

Využívání dimethyldisulfidu bakteriální kulturou *Comamonas testosteroni* RF2

Bc. Jakub Hejtmánek

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jakub HEJTMÁNEK**
Osobní číslo: **T12363**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Využívání dimetyldisulfidu bakteriální kulturou
Comamonas testosteroni RF2**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na vlastnosti dimetyldisulfidu, na schopnost bakterií využívat jej a na biologické účinky dimetyldisulfidu.
2. Provedte zkoušky toxicity dimetyldisulfidu vůči bakterii *Comamonas testosteroni* RF2, případně i vůči jiným druhům bakterií.
3. Provedte testy odstraňování dimetyldisulfidu bakterií *Comamonas testosteroni* RF2 z vodného prostředí.
4. Výsledky přehledně zpracujte požadovanou formou a diplomovou práci odevzdejte v písemné i elektronické podobě v předepsaném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

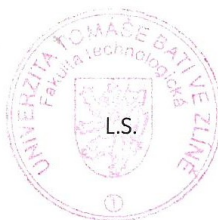
10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: HEJTMANEK JAKUB

Obor: IOŽP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 7.5.2014


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací;

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

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

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

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce byla zaměřena na zkoumání rozkladu a využívání sirné těkavé sloučeniny dimethyldisulfidu (DMDS) bakteriální kulturou *Comamonas testosteroni* RF 2 za aerobních podmínek. V literární rešerši jsou popsány vlastnosti DMDS, doposud známé způsoby jeho odstranění, jakožto i možnosti jeho využití. Vlastní experimentální výsledky ukázaly, že minimální inhibiční koncentrace DMDS pro bakteriální kulturu RF 2 je 650 mg/l. Z dalších pokusů bylo potvrzeno, že bakterie je schopna využívat DMDS jako jediný zdroj síry. Sledováno bylo také využívání DMDS jako doplňkového zdroje uhlíku či energie, což se však pomocí provedených testů nepodařilo potvrdit, ačkoliv z experimentů bylo zřejmé, že DMDS určitým způsobem na studovanou bakterii působí, neboť v testech bylo pravidelně zaznamenáváno zvyšování sušiny buněk v přítomnosti určitých přísad DMDS.

Klíčová slova: dimethyldisulfid, DMDS, *Comamonas testosteroni*, aerobní, biofiltr

ABSTRACT

In this master thesis, an examination and utilization of volatile sulphur substance dimethyl disulfide (DMDS) by bacterial culture *Comamonas testosteroni* RF2 under aerobic conditions was the main objective. The properties of DMDS and known methods for its removal are described. Outline of possible methods of its utilization follows after. The end results from experiments indicated that the minimum inhibitory concentration of DMDS for bacterial culture RF2 is 650 mg/l. Other experiments showed that RF2 bacterium is able to use DMDS as the only sulfur source . The utilization of DMDS as an additional carbon and energy source was monitored as well. Although it was clear from the experiments that DMDS affects studied bacterium in a certain way (increasing dry cell weight of growing cells in the presence of DMDS was periodically recorded) the ability of RF2 cells to utilize DMDS as an additional source of carbon and energy have not been confirmed by these experiments.

Keywords: dimethyl disulfide, DMDS, *Comamonas testosteroni*, aerobic, Biofilter

Děkuji především vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady, které mi průběžně poskytoval. Poděkování patří také laborantkám, paní Lence Machákové, Bc. Veronice Kučabové a Věře Zbrankové.

Motto: Jedna víra, jeden tým, jeden cíl: INŽENÝR

Citát: MATOUŠ 25:29: „Každému, kdo má, bude dáno a přidáno; kdo nemá, tomu bude odňato i to co má.“

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 DIMETHYLDISULFID (DMDS)	13
1.1 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI DMDS	13
1.2 VLASTNOSTI DMDS.....	13
Rizikové H věty pro DMDS:	14
1.3 VÝSKYT DMDS	14
1.3.1 Vznik přirozenými procesy	14
Produkce DMDS kompostováním	15
Produkce DMDS drůbeží.....	17
1.3.2 Antropogenní zdroje DMDS	17
DMDS při odstranění rtuti.....	18
2 DEGRADACE A VYUŽÍVÁNÍ DMDS BAKTERIEMI	19
2.1 DEGRADACE DMDS BAKTERIÍ <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> (KMEN 76)	19
2.2 CHEMICKÁ DEGRADACE DMDS	19
3 DMDS JAKO INHIBITOR QUORUM SENSING.....	21
4 ODSTRAŇOVÁNÍ DMDS A PODOBNÝCH LÁTEK V BIOFILTRECH	23
4.1 BIOFILTRACE TĚKAVÝCH ORGANICKÝCH SLOUČENIN SÍRY	23
5 BAKTEIE <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i> RF 2	25
6 DOSAVADNÍ VÝLEDKY ZÍSKANÉ NA FT UTB.....	26
6.1 VÝLEDKY STUDENTSKÉ A DIPLOMOVÉ PRÁCE V. HUTĚČKY	26
6.2 VÝLEDKY DIPLOMOVÉ PRÁCE B. VALOVÉ	26
II PRAKTICKÁ ČÁST	27
7 POUŽÍVANÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY, ŽIVNÁ MÉDIA, BAKTERIÁLNÍ KULTURY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	28
7.1 POUŽÍVANÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA.....	28
7.1.1 Zásobní roztok citronanu sodného	28
7.1.2 Kompletní minerální médium (KMM).....	28
7.1.3 Bezsírné minerální médium (BMM)	29
7.1.4 TYA agar.....	30
7.1.5 Sabouraudův agar	30
7.1.6 Standardní roztok DMDS.....	30
7.1.7 Fyziologický roztok.....	30
7.1.8 Zásobní vodný roztok DMDS (ZVR DMDS)	30
7.1.9 Fosfátový pufr	30
7.2 POPIS POUŽÍVANÝCH MIKROBIÁLNÍCH KULTUR.....	31
7.2.1 <i>Comamonas testosteroni</i> RF	31

7.3	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	31
8	PRACOVNÍ POSTUPY	33
8.1	STANOVENÍ TOXICITY DMDS NA ROSTOUCÍ BUŇKY <i>COMAMONAS</i> <i>TESTOSTERONI</i> RF2	33
8.2	STANOVENÍ TOXICITY DMDS NA ROSTOUCÍ BUŇKY <i>E. COLI</i>	34
8.3	SLEDOVÁNÍ RŮSTU BAKTERIE <i>C. TESTOSTERONI</i> NA DMDS JAKO ZDROJI SÍRY.....	35
8.4	VYUŽÍVÁNÍ DMDS JAKO DOPLŇKOVÉHO ZDROJE UHLÍKU	36
8.5	VYUŽÍVÁNÍ DMDS JAKO DOPLŇKOVÉHO ZDROJE UHLÍKU SE STANOVENÍM MÍRY ODSTRANĚNÍ DMDS	36
8.6	VYUŽÍVÁNÍ METHANOLU JAKO ZDROJE UHLÍKU A JAKO ZDROJE ENERGIE	37
8.7	SESTAVENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY DMDS	38
9	VÝSLEDKOVÁ A DISKUZNÍ ČÁST.....	39
9.1	STANOVENÍ TOXICITY DMDS NA ROSTOUCÍ BUŇKY <i>COMAMONAS</i> <i>TESTOSTERONI</i> RF2	39
9.2	STANOVENÍ TOXICITY DMDS NA ROSTOUCÍ BUŇKY <i>E. COLI</i>	41
9.3	SLEDOVÁNÍ RŮSTU BAKTERIE <i>C. TESTOSTERONI</i> NA DMDS JAKO ZDROJI SÍRY.....	43
9.4	VYUŽÍVÁNÍ DMDS JAKO DOPLŇKOVÉHO ZDROJE UHLÍKU	44
9.5	SESTAVENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY DMDS	49
9.6	VYUŽÍVÁNÍ DMDS JAKO DOPLŇKOVÉHO ZDROJE UHLÍKU SE STANOVENÍM MÍRY ODSTRANĚNÍ DMDS	51
9.7	VYUŽÍVÁNÍ METHANOLU JAKO ZDROJE UHLÍKU A JAKO ZDROJE ENERGIE	57
	ZÁVĚR	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	63
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	67
	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
	SEZNAM TABULEK.....	69
	SEZNAM ROVNIC	70

ÚVOD

V současné době už není dbáno jen na toxicitu látek, se kterými se pracuje, ale také se více sleduje jejich zápach, neboť člověk již vyžaduje určité pohodlí. Zapáchající látky jsou uvolňovány z průmyslových výroby, zemědělství nebo zpracování odpadů, ale také jsou mnohdy přírodního původu, kde však jsou jejich koncentrace řádově nižší než v průmyslu. Mezi tyto látky lze samozřejmě zařadit jakékoliv sirné sloučeniny, jejichž zápachy bývají velmi specifické i při velmi nízkých koncentracích. Proto se v posledních letech vypracovalo spoustu studií jak tyto látky degradovat nebo eliminovat jejich zápach ať už formou chemickou, fyzikální, mechanickou nebo biotechnologickou. Biotechnologická forma odstranění ať už toxických nebo zapáchajících látek se v současnosti začíná vysoce rozvíjet a je to víceméně požadovaný způsob, protože jde o využití přirozených procesů. Látky, které tímto způsobem vznikají, jsou netoxické, většinou se jedná o CO₂ a vodu.

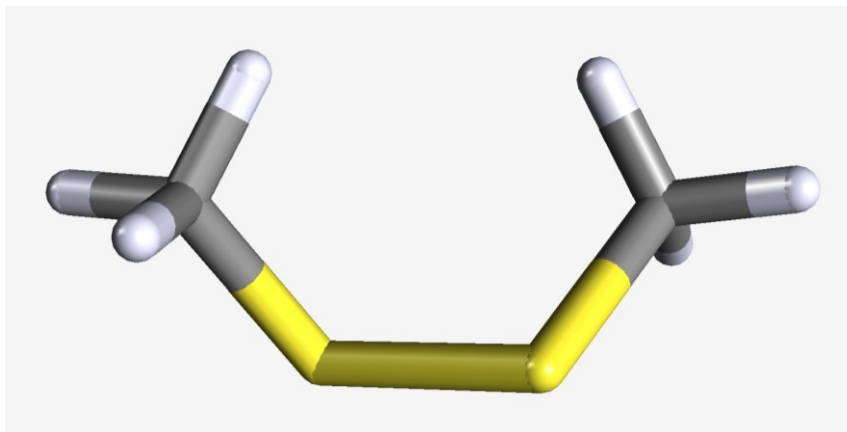
Sirnou sloučeninou, kterou jsem se zabýval v této diplomové práci, je dimetyldisulfid (DMDS), je to látka toxická a silně zapáchající i při velmi nízkých koncentracích. Jejím biotechnologickým odstraněním v biofiltrech se zabývalo několik studií již v předchozích letech, které jako nejvhodnější bakterie k tomuto účelu určily bakterie rodu *Thiobacillus*. V roce 2007 byla popsána bakterie *Pseudomonas fluorescens*, která se k odstranění DMDS hodí ještě více než zmíněný rod *Thiobacillus*.

Na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, byla objevena bakterie, která také využívá DMDS, později identifikovaná jako *Comamonas testosteroni* RF 2, a která byla studována již v dřívějších diplomových pracích, jejíž podrobný význam při odstranění DMDS a jeho využívání je popsán až v této diplomové práci.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 DIMETHYLDISULFID (DMDS)

Struktura DMDS: $\text{CH}_3 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_3$



Obr. 1 Struktura DMDS

1.1 Fyzikální vlastnosti DMDS

Molekulová hmotnost: 94,2 g/mol

Bod tání: -85 °C

Bod varu: 105 °C

Hustota: 1,046 g/cm³

[1]

1.2 Vlastnosti DMDS

Dimethyldisulfid (DMDS) je přirozeně se vyskytující sirná těkající sloučenina, jenž je charakteristická česnekovým zápachem i při velmi nízkých koncentracích.[2] Prahová koncentrace zápachu činí 0,1 µg / m³. [3]

Jedná se o čirou, lehce nažloutlou olejovitou hořlavou kapalinu druhé kategorie, která patří mezi toxické látky s akutní toxicitou při vdechnutí i orálním požití. Toxická je především, pro některé orgány jako jsou játra a ledviny, při zasažení plic může být příčinou bronchopneumonie. DMDS je chronicky toxický pro životní prostředí a může vyvolat dlouhodobé nepříznivé podmínky v životním prostředí. Letální dávka u krysy při orálním použití je stanovena na 300 mg/kg.[1, 2]

Rizikové H věty pro DMDS:

H225	Vysoce hořlavá kapalina a páry.
H302	Zdraví škodlivý při požití.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
H331	Toxický při vdechování.
H335	Může způsobit podráždění dýchacích cest.
H411	Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.[1]

1.3 Výskyt DMDS

Dimethyldisulfid se přirozeně vyskytuje ve všech složkách životního prostředí tam, kde dochází k rozkladu organické hmoty, jakýmkoli mikrobiálními procesy.[2]

1.3.1 Vznik přirozenými procesy

Výzkumem vzniku DMDS bakteriálními procesy se zabýval Schöller a kol., kteří sledovali závislost produkce těkavých sloučenin kulturami gramnegativních bakterií, jako jsou *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia liquefaciens* a *Enterobacter cloacae*. Jako růstový substrát bylo použito 50 ml minerálního média obohaceného o 1 % citronanu sodného nebo glukosu, které bylo uzavřeno v 500 ml kuželovitých láhvích za neustálého provzdušňování a míchání při 30 °C. Pokus byl prováděn přes noc, kdy byly odebrány těkavé metabolity a následně analyzovány na GC-FID. Z výsledků práce bylo zjištěno, že DMDS vzniká převážně u *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* a *E. cloacae*. Zajímavým zjištěním bylo, že DMDS nevznikal ve vzorcích, kde byla zdrojem uhlíku použita glukosa.[4]

Bakteriální produkci DMDS se také zabývali Tomita a kol., kterým se povedlo izolovat z aktivovaného kalu 24 druhů bakterií, jenž produkují DMDS. Získané bakterie byly rozděleny do čtyř skupin. Ve skupině A byly 3 kultury rodu *Lactobacillus*, ve skupině B 8 kultur rodu *Corynebacterium*, do skupiny C byl zařazen jen jeden druh rodu *Corynebacterium* a do skupiny D náleželo 12 gramnegativních bakteriálních kultur rodů *Pseudomonas*, *Achromobacter* a *Alcaligenes*. Následně autoři zkoumali produkci DMDS různými kulturami na živných půdách z DL-methioninu a S-methyl-L-cysteinu. Výsledkem bylo zjištění,

že z rodu *Pseudomonas* nevytváří DMDS na použitých živných půdách pouze *P. aeruginosa*. DMDS tedy vytváří *P. acidovarans*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes* a *P. testosteronei*. Mezi další producenty DMDS se zařadily *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xyloxydans*, *A. denitrificans* subsp. *denitrificans*, *A. faecalis* a *A. odorant*. [5]

Produkce DMDS kompostováním

Na vzniku sirných těkavých sloučenin jako je sulfan (H_2S), methylmerkaptan, dimethylsulfid (DMS), dimethydisulfid (DMDS) a oxid siřičitý (SO_2), se podílejí rozkladné procesy, které probíhají v rámci kompostování tuhého komunálního, rostlinného a kuchyňského odpadu.

Kompostováním se zabývali vědci Zhang a kol., kteří porovnávali 3 způsoby kompostování a jejich vliv na tvorbu DMDS:

- Kompostování tuhého komunálního odpadu ve vrstvě 15 – 80 mm
- Kompostování kuchyňského odpadu
- Kompostování kuchyňského odpadu + kukuřičná stébla

Cílem jejich práce bylo zjistit způsob, při kterém dochází k nejnižším emisím skleníkových plynů a zápachu. Odpad ve všech třech způsobech obsahoval mírně odlišné množství vázané síry, v prvním případě to bylo 0,56 %, ve druhém případě 0,69 % a ve třetím způsobu odpad obsahoval 0,61 %. Produkce DMDS však nebyla dána jen obsahem síry v jednotlivých způsobech kompostování. Nejvíce DMDS bylo produkováno druhým způsobem a to kompostováním samotného kuchyňského odpadu, jehož množství činilo 140,5 mg / kg odpadu. Přibližně poloviční koncentrace DMDS byla vyprodukována kompostováním komunálního odpadu ve vrstvě 15 – 80 mm a to 75 mg / kg odpadu. Nejméně DMDS vzniklo kompostováním kuchyňského odpadu s kukuřičnými stébly, zjištěná hodnota činila 43,9 mg / kg odpadu.

