

# Studie přirozeného výskytu degradérů syntetických polymerů

Bc. Radka Žáková

---

Diplomová práce  
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Radka Žáková**  
Osobní číslo: **T14464**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studie přirozeného výskytu degradérů syntetických polymerů**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na dané téma.
2. Vypracujte metodiku identifikace a charakterizace degradérů PBAT.
3. Přizpůsobte metodiku charakteru zkoumaných vzorků.
4. Interpretujte získaná data.
5. Výsledky přehledně zpracujte do formy DP.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Články v odborných periodících dostupných v databázích Web of Science, Scopus, případně dalších.**

Vedoucí diplomové práce:

**prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**2. února 2016**

Termín odevzdání diplomové práce:

**16. května 2016**

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: ŠALKOVÁ RADKA

Obor: 102P

## 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<sup>1)</sup>;
- 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<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> 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<sup>3)</sup> 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 16. 5. 2016

Šalková

<sup>1)</sup> 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 nevydělěčně 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 nahlázení 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.

<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle 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 jim 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

Diplomová práce popisuje proces kultivace, izolace a identifikace mikroorganismů, které byly schopny degradovat PBAT ve vzorcích půd z okolí Zlína. Kultivace degradérů probíhala při 58 °C po dobu 7 dní. Na kultivačních půdách se submikročáisticemi PBAT rostly i jiné mikroorganismy, avšak snahou bylo vybrat k izolaci mikroorganismy, kolem jejichž kolonií byly prosvětlené zóny svědčící o degradaci polymeru. Izolace DNA byla provedena metodou chloroform/izoamylalkoholu (24:1). Pomocí metody DGGE byla provedena identifikace směsných mikrobiálních konsorcií degradujících polyester. V rámci práce byla jako častý degradující organismus identifikována termofilní aktinomyceta *Thermobispora bispora*. Dále byly identifikovány mikroorganismy, které se v degradujících konsorciích rovněž vyskytovaly např. *Paenibacillus sp.*, *Thermobacillus sp.*, *Bacillus alveayuensis*, *Aeribacillus sp.*, *Geobacillus sp.* Práce ukazuje, že v přirozeném půdním prostředí je možné nalézt degradéry PBAT a jsou poměrně četní.

Klíčová slova: PBAT, půda, biodegradace, aktinomycety, identifikace, *Thermobispora bispora*

## ABSTRACT

The thesis describes the process of cultivation, isolation and identification of microorganisms that are able to degrade PBAT in soil samples from around Zlín. Cultivation of degraders was carried out at 58 ° C for 7 days. Also other microorganisms grew on culture media with PBAT micro-particles, but the aim was to choose and isolate microorganisms where bright zones around their colonies indicated the polymer degradation. Isolation of DNA was performed by chloroform/isoamyl alcohol (24: 1) method. DGGE method was used for the identification of mixed microbial consortia that degrade the polyester. In this work as a frequent degrading organism thermophilic actinomycete *Thermobispora bispora* was identified. Further, microorganisms have been identified in the degradation consortia e.g. *Paenibacillus sp.*, *Thermobacillus sp.*, *Bacillus alveayuensis*, *Aeribacillus sp.*, *Geobacillus sp.* This work shows that in natural soil environment PBAT degraders can be found and are quite ubiquitous.

Keywords: PBAT, soil, biodegradation, actinomycetes, identification, *Thermobispora bispora*

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce prof. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za cenné rady, připomínky a trpělivost, které mi s ochotou během zpracování diplomové práce poskytoval.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Šeré za trpělivost, věcné připomínky a její vstřícnou pomoc a konzultace při praktické části této diplomové práce.

Rovněž děkuji paní laborantce Bc. Veronice Kučabové za její vstřícnost a potřebné rady v rámci praktické části diplomové práce.

V neposlední řadě děkuji hlavně rodině a kamarádům za všestrannou podporu a pomoc po celou dobu mého studia.

*„Cesta k úspěchu je vydlážděná trpělivostí a vytrvalostí.“*

*Sri Chinmoy*

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



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 PŮDA</b> .....	<b>13</b>
1.1 PŮDNÍ MIKROORGANISMY .....	13
1.2 BAKTERIE.....	13
1.2.1 Bakteriální růst .....	14
1.2.2 Aktinomycety .....	15
<b>2 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY</b> .....	<b>16</b>
2.1 BIODEGRADACE .....	17
2.1.1 Fáze biodegradace .....	17
2.1.2 Vlastnosti a faktory ovlivňující biodegradaci .....	19
2.1.3 Abiotické faktory biodegradace .....	20
2.2 METODY STANOVENÍ DEGRADACE (BIOLOGICKÉ) [16,19] .....	20
Vizuální stanovení .....	21
Spotřebovaný O <sub>2</sub> , uvolněný CO <sub>2</sub> .....	21
Tvorba jasných (prosvětlených) zón .....	21
Stanovení zbytkového polymeru .....	21
Změny mechanických vlastností .....	22
<b>3 AROMATICKO- ALIFATICKÉ KOPOLYESTRERY</b> .....	<b>23</b>
3.1 POLY (BUTYLEN ADIPÁT- CO- TEREFTALÁT) PBAT .....	23
3.1.1 Charakteristika PBAT .....	24
3.1.2 Vlastnosti.....	24
3.1.3 Zpracování.....	24
3.1.4 Využití.....	24
3.1.5 Směs škrobu a PBAT .....	25
3.2 BIODEGRADACE AROMATICKO-ALIFATICKÝCH POLYESTERŮ .....	25
3.2.1 Biodegradace v prostředí půdy.....	26
3.2.2 Biodegradace v prostředí kompostu.....	28
3.2.3 Biodegradace v prostředí aktivovaného kalu .....	29
<b>4 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY</b> .....	<b>30</b>
4.1 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN (IZOLACE DNA) .....	30
4.2 POLYMERAZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR) .....	31
4.2.1 TouchDown PCR .....	33
4.2.2 Nested PCR .....	33
4.2.3 Hot start PCR .....	33
4.3 ELEKTROFORÉZA.....	34
4.3.1 Gelová elektroforéza .....	34
4.4 DGGE- DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	35
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
<b>5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>37</b>
<b>6 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA</b> .....	<b>38</b>

6.1	CHEMIKÁLIE.....	38
6.1.1	Primery * .....	39
6.2	ROZTOKY .....	40
6.3	SUSPENZE PBAT.....	42
6.4	ŽIVNÁ MÉDIA .....	43
<b>7</b>	<b>POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....</b>	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>METODIKA PROVEDENÝCH POKUSŮ .....</b>	<b>45</b>
8.1	VZORKY PŮDY.....	45
8.1.1	Příprava půdních vzorků pro pomnožení degradérů PBAT .....	45
8.2	VÝTŘEP VZORKU Z PŮDY.....	46
8.3	OČKOVÁNÍ ŽIVNÝCH PŮD .....	46
8.4	IZOLACE ČISTÉ BAKTERIÁLNÍ KULTURY .....	47
	Kultivace termofilních aktinomycét.....	48
8.5	IDENTIFIKACE DEGRADAČNÍCH MIKROORGANISMŮ .....	48
8.5.1	Izolace DNA.....	48
8.5.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	48
8.5.3	Agarózová elektroforéza .....	51
8.5.4	Denaturační gradientová gelová elektroforéza ( DGGE).....	52
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>55</b>
9.1	DETEKCE A KVANTIFIKACE DEGRADÉRŮ VE VZORCÍCH PŮD .....	55
9.1.1	Kvantifikace degradérů ve vzorcích půdy před pomnožením.....	55
9.1.2	Detekce degradérů po pomnožení v přítomnosti PBAT .....	56
9.2	POKUS O IZOLACI A CHARAKTERIZACI ČISTÝCH KULTUR DEGRADÉRŮ.....	58
9.3	CHARAKTERIZACE DEGRADAČNÍCH KONSORCIÍ POMOCÍ DGGE .....	59
9.3.1	Polymerázová řetězová reakce s primery FD1 a RD1 .....	60
9.3.2	Polymerázová řetězová reakce s primery 341F a 907 R.....	64
9.3.3	Polymerázová řetězová reakce s primery GC 341F a 907R .....	68
9.4	DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ ELEKTROFORÉZA – DGGE .....	70
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>81</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>83</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>90</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>92</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>94</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>95</b>

## ÚVOD

Obrovské zvyšování produkce plastů v různých sférách průmyslu vede v posledních letech k vážným environmentálním obavám. Perzistentní syntetické polymery v životním prostředí představují v přírodním ekologickém systému nadměrné riziko. Způsobem jak snížit znečištění životního prostředí plasty je produkce biodegradabilních plastů, které musí být schopny mikrobiálního rozkladu.

Některé typy biodegradabilních plastů založených na bázi polyesteru - jako například alifatické a aromatické - již byly vytvořeny. Alifatické polyestery a jejich kopolymery se ukázaly jako poměrně dobře rozložitelné, ale pro jejich slabé fyzikální a mechanické vlastnosti nedostatečné pro nahrazení konvenčních plastů. Naproti tomu aromatické polyestery mají výborné fyzikální a mechanické vlastnosti v porovnání s alifatickými, rychlost jejich degradace je však nízká vzhledem k jejich odolnosti v prostředí vůči mikrobiálnímu rozkladu.

Poměrně velké spektrum alifatických a stejně tak i alifaticko-aromatických biodegradabilních polymerů již bylo vytvořeno a uvedeno na trh během posledních dvou desetiletí pod různými obchodními názvy, např. v roce 1998 společnost BASF vstoupila na trh s biodegradabilním kopolyesterem vyráběným pod obchodní značkou Ecoflex.

Biodegradabilní polymery jsou používány především při výrobě kompostovatelných pytlů, zemědělských materiálů (mulčovací fólie), laminovacích či obalových materiálů [1]. Biodegradabilní plasty a výrobky z nich jsou po použití k účelu, k němuž byly určeny, zadržovány do půdy a přímo v místě použití zpracovány degradačními pochody. Tímto však dochází ke zvyšování obsahu výše uvedených plastů v životním prostředí, proto je nezbytné zajistit jejich rozložení v dané půdě pomocí přítomných mikroorganismů [2].

Znovuzískání monomeru je efektivní zejména při recyklaci biodegradabilních plastů, protože většina komerčně dostupných biodegradabilních plastů jsou polyestery, které jsou snadno přípustné hydrolýze a rozkládají se na monomery, jako jsou např. organické kyseliny a polyoly [1].

Tato diplomová práce se zabývá izolací mikroorganismů schopných degradace daného kopolyesteru a následnou identifikaci degradérů za použití molekulárně biologických metod. Při práci byly použity vzorky půd odebrané v okolí Zlína.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 PŮDA

Půda je nejsvrchnější vrstva zemské kůry složená z živých organismů, minerálních látek, ale také odumřelých zbytků, vody, organických látek a vzduchu. Půda je tedy jedním z nejvýznamnějších přírodních zdrojů. Přičemž úrodnost nebo schopnost půdy zadržovat vodu závisí na půdním typu, velikosti částic. Čelními aspekty jsou i obsah organické hmoty a druhy půdních organismů. Důležitou schopností půdy je samoregulace. V případě jakéhokoliv zásahu do půdy a narušení její rovnováhy má půda schopnost sama se za čas vrátit do původního stavu, pouze však, pokud nebyly překročeny určité meze.

V současné době dochází ke značné degradaci půdy. Půda rychleji vysychá, neudrží vodu ani živiny a má menší obsah humusu. V takto zasažené půdě se nemohou rozvíjet ani vznikat půdní společenstva mikroorganismů. Nedostatečnou péčí se půda může stát vyčerpatelem neobnovitelným zdrojem a obnovení by trvalo až tisíce let [3].

### 1.1 Půdní mikroorganismy

Životnost organismů v půdě závisí na vnějším prostředí. V čistých kulturách se mikroorganismy nevyskytují, ale vytvářejí mikrobiální společenstva. Tyto mikroorganismy se podílejí na tvorbě humusu, dále ovlivňují vodní a vzdušné režimy v půdě.

V půdě se vyskytují prakticky všechny druhy bakterií. Bakterie se živí látkami, které jsou v půdě přítomné. Většina těchto látek, které se v půdě vyskytují, je mikrobiálně rozkládána, mohou se však vyskytovat i látky chemicky syntetizované, které aerobní mikroorganismy přímo atakují (např. polychlorované bifenyly) [4].

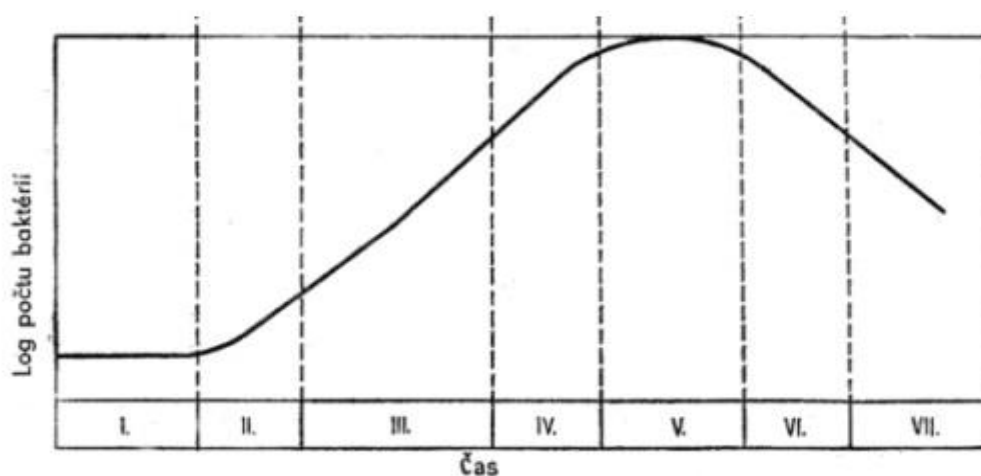
### 1.2 Bakterie

Bakterie jsou organismy, které se řadí mezi prokaryotické. Vyskytují se od běžných podmínek až po extrémní. Základní dělení bakterií je podle složení buněčné stěny na grampozitivní a gramnegativní. Bakteriální buňky neexistují samostatně, ale shlukují se do agregátů z více buněk a tvoří kolonie. Nejčastěji se vyskytují v prostředí půdy, vody, ale také na povrchu materiálu [5].

Tyto mikroorganismy nejen, že umožňují biochemické procesy, ale mohou být rovněž původci chorob. Jsou předmětem studií v souvislosti s koloběhem prvků v přírodě. Bakterie mají rozmanité využití - od produkce antibiotik, přes bioremediaci, až po zpracování biorozložitelné části odpadu. Jejich výskyt v půdách závisí především na teplotě a vlhkosti [5].

### 1.2.1 Bakteriální růst

Růst bakterií dělíme do několika fází, které lze vidět na růstové křivce znázorněné na obr. 1.



Obr. 1 - Růstová křivka bakterií: I. Lagová fáze, II. fáze zrychleného růstu, III. exponenciální fáze růstu, IV. fáze zpomaleného růstu, V. stacionární fáze, VI. fáze odumírání [6]

Fáze se nazývají:

- **Lagová fáze**

Daná kultura mikroorganismů (inokulum) je umístěna na médium. Dříve než dojde k růstu a rozdělení buňky, musí se mikrobiální kultura adaptovat, vytvořit potřebné enzymy a syntézu proteinů. Tento proces může trvat od několika minut až po hodiny.

- **Exponenciální fáze**

Rychlost buněčného dělení se zvyšuje, mikroorganismy se intenzivně množí a dochází k exponenciálnímu růstu jejich počtu.

- **Stacionární fáze**

V této fázi dochází ke zpomalování rychlosti množení buněk, nastává stádium rovnováhy a počty buněk se již dále nemění.

- **Fáze odumírání**

Dochází k vyčerpání substrátu. Hromadí se metabolity a v konečném procesu dochází k odumírání buněk [7].

### **1.2.2 Aktinomycety**

Aktinomycety jsou prokaryotní organismy, které mají ve své DNA vysoký podíl GC párů bází, tj. guaninu a cytosinu. Jedná se o grampozitivní bakterie. Některé typy aktinomycet jsou schopny větvit svá vlákna, a proto se mohou podobat mycéliím houbovitých organismů [8].

Mohou se vyskytovat v půdách, které mají vysoké pH a také za nedostatku vody nebo při vyšších teplotách. Aktinomycety jsou schopny využít v půdách se vyskytující substráty, a to i špatně rozložitelné polymerní látky jako hemicelulóza nebo chitin pocházející z hmyzu a rostlin [5].

## 2 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

Polymery jsou látky tvořené dlouhými řetězci velkého počtu atomů, které jsou vzájemně vázány chemickými vazbami. Tyto řetězce tvoří monomerní jednotky, což jsou pravidelně se opakující části. Polymery lze, podle původu, dělit na syntetické a přírodní [9,10].

Polymery biologického původu pocházejí z přírodních zdrojů (například rostliny, mikroorganismy nebo zvířata) a jsou většinou rozložitelné v přírodě. Mezi tyto polymery patří polysacharidy, lipidy a proteiny. Do této skupiny polymerů rovněž spadají polyestery, které jsou produkovány mikroorganismy nebo syntetizovány z monomerů (PLA) [11]. Syntetické polymery jsou uplatňovány, díky svým přednostem, v řadě aplikací (např. lehká váha, odolnost vůči chemikáliím, snadná zpracovatelnost atd.). Odpad z polymerů, který není možné dále využít, musí být uložen na skládku odpadu. V případě, že se tyto odpady dostanou do volné přírody, mohou způsobit nežádoucí účinky (např. pozření plastů živočichy a následné uvolnění zdraví škodlivých látek potravinovým řetězcem až do lidské stravy, neustálé narůstání objemů plastových odpadů v mořích díky znečištění přítokových řek, pozření plastů vodními živočichy a jejich následný úhyn, zachytávání mořských živočichů do tzv. odpadových bludišť [12].

Biodegradabilní polymery by se měly vyznačovat dobrými zpracovatelskými, mechanickými a užitkovými vlastnostmi. Po ukončení doby používání by, působením mikroorganismů, mělo v krátkém čase dojít k jejich rozložení, a to bez škodlivých zbytků setrvávajících v životním prostředí. [13].

V současné době je produkováno mnoho biodegradabilních polymerů, mezi které patří např. kyselina polymléčná (PLA), která je vyráběna z obnovitelných zdrojů, na bázi ropy jsou založeny polymery jako polyesteramid (PEA), polykaprolaktan (PCL) a rovněž polybutylen sukcinát (PBS), polybutylen sukcinát/adipát (PBSA) patřící do skupiny alifatických kopolyesterů a v neposlední řadě i aromaticko-alifatické kopolyestery, mezi něž patří poly(butylen adipát- co- tereftalát) (PBAT) [14].



## 2.1 Biodegradace

Biodegradace je případ degradace, při níž dochází k rozkladu polymeru působením biologických činitelů. Biodegradací se rozumí biologické odbourání organických látek. Provádějí ji zejména mikroorganismy, a to vzhledem k jejich bohatšímu metabolismu ve srovnání s vyššími organismy. Biodegradace se týká jak látek, které se do životního prostředí dostaly lidskou činností tak i látek přírodních [15,16].

Biodegradace plastů v půdním prostředí může probíhat při různých podmínkách. Mikroorganismy zodpovědné za degradaci se mezi sebou liší a každý z nich má v půdě své specifické podmínky růstu [16].

Skutečnost, jakým způsobem bude biodegradace probíhat, určují podmínky prostředí. Při přítomnosti kyslíku hovoříme o aerobní degradaci, kdy za destrukci materiálu jsou zodpovědné aerobní mikroorganismy a konečnými produkty jsou oxid uhličitý a voda. Pokud degradace probíhá bez přítomnosti kyslíku za anaerobních podmínek, vzniká kromě oxidu uhličitého také metan [17].

Biodegradace je definována jako změna povrchových vlastností rozkladem základního řetězce a snížením molekulové hmotnosti, asimilací mikroorganismů, degradací enzymy, rozkladem základního řetězce, ztrátou mechanické pevnosti polymerů [18].

Biodegradace je iniciována biotickými nebo abiotickými vlivy. Polymer je ve většině případů vystaven působení abiotických vlivů (sluneční záření, teplo, chemické sloučeniny atd.), které mohou na materiál působit a přispívat tak k degradaci polymeru. Abiotický rozklad předchází mikrobiální asimilaci [19].

### 2.1.1 Fáze biodegradace

- **Biodeteriorace**

Proces, při kterém vlivem mikroorganismů nebo abiotických faktorů dochází k rozkladu polymeru na malé fragmenty. Mikroorganismy svou činností rostou na povrchu daného materiálu nebo uvnitř. Rozvoj těchto mikroorganismů závisí na vlastnostech degradujícího polymerního materiálu a na specifických podmínkách daného prostředí. Vyskytující se mikroorganismy jsou různorodé. Patří mezi ně bakterie, řasy, prvoci, houby. Mikroorganismy mohou vytvářet konsorcia s biofilmy [19].

- **Depolymerizace**

Proces, kdy působením mikroorganismů za pomoci jejich enzymů, které vylučují do prostředí, dochází ke štěpení polymerů na oligomery a následný vznik monomerů nebo dimerů. Tyto enzymy se mohou přimknout k molekulám polymerů, čímž dochází k postupnému snižování molekulové hmotnosti. Poté dochází ke štěpení polymerů na oligomery a k následnému vzniku monomerů nebo dimerů. Fragmentace je důležitá pro následující fázi, kterou je asimilace. Molekuly, které mají vysokou molekulovou hmotnost, nejsou schopny projít přes buněčnou stěnu nebo cytoplazmatickou membránu [17,19].

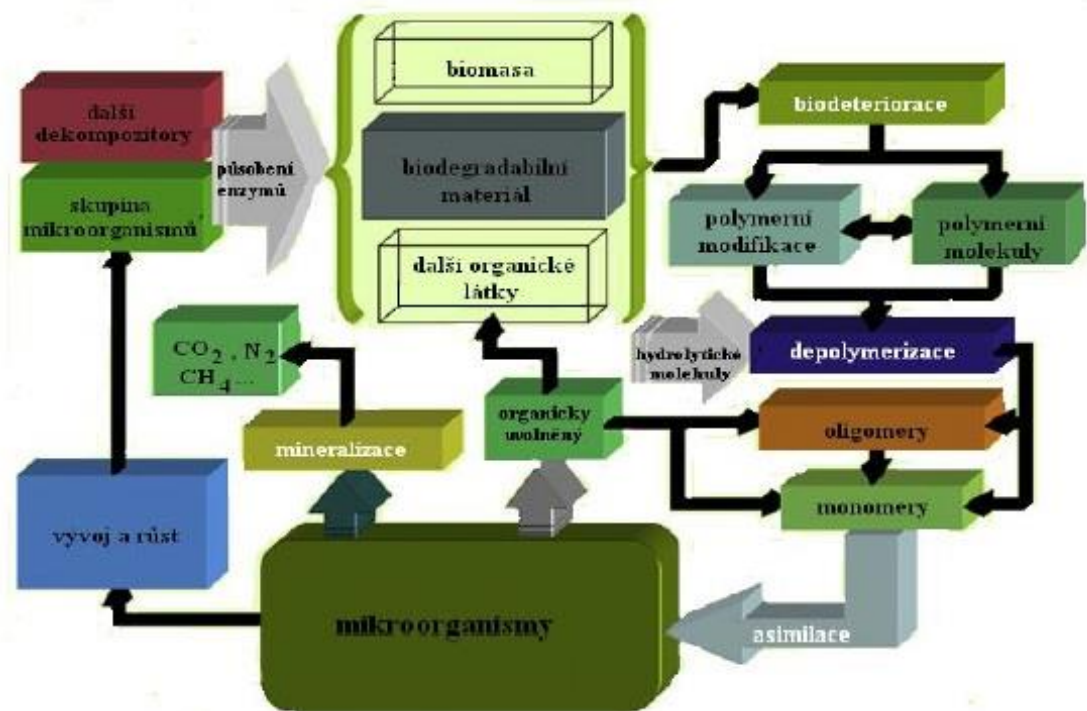
- **Asimilace**

Meziprodukty, které vznikly depolymerací, mohou pronikat až do cytoplazmy přes membrány buněk, kde dochází k jejich zpracování na energii, novou biomasu a dále ke vzniku primárních nebo sekundárních metabolitů. U tohoto procesu dochází uvnitř buňky k začlenění fragmentů polymerního materiálu. Začlenění přináší mikroorganismům potřebné zdroje energie, prvků a elektronů pro vytvoření buněčné struktury. Mikroorganismům umožňuje rovněž růst a schopnost reprodukovat se v prostředí při spotřebě výživného substrátu [19].

