

Biodegradace syntetických polymerů bakteriemi rodu *Sphingomonas*

Bc. Markéta Měrková

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Měrková**
Osobní číslo: **T12370**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biodegradace syntetických polymerů bakteriemi rodu Sphingomonas**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na schopnost bakterií rodu *Sphingomonas* rozkládat různé kontaminující látky a na popis polyvinylalkoholu a polyvinylpyrrolidonu.
2. Provedte zkoušky rozkladu polyvinylalkoholu různými inokulý bakterií rodu *Sphingomonas*.
3. Provedte testy rozkladu polyvinylpyrrolidonu bakteriemi rodu *Sphingomonas*, případně jeho směsnými inokulý s dalšími druhy bakterií.
4. Výsledky přehledně zpracujte požadovanou formou a diplomovou práci odevzdejte v písemné i elektronické podobě v předepsaném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Odborné práce získané z vědeckých databází, především z Web of Science, SCOPUS, ScienceFinder a Medline.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan





doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 5.5.2014



.....

²¹ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²² zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho díla u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývala biodegradací syntetických polymerů bakteriemi rodu *Sphingomonas*. V teoretické části se nachází stručná charakteristika polyvinylalkoholu, polyvinylpyrrolidonu a charakteristika vlastností bakterií rodu *Sphingomonas*.

V praktické části byly prováděny degradační testy polyvinylalkoholu bakteriemi rodu *Sphingomonas* v závislosti na míře inokulace. Do degradačních lahví bylo dávkováno různé množství bakteriální suspenze, tak aby bylo dosaženo výchozí koncentrace buněk od 10^0 po 10^7 buněk/ml. Takto bylo zjištěno, že hustota buněk prodlužuje lagovou fázi rozkladu polyvinylalkoholu, ale podstatně neovlivňuje rychlost následné degradace.

Dále byly v praktické části zkoumány možnosti biologické degradace polyvinylpyrrolidonu, taktéž pomocí bakterií rodu *Sphingomonas* a také pomocí směsných inokul s dalšími druhy bakterií. Z řady pokusů provedených v rámci diplomové práce vyplývá, že použité bakterie rodu *Sphingomonas* nejsou schopny biologického rozkladu polyvinylpyrrolidonu. Zásadní rozklad polyvinylpyrrolidonu nebyl zaznamenán ani v případě pokusů prováděných se směsnými inokuly bakterií rodu *Sphingomonas* s bakteriemi rozkládajícími N-methyl-2-pyrrolidon. Na základě výsledků získaných v rámci diplomové práce lze potvrdit, že polyvinylpyrrolidon je s největší pravděpodobností biologicky nerozložitelný.

Klíčová slova: biodegradace, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, bakterie, *Sphingomonas*

ABSTRACT

This work deals with synthetic polymer biodegradation by bacteria of the genus *Sphingomonas*. The theoretical part is a brief characterization of polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone and characteristics of the bacterial genus *Sphingomonas*.

In the practical part of the thesis tests of polyvinyl alcohol degradation by bacteria of the genus *Sphingomonas*, depending on the degree of inoculation was carried out. Into degradation bottles were inoculated different amounts of bacterial suspension in order to achieve the initial concentration of cells from 10^0 to 10^7 cells/ml. It was found that the cell density influenced lag phase of the process, but did not affect the rate of subsequent decomposition of the polyvinyl alcohol.

Moreover, in the practical part the possibility of biological degradation of polyvinylpyrrolidone, using bacteria of the genus *Sphingomonas* and using the mixed inoculum with other bacterial species was explored. A number of experiments carried out in the practical part of the thesis showed that used bacteria of the genus *Sphingomonas* are not capable of polyvinylpyrrolidone biodegradation. Decomposition of polyvinylpyrrolidone was not observed even in the case of experiments carried out with mixed inoculum of bacteria of the genus *Sphingomonas* and bacteria decomposing N-methyl-2-pyrrolidone. Based on the results obtained in the thesis, we can confirm that polyvinylpyrrolidone is most likely non-biodegradable.

Keywords: biodegradation, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, bacteria, *Sphingomonas*

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a čas, který mi věnoval v průběhu zpracovávání mé diplomové práce. Mé poděkování patří také všem dalším zaměstnancům Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické, UTB ve Zlíně a zvláště paní Lence Machákové za velkou nápomoc a ochotu při provádění experimentálních prací. Nakonec bych ještě ráda poděkovala rodině a všem, kteří mi v průběhu studia napomáhali a podporovali mě.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 POLYVINYLALKOHOL (PVA)	13
1.1 CHARAKTERISTICKÉ VLASTNOSTI PVA.....	13
1.2 VÝROBA PVA	14
1.3 POUŽITÍ PVA	15
1.4 BIODEGRADACE PVA.....	15
1.4.1 Mechanismus biodegradace PVA	15
1.4.2 Pyrrolochinolinchinon (PQQ)	17
1.4.3 Mikroorganismy degradující PVA	17
2 POLYVINYLPIRROLIDON (PVP)	21
2.1 CHARAKTERISTICKÉ VLASTNOSTI PVP	21
2.2 VÝROBA PVP	22
2.3 POUŽITÍ PVP	23
2.4 BIODEGRADACE PVP	23
2.4.1 Možností předúpravy PVP před jeho biologickým rozkladem	24
3 BAKTERIE RODU SPHINGOMONAS	27
3.1 VLASTNOSTI BAKTERIÍ RODU <i>SPHINGOMONAS</i>	27
3.2 BIODEGRADAČNÍ SCHOPNOSTI BAKTERIÍ RODU <i>SPHINGOMONAS</i>	27
4 NÁVAZNOST A CÍLE PRÁCE	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	34
5.2 MINERÁLNÍ MÉDIA A ŽIVNÉ AGARY	37
5.3 PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY	40
5.3.1 Přístrojové vybavení.....	40
5.3.2 Laboratorní pomůcky	41
5.4 BIOLOGICKÝ MATERIÁL – POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KULTURY	41
6 PRACOVNÍ POSTUPY	43
6.1 LAHVOVÉ DEGRADAČNÍ TESTY	43
6.2 ZKUMAVKOVÉ DEGRADAČNÍ TESTY	43
6.3 STANOVENÍ KONCENTRACE PVA V MIKROTITRAČNÍCH DESTIČKÁCH.....	44
6.4 STANOVENÍ KONCENTRACE ROZPUŠTĚNÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU (DOC)	45
6.5 MĚŘENÍ ZÁKALU (OD ₆₀₀) DEGRADAČNÍCH SUSPENZÍ	45
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	46
7.1 DEGRADACE PVA KULTUROU <i>SPHINGOMONAS</i> SP. JK2 V ZÁVISLOSTI NA MÍŘE INOKULACE.....	46
7.1.1 Cíle a rozvržení pokusů.....	46
7.1.2 Výsledky pokusů	47

7.2	DEGRADACE PVP KULTUROU <i>SPHINGOMONAS</i> SP. JK2.....	56
7.2.1	Cíle a rozvržení pokusu.....	56
7.2.2	Výsledky pokusu	57
7.3	DEGRADACE PVP KULTURAMI BAKTERIÍ RODŮ <i>SPHINGOMONAS</i> A <i>SPHINGOBIUM</i> (DSMZ, NĚMECKO)	59
7.3.1	Cíle a rozvržení pokusu.....	59
7.3.2	Výsledky pokusu	60
7.3.3	Modifikovaný pokus s kulturou DSM 7135.....	62
	Cíle a rozvržení pokusu	62
	Výsledky pokusu.....	63
7.4	DEGRADACE PVP KULTURAMI BAKTERIÍ RODŮ <i>SPHINGOMONAS</i> A <i>SPHINGOBIUM</i> (CCM, ČR).....	64
7.4.1	Cíle a rozvržení pokusu.....	64
7.4.2	Výsledky pokusu	65
7.5	POKUS ROZKLADU POSTRANNÍCH SKUPIN PVP BAKTERIEMI DEGRADUJÍCÍMI NMP	67
7.5.1	Cíle a rozvržení pokusu.....	67
7.5.2	Výsledky pokusu	68
7.6	POKUS ROZKLADU PVP BAKTERIEMI DEGRADUJÍCÍMI NMP V KOOPERACI S KULTUROU <i>SPHINGOMONAS</i> SP. JK2	71
7.6.1	Cíle a rozvržení pokusu.....	71
7.6.2	Výsledky pokusu	72
	ZÁVĚR	75
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK.....	87
	SEZNAM PŘÍLOH.....	88

ÚVOD

Otázka ochrany životního prostředí nabývá v posledních několika desetiletích velkého významu. S rostoucí velikostí lidské populace roste i zatížení environmentu. Důsledkem lidských činností dochází k uvolňování různorodých látek do životního prostředí, a to včetně syntetických polymerů. Některé tyto látky se v prostředí hromadí, a proto je nutné zabývat se otázkou jejich odstranění. Výhodnou možností odstranění polymerů je jejich biologická degradace.

Polyvinylalkohol (PVA) je široce využívaným polymerem, je rozpustný ve vodě. Díky svému stále rostoucímu využití se proto stává významným kontaminantem vodních prostředí. K jeho odstranění z vodního prostředí dochází cestou biologické degradace, v jiných prostředích však může být rychlost jeho degradace nízká až nulová. Proto je nutno znát a zjišťovat vlivy a podmínky, které mohou biologickou degradaci tohoto polymeru v přírodě ovlivňovat.

Dalším hojně využívaným polymerem je, díky svým výhodným vlastnostem, jako jsou nízká toxicita, inertnost či rozpustnost ve vodě, polyvinylpyrrolidon (PVP). Tento polymer je používán v mnoha průmyslových odvětvích. Právě díky široké škále jeho využití je potřeba zabývat se otázkou jeho osudu ve složkách životního prostředí. Výhodnou cestou jeho odstranění by se jevila možnost biologické degradace, avšak vzhledem k vlastnostem tohoto polymeru je jeho biodegradabilita v environmentu velice nízká. PVP je považován za biologicky těžce rozložitelný polymer. I přesto je však nutno dále zkoumat možnosti jeho odstranění z životního prostředí.

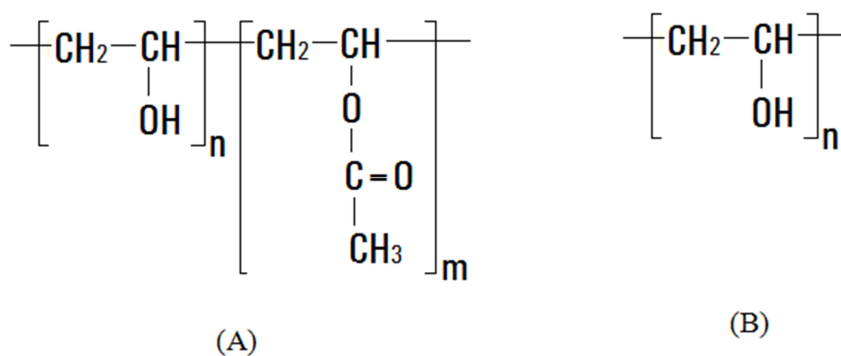
Tato diplomová práce navazuje na sérii předchozích prací, zabývajících se podobou problematikou. Práce se zabývá biologickou rozložitelností PVA v závislosti na míře inokulace a dále studováním biologické rozložitelnosti PVP pomocí bakterií rodu *Sphingomonas*, popřípadě jejich směsnými inokuly s dalšími druhy bakterií.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYVINYLALKOHOL (PVA)

1.1 Charakteristické vlastnosti PVA

Polyvinylalkohol je bílý až krémově světlý prášek krystalického charakteru. [1, 2] Základní chemická struktura PVA je tvořena 1,3 – diolovými jednotkami spojenými hlava-pata. V polymeru se ale vyskytuje malé množství (obvykle 1 – 2 %) 1,2 – diolových jednotek spojených hlava-hlava, jejichž obsah ovlivňuje některé vlastnosti PVA, pravděpodobně včetně jeho biodegradability. [3] Jelikož je PVA vyráběn hydrolýzou polyvinylacetátu, vždy obsahuje také určité množství zbytkových acetátových skupin. Jejich obvyklé množství bývá 15 %. Řada vlastností PVA, mezi nimi i odolnost vůči rozpouštědlům, značně závisí právě na obsahu těchto skupin a dále také na molekulové hmotnosti či teplotě. Při obsahu acetátových skupin 5 % polymer ve vodě botná, při vyšších teplotách se rozpouští. S rostoucí molekulovou hmotností však jeho rozpustnost klesá. Polyvinylalkohol odolává organickým kyselinám a nerozpouští v olejích, a to ani při vyšších teplotách. Lze jej využívat v teplotách od -50°C do 130°C , při vyšších teplotách, kolem 200°C , se rozkládá. [1, 2] Jeho mechanické vlastnosti a zpracovatelnost mohou být ovlivněny přidavkem různých změkčovadel, například glycerolu [2].

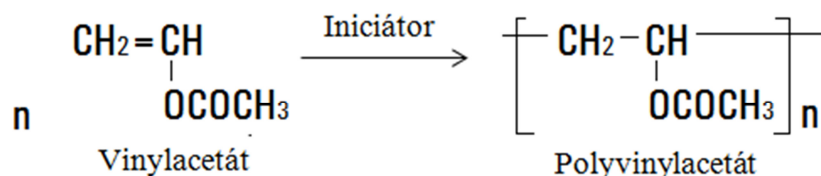


Obr. 1 Strukturální vzorec PVA: (A) – částečně hydrolyzovaný, (B) – plně hydrolyzovaný [4]

1.2 Výroba PVA

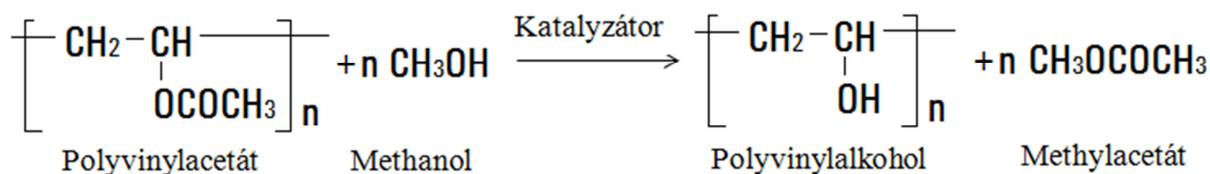
Polyvinylalkohol je polymer, který nelze připravit polymerizací, protože jeho monomer – vinylalkohol – není schopný existence ve volném stavu. Proto je výsledkem všech reakcí, které by zdánlivě vinylalkohol poskytovat mohly, acetaldehyd. [1]

Výroba polyvinylacetátu probíhá na principu radikálové řetězové polymerace v organickém rozpouštědle, kterým obvykle bývá methanol. Ten zde plní hned několik funkcí – společně s iniciátorem umožňuje upravení molární hmotnosti na požadovanou hodnotu, pomáhá odstraňovat teplo vznikající při polymerizaci a používá se také při alkoholýze hotového polyvinylacetátu.[5]



Obr. 2 Polymerace vinylacetátu [5]

Katalyzátorem alkoholýzy polyvinylacetátu na polyvinylalkohol může být například hydroxid sodný. Změnou jeho koncentrace, či změnou reakční doby nebo tepla je možné upravit obsah zbytkových acetátových skupin. Rozlišujeme potom typy polyvinylalkoholu s různým stupněm zmýdelnění. Rozmístění acetátových skupin pak závisí na tom, zda hydrolyza proběhla v kyselém nebo zásaditém prostředí.[5]



Obr. 3 Hydrolyza polyvinylacetátu na polyvinylalkohol [5]

PVA je možno získávat v molekulových hmotnostech v řádu několika tisíců až milionu, přičemž však horní hranice značně záleží na ukončení řetězce acetaldehydem při polymeraci vinylacetátu a také na přítomnosti dalších nečistot v průběhu jiných typů polymerace.[6]

1.3 Použití PVA

V chemickém průmyslu se využívá jako ochranný koloid pro suspenzní polymerace, jako zahušťovadlo pro nátěrové hmoty či k výrobě lepidel. Jelikož PVA svým chováním v mnohém připomíná želatinu, používá se v potravinářském průmyslu pro výrobu ovocného želé [1]. V legislativě lze poté PVA nalézt v Příloze č. 2 k vyhlášce 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Zde se nachází pod označením E 1203 jako přídatná látka – doplněk stravy, stanovený vyhláškou 225/2008 Sb., ve formě tablet a tobolek. [7]

Výhodou při jeho použití je odolnost proti olejům, tukům, chlorovaným rozpouštědlům či uhlovodíkům [2].

Z PVA je možno vyrábět celou škálu výrobků, jako jsou textilní vlákna, hadice, těsnění, obalové materiály či chirurgické nitě. Mezi výhody použití fólií a vláken z PVA patří to, že je lze vyrobit, jak ve formě ve vodě rozpustné, tak nerozpustné. [1, 2]

1.4 Biodegradace PVA

Díky stále rostoucímu využití polyvinylalkoholu, roste environmentální hrozba pro vodní ekosystémy, a to hlavně díky výrobě papíru a textilu. Ačkoliv PVA není akutně toxický pro vodní organismy, vykazuje silné povrchově aktivní vlastnosti, ve vodách pění a tak zabraňuje přestupu kyslíku do vody, což způsobuje vážnou hrozbu pro vodní živočichy.[3]

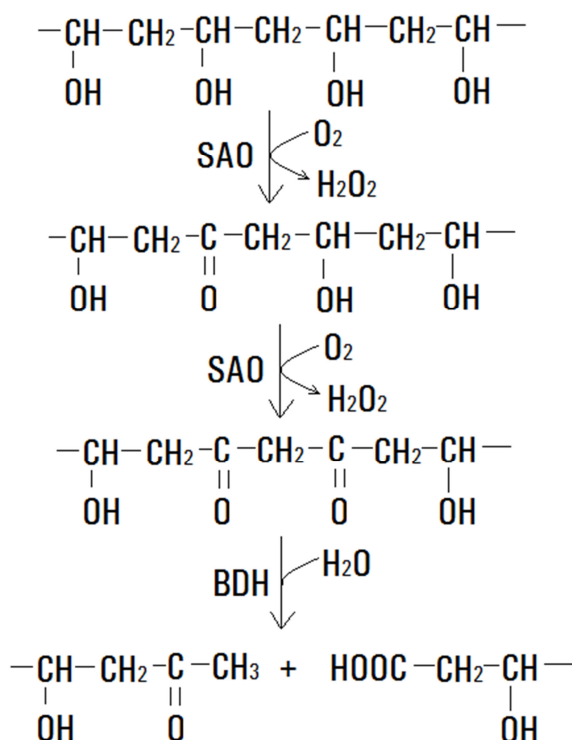
1.4.1 Mechanismus biodegradace PVA

Mechanismus metabolického rozkladu PVA probíhá ve dvou stupních. V prvním stupni dochází buď k oxidaci dvou sousedních hydroxylových skupin, což vede k vytvoření β -diketonové struktury, nebo k oxidaci pouze jedné hydroxylové skupiny, vedoucí k vytvoření monoketonové struktury. Reakce probíhající v druhém stupni rozkladu jsou odvislé od produktů vzniklých v prvním stupni rozkladu. Ve druhém stupni může docházet k hydrolýze β -diketonové struktury oxidovaného PVA nebo k aldolázové reakci monoketonové struktury oxidovaného PVA.[3]

V prvním stupni rozkladu se uplatňuje enzym PVA-oxidáza, který byl poprvé objeven u kultur *Pseudomonas* sp. O-3 a *P. vesicularis* PD [8, 9] a který přenáší vodík ze substrátu

na kyslík. Tento enzym patří do skupiny oxidáz sekundárních alkoholů (SAO). [3] Dalšími oxidačními enzymy prvního kroku jsou PVA-dehydrogenázy (PVA-DH), jejichž účinkem ke vzniku peroxidu nedochází a získaný vodík tak může být využit např. v respiračním řetězci.

Ve druhém stupni rozkladu je β -diketonová struktura rozkládána díky činnosti enzymu β -diketonhydrolázy (BDH). Délka uhlíkového řetězce je na každé straně diketonu různá. Při hydrolýze je na kratší straně produkován methylketon a na straně delší vznikají karboxylové kyseliny. Vzniklé karboxylové a mastné kyseliny jsou následně metabolizovány v buňce β -oxidací mastných kyselin a cyklem trikarboxylových kyselin. Obdobný mechanismus existuje i u hydrolázy oxidovaného polyvinylalkoholu (OPH). [3,10] Mechanismus metabolického rozkladu PVA pomocí SAO a BDH je znázorněn na následujícím *Obr. 4*.



