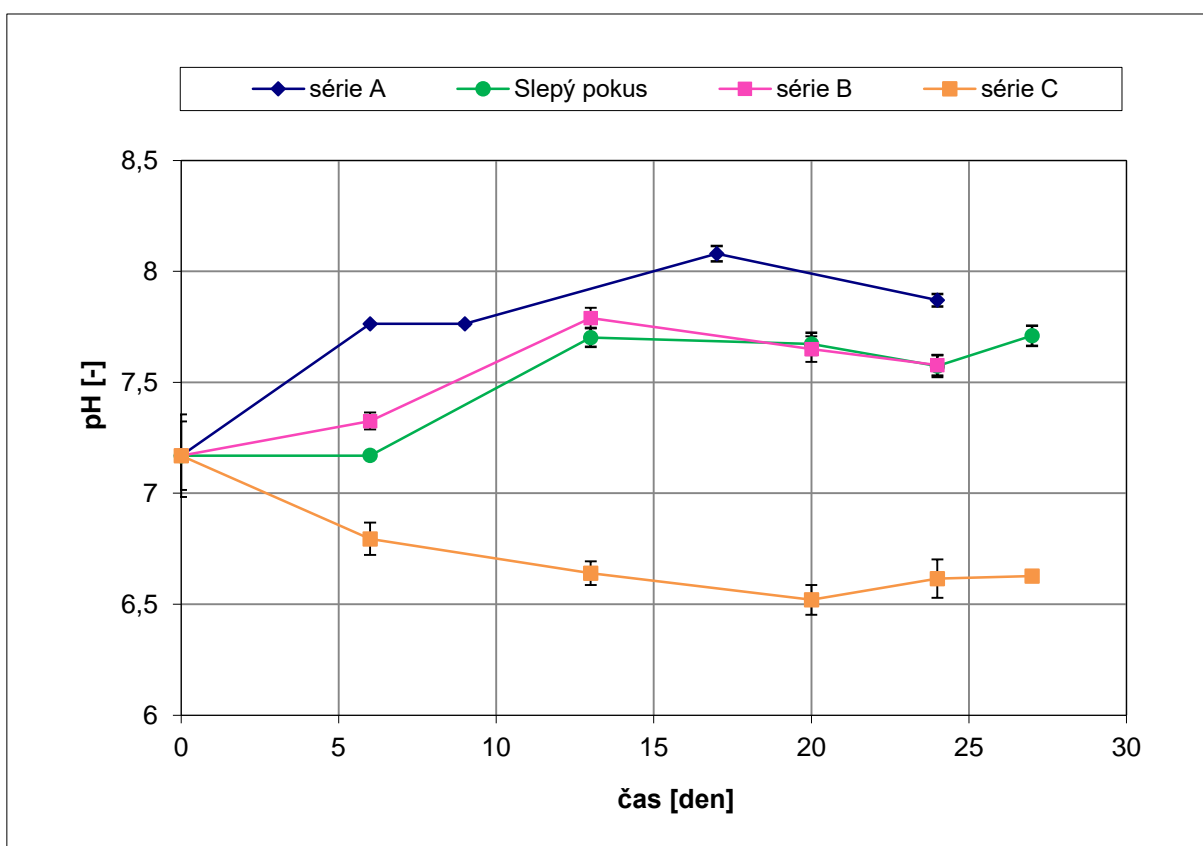
Výsledky celého pokusu jsou uvedeny na následujících grafech. Výsledky jsou uvedeny vždy jako průměr ze tří paralelních kultivačních lahví, s uvedením směrodatných odchylek coby chybových úseček.



**Obr. 8.5** Průběh koncentrací PVA v 2. experimentu.



Obr. 8.6 Průběh koncentrací DOC v 2. experimentu.



Obr. 8.7 Závislost pH na čase v 2. experimentu.

Na Obr. 8.5 a 8.6 je patrné, že nejrychlejší průběh mikrobiální degradace PVA (rozklad během 24 dní) byl podle očekávání zaznamenán u neadaptovaného kalu za aerobních podmínek, tedy v sérii C. O deset dní později byl PVA rozložen také v inokulu série B, ve kterém byla použita směs adaptovaného denitrifikačního kalu z prvního pokusu a nově odebraného denitrifikačního kalu. Proces rozkladu PVA neadaptovaným kalovým inokulem trval cca 100 dnů a byl tak zjevně kratší než průběh stejného pokusu v prvním experimentu. Částečně bylo možné toto vysvětlit novým odběrem kalu z ČOV (čistírenské kultury nemohou být v různých časech totožné), mohl se však také projevit vliv vyšší vstupní koncentrace dusičnanových iontů ( $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  oproti  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  v prvním pokusu).

U všech sériích lze na Obr. 8.6 sledovat postupné snižování koncentrací rozpuštěného organického uhlíku. Nejrychlejší a zároveň nejstrmější pokles DOC byl zaznamenán u pokusu vzorků série B, kdy směsné inokulum mikroorganismů již bylo na PVA adaptováno, a proto rozklad polymeru probíhal výrazně rychleji než v prvním experimentu, a rychlostí se podobal degradaci v sérii C, u které byla sledována mikrobiální degradace PVA za aerobních podmínek.

U mikrobiální degradace vzorků série A a série B za denitrifikačních podmínek docházelo k postupnému zvyšování hodnot pH (Obr. 8.7), zatímco u vzorků série C se hodnoty pH mírně snižovaly. Tyto trendy v průbězích pH jsou v souladu s obecnými procesy změn pH při mikrobiálních degradacích, kdy při aerobních rozkladech (např. uhlovodíků) pH obvykle mírně klesá, zatímco při denitrifikačních pochodech pH vzrůstá díky spotřebování  $\text{H}^+$  iontů.

Suspenze kalu po úspěšně proběhlé degradaci série B byla opětovně uchována v temnu při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  a použita pro další experimenty. Adaptovaný kal byl pro další experimenty upravován stejnými způsoby jako kal neadaptovaný (Kapitola 7.2.7).

### 8.1.3 Třetí experiment

Cílem třetího experimentu bylo zjistit několik skutečností, především do jaké míry ovlivňuje vstupní koncentrace dusičnanů kinetiku mikrobiální degradace PVA, a také jakou rychlostí bude polymer rozkládán za použití již dvakrát adaptovaného kalu.

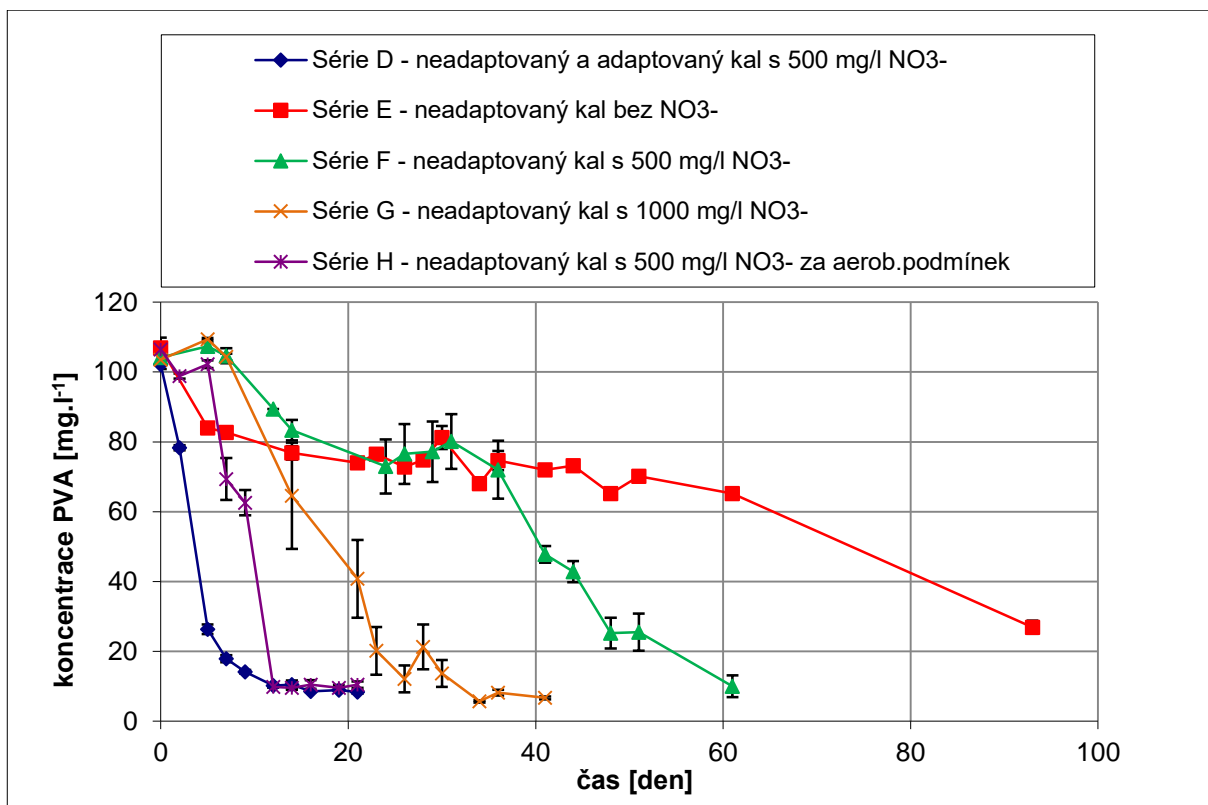
Bylo proto provedeno srovnání průběhů mikrobiální degradace PVA neadaptovaným, čerstvě odebraným čistírenským denitrifikačním kalem, při rozdílné vstupní koncentraci dusičnanových iontů -  $0 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  a

1000 mg.l<sup>-1</sup>. Koncentrace 500 mg.l<sup>-1</sup> dusičnanových iontů byla rovněž použita v pokusu s dvakrát adaptovaným kalem (pomnožený kal z druhého experimentu série vzorků B doplněný čerstvým kalem v poměru 1 : 1). Doplnkově byla ověřena aerobní degradace PVA za přítomnosti dusičnanových iontů.

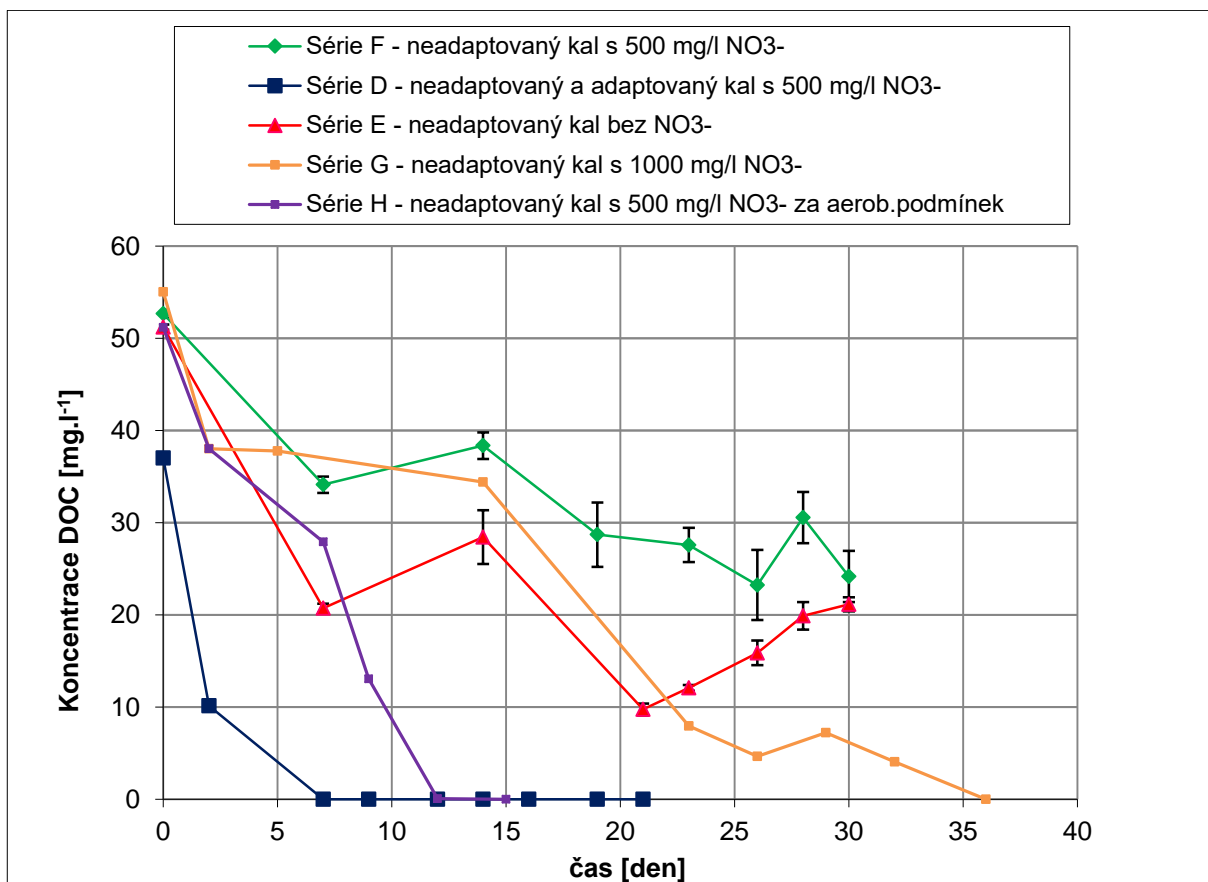
Vstupní hodnota koncentrace PVA v testovacích lahvích byla cca 100 mg.l<sup>-1</sup>. Koncentrace připraveného inokula byla 1,01 g.l<sup>-1</sup>. Počáteční hodnota redox potenciálu u neadaptovaného denitrifikačního kalu byla -42,1 mV, u adaptovaného kalu z druhého experimentu byla -98,6 mV. Počáteční hodnota pH inokula v MM3 byla 7,17. Byly připraveny i slepé pokusy bez PVA. Vzorky byly v testovacích lahvích o objemu 320 ml s pryžovým uzávěrem (denitrifikační pokusy) nebo v lahvích o objemu 1000 ml s plastovým uzávěrem (aerobní pokusy). Vzorky byly odebírány sterilní jehlou přes pryžové septum, nebo, v případě 1000 ml lahví, byly tyto při odběrech otevřené a vzorky byly odebrány asepticky.