- **Mineralizace**

Konečný proces, kdy díky metabolickým procesům daného mikroorganismu vznikají metabolity, především oxid uhličitý, voda a biomasa, případně metan, dusík a soli [19].

K úplné biodegradaci dochází, zůstane-li degradovaný polymer beze zbytku. Úplná mineralizace tedy nastane, když je polymer převeden na plynné produkty, soli a vodu. Část uhlíku je začleněna do humusu a mikrobiální biomasy. Úplné degradace lze však málokdy dosáhnout [17].



Obr. 2 - Schéma biodegradace polymeru [19]

### 2.1.2 Vlastnosti a faktory ovlivňující biodegradaci

Biodegradace je umožněna enzymy, které produkují mikroorganismy. Pro průběh každé biodegradace je důležitá existence mikroorganismů, které mají vhodné metabolické vybavení k enzymové degradaci určitých polymerních materiálů. Způsobnost mikroorganismů degradovat polymery je závislá na intenzitě s jakou produkují pro daný substrát specifické enzymy (extracelulární) [15,20,21].

Biodegradace je rovněž ovlivněna vlivy prostředí jako jsou světlo, teplota, pH, živiny, přítomnost kyslíku a vlhkost.

Proces biodegradace však mohou podporovat i další vlivy, např. mechanická degradace, fotodegradace nebo hydrolýza. Hydrolýza může být biologická nebo chemická - rozdíl je v katalyzátorech. Biologická hydrolýza je katalyzována enzymy a označována jako enzymatická. Chemická hydrolýza je katalyzována kyselinami a zásadami. Reakce probíhá na povrchu polymeru při aerobních podmínkách [15,20,21].

Velký význam při biodegradaci polymeru má rovněž jeho struktura. Nejdůležitějšími charakteristikami polymeru jsou molekulová hmotnost, krystalinita, teplota tání a skelného přechodu, chemická struktura, hydrofilita a hydrofobita. Polymery s postranními řetězci jsou

asimilovány hůře než polymery bez postranních řetězců. Molekulová hmotnost z hlediska degradace ovlivňuje vlastnosti polymeru. Se vzrůstající molekulovou hmotností dochází k poklesu degradace mikroorganismy. Enzymy mikroorganismů z hlediska krystalinity polymeru nejdříve atakují amorfni část polymeru, protože molekuly v této části jsou volně poskládány. Tato část je méně odolná na rozdíl od části krystalické. Proto s nárůstem krystalinity polymeru rychlost degradace klesá. Polymery, které mají vyšší krystalinitu jsou mikroorganismům odolnější. Dále také platí, že čím je teplota tání polymeru větší, tím je biodegradace horší [22].

### 2.1.3 Abiotické faktory biodegradace

Polymery a jejich polymerní materiály, pokud jsou vystaveny venkovním vlivům prostředí, podléhají přeměnám:

- **Fotodegradace** je důležitá hlavně při abiotických podmínkách. Nestabilního stavu může být vytvořeno, pokud je energie nesena fotony.
- **Tepelná degradace** - vlivem vyšší teploty dochází k přeměně pevného materiálu na kapalný. K porušení řetězce a následující biologické a chemické degradaci dochází při nízkých teplotách.
- **Chemická degradace** - atmosférickými imisemi a agrochemikáliemi po reakci s polymerními materiály dochází k rozpadu řetězce. Nejvíce reagují kyslík a ozón.
- **Mechanická degradace** - příčinou degradace je napětí, stříh nebo vysoká komprese. Poškození je zapříčiněno snížením tlaku, vodní a vzdušnou turbulencí. Mechanická degradace nepřevládá, může pouze aktivovat nebo urychlit proces [19].

## 2.2 Metody stanovení degradace (biologické) [16,19]

Pro posouzení míry biodegradace polymerních materiálů existuje celá řada metod. Mezi metody, pomocí nichž měříme množství uvolněného CO<sub>2</sub> po vystavení polymerních materiálů mikroorganismům, patří respirometrické testy. Další z testů používají sledování

úbytku molekulové hmotnosti, změny fyzikálních vlastností (pevnost tahu) nebo sledování produktů probíhajících reakcí.

- **Měření pomocí metod skenovací elektronové mikroskopie (SEM).** Metoda slouží k posuzování morfologie před a během biologického rozkladu, lze podle ní sledovat i tepelné vlastnosti.
- **Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)** je používána pro určení teploty rozkladu, teploty tání a určení bodu tání.

Dalšími metodami pro degradaci polymeru jsou např. **metoda využívající infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), rentgenová difrakční analýza (XRD), nukleární magnetická rezonance (NMR), optická mikroskopie, plynová chromatografie (GC) plynová permeační chromatografie (GPC)** [15].

### **Vizuální stanovení**

Na povrchu polymeru lze pozorovat tvorbu děr, prasklin a roztržení, může dojít ke změně barvy a zdrsnění nebo k výskytu biofilmu. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) nebo mikroskopie atomárních sil lze získat podrobnější informace.

### **Spotřebovaný O<sub>2</sub>, uvolněný CO<sub>2</sub>**

Z hlediska aerobních podmínek přítomné mikroorganismy oxidují kyslík na oxid uhličitý. Nejvíce používaný způsob je pomocí respirometru, kdy se spotřebovává kyslík nebo pomocí Sturmova testu (vznik oxidu uhličitého). Oxid uhličitý se může zachytávat v Ba(OH)<sub>2</sub> a následnou titrací můžeme použít detektory paramagnetický, příp. infračervený pro O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>.

### **Tvorba jasných (prosvětlených) zón**

Jednoduchá metoda - materiál daného polymeru je v podobě malých částic rozptýlen ve ztuženém minerálním médiu (agaru). Po zaočkování agaru kulturou mikroorganismů a následné kultivací dojde k vytvoření jasných zón, což je důkazem, že přítomné kultury organismů jsou schopny depolymerovat přítomný polymerní materiál.

### **Stanovení zbytkového polymeru**

V testech rozkladu lze použít stanovení zbytkového polymeru za pomoci hmotnostního úbytku zkušební vzorku. Problémem při tomto procesu může být nadměrné rozpadá-

vání vzorku. Pro jemné práškovité polymerní materiály je možné polymer stanovit pomocí extrakčních metod.

### **Změny mechanických vlastností**

Změny některých vlastností, které jsou citlivé na změny molekulové hmotnosti, jako například pevnost tahu, jsou rovněž jedním z ukazatelů degradace.

### 3 AROMATICKO-ALIFATICKÉ KOPOLYESTRERY

Běžně používané plastové materiály se ukázaly být odolné vůči mikrobiálnímu napadení i vlivu vlhkosti. Polymerní materiály, které ve svých hlavních řetězcích obsahují heteroatomy, jsou náchylné k hydrolytickému štěpení (např. esterové vazby nebo amidové skupiny) [23].

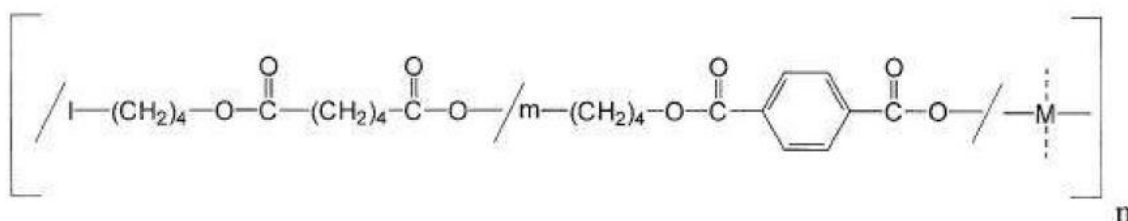
Kopolyestery, které mají aromatické složení struktury, vykazují mechanické a tepelné vlastnosti s obsahem 35 mol% kyseliny tereftalové. Pokud obsah kyseliny tereftalové překračuje 55 mol%, míra biodegradace klesá. Pro optimální biologickou rozložitelnost je důležitým hlediskem množství kyseliny tereftalové. Optimální biologickou rozložitelnost a užitečné vlastnosti vykazuje kopolyester s množstvím kyseliny tereftalové v rozmezí 35-55 mol% v BTA kopolyesterech [23].

Mezi aromaticko-alifatické kopolyestery patří PBAT. Tento polymer obsahuje stavební jednotky a to kyselinu tereftalovou, kyselinu adipovou a 1,4- butandiol.

Polyestery jsou skupinou polymerů, které obsahují esterovou skupinu. Výborné mechanické vlastnosti vykazují aromatické polyestery, které jsou však téměř odolné vůči mikrobiálnímu rozkladu. Naopak alifatickým polyesterům chybí mechanické vlastnosti a jsou tedy poměrně snadno mikrobiálně rozložitelné. Mechanické vlastnosti jsou rozhodující pro většinu aplikací proto nejvýhodnější je jejich spojení. Alifatické složky polymeru degradují mnohem rychleji než složky aromatické [24].

#### 3.1 Poly (butylen adipát- co- tereftalát) PBAT

Aromaticko-alifatický kopolymer na bázi kyseliny adipové, 1,4- butadiolu a dimethyltereftalátu, známý pod zkratkou PBAT. Na obr. 3 je znázorněn strukturní vzorec PBAT [25].



Obr. 3 - Strukturní vzorec PBAT [23]

### 3.1.1 Charakteristika PBAT

PBAT je za termofilních podmínek biologicky rozložitelný polyester. PBAT je lineární aromaticko-alifatický kopolyester složený ze dvou typů dimerů. V první jednotce BT je obsaženo aromatické jádro, na které je navázán 1,4 butandiol. Druhá jednotka BA je složená z monomerů a to kyseliny tereftalové a 1,4 butandiolu [26].

### 3.1.2 Vlastnosti

Mezi mechanické vlastnosti patří především jeho flexibilita, měkkost a houževnatost. Omezení z hlediska mechanických vlastností (nízká pevnost tahu) a rovněž poměrně vysoké výrobní náklady produkce jsou příčinou snižování jeho produkce. Materiálu s dobrými vlastnostmi s nízkými náklady na jejich výrobu lze dosáhnout mísením tohoto polymeru s různými kompozity, které jsou lehce dostupné a jsou přírodního původu např. škrob, sójová moučka [27].

Materiály na bázi PBAT mají srovnatelné vlastnosti jako LD-PE. Film je odolný proti protržení, vzdušné vlhkosti a je rovněž velmi flexibilní [14].

### 3.1.3 Zpracování

PBAT může být zpracováván způsoby, které se používají i pro LD-PE např. vyfukováním fólií - nejvhodnější metoda, kdy není zapotřebí žádných úprav. V závislosti na dostupném vybavení pro zpracování polymerů lze získat filmy nebo fólie až 10  $\mu\text{m}$ . Problémem u těchto fólií je jejich propustnost vodním parám, proto jsou k jejich úpravám používány speciální přísady[28].

### 3.1.4 Využití

V současnosti má PBAT využití zejména v potravinářském průmyslu jako obalové materiály (sáčky, boxy na jídlo nebo kelímky). Využití PBAT z environmentálního hlediska najdeme mj. v zemědělství, kde je používán ve formě kompostovatelných pytlů. Pytle musí odolávat přístupu vody, musí být bezproblémově zpracovatelné v kompostovacím zařízení a určitou dobu stabilní vůči organickému odpadu. Mulčovací fólií mohou být po sklizni zaořány spolu s rostlinnými zbytky a následně jsou postupně rozloženy. Laminované materiály se používají proti odolnosti vlhkosti a tukům. Výhodou materiálu je snadná likvidace obalů (papírové obaly, krabice atd.) [28].



### 3.1.5 Směs škrobu a PBAT

Škrob patří mezi levné suroviny dostupné ve velkém množství. Nevýhodou této suroviny je její omezené použití díky vysoké absorpci vody a proto, že ve svém přírodním stavu bez potřebných přísad nemůže být zpracován jako termoplastický materiál. Pro získání hydrofobní škrobové směsi a jeho biodegradability lze smíchat škrob (hydrofilní) s biodegradabilními polymery (hydrofobní). Tyto směsi jsou poté odolné proti vodě a mohou být použity v dalších aplikacích. Tyto materiály vykazují dobré mechanické vlastnosti jako je propustnost kyslíku, vysoká pevnost atd.[28].

## 3.2 Biodegradace aromaticko-alifatických polyesterů

Faktorů ovlivňujících biodegradaci aromaticko-alifatických kopolyesterů je mnoho. Biologická rozložitelnost je ovlivněna nejen chemickou strukturou polymeru, funkčními skupinami nebo rovnováhou hydrofobní a hydrofilní části, ale také krystalinitou, teplotou a dalšími morfologickými vlastnostmi [24].

- **Obsah kyseliny tereftalové**

Ze studie prováděné Müllerem [29] vyplývá, že rychlost degradace významně klesá s rostoucím obsahem kyseliny tereftalové. Pokud má kyselina tereftalová nad 60%, rychlost degradace klesne a takový kopolymer potom můžeme označit jako biologicky nerozložitelný. U kopolyesteru, který je složený s kyseliny tereftalové, adipové a 1,4 butandiolu je jako limit pro degradaci uveden obsah kyseliny tereftalové kolem 50-60%.

- **Pohyblivost polymerních řetězců, krystalinita a bod tání polymeru**

Krystalinita je jeden z hlavních faktorů ovlivňující degradaci kopolyesteru. Začátek biodegradace nejdříve probíhá v amorfnní části a následně v části krystalické. Struktura kopolyesteru ukazuje, že amorfnní část je tvořena kyselinou adipovou a krystalická část tvořena kyselinou tereftalovou [24].

Podle popsáných výsledků dle studie Martena [30] má značný vliv na rozložitelnost pevnost vazby polymerního řetězce v krystalické oblasti, kde je pevně vázán. V krystalické oblasti je degradační rychlost podstatně nižší. To ovlivňuje teplotu tání ( $T_m$ ) daného materiálu. V amorfnní oblasti polymeru jsou řetězce vysoce pohyblivé

(nad teplotou skelného přechodu) a rychle degradují. Proto mobilita polymerních řetězců je určena rozdílem mezi teplotou tání v krystalických strukturách a degradační teplotou.

- **Molekulová hmotnost polymeru**

Polymery zůstávají, pokud je jejich molekulová hmotnost vysoká, imunní vůči mikroorganismům. Důsledkem vysoké molekulové hmotnosti je pokles rozpustnosti, což je nepříznivé pro mikroorganismy, protože ty vyžadují substrát. Během degradace mikroorganismy se molekulová hmotnost snižuje [30].

### 3.2.1 Biodegradace v prostředí půdy

Většina vědeckých prací je zaměřena na biodegradaci kopolyesteru pomocí termofilních mikroorganismů rychle rozkládajících polymery. Rozkladem PBAT za mezofilních podmínek se však zabývá jen několik málo studií [31].

Studie Tan a kol. [31] se zabývala použitím aerobních mezofilních organismů k rozkladu kopolyesteru. Z půdního prostředí byly izolovány bakterie, houby a kvasinky (mezofilní mikroorganismy). Zkoumaný Ecoflex byl použit ve formě tenkých fólií a následně naočkován suspenzí izolovaných mikroorganismů. Inkubace probíhala při teplotě 30 °C po dobu 21 dní na Petriho miskách.

Souběžně s tím byl v reakčních lahvích prováděn pokus s polymerem ve formě granulí a opět byla použita suspenze izolovaných mikroorganismů. Inkubace v takto připravených reakčních lahvích probíhala po dobu 30 dní a teplotě 22 °C.

Nejlepším degradujícím mikroorganismem z celkového počtu 29 nalezených mikroorganismů byla bakterie *Bacillus subtilis*. Metodou pomocí GC a GC-MS byly sledovány degradační produkty. V médiu po degradaci byla nalezena přítomnost v menším množství kyseliny tereftalové a kyseliny adipové.

Vzorky, které podléhaly degradaci, byly podrobeny gelové permeační chromatografii a u zbytků degradace byla zjištěna molekulová hmotnost.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že biodegradace Ekoflexu může probíhat za mírných podmínek pomocí mezofilních mikroorganismů, proces je však mnohem pomalejší než u termofilních. V této studii je uvedeno, že vyšší teplota může být vysvětlením rozdílu rychlosti biodegradace.

Studie Marten a kol. [30] se zabývala biodegradací Ecoflexu pomocí enzymů. Ze skupiny hydroláz působila *Thermomonospora fusca* na Ecoflex pomocí extracelulárních enzymů, mikroorganismus *Pseudomonas sp.* působil enzymem lipázou. Na závěr studie bylo konstatováno, že biodegradace probíhala rovněž v půdním prostředí. Studie byla dále zaměřena na působení enzymů na místa ve struktuře kopolyesteru.

Ve studiích [23,31] se jednalo o druh příbuzný *Isaria fumosorosea*. Studie hodnotí degradaci Ecoflexu za mírných podmínek. Degradace probíhala v půdě při 30 °C. Podstatně rychleji probíhala v prostředí s přítomností houby, než v prostředí kde se houba nevyskytovala. Ztráta z hmotnosti filmu byla 40 % po 30 dnech. Degradace v půdě, která neobsahovala výše uvedenou houbu, probíhala pomaleji. Druh houby *Isaria fumosorosea* je schopen Ecoflex mineralizovat v mezofilním prostředí na oxid uhličitý. V přírodních podmínkách má proto pro biodegradaci značný význam.

Cílem další studie prováděné Kijchavengkul a kol [32] bylo zkoumání degradace v tropické oblasti.

Degradaci podléhaly mulčovací fólie, které byly vyrobeny z PBAT. U těchto mulčovacích fólií byly sledovány po dobu 40 týdnů mechanické vlastnosti, zesíťování polymeru, vizuální změny. Použity byly rovněž metody SEM a FTIR. Po 20. týdnu experimentu byl na povrchu zkoumané fólie zaznamenán také biofilm.

Závěrem této studie je konstatování, že mulčovací fólie vystavená slunečnímu svitu po 8 týdnech podléhá rozpadu, ale vlivem zesíťování se stává odolnou pro následnou biodegradaci.

Němečtí autoři Eubeler a kol. [33] se zabývali studiem biodegradace kopolyesteru Ecoflex v půdních podmínkách. Experimenty byly provedeny s 29 kmeny bakterií, kvasinek a plísní, které produkovaly enzymy. Po 21 dnech z výsledků vyplývalo, že Ecoflex byl štěpen některými druhy mikroorganismů. S ohledem na skutečnost, že experimenty byly provedeny v prostředí za mírných podmínek a doba trvání byla poměrně krátká, dala se předpokládat omezená biodegradace Ecoflexu. Z výsledků testů ukázaly částečnou degradaci polymeru. Mikroorganismy hydrolyzovaly esterové vazby a přednostně degradovaly alifatické složky polymeru.

Weng a kol [34] se zabývali biodegradací PBAT v reálním půdním prostředí. Testy probíhaly u polymerů PLA a PBAT.

Polymery PLA a PBAT byly smíchány v poměru 40:60 a vzorky ve formě fólií zahrabány do reálného půdního prostředí 40 cm pod povrchem. Zbytky zdegradovaných vzorků byly pravidelně odebírány z půdy a analyzovány metodami SEM, DSC, IR a prvkovou analýzou.

Analýzy ukázaly, že PBAT a PLA mají rozdílné biodegradační mechanismy. Teplota tání a bod tání se měnil v závislosti na složení PBAT/PLA.

Výsledky této studie ukázaly, že PBAT je degradováno i v reálných půdních podmínkách.

### 3.2.2 Biodegradace v prostředí kompostu

V práci Adamus a kol [35] byla zkoumaná biodegradace Ekoflexu, a to v prostředí kompostu, v půdě, v mořské vodě a v kompostu obsahující aktivovaný kal. Nejlepší výsledky dosahovala degradace v prostředí kompostu, což se také ukázalo jako nejlépe vhodný postup pro degradaci polymerů a obalových materiálů.

Další práce [23] se zabývala rozkladem kopolyesteru Ecoflex při použití konkrétních termofilních aktinomycet *Thermomonospora fusca*. Biodegradace touto termofilní aktinomycetou probíhala po dobu 21 dní a teplotě 55 °C, kdy kopolyester byl ve formě prášku přidán do kapalného syntetického média. Pomocí plynové chromatografie a gelové permeační chromatografie byly sledovány produkty a meziproducty vzniklé degradačními pochody. Měření pomocí plynové chromatografie neprokázala hromadění aromatických oligomerů ani zbytky polymeru. Výchozí polymer byl depolymerizován na monomery (1,4 butandiol, adipát a tereftalát) z více než 99 %. Testy bylo dokázáno, že delší aromatické sekvence kopolyesteru jsou rozštěpeny pomocí enzymů a nezůstávají ve formě rozpustných nebo nerozpustných zbytků. Meziproducty krátkých, rozpustných oligomerů jsou po 3 týdnech hydrolyzovány na monomery, a to jen za přítomnosti různorodého mikrobiálního složení. *Thermomonospora fusca* je schopna degradovat kopolyester Ecoflex, ale vzniklé monomery a oligomery není schopna metabolizovat. Proto bylo přidáno různorodé mikrobiální složení po 7 denní degradaci *T. fusca* z kompostu.

V práci Kijchavengkul a kol. [2] byly použity a testovány mulčovací fólie z Ecoflexu, Ecoflexu s plnivem a LD-PE o odlišné barevnosti (černé a bílé) a tloušťce (černá 35 μm, a bílá fólie 25 μm a 35 μm). Bílé fólie měly přídavek aditiv Titanium 19 Oxid (příseada k výrobě bílé barvy ve filmech) - katalyzátor fotodegradace. Černá fólie byla s přídavkem sazí, které stabilizovaly fotodegradaci. Filmy byly použity na pokrytí záhonu rajčat

(v období květen - září). Fotodegradace probíhala díky teplotě půdy, půdní vlhkosti, relativní půdní vlhkosti, teplotě vzduchu a slunečnímu záření. Testy probíhaly při teplotě 58 °C, prostředím byl vyžralý zahradní kompost s vlhkostí 50-60% . Po ukončení sklizně plodin byly rostliny rajčat zlikvidovány a biodegradabilní fólie následně zaorány do půdy.