Obr. 4 Mechanismus degradace PVA u bakterií Pseudomonas sp. [3, 10]

Lokalizace degradačních enzymů v jednotlivých frakcích buněk může být odlišná v závislosti na druhu bakterie; u rodu *Sphingomonas* již bylo prokázáno, že převažující aktivita je vázána na periplasmatickou frakci, jak je patrné z údajů v *Tab. I*. [11]

Tab. I Lokalizace PVA-dehydrogenázy (PVA-DH) a hydrolázy oxidovaného PVA (OPH) u bakterie *Sphingomonas* sp. 113P3 [11]

	Enzymová aktivita [U]	
	PVA-DH	OPH
Supernatant kultury	0,1	0,7
Periplasma buněk	6,3	2,2
Cytoplasma buněk	2,2	0,27
Membrána buněk	0,071	0,19

1.4.2 Pyrrolochinolinchinon (PQQ)

Pyrrolochinolinchinon je nekovalentně vázanou prostetickou skupinou řady chinoproteinů. Je vytvářen z kyseliny glutamové a tyrosinu některými gramnegativními bakteriemi, u nichž katalyzuje reakce probíhající v periplasmě.[12] PQQ neboli 2,7,9-trikarboxy-1H-pyrrolo[2,3-f]chinoline-4,5-dion je tepelně stabilní látka rozpustná ve vodě. Za vhodných podmínek je PQQ schopen katalyzovat oxidaci alkoholů či sacharidů. [12,13]

1.4.3 Mikroorganismy degradující PVA

Mezi organismy degradující polyvinylalkohol patří některé gram-negativní i gram-pozitivní bakterie a také některé druhy hub. Většina degradérů patří právě mezi gram-negativní bakterie, a to bakterie rodů *Sphingomonas* a *Pseudomonas*. Celková škála mikroorganismů degradujících PVA je velmi široká, což naznačuje silný potenciál biologické rozložitelnosti tohoto polymeru v přírodě. Nejčastěji k degradaci dochází v prostředí aerobním, a to pomocí metabolických či méně často nemetabolických procesů. Byly zaznamenány také případy anaerobní degradace. [3]

Předpokládané metabolické cesty rozkladu PVA jsou založeny na dvoustupňovém mechanismu, který byl již popsán v kapitole 1.4.1. Na principu nemetabolických cest jsou schopny PVA degradovat některé ligninolytické houby, které jej odstraňují pomocí nespecifické oxidace extracelulárními oxidačními systémy v prostředí půdy [3]. Dále jsou některé bakterie schopny PVA rozkládat symbioticky [14, 15, 16].

Historie zkoumání biodegradace PVA sahá do 30. let 20. století, kdy v roce 1936 byla Nordem zveřejněna první zpráva o degradaci PVA pomocí houby *Fusarium lini* B [17]. V 70. letech Suzuki a kolektiv zahájil rozsáhlý výzkum mikroorganismů rozkládajících

PVA. V důsledku stále se zvyšující produkce PVA jeho mikrobiální degradace přitahuje pozornost, a tak jsou izolovány stále nové kultury jeho degradérů.[3]

Příkladem degradace polyvinylalkoholu gram-pozitivními bakteriemi může být studie Zhanga a kolektivu. V této studii bylo použito šest vzorků půdy a tři vzorky aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod z textilního průmyslu. Po kultivaci vzorků v PVA médiu bylo nalezeno 20 kmenů, které byly následně zkoumány. Jako nejlepší degradér byl zjištěn kmen aktinomycet označen jako GY1. Identifikací bylo zjištěno, že oním degradačním mikroorganismem je *Streptomyces venezuelae* GY1. Aktivita extracelulárního enzymu, degradujícího PVA, získaného z PVA média, byla až desetkrát vyšší než jeho aktivita v médiích s glukózou či škrobem jako jediným zdrojem uhlíku, což naznačuje, že zkoumaný enzym je produkován inducibilně.[18]

Symbiotická degradace PVA

Řada studií popisuje symbiotickou degradaci PVA [3, 14, 15, 16]. První popsany případ symbiotické degradace PVA spadá do 80. let 20. století, kdy Sakazawa a kolektiv izoloval ze smíšené kultury bakterií dva kmeny schopné společně využít PVA. Převládající kmen *Pseudomonas sp.* VM15C produkoval enzym degradující PVA pouze v přítomnosti kmene *Pseudomonas putida* VM15A. Bylo předpokládáno, že kmen VM15A dodává kmenu VM15C potřebný růstový faktor. [15] V následné studii Shimaa a kolektivu bylo zjištěno, že potřebným růstovým faktorem pro utilizaci PVA pomocí *Pseudomonas sp.* VM15C je pyrrolochinolinchinon (PQQ) produkován bakteriemi *Pseudomonas putida* VM15A. Tento tehdy nový koenzym, na němž je závislá činnost PVA-dehydrogenázy kmene *Pseudomonas sp.* VM15C, byl získán z částečně vyčištěné membránové frakce symbionta, tedy z *Pseudomonas putida* VM15A. [19]

Další příklad symbiotické degradace PVA, tentokrát nezávislé na přísunu PQQ, popsali Rong a kolektiv, kteří izolovali některé bakterie schopné rozkládat PVA z aktivovaného kalu. Aktivovaný kal byl očkovan do média s 0,6 % PVA a následně kultivován při teplotě 30°C za stálého třepání. Stanovení reziduální koncentrace PVA bylo prováděno jodometrickou metodou při vlnové délce 660 nm a růst buněk byl měřen jako optická hustota při 600 nm. Téměř všechny PVA byl degradován do 10 dní. Následně byl degradér, označený jako kmen P7, identifikován pomocí molekulárně biologických metod

jako *Novosphingobium* sp. P7. Přestože kmen P7 degradoval PVA, jeho činnost byla v porovnání s aktivovaným kalem značně omezena, což ukazovalo na přítomnost určitých růstových faktorů či koenzymů nutných k degradaci, pocházejících z dalších bakterií. Na základě dalších výzkumů bylo zjištěno, že potřebným růstovým faktorem je aminokyselina methionin. Kmen B2 produkující tento faktor byl identifikován jako *Xanthobacter flavus*. Je předpokládáno, že dochází k symbiotické degradaci PVA těmito dvěma bakteriálními kmeny, kdy kmen B2 produkuje růstový faktor, který následně *Novosphingobium* sp. P7 využívá pro svůj růst během degradace PVA.[14]

Choi a kolektiv zkoumali rozklad PVA pomocí smíšené kultury *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 a *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508, izolované z odpadních vod. PVA zde byl použit jako jediný zdroj uhlíku a energie. Po řadě testů bylo zjištěno, že každá kultura zvlášť je schopná degradovat PVA, a to *M. barkeri* KCCM 10507 z 98 % a *P. amylolyticus* z 96 %, vše po pěti dnech. Při degradaci smíšenou kulturou zahrnující oba kmeny došlo po pěti dnech k rozložení PVA z 99 %. Dalším záměrem studie bylo zjištění vlivu velikosti polymeračního stupně na rychlost biodegradace, neboť degradace PVA obecně klesá s rostoucím stupněm polymerizace. Autoři použili tři typy PVA s různými stupni polymerizace: 500, 1 700 a 2 000. V případě degradace PVA s polymerizačními stupni 500 a 1 700 došlo po čtyřech dnech k 90% degradaci. U PVA s polymerizačním stupněm 2 000 pak došlo k 80% degradaci po pěti dnech. Tyto výsledky naznačují, že stupeň polymerizace PVA pravděpodobně nemá významně velký vliv na degradační schopnost sledovaných kmenů bakterií *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 a *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508.[16]

Degradace PVA pomocí mikroskopických hub

Jak již bylo zmíněno, degradace PVA jsou schopny i některé druhy hub. Kmen mikroskopických hub *Penicillium* sp. WSH02-21, využívající PVA jako jediný zdroj uhlíku, byl izolován v rámci práce Qiana a kolektivu. Tento kmen byl izolován z aktivovaného kalu čistírny odpadních vod z textilní výroby. Izolovaná kultura byla očkovaná do média s 0,5 % PVA, kde se následně koncentrace PVA velmi rychle snižovaly a PVA byl úplně spotřebován po 12 dnech. [20]

Degradaci PVA pomocí dřevokazných hub hnědé hniloby *Fomitopsis pinicola* [21] a také pomocí dřevokazných hub bílé hniloby *Flammulina velutipes* [22] studovali rovněž

Tsujiyama a kolektiv. Dřevokazné houby degradující PVA mohou být potenciálně využity při degradaci dřevěných kompozitů, k jejichž výrobě se používá lepidel či laků obsahujících PVA. Degradční testy v této studii byly prováděny s kulturou suspendovanou v kapalině a kulturou na křemenném písku. V prvním případě byla suspendovaná kultura převedena do baňky, obsahující médium s 0,1 % PVA a 1,0 % glukózy. Ve druhém případě byla suspendovaná kultura převedena do baňky obsahující určitý podíl křemenného písku.

U obou hub - *Fomitopsis pinicola* i *Flammulina velutipes*, došlo k degradaci PVA pouze v případě kultivace kultur na křemenném písku, v kapalném médiu nebyla degradace zaznamenána. Výsledkem studie je závěr, že tyto dřevokazné houby mají potenciál k degradaci PVA v pevných médiích s obsahem dřevitých odpadů. [21]

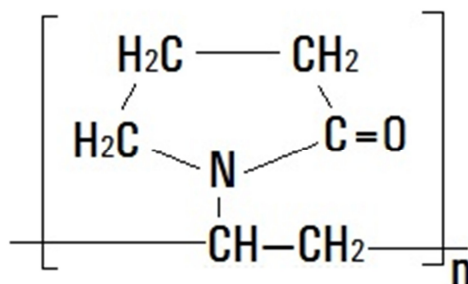
2 POLYVINYLPIRROLIDON (PVP)

2.1 Charakteristické vlastnosti PVP

Polyvinylpyrrolidon je sypký bílý až nažloutlý prášek, jehož částice mají různou velikost. Na trhu lze nalézt rozpustný PVP pod různými názvy, například jako Povidon, Polyvidon, Kollidon, poly(N-vinyl-2-pyrrolidon) či poly(N-vinylbutyrolaktam). [23, 24]

Díky způsobu výroby PVP je ve výsledném produktu možno nalézt malé množství nezměněného monomeru N-vinyl-2-pyrrolidonu, a to obvykle v množství do 0,2 %. Ve výsledném produktu může být dále obsaženo také malé množství 2-pyrrolidonu a hydrazinu, vznikajícího ve výrobním procesu z amoniaku, či acetaldehydu. [23]

PVP je rozpustný ve vodě a řadě organických rozpouštědel. Za normálních podmínek je jako pevná látka i ve vodných roztocích stabilní [23]. Vzhledem ke své struktuře může vytvářet komplexy s řadou látek, včetně léčiv. Rozpustnost těchto komplexů je ve většině případů lepší než rozpustnost čistého léčiva. Nerozpustným se PVP může stát zejména v důsledku zesíťování probíhajícího při vyšších teplotách, a to v kombinaci se silně zásaditými látkami. [24]

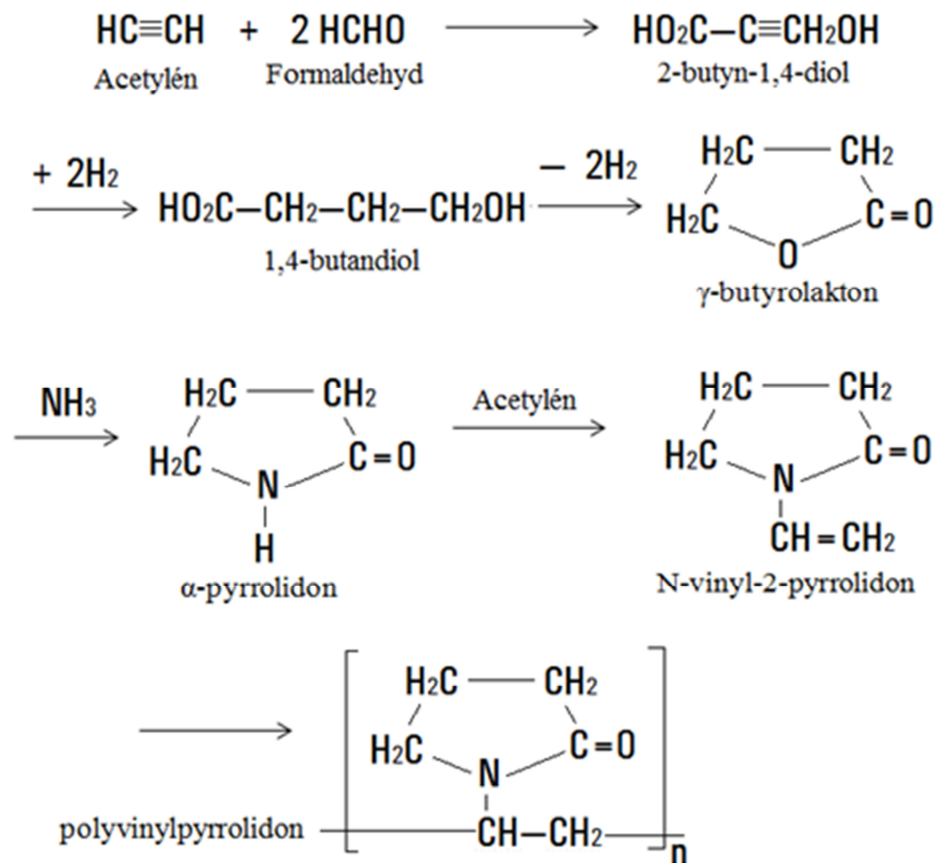


Obr. 5 Struktura PVP [23]

Údaje získané z toxikologických testů naznačují biologickou inertnost PVP; jeho akutní, subchronická a chronická toxicita jsou velmi nízké. PVP není dráždivý ani senzibilizující. [23]

2.2 Výroba PVP

Polyvinylpyrrolidon se vyrábí polymerací N-vinyl-2-pyrrolidonu. Syntéza N-vinyl-2-pyrrolidonu a jeho následná polymerace je popsána na *Obr. 6*. [23]



Obr. 6 Syntéza polyvinylpyrrolidonu [23]

V současné době jsou při komerční výrobě PVP využívány dva postupy. Nejčastěji využívaným je právě postup polymerizace ve vodě, popsáný na *Obr. 6*. V menší míře je poté uplatňována polymerizace v izopropylalkoholu. Oběma postupy je produkován polymer ve formě roztoku. [23]

PVP lze vyrábět v různých průměrných molekulových hmotnostech, v rozsahu od 2,5 do 1 200 kDa. Různé průměrné molekulové hmotnosti vzniklého polymeru jsou poté označovány svou K-hodnotou. Hodnotu K je možné vypočítat z hodnoty relativní viskozity PVP ve vodě a bývá vždy součástí obchodního názvu výrobku - například K-15, K-17, K-30. [23, 24]

2.3 Použití PVP

Díky svým vlastnostem, jako je biologická kompatibilita, adhesivita či nízká toxicita, nachází PVP široké uplatnění v různých odvětvích průmyslu [23].

Polyvinylpyrrolidon bývá často využíván hlavně ve farmaceutickém průmyslu. Slouží jako pojivo do tablet, které tak vykazují spolehlivou míru rozpouštění léků, což je využíváno u přípravků s prodlouženým (řízeným) uvolňováním. PVP v komplexu s jódem je využíván jako germicid v antimikrobiálních mýdlech, čistících a desinfekčních přípravcích. [23]

Časté uplatnění nachází PVP také v potravinářském průmyslu, kde je využíván jako pojivo pro vitamínové tablety, ale také jako stabilizátor kapalných vitaminů či minerálních koncentrátů, aby se zabránilo jejich krystalizaci. [23] V legislativě lze PVP nalézt v Příloze č. 2 k vyhlášce č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Zde se nachází pod označením E 1201 a E 1202 jako přídatná látka – doplněk stravy stanovený vyhláškou č. 225/2008 Sb. ve formě tablet a potahovaných tablet. [7]

Své využití PVP nachází také v kosmetickém průmyslu, kde je používán jako zahušťovadlo, dispergační činidlo nebo také jako mazivo. Při produkci plastů je využíván jako stabilizátor polymerace či ochranný koloid. Dále je používán ve fotografickém průmyslu, bývá přidáván do barviv, inkoustů, nátěrů či detergentů. [23]

2.4 Biodegradace PVP

Vzhledem k široké škále využití PVP v mnoha průmyslových odvětvích, je důležité zabývat se otázkou osudu tohoto polymeru v životním prostředí. Testováním biodegradability polyvinylpyrrolidonu se již několik let zabývá i Fakulta technologická UTB ve Zlíně. Řada testů provedených v rámci diplomových prací však poukazuje na biologickou nerozložitelnost PVP.

Na studium možností biologického odstraňování PVP se ve své diplomové práci zaměřila Marušincová [25]. Při experimentech byla sledována biologická rozložitelnost PVP, jak v aerobním, tak v anaerobním vodném prostředí. Z výsledků práce však vyplývá, že u předem neupraveného PVP v těchto prostředích k rozkladu nedochází. Biologický rozklad PVP a jeho strukturních analogů v anaerobním prostředí byl zkoumán taktéž

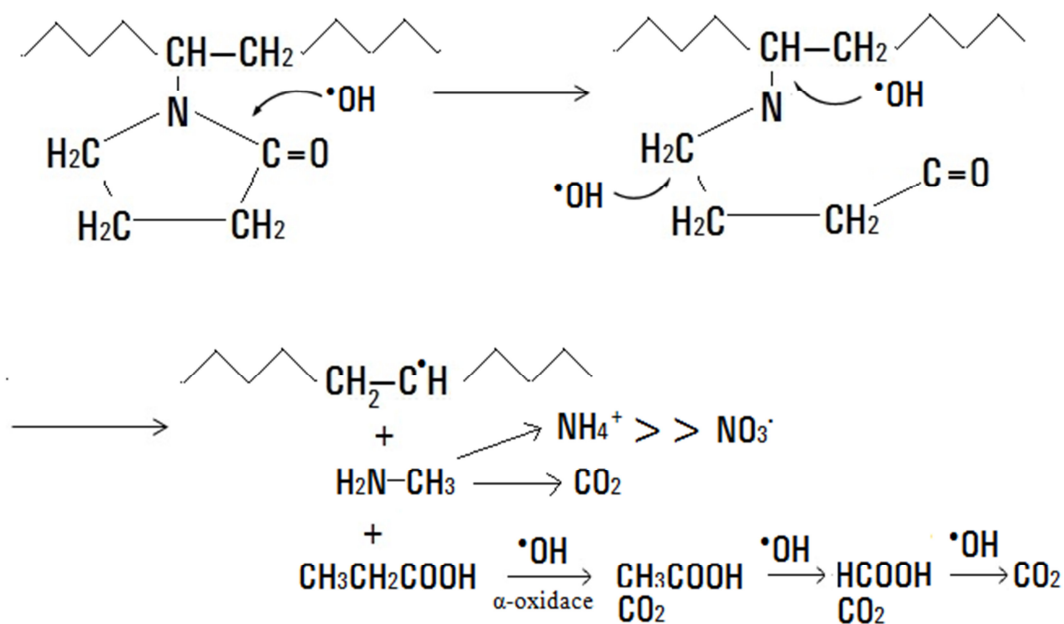
v práci Vrlové [26]. Stupeň rozkladu testovaných látek byl vyhodnocován z produkce methanu a oxidu uhličitého v bioplynu. Z výsledků této práce vyplývá, že v anaerobním prostředí může být PVP do jisté míry biologicky rozložitelný.

V další navazující práci byla zkoumána biologická rozložitelnost PVP v prostředí aktivovaného kalu, v aerobním půdním prostředí, či v prostředí mycelia odpadajícího při výrobě penicilinu. Kromě sledování rozložitelnosti samotného PVP, byl sledován také jeho rozklad za přítomnosti různých kosubstrátů. Výsledky práce ukazují, že k částečnému biologickému rozkladu PVP dochází pouze v prostředí směsné půdy, kde bylo za dobu 780 hodin rozloženo přibližně 16 % PVP. Pozitivních výsledků bylo dosaženo také v půdním inokulu zemědělské půdy, kde bylo za dobu 860 hodin rozloženo přibližně 30 % PVP. Při zkoumání rozkladu v jiných prostředích k biologickému rozkladu PVP nedocházelo. [27]

2.4.1 Možností předúpravy PVP před jeho biologickým rozkladem

Biologická degradace ve vodě rozpustných polymerů v průmyslových odpadních vodách závisí na obsahu mikroorganismů schopných degradovat tyto polymery. Biodegradace může být použita až jako poslední krok v rámci čištění odpadních vod, obsahujících hůře degradovatelné polymery jako je PVP. V tomto případě se volí vhodné techniky, které mohou sloužit pro předčištění těchto vod. [28]

Fotooxidaci ve vodě rozpustného PVP a dalších polymerních materiálů studovali pomocí UV/TiO₂ (s využitím atanasové formy TiO₂, nikoliv rutilové) Horikoshi a kolektiv. Jako modelová látka sloužící ke studiu fotodegradace PVP byl použit 2-vinylpyrrolidon. V prvním kroku degradace dochází k adsorpci PVP na povrch částic TiO₂. Druhým krokem je napadení PVP radikály •OH a •OOH, kdy dochází k otevření laktamového kruhu ve struktuře PVP. Po otevření laktamového kruhu v posledním kroku dochází k vzniku primárního aminu (methylaminu) a kyseliny propionové, které jsou následně rychle degradovány, což je zobrazeno na *Obr. 7*. [29] Při postupu oxidace se délka polymeru snižuje, což může zlepšit jeho transport do buněk, čímž dochází ke zvýšení jeho biologické rozložitelnosti [29, 30].