Série D obsahovala adaptovaný kal z druhého experimentu ze série B (dvakrát adaptovaný kal) a čerstvě odebraný denitrifikační kal v poměru 1:1, a dále dusičnany s koncentrací 500 mg.l<sup>-1</sup>. Série E obsahovala čerstvě odebraný denitrifikační kal bez přídavku dusičnanů. Série F obsahovala čerstvě odebraný neadaptovaný kal a dusičnany s koncentrací 500 mg.l<sup>-1</sup>, zatímco série G byla obohacena 1000 mg.l<sup>-1</sup> dusičnanových iontů. Poslední série H byla složena z čerstvého denitrifikačního kalu s koncentrací 500 mg.l<sup>-1</sup> dusičnanových iontů, při čemž suspenze byla ponechána v 1000 ml lahvích. Výsledky získané v tomto experimentu jsou graficky dokumentovány na Obr. 8.8 až 8.10.

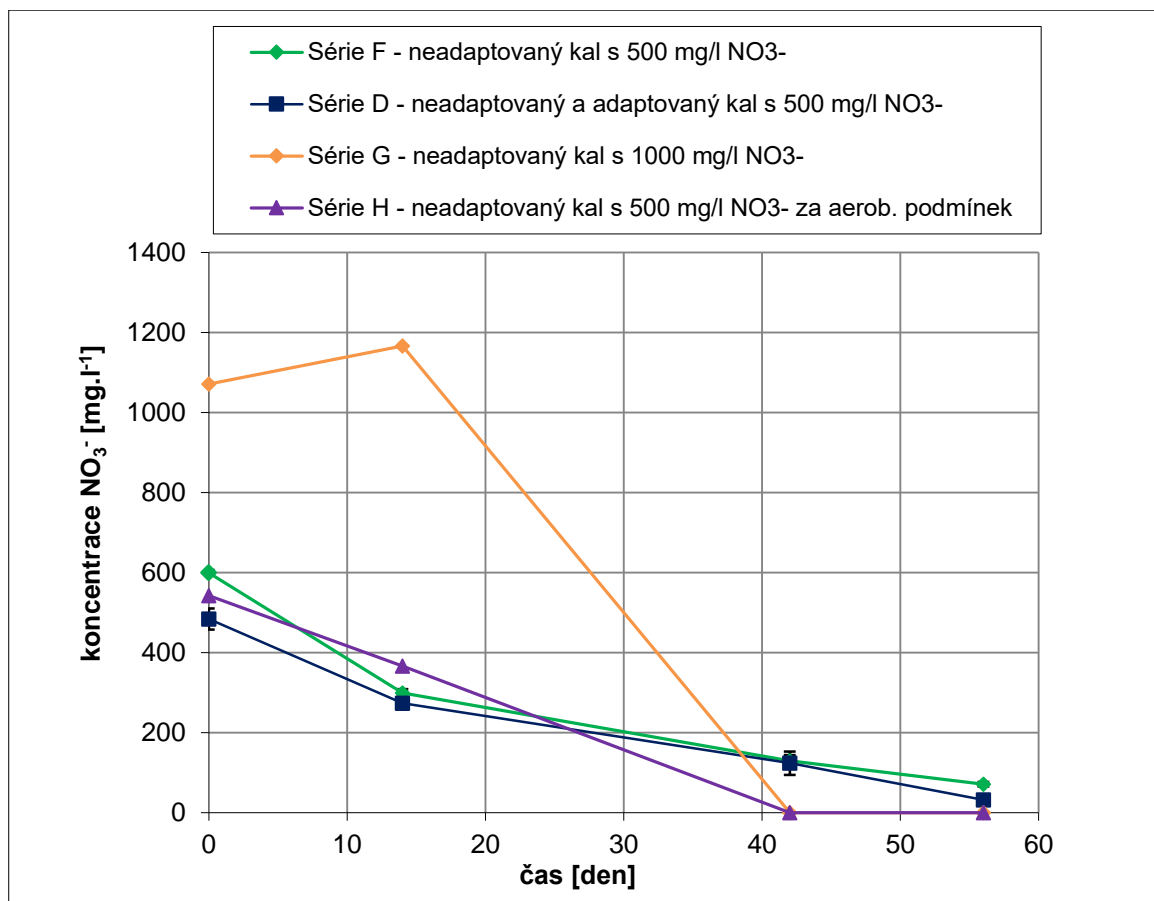




Obr. 8.8 Průběh koncentrací PVA v 3. experimentu.



Obr. 8.9 Průběh koncentrací DOC u vzorků v 3. experimentu.



**Obr. 8.10** Průběh koncentrací NO<sub>3</sub><sup>-</sup> v 3. experimentu.

Z Obr. 8.8 je evidentní, že nejrychleji proběhla mikrobiální degradace PVA ve směsném kalu tj. ve směsi neadaptovaného a dvakrát adaptovaného kalu s přidavkem 500 mg.l<sup>-1</sup> dusičnanových iontů (modrý průběh křivky). Jako druhá nejrychlejší degradace byla zaznamenána u vzorků PVA v neadaptovaném kalu s koncentrací 500 mg.l<sup>-1</sup> dusičnanových iontů probíhající za přístupu kyslíku, tedy za aerobních podmínek. Naopak nejpomaleji probíhala mikrobiální degradace PVA v neadaptovaném kalu bez jakéhokoliv přidavku dusičnanů.

Srovná-li se pouze kinetika mikrobiální degradace PVA (Obr. 8.8) v čerstvě odebraném neadaptovaném kalu s koncentrací dusičnanů 0 mg.l<sup>-1</sup> (série E), 500 mg.l<sup>-1</sup> (série F) a 1000 mg.l<sup>-1</sup> (série G), lze vidět nejkratší průběh degradace u neadaptovaného denitrifikačního kalu s koncentrací dusičnanových iontů 1000 mg.l<sup>-1</sup>. Velmi pozvolný průběh degradace PVA byl zaznamenán i u mikrobiální degradace PVA v denitrifikačním kalu bez přidavku dusičnanů, průběh biodegradace byl ale velmi zdlouhavý a po více jak 90 dnech bylo jeho sledování ukončeno. Studium mikrobiální degradace PVA v neadaptovaném denitrifikačním kalu ukazuje, že kinetika této degradace je do značné míry

ovlivněna koncentrací dusičnanů. S vyšší vstupní koncentrací dusičnanů v denitrifikačním kalu je průběh degradace PVA rychlejší.

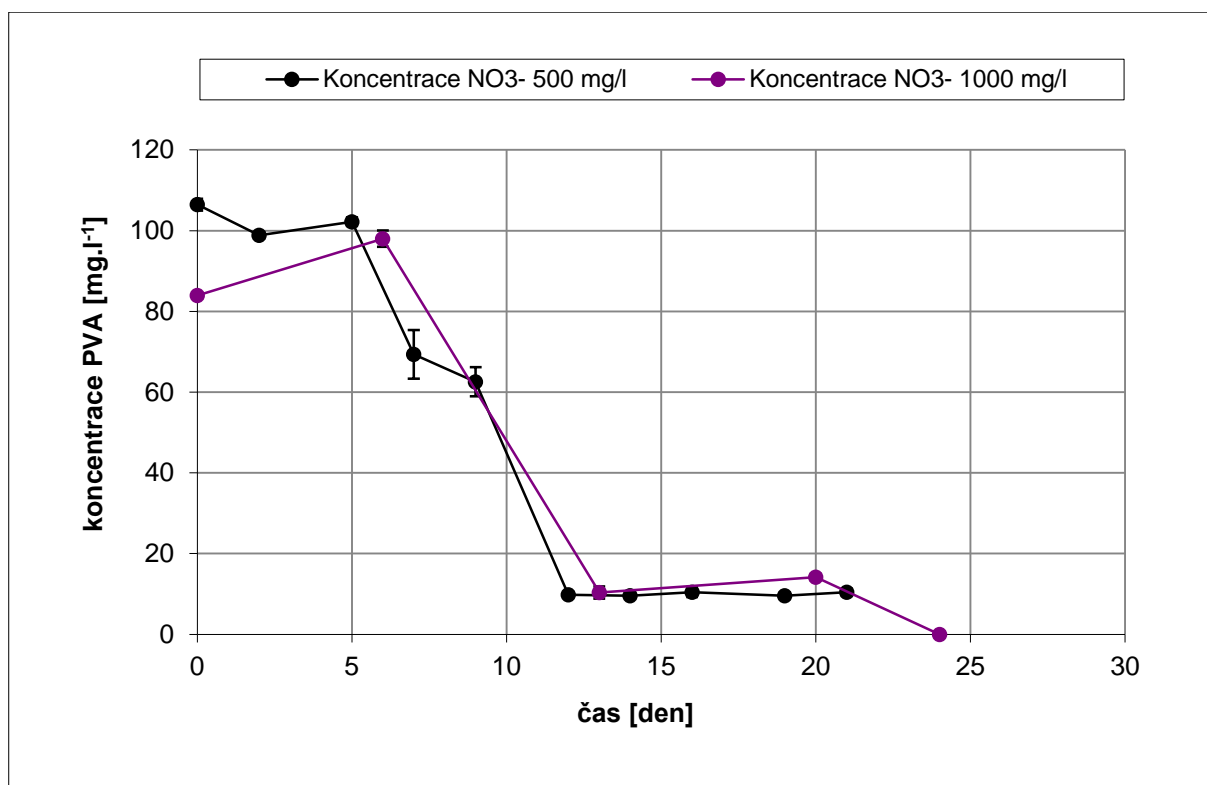
Nejrychlejší pokles množství rozpuštěného organického uhlíku (DOC) byl zaznamenán (Obr. 8.9) u vzorků se směsí dvakrát adaptovaného a neadaptovaného kalu, s koncentrací  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  dusičnanových iontů. Tato směsná kultura mikroorganismů byla již ve dvou předchozích pokusech adaptována na PVA, bylo možné předpokládat významné navýšení počtu degradujících mikroorganismů v ní, a proto byl úbytek DOC tak razantní. PVA byl za uvedených podmínek zcela mineralizován. O pět dní později byl spotřebován DOC také u série H probíhající za aerobních podmínek.

Rychlý úbytek dusičnanů u vzorků s neadaptovaným kalem s koncentrací  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  dusičnanových iontů lze také sledovat na Obr. 8.10. Dusičnanové ionty byly během degradace PVA mikroorganismy rychle spotřebovány, zatímco u vzorků s koncentrací  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  dusičnanových iontů docházelo k pozvolné spotřebě dusičnanů.

#### **8.1.4 Vliv dusičnanů na mikrobiální degradaci PVA za aerobních podmínek**

V předchozích experimentech bylo zjištěno, že mikrobiální degradace PVA také probíhá v neadaptovaném kalu s koncentrací dusičnanů  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  za aerobních podmínek. Cílem této části práce bylo víceméně potvrdit, že přidavek dusičnanů rychlost degradace PVA v čerstvě odebraném neadaptovaném kalu za aerobních podmínek neovlivní.

Pro tento experiment bylo použito stejné neadaptované inokulum jako v předchozím experimentu. Počáteční hodnota redox potenciálu byla  $-42,1 \text{ mV}$ , pH připraveného inokula bylo  $7,17$ . Vstupní hodnota koncentrace PVA byla cca  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  a koncentrace dusičnanů byla  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ . Výsledky jsou znázorněny na Obr. 8.11.



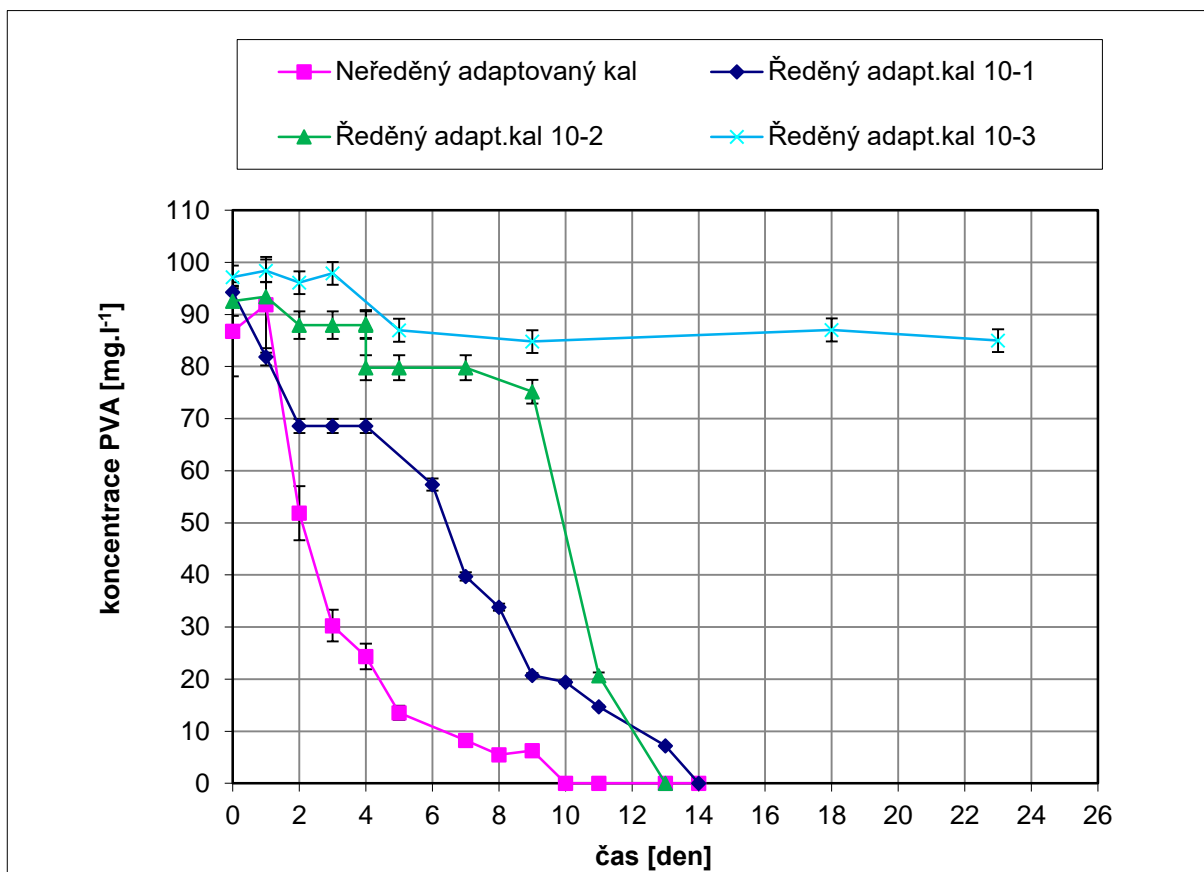
**Obr. 8.11** Závislost mikrobiální degradace PVA na koncentraci dusičnanových iontů.