Zajímavým zjištěním v této studii byl právě vliv kukuřičných stébel na snížení produkce zápachajících látek. Při použití poměru odpadu a kukuřičných stébel 4:1 byl obsah vznikajícího DMDS nižší o 66,8 % než u samotného kuchyňského odpadu. [6]

Studii na vznik těkavých sirných sloučenin v potravinářském odpadu z kuchyní vypracovali Ting Wu a kol. Cílem jejich práce bylo zjistit složení těkavých sirných sloučenin

v průběhu aerobního rozkladu potravinářského odpadu a množství těchto sloučenin vznikajících ve stanoveném časovém intervalu.

Autoři odebírali vzorky z popelnic na sídlištích, přičemž odpad nebyl v popelnicích déle než 24 hodin. Odpad se skládal z ovocných slupek, odřezků zeleniny, zbytků masa a zkažených jídel. Pro urychlení rozkladu byly větší kusy nadrceny na kousky o velikosti 0,5-1 cm. Následně byl odpad vysušen při 60 °C po dobu 48 hodin, a bylo zjištěno, že sušina odpadu obsahuje 1,3 g síry na kg odpadu. Pokus byl prováděn ve válcovém skleněném reaktoru o objemu 11 litrů, který měl zabudovaný přívod a odvod vzduchu, na dně reaktoru byla 5 cm vrstva šterku a skleněných vláken. Reaktor byl naplněn 2 kg vysušeného odpadu spolu s 50 ml výluhu z aerobního rozkladu komunálního odpadu. Pro zajištění aerobních podmínek bylo nutné reaktor provzdušňovat. Poté byly každý den odebírány plynné vzorky a analyzovány na GC-MS. Měření probíhalo 41 dnů.

Měřením vědci zjistili, že ze sirných těkavých látek vzniká v potravinovém odpadu nejvíce DMDS a to 309,4 mg DMDS na kg odpadu, přičemž celková produkce sirných sloučenin činila 409,9 mg/kg odpadu. Na počátku byla produkce DMDS minimální, maximální produkce byla mezi druhým a čtvrtým dnem, poté produkce prudce klesala a v desátém dnu byla produkce DMDS nulová, což pokračovalo až do 41. dne. Vědci tedy zjistili, že z potravinového odpadu vzniká nejvíce DMDS a je produkován v prvních 10 dnech od vhození odpadu do popelnice.[7]

Susaya a kol. sledovali výskyt redukovaných sirných sloučenin (H_2S , DMS a DMDS) ve vnitřním ovzduší v Ansanu v Jižní Koreji. Obsah DMDS v místnosti byl 0,11 ppb, obsah H_2S byl vyšší, a to 0,27 ppb. Celkově autoři zjistili, že sirné látky se vyskytují ve vnitřním prostředí přirozeně a přispívají tak k zápachu zejména v nočních hodinách v letních měsících.[8]

Dimethyldisulfid nemusí vznikat jen mikrobiálními procesy, ale vyskytuje se i v rostlinách. Důkazem toho je i výskyt v oleji semen rostliny kakostu krvavého[9]. Mezi další rostliny, které produkují DMDS, patří i řada sladkovodních řas a jeho výskyt byl tak prokázán ve vodách, kde dochází k vysokému nárůstu sladkovodních řas.[10]

Vznik DMDS ve vodě zkoumali Lu a kol. Jejich výzkum spočíval ve sledování znečištěné vody, ve kterých docházelo k výraznému růstu řas a sinic a následně k eutrofizaci vod. Autoři porovnávali znečištěnou vodu s přidavkem aminokyseliny methioninu a samotnou

znečištěnou vodu. V obou případech docházelo k produkci těkavých sirných sloučenin s mírnou dominancí DMDS. Ve vodách s přídavkem methioninu docházelo až ke vzniku tzv. černého květu, kdy produkce DMDS dosahovala až koncentrace 46,1 mg/l. Ve vodách bez přídavku methioninu byl obsah DMDS řádově nižší.[11]

Produkce DMDS drůbeží

Mezi přírodní producenty zapáchajících sirných sloučenin lze zařadit i chov drůbeže, který ve své studii zkoumali Murphy a kol. S růstem počtu obyvatelstva roste i poptávka po masu a tak je nutné rozšiřovat chovy všech na maso chovaných zvířat v daném případě drůbeže. Rozšiřující chovy s sebou však přináší i vzrůstající množství emisí zapáchajících látek. Zároveň dochází také ke zpřísnění zákonů o vypouštění emisí těchto látek, což vedlo vědce ke snaze porozumět vztahu mezi zápachem a produkcí zapáchajících látek.

K měření byla využívána metoda plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC – MS). Vzorky plynů byly odebírány z každé z pěti hal, kde byla drůbež ustájena. Haly byly dlouhé tunely s přístřeškem, kde na jednom z konců byly mechanické větráky, ze kterých byly vzorky odebírány. Odebírání probíhalo po dobu 35 dnů, vždy 6 vzorků mezi 7 a 13 hodinou. Současně byla měřena míra zápachu pomocí olfaktometru, čímž se zjistí nejnižší možná prahová koncentrace látky, při které ještě látka zapáchá.

(Zapáchajícími látkami se zabývá olfaktometrie a jednotkou zápachu je OU_E / m^3 . Jednotka udává množství odorantu rozptýleného v $1 m^3$, které vyvolá fyziologickou reakci u respondentů.)

Výsledkem práce bylo zjištění, že koncentrace DMDS v odebraných vzorcích byla v ranních hodinách $0,28 \mu g / m^3$ a v poledních hodinách činila $0,35 \mu g / m^3$. Prahová koncentrace pro DMDS je $0,1 \mu g / m^3$. Z výsledků autoři usoudili, že se zvyšující se teplotou v průběhu dne se zvyšovala produkce pachových látek.[12]

1.3.2 Antropogenní zdroje DMDS

Mezi antropogenní zdroje však patří především ty, které jsou uvolňovány z průmyslové činnosti, kde se DMDS používá při výrobě nebo vzniká jako vedlejší nežádoucí produkt.

DMDS při odstranění rtuti

Autoři této studie Asasian a kol. se zabývali odstraněním rtuti z odpadních vod. Rtuť je těžký kov, vysoce toxický pro životní prostředí a je nutno ji odstraňovat. K tomu slouží adsorpce na aktivním uhlí, pro zvýšení účinnosti se však přidávají k aktivnímu uhlí sírné sloučeniny. Dříve byly hojně používány sulfany a sulfidy alkalických kovů nebo kyselina sírová. Mezi nové sumarizační činidlo patří dimethyldisulfid, který obsahuje vysoké množství síry až 68 hmotnostních % a je hojně využíván i v jiných průmyslových procesech.

Autoři porovnávali působení modifikovaného aktivního uhlí obohaceného o DMDS a o sulfid uhličitý (sirouhlík). Domnívali se hned od počátku, že DMDS bude účinnější než sulfid uhličitý, jelikož v DMDS je síra vázána jen jednoduchou vazbou, kdežto v sulfidu uhličitém dvojitou.

Modifikace aktivního uhlí probíhala tak, že se aktivní uhlí ponořilo na 48 hodin do roztoku DMDS za stálého třepání při 30 °C. Adsorpce rtuti modifikovaným uhlím trvala 72 hodin. Z výsledků práce je patrné že DMDS je účinnější než sulfid uhličitý, a to přibližně 1,5 krát. Oproti samotnému aktivnímu uhlí bylo aktivní uhlí modifikované DMDS účinnější dvojnásobně.[13]

2 DEGRADACE A VYUŽÍVÁNÍ DMDS BAKTERIEMI

2.1 Degradace DMDS bakterií *Pseudomonas fluorescens* (kmen 76)

Jak již bylo popsáno výše DMDS je velmi zapáchající látka, která je zároveň toxická pro všechny organismy a je nutné ji odstraňovat. Nejlepším způsobem odstranění DMDS a látek podobné povahy je biodegradace. Již dříve byly známy metabolické pochody při využívání DMDS bakterií *Thiobacillus thioparus*, *Pseudonocardia asaccharolytica* a *Pseudonocardia sulfidoxydans*. Tyto bakterie využívají DMDS jako jediný zdroj uhlíku, ale špatně rostou při vysokých koncentracích DMDS. [1, 14, 15, 16]

Degradací DMDS se zabývali Takashi a spol., kteří vybrali 8 mikroorganismů, u nichž předpokládali tuto schopnost. Připravili živné médium, kde jediným zdrojem uhlíku byla glukóza a zdrojem síry DMDS. Kultivace probíhala při 30 °C za neustálého třepání v uzavřené nádobě. Identifikace mikrobakterií probíhala fotometricky, kmen 76 byl objeven v UV oblasti při 254 nm. Tento kmen byl identifikován taxonomickou charakterizací a sekvenční analýzou proteinů jako *Pseudomonas fluorescens*.

Následnou analýzou pomocí GC–FID zjistili, že kmen 76 je schopen využívat DMDS jako jediný zdroj síry, avšak nepatří mezi methanotrofy protože neroste na DMDS a sloučeninách obsahující chlor, pokud jsou tyto sloučeniny jediným zdrojem uhlíku. Do této doby byly známy pouze mikroorganismy methanotrofní, které však neměly příliš velkou odolnost vůči vysokým koncentracím DMDS, jenž nerostly na koncentracích vyšších než 188 mg/l DMDS. Kmen 76 ukázal vysokou odolnost a rostl při koncentracích vyšších než 851,5 mg/l. Na základě těchto zjištění autoři usoudili, že kmen 76 metabolizuje DMDS a má dvojí fyziologickou roli, a to rozklad DMDS a asimilaci síry v něm obsažené.

Závěrem práce bylo zjištění, že kmen 76 díky vysoké odolnosti vůči DMDS a jeho využívání jako jediného zdroje síry je vhodný pro použití k biodegradaci DMDS.[17]

2.2 Chemická degradace DMDS

Chemické degradaci se věnovali Dallago a spol., kteří ve své práci popisují rozklad DMDS Fentonovou reakcí, která spočívá v reakci DMDS s peroxidem vodíku za přídavku solí železa. Studie se věnuje porovnání degradací samotným peroxidem vodíku, který se využíval již dříve, a Fentonovou reakcí. K pokusu autoři využili standardní komerční

DMDS, který byl následně extrahován na pevnou fázi. Roztok DMDS byl rozdělen do tří řad injekčních lahvíček po 20 ml, v každé lahvičce bylo 10 ml vzorku, přičemž v první řadě, byl samotný DMDS, ve druhé řadě byl DMDS s přídavkem 30% peroxidu vodíku a ve třetí řadě bylo využito Fentonové reakce, kdy byl k 30 % peroxidu vodíku přidán roztok síranu železnatého. Cílem práce tedy bylo zjistit maximální degradaci DMDS s co nejnižšími přídavky peroxidu vodíku a síranu železnatého za různých teplot a pH.

První řada lahvíček byla využita k vytvoření modelu, ze kterého autoři zjistili spolehlivost metody přes 95 %. Výsledkem práce bylo zjištění, že maximální degradace DMDS v roztoku se samotným peroxidem vodíku po 30 minutách v roztoku s pH 3 a teplotou 60°C dosahovala 59,7 %. Degradace DMDS Fentonovou reakcí se ukázala jako mnohem účinnější než samotným peroxidem vodíku a dosahovala, až 95 %. Reakce proběhly už po 10 minutách při pH 3 a teplotě 60 °C.[18]

3 DMDS JAKO INHIBITOR QUORUM SENSING

Quorum sensing je biochemický systém, který umožňuje mezibuněčnou komunikaci bakteriálních buněk a jejich koordinované chování. Mnoho druhů bakterií používá quorum sensing ke koordinaci své genové exprese v závislosti na místní hustotě jejich populace.

Tomuto tématu se věnovali Chernin a kol. Expres fenotypových charakteristik u gramnegativních bakterií, jako je například bioluminiscence, tvorba biofilmu, produkce faktorů virulence, exoenzymů, antibiotik a pigmentů je často regulována buněčnou hustotou prostřednictvím signálních látek, což jsou u gramnegativních bakterií deriváty N-acyl-homoserin laktonu. Naproti tomu mají některé mikroorganismy schopnost degradovat signální látky určitých bakteriálních druhů, což je označováno jako quorum quenching. Quorum quenching je tak důležitým mechanismem soutěže mezi bakteriemi, kde může zvýhodnit jeden bakteriální druh před druhým.

Autoři práce vycházeli z faktu, že systém quorum sensing byl již popsán u mnoha druhů rhizobakterií, které se vyskytují v rhizosféře, tedy v oblasti kořenů rostlin. Cílem jejich práce bylo popsat těkavé organické látky, které produkují rhizobakterie, a které se podílejí na interakci mezi rostlinami a fytopatogenními mikroorganismy. U rhizobakteriálních těkavých organických látek bylo prokázáno, že inhibují mikrobiální rostlinné patogeny a mohou tak vyvolat systémovou rezistenci rostlin, čímž podporují jejich růst. Autoři prokázali, že těkavé látky produkované rhizosférickými kmeny *Pseudomonas fluorescens* B-4117 a *Serratia plymuthica* IC1270 drasticky potlačují růst patogenních bakterií rodu *Agrobacterium* a jsou tedy důležité při potlačování nemoci „crown gall“, postihující rajčata. Z výzkumu bylo zřejmé, že je možné potlačit signály quorum sensing u několika patogenních bakterií, jejichž N-acyl-homoserin laktonové deriváty byly již charakterizovány.

Jak autoři zjistili, hlavní produkovanou těkavou látkou kmene *Serratia plymuthica* IC 1270 je DMDS, proto byla tato látka testována na aktivitu quorum quenching. Účinek DMDS byl testován do koncentrace 200 μM , což odpovídá 18,84 mg/l. Inhibice systému quorum sensing u bakterií r. *Agrobacterium* byla pozorována i při nejnižších dávkách 10 – 20 μM (0,942 – 1,884 mg/l), nejvíce zřetelná však byla při koncentracích 50 – 100 μM (4,71 – 9,42 mg/l). Ke zjištění, zda pozorovaná inhibice quorum sensing těkavými organickými látkami účinkuje v důsledku potlačení produkce N-acyl-homoserin laktonu nebo v důsledku inaktivace již vytvořených molekul N-acyl homoserin laktonu, byly provedeny

série pokusů s modelovými kulturami bakterií, a to s *P. chlororaphis* 449 a *P. aeruginosa* PAO1, z nichž byly po kultivacích získávány ethyl acetátové extrakty. Tyto kultury byly pěstovány na třech agaroch: na agaru s přítomností těkavých organických látek emitovaných *S. plymuthica* IC1270, na agaru s DMDS a na agaru bez přídavku (kontrolní čistý agar). Extrakty získané z kultury rostoucí v přítomnosti DMDS (50 μmol = 4,71 mg/l) a v přítomnosti těkavých organických látek z *S. plymuthica* IC1270 ukázaly, že k tvorbě signálních látek, které by byly schopny indukovat quorum sensing, vůbec nedošlo.

Výsledky tedy celkově ukázaly, že pozorovaný účinek (quorum quenching) těchto těkavých organických látek a konkrétně DMDS je důsledkem potlačení schopnosti patogenních bakterií vyrábět N-acyl-homoserin lakton a ne jeho přímou inaktivaci.[19]

4 ODSTRAŇOVÁNÍ DMDS A PODOBNÝCH LÁTEK V BIOFILTRECH

Dimethyldisulfid stejně jako řadu jiných podobných látek lze odstraňovat pomocí biofiltrů s vhodnou náplní a vhodným kmenem bakterií toto odstranění umožňující.

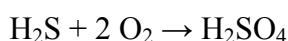
4.1 Biofiltrace těkavých organických sloučenin síry

Jak již bylo výše popsáno, těkavé organické sirné sloučeniny vznikají anaerobním i aerobním rozkladem organické hmot. Tyto procesy probíhají jak v přírodě, tak přímo ve městech, např. v kanalizaci, v průmyslových objektech zpracovávajících ropu, papír, uhlí, olej a při řadě dalších chemických procesů. V některých procesech se DMDS používá účelně, v jiných vzniká jako nežádoucí odpadní produkt.

Zvláště v průmyslových procesech, kdy koncentrace těchto látek přesahují únosnou mez, je zapotřebí jejich odstranění. Biofiltry k tomuto sloužící musí mít téměř 100 % - ní účinnost, jelikož pachové koncentrace sirných látek jsou velmi nízké.

Účinnost biofiltru zkoumali Cáceres a kol. V práci autoři zkoumali vliv sirovodíku (H_2S) na pH biofiltru, kdy dochází ke snižování pH a tím vznikají nepříznivé podmínky pro použité bakterie *Thiobacillus thioparus* a nedochází tak k požadovanému rozkladu methylmerkaptanu, dimethylsulfidu (DMS) a dimethyldisulfidu. Tento problém byl autory vyřešen dvěma biofiltry za sebou zapojených v sérii, kdy v první fázi acidofilní bakterie odstraní většinu H_2S a ve druhé fázi jsou teprve odstraňovány methylmerkaptan, DMS a DMDS. Biofiltr byl provozován v ustáleném stavu za konstantního tlaku a teploty, kyslík byl přítomen v nadbytku, aby nedocházelo k nedostatku živin. Na povrchu nosiče biofiltru byl vytvořen biofilm skládající se převážně z *T. thioparus*.