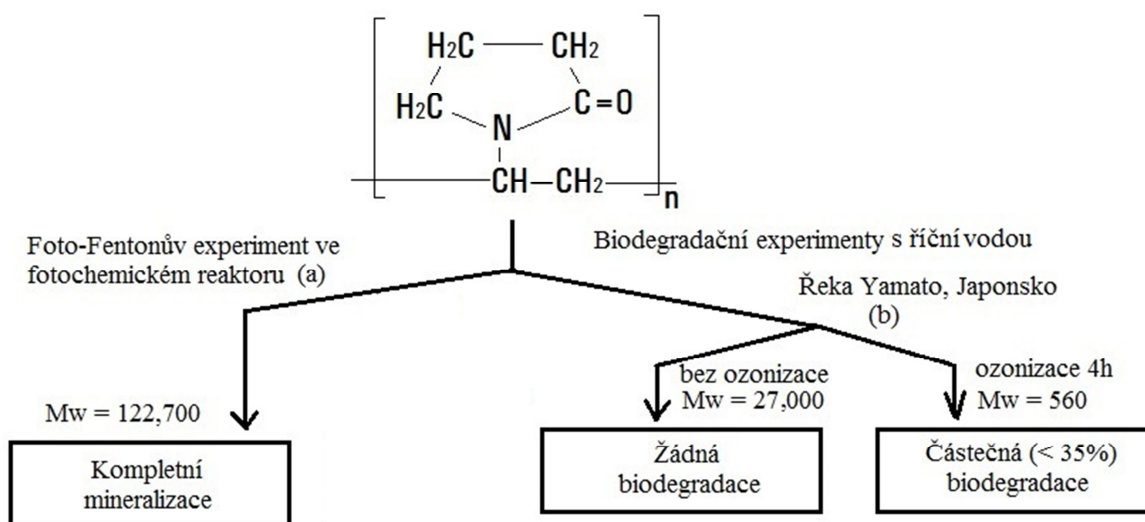


Obr. 7 Princip fotodoxidace PVP pomocí UV/TiO₂ [29]

To, že oxidace PVP před samotným biologickým rozkladem vede zvýšení biodegradability u mnoha průmyslových vod, bylo potvrzeno také ve studii Loraina. PVP byl oxidován pomocí UV/H₂O₂. Oxidace PVP v odpadních vodách byla prováděna za různých podmínek. V deionizované vodě došlo k odstranění veškerého PVP za dobu pouhých 30 minut a k určitému nárůstu biodegradability produktů aktivovaným kalem. V odpadní vodě však bylo, za stejných podmínek, odstraněno pouze 35 % PVP přičemž biodegradabilita produktů nebyla zjištěna. Po zdvojnásobení intenzity UV záření i množství peroxidu vodíku a délky trvání oxidace bylo odstraněno 45 % PVP a došlo i k mírnému zlepšení biodegradability vzniklých produktů. Oxidace pomocí UV/H₂O₂ jeví jako ekonomicky dostupná možnost pro nakládání s vodami znečištěnými PVP. [30]

Na fotodegradační experimenty, tentokrát pomocí foto-Fentonovy reakce, se ve své studii zaměřili Giroto a kolektiv. Při této reakci je Fe⁺² oxidován na Fe⁺³ a H₂O₂ je redukován na hydroxylové ionty OH⁻ a radikály $\cdot\text{OH}$. Tato reakce může být značně urychlena pomocí UV záření. Průběh reakce byl vyhodnocován na základě analýzy celkového organického uhlíku (TOC). Byly použity vodné roztoky polymeru s koncentrací 1500 mgC.l⁻¹. V závislosti na množství Fe⁺² a H₂O₂ docházelo ke kompletní mineralizaci organických látek během dvou až tří hodin. Experimentální výsledky dokazují, že degradace ve vodě rozpuštěného PVP pomocí foto-Fentonovy reakce je proveditelná. [28]

Jednou z dalších možností předúpravy vod před biologickým čištěním je její ozonizace, kterou se ve své práci zabýval Suzuki a kolektiv [31]. Bylo však zjištěno, že biodegradace produktů ozonizace je i za těchto podmínek obtížná. Výsledky této práce i práce Girota a kolektivu [28] jsou shrnuty na Obr. 8.



Obr. 8 Možné biodegradační dráhy PVP [32]; (a) Giroto a kol.[28], (b) Suzuki a kol.[31]

3 BAKTERIE RODU *SPHINGOMONAS*

3.1 Vlastnosti bakterií rodu *Sphingomonas*

Rod *Sphingomonas* patří do α -4 podskupiny proteobakterií. Takeuchi a kolektiv v roce 2001 rozdělil rod do čtyř nových rodů – *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* a *Sphingopyxis* [33]. Následně autor Mayumara a kolektiv v roce 2006 přidal k této skupině pátý rod – *Sphingosinicella* [34].

Bakterie rodu *Sphingomonas* jsou gram-negativní, chemoheterotrofní, obligátně aerobní, žlutě pigmentované bakterie. Mají tvar rovné až mírně zakřivené tyčky. Některé mohou být pohyblivé – mají polární bičík. V životním prostředí jsou široce rozšířené. Vyskytují se v půdách, řekách či hlubokých podpovrchových sedimentech. Je možno je nalézt také v korodujících měděných trubkách, pitných vodách, v rhizosféře, či na povrchu rostlin. Některé druhy bakterií rodu *Sphingomonas* mohou být pro člověka podmíněně patogenní, takovéto byly izolovány v různých zdravotnických zařízeních, zejména *S. paucimobilis*. [35, 36, 37]

3.2 Biodegradační schopnosti bakterií rodu *Sphingomonas*

Jednou z nejzajímavějších schopností bakterií rodu *Sphingomonas*, kterou disponuje mnoho zástupců tohoto rodu, je schopnost degradace látek znečišťujících životní prostředí. [35] Bylo nalezeno velké množství bakterií rodu *Sphingomonas* schopných degradovat velké množství přírodních i antropogenních uhlovodíků, jako jsou bifenyl, (substituovaný) naftalen, fenantren, (chlorované) furany a dibenzo-p-dioxiny, chlorované fenoly či různé herbicidy a jiné pesticidy. Metabolická univerzálnost bakterií rodu *Sphingomonas* napovídá, že vyvinuly mechanismy, kterými se k rozkladu nových sloučenin přizpůsobí rychleji než zástupci jiných bakteriálních rodů. Ve srovnání s jinými bakteriálními rody to někteří autoři vysvětlují existencí plazmidů šířených pouze mezi sfingomonádami. [36]

Pro lepší představu, jak široká je škála degradačních schopností bakterií rodu *Sphingomonas*, uvádím přehled jimi degradovaných látek, vypracovaný Stolzem a kol., v *Tab. II.* [36]

Tab. II Příkladů aromatických a xenobiotických látek degradovaných bakteriemi rodu *Sphingomonas* [36]

Skupina sloučenin	Látky degradované bakteriemi <i>Sphingomonas</i>
Monocyklické a polycyklické aromatické uhlovodíky	toluen, xyleny, bifenyl, naftalen, antracen, fenantren, acenaften, acenaftylen, 2-methylnaftalen, dimethylnaftaleny, dimethylfenantreny, fluoren, fluoranten, tetralin pyren, benz[a]anthracen, benzo[a]pyren, chrysen
Aromatické sloučeniny odvozené od ligninu	2,2'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-5,5'-dikarboxybifenyl, trans-4-hydroxystilben
Heterocyklické sloučeniny	(chlorované) dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany difenylétery karbazol 4-methylchinolin
Chlorované aromatické sloučeniny	chlorované fenoly - 2,4,6-trichlorofenol; 2,3,4,6-tetrachlorofenol chlorované fenoxykyseliny <ul style="list-style-type: none"> • 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4D), • 2-methyl-4-chlorofenoxyoctová kyselina, • (R,S)-2-(2,4-dichlorofenoxy)propionová kyselina, • (R,S)-2-(2-methyl-4-chlorofenoxy)propionová kyselina 2-, 3-, 4-fluorobenzoát 1,4-dichlorobenzen
Sulfonované aromáty a azosloučeniny	saccharin (2-sulfobenzoic acid imide), bromamin (1-amino-4-bromoanthraquinone-2-sulfonic acid) sulfonované azobarviva
Insekticidy a herbicidy	γ -hexachlorocyclohexan (lindane) karbofuran isoproturon [3-(4-isopropylfenyl)-1,1,-dimethylmočovina] chlorpyrifos [O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)phosphorothioate]
Endokrinní disruptory	Nonylfenoly Bisphenol A [2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan] 17 β -estradiol
Polyethylenglykoly	PEG-4000 PEG-6000

Polycyklické aromatické uhlovodíky

Schopnost metabolizovat toluen i naftalen je mezi heterotrofními aerobními gram-negativními bakteriemi vzácná a velmi důležitá pro bioremediaci podpovrchového ropného znečištění. [35]

Fredrickson a kolektiv v rámci svých výzkumů izolovali a identifikovali několik druhů bakterií rodu *Sphingomonas*, včetně *S. aromaticivorans*, *S. stygia*, and *S. subterranea*, které jsou schopny rozkladu aromatických uhlovodíků, jako jsou toluen, naftalen, o-xylen,

m-xylen, p-xylen, p-kresol, bifenyly a další. Tyto bakterie byly izolovány z podpovrchových sedimentů v hloubkách větších než 200 metrů pod povrchem země. [38]

Heterocyklické sloučeniny

Harms a kolektiv ve svém výzkumu prokázali mineralizaci 2-, 3-, 4-acetoxydibenzofuranu, 2-, 3-, 4-hydroxydibenzofuranu a dalších substituovaných dibenzofuranů bakteriálním kmenem *Sphingomonas* sp. HH69 izolovaným z půdy. [35, 39]

O bakterii schopné plně mineralizovat některé halogenované difenylétery poprvé podali zprávu Schmidt a kolektiv. Tato bakterie izolovaná z kontaminovaných půd v Německu, schopná využívat difenyléter a jeho 4-fluoro, 4-chloro a 4-bromo deriváty jako jediný zdroj uhlíku a energie, byla identifikována jako *Sphingomonas* sp. SS3. [35, 40] Další kultura bakterií rodu *Sphingomonas*, schopná rozkládat difenyléter, byla izolována v rámci práce Kima a kolektivu. Kultury zde byly získány z aktivovaného kalu komunální čistírny odpadních vod a kultivovány v minerálním médiu. Pro další studium byl vybrán kmen PH-07, který byl následně identifikován jako *Sphingomonas* sp. PH-07. Za aerobních podmínek tento kmen zcela využil počáteční množství difenyléteru 1 g.l^{-1} během 6 dní. [41]

Chlorované aromatické sloučeniny

Z řady chlorovaných aromatických sloučenin mají jako polutanty velký význam chlorované fenoly, které mají tendenci přetrvávat v životním prostředí. Proto je snaha zkoumat jejich biodegradaci. Prioritní znečišťující látkou skupiny chlorovaných fenolů je pentachlorfenol (PCP), který byl v minulosti běžně využíván jako biocid v průmyslu a zemědělství. Biologická rozložitelnost PCP byla zkoumána ve studii autora Yanga a kolektivu. Byly analyzovány vzorky půd kontaminované PCP odebrané z kontaminovaných lokalit z jižní části Tchaj-wanu. Neprosetá půda (6 g) byla smíchána s anorganickým kultivačním médiem (70 ml). Část této směsi (8 ml) byla opět smíchána s anorganickým kultivačním médiem (80 ml) a bylo přidáno 25 mg.l^{-1} PCP jako jediného zdroje uhlíku a energie. Vzorky byly kultivovány na třepačce ve tmě, při 30°C a biodegradace PCP byla pravidelně sledována pomocí HPLC. PCP byl pravidelně doplňován pro adaptaci kultury na určitou stabilní úroveň PCP. Tímto způsobem došlo

k namnožení kultury a její adaptaci. Pro pochopení schopnosti adaptace směsné kultury k rozkladu PCP byl proveden další experiment. Do 250 ml baněk bylo dávkováno 40 ml anorganického kultivačního média, směsná kultura bakterií a různé koncentrace PCP (10 – 180 mg.l⁻¹). Výsledky ukázaly, že koncentrace PCP menší než 180 mg.l⁻¹ byly adaptovanou smíšenou kulturou zcela degradovány a to v pořadí 10 mg.l⁻¹ za 27 hodin, 25 mg.l⁻¹ za 35 hodin, 50 mg.l⁻¹ za 35 hodin, 100 mg.l⁻¹ za 45 hodin a 180 mg.l⁻¹ za 53 hodin. V rámci experimentu byla izolována kultura schopna rozkládat PCP ve vyšších koncentracích než kultury zbylé, a tato byla identifikována jako *Sphingomonas chlorophenolica*. V dalších experimentech poté byla zkoumána šíře jejích degradačních schopností a bylo zjištěno, že je schopna zcela odstranit PCP v koncentracích 100 a 250 mg.l⁻¹ za dobu 25 a 90 hodin, má proto vysoký potenciál pro využití při bioremediacích. [42]

Sulfonované aromáty a azosloučeniny

V rámci studie Magony a kolektivu byl izolován kmen bakterií SA1, schopný růst na kyselině sulfanilové, jako na jediném zdroji uhlíku, dusíku a síry. Taxonomickou analýzou bylo zjištěno, že je jedná o kmen *Sphingomonas subarctica* SA1. Dále byly zkoumány biodegradační cesty kyseliny sulfanilové a popsána schopnost kmene degradovat také některé analogické aromatické sloučeniny, včetně kyseliny p-aminobenzoové. Kmen byl následně úspěšně využit pro odstraňování ropných nečistot. [43]

Insekticidy a herbicidy

Mezi pesticidy degradovatelné pomocí bakterií rodu *Sphingomonas* patří například chlorpyrifos, který byl široce využíván od roku 1960 jako insekticid na bavlníkových či rýžových polích. Jeho biodegradace byla studována v rámci práce Li a kolektivu. Analyzovány byly vzorky znečištěné vody vytékající z továrny, kde se chlorpyrifos vyráběl více než deset let. Vzorky byly naneseny na minerální agar s obsahem 100 mg.l⁻¹ chlorpyrifosu jako jediného zdroje uhlíku. Během kultivace došlo na agaru k vývoji transparentních zón, indikujících degradaci. Bakteriální kolonie tvořící zóny byly následně izolovány a pro další zkoumání byl vybrán kmen s nejvyšší degradační schopností označený jako Dsp-2. Tento kmen byl identifikován jako *Sphingomonas* sp. Dsp-2. Degradace 100 mg.l⁻¹ chlorpyrifosu v buněčné kultuře proběhla úplně do 24 hodin. Byla

ale také zkoumána jeho rozložitelnost v půdách a vliv pH na průběh biodegradace. Pro experimenty bylo použito množství 100 mg chlorpyrifosu na kg půdy. Při degradaci v neutrálních půdách byl pesticid už po 7 dnech degradován z 90 %, po 30 dnech z 98 %. V kyselé půdě (pH 4,8) byl rozklad pesticidu značně zpomalen, degradace po 7 dnech proběhla z 58,1 %. V půdě alkalické naproti tomu proběhla degradace po 7 dnech již z 98,7 %. Rychlost degradace chlorpyrifosu je tedy větší v alkalických půdách. [44]

Endokrinní disruptory

Další látkou rozkládanou sfingomonádami je bisfenol A, který je široce využívanou průmyslovou sloučeninou. Jeho biologickou rozložitelnost pomocí nově izolovaného kmene AO1 zkoumal Sasaki a kolektiv. Tento kmen byl izolován ze zeleninových polí v Japonsku a následně byl identifikován jako *Sphingomonas bisphenolica* AO1. Pro testování biodegradace byly použity dva typy médií - L médium (10 g trypton, 5g kvasničný extrakt a 5g NaCl na litr, pH 7,2) a základní minerální médium (BMSM). K médiím byl následně přidán bisfenol A (BPA) v množství 115 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kultura byla kultivována v médiích při 30°C za stálého třepání. U L média došlo k úplné degradaci BPA za dobu 6 hodin, u média BMSM klesla koncentrace BPA pod meze detekce až po 117 hodinách. Další snahou bylo zmenšit zpoždění degradace u BMSM média. Po přidavku glukózy došlo ke stimulaci růstu buněk, rychlost degradace se zvýšila a kompletní rozklad BPA byl pozorován již kolem 40. hodiny. Výsledky této studie naznačují, že kmen *Sphingomonas bisphenolica* AO1 může být užitečným pro případné bioremediace. [45]

Polyethylenglykoly

Rozklad polyethylenglykolu (PEG) ve své práci studovali Kawai a kolektiv. Pro svou práci využili již izolované kultury PEG-utilizujících bakterií – kmen K1 rostoucí na PEG 4000 a kmen N6 rostoucí na PEG 6000. Tyto kultury byly identifikovány jako bakterie rodu *Sphingomonas*. Kmen N6 se následně podařilo adaptovat pro růst na PEG 10 000, 15 000 a 20 000. [46, 47]

4 NÁVAZNOST A CÍLE PRÁCE

Již v rámci mnoha předchozích diplomových prací byl zkoumán biologický rozklad PVA. Například v práci Nedbálka [48] byl zkoumán vliv podmínek prostředí na degradaci PVA. Mimo jiné zde bylo zjištěno, že růst použitých degradačních kultur OT2, JK2 a Ž1 negativně ovlivňuje zvýšená koncentrace fosforečnanů či hydrogenuhličitánů v prostředí. V navazující práci Ošřádalové [49] bylo potvrzeno, že zvýšená koncentrace fosforečnanů, ale také chloridů, negativně ovlivňuje průběh degradace. Nižší koncentrace těchto solí kultury v růstu neomezují.

V rámci této diplomové práce bylo jedním z cílů provedení testů biologického rozkladu PVA bakteriemi rodu *Sphingomonas* v závislosti na míře inokulace.

Možnostmi biologického rozkladu PVP se zabývala v rámci Fakulty technologické UTB ve Zlíně také velká řada prací, jak již bylo zmíněno v kapitole 2.4. Z výsledků těchto prací i dalších studií je zřejmé, že biologický rozklad PVP je velmi problematický. I přesto bylo dalším cílem diplomové práce provést degradační testy zaměřené na rozklad PVP pomocí bakterií rodu *Sphingomonas*, popřípadě jejich směsnými inokuly s dalšími druhy bakterií.

Práce se skládá z několika částí:

1. Literární rešerše zaměřená na popis PVA, PVP a schopností bakterií rodu *Sphingomonas* rozkládat různé kontaminanty
2. Zkoušky rozkladu PVA inokuly bakterií rodu *Sphingomonas* s různou výchozí koncentrací buněk
3. Testy rozkladu PVP bakteriemi rodu *Sphingomonas* a jejich směsnými inokuly s dalšími druhy bakterií, zejména bakteriemi rozkládajícími N-methyl-2-pyrrolidon
4. Zpracování a zhodnocení naměřených výsledků

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie a roztoky

Chemikálie a roztoky použité v této diplomové práci jsou vypsány v následující kapitole. Použité chemikálie byly čistoty p. a. a není-li uvedeno jinak, pocházejí od standardních dodavatelů jako je Fluka, Lachema či Penta.

Polyvinylalkohol (PVA)

Pro pokusy byl využíván PVA nesoucí obchodní označení MOWIOL 5 – 88 od výrobce Clariant, SRN. První číslo označuje viskozitu 4% vodného roztoku PVA při 20°C, která je 5 mPa.s. Druhé číslo označuje stupeň hydrolýzy, což je v tomto případě 88 mol% (zastoupení zbytkových acetátových skupin – 12 %).

Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Pro pokusy byl využíván PVP nesoucí obchodní označení Polyvinylpyrrolidon K 15 vyráběný firmou Fluka.

N-methyl-2-pyrrolidon (NMP)

Pro pokusy byl používán NMP vyráběný firmou Fluka.

Fyziologický roztok (FR)

Bylo naváženo 8,5 g NaCl a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl následně sterilizován v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 30 minut.

Zásobní roztok PQQ (20 µg.l⁻¹)

Bylo naváženo 2 mg PQQ, které byly následně rozpuštěny ve 20 ml fyziologického roztoku a sterilizovány pomocí injekční stříkačky přes filtr Millex GS Filter Unit 0,22 µm.

Roztok pufru A

Bylo naváženo 9,07 g KH_2PO_4 a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody.

Roztok pufru B

Bylo naváženo 23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody.

Roztok stopových prvků

Bylo naváženo:

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

Navážená množství stopových prvků byla následně rozpuštěna v 1000 ml destilované vody.

Roztoky solí

Bylo naváženo:

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

Jednotlivé soli byly naváženy a každá zvlášť byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

Roztok vitaminů

Byl použit roztok vitamínů MEM Vitamins (100x) komerčně vyráběný společností PAA The Cell Culture Company o koncentraci složek:

- D-pantothenát vápenatý (vitamin B5)..... 100 mg.l⁻¹
- Cholinchlorid..... 100 mg.l⁻¹
- Kyselina listová..... 100 mg.l⁻¹
- Myo-Inositol..... 200 mg.l⁻¹
- Nikotinamid..... 100 mg.l⁻¹
- Pyridoxal hydrochlorid..... 100 mg.l⁻¹
- Riboflavin..... 10 mg.l⁻¹
- NaCl..... 8500 mg.l⁻¹
- Thiamin hydrochlorid 100 mg.l⁻¹

Bujon

Byl navážen 1 g tryptonu, rozpuštěn ve 100 ml destilované vody a sterilizován.

Kvasničný extrakt

Bylo naváženo 0,5 g kvasničného extraktu a rozpuštěno v 50 ml destilované vody. Následně byl roztok sterilizován pomocí injekční stříkačky přes filtr Millex GS Filter Unit 0,22 µm.