Obr. 8.11 znázorňuje, že dusičnanové ionty s koncentrací 500 mg.l<sup>-1</sup> a také 1000 mg.l<sup>-1</sup> neměly zásadní vliv na rychlost mikrobiální degradaci PVA v neadaptovaném kalu za aerobních podmínek. Polyvinylalkohol byl mikrobiálně degradován do cca 25 dní v obou případech.

### 8.1.5 Kinetika mikrobiální degradace PVA s různou koncentrací adaptovaného kalu

Cílem dalšího experimentu bylo sledování mikrobiální degradace PVA v adaptovaném kalu s různou koncentrací vícekrát pomnožené adaptované kalové biomasy. Dále byl tento experiment využit pro odběry kalové biomasy, za účelem extrakce DNA, s následným provedením PCR a TGGE, k nekultivačnímu zkoumání bakteriálních zástupců, podílejících se na degradaci PVA za denitrifikačních podmínek.

K práci byl použit adaptovaný kal z třetího experimentu, po úspěšně proběhlé degradaci PVA (Kapitola 8.1.3). Adaptovaný kal byl upraven na hodnotu sušiny 1 g.l<sup>-1</sup> a poté naředěn v rozsahu 10<sup>-1</sup> až 10<sup>-3</sup> pomocí sterilního odkysličeného minerálního média MM3, obsahujícího PVA a dusičnany (příprava Kapitola 7.5.4). Koncentrace dusičnanových iontů byla vždy 1000 mg.l<sup>-1</sup>, pH 7,24 a vstupní hodnota redox potenciálu byla -48,1 mV. Průběh testu je uveden na Obr. 8.12.



**Obr. 8.12** Kinetika degradace PVA v ředěném adaptovaném kalu.

V několikrát adaptovaném kalu, s koncentrací sušiny  $1 \text{ g.l}^{-1}$  (v neředěném kalu), jak znázorňuje Obr. 8.12, byl PVA degradován velmi rychle, během 10 dní. O cca 5 dní později byl PVA mikrobiálně degradován také v adaptovaném kalu s koncentrací sušiny  $0,1 \text{ g.l}^{-1}$  (ředění  $10^{-1}$ ) a rovněž kal ředěný 100x byl schopen - po zdlouhavější úvodní fázi - rozložit polymer do 2 týdnů. Naopak, s dalším vyšším ředěním kalu již mikrobiální degradace PVA prakticky neprobíhala a pokus byl po 3 týdnech ukončen.

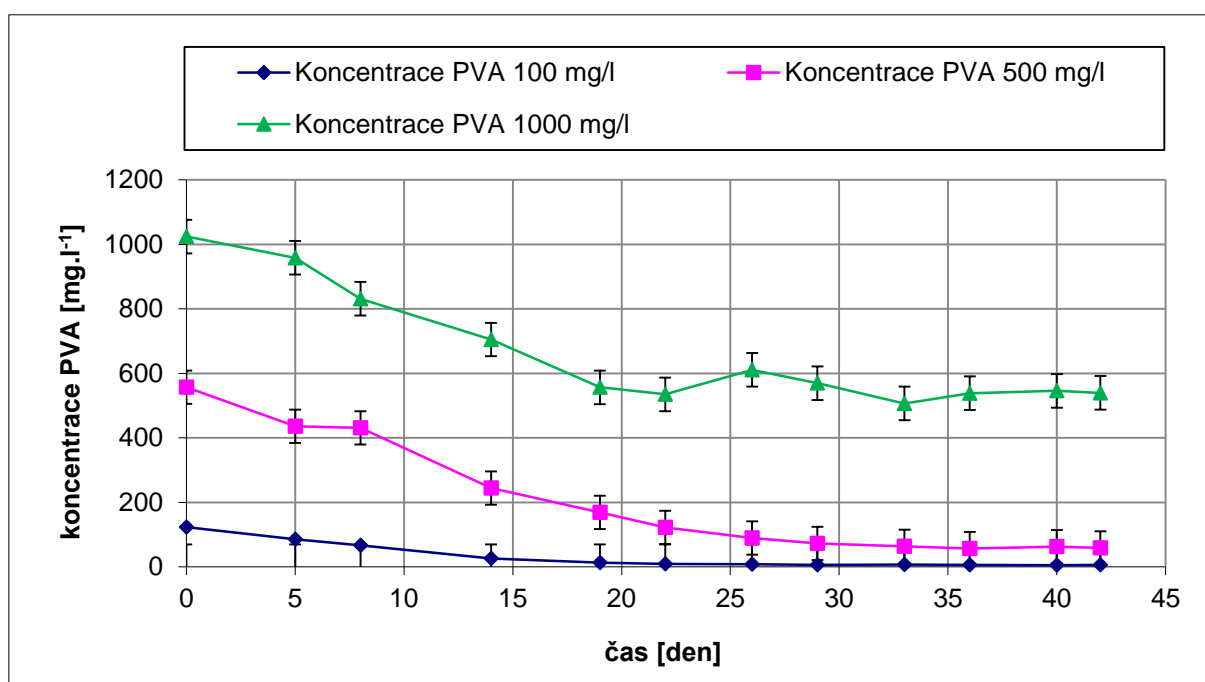
Adaptovaný kal po ukončení experimentu byl vždy uchováván v testovacích lahvích, v temnu, při teplotě  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a také byl kontinuálně míchán.

Získaná kalová biomasa z průběhu pokusů byla použita pro získání bakteriální DNA, pro molekulárně biologickou identifikaci bakterií, podílejících se na rozkladu PVA (spolupráce se souběžně probíhající doktorskou prací L. Husárové, [70, 73, 74]), viz dále.

### 8.1.6 Vliv koncentrace PVA na jeho mikrobiální rozklad

Vliv koncentrace PVA na jeho mikrobiální degradaci byl studován v adaptovaném kalu, s koncentrací dusičnanových iontů  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ . K experimentu byl použit již pětkrát pomnožený adaptovaný kal, použitý v předchozích experimentech. Tento adaptovaný kal byl upraven a smíchan s minerálním médiem MM3, obsahujícím PVA a dusičnany (příprava Kapitola 7.5.4). Hodnota pH připraveného inokula byla 7,35. Vstupní hodnota redox potenciálu adaptovaného kalu byla  $-67,9 \text{ mV}$ .

Byla sledována kinetika mikrobiální degradace PVA, s koncentracemi polymeru  $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ . Koncentrace sušiny připraveného inokula v testovacích lahvích byla  $1 \text{ g.l}^{-1}$ . Získané hodnoty jsou prezentovány na Obr. 8.13.



Obr. 8.13 Mikrobiální degradace PVA v koncentracích 100, 500 a  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Z Obr. 8.13 je patrné, že vícekrát adaptované kalové inokulum bylo při vstupní koncentraci dusičnanových iontů  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  schopno rozkladu několikanásobně vyšší koncentrace PVA než obvyklých  $100 \text{ mg.l}^{-1}$ . I v případě  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  došlo během 5 týdnů téměř k úplné degradaci polymeru a u vstupní koncentrace PVA  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  proběhl rozklad znamenající snížení koncentrace PVA přibližně na polovinu. Je do určité míry pravděpodobné, že dále zvýšená vstupní koncentrace dusičnanů, či případný přídavek dusičnanů v průběhu degradace polymeru by mohly zabezpečit významný rozklad PVA i v uvedené koncentraci  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ ,

jelikož však takové koncentrace jsou v odpadních vodách zcela nereálné, bylo od dalších pokusů tohoto typu upuštěno.

Z řady studií o biodegradaci PVA, např. z práce Julinové a kol. [51], Gartisera a kol. [57], Matsumury a kol. [56] nebo také Jinlana a kol. [61], vyplývá, že čistý PVA je mikrobiálně rozložitelný za aerobních a také, i když podstatně hůře a jen částečně, za anaerobních podmínek. Závěrem této kapitoly lze konstatovat, že tato disertační práce jako první prokázala úplný mikrobiální rozklad PVA za denitrifikačních podmínek v odpadních vodách.

Kinetika mikrobiální degradace byla v převážné většině také ovlivněna mírou adaptace kalové biomasy na tento organický substrát. Vícekrát adaptované kalové inokulum bylo schopno rozložit PVA v koncentraci vyšší než 100 mg.l<sup>-1</sup>. Adaptované inokulum bylo dále využito k nekultivačním metodám popsaných v následujících kapitolách.

## **8.2 Studium bakterií degradujících PVA za denitrifikačních podmínek a pokusy o jejich izolaci**

Současně se studiem mikrobiální degradace PVA ve vodném prostředí denitrifikačního kalu byly realizovány experimenty, zaměřené na studium bakterií odpovědných za rozklad PVA za denitrifikačních podmínek. Experimenty byly rozděleny na kultivační a nekultivační pokusy, které na sebe v některých případech navazovaly, někdy běžely souběžně.

Pro kultivační experimenty, respektive pro pokusy izolací denitrifikačních kultur, rozkládajících PVA, byla použita suspenze vícekrát adaptovaného kalu, u které byla prokázána degradace PVA; v takovém vzorku byl předpokládán zvýšený obsah klíčových bakterií. Postupně byla připravena celá řada živných médií, na kterých byly prováděny vlastní kultivace.

Pro nekultivační experimenty, tedy pro extrakci DNA mikroorganismů, degradujících PVA za denitrifikačních podmínek, byla ve vybraných pokusech degradace PVA adaptovanými kalovými suspenzemi odebírána v určitých časových intervalech biomasa mikroorganismů, z níž byla DNA extrahována příslušnými činidly. Po provedení amplifikace genu pro 16S rRNA pomocí PCR byla následně provedena TGGE, pro rozdělení fragmentů DNA zastoupených bakterií. V některých případech byl tento postup použit za použití specifických primerů i k předběžné identifikaci izolovaných čistých kultur. Tato část práce,

věnovaná nekultivačním metodám studiu příslušných bakterií, byla prováděna ve spolupráci se souběžně probíhající doktorskou prací ing. Husárové [70, 73, 74].

### 8.2.1 Prvotní pokus izolace degradačních bakterií

Cílem této části bylo pokusit se získat čistou mikrobiální kulturu degradující PVA za denitrifikačních podmínek. Byl použit postup, dříve již několikrát na ÚIOŽP úspěšně aplikovaný při izolaci aerobních bakterií, degradujících PVA, spočívající v naočkování povrchu živných agarů s PVA, kde byl polymer jedinou organickou látkou, zředěnou kalovou suspenzí obsahující pomnožené degradační organismy [52, 53, 54].

Postupným zředěním suspenze adaptovaného kalu (pocházejícího z třetího experimentu a navíc ještě dvakrát pomnoženého přidavkem PVA) sterilním fyziologickým roztokem byla získána jeho ředění  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ . Vzorky byly po 20  $\mu$ l asepticky přeneseny na živná média typu ŽP 1 až ŽP 5 a rozetřeny sterilní zahnutou tyčinkou. Živná média ŽP1 a ŽP 5 byla kontrolní, bez PVA, média ŽP 2, ŽP 3 a ŽP 4 obsahovala PVA a buď ještě PQQ nebo kvasničný autolyzát nebo obojí (viz Tabulka 7.1).

Misky obsahující vzorky s ředěním  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  byly kultivovány za anaerobních podmínek v anaerostatu. Misky se vzorky s ředěním  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  byly kultivovány mikroaerofilně v exsikátoru, s částečným odstraněním kyslíku plamenem. Teplota při kultivacích byla  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Po 1,5 měsíci inkubace byly misky prohlédnuty; počet a charakter kolonií, narostlých na různých agarech se stejným ředěním, se však téměř nelišil. Přesto bylo vytipováno několik kultur, které narostly na živných agarech ŽP 4, obsahujících PVA, dusičnany, PQQ a kvasničný autolyzát, kultivovaných mikroaerofilně v exsikátoru. Získané kultury byly pracovníě označeny jako K1, K2, JR a HM. Kultury K1 a K2 byly bíle pigmentující, zatímco kultury JR a HM byly spíše transparentní. Tyto kultury byly přeočkovány na živné agary typu ŽP 2, ŽP 3 a ŽP 4 a kultivované opět mikroaerofilně v exsikátoru. Dále byla přeočkována kultura 2D, z anaerobně kultivovaných misek, která jako jediná vykazovala nepatrně výraznější růst na agaru ŽP 4 oproti kontrolním agarům.

Po opětovném nárůstu kultur byly všechny odzkoušeny na degradaci PVA v tekutém médiu MM4 s dusičnany, včetně zkoušky rozkladu PVA konsorciem složeným ze všech těchto kultur. Koncentrace PVA byla v průběhu testů sledována jodometricky, vzorky odebrané po cca 3 týdnech a dále po 2 měsících kultivace za denitrifikačních podmínek však ukázaly, že hodnoty koncentrací PVA se neustále pohybovaly v blízkosti vstupní koncentrace  $100\text{ mg.l}^{-1}$ . Bylo tak



zjištěno, že kultury K1, K2, JR, HM a 2D polymer za denitrifikačních podmínek nerozkládají, a to ani při společné kultivaci.

Tento prvotní poznatek ukázal, že bakterie rozkládající PVA za denitrifikačních podmínek nebude možné kultivovat za dříve používaných podmínek na uvedených agarech, ale bude nutné se pokusit modifikovat kultivační média, zejména ověřit použití universálnějších živných půd, a také použít nekultivační metody popisu klíčových mikroorganismů.

### **8.2.2 Isolace kultur na živných půdách ŽP 4, ŽP 5 a ŽP 6**

Cílem následujícího pokusu bylo pokusit se o další namnožení degradačních bakterií v kalové suspenzi a současně se pokusit omezit balastní druhy mikroorganismů. Navíc bylo v tomto pokusu odzkoušeno použití universálního isolačního agaru (bez PVA). Tato část práce byla prováděna ve spolupráci s D. Svobodovou v rámci její diplomové práce [18].

