



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## BIODEGRADACE S VYUŽITÍM TERMOFILNÍCH MIKROORGANISMŮ

THERMOPHILIC MICROORGANISMS APPLICATION TO BIODEGRADATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. TAMARA VARMUŽOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0266/2008** Akademický rok: **2008/2009**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Bc. Tamara Varmužová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)  
Vedoucí diplomové práce: **Ing. Libor Babák, Ph.D.**  
Konzultanti diplomové práce: Ing. Jana Piechová

### Název diplomové práce:

Biodegradace s využitím termofilních mikroorganismů

### Zadání diplomové práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce
- 2) provedení několika kultivací termofilních bakterií
- 3) vyhodnocení biodegradačních parametrů a vybraných bioinženýrských charakteristik
- 4) diskuze nad výsledky

### Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Tamara Varmužová  
Student(ka)

-----  
Ing. Libor Babák, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Obsahem této diplomové práce je studium biodegradability modifikovaných polyuretanových fólií v syntetickém médiu s minerály a vitamíny na temperovaných třepačkách pomocí směsné termofilní aerobní bakteriální kultury rodů *Bacillus* a *Thermus*. Přídavkem biopolymerních plnidel (karboxymethyl celuloza, hydroxyethyl celuloza, acetylovaná celuloza, acetylovaný škrob a pšeničná bílkovina) se ve většině případech zvyšovala biodegradabilita fólií s plnidlem v porovnání s fólií bez plnidla (referenční).

Růst kultury nejvíce podporovaly fólie modifikované 10 % acetylovanou celulosou a 10 % karboxymethyl celulosou.

Při degradaci fólií docházelo nejdříve k abiotickému rozkladu fólie a následně k využití štěpných produktů bakteriálními kulturami.

## **ABSTRACT**

This thesis is focused on study of biodegradability of modified polyurethane elastomeric films in synthetic medium with minerals and vitamins on tempered shaker by mixed thermophilic aerobic bacterial culture *Bacillus* and *Thermus* genera. In most cases addition of all used fillers (carboxymethyl cellulose, hydroxyethyl cellulose, acetylated cellulose, acetylated starch and gluten) led to increased biodegradability of elastomeric films with modifying agent in comparison with elastomeric films without modifying agent (referential).

The growth of cultures was strongly increased in presence of elastomeric films modified by 10 % acetylated cellulose and 10 % carboxymethyl cellulose.

Elastomeric film biodegradation mechanism included probably two stages: abiotic destruction of elastomeric films and consequent utilization of degradation products by bacterial culture.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Termofilní bakterie, biodegradace, modifikované polyuretany

## **KEYWORDS**

Thermophilic bacteria, biodegradation, modified polyurethanes

VARMUŽOVÁ, T. *Biodegradace s využitím termofilních mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 89 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis diplomanta

*Poděkování: Děkuji vedoucímu mé diplomové práce Ing. Liboru Babákovi Ph.D., doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc a Ing. Stanislavu Obručovi za odborné vedení a všestrannou pomoc při realizaci této diplomové práce.*

# OBSAH

1. ÚVOD .....	8
2. TERMOFILNÍ MIKROORGANISMY .....	9
2.1 Charakteristika .....	9
2.1.1 Výskyt .....	9
2.1.2 Podskupiny termofilních mikroorganismů .....	11
2.1.3 Termofilní bakterie .....	12
2.1.3.1 Rod Bacillus .....	12
2.1.3.2 Rod Thermus .....	13
2.1.3.3 Rod Thermoactinomyces .....	13
2.1.4 Extrémně termofilní bakterie .....	13
2.2 Metabolické dráhy termofilních bakterií .....	14
3. MIKROORGANISMY A JEJICH PROSTŘEDÍ .....	19
3.1 Abiotické faktory .....	19
3.1.1 Vliv teploty .....	20
3.1.2 Adaptace termofilních organismů na vyšší teploty .....	21
3.1.3 Vliv pH prostředí .....	21
3.1.4 Voda a relativní vzdušná vlhkost .....	22
3.2 Biotické faktory .....	22
3.2.1 Vzájemné vztahy mikroorganismů .....	22
3.3 Mikroorganismy v odpadních vodách a biologických čistírnách .....	24
3.4 Vody povrchové a odpadní .....	25
3.4.1 Zdroje znečištění .....	25
3.5 Biologické čištění .....	25
3.5.1 Anaerobní rozklad .....	25
3.5.2 Aerobní rozklad .....	25
4. TERMOFILNÍ MIKROORGANISMY V PROCESECH ČIŠTĚNÍ .....	26
4.1 Historie a současnost termofilního čištění .....	26
4.2 Biologické termofilní aerobní čistící systémy .....	27
4.2.1 BETT proces .....	27
4.2.2 TAS proces .....	28
4.2.3 ALPHA-BIOTHERM proces .....	29
4.2.4 FUCHS ATAD proces .....	29
4.2.5 ATAD a AEROTHERM proces .....	30
4.2.5.1 Historie aerobní autotermní technologie .....	30
4.2.5.2 Princip technologie .....	31
4.2.5.3 Reaktor ATAD procesu .....	31
4.2.6 Výhody a nevýhody procesu .....	32
5. APLIKACE TERMOFILŮ V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU .....	33
5.1 Termofilní sýrařské kyselé kultury .....	33
5.2 Termofilní jogurtové kultury .....	34
5.3 Vznik a výroba kyseliny mléčné .....	36
6. BIODEGRADACE POLYURETANŮ .....	37
6.1 Polyuretany (PUR) .....	37
6.1.1 Použití .....	38
6.1.2 Vlastnosti .....	38
6.1.3 Plniva .....	38
6.2 Biodegradace .....	39
6.2.1 Základní pojmy .....	39

6.2.2 Podmínky .....	39
6.2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti polymeru ovlivňující biodegradabilitu .....	40
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	41
7.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje .....	41
7.1.1 Chemikálie .....	41
7.1.1.1 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů .....	41
7.1.1.2 Chemikálie pro stanovení CHSK .....	42
Oxidační roztok: .....	42
Katalyzátorový roztok: .....	42
7.1.1.3 Chemikálie pro stanovení redukcí cukrů .....	42
7.1.1.4 Chemikálie pro stanovení obsahu neutrálních sacharidů .....	43
7.1.1.5 Chemikálie pro stanovení celkových proteinů .....	43
7.1.2 Přístroje .....	43
7.1.3 Materiál .....	44
7.1.3.1 Použité kmeny bakterií a příprava kultivace .....	44
7.1.3.2 Testované PUR fólie .....	44
7.1.3.2.1 Příprava PUR fólií pro kultivaci na třepače .....	44
7.2 Kultivace .....	44
7.2.1 Biodegradace modifikovaných PUR fólií na třepače .....	44
7.2.2 Biodegradace modifikovaných PUR fólií při absenci C nebo N zdroje .....	45
7.2.2.1 Příprava kultury .....	45
7.2.2.2 Příprava PUR fólií .....	45
7.2.2.3 Kultivace a stanovení míry degradace .....	45
7.3 Bioinženýrské charakteristiky .....	45
7.3.1 Měrná růstová rychlost .....	45
7.3.2 Výtěžnostní koeficient .....	46
7.4 Analytické metody .....	47
7.4.1 Stanovení množství biomasy .....	47
7.4.1.1 Turbidimetrie .....	47
7.4.1.2 Gravimetrie .....	48
7.4.2 VIS spektrofotometrie .....	48
7.4.3 Stanovení CHSK .....	49
7.4.4 Analýza výluhu po třepání bez kultury (abioticky) .....	49
7.4.4.1 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise .....	49
7.4.4.2 Stanovení redukcí cukrů metodou Somogyi – Nelson .....	50
7.4.4.3 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou .....	50
7.4.5 Mikroskopování PUR fólií .....	51
8. VÝSLEDKY A DISKUSE .....	52
8.1 Kalibrace turbidimetrického stanovení biomasy .....	52
8.1.1 Glukosové médium .....	52
8.1.2 Laktosové médium .....	52
8.1.3 Médium s minerály a vitamíny .....	53
8.2 Výběr média pro biodegradační experimenty .....	53
Cílem tohoto experimentu bylo otestovat tři média používaná ke kultivaci termofilní kultury a vybrat médium, na kterém bude kultura vykazovat nejvhodnější růstové parametry pro dlouhodobé biodegradační experimenty .....	53
8.3 Optimalizace složení média s minerály a vitamíny .....	55
8.3.1 Kalibrace spektrofotometrického stanovení koncentrace biomasy .....	55
8.3.2 Optimalizace koncentrace zdroje uhlíku .....	56
8.3.3 Optimalizace koncentrace zdroje dusíku .....	57

8.4 Porovnání dvou šarží PUR fólií při biodegradaci v syntetickém médiu .....	58
Cílem krátkodobého degradačního experimentu bylo srovnat stejné PUR folie, které však byly připraveny přibližně s odstupem jednoho roku (dvě šarže) .....	58
8.5 Střednědobý biodegradační test PUR fólií v kompletním syntetickém médiu .....	59
8.5.1 První fáze biodegradačního testu (prvních 14 dní) .....	59
8.5.1.1 Kalibrace CHSK .....	60
8.5.1.2 Změna CHSK během biodegradace .....	61
8.5.1.3 Hmotnostní úbytky fólií .....	61
8.5.2 Druhá fáze biodegradačního testu (15. – 28. den).....	63
8.5.2.1 Změna CHSK během biodegradace .....	65
8.5.2.2 Hmotnostní úbytky fólií .....	65
8.5.2.3 Mikroskopická analýza .....	67
8.6 Biodegradační test modifikovaných PUR fólií při absenci zdroje C nebo N.....	69
8.6.1 Test využitelnost fólií jako jediného zdroje uhlíku .....	69
8.6.2 Test využitelnosti fólií jako jediného zdroje dusíku .....	70
8.7 Test využitelnosti samotného plnidla v syntetickém médiu jako zdroj uhlíku nebo dusíku .....	72
8.7.1 Plnidla v kompletním syntetickém médiu .....	72
8.7.2 Plnidla v syntetickém médiu bez glukosy .....	73
8.8 Testování lag fáze.....	74
8.8.1 Testování jednotlivých komponent PUR fólií jako možných původců protažené lag fáze .....	74
8.8.2 Testování kombinací komponent PUR fólií jako možných původců protažené lag fáze u termofilní kultury v syntetickém médiu s minerály a vitamíny.....	75
8.8.3 Studium mechanismu účinku fólie na délku lag fáze termofilní kultury .....	76
8.9 Abiotická degradace PUR fólií a analýza degradačních produktů.....	77
8.9.1 Hmotnostní úbytek polysacharidů (podle Duboise).....	78
8.9.2 Hmotnostní úbytek redukujících cukrů (podle Somogyiho – Nelsona).....	80
8.9.3 Stanovení proteinů uvolněných z modifikované fólie (metodou dle Hartree – Lowryho).....	81
9. ZÁVĚR.....	84
10. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	85

## 1. ÚVOD

Termofilní mikroorganismy jsou jednou z mnoha zajímavých skupin mikroorganismů, které jsou schopné obývat i prostředí, kde je přirozeně zvýšená teplota, často až na extrémní úroveň. Skupina termofilních mikroorganismů je zajímavá z hlediska obecně biologického z toho důvodu, že většina jich žije a aktivně se rozmnožuje při teplotách, které jinak působí ničivě na běžné mesofilní organismy.

Aplikace termofilních mikroorganismů v oblasti ekologie, kde se využívají při zpracování znečištěných odpadů a k likvidaci vedlejších produktů, v posledních letech značně stoupá.

Při zpracování odpadů se jedná z technologického hlediska zejména o odstranění, nebo alespoň o maximální snížení obsahu organických látek (vyjadřují se jako BSK nebo CHSK), fosforu nebo látek dusíkatých [2, 19].

Jednou z možností jak zabránit dalšímu hromadění odpadu je syntéza a následná biodegradace biodegradovatelných polymerů.

Biodegradace polymerních materiálů je přirozený jev. Dochází při něm k narušení struktury makromolekul působením mikroorganismů či prostředí, nejčastěji však obou faktorů současně. Problematická je však biodegradovatelnost syntetických polymerů. Často se jedná o materiály vůči biodegradaci rezistentní a je tedy nutné je určitým způsobem upravit. Jednou z možností je kopolymerace s přírodním polymerem, případně modifikovaným přírodním polymerem (deriváty celulózy, modifikované škroby atd.), které jsou relativně biodegradovatelné a tuto vlastnost pak předají i samotnému kopolymeru.

Studiu biodegradovatelnosti biodegradovatelných polymerů je třeba věnovat ještě mnoho úsilí, protože je to jedna z cest, jak chránit naše životní prostředí před tvorbou dalšího těžko zpracovatelného odpadu [48].

## 2. TERMOFILNÍ MIKROORGANISMY

### 2.1 Charakteristika

Termofilní mikroorganismy jsou mikroorganismy, které mají optimální teplotu růstu 45 °C nebo vyšší; pro růst většiny z nich je optimální teplota 50 až 60 °C, někdy i vyšší. Některé mohou růst výjimečně i při teplotě až 80 °C (např. jisté kmeny druhu *Bacillus stearothermophilus*). Řada termofilních mikroorganismů se nerozmnožuje při teplotách 28 až 30 °C, dokonce ani při teplotách nižších než 40 °C, kdežto jiné se při teplotách kolem 30 °C rozmnožují ještě zjistitelnou rychlostí [1].

Skupina termofilních mikroorganismů je zajímavá z hlediska obecně biologického z toho důvodu, že většina jich žije a aktivně se rozmnožuje při teplotách, které jinak působí ničivě na běžné mesofilní organismy. Většina termofilů vznikla z mesofilních organismů, což potvrzuje skutečnost, že z kultur mesofilů je možno získat uměle při postupně zvyšovaných teplotách buňky termofilní, resp. termotolerantní. Vznik podobných teplomilných ras probíhá i v přírodě, a proto u bakterií a aktinomycet byly zjištěny paralelní buňky mesofilní a termofilní [2].

Vyznačují se mimořádně vysokou metabolickou aktivitou a rychlostí růstu za optimální teploty; vysoká metabolická aktivita při těchto teplotách je výsledkem odlišného složení bílkovinných složek jejich enzymů, neboť optimální teplota většiny izolovaných enzymů se pohybuje v rozmezí optimálních teplot pro růst. Některé enzymy termofilních bakterií jsou však u celých buněk aktivnější při vyšších teplotách než při extrakci z rozdrcených buněk, což svědčí o ochranných účincích některých složek buňky vůči vysokým teplotám [1].

Termofilní bakterie mají své zástupce ve většině známých rodů, např. mezi rody *Bacillus* (např. *B. stearothermophilus*), *Clostridium* (*C. thermosaccharolyticum*), *Lactobacillus* (*L. delbrueckii subsp. delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*), mezi aktinomycetami (např. rody *Thermoactinomyces* a *Thermomonospora*) i v některých jiných rodech [1].

Termofilní mikroorganismy mají značný význam v potravinářském průmyslu. Tak zvaná zbytková mikroflóra konzerv tepelně sterilovaných jsou v podstatě termofily, které působí zkázu konzerv při nevhodném uložení [2].

#### 2.1.1 Výskyt

Termofilní mikroorganismy mají nároky na vysoké teploty, a proto ke svému růstu vyžadují termální prostředí.

Termální prostředí může v přírodě vznikat čtyřmi způsoby:

- Solárním ohřevem
- Spalovacími procesy
- Radioaktivním rozpadem
- Geotermální aktivitou

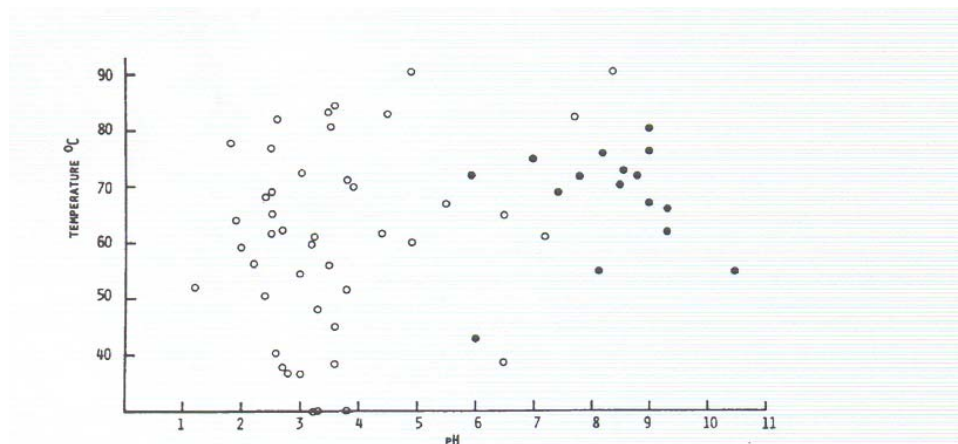
Solární ohřev půdy je možný do teplot okolo 60 °C, zejména v pouštních oblastech. K výraznějšímu zvýšení teploty ve vodném prostředí dochází pouze v mělkých vodách nebo ve vodách s neobvyklou hustotou. V mělkých mořských zátokách mohou být teploty i vyšší než 40 °C.

Spalovacími procesy se tvoří v přírodě největší množství tepla. Mohou být vyvolány procesy biologickými i nebiologickými. Tepelná energie může vznikat činností mikroorganismů, např. při kompostování organických odpadů, kde může teplota dosahovat 70 °C i více.

Nejpočetnější skupinu termálních prostředí tvoří geotermální aktivita. V aktivních vulkánech je však teplota pro život organismů příliš vysoká (nad 1000 °C), ale horké prameny, které souvisí se sopečnou činností, mají vhodné teplotní podmínky pro život termofilních mikroorganismů. Teplota těchto pramenů se pohybuje od 30 °C až po bod varu (90 – 100°C) v závislosti na nadmořské výšce). Nejvýznamnějšími oblastmi výskytu horkých pramenů jsou Yellowstone National Park, Island, Nový Zéland a Rusko [3].

V Yellowstone byly testovány čtyři termální oblasti: Mud Vulcano a Norris Geyser Basin téměř výhradně kyselé oblasti, White Creek (Lower Geyser Basin) a Potts Hot Spring Basin (West Thumb) obsahovali většinou neutrální až alkalické prameny. Bylo testováno asi 65 horkých pramenů a odpadních kanálů, pH a teplotní profily byly dány do grafu [22].

*Graf 1: Teplotní a pH profil. Jsou zde znázorněny vzorky, ze kterých byl *Thermus sp.* izolován (plně kolečko) a nemohl být izolován (prázdné kolečko) [22].*



Termofilní mikroorganismy se vyskytují v půdě, v kompostech, v chlévské mrvě, v uskladněném vlhkém materiálu (rašelině, seně, obilí), v bahně, tj. všude tam, kde činnost mesofilních mikroorganismů přispěla ke zvýšení teploty na 40 až 45 °C. Při této teplotě začíná intenzivní činnost termofilů, jež vede k dalšímu zvyšování teploty a někdy i k samovznícení (např. u sena, rašeliny nebo obilí). Samovznícení je způsobeno tvorbou lehce zápalných zplodin metabolismu termofilních bakterií [1].

Tab. 1: Termofilní mikroorganismy a jejich využití v potravinářství [2].

Organismus	Ekonomický význam	Tvorba spor	Optimální teplota růstu °C	Tepelné rozmezí růstu °C	Požadavek na kyslík
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Přežívá pasteraci mléka; účastní se zrání tvrdých sýrů	0	50	25 – 60	fakultativně anaerobní
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	součást mikroflóry jogurtu; využit pro výrobu kyseliny mléčné	0	50	25 – 60	„
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	přežívá pasteraci mléka	0	55	30 – 65	„
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	využit pro výrobu kyseliny mléčné	0	45	?	„
<i>Bacillus calidolactis</i>	sráží mléko při vyšších teplotách	+	55 – 65	45 – 75	„
<i>Bacillus thermoacidurans</i>	původce plynuprostého kvašení konzerv	+	55	?	„
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	původce plynuprostého kvašení konzerv	+	50	45 – 76	„
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	Původce bombáží konzerv	+	55 – 61,7	43 – 71	anaerobní
<i>Clostridium nigrificans</i>	původce sulfidického kažení konzerv	+	55	? - 70	„

### 2.1.2 Podskupiny termofilních mikroorganismů

Podskupiny termofilních mikroorganismů se dají rozdělit do 4 podskupin: [4].

- **Termotolerantní** organismy mají teplotní maximum 60-70 °C, optimum 35-45 °C a minimum 5-10 °C. Tato skupina se může pomnožovat jak při 30 °C tak při 60 °C, s téměř stejnou rychlostí. Jsou velmi rozšířeny v přírodě a mnohé organismy, popsané jako typické termofily, patří podle své životní činnosti k termotolerantním mikrobům [2, 4].
- **Eurytermické** termofilní organismy mají teplotní maximum 70-75 °C, optimum 50- 65 °C a při teplotách kolem 30 °C i při nižších se rozmnožují pomalu, v přírodě jsou velmi rozšířeny [4].

- **Stenotermické** termofilní mikroorganismy mají teplotní maximum 75-80 °C, optimum 50-65 °C a při teplotách kolem 30 °C se nerozmnožují, v přírodě jsou poměrně vzácné [4].
- **Hypertermofilní** mikroorganismy mají maximum 105-113 °C (není ale vyloučen objev organismů s ještě vyšší termotolerancí), optimum 80-95 °C a minimum 70-80 °C.

Uvedené rozdělení termofilů podle tepelných nároků má význam hlavně při popisu vlastností čistých kultur, kdežto při stanovení počtu termofilů v různém materiálu se zahrnují do společné skupiny teplomilných organismů, pěstovaných obvykle při 55 °C, jak termofilní, tak i termotolerantní druhy [2].

### 2.1.3 Termofilní bakterie

Termofilní bakterie, zvláště sporotvorné, mohou působit nežádoucí změny potravin zpracovávaných vyšší teplotou, kterou přetrvávají; jde o zástupce rodu *Bacillus* a *Clostridium* podmiňujících plynuprosté kvašení, bombáže i sulfidické kažení konzerv. Z nesporotvorných termofilů se využívá prospěšné činnosti *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* [2].

#### 2.1.3.1 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* je rozsáhlý a v přírodě velmi rozšířený, rod grampozitivních aerobních tyčinkovitých bakterií z čeledi *Bacillaceae*. Jsou převážně pohyblivé, mají schopnost vytvářet vysoce termorezistentní spory (endospory). *Bacillus* se vyskytuje v povrchových vrstvách půdy a ve vodě, několik druhů parazituje v hmyzích larvách, například *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus anthracis* působí onemocnění zvířat a lidí, antrax. Další zástupci: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* [5].

Jeho druhy mají v celku bohaté enzymové vybavení, takže mohou rozkládat nejrůznější organické sloučeniny. Většina druhů má velmi aktivní amylolytické enzymy, které štěpí škrob, řada druhů má pektolytické enzymy, které štěpí rostlinné pektiny, a většina druhů má velmi aktivní proteolytické enzymy, takže se uplatňuje při aerobním a anaerobním rozkladu bílkovin. Řada druhů produkuje antibiotika polypeptidové povahy, z nichž některá se pomocí těchto bakterií vyrábějí průmyslově (např. bacitracin). Některé druhy tvoří současně několik polypeptidových antibiotik. Jiné druhy tvoří pouzdra polysacharidové povahy, které způsobují nežádoucí nitkovitost pečiva a pšeničného chleba. Určité druhy slouží pro průmyslovou přípravu enzymů. Bakteriální amylasy získané z *Bacillus subtilis* se uplatňují v pivovarství a v textilním průmyslu [5].

Enzymové vybavení termofilních zástupců rodu *Bacillus* [13]:

- Thermolysin – neutrální proteasa, produkovaná bakterií *Bacillus stearothermophilus* a schopná udržet si 86 % své aktivity při 70 °C po dobu 30 hodin [6, 13].
- $\alpha$ -amylasa – k produkci dochází v exponenciální fázi růstu. Při 40 °C dochází k hromadění enzymu v buňce. Maximální koncentrace extracelulárního enzymu byla nalezena při 50 – 55 °C.
- Pullulanasa – schopna štěpit  $\alpha$ -1,6-glukosidasovou vazbu v pullulanu za vzniku maltotriosy.

- $\alpha$ -glukosidasa – hydrolyzuje  $\alpha$ -1,4 nebo  $\alpha$ -1,6 vazby v krátkých řetězcích sacharidů.
- Xylanasa – endoenzym, který štěpí  $\beta$ -1,4-glykosylovou vazbu v xylanu a celulose. Produktem hydrolyzy xylanu je xylobiosa, xylotriosa a xylosa. Hydrolyzou celulosy vzniká cellobiosa a další oligosacharidy.
- Lipasa – optimální teplota je 75 °C při pH = 5
- Glukosa-isomerasa – tvoří ji *B. coagulans* při kultivacích limitovaných kyslíkem na médiu, které obsahuje glukosu a soli minerálních kyselin při teplotě 50 °C [13].

### 2.1.3.2 Rod *Thermus*

Zástupci **rodu *Thermus*** jsou popisováni jako termofilní, gramnegativní, aerobní, žlutě zbarvení heterotrofové s optimální teplotou růstu okolo 70 °C a s pH optimem 7-8.

*Thermus aquaticus* byl jako první izolován z horkého pramene v Yellowstonském Národním Parku. Od této první izolace byli představitelé rodu *Thermus* izolováni také z dalších lokalit, například z horkých pramenů v Japonsku, USSR, Islandu nebo Nového Zélandu.

Předchozí práce byla soustředěna na biochemické a fyziologické aspekty zástupců rodu *Thermus*, ale byla objasněna i genetika tohoto rodu [7].

### 2.1.3.3 Rod *Thermoactinomyces*

Rod, který tvoří kulovité spory vznikající jednotlivě na vzdušných i substrátových hyfách, které jsou jednoduché nebo větvené. Optimální teplota růstu je 50 – 55 °C. Při této teplotě má vysokou enzymovou aktivitu a jeho enzymy (lipáza, proteáza a amyláza) jsou technologicky zajímavé. Je rozšířený v přírodě, hlavní mikroflóru kompostů, mokrého sena, vlhkého obilí a jiných rozkládajících se organických materiálů. Metabolická činnost příslušníků tohoto rodu může vést k samovznícení sena, slámy apod. Je silným alergenem projevujícím se nejčastěji dýchacími potížemi a dá se nalézt také na filtrech klimatizačního zařízení [7].

### 2.1.4 Extrémně termofilní bakterie

Některé extrémní termofily z archaeobakterií metabolizující síru (*Desulfurococcus*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus*, *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Thermoproteus*) rostou i při teplotách nad 100 °C. Mezi archaeobakterie náležejí také gramnegativní obligátně termofilní bakterie, z nichž většina redukuje elementární síru v H<sub>2</sub>S. Zahrnují aeroby, fakultativní anaeroby i přísné anaeroby. Většina druhů má optimální teplotu růstu mezi 70 až 100 °C.

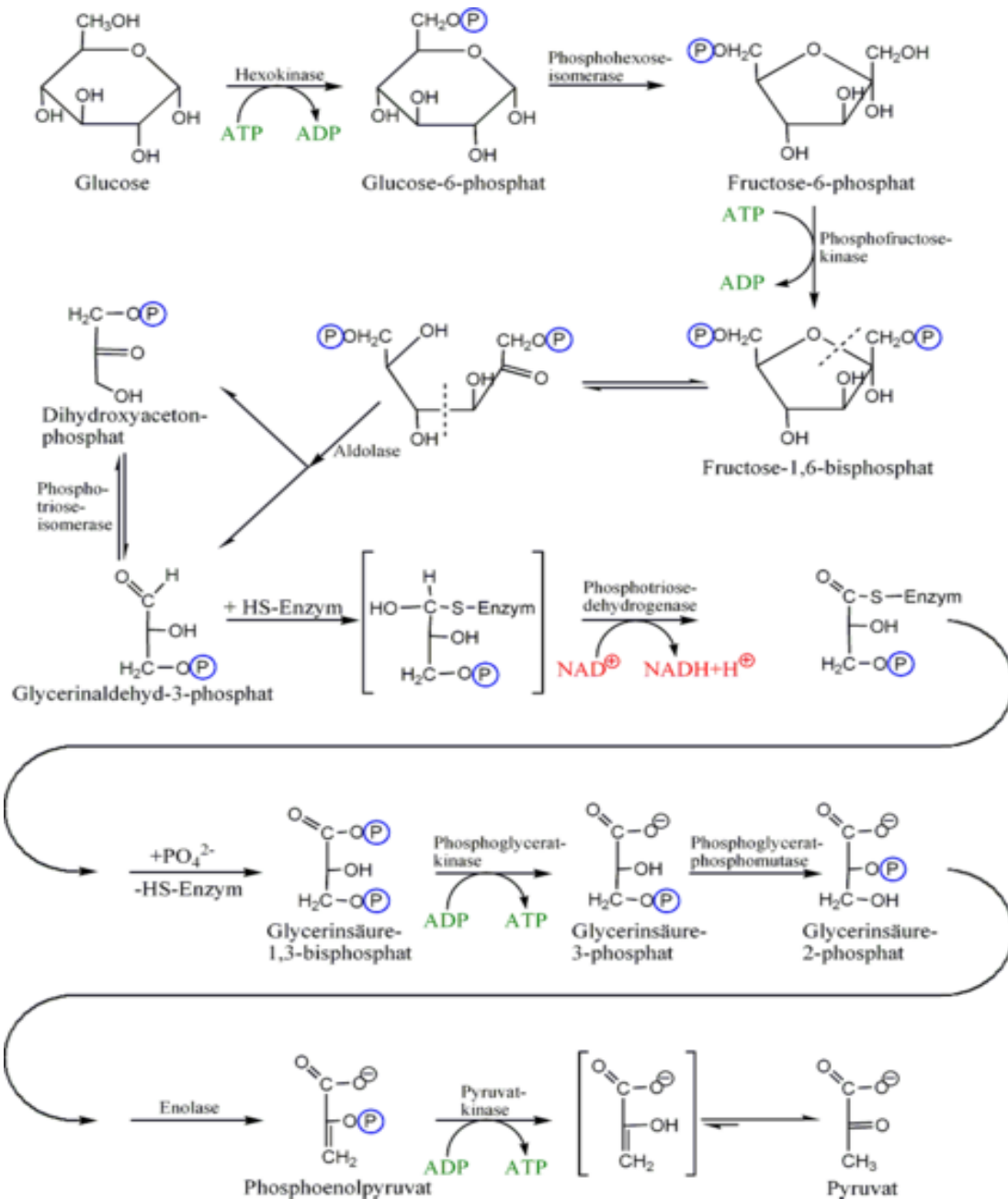
Rody anaerobních řádů byly nalezeny v jícnech nebo v okolí činných sopek a v horkých sirných pramenech.

Od extrémních termofilů se v mnoha ohledech odlišuje rod *Thermoplasma*, který je pokládán za zástupce samostatné skupiny archaeobakterií. Jeho hlavním znakem je nepřítomnost buněčné stěny. Jeho buňky mají na svém povrchu silnou trojvrstevnou membránu, obsahující čtyřicetihlíkaté isoprenoidně větvené diglyceroltetraethery. Vyžaduje pH 1-2 a optimální teplota růstu je 55-59 °C. V prostředí o pH kolem 7,0 buňky lyzují [1,8].

