



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Ing. Eva HLAVOŇOVÁ

**STUDIUM PRODUKCE A VLASTNOSTÍ VYBRANÝCH
BAKTERIÁLNÍCH EXOPOLYMERŮ**

**Study of production and features of chosen bacterial
exopolymers**

Disertační práce

Obor:

2808V006 Technologie makromolekulárních látek

Školitel:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Zlín 2011

PODĚKOVÁNÍ

Velké a upřímné díky panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za jeho nemalou pomoc při sepisování práce, za neobyčejné vedení během výzkumné činnosti a celého mého vysokoškolského studia a za trpělivost a ochotu.

Jmenovité díky Ing. Tereze Václavkové, Ph.D., Ing. Pavlíně Vltavské, Ph.D., doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. a paní Lence Machálkové za vytvoření vynikajících pracovních podmínek.

Velký dík patří také mé rodině za stálou psychickou, fyzickou a finanční podporu a pomoc při studiu.

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na studium dvou bakteriálních kultur pracovně označených PR a FR8, izolovaných ze dvou aktivovaných kalů vykazujících známky viskózního bytnění. Bakterie byly v průběhu prací identifikovány jako *Leuconostoc garlicum* PR a *Pseudoxanthomonas mexicana* FR8 a byly sledovány jejich základní růstové a biochemické vlastnosti. U obou kultur byla zjištěna schopnost produkce extracelulárních polymerů, což doposud nebylo u příslušných druhů bakterií v odborné literatuře popsáno. Bylo prokázáno, že kultura *Leuconostoc garlicum* PR produkuje v médiu se sacharosu extracelulárně polymer odpovídající svojí strukturou dextransu, zatímco u kultury *Pseudoxanthomonas mexicana* FR8 bylo nalezeno, že je za určitých podmínek schopna produkovat extracelulárně materiál způsobující značnou kompaktnost její biomasy.

Klíčová slova: Bakteriální polymery, extracelulární polymery, exopolysacharidy, exoproteiny, eDNA

ABSTRACT

This work was focused on the study of two different bacterial cultures designated PR and FR8 isolated from two different samples of activated sludge affected by slime bulking. The bacterial cultures were identified as *Leuconostoc garlicum* PR and *Pseudoxanthomonas mexicana* FR8. Basic growth and biochemical features of both bacteria were studied. The ability to produce exocellular polymers was observed with both bacteria, till this time this feature was not public in a science literature. It was proved that the culture *Leuconostoc garlicum* PR produced dextran-like structure exopolymer in the saccharidic medium. Whereas, the culture *Pseudoxanthomonas mexicana* FR8 was able to produce exocellular material causing appreciable biomass consistency under the specific conditions.

Keywords: Bacterial polymers, eDNA, Exopolysaccharides, Exoproteins, Extracellular polymers

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	7
SEZNAM TABULEK	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
1.1 Mikrobiální polymery	13
1.2 Extracelulární polymery	13
1.2.1 Složení exopolymerů a vliv prostředí na jejich produkci	14
1.2.2 Formy exopolymerů	16
1.2.3 Biologická funkce exopolymerů u bakterií	18
1.3 Extracelulární polysacharidy	19
1.3.1 Struktura a dělení exopolysacharidů	19
1.3.2 Mechanismus produkce exopolysacharidů bakteriemi	20
1.3.3 Významné skupiny heteropolysacharidů	20
1.3.4 Využití exopolysacharidů	21
1.4 Extracelulární proteiny	21
1.4.1 Typy exoproteinů	21
1.4.2 Významné typy exoproteinů a jejich průmyslové využití	23
1.5 Extracelulární DNA	24
1.6 Viskózní bytnění aktivovaného kalu	24
2 CÍL PRÁCE	26
3 ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ	27
3.1 Použité chemikálie	27
3.2 Použitá zařízení a pomůcky	27
3.3 Roztoky a živná média	28
3.3.1 Roztoky	28
3.3.2 Agarová média	30
3.3.3 Tekutá média	31
3.4 Použité bakteriální kultury	33
3.4.1 Kultura PR	33
3.4.2 Kultura FR8	33
3.4.3 Příprava inokul bakteriálních kultur	33
3.5 Kultivační testy prováděné s kulturou PR	33
3.5.1 Izolace z aktivovaného kalu	33
3.5.2 Kultivace na pevných agarových půdách	33
3.5.3 Gramovo barvení	34
3.5.4 Stanovení biochemických vlastností	34
3.5.5 Testy v tekutých médiích	35
3.5.6 Stanovení prováděná při kultivaci v tekutých médiích	35
3.6 Kultivační testy prováděné s kulturou FR8	36
3.6.1 Kultivace na pevných agarových půdách	36
3.6.2 Zkoušky ztekucení suspendované biomasy trypsinem	36
3.6.3 Zkoušky ztekucení suspendované biomasy DNA-asou	36
3.7 Stanovení charakteristik exopolymerů produkovaných kulturami PR a FR8	36
3.7.1 Postup získání a přečištění exopolymeru kultury PR	36
3.7.2 Postup suspendace biomasy kultury FR8	37
3.7.3 Stanovení sušiny a popela	37