Poté se autoři snažili dávkovat různé koncentrace sirovodíku, aby zjistili, zda nedochází k velkým změnám pH, jelikož oxidací sirovodíku vzniká kyselina sírová:



Při nulové koncentraci sirovodíku došlo k výraznému snížení množství DMDS až na 10 % původní koncentrace, přičemž z počátku ubývalo množství DMDS rychleji, postupně docházelo ke zpomalení. Při koncentraci sirovodíku 5 g síry / m^3h bylo odstraněno přibližně 20 % DMDS, při 50 g S / m^3h se zachytilo 30 % a při 150 g S / m^3h cca 38 % DMDS. U

nejvyšší koncentrace H₂S byl průběh biofiltrace DMDS téměř lineární. Z výsledků je tedy patrné, že sirovodík má výrazný vliv na odstranění DMDS v biofiltrech.[20]

V jiné studii věnující se biofiltrům se autoři Cabrol a kol. zabývali odolností biofiltrů na změny v přítoku zachytávaných látek. Biofiltry jsou schopné reagovat na menší změny, ale autoři se zaměřili na výrazné změny způsobené poruchami. K pokusu používali 4 sloupcové biofiltry o vnitřním průměru 15 mm a výšce 230 mm naplněné smrkovou naštěpkovanou kůrou, 2 biofiltry byly využity pro experiment a 2 jako slepé vzorky. Výška náplně byla 150 mm, přičemž, byly v plášti vyvrtány sondy pro odběr plynu ve výšce 0, 30, 60, 90, 120 a 150 mm. Do biofiltru byla kontinuálně přiváděna směs emisí vznikajících kompostováním obsahujících amoniak a těkavé organické látky (VOC), včetně DMDS. Experiment spočíval v dávkování amoniaku o koncentraci 21,3 mg/m³ a VOC 4,9 mg/m³. Zkoumány byly reakce na zvýšení koncentrace 2 – 44 krát ve dnech 42, 58, 91, 121, 169 a 224. Každý šok byl použit tehdy, když byl biofiltr v ustáleném stavu a trval 6 dnů, než byla znovu ustálena původní koncentrace.

Výsledkem pokusu bylo zjištění, že biofiltr i při šokových změnách koncentrací neztratil svoji funkčnost, přestože se těkavé organické látky dostávaly do nižší polohy biofiltru, tam však byly úspěšně zachytávány a nedocházelo k jejich úniku. Po 6 denním ustálení docházelo opět k zachytávání VOC a NH₃ již v horní části a biofiltr nadále pracoval správně.[21]

Soupramanien a kol. testovali odstranění těkavých sirných sloučenin včetně DMDS v tekutém minerálním médiu, které bylo naočkováno aktivovaným kalem z čistírny odpadních vod s obsahem sirných sloučenin. Koncentrace sirných látek činila 100 µg/l vzduchu, který byl probubláván rychlostí 100 ml/min minerálním médiem. Po sérii testů zjistili, že při pH 7 a pH 5 docházelo k úplnému odstranění DMDS. Při pH 3 a pH 1 bylo odstranění DMDS jen okolo 20 %. Následnou elektroforézou v gradientovém denaturačním gelu a sekvenací byly zjištěny dominantní mikroorganismy, při pH 7 to byl *Thioalcalibacter* a při pH 5 *Dyella*. [22]

5 BAKTEIE *COMAMONAS TESTOSTERONI* RF 2

Rod *Comamonas* je charakteristický rovnými nebo mírně zakřivenými gramnegativními tyčkami, které se vyskytují jednotlivě nebo po dvou. Pohybují se pomocí svazku polárních bičíků, uvnitř buněk dochází k akumulaci poly- β -hydroxybutyrátu. Jsou to striktně aerobní, nefermentující, chemoorganotrofní, oxidáza a kataláza pozitivní. Dobře rostou na médiích, která obsahují organické kyseliny, aminokyseliny nebo peptony. Neprodukují flurescentní pigmenty, většinou nevyužívají sacharidy.

C. testosteroni

- vyskytuje se v půdě, původně se nazýval *Pseudomonas testosteroni*
- rozkládá: toluen, etylbenzen, 2-,3-a 4-chlorfenol, 4-sulfofenol, nitrofenol, notrobenzen, p-toluensulfonát, 3-chloranilin a 3,4-dichloranilin.[23, 24]

6 DOSAVADNÍ VÝLEDKY ZÍSKANÉ NA FT UTB

6.1 Výsledky studentské a diplomové práce V. Hutěčky

Úplně první zmínku o DMDS najdeme v odborné práci V. Hutěčky, který při mikrobiálním rozkladu trichloretylenu chromatografickou analýzou objevil v šestnácté minutě záznamu neznámou látku, kterou pomocí GC-MS identifikoval jako DMDS.[25]

Vzniku DMDS se věnoval V. Hutěčka i ve své diplomové práci, ve které popisuje, že DMDS nesouvisí s přítomností trichloretylenu a je produkován bakteriemi přirozeným způsobem. Autor se ještě věnoval izolaci bakteriálních kmenů, schopných DMDS odstraňovat. Izolací získal 5 mikrobiálních kultur, přičemž nejvyšší schopnost degradace DMDS vykazovala bakterie později identifikovaná jako *Comamonas testosteroni*. [26]

6.2 Výsledky diplomové práce B. Valové

Dalšími pokusy věnujícími se dimetyldisulfidu se ve své diplomové práci zabývala B. Valová, na jejíž práci navazuje i tato diplomová práce. Autorka provedla několik testů, jako zkouška růstu *Comamonas testosteroni* RF2 na DMDS jako na jediném zdroji uhlíku a energie, který přinesl negativní výsledek se závěrem, že bakterie RF není schopna využívat DMDS jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Dále byly provedeny dva testy sledování využívání DMDS jako zdroje síry. Kultivace byla prováděna v kompletním minerálním mediu a bezsírém minerálním mediu, z výsledků bylo patrné, že bakterie *C. testosteroni* RF2 využívá DMDS jako zdroj síry. Tento pokus byl proveden i v rámci této diplomové práce.

Dalším prováděným testem bylo sledování produkce formaldehydu kulturou RF2 při degradaci DMDS, z jehož výsledků je patrné, že formaldehyd rozkladem DMDS nevzniká. Také bylo testováno, zda kultura RF2 není schopna formaldehyd využívat jako růstový substrát, následné výsledky byly negativní.

Autorka dále stanovovala toxicitu DMDS pro kulturu RF2. Z výsledků je zřejmé, že koncentrace 200 mg/l nemá na bakterie ještě žádný výrazný vliv, koncentrace 300-400 mg/l zpomalují růst bakterií a jako minimální inhibiční koncentrace byla zjištěna koncentrace 500 mg/l DMDS.[27]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 POUŽÍVANÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY, ŽIVNÁ MÉDIA, BAKTERIÁLNÍ KULTURY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

7.1 Používané chemikálie, roztoky a živná média

7.1.1 Zásobní roztok citronanu sodného

Bylo připraveno 100 ml roztoku citronanu sodného navážením a rozpuštěním 11,407 g v destilované vodě. Následně bylo pomocí HCl upraveno pH z 9,55 na 7,85. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 120 °C po dobu 25 minut.

7.1.2 Kompletní minerální médium (KMM)

Nejprve byly připraveny roztoky jednotlivých solí: Roztok A (KH_2PO_4 9,07 g/l), roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 23,9 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (10 g/l), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (3 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l), NH_4Cl (30 g/l) a NaCl (50 g/l).

Na přípravu 100 ml minerálního média bylo použito:

Destilovaná voda.....	85 ml
Roztok A (KH_2PO_4 9,07 g/1000 ml dest. vody).....	2 ml
Roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23,90 g/1000 ml dest. vody).....	8 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l).....	1,0 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l).....	1,0 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l).....	1,0 ml
NH_4Cl (30 g/l).....	1,0 ml
NaCl (50 g/l).....	1,0 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (čistý).....	0,043 g/l
H_3BO_2 (p.a.).....	0,057 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a.).....	0,043 g/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (p.a.).....	0,037 g/l

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (p.a.).....	0,025 g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (čistý).....	0,040 g/l

7.1.3 Bezsrné minerální médium (BMM)

Nejprve byly připraveny roztoky jednotlivých solí: Roztok A (KH_2PO_4 9,07 g/l), roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23,9 g/l), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (8,25 g/l), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,5 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l), NaCl (25 g/l), NH_4Cl (30 g/l).

Na přípravu 100 ml minerálního média bylo použito:

Destilovaná voda.....	85 ml
Roztok A (KH_2PO_4 9,07 g/1000 ml dest. vody).....	2 ml
Roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23,90 g/1000 ml dest. vody).....	8 ml
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (8,25 g/l).....	1,0 ml
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,5 g/l).....	1,0 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l).....	1,0 ml
NH_4Cl (30 g/l).....	1,0 ml
NaCl (25 g/l).....	1,0 ml
Bezsrný roztok stopových prvků.....	0,2 ml
MnCl_2	0,035 g/l
H_3BO_2 (p.a.).....	0,057 g/l
ZnCl_2 (p.a.).....	0,028 g/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (p.a.).....	0,037 g/l
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (p.a.).....	0,025 g/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,027 g/l

7.1.4 TYA agar

Nejprve bylo rozpuštěno 2,1 g sušeného základu (Himedia) ve 100 ml destilované vody. Poté byl obsah sterilizován v autoklávu po dobu 30 minut při 115 °C. Nakonec byl agar ochlazen a rozlit do Petriho misek.

7.1.5 Sabouraudův agar

Nejprve bylo rozpuštěno 5,9 g sušeného základu (Imuna) ve 100 ml destilované vody. Poté byl obsah sterilizován v autoklávu po dobu 30 minut při 115 °C. Nakonec byl agar ochlazen a rozlit do Petriho misek.

7.1.6 Standardní roztok DMDS

Do 10 ml odměrné baňky se zábrusovou zátkou bylo nepipetováno 9,8 ml methanolu. Bylo nutné nechat odpařit methanol ze stěn nad ryskou. Poté byla baňka s metanolem zvážena na 5-místných vahách a následně přidáno 20 μ l DMDS přímo do methanolu, poté opět byla baňka opět zvážena, doplněna po rysku a ihned uzavřena a dokonale promíchána. Koncentrace DMDS činila 2,057 g/l.

7.1.7 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připravován rozpuštěním 8,5 g NaCl v 1 l destilované vody a následně sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 2 hodin.

7.1.8 Zásobní vodný roztok DMDS (ZVR DMDS)

Byl připravený nasycený roztok DMDS v destilované vodě o koncentraci 2,5 g/l, který byl skladován v chladničce při 5 °C.

7.1.9 Fosfátový pufr

Fosfátový pufr byl připraven smícháním 2 ml roztoku A (KH_2PO_4 9,07 g/l) a 8 ml roztoku B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23,9 g/l) ve 100 ml destilované vody.

7.2 Popis používaných mikrobiálních kultur

7.2.1 *Comamonas testosteroni* RF

Byla používána kultura *Comamonas testosteroni* RF 2, získaná v předchozích DP vypracovaných na FT UTB ve Zlíně a uložená při -80 °C v mikrobiologické laboratoři FT.

7.3 Přístrojové vybavení

- Plynový chromatograf HP 5890 (Hewlett Packard, USA)
- Koncentrátor LSC 2000 (Tekmar, USA)
- Integrátor (Hewlett Packard, USA)
- Analyzátor uhlíku 5000 A (Schimadzu, Japonsko)
- UV/VIS Spektrofotometr (UNICAM UV 500)
- Aseptický box (Telstar Bio – II – A, Španělsko)
- Aseptický box (PMV)
- Centrifuga MR 23i (Jouan, Francie)
- Elektrická sušárna (MORA, ČR)
- Elektrická sušárna (Chirana, ČR)
- Elektrická pec LAC mikro Therm 825 (LAC, ČR)
- Chladnička (Ardo, ČR)
- Chladnička (Zanusi)
- Laboratorní váhy (Sartorius)
- Laboratorní váhy (Adventurer Pro)
- Třepačka T 22 (Autocentrum Praha, ČR)
- Třepačka GFL 3020 (ČR)
- Mikroskop Olympus (Japonsko)
- Mikroskopická komůrka Cyrus II (Meopta, ČR)
- Fotoaparát OLYMPUS (Japonsko)

- Vzorkovnice Sample Vials (Supelco, USA)
40 ml vialky uzavřené silikonovými septy s teflonovou fólií a šroubovatelnými uzávěry
- Vzorkovnice (Supelco, USA)
120 ml lahvičky uzavřené silikonovými septy s teflonovou fólií a šroubovatelnými uzávěry
- Mikrodávkoč plynotěsný – 10, 50, 100 a 200 μ l (Hamilton, USA)
- Mikropipety (HT, Polsko)
- Autokláv (VARIOKLAV, Německo)
- Autokláv (SANO clav, Německo)
- pH metr (Waterproof)
- Termostat (BT 120)

8 PRACOVNÍ POSTUPY

8.1 Stanovení toxicity DMDS na rostoucí buňky *Comamonas testosteroni* RF2

Principem testu byla kultivace bakteriální kultury RF 2 v minerálním médiu s roztokem citronanu sodného o koncentraci 300 mg/l jako organickým substrátem a s odstupňovanými koncentracemi DMDS v rozsahu 300 mg/l až 1 g/l.

Do 18 vialek bylo asepticky napipetováno 10 ml MM s roztokem citronanu sodného, do každé bylo přidáno 50 µl suspence *Comamonas testosteroni* RF2 (2. st. McFarlandovy stupnice) a množství DMDS uvedené v Tab. 1. Kultivace probíhala při 25 °C ve tmě na rotační třepačce při 100 ot/min, s režimem pohybu 15 minut pohyb / 15 minut klid. Vyhodnocení spočívalo ve vizuálním sledování zákalu v intervalu 2, 7, 14 dní, na konci testu bylo provedeno vyočkování vybraných vialek na TYA agary pro zjištění přežití buněk.

Tab. 1 Rozpis dávkování DMDS do vialek

Vialka	Koncentrace DMDS [mg/l]	Dávkování DMDS [µl]
1, 2	0	0
3, 4	300	3,3
5, 6	400	4,4
7, 8	500	5,5
9, 10	600	6,6
11,12	700	7,7
13,14	800	8,8
15,16	900	9,9
17,18	1000	11

Test byl zopakován pro upřesnění koncentrací, podle výsledků předchozího testu byly vybrány následující koncentrace DMDS popsané v Tab. 2:

Tab. 2 Rozpis dávkování DMDS s přesnějšími koncentracemi

Vialka	Koncentrace DMDS [mg/l]	Dávkování DMDS [μl]
1, 2	0	0
3, 4	500	5,5
5, 6	550	6,05
7, 8	600	6,6
9, 10	650	7,15
11,12	700	7,7
13,14	750	8,25

8.2 Stanovení toxicity DMDS na rostoucí buňky *E. coli*

Tento test byl prováděn obdobně jako u určení toxicity DMDS na bakterii RF 2, principem byla kultivace bakterie *E. coli* v minerálním médiu s glukózou o koncentraci 250 mg/l a tryptonem o koncentraci 50 mg/l jako organickými substráty s odstupňovanými koncentracemi DMDS v rozmezí 200 mg/l až 1 g/l.

Do 20 vialek bylo asepticky nepipetováno 10 ml MM s glukosou a tryptonem, do každé bylo přidáno 50 μl suspence *E. coli* (2. st. McFarlandovy stupnice) a níže uvedené množství DMDS popsané v Tab. 3. Kultivace probíhala při 25 °C ve tmě na třepačce. Vyhodnocení bylo provedeno za 2, 7, 14 dní vizuálně, na konci testu vyočkování vybraných vialek na TYA agary pro zjištění přežití buněk.

Tab. 3 Rozpis koncentrací DMDS pro určení toxicity na *E.coli*

Vialka	Koncentrace DMDS [mg/l]	Dávkování DMDS [μl]
1, 2	0	0
3, 4	200	2,2
5, 6	300	3,3
7, 8	400	4,4
9, 10	500	5,5
11,12	600	6,6
13,14	700	7,7
15,16	800	8,8
17,18	900	9,9
19,20	1000	11

8.3 Sledování růstu bakterie *C. testosteroni* na DMDS jako zdroji síry

Test byl prováděn v 54 vialkách, které byly rozděleny do 3 sérií. V první sérii bylo kompletní minerální médium s přidavkem citronanu sodného o koncentraci 500 mg/l, ve druhé sérii bylo použito bezsírné minerální médium s přidavkem citronanu sodného o koncentraci 500 mg/l a ve třetí sérii bylo použito bezsírné minerální médium s citronanem sodným o koncentraci 500 mg/l a přidavkem DMDS o koncentraci 25 mg/l. Do všech vialek bylo nadávkováno 50 μl suspenze RF 2 (2. st. McFarlandovy stupnice). Rozpis dávkování je uveden v Tab. 4.