Roztok salicylanu sodného

Bylo naváženo 5 g salicylanu sodného a rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Následně byl roztok sterilizován pomocí injekční stříkačky přes filtr Millex GS Filter Unit 0,22 µm.

Roztok kyseliny borité (40 g.l⁻¹)

Bylo naváženo 20 g H₃BO₃ a rozpuštěno v 500 ml destilované vody.

Roztok jodu s jodidem draselným

V třecí misce bylo spolu s malým množstvím destilované vody rozetřeno 6,35 g I₂ spolu s 20 g KI. Směs byla následovně kvantitativně převedena do 500 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku.

5.2 Minerální média a živné agary

Minerální médium

Na přípravu 1000 ml minerálního média bylo použito:

- Roztok A (KH₂PO₄)..... 20 ml
- Roztok B (Na₂HPO₄.12H₂O)..... 80 ml
- Destilovaná voda..... 850 ml
- Roztok stopových prvků..... 2 ml
- MgSO₄.7H₂O (10 g.l⁻¹)..... 10 ml
- Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O (3 g.l⁻¹)..... 10 ml
- CaCl₂.2H₂O (1 g.l⁻¹)..... 10 ml
- NH₄Cl (30 g.l⁻¹)..... 10 ml
- NaCl (50 g.l⁻¹)..... 10 ml

Minerální médium s vitaminy

Na přípravu 1000 ml minerálního média byly použity složky, viz minerální médium. Médium bylo sterilizováno a po sterilizaci bylo asepticky přidáno 10 ml vitaminů MEM.

Minerální médium pro kulturu *Sphingomonas paucimobilis* CCM 2129

Na přípravu 1000 ml minerálního média bylo použito:

- Kvasničný extrakt 1 g
- (NH₄)₂HPO₄ 0,5 g
- KCl 0,2 g
- MgSO₄.7H₂O..... 0,2 g

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g
- CaCl_2 0,002 g
- Destilovaná voda..... 1000 ml

Minerální agar bez BTM

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

- K_2HPO_4 0,1 g
- NH_4Cl 0,11 g
- $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g
- CaCl_2 0,002 g
- Agar..... 1,7 g
- Destilovaná voda..... 100 ml

Všechny navážené složky byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody a následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Po vytažení z autoklávu a částečném ochlazení byl agar asepticky rozlit do Petriho misek.

TYA agar

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

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

Složky byly rozmíchány ve 100 ml destilované vody a následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Po vytažení z autoklávu a částečném ochlazení byl agar asepticky rozlit do Petriho misek.

PVA agar s pyrrolochinolinchinonem (PQQ)

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

- PVA..... 0,1 g
- Agar..... 1,9 g
- Zásobní roztok PQQ (0,1 mg.ml⁻¹)..... 0,02 ml
- Roztok stopových prvků..... 0,2 ml
- Destilovaná voda..... 100 ml

Všechny složky byly rozmíchány ve 100 ml destilované vody a následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Po vytažení z autoklávu a částečném ochlazení byl agar asepticky rozlit do Petriho misek.

Agar s N-methyl-2-pyrrolidonem (NMP agar)

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

- NMP..... 0,5 g
- Agar..... 1,9 g
- Roztok stopových prvků..... 0,2 ml
- Destilovaná voda..... 100 ml

Všechny složky byly rozmíchány ve 100 ml destilované vody a následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Po vytažení z autoklávu a částečném ochlazení byl agar asepticky rozlit do Petriho misek.

CASO agar

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

- Trypton..... 1,5 g
- Sójový pepton..... 0,5 g
- NaCl..... 0,5 g
- Destilovaná voda..... 100 ml

Všechny složky byly rozmíchány ve 100 ml destilované vody a následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Po vytažení z autoklávu a částečném ochlazení byl agar asepticky rozlit do Petriho misek.

Agar pro kulturu *Sphingomonas paucimobilis* CCM 2129

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

- Kvasničný extrakt 0,1 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,05 g
- KCl 0,02 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0001 g
- CaCl_2 0,0002 g
- Agar 2 g
- Destilovaná voda 100 ml

Všechny složky byly rozmíchány ve 100 ml destilované vody a následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Po vytažení z autoklávu a částečném ochlazení byl agar asepticky rozlit do Petriho misek.

5.3 Přístroje a laboratorní pomůcky

V rámci této diplomové práce bylo využíváno přístrojové vybavení a laboratorní pomůcky popsané v následujících dvou podkapitolách.

5.3.1 Přístrojové vybavení

Aseptický laminární box Telstar (Španělsko)

Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky TECAN (Sunrise, USA)

Dvoupaprskový UV – VIS spektrofotometr Unicam UV 500 (ThermoSpectronic)

Analyzátor uhlíku TOC-5000A – Shimadzu (Japonsko)

Centrifuga MR23i (Jouan, Francie)

Centrifuga Rotanta 460 R (Hettich)

Laboratorní váhy Adventurer Pro 500

Analytické váhy SI – 64A (Denver Instrument)

Laboratorní sterilizátor SANOclav (Wolf, SRN)

Třepačka laboratorní vratná GFL (SRN)

Elektrická sušárna MORA (ČR)

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem MM2A (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

Chladnička ARDO

Mikroskop Olympus CX 41 (Japonsko)

Termostat BT 120 pro psychrofilní kultivaci (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

Kultivační místnost, 25°C (ÚIOŽP, FT UTB ve Zlíně)

5.3.2 Laboratorní pomůcky

Filtry Millex GS Filter Unit 0,22 µm

Mikrotitrační destička 96 jamek – GAMA, ČR

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

5.4 Biologický materiál – použité bakteriální kultury

Kultury rozkládající PVA:

Kultura JK2 izolovaná z aktivovaného kalu ČOV Zlín – Malenovice v rámci dizertační práce Terezy Václavkové v roce 2006 [50]

Kultury rozkládající NMP:

Kultury Š (šedá) a JF1 byly izolovány ze stojaté povrchové vody přirozeného mokřadu Rákosina ve Stříteži nad Bečvou v rámci DP Jany Fuskové v roce 2013 [51]

Kultury MS Y, MS Z, MS1a MS2 byly izolovány z říční vody v rámci probíhající bakalářské práce Michala Smělíka (FT UTB ve Zlíně)

Kultury MP1 a MP2 z aktivovaného kalu Slovenská Lupča byly získány z dřívějších prací probíhajících na UIOŽP, rozklad NMP těmito kulturami byl ověřen v diplomové práci Karla Křížka v roce 2012 [52]

Kultury MP10, MP11, MP13 byly izolovány z aktivovaného kalu ČOV Zlín – Malenovice v rámci diplomové práce Karla Křížka v roce 2012 [52]

Kultura FEN2B byla získána z laboratorního bioreaktoru, kde byl prováděn rozklad fenolu o koncentraci 2 g.l^{-1} , rozklad NMP touto kulturou byl ověřen v diplomové práci Karla Křížka v roce 2012 [52]

Kultury R0 a J20 byly izolovány z pramenné vody z okolí obce Jasenná v rámci probíhající bakalářské práce Aleny Černotové (FT UTB ve Zlíně)

Další použité kultury:

Kultura *Sphingomonas* sp. DSM No.: 7135 zakoupená z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Braunschweig).

Kultura *Sphingomonas* sp. DSM No.: 7356 zakoupená z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Braunschweig).

Kultura *Sphingobium xenophagum* 8566 zakoupená z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Braunschweig).

Kultura *Sphingobium ummariense* CCM 7431 zakoupená z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno).

Kultura *Sphingomonas histidinilytica* CCM 7545 zakoupená z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno).

Kultura *Sphingomonas paucimobilis* CCM 2129 zakoupená z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno).

6 PRACOVNÍ POSTUPY

6.1 Lahvové degradační testy

Při lahvových degradačních testech bylo používáno minerální médium. Médium bylo rozlito do skleněných lahví, které byly následně sterilizovány. Poté byly přidány sterilní roztoky výchozích substrátů – PVP či NMP. V případě použití PVA, byla tato látka dávkována před sterilizací. Lahve byly plněny tak, aby objem plynné fáze tvořil minimálně tři čtvrtiny objemu lahví. Do takto připravených lahví bylo dále očkováno 20 μ l čisté kultury bakterií ve formě suspence o zákalu odpovídajícím 2. stupni McFarlandovy stupnice. Lahve byly po dobu pokusu umístěny na vratné laboratorní třepačce ve tmě při teplotě 25°C. Ve vhodných časových intervalech byly z lahví pro následné analýzy asepticky odebrány vzorky. Po odběru vzorků byly lahve v laminárním boxu ponechány otevřené po dobu cca 15 minut pro potřebné provzdušnění.

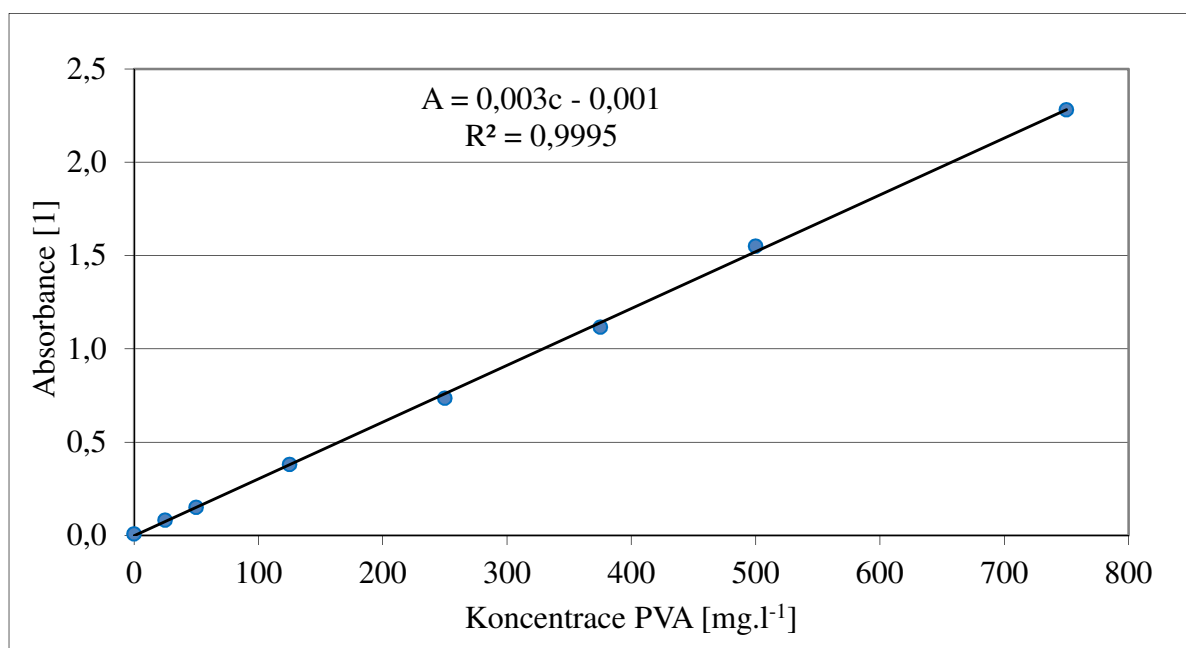
6.2 Zkumavkové degradační testy

Průběh zkumavkových degradačních testů byl ve srovnání s testy lahvovými obdobný. Bylo připraveno minerální médium, které bylo sterilizováno. Do tohoto média byly poté přidány sterilní roztoky výchozích substrátů – PVP či NMP. Opět v případě použité PVA, byla látka dávkována před sterilizací. Takto připravené médium bylo rozplněno do zkumavek, do kterých bylo následně očkováno 20 μ l čisté kultury bakterií ve formě suspenze. Zákal bakteriální suspenze byl odpovídající 2. stupni McFarlandovy stupnice. Zkumavky byly opět plněny tak, aby objem plynné zaujímal minimálně tři čtvrtiny zkumavky. Následně byly zkumavky vodorovně umístěny na vratné laboratorní třepačce ve tmě při teplotě 25°C. Ve vhodných časových intervalech byly zkumavky vizuálně kontrolovány a asepticky byly odebírány vzorky pro další analýzy.

6.3 Stanovení koncentrace PVA v mikrotitračních destičkách

Stanovení koncentrace PVA bylo prováděno v mikrotitračních destičkách spektrofotometrickou (jodometrickou) metodou. Do jednotlivých jamek sloupců destičky byl dávkován supernatant centrifugovaných vzorků o objemu 20 μl , k němuž bylo následně přidáno 42 μl roztoku kyseliny borité a následně 10 μl roztoku jodu s jodidem draselným. Absorbance vzniklého tmavě zeleného zabarvení směsi PVA s trijodidem byla měřena na přístroji TECAN. Měření probíhalo při vlnové délce 660 nm, při nastavení přístroje na 20 sekund míchání a 5 sekund klidu. Nejprve byla měřena absorbance prázdné destičky, která byla následně odečtena od hodnot absorbance destičky se vzorky. Odečtené hodnoty pro jednotlivé vzorky byly zprůměrovány a dosazeny do rovnice kalibrační přímky, viz. *Obr. 9*. Takto byla stanovena koncentrace polyvinylalkoholu v mg.l^{-1} .

Kalibrační závislost byla zjištěna měřením připravených roztoků PVA v určitém rozsahu koncentrací. Výsledná kalibrační závislost byla zpracována v programu Microsoft Excel 2010, z něhož byla získána rovnice kalibrační přímky, sloužící pro výpočet koncentrace PVA.



Obr. 9 Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVA

6.4 Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC)

Před tímto stanovením bylo nutno odstranit z odebraných vzorků biomasu buněk, což bylo prováděno buď centrifugací vzorku v režimu 10 000 g, při 25°C po dobu 10 minut, nebo filtrací přes filtry Millex GS Filter Unit 0,22 µm. Získaný supernatant byl následně ředěn podle předpokládané koncentrace substrátu a analyzován na přístroji Shimadzu. Výstupními hodnotami přístroje byly hodnoty představující koncentraci celkového organického uhlíku (TOC), avšak díky předchozí centrifugaci vzorků se prakticky jedná o koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

6.5 Měření zákalu (OD_{600}) degradačních suspenzí

V průběhu degradace byl sledován vznikající zákal, což sloužilo jako kontrola růstu mikroorganismů. Z lahví, ve kterých probíhala degradace, bylo po pečlivém promíchání odebráno vždy malé množství vzorku, u kterého byl měřen zákal pomocí dvoupaprskového spektrofotometru Unicam při vlnové délce 600 nm.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Degradace PVA kulturou *Sphingomonas* sp. JK2 v závislosti na míře inokulace

7.1.1 Cíle a rozvržení pokusů

V těchto pokusech byl sledován průběh degradace PVA v závislosti na míře inokulace, kdy bylo do degradačních lahví dávkováno různé množství bakteriální suspenze tak, aby výchozí koncentrace bakterií dosahovala od 10^0 po 10^7 buněk/ml. První pokus byl zaměřen i na potvrzení degradace PVA bakteriemi *Sphingomonas* sp. JK2 a byl prováděn s inokuly 10^7 , 10^5 a 10^3 buněk/ml. K nasazení druhého pokusu vedly výsledky pokusu prvního. V tomto pokusu byla použita inokula o koncentraci buněk 10^3 , 10^2 , 10^1 a 10^0 v 1 ml.

Rozvržení pokusů:

Při tomto pokusu byly nasazeny tři série, vždy s třemi paralelními lahvemi. Všechny lahve obsahovaly 90 ml MM s $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ PQQ a 500mg.l^{-1} PVA. Následně byly do lahví dávkovány různé objemy bakteriální suspenze a doplněny MM na celkový objem kapaliny v lahvích 100 ml.

Rozpis lahví – pokus č. 1:

Lahve č. 1, 2 a 3: 10 ml bakteriální suspenze kultury JK2, výchozí počet buněk v suspenzi **10^7 buněk/ml**

Lahve č. 4, 5 a 6: 100 μl bakteriální suspenze kultury JK2 + 9,9 ml MM, výchozí počet buněk v suspenzi **10^5 buněk/ml**

Lahve č. 7, 8 a 9: 1 μl bakteriální suspenze kultury JK2 + 10 ml MM, výchozí počet buněk v suspenzi **10^3 buněk/ml**

V průběhu pokusu byly odebírány vzorky pro stanovení koncentrace PVA a pro stanovení DOC. Pokus probíhal po dobu 7 dní.

Při dalším pokusu byly nasazeny čtyři série opět s třemi paralelními lahvemi vedle sebe. Všechny lahve obsahovaly 100 ml MM s $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ PQQ a 500mg.l^{-1} PVA. Následně byly do lahví dávkovány různé objemy bakteriální suspenze.

Rozpis lahví – pokus č. 2:

Lahve č. 1, 2 a 3: 10 μl bakteriální suspenze kultury JK2 zředěné 1 : 9, výchozí počet buněk v suspenzi **10³ buněk/ml**

Lahve č. 4, 5 a 6: 10 μl bakteriální suspenze kultury JK2 zředěné 1 : 99, výchozí počet buněk v suspenzi **10² buněk/ml**

Lahve č. 7, 8 a 9: 10 μl bakteriální suspenze kultury JK2 zředěné 1 : 999, výchozí počet buněk v suspenzi **10¹ buněk/ml**

Lahve č. 10, 11 a 12: 10 μl bakteriální suspenze kultury JK2 zředěné 1 : 9999, výchozí počet buněk v suspenzi **10⁰ buněk/ml**

V průběhu pokusu byly odebírány vzorky pro stanovení koncentrace PVA, stanovení DOC a měření zákalu (OD_{600}). Pokus probíhal po dobu 12 dní.

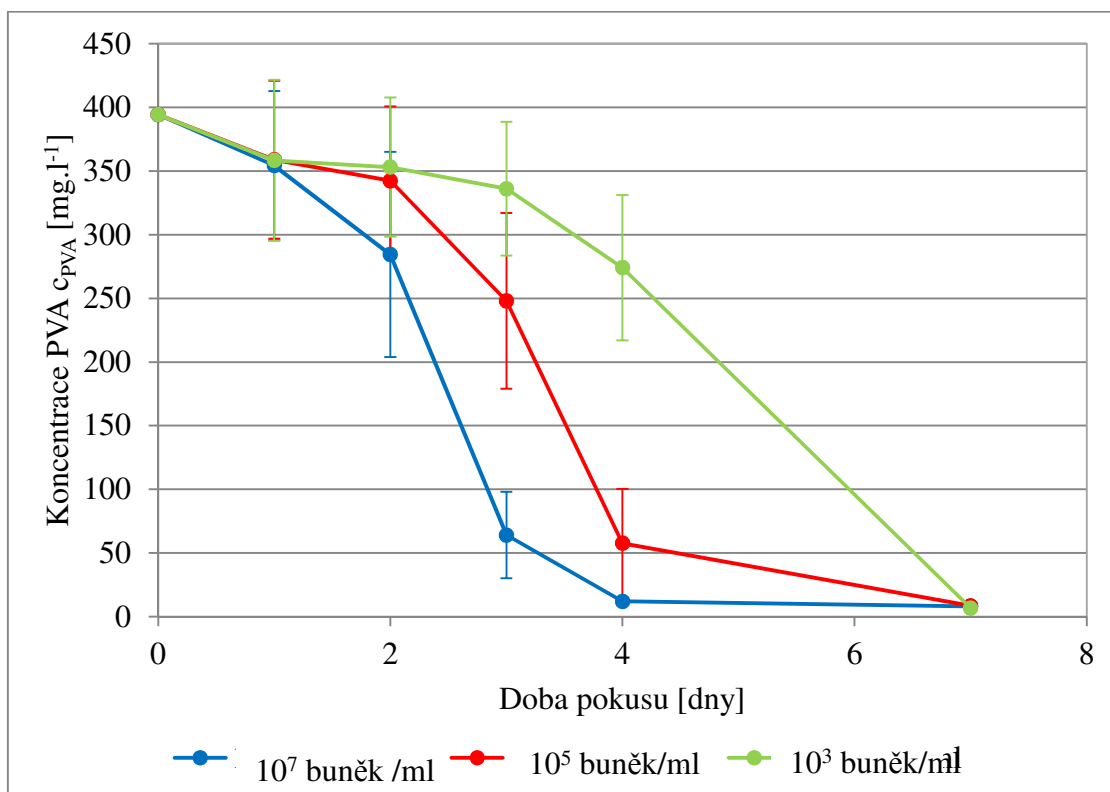
7.1.2 Výsledky pokusů

Pokus č. 1

Hodnoty koncentrace PVA v průběhu pokusu jsou uvedeny v *Tab. III*. Klesající koncentrace PVA jsou znázorněny na *Obr. 10*. Hodnoty DOC stanovené v průběhu pokusu jsou poté uvedeny v *Tab. IV* a jejich grafické znázornění lze nalézt na *Obr. 11*. Všechny hodnoty uvedené v grafech jsou hodnoty odpovídající průměru stanovení ze tří paralelních lahví a chybové úsečky jsou rovny jejich směrodatným odchylkám.