## 2.2 Metabolické dráhy termofilních bakterií

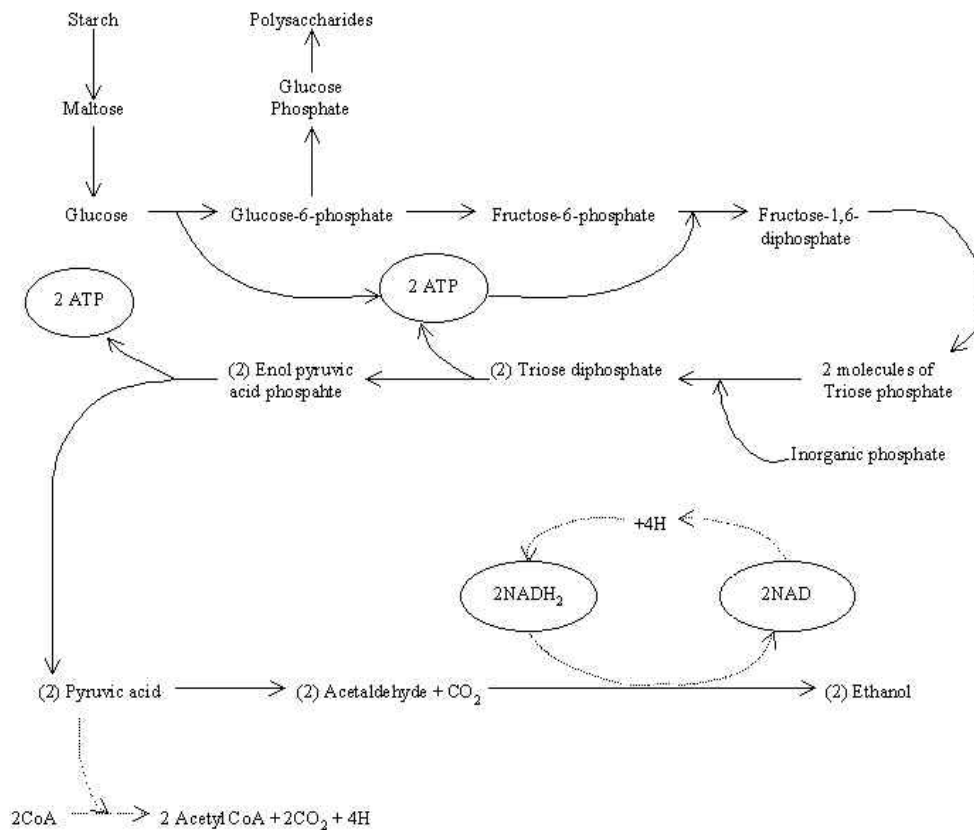
Základní metabolické rysy termofilů jsou kompletní cyklus tricarboxylových kyselin včetně glyoxylátového cyklu, taktéž kompletní Embden - Meyerhoffova dráha u většiny druhů a často modifikovaný dýchací řetězec.

Základním anaerobním katabolickým procesem sacharolytických mikroorganismů je tzv. **glykolýza**. Spočívá v přeměně hexos a její úsek k pyruvátu, v němž je jeden dehydrogenační stupeň, je společný většině živých organismů. Další zpracování pyruvátu je odlišné u aerobního a anaerobního metabolismu [1].



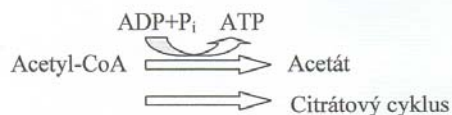
Obr. 1: Schéma glykolýzy [9].

Glykolýza je biochemický proces, který je zprostředkován skrz Embden-Meyerhoffovy dráhy.

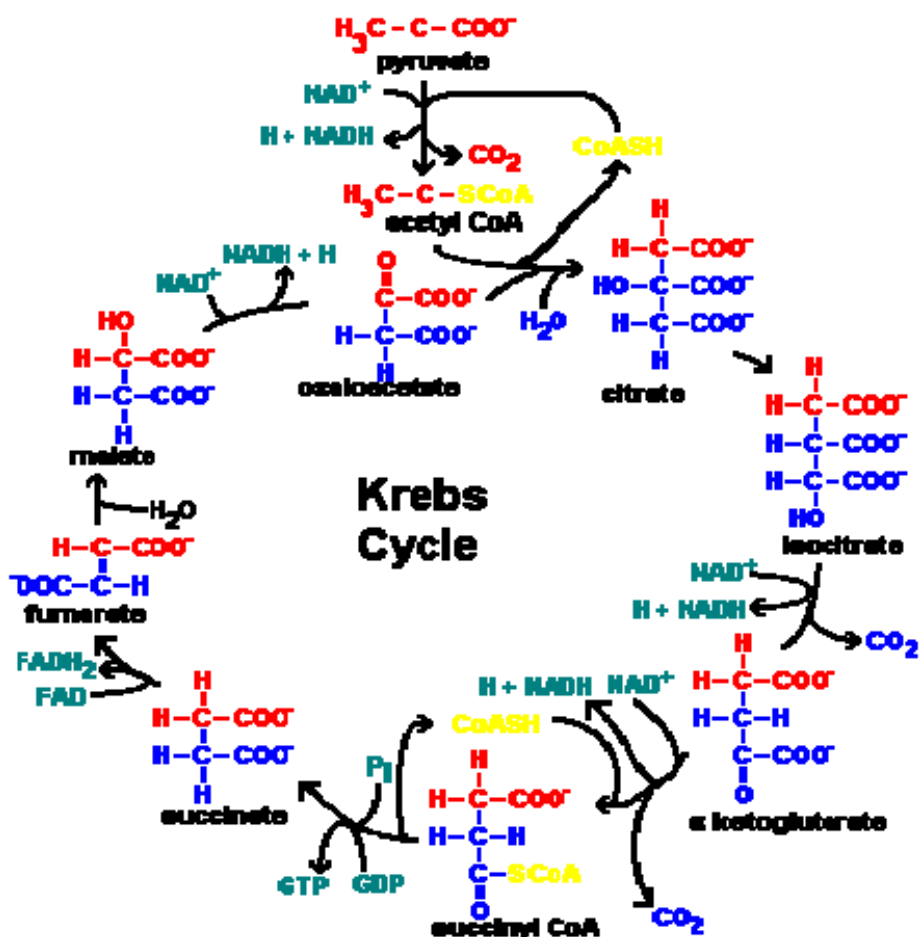


Obr. 2: Schéma Embden-Meyerhoffovy dráhy [9].

Nejdůležitějším aerobním katabolickým procesem mikroorganismů je **citrátový cyklus** neboli **cyklus trikarboxylových kyselin**. Do tohoto cyklu vstupuje acetylkoenzym A a acetyl je v něm postupně oxidován až na oxid uhličitý za redukce celkem čtyř molekul kofaktorů. Redukované kofaktory jsou pak oxidovány **dýchacím řetězcem** za vzniku ATP, takže se při oxidaci jedné molekuly acetylů a oxidační regeneraci kofaktorů získá až dvanáct molekul ATP. Důležitým zdrojem acetylů pro citrátový cyklus je pyruvát vytvořený glykolýzou z hexosy. Pyruvát je oxidačně dekarboxylován (za součinnosti komplexu enzymů, obsahujícího také  $\text{NAD}^+$ ) a převáděn v acetylkoenzym A, který pak vstupuje do citrátového cyklu [1].



Obr. 3: Metabolismus acetylkoenzym A u termofilních bakterií [10].



Obr. 4: Schéma citrátového cyklu [9].

Při anaerobním metabolismu se pyruvát redukuje na různé fermentační produkty (např. ethanol, kyselina mléčná aj.) za současné reoxidace  $\text{NADH} + \text{H}^+$  [1].

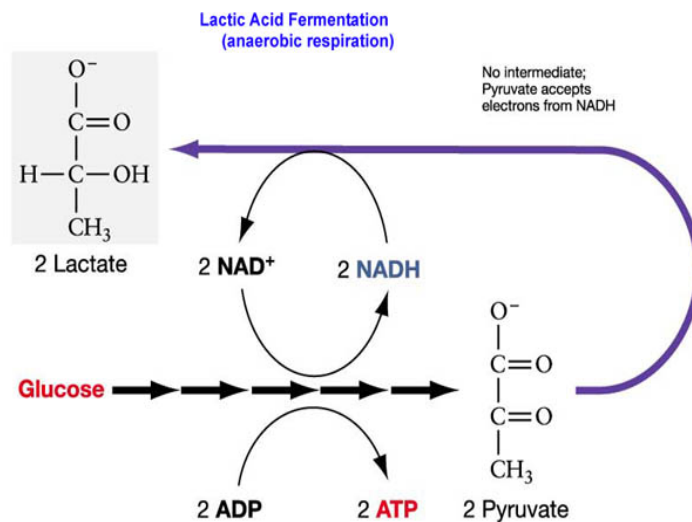
Níže jsou uvedeny hlavní typy průmyslových fermentací. Fermentace vycházející z glykolýzy jsou rozděleny podle konečných akceptorů vodíku.

Mléčná fermentace:

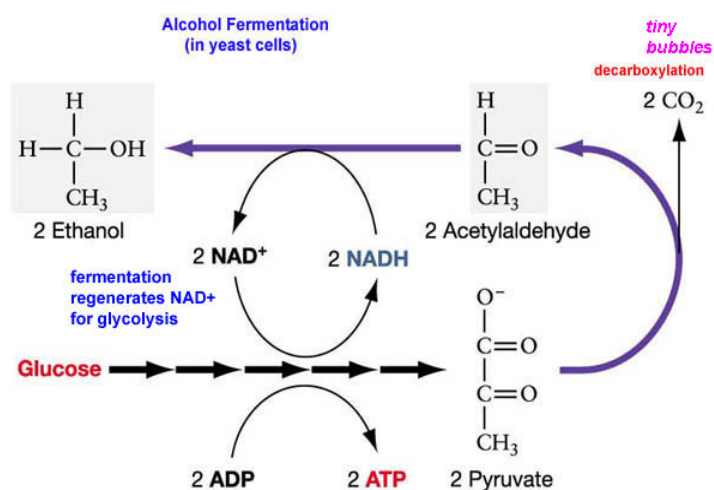
Nejjednodušším řešením problému nalezení vhodného akceptoru pro odstranění vodíkových atomů, odebraných na cestě od glukózy k pyruvátu, je tvorba laktátu, protože akceptorem je sám pyruvát.

Přeměnu pyruvátu na laktát realizuje enzym **laktátdehydrogenasa**. Laktát je asi nejběžnějším produktem fermentace cukrů a vzniká při většině kvasných procesů používaných v mlékárenském průmyslu. Mléčnou fermentaci provádí početná, morfologicky heterogenní skupina mikrobů, zvaných **mléčné bakterie** (laktobacily, *Lactobacteriaceae*), s komplexními nároky na výživu. Jsou to přísné fermentující organismy a jeho zástupci jsou například *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Pediococcus acidilactici*. Jako další fermentace vycházející z glykolýzy je **etanolová**, kdy dochází v prvním kroku k dekarboxylaci pyruvátu na acetaldehyd a  $\text{CO}_2$  a v kroku druhém k redukcii acetaldehydu na etanol.

Kondenzací dvou molekul acetyl-CoA, které se vytvořily ze dvou molekul pyruvátu za odštěpení  $H_2$  a  $CO_2$ , může vzniknout acetoacetyl-CoA, který se může dekarboxylovat na aceton a ten se může stát akceptorem atomů vodíku a redukovat se na isopropanol (*Clostridium butylicum*). Paralelní možnost, které dávají přednost jiné druhy rodu *Clostridium*, je tvorba **butyrátu** (tzv. **máselné kvašení**) použitím stejného sledu, jaký užívají živočišné buňky při syntéze mastných kyselin. Butyrát může být konečným produktem fermentace nebo může v případě potřeby posloužit za akceptor vodíku a redukovat se na butanol [1].

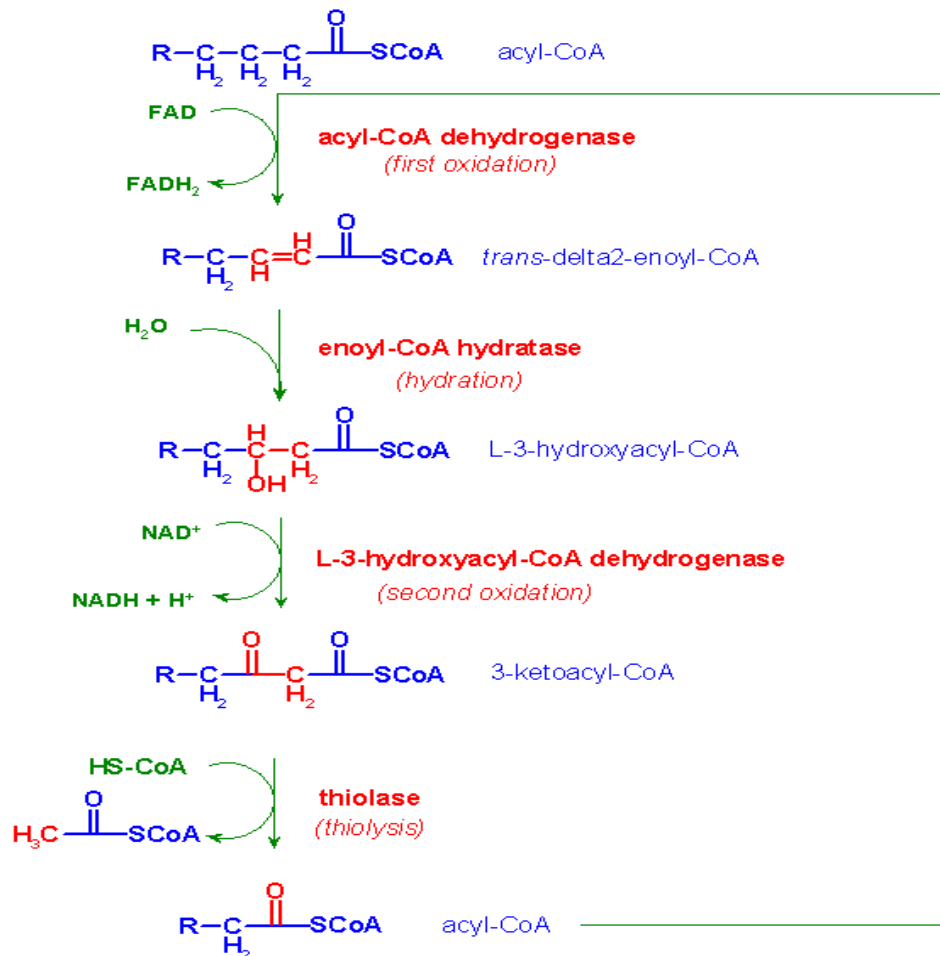


Obr. 5: Schéma mléčného kvašení [9].



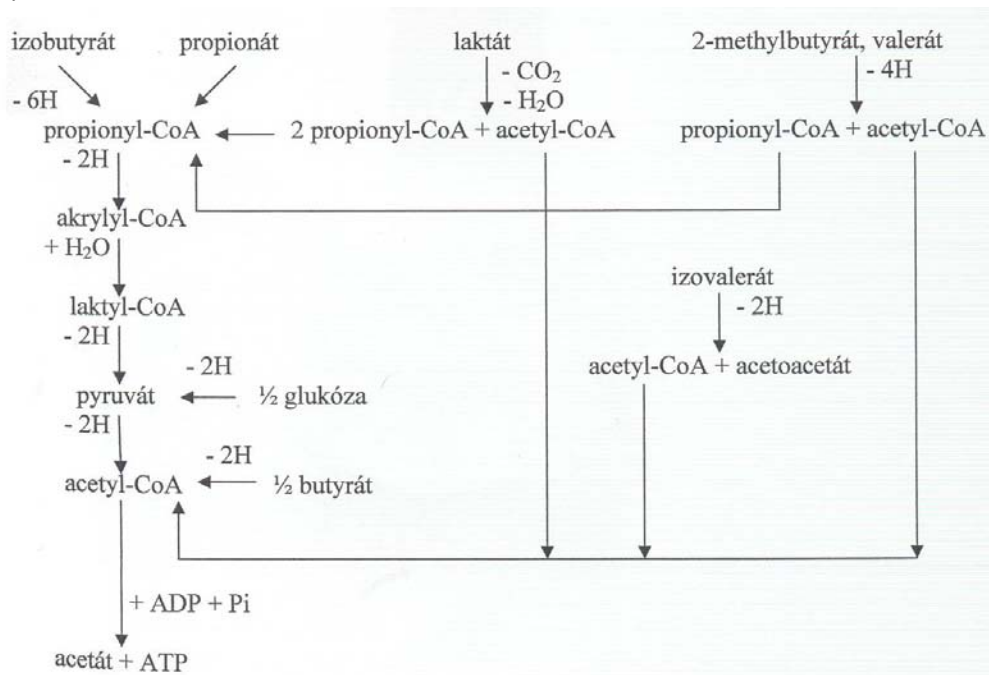
Obr. 6: Schéma alkoholového kvašení [9].

Jestliže byly spotřebovány sacharidy prostředí, mohou být využity další organické sloučeniny, především produkty glykolýzy, nižší mastné kyseliny apod. U většiny mikroorganismů je možno tyto sloučeniny využít pouze aerobním metabolismem. Některé mikroorganismy tvoří extracelulární enzym lipasu, která odštěpuje mastné kyseliny z lipidů. Tyto mastné kyseliny jsou pak aerobním způsobem postupně oxidovány tak, že vzniká acetylkoenzym A a kyselina o dva uhlíky kratší, až se zoxiduje celá kyselina se sudým počtem uhlíků. Tento proces se nazývá  **$\beta$ -oxidace mastných kyselin** a je velkým zdrojem pro mikrobiální buňku [1].



Obr. 7: Schéma  $\beta$ -oxidace mastných kyselin [9].

U termofilních mikroorganismů je také zajímavý metabolismus a transformace organických kyselin.



Obr. 8: Schéma metabolismu nižších organických kyselin u aerobních termofilních bakterií [10].

### 3. MIKROORGANISMY A JEJICH PROSTŘEDÍ

Okolní životní prostředí, které je charakterizované fyzikálními a chemickými parametry, se označuje jako **abiotická složka** (tj. neživá) prostředí. Složka, kterou představují samotné organismy, se nazývá **biotická** (tj. živá). Abiotická a biotická složka tvoří **ekosystém**, který je základní samostatnou existencí a schopnou jednotkou života biosféry. Tok energie zde vede k jasně definované struktuře, biotické rozmanitosti a koloběhu látek uvnitř této soustavy. Ekosystém je do jisté míry na okolí nezávislý, živiny jsou součástí těl mikroorganismů a zpětně mohou být i využívány. Výskyt mikroorganismů na lokalitě je tedy do jisté míry dán fyzikálními a chemickými faktory prostředí, významně se projevuje i vliv ostatních mikroorganismů, které mohou mít pozitivní či negativní vliv na osídlení biotopu (tj. životního prostoru) jiným mikroorganismem. Živé organismy jsou vysoce uspořádané systémy, které pokud nedostanou energii z prostředí, tak hynou a ztrácí uspořádanost [11].

#### 3.1 Abiotické faktory

Na mikroorganismy působí mnohé fyzikální i chemické faktory vnějšího prostředí, vůči kterým mohou být více či méně odolné (rezistentní druhy) [11].

### 3.1.1 Vliv teploty

Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů i možnost jejich života. U každého mikroorganismu rozeznáváme tři základní body teploty: **minimální teplotu**, tj. nejnižší teplotu, při níž se daný druh rozmnožuje ještě zjistitelnou rychlostí, **optimální teplotu**, při níž se rozmnožuje největší rychlostí, a **maximální teplotu**, tj. nejvyšší teplotu, při které je schopen se ještě rozmnožovat. Stanovení minimální teploty je poměrně obtížné, neboť s klesající teplotou klesá postupně i rychlost rozmnožování. Teplotní mez úplného zastavení růstu je proto zjistitelná velmi obtížně. Zatímco optimální teplota je obvykle asi o 30 °C vyšší než teplota minimální, převyšuje maximální teplota pouze o 5 až 10 °C optimální teplotu určitého mikroorganismu. To znamená, že při zvýšení teploty nad optimální teplotu dochází k prudkému poklesu rychlosti rozmnožování a nakonec k jeho zastavení. Další zvýšení teploty pak vede dokonce k usmrcení buněk. Prudký pokles růstu při vyšších teplotách je způsoben denaturací určitých enzymů, jež jsou pro růst nezbytné. Tato denaturace je zprvu reverzibilní, avšak při vyšších teplotách se stává ireverzibilní a vede k usmrcení buňky.

Krátkodobé zvýšení teploty nad maximální teplotu vyvolává **teplotní šok**, který vede k různým výkyvům metabolismu. Přitom se syntetizují tzv. teplotně šokové proteiny (angl. heat shock proteins, HSP), které náleží mezi tzv. stresové proteiny. Těmito proteiny se rozeznávají anomální proteiny tvořené při stresu a zajišťuje se jejich rychlé odbourávání.

Optimální teplota pro rozmnožování se nemusí vždy shodovat s optimální teplotou pro ostatní životní procesy buňky.

Je zajímavé, že maxima celkového výtěžku buněčné hmoty je dosaženo obvykle při teplotách podstatně nižších, než jsou teploty optimální pro rychlost růstu.

Minimální teplota růstu je určena tím enzymem, jehož aktivita je nejcitlivější k nízkým teplotám. V teplotním rozmezí mezi minimální a optimální teplotou se zvyšuje se stoupající teplotou rychlost všech procesů v buňce, a tedy i rychlost rozmnožování. Při teplotách blízkých se optimální teplotě se již začíná uplatňovat vliv denaturačních procesů na některé enzymy. Při maximální teplotě růstu je teplotní destrukce bílkovin tak velká, že růst přestává.

Teploty nižší než minimální teplota růstu přežívá většina mikroorganismů poměrně dlouhou dobu. Jestliže se však intenzivně se rozmnožující buňky (tj. buňky v exponenciální fázi růstu) některých druhů bakterií přenesou z optimální teploty na teploty blízké 0 °C, dochází k tzv. chladovému šoku, který se projevuje ztrátou životnosti velkého podílu populace. Chladový šok byl pozorován u gramnegativních bakterií, u grampozitivních spirálujících bakterií a dokonce i u psychofilů. Citlivost různých druhů bakterií k chladovému šoku je však odlišná. Termofilní *Bacillus stearothermophilus* patří k nejcitlivějším druhům, neboť při přenosu jeho rostoucích buněk z optimální teploty na 20 °C se již po krátké době ztrácí jejich životnost.

Základní teplotní body určitého mikroorganismu lze měnit, změníme-li jeho genetický materiál. Tak byly působením mutagenních prostředků získány mutanty senzitivní k teplotě (tzv. **ts-mutanty**), které mají výrazně sníženou maximální, případně i optimální teplotu. Tyto mutanty mají některý nezbytný enzym mnohem termolabilnější, než mají nezmutované kmeny [1].

### 3.1.2 Adaptace termofilních organismů na vyšší teploty

Extrémní teploty působí na mikroorganismy několika způsoby. Nejvíce jsou ovlivněné bílkoviny, vysoké teploty způsobí jejich denaturaci, při nízkých teplotách se naopak bílkoviny stávají rigidními („ztuhými“). Další vliv má teplota na membrány. Aby membrána plnila správně svoji biologickou funkci, musí být přiměřeně nepropustná a zároveň přiměřeně fluidní. Při vyšších teplotách dochází ke zvýšení fluidity a propustnosti, při nižších teplotách naopak membrána tuhne a stává se rigidní.

Membrána termofilních organismů je adaptována na vysokou teplotu tak, aby byla dostatečně nepropustná i při vyšších teplotách, kdy se zvyšuje její fluidita. Analýza lipidů z různých organismů kultivovaných při různých teplotách ukázala některé obecné trendy v adaptaci membrány. Při vyšších teplotách stoupá celkový obsah membránových lipidů, zvyšuje se podíl nasycených mastných kyselin na úkor nenasycených, vyšší je i podíl kyselin s delším řetězcem. Se vzrůstající teplotou také ubývá rozvětvených mastných kyselin. Důvodem je prostorové uspořádání těchto mastných kyselin. Nerozvětvená a nasycená mastná kyselina se v membráně orientuje prakticky do přímky a zabere tak nejméně prostoru, čímž umožní těsné uspořádání i dalším nasyceným mastným kyselinám. Výsledkem je hustější membrána [30].

Adaptace membrány na teplotu je proces fyziologický, poměrně rychlý a vratný. Přímo v membráně prokaryotických mikroorganismů působí enzym desaturáza, která má schopnost reverzibilně saturovat a desaturovat dvojně vazby. Další úpravy mastných kyselin probíhají pomocí jejich odbourávání a nové syntézy závislé na teplotě. Tento postup je také jediný, který používají eukaryotické organismy.

Termofilní bílkoviny a enzymy jsou adaptovány na vyšší teplotu změnou svojí struktury bílkovin tak, aby byla posílena jejich rigidita [30].

### 3.1.3 Vliv pH prostředí

Koncentrace vodíkových iontů (pH) patří k nejvýznamnějším faktorům prostředí. Ovlivňuje elektrický náboj buněčného povrchu a tím se mění i permeabilita buněčné membrány vůči iontům. Mění se i poměr hlavních metabolických procesů, aktivita enzymů, odolnost buněk vůči jiným faktorům (teplotě aj.) [4].

Růst mikroorganismů i jejich biochemická činnost jsou silně ovlivněny koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Každý mikrobiální druh se může rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH. Pro optimální růst většiny bakterií je toto rozmezí poměrně úzké. Extrémní pH může mikroorganismy usmrtit.

Většina bakterií roste v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí. Mezi bakterie přežívající extrémní pH patří střevní bakterie, neboť musí přežít velmi nízké pH žaludečních šťáv i alkalické pH žluči. Kyselé prostředí přežívají také druhy tvořící kyseliny jako hlavní produkty metabolismu (octové, mléčné nebo propionové bakterie). Při příliš nízkém pH se ovšem přestávají rozmnožovat a ustává jejich hlavní metabolická činnost. Naproti tomu hnilobné bakterie jsou velmi citlivé k nízkému pH, čehož se využívá při konzervaci potravin (marinované ryby, zelenina v kyselém nálevu nebo mléčně zkvašená zelenina).

pH prostředí ovlivňuje také odolnost buněk ke zvýšeným teplotám. Odolnost k vysokým teplotám je tím menší, čím větší je odchylka od optimálního pH, což platí jak pro vegetativní buňky, tak i pro spory.

U bakteriálních spor rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Desulfotomaculum* zabraňuje kyselé pH klíčení spor a jejich přeměně ve vegetativní formu. Této skutečnosti se využívá u potravin sterilovaných teplem [1].

V nekyselém nebo jen málo kyselém prostředí se rozvíjí spory obligátně anaerobních nebo fakultativně aerobních termofilních mikrobů, jako např. *Clostridium thermosaccharolyticum* a v prostředí okyseleném pod pH = 4 tvoří *Bacillus thermoacidurans* jen vegetativní formy, tj. relativně velké tyčinky.

### 3.1.4 Voda a relativní vzdušná vlhkost

Voda je v prostředí pro existenci mikroorganismů nezbytná. Umožňuje transport živin do buňky a metabolitů z buňky do prostředí. Veškeré biochemické reakce probíhají ve vodném prostředí a buňky samy obsahují až 90 % vody. Snižující se obsah vody zpomaluje životní činnost a pod určitou mezí ji zcela zastavuje, i když se mikrob neusmrtí. Různé mikroorganismy jsou schopné růstu při různém obsahu vody v prostředí. Právě tak různé druhy snášejí různě dlouhou dobu vysušení, po kterou si zachovávají životnost. Mimořádně odolné jsou spory bakterií, které mohou klíčit i po desítkách let vysušení. Velmi citlivé jsou např. bakterie octového kvašení nebo nitrifikační.

Relativní vzdušná vlhkost je důležitým faktorem pro životní činnost mikroorganismů, závisí na teplotě a má praktický význam při transportu a skladování kultur či potravin konzervovaných sušením [4].

## 3.2 Biotické faktory

### 3.2.1 Vzájemné vztahy mikroorganismů

Pro charakterizaci biotických faktorů, zde uvedených vztahů mezi organismy a jejich prostředím a mezi organismy navzájem, je důležité zmínit základní ekologické a taxonomické pojmy. V případě taxonomie (tj. disciplína zabývající se popisem a tříděním mikroorganismů na základě morfologických, biochemických, fyziologických charakteristik do taxonomických jednotek), je základní taxonomickou jednotkou tzv. **taxon** (druh, rod, čeleď, atd.) [11].

**Populace** je skupina organismu určitého druhu, které mají společný genofond, žijí v určitém prostoru a čase. Pro tuto skupinu mikroorganismů je charakteristické, že pravděpodobnost vzájemného křížení je větší, než pravděpodobnost křížení s členy jiných populací. Příkladem populace bakteriálních buněk je **kultura**, která může být **čistá** (populace buněk výhradně z jednoho kmene x klon je populace dceřinných buněk pocházející z jedné mateřské buňky) či **smíšená** (složená z několika kmenů bakterií). Soubor populací, žijících na určitém biotopu, je **společenstvo** [11].

Mezi jednotlivými populacemi mikroorganismů, které vzájemně přicházejí do kontaktu, se vytvářejí různé vztahy. Populace se ovlivňují pozitivně, negativně či na sebe vůbec nepůsobí.

Příkladem jednotlivých vztahů je adaptace, neutralismus, komenzalismus, protokooperace, mutualismus, kompetice, predace, parazitismus a amensalismus [11].

**Adaptace** je stavem přizpůsobení se daným podmínkám prostředí a tím i zajištěním dalších populací. Adaptace je jistou ochranou před nepříznivými vlivy okolí [11].

### **Neutralismus**

V případě, kdy se populace druhů navzájem neovlivňují, nejsou stimulovány ani inhibovány, dochází k tzv. neutralismu [11].

### **Komenzalismus**

Komenzalismus je vztahem jednostranného prospěchu, kdy pouze populace prvního druhu má z tohoto vztahu prospěch a druhá populace není ovlivněna. Příkladem tohoto vztahu je sukcesivní působení mikroorganismů při různých metabolických procesech (metabióza), kdy jedna populace převádí látku enzymaticky na substrát, který je výchozí látkou pro metabolickou činnost dalších populací [11].

### **Protokooperace**

Protokooperace je vztahem začínající spolupráce, která je prospěšná, nikoliv nutná. Příkladem je synergismus, projevuje se např. tím, že populace obou druhů dokážou ve spolupráci uskutečnit reakce, které by individuálně svým metabolismem nebyly schopny provést [4, 11].

### **Mutualismus**

Mutualismus je vztahem obligátní symbiózy, spoluprací nutné k životu obou na ní zúčastněných druhů [11].

### **Kompetice**

Kompetice je projevem soutěže mezi jedinci různých druhů i jednoho druhu o jeden zdroj potravy či energie, který je omezen. Na základě GAUSSEHO principu zde dochází ke konkurenčnímu vyloučení, protože dva druhy se zcela shodnými nároky nemohou žít pohromadě v jednom prostoru [11].

### **Predace**

Predace je případem vztahu, kdy se jeden druh živí druhým. Prvním typem organismu, účastnícím se na tomto vztahu, je **predátor**, který bývá obvykle větších rozměrů. Druhým organismem je **kořist**, která predátorovi slouží jako potrava. Predátor je závislý výživově na populaci kořisti. Příkladem těchto vztahů je běžné vyžírání drobných bakterií a mikromycet prvky a většími mikroorganismy [11].

## Parazitismus

Parazitismus je vztahem mezi parazitem, který je menších rozměrů a jeho hostitelem. Ze vztahu má prospěch parazit, který je pro svého hostitele škodlivý. Podle toho, jakým způsobem se na hostiteli vyživuje, se rozlišují tzv. **ektoparazité** (žijí na povrchu hostitele) a **endoparazité** (žijí uvnitř svého hostitele) [11].

## Amensalismus

Populace prvního druhu je omezována, druhého nedotčena. Účinek negativního působení může být přímý, kdy organismus vytváří látky škodlivé pro druhou populaci (antibiotika, inhibitory, jedy, apod.), nebo nepřímý, kdy aktivita jedné populace vede ke změně jiných podmínek prostředí ve směru nepříznivém pro druhý organismus (pH, redox-potenciál, pO<sub>2</sub>, aj.) [4].

Těchto osm typů vzájemných vztahů lze rozdělit na záporné a kladné. Záporné vztahy, kdy jedna populace škodí populaci druhé, jsou označovány jako **antibióza** a jsou zpravidla typu amensalismus. Povaha vzájemného vztahu se může měnit za různých podmínek, nebo v průběhu společného soužití. Interakce mezi organismy závisí též na prostorové distribuci účastníků, mohou se projevovat současně nebo postupně [4].

Např. při kultivaci směsné termofilní kultury se mění koncentrace biomasy a CHSK.

## 3.3 Mikroorganismy v odpadních vodách a biologických čistírnách

Odpadní vody přicházející do biologických čistíren si přinášejí v závislosti na jejich původu celou řadu mikroorganismů. Kromě fekální mikroflóry obsahují odpady z domácností (laktoflóru, mikroorganismy ze zbytků masa a masných výrobků, moučných výrobků, ovoce a zeleniny aj.). Z celé řady průmyslových výroby odcházejí mikroorganismy jako odpady z výroby (pivovary, lihovary, výroba léčiv, mlékárenský průmysl, konzervárny apod.). Tato mikroflóra však většinou není schopna v čistírenském procesu dále vegetovat a většina zástupců hyne. Po lyzi jejích buněk stoupá znečištění, zvláště přichází-li do odpadů velké množství biomasy. V biologických čistírnách je pro čistírenské procesy využívána spontánně vzniklá mikroflóra, která je adaptována na přiváděnou odpadní vodu. Při styku odpadní vody s vytvořenou biocenózou jsou přítomné organické látky (znečištění) metabolizovány. Posléze je odpadní voda od mikroorganismů oddělena a vypouštěna do recipientu. Mikroorganismy se vracejí do procesu jako inokulum. Jsou-li v přebytku, mohou být ze systému odstraněny.