Kultivace probíhala stejně jako v předcházejících pokusech, vzorky byly průběžně odebírány a měřeny zákaly na UV/VIS spektrofotometru při 600 nm.

Tab. 4 Rozpis dávkování do vialek pro stanovení využívání síry

Vialka	Minerální médium	Koncentrace citronanu [mg/l]	Koncentrace DMDS [mg/l]
1 - 18	KMM	500	-
19 - 36	BMM	500	-
37 -54	BMM	500	25

8.4 Využívání DMDS jako doplňkového zdroje uhlíku

Do 12 sterilních plynotěsných lahvíček se septy bylo asepticky plněno 20 ml minerálního média, citrónan sodný, suspenze RF 2 podle 2. st. McFarlandovy stupnice a DMDS. Podrobný popis použitých koncentrací je popsán v Tab. 5:

Tab. 5 Rozpis dávkování pro test využívání DMDS jako zdroje uhlíku

Láhev	Minerální médium	Koncentrace citrónanu [mg/l]	Koncentrace DMDS [mg/l]	Suspenze RF 2 [μ l]
1 - 4	KMM	300	-	20
5 - 8	KMM	300	150	20
9 - 12	BMM	300	150	20

Inkubace probíhala 48 hodin ve tmě na třepačce, po inkubaci bylo z každé láhve odebráno 20 μ l suspenze s následným mikroskopováním a počítáním buněk v komůrce Cyrrus II. Zbytek suspenzí byl odstředěn na odstředivce po dobu 12 minut, teplotě 4 °C a 20000 g. Následně byl opatrně odlit supernatant a terčík buněk byl rozmíchán ve 20 ml fosfátového pufru, opět následovalo odstředění, slití supernatantu a znovu promíchání s pufrem. Po odstředění byla každá suspenze opět promíchána s fosfátovým pufrem a mikropipetou bylo odebráno 5 ml, které byly dávkovány do porcelánových, předem vyžíhaných a schládlých kelímků. Kelímky byly poté vysušeny při 105 °C po dobu 3 hodin a následovalo vychládnutí v exsikátoru a stanovení sušiny.

8.5 Využívání DMDS jako doplňkového zdroje uhlíku se stanovením míry odstranění DMDS

Tento test probíhal podobně jako předchozí, kdy do 16 sterilních plynotěsných lahvíček se septy bylo dávkováno 20 ml MM, citrónan sodný, suspenze RF 2 podle 2. st. McFarlandovy stupnice a DMDS, dle následujícího rozpisu v Tab. 6.

Tab. 6 Rozpis dávkování pro test využívání DMDS jako zdroj uhlíku se stanovením míry odstranění DMDS

Láhev	Minerální médium	Koncentrace citronanu [mg/l]	Koncentrace DMDS [mg/l]	Suspenze RF 2 [μ l]
1 - 4	KMM	300	-	20
5 - 8	KMM	300	50	20
9 - 12	KMM	300	150	20
13 - 16	KMM	300	300	20

Inkubace probíhala 48 hodin, ve tmě na třepačce, poté byly na mikroskopu počítány buňky a opět stanovena sušina biomasy obdobně jako v předchozím pokusu. Oproti předchozímu pokusu byly u 3. série láhví, tedy v láhvích s koncentrací DMDS 150 mg/l, měřeny koncentrace DMDS na plynovém chromatografu. Nutné bylo také připravit další 3 láhve s 20 ml destilované vody a přídatkem DMDS o koncentraci 150 mg/l pro zjištění vstupní koncentrace DMDS. Tyto láhve byly nechány přes noc na třepačce.

8.6 Využívání methanolu jako zdroje uhlíku a jako zdroje energie

Do sterilních plynotěsných 12 láhví bylo dávkováno 20 ml minerálního média, suspenze RF 2 podle 2. st. McFarlandovy stupnice, citronan sodný a methanol, dle následujícího rozpisu.

Tab. 7 Rozpis dávkování pro test využívání methanolu

Láhev	Minerální médium	Koncentrace citronanu [mg/l]	Koncentrace methanolu [mg/l]	Suspenze RF 2 [μ l]
1 - 4	KMM	300	-	20
5 - 8	KMM	300	150	20
9 - 12	KMM	-	200	20

Následovala 48 hodinová inkubace ve tmě na třepačce. Po inkubaci bylo opět u všech láhví provedeno mikroskopování s počítáním buněk v komůrce Cyrrus II. Všechny vzorky byly opět odstředěny a buňky promyty, u sérií 1 a 2 byla stanovována sušina obdobně jako u předchozích pokusů, u vzorků ze série 3 byl odebrán supernatant, u kterého byl na analyzátoru uhlíku Shimadzu stanovován DOC. Nutné bylo pro kontrolu připravit 3 slepé vzor-

ky, kdy bylo smícháno 20 ml destilované vody a dávkován methanol o koncentraci 200 mg/l. Po krátkém protřepání byla i u těchto vzorků stanovována koncentrace DOC.

8.7 Sestavení kalibrační křivky DMDS

Měření probíhalo na plynovém chromatografu Hewlett Packard s detektorem elektro-
nového záchytu (ECD), pro zkoncentrování vzorku byl využit koncentrátor Tekmar využí-
vající metodu Purge and Trap. Do stripovací nádoby koncentrátoru bylo dávkováno 5 ml
destilované vody s odstupňovanými množstvími DMDS. Koncentrace, které byly zvoleny,
se pohybovaly od 8 µg/l do 411 µg/l DMDS. Na základě výsledků ploch získaných píků
DMDS byla sestrojena kalibrační křivka a koncentrace DMDS v měřených pokusných
vzorcích byly v průběhu práce vypočítávány podle ní.

$$\text{Rovnice kalibrační křivky: } y = 101\,414\,150x^2 + 2\,608\,083x + 170\,874$$

9 VÝSLEDKOVÁ A DISKUZNÍ ČÁST

9.1 Stanovení toxicity DMDS na rostoucí buňky *Comamonas testosteroni* RF2

Prvním testem, který byl proveden, bylo posouzení toxicity DMDS na buňky bakterie RF 2. Test probíhal v kompletním minerálním médiu s přidavkem citronanu sodného o koncentraci 300 mg/l a odstupňovanými koncentracemi DMDS. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 8

Tab. 8 Výsledky toxicity DMDS na kulturu RF 2

Vialka	Koncentrace DMDS [mg/l]	Růst buněk po		
		2 dnech	7 dnech	14 dnech
1, 2	0	++	++	++
3, 4	300	+	++	++
5, 6	400	+	+	++
7, 8	500	-	+	++
9, 10	600	-	+	+
11, 12	700	-	-	-
13, 14	800	-	-	-
15, 16	900	-	-	-
17, 18	1000	-	-	-

Vysvětlivky:

- zákal nevytvořen (bez růstu)
- + slabý zákal (slabý růst)
- ++ vytvořen zákal (růst buněk)

Z výsledků uvedených v Tab. 8 bylo patrné, že minimální inhibiční koncentrace DMDS leží mezi 600 a 700 mg/l. Současně bylo v průběhu pokusu zřejmé, že již při koncentraci 500 mg/l dochází ke zpomalení růstu bakterií, oproti růstu při nulové koncentraci DMDS. Pro ověření výsledků byly suspence z vialek o koncentracích 0, 500, 600, 700 a 800 mg/l DMDS přeočkovány na TYA agar.

Tab. 9 Výsledky přeočkování suspenzí na TYA agar

Miska	Koncentrace DMDS [mg/l]	Růst
1	0	+
2	500	+
3	600	+
4	700	-
5	800	-

Vysvětlivky:

- nedocházelo k růstu
- + růst kultury

Výsledky uvedeny v Tab. 9 ukázaly, že k růstu bakterií docházelo ještě při koncentraci 600 mg/l, kdežto při koncentraci 700 mg/l byly již veškeré buňky ve vialkách mrtvé a tedy koncentrace 700 mg/l představuje baktericidní koncentraci.

Pro upřesnění získaných výsledků byl pokus opakován, a to s menšími rozestupy koncentrací DMDS. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 10:

Tab. 10 Výsledky pokusu toxicity DMDS na *C. testosteroni*

Vialka	Koncentrace DMDS [mg/l]	Růst buněk po		
		2 dnech	7 dnech	14 dnech
1, 2	0	++	++	++
3, 4	500	-	+	++
5, 6	550	-	+	+
7, 8	600	-	-	+
9, 10	650	-	-	-
11, 12	700	-	-	-
13, 14	750	-	-	-

Vysvětlivky:

- zákal nevytvořen (bez růstu)
- + slabý zákal (slabý růst)
- ++ vytvořen zákal (růst buněk)

Z tabulky je patrné, že minimální inhibiční koncentrace, zcela v souladu s předchozím testem, je skutečně 650 mg/l, neboť při této koncentraci nedocházelo k žádnému růstu kultury RF 2. Podobně test ukázal, že při koncentracích 500, 550 a 600 mg/l již docházelo

ke zpomalení růstu. Pro ověření výsledků byly suspenze z koncentrací 0, 550, 600 a 650 přeočkovány na TYA agar pro ověření přežití buněk. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Tab. 11 Přeočkované suspenze na TYA agar

Miska	Koncentrace DMDS [mg/l]	Růst
1	0	+
2	550	+
3	600	+
4	650	-

Vysvětlivky:

- nedocházelo k růstu
- + růst kultury

Tyto výsledky ukázaly, že minimální inhibiční koncentrace DMDS pro *Comamonas testosteroni* RF 2 je současně i minimální baktericidní koncentrací.

9.2 Stanovení toxicity DMDS na rostoucí buňky *E. coli*

Tento test probíhal obdobně jako předchozí a byl proveden pro srovnání citlivosti studované bakterie s běžnou a dokonale popsanou gramnegativní bakterií. Test probíhal v kompletním minerálním médiu s přidavkem glukózy a tryptonu jako organickými substráty a přidavkem DMDS s odstupňovanými koncentracemi. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab. 12 Výsledky pokus toxicity DMDS na *E.coli*

Vialka	Koncentrace DMDS [mg/l]	Růst buněk po		
		2 dnech	5 dnech	7 dnech
1, 2	0	++	++	++
3, 4	200	++	++	++
5, 6	300	++	++	++
7, 8	400	+	++	++
9, 10	500	+	++	++
11, 12	600	+	++	++
13, 14	700	+	+	++
15, 16	800	+	+	++
17, 18	900	-	+	+
19, 20	1000	-	+	+

Vysvětlivky:

- zákal nevytvořen (bez růstu)
- + slabý zákal (slabý růst)
- ++ vytvořen zákal (růst buněk)

Výsledky, které jsou popsány v Tab. 12, ukazují, že se nepodařilo zjistit minimální inhibiční koncentraci, neboť ta činí více než 1000 mg/l. U koncentrací 900 a 1000 mg/l již však docházelo k mírnému zpomalení růstu. Pro kontrolu byly vzorky s koncentracemi 0, 800, 900 a 1000 vyočkovány na TYA agar, pro potvrzení růstu inokulované kultury (a ne případné kontaminace).

Tab. 13 Vočkování suspenzí *E. coli* na TYA agar

Miska	Koncentrace DMDS [mg/l]	Růst
1	0	+
2	800	+
3	900	+
4	1000	+

Vysvětlivky:

- nedocházelo k růstu
- + růst kultury

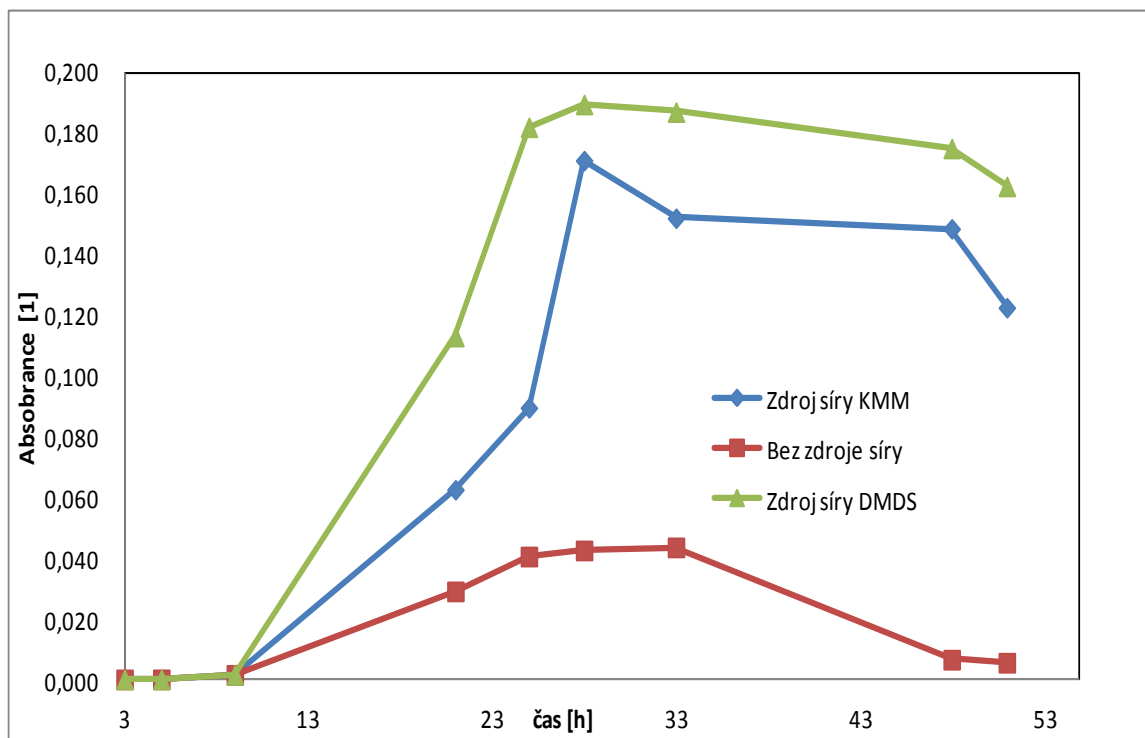
Podle výsledků z Tab. 13 lze konstatovat, že minimální inhibiční koncentrace DMDS pro bakterie *E. coli* je vyšší než 1000 mg/l.

9.3 Sledování růstu bakterie *C. testosteroni* na DMDS jako zdroji síry

Test byl prováděn ve třech sériích, přičemž v první sérii bylo zdrojem síry kompletní minerální médium, ve druhé sérii bylo použito bezsírné minerální médium, kdy byly soli síry nahrazeny chloridy a jediným zdrojem síry byl DMDS. Ve třetí sérii nebyl využit žádný zdroj síry. Na rozdíl od podobných testů Valové (2004) byl tento test proveden za pohybu vialek na třepačce, a tedy za podmínek obvyklých u podobných mikrobiologických testů. Cílem bylo i ověření schopnosti studované kultury využívat DMDS po 10 letech uchování při -80 °C. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 14:

Tab. 14 Výsledky testu využívání DMDS jako zdroje síry

Čas [h]	KMM			BMM			DMDS		
	A1	A2	A _{prům.}	A1	A2	A _{prům.}	A1	A2	A _{prům.}
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
9	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002
21	0,066	0,059	0,063	0,034	0,024	0,029	0,104	0,122	0,113
25	0,093	0,086	0,090	0,036	0,045	0,041	0,197	0,167	0,182
28	0,157	0,185	0,171	0,049	0,036	0,043	0,193	0,186	0,190
33	0,158	0,146	0,152	0,043	0,044	0,044	0,182	0,192	0,187
48	0,145	0,152	0,149	0,005	0,008	0,007	0,179	0,171	0,175
51	0,126	0,119	0,123	0,005	0,006	0,006	0,160	0,165	0,163



Obr. 2 Využívání DMDS kulturou RF 2 jako jediný zdroj síry

Z Obr. 2 je patrné, že lagová fáze trvala přibližně do 10. hodiny kultivace, poté došlo k nárůstu u všech vzorků. Největší nárůst nastal u buněk využívajících DMDS, maximální nárůst byl zaznamenán mezi 27. a 28. hodinou. Výrazný nárůst byl zaznamenán také u vzorků, kde bylo zdrojem síry využito samotné minerální médium (obsahující sírany), tam maximální nárůst byl přibližně ve 28. hodině. Nepatrný nárůst nastal také vzorků bez jakéhokoliv zdroje síry, což bylo nejspíše způsobeno tvorbou zásob, které si bakterie vytvořila ještě před vlastním testem, při předkultivaci na Sabouradově agaru. Lze tedy na závěr usoudit, že bakterie *Comamonas testosteroni* je schopná využívat DMDS jako jediný zdroj síry a že jí tento zdroj umožňuje o něco rychlejší růst než sírany.