Tab. III Hodnoty koncentrace PVA v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas sp. JK2* v závislosti na míře inokulace

Doba pokusu [dny]		0	1	2	3	4	7
Výchozí počet buněk v suspenzi	Láhev č.	Koncentrace PVA c_{PVA} [mg.l ⁻¹]					
10 ⁷ buněk/ml	1	394,21	286,67	314,79	48,58	14,83	8,04
	2	394,21	387,63	345,46	103,04	12,54	8,83
	3	394,21	388,42	193,00	40,79	8,96	7,83
Průměr		394,21	354,24	284,42	64,14	12,11	8,24
Sm. odchylka		-	58,52	80,64	33,92	2,96	0,53
10 ⁵ buněk/ml	4	394,21	287,79	379,33	269,79	31,75	5,58
	5	394,21	401,54	372,63	303,54	106,96	11,17
	6	394,21	387,13	274,92	170,67	34,33	8,79
Průměr		394,21	358,82	342,29	248,00	57,68	8,51
Sm. odchylka		-	61,93	58,44	69,06	42,70	2,81
10 ³ buněk/ml	7	394,21	285,63	400,17	361,67	314,92	6,04
	8	394,21	400,38	365,63	370,83	298,21	6,75
	9	394,21	388,83	293,04	275,71	208,96	7,67
Průměr		394,21	358,28	352,95	336,07	274,03	6,82
Sm. odchylka		-	63,18	54,68	52,47	56,97	0,82

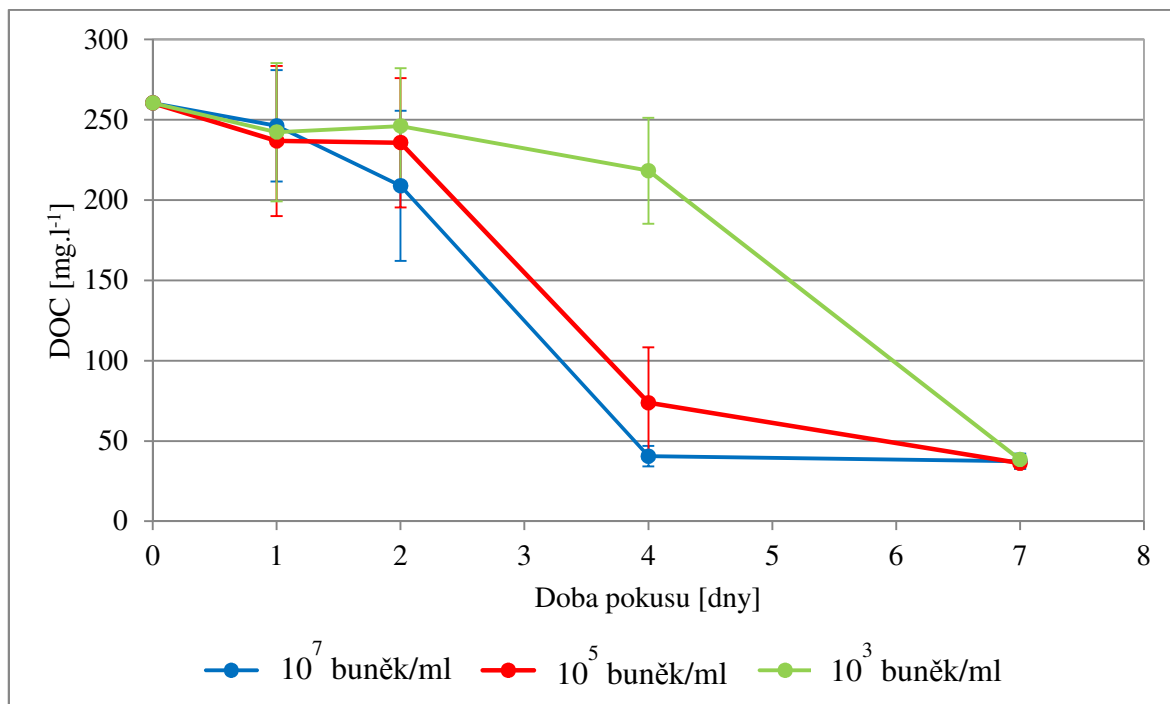


Obr. 10 Graf závislosti koncentrace PVA na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas sp. JK2* v závislosti na míře inokulace

Na *Obr. 10* lze pozorovat koncentraci PVA v průběhu pokusu. Je patrné, že u největšího inokula obsahujícího 10^7 buněk/ml došlo s rozkladu PVA velmi rychle, a to už během čtyř dní. Lagová fáze v tomto případě nebyla téměř zaznamenána. U inokula s výchozí koncentrací buněk 10^5 /ml docházelo k rozkladu PVA taktéž rychle, lze předpokládat, že zde došlo k rozložení PVA přibližně v pátém dni degradace. Jako poslední v tomto pokusu bylo testováno inokulum s výchozí koncentrací buněk 10^3 /ml. Zde byla lagová fáze mírně prodloužená, jak je patrné i z grafu na *Obr. 11*. Po uplynutí lagové fáze, však k rozkladu PVA také došlo, a to po sedmi dnech.

Tab. IV Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou Sphingomonas sp. JK2 v závislosti na míře inokulace

Doba pokusu* [dny]		0	1	2	4	7
Výchozí počet buněk v suspenzi	Láhev č.	DOC [mg.l^{-1}]				
10^7 buněk/ml	1	260,45	206,35	236,35	39,43	34,33
	2	260,45	268,60	235,40	47,38	42,79
	3	260,45	263,80	155,00	34,75	34,74
Průměr		260,45	246,25	208,92	40,52	37,29
Sm. odchylka		-	34,64	46,70	6,38	4,77
10^5 buněk/ml	4	260,45	182,90	257,05	54,90	38,78
	5	260,45	262,30	260,75	113,65	36,16
	6	260,45	265,25	189,35	52,85	33,53
Průměr		260,45	236,82	235,72	73,80	36,15
Sm. odchylka		-	46,72	40,20	34,53	2,63
10^3 buněk/ml	7	260,45	192,60	265,45	236,80	35,99
	8	260,45	266,90	268,30	237,95	41,57
	9	260,45	267,40	204,55	180,15	37,59
Průměr		260,45	242,30	246,10	218,30	38,38
Sm. odchylka		-	43,03	36,01	33,04	2,87



Obr. 11 Graf závislosti koncentrace DOC na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas sp. JK2* v závislosti na míře inokulace

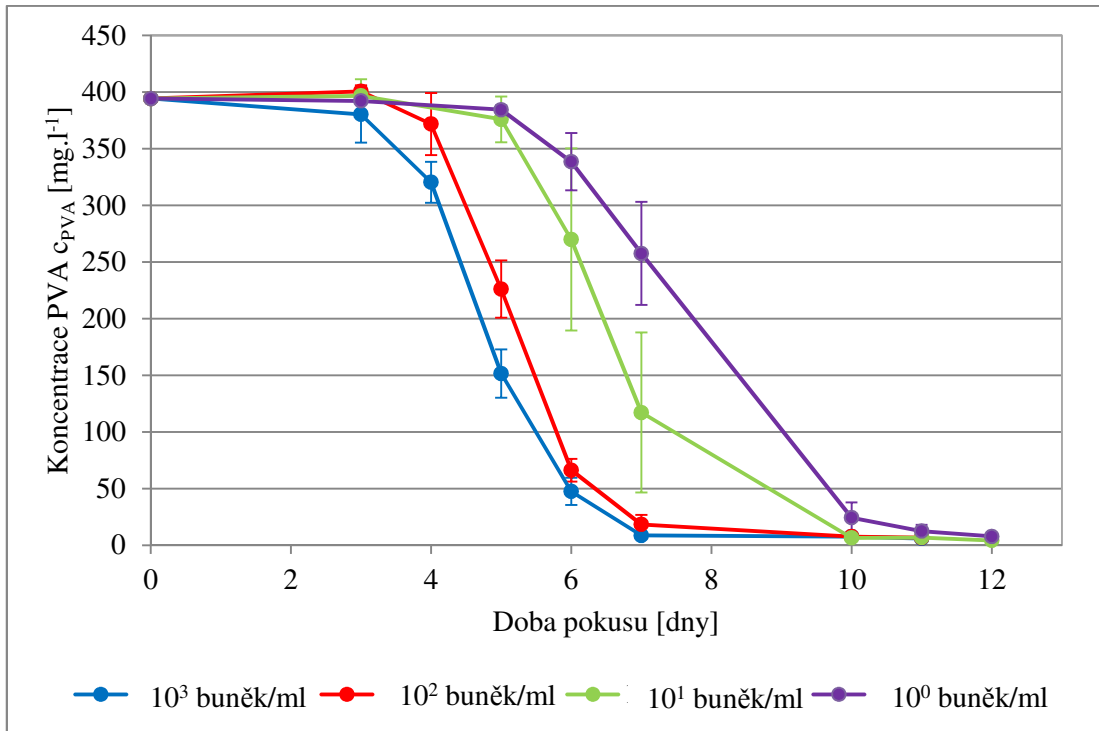
V tomto pokusu bylo potvrzeno, že kultura *Sphingomonas sp. JK2* je schopna rozkladu PVA. K rozkladu PVA docházelo za použití inokul o různých velikostech. Na základě výsledků získaných v tomto pokusu byl nasazen pokus druhý, kde byla testována inokula s menší výchozí koncentrací buněk. Důvodem nasazení druhého pokusu bylo vyvrácení možnosti toho, že rozklad PVA je závislý na hustotě buněk přítomných v degradační suspenzi.

Pokus č. 2

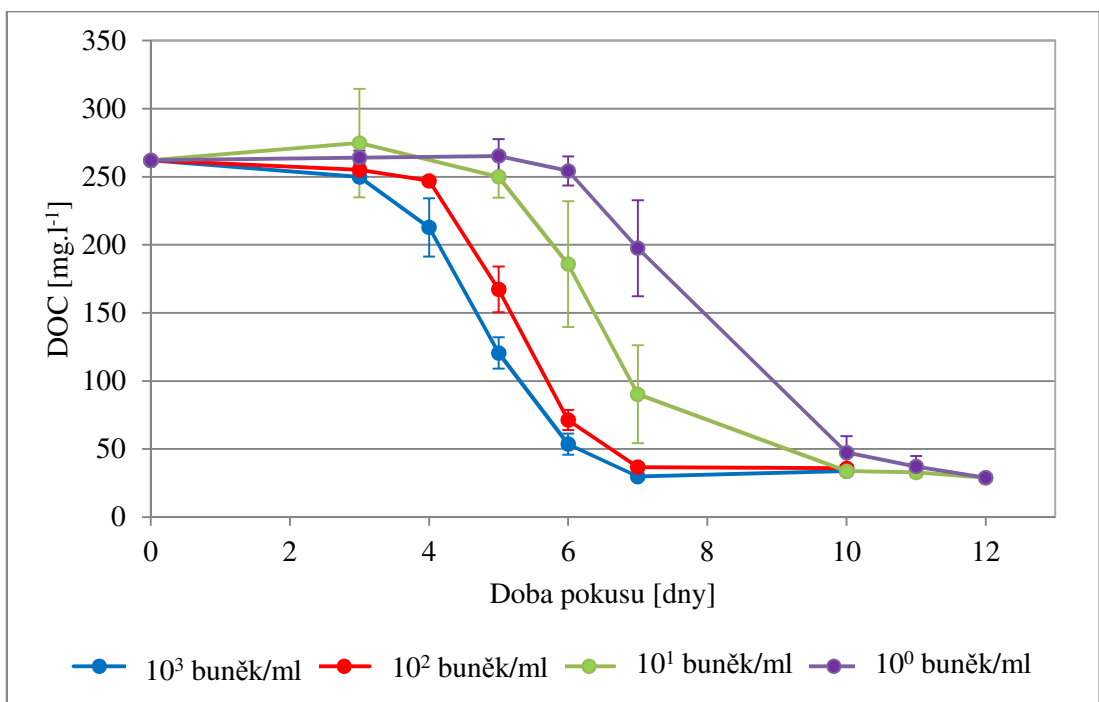
Hodnoty koncentrace PVA v průběhu pokusu jsou uvedeny v *Tab. V*. Klesající koncentrace PVA jsou znázorněny na *Obr. 12*. Hodnoty DOC stanovené v průběhu pokusu jsou poté uvedeny v *Tab. VI* a jejich grafické znázornění lze nalézt na *Obr. 13*. Dále v *Tab. VII* jsou uvedeny hodnoty zákalu (OD_{600}) měřené v průběhu pokusu a na *Obr. 14* jejich grafické znázornění. Všechny hodnoty uvedené v grafech jsou hodnoty odpovídající průměru stanovení ze tří paralelních lahví a chybové úsečky jsou rovny jejich směrodatným odchylkám.

Tab. V Hodnoty koncentrace PVA v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas sp. JK2* v závislosti na míře inokulace

Doba pokusu [dny]		0	3	4	5	6	7	10	11	12
Výchozí počet buněk v suspenzi	Láhev č.	Koncentrace PVA c_{PVA} [mg.l ⁻¹]								
10 ³ buněk/ml	1	394,43	355,25	328,46	170,50	52,29	11,21	7,63	6,21	-
	2	394,43	380,76	299,83	128,38	33,88	6,67	9,50	4,92	-
	3	394,43	405,04	333,08	156,00	56,42	8,00	5,75	6,71	-
Průměr		394,43	380,35	320,46	151,63	47,53	8,63	7,63	5,94	-
Sm. odchylka		-	24,90	18,01	21,40	12,00	2,33	1,88	0,92	-
10 ² buněk/ml	4	394,43	406,75	399,54	254,08	75,29	24,83	5,96	5,38	-
	5	394,43	397,75	344,88	220,04	68,08	21,33	7,67	6,50	-
	6	394,43	397,75	371,17	204,67	55,50	9,00	9,42	8,13	-
Průměr		394,43	400,75	371,86	226,26	66,29	18,39	7,68	6,67	-
Sm. odchylka		-	5,20	27,34	25,29	10,02	8,32	1,73	1,38	-
10 ¹ buněk/ml	7	394,43	380,33	-	362,04	292,42	105,38	7,50	7,33	5,04
	8	394,43	402,07	-	366,92	180,88	53,17	6,25	6,54	3,33
	9	394,43	408,13	-	399,17	336,63	193,00	5,79	6,42	4,50
Průměr		394,43	396,84	-	376,04	269,97	117,18	6,51	6,76	4,29
Sm. odchylka		-	14,62	-	20,18	80,26	70,66	0,88	0,49	0,87
10 ⁰ buněk/ml	10	394,43	385,21	-	386,92	364,04	249,88	28,46	12,67	6,25
	11	394,43	389,22	-	380,04	313,63	216,42	9,04	7,00	6,21
	12	394,43	402,47	-	386,29	338,21	306,46	35,38	17,83	10,79
Průměr		394,43	392,30	-	384,42	338,63	257,58	24,29	12,50	7,75
Sm. odchylka		-	9,03	-	3,80	25,21	45,51	13,66	5,42	2,63



Obr. 12 Graf závislosti koncentrace PVA na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas sp. JK2* v závislosti na míře inokulace



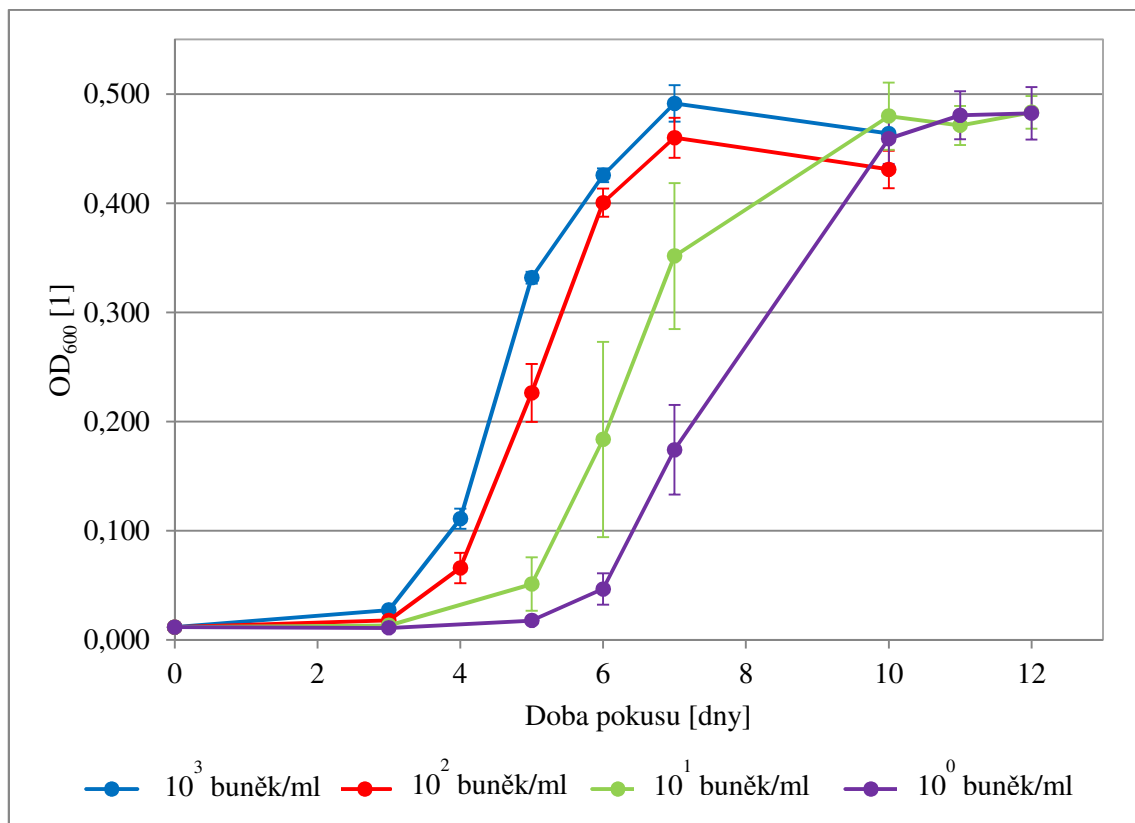
Obr. 13 Graf závislosti koncentrace DOC na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas sp. JK2* v závislosti na míře inokulace

Tab. VI Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas* sp. JK2 v závislosti na míře inokulace

Doba pokusu [dny]		0	3	4	5	6	7	10	11	12
Výchozí počet buněk v suspenzi	Láhev č.	DOC [mg.l ⁻¹]								
10 ³ buněk/ml	1	262,08	252,35	236,75	126,60	60,10	31,76	35,18	-	-
	2	262,08	248,50	206,50	107,35	45,02	28,40	33,86	-	-
	3	262,08	248,70	195,45	127,85	55,80	29,23	32,36	-	-
Průměr		262,08	249,85	212,90	120,60	53,64	29,79	33,80	-	-
Sm. odchylka		-	2,17	21,38	11,49	7,77	1,75	1,41	-	-
10 ² buněk/ml	4	262,08	249,00	245,35	186,45	79,40	39,81	35,48	-	-
	5	262,08	258,45	249,30	160,10	69,60	37,26	34,00	-	-
	6	262,08	257,75	246,50	155,20	65,05	33,28	38,48	-	-
Průměr		262,08	255,07	247,05	167,25	71,35	36,78	35,99	-	-
Sm. odchylka		-	5,27	2,03	16,81	7,33	3,29	2,28	-	-
10 ¹ buněk/ml	7	262,08	247,80	-	244,80	190,15	85,25	34,59	35,02	28,76
	8	262,08	256,05	-	238,00	137,70	57,10	30,17	32,20	28,02
	9	262,08	320,60	-	267,25	229,70	128,50	36,77	31,32	29,91
Průměr		262,08	274,82	-	250,02	185,85	90,28	33,84	32,84	28,89
Sm. odchylka		-	39,86	-	15,31	46,15	35,97	3,36	1,93	0,95
10 ⁰ buněk/ml	10	262,08	259,40	-	258,55	249,15	188,15	47,33	44,53	28,31
	11	262,08	263,30	-	257,60	247,20	167,80	35,63	29,24	30,00
	12	262,08	269,45	-	279,70	266,55	236,60	59,50	37,83	28,56
Průměr		262,08	264,05	-	265,28	254,30	197,52	47,49	37,20	28,95
Sm. odchylka		-	5,07	-	12,49	10,65	35,34	11,94	7,66	0,91

Tab. VII Hodnoty zákalu (OD_{600}) v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas sp. JK2* v závislosti na míře inokulace

Doba pokusu [dny]		0	3	4	5	6	7	10	11	12
Výchozí počet buněk v suspenzi	Láhev č.	Zákal (OD_{600}) [1]								
10^3 buněk/ml	1	0,012	0,029	0,108	0,327	0,430	0,508	0,466	-	-
	2	0,012	0,028	0,122	0,338	0,428	0,491	0,463	-	-
	3	0,012	0,025	0,104	0,331	0,419	0,475	0,463	-	-
Průměr		0,012	0,027	0,111	0,332	0,426	0,491	0,464	-	-
Sm. odchylka		0,000	0,002	0,009	0,005	0,006	0,017	0,01	-	-
10^2 buněk/ml	4	0,012	0,017	0,051	0,198	0,394	0,464	0,449	-	-
	5	0,012	0,018	0,070	0,251	0,392	0,440	0,429	-	-
	6	0,012	0,019	0,078	0,231	0,415	0,476	0,415	-	-
Průměr		0,012	0,018	0,066	0,226	0,401	0,460	0,431	-	-
Sm. odchylka		0,000	0,001	0,014	0,026	0,013	0,018	0,017	-	-
10^1 buněk/ml	7	0,012	0,014	-	0,046	0,171	0,350	0,453	0,474	0,481
	8	0,012	0,015	-	0,078	0,279	0,419	0,473	0,452	0,470
	9	0,012	0,011	-	0,030	0,101	0,286	0,513	0,488	0,499
Průměr		0,012	0,013	-	0,051	0,184	0,352	0,480	0,471	0,483
Sm. odchylka		0,000	0,002	-	0,024	0,089	0,067	0,031	0,018	0,015
10^0 buněk/ml	10	0,012	0,010	-	0,020	0,046	0,195	0,468	0,480	0,482
	11	0,012	0,013	-	0,016	0,061	0,200	0,433	0,459	0,459
	12	0,012	0,011	-	0,018	0,033	0,127	0,476	0,503	0,507
Průměr		0,012	0,011	-	0,018	0,047	0,174	0,459	0,481	0,482
Sm. odchylka		0,000	0,001	-	0,002	0,014	0,041	0,023	0,022	0,024



Obr. 14 Graf závislosti zákalu (OD_{600}) na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou *Sphingomonas sp. JK2* v závislosti na míře inokulace

Na Obr. 14 lze pozorovat nárůst zákalu po dobu trvání pokusu. U lahví s koncentrací buněk 10^3 , 10^2 a 10^1 / ml lze na grafu pozorovat lagovou fázi, trvající přibližně 3 dny. U lahví s koncentrací buněk 10^0 /ml byla doba lagové fáze prodloužena až na 5 dnů. Následně docházelo k růstu zákalu až na maximální hodnoty.