Bílá fólie byla viditelně rychleji degradována než fólie černá. U bílé fólie byly pozorovány již během prvních pár týdnů praskliny a začínající rozpad této fólie. Rozklad černé fólie byl pomalejší - až kolem 8. týdne. Testována byla také klasická LD-PE fólie, která během testování nevykazovala žádnou viditelnou degradaci. Během 120 denní inkubace a měření produkce CO<sub>2</sub> byla mineralizace u všech těchto testovaných fólií více jak 60 % a u kukuřičného škrobu (pozitivní kontrola) byla mineralizace větší než 70%.

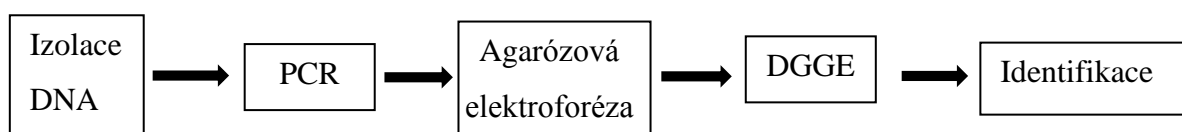
Kijchavengkul a kol. [26] se v další práci zabývali degradací PBAT v prostředí hnoje, běžného kompostu a v potravinovém kompostu. Použité filmy polymeru měly tloušťku  $38,1 \pm 5,1 \mu\text{m}$ . Mineralizace, ztráta molekulové hmotnosti a strukturní změny filmů byly posuzovány pomocí metod DSC, FTIR a NMR (indikátory biodegradace a hydrolýzy). Film PBAT degradoval rozdílnými rychlostmi v hnoji, běžném kompostu a v potravinářském kompostu. Nejvyšší rychlost biodegradace byla v hnoji, který měl nejvyšší emise CO<sub>2</sub> a nejnížší poměr C/N. Celková biodegradace během 45 dní byla tedy nejvyšší v hnoji  $67,3 \pm 2,8 \%$ , následoval potravinový kompost, kde došlo k degradaci těchto filmů  $44,9 \pm 2,6 \%$ , nejméně účinné testované prostředí byl běžný kompost z degradací  $33,9 \pm 1,5 \%$ . Autoři v této studii dále uvádí, že hydrolýze snadněji podléhají alifatické části než aromatické části řetězce.

### 3.2.3 Biodegradace v prostředí aktivovaného kalu

Práce Wang a kol. [36] se zabývala biodegradací tří rozložitelných polymerů PHB (polyhydroxy butyrát), PHBHHx (polyhydroxybutyrát-ko-hydroxyhexanoát) modifikovaný kopolymer a Ecoflex v prostředí aktivovaného kalu. Tloušťka filmů byla 100  $\mu\text{m}$ . Lze říci, že biodegradace závisí na drsnosti filmu a krystalinitě polymeru. Po 18 denní degradaci bylo zjištěno, že nejpomaleji degradujícím kopolyestrem v prostředí aktivovaného kalu byl vyhodnocen Ecoflex. Kontroly těchto filmů byly prováděny metodou SEM.

## 4 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY

Molekulární biologie je v dnešní době značně se rozvíjející obor, který je využíván ve všech oblastech zkoumání, a to jak biologických tak chemických. Z hlediska historie patří molekulárně-genetické a biotechnologické metody k nejmladším v oblasti přírodních věd [37]. Tyto metody a jejich aplikace mají řadu výhod. Jednou z nich je kratší čas potřebný pro identifikaci nebo možnost identifikovat mikroorganismy, které díky klasickým metodám jsou jinak neidentifikovatelné [38].



Obr. 4 - Schéma posloupnosti molekulárně biologických metod

### 4.1 Izolace nukleových kyselin (izolace DNA)

Nukleové kyseliny jsou izolovány za použití nativního substrátu. Nativní substrát musí být v dostatečném množství a čistotě. Problematická u izolace DNA je lyze buněk, a to především u bakterií grampozitivních vzhledem k vysokému množství peptidoglykanu ve své buněčné stěně [38]. Tento krok je velice důležitý pro následující úspěch dalších fází. Izolaci DNA lze rozdělit na další dva kroky lýzi buněk a purifikaci DNA [39].

Pomocí lýze buněk dosáhneme uvolnění DNA z buňky bakterie, kdy dochází k rozpuštění buněčné stěny. Pro tento krok je používán lysozym (enzym) s detergentem (např. EDTA), které vážou dvoumocné kationty nebo vysokofrekvenční třepání s kuličkami [38,39].

Po lýzi buněk je třeba z nukleových kyselin odstranit přítomné látky, které se nachází v roztoku degradačního činidla spolu se složkami (DNA, RNA, lipidy, proteiny, sacharidy atd.) a mohly by bránit v působení enzymů - purifikace DNA. Nežádoucího typu a jeho odstranění lze dosáhnout pomocí příslušné nukleázy a purifikační způsob opakovat. Nukleové kyseliny lze izolovat metodami např. fenol-chloroformová extrakce, kdy dochází k odstranění proteinů, pomocí chromatografie (nukleové kyseliny se zachytí na nosiči a následně jsou vymyty) nebo je lze srážet alkoholem za převedení nukleových kyselin z velkého objemu do malého [38,39]. V současné době se k izolaci nukleových kyselin využívá komerčně prodávaných kitů.

## 4.2 Polymerazová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda využívající možnost amplifikace DNA v in vitro podmínkách. Princip této metody je založen na cyklicky opakujících se enzymových syntézách úseků řetězce DNA, a dochází k replikaci DNA směrem  $5' \rightarrow 3'$  prostřednictvím DNA-polymerázy. Jako DNA-polymerázy se používají izolované polymerázy z termofilních mikroorganismů, které odolávají denaturační teplotě DNA. Vybraný úsek je vymezen připojením dvou vybraných primerů. Ty se navazují na protilehlé řetězce DNA takovým způsobem, že konce  $3'$  směřují k sobě. PCR metoda je citlivá a díky tomu lze ve vzorku zjistit i malé množství těchto nukleových kyselin [39].

Před provedením PCR metody je nutné vhodně zvolit komponenty, které se připravují a jsou potřebné před započítím amplifikace. Těmito komponenty jsou:

- **Templátová DNA**

Obsahuje cílovou sekvenci nebo jen segment DNA pro PCR reakci.

- **Primery**

Jedná se o krátké úseky nukleových kyselin (DNA). Primery se navazují na základě komplementarity k  $3'$  koncové sekvenci řetězce templátové DNA. Jsou použity dva primery podle místa jejich navázání na řetězce výchozí DNA - primer forward a reverse primer.

- **DNA-polymeráza**

Jedná se o enzym, který slouží k nové syntéze nového řetězce nukleových kyselin. DNA-polymeráza prodlužuje navázané primery a přidává nové nukleotidy. Dochází ke vzniku templátového vlákna.

- **dNTP**

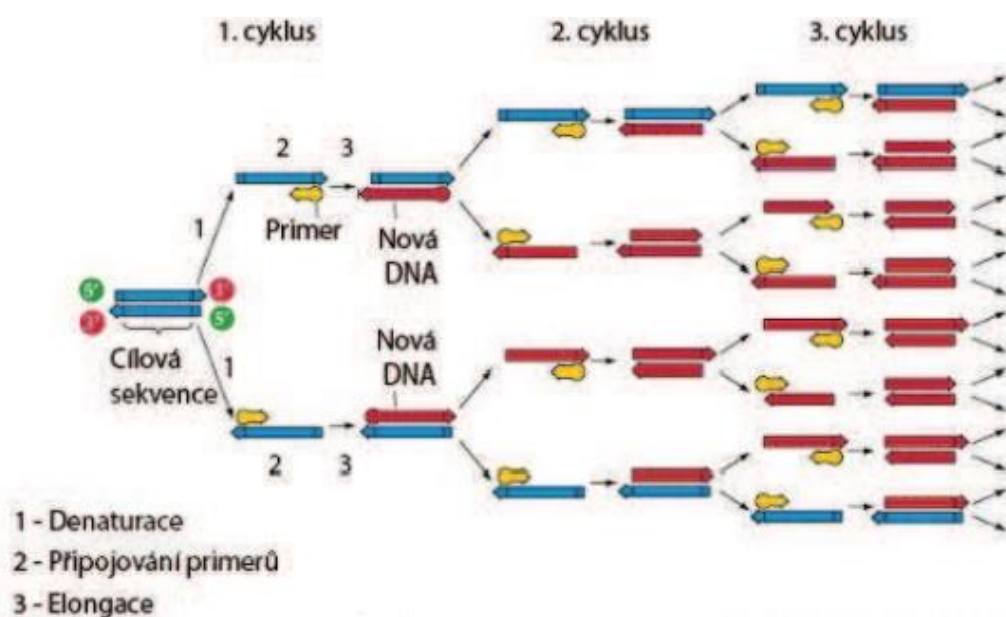
Deoxinukleotid trifosfát - jedná se o nukleotidy (adenin, guanin, thymin, cytosin), které jsou využity DNA-polymerázou k tvorbě nového řetězce DNA.

- **Pufř**

Roztok, který zajišťuje neměnnost pH (musí být stabilní). Je to důležité pro DNA-polymerázu a její maximální aktivitu.

- **Magnesium (ionty hořčíku)**  
Kofaktor pro funkci DNA-polymerázy. Ionty hořčíku jsou obvykle přidávány formou chloridu hořečnatého.
- **PCR voda**  
Používá se redestilovaná. Jde o vodu v PCR kvalitě [39,40].

Samotný proces je složen ze tří kroků, které jsou znázorněny na obr. 5



Obr. 5 - Princip polymerázové řetězové reakce [41]

- **Denaturace** - v závislosti na použité DNA-polymeráze se teplota v tomto kroku pohybuje kolem 94 - 96 °C. Dochází k rozrušení dDNA a vznikají dva samostatné řetězce, rovněž dochází k zastavení všech enzymatických reakcí [39].
- **Annealing (připojení primerů)** - teplota se pohybuje 30 - 65 °C na základě použitých primerů. Primery se připojují na komplementární sekvence DNA. Vlivem Brownova pohybu se primery dostávají k místu, kde se mají na sDNA navázat iontovou vazbou. DNA-polymeráza se napojuje a následně replikuje nukleotidové sekvence [39].



- **Extension (prodlužování, syntéza nových řetězců)** - teplota pro prodlužování primerů je v rozmezí 65 - 75 °C (za optimální se považuje teplota 72 °C). Vlivem DNA-polymerázy dochází k syntéze nových řetězců. Deoxiribonukleotid trifosfát (dNTP) je v tomto kroku velice důležitý pro DNA-polymerázu. V místě, kde probíhá syntéza se dNTP připojují ke komplementárním bázím samovolně [39].

#### 4.2.1 TouchDown PCR

Tato metoda se využívá v případě, kdy primery mají odlišné teploty tání. Problémem je zde správné nalezení annealingové teploty, kdy při nesprávné annealingové teplotě mohou vznikat nespecifické amplikony.

K odstranění vzniku nespecifických amplikonů, zvýšení specifičnosti a optimalizaci annealingové teploty se využívá modifikace Touchdown PCR. Primery nasedají nejdříve v prvních cyklech na templáty s největší komplementaritou a vytvoří se pouze specifický produkt (dojde k zabránění jakéhokoliv vzniku nespecifických produktů) [42].

#### 4.2.2 Nested PCR

Jedná se o modifikaci PCR, kdy amplifikace probíhá dvoufázově. Zde se využívá vnitřních a vnějších primerů. Umožňuje detekovat i jednu molekulu templátové DNA.

V první fázi je využita sada vnějších primerů k namnožení delší sekvence nukleové kyseliny. Vzniká specifický produkt, který je převeden do nové zkumavky a dochází k druhému kroku s vnitřními primery. Jedná se o fázi, kde je amplifikována kratší vnitřní sekvence. Po skončení celé Nested PCR dochází k detekci specifického produktu pomocí elektroforézy.

Výhodou modifikace je specifita a vysoká výtěžnost. Přenos produktu z první reakce do druhé umožní naředění inhibitorů. Může však dojít k riziku možné kontaminace, což je negativem této metody. [39,42]

#### 4.2.3 Hot start PCR

Jedná se o metodu, která zabraňuje vzniku nespecifických produktů během PCR. Nejčastěji během vyhřívání vzorku na teplotu počáteční denaturace, může docházet k nespecifickému nasedání primerů na templátovou DNA nebo primerů mezi sebou a vzniku dimerů (dva primery se navzájem spárují). Následně dochází vlivem DNA polymerázy

k prodlužování DNA úseků a tím dochází ke vzniku nevyhovujících produktů. Metoda zabraňuje syntéze DNA během náběhové teploty [43].

### 4.3 Elektroforéza

Elektroforéza je nejpoužívanější separační technikou při izolaci, purifikaci fragmentů, identifikaci a analýze nukleových kyselin. Princip elektroforézy je pohyb nabitých částic v elektrickém poli. V elektrickém poli se nukleové kyseliny pohybují k opačně nabitě elektrodě (anodě), kde fosfátové skupiny jsou hlavním nositelem náboje nukleových kyselin (nabitě negativně) [39].

#### 4.3.1 Gelová elektroforéza

Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči (gelu). Agarózové nebo polyakrylamidové gely jsou často používané gely pro separaci nukleových kyselin. Tyto gely následně vytvoří síťovou složitou strukturu polymerních molekul s póry. Koncentrací polymeru a složením roztoku lze ovlivnit velikosti pórů. Pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti 100 bp – 50 kb se používají agarózové gely a pro separaci menších molekul 10 - 1000 bp polyakrylamidové gely. Podle polohy gelu na aparatuře dělíme elektroforézu na vertikální a horizontální, a pokud je gel uvnitř kapiláry tak na kapilární.

Nepřímo úměrná logaritmu velikosti nukleových kyselin je elektroforetická pohyblivost, která udává rychlost pohybu DNA v gelu. Velikost molekuly DNA nebo jejího fragmentu neznámých velikostí lze stanovit pomocí markeru - hmotnostní standard (známe velikost). Marker bývá často restričním fragmentem genomu plazmidových molekul nebo bakteriofágů, kdy sekvencováním je stanovena přesná velikost.

Pro dobrou identifikaci polohy separovaných molekul DNA se na gelu zviditelní vhodným barvivem. Nejčastěji používaným barvivem je etidiumbromid. Barvivo se vmezuje mezi sousední páry bází v DNA a za vzniku komplexu, floreskuje pod UV světlem. Molekuly DNA jsou poté na gelu viditelné bandy, koncentrace je úměrná jejich intenzitě. Barvením stříbrem můžeme detekovat molekuly DNA na polyakrylamidovém gelu [39,44].

#### 4.4 DGGE- denaturační gradientová gelová elektroforéza

Jedná se o analytickou metodu, kdy je použito polyakrylamidového gelu. Tento gel obsahuje denaturační gradient (linerální), který je zajištěn koncentrací činidla v gelu (vzrůstá). Mezi nejčastěji používané denaturační činidla patří formamid a močovina [39].

Dvouvláknová DNA putuje rychlostí, kterou je dána její molekulová hmotnost, až do doby než vstoupí do té části gelu, kde je odpovídající koncentrace denaturačních látek. Dochází k denuraci dvouvláknové DNA na jednovláknovou DNA. Rychlost denaturace DNA je závislá na počtu vodíkových můstku. Řetězce DNA se od sebe snáze oddělují v místech s bohatým AT páry. Páry GC jsou stabilnější. Během denaturace dochází k nabývání stejně dlouhých, ale sekvenčně odlišných úseků jiných konformací a tím k rozdílné elektroforetické pohyblivosti. Konečná pozice fragmentu v gelu je závislá na denaturačním bodu. Oddělená jednovláknová DNA vytvářela neostré proužky, proto jsou používány primery s GC-svorkou (částečná nikoliv úplná denaturace)[39,45].

Pomocí metody DGGE lze identifikovat vybrané skupiny, např. sekvencí a reamplifikací DNA nebo vyříznutím bandu. Metoda DGGE poskytuje informace o dosud neznámých skupinách, pokud jsou amplifikovány [45].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle práce se dají rozdělit na dva aspekty. Prvním bylo zpracování literární rešerše a přehledné uvedení studií zabývajících se daným tématem. Na základě studií potom charakterizovat izolované mikroorganismy, které jsou schopny degradovat kopolymer PBAT.

Druhým cílem diplomové práce bylo osvojení si metodiky molekulárně biologických metod, a to elektroforézy v agarózovém gelu, polymerázové řetězové reakce (PCR) a denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE).

V praktické části diplomové práce bylo úkolem:

- Kvantifikovat počet degradérů ve vzorcích půdy.
- Detekovat přítomnost degradérů po jejich pomnožení.
- Pokusit se izolovat přítomné degradéry jako čisté kultury, nebo konsorcia.
- Charakterizovat kultury pomocí molekulárně biologických metod (DGGE).

## 6 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA

### 6.1 Chemikálie

$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Chlorid vápenatý dihydrát (Penta, Chrudim)
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Dusičnan kobaltnatý hexahydrát (Penta, Chrudim)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Síran měďnatý pentahydrát (Lachema, Brno)
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Síran amonno-železnatý hexahydrát (Lachema, Brno)
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Kyselina boritá (Lachema, Brno)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Hydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Brno)
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Chlorid hořečnatý hexahydrát (Penta, Chrudim)
$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Síran manganatý pentahydrát (Penta, Chrudim)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lachema, Brno)
$\text{NaCl}$	Chlorid sodný (Penta, Chrudim)
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Molybdenan amonný tetrahydrát (Lachema, Brno)
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Chlorid amonný (Lachema, Brno)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Síran zinečnatý heptahydrát (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
Agar, Agar, Type I.	(HiMedia)
Agarosa	(Sigma- Aldrich ®)
Ammonium persulfáte (APS)	(SERVA)
Destilovaná voda- Nuclease- Free Water	(Promega)
DNA- Marker GeneRuler 100bp	(Thermo Scientific)
Ethidiumbromid 10mg/l	(SERVA)
Chloroform, Stab.	(Lach-Ner)
Izomyalkohol	(Lach-Ner)
Kvasničný autolyzát	(HiMedia)

Močovina	(Promega)
N,N,N',N'- tetramethylethyldiamid (TEMED)	(Sigma- Aldrich ®)
Nanovlákná Ecoflexu	(Spur)
Parafilm "M"	(Bemis ®)
PBAT- G8060	(EnPol Irechemicals, Korea)
Primery *	
TAE- Tris Acetete-EDTA buffer	(Sigma- Aldrich ®)
Tween 80	(Lach-Ner)
PVA 205	(Poval)
Voda pro molekulárně biologické metody	(Sigma- Aldrich ®)

### 6.1.1 Primery \*

Zásobní roztok primerů 100 pmol/μl

Pracovní roztok primerů 20 pmol/μl

Tab. 1 - Přehled použitých primerů

Primer	Sekvence
341 F	CCT ACG GGA GGC AGC AG
907 R	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT
FD1	AGA GTT TGA TCC TGG TCT AG
RD1	AAG GAG GTG ATC CAG CC
GC 341 F *	CCT ACG GGA GGC AGC AG

\*Primer, který obsahoval GC svorku ve své sekvenci CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG.

## 6.2 Roztoky

### *Suspendační roztok*

Pro přípravu suspenčního roztoku bylo použito:

NaCl .....	8,5 g
Destilovaná voda .....	1000 ml
Tween .....	1g

### Postup:

Nejdříve byl připraven fyziologický roztok. Příslušné množství naváženého NaCl se kvantitativně převedlo do 1000 ml odměrné baňky a doplnilo se destilovanou vodou po rysku. Připravený roztok se důkladně promíchal a následně byl rozlit po 50 ml do vzorkovnic. Následně byla provedena sterilizace v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 120 °C.

Připravené suspenční roztoky sloužily pro přípravu výluhu z půdy.

### *Roztok stopových prvků*

Na přípravu 1 litru roztoku stopových prvků bylo použito:

MnSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O.....	0,043 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,057 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O.....	0,043 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O.....	0,037 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O.....	0,025 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O.....	0,040 g

Navážená množství látek byla kvantitativně převedena, rozpuštěna v 1 litru destilované vody a řádně promíchána.



**Roztok A**

Byl připraven rozpuštěním 9,078 g  $K_2HPO_4$  v 1 litru destilované vody.

**Roztok B**

Byl připraven rozpuštěním 23,9 g  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$  v 1 litru destilované vody.

**Roztoky solí pro přípravu minerálního média**

$CaCl_2 \cdot H_2O$ .....	1 g
$Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6 H_2O$ .....	3 g
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ .....	10 g
NaCl .....	50 g
$NH_4Cl$ .....	50 g

Navážené soli byly následně rozpuštěny v 1 litru destilované vody.

**Minerální médium**

Minerální médium je využíváno jako zdroj prvků pro život mikroorganismů. Pro přípravu minerálního média byly použity roztoky A a B, roztoky solí a stopové prvky.

Na přípravu 500 ml minerálního média bylo odměřeno:

Roztok A ( $K_2HPO_4$ ).....	10 ml
Roztok B ( $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ ) .....	40 ml
$CaCl_2 \cdot H_2O$ .....	5 ml
$Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6 H_2O$ .....	5 ml
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ .....	5 ml
NaCl.....	5 ml
$NH_4Cl$ .....	5 ml
Stopové prvky.....	0,5 ml
Kvasničný autolyzát.....	0,05 g

Všechny látky byly smíchány a doplněny na objem 500 ml. Poté byly sterilizovány po dobu 20 minut a teplotě 120 °C.

### 6.3 Suspenze PBAT

Pod obchodním názvem PBAT- G8060 u EnPol Irechemical Korea byl zakoupen kopolymer z kyseliny adipové, 1,4- butadiolu a kyseliny tereftalové. Suspenze PBAT byla tvořena mikročásticemi tohoto kopolymeru, který dispergoval ve vodě. Metoda Oil-in water emulsion solvent evaporation method byla zvolena k jejímu samotnému vytvoření. Zde bylo využito jako emulgátoru PVA, které snižovalo povrchové napětí mezi nemísitelnými látkami, a to PBAT a vodou a tím došlo k emulzifikaci.

Obecně platí:

5 g/ 100 ml- PVA/ destilované vody

10 g/ 100 ml- PBAT/ chloroform

Bylo naváženo PVA a přidána destilovaná voda. Poté se celý objem, za neustálého míchání, zahřívá až do doby než došlo k rozpuštění PVA. Teplota však nesměla překročit 100 °C. Po vychladnutí roztoku bylo přidáno PBAT a následně i chloroform. Vytvořená směs byla po dobu 5 minut a při 24 000 otáčkách smíchána vysokorychlostním homogenizátorem. Po dobu 5 minut byl použit ultrazvuk, který měl za úkol zmenšit velikost mikročástic (amplituda 35%). Pro volné odpaření chloroformu byla směs umístěna na míchadlo do digestoře. Když došlo k úplnému odpaření chloroformu, následovalo vymývání PVA. Směs byla při 10 000 RPM po dobu 5 minut a teplotě 25 °C centrifugována. PVA obsažené v tekutině bylo slito a zbylá usazenina doplněna vodou a opět centrifugována (totéž se opakovalo následně ještě 2x). Na závěr byla usazenina doplněna destilovanou vodou, pro dosažení výsledné koncentrace suspenze PBAT, která měla činit 20 mg/l.