3.7.4	Stanovení rozpuštěného organického uhlíku	37
3.7.5	Stanovení bílkovin	38
3.7.6	Stanovení sacharidů fenol-sulfátovou metodou	41
3.7.7	Stanovení koncentrace DNA	42
3.7.8	Stanovení živých buněk a celkového počtu buněk	44
3.8	SDS-PAGE	45
3.8.1	Roztoky a chemikálie potřebné pro separaci SDS-PAGE	45
3.8.2	Příprava vzorků a gelů pro separaci	45
3.8.3	Vlastní elektroforéza	46
3.8.4	Barvení gelů	46
3.9	Izolace bakteriální DNA fenol-chloroformovou metodou	48
3.9.1	Roztoky a chemikálie potřebné pro izolaci	48
3.9.2	Postup izolace	48
4	HLAVNÍ VÝSLEDKY A JEJICH DISKUSE	49
4.1	Výsledky získané zkoumáním kultury PR	49
4.1.1	Izolace a první testy	49
4.1.2	Základní morfologické a biochemické vlastnosti	50
4.1.3	Růstové vlastnosti na agarových půdách	52
4.1.4	Identifikace	55
4.1.5	Diskuse výsledků	56
4.1.6	První pokusy v tekutých médiích	57
4.1.7	Optimalizace kultivačních podmínek pro produkci exopolymeru	60
4.1.8	Optimalizace postupu izolace exopolymeru	71
4.1.9	Základní charakteristiky částečně přečištěného exopolymeru	72
4.1.10	Strukturní testy prováděné s exopolymerem	74
4.2	Výsledky získané zkoumáním kultury FR8	76
4.2.1	Izolace kultury a výsledky získané v průběhu studentské vědecké činnosti	76
4.2.2	Růstové vlastnosti kultury Pseudoxanthomonas sp. FR8	77
4.2.3	Druhá identifikace kultury	79
4.2.4	Diskuse výsledků s odbornou literaturou	79
4.2.5	Suspendační pokusy s biomasou kultury FR8 a elektroforetická separace	80
4.2.6	Testování biomasy kultury FR8 o rozdílné konzistenci	86
4.2.7	Stanovení koncentrace bílkovin	88
4.2.8	Základní charakteristiky vzorků supernatantů	90
4.2.9	Zkouška ztekucení suspendované biomasy trypsinem	92
4.2.10	Zkouška ztekucení suspendované biomasy DNA-asou	93
4.2.11	Stanovení koncentrace DNA	93
	ZÁVĚR	95
	PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI	97
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	98
	SEZNAM PUBLIKACÍ A AKTIVIT	107
	CURRICULUM VITAE	109