Z provedených pokusů vyplývá, že hustota buněk prodlužuje lagovou fázi rozkladu polyvinylalkoholu, ale podstatně neovlivňuje rychlost následné degradace. Hustota buněk tedy nerozhoduje o tom, zda degradace nastane. Výsledky provedených pokusů naznačují, že v tomto případě nenachází uplatnění systém quorum sensing.

7.2 Degradace PVP kulturou *Sphingomonas* sp. JK2

7.2.1 Cíle a rozvržení pokusu

Z předchozích diplomových prací vyplývá, že PVP je s největší pravděpodobností biologicky nerozložitelný. Součástí této práce byl ovšem výzkum potenciální rozložitelnosti PVP pomocí bakterií rodu *Sphingomonas*. Tyto bakterie byly vybrány právě proto, že jsou schopny rozkladu velkého množství xenobiotických látek, včetně polyvinylalkoholu. PVA a PVP jsou polymery s dlouhým uhlíkatým řetězcem, rozpustné ve vodě. Právě díky určité podobnosti těchto polymerů bylo předpokládáno, že by k rozkladu PVP pomocí bakterií rodu *Sphingomonas* mohlo docházet. Pro první pokus byla vybrána kultura *Sphingomonas* sp. JK2.

Rozvržení pokusu:

V tomto pokusu byly nasazeny tři série se dvěma paralelními lahvemi vedle sebe. Všechny lahve obsahovaly 10 ml MM s $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ PQQ a dále byl do lahví dávkován výchozí substrát (PVA, PVP) a určený objem bakteriální suspenze. V první sérii lahví byl jako jediný zdroj uhlíku a energie použit PVP. V sérii druhé byl kromě PVP přidán také PVA, a to jako induktor pro tvorbu degradačních enzymů a současně jako substrát pro podporu kultury JK2. Poslední série lahví obsahovala pouze PVA a sloužila k vizuálnímu srovnání s dalšími sériemi lahví.

Rozpis lahví:

Láhve č. 1, 2: 500 mg.l^{-1} PVP + kultura JK2

Láhve č. 3, 4: 500 mg.l^{-1} PVP + 100 mg.l^{-1} PVA + kultura JK2

Láhve č. 5, 6: 100 mg.l^{-1} PVA + kultura JK2

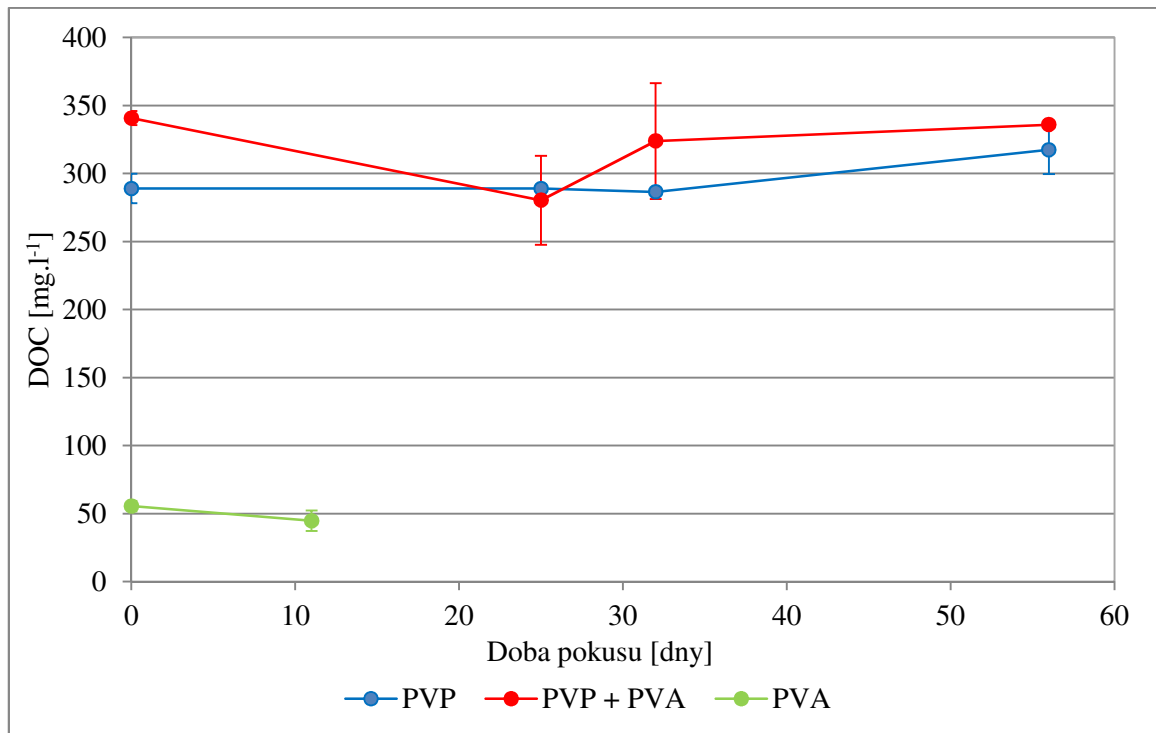
V určených časových intervalech byly v průběhu pokusu odebírány vzorky pro stanovení DOC. Pokus probíhal po dobu 56 dní.

7.2.2 Výsledky pokusu

Hodnoty DOC v průběhu pokusu jsou uvedeny v *Tab. VIII*. V grafu na *Obr. 15* jsou uvedeny hodnoty odpovídající průměru stanovení ze dvou paralelních lahví a chybové úsečky, které jsou rovný jejich směrodatným odchylkám.

Tab. VIII Hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP kulturou Sphingomonas sp. JK2

Výchozí substrát	Lahev č.	Doba pokusu [dny]				
		0	11	25	32	56
		DOC [mg.l ⁻¹]				
PVP	1	281,33	-	287,84	286,79	304,85
	2	296,59	-	290,01	286,16	330,12
Průměr		288,96	-	288,93	286,48	317,49
Sm. odchylka		10,79	-	1,53	0,45	17,87
PVP + PVA	3	344,47	-	303,52	293,79	335,93
	4	337,05	-	257,11	353,92	-
Průměr		340,76	-	280,32	323,86	335,93
Sm. odchylka		5,25	-	32,82	42,52	-
PVA	5	58,15	50,02	-	-	-
	6	52,77	39,34	-	-	-
Průměr		55,46	44,68	-	-	-
Sm. odchylka		3,80	7,55	-	-	-



Obr. 15 Graf závislosti koncentrace DOC na době trvání pokusu degradace PVP kulturou *Sphingomonas sp. JK2*

Průběh pokusu je patrný z Obr. 15. V lahvích č. 1 a 2, kde byl přítomen pouze PVP, znázorněných modrou křivkou, k rozkladu nedocházelo. Na konci pokusu bylo patrné, že u hodnot DOC dochází k nepatrnému nárůstu, což bylo pravděpodobně způsobeno odumíráním buněk a rozkladem buněčné biomasy. U lahví č. 3 a 4, znázorněných křivkou červenou, docházelo pouze k rozkladu PVA. Klesající část křivky má velice podobný trend jako křivka odpovídající lahvím č. 5 a 6, kde byl přítomen pouze PVA. Od 25. dne pokusu, dochází u lahví obsahujících PVP + PVA, podobně jako u lahví obsahujících pouze PVP, k nárůstu hodnot DOC, což je opět pravděpodobně způsobeno odumíráním buněk a rozkladem buněčné biomasy.

Pokus byl po uplynutí 56 dní přerušen, jelikož k rozkladu PVP nedocházelo. Závěrem pokusu je tedy možno říci, že k rozkladu PVP čistou kulturou bakterií *Sphingomonas sp. JK2* nedochází, a to ani v případě přítomnosti PVA jako kosubstrátu.

7.3 Degradace PVP kulturami bakterií rodů *Sphingomonas* a *Sphingobium* (DSMZ, Německo)

7.3.1 Cíle a rozvržení pokusu

Kultury použité v následujícím pokusu byly zakoupeny z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur. Použité kultury byly vybrány na základě svých degradačních schopností.

Kultura *Sphingomonas* sp. DSM 7356 je schopna využívat arylovou část propachloru, N-methyl- nebo N-ethylacetanilid jako jediný zdroj uhlíku [53]. Z tohoto důvodu bylo předpokládáno, že by zmíněná kultura mohla být schopna odštěpení pyrrolidonového kruhu z uhlíkatého řetězce PVP. Další použitou kulturou byla kultura *Sphingobium xenophagum* DSM 8566 využívající anilin, N,N-dimethylanilin či 4-hydroxybenzoát [53]. Tato kultura je schopna rozkladu anilinového kruhu, bylo tedy předpokládáno, že by mohla být schopna rozkladu pyrrolidonového kruhu či jeho odštěpení z uhlíkatého řetězce. Poslední použitou kulturou byla kultura *Sphingomonas* sp. DSM 7135, která je schopna využívat acetoxydibenzofurany, dibenzofuran, hydroxydibenzofuran či kyselinu salicylovou [53]. Tato kultura byla opět vybrána díky svým schopnostem, přičemž bylo předpokládáno, že by mohla být schopna otevření pyrrolidonového kruhu.

Rozvržení pokusu:

V tomto pokusu bylo nasazeno šest sérií, každá se dvěma paralelními lahvemi vedle sebe. Pro pokus byly připraveny dvě dávky MM s vitaminy – první dávka byla složena z MM s vitaminy a se 600 mg.l^{-1} PVP, dávka druhá se skládala z MM s vitaminy, s 600 mg.l^{-1} PVP a 100 mg.l^{-1} NMP. Všechny lahve obsahovaly 20 ml MM s vitaminy, dále bylo do lahví dávkováno 20 μl bakteriální suspenze. V průběhu pokusu, 2. den kultivace, bylo pro podporu růstu kultury do lahví s kulturou DMS 8566 přidáno 100 μl sterilního roztoku kvasničného extraktu. Následně, 7. den kultivace, bylo do lahví s kulturou DMS 7356 přidáno 20 μl bakteriální suspenze MS1 a 20 μl bakteriální suspenze Š.

Rozpis lahví:

Láhve č. 1, 2: 600 mg.l⁻¹ PVP + kultura DSM 7356 + kultura MS1 + kultura Š

Láhve č. 3, 4: 600 mg.l⁻¹ PVP + kultura DSM 8566 + 100 µl roztoku kvasničného extraktu

Láhve č. 5, 6: 600 mg.l⁻¹ PVP + kultura DSM 7135

Láhve č. 7, 8: 600 mg.l⁻¹ PVP + 100 mg.l⁻¹ NMP + kultura DSM 7356 + kultura MS1 + kultura Š

Láhve č. 9, 10: 600 mg.l⁻¹ PVP + 100 mg.l⁻¹ NMP + kultura DSM 8566 + 100 µl roztoku kvasničného extraktu

Láhve č. 11, 12: 600 mg.l⁻¹ PVP + 100 mg.l⁻¹ NMP + kultura DSM 7135

V určených časových intervalech byly v průběhu pokusu odebírány vzorky pro stanovení DOC. Pokus probíhal po dobu 36 dní.

7.3.2 Výsledky pokusu

Hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP jsou uvedeny v *Tab. IX*. V *Tab. X* jsou uvedeny hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP s přidavkem NMP.

Tab. IX Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVP bakteriemi *Sphingomonas* a *Sphingobium* (DSMZ, Německo)

Výchozí substrát	Použitá kultura	Lahev č.	Doba pokusu [dny]			
			0	12	26	36
			DOC [mg.l ⁻¹]			
PVP	DSM 7356	1	338,7	341,3	330,7	327,4
		2	338,7	330,0	334,9	319,6
		Průměr	338,7	335,7	332,8	323,5
		Sm. odchylka	-	8,0	3,0	5,5
	DSM 8566	3	358,8	342,5	360,1	350,8
		4	358,8	348,9	356,8	351,7
		Průměr	358,8	345,7	358,5	351,3
		Sm. odchylka	-	4,5	2,3	0,6
	DSM 7135	5	338,7	333,5	353,2	350,0
		6	338,7	341,7	346,1	345,4
		Průměr	338,7	337,6	349,7	347,7
		Sm. odchylka	-	5,8	5,0	3,3

Tab. X Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVP bakteriemi *Sphingomonas* a *Sphingobium* (DSMZ, Německo), s přísávkem *N*-methyl-2-pyrrolidonu

Výchozí substrát	Použitá kultura	Lahev č.	Doba pokusu [dny]			
			0	12	26	36
			DOC [mg.l ⁻¹]			
PVP + NMP	DSM 7356	7	399,8	330,9	339,8	349,7
		8	399,8	330,2	348,4	339,8
		Průměr	399,8	330,6	344,1	344,8
		Sm. odchylka	-	0,5	6,1	7,0
	DSM 8566	9	419,9	380,8	408,2	393,0
		10	419,9	382,5	398,4	395,4
		Průměr	419,9	381,7	403,3	394,2
		Sm. odchylka	-	1,2	6,9	1,7
	DSM 7135	11	399,8	394,4	406,0	410,2
		12	399,8	393,8	414,4	402,3
		Průměr	399,8	394,1	410,2	406,3
		Sm. odchylka	-	0,4	5,9	5,6

Lahve byly po celou dobu pokusu vizuálně pozorovány. U obou sérií lahví obsahujících kulturu DSM 7356 nebyl ani po sedmi dnech pozorován vznik viditelného zákalu, a proto byly do těchto lahví přidány kultury MS1 a Š, rozkládající NMP. Tyto kultury byly přidány také proto, aby došlo k ověření, zda dochází k rozkladu PVP. Bylo předpokládáno, že pokud by kultura DSM 7356 byla schopna odštěpení pyrrolidonového kruhu, bakterie rozkládající NMP by pak mohly odštěpený kruh rozkládat. Z výsledků uvedených v Tab. IX je však patrné, že k odštěpení pyrrolidonového kruhu kulturou DSM 7356 nedochází, neboť pokles hodnoty DOC pod úroveň odpovídající zastoupení uhlíku v PVP (cca 330 mg.l⁻¹) nenastal.

V případě obou sérií lahví s kulturou DSM 8566 došlo pouze k rozkladu přítomného kvasničného extraktu.

Předpokládané degradační vlastnosti zakoupených kultur nebyly v tomto pokusu potvrzeny. Použité kultury DSM tedy nejsou schopny rozkladu PVP.

Z Tab. X vyplývá, že ani za přítomnosti NMP jako kosubstrátu k rozkladu PVP nedošlo. NMP obsažený v degradačních lahvích pravděpodobně neindukuje tvorbu

degradačních enzymů u použitých kultur. Hodnoty DOC v průběhu pokusu se v obou sériích spíše zvyšovaly v důsledku odumírání buněk a rozkladu buněčné biomasy.

Závěrem lze tedy říci, že u kultur DSM k rozkladu PVP ani NMP nedochází. U kultury DSM 7135 byl pokus ještě dále modifikován, viz. následující podkapitola.

7.3.3 Modifikovaný pokus s kulturou DSM 7135

Cíle a rozvržení pokusu

Z předchozího pokusu je zřejmé, že k rozkladu PVP ani NMP kulturou DSM 7135 nedochází. Bylo tak zjištěno, že přídavek NMP není schopen indukovat tvorbu enzymů, pomocí nichž kultura DSM 7135 rozkládá aromatický kruh degradovaných látek. V tomto pokusu byl tedy testován rozklad PVP pomocí této kultury, ovšem za přídavku roztoku salicylanu sodného jako kosubstrátu, neboť salicylan je DSMZ [53] uváděn jako růstový substrát této kultury.

Rozvržení pokusu:

V pokusu byly nasazeny dvě série, každá se dvěma paralelními lahvemi. Bylo použito MM s vitaminy, s 600 mg.l^{-1} PVP a se 100 mg.l^{-1} salicylanu sodného. Všechny lahve obsahovaly 20 ml MM s vitaminy, dále bylo do lahví dávkováno 20 μl bakteriální suspenze. Do lahví jedné série byl dávkován kvasničný extrakt (50 mg.l^{-1}).

Rozpis lahví:

Láhve č. 1, 2: 600 mg.l^{-1} PVP + 100 mg.l^{-1} salicylan sodný + kultura DSM 7135

Láhve č. 3, 4: 600 mg.l^{-1} PVP + 100 mg.l^{-1} salicylan sodný + kultura DSM 7135

+ 100 μl roztoku kvasničného extraktu

V určených časových intervalech byly v průběhu pokusu odebírány vzorky pro stanovení DOC. Pokus probíhal po dobu 32 dní.

Výsledky pokusu

Hodnoty DOC v průběhu pokusu jsou uvedeny v *Tab. XI*.

Tab. XI Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVP kulturou DSM 7351

Lahev č.	Doba pokusu [dny]			
	0	10	27	32
	DOC [mg.l ⁻¹]			
1	395,8	314,3	329,1	314,5
2	395,8	336,7	356,9	335,3
Průměr	395,8	325,5	343,0	324,9
Sm. odchylka	-	15,8	19,7	14,7
3	415,9	346,5	367,4	349,0
4	415,9	343,5	334,9	331,4
Průměr	415,9	345,0	351,2	340,2
Sm. odchylka	-	2,1	23,0	12,4

U lahví č. 1 a 2 došlo ke snížení hodnot DOC, tyto hodnoty však odpovídají pouze rozkladu přítomného salicylanu sodného. Taktéž u lahví č. 3 a 4 došlo ke snížení hodnot DOC, opět však tyto hodnoty odpovídají pouze rozložení salicylanu sodného. K rozkladu přidaného kvasničného extraktu v lahvích č. 3 a 4 pravděpodobně nedošlo. V závěru pokusu docházelo k nárůstům hodnot DOC, způsobeným odumíráním buněk a rozkladem buněčné biomasy.

Z provedeného pokusu vyplývá, že kultura DSM 7135 není schopna rozkladu PVP, a to ani po přidání salicylanu sodného jako kosubstrátu. Přítomnost salicylanu sodného v degradačních lahvích sice umožňuje, na rozdíl od přítomnosti NMP, zahájit tvorbu degradačních enzymů dané metabolické dráhy, avšak ani v přítomnosti těchto enzymů k rozkladu PVP nedochází.

7.4 Degradace PVP kulturami bakterií rodů *Sphingomonas* a *Sphingobium* (CCM, ČR)

7.4.1 Cíle a rozvržení pokusu

Kultury použité v následujícím pokusu byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů. Použité kultury byly vybrány na základě svých degradačních schopností.

Kultura *Sphingomonas histidinilytica* CCM 7545 je schopna degradace histidinu a je schopna využívat hexachlorcyklohexan. Kultura *Sphingomonas ummariense* CCM 7431 je rovněž schopna degradace β -hexachlorcyklohexanu. Poslední kulturou je kultura *Sphingomonas paucimobilis* CCM 2129, která je schopna využívat 2,4-dichlorofenoxyalkylkarboxylové kyseliny. [54] Cílem pokusu bylo zjistit, zda jsou tyto kultury schopny rozkladu pyrrolidonového kruhu.

Rozvržení pokusu:

V tomto pokusu bylo nasazeno šest sérií, každá se dvěma paralelními lahvemi vedle sebe. Pro pokus byly připraveny dvě dávky MM s vitaminy – první dávka byla složena z MM s vitaminy a se 600 mg.l⁻¹ PVP, dávka druhá se skládala z MM s vitaminy, s 600 mg.l⁻¹ PVP a 100 mg.l⁻¹ NMP. Všechny lahve obsahovaly 20 ml MM s vitaminy, dále bylo do lahví dávkováno 20 μ l bakteriální suspenze.