Příprava suspenze PBAT probíhala za pomoci Ing. Jany Šeré a Ing. Petra Stloukala PhD.

## 6.4 Živná média

### *Minerální médium s PBAT*

Na živné médium bylo potřeba:

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

Minerální médium společně s agarem bylo sterilizováno. Suspenze PBAT musela být ovšem sterilizovaná zvlášť, protože by mohlo dojít ke vzniku sraženiny polymeru, a to v případě, že by všechny látky byly v jedné vzorkovnici. Sterilizace byla provedena v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 120 °C. Po vyjmutí z autoklávu byly obsahy lahví promíchány krouživými pohyby. Po ochlazení na cca 50 °C byly komponenty smíchány v aseptickém laminárním boxu, rozlity do sterilních Petriho misek a ponechány ztuhnout.

## 7 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Analytické váhy	(Denver Instrument – SI 64A d= 0,0001 g)
Autokláv	(Varioklav ® H+P-SN 9868 1104)
Box Aura PCR	(BioAir MP- 300 N (Major Science))
Centrifuga chlazená Rotana 460R	(Andres Hettich Gmbh Co. KG)
Centrifuga mini Spin plus	(Eppendorf AG)
DGGE- Cipher genetic analysis systém	(C.B.S. Scientific Company)
Elektroforéza horizontální model 4	(Thomas Scientific)
Kombinovaná chladnička	(Beko CSA 34020)
Laminární box MSC advantage	(Thermo Scientific)
Mikrovlná trouba	(Electrolux)
Nitrilové rukavice	(Vasco)
PCR tube Strips	(Bio-Rad)
Sušárna Memment	(Verkon)
Sterilní špičky různé velikosti	(Bioplastic)
Sterilní špičky s filtry	(CAPP Aps)
Skleněné kuličky 1,0-1,3	(Merci)
Termostat	(Biological thermostat BT 120 4307- laboratorní přístroje Praha)
Thermocyklér	(FINNRYMES PIKO)
Třepačka Kavalier LT2	(Verkon)
UV-transluminátor InGeniusLHR	(SynGene)

## 8 METODIKA PROVEDENÝCH POKUSŮ

### 8.1 Vzorky půdy

Vzorky půd byly odebrány ze svrchní části v maximální hloubce 20 cm. Vzorkováno bylo 25 lokalit v okolí Zlína. Vzorky půd byly odebrány do PE sáčků a uloženy při teplotě 6,6 °C. Odebrané vzorky půdy byly poskytnuty Ing. Janou Šerou. V příloze I Jsou uvedeny typy půd podle BPEJ (Bonitová půdně ekologická jednotka).

#### 8.1.1 Příprava půdních vzorků pro pomnožení degradérů PBAT

Vzorky odebraných půd byly umístěny do vzorkovnic a přidána suspenze PBAT, abychom podpořili růst potenciálních mikroorganismů schopné PBAT degradovat. K vytvoření optimálních podmínek pro zdárné množení mikroorganismu musela být u půd rovněž patřičně upravena vlhkost. K udržení potřebné vlhkosti byl do směsi přidán i perlit, který napomáhal přístupu kyslíku do půdy. Před samotným použitím perlitu bylo nezbytné jeho promytí (3x) v destilované vodě a následné vysušení při 105 °C. Při teplotě 58 °C po dobu 64 dní probíhala inkubace vzorkovnic v termostatu.

V řadě studií byly termofilní aktinomycety prokázány jako degradéři PBAT. Pro podporu jejich růstu byl zvolen postup kultivace při 58 °C. Pro další růst a namnožení byly podmínky modelovány tak, aby je bylo možné kultivovat na tuhém živém médiu, které obsahovalo PBAT.

Pro přípravu vzorkovnic:

sušina půdy..... 15 g  
suspenze PBAT..... 2 ml o koncentraci 20 mg/ l  
perlit..... 2 g  
50 % vlhkost



*Obr. 6 - Inkubační vzorkovnice*

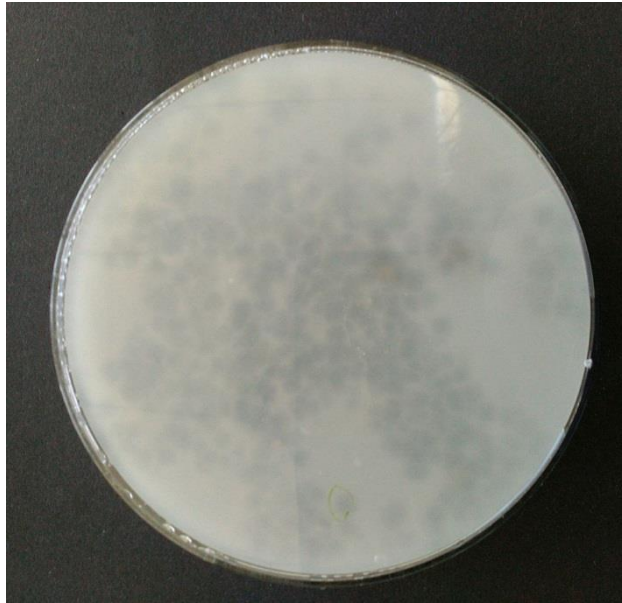
## 8.2 Výtřep vzorku z půdy

Do sterilního suspenzačního roztoku o objemu 50 ml bylo naváženo 5 g půdy a po dobu 15 minut intenzivně mícháno na třepačce. Po uplynutí doby na třepačce musela být směs půdy a suspenzačního roztoku ponechána v klidu po dobu dalších 15 minut, aby došlo k sedimentaci pevných půdních částic.

## 8.3 Očkování živných půd

Připravené kultivační půdy s PBAT byly suspenzí výluhu z půdy naočkovány nanesením 100  $\mu$ l pomocí mikropipety se sterilní špičkou na Petriho misky s připraveným tuhým živným médiem a rozetřeny sterilní hokejkou po celé ploše misky. Jednalo se o ředění  $10^{-2}$  a ředění  $10^{-3}$ .

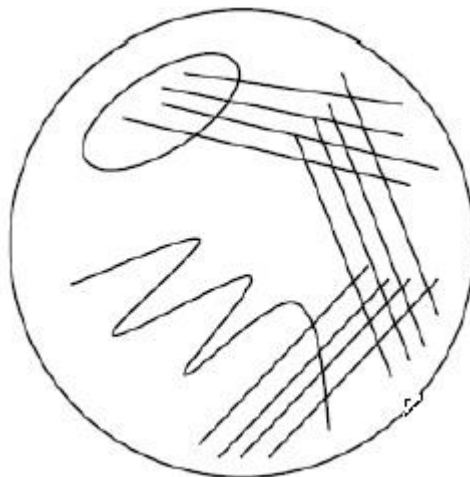
Takto zaočkované Petriho misky byly umístěny při teplotě 58 °C do termostatu. Pokud byli přítomni degradéři kopolymeru PBAT, bylo možné je rozeznat prosvětlenými zónami, které byly viditelné po 7 denní kultivaci na Petriho miskách. Přítomné mikroorganismy rostou na živném médiu ve formě kolonií. (obr. 7).



*Obr. 7 - Kolonie s prosvětlenými zónami na kultivační půdě obsahující PBAT*

#### **8.4 Izolace čisté bakteriální kultury**

Abychom získali čistou kulturu, provádí se tzv. křížový roztěr (obr. 8). Jedná se o metodu, kdy je pomocí vyžíhané a sterilní kličky nabrána kultura. Ta se nejdříve dobře rozetře u okraje nové misky, na níž je sterilní živné médium. Pomocí nové sterilní kličky se z místa roztěru uvádí čáry po obvodu misky. Další čáry, opět sterilní kličkou, protínají již vytvořené čáry do kříže. Z nově vytvořených čar, opět sterilní kličkou, vedených do kříže čar původních. Naposled je vedena čára ve tvaru hada.



*Obr. 8 - Křížový roztěr [46]*

### **Kultivace termofilních aktinomycét**

Kultivace probíhala v termostatu při teplotě 58 °C. Termofilní aktinomycety se kultivují optimálně 7 dní. Pro umožnění většího nárůstu aktinomycet byla doba kultivace prodloužena i na 10 dní.

## **8.5 Identifikace degradačních mikroorganismů**

### **8.5.1 Izolace DNA**

Přestože je známo více molekulárních metod, byla izolace templátové DNA provedena způsobem, který se jevil jako nejpřijatelnější postup a to pomocí metody chloroform/izoamylalkohol (24:1).

#### ***Metoda chloroform/ izoamylalkohol (24:1)***

Do mikrozkušavky bylo nadávkováno 100 µl sterilní vody a následně byla přenesena biomasa mikroorganismů, které byly schopny PBAT degradovat. K suspenzi bylo přidáno 100 µl roztoku chloroform/izomyalkoholu (24:1). Vzniklá směs byla 5 sekund vortexována. Po uplynutí 5 sekund na vortexu byla směs dále po dobu 5 minut, při teplotě 4 °C a 16 000 otáčkách centrifugována. Následně bylo do sterilní mikrozkušavky odebráno 20 µl supernatantu z horní vodné vrstvy jako zdroj pro templátovou DNA.

### **8.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

V teoretické části diplomové práce (kapitola 4.2.) je popsán princip polymerázové řetězové reakce. Je to metoda používaná pro amplifikaci vymezeného úseku DNA za pomoci enzymů pro přípravu reakční směsi obsahující DNA a další složky. Samotná reakce probíhá v tzv. thermocykleru, kde jsou přesně stanovené podmínky.



***Příprava směsi pro PCR***

Pro přípravu směsi bylo nezbytné použít sterilní vodu pro molekulární biologii, MasterMix (Go-Taq<sup>®</sup> Hot Start Green MasterMix), sadu dvou primerů, eventuálně chlorid hořečnatý jako přídavek.

MasterMix obsahuje složky, které jsou potřebné pro správnou replikaci DNA.

Chlorid hořečnatý je obsažen v MasterMixu. Lepší polymerázové aktivity lze dosáhnout jeho navýšením.

Primery jsou dodávány v lyofylizované formě. Pro získání požadované koncentrace 100 pmol/μl byly doplněny, podle doporučení výrobce, určitým objemem sterilní vody. Dále byl roztok primerů zahřátý na teplotu 37 °C, při níž byly lyofylizované primery rozpuštěny a naředěny (vortexovány po dobu 5 sekund). Pracovní koncentrace primerů byla následně 20 pmol/μl.

Reakční směs pro PCR byla připravována v objemech 20 μl a 30 μl. Podle níže uvedené tabulky.

*Tab. 2 - Složení reakčních směsí pro 20 μl a 30 μl*

	20 μl	30 μl	Koncentrace v reakční směsi
Sterilní voda	7 μl	10,5 μl	
MasterMix	10 μl	15 μl	1x
Forward primer	1 μl	1,5 μl	1 μmol/l
Reserve primer	1 μl	1,5 μl	1 μmol/l
DNA	1 μl	1,5 μl	

Reakční směsi byly připravovány v laminárním aseptickém prostředí PCR boxu. Box byl před přípravou směsi nejdříve sterilizován pomocí UV zářiče po dobu cca 25 minut, aby bylo zamezeno případné kontaminaci vzorků templátové DNA a komponent potřebných do reakční směsi. Do tzv. stripů (za sebou spojených 8 PCR mikrozkušavek) byly dávkovány komponenty pro reakční směs PCR (MasterMix, sterilní voda a sada primerů) a následně byla přidána izolovaná templátová DNA. Vzniklá reakční směs byla důkladně promíchána

pomocí vortexu a poté centrifugována. Při každé reakci byla připravená i negativní kontrola pro nefunkčnost PCR nebo odhalení kontaminace. U negativní kontroly byla dávkována sterilní voda pro molekulární biologické metody.

### ***Použité cykly pro PCR reakce***

Stripy s reakční směsí byly vloženy do thermocykleru a následně byl spuštěn program. Následné kroky:

#### **Klasická PCR**

Počáteční denaturace	7 min	při	94 °C	
Denaturace	1 min	při	94 °C	} 35-40 x
Annealing	1 min	při	55 °C	
Elongace	1 min	při	72 °C	
Závěrečná amplifikace	10 min	při	72 °C	
Uložení			4 °C	

Při teplotě 94 °C je syntetický úsek DNA denaturován, tím dochází k rozpletení DNA šroubovice. Dalším krokem je annealing probíhající zpravidla při teplotě 55 °C, kdy na vzniklá vlákna DNA přisedají primery. Následně v úseku, který je ohraničený primery, probíhá při teplotě 72 °C syntéza komplementárních vláken DNA (elongace), která je zajišťována DNA-polymerázou. Výše je uveden průběh celého cyklu. Cyklus denaturace - annealing - elongace se opakuje 35-40x. Replikovaný úsek DNA je po jednom cyklu zdvojnásoben.

**Touchdown PCR**

Počáteční denaturace	2 min	při	94 °C		
Denaturace	30 s	při	94 °C	}	9x
Annealing	1 min	při	61-57 °C		
Elongace	1 min	při	72 °C		
Denaturace	30 s	při	94 °C	}	24x
Annealing	30 s	při	52-56 °C		
Elongace	1 min	při	72 °C		
Závěrečná amplifikace	10 min	při	72 °C		
Uložení			4 °C		

**8.5.3 Agarózová elektroforéza**

Principem gelové agarózové elektroforézy je pohyb molekul DNA, které jsou záporně nabitý, směrem k anodě. Jedná se o metodu, která slouží k separaci různě dlouhých úseku DNA.

Při metodě elektroforézy slouží pufr (TAE) jako elektrolyt a agarózový gel je v tomto případě nosič.

Na přípravu 1 % agarózového gelu, na kterém elektroforéza probíhala, bylo potřeba:

0,5- 1 g	agarózy
50- 100 ml	pufru TAE
30- 60 µl	ethidiumbromidu

Na přípravu 2 % agarózového gelu, na kterém elektroforéza probíhala, bylo potřeba:

4 g	agarózy
200 ml	pufru TAE
90 µl- 120 µl	ethidiumbromidu

Navážka agarózy byla kvantitativně převedena do Erlenmayerovy baňky pomocí pufru TAE. Připravená směs byla pomocí mikrovlnné trouby přivedena k varu, pro lepší rozpustnost agarózy. Poté byl do směsi přidán ethidiumbromid (barvivo pro lepší floreskaci pod UV - zářičem). Do gelu byl vložen hřebínek umožňující vytvoření jamek. Do jamek se následně nanáší PCR produkty.

Po ztuhnutí gelu je hřebínek odstraněn, gel je umístěn do elektroforetické vany a zalit TAE puftrem. Do první vytvořené jamky v gelu bylo nanášeno 5  $\mu$ l DNA-Marker a dále do následujících jamek bylo dávkováno 5  $\mu$ l produktu PCR. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 95 V po dobu cca 45 minut. Výsledný gel byl přenesen do UV-transluminátoru a osvětlen. Pomocí programu GeneShap bylo možné pozorovat bandy a pořídit fotografii.

#### 8.5.4 Denaturační gradientová gelová elektroforéza ( DGGE)

Prvním krokem bylo důkladné očištění skel pomocí ethanolu, který se následně nechal volně odpařit. Důležité bylo správné sestavení skel tak, aby při aplikaci gelu nedocházelo k jeho prosakování. Na obdélníkové sklo bylo připevněno silikonové těsnění ve tvaru písmene „U“. Dále byly vloženy tzv. spacers o velikosti 1 mm, které zajišťovaly požadovanou tloušťku vzniklého gelu. Na obdélníkové sklo bylo přiloženo další, atypické sklo. Pro zajištění byly použity svorky po stranách skel.

Na přípravu gelu byly nezbytné komponenty uvedené v tabulce 3:

Tab. 3 - Složení roztoku gelu

	70 %	30 %
<b>Močovina</b>	8,4 g	3,6 g
<b>Formamid</b>	8,82 ml	3,78 ml
<b>TAE buffer- 50x</b>	0,6 ml	0,6 ml
<b>Akrylamid 40 %</b>	5,64 ml	5,64 ml
<b>Destilovaná voda</b>	doplněno na 30 ml	

U této metody byl využit polyakrylamidový gel, u kterého se zvyšovala koncentrace denaturačních složek (močovina a formamid). Dle tab. 3 byly připraveny roztoky 30 %

a 70 %. Roztoky byly připravovány ve větším množství, pro možné opakování plnění z důvodu vytečení gelu z aparatury apod.

Do plastové nádoby bylo odměřeno cca 15 ml připraveného roztoku podle tab. 3 a následně bylo k této směsi přidáno 6,5  $\mu\text{l}$  katalyzátoru reakce N,N,N',N'- tetramethylethylendiamidu (TEMED) a 104,5  $\mu\text{l}$  polymeračního činidla ammonium persulfátu (APS). Poté byla nádoba uzavřena a promíchána. Pro možnou předčasnou polymeraci v nádobce musel být tento krok prováděn velmi rychle. Připravené roztoky byly dávkovány do válců. Nejdříve byl dávkován roztok 30 %, 70 % roztok byl poté dávkován blíže k ventilku na aparatuře. Ve válcích s roztoky byla míchadélka z důvodu homogenizace směsi. K válcům s roztoky byla upevněna hadička zakončená jehlou. Jehla byla vložena mezi složená skla. Čerpání roztoků bylo zajištěno pomocí peristaltického čerpadla. Při středním stupni rychlosti čerpadla a otevřeném ventilu probíhalo dávkování cca 10 minut. Po nadávkování směsi byla vložena jehla vyjmuta a místo ní byl mezi skla vložen hřebínek pro vytvoření jamek k nadávkování produktu. Úplné polymerace gelu bylo dosaženo po 2 hodinách a při laboratorní teplotě.

Vyhotovený gel i s formou byl umístěn do plastové kazety a pro lepší stabilitu byl připevněn svorkami v kolmé poloze. Kvůli kontaktu gelu s pufrem a vloženým napětím bylo nutné vyjmout těsnění ze spodní části skel. Do vyhřátého termostatu na 60 °C byla vložena a pomocí návodu napojena kazeta s gelem. Po vložení kazety byl vyjmut hřebínek pro dávkování vzorku. Napětí vložené do aparatury bylo 120 V a proud 36 mA. Do první jamky bylo dávkováno 4  $\mu\text{l}$  DNA-Markeru a poté 7  $\mu\text{l}$  vzorku DNA.

Po uplynutí 900 minut, kdy elektroforéza běžela, byla kazeta s gelem vytažena z 1x TAE pufru. K oddělení skel byly použity destilovaná voda a kopistí. Gel byl umístěn do roztoku, který byl složen ze 450 ml destilované vody, 10x TAE a 50  $\mu\text{l}$  GelStar Nucleic Acid Gel Stain. Za stálého třepání po dobu 2 hodin došlo k barvení výsledného gelu.

Gel byl následně vložen do UV-transluminátoru a ozářen. Viditelné bandy byly z gelu vyřezány a umístěny do mikroskopu. Vyříznuté bandy byly 200  $\mu\text{l}$  sterilní vody rozpuštěny. Pro umožnění mechanického působení na bandy bylo přidáno do mikroskopu 5-10 skleněných kuliček. Po dobu 10 minut byla směs vortexována a umístěna do lednice pro volné rozpouštění do druhého dne. Pokud konečný gel z agarózové elektroforézy měl možné amplikony, bylo nutné pracovat s fragmentem DNA. Jednalo se o fragmenty, které byly ve směsi přítomné společně se složkami reakční směsi pro polymerázovou řetězovou reakci.

Opět byla provedena PCR reakce ze získaných fragmentů DNA. Pro PCR reakci byla použita sada primerů 341 F a 907 R. Před purifikací se zbylá reakční směs nanese z důvodu odstranění možných nežádoucích fragmentů rozdílných od požadovaných. Konečné bandy se vyřezávají z gelu za pomoci UV-transluminátoru. Znatelné bandy byly vyřezány pomocí sterilního skalpelu. Vyřezané bandy byly umístěny do sterilních mikrokumavek. Vzhledem k tomu, že UV-záření degraduje DNA, bylo postupováno velmi rychle.

Pomocí komerčního kitu Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit byly produkty PCR purifikovány a po purifikaci následně zaslány na sekvenaci.

## 9 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 9.1 Detekce a kvantifikace degradérů ve vzorcích půd

Prvotní určení degradérů alifatico-aromatického kopolymeru PBAT, kteří byli přítomni v půdě, probíhalo vizuálně. V případě, že se na tuhém živném médiu, na kterém byl materiál daného kopolymeru rozptýlen v podobě malých částic, tvořily prosvětlené zóny, byli degradéři přítomni. Zjištěné kolonie degradérů PBAT byly sčítány.