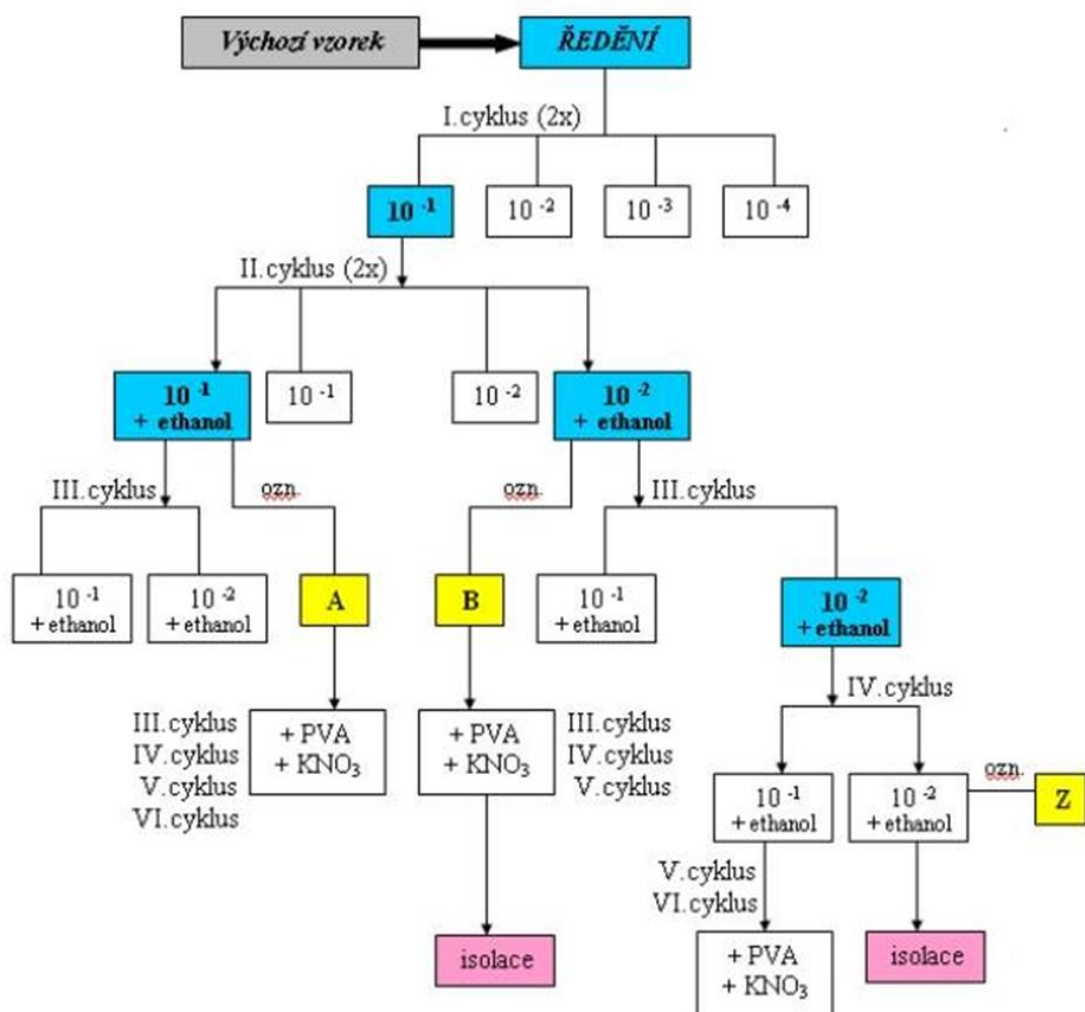
Kalová suspenze z předcházejícího pokusu byla zředěna na hodnoty  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  tekutým minerálním médiem a po přidavku  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  PVA a  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  iontů  $\text{NO}_3^-$  byla všechna ředění inkubována za podmínek identických degradačním testům (= I. cyklus pomnožení). Po 2 týdnech byl jodometricky potvrzen významný úbytek PVA v ředění  $10^{-1}$  (90%) a tato suspenze byla použita pro II. cyklus. Její část byla opětovně zředěna minerálním médiem 10x a 100x (tedy ředění  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ ), obohacena o PVA (již  $150 \text{ mg.l}^{-1}$ ) i  $\text{KNO}_3$ , a inkubována. Každé ředění bylo připraveno ve 4 paralelních lahvích a vždy do dvou bylo před zahájením kultivace přidáno 5  $\mu\text{l}$  ethanolu (na 120 ml vodné fáze), jako rychle dostupného substrátu, pro spotřebování případného zbytkového kyslíku. Po 2 týdnech inkubace byla koncentrace polymeru ve všech lahvích znovu stanovena, s výsledky, jež jsou uvedeny v Tabulce 8.1.

**Tab. 8.1** Konečné koncentrace PVA po provedení II. pomnožovacího cyklu (výchozí koncentrace 150 mg.l<sup>-1</sup>)

Ředění	Koncentrace PVA (mg.l <sup>-1</sup> )
10 <sup>-1</sup>	5,27
10 <sup>-1</sup>	7,07
10 <sup>-1</sup> + ethanol	1,01
10 <sup>-1</sup> + ethanol	2,22
10 <sup>-2</sup>	26,15
10 <sup>-2</sup>	20,76
10 <sup>-2</sup> + ethanol	2,93
10 <sup>-2</sup> + ethanol	5,80

Výsledky tedy ukázaly poněkud nečekaný příznivý vliv přídavku ethanolu na míru rozkladu polymeru, zejména v ředění 10<sup>-2</sup>. Pro další pomnožení proto byly použity tyto suspenze. Suspenze 10<sup>-2</sup> byla rozdělena do dvou částí, z nichž jedna byla dále pomnožována několikerými přídavky PVA a KNO<sub>3</sub>, bez zředování mezi cykly – výsledná suspenze byla označena jako „B“. Druhá část („Z“) byla pomnožována zředěním předcházející suspenze v minerálním médiu, s přídavkem PVA (150 – 200 mg.l<sup>-1</sup>) a KNO<sub>3</sub>. Suspenze 10<sup>-1</sup> z cyklu II byla rovněž použita pro několik dalších pomnožovacích cyklů (označení „A“), nicméně získaná konečná obohacená suspenze k žádným dalším pracím použita nebyla.

Přehledné schéma pomnožování je uvedeno níže, na Obr. 8.14.



Obr. 8.14 Pomnožovací cykly [18].

Výsledky koncentrací PVA na konci posledního cyklu jsou uvedeny v Tabulce 8.2.

Tab. 8.2 Konečné koncentrace PVA po provedení posledních pomnožovacích cyklů (výchozí koncentrace  $200 \text{ mg.l}^{-1}$ )

Série pomnožování	Koncentrace PVA ( $\text{mg.l}^{-1}$ )
A	25,0
B	21,0
Z	10,1

Po ukončení pomnožovacích cyklů byla konečná získaná konsorcia „B“ a „Z“ šetrně desintegrována sterilními skleněnými kuličkami a zředěna desetinným ředěním  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  pomocí minerálního média MM2. Tři ředění z každého vzorku byla naočkována na živná média ŽP 4 (s PVA) a také ŽP 5 (kontrolní, bez PVA), použitá již v dříve, a dále na universální živný agar s obsahem jantaranu a etanolu ŽP 6. Tato živná půda byla použita na základě práce Heylena a kol. [24], který vyhodnotil tyto substráty jako nejvhodnější pro izolaci denitrifikačních bakterií z čistírenských kalů. Kultivace probíhala 2 měsíce v anaerostatu, při teplotě 25 °C.

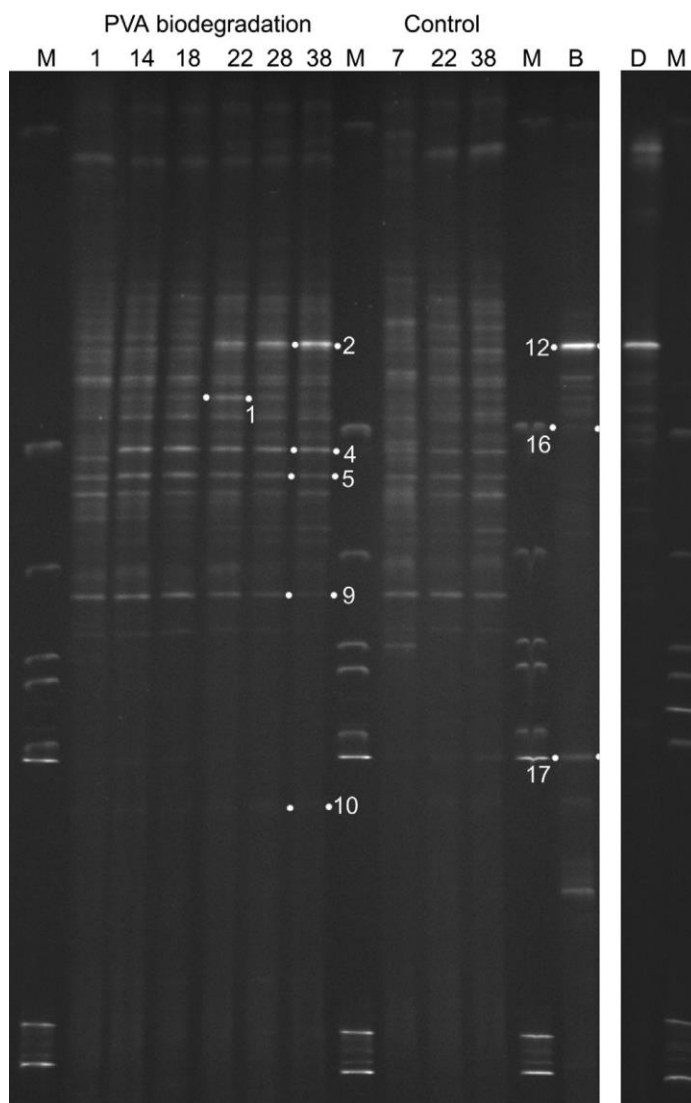
Po kultivaci bylo pro izolaci bakterií využito médium ŽP 6, neboť při srovnávání růstu kolonií na agarech ŽP 4 a ŽP 5 nebyl mezi těmito dvěma agary pozorován žádný rozdíl, který by svědčil o využívání PVA na agaru ŽP 4 – opakoval se tak výsledek z prvního isolačního pokusu. Isolací různých bakteriálních kultur na médiu ŽP 6 se pak věnovala Svobodová [18], která získala z konsorcia „B“ 11 kultur a z konsorcia „Z“ 12 kultur. Ačkoliv většina získaných kmenů byla schopna denitrifikace při využití universálních substrátů (jantaran, ethanol, kvasničný autolyzát), žádná neprokázala schopnost degradace PVA v provedených testech, a to ani v případě společné degradace polymeru všemi kulturami [18].

### 8.2.3 Nekultivační metody

Pro nekultivační studium bakterií, klíčových pro denitrifikační rozklad PVA, bylo využito několika degradačních pokusů s neadaptovaným i různě zředěným adaptovaným kalem, v jejichž průběhu byla kalová biomasa odebírána za účelem následné extrakce bakteriální DNA. Současně byla kalová biomasa odebírána i z kontrolních pokusů, bez PVA.

Po extrakci DNA z jednotlivých vzorků, pocházejících z různých časových bodů degradačního i kontrolního procesu, byla u všech provedena amplifikace genu pro 16S rRNA pomocí PCR a poté byla uskutečněna separace získaných amplikonů pomocí metody TGGE (Kapitola 6.5). Ta umožňuje sledovat zastoupení různých mikroorganismů ve směsných kulturách a nepřímo tak může – v podobě konkrétních bandů – ukázat na potenciální degradéry použitého substrátu (jejichž zastoupení by se mělo v průběhu degradace zvyšovat).

Na Obr. 8.15 je znázorněn TGGE záznam série 6 vzorků z degradačního pokusu a 3 vzorků kontrolních (vždy uvedeny dny odběru), včetně TGGE záznamu konsorcia „B“, popsaného v předchozí kapitole. Vzorek „D“ představuje výchozí kalovou suspenzi, z níž bylo konsorcium „B“ získáno.

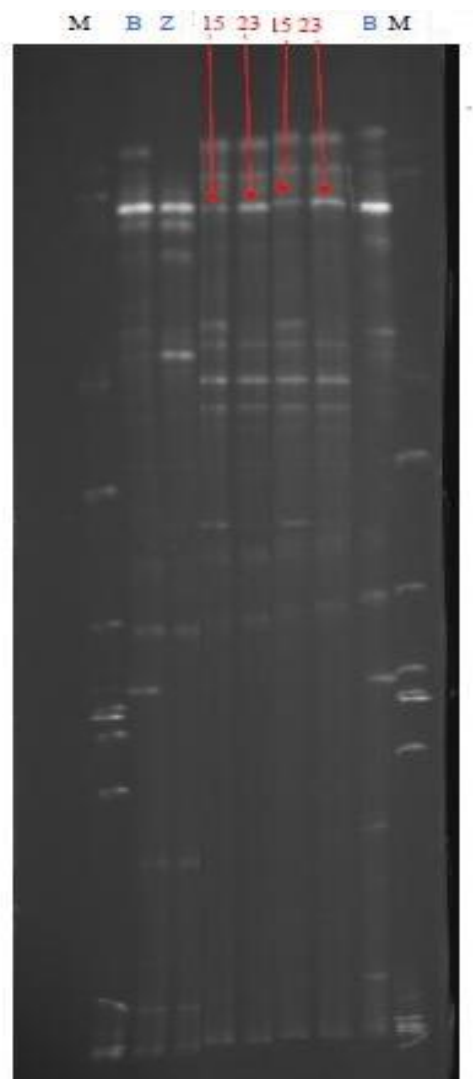


**Obr. 8.15** Záznam z elektroforetické separace amplikonů pomocí TGGE (dny odběru, B, D – konsorcia dle textu výše, M = marker).