Rozpis lahví:

Láhve č. 1, 2: 600 mg.l⁻¹ PVP + kultura CCM 7545

Láhve č. 3, 4: 600 mg.l⁻¹ PVP + kultura CCM 7431

Láhve č. 5, 6: 600 mg.l⁻¹ PVP + kultura CCM 2129

Láhve č. 7, 8: 600 mg.l⁻¹ PVP + 100 mg.l⁻¹ NMP + kultura CCM 7545

Láhve č. 9, 10: 600 mg.l⁻¹ PVP + 100 mg.l⁻¹ NMP + kultura CCM 7431

Láhve č. 11, 12: 600 mg.l⁻¹ PVP + 100 mg.l⁻¹ NMP + kultura CCM 2129

V určených časových intervalech byly v průběhu pokusu odebírány vzorky pro stanovení DOC. Pokus probíhal po dobu 20 dní.

7.4.2 Výsledky pokusu

Hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP jsou uvedeny v *Tab. XII*. V *Tab. XIII* jsou uvedeny hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP s přidavkem NMP.

Tab. XII Hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP kulturami bakterií Sphingomonas a Sphingobium (CCM, ČR)

Výchozí substrát	Použitá kultura	Lahev č.	Doba pokusu [dny]			
			0	7	15	20
			DOC [mg.l ⁻¹]			
PVP	CCM 7545	1	338,5	367,9	344,5	320,3
		2	338,5	359,2	331,2	313,4
		Průměr	338,5	363,6	337,9	316,9
		Sm. odchylka	-	6,2	9,4	4,9
	CCM 7431	3	338,5	358,4	336,5	316,2
		4	338,5	366,1	351,3	314,9
		Průměr	338,5	362,3	343,9	315,6
		Sm. odchylka	-	5,4	10,5	0,9
	CCM 2129	5	338,5	371,2	329,8	316,9
		6	338,5	366,1	337,7	318,6
		Průměr	338,5	368,7	333,8	317,8
		Sm. odchylka	-	3,6	5,6	1,2

Z *Tab. XII* je patrné, že 7. den pokusu došlo ke zvýšení hodnot DOC. Příčinu tohoto zvýšení nedokážeme vysvětlit, protože však bylo zaznamenáno ve všech případech, předpokládáme systémový vliv. V následujících dnech pokusu naopak docházelo k mírnému poklesu hodnot DOC.

Tab. XIII Hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP kulturami bakterií *Sphingomonas* a *Sphingobium* (CCM, ČR), s přidavkem *N*-methyl-2-pyrrolidonu

Výchozí substrát	Použitá kultura	Lahev č.	Doba pokusu [dny]			
			0	7	15	20
			DOC [mg.l ⁻¹]			
PVP + NMP	CCM 7545	7	411,6	445,4	418,20	396,0
		8	411,6	447,8	413,70	397,6
		Průměr	411,6	446,6	415,95	396,8
		Sm. odchylka	-	1,2	3,18	1,1
	CCM 7431	9	411,6	441,0	397,80	383,3
		10	411,6	425,0	391,40	375,2
		Průměr	411,6	433,0	394,60	379,3
		Sm. odchylka	-	11,3	4,53	5,7
	CCM 2129	11	411,6	425,4	415,10	382,3
		12	411,6	454,3	416,60	398,9
		Průměr	411,6	439,9	415,85	390,6
		Sm. odchylka	-	20,4	1,06	11,7

V Tab. XIII lze pozorovat, podobně jako v Tab. XII, zvýšení hodnot DOC 7. den pokusu. V následujících dnech pokusu však docházelo k mírnému poklesu hodnot DOC a protože tato tendence byla poněkud odlišná od průběhů předcházejících pokusů, nebyl pokus prozatím ukončen a nadále bude sledován pracovníky ÚIOŽP.

7.5 Pokus rozkladu postranních skupin PVP bakteriemi degradujícími NMP

7.5.1 Cíle a rozvržení pokusu

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda je některá z kultur rozkládajících N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) schopna rozložit postranní skupiny PVP. Kultury rozkládající NMP byly vybrány z toho důvodu, že NMP je tvořen obdobným dusíkatým heterocyklem, který se nachází také v PVP. Vyhodnocení pokusu vycházelo ze skutečnosti, že uhlík obsažený v postranních skupinách PVP představuje většinu uhlíku PVP, a tedy případný rozklad pyrrolidonových kruhů PVP a jejich utilizace by měla být zachytitelná stanovením DOC. V pokusu byly použity kultury získané a uložené v rámci výzkumných prací ÚIOŽP FT.

Rozvržení pokusu:

Pro pokus byly připraveny dvě dávky MM, a to dávka A a dávka B. Dávka A byla složena z MM se 100 mg.l^{-1} NMP, dávka B se skládala z MM se 100 mg.l^{-1} NMP a 600 mg.l^{-1} PVP. Byly tedy připraveny dvě série zkumavek, jedna s dávkou A, druhá s dávkou B. Zbytek dávek A a B byl po vhodném zředění použit pro stanovení vstupní hodnoty DOC. Zkumavky dávky A v průběhu pokusu sloužily pouze pro vizuální porovnání růstu bakteriální biomasy.

Rozpis zkumavek:

Zkumavky č. 1 a 2: kultura MS1

Zkumavky č. 13 a 14: kultura MP13

Zkumavky č. 3 a 4: kultura MSZ

Zkumavky č. 15 a 16: kultura FEN2B

Zkumavky č. 5 a 6: kultura JF1

Zkumavky č. 17 a 18: kultura MP1

Zkumavky č. 7 a 8: kultura MS2

Zkumavky č. 19 a 20: kultura MP2

Zkumavky č. 9 a 10: kultura MSY

Zkumavky č. 21 a 22: kultura MP11

Zkumavky č. 11 a 12: kultura MP11

V průběhu pokusu byly odebírány vzorky pro stanovení DOC. Pokus probíhal po dobu 28 dní.

7.5.2 Výsledky pokusu

Hodnoty koncentrace DOC v průběhu pokusu jsou u série B uvedeny v *Tab. XIV*.

Tab. XIV Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu postranních skupin PVP bakteriemi degradujícími NMP

Doba pokusu [dny]		0			14			28		
Č. zk.	Použitá kultura	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.
1	MS1	381,9	381,9	-	325,4	328,6	4,5	335,3	339,3	5,7
2		381,9			331,8			343,3		
3	MSZ	381,9	381,9	-	339	337,9	1,6	340,8	344,8	5,7
4		381,9			336,8			348,8		
5	JF1	381,9	381,9	-	334,1	332,5	2,3	342,2	344,9	3,7
6		381,9			330,8			347,5		
7	MS2	381,9	381,9	-	354	348,5	7,8	349,3	349,1	0,3
8		381,9			343			348,9		
9	MSY	381,9	381,9	-	342,5	340,1	3,4	348,9	351,2	3,3
10		381,9			337,7			353,5		
11	MP11	381,9	381,9	-	344,5	346,2	2,3	342,2	348,8	9,3
12		381,9			347,8			355,4		
13	MP13	381,9	381,9	-	337,7	336,3	2,1	346,9	347,5	0,8
14		381,9			334,8			348,1		
15	FEN2B	381,9	381,9	-	351,9	341,7	14,5	358,8	355,5	4,7
16		381,9			331,4			352,1		
17	MP1	381,9	381,9	-	339	338,8	0,3	348,4	346,7	2,5
18		381,9			338,6			344,9		
19	MP2	381,9	381,9	-	333,2	339,1	8,3	341,6	344,8	4,5
20		381,9			345			348		
21	MP11	381,9	381,9	-	343,6	344,0	0,6	356,5	346,1	14,8
22		381,9			344,4			335,6		

Jak je z údajů v *Tab. XIV* patrné, v průběhu pokusu došlo u všech kultur důsledkem rozkladu NMP ke snížení hodnot DOC. Snížení hodnot DOC však bylo opětovně následováno jejich nárůstem, a to zřejmě díky odumírání a rozkladu buněčné biomasy, aniž by došlo k poklesu hodnoty DOC pod hladinu danou obsahem uhlíku v PVP (přibližně 330 mg.l⁻¹).

Výsledky vizuálního pozorování zkumavek jsou uvedeny v *Tab. XV*. Zde je ve sloupcích A zaznamenána míra zákalu u kontrolních zkumavek (s dávkou A, jen s NMP), ve sloupcích B je zákal zkumavek s dávkou B (NMP + PVP). Ve vedlejších sloupcích jsou poznámky o dalších pozorovaných jevech. Zkumavky byly pozorovány ve zvolených intervalech, v *Tab. XV* jsou však uvedeny pouze pozorování zaznamenané 6. a 14. den. V následujících dnech nedocházelo již k žádným významným změnám, proto zde nejsou uvedeny.

Tab. XV Vizuální hodnocení v průběhu pokusu rozkladu postranních skupin PVP bakteriemi degradujícími NMP

Doba pokusu [dny]		6				14			
Č. zk.	Použitá kultura	A	pozn.	B	pozn.	A	pozn.	B	pozn.
1	MS1	++	-	++	-	++	-	++	-
2		++		++					
3	MSZ	++	-	++	-	++	-	++	vločky
4		++		++					
5	JF1	+	-	-	vločky	++	vločky	++	vločky
6		+		-		++			
7	MS2	++	-	++	biofilm	++	-	++	biofilm
8		++		++					
9	MSY	++	-	++	-	++	-	++	-
10		++		++					
11	MP11	+	vločky	+	vločky	++	vločky	++	vločky
12		+		++					
13	MP13	++	-	++	-	++	vločky	++	vločky
14		++		++					
15	FEN2B	++	-	++	-	++	-	++	-
16		++		++					
17	MP1	++	-	++	-	++	-	+++	-
18		++		++					
19	MP2	++	-	++	-	++	vločky	++	vločky
20		++		++					
21	MP11	++	-	++	-	++	vločky	++	vločky
22		++		++					

Vysvětlivka: +++ – silný zákal, ++ – střední zákal, + – slabý zákal

Z *Tab. XV* je patrné, že mezi zkumavkami stejných sérií nebyly pozorovány velké rozdíly. Pouze u několika kultur byly pozorovány změny ve zkumavkách série B proti sérii A. U kultury MSZ došlo v sérii B na rozdíl od série A k tvorbě vloček, což mohlo být způsobeno právě přítomností PVP ve zkumavkách série B. Zajímavé výsledky byly získány u kultury MS2, kde byla v přítomnosti PVP pozorována tvorba vločkovitého biofilmu na stěně zkumavek, který zcela chyběl ve zkumavkách jen s NMP. Tyto výsledky mohou být podnětem ke sledování vlivu rozpuštěného PVP na uvedené bakteriální kultury a mohou naznačovat, že PVP má určitý biologický vliv na některé (mikro)organismy.

Závěrem tohoto pokusu je, že bakterie rozkládající NMP nejsou schopny rozkladu postranních skupin PVP.

7.6 Pokus rozkladu PVP bakteriemi degradujícími NMP v kooperaci s kulturou *Sphingomonas* sp. JK2

7.6.1 Cíle a rozvržení pokusu

Na základě předchozích pokusů bylo zjištěno, že čistá kultura *Sphingomonas* sp. JK2 není schopna samostatného rozkladu PVP. Taktéž bylo potvrzeno, že použité bakteriální kultury, rozkládající NMP, nejsou schopny rozkladu postranních skupin PVP. V následujícím pokusu bylo přesto zkoumáno, zda může k biologickému rozkladu PVP docházet ve smíšených společenstvech těchto bakterií, za přítomnosti jak NMP, tak PVA.

Rozvržení pokusu:

V tomto pokusu bylo nasazeno 12 sérií, každá se dvěma paralelními vialkami. Všechny vialky obsahovaly 10 ml MM s $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ PQQ a dále 100 mg.l^{-1} PVA, 100 mg.l^{-1} NMP a 600 mg.l^{-1} PVP. Následně byly všechny vialky zaočkovány kulturou JK2 a druhou kulturou, jinou pro každou sérii – viz rozpis níže.

Rozpis vialek:

Vialka č. 1 a 2: kultura JK2 + kultura MP1

Vialka č. 3 a 4: kultura JK2 + kultura MP2

Vialka č. 5 a 6: kultura JK2 + kultura MP10

Vialka č. 7 a 8: kultura JK2 + kultura MP11

Vialka č. 9 a 10: kultura JK2 + kultura MP13

Vialka č. 11 a 12: kultura JK2 + kultura FEN2B

Vialka č. 13 a 14: kultura JK2 + kultura MS1

Vialka č. 15 a 16: kultura JK2 + kultura MS2

Vialka č. 17 a 18: kultura JK2 + kultura JF2

Vialka č. 19 a 20: kultura JK2 + kultura MSY

Vialka č. 21 a 22: kultura JK2 + kultura R0

Vialka č. 23 a 24: kultura JK2 + kultura J20

Přídavky PVA a NMP, přítomné v degradačních zkumavkách, sloužily jako případné induktory pro tvorbu degradačních enzymů a současně jako substrát pro podporu růstu kultur. V průběhu pokusu byly odebírány vzorky pro stanovení DOC. Pokus probíhal po dobu 45 dní.

7.6.2 Výsledky pokusu

Hodnoty DOC naměřené v průběhu pokusu jsou uvedeny v příloze P I.

Výsledky vizuálního pozorování vialek jsou uvedeny v *Tab. XVI*. Zde je zaznamenána míra zákalu a také poznámky o dalších zpozorovaných jevech. Zkumavky byly pozorovány ve zvolených intervalech, v *Tab. XVI* jsou však uvedeny pouze pozorování zaznamenané 10., 17., a 31. den. V dalších pozorovacích dnech totiž již nedocházelo k žádným významným změnám, proto zde nejsou uvedeny.

Tab. XVI Vizuelní hodnocení v průběhu pokusu rozkladu PVP bakteriemi degradujícími NMP v kooperaci s kulturou *Sphingomonas sp. JK2*

Doba pokusu [dny]		10		17		31	
Č. zk.	Použitá kultura	Zákal	pozn.	Zákal	pozn.	Zákal	pozn.
1	MP1	+++	drobné vločky	+++	drobné vločky	++	drobné vločky
2		+++		+++			
3	MP2	+++	drobné vločky	+++	vločky, smývateľný povlak	+++	vločky, smývateľný povlak
4		+++		+++			
5	MP10	++	více větších vloček	++	více větších vloček	++	více větších vloček
6		++		++			
7	MP11	+	drobné vločky	+	drobné vločky	+	drobné vločky
8		+		+			
9	MP13	+++	více drobných vloček	+++	více drobných vloček	++	více drobných vloček
10		+++		+++			
11	FEN2B	+++	drobné vločky	+++	více větších vloček	++	více větších vloček
12		+++		+++			
13	MS1	++	více větších vloček	++	velké vločky	++	velké vločky
14		++		++			
15	MS2	+++	drobné vločky	+++	velké vločky	+++	velké vločky
16		+++		+++			
17	JF2	+++	více drobných vloček	+++	vločky, smývateľný povlak	+++	vločky, smývateľný povlak
18		+++		+++			
19	MSY	++	více větších vloček	++	velké vločky	++	méně větších vloček
20		++		++			
21	R0	+++	více drobných vloček	+++	více drobných vloček	+++	více drobných vloček
22		+++		+++			
23	J20	+++	více drobných vloček	+++	více drobných vloček	+++	více drobných vloček
24		+++		+++			

Vysvětlivka: +++ – silný zákal, ++ – střední zákal, + – slabý zákal

Z tabulky uvedené v příloze P I vyplývá, že ve vialkách s kulturami JK2 + MP1, JK2 + MP13 a JK2 + FEN2B došlo v průběhu pokusu k poklesu hodnot DOC na hodnoty pod úroveň odpovídající zastoupení uhlíku v PVP (cca 330 mg.l⁻¹). Tento pokles může být vysvětlen buď sorpcí části PVP na pomnožené buňky degradérů nebo jako cca 10% degradace PVP nejasného charakteru. Pokles hodnot DOC však byl následován jejich nárůstem, zřejmě opět v důsledku odumírání a rozkladu buněčné biomasy.

Z *Tab. XVI* je patrné, že u většiny vialek došlo k vytvoření dobře pozorovatelného zákalu v důsledku rozkladu NMP i PVA oběma typy kultur. Dále byl pozorován vznik vloček, což bývá u smíšených mikrobiálních kultur poměrně obvyklé. U vialek s kulturami JK2 + MP2 a JK2 + JF2 došlo po dobu trvání pokusu k vytvoření smývateľného povlaku na stěnách vialek. Toto bylo pravděpodobně dáno charakterem metabolitů vznikajících při růstu uvedených mikroorganismů.

Celkově výsledky pokusu nedokazují, že by došlo k významnému rozkladu PVP.

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala biodegradací syntetických polymerů bakteriemi rodu *Sphingomonas*. Biodegradace byla sledována u polyvinylalkoholu (PVA) nesoucího obchodní označení MOWIOL 5-88 a u polyvinylpyrrolidonu, značeného PVP K15. V rámci práce byla provedena řada lahvových a zkumavkových degradačních testů. Z lahví či zkumavek byly ve zvolených časových intervalech odebírány vzorky, které byly podrobeny analýze. Testy byly vyhodnocovány sledováním poklesu koncentrace PVA spektrofotometrickou metodou v mikrotitračních destičkách a dále sledováním snížení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v centrifugovaných vzorcích pomocí analyzátoru uhlíku. V případě potřeby byl spektrofotometricky sledován zákal (OD_{600}) degradačních suspenzí, jako ukazatel množení buněk.

První pokusy v rámci této práce se zabývaly rozkladem PVA ve vodném aerobním prostředí kulturou *Sphingomonas sp.* JK2, v závislosti na míře inokulace. Do degradačních lahví s obsahem minerálního média s PQQ a 500 mg.l^{-1} PVA bylo dávkováno různé množství bakteriální suspenze tak, aby výchozí koncentrace bakterií dosahovala od 10^0 po 10^7 buněk/ml. Po vyhodnocení pokusu bylo zjištěno, že k biologickému rozkladu PVA může docházet i v prostředí s nejnižší použitou výchozí koncentrací bakterií. Takto bylo zjištěno, že nízká hustota buněk prodlužuje lagovou fázi rozkladu polyvinylalkoholu, ale podstatně neovlivňuje rychlost následné degradace polymeru.

V další části diplomové práce byly prováděny pokusy biologické degradace PVP ve vodném aerobním prostředí. Testy proběhly jak za použití čistých kultur bakterií rodu *Sphingomonas*, popřípadě rodu *Sphingobium*, tak za použití směsných inokul bakterií rodu *Sphingomonas* s bakteriemi rozkládajícími N-methyl-2-pyrrolidon (NMP).

Degradační testy s čistými kulturami bakterií probíhaly při výchozí koncentraci 500 či 600 mg.l^{-1} PVP. V některých případech byl přidáván relevantní kosubstrát, a to PVA, NMP či salicylan sodný, vždy o koncentraci 100 mg.l^{-1} . Z provedených pokusů však vyplývá, že při použití zvolených čistých kultur k významnému rozkladu PVP nedochází, a to ani v případě přidání daných kosubstrátů.

Dále byla testována biologická rozložitelnost postranních skupin PVP bakteriemi rozkládajícími NMP. Koncentrace výchozího substrátu v degradačních zkumavkách byla 600 mg.l^{-1} PVP a 100 mg.l^{-1} NMP. V průběhu pokusu došlo ke snížení hodnot rozpuštěného organického uhlíku, které však odpovídaly pouze rozkladu přítomného NMP. Lze tedy

konstatovat, že použité bakterie rozkládající NMP nejsou schopny rozkladu postranních skupin PVP.

V neposlední řadě proběhl také pokus rozkladu PVP pomocí bakterií *Sphingomonas* sp. JK2 v kooperaci s bakteriemi rozkládajícími NMP. Výchozí koncentrace PVP v pokusu byla 600 mg.l^{-1} . Dále bylo kromě PVP přidáno 100 mg.l^{-1} PVA a 100 mg.l^{-1} NMP, které zde sloužily jako induktory pro tvorbu degradačních enzymů a současně jako substrát pro podporu růstu kultur. Z hodnot rozpuštěného organického uhlíku v průběhu pokusu vyplývá, že k podstatnému rozkladu PVP ani v této kombinaci nedošlo.