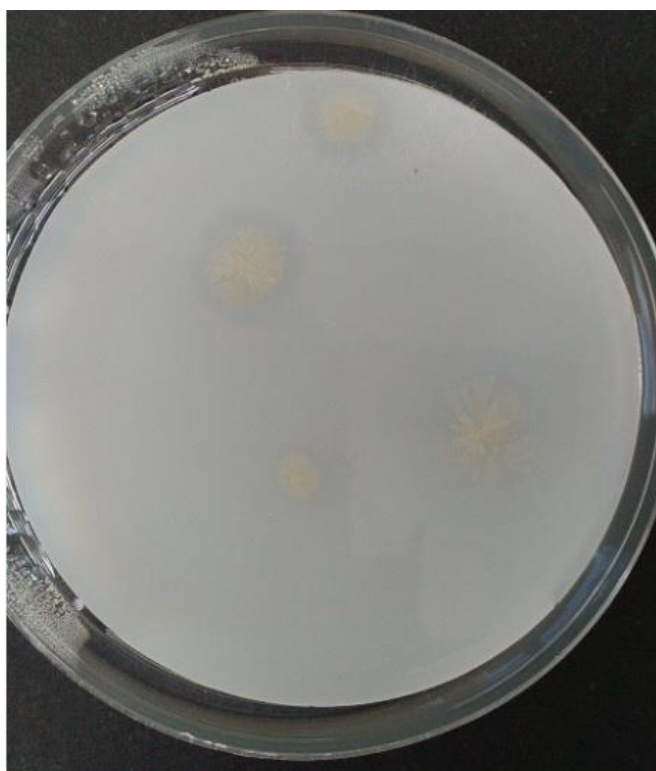
#### 9.1.1 Kvantifikace degradérů ve vzorcích půdy před pomnožením

Využití ředění při přímé detekci degradérů PBAT bylo  $10^{-2}$ . Na Petriho misky bylo nadávkováno 100  $\mu$ l suspenze obsahující mikroorganismy. Následná kultivace probíhala při 58 °C po dobu 7 dní na kultivační půdě obsahující PBAT (tab. 4)

Tab. 4 - Jednotky tvořící kolonie při přímé detekci degradérů

č. půdy	Počet kolonií na kultivační půdě Při ředění $10^{-2}$	CFU/ g
1	0	0
3	2	$2 \cdot 10^2$
7	0	0
8	0	0
11	1	$1 \cdot 10^2$
12	2	$2 \cdot 10^2$
15	0	0
16	2	$2 \cdot 10^2$
20	0	0
25	0	0
28	0	0
29	0	0
32	0	0
34	1	$1 \cdot 10^2$
35	2	$2 \cdot 10^2$
38	0	0
39	0	0
41	0	0
43	0	0
45	0	0
48	4	$4 \cdot 10^2$
49	0	0
53	1	$1 \cdot 10^2$
55	1	$1 \cdot 10^2$
56	1	$1 \cdot 10^2$

Z celkového počtu 25 vzorků půd odebraných v okolí Zlína byli u 10 vzorků zjištěni degradéři, kteří jsou schopni přímou detekcí degradovat PBAT. U ostatních půd se degradéři nevyskytovali, nebo byli přítomni v tak nízkém počtu, že nebyli touto metodou detekováni. Již při experimentu se ukázalo, že na miskách narůstá také velké množství mikroorganismů, které patrně náleží do taxonomické kategorie *Bacillu*; středy prosvětlených zón většinou tvořily kolonie vláknitých mikroorganismů, o kterých jsme se domnívali, že se jedná o aktinomycey (obr. 9)



Obr. 9 - Nárůst mikroorganismů na tuhém živném médiu obsahující PBAT

### 9.1.2 Detekce degradérů po pomnožení v přítomnosti PBAT

Metoda s pomnožením je užitečná pro zvýšení zachytu degradačních bakterií, zejména u těch půdních vzorků, které měly nízký počet degradérů zjištěných metodou bez pomnožení. Do vzorkovnic s naváženými odebranými půdami byla přidána suspenze kopolyestru PBAT pro růst potencionálních mikroorganismů, které by byly schopny degradovat PBAT a tím byly vytvořeny optimální podmínky pro jejich růst. Rovněž musela být upravena i vlhkost přidáním perlitu pro její udržování a nápomoci v přístupu kyslíku. Inkubace připravených vzorkovnic s půdami probíhala po dobu 64 dní a teplotě 58 °C. Využito bylo ředění  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ .



V tab.5 jsou hodnoty přepočteny na  $10^{-1}$  a také určeny počty jednotek, které tvořily kolonie na gram sušiny vzorku půdy po pomnožení.

Tab. 5 - Jednotky tvořící kolonie po pomnožení

č. půdy	Počet kolonií (Přepočet na ředění $10^{-1}$ )	Navážka půdy [g]	Sušina půdy [g]	CFU/g
1	$7,1 \cdot 10^3$	1,92	1,63	$4,4 \cdot 10^3$
3	$1,7 \cdot 10^3$	3,63	3,02	$5,7 \cdot 10^2$
7	$4,6 \cdot 10^3$	2,05	1,76	$2,7 \cdot 10^3$
8	$3,2 \cdot 10^3$	2,33	1,90	$1,7 \cdot 10^3$
11	$1,04 \cdot 10^4$	2,36	1,99	$5,2 \cdot 10^3$
12	$2,8 \cdot 10^3$	2,07	1,73	$1,6 \cdot 10^3$
15	0	3,22	2,79	0
16	$1,9 \cdot 10^3$	1,90	1,59	$1,2 \cdot 10^3$
20	$1,6 \cdot 10^4$	2,13	1,74	$9,2 \cdot 10^3$
25	$2,7 \cdot 10^4$	1,97	1,76	$1,5 \cdot 10^4$
28	$3,7 \cdot 10^4$	2,78	2,35	$1,6 \cdot 10^4$
29	$1,0 \cdot 10^4$	3,65	3,19	$3,1 \cdot 10^3$
32	$2,8 \cdot 10^4$	2,35	1,98	$1,4 \cdot 10^4$
34	$6 \cdot 10^2$	2,08	1,77	$3,4 \cdot 10^2$
35	$5 \cdot 10^3$	2,11	1,81	$2,8 \cdot 10^3$
38	0	1,95	1,67	0
39	0	3,15	2,55	0
41	$6,0 \cdot 10^3$	3,01	2,45	$2,4 \cdot 10^3$
43	$1,1 \cdot 10^4$	2,55	2,43	$4,6 \cdot 10^3$
45	$1,7 \cdot 10^4$	2,21	1,91	$8,9 \cdot 10^3$
48	$2,4 \cdot 10^4$	2,09	1,74	$1,4 \cdot 10^4$
49	0	2,60	2,28	0
53	$4,5 \cdot 10^4$	1,43	1,16	$3,9 \cdot 10^4$
55	$7,1 \cdot 10^3$	2,63	2,26	$3,1 \cdot 10^3$
56	$3,0 \cdot 10^3$	2,68	2,30	$1,3 \cdot 10^3$

Degradéři, kteří jsou schopni PBAT rozkládat byli zjištěni u 21 půd z celkového počtu 25 odebraných vzorků půd v okolí Zlína. Pokusy byly zaměřeny na přítomnost termofilních mikroorganismů, především termofilních aktinomycet, vzhledem k tomu, že cílem diplomové práce bylo zhodnotit perspektivu zpracování odpadu s přítomností PBAT metodou kompostování. Aktinomycety byly metodou prosvětlených zón předběžně identifikovány a následně s nimi bylo, v rámci této diplomové práce, dále pracováno. Nejvíce detekovaných degradérů PBAT po pomnožení bylo u půdy č. 53, kde se vytvořily prosvětlené zóny s hnědými koloniemi bakterií, což odpovídalo  $3,9 \cdot 10^4$  CFU na gram sušiny půdy po pomnožení. Podle BPEJ se jedná o typ půdy o kambizem oglejenou. Naopak nejméně

detekovaných degradérů bylo u půdy č. 34, která je podle BPEJ typ fluvizem oglejená, kde bylo viditelných prosvětlených zón s jinými mikroorganismy  $3,4 \cdot 10^2$  CFU na gram sušiny půdy po pomnožení. Žádní degradéři nebyli nalezeni ani po pomnožení u půd č. 15, kde se podle BPEJ jednalo o typ půdy fluvizem oglejenou, půda č. 38, kde typ půdy byla fluvizem glejová, dále půda č. 39 což odpovídalo podle BPEJ typu modální černozemi a půda č. 49, která odpovídala typu půdy luvizemi.

## 9.2 Pokus o izolaci a charakterizaci čistých kultur degradérů

Původní kolonie, které se vyskytovaly na tuhém živném médiu obsahující submikročástice PBAT tvořily po výluhu půdy prosvětlené zóny. Prvním krokem v rámci diplomové práce byl pokus o izolaci čistých mikrobiálních kultur.

Pomocí metody křížového roztěru (kapitola 8.4) byla kolonie tvořící prosvětlenou zónu přeočkována na nové sterilní tuhé živné médium obsahující submikročástice kopolyesteru PBAT. Metoda křížového roztěru byla používána i na následné přeočkování, až do doby vizuálního potvrzení čisté kultury.

Přeočkování bylo časově náročné a zdlouhavé. Kultivace termofilních aktinomycet probíhala optimálně 7 dní, případně byla prodloužena na 10 dní.



Obr. 10 - Bakteriální kultura izolovaná z půdy

Na půdě se vyskytovaly i jiné bakteriální kultury, kolem kterých nebyly typické zóny, které byly problémem u samotného přeočkování. Kolonie tvořily na tuhých živných médiích s PBAT šířící se porosty, které znesnadňovali izolaci čistých kultur. Pravděpodobně se jednalo o kolonie bakterie rodu *Bacillus*. Je možno shrnout, že ani u jednoho vzorku půdy se nepodařilo izolovat čistou degradující kulturu, spíše se vždy jednalo o konsorcium více mi-

kroorganismů, kde je možno konstatovat, že často byla zřetelně přítomna bakterie, kterou bylo možno vizuálně označit jako aktinomycetu a také další mikroorganismy, které se jevíly jako náležející do skupiny *Bacillů*.

### 9.3 Charakterizace degradačních konsorcií pomocí DGGE

Všechny bakterie obsahují gen 16S rRNA, proto byly použity primery vhodné na tento gen, který umožňuje identifikaci a taxonomické zařazení mikroorganismů. Pro syntézu proteinů je nezbytná ribozomální RNA. Struktura a funkce jsou konzervovány a nachází se ve všech bakteriích. Sekvence pro gen 16S rRNA je dlouhá zhruba 1500 bp. Primární struktura dále obsahuje variabilní úseky. Variabilní úseky umožňují rozlišení mikroorganismů na jednotlivých taxonomických úrovních [47].

V rámci diplomové práce byla použita chloroform/izoamylalkohol (24:1) metoda pro izolaci bakteriální DNA. Dále byly provedeny metody PCR a metoda DGGE pro charakterizaci konsorcií schopných degradovat PBAT. Výsledek PCR byl kontrolován pomocí agarózové elektroforézy. Soubor provedených PCR reakcí je rozsáhlejší, jelikož bylo použito více sad primerů.

Testované primery byly univerzální pro všechny bakterie. Primery, které byly označovány FD1 a RD1, amplifukují fragment, který zahrnuje téměř celou sekvenci genu 16S rRNA. Dále byly zkoušeny PCR reakce s primery 341 F a 907 R, které zajišťují průběh kratšího úseku genu 16S rRNA na templátové DNA. Následně byla použita další skupina univerzálních primerů GC 341F a 907R pro PCR, kde jako templát byl použit produkt reakce s primery FD1 a RD1. Výsledek PCR reakcí byl opět kontrolován v 1 % agarózovém gelu.

Charakterizace konzorcií degradujících PBAT byla provedena pomocí DGGE v polyakrylamidovém gelu. Na gel byly jako vzorky naneseny produkty druhé PCR reakce (s primery GC 341 F a 907 R) a došlo k jejich elektroforetickému rozdělení. Následně byl pomocí UV-transluminátoru zaznamenán výsledek v programu GeneSnap.

Jako velikostní standart fragmentů byl použit DNA Marker-Gene Ruler 100 bp. Zároveň byla také použita pro kontrolu PCR směsi negativní kontrola, kde nebyl přídavek templátové DNA. V následujících kapitolách jsou uvedeny výsledky těchto jednotlivých kroků.

### 9.3.1 Polymerázová řetězová reakce s primery FD1 a RD1

Pro první stupeň PCR reakce byly použity primery FD1 a RD1. Jedná se o primery amplifikující fragmenty, které zahrnují skoro celou sekvenci genu 16S rRNA. Často používanou technikou, která se využívá pro získání produktů z polymerázové řetězové reakce pro DGGE je ta, při níž se používají primery FD1 a RD1. Jak již bylo dříve zmíněno, primery zahrnují větší úsek DNA a v následné polymerázové řetězové reakci primer forward obsahuje GC svorku. Jedná se o postup, který vede k lepšímu výsledku než při přímém použití primeru s GC svorkou.

Templátová DNA byla izolovaná z výtřepu půd na tuhých živných médiích s obsahem kopolyesteru PBAT, které byly kultivovány při teplotě 58 °C. Dávkována byla i negativní kontrola bez přídavku templátové DNA.

Pro první stupeň PCR reakce byly použity primery FD1 a RD1.

Sekvence použitých primerů:

FD1: AGA GTT TGA TCC TGG TCT AG

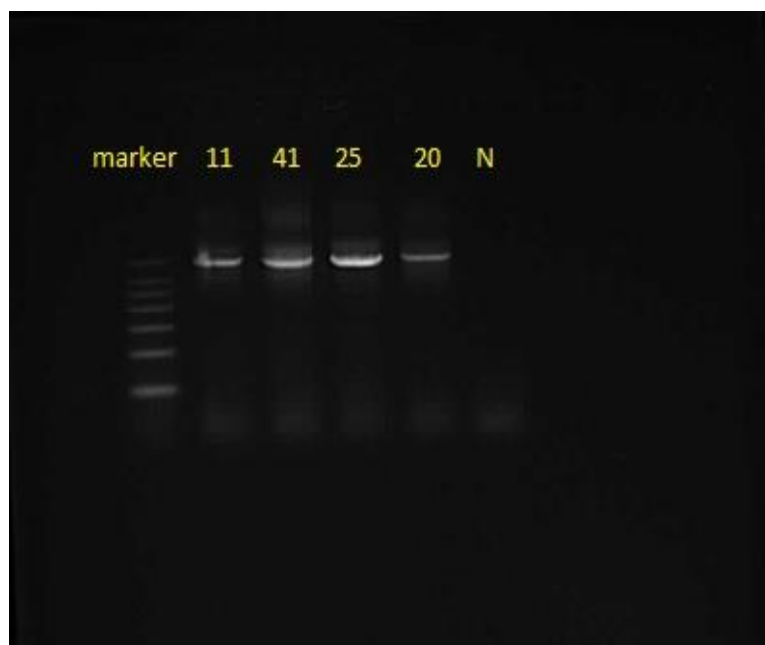
RD1: AAG GAG GTG ATC CAG CC

Výslednému záznamu předcházelo provedení lyze buněk pomocí chloroformu/izoamyalkoholem. V tomto experimentu jsme se pokusili aplikovat DNA konsorcií všech půd, které obsahovaly prosvětlené zóny.

Byla připravena směs o objemu 20 µl (kap. 8.5.2) bez přídavku hořčičných iontů. PCR cyklus byl v thermocykleru proveden programem TouchDown:

Počáteční denaturace po dobu 2 min při teplotě 94 °C, denaturace 94 °C po dobu 30 s, Annealing 61-57 °C po dobu 1 min (teplota snižována o 0,5 °C na cyklus v průběhu 9 cyklů), Elongace 72 °C po dobu 1 min, závěrečná amplifikace 72 °C po dobu 10 min, Uložení 4 °C nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annealing a elongace se opakují v 24 cyklech.

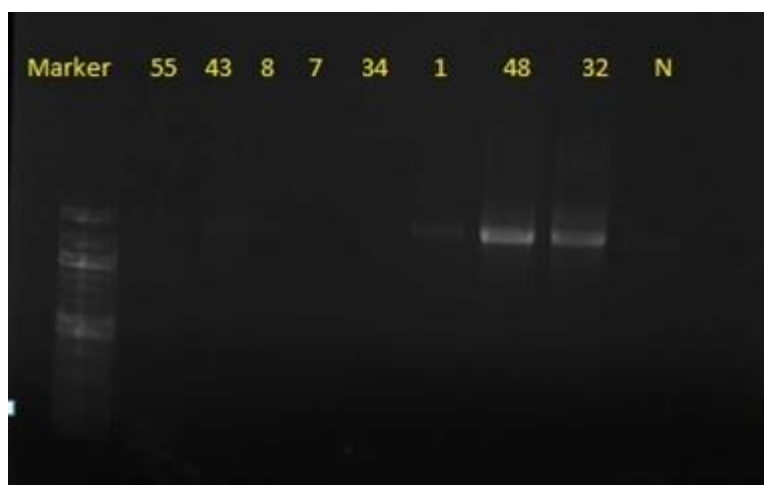
V PCR reakci jsme se pokusili získat produkt odpovídající pro část genu 16S rRNA pro DNA izolovanou z degračních konsorcií izolovaných z půd č. 11, 41, 25, 20.



Obr. 11 - PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Touch-Down PCR, 11- půda č. 11, 41- půda č. 41, 25- půda č. 25, 20- půda č. 20, N-negativní kontrola

Na obr. 11 je viditelný uspokojivý výsledek. Vytvořený produkt měl délku přibližně 1400 bp. Produkty vykazují silnou odezvu, tzn. vysokou koncentraci amplifikovaných fragmentů DNA. Ve spodní části gelu jsou slabě viditelné pozůstatky nezreagovaných primerů, popř. se může jednat také o nízkomolekulární nespecifické produkty.

V další PCR reakci jsme se pokusili získat produkt odpovídající pro část genu 16S rRNA pro DNA z degračních konsorcií izolovaných z půd č. 55, 43, 8, 7, 34, 1, 48, 32.

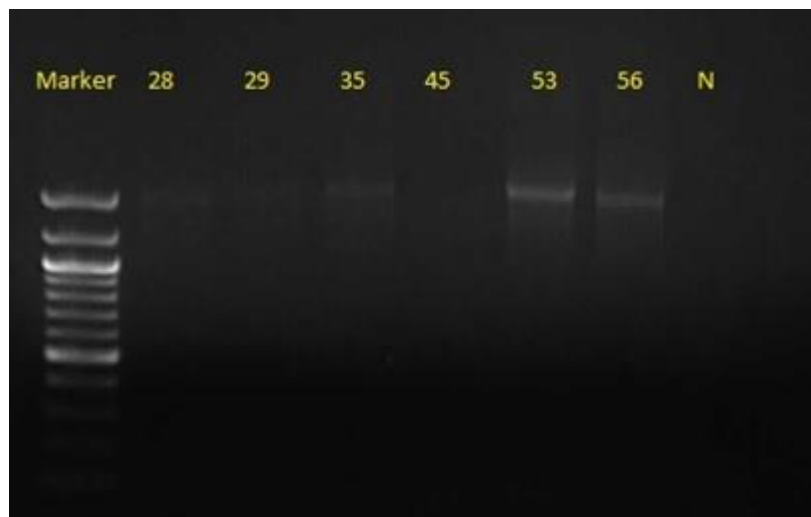


Obr. 12 - PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Touch-Down PCR, 55- půda č. 55, 43- půda č. 43, 8- půda č. 8, 7- půda č. 7, 34- půda č. 34, 1- půda č. 1, 48- půda č. 48, 32- půda č. 32, N-negativní kontrola

Na obr. 12 můžeme vidět, že výsledek nebyl plně uspokojivý ve všech sloupcích. Marker jako ukazatel délky bázi byl v krajní dráze a došlo k jeho deformaci. V dráhách obsahující DNA konsorcií půd č. 55, 43, 8, 7 a 34 produkty nejsou viditelné, ale i přesto se dá předpokládat dostatečné množství DNA pro amplifikaci s jinými primery.

V dráze obsahující vzorek DNA z konsorcia z půdy č. 1 vykazoval slabší band (odezvu). Pravděpodobně byla ve vzorku slabší koncentrace templátové DNA. V dráhách obsahující DNA konsorcií z půd č. 48 a č. 32 byl produkt viditelný a v minimálním množství byly viditelné také nespecifické produkty. Z výřezu z gelu je patrné, že negativní kontrola neobsahovala žádnou amplifikovanou DNA.

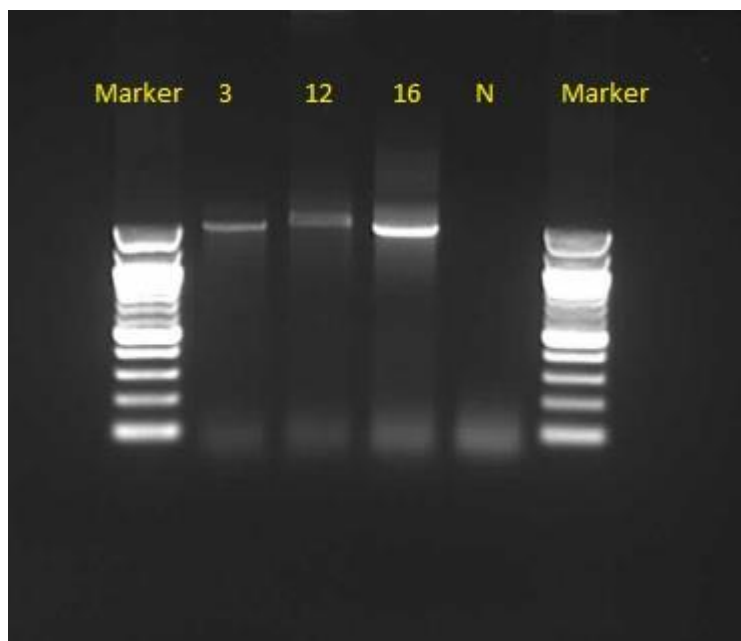
V další PCR reakci jsme se pokusili získat produkt odpovídající pro část genu 16S rRNA pro DNA z degračních konsorcií izolovaných z půd č. 28, 29, 35, 45, 53, 56.



Obr. 13 - PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Touch-Down PCR, 28- půda č. 28, 29- půda č. 29, 35- půda č. 35, 45- půda č. 45, 53- půda č. 53, 56- půda č. 56, N-negativní kontrola

Produkt se vytvořil o předpokládané délce asi 1400 bp (obr. 13). Vytvořené produkty byly slabě viditelné, v dráze obsahující DNA konsorcií z půd č. 53 a č. 56 lze také vidět velmi slabě s náznakem nespecifických produktů. V dráze s konsorciem z půdy č. 45 se produkt nevytvořil, opět se dá předpokládat dostatečné množství při amplifikaci s jinou sadou primerů. Negativní kontrola neobsahovala žádnou amplifikovanou DNA.

V následné PCR reakci jsme se pokusili získat produkt odpovídající pro část genu 16S rRNA pro DNA z degračních konsorcií izolovaných z půd č. 3, 12, 16.



Obr. 14 - PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Touch-Down PCR, 3- půda č. 3, 12- půda č. 12, 16- půda č. 16, N-negativní kontrola

Na obr. 14 jsou zřejmé vytvořené produkty ve všech drahách. Negativní kontrola vyšla. V dráze s DNA ze vzorku půdy č. 16 byl vzniklý produkt nejjasnější (nejvyšší koncentrace templátové DNA), avšak v této dráze bylo současně větší množství vytvořených nespecifických produktů. V dráze obsahující DNA z půdy č. 12 je produkt viditelný, rovněž i zde je pozorovatelné minimální množství vzniklých nespecifických produktů. Ve spodní části gelu u všech vzorků můžeme vidět dimery, které pravděpodobně vznikly jako důsledek nadbytku primerů nebo vytvořením nespecifických produktů.

Na obrázku je viditelné, že došlo k špatnému rozseparování DNA-markeru, pravděpodobně kvůli krátkému času, po který elektroforéza probíhala.

### 9.3.2 Polymerázová řetězová reakce s primery 341F a 907 R

Byly provedeny PCR reakce se vzorky templátové DNA izolovaných konzorcií, a to sadou univerzálních primerů 341F a 907R. Primery zajišťují průběh kratšího úseku genu 16S rRNA.