Na Obr. 8.15 je dobře patrné, že v průběhu degradace PVA se zvýrazňoval proužek (band) označený číslem 2, a tento band byl rovněž velmi dobře patrný i ve vzorcích adaptované suspenze „D“, i pomnoženého konsorcia „B“, kde byl nejvýraznější. V rámci souběžné práce Husárové [73] byly významné bandy 1 a 2 z gelu vyříznuty a sekvenovány. Band 1 byl shledán blízkým rodu *Brevundimonas*; jeho zvýraznění ve 22. dni degradace PVA a následné vymizení ke konci pokusu by mohlo ukazovat na jeho schopnost využít např. zbytkové acetátové skupiny PVA pro svůj růst. V silně pomnoženém konsorciu „B“ jeho band nijak výrazný nebyl. Signálem stěžejního bakteriálního zástupce se tak ukázal band 2, jehož sekvence vykazovala 97%-ní shodu se sekvencí *Steroidobacter* sp. ZUMI 37 (GenBank AB548216.1) a také se *Steroidobacter denitrificans* (GenBank EF605262.1), popsáným Fahrbachem v roce 2008 [75].

Ten se se svým kolektivem zabýval degradací estradiolu a testosteronu za denitrifikačních podmínek a podařilo se jim izolovat tento nový druh bakterie. Ve své práci použili mikrobiální společenstvo z čistírenského kalu a sledovali degradaci uvedených hormonálních látek za anoxických podmínek s přidavkem dusičnanů. Čistá kultura byla poté získána po několika opakovaných sériích kultivací na agarech, obsahujících sledované látky a dusičnany, kdy po 6 týdnech inkubace byly odebrány kolonie se žlutohnědým zabarvením, diskovitého tvaru. Čistá kultura byla ověřena z pohledu degradace steroidů přenesením do tekutých minerálních médií s obsahem estradiolu nebo testosteronu. Koncentrace dusičnanů, dusitanů i úbytek sledovaných látek v průběhu degradací pak byly sledovány chromatograficky. Na základě úspěšně proběhlých degradací byl izolovaný kmen podroben detailnímu zkoumání a popsán jako nový druh bakterie pod názvem *Steroidobacter denitrificans*. Z pohledu kultivačních vlastností bylo zjištěno, že kromě steroidů využívá tento druh ke svému růstu jen omezené množství substrátů: propionát, glutamát a acetát. Autoři v práci rovněž uvádí, že *Steroidobacter denitrificans* neroste na běžných agarových médiích [75].

Nekultivačnímu vyšetření byl podroben i vzorek konsorcia „Z“ a porovnán se vzorkem konsorcia „B“ – toto je uvedeno na Obr. 8.16, spolu se vzorky kalových suspenzí z pokusu degradace PVA, odebranými v 15. a 23. den rozkladu.



**Obr. 8.16** TGGE záznam konsorcií „B“ a „Z“.

I tento obrázek dokumentuje, že obě pomnožovací varianty (zředovací i bez zředování) vedly k získání konsorcií s významným zastoupením bakteriálního kmene, reprezentovaného bandem 2, využívajícího použitý polymer ke svému růstu.

Význam rodu *Steroidobacter* při denitrifikační degradaci PVA byl potvrzen i kvantitativním zastoupením tohoto rodu v biomase kalu, v průběhu rozkladu polymeru. Tyto práce byly provedeny na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlově v Praze Dr. V. Navrátilem a pomocí kvantitativní PCR byl podíl rodu *Steroidobacter* v celkovém zastoupení bakterií vyjádřen v %, jež se v průběhu rozkladného procesu významně zvyšovaly – viz následující Tabulka 8.3.

**Tab. 8.3** Podíl rodu *Steroidobacter* v celkovém zastoupení bakterií kalu v průběhu denitrifikační degradace PVA

Doba degradace	Podíl rodu <i>Steroidobacter</i> (%)
1	0,02
14	0,13
22	7,7
38	16

#### 8.2.4 Pokusy izolací na živných agarech s přidavkem kalové suspenze

V tomto pokusu bylo snahou ověřit možnost, že degradační kultura vyžaduje pro svůj růst či degradaci PVA určitou látku od některých dalších mikroorganismů přítomných v kalových suspenzích. Byly proto připraveny jak PVA agary, již použité dříve (ŽP 4), tak PVA agary s přidavkem autoklávované kalové suspenze (ŽP 7 – 9), kde agar ŽP 8 byl kompletní, ostatní kontrolní bez PVA, resp. bez dusičnanů. Na všechny uvedené agary byla naočkována ředění  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  vzorku z konsorcia „B“ a inkubovány jak anaerobně, tak mikroaerofilně.

Po několikátýdenní kultivaci byly misky prohlédnuty, nicméně na agaru ŽP 8 nebyly nalezeny žádné odlišné kolonie či kolonie výrazně odlišných velikostí než na agaru ŽP 4. Jedinou nepatrně odlišnou kulturou byla kultura s koloniemi hnědé pigmentace, která teoreticky mohla odpovídat Fahrbachovu popisu r. *Steroidobacter*. Proto byla tato kultura, pracovníčně označená jako DH1, asepticky odebrána a naočkována křížovým roztěrem na různá živná média a později identifikována pomocí zjištění sekvence podstatné části genu pro 16S rRNA. Srovnání získané sekvence s databází GenBank však ukázalo, že jde o bakterii *Alicyclophilus denitrificans*, protože získaná sekvence vykazovala 99%-ní shodu se záznamy NR\_074585.1 a NR\_025510.1, patřícími tomuto druhu.

#### 8.2.5 Získání nevyvločkových konsorcií

Protože průvodním jevem dosavadních pokusů o izolaci degradační kultury bylo silné vločkování všech použitých kalových vzorků a konsorcií, komplikující ředění vzorků, byl učiněn pokus získat jemnou buněčnou suspenzi bez tvorby vloček a také pokusit se stanovit alespoň řádové množství degradujících bakterií v adaptovaném kalu.



Bylo použito konsorcium „B“ se schopností rozkladu PVA, které bylo výrazněji desintegrováno buď sterilními skleněnými kuličkami, nebo sterilním mořským pískem. Po provedené desintegraci byly vzniklé suspenze mikroskopicky zkontrolovány a byla vybrána suspenze desintegrovaná skleněnými kuličkami (výraznější desintegrace vloček).

Následně byla tato suspenze ředěna sterilním minerálním médiem s obsahem PVA a dusičnanů, a to ve sterilních skleněných vialkách s plynotěsnými silikonovými septy a uzávěry. Desetinné ředění ve vialkách bylo v rozsahu od  $10^{-1}$  po  $10^{-7}$ , provedeno duplicitně. Koncentrace PVA byla  $280,9 \text{ mg.l}^{-1}$ . Inkubace vialek probíhala v temnu při  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 2 měsíců. Během inkubace byly asepticky odebrány vzorky a koncentrace PVA byla kontrolována jodometricky. Výsledky jsou vedeny v Tabulce 8.4.

**Tab. 8.4** Koncentrace PVA v průběhu degradace zředěnými desintegroványými suspenzemi (výchozí koncentrace  $280,9 \text{ mg.l}^{-1}$ )

Ředění	Koncentrace PVA [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	
	1. měsíc degradace	2. měsíc degradace
$10^{-1}$	14,1	3,05
$10^{-1}$	27,6	0,80
$10^{-2}$	74,5	0,44
$10^{-2}$	90,6	1,89
$10^{-3}$	87,8	2,54
$10^{-3}$	115,9	0
$10^{-4}$	82,0	0
$10^{-4}$	107,5	5,30
$10^{-5}$	197,2	29,21
$10^{-5}$	248,4	0
$10^{-6}$	267,7	0,87
$10^{-6}$	81,3	74,60
$10^{-7}$	274,2	264,6
$10^{-7}$	265,6	259,9

Po 2 měsících degradace nebyl polymer rozložen jen v nejvyšším ředění, řádový počet degradačních bakterií v původní dezintegrované suspenzi tak byl

min.  $10^6$  buněk v 1 ml. Navíc, suspenze ředěné  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  již byly po 2 měsíční degradaci jen slabě vyvločkovány.

Pro další pokus izolace byla vybrána suspenze ředěná  $10^{-5}$ , s nulovou konečnou koncentrací PVA. Ta byla také desintegrována sterilními skleněnými kuličkami a ředěna desetinným ředěním v rozsahu od  $10^{-1}$  po  $10^{-5}$ . Pro izolaci kultur byl použit PVA agar s vitamíny (ŽP 10) a universální živný agar s kvasničným autolyzátem, tryptonem a sojovým peptonem (ŽP 11).

Po cca 4 týdnech bylo z PVA agarů s vitamíny, kultivovaných v anaerostatu i mikroaerofilně, s ředěním  $10^{-4}$ , vybráno 5 různých kolonií a ty přeočkovány na stejné agary a také na kontrolní půdy pouze s vitamíny, bez PVA. Ze stejného typu živné půdy, ale s ředěním  $10^{-5}$ , byly přeočkovány další 3 typy kolonií. Z agarů ŽP 11 bylo přeočkováno 5 kultur.

Navíc, z misek s PVA agary s nízkým ředěním ( $10^{-2}$ ), tedy s hustým nárůstem srostlých kolonií, byly kličkou odebrány 2 směsné vzorky biomasy, zahrnující několik různých kultur. Tyto dva směsné vzorky, označené KO1 a KO2, byly ihned naočkovány do tekutého minerálního média MM4 s PVA a dusičnany a inkubovány. V stejných tekutých médiích (ale s přidavkem MEMs vitamínů) byly také ověřovány všechny získané čisté kultury, včetně kultury společné.

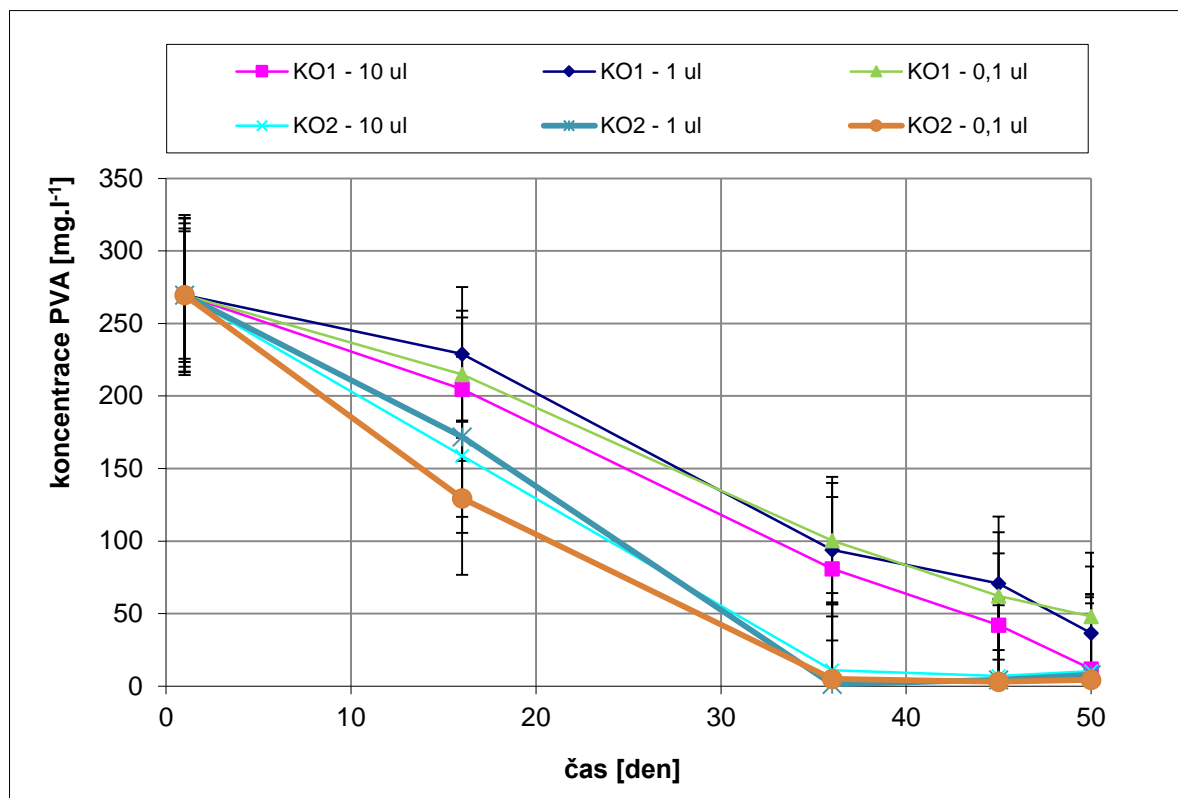
Po 4 týdenní kultivaci tekutých médií byly odebrány vzorky, u kterých byla stanovena koncentrace PVA jodometrickou metodou, výsledky uvádí Tabulka 8.5.

**Tab. 8.5** Koncentrace PVA po degradaci v tekutém médiu získanými kulturami a konsorcií (výchozí koncentrace 280 mg.l<sup>-1</sup>)

<b>Kultura</b>	<b>Koncentrace PVA [mg.l<sup>-1</sup>]</b>
<b>1</b>	259,59
<b>2</b>	277,46
<b>3a</b>	256,47
<b>3b</b>	267,52
<b>4</b>	269,91
<b>5</b>	280,89
<b>6</b>	286,11
<b>7</b>	294,01
<b>8</b>	289,89
<b>9</b>	267,11
<b>10</b>	277,09
<b>12</b>	235,62
<b>13</b>	252,80
<b>Společná (1 – 13)</b>	272,80
<b>Konsorcium KO1</b>	2,03
<b>Konsorcium KO2</b>	2,83

Z Tabulky 8.5 je patrné, že ani po 4 týdenní kultivaci nebyla u čistých kultur, pracovně označených jako 1 až 13, zaznamenána žádná degradace PVA. Naopak, konsorcia s pracovním označením KO1 a KO2 spotřebovala prakticky veškerý polymer ke svému růstu, a navíc ani jedno konsorcium nevytvářelo makroskopicky viditelné vločky, obě vytvářely jemnou buněčnou suspenzi se stejným zrnem.

Pro ověření degradačních schopností konsorcií KO1 a KO2 byla provedena opakovaná degradace PVA v tekutém médiu MM4, s počáteční koncentrací PVA 269,9 mg.l<sup>-1</sup>. Objemy 40 ml tohoto média ve sterilních vialkách byly asepticky naočkovány 0,1 µl, 1 µl a 10 µl obou konsorcií a kultivovány. Úbytek PVA v průběhu rozkladu je graficky znázorněn na Obr. 8.17.