Čistírenské procesy se v podstatě dělí na aerobní a anaerobní. Podle typu vytvořené aktivní mnohasložkové kultury mohou být buď s kulturou suspenzní nebo nárostovou (tzv. biofilmem). Suspenzní kultura je nejčastěji označována jako **aktivovaný kal**, nerostová se uplatňuje v různých typech **biologických kolon**.

Základním předpokladem pro funkci čistírenského systému je takové složení přiváděné vody, které umožňuje růst a množení bakterií. Ty jsou základním článkem postupně tvořené polykultury [4].

### **3.4 Vody povrchové a odpadní**

Voda je přirozeným prostředím, v němž se mikroby mohou vyvíjet a žít. Hlavním faktorem, který ovlivňuje vývoj bakterií ve vodě, je přítomnost živin. Čím více je voda znečištěna organickými látkami, tím více obsahuje mikroorganismů. Po stránce mikrobiologické máme různé požadavky na vodu, a to podle účelu, k němuž se vody používá [2].

#### **3.4.1 Zdroje znečištění**

Znečištění vody můžeme definovat jako takovou změnu fyzikálních, chemických a biologických vlastností vody, která omezuje nebo i znemožňuje její použití k danému účelu. Pojem znečištění je tedy pojmem relativním [25].

Voda vypouštěná z domácností a z průmyslových podniků je po použití více či méně znečištěná. Ke znečištění vody rovněž dochází při jejím použití jako transportního média při odstraňování odpadních produktů. Městské odpadní vody se liší stupněm znečištění a svým složením a to především v závislosti na typu sídla, druhu průmyslu a rovněž stupně nařazení srážkovými vodami, které vstupují do systému. Objem a složení odpadních vod ve stejném místě se liší v průběhu času a to jak v průběhu dne, týdne, tak i let [12].

### **3.5 Biologické čištění**

Biologické čištění odpadních vod využívá termofilních mikroorganismů, které rozkládají a odstraňují organické znečištění tak, že ho přeměňují na biologické vločky. Rozkladný proces je velmi složitý a skládá se z řady reakcí. Rychlost tohoto procesu závisí na řadě faktorů, např. na obsahu kyslíku, pH, teplotě, typu znečištění a přítomnosti toxických látek, důležitá je použitá metoda čištění a velikost částic [12].

Biologické čištění se běžně projektuje na odstranění organických látek. V biologickém stupni čištění s normálním zatížením se odstraní jen takové množství živin (solí dusíku a fosforu), které může být zabudováno do buněčné hmoty [12].

#### **3.5.1 Anaerobní rozklad**

Bez přítomnosti kyslíku dochází k rozkladu anaerobnímu. Organické látky se oxidují na oxid uhličitý a vodu, zatímco některé jiné látky se redukuje na organické plyny, např. methan. Anaerobní biologické čištění se obvykle používá pouze u silně znečištěných vod a také při běžném způsobu likvidace kalu, známém jako vyhnívání [12].

#### **3.5.2 Aerobní rozklad**

Při biologickém aerobním čištění dochází k oxidaci organických látek působením mikroorganismů za přítomnosti kyslíku, výsledným produktem jsou  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  [12].

Při aerobním biologickém čištění městských odpadních vod rostou mikroorganismy buď na pevné náplni filtru v imobilizované kultuře (biofiltr), nebo jsou volně unášeny ve vodné fázi a tvoří tzv. kulturu ve vznosu [12].

## 4. TERMOFILNÍ MIKROORGANISMY V PROCESECH ČIŠTĚNÍ

### 4.1 Historie a současnost termofilního čištění

Termofilní biologické čištění bylo poprvé studováno v roce 1953. Předmětem výzkumu byla vysokoteplotní odpadní voda z papírenského průmyslu. Pokles BSK po 24 hodinách byl nepatrně menší v termofilním reaktoru, než v analogickém mesofilním. Ačkoli degradační rychlosti byly nejvyšší při 50 °C, nízké usazovací rychlosti bakterií snižovaly kvalitu finální odpadní vody. O tři roky později byla provedena pilotní studie na čištění sulfátové odpadní vody při 48 – 50 °C. Výzkum stupně eliminace BSK v rozsahu pH 9,5 – 9,8 dal v podstatě stejné výsledky jako u předešlých experimentů při nižších teplotách (30 – 38 °C). Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla zpravidla nejspolehlivější, ale žádný nepříznivý účinek na efektivitu procesu nebyl pozorován. Usazovací rychlosti byly velmi dobré, ovšem pokud byla trvale udržována koncentrace pevné látky v reakční kapalině na 3 g.l<sup>-1</sup>. Tyto prvotní studie společně demonstrují 3 běžné procesní charakteristiky:

- *vysoké biodegradační rychlosti*
- *nízké koncentrace rozpuštěného kyslíku v aerační nádrži vyplývající právě z těchto vysokých rychlostí odbourávání a ze snížení rozpustnosti kyslíku v důsledku vysoké teploty*
- *potenciální problémy s usazováním bakteriálních buněk*

Dalšími analýzami vlivu teploty na výkonnost čistícího procesu bylo zjištěno, že nízká usazovací schopnost bakterií je při teplotách vyšších než 43 °C překážkou kvalitě vyčištěné odpadní vody [19].

Následovalo několik studií termofilního aerobního čištění odpadních vod, ale žádný z nich navrhovaný systém nebyl v plném měřítku proveditelný. Studované odpadní vody neměly ani vysokou teplotu, ani vyšší obsah uhlíkatého substrátu. Byl porovnán efekt čištění odpadní vody při teplotách od 4 do 55 °C a nejlepší čistící výkon byl zaznamenán při teplotě 45 °C. Rovněž další výzkum na základě měření specifické rychlosti utilizace kyslíku potvrdil teplotu nejvyšší biologické aktivity na 45 °C. Další práce byla věnována čištění městských odpadních vod při 55 °C. Filtrací byl dosažen pokles hladiny BSK o více než 90 %. Při čištění kombinovaného městského a průmyslového odpadu při 35 – 52 °C byl zjištěn největší pokles BSK při teplotě 35 °C (tj. pod „termofilní“ teplotní oblastí). Výkonnost procesu klesala s rostoucí teplotou při procesu čištění modifikovaného městského odpadu s využitím submerzního aerovaného biofiltru v teplotním rozmezí 30 – 55 °C [19].

Většina z publikovaných vědeckých článků zabývajících se touto problematikou obsahuje termofilní aerobní systémy použitelné pro odpadní vody o vysoké teplotě, nebo odpadní vody s vyšším obsahem uhlíkatého zdroje vhodné pro autotermní proces (viz. kap. 4.2.5). Při čištění odpadních vod o vysoké teplotě z celulózového a papírenského průmyslu byly zaznamenány pouze proměnlivé úspěchy. Častou limitací výkonu čistícího procesu byla nedostatečná schopnost separace buněk termofilních bakterií z ošetřené odpadní vody. Jako důsledek této špatné usazovací schopnosti buněk byla pozorována klesající efektivita čištění při teplotách větších než 37 °C. Proto byly prováděny pokusy na zlepšení usazovacích charakteristik, např. pomocí přídatku modifikovaného přírodního polymeru chitosanu do

teplé odpadní vody. Naopak ale v kalu starém 15 dní byly zjištěny dobré usazovací schopnosti buněk a bylo dosaženo až 90 % eliminace BSK.

Je patrné, že ve skutečnosti je mnoho z dosažených výsledků a informací protikladných. Optimální hladina některých elementárních parametrů jako je teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH není ještě zcela stanovena. Nicméně experimentální studie zřetelně ukazují, že biologické aerobní ošetření při vysoké teplotě (50 – 60 °C) je proveditelné [19].

## **4.2 Biologické termofilní aerobní čistící systémy**

Biologické termofilní aerobní čistící systémy představují relativně nový postup úpravy vysokoteplotních odpadních vod. Principem této metody je metabolické odbourávání znečišťujících látek termofilními mikroorganismy. Výzkum této techniky sahá až k roku 1950, ale pouze málo z těchto systémů bylo v průmyslovém měřítku zrealizováno. Většina zařízení byla vyvinuta jen náhodně, když teplota v reaktoru stoupla v důsledku tvorby tepla biodegradací látek v odpadní vodě [26].

Je třeba probrat slovo „termofilní“. Z pohledu biologického čištění odpadních vod se jako termofilní označuje proces, který probíhá při teplotě 45 °C a vyšší, což odlišuje tyto vysokoteplotní procesy od přechodových systémů jako je např. vyhnívání kalu, probíhající při teplotách 35 – 40 °C [26].

### **4.2.1 BETT proces**

Zkušební provoz BETT procesu je tvořen mobilní jednotkou obsahující 900 galonový izolovaný reaktor pro termofilní čištění odpadních vod a zpracování kalu. Kyslík pro ošetření je dodáván tryskovým aeračním systémem využívající jednu trysku umístěnou 1,5 stopy ode dna reaktoru. Recirkulace pro aerační systém je poskytována mísicí pumpou. BETT zařízení je konstruováno pro vsádkový nebo kontinuální způsob kultivace [15].

Vsádkový proces kultivace je využíván pro studium vyhnívání kalu (bioreaktor se naplní a zaočkuje mikrobiální kulturou), kdežto kontinuální způsob je užíván pro studium zpracování kapalného aktivovaného kalu (mikroorganismy se plynule doplňují s novým médiem a staré medium se suspendovanými mikroorganismy se simultánně odstraňuje odtokem). Plnění zahuštěným odpadním kalem a vypouštění je u vsádkového způsobu zajišťováno membránovým čerpadlem s plynulou regulací otáček. Kromě reakční jednotky jsou lokalizovány další nádrže sloužící k plnění reaktoru a přepadu pěny. Systém umožňuje také kontinuální záznam objemu, teploty, pH, rozpuštěného kyslíku a tepelné vodivosti [14, 15].

Pro studium zpracování kapalného kalu je na návěsu umístěna usazovací nádrž. Při tomto způsobu je do zkušební jednotky kontinuálně přiváděna odpadní voda pomocí peristaltické pumpy. Kapalina vytéká z reaktoru do usazovací nádrže, kde kal sedimentuje na dně a supernatant odtéká z horní části usazovací nádrže. Usazený kal může být vrácen zpět do reaktoru jako recyklovaný aktivovaný kal, nebo odčerpáván jako odpadní aktivovaný kal [15].



*Obr. 9: Zkušební provoz BETT reaktoru [15].*

V současné době se rozjíždí plně provozní zařízení využívající technologii BETT procesu.



*Obr. 10: Plný provoz BETT reaktoru [15].*

#### **4.2.2 TAS proces**

Malé čistírny odpadních vod úspěšně využívají proces termofilní stabilizace kalu (TAS). Odpadní kal je při tomto procesu stabilizován vzduchem nebo průmyslovým kyslíkem a zároveň hygienizován vysokou teplotou.

Větší čistírny odpadních vod používají způsob dvojitého zpracování kalu (DS). Kombinace aerobní a anaerobní stabilizace umožňuje použití menších reaktorů ke stabilizaci a hygienizaci odpadního kalu než při čistě anaerobním způsobu zpracování [13].

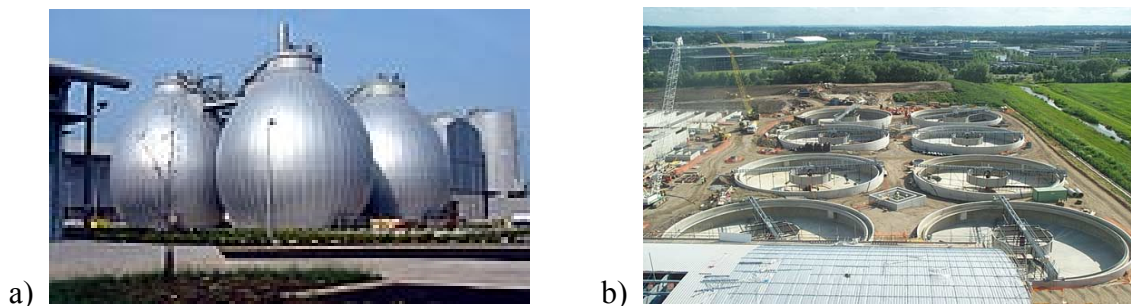
### 4.2.3 ALPHA-BIOTHERM proces

Hlavními součástmi ALPHA-BIOTHERM procesu jsou: reaktor, tepelný výměník, čerpadla, potrubí a elektrická kontrolní jednotka. Reaktor zajišťuje především intenzivní homogenizaci a aeraci vsádky, umožňuje udržení autotermálního procesu, inaktivaci potenciálních patogenů, redukci organických polutantů a vylepšení procesu odvodnění odpadu [13].

Primární a sekundární aktivované kaly vstoupí do Alpha Biotherm pasterizace (provozní termofilní aerobní autokláv) skrz vyluhovače, kde jsou drženy při 70 °C jednu hodinu.

Pasterizovaný kal je postupně čerpán do čtyř vejčitých, anaerobních autoklávů, z nichž je každý asi 20 metrů vysoký. Jsou první jejich druhu v zemi, vybudované zcela ze železobetonu s externím stříbrným plátováním. Teplo požadované pro pasterizaci a procesy vyhívání je poskytnuté buď autoklávem, nebo třemi palivovými kotly [27].

Jednotka Alpha-biotherm může s využitím termofilních bakterií zpracovávat jakékoliv mechanicky zahuštěné tuhé biologické látky s obsahem sušiny více jak 8 % [13].



Obr. 11, 12: a) autoklávy b) biologické filtry [27]

### 4.2.4 FUCHS ATAD proces

Kal obsahuje cenné organické a minerální látky, a proto je třeba jak z ekologického, tak i z ekonomického hlediska upřednostnit jeho využití pomocí bezodpadkových technologií. Jedním z těchto řešení je aplikace kalu na zemědělské půdě, která vrací tyto cenné látky zpět do přirozeného koloběhu v přírodě. Použití kalu v zemědělství však vyžaduje jeho stabilizaci a hygienizaci.

Technologie FUCHS ATAD je postup, který kal neodstraňuje, ale zušlechťuje. Aerobní termofilní stabilizace je postup, který kal nejen stabilizuje, ale zabezpečuje i po stránce hygienické. Tímto způsobem se získá cenné hnojivo a kromě toho se chrání přírodní zdroje [16].



Obr. 13: FUCHS ATAD technologie [16]

#### 4.2.5 ATAD a AEROTHERM proces

Jako autotermní termofilní aerobní stabilizace kalu (ATAD) se označuje biologické aerobní zpracování kalu, které probíhá při procesních teplotách nad 45 °C, a jehož ohřívací energie se získává z činnosti látkové výměny mikroorganismů. K dosažení zvýšené reakční teploty se nepřivádí teplo z vnějšku, nýbrž proces se exotermickými reakcemi samočinně udržuje v termofilním rozsahu teplot.

Vedle ATAD postupu se používá také technologie duální stabilizace kalu známá pod označením AEROTHERM, která využívá autotermní termofilní aerobní proces jako předstupeň před anaerobní mezofilní stabilizací.

Technologie ATAD a AEROTHERM se úspěšně používají pro následující účely:

- *desinfekce čistírenských kalů*
- *odlehčení stávajících vyhnívacích zařízení na stabilizaci čistírenského kalu*
- *snížení investičních nákladů při pořizování nových zařízení na stabilizaci čistírenských kalů [17].*

##### 4.2.5.1 Historie aerobní autotermní technologie

Historii vývoje technologií ATAD a AEROTHERM pro stabilizaci kalu charakterizují následující údaje:

- původ ATAD technologie je v Německu
- počátkem 70. let byly zveřejněny první odborné příspěvky
- 1974: Loll - ucelené technologické základy metody ATAD
- 1975: Strauch - výzkumné práce týkající se desinfekčního účinku aerobně termofilního procesu
- 1977: První velká čistírna s ATAD stabilizací kalu realizována ve Vilsbiburgu, SRN.
- 80. léta - rozšíření ATAD a AEROTHERM technologií v Německu a Švýcarsku, později v V. Británii, USA, Kanadě

- v současnosti je v německy mluvících zemích v provozu více než 100 velkých čistíren s ATAD a AEROTHERM technologií pro stabilizaci kalu [17].

#### **4.2.5.2 Princip technologie**

Princip aerobní autotermní stabilizace kalu vychází z poznatku, že v celkové energetické bilanci biochemických reakcí při aerobním rozkladu organického substrátu v kalu dochází k uvolnění značně velkého reakčního tepla. Uvolněné reakční teplo zvyšuje teplotu kalu na hodnotu, odpovídající rovnováze mezi produkcí reakčního tepla, tepelným obsahem kalu a ztrátami tepla do okolí systému. Pokud je substrát dostatečně koncentrovaný a reakční systém tepelně izolovaný od okolního prostředí, pak se teplota kalu tímto procesem samočinně zvýší na značně vysoké hodnoty, dosahující v praxi 70 °C. Při zvýšené teplotě se rozkladné biochemické procesy podstatně urychlují, kal se stabilizuje během několika dnů a rovněž dochází ke zničení přítomných patogenních mikroorganismů [17].

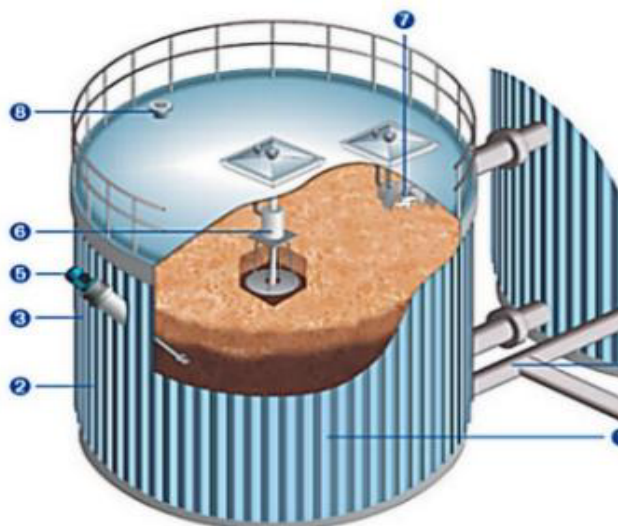
Vlivem teploty, dosahující při termofilním procesu hodnot kolem 65 °C, dochází při dostatečně dlouhé expozici ke zničení patogenních mikroorganismů v kalu. Této skutečnosti se výhodně využívá k desinfekci čistírenského kalu. Podle Straucha (1981) se při duální stabilizaci čistírenského kalu dosáhne desinfekce za následujících podmínek procesu:

- *minimálně 24 hod. doba zpracování v aerobně termofilním předstupni při teplotách kolem 55 °C.*
- *během této doby by měla být alespoň po dobu jedné hodiny udržována teplota na 55 – 60 °C [17].*

#### **4.2.5.3 Reaktor ATAD procesu**

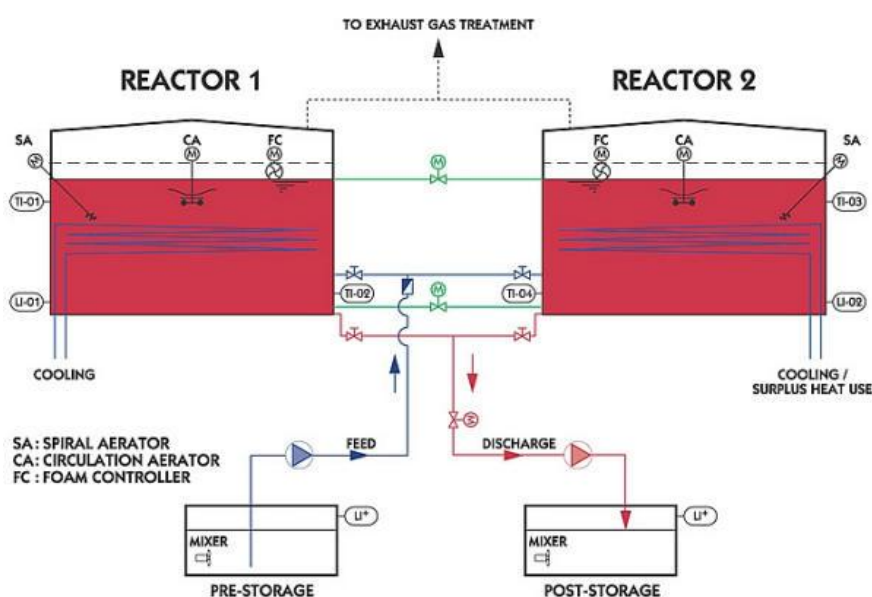
Reaktory, v nichž probíhá ATAD proces mají obvykle tvar válce. Optimální poměr mezi průměrem a výškou kalu je závislý na způsobu provzdušňování. Při tlakové aeraci a přívodu technicky čistého kyslíku se doporučuje výška větší než 1,5 násobek průměru. Nádrže mají být uzavřené a ze všech stran tepelně izolované. Rovněž potrubí se substrátem vně reaktoru má být izolované.

U menších zařízení postačí instalovat jeden samostatný reaktor. U středních a větších jednotek se zapojuje více reaktorů za sebou do kaskády. Jako nejlepší se osvědčila dvoustupňová kaskáda. Více než tři stupně kaskády se nedoporučují [17].



Obr. 14: Reaktor ATAD procesu

Popis: 1-reaktor, 2-izolace, 3-obkládání, 4-potrubi, 5-spirálovitý provzdušňovač, 6-proudící, provzdušňovač, 7-kontrolor pěny, 8-výfukový plyn [18].



Obr. 15: Schéma reaktoru ATAD procesu [18].

#### 4.2.6 Výhody a nevýhody procesu

Výhody termofilního aerobního čištění odpadních vod jsou: rychlá inaktivace patogenních mikroorganismů, která může být stěžejním činitelem při čištění mnoha odpadů a vysoké biodegradční rychlosti spojené s nízkými růstovými výtěžky způsobenými vysokými požadavky buněk na zachování životních funkcí. Maximum specifické rychlosti využití substrátu je u termofilních procesů 3-10x větší než u analogických mesofilních procesů.

V těchto systémech je pozoruhodně nízká rychlost tvorby kalu, která je tak nízká, jako u anaerobních čistících procesů.

Nevýhody termofilních aerobních procesů zahrnují zejména zvýšené výdaje na aeraci provozní nádrže a udržení teploty, slabou flokulaci bakterií a problémy s pěněním. Náklady na vzdušnění reaktorů představují zjevnou nevýhodu ve srovnání s anaerobní technologií. Navíc nízké procento odpadního kalu, příznačné pro tyto aerobní termofilní procesy, vede k vyšším požadavkům na kyslík. Termofilní aerobní čistící procesy mají téměř vždy nízké usazovací schopnosti buněk, plynoucí z dispergace mikroorganismu v celém objemu reaktoru.

## 5. APLIKACE TERMOFILŮ V POTRAVINÁŘSKÉM PRŮMYSLU

### 5.1 Termofilní sýrařské kyselé kultury

Termofilní kyselé kultury se v mlékárenském průmyslu používají při výrobě:

- sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou (typ ementál nebo parmezán),
- termofilního kyselého mléka jogurt a od něho odvozených produktů,
- měkkých sýrů a tvarohů (místo mezofilních kyselých).

Termofilní kyselé kultury obsahují kokovité a paličkovité termofilní bakterie mléčného kysnutí s optimální teplotou v rozmezí 40-45 °C:

- *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*,
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*,
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*,
- *Lactobacillus helveticus*.

Úlohy termofilních kyselých bakterií mléčného kysnutí jsou při výrobě sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou dvojaké:

- fermentují laktózu na kyselinu mléčnou,
- uplatňují svoji, i když mírnou, proteolytickou aktivitu.

Při fermentaci laktózy na kyselinu mléčnou snižují hodnotu pH sýřeniny, čím napomáhají její dehydrataci. Voda navázaná na kasein s klesající hodnotou pH přechází postupně na volnou, kterou je potom možno odstranit lisováním. Důležité je, že fermentují i při zvýšených teplotách dohřívání a dosušení sýřeniny (51-55 °C) a taky při jejím lisování. Nízká hodnota pH sýřeniny a při ní málo disociovaná kyselina mléčná inhibují růst a metabolismus nežádoucích kontaminujících bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Při fermentaci laktózy v sýřenině se hodnota pH nesnižuje tak nízko jako v mléce, protože tato má tlumivý účinek; dosahuje hodnoty pH jen asi 5,2. Paličkovité bakterie termofilních kyselých musí při výrobě sýrů snášet vyšší koncentrace soli, a proto i nižší hodnoty  $a_w$  [24].

Druhou významnou úlohou termofilních kyselých kultur při výrobě sýrů je uplatnění jejich proteolytické aktivity. Proteolýzou kaseinu sýřeniny vznikají štěpné produkty, které spolu s produkty proteolýzy residuí syřidlových enzymů, enzymů mezofilního kyslíku a propionové kultury, také spolu s produkty vzájemných chemických reakcí prekurzorů a metabolitů a obsah soli určují chuť, vůni a reologické vlastnosti sýrů [24].

Bakterie termofilních zákysových kultur jsou charakteristické pro mléko a mléčné produkty, jen výjimečně se izolují z jiných substrátů.

V praxi při výrobě sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou se rozlišují dvě skupiny bakteriálních kultur:

- přírodní směsné kultury s neúplně známým složením,
- složené kultury se známým složením.

Přírodní směsné kultury se dodnes používají v malých sýrárnách typických oblastí výroby tvrdých sýrů v pohoří Jura na francouzsko-švýcarském pohraničí, ve švýcarských Alpách a v Itálii. Pomocí nich se vyrábějí přírodní ementálské a grojské sýry a sýr grana. Tyto zákyusy se připravují volně na vzduchu macerací sušených telecích žaludků syrovátkou, která se odebírá denně ze sýrařských kotlů na konci úpravy sýřeniny. Macerát se inkubuje při 40-45 °C. Obsahuje syřidlové enzymy z telecích žaludků a termofilní bakterie potřebné na fermentaci laktózy a bílkovin mléka a syrovátky. Bakteriální flóra takto získaného zákyusu odpovídá svým složením vnitřním a vnějším podmínkám macerátu. Obvykle jsou v něm zastoupené různé druhy laktobacilů, *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. fermentum*, v menším množství *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *L. acidophilus* a z kokovitých *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* a někdy i příslušníci rodu *Enterococcus* [24].

Nestandardní složení bakterií v těchto empirických zákysech nezaručuje vždy požadovaný průběh fermentace mléka a sýřeniny. Například, když převládne přítomnost heterofermentativní paličky *L. fermentum*, může při zrání sýru vznikat nadměrná tvorba ok už v mladém sýru. Výhodou přírodních zákyusů je ale skutečnost, že jsou odolnější vůči bakteriofágům než zákyusy složené ze selektovaných bakterií [24].

Termofilní zákysové kultury se známým složením obsahují různé kmeny laktobacilů: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a ze streptokoků *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* [24].

## 5.2 Termofilní jogurtové kultury

Jogurt je mléčný výrobek, při kterém se v mléce nechávají vyvíjet bakterie, které procesem zvaným kysání přemění cukr (laktózu) na kyselinu mléčnou. Jde o nejrozšířenější funkční potravinu na světě.

Ve velkém množství pro spotřebitele se ve světě začal jogurt vyrábět teprve na začátku 20. století. Původně se nechávaly kysat přímo ve skleničkách, ve kterých se později prodávaly, ale postupem času se kysnutí přesunulo do obrovských nádrží v mlékárnách a do skleniček či kelímků se stácel již zkysaný produkt.

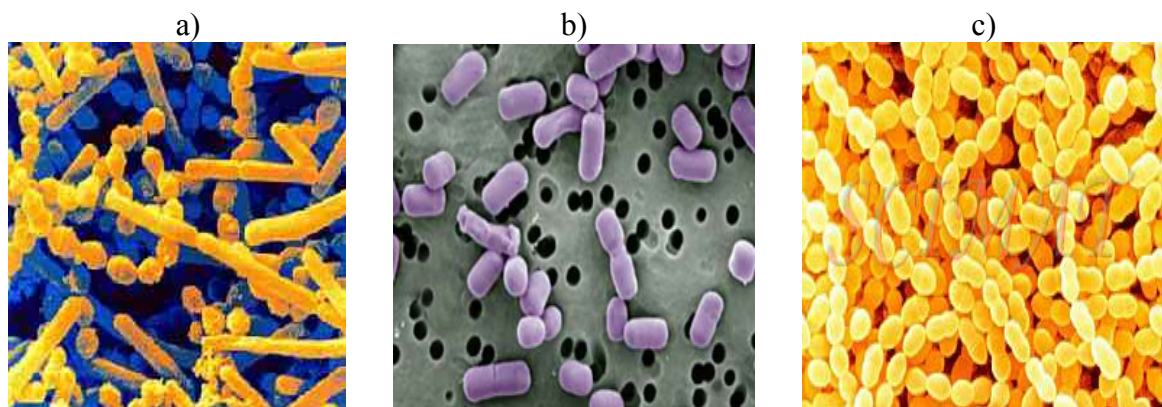
Obecně lze říci, že jogurt působí blahodárně na střevní mikroflóru člověka a je spolu s acidofilním mlékem nejvýznamnější probiotickou potravinou [28].

Jogurty, jogurtové mléka a od nich odvozené podobné kyselo-mléčné produkty se připravují pomocí druhů *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Tyto mikroby mají symbiotický vztah a spolu se vyznačují rychlou tvorbou

kyseliny mléčné; při optimální teplotě 40 - 43 °C koaguluje kasein za 2 až 3 h. Koagulace začíná při hodnotě pH 5,3 a při 4,5 je ukončená. Druhou významnou vlastností jogurtového zákysu je tvorba aromatické látky acetaldehydu v množství 20 až 30 mg.l<sup>-1</sup> [24].

*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* stimuluje růst *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, který má malou schopnost hydrolyzovat bílkovinu, proto ho *Lactobacillus* podporuje uvolňováním aminokyselin z bílkovin mléka svou větší proteolytickou aktivitou. *Streptococcus thermophilus* naopak stimuluje růst a metabolismus *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* tvorbou kyseliny mravenčí (při anaerobní kultivaci). Při vysokém záhřevu mléka určeném na výrobu jogurtu (85 °C na 20-30 minut nebo 95 °C na 5 minut) vzniká termickým rozkladem laktózy také kyselina mravenčí, ale ne v dostatečném množství [24].

Při výrobě jogurtů z nezahuštěného mléka (jogurtové mléko a jiné) se stává, že vzniklá sraženina nemá požadovanou konzistenci, velmi lehce se porušuje a uvolňuje syrovátku. Z tohoto důvodu se používá jogurtová kultura, která se vyznačuje tvorbou slizu, vedle ostatních požadovaných vlastností. Sliz zvyšuje kompaktnost koagulátu. Tuto vlastnost nabývají jogurtové kultury vlivem nižší kultivační teploty (30 °C) a při vyšší hodnotě pH [24].



Obr. 16, 17, 18:

- a) Jogurtová bakteriální kultura obsahuje termofilní streptokoky a laktobacily
- b) *Lactobacillus bulgaricus*
- c) *Streptococcus thermophilus* [9].

### 5.3 Vznik a výroba kyseliny mléčné

Mléčný disacharid laktóza je z hlediska fyziologie výživy důležitý jako přirozený pomocník v procesu trávení a znovuvytvoření střevní mikroflóry po střevních infekcích, terapii antibiotiky a po plísňových chorobách střeva. Znamená to, že laktóza je výhodná jako prebiotikum, tzn. jako substrát schopný selektivně podporovat růst probiotických bakterií, především termofilní laktobacily (např. *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrückii*). Tyto bakterie dokáží laktózu štěpit, využít pro svůj růst, přičemž se vytvářejí určité výživově významné látky (vitamín B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, kyseliny s krátkým řetězcem). Pro některé mikroorganismy je laktóza bez předchozího štěpení nevyužitelná. Růst laktobacilů a potlačování růstu patogenních mikroorganismů je podporováno kyselým prostředím v důsledky vzniku kyseliny mléčné.