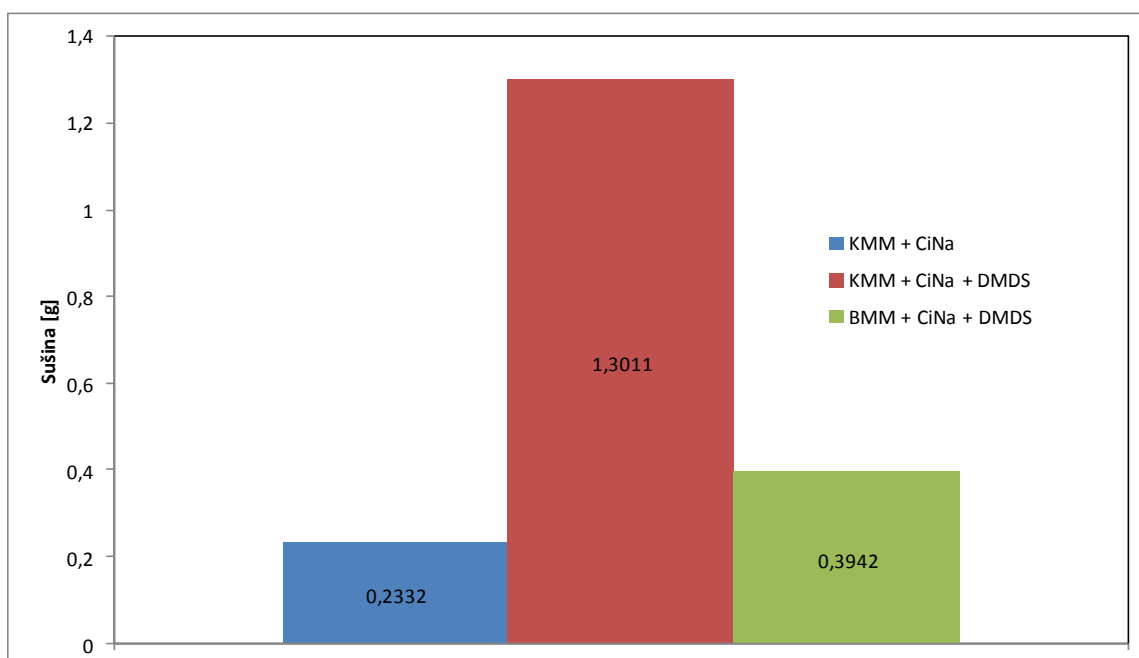
9.4 Využívání DMDS jako doplňkového zdroje uhlíku

Jak již popsala ve své diplomové práci Valová, kultura RF 2 není schopna využívat DMDS jako jediný zdroj uhlíku, proto byly provedeny testy na zjištění, zda je kultura schopna DMDS využít alespoň jako doplňkový zdroj uhlíku, při růstu na jiném organickém substrátu. Testy byly prováděny v kompletním a bezsírém minerálním médiu s přidavkem DMDS o koncentraci 150 mg/l, koncentrace citronanu sodného činila 300 mg/l. Inkubace

trvala 48 hodin, poté bylo provedeno mikroskopování s počítáním buněk a následně stanovena sušina narostené biomasy. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 15:

Tab. 15 Sušina buněk po 48 hodinách v lahvičkách

Minerální médium	KMM	KMM + DMDS	BMM + DMDS
	g/l		
	0,2412	1,1396	0,3896
	0,2427	1,0765	0,3727
	0,2021	1,5707	0,4785
	0,2467	1,4176	0,3359
Ø	0,2332	1,3011	0,3942



Obr. 3 Sušina buněk po 48 hodinách v lahvičkách

Hodnoty zjištěné v tomto testu, které jsou uvedené v Tab. 15, a taktéž znázorněny na Obr. 3, byly velmi překvapující. Byly však spíše nepravděpodobné, vzhledem ke koncentracím použitých substrátů. Bylo málo pravděpodobné, že by přídavek DMDS vyvolal tak výrazné navýšení biomasy buněk, teoreticky bylo možno uvažovat jen o zvýšeném příjmu anorganických složek minerálního média. Bylo také provedeno počítání buněk, jehož výsledky jsou v Tab. 16:

Tab. 16 Počítání buněk při stanovení sušiny

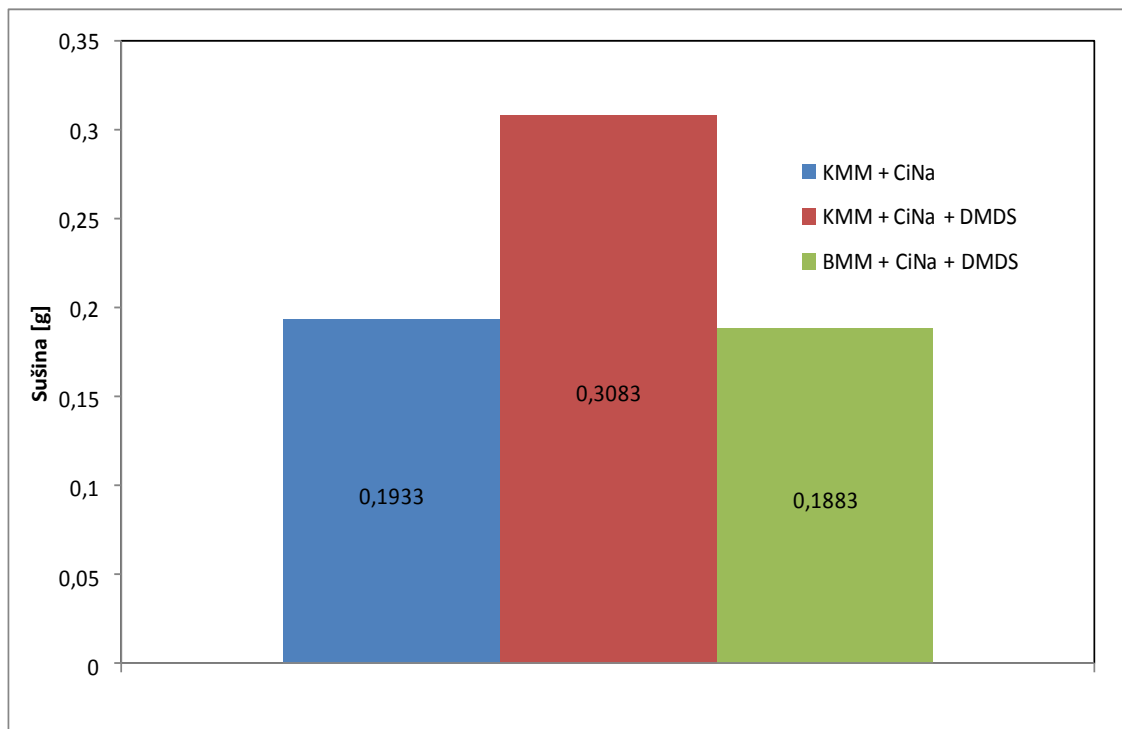
Minerální médium	KMM	KMM + DMDS	BMM + DMDS
	Počítání buněk v komůrce Cyrrus II		
	6	16	8
	7	20	11
	9	19	10
	7	18	12
Ø	7,2500	18,2500	10,2500
Přepočet na ml	$5,8 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^8$	$8,2 \cdot 10^7$

Z výsledků počítání buněk také nebylo zjištěno, proč nastal u KMM s DMDS tak výrazný nárůst.

Proto byl test opakován a byly u něj po kultivaci provedeny další doplňující testy, jako jsou Neisserovo barvení buněk, pro zjištění přítomnosti polyfosfátů, a mikroskopování buněk ve fázovém kontrastu, ke zjištění zda nevznikají sírné granule. Tyto oba testy však byly u následného pokusu negativní, zato však výsledky stanovení biomasy v pokusu již odpovídaly množství použitých substrátů a bylo možné je považovat za reálné. Výsledky opakovaného testu jsou uvedeny v Tab. 17:

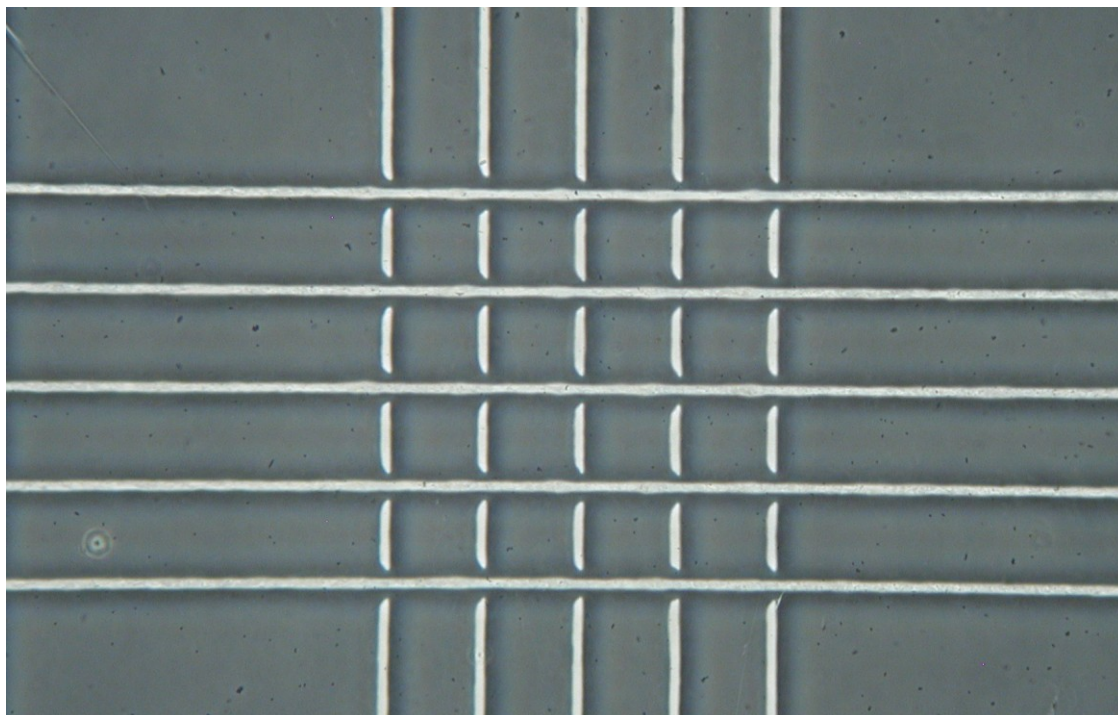
Tab. 17 Sušina buněk po 48 hodinách v lahvičkách – opakovaný test

Minerální médium	KMM	KMM + DMDS	BMM + DMDS
	g/l		
	0,1533	0,3133	0,2133
	0,1733	0,2733	0,1133
	0,2333	0,3333	0,1533
	0,2133	0,3133	0,2733
Ø	0,1933	0,3083	0,1883

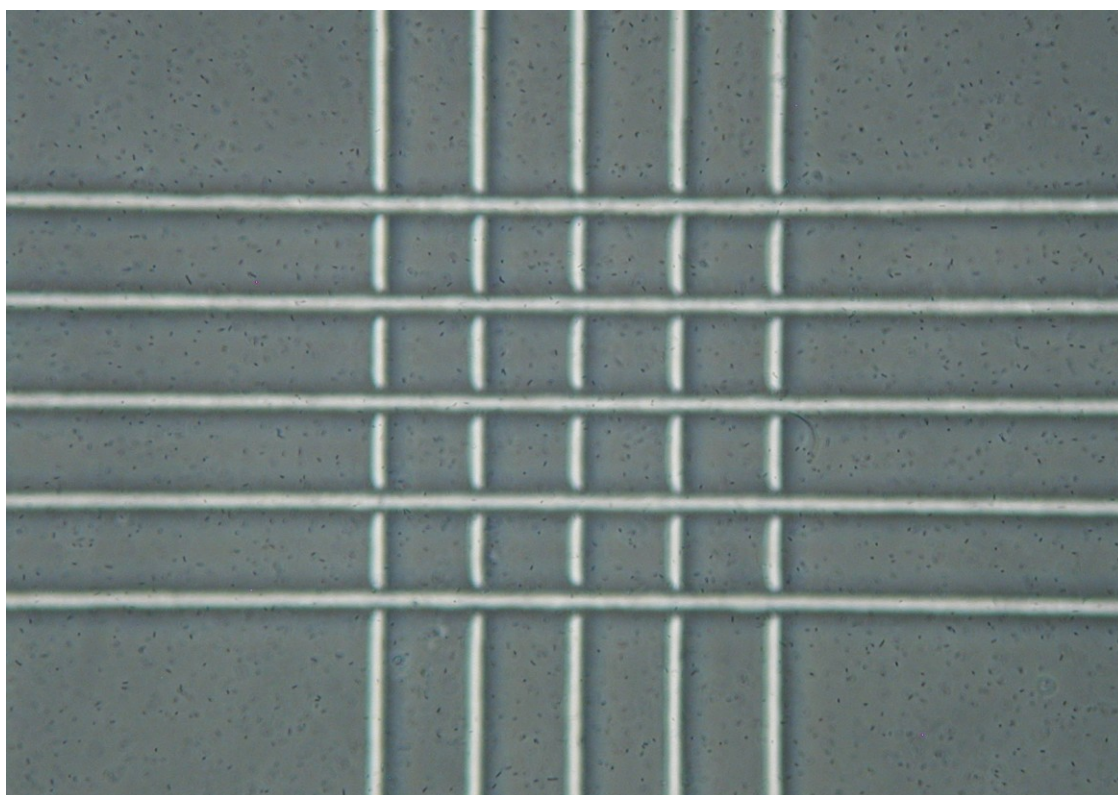


Obr. 4 Sušina po 48 hodinách – opakovaný pokus

Z Tab. 17 a Obr. 4 je patrné, že v kompletním minerálním médiu bylo přibližně stejné množství sušiny buněk jako v bezsírém minerálním médiu s DMDS. V kompletním minerálním médiu s DMDS však byl zaznamenán nárůst sušiny, z čehož bylo usuzováno, že buď docházelo ke spotřebě uhlíku z DMDS nebo k využití energie v něm vázané.



Obr. 5 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa



Obr. 6 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa a DMDS

Na Obr. 5 a Obr. 6 je vidět porovnání vyrostených buněk v kompletním minerálním médiu bez DMDS a s DMDS. Množství buněk v KMM s DMDS je výrazně vyšší než bez DMDS. Výsledky počítání buněk jsou popsány v Tab. 18.

Tab. 18 Počítání buněk v opakovaném testu

Minerální médium	KMM	KMM + DMDS	BMM + DMDS
	Počítání buněk		
	6	16	9
	7	14	7
	7	15	8
	5	16	7
Ø	6,2500	15,2500	7,7500
Přepočet na ml	$5 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$	$6,2 \cdot 10^7$

Po spočítání buněk a přepočtení na ml bylo největší množství v kompletním minerálním médiu s DMDS. Zajímavostí je, že počet buněk v BMM s DMDS byl vyšší než v samotném KMM, přestože sušina byla nepatrně vyšší právě v KMM.