**Obr. 8.17** Průběh rozkladu PVA konsorcií KO1 a KO2 za denitrifikačních podmínek.

Z výsledků je patrné, že směsná mikrobiální kultura KO2 rozkládala PVA o něco rychleji než KO1, a že neexistoval zásadní rozdíl v rychlosti degradace při použití různých objemů inokul. Konsorcium KO2 bylo proto použito do dalšího isolačního experimentu.

### 8.2.6 Isolace kultur na živných půdách s gellanem a při prodloužené kultivaci

Na základě výsledků získaných v experimentu popsaném výše bylo konsorcium KO2 naočkováno v několika ředěních na soubor živných půd. Ten zahrnoval R2A agar s dusičnany (ŽP 12), ředěný R2A agar s glutamátem a dusičnany (a ztužený přídatkem gellanu - ŽP 13) a PVA gel bez agaru, kde byl jako ztužovací prostředek použit jen gellan (ŽP 14). Použití glutamátu bylo vedeno snahou podpořit růst r. *Steroidobacter*, zatímco použitím gellanu bylo sledováno omezení množství agaru. Inkubace misek probíhala paralelně v anaerostatu za anaerobních podmínek a také v exsikátoru za mikroaerofilních podmínek, v temnu při teplotě  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

Po 6 týdnech kultivace byly misky prohlédnuty a izolovány kultury z R2A agaru (ŽP 12), který vykazoval větší rozmanitost kolonií než zředěný R2A agar;

tyto kmeny byly označeny R1 až R6. Z misek z nízkého ředění bylo dále získáno směsné konsorcium z bohatého nárůstu biomasy (označeno RS), obdobně jako konsorcia KO1 a KO2 dříve. PVA gel byl rovněž využit pro izolaci narostlých kultur, byly označeny jako H1 a P1 až P7.

U všech kultur byla provedena zkouška degradace PVA za denitrifikačních podmínek v tekutém médiu; výsledky degradací PVA jsou uvedeny v Tabulce 8.6.

**Tab. 8.6** Konečné koncentrace PVA při degradačním testu (6. týden degradace; výchozí koncentrace PVA 284.7 mg.l<sup>-1</sup>)

<b>Kultura</b>	<b>Koncentrace PVA [mg.l<sup>-1</sup>]</b>
<b>H1</b>	254,5
<b>P1</b>	269,2
<b>P2</b>	251,6
<b>P3</b>	266,3
<b>P4</b>	296,4
<b>P5</b>	267,9
<b>P6</b>	245,8
<b>P7</b>	277,2
<b>H1 + P1 – P7</b>	276,6
<b>Konsorcium RS</b>	2,9

Výsledky tedy opětovně ukázaly, že žádná z jednotlivých kultur, ani jejich směsná společná kultura, nebyly rozkladu polymeru schopny. Prakticky obdobně proběhly testy s kulturami R1 až R6, avšak rozklad PVA byl zjištěn u konsorcia RS (koncentrace PVA po 6 týdnech 2.9 mg.l<sup>-1</sup>), získaného z misek s nízkým ředěním vzorku.

Společně s výše uvedenými zkouškami byla ještě dodatečně provedena kontrola misek s PVA agarem a vitamíny, z pokusu popsáno v Kapitole 8.2.5, které byly ponechány v anaerobní kultivaci po dobu celkově 10 měsíců. Z misek s ředěním 10<sup>-5</sup> byly izolovány 4 přítomné kultury, s nepatrně odlišnými koloniemi, a s nimi byly poté provedeny obvyklé denitrifikační degradace. Protože šlo o relativně nadějně získané kultury, byla provedena i jejich rodová

identifikace pomocí zjištění částečné sekvence genu pro 16S rRNA. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8.7, včetně kontrolního testu degradace PVA s inokulem konsorcia KO2.

**Tab. 8.7** Rodová identifikace získaných kultur a koncentrace PVA v degradačních zkouškách, kultury Z1 – Z4 (výchozí koncentrace PVA 276.7 mg.l<sup>-1</sup>)

Kultura	Identifikace	Shoda (%)	Koncentrace PVA [mg.l <sup>-1</sup> ]	
			3. týden	6. týden
Z1	<i>Afipia</i>	96	280,2	268,3
Z2	<i>Mesorhizobium</i>	95	214,0	187,0
Z3	<i>Afipia</i> <i>/Pseudomonas</i>	96	290,4	284,0
Z4	<i>Pseudomonas</i>	98	290,2	281,7
Z1+Z2+Z3+Z4	---	-	278,1	269,8
KO2	---	-	66,13	0

Jak ukazují výsledky identifikací i degradací, zásadní kulturu r. *Steroidobacter* se ani po deseti měsíční kultivaci získat nepodařilo; nepřímo tak byl opět prokázán klíčový význam tohoto mikroorganismu, neboť jakýkoliv pokus degradace PVA bez jeho přítomnosti skončil neúspěšně.

### 8.2.7 Kultivace na živných půdách při extrémně prodloužené kultivaci

Jako poslední možnost byla ověřena kultivace několika ředění směsné kultury KO2 na zředěném a modifikovaném R2A agaru, doplněném o vitamíny a octan sodný (ŽP 15). Tato spíše universální živná půda byla použita vzhledem k neúspěchu předcházejících ztužených živných půd, zejména půd s PVA. Konsorcium KO2 bylo naředěno sterilním fyziologickým roztokem a ředění 10<sup>-3</sup> 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-6</sup> byla naočkována na plochu celých petriho misek. Po mírném odsušení byly misky inkubovány v anaerostatu i v exsikátoru při 25 °C.

Po 1 roce inkubace byly misky prohlédnuty a ředění 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-4</sup> vyřazeny vzhledem k nárůstu velkého množství kolonií, vzájemně slitých do nepřehledné biomasy. Na miskách inkubovaných v exsikátoru bylo v ředění 10<sup>-5</sup> patrné značné množství (150 – 200) velmi drobných kolonií, připomínající již dříve získané a identifikované bakterie r. *Afipia*, dále cca 20 kolonií bakterie *Alicyclophilus*

*denitrificans* a několik žlutozelených kolonií, které byly po přeočkování a po provedení základních testů a NEFERMtestu identifikovány jako *Pseudomonas* sp. Na miskách s ředěním  $10^{-6}$  byl však počet kolonií domnělých bakterií r. *Afipia* výrazně nižší než by odpovídalo desetinnému ředění, a tak bylo usouzeno, že by se na miskách s ředěním  $10^{-5}$  mohly mezi jejími koloniemi nacházet i podobné, zatím morfologicky neodlišitelné kolonie další bakterie. Kultivace byla proto dále prodloužena a závěrečná kontrola byla učiněna po 25 měsících. Při ní bylo skutečně zjištěno, že na miskách s ředěním  $10^{-5}$  se mezi koloniemi r. *Afipia* nacházejí velmi drobné, jen cca 0,5 mm velké, okrouhlé, průhledné a pravidelné kolonie, které doposud na žádném ztuženém živném médiu nebyly nepozorovány. Od kolonií r. *Afipia* byly přes malou velikost již dobře odlišitelné. Zajímavostí bylo to, že ačkoliv počet těchto kolonií na miskách  $10^{-5}$  dosahoval 80 – 90, na miskách  $10^{-6}$  nebyly nalezeny žádné kolonie stejného typu.

Z misek  $10^{-5}$  bylo proto provedeno přeočkování neznámých kolonií (isolát byl pracovníčně označen jako N1), stejně jako přeočkování kolonií r. *Afipia* a r. *Alicyclophilus*. Paralelně byly izoláty naočkovány v čistých kulturách a i ve dvojicích do MM s PVA a dusičnany, pro zjištění degradačních vlastností.

Pro zjištění, zda je kultura N1 skutečně zástupcem rodu *Steroidobacter*, byla provedena izolace její DNA z cca 10 kolonií, amplifikována primery specifickými pro r. *Steroidobacter*, navrženými již dříve prof. Koutným, a produkt byl znázorněn gelovou elektroforézou. Výsledek tohoto postupu však opět byl negativní, tj. k vytvoření produktu nedošlo. Tento výsledek tak vyloučil možnost, že by kultura N1 byla hledaným mikroorganismem. Pokus však ukázal, že v konsorciu KO2 se skrývají kultury, vyžadující pro dobré odlišení od jiných poměrně značné kultivační doby; lze tak částečně soudit, že podobný, extrémně pomalý růst, může být důvodem dosavadní nemožnosti kultivačního získání bakterie r. *Steroidobacter*.

Po tomto zjištění, že prakticky žádná izolovaná kultura není schopna samostatné degradace polymeru, ani v definované směsné kultuře s ostatními kulturami, získanými v témže pokusu, byly pokusy o izolaci degradačního kmene ukončeny.

Konsorcia KO1, KO2 a RS byla po centrifugaci zamražena při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v glycerolu a jsou nadále uchovávána v mikrobiologické laboratoři Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně.

### 8.2.8 Diskuse k rodu *Steroidobacter*

Během první fáze doktorské práce, věnované degradacím PVA kalovými suspenzemi, byla známa pouze jediná práce Fahrbaacha, pojednávající o tomto rodu. Teprve poté, po několika letech pokusů o izolaci kultury *Steroidobacter* sp. PD, byly o bakteriích rodu *Steroidobacter* publikovány další práce.

Tyto studie dokládají, že bakterie rodu *Steroidobacter* se vyskytují jak ve vodním, tak také v půdním prostředí. Pro sledování jejich zastoupení byly ve většině studií využity nekultivační metody, založené na molekulárně biologických postupech.

Jedna z významných prací, využívající nekultivační metody k popisu izolovaných mikroorganismů, patří studie Yuichiho a kol. [76]. Ten se také zabýval studiem a popisem nových mikroorganismů degradujících PVA, vyskytujících se na rostlinách, v odpadních vodách a v půdách. K identifikaci mikroorganismů využil nekultivační metody, založené mj. na sekvenaci genu pro 16S rRNA. Ze získaných kultur studoval zejména isolát Zumi 37 (AB548216), patřící do třídy Gammaproteobacteria, který zprvu vykazoval značnou podobnost s rodem *Steroidobacter* (98% podobnost 16S rDNA). Na základě detailních fylogenetických, fyziologických, biochemických a taxonomických analýz však nakonec autoři navrhli, aby byl Zumi 37 klasifikován jako nový rod i druh v rámci Gammaproteobakterií, pro který navrhli název *Povalibacter uvarum*. Na rozdíl od r. *Steroidobacter* rostla tato kultura na komplexních médiích dobře a tvořila po 3 dnech kultivace světle hnědé, okrouhlé, hladké kolonie. Byl potvrzen rozklad PVA, antracenu a fenantrenu [76].

Studie Chen Honga a kol. [77], dokládající přítomnost r. *Steroidobacter* v půdách, zkoumala přírodní bioremediační konsorcia, vyskytující se v půdách kontaminovaných těžkými kovy. Autoři zjistili, že zatímco četnost původně dominantních rodů se výrazně snížila s rostoucím znečištěním, zastoupení rodů *Massilia*, *Arthrobacter*, *Flavisolibacter*, *Roseiflexus* a také *Steroidobacter* vzrostlo [77].

Cébron a kol. [78] použili pro detekci bakterií, vyskytujících se v zemině kontaminované PAH, metody PCR a TGGE. V takto kontaminovaných půdách je sice mikrobiální komunita hojně zastoupena, ale její aktivita je ovlivněna množstvím živin, proto autoři studovali vliv přídavku minerálů, dřevěných pilin a organického materiálu na aktivitu mikroorganismů. Zjistili, že přídavkem těchto substrátů došlo ke zvýšení míry degradace PAH a mezi zastoupenými bakteriemi byl rovněž nalezen rod *Steroidobacter* [78].



Wuttichai a kol. [79] studovali mikrobiální rozmanitost vodních sedimentů v Thajsku, v období po velkých povodních roku 2011. K popisu mikrobiálních společenstev také využili PCR + DGGE a zjistili, že jako dominantní rody se v sedimentech vyskytovaly rody *Anaeromyxobacter*, *Steroidobacter* a *Geobacter*, zatímco ve vodách převažovali zástupci rodů *Sulfuricurvum*, *Thiovirga* a *Hydrogenophaga* [79].

Gong a kol. [80] jako jeden z mála vykultivoval z půdy bakteriální kmen degradující mikrocystin, pracovně označený CPCC 100154. Nejprve bylo zjištěno, že je příbuzný s druhy *Steroidobacter agariperforans*, *S. denitrificans* a *Poivalibacter uvarum*, ale podrobná fylogenetická analýza ukázala, že je zástupcem odlišného druhu, pro nějž bylo navrženo jméno *Steroidobacter flavus* [80].

Kromě výskytu v půdách, Correa-Galeote a kol. [81] potvrdili přítomnost bakterií r. *Steroidobacter* také v rhizosféře, a to u kukuřice rostoucí v Peruánských Andách. K popisu rhizosférických bakteriálních společenstev využili PCR a pyrosekvenaci a zjistili, že mezi 16 nejvíce zastoupenými rody (z 309) se také nacházel rod *Steroidobacter* [81].

Z uvedených studií tedy vyplývá, že rod *Steroidobacter* je zřejmě obecně zastoupen ve vnějším prostředí, a to jak ve vodním, tak také v půdním, a že je také v některých případech významným činitelem degradací polutantů.

## 9. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Cílené studie mikrobiální degradace syntetických polymerů představují jednu z cest výzkumu, vedoucí k získání znalostí o osudu syntetických látek v prostředí a o jejich chování v průběhu čistírenských procesů.

Disertační práce se zabývala sledováním mikrobiální degradace PVA za denitrifikačních podmínek, a také některými možnostmi izolace mikroorganismů rozkládající PVA za daných podmínek.

Polyvinylalkohol patří mezi polymery s velmi dobrou rozpustností ve vodě a s širokou škálou využití v průmyslovém odvětví. Díky své rozpustnosti se PVA stává hlavním znečišťovatelem životního prostředí. Velkým přínosem pro vědu spočívá v tom, že disertační práce jako první zkoumala proces biodegradace polymeru za denitrifikačních podmínek. Jelikož se řada studií zabývala degradací PVA za aerobních podmínek a menší část za anaerobních podmínek ve vodném prostředí, bylo tak rozšířeno spektrum znalostí o biodegradabilitě PVA za denitrifikačních podmínek.