Laktóza může být jako prebiotikum využívána přímo nebo z ní mohou být vyráběny galaktooligosacharidy či laktulóza [29].

Při trávení dochází ke štěpení laktózy  $\beta$ -galaktosidázou (laktáza, optimum pH 5,5 – 6,0), které je 4x pomalejší než štěpení sacharózy sacharázou. Vzniklá glukóza se vstřebává přímo, galaktóza až po přeměně na glukózu. Při nedostatečné aktivitě laktázy se nerozštěpená laktóza dostává do tlustého střeva, kde je štěpena bakteriemi na kyselinu mléčnou a další kyseliny s krátkým řetězcem [29].

Účinek kyseliny mléčné je vytvoření kyselého prostředí ve střevě, které podporuje růst laktobacilů a potlačuje růst patogenních mikroorganismů. V důsledku působení kyseliny mléčné se zlepšuje rozpustnost vápníku a průchodnost střevní sliznice [29].

Výroba kyseliny mléčné se provádí pomocí bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus bulgaricus*), kdy se laktóza při teplotách vhodných pro konkrétní bakterie přemění na kyselinu mléčnou. Ta se během fermentace neutralizuje např. uhličitanem vápenatým. Po prokvašení se médium zahřeje, zfiltruje, filtrát se zahustí, mléčnan vápenatý se převede pomocí kyseliny sírové na kyselinu mléčnou a nerozpustný síran vápenatý, který se oddělí. Z takto získané kyseliny mléčné lze rafinací získat látku v potravinářské jakosti [29].

## 6. BIODEGRADACE POLYURETANŮ

### 6.1 Polyuretany (PUR)

Pod pojmem polyuretany rozumíme širokou skupinu polymerů vzniklých reakcí vícefunkčních isokyanátů a vícefunkčních alkoholů. Nejčastěji se vyrábějí polyadiční reakcí. Podle funkčnosti reagujících složek vznikají lineární nebo prostorově uspořádané polyadukty. Charakteristickou vazební jednotkou je uretanová skupina –NH-CO-O-.

Isokyanáty jsou velmi reaktivní, reagují nejen s hydroxylovými skupinami ale i s jinými látkami obsahujícími aktivní vodíkové atomy. S aminy reagují za vzniku substituovaných močoviny, při reakci s vodou vznikají aminy a odštěpují oxid uhličitý, s karboxylovými kyselinami vytvářejí substituované isokyanáty a oxid uhličitý apod. Za určité situace může isokyanát reagovat i se substituovanou močovinou a s vodíkem uretanové skupiny. Jednoduché sloučeniny s aktivním vodíkem lze podle klesající reaktivity s isokyanáty sestavit do řady: alifatické aminy > aromatické aminy > alifatické substituované močoviny > primární alkoholy > sekundární alkoholy > voda > fenoly > aromatické substituované močoviny. Isokyanáty s nízkou molekulovou hmotností jsou snadno těkavé kapaliny. Isokyanáty jsou také velmi toxické látky. To vše naznačuje, že výroba polyuretanů je z hlediska bezpečnosti a technologicky velmi náročná. Aby proběhla reakce isokyanátů s hydroxy sloučeninou, je nutno pracovat s velice čistými surovinami a ve zcela bezvodém prostředí.

Teplota disociace uretanové vazby závisí na povaze skupin spojených touto vazbou.

Různé uretany jsou prakticky stabilní do těchto teplot:

- aryl – NH – CO – O – aryl asi do 120 °C,
- alkyl – NH – CO – O – aryl asi do 180 °C,
- aryl – NH – CO – O – alkyl asi do 200 °C a
- alkyl – NH – CO – O – alkyl asi do 250 °C [38].

Rozdílné tepelné stability různých uretanových skupin se využívá v praxi. Z polyisokyanátů se reakcí s fenoly, kaprolaktamem aj. připravují tzv. maskované isokyanáty, které jsou za normální teploty úplně netečné vůči vodě a sloučeninám s hydroxylovou skupinou. Zahřátím na teplotu rozkladu se odštěpuje maskující činidlo a vzniká volný isokyanát, který může reagovat s přítomnými polyoly na PUR. Reaktivita isokyanátů vzrůstá v pořadí hydroaromatické – alifatické – aromatické isokyanáty.

Přibližně 95 % produkce PUR je založeno na aromatických polyisokyanátech, které jsou levnější a reaktivnější než alifatické [38].

- Na výrobu měkkých pěn se nejčastěji používá 2,4- a 2,6-diisokyanatotoluen a diisokyanatodifenylmethan.
- Pro přípravu elastomerů a pro polotvrdé a tvrdé integrální PUR pěny se používá 4,4- diisokyanatodifenylmethan.
- Pro přípravu mechanicky náročnějších elastomerů se používá 1,5-diisokyanatonafthalen.
- Pro lepidla se používá tris(p-isokyanatofenyl)methan a tris(p-isokyanatofenyl)thiofosfát v roztoku methylenchloridu [38].

Nevýhodou aromatických isokyanátů je tendence jejich produktů ke žloutnutí vlivem světla a kyslíku. Tento nedostatek nemají polyuretany připravené z alifatických a cykloalifatických isokyanátů, ty jsou však velmi těkavé a značně toxické.

Při výrobě PUR se jako druhá složka jen výjimečně používají monomerní dioly. Téměř vždy se používají oligomerní až polymerní produkty s koncovými hydroxylovými skupinami. Alkoholová složka je také výrazně levnější než isokyanátová a proto se stoupající její molekulovou hmotností se snižuje potřebné množství složky isokyanátové, a tím klesají celkové náklady na produkt. V praxi se tedy místo jednoduchých vícefunkčních alkoholů používají polyetheralkoholy a polyesteralkoholy.

Polyesteralkoholy se vyrábějí polyesterifikací dikarboxylových kyselin (kyselina adipová, ftalanhydrid) s přebytkem diolu (diethylenglykolu aj.), tak aby konce řetězců byly obsazeny hydroxylovými skupinami.

Polyetheralkoholy se připravují z propylenoxidu (nebo jeho směsi s ethylenoxidem) reakcí s látkami obsahujícími aktivní vodík [38].

### **6.1.1 Použití**

Polyuretany mohou mít, podle své vnitřní struktury, charakter termoplastu, reaktoplastu i elastomeru. Závisí to na výchozích surovinách a také na použité technologii výroby. Převažující modifikací jsou pěnové typy PUR. Známé jsou především měkké elastické pěnové hmoty. Méně známé, avšak široce používané jsou tuhé pěnové polyuretany. Variantou prostých pěnových materiálů jsou tzv. integrální pěny. PUR se však používá i v podobě plastu, vláken, nátěrových hmot, tmelů a lepidel [38].

### **6.1.2 Vlastnosti**

Polyuretany z hexamethylendiisokyanátu a 1,4-butandiolu jsou silné krystalické bílé hmoty o teplotě tání kolem 180 °C, při teplotách nad 220 °C se rozkládají na své složky.

Ve srovnání s polyamidami mají polyuretany nižší navlhavost, lepší elektroizolační vlastnosti a větší odolnost vůči vodě, kyselinám a povětrnosti. Za běžné teploty jsou rozpustné pouze ve fenolech a kyselinách mravenčí a sírové. Zpracovávají se vstřikováním, lisováním a zvlákněním, ale jen na technická vlákna; k textilním účelům nejsou vhodná pro svůj drsný omak, špatnou barvitelnost a schopnost držet i silný elektrostatický náboj [45].

### **6.1.3 Plniva**

Plniva jsou důležité přísady, které významně ovlivňují vlastnosti směsí a ještě více vlastnosti výrobků, jež právě máme možnost volbou kvality a kvantity plniva upravovat v širokých mezích. Jsou to většinou tuhé látky používané ve formě prášku nebo krátkých vláken. Používají se dnes nejen do kaučuků, ale i do plastů, a to jak termoplastů, tak reaktoplastů.

Obecně je možno říci, že plnivy lze zlepšovat mechanické vlastnosti materiálu (např. zvyšovat pevnost, odolnost vůči oděru, houževnatost, tuhost), jeho odolnost vůči teplu, ohni, korozi, stárnutí, ovlivňovat vzhled výrobků, ale i jejich cenu [45].

## 6.2 Biodegradace

Biodegradace neboli biologický rozklad je speciálním případem degradace, při níž dochází k rozkladu polymerních organických látek působením biologických činitelů, především mikroorganismů a který ovlivňuje řada činitelů [46, 48].

Jsou to fyzikální a chemické parametry degradovaného materiálu, přítomnost degradační mikrobiální populace a v neposlední řadě podmínky, které umožňují růst mikroorganismů. Výsledkem je pak buď částečná degradace materiálu, která se projeví změnou mechanických vlastností, nebo úplná degradace materiálu [48].

Když jsou organické sloučeniny v procesu biodegradace zcela rozloženy, vznikají anorganické sloučeniny uhlíku, dusíku, fosforu, síry a jiných prvků obsažených v původní kontaminující organické látce a tyto jsou uvolňovány do prostředí a zařazeny do koloběhu prvků v přírodě. Lze tedy říci, že tato úplná biodegradace toxické organické látky, která je známá pod pojmem mineralizace, je přírodě velmi prospěšná [21].

### 6.2.1 Základní pojmy

Pro přehlednost je v dalším textu uvedeno několik základních termínů:

**Degradace** – ireverzibilní proces, při kterém prochází polymerní materiál fyzikálními, chemickými nebo biochemickými změnami spojenými s nárůstem entropie.

**Biodegradace** – degradace zprostředkovaná živými organismy, vedoucí k mineralizaci, případně k tvorbě biomasy.

**Mineralizace** – přeměna (organického) materiálu na plyny nebo anorganické prvky.

**Biodegradabilita** – Biodegradabilita je specifická vlastnost daného materiálu, která definuje jeho kompletní biologickou rozložitelnost.

**Biodegradabilní** - materiál se nazývá biodegradabilní s ohledem ke specifickým podmínkám prostředí, pokud podléhá biodegradaci v určitém rozsahu v daném čase (měřeno standardními testovacími metodami [47, 48].

### 6.2.2 Podmínky

Biodegradace je ovlivňována zejména těmito vlivy prostředí: teplota, světlo, živiny, pH, vlhkost a přítomnost kyslíku. Biodegradace je většinou zapříčiněna enzymy produkovány mikroorganismy, ale podporují ji i další procesy, např. abiotická hydrolýza, fotodegradace, mechanické narušení apod. Mikrobiální aktivita mění zároveň strukturu látek kultivačního média. V anaerobních podmínkách dochází většinou ke snížení pH vlivem organických kyselin produkováných mikroorganismy. Naproti tomu v aerobním prostředí může pH i růst. Vlivem ohromných rozdílů v přírodních podmínkách biodegradabilita polymerů silně kolísá jak v globálních měřítcích, tak i v rámci malého ekosystému. To je mimo jiné zapříčiněno i druhy mikroorganismů vyskytujících se v dané lokalitě. Při testování by podmínky prostředí měly být udržovány co možná nejstandardnější a nejkonstantnější, aby byla zajištěna spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků [44].

Biodegradabilita prvních biodegradovatelných plastů byla testována metodami vyvinutými pro studium schopnosti plastů odolávat mikrobiálnímu napadení. Tyto testy byly posléze nahrazeny metodami, které stanovují koncové produkty mikrobiálního metabolismu.

Konečné produkty biodegradace jsou u aerobní degradace  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  a u anaerobní  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Nulová biodegradabilita plastu zjištěná při testech ve vodním prostředí neznamená, že se tyto plasty nebudou rozkládat v jiných podmínkách např. při kompostování [44].

### 6.2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti polymeru ovlivňující biodegradabilitu

Faktorů, které ovlivňují biodegradovatelnost polymeru, je celá řada. Patří mezi ně samozřejmě přítomnost potřebné mikroflóry a podmínky umožňující její růst, případně takové podmínky, které se samy podílejí na degradaci polymeru. Stejně důležitými faktory, které ovlivňují biodegradabilitu polymeru, jsou jeho fyzikální a chemické vlastnosti [42].

**Chemické složení** – přítomnost C, H, N, O ve struktuře polymeru podporuje růst mikroorganismů a biodegradabilitu polymeru.

**Strukturní jednotnost** – monomerní jednotky, které obsahují různé chemické struktury a chemické vazby vyžadující k biodegradaci kooperaci více enzymů.

**Strukturní podobnost** – funkční skupiny a chemické vazby, které se nacházejí v přírodních polymerech, jako jsou např. amidová nebo esterová vazba, jsou obecně snadněji biodegradovatelné působením mikroorganismů a enzymů.

**Molekulová hmotnost** – vzrůst molekulové hmotnosti je spojen s klesající biodegradabilitou polymeru. Ve většině případů mikroorganismy nedegradují syntetické polymery, jejichž relativní molekulová hmotnost je vyšší než 20 000.

**Zesítnění** – k inhibici penetrace enzymů do polymeru a tím i ke snížení biodegradability polymeru dochází, i když se při zesítnění redukuje krystalická struktura polymeru.

**Flexibilita řetězce** – flexibilní řetězce umožňují tvorbu komplexu enzym – substrát, a tím zvyšují biodegradabilitu polymeru.

**Přítomnost hydrofilních funkčních skupin** – hydrofilní skupiny zvyšují pravděpodobnost enzymatické reakce, protože zvyšují rozpustnost polymeru, případně alespoň umožňují přístup vody (pro většinu biodegradčních reakcí je voda nezbytná).

**Krystalické struktury** – amorfni oblasti jsou snadněji biodegradovatelné, krystalické materiály mohou být biodegradovány pouze na povrchu, protože enzymy nemohou penetrovat do pevné struktury krystalů.

**Porozita materiálu** – se vzrůstající porozitou materiálu vzrůstá také velikost povrchu, na kterém může docházet k vytváření komplexu substrát - enzym.

**Typ kontaktu** – nejlepší biodegradční podmínky jsou v roztoku.

**Koncentrace substrátu** – pro enzymy jsou optimální podmínky ve zředěných roztocích [42, 43, 48].

Dalším důležitým faktorem ovlivňující biodegradabilitu syntetických polymerů, je přítomnost aditiv, plastifikátorů a stabilizátorů. Typickým příkladem je polyvinylchlorid (PVC). Díky vysokému obsahu chloru je vůči biodegradaci prakticky rezistentní. Ale některé jeho plastifikátory a stabilizátory mohou být využívány mikroorganismy. Mezi mikroorganismy, které dokážou využít plastifikátory, patří např. rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pollularia* a *Trichoderma* [42, 43].

## 7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 7.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

#### 7.1.1 Chemikálie

##### 7.1.1.1 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

Pro optimalizaci média byly použity polosyntetické laktosové a glukosové média a syntetické médium s minerály a vitamíny a pro kultivaci polyuretanových fólií na třepačce bylo připraveno syntetické médium s minerály a vitamíny.

#### *I. Polosyntetické optimalizované laktosové médium*

Laktóza	4 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
Kvasničný extrakt	2 g
Pepton	6 g
Destilovaná voda	1000 ml

#### *II. Polosyntetické optimalizované glukosové médium*

Glukóza	4 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
Kvasničný extrakt	2 g
Pepton	6 g
Destilovaná voda	1000 ml

#### *III. Syntetické médium s minerály a vitamíny*

Glukóza	8 g - C zdroj
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g - N zdroj
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,52 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,05 g
Roztok stopových prvků*	10 ml
Vitamínový roztok**	2,5 ml
Destilovaná voda	1000 ml

\* Roztok stopových prvků:

FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Roztok stopových prvků ***	100 ml
Destilovaná voda	900 ml

*** Roztok stopových prvků:	
ZnSO <sub>4</sub>	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,03 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 g
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 g
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,03 g
Destilovaná voda	1000 ml

** Vitamínový roztok	
p-Aminobenzoát	1 mg
Biotin	0,2 mg
Nikotinová kyselina	2 mg
Thiamin	1 mg
Ca-Pantotenát	0,5 mg
Pyridoxamin	5 mg
Destilovaná voda	100 ml

### 7.1.1.2 Chemikálie pro stanovení CHSK

#### Standardní roztok hydrogenftalanu draselného (HFK):

0,851 g HFK bylo rozpuštěno v 1000 ml odměrné baňce a doplněno po rysku. (použitý HFK byl předem jemně rozetřen a vysušen do konstantní hmotnosti při 105 °C)  
 Připravený standardní roztok měl CHSK 1000 mg.l<sup>-1</sup>.

#### Oxidační roztok:

Do 500 ml destilované vody bylo přidáno 10,2148 g dichromanu didraselného (předem vysušeného při 110 °C na 2 hodiny) a za stálého míchání 167 ml koncentrované kyseliny sírové a 33,33 g HgSO<sub>4</sub>.

#### Katalyzátorový roztok:

10 g síranu stříbrného bylo rozpuštěno v 1000 ml koncentrované kyseliny sírové.

### 7.1.1.3 Chemikálie pro stanovení redukujících cukrů

#### Standardní roztok glukosy:

10 mg glukosy bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody.

#### Somogyi – Nelsonovo činidlo I:

V 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 24 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 16 g NaHCO<sub>3</sub>, 144 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 12 g Seignettovy soli (vinan sodno-draselný).

#### Somogyi – Nelsonovo činidlo II:

V 200 ml destilované vody byly rozpuštěny 4 g CuSO<sub>4</sub> . 5 H<sub>2</sub>O a 24 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### **Somogyi – Nelsonovo činidlo III:**

Bylo rozpuštěno 25 g molybdenanu amonného ve 450 ml destilované vody a poté bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové a 3 g  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ve 25 ml vody.

#### **7.1.1.4 Chemikálie pro stanovení obsahu neutrálních sacharidů**

*Roztoky a chemikálie:*

- Koncentrovaná  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 5 % vodný roztok fenolu ve vodě
- Základní roztok D-glukosy o koncentraci 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (10 mg/100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

#### **7.1.1.5 Chemikálie pro stanovení celkových proteinů**

**Kalibrační standard:** Bylo rozpuštěno 0,3 mg krystalického BSA (hovězí albumin) v 1 ml destilované vody.

#### **Hartree-Lowryho činidla:**

**Roztok A:** Byly rozpuštěny 2 g vinanu sodno-draselného, 4  $\text{H}_2\text{O}$ , 100 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 500 ml 1 mol/l NaOH a doplněno vodou do 1000 ml.

**Roztok B:** Byly rozpuštěny 2 g vinanu sodno-draselného, 4  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 90 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a 10 ml 1 mol/l NaOH.

**Roztok C:** Byl zředěn 1 objem Folin-Ciocalteuova činidla s 15 objemy vody.

### **7.1.2 Přístroje**

- Spektrofotometr Unicam typ Helios Epsilon
- Centrifuga Hettich EBA 20
- Pec Mora 524
- Analytické váhy
- Mrazicí box Ecold HFL 230
- Termostatovaná třepačka, Heidolph Promax 1020, Labicom s.r.o. (ČR)
- Turbidimetr Eutech Instruments Turbidimetr NT – 100
- Sušárna Memmert
- Dvojvaříč Eta 311901
- Běžné laboratorní sklo



*Obr. Termostatovaná třepačka*

### **7.1.3 Materiál**

#### **7.1.3.1 Použité kmeny bakterií a příprava kultivace**

K testování biodegradability modifikovaných PUR fólií byla použita aerobní bakteriální směsná termofilní kultura rodů *Bacillus* a *Thermus*, která je používána k aerobnímu čištění odpadních vod v čistírně odpadních vod v Bystřici pod Hostýnem.

Odstředěná a promytá biomasa byla uchovávána v hlubokochladícím boxu při -30 °C ve zkumavkách s kryoprotektikem glycerolem, kde poměr biomasy a glycerolu byl 5:2. K přípravě inokula byla použita buď přímo zamražená kultura, nebo kultura již rekultivovaná na třepačce (60 °C, 100 rpm, 24 hod.)

#### **7.1.3.2 Testované PUR fólie**

Veškeré vzorky polyuretanových fólií byly poskytnuty pracovníky Ústavu chemie materiálů FCH VUT v Brně. Pro přípravu fólií byl použit polyeterový polyol, tolynediisocyanát 80/20 (TDI), cínový a aminový katalyzátor. Polyuretanové fólie byly připraveny bez použití pěnidla (vody). Jako modifikační činidla byly použity tyto polymery: acetylovaný škrob (AŠ), acetylovaná celulóza (AC), 2-hydroxyethyl celulóza (HEC), karboxymethyl celulóza (CMC) a pšeničná bílkovina (PB). Koncentrace modifikačních činidel byla 10% kromě PB (1 %).

##### **7.1.3.2.1 Příprava PUR fólií pro kultivaci na třepačce**

Jednotlivé fólie byly nastříhány na malé čtverečky o hmotnosti asi 0,25 g a zváženy na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa.

## **7.2 Kultivace**

### **7.2.1 Biodegradace modifikovaných PUR fólií na třepačce**

Do 100 ml Erlenmayerových baněk bylo připraveno 50 ml syntetického média s minerály a vitamíny (složení viz 7.1.1.1), kdy každá obsahovala jednu z pěti druhů polyuretanových fólií, které byly předem zváženy na analytických vahách. Vždy jedna baňka sloužila jako kontrola a neobsahovala žádnou PUR fólii. Erlenmayerovy baňky s médiem a fólií (nebo bez) byly zaočkovány 5 ml rekultivovaného inokula. Kultivace byla provedena na termostatované třepačce při 60 °C a 100 rpm. Každých 24 hodin byla proměřena absorbance při 630 nm proti vodě a jednou za 2 nebo 3 dny bylo odebráno 1,5 ml vzorku na stanovení CHSK. Po skončení testu byly fólie pečlivě promyty destilovanou vodou a ethanolem a vysušeny do konstantní hmotnosti při 40 °C, poté zváženy a byl zjištěn celkový hmotnostní úbytek

## 7.2.2 Biodegradace modifikovaných PUR fólií při absenci C nebo N zdroje

### 7.2.2.1 Příprava kultury

Směsná termofilní kultura byla kultivována 24 hodin ve 250 ml kompletního média, poté bylo 50 ml kultury stočeno (8000 rpm, 5 min., 40°C) a promyto médiem s absencí zdroje uhlíku. Buněčná suspenze byla rozsuspendována celkem v 10 ml média (bez zdroje uhlíku) a přidána do 40 ml média také bez zdroje uhlíku. Stejným postupem byla připravena limitace dusíkem.

### 7.2.2.2 Příprava PUR fólií

Fólie byly nastříhány na malé čtverečky a hmotnosti asi 0,25 g a byly zváženy s přesností na čtyři desetinná místa na analytických vahách.

### 7.2.2.3 Kultivace a stanovení míry degradace

Kultivace probíhala ve 100 ml Erlenmayerových baňkách v 50 ml média na termostatovaných třepačkách (60°C, 100 rpm). V asi 24 hodinových intervalech byly odebírány vzorky a bylo určeno množství biomasy. Po ukončení kultivace byly fólie dokonale promyty v destilované vodě a etanolu a šetrně vysušeny v termostatu při 40 °C do konstantní hmotnosti. Poté byly fólie zváženy a byl určen jejich hmotnostní úbytek.

## 7.3 Bioinženýrské charakteristiky

### 7.3.1 Měrná růstová rychlost

Měrná růstová rychlost se stanoví v exponenciální fázi růstu buněk. Je definována jako:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

kde X je koncentrace biomasy po kultivaci; t je čas.

Po separaci proměnných a integraci získá vztah podobu:

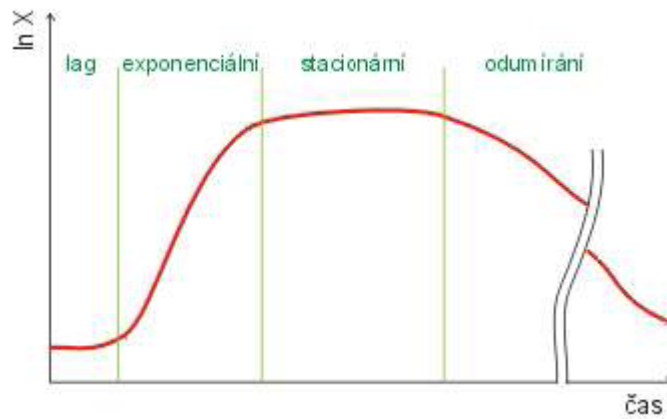
$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \quad (2)$$

Experimentálně se proměří závislost  $\ln X = f(t)$  a pomocí metody lineární regrese se určí měrná růstová rychlost jako směrnice přímky [40].

### Růstová křivka mikroorganismů

Pro analýzu růstu mikrobiální populace je základní modelovou situací růst čisté kultury v uzavřeném, uměle připraveném homogenním prostředí, které obsahuje nadbytek živin. Růst mikroorganismů lze vyjádřit růstovou křivkou (viz obr. 19). Jestliže se buňky dostanou do kontaktu se substrátem, kterého mohou využívat pro svůj růst, začnou se rozmnožovat svým typickým způsobem: bakterie dělením, kvasinky pučením. Znamená to, že z jedné buňky

vzniknou dvě, z těchto dvou buněk následujícím dělením čtyři atd. Takto proces dělení pokračuje dále, pokud trvají příznivé podmínky (koncentrace živin, přítomnost kyslíku, pH, teplota apod.). Rychlost dělení na těchto podmínkách závisí [41].



Obr 19. Růstová křivka [41].

### 7.3.2 Výtěžnostní koeficient

Spotřeba substrátu a tvorba produktu při fermentaci jsou dány stechiometrií procesu a jejich rychlost souvisí s rychlostí růstu mikroorganismů. Pro vyjádření stechiometrických vztahů se používá tzv. výtěžnostních koeficientů. Výtěžnostní koeficient biomasy ze substrátu  $Y_{X/S}$  (množství biomasy vyrostlé z jednotkového množství substrátu) a výtěžnostní koeficient produktu ze substrátu  $Y_{P/S}$  (množství produktu vzniklé fermentací z jednotkového množství substrátu) jsou definovány vztahy:

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} \quad (3)$$

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad (4)$$

Vztah mezi rychlostí růstu biomasy a rychlostí spotřeby substrátu pak bude

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

a vztah mezi rychlostí spotřeby substrátu a rychlostí tvorby produktu bude

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{1}{Y_{P/S}} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (6) [41].$$

## 7.4 Analytické metody

Při optimalizaci média bylo provedeno stanovení biomasy turbidimetricky i gravimetricky. Při kultivaci PUR fólií na třepačce byl využit supernatant ke stanovení CHSK.

### 7.4.1 Stanovení množství biomasy

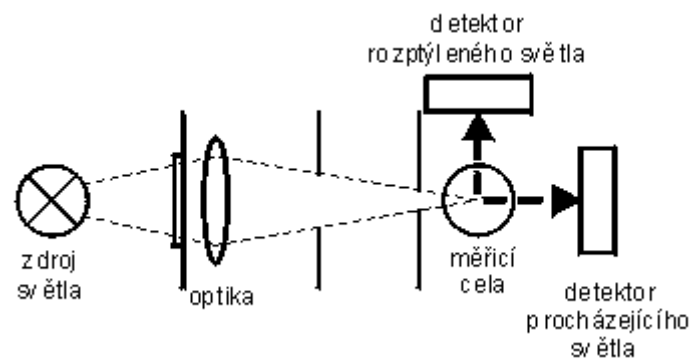
#### 7.4.1.1 Turbidimetrie

##### Princip:

Metoda měření koloidních nebo zakalených roztoků ve směru primárního záření, které dopadá na kyvetu analogicky jako u klasické spektrofotometrie. Jde o kombinovaný efekt a měří se zdánlivá propustnost záření roztokem, která je výsledkem:

- absorpce primárního i sekundárního záření v přímém směru
- rozptyl záření do všech stran mimo přímý směr
- rozptyl záření do přímého směru [33].

Zeslabení primárního paprsku zředěnými systémy je velmi malé, proto je turbidimetrie vhodnější pro koncentrovanější systémy, zatímco nefelometrie je používána pro systémy zředěné, příp. slabě zakalené. Metody se od sebe liší také v umístění detektoru. V turbidimetrii je detektor v ose paprsku a měří záření prošlé vzorkem, které je ochuzené o rozptýlenou složku záření [34].



Obr. 20: Schéma turbidimetru (detektor procházejícího světla) a nefelometru (detektor rozptýleného světla) [32].

Pokles intenzity světelného toku je analogický poklesu při absorpci světla a platí vztah obdobný Lambert – Beerovu zákonu.

$$\log\left(\frac{y}{y_0}\right) = e_T \cdot c \cdot l \quad (7)$$

kde  $y_0$  = dopadající světelný tok

$y$  = prošlý světelný tok

$e_T$  = turbiditní koeficient

$c$  = koncentrace

$l$  = světelná dráha (tloušťka) měřicí kyvety [34].

Závislost  $T_b = f(c)$  je přímková jen pro malé koncentrace analyzu; pro vyšší koncentrace je zakřivená k ose x, protože dochází ke zvýšenému rozptylu, a také s rostoucí velikostí částičky narůstá absorpce záření [33].

#### **Postup:**

Bylo provedeno proměření zákalu turbidimetricky. Odebraný vzorek byl protřepán, umístěn do kyvety přístroje a byla proměřena turbidita třikrát po sobě a z hodnot byl vypočítán aritmetický průměr. Výsledná turbidance v jednotkách NTU byla přepočítána na koncentraci sušiny biomasy pomocí kalibrační křivky, která byla vytvořena vážkovým stanovením sušiny biomasy a jeho srovnáním s turbidimetrickým stanovením zákalu.

#### **7.4.1.2 Gravimetrie**

##### **Princip:**

Gravimetrie (vážková analýza) je metodou chemické kvantitativní analýzy, která je založená na vyloučení stanovované složky ve formě málo rozpustné sloučeniny (tj. vylučovací forma složky) a na jejím převedení na sloučeninu o přesně definovaném složení (tj. forma k vážení), která se poté váží. V některých případech se váží přímo izolovaná sraženina [51].

##### **Postup:**

Odebraných 5 ml vzorku bylo zcentrifugováno ( $2500 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ , 15 minut) a po stočení byl supernatant odlit. Sediment po centrifugaci byl promyt 5 ml destilované vody, protřepán a opět stočen. Poté byl supernatant odlit a sediment byl kvantitativně převeden do předem zvážené a vysušené odpařovací misky, které byly poté s biomasou sušeny do konstantní hmotnosti při  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po vysušení byly odpařovací misky ochlazeny v exsikátoru na laboratorní teplotu a zváženy na analytických vahách. Z rozdílu hmotnosti odpařovací misky se sušinou a prázdné odpařovací misky byla stanovena koncentrace biomasy.

#### **7.4.2 VIS spektrofotometrie**

Spektrofotometrie patří mezi optické metody, které jsou založené na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením. Podstatou je absorpce viditelného záření (400 – 800 nm) zředěnými roztoky molekul. Absorpce při těchto vlnových délkách je způsobena excitací valenčních elektronů [35, 37].

Absorpce VIS záření je kvantitativně popsána pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (8)$$

kde  $\varepsilon$  = molární absorpční dekadický koeficient

$c$  = koncentrace analytu v  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$

$l$  = délka absorpční dráhy (tj. délka kyvety kde je měřený roztok, a kterým prochází paprsek UV-Vis záření).

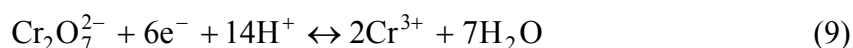
Lambert Beerův zákon je splněn pro zředěné roztoky do koncentrace asi  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  [36].

### 7.4.3 Stanovení CHSK

#### Princip:

CHSK neboli chemickou spotřebu kyslíku, lze definovat jako hmotnostní koncentraci kyslíku, která je ekvivalentní hmotnosti silného oxidačního činidla spotřebovaného za vymezených podmínek na oxidaci oxidovatelných látek obsažených v 1 l vody. Přičemž hlavní skupinu „oxidovatelných“ látek tvoří látky organické, které obsahují vody v různé koncentraci dle svého znečištění [39].

Metoda stanovení CHSK je založena na oxidaci organických látek obsažených ve vzorku (médium bez mikroorganismů) dichromanem draselným v silně kyselém prostředí kyseliny sírové při dvouhodinovém varu (při teplotě  $148\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ ). Oxidace organických látek je katalyzována ionty  $\text{Ag}^+$  a probíhá v nadbytku dichromanu. Pro maskování chloridů, jenž by způsobovaly při stanovení  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$  pozitivní chybu, se přidává síran rtuťnatý. Při oxidaci se dichromanové ionty zredukuje na ionty chromité podle reakce:



Koncentrace chromitého iontu, která je úměrná obsahu organických látek ve vzorku, se stanoví metodou absorpční spektrofotometrie při vlnové délce  $\lambda = 600\text{ nm}$ . Množství CHSK se pak určí z kalibrace [39].