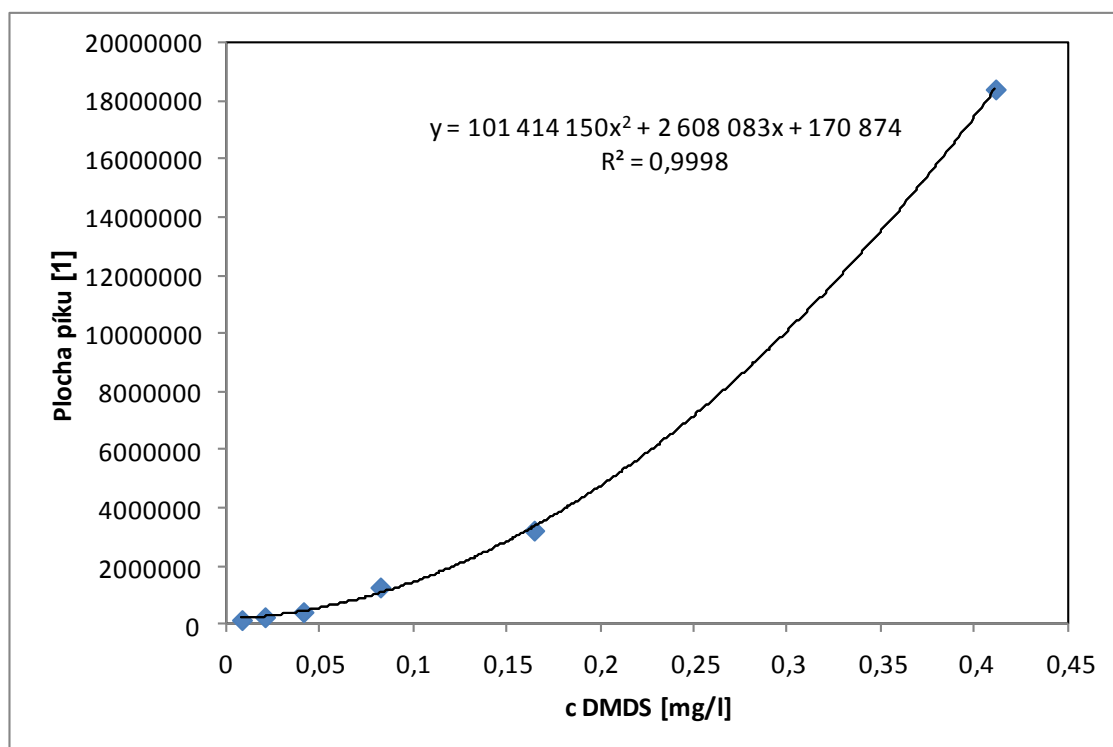
9.5 Sestavení kalibrační křivky DMDS

Pro stanovení množství DMDS v pokusu 9.6 Využívání DMDS jako doplňkového zdroje uhlíku se stanovením míry odstranění DMDS, bylo nutné si stanovit kalibrační křivku DMDS na plynovém chromatografu Hewlett Packard. Kalibrace byla stanovována dvakrát, na podzim roku 2013, kdy po dobu tří týdnů probíhalo měření, ze kterého však nebylo možné použít žádné výsledky, kvůli poruše koncentrátoru Tekmar. Další stanovení probíhalo až na jaře 2014, kdy se již podařilo sestavit celou kalibrační křivku. Práce spočívala v přípravě standardu, jehož koncentrace činila **2,057 g/l**, a následném ředění standardu, kdy byla použita ředění 2,5x, 5x, 10x, 20x a 50x. Z každého z připravených standardů byl dávkován plynotěsným dávkovačem 1 μ l do 5 ml destilované vody v dávkovači, který byl poté nadávkován do stripovací nádoby koncentrátoru. Poté byly zaznamenány plochy jednotlivých píků, které jsou pro aktuální koncentrace DMDS popsány v Tab. 19:

Tab. 19 Naměřené hodnoty pro sestavení kalibrační křivky

Ředění	S [I]					Ø	c DMDS µg/l
Neředěné	17783168	20150560	18212800	18702400	17246464	18419078	411,4
2,5x	2959506	3500398	-	-	-	3229952	164,6
5x	1524617	1235020	1061382	-	-	1273673	82,3
10x	427055	421170	420242	-	-	422822	41,1
20x	276013	237171	231035	-	-	248073	20,6
50x	153843	145006	-	-	-	149425	8,2

Z ploch píků a koncentrací DMDS u jednotlivých roztoků byla sestrojena kalibrační křivka a vytvořena rovnice regrese, označená na Obr. 7.



Obr. 7 Kalibrační křivka a rovnice regrese

Kalibrační křivka na obrázku vykazuje polynomiální charakter se stoupavou tendencí, což je způsobeno detektorem ECD. Hodnota $R^2 = 0,9998$ ukazuje, že kalibrace byla provedena správně.

Rovnice kalibrační křivky: $y = 101\,414\,150x^2 + 2\,608\,083x + 170\,874$

9.6 Využívání DMDS jako doplňkového zdroje uhlíku se stanovením míry odstranění DMDS

Tento test byl prováděn ve čtyřech sériích lahviček v kompletním minerálním médiu s koncentrací citronanu sodného 300 mg/l, přičemž jednotlivé série se lišily pouze v koncentraci DMDS. Různé koncentrace DMDS byly použity pro prokázání vlivu DMDS na kulturu RF 2. Výsledky jsou popsány v následující tabulce:

Tab. 20 Sušina buněk v testu s různými koncentracemi DMDS

Koncentrace DMDS	0	50	150	300
	g/l			
Sušina buněk [g/l]				
	0,0667	0,0066	-0,1734	0,0866
	0,0266	0,0466	-0,0534	0,1266
	0,0466	0,0266	-0,0934	-0,0134
	-0,0334	0,1666	-0,0134	0,0466
Ø	0,0266	0,0616	-0,0834	0,0616

Výsledky uvedené v Tab. 20 nebyly reprodukovatelné a v průběhu pokusu došlo k chybě, bakterie narostly velmi slabě. Pokus byl proto opakován, avšak výsledky opakovaného pokusu byly obdobné. Proto bylo usouzeno, že bakterie *Comamonas testosteroni* již po několikanásobném přeočkování na TYA agaru určitým způsobem změnila své vlastnosti, bylo tedy nutné vyočkovat čerstvou kulturu z mrazicího boxu. Výsledky pokusu s čerstvou kulturou jsou uvedeny v Tab. 21:

Tab. 21 Sušina buněk v testu s různými koncentracemi DMDS – opakovaný pokus

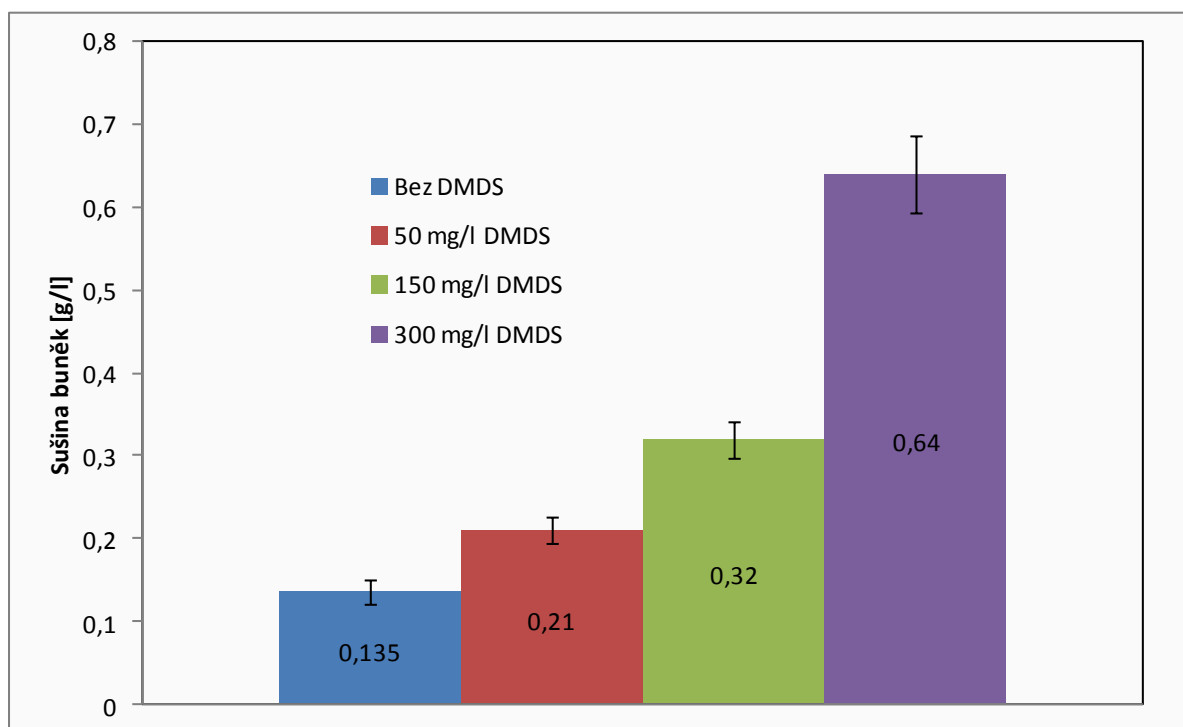
Koncentrace DMDS	0	50	150	300
	g/l			
Sušina buněk [g/l]				
	0,06	0,10	-	0,14
	0,10	0,12	-	0,16
	0,02	0,10	0,12	0,16
	0,02	0,10	0,12	0,14
Ø	0,0500	0,1050	0,1200	0,1500

Dle výsledků z Tab. 21, lze konstatovat, že čerstvá bakterie rostla, ale výsledky byly opět nereprodukovatelné, vzhledem k výrazným výkyvům sušiny buněk v lahvičkách

v rámci stejné série. Tyto výkyvy byly způsobeny odléváním supernatantu po centrifugaci, kdy docházelo k odlití i části buněk. Test musel být tedy opakován počtvrté s obdobným postupem, jen s rozdílem ve způsobu odebírání supernatantu pomocí pipety, aby nedocházelo k odtoku buněk. Výsledky testu jsou uvedeny v Tab. 22:

Tab. 22 Sušina buněk z testu s různými koncentracemi DMDS – čtvrtý pokus

Koncentrace DMDS	0	50	150	300
	g/l			
Sušina buněk [g/l]				
	0,1550	0,1950	0,2950	0,595
	0,1350	0,2350	0,3550	0,715
	0,1150	0,2150	0,3150	0,635
	0,1350	0,1950	0,3150	0,615
Ø	0,1350	0,2100	0,3200	0,6400
SMODCH	0,0141	0,0166	0,0218	0,0456



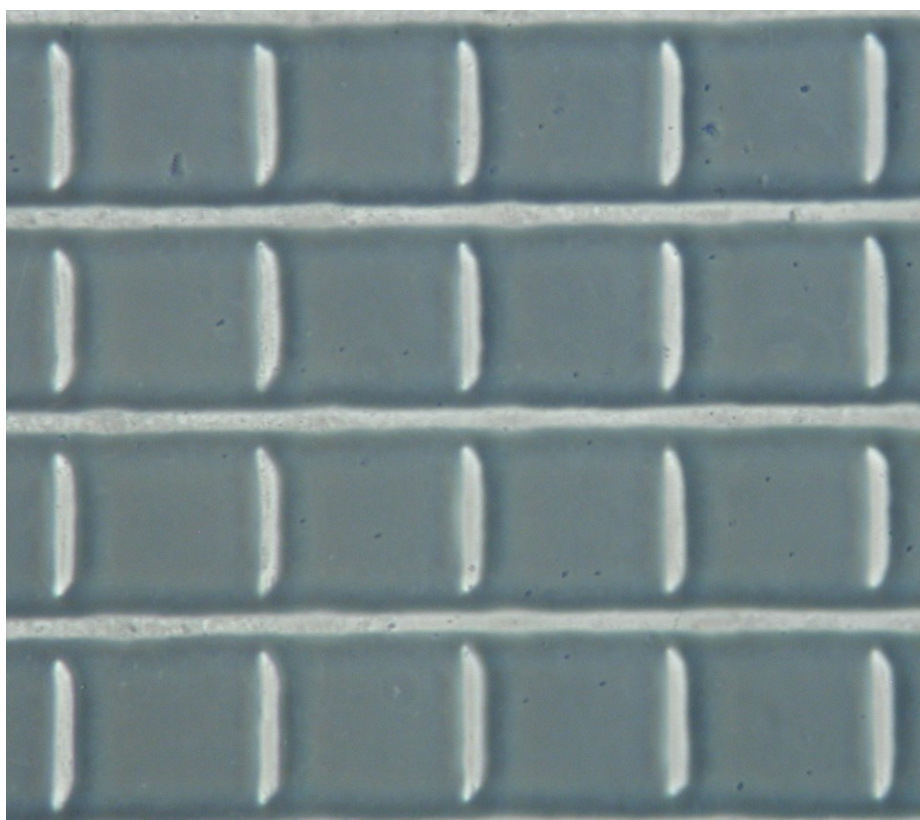
Obr. 8 Sušina buněk v testu s různými koncentracemi DMDS

Z Tab. 22 a Obr. 8 je patrné, že zvyšující se koncentrace DMDS vedla k nárůstu sušiny buněk. Modře označený sloupeček v grafu označuje použité KMM s citronanem sod-

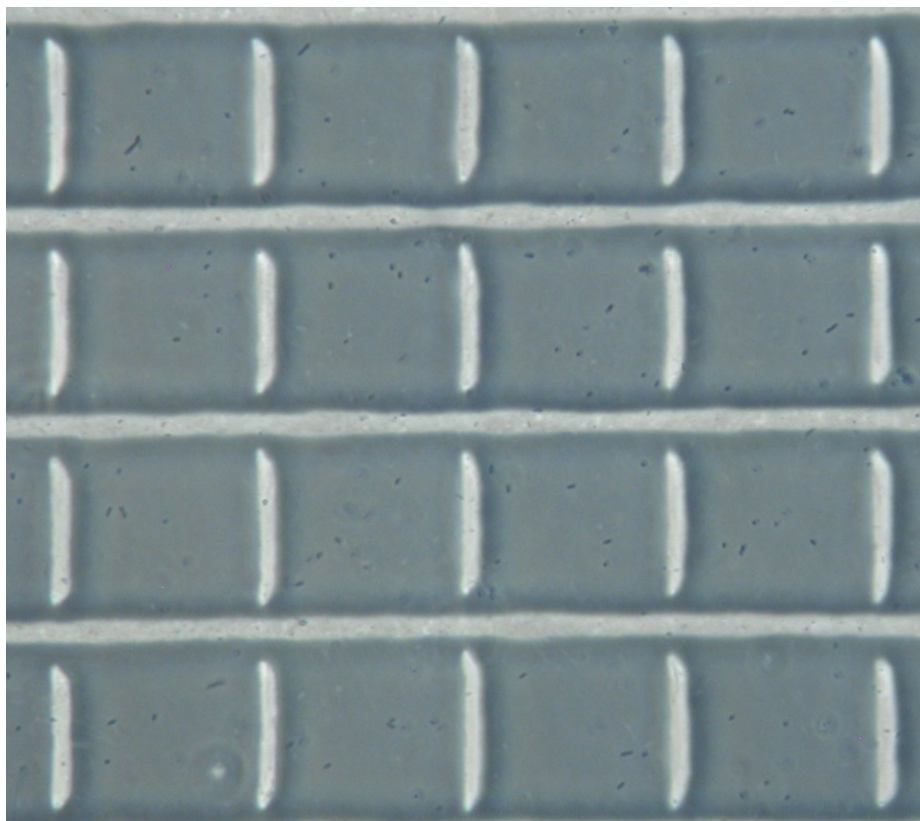
ným bez přidavku DMDS, v červeném sloupečku byl přidán DMDS o koncentraci 50 mg/l, získaná sušina činila 0,21 g/l. V zeleně označeném sloupečku byla použita koncentrace DMDS 150 mg/l, výsledná sušina buněk zde byla 0,32 g/l. U posledního fialového sloupečku byla použita koncentrace 300 mg/l, sušina zde získaná byla stanovena na 0,64 g/l, což je dvojnásobek než u koncentrace 150 mg/l.

Tab. 23 Počítání buněk pro test s různými koncentracemi DMDS

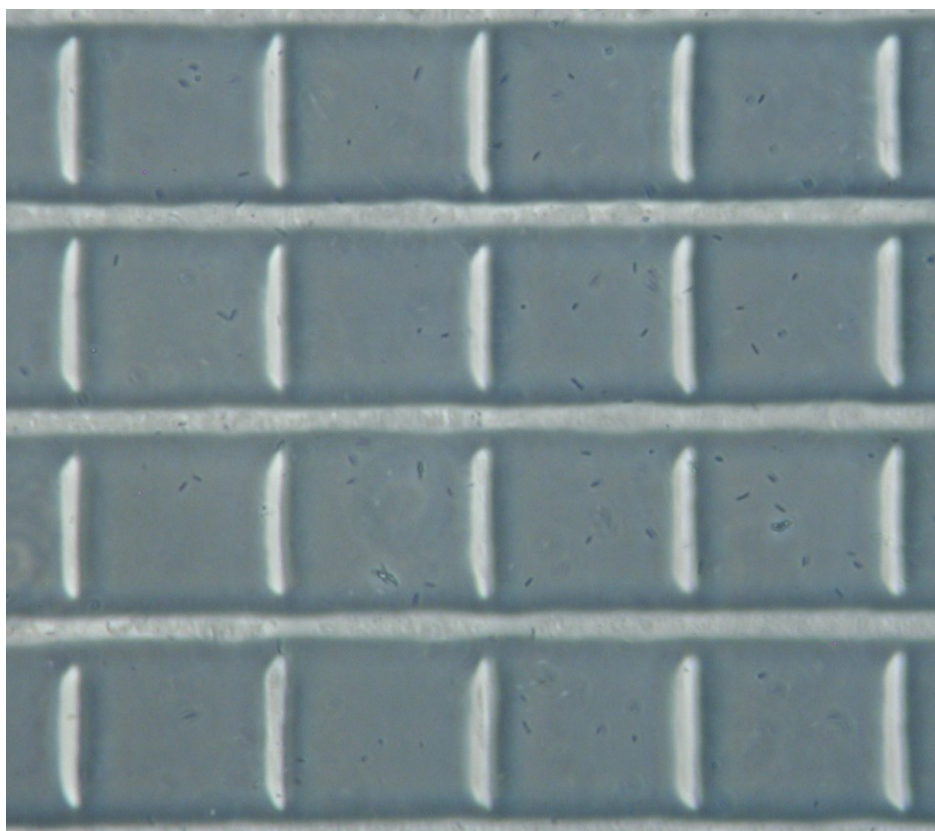
c_{DMDS} [mg/l]	0	50	150	300
	Počítání buněk			
	6	10	13	14
	5	8	11	16
	8	9	14	15
	5	11	12	16
$\bar{\varnothing}$	6,0000	9,5000	12,5000	15,2500
Přepočet na ml	$4,8 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$