Dalším přínosem pro vědu bylo objasnění, jaký rod bakterií hraje klíčovou roli při bakteriálním rozkladu PVA za daných podmínek. Řadou experimentů zabývajících se pokusy o izolaci mikrobiální kultury degradující PVA bylo potvrzeno, že běžnými kultivačními metodami nelze hledaný druh bakterie vypěstovat. Nicméně bylo prokázáno, že směsnou velmi aktivní degradační kulturu lze v laboratorních podmínkách získat v podobě nevločkové suspenze.

Hlavním přínosem disertační práce pro praxi bylo prokázání, že mikrobiální rozklad PVA, jako široce používaného polymeru, není omezen jen na aerobní prostředí. PVA je mikrobiálně degradovatelný také za denitrifikačních podmínek, přičemž rychlost mikrobiální degradace je do značné míry ovlivněna charakterem společenstva mikroorganismů, především zastoupením druhů s potřebným enzymovým vybavením. Bylo prokázáno, že mikrobiální rozklad PVA může probíhat v čistírenských kalech, i když tam není jeho rychlost zřejmě vysoká.

## 10. ZÁVĚR

Studium mikrobiální degradace PVA bylo zaměřeno na dvě hlavní části. První část se zabývala studiem mikrobiální degradace PVA za denitrifikačních, aerobních a anaerobních podmínek v denitrifikačním kalu. Druhá část byla zaměřena na izolaci mikroorganismů degradujících PVA za denitrifikačních podmínek.

V disertační práci bylo prokázáno, že PVA je mikrobiálně degradovatelný za denitrifikačních podmínek, a to jak v neadaptovaném, tak zejména v adaptovaném kalu. Rychlost degradace PVA za denitrifikačních podmínek je tak závislá na adaptaci mikroorganismů na tento organický substrát. Rovněž koncentrace dusičnanů ( $0 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$ ) měla vliv na mikrobiální degradaci; nejrychlejší průběh mikrobiální degradace PVA byl zaznamenán v adaptovaném kalu s přídatkem s  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  dusičnanových iontů. Rozklad PVA bez dusičnanů byl velmi zdlouhavý a ne zcela úplný.

Pro sledování mikrobiálních degradérů a jejich výskyt v průběhu degradace polymeru byly využity nekultivační metody, a to ve významné spolupráci s doktorskou prací Husárové [70, 73, 74]. Tyto metody byly založené na extrakci DNA z biomasy mikroorganismů, amplifikaci části genů pro 16S rRNA pomocí PCR a separaci amplikonů pomocí TGGE. Tímto způsobem bylo prokázáno, že klíčovou roli při rozkladu polymeru má bakteriální rod *Steroidobacter*, jehož podíl se v biomase degradačního kalu významně zvyšoval.

Pro izolaci mikroorganismu rozkládajícího PVA bylo připraveno 6 druhů minerálních médií a řada živných agarů. Pro pokusy izolace byla využita mikrobiální kultura z adaptovaného kalu, dále ještě obohaceného několika pomnožovacími cykly. Postupným zředováním získaných suspenzí a jejich kultivací na živných agarech byly získány čisté kultury. Degradční schopnosti těchto kultur byly zároveň kontrolovány zaočkováním minerálních médií, obsahujících PVA, těmito kulturami. Většina čistých mikrobiálních kultur byla sice schopna denitrifikace, ale u žádné z nich nebyla prokázána degradace PVA za uvedených podmínek. Byla však získána konsorcia, pracovně označená jako KO1, KO2 a RS, která prokázala degradaci PVA za denitrifikačních podmínek. Tato mikrobiální konsorcia jsou uložena v mikrobiologické laboratoři FT a lze je využít k dalším studiím možností izolací čisté kultury degradující PVA.

## 11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] STATISTA: Production of plastics worldwide from 1950 to 2013 [online]. ©2015[cit.2015-10-18].  
Dostupné z: <http://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950>
- [2] Plastics Europe: Plastics – the facts 2013 [online]. ©2015 [cit. 2015-10-18]. Dostupné z:  
[http://www.plasticseurope.org/documents/document/20131014095824-final\\_plastics\\_the\\_facts\\_2013\\_published\\_october2013.pdf](http://www.plasticseurope.org/documents/document/20131014095824-final_plastics_the_facts_2013_published_october2013.pdf)
- [3] VROMAN, I., et al., Biodegradable polymers. *Materials* 2009, 2, 307-344; DOI: 10.3390/ma2020307, ISSN 1996-1944.  
Dostupné z: [www.mdpi.com/1996-1944/2/2/307/pdf](http://www.mdpi.com/1996-1944/2/2/307/pdf)
- [4] SHIMAO, M., et al., Biodegradation of plastics. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, Vol. 12, pp. 242-247.
- [5] PREMRAJ, R., et al., Biodegradation of polymers. *Indian Journal of Biotechnology*, 2005, Vol. 4, pp. 186-193.
- [6] MARCHESSAULT, R. H., et al., Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 2005, Vol. 6, No. 1, pp. 1-8.
- [7] LEWANDOWICZ, G., et al., Polymer biodegradation and biodegradable polymers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2010, Vol. 19, No. 2, pp. 255-266.
- [8] ZEE, M., et al., Structure-biodegradability relationships of polymeric materials. Vydání: University of Twente, Dizertační PhD práce, Holandsko, ©1997, ISBN 90-365-0958-0.
- [9] FRITZ H, G., et al., Study on production of thermoplastics and fibers based mainly on biological materials. European Commission Directorate-General XII, Science, Research and Development: Biodiversity, Crops and Agroecosystems Research Division, 1994, pp. 392, ISSN 1018-5593.
- [10] MARUŠINCOVÁ, H., Studie možností biologického odstraňování polyvinylpyrrolidonu, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009.
- [11] SPAIN, J., et al., Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water Cores from Estuarine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 198, Vol. 40, No. 4, pp. 726-734.

- [12] SHAH, A. A., et al., Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, June 2008, Vol. 26, No. 3, pp. 246-265. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- [13] SHAH, A. A., et al., Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, April 2014 Vol. 98, No. 8, pp: 3437–3447, DOI 10.1007/s00253-014-5558-1.
- [14] AZEVEDO, H., et al., Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine. Chapter: Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers, and strategies to control their degradation rate, Vydání: CRC PRESS, October 2004, pp. 177, ISBN 9780849319365 - CAT# 1936.
- [15] EINSLE, O., et al., Structural basis of denitrification. *Biological Chemistry*. October 2004, Vol. 385, No. 10. pp. 875–883, DOI 10.1515/BC.2004.115.
- [16] LETTINGA, G., et al., Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, April. 1980, Vol. 22, Issue: 4, pp. 699-734, DOI: 10.1002/bit.260220402.
- [17] GERARDI, M., et al., Nitrification and denitrification in the activated sludge process. ©2002, John Wiley and Sons, Inc., New York, ISBN 978-0-471-06508-1. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=ccIKuXYNIBMC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=ccIKuXYNIBMC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- [18] SVOBODOVÁ, D., Studium denitrifikačních mikroorganismů při biodegradaci polymerů. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011.
- [19] ZHANG, L., et al., Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of environmental sciences*, 2007, 19(11), pp. 1293-1297.
- [20] DUNCAN, M., et al., Handbook of water and wastewater microbiology. School of Civil Engineering, University of Leeds, UK, Academic press. ©2003, Elsevier, ISBN 0-12-470100-0. Dostupné z: <http://w3.ualg.pt/~hgalvao/MicroMarinha/REadingMaterial/Handbook%20of%20Water%20and%20Wastewater%20Microbiology.pdf>
- [21] MATSUMURA, S., et al., Effects of molecular weight and stereoregularity on biodegradation of poly(vinyl) alcohol by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters*, November 1994 Vol. 16, No. 11, pp. 1205-1210.

- [22] KHAN, S. T., et al., Isolation and characterization of a New Poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, denitrifying bacterium from activated sludge. *Fems Microbiology Letters*, 2001, Vol. 205, pp. 253-257.
- [23] SHINODA, Y., et al., Aerobic and Anaerobic Toluene Degradation by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium. *Thauera Sp Strain DNT-1*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, Vol. 70, pp. 1385-1392.
- [24] HEYLEN, K., et al., Cultivation of denitrifying bacteria: Optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, Vol. 72, pp. 2637-2643.
- [25] BONARTSEVA, G.A., et al., Aerobic and anaerobic microbial degradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, Vol. 109, pp. 285-301, DOI: 10.1385/ABAB:109:1-3:285
- [26] HARDER, J. et al., Anaerobic mineralization of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. *Arch Microbiol*, 1997, Vol. 167, pp. 269-274, DOI: 10.1007/s002030050442.
- [27] KNIEMEYR, O., et al., Anaerobic mineralization of quaternary carbon atoms: Isolation of denitrifying bacteria on dimethylmalonate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, Vol. 65, pp. 3319-3324, DOI: 10.1128/AEM.69.3.1866–1870.2003.
- [28] AMBROSOLI, R., et al., Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. *Chemosphere*, 2005, Vol. 60, pp. 1231–1236, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.02.030.
- [29] CHANG, B. V., et al., Microbial dechlorination of PCBs in anaerobic sewage sludge. *Chemosphere*, 1999, Vol. 39, pp. 45–54, DOI: 10.1016/s0045-6535(98)00587-6.
- [30] CHANG, B. V., et al., Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, 2002, Vol. 48, pp. 717–724, ISSN
- [31] RIVAS, D., et al., MALDI-TOF MS Imaging evidences spatial differences in the degradation of solid polycaprolactone diol in water under aerobic and denitrifying conditions. *Science of the Total Environment*, 2016, Vol. 566–567, pp. 27–33, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.090.
- [32] PAULO, A.M.S., et al., Anaerobic degradation of sodium dodecyl sulfate (SDS) by denitrifying Bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, Vol. 84, pp 14-20, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00564.x.

- [33] YING, G.G., et al., Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 2006, Vol. 32, pp. 417-431, DOI:10.1016/j.envint.2005.07.004.
- [34] SAXENA, S.K., Polyvinyl alcohol (PVA). *Chemical and Technical Assessment (CTA)*, First draft, © FAO 2004.
- [35] FOCHT, D., et al., Nitrification and denitrification processes related to waste water treatment. April 1975, Vol. 19, pp. 153-186, DOI 10.1016/S0065-2164(08)70428-3.
- [36] KURARAY POVAL, Technical data sheet, [online]. © 2015 [cit. 2015-10-15]. Dostupný z:  
[http://www.kuraray.eu/fileadmin/Downloads/Poval/technical\\_data\\_sheets/TDS\\_KURARAYPOVAL\\_ENGLISCH\\_SINGLESHEET\\_18\\_08\\_2014.pdf](http://www.kuraray.eu/fileadmin/Downloads/Poval/technical_data_sheets/TDS_KURARAYPOVAL_ENGLISCH_SINGLESHEET_18_08_2014.pdf)
- [37] MATSUMURA, S., et al., Novel poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism. 1999, *Macromolecules* 32, pp. 7753-7761.
- [38] KIM, J., et al., Structure and properties of poly(vinyl alcohol)-modified mortar and concrete. *Cement and Concrete Research*, March 1999, Vol. 29, No. 3, pp. 407–415, DOI: 10.1016/S0008-8846(98)00246-4.
- [39] JIANG, S., et al., PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, October 2011, Vol. 4, No. 7, pp. 1228 – 1233.
- [40] DEMERLIS, C.C., et al., Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*, March 2003, Vol. 41, No. 3, pp. 319 – 326, PMID: 12504164.
- [41] DŘÍMAL, P., et al., Biologická rozložitelnost polyvinyl alkoholu půdními mikroorganismy. *Plasty kaučuk*, 2007, Vol. 34, No. 3-4, pp. 79-84, ISSN 0322-7340.
- [42] CHIELLINI, E., et al., Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based blown films under different environmental conditions. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 64, No. 2, May 1999, pp. 305–312, DOI: 10.1016/S0141-3910(98)00206-7.
- [43] FINK, J. K., et al., *Handbook of engineering and speciality thermoplastic*. Vol. 2, Water Soluble Polymers, ©2011, Scrivener Publishing LLC. ISBN: 978-1-118-06275-3, [cit. 2015-10-15].  
Dostupné z:  
<https://books.google.cz/books?id=xAaGfxx5ctMC&pg=PT8&lpg=PT8&dq=Handbook+of+Engineering+and+Speciality+Thermoplastic,+Volume+>

[2+Water+Soluble+Polymers+by+Johannes+Karl+Fink,+2011&source=bl&ots=XQtRSz4IU8&sig=WukJhRYPJIDgb0L3eYctpWd-cBo&hl=cs&sa=X&ved=0CEAQ6AEwBGoVChMIybqp\\_JzwyAIVil4UC h2IaQOF#v=onepage&q=Handbook%20of%20Engineering%20and%20Speciality%20Thermoplastic%2C%20Volume%202%20Water%20Soluble%20Polymers%20by%20Johannes%20Karl%20Fink%2C%202011&f=false](https://www.google.com/search?q=Handbook%20of%20Engineering%20and%20Speciality%20Thermoplastic%2C%20Volume%202%20Water%20Soluble%20Polymers%20by%20Johannes%20Karl%20Fink%2C%202011&source=bl&ots=XQtRSz4IU8&sig=WukJhRYPJIDgb0L3eYctpWd-cBo&hl=cs&sa=X&ved=0CEAQ6AEwBGoVChMIybqp_JzwyAIVil4UC h2IaQOF#v=onepage&q=Handbook%20of%20Engineering%20and%20Speciality%20Thermoplastic%2C%20Volume%202%20Water%20Soluble%20Polymers%20by%20Johannes%20Karl%20Fink%2C%202011&f=false)

- [44] CHIELLINI, E., et al., Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science*, 2003, 963-1014.
- [45] SUZUKI, T., et al., Some characteristics of *Pseudomonas* 0–3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1973, Vol. 37, No. 4, pp. 747-756.
- [46] MORI, T., et al., Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades poly(vinyl alcohol). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1996, Vol. 60, No. 2, pp. 330-332. ISSN:0916-8451.
- [47] KAWAI, F., et al., Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, Vol. 84, No. 2, pp. 227-237, DOI: 10.1007/s00253-009-2113-6, [cit. 2015-10-15].  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2113-6>
- [48] CHOI, K., et al., Polyvinyl alcohol degradation by microbacterium *barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 in Dyeing wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, [online]. 2004, Vol. 14, No. 5, pp. 1009-1013, [cit. 2015-10-15].  
Dostupné z: [http://210.101.116.28/W\\_files/kiss2/05209033\\_pv.pdf](http://210.101.116.28/W_files/kiss2/05209033_pv.pdf)
- [49] ZHANG, Y. F., et al., A new strain, *Streptomyces venezuelae* GY1, producing a poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, Vol. 22, No. 6, pp. 625 – 628.
- [50] SOLARO, R., et al., Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) with different molecular weights and degree of hydrolysis. *Polymer Advanced Technologies*, 2000, Vol. 11, No. 8-12, pp. 873-878.
- [51] JULINOVÁ, M., et al., Podmínky ovlivňující biologickou rozložitelnost PVA a modifikovaných fólií, *Plasty a kaučuk*, 2005, Vol. 42, No. 9-10, pp. 17-22, ISSN 0322-7340.
- [52] ZEMAN, P., Vliv přídatných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007.