#### Postup:

K 1 ml supernatantu odstředěné kultury (4000 rpm, 10 minut) bylo přidáno 9 ml destilované vody. Z tohoto naředěného roztoku bylo odpipetováno 2,5 ml do uzavíratelné zkumavky. Z dávkovací láhve bylo přidáno 1,5 ml oxidačního roztoku a 3,5 ml katalyzátorového roztoku. Zkumavky byly uzavřeny, obsah promíchán a zahříván po dobu 2 hodin při teplotě  $150\text{ °C}$ . Po dokonalém vychladnutí byl obsah zkumavek zředěn 5 ml destilované vody. Po promíchání byla stanovena absorbance vzorku při vlnové délce  $\lambda = 600\text{ nm}$ .

Kalibrace  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$  byla provedena ředěním standardního roztoku hydrogenftalanu draselného na kalibrační roztoky  $50\text{ mg.l}^{-1}$  až  $1000\text{ mg.l}^{-1}$ . Byla naměřena absorbance těchto roztoků a sestrojena kalibrační křivka.

### 7.4.4 Analýza výluhu po třepání bez kultury (abioticky)

Na termostátované třepačce bylo týden třepáno 6 Erlenmayerových baněk s médiem s minerály a vitamíny, kde byly fólie s různými plnidly, a byl zjištěn hmotnostní úbytek těchto fólií. Bylo zjištěno, jaké množství z tohoto úbytku byly polysacharidy, redukující cukry a v případě PB (pšeničné bílkoviny) bílkoviny.

#### 7.4.4.1 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise

#### Princip:

Tato metoda je založena na dehydrataci cukrů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklého furfuralu či 5-hydroxymethylfurfuralu s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze spektrofotometricky stanovit. Neutrálními sacharidy se rozumí „pravé“ cukry, tedy ne např. jejich aminoderiváty [49].

**Postup:**

Pro kalibraci byly připraveny vodné roztoky o koncentraci 0 až 100 µg/ml (ze základního roztoku D-glukosy bylo pipetováno 0; 0,1; 0,2 až 1 ml a doplněno vodou do 1 ml). K 1 ml všech vzorků a standardů byl přidán 1 ml 5 % roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla ihned protřepána a poté stála při laboratorní teplotě 30 minut. Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 490 nm.

**7.4.4.2 Stanovení redukujících cukrů metodou Somogyi – Nelson****Princip:**

Redukující sacharidy v alkalickém prostředí a za zvýšené teploty (100 °C) redukují měďnatou sůl obsaženou v Somogyiho činidle. Vznikající měďná sůl vytváří s Nelsonovým činidlem modrozelený komplex, jehož koncentrace se určí měřením absorbance při 540 nm proti slepému pokusu [49].

**Postup:**

Do zkumavky bylo nepipetováno 0,5 ml Somogyiho činidla (I. + II. v poměru 4:1) a přidáno 0,5 ml supernatantu a to vše bylo 10 minut povařeno ve vodní lázni a následně ochlazeno na laboratorní teplotu. Poté bylo do zkumavky přidáno 0,5 ml Nelsonova roztoku (činidlo III.) a doplněno 3,5 ml destilované vody. Obsah zkumavky byl dobře promíchán a na spektrofotometru byla změřena absorbance proti blanku při 530 nm.

Kalibrace byla připravena ze standardního roztoku glukosy ředěním destilovanou vodou na kalibrační roztoky o koncentraci 5 – 100 mg/l a dále byly zpracovány jako vzorky. Z hodnot absorbance byla sestrojena kalibrační křivka.

**7.4.4.3 Stanovení celkových proteinů Hartree-Lowryho metodou****Princip:**

Původní Lowryho metoda z roku 1951 patří k nejcitovanějším pracem v biochemii. Stanovení je kolorimetrické, založené na dvousložkovém činidle. První složkou je biuretové činidlo, druhou složkou je Folin-Ciocalteu činidlo na fenoly. Jsou to polykyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrozinovými zbytky proteinů a barví se modře. Metoda byla mnohokrát upravena. Prováděné stanovení je modifikace, kterou vypracoval Hartree v roce 1972. Verze využívá tři činidla, z nichž první dvě jsou biuretové stanovení, namísto původních pěti. Dochází k tvorbě daleko intenzivnějšího zbarvení (zvýšená citlivost) a stanovení je lineární v širším rozsahu koncentrací [50].

**Postup:**

Byly připraveny a naředěny kalibrační standardy ve stejném roztoku jako vzorek. Koncentrace kalibračních roztoků byla v rozmezí 30 – 300 µg/ml.

K 1 ml vzorku obsahující protein, ke kalibračnímu standardu nebo blanku bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A. Roztok byl inkubován 10 min ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C a poté ochlazen na laboratorní teplotu. Dále do každé zkumavky bylo přidáno 0,1 ml činidla B, protřepáno a inkubováno na 10 minut při laboratorní teplotě. Poté do každé zkumavky byly rychle přidány 3 ml činidla C, zamícháno a inkubováno 10 minut ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C a ochlazen.

Byla změřena absorbance vzorku a kalibračních roztoků při 650 nm.

#### **7.4.5 Mikroskopování PUR fólií**

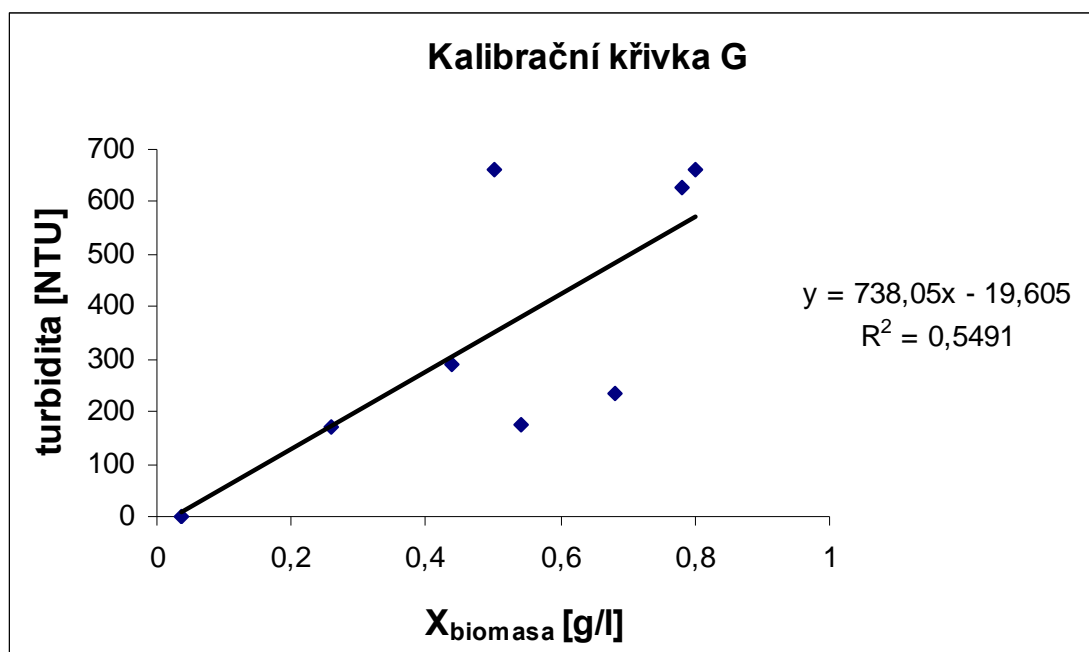
PUR fólie byly sledovány na mikroskopu před a po čtrnáctidenní degradaci (zvětšení 40 krát) a poté byly vyfotografovány fotoaparátem k mikroskopu GKB 1/3 color digital CCD kamera a dále zpracovány.

## 8. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 8.1 Kalibrace turbidimetrického stanovení biomasy

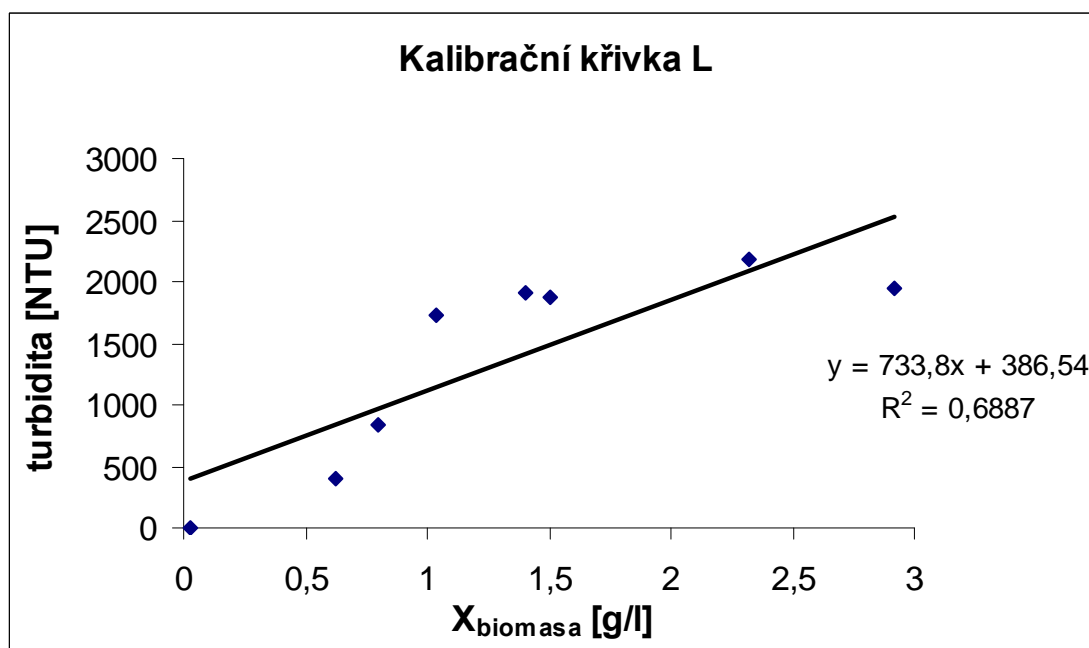
Ze závislostí turbidit na koncentracích biomasy (hodnoty turbidimetrického měření zákalu suspenze buněk) a gravimetrických měření množství biomasy byly sestrojeny kalibrační křivky, a to jak pro glukosové a laktosové médium, tak pro médium s minerály a vitamíny.

#### 8.1.1 Glukosové médium



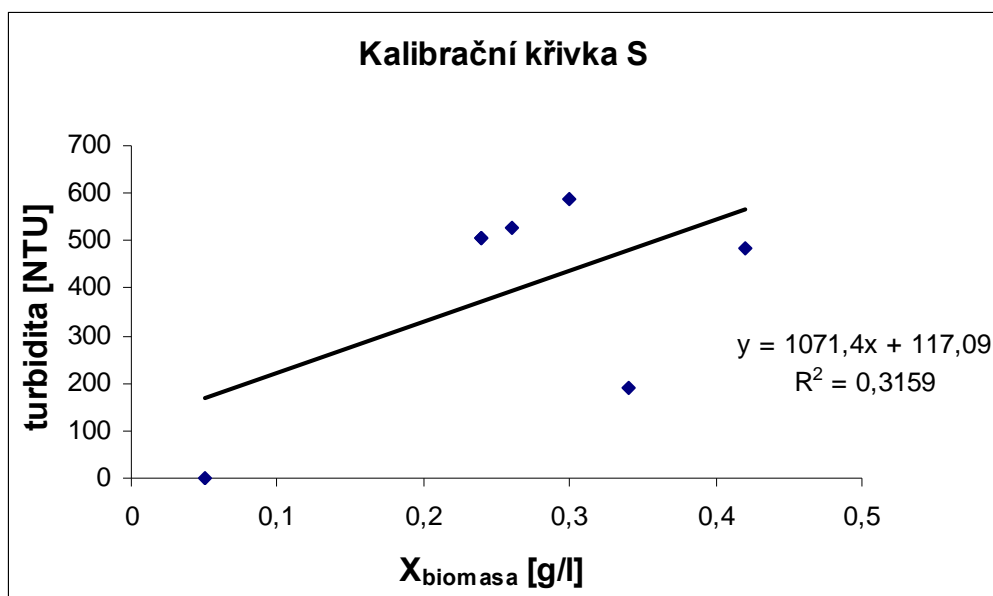
Graf 2: Kalibrační křivka glukosového média

#### 8.1.2 Laktosové médium



Graf 3: Kalibrační křivka laktosového média

### 8.1.3 Médium s minerály a vitamíny



Graf 4: Kalibrační křivka média s minerály a vitamíny

## 8.2 Výběr média pro biodegradační experimenty

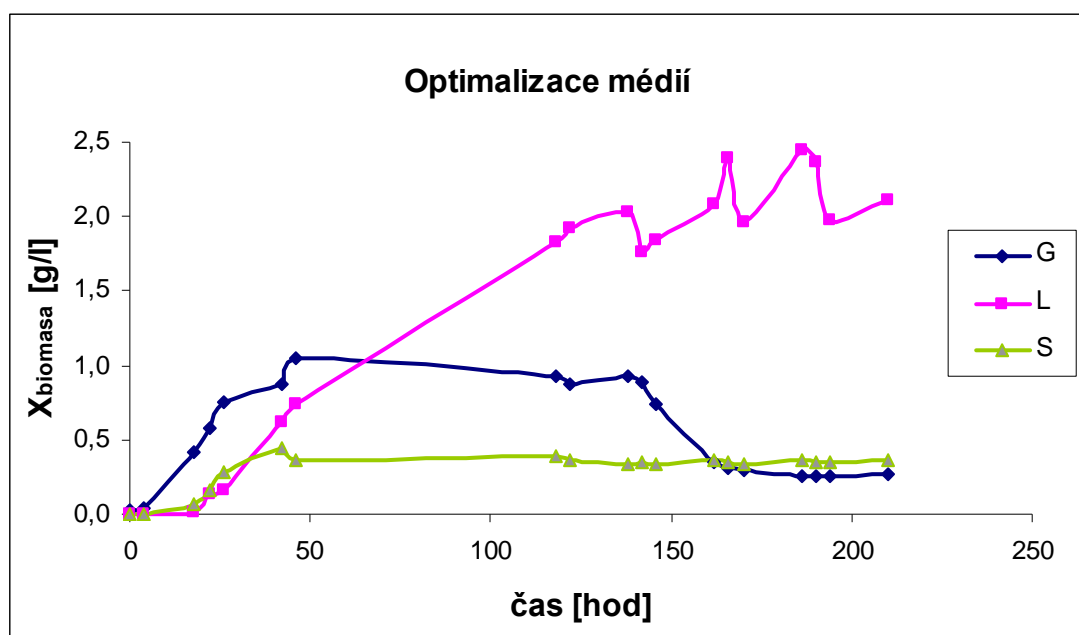
Cílem tohoto experimentu bylo otestovat tři média používaná ke kultivaci termofilní kultury a vybrat médium, na kterém bude kultura vykazovat nejvhodnější růstové parametry pro dlouhodobé biodegradační experimenty.

Tab. 2: Růst kultury v syntetickém a polosyntetických médiích

$X_{\text{biomasa}}$ [g/l]			čas [hod]
G	L	S	
0,027	0,000	0,000	0
0,042	0,000	0,000	4
0,421	0,019	0,069	18
0,571	0,136	0,167	22
0,754	0,165	0,278	26
0,876	0,621	0,439	42
1,049	0,736	0,369	46
0,922	1,835	0,385	118
0,869	1,918	0,363	122
0,925	2,035	0,343	138
0,884	1,766	0,345	142
0,738	1,846	0,340	146
0,345	2,083	0,357	162
0,310	2,393	0,346	166
0,299	1,968	0,343	170
0,258	2,451	0,363	186
0,256	2,366	0,350	190
0,250	1,976	0,345	194
0,265	2,113	0,362	210

G = glukosové médium  
 L = laktosové médium  
 S = syntetické médium s minerály a vitamíny  
 Složení těchto tří médií je popsáno v kapitole 7.1.1.1.

Pro stanovení růstových křivek směsné termofilní kultury pro jednotlivá média byly hodnoty zákalu přepočteny na množství biomasy v g/l z rovnic lineárních regresí z příslušných kalibračních křivek.



Graf 5: Turbidimetrické stanovení biomasy pro všechny 3 média

Z porovnání růstových křivek jednotlivých médií je patrné, že největší růst biomasy (i když se zřetelnou počáteční krátkou lag fází) nastal u laktosového média. Avšak po 140. hodině začala koncentrace biomasy velmi kolísat, a proto laktosové médium nebylo nejvhodnější pro další biodegradční testy.

Na glukosovém médiu vykazovala kultura rychlý růst téměř exponenciálního charakteru, který byl ukončen v 50. hodině. Poté následovala přibližně 100 hodinová stacionární fáze, po níž došlo k odumírání kultury. Toto chování je pro dlouhodobé testy nevýhodné, a proto jsem pro všechny následující testy zvolila médium, na kterém sice nedošlo k nejintenzivnější tvorbě biomasy, ale kultura vykazovala nejstabilnější růstové parametry. Navíc složení média s vitamíny a minerály umožňuje provést limitaci uhlíkatým a dusíkatým zdrojem. Tato možnost u ostatních médií díky přítomnosti komplexního zdroje (pepton, kvasničný autolyzát) nepřicházela v úvahu.

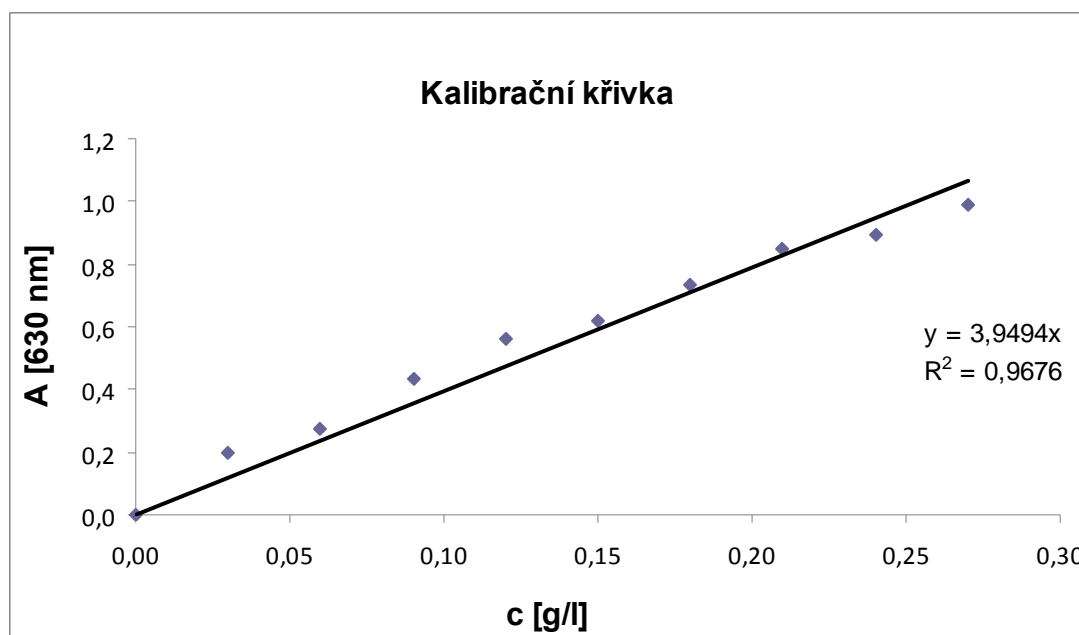
## 8.3 Optimalizace složení média s minerály a vitamíny

### 8.3.1 Kalibrace spektrofotometrického stanovení koncentrace biomasy

Byla sestrojena kalibrační křivka závislosti absorbance (630 nm) na koncentraci biomasy (g/l).

Tab. 3: Hodnoty kalibrační křivky

c [g/l]	A <sub>630</sub>
0,00	0,000
0,03	0,195
0,06	0,273
0,09	0,431
0,12	0,560
0,15	0,620
0,18	0,731
0,21	0,852
0,24	0,895
0,27	0,987
0,30	1,042



Graf 6: Kalibrační křivka pro přepočítání absorbance na koncentraci sušiny biomasy

Podle naměřených hodnot koeficientů spolehlivosti je spektrofotometrické stanovení biomasy při vlnové délce 630 nm výrazně přesnější a spolehlivější než měření na turbidimetru. Z tohoto důvodu bylo spektrofotometricky stanovení použito ve všech následujících experimentech.

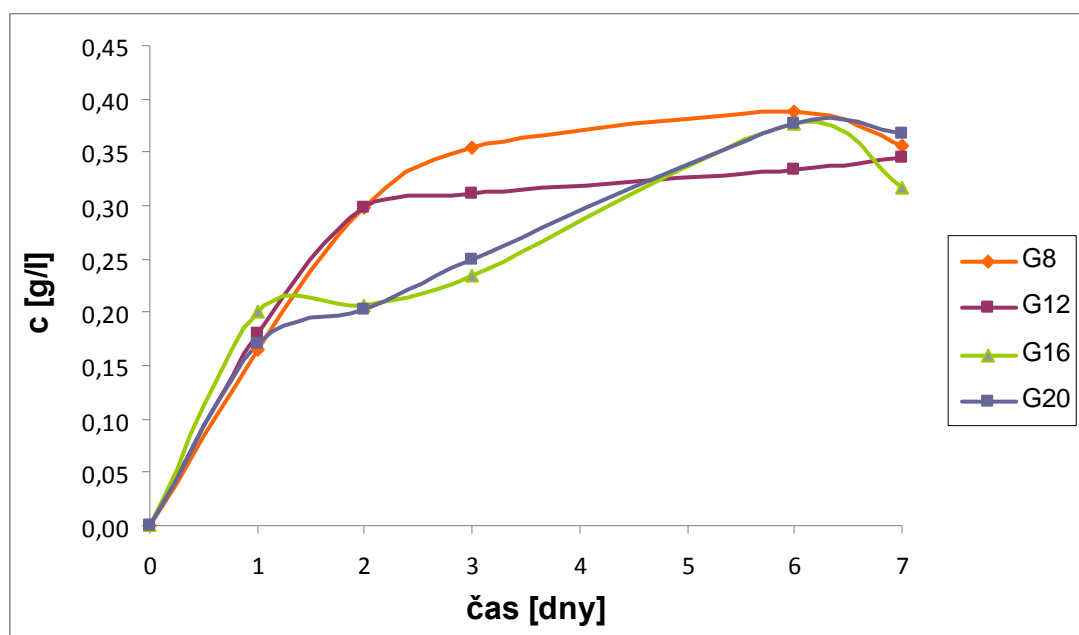
### 8.3.2 Optimalizace koncentrace zdroje uhlíku

Bylo připraveno médium s minerály a vitamíny o různých koncentracích glukosy (8, 12, 16 a 20 g/l) a síranu amonného (1, 3, 5 a 7 g/l) a byla provedena kultivace za účelem zjistit, která koncentrace zdroje C a N je nejvhodnější pro další biodegradační testy.

Pomocí sestrojené kalibrační křivky byla přepočtena absorbance médií s různou koncentrací C a N na koncentraci biomasy v g/l a sestrojena růstová křivka závislosti koncentrace biomasy na čase.

Tab. 4: Růst biomasy v syntetickém médiu při různých koncentracích glukosy

c [g/l]				čas [dny]
G <sub>8</sub>	G <sub>12</sub>	G <sub>16</sub>	G <sub>20</sub>	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0
0,1641	0,1793	0,2000	0,1714	1
0,2988	0,2983	0,2059	0,2031	2
0,3535	0,3104	0,2345	0,2486	3
0,3879	0,3342	0,3763	0,3773	6
0,3565	0,3449	0,3170	0,3671	7



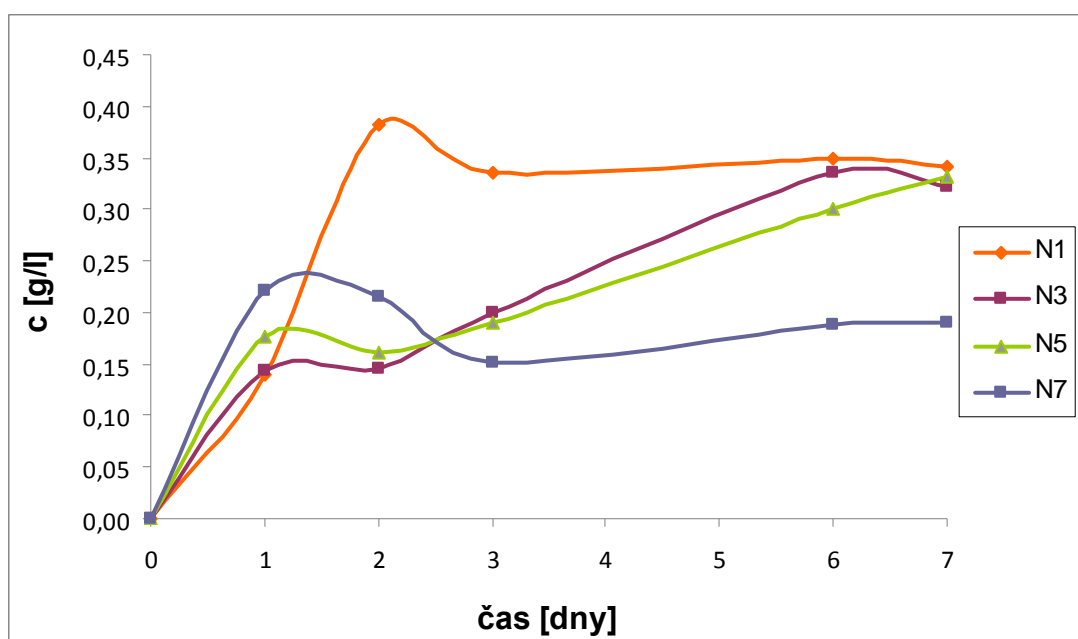
Graf 7: Růstová křivka termofilů v médiu s různými koncentracemi glukosy jako zdroje uhlíku

Vysoké koncentrace cukru (16 a 20 g/l) růst spíše inhibují, je možné, že již dochází k inhibici substrátem. Termofilní kultura vykazovala nejlepší parametry růstu a nejstabilnější vlastnosti při kultivaci na médiu s obsahem 8 g/l glukosy jako jediného zdroje uhlíku. Proto byla tato koncentrace použita v následujících biodegradačních experimentech.

### 8.3.3 Optimalizace koncentrace zdroje dusíku

Tab. 5: Růst biomasy v syntetickém médiu při různých koncentracích síranu amonného

c [g/l]				čas [dny]
N <sub>1</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>7</sub>	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0
0,1388	0,1428	0,1772	0,2213	1
0,3828	0,1456	0,1600	0,2145	2
0,3352	0,1998	0,1904	0,1509	3
0,3484	0,3363	0,3008	0,1874	6
0,3418	0,3226	0,3317	0,1894	7



Graf 8: Růstová křivka termofilů v médiu s různými koncentracemi síranu amonného jako zdroje dusíku

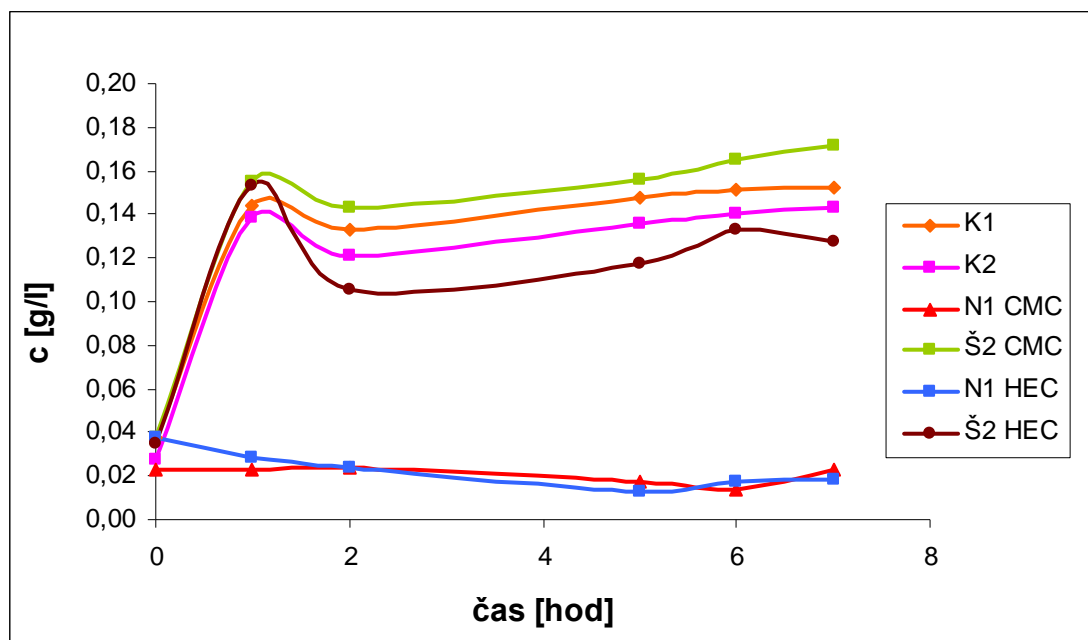
Taktéž bylo vyzkoušeno, při které koncentraci síranu amonného (zdroj dusíku) budou termofilní bakterie růst nejlépe. Jako optimální se jeví koncentrace 3 g/l, při této hodnotě vykazuje směsná kultura rovnoměrný a vyrovnaný růstové parametry prakticky po celou dobu testu. Nižší koncentrace dusíkatého zdroje vedla sice k prudkému nárůstu biomasy, ale také k brzkému nástupu stacionární fáze. Stejně tak vyšší koncentrace síranu amonného mají spíše negativní vliv na růst kultury (velmi patrné především pro koncentraci 7 g/l).

## 8.4 Porovnání dvou šarží PUR fólií při biodegradaci v syntetickém médiu

Cílem krátkodobého degradačního experimentu bylo srovnat stejné PUR folie, které však byly připraveny přibližně s odstupem jednoho roku (dvě šarže).

Tab. 6: Růst biomasy v přítomnosti PUR fólií dvou různých šarží

c [g/l]						čas [dny]
K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	N <sub>1</sub> CMC	Š <sub>2</sub> CMC	N <sub>1</sub> HEC	Š <sub>2</sub> HEC	
0,0375	0,0271	0,0228	0,0375	0,0375	0,0344	0
0,1443	0,1382	0,0233	0,1555	0,0281	0,1532	1
0,1332	0,1215	0,0235	0,1431	0,0241	0,1051	2
0,1481	0,1362	0,0175	0,1557	0,0132	0,1177	5
0,1517	0,1408	0,0139	0,1653	0,0175	0,1332	6
0,1522	0,1431	0,0228	0,1719	0,0187	0,1274	7



Graf 9: Porovnání růstových křivek termofilů v médiu za přítomnosti PUR fólií dvou šarží

K1,2 = kontroly (bez fólie)

N1 = šarže 1, Novotný

Š2 = šarže 2

Fólie první šarže nedovolily směsné kultuře růst. Je pravděpodobné, že toxický efekt byl způsoben látkami, které se z fólií uvolnily do média, a následně inhibovaly růst bakteriální kultury. V dalších testech byly proto využity fólie z druhé šarže, které růst kultury neinhibovaly a naopak fólie modifikovaná CMC (karboxymethyl celulósa) podpořila růst kultury oproti kontrole.