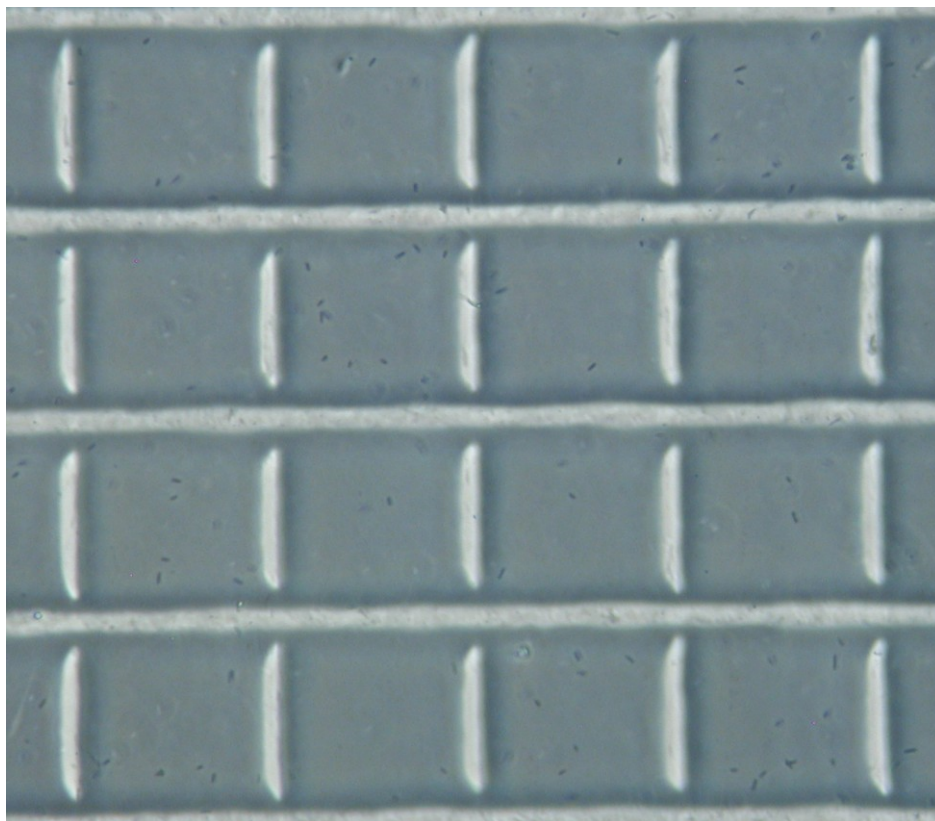
Obr. 9 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa bez DMDS



Obr. 10 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa s DMDS 50 mg/l



Obr. 11 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa s DMDS 150 mg/l



Obr. 12 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa s DMDS 300 mg/l

Z Tab. 23 a Obr. 9 – 12 je patrný počet buněk, vyrostených v minerálních médiích s odstupňovanými koncentracemi DMDS. Jak bylo zjištěno ze sušiny buněk, se zvyšující se koncentrací dochází ke zvýšení počtu buněk, přestože počet buněk zcela neodpovídá množství zjištěné sušiny, což může být způsobeno velikostí buněk, které jsou při vyšších koncentracích větší, jak je vidět na jednotlivých obrázcích.

U série vzorků s koncentrací 150 mg/l bylo provedeno měření na plynovém chromatografu pro zjištění zbytkového DMDS po nárůstu buněk při kultivaci. Také byla změřena počáteční koncentrace DMDS. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 24:

Tab. 24 Změřené množství DMDS na plynovém chromatografu

	s [1]			Ø	c_{DMDS} [mg/l]	Neřaděné c_{DMDS} [mg/l]
Vstupní koncentrace DMDS	313281	291350	250428	285019,7	0,0231	115,5
Výstupní koncentrace DMDS	737043	638833	698628	691501,3	0,0599	149,75

Vysvětlivky:

S – plocha píku

c_{DMDS} – koncentrace DMDS [mg/l]

Rovnice 1 Rovnice kalibrační křivky

$$y = 101414150x^2 + 2608083x + 170874$$

Rovnice 2 Dosazená rovnice kalibrační křivky

$$S = 101414150c^2 + 2608083c + 170874$$

Rovnice 3 Výpočet vstupní koncentrace DMDS

$$ax^2 + bx + c = 0$$

$$101414150x^2 + 2608083x + (170874 - 285019) = 0$$

$$\sqrt{D} = \sqrt{b^2 - [4ac]}$$

$$\sqrt{D} = \sqrt{2608083^2 - [4 * (101414150) * (170874 - 285019)]} = 7287370,55$$

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{D}}{2a} = x_1 = \frac{-2608083 + 7287370,55}{2 * 101414150} = 0,0231 \text{ mg/l}$$

Rovnice 4 Výpočet výstupní koncentrace DMDS

$$ax^2 + bx + c = 0$$

$$101414150x^2 + 2608083x + (170874 - 691501) = 0$$

$$\sqrt{D} = \sqrt{b^2 - [4ac]}$$

$$\sqrt{D} = \sqrt{2608083^2 - [4 * (101414150) * (170874 - 691501)]} = 14764751,12$$

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{D}}{2a} = x_1 = \frac{-2608083 + 14764751,12}{2 * 101414150} = 0,0599 \text{ mg/l}$$

V Tab. 24 jsou uvedeny změřené plochy píků na plynovém chromatografu, u vstupních koncentrací bylo dávkováno do 5 ml destilované vody 1 µl vzorku DMDS o koncentraci 150 mg/l v destilované vodě. U výstupní koncentrace byly dávkovány do 5 ml destilované vody 2 µl vzorku. Z výsledků je patrné, že získaná koncentrace po dvoudenní inkubaci byla dokonce o něco vyšší než na počátku testu, což ukazuje, že studovaná bakterie DMDS

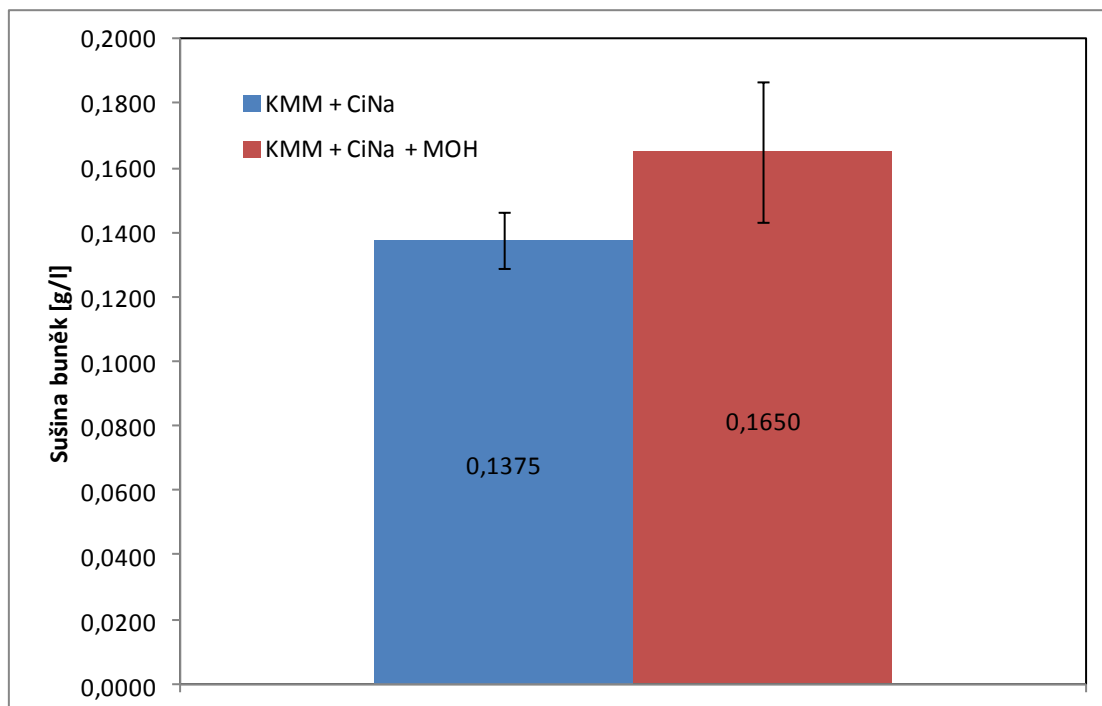
ve skutečnosti za těchto podmínek nespotřebovává. Není jednoduché najít vysvětlení pro tyto výsledky, několik předcházejících pokusů ukázalo, že za přídavku DMDS dochází ke zvýšení sušiny buněk, avšak analytické výsledky stanovení DMDS neprokázaly jeho rozklad. Teoreticky lze uvažovat o sorpci DMDS na rostoucí buňky *Comamonas testosteroni* RF 2 nebo vlivu DMDS na jejich vlastnosti, např. v příjmu či vylučování anorganických látek (případně kombinaci těchto jevů), které by mohly vést ke zvyšování sušiny buněk, prokázání takových procesů se však již vymykalo předpokládané náplni této DP.

9.7 Využívání methanolu jako zdroje uhlíku a jako zdroje energie

S ohledem na výsledky předchozích pokusů a paralelně s předcházejícím testem, a snaze pochopit, jakým způsobem, je DMDS využíván bakteriemi *C. testosteroni*, bylo uvažováno, že při využití síry v něm obsažené a následné oxidaci, může z koncových methylových skupin vznikat methanol, byl proveden test na využívání methanolu. Test probíhal obdobně jako předchozí testy, kdy bylo pracováno se třemi sériemi lahvíček, ve všech lahvíčkách bylo použito minerální médium. V první sérii byl jako růstový substrát využit citronan sodný o koncentraci 300 mg/l, ve druhé sérii byl stejně jako v první využit citronan sodný o stejné koncentraci s přídavkem methanolu o koncentraci 150 mg/l. Ve třetí sérii byl jako růstový substrát využit pouze methanol o koncentraci 200 mg/l. U první a druhé série byla stanovována sušina buněk, u série 3 byla měřena koncentrace DOC. Test musel být proveden dvakrát, jelikož první pokus, vzhledem ke změně vlastností bakterií po několikanásobném přeočkování, nebyl reprodukovatelný. Test byl tedy opakován a jeho výsledky jsou uvedeny a popsány v Tab. 25:

Tab. 25 Sušina buněk při využívání methanolu

Koncentrace methanolu	0	150
	g/l	
Sušina buněk [g/l]		
	0,1500	0,1600
	0,1300	0,2000
	0,1300	0,1600
	0,1400	0,1400
Ø	0,1375	0,1650
SMODCH	0,0087	0,0218



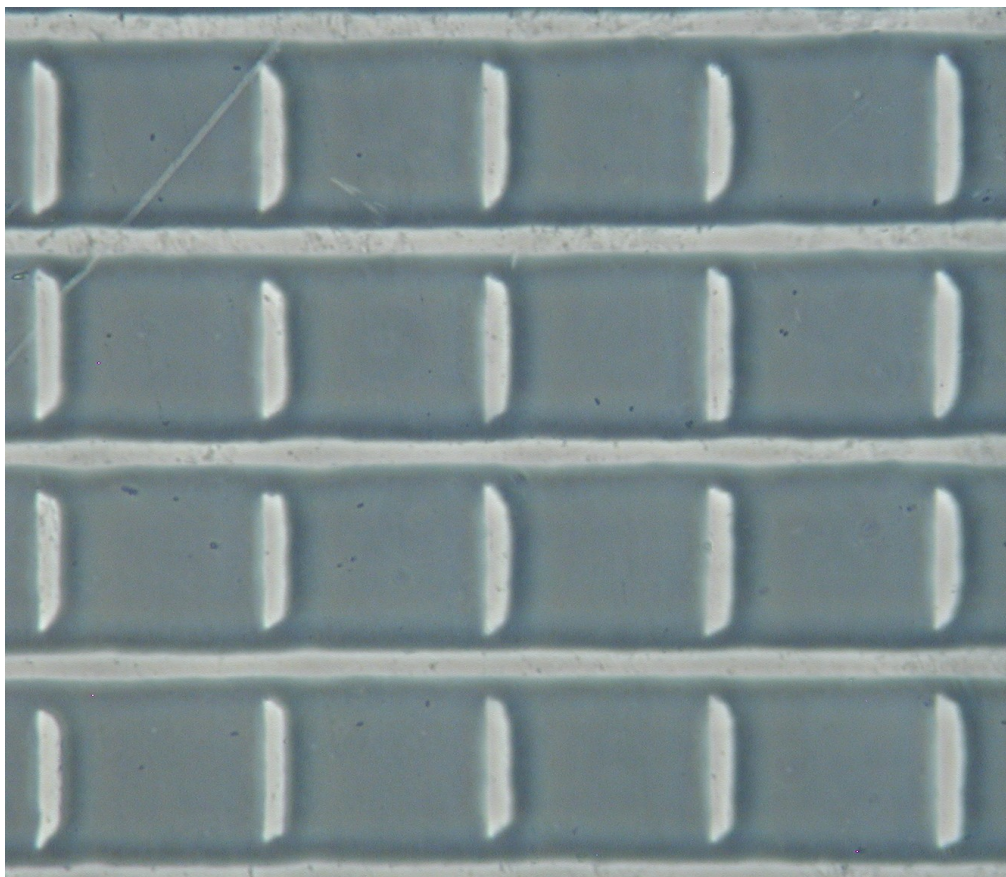
Obr. 13 Sušina buněk při využívání methanolu

Z výsledků, jež jsou uvedeny v Tab. 25 a znázorněny na Obr. 13, bylo zjištěno, že bakteriální suspence měla vyšší obsah sušiny ve vzorku, kde byl jako doplňkový substrát využit methanol, což naznačuje, že bakterie je patrně schopna využívat methanol jako zdroj energie. Pro zjištění, zda bakterie využívá methanol i jako jediný zdroj uhlíku byl proveden růstový test a vyhodnocen stanovením DOC, pomocí analyzátoru uhlíku Shimadzu. Tento test byl proveden u třetí série vzorků, ke kterým byly ještě připraveny vzorky s počáteční koncentrací methanolu. Výsledky měření jsou uvedeny v následující tabulce:

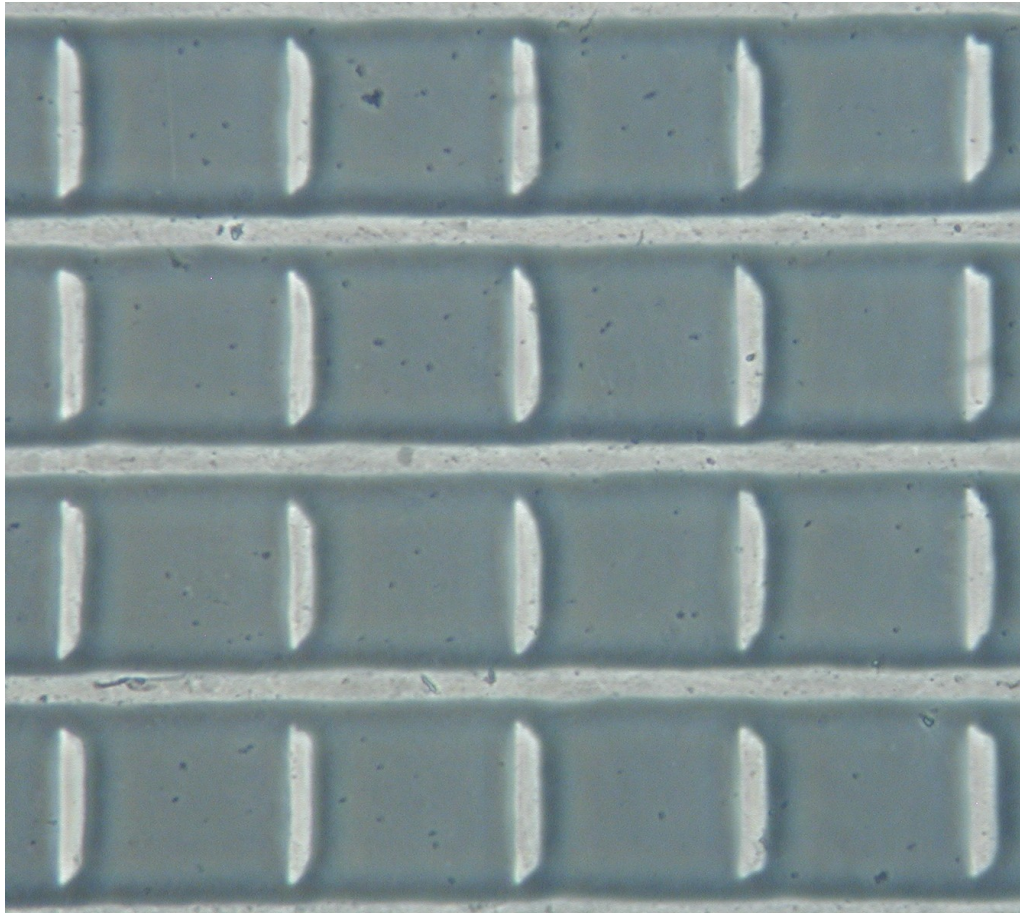
Tab. 26 Výsledky měření koncentrace uhlíku

	DOC [mg/l]				Ø
Vstupní koncentrace	75,71	76,92	73,31	-	75,313
Výstupní koncentrace	74,24	73,72	75,25	75,45	74,665

Výsledky uvedené v Tab. 26 ukazují, že koncentrace uhlíku se ve vzorcích v průběhu kultivace prakticky nezměnila, čímž lze říci, že bakterie není schopna využívat methanol jako zdroj uhlíku.