Závěrem lze k biologickému rozkladu PVP říci, že ačkoliv je tento polymer všeobecně považován za velmi těžce biologicky rozložitelný, je třeba i nadále sledovat možnosti jeho rozkladu a tím i odstranění z životního prostředí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006, 278 s. ISBN 80-708-0617-6.
- [2] KOVAČIČ, Ľudomír a Jaroslav BÍNA. *Plasty: vlastnosti, spracovanie, využitie*. 1. Vydanie. Bratislava: Alfa, 1974, 339 s.
- [3] KAWAI, Fusako a Xiaoping HU. Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, vol. 84, issue 2, s. 227-237 [cit. 2013-12-06]. DOI: 10.1007/s00253-009-2113-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2113-6>
- [4] DEMERLIS, C.C a D.R SCHONEKER. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2003, vol. 41, issue 3, s. 319-326 [cit. 2013-12-06]. DOI: 10.1016/S0278-6915(02)00258-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691502002582>
- [5] CLARIANT GMBH. *Mowiol Polyvinyl alcohol*. Sulzbach, 1999. Dostupné z: <http://www2.cbm.uam.es/confocal/Manuales/mowiol.pdf>
- [6] PRITCHARD, J. *Poly(vinyl alcohol): basic properties and uses*. London: Macdonald Technical & Scientific, 1970, 139 s.
- [7] Česká republika. Vyhláška č. 4/2008 Sb. kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In: 2008.
- [8] SUZUKI, Tomoo. Degradation of polyvinyl alcohol by microorganisms. II. Purification and some properties of polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by *Pseudomonas O-3*. *Agricultural and Biological Chemistry* [online]. 1976, vol. 40, issue 3, s. 497-504 [cit. 2013-11-01]. DOI: 10.1271/bbb1961.40.497. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/bbb1961/40.497?from=CrossRef>
- [9] WATANABE, Yasuto, Nobutake HAMADA, Makoto MORITA a Yoshio TSUJISAKA. Purification and properties of a polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain of *Pseudomonas*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1976, vol. 174, issue 2, s. 575-581 [cit. 2013-11-01]. DOI: 10.1016/0003-9861(76)90386-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986176903866>
- [10] SAKAI, Kiyofumi, Nobutake HAMADA a Yasuto WATANABE. Studies on the poly(vinyl alcohol) degrading enzyme. Part VI. Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and β -

- diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp. *Agricultural and Biological Chemistry* [online]. 1986, vol. 50, issue 4, s. 989-996 [cit. 2013-11-01]. DOI: 10.1271/bbb1961.50.989. Dostupné z:
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/bbb1961/50.989?from=CrossRef>
- [11] KLOMMLANG, W. Biochemical and molecular characterization of a periplasmic hydrolase for oxidized polyvinyl alcohol from *Sphingomonas* sp. strain 113P3. *Microbiology* [online]. 2005-04-01, vol. 151, issue 4, s. 1255-1262 [cit. 2013-12-08]. DOI: 10.1099/mic.0.27655-0.
Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.27655-0>
- [12] GOODWIN, Pat M. a Chris ANTHONY. The Biochemistry, Physiology and Genetics of PQQ and PQQ-containing Enzymes. [online]. s. 1 [cit. 2013-12-08]. DOI:10.1016/S0065-2911(08)60129-0.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065291108601290>
- [13] RUCKER, Robert; CHOWANADISAI, Winyoo; NAKANO, Masahiko. Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone. *Alternative Medicine Review* [online]. 2009, v. 14, p. 268-277. [cit. 2013-12-08]. Dostupné z:
<http://web.a.ebscohost.com.proxy.k.utb.cz/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=79c31a0c-9ef0-4984-9303-642b6d17b32b%40sessionmgr4001&vid=1&hid=4212>
- [14] RONG, Da. Symbiotic Degradation of Polyvinyl Alcohol by *Novosphingobium* sp. and *Xanthobacter flavus*. [online]. 2009, 9.2: 131-134. [cit. 2013-11-23]. Dostupné z:
<http://www.jseb.jp/jeb/09-02/09-02-131.pdf>
- [15] SAKAZAWA, Chikahiro, et al. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *Applied and environmental mikrobiology* [online]. 1981, 41.1: 261-267. [cit. 2013-11-23]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/41/1/261.short>
- [16] CHOI, Kwangkeun, 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, 14.5: 1009-1013. . [cit. 2013-11-23].
Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/main.html?mod=vol>
- [17] NORD, F. F. Dehydrogenation activity of *Fusarium lini* B. *Naturwiss*, 1936, 24: 763.

- [18] ZHANG, Ying, Yin LI, Wei SHEN, Dengru LIU a Jian CHEN. A new strain, *Streptomyces venezuelae* GY1, producing a poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006-5-15, vol. 22, issue 6, s. 625-628 [cit. 2013-11-13]. DOI: 10.1007/s11274-005-9081-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-005-9081-5>
- [19] SHIMAO, Masayuki, et al. Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinone-dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Applied and environmental mikrobiology* [online], 1986, 51.2: 268-275. [cit. 2013-11-13].
Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/51/2/268.full.pdf+html>
- [20] QIAN, Ding, Guocheng DU a Jian CHEN. Isolation and Culture Characterization of a New Polyvinyl Alcohol-Degrading Strain: *Penicillium* sp. WSH02-21. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, vol. 20, issue 6, s. 587-591 [cit. 2013-12-01]. DOI: 10.1023/B:WIBI.0000043172.83610.08. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:WIBI.0000043172.83610.08>
- [21] TSUJIYAMA, S. a A. OKADA. Biodegradation of polyvinyl alcohol by a brown-rot fungus, *Fomitopsis pinicola*. *Biotechnology Letters* [online]. 2013, vol. 35, issue 11, s. 1907-1911 [cit. 2013-12-01]. DOI: 10.1007/s10529-013-1281-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-013-1281-8>
- [22] TSUJIYAMA, Sho-ichi, Tomoko NITTA a Takashi MAOKA. Biodegradation of polyvinyl alcohol by *Flammulina velutipes* in an unsubmerged culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2011, vol. 112, issue 1, s. 58-62 [cit. 2013-12-01]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.03.004.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172311001083>
- [23] ROBINSON, B. *PVP: a critical review of the kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone (povidone)*. Chelsea, MI: Lewis Publishers, c1990, xix, 209 p. ISBN 08-737-1288-9.
- [24] BÜHLER, Volker. *Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals: povidone, crospovidone, and copovidone*. Berlin: Springer, c2005, vii, 254 s. ISBN3-540-23412-8.

- [25] MARUŠINCOVÁ, Hana. *Studie možností biologického odstraňování polyvinylpyrrolidonu*. Zlín, 2009. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [26] VRLOVÁ, Lenka. *Biodegradace polyvinylpyrrolidonu ve vodném anaerobním prostředí*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [27] VYORALOVÁ, Martina. *Předpoklady mikrobiálního rozkladu polyvinylpyrrolidonu*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [28] GIROTO, J.A., A.C.S.C. TEIXEIRA, C.A.O. NASCIMENTO a R. GUARDANI. Photo-Fenton removal of water-soluble polymers. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* [online]. 2008, vol. 47, issue 12, s. 2361-2369 [cit. 2013-12-15]. DOI: 10.1016/j.cep.2008.01.014.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270108000330>
- [29] HORIKOSHI, Satoshi, Hisao HIDAKA a Nick SERPONE. Photocatalyzed degradation of polymers in aqueous semiconductor suspensions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2001, vol. 138, issue 1, s. 69-77 [cit. 2013-12-15]. DOI: 10.1016/S1010-6030(00)00388-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603000003889>
- [30] LORAINE, Gregory A. Oxidation of Polyvinylpyrrolidone and an Ethoxylate Surfactant in Phase-Inversion Wastewater. *Water Environment Research* [online]. 2008-04-01, vol. 80, issue 4, s. 373-379 [cit. 2013-12-15]. DOI: 10.2175/106143008X266779.
Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article>
- [31] SUZUKI, Junzo a Shizuo SUZUKI. Effect of ozone treatment upon biodegradability of water-soluble polymers. *Environmental Science* [online]. 1978, vol. 12, issue 10 [cit. 2013-12-15]. DOI: 10.1021/es60146a002.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es60146a002>
- [32] EUBELER, Jan P., Marco BERNHARD a Thomas P. KNEPPER. Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2010, vol. 29, issue 1, s. 84-100 [cit. 2013-12-15]. DOI: 10.1016/j.trac.2009.09.005.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993609002052>

- [33] TAKEUCHI, Mariko; HAMANA, Koei; HIRAISHI, Akira. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51.4: 1405-1417 [cit. 2013-12-15].

Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/content/51/4/1405.short>

- [34] MARUYAMA, T. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a microcystin-degrading bacterium. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2006-01-01, vol. 56, issue 1, s. 85-89 [cit. 2013-12-15]. DOI: 10.1099/ijs.0.63789-0. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.63789-0>

- [35] WHITE, David C, Susan D SUTTON a David B RINGELBERG. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Current Opinion in Biotechnology*[online]. 1996, vol. 7, issue 3, s. 301-306 [cit. 2013-12-18]. DOI: 10.1016/S0958-1669(96)80034-6.

Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166996800346>

- [36] STOLZ, Andreas. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2009, vol. 81, issue 5, s. 793-811 [cit. 2013-12-18]. DOI: 10.1007/s00253-008-1752-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-008-1752-3>

- [37] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.*

- [38] FREDRICKSON, J K, D L BALKWILL, M F ROMINE a T SHI. Ecology, physiology, and phylogeny of deep subsurface *Sphingomonas* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 1999-10-1, vol. 23, 4-5, s. 273-283 [cit. 2013-12-18]. DOI: 10.1038/sj.jim.2900741. Dostupné z:<http://link.springer.com/10.1038/sj.jim.2900741>

- [39] HARMS, Hauke, et al. Metabolism of Hydroxydibenzofurans, Methoxydibenzofurans, Acetoxydibenzofurans, and Nitrodibenzofurans by *Sphingomonas* sp. Strain HH69. *Applied and environmental mikrobiology* [online].

- 1995, 61.7: 2499-2505 [cit. 2013-12-18].
Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/61/7/2499.full.pdf+html>
- [40] SCHMIDT, S., et al. Biodegradation of diphenyl ether and its monohalogenated derivatives by *Sphingomonas* sp. strain SS3. *Applied and environmental microbiology* [online]. 1992, 58.9: 2744-2750 [cit. 2013-12-18]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/58/9/2744.long>
- [41] KIM, Young-Mo, In-Hyun NAM, Kumarasamy MURUGESAN, Stefan SCHMIDT, David E. CROWLEY a Yoon-Seok CHANG. Biodegradation of diphenyl ether and transformation of selected brominated congeners by *Sphingomonas* sp. PH-07. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007-10-9, vol. 77, issue 1, s. 187-194 [cit. 2013-12-19]. DOI: 10.1007/s00253-007-1129-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-1129-z>
- [42] YANG, Chu-Fang, Chi-Mei LEE a Chun-Chin WANG. Isolation and physiological characterization of the pentachlorophenol degrading bacterium *Sphingomonas chlorophenolica*. *Chemosphere* [online]. 2006, vol. 62, issue 5, s. 709-714 [cit. 2013-12-19]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.05.012.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653505007149>
- [43] MAGONY, Mónika, Ildikó KÁKONYI, Anna GARA, P. RAPALI, Katalin PEREI, K. KOVÁCS a G. RÁKHELY. Overlaps between the various biodegradation pathways in *Sphingomonas subarctica* SA1. *Acta Biologica Hungarica* [online]. 2007-11-1, vol. 58, issue 0, s. 37-49 [cit. 2013-12-19]. DOI: 10.1556/ABiol.58.2007.Suppl.4.
Dostupné z: <http://www.akademiai.com/openurl.asp?genre=article>
- [44] LI, Xiaohui, Jian HE a Shunpeng LI. Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the mpd gene. *Research in Microbiology* [online]. 2007, vol. 158, issue 2, s. 143-149 [cit. 2013-12-19]. DOI: 10.1016/j.resmic.2006.11.007.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250806002531>
- [45] SASAKI, Miho, Jun-ichi MAKI, Ko-ichi OSHIMAN, Yoshinobu MATSUMURA a Tetsuaki TSUCHIDO. Biodegradation of bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Biodegradation* [online]. 2005, vol. 16, issue 5, s.

- 449-459 [cit. 2013-12-20]. DOI: 10.1007/s10532-004-5023-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10532-004-5023-4>
- [46] KAWAI, Fusako a Shogo ENOKIBARA. Symbiotic degradation of polyethylene glycol (PEG) 20,000-phthalate polyester by phthalate ester- and PEG 20,000-utilizing bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [online]. 1996, vol. 82, issue 6, s. 575-579 [cit. 2013-12-20]. DOI: 10.1016/S0922-338X(97)81255-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0922338X9781255X>
- [47] KAWAI, Fusako a Mariko TAKEUCHI. Taxonomical position of newly isolated polyethylene glycol-utilizing bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [online]. 1996, vol. 82, issue 5, s. 492-494 [cit. 2013-12-20]. DOI: 10.1016/S0922-338X(97)86989-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0922338X97869899>
- [48] NEDBÁLEK, Martin. *Vliv podmínek prostředí na biodegradaci polyvinylalkoholu*. Zlín, 2008. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [49] OŠŤÁDALOVÁ, Kateřina. *Význam minerálních solí při biodegradaci polyvinylalkoholu*. Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [50] VÁCLAVKOVÁ, Tereza. *Studium mikroorganismů významných při rozkladu polyvinylalkoholu*. Zlín, 2009. Dizertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [51] FUSKOVÁ, Jana. *Mikrobiální degradace N-methyl-2-pyrrolidonu v povrchové stojaté vodě*. Zlín, 2013. Bakalářské práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [52] KŘÍŽEK, Karel. *Studium bakterií rozkládajících strukturální analogy vinylpyrrolidonu*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [53] Catalogue of microorganisms. *Leibnitz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* [online]. 2014 [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html#searchResult>
- [54] Katalog kmenů bakterií CCM. *Česká sbírka mikroorganismů* [online]. 2014 [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/ccm/indexCZ.html>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BDH	β -diketonhydroláza
BMSM	Základní minerální médium
BPA	Bisfenol A
BTM	Bromthymolová modř
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CASO	Casein-Soya agar
c _{PVA}	Koncentrace PVA
ČR	Česká republika
ČOV	Čistírna odpadních vod
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
DSMZ	Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur
FR	Fyziologický roztok
FT	Fakulta technologická
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MM	Minerální médium
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
OD ₆₀₀	Optická hustota – zákal měřený při vlnové délce 600 nm
OPH	Hydroláza oxidovaného polyvinyalkoholu
PCP	Pentachlorfenol
PEG	Polyethylenglykol
PQQ	Pyrolochinolinchinon
PVA	Polyvinylalkohol
PVA-DH	Polyvinylalkohol dehydrogenáza
PVP	Polyvinylpyrrolidon

SAO	Oxidáza sekundárního alkoholu
TOC	Celkový organický uhlík
TYA	Tryptone yeast extract agar
ÚIOŽP	Ústav Inženýrství ochrany životního prostředí
UV	Ultrafialové záření
UTB	Univerzita Tomáše Bati

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1</i> Strukturní vzorec PVA: (A) – částečně hydrolyzovaný, (B) – plně hydrolyzovaný [4].....	13
<i>Obr. 2</i> Polymerace vinylacetátu [5]	14
<i>Obr. 3</i> Hydrolýza polyvinylacetátu na polyvinylalkohol [5]	14
<i>Obr. 4</i> Mechanismus degradace PVA u bakterií <i>Pseudomonas sp.</i> [3,10]	16
<i>Obr. 5</i> Struktura PVP [23]	21
<i>Obr. 6</i> Syntéza polyvinylpyrrolidonu [23]	22
<i>Obr. 7</i> Princip fotodoxidace PVP pomocí UV/TiO ₂ [29]	25
<i>Obr. 8</i> Možné biodegradační dráhy PVP [32]; (a) Giroto a kol.[28], (b) Suzuki a kol.[31]	26
<i>Obr. 9</i> Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVA	44
<i>Obr. 10</i> Graf závislosti koncentrace PVA na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp. JK2</i> v závislosti na míře inokulace	48
<i>Obr. 11</i> Graf závislosti koncentrace DOC na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp. JK2</i> v závislosti na míře inokulace	50
<i>Obr. 12</i> Graf závislosti koncentrace PVA na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp. JK2</i> v závislosti na míře inokulace	52
<i>Obr. 13</i> Graf závislosti koncentrace DOC na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp. JK2</i> v závislosti na míře inokulace	52
<i>Obr. 14</i> Graf závislosti zákalu (OD ₆₀₀) na době trvání pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp. JK2</i> v závislosti na míře inokulace	55
<i>Obr. 15</i> Graf závislosti koncentrace DOC na době trvání pokusu degradace PVP kulturou <i>Sphingomonas sp. JK2</i>	58

SEZNAM TABULEK

Tab. I	Lokalizace PVA-dehydrogenázy (PVA-DH) a hydrolázy oxidovaného PVA (OPH) u bakterie <i>Sphingomonas sp.</i> 113P3 [11]	17
Tab. II	Příklady aromatických a xenobiotických látek degradovaných bakteriemi rodu <i>Sphingomonas</i> [36].....	28
Tab. III	Hodnoty koncentrace PVA v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp.</i> JK2 v závislosti na míře inokulace	48
Tab. IV	Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp.</i> JK2 v závislosti na míře inokulace	49
Tab. V	Hodnoty koncentrace PVA v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp.</i> JK2 v závislosti na míře inokulace	51
Tab. VI	Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp.</i> JK2 v závislosti na míře inokulace	53
Tab. VII	Hodnoty zákalu (OD_{600}) v průběhu pokusu rozkladu PVA kulturou <i>Sphingomonas sp.</i> JK2 v závislosti na míře inokulace	54
Tab. VIII	Hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP kulturou <i>Sphingomonas sp.</i> JK2	57
Tab. IX	Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVP bakteriemi <i>Sphingomonas a Sphingobium</i> (DSMZ, Německo)	60
Tab. X	Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVP bakteriemi <i>Sphingomonas a Sphingobium</i> (DSMZ, Německo), s přidavkem N-methyl-2-pyrrolidonu	61
Tab. XI	Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu PVP kulturou DSM 7351.....	63
Tab. XII	Hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP kulturami bakterií <i>Sphingomonas a Sphingobium</i> (CCM, ČR).....	65
Tab. XIII	Hodnoty DOC v průběhu pokusu degradace PVP kulturami bakterií <i>Sphingomonas a Sphingobium</i> (CCM, ČR), s přidavkem N-methyl-2-pyrrolidonu.....	66
Tab. XIV	Hodnoty DOC v průběhu pokusu rozkladu postranních skupin PVP bakteriemi degradujícími NMP	68
Tab. XV	Vizuální hodnocení v průběhu pokusu rozkladu postranních skupin PVP bakteriemi degradujícími NMP	69
Tab. XVI	Vizuální hodnocení v průběhu pokusu rozkladu PVP bakteriemi degradujícími NMP v kooperaci s kulturou <i>Sphingomonas sp.</i> JK2.....	73

SEZNAM PŘÍLOH

- P I Hodnoty DOC naměřené v průběhu pokusu rozkladu PVP bakteriemi rozkládajícími NMP v kooperaci s kulturou *Sphingomonas* sp. JK2

PŘÍLOHA P I: HODNOTY DOC V PRŮBĚHU POKUSU ROZKLADU PVP BAKTERIEMI ROZKLÁDAJÍCÍMI NMP V KOOPERACI S KULTUROU *SPHINGOMONAS SP. JK2*

Doba pokusu [dny]		0			10			17			31			45		
Č. zk.	Použitá kultura	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.
1	MP1	454,8	454,8	-	270,4	290,9	29,0	300,2	299,9	0,5	315,4	319,5	5,8	325,1	323,8	1,8
2		454,8			311,4			299,5			323,6			322,5		
3	MP2	454,8	454,8	-	320,9	317,7	4,5	300,9	300,7	0,4	308,3	308,3	0,1	333,3	327,1	8,8
4		454,8			314,5			300,4			308,2			320,9		
5	MP10	454,8	454,8	-	320,3	319,9	0,6	310,2	310,6	0,5	323,3	323,8	0,6	327,1	327,1	0,1
6		454,8			319,4			310,9			324,2			327,0		
7	MP11	454,8	454,8	-	313,0	321,9	12,6	310,1	307,4	3,8	328,2	322,5	8,1	333,1	332,3	1,2
8		454,8			330,8			304,7			316,8			331,4		
9	MP13	454,8	454,8	-	307,0	302,9	5,8	297,7	304,5	9,5	308,9	314,5	7,9	318,2	327,7	13,4
10		454,8			298,8			311,2			320,1			337,2		
11	FEN2B	454,8	454,8	-	299,7	307,7	11,2	299,3	307,2	11,1	313,9	317,9	5,7	318,7	330,4	16,5
12		454,8			315,6			315,0			321,9			342,1		
13	MS1	454,8	454,8	-	323,6	324,4	1,1	314,2	314,9	1,0	343,2	336,3	9,8	338,5	351,0	17,7
14		454,8			325,2			315,6			329,4			363,5		
15	MS2	454,8	454,8	-	321,3	324,1	3,9	317,2	317,4	0,2	336,3	340,1	5,3	345,9	346,6	1,0
16		454,8			326,8			317,5			343,8			347,3		

PŘÍLOHA P I – POKRAČOVÁNÍ: HODNOTY DOC V PRŮBĚHU POKUSU ROZKLADU PVP BAKTERIEMI ROZKLÁDAJÍCÍMI NMP V KOOPERACI S KULTUROU *SPHINGOMONAS* SP. JK2

Doba pokusu [dny]		0			10			17			31			45		
Č. zk.	Použitá kultura	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.	DOC [mg.l ⁻¹]	Průměr	Sm. odch.
17	JF2	454,8	454,8	-	311,0	316,2	7,3	312,7	331,5	26,5	332,4	329,4	4,3	330,6	330,7	0,1
18		454,8			321,3			350,2			326,3			330,8		
19	MSY	454,8	454,8	-	375,7	376,5	1,1	318,6	316,6	2,9	335,2	332,0	4,6	337,8	340,8	4,2
20		454,8			377,3			314,5			328,7			343,8		
21	R0	454,8	454,8	-	308,4	310,2	2,5	311,5	308,9	3,7	327,8	320,6	10,2	335,4	333,8	2,3
22		454,8			311,9			306,2			313,4			332,2		
23	J20	454,8	454,8	-	309,1	315,7	9,3	305,0	307,9	4,0	318,7	323,2	6,3	322,8	344,7	30,9
24		454,8			322,3			310,7			327,6			366,5		