Sekvence použitých primerů:

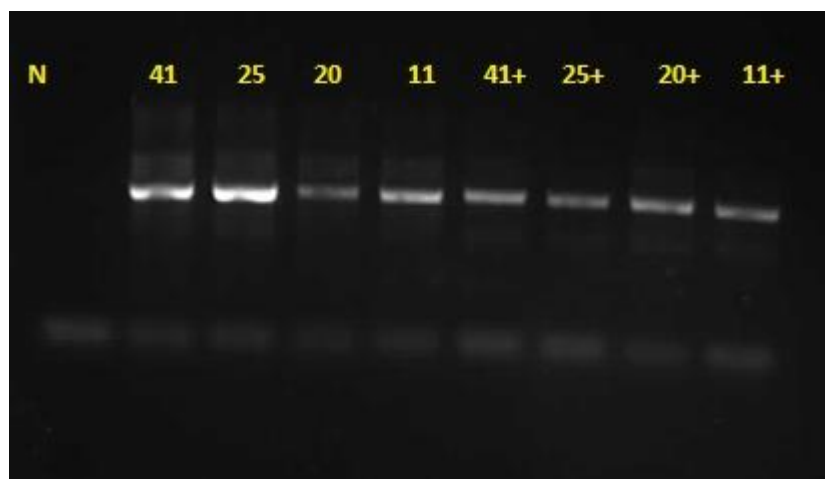
341F: CCT ACG GGA GGC AGC AG

907R: CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT

Byla připravena směs o objemu 20  $\mu$ l (kap. 8.5.2). PCR cyklus byl v thermocykleru proveden programem „Klasické PCR“:

Počáteční denaturace při 94 °C po dobu 2 min, Denaturace při 94 °C po dobu 30 s, Annaeling při 55 °C po dobu 30 s, Elongace při 72 °C, Závěrečná amplifikace při 72 °C po dobu 10 min, Uložení při 4 °C nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annaeling, elongace se opakují v 35 cyklech.

V experimentu byly aplikovány vzorky DNA z degradačních konsorcií izolovaných z půd 41, 25, 20, 11 pro krátký úsek části genu 16S rRNA.



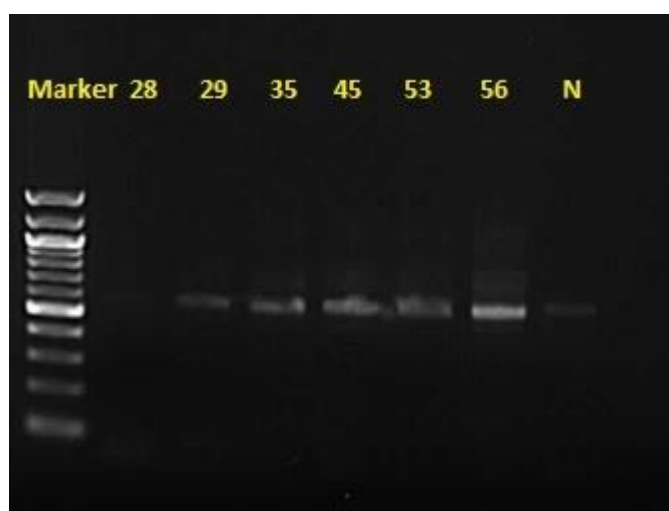
*Obr. 15 - PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR, 41- půda č. 41, 25- půda č. 25, 20- půda č. 20, 11- půda č. 11, 41+- půda č. 41- 10x ředěné DNA, 25- půda č.25- 10x ředěné DNA,20 - půda č. 20-10x ředěné DNA, 11- půda č. 11-10x ředěné DNA, N-negativní kontrola*

Ve všech dráhách s DNA byly vytvořeny viditelné produkty (obr. 15). Produkty v drahách s DNA konsorcií z půd č. 41, 25 bylo dávkováno množství 1  $\mu$ l neředěného rozto-ku DNA. V těchto drahách byl produkt viditelný a rovněž jsou v nich pozorovatelné vzniklé



nespecifické produkty. V dráze se vzorkem DNA konsorcia z půdy č. 20 je vidět slabší band (odezvu). V dráze se vzorkem DNA konsorcia z půdy č. 11 je band viditelný, ale navíc je zde i minimální množství nespecifických produktů. V drahách se vzorky 41+, 25+, 20+, 11+ bylo dávkováno 1  $\mu$ l 10x ředěného základního DNA. Výsledek byl uspokojivý. Ve spodní části gelu můžeme vidět nízkomolekulární nespecifické produkty. Negativní kontrola vyšla v pořádku, tedy bez amplifikační DNA.

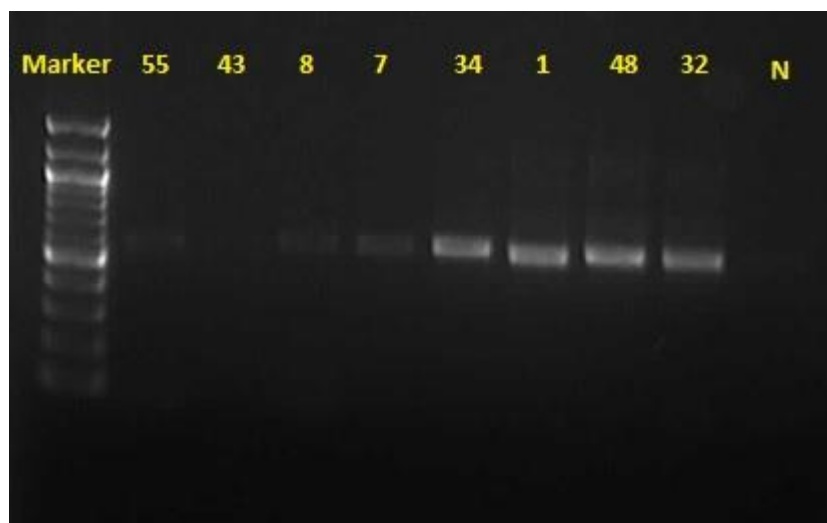
Další PCR reakce probíhala pro krátký úsek části genu 16S rRNA se vzorky DNA z degradačních konsorcií izolovaných z půd 28, 29, 35, 45, 53, 56.



Obr. 16 - PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR, 28- půda č. 28, 29- půda č. 29, 35- půda č. 35, 45- půda č. 45, 53- půda č. 53, 48- půda č. 48, N-negativní kontrola

Amplikony (obr. 16) byly vyhodnoceny jako fragmenty o velikosti 560 bp. V dráze se vzorkem DNA konsorcia z půdy č. 28 byl produkt ve velmi malém množství, není zřejmé, zda vzorek alespoň malé množství produktu obsahoval. Naproti tomu v dalších drahách se vzorky DNA konsorcií z půd č. 29, 35, 45, 53 jsou produkty slabě viditelné. Z neznámých důvodů došlo ke zdeformování produktů v drahách se vzorky č. 45 a 53. Nejjasněji viditelný produkt byl v dráze se vzorkem DNA z půdy č. 56, kde také vznikly další nespecifické produkty. Slabě viditelný band byl zaznamenán i u negativní kontroly. Důvodem může být kontaminace složek PCR směsi.

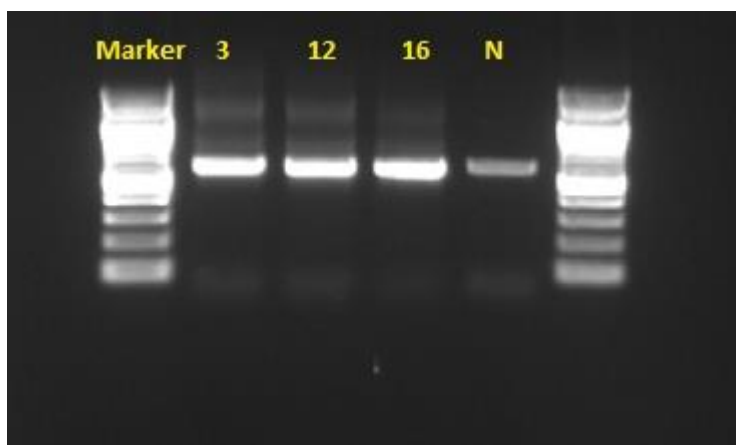
Provedená PCR reakce byla pro krátký úsek části genu 16S rRNA se vzorky DNA z degradačních konsorcií izolovaných z půd 55, 43, 8, 7, 34, 1, 48, 32.



*Obr.17 - PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR, 55- půda č. 55, 43- půda č. 43, 8- půda č. 8, 7- půda č. 7 34- půda č. 34, 1- půda č.1, 48- půda č. 48, 32- půda č. 32, N-negativní kontrola*

Byly zaznamenány amplikony o velikosti přibližně cca 520 bp. Příčina negativního výsledku v drahách s DNA konzorcií z půd č. 55 a 43 spočívala pravděpodobně v templátové DNA použité do PCR směsi. Produkty zde nejsou viditelné, ale můžeme předpokládat dostatečné množství produktu pro amplifikaci s primery GC 341 F a 907R. V dráze se vzorkem DNA z půdy č. 8 a 7 lze vidět slabší odezvy bandu. V drahách obsahující DNA konsorcií z půd č. 34, 1, 48, 32 výsledné amplikony zobrazuje jasně. Negativní kontrola vyšla bez amplifikační DNA.

Provedená PCR reakce byla pro krátký úsek části genu 16S rRNA se vzorky DNA z degradačních konsorcií izolovaných z půd 3, 12, 16.



*Obr. 18 - PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR, 3- půda č. 3, 12- půda č. 12, 16- půda č. 16, N-negativní kontrola*

Na výsledném záznamu, lze vidět vzniklé produkty velmi jasně a ve vysokých odezvách amplikonů, bohužel vznikly i nespecifické produkty. Ve spodních částech gelu rovněž vznikly nespecifické nízkomolekulární produkty. V 1. a 6. dráze, v nichž byl dávkován marker, došlo k jeho špatnému rozseparování kvůli krátkému času, po který elektroforéza probíhala.

Zaznamenaný band byl i u negativní kontroly, což není standartní. Vzniklý band u negativní kontroly může být důsledek kontaminace některé ze složek pro přípravu PCR směsi (pravděpodobně kontaminované primery, protože laboratoře jsou používány velkým množstvím osob) nebo může být způsobena bakteriální DNA vyskytující se ve vzduchu.

### 9.3.3 Polymerázová řetězová reakce s primery GC 341F a 907R

Pro amplifikaci druhého stupně PCR reakce bylo využito sady primeru GC 341 F a 907 R. Označení GC u prvního primeru znamená, že komplementárním bázím předchází GC svorka, která je nutná pro aplikaci na DGGE. Primery s GC svorkou často vytváří ne-specifické produkty [45].

Jako templátová DNA byla použita, která byla produktem PCR reakce s primery FD1 a RD1. Do poslední zkumavky DNA nebyla dávkována, sloužila jako negativní kontrola. Byla připravena směs na PCR o objemu 20  $\mu$ l (kap. 8.5.2.) PCR cyklus byl v thermocykleru proveden programem „Klasické PCR“:

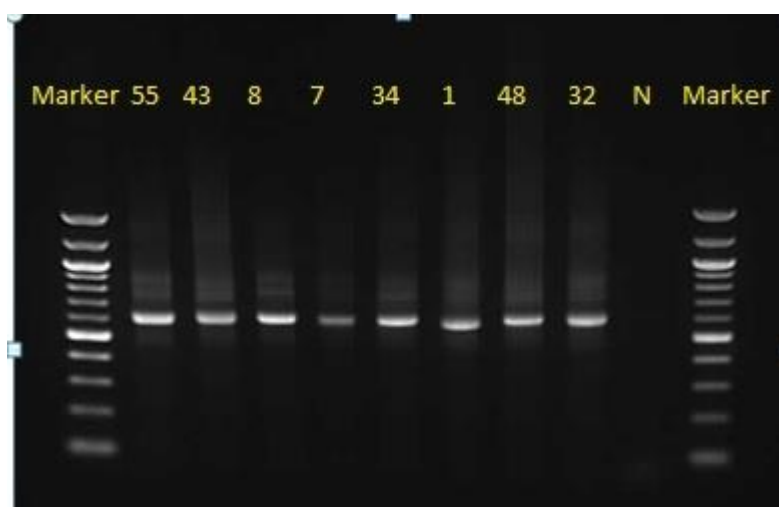
Počáteční denaturace při 94 °C po dobu 2 min, Denaturace při 94 °C po dobu 30 s, Annaeling při 55 °C po dobu 30 s, Elongace při 72 °C, Závěrečná amplifikace při 72 °C po dobu 10 min, Uložení při 4 °C nekonečně dlouho. Fáze denaturace, annaeling, elongace se opakují v 35 cyklech.

Sekvence použitých primerů:

GC 341 F: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCT  
ACGGGAGGCAGCAG

907 R: CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT

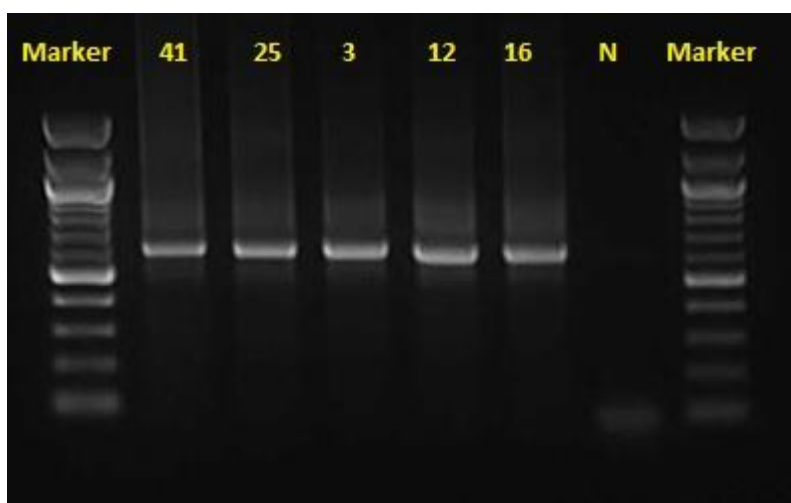
PCR reakce byla provedena pomocí produktu z prvního stupně s DNA konsorcií izolovaných z půd 55, 43, 8, 7, 34, 1, 48, 32.



Obr. 19 - PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR, 55- půda č. 55, 43- půda č. 43, 8- půda č. 8, 7- půda č. 7 34- půda č. 34, 1- půda č.1, 48- půda č. 48, 32- půda č. 32, N-negativní kontrola

Byly zaznamenány výrazné amplikony ve všech sloupcích se vzorky templátové DNA konsorcií o očekávané délce 217 bp avšak došlo i k vzniku nespecifických produktů (obr. 19). V dráze se vzorkem DNA konsorcia z půdy č. 7 je produkt méně jasný než v ostatních drahách a je zde pozorovatelné i minimální množství nespecifických produktů. Negativní kontrola vyšla v pořádku - neobsahovala amplifikovanou DNA.

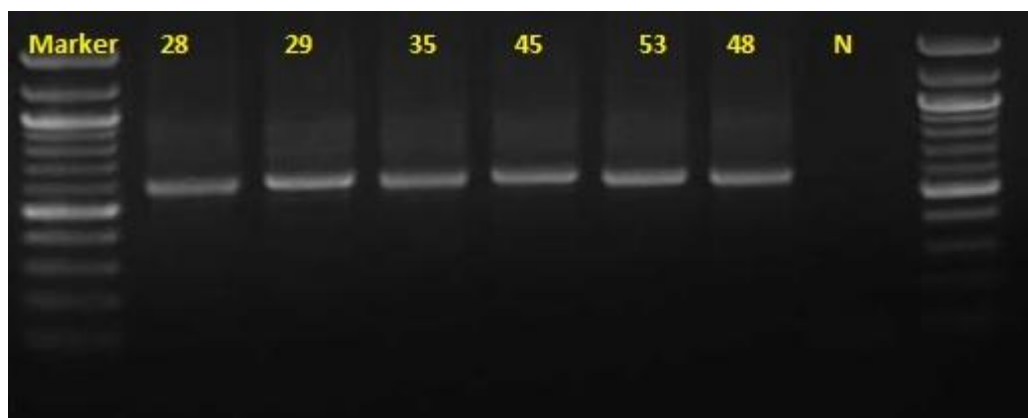
PCR reakce byla provedena pomocí produktu z prvního stupně s DNA konsorcií izolovaných z půd 41, 25, 3, 12, 16.



Obr. 20 - PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR, 41- půda č. 41, 25- půda č. 25, 3- půda č. 3, 12- půda č. 12, 16- půda č. 16, N-negativní kontrola

Výsledek záznamu PCR (obr. 20) byl uspokojivý. Produkty PCR reakce se vytvořily o předpokládané délce cca 200 bp. Produkty byly opět viditelné ve všech dráhách velmi jasně. Na záznamu lze dále vidět velké množství nespecifických produktů o vyšších počtech bp. Negativní kontrola vyšla v pořádku, neobsahovala žádnou amplifikovanou DNA.

PCR reakce byla provedena pomocí produktu z prvního stupně z DNA konsorcií izolovaných z půd 28, 29, 35, 45, 53, 48.



Obr. 21 - PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR, 28- půda č. 28, 29- půda č. 29, 35- půda č. 35, 45- půda č. 45, 53- půda č. 53, 48- půda č. 48, N-negativní kontrola

Na záznamu z PCR reakce (obr. 21) lze vidět uspokojivý výsledek. Produkty jsou viditelné ve všech drahách o očekávané délce 216 bp. Ve všech drahách jsou vidět nespecifické produkty. Negativní kontrola vyšla čistě a neobsahovala amplifikovanou DNA.

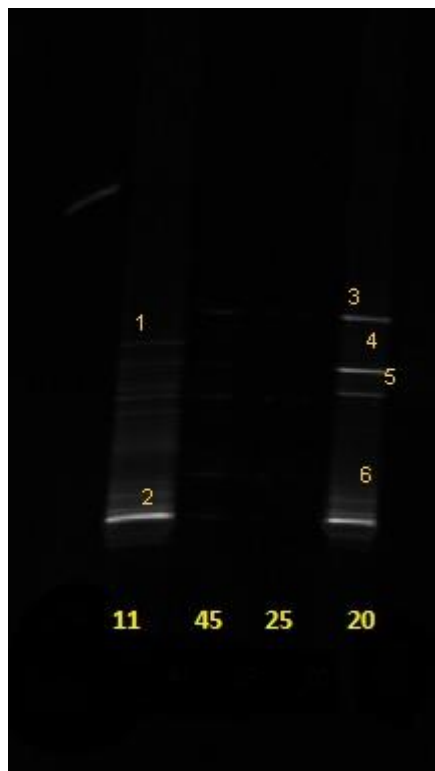
#### 9.4 Denaturační gradientová elektroforéza – DGGE

Na DGGE byly použity kratší PCR produkty s GC svorkou (GC 341 F a 907 R). Metodika byla prováděna podle kapitoly 8.5.4. Do sampléru bylo dávkováno 7  $\mu$ l amplikonu. Jako standart byl použit Marker- Quick-Load 100 bp DNA Ladder. Výsledek je znázorněn na polyakrylamidovém gelu.

Bylo předpokládáno, že výsledkem by nemusely být pouze termofilní aktinomyceety, ale i jiná konsorcia, které mohou být přítomna v blízkosti aktinomycet nebo se částečně podílet na degradaci. Pomocí metody DGGE bylo dosaženo identifikace směsné mikrobiální kultury přítomných ve vzorcích půd.

Pořadí vzorků na gelu bylo následující: 11- vzorek DNA z půdy č. 11, 45- vzorek DNA z půdy č. 45, 25- vzorek DNA z půdy č. 25, 20- vzorek z půdy č. 20.

Výsledek denaturační gradientové gelové elektroforézy je znázorněn na polyakrylamidovém gelu (obr. 22), kde jsou patrné signály dominantních mikroorganismů.

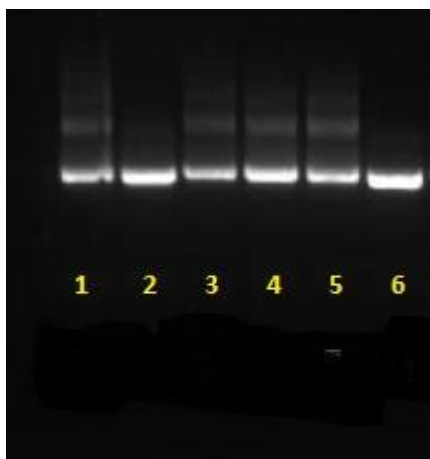


*Obr. 22 - Výsledek DGGE analýzy na polyakrylamidovém gelu - očíslované bandy poslány na sekvenaci a identifikovány - půdy 11,45,25,20 (Tab. 6, 7 )*

V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 11 bylo možné sledovat 2 různé signály. V jamkách se vzorkem DNA z půdy č. 45 a 25 se signály z neznámých důvodu nezobrazily. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 20 byly pozorovatelné 4 různé signály.

Signály dominantních mikroorganismů bylo možno sledovat při ozáření polyakrylamidového gelu pomocí UV - transluminátoru. Pozorovatelné signály (bandy) byly označeny a z gelu následně sterilním skalpelem vyřezány a umístěny do sterilních miktozkumavek, poté bylo přidáno 200  $\mu$ l destilované vody a 5-10 kuliček, směs byla vortexována a ponechána do druhého dne.

Opětovně byla provedena PCR reakce pro DNA fragmenty s primery 341 F a 907 R (již bez GC svorky), kdy byla připravena podle tab. 2 směs na PCR reakci o objemu 30  $\mu$ l. PCR cyklus byl v thermocykleru proveden programem „Klasické PCR“.



Obr. 23 - Následná PCR reakce s DNA pro identifikaci mikroorganismů z půd 11, 20

Před purifikací byla směs nanášena na 2 % agarózový gel, z důvodu odstranění nežádoucích fragmentů od požadovaných. Bandy byly pomocí UV- transluminátoru vyřezány sterilním skalpelem a umístěny do sterilních mikrozkušavek (obr. 23).

V namnoženém získaném vzorku DNA po PCR reakci jsou obsaženy látky (např primery). Látky obsažené v DNA by mohly způsobit komplikace při sekvenacích, proto bylo provedeno přečištění vzorků. Produkt byl purifikován pomocí komerčního kitu Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit.

Sekvence nukleotidů DNA u půd byly získány prostřednictvím SEQme s.r.o. Dobříš, kde byla zobrazena pomocí programu a v databázi GenBank porovnána pomocí programu BLAST - jedná se o program, který srovnává sekvence nukleotidů se sekvencemi v databázi a statisticky zhodnotí význam nalezené shody.

Výsledkem sekvenování byly identifikovány mikroorganismy schopné degradovat PBAT nebo se na degradaci částečně podílet.

Tab. 6 - Výsledky identifikace mikroorganismů pro půdu č. 11

band	č. půdy	Mikroorganismus	shoda sekvence
1	11	<i>Thermoactinospora rubra, Thermobispora bispora</i>	87 %
2		<i>Thermobispora bispora</i>	91 %



Výsledkem sekvenování u půdy č. 11 byl nejsilnější band č. 2 identifikován mikroorganismus jako *Thermobispora bispora* se shodou sekvence 91 %. Jedná se o mikroorganismus, který často bývá izolován z kompostu jako degradér polyesterů. I druhý signál byl identifikován jako aktinomyceta *Thermobispora bispora* se shodou sekvence 87 %, která se v tomto konsorciu mohla na degradaci podílet.