Obr. 14 Fotografie buněk v KMM bez methanolu



Obr. 15 Fotografie buněk v KMM s metanolem

Na Obr. 14 a 15 jsou zaznamenány fotografie buněk v kompletním médiu bez methanolu, resp. s methanolem. Na Obr. 15 je vidět poněkud vyšší nárůst buněk v suspensi s citronanem a metanolem proti suspensi jen s citronanem, což je v souladu se stanovením sušín.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit možnosti odbourávání a využívání dimethylsulfidu (DMDS) bakteriální kulturou *Comamonas testosteroni* RF 2. Nejprve byla zkoumána toxicita DMDS na buňky této bakterie, kdy bylo použito rozmezí koncentrací DMDS od 0 do 1000 mg/l v minerálním médiu. Pro kulturu RF 2 byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace DMDS 650 mg/l, což byla zároveň i minimální baktericidní koncentrace. Obdobným způsobem, pro srovnání, byla stanovována toxicita na bakterii *E. coli*, kdy byly taktéž zvoleny koncentrace DMDS od 0 do 1000 mg/l. Tímto testem se však minimální inhibiční koncentraci nepodařilo zjistit, avšak při vyšších koncentracích již docházelo ke zpomalení růstu buněk, bylo tedy uzavřeno, že minimální inhibiční koncentrace DMDS pro *E. coli* je vyšší než 1000 mg/l.

Dalším prováděným testem bylo využívání DMDS kulturou RF 2 jako zdroje síry. Tento test byl již popsán v DP B. Valové, avšak s tím rozdílem, že byly změněny podmínky kultivace a to kultivací na třepačce. Cílem tohoto testu bylo také ověřit, zda kultura RF 2 je schopna využívat DMDS jako zdroj síry po 10 letech uložení při -80 °C. Z výsledků je patrné, že bakterie RF 2 je schopna využívat DMDS jako zdroj síry a je dokonce schopna o něco rychleji růst, než při využívání síranů obsažených v kompletním minerálním médiu. Nepatrný nárůst kultury byl zaznamenán i v minerálním médiu bez jakéhokoliv zdroje síry, což ukazuje na tvorbu zásob touto bakterií.

Dále bylo zkoumáno využívání DMDS jako doplňkového zdroje uhlíku. Tento pokus musel být zkoumán dvakrát, jelikož výsledky prvního pokusu byly nejen velmi překvapující, ale vzhledem k množství použitých substrátů i nepravděpodobné. Test byl tedy opakován s již reálnými výsledky, které naznačovaly, že dochází ke spotřebě uhlíku nebo energie v DMDS obsažené.

Vzhledem k výsledkům předchozího testu byl proveden test na využití DMDS jako doplňkového zdroje uhlíku s určením míry spotřebování DMDS. Tento pokus musel být opět několikrát opakován díky změně vlastností bakterie po několikanásobném přeočkování na TYA agaru. Test byl reprodukovatelný až na čtvrtý pokus, ve kterém výsledky ukázaly, že se zvyšující se koncentrací DMDS dochází k většímu nárůstu sušiny buněk. Pro potvrzení předpokladů, byla změřena i spotřeba DMDS bakteriemi *C. testosteroni* na plynovém chromatografu. Výsledkem tohoto měření však bylo, že kultura RF 2 DMDS nespo-

třebovává a množství DMDS bylo ve vzorcích dokonce vyšší na konci testu, než na jeho počátku. Tyto výsledky se obtížně vysvětlují, je však možné, že DMDS nějakým způsobem ovlivňuje vlastnosti bakterie *C. testosteroni*, např. v příjmu či vylučování anorganických látek, jež by mohly vést ke zvyšování sušiny buněk. Jiným teoretickým vysvětlením jevu je adsorpce DMDS na rostoucí buňky studované kultury.

Doplňkovým testem, který byl v rámci DP proveden, bylo využívání methanolu jako zdroje uhlíku a jako zdroje energie pro bakterii RF 2. Tento test ukázal, že kultura RF 2 není schopna využít methanol jako zdroj uhlíku, avšak při růstu na citronanu dochází při současné přítomnosti methanolu k mírnému nárůstu sušiny buněk, tedy k obdobnému jevu, jako při jejím růstu na citronanu s přítomností DMDS.

Výsledky této diplomové práce potvrdily využívání DMDS bakterií *Comamonas testosteroni* RF 2 jako zdroje síry, avšak testy na ověření využívání této látky jako doplňkového zdroje uhlíku vyvolaly spíše další otázky a ve snaze pochopit jakým způsobem DMDS tuto bakterii ovlivňuje, bude zapotřebí provést řadu dalších zkoumání.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Bezpečnostní list DMDS, Sigma-Aldrich
- [2] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=12232#x332>
- [3] <http://www.odour.cz/>, Petra Auterská, Pachové látky
- [4] SCHÖLLER, Charlotte, Soren MOLIN a Ken WILKINS. VOLATILE METABOLITES FROM SOME GRAM-NEGATIVE BACTERIA. *Chemosphere*. 1997, č. 35, 1487 - 1495. DOI: 10.1016/S0045-6535(97)00209-9.
- [5] TOMITA, Banichi, Hiromasa INOUE, Kunio CHAYA, Akira NAKAMURA, Norikatsu HAMAMURA. Identification of dimethyl disulfide-forming bacteria isolated from activated sludge. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1987, č. 53, 1541 - 1547.
- [6] ZHANG, Hongyu, Frank SCHUCHARDT, Guoxue LI, Jinbing YANG a Qingyu-an YANG. Emission of volatile sulfur compounds during composting of municipal solid waste (MSW). *WASTE MANAGEMENT*. 2013, č. 33, s. 957-963. DOI: 10.1016/j.wasman.2012.11.008.
- [7] WU, Ting, Xinming WANG, Dejun LI a Zhigang YI. Emission of volatile organic sulfur compounds (VOSCs) during aerobic decomposition of food wastes. *ATMOSPHERIC ENVIRONMENT*. 2010, č. 44, 5065 - 5071. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2010.09.019.
- [8] SUSAYA, Janice, Ki-Hyun KIM, Nhu-Thuc PHAN a Jo-Chun KIM. Assessment of reduced sulfur compounds in ambient air as malodor components in an urban area. *ATMOSPHERIC ENVIRONMENT*. 2011, č. 45, 3381 - 3390. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2011.03.051.
- [9] TSEVEGSUREN, N, K AITZETMULLER a K VOSMANN. Geranium sanguineum (Geraniaceae) seed oil: A new source of petroselinic and vernolic acid. *LIPIDS*. 2004, č. 39, 571 - 576. DOI: 10.1007/s11745-004-1265-8.
- [10] CARON, F a JR KRAMER. FORMATION OF VOLATILE SULFIDES IN FRESH-WATER ENVIRONMENTS. *SCIENCE OF THE TOTAL*

- ENVIRONMENT. 1994, č. 153, 177 - 194. DOI: 10.1016/0048-9697(94)90197-X.
- [11] LU, Xin, Chengxin FAN, Wei HE, Jiancai DENG a Hongbin YIN. Sulfur-containing amino acid methionine as the precursor of volatile organic sulfur compounds in alga-induced black bloom. JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES-CHINA. 2013, č. 25, 33 - 43. DOI: 10.1016/S1001-0742(12)60019-9.
- [12] MURPHY, Kathleen, Gavin PARCSI a Richard STUETZ. Non-methane volatile organic compounds predict odor emitted from five tunnel ventilated broiler sheds. CHEMOSPHERE. 2014, č. 95, s. 423-432. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.09.076.
- [13] ASASIAN, Neda a Tahereh KAGHAZCHI. Comparison of Dimethyl Disulfide and Carbon Disulfide in Sulfurization of Activated Carbons for Producing Mercury Adsorbents. INDUSTRIAL & ENGINEERING CHEMISTRY RESEARCH. 2012, č. 51, 12046 - 12057. DOI: 10.1021/ie3001474.
- [14] SMITH, N. A. a D. P. KELLY. Isolation and Physiological Characterization of Autotrophic Sulfur Bacteria Oxidizing Dimethyl Disulfide as Sole Source of Energy. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY. 1988, č. 134, 1407 - 1417. DOI: WOS:A1988N987100002.
- [15] CHO, K. S., M. HIRAI a M. SHODA. Degradation Characteristics of HYDROGEN-SULFIDE, METHANETHIOL, DIMETHYL SULFIDE and DIMETHYL DISULFIDE by THIOBACILLUS-THIOPARUS DW44 Isolated from Peat Biofilter. Journal of Fermentation and Bioengineering. 1991, č. 71, 384 - 389. DOI: 10.1016/0922-338X(91)90248-F.
- [16] REICHERT, K., A. LIPSKI, S. PRADELLA, E. STACKEBRANDT a K. ALTENDORF. *Pseudonocardia asaccharolytica* sp. nov. and *Pseudonocardia sulfidoxydans* sp. nov., two new dimethyl disulfide-degrading actinomycetes and emended description of the genus *Pseudonocardia*. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 1998, č. 48, 441 - 449. DOI: WOS:000074045700013.
- [17] ITO, Takashi, Tatsuro MIYAJI, Tomoyuki NAKAGAWA a Noboru TOMIZUKA. Degradation of dimethyl disulfide by *Pseudomonas fluorescens*

- strain 76. BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY. 2007, č. 71, 366 - 371. DOI: 10.1271/bbb.60295.
- [18] KRUGER, Roberta Leticia, Rogerio Marcos DALLAGO a Marco DI LUCCIO. Degradation of dimethyl disulfide using homogeneous Fenton's reaction. JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS. 2009, č. 169, 443 - 447. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.118.
- [19] CHERNIN, Leonid, Natela TOKLIKISHVILI, Marianna OVADIS, Sofia KIM, Julius BEN-ARI, Inessa KHMEL a Alexander VAINSTEIN. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY REPORTS. 2011, č. 3, 698 - 704. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2011.00284.x.
- [20] CACERES, Manuel, Javier SILVA, Marjorie MORALES, Ricardo SAN MARTIN a German AROCA. Kinetics of the bio-oxidation of volatile reduced sulphur compounds in a biotrickling filter. BIORESOURCE TECHNOLOGY. 2012, č. 118, 243 - 248. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.04.039.
- [21] CABROL, Lea, Luc MALHAUTIER, Franck POLY, Xavier LE ROUX, Anne-Sophie LEPEUPLE a Jean-Louis FANLO. Resistance and resilience of removal efficiency and bacterial community structure of gas biofilters exposed to repeated shock loads. BIORESOURCE TECHNOLOGY. 2012, č. 123, 548 - 557. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.033.
- [22] SOUPRAMANIEN, Alexandre, Luc MALHAUTIER, Eric DUMONT, Yves ANDRES, Jannick ROCHER a Jean-Louis FANLO. Biological treatment of a mixture of gaseous sulphur reduced compounds: identification of the total bacterial community's structure. JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. 2012, č. 87, 817 - 823. DOI: 10.1002/jctb.3729.
- [23] SEDLÁČEK, Ivo. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 8021042079.
- [24] RŮŽIČKA, Jan, Marie DVOŘÁČKOVÁ a Marek KOUTNÝ. Trichloroethylene Degradation by Two Phenol Utilizing Strains of *Comamonas testosteroni*. ASIAN JOURNAL OF CHEMISTRY. 2011, č. 10, 4255 - 4259. DOI: WOS:000296218600003.

- [25] Hutěčka V.: Produkce dimetyldisulfidu bakteriálními kulturami při biodegradaci trichlorethylenu. (Studentská práce). Fakulta technologická VUT v Brně se sídlem ve Zlíně, 2000.
- [26] Hutěčka, V.: Význam dimetyldisulfidu a podmínek kultivace pro bakteriální rozklad trichlorethylenu. (Diplomová práce). Fakulta technologická UTB Zlín, 2000.
- [27] Valová, B.: Enviromentální využití mikroorganismů oxidujících sirmé sloučeniny. (Diplomová práce) Fakulta technologická UTB ve Zlíně, 2004

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DMDS	Dimethyldisulfid.
DMS	Dimethylsulfid.
GC - MS	Plynový chromatogram s hmotnostním detektorem.
GC - FID	Plynový chromatogram s plamenoionizačním detektorem
VOC	Těkavé organické látky
KMM	Kompletní minerální médium
BMM	Bezsrné minerální médium
ZVR DMDS	Základní vodní roztok dimethyldisulfidu
MM	Minerální médium
UV/VIS	Ultrafialová/viditelná oblast
TOC	Celkový organický uhlík
ECD	Elektroionizační detektor
CiNa	Citronan sodný
SMODCH	Směrodatná odchylka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Struktura DMDS.....	13
Obr. 2 Využívání DMDS kulturou RF 2 jako jediný zdroj síry.....	44
Obr. 3 Sušina buněk po 48 hodinách v lahvičkách.....	45
Obr. 4 Sušina po 48 hodinách – opakovaný pokus.....	47
Obr. 5 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa	48
Obr. 6 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa a DMDS	48
Obr. 7 Kalibrační křivka a rovnice regrese	50
Obr. 8 Sušina buněk v testu s různými koncentracemi DMDS	52
Obr. 9 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa bez DMDS	53
Obr. 10 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa s DMDS 50 mg/l.....	54
Obr. 11 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa s DMDS 150 mg/l.....	54
Obr. 12 Bakterie vyrostené v KMM s CiNa s DMDS 300 mg/l.....	55
Obr. 13 Sušina buněk při využívání methanolu.....	58
Obr. 14 Fotografie buněk v KMM bez methanolu	59
Obr. 15 Fotografie buněk v KMM s metanolem.....	60

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Rozpis dávkování DMDS do vialek	33
Tab. 2 Rozpis dávkování DMDS s přesnějšími koncentracemi	34
Tab. 3 Rozpis koncentrací DMDS pro určení toxicity na <i>E.coli</i>	35
Tab. 4 Rozpis dávkování do vialek pro stanovení využívání síry	35
Tab. 5 Rozpis dávkování pro test využívání DMDS jako zdroje uhlíku	36
Tab. 6 Rozpis dávkování pro test využívání DMDS jako zdroj uhlíku se stanovením míry odstranění DMDS	37
Tab. 7 Rozpis dávkování pro test využívání methanolu	37
Tab. 8 Výsledky toxicity DMDS na kulturu RF 2	39
Tab. 9 Výsledky přeočkování suspenzí na TYA agar	40
Tab. 10 Výsledky pokusu toxicity DMDS na <i>C. testosteroni</i>	40
Tab. 11 Přeočkované suspenze na TYA agar	41
Tab. 12 Výsledky pokusu toxicity DMDS na <i>E.coli</i>	42
Tab. 13 Vočkování suspenzí <i>E. coli</i> na TYA agar	42
Tab. 14 Výsledky testu využívání DMDS jako zdroje síry	43
Tab. 15 Sušina buněk po 48 hodinách v lahvičkách	45
Tab. 16 Počítání buněk při stanovení sušiny	46
Tab. 17 Sušina buněk po 48 hodinách v lahvičkách – opakovaný test	46
Tab. 18 Počítání buněk v opakovaném testu	49
Tab. 19 Naměřené hodnoty pro sestavení kalibrační křivky	50
Tab. 20 Sušina buněk v testu s různými koncentracemi DMDS	51
Tab. 21 Sušina buněk v testu s různými koncentracemi DMDS – opakovaný pokus	51
Tab. 22 Sušina buněk z testu s různými koncentracemi DMDS – čtvrtý pokus	52
Tab. 23 Počítání buněk pro test s různými koncentracemi DMDS	53
Tab. 24 Změřené množství DMDS na plynovém chromatografu	55
Tab. 25 Sušina buněk při využívání methanolu	57
Tab. 26 Výsledky měření koncentrace uhlíku	58

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Rovnice kalibrační křivky.....	56
Rovnice 2 Dosazená rovnice kalibrační křivky	56
Rovnice 3 Výpočet vstupní koncentrace DMDS	56
Rovnice 4 Výpočet výstupní koncentrace DMDS	56