- [53] NEDBÁLEK, M., Vliv podmínek prostředí na biodegradaci polyvinylalkoholu, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008.
- [54] VÁCLAVKOVÁ, T., Studium mikroorganismů významných při rozkladu polyvinyl alkoholu. Disertační práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009.
- [55] PŠEJA Jiří, et al., Anaerobic biodegradation of blends based on polyvinyl alcohol. *Journal of Polymers and the Environment*, 2006, Vol. 14pp. 185-190, DOI 10.1007/s10924-006-0009-4.
- [56] MATSUMURA, S., et al., Anaerobic biodegradability of polyvinyl alcohol. *Biotechnology Letters*, 1993, Vol. 15, No.7, pp.749-754, DOI: 10.1007/BF01080150.
- [57] GARTISER, S., et al., Assessment of several test methods for the determination of the anaerobic biodegradability of polymers. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1998, vol. 6, pp. 159–173, DOI: 10.1023/A:1021869530253.
- [58] JULINOVÁ, M., et al., Biodegradace polyvinylalkoholu za přítomnosti pyrrollochinolinchinonu a specifických substrátů. *Plasty a kaučuk*, 2006, Vol. 43, No. 5-6, pp. 9-12.
- [59] JULINOVÁ, M., et al., Influence of technological process on biodegradation of PVA/Waxy starch blends in an aerobic and anaerobic environment. *Journal of Polymers and the Environment*, 2008, Vol. 16, No. 4, pp. 241–249, DOI 10.1007/s10924-008-0109-4.
- [60] KOPČILOVÁ, M., et al., Biodegradability and mechanical properties of poly(vinyl alcohol)-based blend plastics prepared through extrusion method. *Journal of Polymers and the Environment*, 2012, Vol. 21, No. 1, pp. 88–94, DOI 10.1007/s10924-012-0520-8.
- [61] JINLAN, X., et al., Pilot study on characteristics of anaerobic biodegradation of PVA. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2004, Vol. 10, pp. 30-34.
- [62] ESTROFF, L.A, et al., At the interface of organic and inorganic chemistry: Bioinspired synthesis of composite materials. *Chemistry of Materials*, 2001, 13(10), pp. 3227-3235.
- [63] SPEIGHT, J.G., et al., *Lange's handbook of chemistry*. Vol. 1, New York: McGraw-Hill, 2005.
- [64] PEARSON, T.H., Comparative measurement of the redox potential of marine sediments as a rapid means of assessing the effect of organic

- pollution. *Marine Biology*, August 1979, Vol. 53, Issue: 4, pp. 371-379, DOI: 10.1007/BF00391620.
- [65] FINLEY, J. H., et al., Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coatings. *Analytical Chemistry*, December 1961, Vol. 33, No. 13, pp. 1925 – 1927.
- [66] WORLD HEALTH ORGANIZATION, Guidelines for drinking water quality. World Health Organization, 2004.
- [67] ALBERTS, B., *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing, 2008. ISBN 978-0-8153-4106-2.
- [68] SOBEL, R., Využití metody TGGE pro studium vybraných bakterií mléčného kvašení, [online]. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012.
- [69] MUYZER, G., et al., DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, Elsevier Science Ltd, 1999, Vol. 2, pp. 317 – 322, ISSN 1369-5274.
- [70] HUSÁROVÁ, L., Studium biodegradace polymerních materiálů s využitím kombinace konvenčních a molekulárně biologických metod. Disertační práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2014.
- [71] McDONALD, K., et al., Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International journal of food microbiology*, 1999, 52(1), pp. 1-27.
- [72] COLLINS, C.H., et al., *Microbiological methods*. Microbiological methods, 1967, 2nd Edition.
- [73] HUSÁROVÁ, L., et al., Biodegradation of synthetic polymers: application of TGGE. *Ecology of Soil Microorganisms*, 27. 4. – 1. 5. 2011, Prague, Czech Republic.
- [74] HUSÁROVÁ, L., et al., Use of temperature gradient gel electrophoresis for the investigation of poly(vinyl alcohol) biodegradation. *International Conference on Development, Energy, Environment, Economics (DEEE 10)*, Nov. 30 – Dec. 2, 2011, Puberto De La Cruz, Tenerife, ISBN 978-960-474-253-0, ISSN 1792-6653.
- [75] FAHRBACH, M., et al., *Steroidobacter denitrificans* gen.nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, Vol. 58, pp. 2215-2223.
- [76] YUICHI, N., et al. *Povalibacter uvarum* gen. nov., sp. nov., a polyvinylalcohol-degrading bacterium isolated from grapes. *International*

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2014), 64, 2712–2717 DOI 10.1099/ijs.0.062620-0.
- [77] HONG, Ch., et al., Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environ Sci Pollut Res* (2015) 22: pp.10788–10799, DOI 10.1007/s11356-015-4186-3.
- [78] CÉBRON, A., et al., Impact of clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res* (2015) 22:13724–13738 DOI 10.1007/s11356-015-4117-3.
- [79] Wuttichai Mhuantong a kol., Survey of Microbial Diversity in Flood Areas during Thailand 2011 Flood Crisis Using High-Throughput Tagged Amplicon Pyrosequencing. *PLOS ONE*, DOI:10.1371/journal.pone.0128043 May 28, 2015.
- [80] GONG, ZL., et al., *Steroidobacter flavus* sp nov., a microcystin-degrading Gammaproteobacterium isolated from soil. *Antonie van Leeuwenhoek international journal of general and molecular microbiology*, 2016, Vol.: 109, Issue: 8, pp: 1073-1079, DOI: 10.1007/s10482-016-0706-5.
- [81] CORREA-GALEOTE, D., et al., Bacterial Communities in the Rhizosphere of Amilaceous Maize (*Zea mays* L.) as Assessed by Pyrosequencing. *Frontiers in plant science*, 2016, Vol.: 7, Article Number: 1016, DOI: 10.3389/fpls.2016.01016.

## 12. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

### Příspěvky v mezinárodních časopisech s impact faktorem ( $J_{imp}$ )

1. **Marušincová H.**, Husárová L., Růžička J., Ingr M., Navrátil V., Buňková L., Koutný M., Polyvinyl alcohol biodegradation under denitrifying conditions, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, Vol. 84, pp. 21-28.  
IF = 2,235 (2013), 6 citací ve WoS (ke dni 12. 1. 2017)
2. Julinová M., Kupec J., Houser J., Slavík R., **Marušincová H.**, Červenáková L., Klívar S. Removal of polyvinylpyrrolidone from wastewater using different methods, *Water Environment Research*, 2012, Vol. 84, No. 12, pp. 2123-2132.  
IF = 1,134 (2012), 2 citace ve WoS (ke dni 12. 1. 2017)

### Příspěvky na mezinárodních kongresech, symposiích a konferencích (D)

1. **Marušincová H.**, Hubáčková J., Kupec J., Růžička J., Biodegradation of oxidized polyvinylpyrrolidone (pre)treated by Fenton's reagent or photo-oxidation reaction; 37th International Conference of SSCHE, May 24-28, 2010, Tatranské Matliare, Slovakia, p. 75, ISBN 978-80-227-3290-1.
2. **Marušincová H.**, Růžička J., Houser J., Biodegradation of polyvinylalcohol under denitrifying conditions; 25th Congress of ČSSM, September 15-18, 2010, Stará Lesná, Slovakia, p. 126, ISBN 970-80-970477-8-8.
3. Růžička J., **Marušincová H.**, Julinová M., Ošťádalová K., Význam minerálních solí při biodegradaci polyvinylalkoholu; 25. Kongres ČSSM, September 15-18, 2010, Stará Lesná, Slovenská republika, str. 34, ISBN 970-80-970477-8-8.
4. Husárová L., Růžička J., **Marušincová H.**, Koutný M., Use of temperature gradient gel electrophoresis for the investigation of poly(vinyl alcohol) biodegradation; International Conference on Development, Energy, Environment, Economics (DEEE 10), Nov. 30 – Dec. 2, 2011, Puberto De La Cruz, Tenerife, ISBN 978-960-474-253-0, ISSN 1792-6653.

### Ostatní výsledky (O)

1. Husárová L., **Marušincová H.**, Růžička J., Wunderlichová L., Koutný M.: Biodegradation of synthetic polymers: application of TGGE. Ecology of Soil Microorganisms, 27. 4. – 1. 5. 2011, Prague, Czech Republic

## 13. CURRICULUM VITEA

Osobní údaje:

**Jméno a příjmení:** Ing. Hana Dostálková, rozená Marušincová  
**Datum a místo narození:** 7. 8. 1985  
**Adresa:** Machová 234, 763 01 Mysločovice  
**Email:** hana.dostalkova@email.cz

### Vzdělání:

2009 – dosud	Univerzita Tomáš Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, navazující doktorské studium oboru Technologie makromolekulárních látek
2007 – 2009	Univerzita Tomáš Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, navazující magisterské studium oboru Inženýrství ochrany životního prostředí
2004 – 2007	Univerzita Tomáš Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, bakalářské studium oboru Chemie a technologie materiálů
2000 – 2004	Gymnázium Otrokovice, všeobecné vzdělání

### Zaměstnání:

#### **2012 – současnost – Fatra, a.s.**

instrumentální analýzy – hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie, reologie polymerů, infračervená spektroskopie a termální analýzy (DSC, TG), FMV, ITT, řešení reklamací, projektů v rámci TAČR, vstupní a výstupní kontrola surovin a výrobků; provádění interních auditů.

#### **2011 – 2012 – Česká inspekce životního prostředí**

oddělení odpadového hospodářství – kontrola a dohlížení dodržování zákonů životního prostředí, realizace kontrol, vedení správních řízení.

#### **2009 – 2011 - Výzkumný záměr, Univerzita T. Bati Zlín**

výzkum se zaměřením na biodegradaci polymerů.

## **Dosažené zvýšení kvalifikace v oboru**

- Potvrzení o absolvování kurzu základů vědecké práce 2009, Akademie věd České republiky
- Certifikát za účast na odborné podujatí 25. Kongrese ČSSM 2010 "Mikroorganizmy a kvalita života", 2010
- Osvědčení pod číslem VVÚ/4/2011 o absolvování vstupního vzdělávání úvodního pro nové zaměstnance
- Osvědčení pod číslem SŘ/2/2011 o účasti na semináři Správní řád
- Osvědčení pod číslem VVÚ IA/2/2011 o absolvování vzdělávání úvodního v integrovaných agendách
- Osvědčení pod číslem CIZP/235 úspěšném absolvování kurzu: školení NEWTON Dictate (uživatelská znalost software a pravidla správného diktování)
- Osvědčení pod číslem SŘP/43/2012 o účasti na semináři Správní řád pro pokročilé
- Osvědčení o absolvování 13. ročníku Školy hmotnostní spektrometrie pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Mercí a Katedrou analytické chemie Univerzity Pardubice, 2012
- Osvědčení o absolvování kurzu "Kurz plynové chromatografie" pod vedením Doc. Ing. J. Čáslavský, CSc., prof. Ing. V. Janda, CSc. a pan K. Petrus
- Certifikát o absolvování kurzu Základy FTIR spektroskopie a ovládání programu Omnic, Nicolet CZ, 2014
- Osvědčení kurz hmotnostní spektrometrie pod vedením Doc. Ing. J. Čáslavský, CSc., Doc. Ing. Ivan Víden, CSc. a pan K. Petrus a RNDr. P. Kořínek
- Certifikát komunikační a prezentační dovednosti, Tempo training and consulting, a.s., 2013
- Osvědčení Kurz Ovládání programu XCalibur pod vedením Ing. J. Malbeck, CSc., Ing. L. Plaček, Ph.D., Mgr. M. Tyleček
- Osvědčení Seminář Reologie v praxi pod vedením doc.RNDr. P. Štern, CSc., Ing. M. Klimovič
- Osvědčení č.63/2015 Interní auditor integrovaného systému QMS a EMS, 2015
- Certifikát Kurz Program TQ Analyst, Nicolet CZ, 2015
- Osvědčení o absolvování kurzu Měření vibračních spekter, Nicolet CZ, 2015
- Osvědčení o absolvování 16. ročníku Školy hmotnostní spektrometrie pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Mercí a Katedrou analytické chemie Univerzity Pardubice, 2015

## **Účast na grantových projektech:**

*V rámci studia na Univerzitě Tomáš Bati ve Zlíně:*

- IGA 5/FT/10/D Biodegradabilita polyvinylalkoholu za denitrifikačních podmínek.

*V rámci zaměstnání ve společnosti Fatra, a.s.:*

- TH01030054 - Možnosti zpracování odpadní PES cupaniny a dalšího technologického odpadu (TAČR).
- TE02000006 - Centrum alternativních ekologicky šetrných vysoce účinných antimikrobiálních prostředků pro průmyslové aplikace (TAČR).

## **Práce byla podpořena těmito projekty:**

**2009 – 2011:** Výzkumný záměr MŠMT ČR č. MSM 7088352101

**2013:** projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně č. IGA/FT/2013/013.