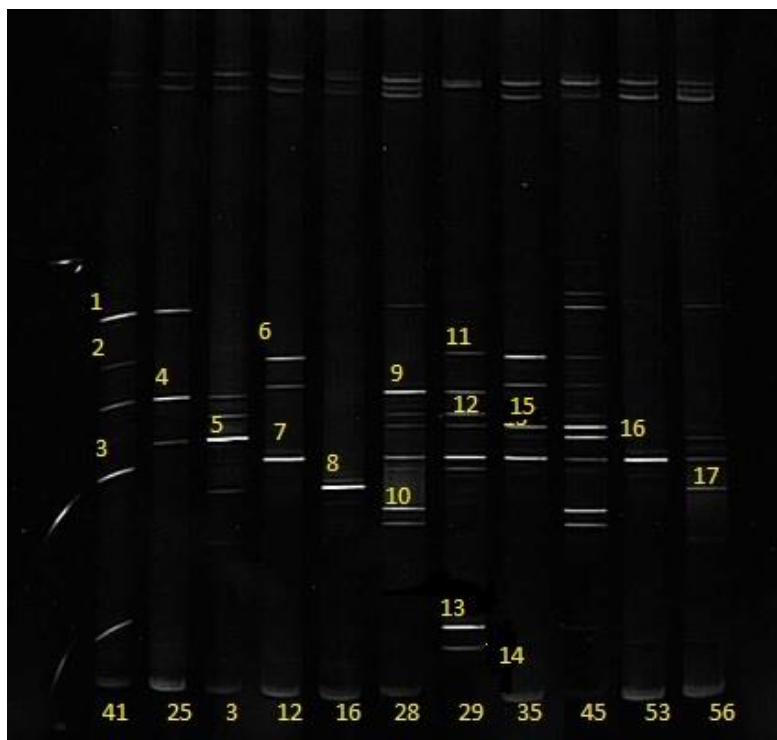
Tab. 7 - Výsledky identifikace mikroorganismů pro půdu č. 20

band	č. půdy	Mikroorganismus	shoda sekvence
3	20	<i>Paenibacillus sp.</i>	93 %
4		<i>Thermobacillus sp</i>	94 %
5		<i>Bacillus alveayuensis</i>	88 %
6		<i>Thermobispora bispora</i>	96%

Výsledkem sekvenování u půdy č. 20 byla identifikována termofilní aktinomyceta *Thermobispora bispora* se shodou sekvence 96 %. Dále byly identifikovány mikroorganismy vyskytující se v těsné blízkosti degradérů PBAT. Band č. 3 byl identifikován jako mikroorganismus *Paenibacillus sp.* Se shodou sekvence 93 %, band č. 4 byl identifikován na základě sekvencí nukleotidů jako *Thermobacillus sp* se shodou sekvence 94 % a band č. 5 *Bacillus alveayuensis* se shodou sekvence 88 %. Při zpracování vzorků a izolaci čisté mikrobiální kultury je pro podobné podmínky růstu od aktinomycet bylo obtížné odstranit.

Pořadí vzorků na gelu bylo následující: 41- vzorek DNA z půdy č. 41, 25- vzorek DNA z půdy č. 25, 3- vzorek DNA z půdy č. 3, 12- vzorek z půdy č. 12, 16- vzorek s DNA z půdy č. 16, 28- vzorek DNA z půdy č. 28, 29- vzorek DNA z půdy č. 29, 35- vzorek DNA z půdy č. 35, 45- vzorek z půdy č. 45, 53- vzorek s DNA z půdy č. 53, 56- vzorek DNA z půdy 56.

Výsledek denaturační gradientové gelové elektroforézy je znázorněn na polyakrylamidovém gelu (obr. 24), kde jsou viditelné signály dominantních mikroorganismů.



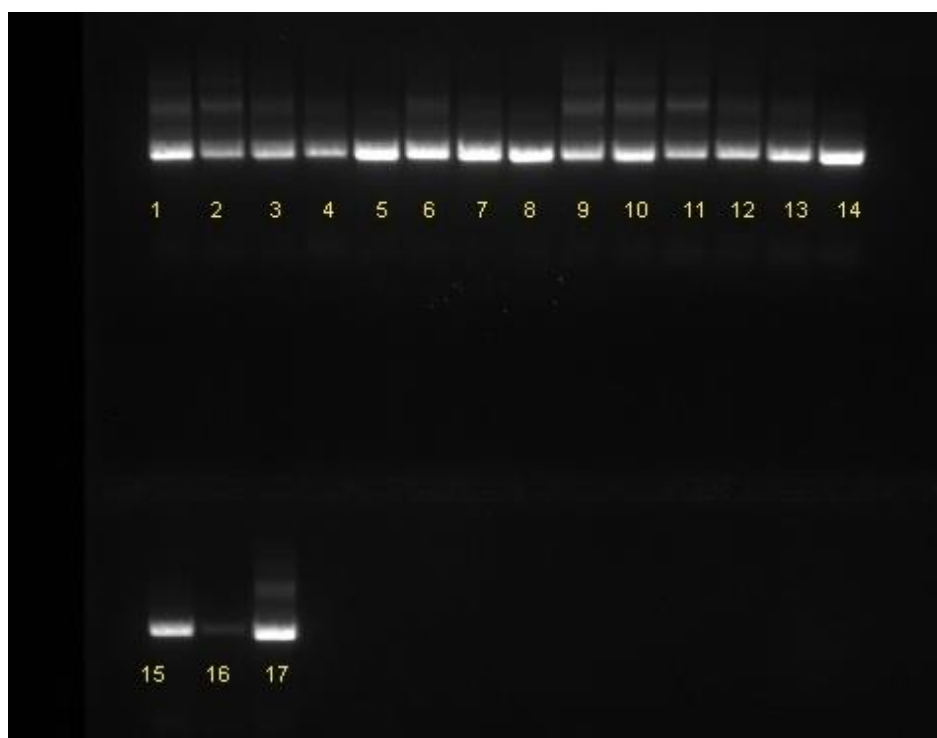
Obr. 24 - Výsledek DGG analýzy na polyakrylamidovém gelu - očíslované bandy zaslány na sekvenaci a identifikovány- půdy 41, 25, 3, 12, 16, 28, 29, 35, 45, 53, 56 (Tab. 8)

V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 41 bylo možné sledovat 3 různé signály. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 25 byl pozorovatelný 1 signál. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 3 byl pozorovatelný 1 signál. V jamce s DNA z půdy č. 12 byly pozorovatelné 2 různé signály. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 16 byl viditelný 1 signál. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 28 byly viditelné 2 různé signály. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 29 bylo možné sledovat 3 různé signály. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 35 byly viditelné 2 různé signály a v jamkách se vzorky DNA z půd č. 53 a 56 bylo po jednom viditelném signálu.

Signály dominantních mikroorganismů bylo možno sledovat při ozáření polyakrylamidového gelu pomocí UV - transluminátoru. Pozorovatelné signály (bandy) byly označeny

a z gelu následně sterilním skalpelem vyřezány, poté bylo přidáno 200  $\mu$ l destilované vody a 5-10 kuliček, směs byla vortexována a ponechána do druhého dne.

Opětovně byla provedena PCR reakce pro DNA fragmenty s primery 341 F a 907 R (již bez GC svorky), kdy byla připravena podle tab. 2 směs na PCR reakci o objemu 30  $\mu$ l. PCR cyklus byl v thermocykleru proveden programem „Klasické PCR“.



Obr. 25 - Následná PCR reakce s DNA pro identifikaci mikroorganismů pro půdy 41, 25, 3, 12, 16, 28, 29, 35, 45, 53, 56

Před purifikací byla směs nanášena na 2 % agarózový gel, z důvodu odstranění nežádoucích fragmentů od požadovaných. Bandy pomocí UV - transluminátoru vyřezány sterilním skalpelem a umístěny do sterilních mikrozkušavek (obr. 25). Následně byly produkty purifikovány pomocí komerčního kitu Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit, vzhledem k tomu, že v namnoženém vzorku DNA po následné PCR reakci jsou obsaženy látky (primery aj.), které by mohly způsobit potíže při sekvenci nukleotidů DNA, bývají vzorky před sekvenací předčištěny.

Sekvence nukleotidů DNA u půd byly získány prostřednictvím SEQme s.r.o. Dobříš byla zobrazena pomocí programu a v databázi GenBank porovnána pomocí programu BLAST - program na základě sekvence nukleotidů srovnává a statisticky zhodnotí význam nalezené shody.

Na základě sekvencí nukleotidů byly identifikovány mikroorganismy schopné degradovat PBAT nebo se na degradaci částečně podílet.

Tab. 8 - Výsledky identifikace mikroorganismů pro vzorky půd 41, 25, 3, 12, 16, 28, 29, 35, 45, 53, 56

Band	Č. půdy	Mikroorganismus	Shoda sekvence
1	41	<i>Paenibacillus sp.</i>	97 %
2		<i>Paenibacillus sp.</i>	85 %
3		Chiméra	x
4	25	<i>Paenibacillus sp.</i>	90 %
5	3	<i>Aeribacillus pallidus</i>	99 %
6	12	Chiméra	x
7		<i>Sporolactobacillaceae bacterium</i>	99 %
8	16	<i>Geobacillus sp</i>	99 %
9	28	<i>Paenibacillus sp</i>	99 %
10		<i>Alicyclobacillus sp.</i>	91 %
11	29	Směsný vzorek	x
12		<i>Paenibacillus sp.</i>	92 %
13		<i>Kyrpidia sp.</i>	95 %
14		<i>Kyrpidia sp.</i>	98 %
15	35	<i>Sporolactobacillaceae bacterium</i>	93 %
16	53	Směsný vzorek	x
17	56	<i>Hyphomicrobiaceae bacterium</i>	97 %

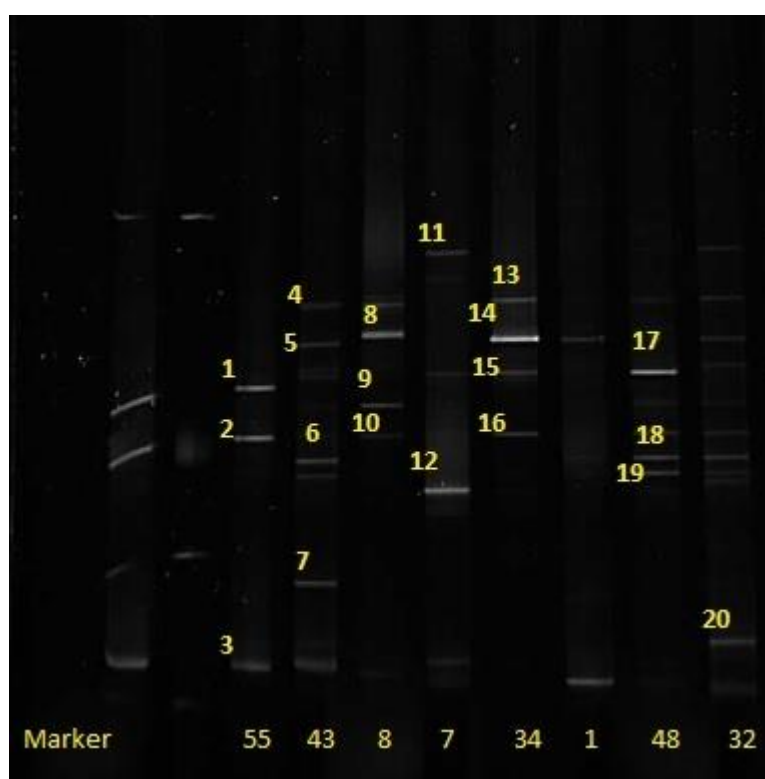
V proběhlém experimentu nebyl identifikován žádný mikroorganismus jako termofilní aktinomyce. Jak již bylo dříve zmíněno, při izolaci čisté kultury bylo obtížné odstranit tyto mikroorganismy od aktinomycet pro jejich podobné podmínky růstu. Následně došlo k tomu, že nebyly identifikovány aktinomyce, ale výše uvedené mikroorganismy. Pravděpodobně došlo ke vzniku konsorcií mikroorganismů, které se z části mohou podílet na biodegradaci PBAT.

U vzorku půd č. 41 a 12 byly identifikovány chiméry. Jedná se o sekvence, které jsou tvořené ze dvou a více sekvencí, které se amplifikovali dohromady. Během následných cyk-

lů PCR, kde částečně prodlužuje řetězec a může se vázat na templát DNA z jiné podobné sekvence.

Pořadí vzorků na gelu bylo následující: 55 - vzorek DNA z půdy č. 55, 43 - vzorek DNA z půdy č. 43, 8 - vzorek DNA z půdy č. 8, 7 - vzorek z půdy č. 7, 34 - vzorek s DNA z půdy č. 34, 1 - vzorek DNA z půdy č. 1, 48 - vzorek DNA z půdy č. 48, 32 - vzorek DNA z půdy č. 32

Výsledek denaturační gradientové gelové elektroforézy je znázorněn na polyakrylamidovém gelu (obr. 26), kde jsou viditelné signály dominantních mikroorganismů.

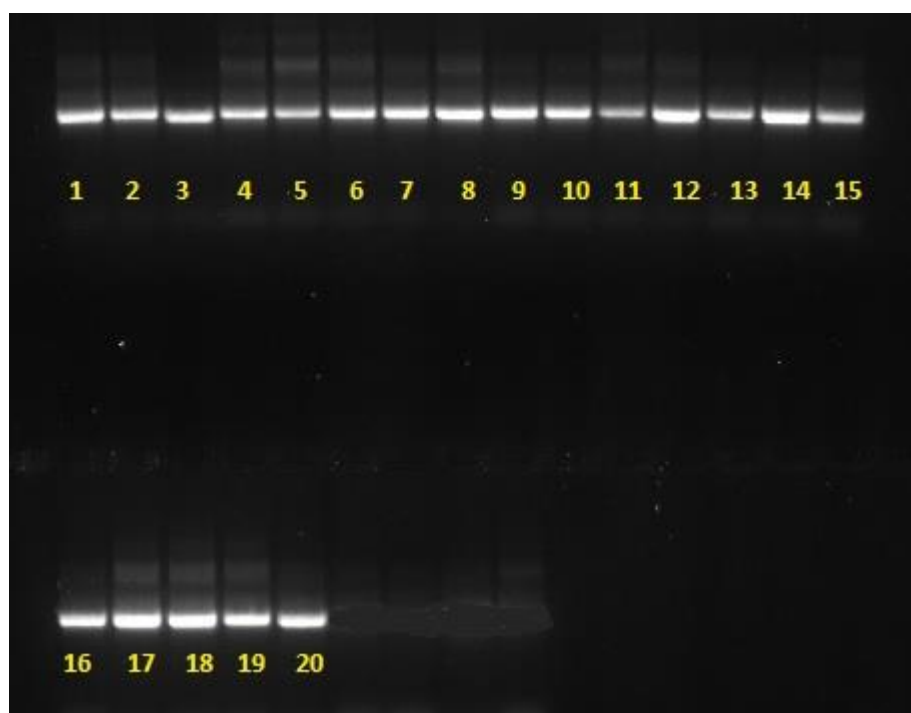


Obr. 26 - Výsledek DGGGE analýzy na polyakrylamidovém gelu - očíslované bandy zaslány na sekvenaci a identifikovány- půdy 55, 43, 8, 7, 34, 1, 48, 32 (Tab 9, 10 )

V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 55 bylo možné sledovat 3 různé signály. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 43 byly viditelné 4 různé signály mikroorganismů, V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 8 byly pozorovatelné 3 signály. V jamce, kde bylo DNA z půdy č. 7 viditelné 2 různé signály. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 34 byly viditelné 4 různé signály. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 48 byly viditelné 3 různé signály. V jamce se vzorkem DNA z půdy č. 32 byl viditelný pouze 1 odlišný signál.

Signály jednotlivých dominantních mikroorganismů bylo možné sledovat pomocí UV - transluminátoru. Pozorovatelné a označené amplikony byly pomocí sterilního skalpelu vyřezány, poté bylo přidáno 200  $\mu$ l destilované vody a 5-10 kuliček, směs byla vortexována a ponechána do druhého dne.

Opětovně byla provedena PCR reakce pro DNA fragmenty s primery 341 F a 907 R (již bez GC svorky), kdy byla připravena podle tab. 2 směs na PCR reakci o objemu 30  $\mu$ l. PCR cyklus byl v thermocykleru proveden programem „Klasické PCR“.



Obr. 27 - Následná PCR reakce s DNA pro identifikaci mikroorganismů pro půdy 55, 43, 8, 7, 34, 1, 48, 32

Dříve než byly vzorky purifikovány, byla PCR směs nanášena na 2 % agarózový gel, aby došlo k odstranění nežádoucích fragmentů. Viditelné bandy (obr. 27) byly vyřezány a umístěny do sterilních mikrozkušavek. Následně byly purifikovány pomocí komerčního kitu Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit, a to proto, že v takto namnožených DNA po PCR reakci mohou být obsaženy např. primery nebo jiné látky, které by mohly být problematické při sekvenaci.

Produkty PCR směsi byly odeslány na sekvenaci do SEQme s.r.o. Dobříš, kde jednotlivé sekvence nukleotidů DNA byly zobrazeny pomocí programu a v databázi GenBank porovnány pomocí programu BLAST .

Tab. 9 - Výsledky identifikace mikroorganismů pro vzorek půdy 55

Band	Č. půdy	Mikroorganismus	Shoda sekvence
1	55	<i>Aeribacillus sp.</i>	99 %
2		<i>Geobacillus sp.</i>	99 %
3		<i>Thermobispora bispora</i>	96 %

Výsledkem sekvence nukleotidu DNA byl u půdy č. 55 identifikován mikroorganismus jako termofilní aktinomyceta *Thermobispora bispora* se shodou sekvence 96 %. Při pokusu o získání čisté kultury mikroorganismů, pro podobné podmínky růstu bylo problematické odstranit přítomné konsorcia. V těsné blízkosti aktinomycety, byly v půdě identifikovány mikroorganismy *Aeribacillus sp.* Se shodou sekvence 99 % a *Geobacillus sp.* 99 %, které se z části mohly podílet na biodegradaci kopolyesteru PBAT.

Tab. 10 - Výsledky identifikace mikroorganismů pro vzorek půdy 43, 8, 7, 34, 48, 32

Band	Č. půdy	Mikroorganismus	Shoda sekvence
4	43	<i>Thermobacillus sp</i>	95 %
5		Nízká koncentrace templátu	x
6		<i>Alicyclobacillus pohliae</i>	97 %
7		<i>Kyrpidia tusciae</i>	94 %
8	8	<i>Pelomonas puraquae</i>	99 %
9		<i>Sporolactobacillaceae bacterium</i>	99 %
10		<i>Geobacillus sp.</i>	99 %
11	7	<i>Paenibacillus sp.</i>	99 %
12		<i>Cohnella sp.</i>	95 %
13		artefakt	x

14		<i>Paenibacillus sp.</i>	93 %
15		artefakt	x
16		<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	99 %
17	48	<i>Paenibacillus ehimensis</i>	94 %
18		Fragment	x
19		<i>Alicyclobacillus pohliae</i>	99 %
20	32	Nízká koncentrace templátu	x

V proběhlém pokusu se vzorky DNA půd (tab. 10) nebyla na základě sekvencí nukleotidů v DNA identifikována žádná termofilní aktinomyceta. Jedná se o konsorcia, která byla komplikacemi při přeočkování a získání čistých kultur mikroorganismů vzhledem k podobným vlastnostem růstu. Samotné mikroorganismy se mohou vyskytovat v blízkosti termofilních aktinomyct, ale jsou pravděpodobně schopny samostatně PBAT částečně degradovat.

Ve vzorku DNA z půdy č. 43 a 32 nebylo možné mikroorganismy identifikovat kvůli nedostatečné koncentraci templátové DNA.

Pomocí metody DGGE bylo dosaženo identifikace směsné mikrobiální kultury přítomné v blízkosti prosvětlených zón kolonií aktinomyct nebo aktinomyct samotných.

V diplomové práci Pavlíkové [48] byly identifikovány termofilní aktinomycety: *Thermobispora bispora*, *Actinomadura rubrobrunea* a *Thermomonospora sp.* Pomocí metody DGGE byly rovněž identifikovány mikroorganismy, které se vyskytovaly v blízkosti aktinomyct např. *Geobacillus sp* a *Geobacillus thermoglucosidasius*.



## ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce byla detekce, kvantifikace, izolace a identifikace mikroorganismů, které byly schopny degradovat kopolyester PBAT. Potencionálním zdrojem jejich přítomnosti bylo 25 vzorků půd odebraných v okolí Zlína.

U vzorků půdy před pomnožením byl počet jednotek nejvíce u půdy č. 48, což odpovídalo asi  $4 \cdot 10^2$  CFU na gram půdy. Ukázalo se, že počty degradérů se pohybují přirozeně zřejmě v blízkosti detekčního limitu použitého postupu ( $1 \cdot 10^2$  CFU). Je možné, že z tohoto důvodu nebyli degradéři asi u poloviny půd detekováni před pomnožením vůbec.

U vzorků po pomnožení bylo nejvíce degradérů detekováno u vzorku půdy č. 53, což odpovídá  $3,9 \cdot 10^4$  CFU na gram sušiny půdy po pomnožení. Naopak nejméně degradérů bylo detekováno v půdě č. 34, což odpovídá  $6 \cdot 10^2$  CFU na gram sušiny půdy po pomnožení.

V rámci práce bylo využito mikrobiologických a molekulárně biologických metod. Pro získání čisté mikrobiální kultury bylo nutno přeočkování na tuhá živná média, která obsahovala submikročástice PBAT, několikrát opakovat. Následně proběhla kultivace při teplotě 58 °C, optimální doba kultivace byla stanovena na 7 dní. Na kultivačních půdách rostly i jiné mikroorganismy, avšak byla snaha vybírat k izolaci pouze kultury bakterií, kolem jejichž kolonií byly vytvořeny prosvětlené zóny svědčící o degradaci polymeru. Izolace DNA byla provedena metodou chloroform/izoamylalkoholu (24:1)

Pomocí metody DGGE byla prováděna identifikace a charakterizace směsných mikrobiálních kultur. Degradální konzorcium izolované z půd č. 11, 20 a 55 obsahovala bakterii identifikovanou jako termofilní aktinomyceta *Thermobispora bispora*. Dále byly identifikovány mikroorganismy, které se v půdách rovněž vyskytovaly např. *Paenibacillus sp.*, *Thermobacillus sp.*, *Bacillus alveayuensis*, *Aeribacillus sp.*, *Geobacillus sp.* Jelikož podmínky jejich růstu byly podobné aktinomycetám, bylo problematické jejich odstranění a nelze vyloučit ani to, že se na degradaci PBAT rovněž podílejí. U konzorcií z některých půd nebyla přítomnost aktinomycet zjištěna (č. půd-3, 7, 8, 12, 16, 25, 28, 29, 32, 34, 35, 41, 43, 48, 53, 56). Tato konzorcium mikroorganismů, nejsou pravděpodobně závislá na přítomnosti aktinomycet, ale jsou schopny sama částečně PBAT degradovat. Na základě identifikací směsných mikrobiálních kultur bylo zjištěno, že degradéři jsou poměrně četní.