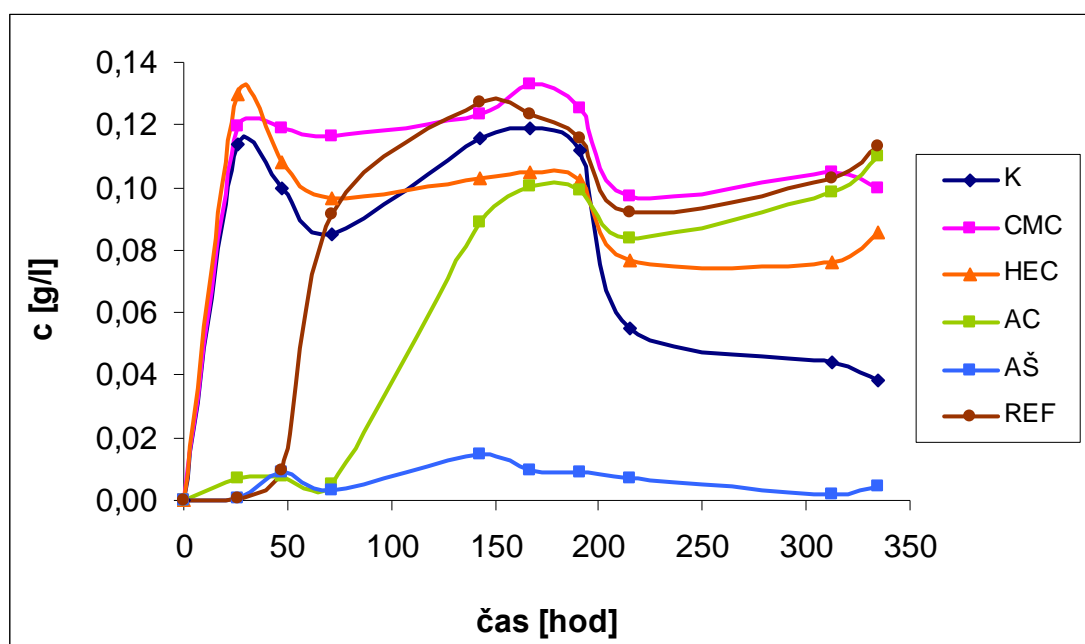
## 8.5 Střednědobý biodegradační test PUR fólií v kompletním syntetickém médiu

### 8.5.1 První fáze biodegradačního testu (prvních 14 dní)

Princip biodegradačního testu spočíval v kultivaci termofilní kultury v přítomnosti modifikovaných PUR fólií. V průběhu testu byl sledován růst biomasy, změna CHSK média a také byl stanoven hmotnostní úbytek fólií po degradaci. Cílem testu bylo posoudit vliv jednotlivých fólií na růst biomasy, a zároveň otestovat, je-li možné využít směsnou termofilní kulturu k biodegradaci PUR fólií. Dalším cílem bylo experimentálně stanovit, je-li modifikace PUR fólie biodegradabilním polymerem účinným způsobem navýšení biodegradability materiálu, a najít nejvhodnější modifikační činidlo.

Tab. 7: Růst termofilů v přítomnosti PUR fólií v kompletním syntetickém médiu

c [g/l]						čas [hod]
K	CMC	HEC	AC	AŠ	REF	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0
0,1137	0,1193	0,1299	0,0073	0,0008	0,0008	26
0,0995	0,1190	0,1079	0,0076	0,0089	0,0096	47
0,0848	0,1165	0,0967	0,0051	0,0030	0,0912	71
0,1157	0,1236	0,1031	0,0889	0,0147	0,1271	143
0,1190	0,1329	0,1046	0,1005	0,0099	0,1236	167
0,1122	0,1251	0,1025	0,0993	0,0091	0,1157	191
0,0552	0,0972	0,0765	0,0836	0,0068	0,0919	215
0,0443	0,1051	0,0762	0,0985	0,0018	0,1028	312
0,0382	0,0998	0,0856	0,1101	0,0043	0,1134	335



Graf 10: Růst kultury v přítomnosti PUR fólií v kompletním syntetickém médiu

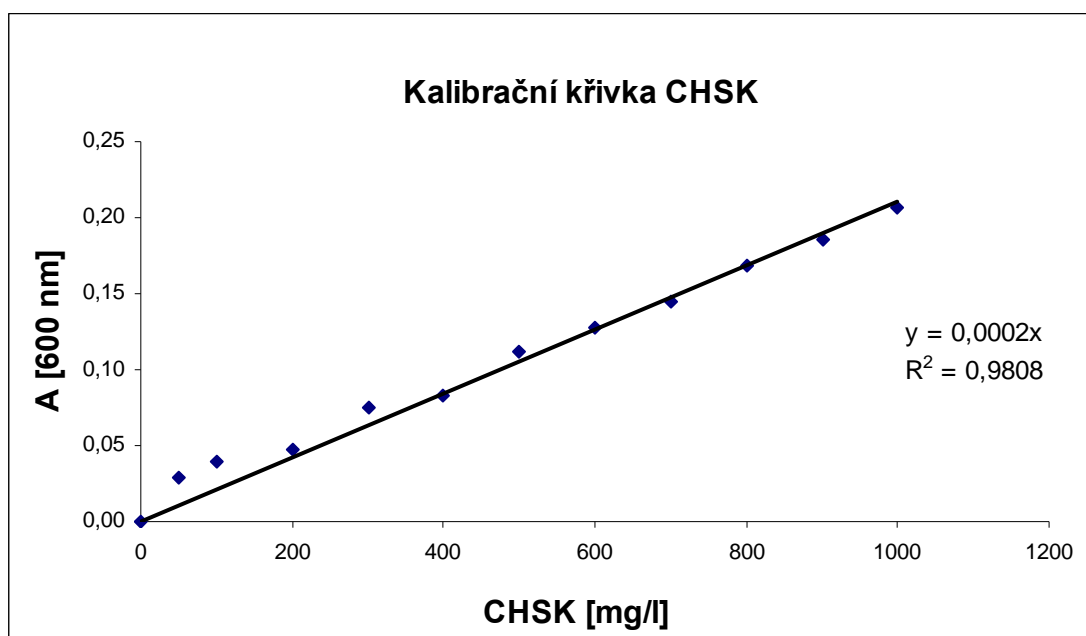
Růstové parametry kultur kultivovaných s PUR fólií byly vesměs velice podobné. Kromě fólie modifikované 10 % AŠ, u které byly termofilové po celou dobu kultivace víceméně v lag fázi. Nízká hladina biomasy byla nalezena také v poslední fázi kultivace u kontroly, která neobsahuje žádnou fólii, a tak neměla kultura po vyčerpání živin z média další zdroj uhlíku pro svůj růst.

### 8.5.1.1 Kalibrace CHSK

Byla sestrojena kalibrační křivka pro přepočítání absorbance na koncentraci v mg/l.

Tab. 8: Naměřená data kalibrace CHSK

c [mg/l]	A <sub>600</sub>
0	0,000
50	0,029
100	0,039
200	0,048
300	0,075
400	0,083
500	0,112
600	0,127
700	0,145
800	0,169
900	0,185
1000	0,206

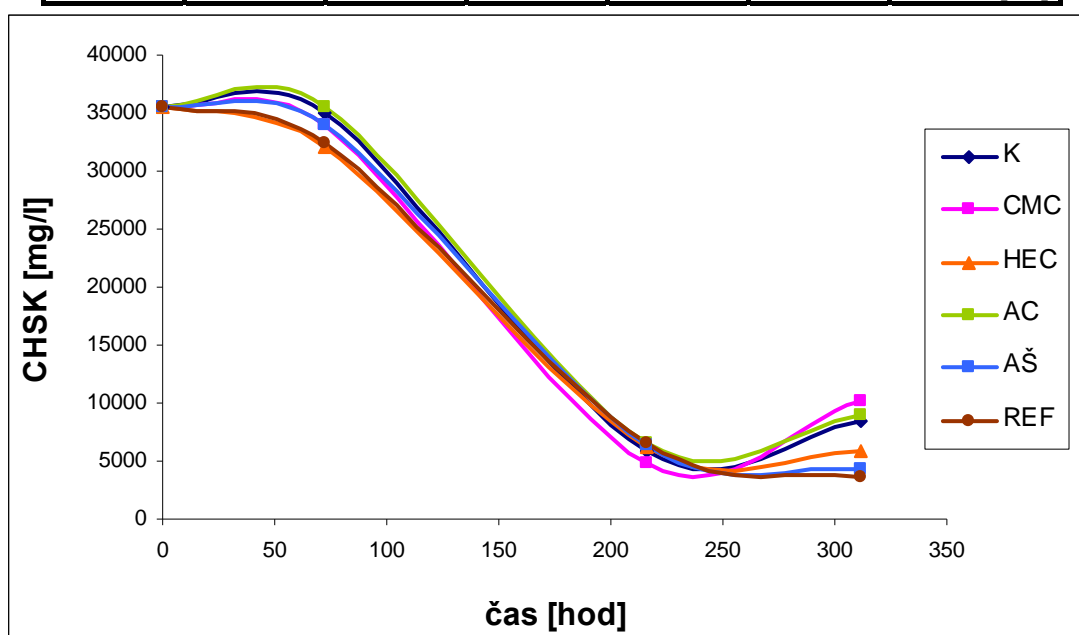


Graf 11: Kalibrační křivka CHSK

### 8.5.1.2 Změna CHSK během biodegradace

Tab. 9: Změna CHSK (mg/l) v průběhu kultivace kultury s fólií

CHSK [mg/l]						čas
K	CMC	HEC	AC	AŠ	REF	
35500	35500	35500	35500	35500	35500	0
35000	34000	32000	35500	34000	32500	72
5850	4850	6200	6600	6450	6500	216
8400	10250	5800	9050	4333	3667	312
76,34	71,13	83,66	74,51	87,79	89,67	Úbytek CHSK [%]



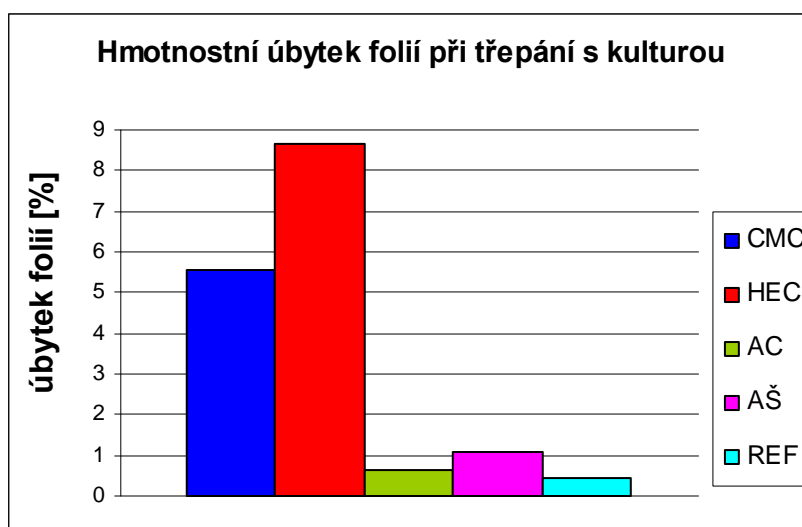
Graf 12: Změna CHSK (mg/l) v průběhu kultivace kultury s fólií

Průběh CHSK měl u všech vzorků podobný charakter. Nejnižší hodnoty CHSK, a tedy nejvyšší procentuální úbytek CHSK byl pozorován u REF fólie a u folie modifikované AŠ. Tento fakt naznačuje, že samotné fólie do média neuvolňovaly vysoké množství abiotických degradačních produktů, a zároveň byly i tyto látky bakteriální kulturou efektivně využívány, byť měly v případě AŠ na růst kultury výrazně inhibiční vliv. Naopak u folie modifikované CMC, která vykazuje vysoký hmotnostní úbytek, nedošlo pravděpodobně k efektivnímu využití všech uvolněných látek, jak naznačuje vysoká hodnota CHSK po ukončení testu.

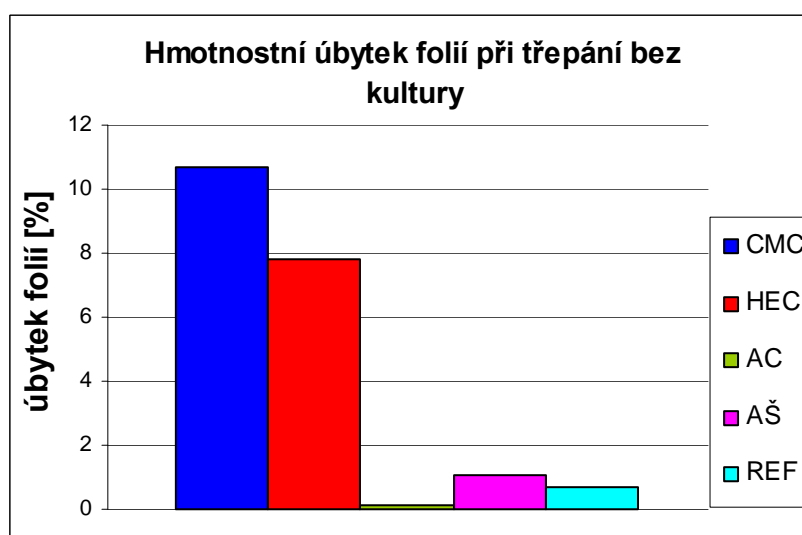
### 8.7.1.3 Hmotnostní úbytky fólií

Tab. 10: Hmotnostní úbytek fólií

S kulturou	$\Delta m$ [%]	Bez kultury	$\Delta m$ [%]
CMC	5,55	CMC	10,67
HEC	8,68	HEC	7,84
AC	0,62	AC	0,11
AŠ	1,10	AŠ	1,08
REF	0,45	REF	0,72



Graf 13: Hmotnostní úbytek fólií při třepání s kulturou



Graf 14: Hmotnostní úbytek fólií při třepání bez kultury

Srovnání hmotnostního úbytku fólií, které byly třepány v přítomnosti termofilní kultury s hmotnostním úbytkem fólií třepaných bez kultury, napovídá tomu, že termofilní bakterie se na celkovém hmotnostním úbytku fólií výrazně nepodílejí. Ke ztrátám hmotnosti fólie zřejmě dochází zejména v důsledku mechanického namáhání během třepání anebo rozpouštěním plnidla vlivem relativně vysoké teploty (60 °C). Podobné poškození je možno pozorovat jak u fólií ovlivněných kulturou, tak u fólií třepaných bez kultury. Hlavní rozdíl je u fólií s plnidlem CMC, kdy hmotnostní úbytek fólií byl větší u abiotické degradace a HEC, kdy hmotnostní úbytek fólií byl větší při třepání s kulturou. Spíše než k rozkladu fólií přímým působením termofilních bakterií dochází k abiotické degradaci materiálu, a následně k využití štěpných produktů kulturou. Ty podle svého charakteru buď podporují, nebo inhibují růst kultury.

Na základě dosažených výsledků lze formulovat následující dílčí závěry:

**REF fólie:** Kultura do 27. hodiny vykazuje lag fázi a po 27. hodině začíná fáze exponenciální, která po 71. hodině kultivace přechází ve fázi zpomaleného růstu a na konci opět mírně roste, což je zvláštní, protože referenční fólie neobsahuje žádné plnidlo, které může sloužit jako snadný zdroj uhlíku, který by mohly bakterie čerpat pro svůj růst. U referenční fólie došlo k nejnižšímu hmotnostnímu úbytku (0,45 %) a tak i k poškození materiálu. Pokles CHSK byl 89,67 %, což představuje nejvyšší hodnotu.

**CMC fólie:** Kultura kultivovaná v přítomnosti PUR folie s 10 % CMC vykazovala vysokou koncentraci biomasy v průběhu celé kultivace a přesahovala tak kontrolu. Hmotnostní úbytek fólie byl druhý nejvyšší po HEC, pohyboval se okolo 5,6 %. Pokles CHSK je v tomto testu úplně nejnižší, ale i přesto velmi vysoký (71,13 %).

**HEC fólie:** Tato fólie podporovala růst kultury nad úroveň kultury bez fólie (kontroly) až na část mezi 120. a 200. hodinou. Došlo k nejprudšímu nárůstu biomasy a k následnému pozvolnému poklesu biomasy. Pokles CHSK představoval 83,66 %, což představuje jednu z nejvyšších hodnot, ale mezi jednotlivými fóliemi byly v tomto parametru malé rozdíly. Hmotnostní úbytek fólie byl ze všech nejvyšší, a to přibližně 9,56 %, což znamená, že plnidlo HEC s původními 10 % bylo skoro celé vyčerpáno.

**AC fólie:** Růst kultury v přítomnosti PUR folie s AC byl spojen s krátkou lag fází a pohyboval se až do 200. hodiny pod úroveň kontroly. Hmotnostní úbytek této fólie byl asi 0,62 %, úbytek CHSK byl 74,51 %.

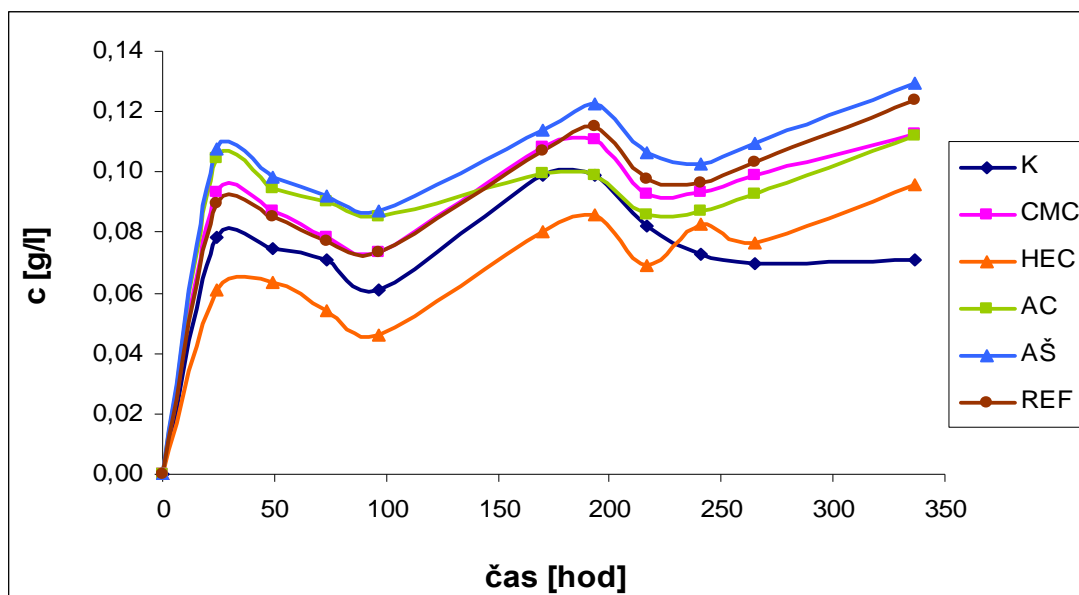
**AŠ fólie:** Růst kultury v přítomnosti PUR fólie s AŠ projevuje po celou dobu kultivace lag fázi způsobenou zřejmě přítomností toxických látek z fólie, které inhibovaly růst termofilních bakterií. Hmotnostní úbytek folie se pohybuje okolo 1,41 %, a pokles hodnoty CHSK (87,79 %) byl jedním z nejvyšších v celém experimentu.

### **8.5.2 Druhá fáze biodegradačního testu (15. – 28. den)**

Pro tento test byly použity fólie z prvních čtrnácti dní a vloženy do nově připraveného a zaočkovaného média. V průběhu testu byl opět sledován růst biomasy a změna CHSK, po ukončení kultivace byla provedena mikroskopická analýza, srovnání degradovaných PUR fólií s nedegradovanými a posouzení míry degradace jednotlivých fólií. Také byl stanoven hmotnostní úbytek fólií po degradaci.

Tab. 11: Růst termofilů v přítomnosti PUR fólií v kompletním syntetickém médiu

c [g/l]						čas [hod]
K	CMC	HEC	AC	AŠ	REF	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0
0,0782	0,0932	0,0613	0,1046	0,1076	0,0894	25
0,0744	0,0874	0,0633	0,0944	0,0985	0,0853	49
0,0709	0,0785	0,0544	0,0901	0,0919	0,0772	73
0,0608	0,0732	0,0463	0,0853	0,0874	0,0732	97
0,0987	0,1081	0,0805	0,0995	0,1139	0,1071	170
0,0990	0,1106	0,0856	0,0987	0,1228	0,1152	193
0,0823	0,0929	0,0694	0,0861	0,1066	0,0977	217
0,0727	0,0932	0,0825	0,0871	0,1025	0,0967	241
0,0696	0,0987	0,0765	0,0927	0,1096	0,1033	265
0,0706	0,1124	0,0960	0,1122	0,1296	0,1238	337



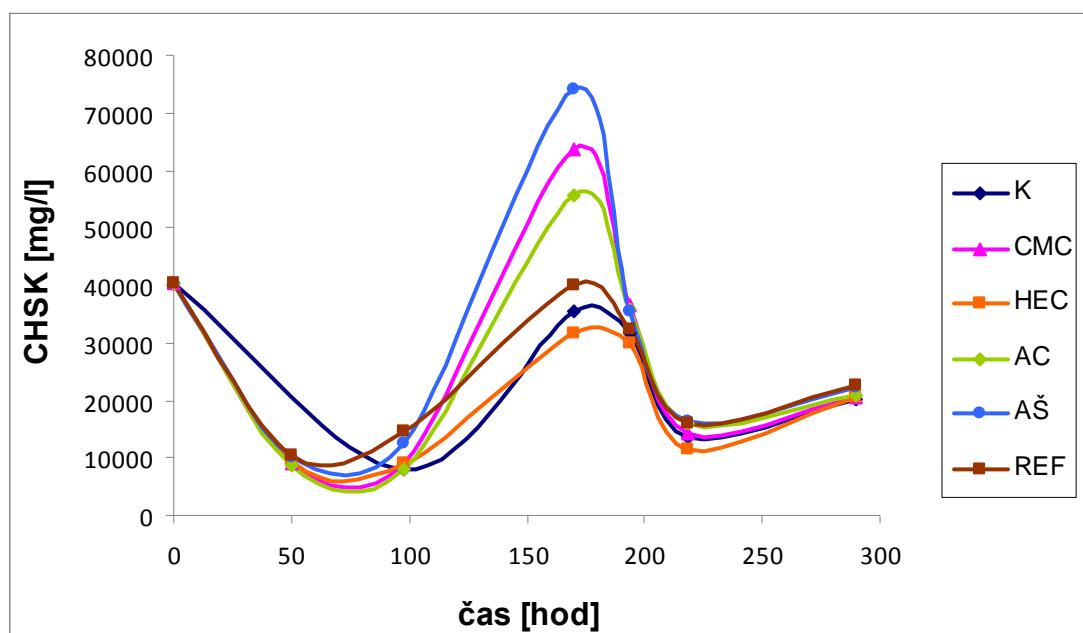
Graf 15: Růst kultury v přítomnosti PUR fólií v kompletním syntetickém médiu

Růstové parametry kultur kultivovaných s PUR fólií byly vesměs velice podobné, všechny kromě fólie modifikované 10 % HEC přerostly kulturu bez fólie. Fólie s HEC přerostla kulturu až skoro na konci kultivace po 230. hodině.

### 8.5.2.1 Změna CHSK během biodegradace

Tab. 12: Změna CHSK (mg/l) v průběhu kultivace kultury s fólií

CHSK [mg/l]						čas
K	CMC	HEC	AC	AŠ	REF	
40500	40500	40500	40500	40500	40500	0
61500	9150	9400	8750	10150	10350	50
8000	9000	9000	8000	12500	14500	98
35500	63500	31500	55500	74000	40000	170
31500	36500	30000	36000	35500	32500	194
13667	14333	11333	15833	16333	16000	218
20167	20667	20500	21000	22333	22500	290
50,21	48,97	49,38	48,15	44,86	44,45	Úbytek CHSK [%]

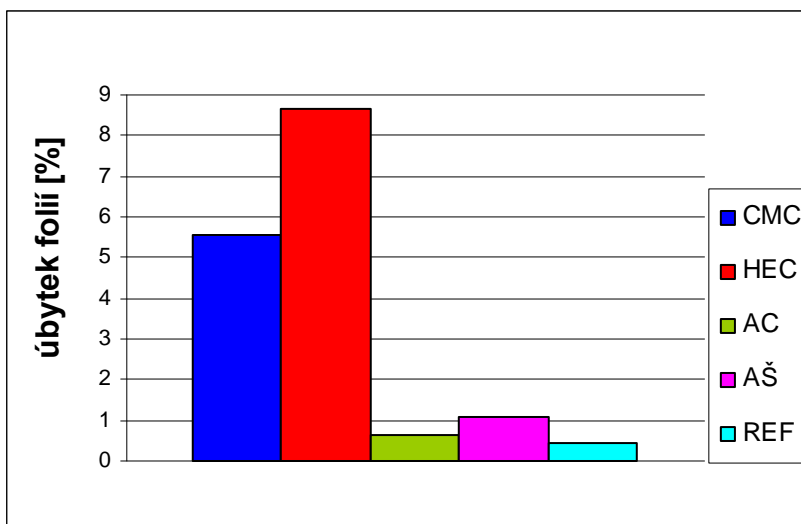


Graf 16: Změna CHSK (mg/l) v průběhu kultivace kultury s fólií

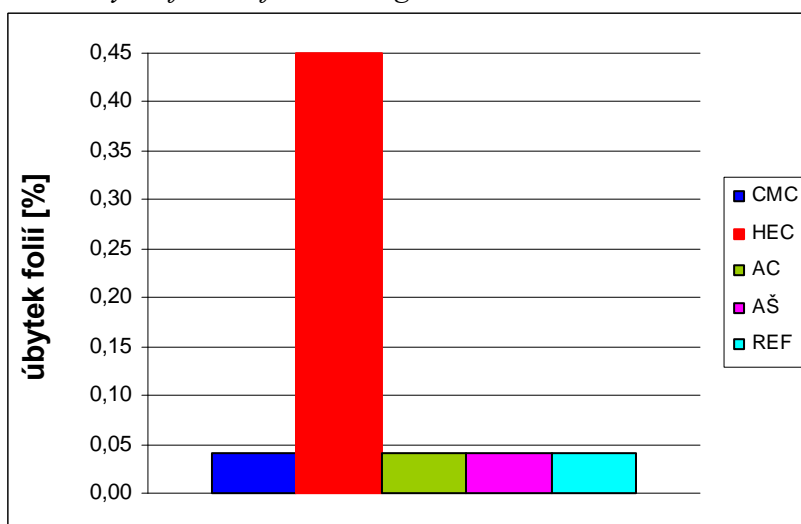
### 8.5.2.2 Hmotnostní úbytky fólií

Tab. 13: Hmotnostní úbytek fólií

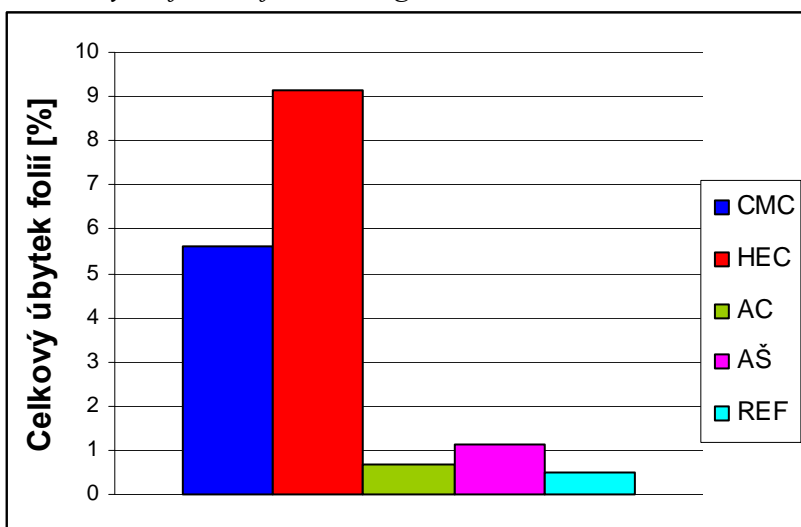
	$\Delta m$ [%]
CMC	0,04
HEC	0,45
AC	0,04
AŠ	0,04
REF	0,04



Graf 17: Hmotnostní úbytek folií 1. fáze biodegradčního testu



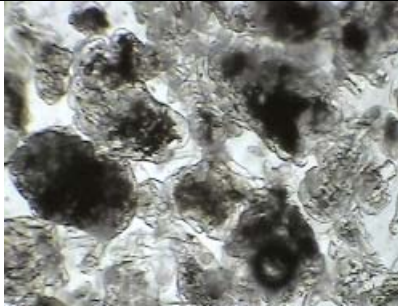


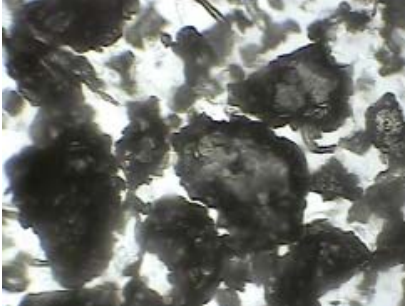



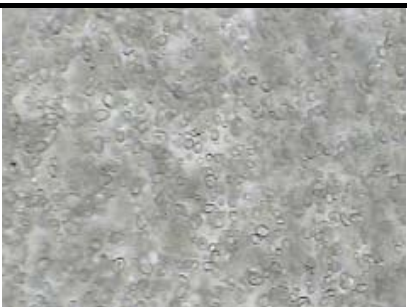
Graf 18: Hmotnostní úbytek folií 2. fáze biodegradčního testu



Graf 19: Celkový hmotnostní úbytek folií obou fází biodegradčního testu

### 8.5.2.3 Mikroskopická analýza

Tab. 14: Mikroskopické snímky PUR fólií (zvětšeno 40krát):

Folie	Nedegradovaná	Degradovaná
10% CMC PUR		
10% HEC PUR		
10% AC PUR		
10% AŠ PUR		

Největší hmotnostní úbytky CMC a HEC lze vypočítat i z mikroskopických snímků, kdy můžeme vidět velké rozdíly mezi fóliemi před a po degradaci kulturou. Naopak lze vidět, že při malých úbytcích (AŠ a AC) jsou snímky prakticky stejné.

Na základě dosažených výsledků lze formulovat následující dílčí závěry:

**REF fólie:** U této fólie bez plnidla vykazovala kultura po celou dobu kultivace vysokou koncentraci biomasy a přesahovala tak kontrolu. U referenční fólie došlo celkově k nejnižšímu hmotnostnímu úbytku 0,49 %. Pokles CHSK byl 44,45 %, což představuje nejnižší hodnotu.

**CMC fólie:** Kultura kultivovaná v přítomnosti PUR fólie s 10 % CMC vykazovala vysokou koncentraci biomasy v průběhu celé kultivace a přesahovala tak kontrolu. Hmotnostní úbytek fólie byl 0,04 % (celkový pak 5,64 %). Pokles CHSK byl v tomto testu 48,97 %.

**HEC fólie:** Tato fólie jako jediná nepodporovala růst kultury nad úroveň kultury bez fólie (kontroly) skoro po celou dobu kultivace a přerostla kontrolu až asi po 230. hodině. Nárůst biomasy byl ze všech fólií nejmenší. Pokles CHSK představoval 49,38 %, což představuje druhou nejvyšší hodnotu, ale mezi jednotlivými fóliemi byly v tomto parametru malé rozdíly. Hmotnostní úbytek fólie byl ze všech nejvyšší, a to přibližně 0,45 % (celkový pak 10 %) což znamená, že plnidlo HEC s původními 10 % bylo kulturou celé vyčerpáno.

**AC fólie:** Růst kultury v přítomnosti PUR fólie s AC byl druhý nejprudší, ale poté docházelo k většímu úhynu termofilů než u ostatních. Hmotnostní úbytek této fólie byl 0,04 % (celkový pak 0,66 %) a úbytek CHSK byl nejnižší a to 48,15 %.

**AŠ fólie:** Růst kultury v přítomnosti PUR fólie s AŠ byl nejprudší. Hmotnostní úbytek fólie byl 0,04 %, celkový úbytek pak 1,45 % a pokles hodnoty CHSK (44,86 %) byl druhý nejnižší v celém experimentu.

Fólie silně ovlivňují růst termofilní kultury, na jedné straně některé fólie silně podporují růst kultury v obou fázích testu (CMC, AC), tyto fólie dokáže pravděpodobně kultura využít ke svému růstu. Naopak u některých fólií (AS, AC, REF) došlo v první fázi testu k pozorování neobvykle dlouhé lag fáze. Ta je pravděpodobně způsobena uvolňováním toxických komponent do média. Tyto látky následně inhibují růst kultury, nicméně kultura se dokáže adaptovat, případně dokáže toxické látky odbourat (viz AC a REF fólie). Jen u fólie AS byla koncentrace toxických látek natolik vysoká, že nedovolila kultuře vůbec růst. V druhé části testu už byly toxické látky z fólií pravděpodobně odstraněny, takže žádná inhibice růstu nebyla pozorována, a naopak fólie AS, která v první části testu růst silně inhibovala, ho ve druhé části testu silně podporovala.

Hmotnostní úbytky fólií mají pravděpodobně abiotický charakter – dochází k samovolnému uvolňování nebo rozpouštění látek z fólií, přičemž nebyl pozorován výrazný vliv bakterií na samotný proces rozpadu fólií, z toho vyplývá, že proces má abiotický charakter. Nicméně degradační produkty následně silně ovlivňují růst kultury, především některá plnidla dokáže kultura využít ke svému růstu, a proto pravděpodobně fólie CMC a HEC (které vykazovaly výrazný hmotnostní úbytek pravděpodobně v důsledku rozpuštění modifikačního činidla) podporovaly růst kultury.

Průběh CHSK byl u všech fólií velmi podobný, pokles CHSK se pohyboval okolo 50 %.

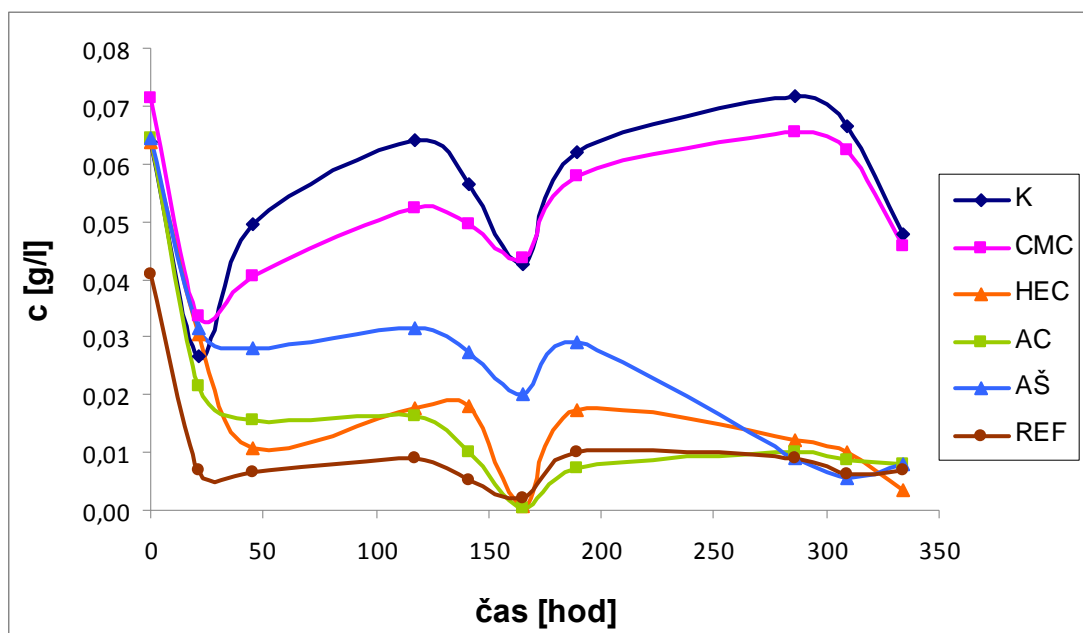
## 8.6 Biodegradační test modifikovaných PUR fólií při absenci zdroje C nebo N

### 8.6.1 Test využitelnost fólií jako jediného zdroje uhlíku

Tento test byl zaměřen na studium možností využití modifikovaných PUR fólií jako možného zdroje uhlíku nebo dusíku. Princip testu spočíval v přidání narostlé a zcentrifugované kultury do syntetického média, ve kterém chyběl buď zdroj uhlíku, nebo dusíku.

Tab. 15: Růst kultury ( $c$  (g/l)) na modifikovaných PUR fóliích při limitaci uhlíkem

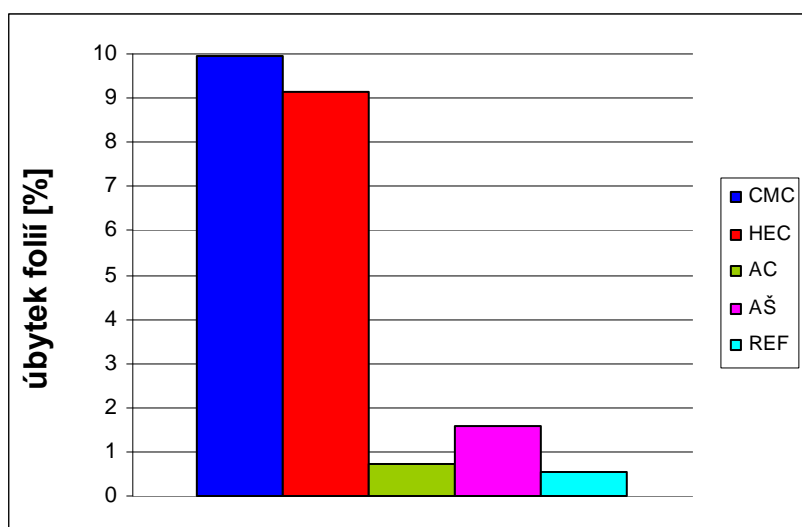
c [g/l]						čas [hod]
K	CMC	HEC	AC	AŠ	REF	
0,0638	0,0714	0,0636	0,0646	0,0643	0,0408	0
0,0268	0,0337	0,0304	0,0215	0,0314	0,0071	21
0,0496	0,0405	0,0109	0,0154	0,0281	0,0066	45
0,0641	0,0522	0,0177	0,0162	0,0317	0,0091	117
0,0565	0,0496	0,0180	0,0099	0,0273	0,0053	141
0,0425	0,0438	0,0008	0,0003	0,0203	0,0020	165
0,0620	0,0577	0,0175	0,0073	0,0291	0,0101	189
0,0717	0,0656	0,0122	0,0101	0,0089	0,0091	286
0,0666	0,0623	0,0099	0,0086	0,0056	0,0061	309
0,0479	0,0456	0,0035	0,0081	0,0078	0,0071	334



Graf 20: Růst kultury na modifikovaných PUR fóliích při limitaci uhlíkem

Tab. 16: Hmotnostní úbytek fólií

	$\Delta m$ [%]
CMC	9,95
HEC	9,15
AC	0,73
AŠ	1,58
REF	0,56



Graf 21: Hmotnostní úbytek fólií

Kultury limitované uhlíkem po celou dobu kultivace nepřerostly kontrolu, u které neměla termofilní kultura ani fólii jako další možný zdroj uhlíku. Bakterie pravděpodobně nedokázaly překonat toxický efekt fólií bez přítomnosti jiného zdroje uhlíku (glukosu).

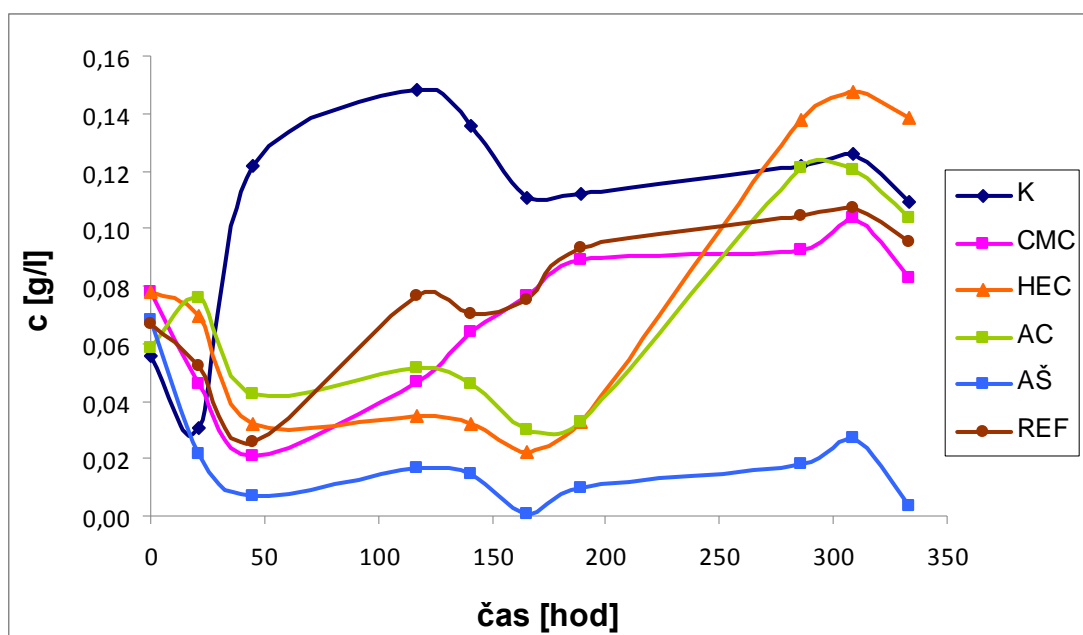
Směsná termofilní kultura obsahující především rody *Bacillus* a *Thermus* není schopna využít štěpné produkty modifikovaných PUR fólií jako jediný zdroj uhlíku.

Pokud se jedná o hmotnostní úbytek fólií zejména CMC a HEC (9,95 a 9,15 %), tak zde se spíše jedná o abiotický rozklad fólií.

### 8.6.2 Test využitelnosti fólií jako jediného zdroje dusíku

Tab. 17: Růst kultury (*c* (g/l)) na modifikovaných PUR fóliích při limitaci dusíkem

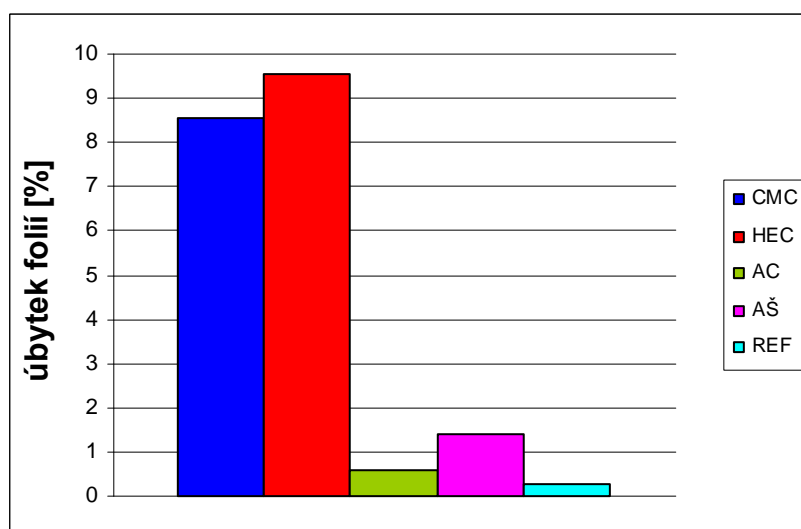
K	c [g/l]					čas [hod]
	CMC	HEC	AC	AŠ	REF	
0,0557	0,0782	0,0782	0,0582	0,0681	0,0671	0
0,0304	0,0456	0,0694	0,0760	0,0218	0,0519	21
0,1220	0,0208	0,0322	0,0425	0,0071	0,0261	45
0,1484	0,0468	0,0347	0,0514	0,0170	0,0762	117
0,1360	0,0641	0,0319	0,0461	0,0147	0,0701	141
0,1106	0,0762	0,0220	0,0296	0,0010	0,0755	165
0,1119	0,0889	0,0329	0,0324	0,0099	0,0932	189
0,1218	0,0924	0,1380	0,1213	0,0182	0,1043	286
0,1258	0,1038	0,1474	0,1200	0,0271	0,1069	309
0,1094	0,0828	0,1382	0,1036	0,0038	0,0952	333



Graf 22: Růst kultury na modifikovaných PUR fóliích při limitaci dusíkem

Tab. 18: Hmotnostní úbytek fólií

	$\Delta m$ [%]
<b>CMC</b>	8,57
<b>HEC</b>	9,56
<b>AC</b>	0,61
<b>AŠ</b>	1,41
<b>REF</b>	0,27



Graf 23: Hmotnostní úbytek fólií

Kultury limitované dusíkem stejně jako u limitace uhlíkem po celou dobu kultivace nepřerostly kontrolu.

Tato směsná termofilní kultura rodů *Bacillus* a *Thermus* není schopna využít štěpné produkty modifikovaných PUR fólií jako jediný zdroj dusíku.

Výjimkou je ale fólie modifikovaná 10 % HEC, kterou termofilní kultura jako jediná využila jako zdroj uhlíku skoro na konci kultivace (asi po 270. hodině) a přerostla tak kontrolu.

Pokud se jedná o hmotnostní úbytek fólií CMC a HEC (8,57 a 9,56 %), tak v případě fólie modifikované 10 % CMC se jedná spíše o abiotický rozklad, kdežto u fólie s HEC je možné, že na rozkladu fólie se částečně podílela i bakteriální kultura, částečně je tedy možný biotický rozklad (vysoký stupeň rozkladu fólie).

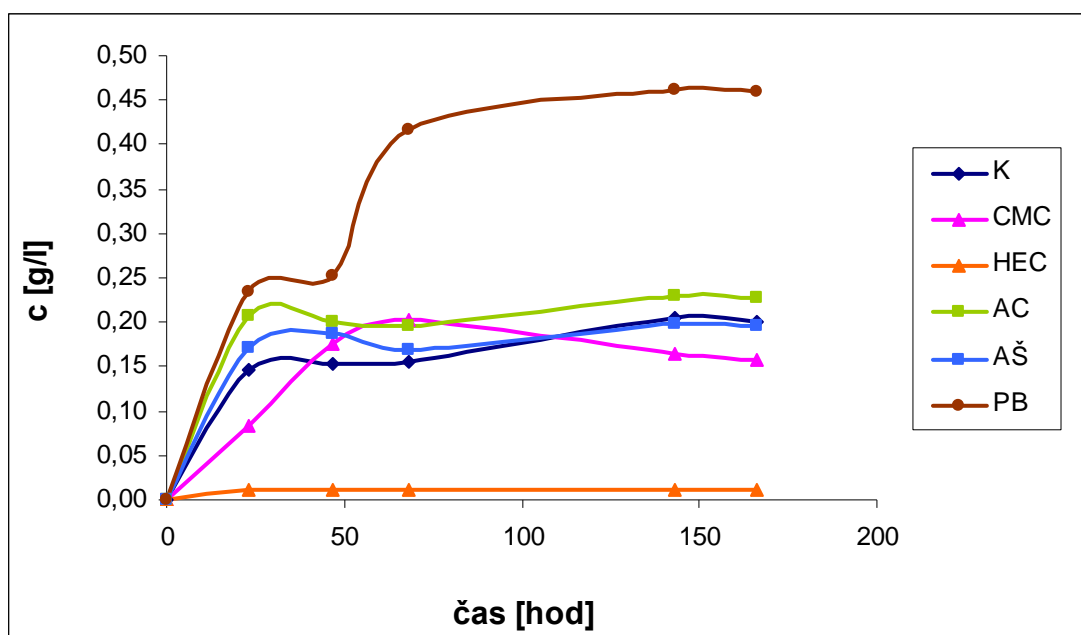
## 8.7 Test využitelnosti samotného plnidla v syntetickém médiu jako zdroj uhlíku nebo dusíku

V tomto testu byly testovány samostatné plnidla jako doplňkový zdroj uhlíku ke glukose (8 g/l) v kompletním syntetickém médiu (8.7.1.) případně jako jediný dostupný zdroj uhlíku v syntetickém médiu bez glukosy (8.7.2). Koncentrace plnidel byla 8 g/l. Cílem testu bylo ověřit, zda termofilní bakterie umí využít tyto plnidla pro svůj další růst a tedy, zda přerostou kontrolu.

### 8.7.1 Plnidla v kompletním syntetickém médiu

Tab. 19: Růst kultury ( $c$  (g/l)) v kompletním syntetickém médiu s plnidly

c [g/l]						čas [hod]
K	CMC	HEC	AC	AŠ	PB	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0
0,1464	0,0836	0,0114	0,2076	0,1704	0,2332	23
0,1532	0,1765	0,0119	0,2003	0,1861	0,2514	47
0,1565	0,2028	0,0119	0,1950	0,1691	0,4178	68
0,2043	0,1643	0,0116	0,2307	0,1980	0,4623	143
0,2015	0,1583	0,0114	0,2281	0,1950	0,4598	166



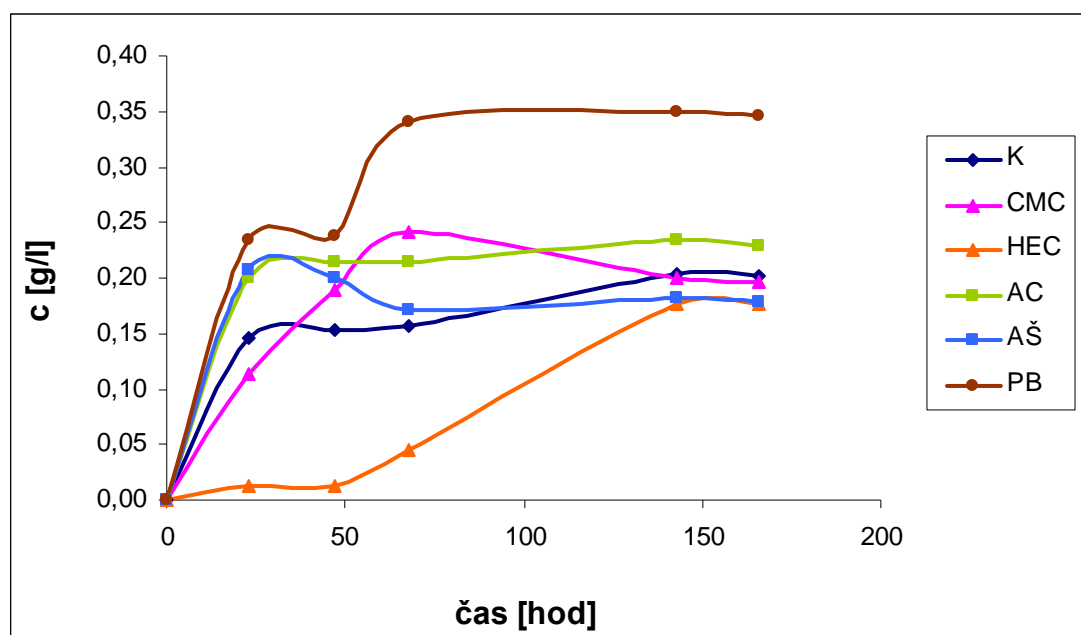
Graf 24: Růst kultury v kompletním syntetickém médiu s plnidly

Většina testovaných plnidel podporuje růst kultury v přítomnosti glukosy. Nejvýraznější podpora růstu byla pozorována u vzorku pšeničné bílkoviny (PB), ta pravděpodobně představuje pro kulturu vhodný substrát, který je pravděpodobně nejen zdrojem uhlíku, ale i potenciálním zdrojem dusíku, případně aminokyselin. Naopak hydroxyethyl celuloza silně inhibovala růst bakteriální kultury, takže prakticky nedošlo k nárůstu biomasy. Je pravděpodobné, že i samotné plnidlo vykazuje toxický efekt.

### 8.7.2 Plnidla v syntetickém médiu bez glukosy

Tab. 20: Růst kultury ( $c$  (g/l)) v syntetickém médiu bez glukosy s plnidly

c [g/l]						čas [hod]
K	CMC	HEC	AC	AŠ	PB	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0
0,1464	0,1132	0,0127	0,2000	0,2076	0,2345	23
0,1532	0,1884	0,0132	0,2152	0,2005	0,2378	47
0,1565	0,2418	0,0443	0,2147	0,1709	0,3408	68
0,2043	0,1998	0,1770	0,2342	0,1826	0,3489	143
0,2015	0,1962	0,1757	0,2286	0,1790	0,3459	166



Graf 25: Růst kultury v syntetickém médiu bez glukosy s plnidly

Výsledky experimentu naznačují, že i plnidla samotná mohou sloužit jako jediný zdroj uhlíku k růstu termofilní kultury. Opět nejsilněji podporovala růst kultury pšeničná bílkovina, která je lepším zdrojem uhlíku pro růst kultury než samotná glukosa. Podobný jev vykazuje acetylovaná celuloza, ostatní plnidla jsou stejně vhodným zdrojem uhlíku jako glukosa. Neobvyklé chování bylo opět pozorováno u hydroxyethyl celulosy. Ta, pokud je v médiu přítomná jako jediný zdroj uhlíku, vyvolá poměrně dlouhou lag fázi, která je však následována poměrně intenzivním růstem. Tento jev je velice neobvyklý, protože pokud byla v médiu přítomna hydroxyethyl celuloza, a zároveň i glukosa, růst vůbec nenastal.

## 8.8 Testování lag fáze

Cílem následujících experimentů bylo ověřit, které látky nacházejících se ve fóliích by mohly být zodpovědné za protažení lag fáze.

### 8.8.1 Testování jednotlivých komponent PUR fólií jako možných původců protažené lag fáze

Testovány byly:

- Diisokyanát – **TDI** (Toluen – 2,4 – (2,6) – diisokyanát)

Diisokyanát byl přímo aplikován pomocí automatické pipety a testované množství odpovídají procentuálnímu poměru (20 %) diisokyanátu, který se mohl z fólií uvolnit.

- **DBTL** - Dibutylcínlaurát

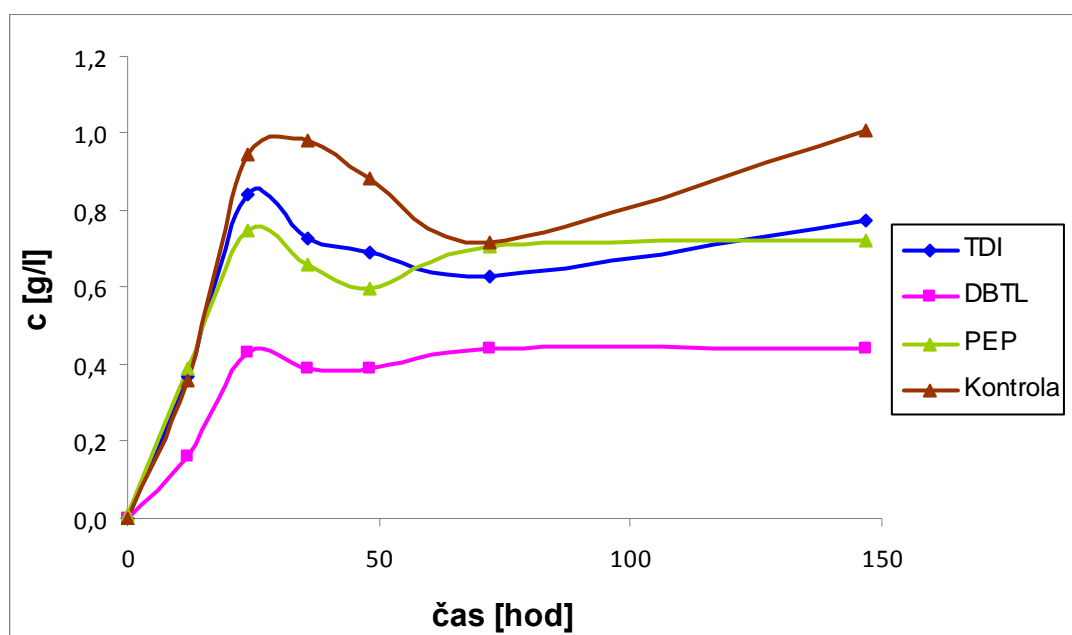
Také katalyzátor byl aplikován přímo. Testované množství katalyzátoru bylo 50 % z množství přítomného ve fólii.

- Polyetherpolyol - **PEP**

Testován byl také polyetherpolyol (**PEP**; v množství odpovídající 20 % fólie).

Tab. 21: Hodnoty jednotlivých komponent PUR fólií v syntetickém médiu

c [g/l]				čas [hod]
TDI 20%	DBTL 50%	PEP 20%	Kontrola	
0,001	0,001	0,010	0,001	0
0,371	0,159	0,390	0,358	12
0,842	0,431	0,748	0,947	24
0,727	0,387	0,657	0,980	36
0,693	0,389	0,596	0,882	48
0,626	0,442	0,706	0,718	72
0,774	0,442	0,724	1,008	147



Graf 26: Růst kultury s jednotlivými komponenty PUR fólií v syntetickém médiu

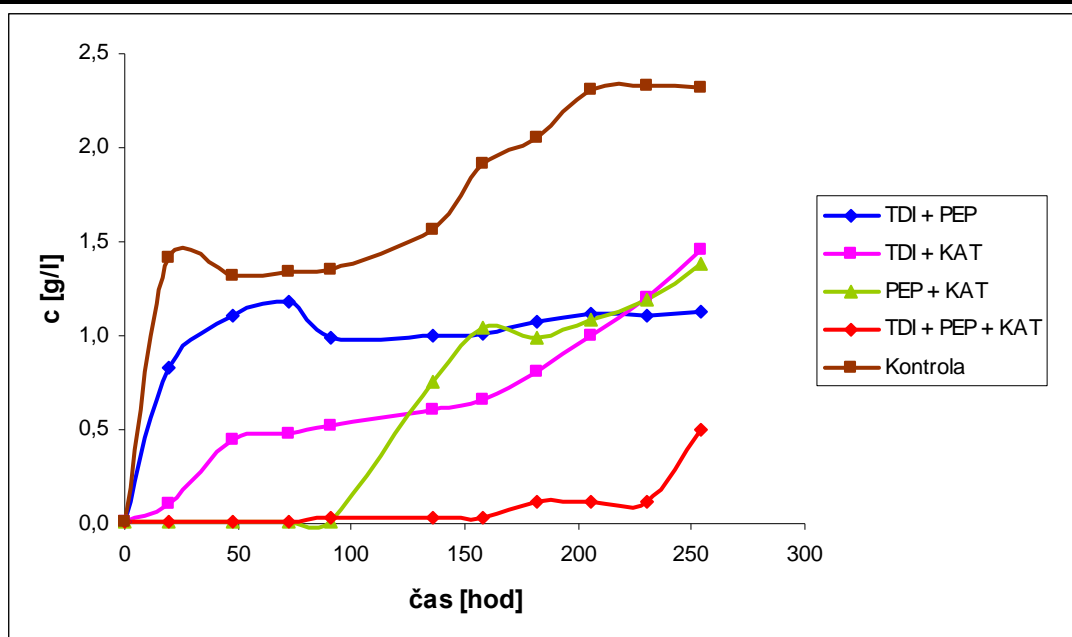
Diisokyanát vykazuje překvapivě relativně nízkou toxicitu. Za prodlouženou lag fází tedy TDI pravděpodobně nemůže. Katalyzátor vykazuje vůči kontrole výrazně vyšší toxicitu. V porovnání s kontrolou je výrazně nižší měrná růstová rychlost i množství nakultivované biomasy. Nicméně ani katalyzátor nemá na kulturu stejný efekt jako samotná fólie – tedy natažení lag fáze a až poté nastartování růstu. Ani polyol nevykazuje vysokou toxicitu a neprotahuje lag fázi.

### 8.8.2 Testování kombinací složek PUR fólií jako možných původců protažené lag fáze u termofilní kultury v syntetickém médiu s minerály a vitamíny

Test vlivu kombinací složek PUR fólií byl proveden stejně jako u samotných složek, tedy aplikací jednotlivých látek přímo do média. Látka byly aplikovány v následujících množstvích: TDI 20 %, PEP 20 %, DBTL 100 %.

Tab. 22: Hodnoty kombinace složek PUR fólií v syntetickém médiu

c [g/l]					čas [hod]
TDI + PEP	TDI + KAT	PEP + KAT	TDI + PEP + KAT	Kontrola	
0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0
0,825	0,108	0,010	0,010	1,416	19
1,108	0,446	0,010	0,010	1,322	48
1,180	0,483	0,010	0,010	1,336	72
0,986	0,518	0,012	0,027	1,346	91
0,996	0,606	0,755	0,029	1,567	136
1,006	0,664	1,039	0,036	1,912	158
1,074	0,809	0,991	0,118	2,053	182
1,121	1,001	1,080	0,116	2,307	206
1,102	1,203	1,195	0,116	2,329	230
1,128	1,457	1,380	0,502	2,314	254



Graf 27: Růst kultury s kombinacemi složek PUR fólií v syntetickém médiu

Natažení lag fáze je možné pozorovat, pokud je v médiu přítomný polyetherpolyol společně s katalyzátorem, anebo pokud jsou v médiu přítomné všechny tři složky současně.

Pokud je přítomen katalyzátor společně s polyolem dochází k nastartování růstu po 96. hodině. Růst je poté dynamický a rychlý, stejně jako je tomu u fólií. Můžeme tedy předpokládat, že protažení lag fáze způsobují právě tyto dvě složky.

### 8.8.3 Studium mechanismu účinku fólie na délku lag fáze termofilní kultury

Pro experiment byla vybrána referenční PUR fólie, která v předchozím experimentu způsobovala lag fázi (viz 8.7.1) a vykazovala nejnižší hmotnostní úbytky (0,49 %).

Testované vzorky:

**Kontrola** – kultura bez PUR fólie

**Bio** – kultura kultivovaná společně s fólií, zaočkována okamžitě po přidání fólie do média

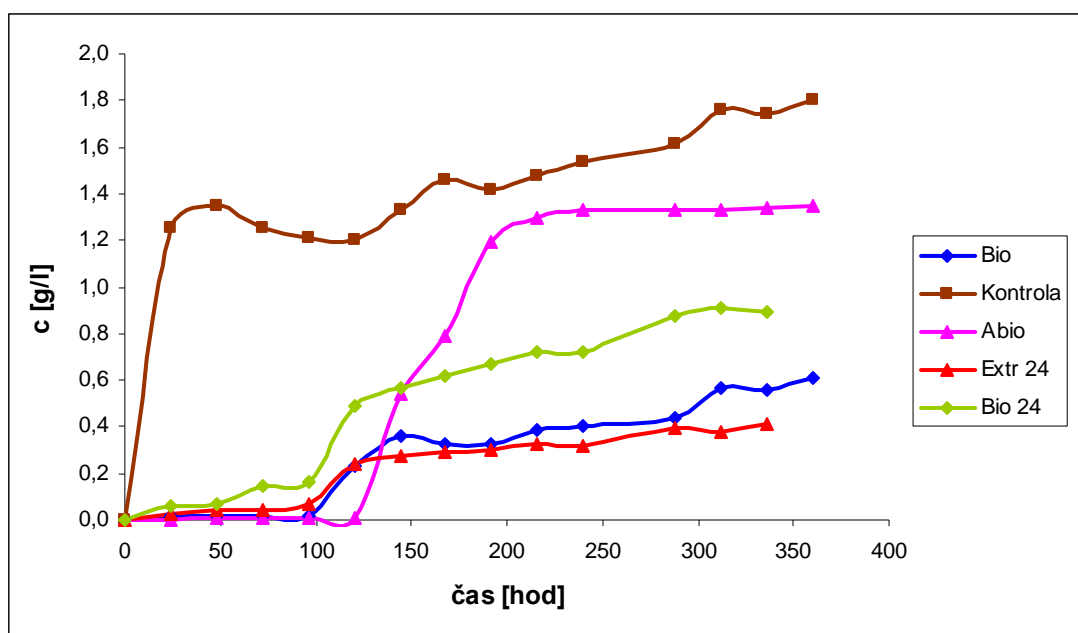
**Abio** – kultura zaočkováná po 144 hodinách po přidání PUR fólie a třepání za stejných podmínek jako ostatní kultivace (poté co došlo k nárůstu vzorků **Bio**). Cílem bylo ověřit, zda odbourávání toxických látek je biotické nebo abiotické povahy.

**Extr** – fólie byla třepána 24 hodin bez kultury, poté byla fólie vyjmuta a médium bylo zaočkováno. Cílem bylo potvrdit hypotézu uvolňování toxických látek do média.

**Bio 24** – fólie ze vzorků **Extr** byla přidána do média a okamžitě zaočkována kulturou. Cílem bylo ověřit dynamiku uvolňování toxických látek do média.

Tab. 23: Hodnoty koncentrací při různých podmínkách v syntetickém médiu

c [g/l]					čas [hod]
Bio	Kontrola	Abio	Extr 24	Bio 24	
0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0
0,016	1,257	0,004	0,027	0,059	24
0,015	1,350	0,005	0,039	0,069	48
0,018	1,254	0,006	0,042	0,146	72
0,018	1,212	0,006	0,068	0,167	96
0,233	1,202	0,009	0,242	0,490	120
0,361	1,328	0,543	0,278	0,570	144
0,327	1,457	0,791	0,293	0,616	168
0,326	1,419	1,191	0,300	0,672	192
0,384	1,473	1,293	0,328	0,723	216
0,407	1,538	1,330	0,318	0,719	240
0,440	1,618	1,332	0,392	0,876	288
0,564	1,758	1,333	0,376	0,910	312
0,554	1,744	1,338	0,415	0,894	336
0,609	1,803	1,351	-	-	360



Graf 28: Růst kultury při různých podmínkách v syntetickém médiu

Všechny vzorky „protáhly“ délku lag fáze v porovnání s kontrolou a to na stejnou dobu – cca 96 hodin.