Lze tedy konstatovat, že v přirozeném půdním prostředí je možné nalézt degradéry PBAT a z hlediska půdy nejsou kritickým problémem při degradaci samotného kopolyesteru PBAT, nebo jeho zpracování pomocí kompostování.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] SHAH, Aamer Ali, Satoshi KATO, Noboru SHINTANI, Numbi Ramudu KAMINI a Toshiaki NAKAJIMA-KAMBE. Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **98**(8), 3437-3447 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1007/s00253-014-5558-1. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5558-1>.
- [2] KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Mathieu NGOUAJIO a R. Thomas FERNANDEZ. Assessment of aliphatic–aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: Field study. *Chemosphere* [online]. 2008, **71**(5), 942-953 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.10.074. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653507015287>.
- [3] STEJSKAL, Jan: Zdeněk Vašků: Půda je nenahraditelná, *Ekolist* /03, 2008
- [4] HAUPTMAN, Ivo, Zdeněk KUKAL, Karel POŠMOURNÝ a Ivan BIČÍK. *Půda v České republice*. Praha: Pro Ministerstvo životního prostředí a Ministerstvo zemědělství vydal Consult, 2009. ISBN 978-80-903482-4-0.
- [5] MAIER, Raina M., Ian L. PEPPER a Charles P. GERBA. *Environmental microbiology*. San Diego: Harcourt Brace Jovanovich, c2000. ISBN 0-12-497570-4.
- [6] KAPRÁLEK, František. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-7184-811-5.
- [7] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-973-0.
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. opr. a dopl. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [9] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. ISBN 80-7080-617-6.
- [10] BREULMANN, Michael, Andreas KÜNKEL, Sabine PHILIPP, Valentine REIMER, Kai O. SIEGENTHALER, Gabriel SKUPIN a Motonori YAMAMOTO. Polymers, Biodegradable. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1002/14356007.n21\_n01. ISBN 3527306730. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.n21\\_n01](http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.n21_n01).

- [11] SONG, J. H., R. J. MURPHY, R. NARAYAN a G. B. H. DAVIES. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2009, **364**(1526), 2127-2139 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1098/rstb.2008.0289. ISSN 0962-8436.  
Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2008.0289>
- [12] RUTKOWSKA, Maria, Katarzyna KRASOWSKA, Aleksandra HEIMOWSKA a Marek KOWALCZUK. Degradation of the blends of natural and synthetic copolyesters in different natural environments. *Macromolecular Symposia* [online]. 2003, **197**(1), 421-430 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1002/masy.200350736. ISSN 1022-1360.  
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/masy.200350736>
- [13] KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Mathieu NGOUAJIO a R. THOMAS FERNANDEZ. Development of an automatic laboratory-scale respirometric system to measure polymer biodegradability. *Polymer Testing* [online]. 2006, **25**(8), 1006-1016 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2006.06.008. ISSN 01429418.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941806001231>
- [14] HWANG, In-Tae, Chan-Hee JUNG, In-Seol KUK, Jae-Hak CHOI a Young-Chang NHO. Electron beam-induced crosslinking of poly(butylene adipate-co-terephthalate). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. 2010, **268**(21), 3386-3389 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.nimb.2010.08.010. ISSN 0168583x.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X10007147>
- [15] KRZAN, Andrej, Sarunya HEMJINDA, Stanislav MIERTUS, Andrea CORTI a Emo CHIELLINI. Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2006, **91**(12), 2819-2833 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2006.04.034. ISSN 01413910.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391006001996>
- [16] SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* [online]. 2008, **26**(3), 246-265 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005. ISSN 07349750.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975008000141>

- [17] BASTIOLI, Catia. *Handbook of biodegradable polymers*. Shrewsbury: Rapra Technology, 2005.
- [18] SINGH, Baljit a Nisha SHARMA. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2008, **93**(3), 561-584 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008. ISSN 01413910.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391007003539>
- [19] LUCAS, Nathalie, Christophe BIENAIME, Christian BELLOY, Michèle QUENEUDEC, Françoise SILVESTRE a José-Edmundo NAVA-SAUCEDO. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere* [online]. 2008, **73**(4), 429-442 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064. ISSN 00456535.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653508008333>
- [20] HOFFMANN, Jaromír. *Technologická cvičení z Ochrany prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 2000. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-214-1709-9.
- [21] KUPEC, Jan. *Zpracování odpadních vod a čistírenských kalů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2002. ISBN 80-7318-058-8.
- [22] TOKIWA, Yutaka, Buenaventurada P. CALABIA, Charles U. UGWU a Seiichi AIBA. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, **10**(9), 3722-3742 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.3390/ijms10093722. ISSN 1422-0067.  
Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/9/3722/>
- [23] WITT, U, T EINIG, M YAMAMOTO, I KLEEBERG, W.-D DECKWER a R.-J MÜLLER. Biodegradation of aliphatic–aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere* [online]. 2001, **44**(2), 289-299 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/S0045-6535(00)00162-4. ISSN 00456535.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653500001624>
- [24] CHEN, Yiwang, Licheng TAN, Lie CHEN, Yan YANG a Xiaofeng WANG. Study on biodegradable aromatic/aliphatic copolyesters. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* [online]. 2008, **25**(2), - [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1590/S0104-66322008000200011. ISSN 0104-6632.

- Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-66322008000200011&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322008000200011&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- [25] FUKUSHIMA, Kikku, Meng-Hsiu WU, Sergio BOCCHINI, Amaliya RASYIDA a Ming-Chien YANG. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2012, **32**(6), 1331-1351 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.msec.2012.04.005. ISSN 09284931.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493112001245>
- [26] KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Susan SELKE, Mathieu NGOUAJIO a R. Thomas FERNANDEZ. Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2010, **95**(12), 2641-2647 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.018. ISSN 01413910.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391010003125>
- [27] WU, Chin-San. Utilization of peanut husks as a filler in aliphatic–aromatic polyesters: Preparation, characterization, and biodegradability. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, **97**(11), 2388-2395 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.07.027. ISSN 01413910.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139101200290X>
- [28] YAMAMOTO, Motonori, Uwe WITT, Gabriel SKUPIN, Dieter BEIMBORN, Rolf-Joachim Müller. *Biodegradable Aliphatic-Aromatic Polyesters: "Ecoflex®"* [online]. [cit. 2012-01-15].  
Dostupné z: [www: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600035.bpol4011/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600035.bpol4011/full)
- [29] MÜLLER, Rolf-Joachim, Ilona KLEEBERG a Wolf-Dieter DECKWER. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of Biotechnology* [online]. 2001, **86**(2), 87-95 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00407-7. ISSN 01681656.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600004077>
- [30] MARTEN, Elke, Rolf-Joachim MÜLLER a Wolf-Dieter DECKWER. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic–aromatic copolyesters. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, **88**(3), 371-381 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.001. ISSN 01413910.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391004003970>

- [31] TRINH TAN, Frederick, David G. COOPER, Milan MARIĆ a James A. NICELL. Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2008, **93**(8), 1479-1485 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.05.005. ISSN 01413910.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139100800147X>
- [32] KIJCHAVENGKUL, Thitisilp, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Edgar ALVARADO, José Roberto CAMACHO MONTERO a Jorge Mario ROSALES. Atmospheric and soil degradation of aliphatic–aromatic polyester films. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2010, **95**(2), 99-107 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.048. ISSN 01413910.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139100900411X>
- [33] 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, **29**(1), 84-100 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.trac.2009.09.005. ISSN 01659936.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993609002052>
- [34] WENG, Yun-Xuan, Yu-Juan JIN, Qing-Yang MENG, Lei WANG, Min ZHANG a Yu-Zhong WANG. Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polymer Testing* [online]. 2013, **32**(5), 918-926 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2013.05.001. ISSN 01429418.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941813000962>
- [35] ADAMUS, Grazyna, Piotr DACKO, Marta MUSIOL, Wanda SIKORSKA, Michal SOBOTA, Robert BICZAK, Barbara HERMAN, Piotr RYCHTER, Katarzyna KRASOWSKA, Maria RUTKOWSKA, Marek KOVALCZUK. Degradation of selected synthetic polyesters in natura conditions, *Polymery* (2006), pg. 539-546.
- [36] WANG, Ya-Wu, Weike MO, Huilan YAO, Qiong WU, Jinchun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2004, **85**(2), 815-821 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.02.010. ISSN 01413910.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391004000825>

- [37] ŠIMÍČEK Michal., *Molekulární metody*, 3'POL, 2005.  
Dostupné z: <http://www.3pol.cz/cz/rubriky/medicina-a-prirodoveda/861-molekularni-metody>
- [38] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 3., inovované vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2002. ISBN 80-902562-4-4.
- [39] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [40] RUML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-499-8.
- [41] PCR schema. In: PCR schema [online]. 2001 [cit. 2013-04-21].  
Dostupné z: [http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public\\_html/pcr.png](http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public_html/pcr.png)
- [42] ROUX, K. H. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2009, **2009**(4), pdb.ip66-pdb.ip66 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1101/pdb.ip66. ISSN 1559-6095. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.ip66>
- [43] BUTLER, John M. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. 2nd ed. Boston: Elsevier Academic Press, c2005. ISBN 0-12-147952-8.
- [44] RAWEL, H. M. R. Westermeier: *Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. Second edition. XVII and 331 pages, numerous figures and tables. VCH Verlagsgesellschaft mbH., Weinheim 1997. Price. *Food / Nahrung* [online]. 1997, **41**(5), 319-320 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1002/food.19970410530. ISSN 0027769x.  
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/food.19970410530>
- [45] EDITED BY GEORGE P. PATRINOS, WILHELM J. ANSORGE., edited by George P. Patrinos, Wilhelm J. Ansorge. *Molecular diagnostics*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2010. ISBN 9780080923185.
- [46] RŮŽIČKA, Jan. *Mikrobiologická cvičení*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-7318-017-0
- [47] OLSEN, G J, D J LANE, S J GIOVANNONI, N R PACE a D A STAHL. Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Annual Review of Microbiology* [online]. 1986, **40**(1), 337-365 [cit. 2016-05-02]. DOI: 10.1146/annurev.mi.40.100186.002005. ISSN 0066-4227.  
Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.40.100186.002005>



- [48] Pavlíková Denisa, *Izolace a charakterizace mikrobiálních degradérů aromaticko- alifatických polyester*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

A	Adenin
AP	Peroxodisíran amonný
bp	Páry bází
C	Cytosin
CFU	Počet jednotek tvořící kolonie
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dDNA	Dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleotit trifosfát
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
G	Guanin
GC	Plynová chromatografie
GPC	Plynová permeační chromatografie
GC-svorka	Sekvence přibližně 20 nukleotidů guaninu a cytosinu
LDPE	Nízkohustotní polyethylen
MM	Minerální médium
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PBAT	Polybutylen adipát-co-tereftalát
PBS	Polybutylen sukcinát
PBSA	Polybutylen sukcinát/adipát
PCL	Polykaprolaktan
PCR	Polymerázová řetězová reakce

---

PEA	Polyesteramid
PE	Polyethylen
PLA	Kyselina polyléčná
PBAT/PLA	Směs polybutylen adipát-co-tereftalát a kyselina polyléčná
PHBHHx	Polyhydroxybutyrát-co-hydroxyhexanoát
PVA	Polyvinyalkohol
®	Registrovaná ochranná značka
RPM	Otáčky za minutu
RNA	Ribonukleová kyselina
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
T	Thymin
TAE	Pufr Tris-acetát EDTA
$T_m$	Teplota tání
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamid
UV	Ultrafialové záření
XRD	Rentgenová difrakční analýza

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

obrázek	strana
č. 1 Růstová křivka bakterií	14
č. 2 Schéma biodegradace polymeru	19
č. 3 Strukturní vzorec PBAT	23
č. 4 Schéma posloupnosti molekulárně biologických metod	30
č. 5 Princip polymerázové řetězové reakce	32
č. 6 Inkubační vzorkovnice	46
č. 7 Kolonie s prosvětlenými zónami na kultivační půdě obsahující PBAT	47
č. 8 Křížový roztěr	47
č. 9 Nárůst mikroorganismů na tuhém živném médiu obsahující PBAT	56
č. 10 Bakteriální kultura izolovaná z půdy	58
č. 11 PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), TouchDown PCR	61
č. 12 PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), TouchDown PCR	61
č. 13 PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), TouchDown PCR	62
č. 14 PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), TouchDown PCR	63
č. 15 PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR	64
č. 16 PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR	65
č. 17 PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR	66
č. 18 18 PCR reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR	67
č. 19 PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR	68
č. 20 PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR	69
č. 21 PCR reakce s reakce s izolovanou DNA pomocí chloroform/izoamylalkohol (24:1), Klasická PCR	70
č. 22 Výsledek DGGE analýzy na polyakrylamidovém gelu	71
č. 23 Následná PCR reakce s DNA pro identifikaci mikroorganismů z půd 11, 20	72
č. 24 Výsledek DGG analýzy na polyakrylamidovém gelu	74

---

č. 25	Následná PCR reakce s DNA pro identifikaci mikroorganismů pro půdy 41, 25, 3, 12, 16, 28, 29, 35, 45, 53, 56	75
č. 26	Výsledek DGGE analýzy na polyakrylamidovém gelu	77
č. 27	Následná PCR reakce s DNA pro identifikaci mikroorganismů pro půdy 55, 43, 8, 7, 34, 1, 48, 32	78

**SEZNAM TABULEK**

tabulka	strana
č. 1 Přehled použitých primerů	39
č. 2 Složení reakčních směsí pro 20 $\mu$ l a 30 $\mu$ l	49
č. 3 Složení roztoku gelu	52
č. 4 Jednotky tvořící kolonie při přímé detekci degradérů	55
č. 5 Jednotky tvořící kolonie po pomnožení	57
č. 6 Výsledky identifikace mikroorganismů pro půdu č. 11	72
č. 7 Výsledky identifikace mikroorganismů pro půdu č. 20	73
č. 8 Výsledky identifikace mikroorganismů pro vzorky půd 41, 25, 3, 12, 16, 28, 29, 35, 45, 53, 56	76
č. 9 Výsledky identifikace mikroorganismů pro vzorek půdy 55	79
č. 10 Výsledky identifikace mikroorganismů pro vzorek půdy 43, 8, 7, 34, 48, 32	79

## **SEZNAM PŘÍLOH**

PŘÍLOHA P I: CHARAKTERISTIKA VZORKOVANÝCH PŮD

PŘÍLOHA P II: IDENTIFIKOVANÉ KULTURY KONSORCIÍ

## PŘÍLOHA P I: CHARAKTERISTIKA VZORKOVANÝCH PŮD

Na základě BPEJ- Bonitové půdně ekologické jednotky

Č. půdy	Genetický půdní představitel - Bonitová půdně ekologická jednotka ( BPEJ)
1	Fluvizem modální eubazické až mezobazické, fluvizemě kambické, koluvizemě modální
3	Fluvizem modální eubazické až mezobazické, fluvizemě kambické, koluvizemě modální
7	Fluvizem modální eubazické až mezobazické, fluvizemě kambické, koluvizemě modální
8	Luvizem modální, hnědozem luvická- včetně slabě oglejených variet
11	Pseudogleje modální, pseudogleje luvické, kambizemě oglejené
12	Fluvizemě oglejené
15	Fluvizemě oglejené
16	Hnědozemě luvické oglejené, luvizemě oglejené
20	Pelozemě modální, vyluhované a melanické, regozemě pelické, kambizemě pelické i pararendziny pelické
25	Fluvizemě pelické kambické eubazické až mezobazické
28	Hnědozemě luvické oglejené, kambizemě oglejené, luvizemě oglejené, rendziny kambické oglejené a pseudogleje modální
29	Hnědozemě luvické oglejené, luvizemě oglejené
32	Hnědozemě luvické, luvizemě oglejené, fluvizemě glejové, gleje modální
34	Fluvizemě glejové
35	Černozemě modální a černozemě pelické, hnědozemě, luvizemě, popřípadě i kambizemě luvické
38	Fluvizemě glejové
39	Černozemě modální a černozemě pelické, hnědozemě, luvizemě, popřípadě i kambizemě luvické



41	Luvizemě modální, hnědozemě luvické, včetně slabě oglejených
43	Luvizemě modální, hnědozemě luvické, včetně slabě oglejených
45	Černozemě modální a černozemě pelické, hnědozemě, luvizemě, popřípadě i kambizemě luvické
48	Luvizemě modální, hnědozemě luvické, včetně slabě oglejených
49	Luvizemě modální, hnědozemě luvické, včetně slabě oglejených
53	Kambizem oglejená, pararendzina kambická oglejená, pseudoglej modální
55	Fluvizemě modální eubazické až mezobazické, fluvizemě kambické, koluvizemě modální
56	Fluvizemě glejové

## PŘÍLOHA P II. IDENTIFIKOVANÉ KULTURY KONSORCIÍ

Půda č. 11

**Thermobispora bispora** Shoda sekvence - 91 %

ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGGAGCTGACGCAGGAC  
GTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGC  
CTGTCGCGTCTGCCGTGAAAGCCCGCGGCTTAACCGTGGGTCTGCGGTGGATA  
CGGGTGGGCTTGAGGCTGGTAGGGGCAAGTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA  
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGGGGCAAAGCGGCTTGAGGGGCCAG  
TTCTAAAGATGAACAAGAAAGCGTGGCGAACAACACGTTAATACCCTGGTAG  
TCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGCTTCCACGGTCCCGTGC  
CGTAGCTAACGCATAAGCGCCCCGC

**Thermoactinospora rubra, Thermobispora bispora** Shoda sekvence- 87 %

CTTACCCAGGCGGAGGGCATAATTAACGCGTTAGGGCTACCGCAAAGACAAG  
AAAGCCCCCATGCACGTAGAGCATCTCATGTTTCGTATAGCGCGTGGAACCAC  
CAGGGTATAATAATCGTGTTTCGCTCCCCCACGCTTTCGCTCATCAGAGTCAGA  
ACGGGCCAGCAAGCCGCGCTTCGCCACAGGTGTTCCCTCTCAGTTATATCTGCG  
AATTCACACGCTACACCAGGAAATCCACACGCCTCTACCACCCTCAACCCCA  
CCCGTATCCACAGCACACCCACGGTTAAGCCCCGGGCTTTC AAGGCAAACGCG  
ACAAGCCGCCTAAGAGCTCTTTACGCCAATAAATCCAGACAACGCTCGCCCC  
CTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAAGGAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGT  
ACACGTCACCTTTCGTCCCTGCCGAAAGGAGGTTTACA ACTCCAAAGGCCCTC  
ATCCACCTCACAGCGGCGTCACTGCGTCAGCTTCCCCCAGTGCNCAAGATTCC  
CCACTGCTGCCCC

Půda č. 20

**Thermobispora bispora** Shoda sekvence- 96 %

GCGSTMTCCATGCGGGGCGCTTATGCGTTAGCTACGGCACGGGAACCGTGGA  
AGCCCCACACCTAGCGCCCAACGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA  
TCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGAACTGGCCCAGCAAGC  
CGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAG  
GAATTCCACTTGCCCCCTACCAGCCTCAAGCCCACCCGTATCCACCGCAGACCC  
ACGGTTAAGCCGCGGGCTTTCACGGCAGACGCGACAGGCCGCCTACRAGCTCT  
TTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTYGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGC  
TGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACACGTACCTTCGTCCCTG  
CTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCCACACGGCGTCGCTGCG  
TCAGGCTTCCGCCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTGCCCCCCSGTAGRRAA

**Paenibacillus sp.** Shoda sekvence - 93 %

GCGGATGCTTACTGTGTTACTTCGGCACCAAGGATATCGAAACCCCTAACACC  
TAGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC  
CCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGGCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACT  
GGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCCC  
CTCTCCTGCACTCCAGTCGCCCAGTTTCCCGTGCGTACCGGGGTTGAGCCCCAG  
TCTTATACACGGGAATTAACGACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTC  
CGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCC  
GGGGCTTTCCTTCTCAGGTACCGTCACCATGTTTGCAGTTACTCAAACATGTGTT  
CTTCCCTGGCAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCCTCGCTCACGCGGCGT  
TGCTCCGACAGACTTGCGCCCATTGCGGAAGGTTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA  
GG

**Thermobacillus sp.** Shoda sekvence- 94 %

GGGAGCCCCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAACCCTGACGGAGGCT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATT  
GGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGCCGTTTAAGTCCTGTGTATAAGACCGGGGC  
TCAACCCTGGTTCGCATGGGAAACTGGGCGGCTGGAGTGCAGGAGAGGGGAAG  
CGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT  
GGCGAAGGCGGCTTCCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAG  
GTGTCAGGGGTTTTGACACCCTTGGTGCCGAAGTAACACAGTAAGCATCCCCG  
GGGGGAGTAGGGTTCGGAAAGAARAAACTCAGGGGCTTTTC

**Bacillus alveayuensis** Shoda sekvence- 88%

GCGGAGTGCTTACTGCGTTAGCTGCGGCACTAAGGGKGGGAACCCTCGACACY  
TAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCC  
CCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGGCCAGAAAGCCGCCTTCGCCAC  
TGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTC  
CCTCTCCTGCACTCAAGCCCCCAGTTTCCAATGCAAACCCGGGGTTAACCCGC  
GACATTTACCACGAACTAAACGGGCCGCGGCCACCGCTTTACCCCAAAAA  
TTCCGAACAACGCTYGCCCCCTACKAATTACCGCGGCGGGCAGGAATTTA  
SCCGGGCCTTCTTCTCCAGGACCCTCCAGGATCAGCCCTGTTCAAASCTTTTT  
GTTTCCCCGGGACAACAACTTTCAAACCAAAAAACTTCTTGCTCTCGCGCG  
GTGTCACCCATTTCGCATTTGCTCCCTTCGGAAAGAATCCYAAAG

Půda č. 55

**Thermobispora bispora** Shoda sekvence- 96 %

GGCGSGTMTCCCAGGCGGGGCGCTTATGCGTTAGCTACGGCACGGGAACCGTG  
GAAAGCCCCACACCTAGCGCCCAACGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATC  
TAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGAAGTGGCCCAGCA  
AGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACAC  
CAGGAATTCCACTTGCCCCCTACCAGCCTCAAGCCCACCCGTATCCACCGCAGA  
CCCACGGTTAAGCCGCGGGCTTTCACGGCAGACGCGACAGGCCGCCTACRAGC  
TCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTYGCGCCCTACGTATTACCGCGGCT  
GCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACACGTCACCTTCGTCCC  
TGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCCACACGGCGTCGCTG  
CGTCAGGCTTCCGCCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTGYCCCCCKAAA

**Aeribacillus sp.** Shoda sekvence- 99 %

CCAGGCGGAGTGCTTATGCGTTTGCTGCAGCACTAAAGGGTGGATACCCTCTA  
AACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTC  
GCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCCTTC  
GCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCC  
GCTCCCCTCTCCTGCACTCAAGTTCGCCAGTTTCCAATGGCCGCTCGCGGTTGA  
GCCGCGAGATTTACATCAGACTTAAGGAACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCC  
AATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGACCACG  
TAWTTAGCC

**Geobacillus sp.** Shoda sekvence- 99 %

TGAGCGTMTCCAGGCGGAGTGCTTATCGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGTGT  
GACCCCTCTAACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  
AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTGCAGGCCAGAGA  
GCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACG  
TGGAATTCCGCTCTCCTCTCCTGCACTCAAGTCCCCAGTTTCCAATGACCCTC  
CACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGRACCGCCTGCGCGCGC

TTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGC  
TGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCGTGAGGTACCGTCACCGCGCCGCCCTS  
TTCRAACGGCGCTCCTTCGTCCCTCACAACAGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTT  
CTTCGCTCACGCGGCGTCGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCC  
TACTGCTGCYTYCCCGTAGGAA