Vorky **Bio** a **Extr** vykazovaly velice podobný charakter růstu – délku lag fáze (96 hodin) i množství nakultivované biomasy. Tím je potvrzeno, že toxické látky inhibující růst opravdu přecházejí z fólie do média.

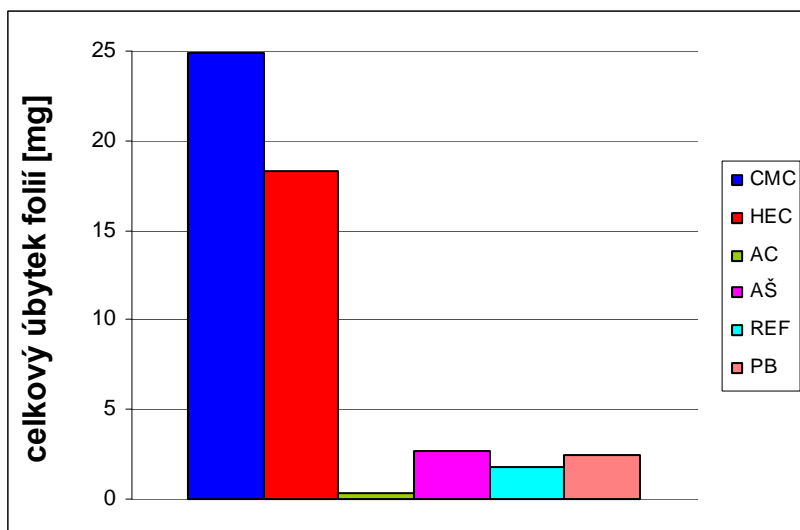
Většina toxických látek se pravděpodobně uvolní během prvních 24 hodin. To naznačuje podobnost vzorků **Bio** a **Extr** a také fakt, že vzorky **Bio 24** vykazovaly malý růst již před 96. hodinou a narostli více než vzorky **Bio** a **Extr**. Skutečnost, že délka lag fáze byla u vzorků **Abio** stejná jako u ostatních vzorků naznačuje, že mechanismus odbourávání toxické látky je biotické povahy.

## 8.9 Abiotická degradace PUR fólií a analýza degradačních produktů

V tomto testu byly fólie vystaveny stejným podmínkám jako při ostatních biodegradačních testech, ovšem tentokrát bez přítomnosti bakteriální kultury. Na konci experimentu byl zjištěn celkový hmotnostní úbytek těchto fólií a stanoveno, jaké množství z uvolněných látek byly redukcující cukry, polysacharidy a v případě PB (pšeničné bílkoviny) celkových proteinů.

Tab. 24: Celkové hmotnostní úbytky fólií

	CMC	HEC	AC	AŠ	REF	PB
m (před)	0,2334	0,2335	0,2740	0,2497	0,2513	0,2350
m (po)	0,2085	0,2152	0,2737	0,2470	0,2495	0,2326
Úbytek [%]	10,67	7,84	0,11	1,08	0,72	1,02
Úbytek [mg]	<b>24,90</b>	<b>18,30</b>	<b>0,30</b>	<b>2,70</b>	<b>1,80</b>	<b>2,40</b>



Graf 29: Celkové hmotnostní úbytky fólií

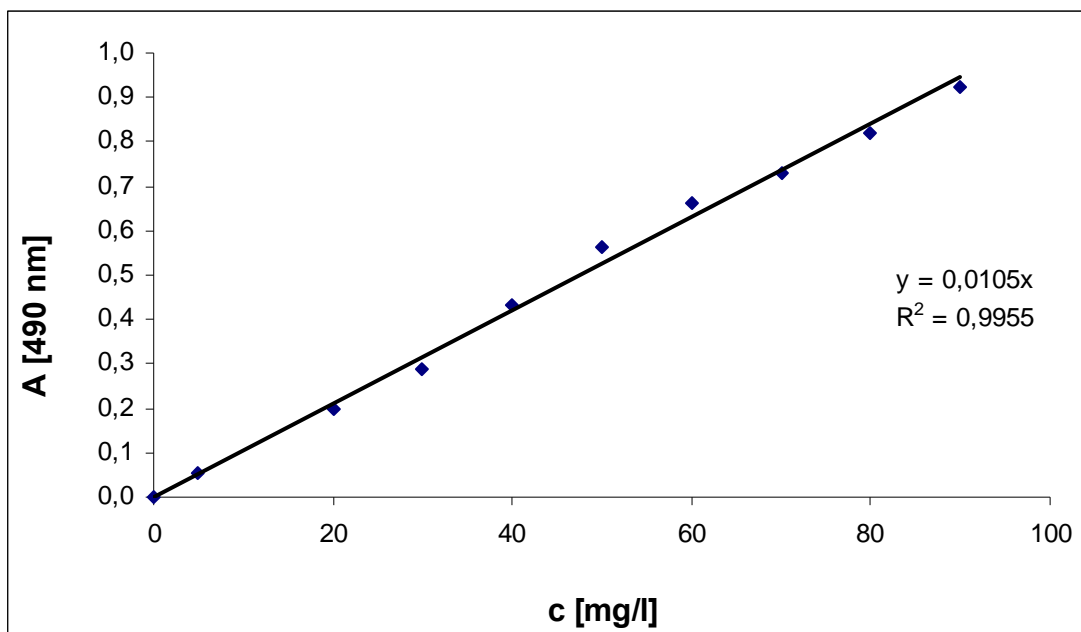
Hmotnostní úbytky při abiotické degradaci PUR fólií byly velmi podobné jako při biotické degradaci. Při biotické degradaci je hmotnostní úbytek větší u HEC a AC a menší u CMC a REF než u abiotické, ale rozdíly jsou malé.

### 8.9.1 Hmotnostní úbytek polysacharidů (podle Duboise)

Vzorky byly proměřeny metodou podle Duboise, ale nejdříve byla sestrojena kalibrační křivka.

Tab. 25: Kalibrační křivka

c [mg/l]	A <sub>490</sub>
0	0,000
5	0,052
20	0,200
30	0,289
40	0,434
50	0,563
60	0,663
70	0,728
80	0,822
90	0,925



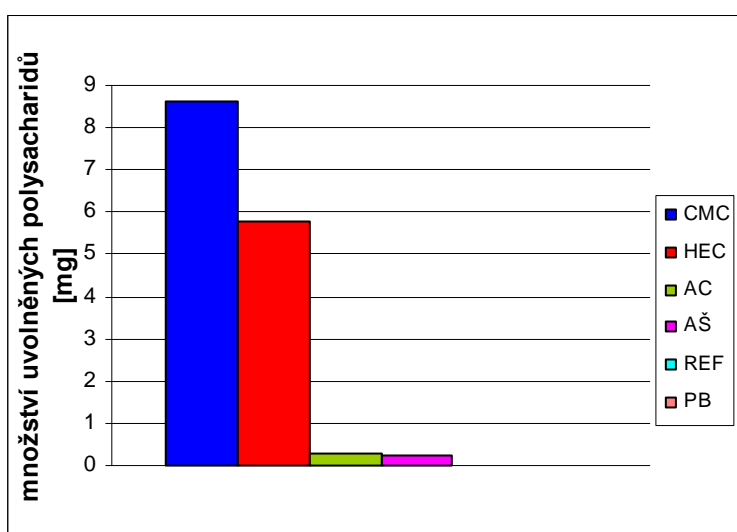
Graf 30: Kalibrační křivka

Poté byly změřeny vzorky a vypočítána koncentrace a následně celková hmotnost polysacharidů ve vzorcích.

Tab. 26: Úbytek polysacharidů

	CMC	HEC	AC	AŠ	REF	PB
A [490 nm]	0,903	0,605	0,057	0,053	0,000	0,000
c [mg/l]	172,000	115,238	11,904	5,048	0,000	0,000
<b>Celkový úbytek folie [mg]</b>	<b>24,90</b>	<b>18,30</b>	<b>0,30</b>	<b>2,70</b>	<b>1,80</b>	<b>2,40</b>
<b>Množství PS uvolněných z folií [mg]</b>	<b>8,600</b>	<b>5,762</b>	<b>0,271</b>	<b>0,252</b>	0,000	0,000

PS = Polysacharidy



Graf 31: Množství uvolněných polysacharidů

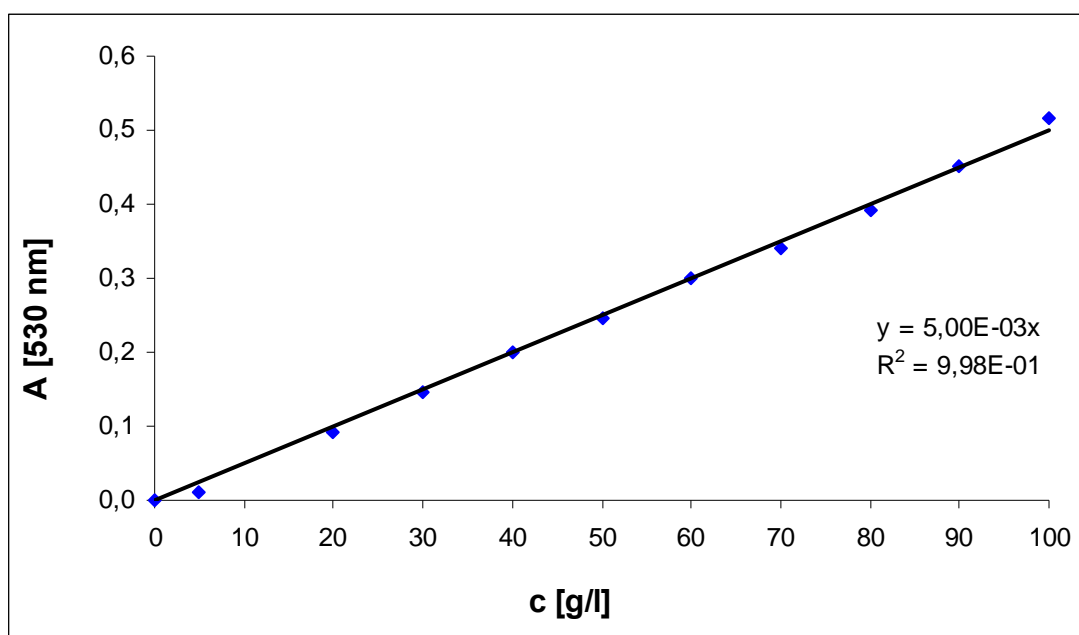
Podle výsledků analýzy představují významnou část látek uvolněných z fólií polysacharidy na bázi celulózy (CMC, HEC). Tento fakt je pravděpodobně způsoben dobrou rozpustností těchto polysacharidů ve vodě.

### 8.9.2 Hmotnostní úbytek redukujících cukrů (podle Somogyiho – Nelsona)

Vzorky byly proměřeny Somogyiho – Nelsonovou metodou, ale nejdříve byla sestrojena kalibrační křivka.

Tab. 27: Kalibrační křivka

c [mg/l]	A <sub>530</sub>
0	0,000
5	0,010
20	0,093
30	0,145
40	0,201
50	0,245
60	0,299
70	0,341
80	0,393
90	0,452
100	0,516



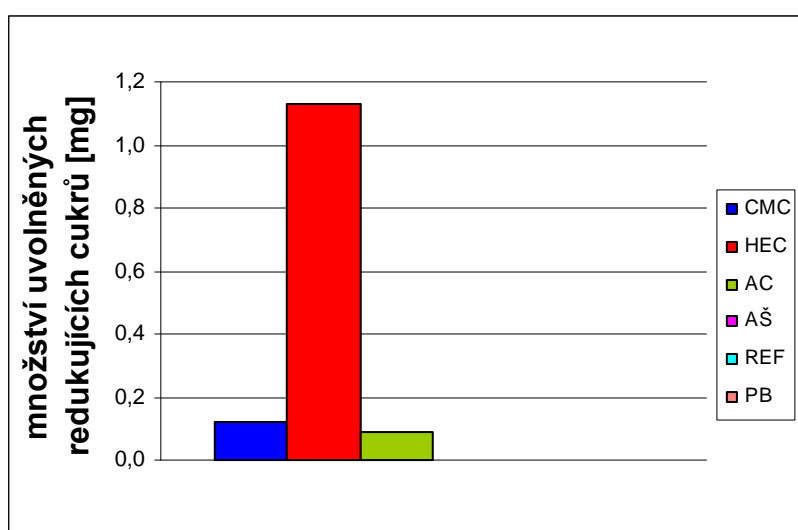
Graf 32: Kalibrační křivka

Poté byly změřeny vzorky a vypočítána koncentrace a následně celková hmotnost redukujících cukrů ve vzorcích.

Tab. 28: Úbytek redukujících cukrů

	CMC	HEC	AC	AŠ	REF	PB
A [530 nm]	0,012	0,113	0,029	0,000	0,000	0,000
c [mg/l]	2,40	22,60	5,80	0,00	0,00	0,00
<b>Celkový úbytek fólie [mg]</b>	<b>24,90</b>	<b>18,30</b>	<b>0,30</b>	<b>2,70</b>	<b>1,80</b>	<b>2,40</b>
<b>Množství RC uvolněných z fólií [mg]</b>	<b>0,120</b>	<b>1,130</b>	<b>0,090</b>	0,000	0,000	0,000

RC = Redukující cukry



Graf 33: Množství uvolněných redukujících cukrů

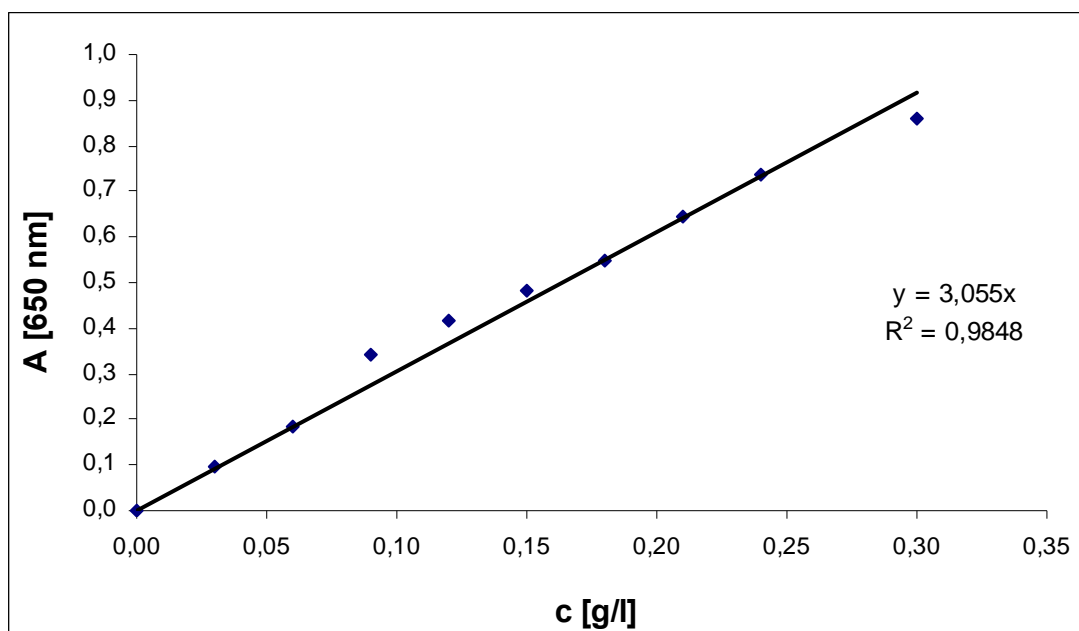
Při abiotické degradaci PUR fólií se do média uvolňuje malé množství redukujících cukrů. Je však možné, že pozitivní reakci nedávaly vznikuvší monosacharidy nebo krátké oligosacharidy, ale spíše redukující konce řetězců modifikovaných celuloz. Potom by výsledek naznačoval, že rozpad hydroxyethyl celulosy se v médiu rozpadá na kratší řetězce za vzniku většího počtu redukujících konců. Je pravděpodobné, že rozpad hydroxyethyl celulosy vede k částečnému odstranění hydroxyethyl- skupiny, což by mohlo vysvětlit toxický účinek samotné hydroxyethyl celulosy na směšnou termofilní kulturu.

### 8.9.3 Stanovení proteinů uvolněných z modifikované fólie (metodou dle Hartree – Lowryho)

Hartree – Lowryho metodou byl proměřen pouze jeden vzorek, ve kterém se nachází bílkoviny a tím byl PB (pšeničná bílkovina). Opět byla nejdříve sestrojena kalibrační křivka.

Tab. 29: Kalibrační křivka

c [g/l]	A <sub>650</sub>
0,00	0,000
0,03	0,098
0,06	0,186
0,09	0,342
0,12	0,416
0,15	0,483
0,18	0,547
0,21	0,645
0,24	0,735
0,27	0,739
0,30	0,861



Graf 34: Kalibrační křivka

Poté byl vzorek změřen a vypočítána koncentrace a následně stanovena celková hmotnost celkových proteinů ve vzorku.

Tab. 30: Úbytek celkových proteinů

	PB
A [650 nm]	0,152
c [g/l]	0,0498
<b>Celkový úbytek fólie [mg]</b>	<b>2,40</b>
<b>Množství CP uvolněných z fólie [mg]</b>	<b>2,490</b>

CP = Celkové proteiny

U vzorku PB bylo zjištěno, že pravděpodobně vše, co se uvolnilo z fólie (s plnidlem PB) byly proteiny. Celkový úbytek fólie s PB totiž činil 2,40 mg a Hartree - Lowryho metodou bylo stanoveno, že se uvolnilo celkem 2,49 mg proteinů.

*Tab. 31: Celkové hmotnostní úbytky při abiotické degradaci*

	<b>CMC</b>	<b>HEC</b>	<b>AC</b>	<b>AŠ</b>	<b>REF</b>	<b>PB</b>
<b>Úbytek [%]</b>	10,67	7,84	0,11	1,08	0,72	1,02
<b>Celkový úbytek fólie [mg]</b>	<b>24,90</b>	<b>18,30</b>	<b>0,30</b>	<b>2,70</b>	<b>1,80</b>	<b>2,40</b>
<b>Množství PS uvolněných z fólie [mg]</b>	8,600	5,762	0,271	0,252	0,000	0,000
<b>Množství RS uvolněných z fólie [mg]</b>	0,120	1,130	0,090	0,000	0,000	0,000
<b>Množství CP uvolněných z fólie [mg]</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,49

## 9. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo popsat termofilní mikroorganismy a experimentálně ověřit potenciální využití směsné termofilní kultury k biodegradaci modifikovaných polyuretanových materiálů ve formě elastomerních fólií.

- V průběhu biodegradčních testů docházelo ke zřetelnému odbourávání materiálů, přičemž míra degradace materiálu silně závisela na použitém modifikačním činidle. K nejvýraznějšímu hmotnostnímu úbytku docházelo, pokud bylo jako modifikační činidlo použito karboxymethyl nebo hydroxyethyl celulosy. Avšak ani ostatní materiály včetně referenční fólie nebyly vůči degradačním procesům zcela rezistentní.
- Mechanismus rozpadu PUR fólií pravděpodobně zahrnuje dva kroky. V prvním dochází k abiotické degradaci materiálu, kdy se především díky působení vysoké teploty a vodního prostředí z materiálů uvolňují anebo rozpouštějí komponenty materiálů. Dle analýzy biodegradčních produktů můžeme konstatovat, že převážnou většinu takto uvolněných látek představují použité modifikační činidla.
- Druhým krokem, který následuje po abiotické degradaci materiálu je využití abiotických degradačních produktů bakteriální kulturou. Ta dokáže tyto biotické produkty využít tak, že v kompletním médiu výrazně podporují její růst. Nejintenzivněji růst bakteriální kultury podporovala PUR fólie modifikovaná karboxymethyl celulosou.
- V některých případech byl pozorován i nízký stupeň biotické degradace, nicméně vzhledem při porovnání s rozsahem abiotické degradace se jedná o zcela minoritní jev, který se významně nepodílí na celkové degradaci materiálu.
- Ačkoliv samotná plnidla však mohou sloužit jako jediný zdroj uhlíku, testovaná bakteriální kultura nedokáže využít PUR fólie jako jediný zdroj uhlíku nebo dusíku.
- Při expozici bakteriální kultury některým fóliím (referenční, modifikované acetylovaným škrobem a acetylovanou celulosou) docházelo k neobvyklému protažení lag fáze. Experimentálně bylo ověřeno, že tento jev byl způsoben dvěma produkty abiotické degradace fólií, a to polyetherpolyolu a katalyzátorem, přičemž pro natažení lag fáze je nutné, aby oba komponenty byly v kultivačním médiu přítomny současně. Doposud se na syntetické polymerní materiály pohlíželo především jako na zdroj pevného odpadu. To, že se z těchto materiálů mohou uvolňovat jiné látky o nízké molekulové hmotnosti, které mají výrazný ekologický dopad, je poměrně málo zdokumentovanou skutečností, která zaslouží další podrobné zkoumání. Zdá se, že toxický efekt samotného materiálu (referenční fólie) může být snížen vhodně zvolenou modifikací, kdy z materiálů testovaných v této práci nejlepší vlastnosti vykazuje karboxymethyl celulosy. Ta nevykazuje protaženou lag fázi, proto je množství uvolněných toxických komponent velice nízké. Fólie modifikovaná karboxymethyl celulosou vykazuje navíc nejvyšší degradabilitu a nejintenzivněji podporuje růst směsné termofilní bakteriální kultury.

## 10. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře*. 3. opravené vydání. Praha: Academia, 2002. 364 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [2] Hampl, B.: *Potravinářská mikrobiologie*, 1. vyd., Praha: SNTL, 1968. 276s.
- [3] Brock, T. D.: *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Dostupné na www: <http://digicoll.library.wisc.edu/Science/> [citováno 2007-04-28].
- [4] Kunc, F., Ottová, V.: *Mikrobiologie pro posluchače studijního oboru technologie vody*, 3. vyd., Praha: VŠCHT Praha, 1998. 174s. ISBN 80-7080-270-7.
- [5] Kolář, J.: *Charakteristika rodu a tvorba spor* [online]. 2001, poslední revize 2004 [citováno 2007-03-14]. Dostupné z: <<http://sweb.cz/kolar-jiri/jirka/detaily/charakt.htm>>.
- [6] Thermolysin [online]. 2001, poslední revize 2005 [citováno 2007-03-14]. Dostupné z: <[http://www.daiwa-enzymes.co.jp/pdf/catalog/THERMOLYSIN\\_en.pdf](http://www.daiwa-enzymes.co.jp/pdf/catalog/THERMOLYSIN_en.pdf)>.
- [7] Hudecová, D., Maltán, V.: *Mikrobiológia I*. 1. vyd. Bratislava: STU Bratislava, 2002. 189 s. ISBN 80-227-1663-4.
- [8] Fajt, J.: *Systém Archaeobakterií* [online]. 2003, posl. revize 30.11. 2006 [citováno 2007-06-24]. Dostupné z: <[http://botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/MB\\_system\\_t.pdf](http://botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/MB_system_t.pdf)>.
- [9] [online]. [citováno 2007-05-05]. Dostupné z: <<http://images.google.cz>>.
- [10] Chu, A. et al.: *Water Research*, vol. 30, 1996.
- [11] Ambrožová, J.: *Mikrobiologie v technologii vod*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2004. 244 s. ISBN 80-7080-534-X.
- [12] Dolejš, P.: *Příručka pro čištění a úpravu vod*. Přerov: KEMIFLOC,a.s., 1996. 133 s.
- [13] Dvořáček, J.: *Studium chování směsných termofilních bakteriálních kultur v různých kultivačních systémech*. Brno, 2004. Diplomová práce na Ústavu chemie potravin a biotechnologií na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Školitel: Ing. Libor Babák, Ph.D.
- [14] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2. opravené vydání, Praha: Academia, 1999. 192s. ISBN 80-200-0600-1.
- [15] Stovergroup, *BETT process a pilot plant* [online]. 1999, poslední revize 2005 [citováno 2007-04-15]. Dostupné z: <<http://www.stovergroup.com/bett/index.htm>>.
- [16] Zpracování kalů [online]. 1993, poslední revize 6/2007 [citováno 2007-03-03]. Dostupné z: <<http://www.asio.cz/czech/novinky.htm>>.

- [17] Voda [online]. 1998, poslední revize 5/2004 [citováno 2007-04-02]. Dostupné z: <<http://www.e-voda.cz/voda/Voda-kveten04.pdf>>.
- [18] Perso [online]. [citováno 2007-05-08]. Dostupné z: <[http://perso.orange.fr/isma/en\\_sat-documentation.html](http://perso.orange.fr/isma/en_sat-documentation.html)>.
- [19] Babák, L.: *Modelování a optimalizace kultivací průmyslově důležitých termofilních mikroorganismů*. Brno, 2005. Disertační práce na Ústavu chemie potravin a biotechnologií na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Školitel: prof. Ing. Mojmír Richtera, CSc.
- [20] Dohányos, M. a kol.: *Anaerobní čistírenské technologie*. 1. vyd. Brno: Noel 2000 s.r.o., 1998. 343 s. ISBN 80-86020-19-3.
- [21] Bioremediace [online]. 1999, poslední revize 2007 [citováno 2007-03-13]. Dostupné z: <[http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3062932/bioremediace\\_FRVS\\_2006-2.pdf](http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3062932/bioremediace_FRVS_2006-2.pdf)>.
- [22] Munster, M. J., Munster, A. P., Sharp, R. J.: Incidence of Plasmids in *Thermus* spp. Isolated in Yellowstone National Park. *Applied and environmental microbiology*, 1985, vol. 50, no. 5, pp. 1325-1327. ISSN 0099-2240.
- [23] Slabihoudová, I.: *Studium chování termofilní bakteriální populace ovlivněné způsobem kultivace a vnějšími podmínkami*. Praha, 2002. Diplomová práce VŠCHT Praha.
- [24] Görner, F., Valík, L'.: *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [25] Dohányos, M., Koller, J., Strnadová, N.: *Čištění odpadních vod*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 1998. 177 s. ISBN 80-7080-316-9.
- [26] Lapara, T. M., Alleman, J. E.: Thermophilic aerobic biological wastewater treatment. *Water Research*, 1999, vol. 33, is. 4, pp. 895-908. ISSN 0043-1354.
- [27] Water technology [online]. 2007, poslední revize 2007 [citováno 2007-04-13]. Dostupné z: <[http://www.water-technology.net/projects/reading\\_sewage/](http://www.water-technology.net/projects/reading_sewage/)>.
- [28] Jogurt [online], poslední revize 7.5. 2004 [citováno 2007-06-25]. Dostupné z: <[http://druidova.mysteria.cz/ZDRAVA\\_VYZIVA/JOGURT.htm](http://druidova.mysteria.cz/ZDRAVA_VYZIVA/JOGURT.htm)>.
- [29] Agronavigator [online], poslední revize 2006 [citováno 2007-07-04]. Dostupné z: <[http://www.agronavigator.cz/attachments/Sukova\\_Syrovatka.pdf](http://www.agronavigator.cz/attachments/Sukova_Syrovatka.pdf)>.
- [30] Icpf [online], poslední revize 2005 [citováno 2007-06-26]. Dostupné z: <[http://www.icpf.cas.cz/trogl/CD/Literární%20zdroje/2\\_diplomka.doc](http://www.icpf.cas.cz/trogl/CD/Literární%20zdroje/2_diplomka.doc)>.

- [31] VUT [online], poslední revize 2007 [citováno 2007-07-06]. Dostupné z: <[http://smetana.fch.vutbr.cz/r\\_studenti/4.rocnik/UHPBT/Principy%20uchovavani%20potravin/](http://smetana.fch.vutbr.cz/r_studenti/4.rocnik/UHPBT/Principy%20uchovavani%20potravin/)>.
- [32] Turbidimetrie [online], [citováno 2009-03-11]. Dostupné z: <<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://uprt.vscht.cz/ucebnice/mrt/F4/F4k46-o494.gif&imgrefurl=http://uprt.vscht.cz/ucebnice/mrt/F4/F4k46-sloz.htm&usg>>.
- [33] Sommer, L.: *Základy analytické chemie 2*. 1. vyd.. Brno: VUT, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [34] Piechová, J.: *Biodegradace organických látek aplikací termofilní kultury*. Brno, 2008. Diplomová práce na Ústavu chemie potravin a biotechnologií na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Školitel: Ing. Libor Babák, Ph.D.
- [35] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 80-902155-05.
- [36] Spektrofotometrie [online], poslední revize 1.11. 2008 [citováno 2009-03-12]. Dostupné z: <<http://analytika.upol.cz/elektromigrace/docs/navody/ACHSB/pdf/09.pdf>>.
- [37] Spektrofotometrie [online], poslední revize 2009 [citováno 2009-03-12]. Dostupné z: <<http://www.google.cz/search?hl=cs&q=VIS+spektrofotometrie&lr=&aq=f&oq=>>>.
- [38] Filipi, B.: *Plasty*. 1. vyd.. Ostrava: VŠB, 2003. 48 s. ISBN 80-86634-13-2.
- [39] Horáková M. a kol. *Analytika vody*. VŠCHT Praha, 2000. ISBN 80-7080-520-1.
- [40] Richtera, M., Páca, J.: *Bioinženýrství kvasných procesů*; SNTL Praha, 1985. ISBN 1-263-58975-4.
- [41] [online], poslední revize 2009 [citováno 2009-03-12]. Dostupné z: <[http://sci.muny.cz/data/C6210/C6210\\_Bioproceny\\_1-2.pdf](http://sci.muny.cz/data/C6210/C6210_Bioproceny_1-2.pdf)>.
- [42] Wypych G. *Handbook of Material Weathering (3rd Edition)*. ChemTec Publishing, 2003. 644-662 s. ISBN 1-59124-539-7.
- [43] Wypych G. *Handbook of plasticizers*. ChemTec Publishing, 2004. 241 – 243 s. ISBN 1-59124-705-5.
- [44] [online], poslední revize 2009 [citováno 2009-04-06]. Dostupné z: <[http://stary.biom.cz/clen/as/biodegr\\_test.html](http://stary.biom.cz/clen/as/biodegr_test.html)>.
- [45] Ducháček, V.: *Polymery – Výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 1. vydání, 1995, VŠCHT Praha, 354 s. ISBN 80-7080-241-3.

- [46] [online], poslední revize 2009 [citováno 2009-04-06]. Dostupné z: <<http://www.gymik.cz/finsko/projekty/Biodegradace.pdf>>.
- [47] [online], poslední revize 2009 [citováno 2009-04-06]. Dostupné z: <<http://www.hbabio.cz/faq.html>>.
- [48] Obruča, S.: *Využití různých typů bakterií k produkci a biodegradaci modifikovaných kompozitních materiálů a jejich složek*. Brno: Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu potravinářské chemie a biotechnologie. 2007. 113 stran.
- [49] Káš J., Kodíček M., Valentová O.: *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. 258 str. ISBN 80-7080-586-2.
- [50] Márová, I., Vránová, D.: *Praktikum z biochemie*, ÚCHPBT FCH VUT v Brně, 2002.
- [51] [online], poslední revize 2009 [citováno 2009-04-21]. Dostupné z: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Gravimetrie\\_\(chemie\)](http://cs.wikipedia.org/wiki/Gravimetrie_(chemie))>.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AC	Acetylovaná celulóza
AŠ	Acetylovaný škrob
CMC	Karboxymethyl celulóza
HEC	Hydroxyethyl celulóza
K	Kontrola
REF	Referenční pěna bez plnidla
PB	Pšeničná bílkovina
CHSK	Chemická spotřeba kyslíku (g/l)
BSK	Biologická spotřeba kyslíku
FUCHS ATAD proces	Aerobní termofilní stabilizace
ATAD proces	Autotermní termofilní aerobní stabilizace kalu
TAS proces	Termofilní stabilizace kalu
BETT proces	Biologicky vylepšené termofilní čištění
$\text{NAD}^+$ , $\text{NADH}+\text{H}^+$	Nikotinamidadeninukleotid a jeho redukovaná forma
ATP	Adenosintrifosfát
$\text{ADP} + \text{P}_i$	Adenosindifosfát + fosfátová jednotka
CoA	Koenzym A
FAD	Flavinadeninukleotid
GTP, GDP	Guanosintrifosfát, Guanosindifosfát
HSP	Heat shock proteins
DS	Dvojité zpracování kalu
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
RPM	Revolutions per minute