SEZNAM ILUSTRACÍ

<i>Obr. 1 Procentuální vyjádření složení ECP u bakterií s bohatou (R1, R2) a chudou (P1, P2) produkcí exopolymery. Množství složek je vztaženo na 1g suché biomasy [9].....</i>	<i>15</i>
<i>Obr. 2 Tvorba slizu (bílé oblasti) kulturou Rhodococcus erythropolis FR7 (negativní barvení Nigrosinem).....</i>	<i>17</i>
<i>Obr. 3 Tzv. ropy charakter kolonií vytvořený mléčnou bakterií [17]</i>	<i>18</i>
<i>Obr. 4 Kalibrační přímka pro stanovení bílkovin – kyselinou bicinchoninovou – metoda v mikrotitračních destičkách.....</i>	<i>39</i>
<i>Obr. 5 Kalibrační přímka pro stanovení bílkovin – kyselinou bicinchoninovou – zkumavková metoda</i>	<i>40</i>
<i>Obr. 6 Kalibrační přímka pro stanovení sacharidů fenol-sulfátovou metodou</i>	<i>42</i>
<i>Obr. 7 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace DNA.....</i>	<i>43</i>
<i>Obr. 8 Tvorba a) drobných kolonií kultury PR na TYA agaru (4. den kultivace) a b) mukósních kolonií na TYA s 2 % sacharosy (7. den kultivace).....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 9 Gramovo barvení kultury PR z TYA s 2 % sacharosy (7. den kultivace).....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 10 Vzhled a) mukósních a b) nemukósních kolonií kultury PR na TYA s 2 % sacharosy a na VL agaru (7. den kultivace)</i>	<i>54</i>
<i>Obr. 11 Výřez výsledků z databáze GenBank ke dni 18.01.2011</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 12 Průběh růstu kultury PR v různých pufrovaných Trypton kvasničných médiích s 10 % sacharosy.....</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 13 pH různých pufrovaných Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy během kultivace</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 14 Viskozita různých pufrovaných médií v průběhu kultivace.....</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 15 Růst kultury PR v tekutém Trypton kvasničném médiu s 10 % sacharosy, resp. s 10 % glukosy.....</i>	<i>63</i>
<i>Obr. 16 pH tekutých Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy, resp. s 10 % glukosy během kultivace kultury PR.....</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 17 Viskozita kultivačních Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy, resp. s 10 % glukosy při kultivaci kultury PR</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 18 Růst kultury PR v Trypton kvasničných médiích s 10 % sacharosy, s různým obsahem tryptonu a kvasničného autolyzátu</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 19 pH tekutých Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy a s různým obsahem složek během kultivace kultury PR.....</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 20 Viskozita Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy a s různým obsahem složek během kultivace kultury PR.....</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 21 Růst kultury PR v tekutých Trypton kvasničných médiích a VL médiu se sacharosou.....</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 22 Viskozita Trypton kvasničných médií a VL média během kultivace kultury PR</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 23 Kultura FR8 s obarvenými pouzdry - barvení dle Hisse.....</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 24 Kultura FR8 na kaseinovém agaru při různých teplotách, 4. den kultivace.....</i>	<i>77</i>
<i>Obr. 25 Vzhled soudržné biomasy kultury FR8 na TYA s 2 % glukosy při použití kličky.....</i>	<i>78</i>
<i>Obr. 26 Vzhled biomasy kultury FR8 na kaseinovém agaru</i>	<i>78</i>
<i>Obr. 27 Produkce biomasy kultury FR8 během kultivace na TYA s 2 % glukosy.....</i>	<i>79</i>
<i>Obr. 28 Schéma rozvrstvení suspenze biomasy kultury FR8 po centrifugaci (30 000 g, 15 min.).....</i>	<i>81</i>
<i>Obr. 29 První SDS-PAGE separace vzorků supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 napěstované na TYA s glukosou – barvení stříbrem</i>	<i>83</i>
<i>Obr. 30 Elektroforetická separace vzorků supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 z TYA s glukosou v pufrovaném fyziologickém roztoku a 5M LiCl -barvení stříbrem</i>	<i>84</i>

<i>Obr. 31 Separace SDS-PAGE vzorků supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 z TYA s glukosou v pufrovaném fyz. roztoku a v kationaktivním detergentu – bavení Coomassie Brilliant Blue</i>	<i>85</i>
<i>Obr. 32 Elektroforetická separace vzorků supernatantů po suspendaci kultury FR8 narostené na TYA s 2 % glukosy a na kaseinovém agaru – barvení stříbrem</i>	<i>87</i>
<i>Obr. 33 Elektroforetická separace vzorků supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8, srovnání barvení stříbrem a Coomassie Brilliant Blue</i>	<i>88</i>
<i>Obr. 34 Separace SDS-PAGE vzorků supernatantů z biomasy kultury FR8 kultivované na TYA s glukosou a na kaseinovém agaru – barvení Coomassie Brilliant Blue</i>	<i>92</i>

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Složení fosfátových pufrů o různé pufrací kapacitě.....	29
Tab. 2 Složení modifikovaných TYM médií, na 1 000 ml média.....	32
Tab. 3 Složení TYM a VL média s přísady různých živin, na 1 000 ml média.....	32
Tab. 4 Hodnoty absorbance A_{562} pro kalibrační roztoky albuminu – metoda stanovení kyselinou bicinichoninovou – metoda v mikrotitr. destičkách.....	39
Tab. 5 Hodnoty absorbance A_{562} pro kalibrační roztoky albuminu	40
Tab. 6 Objemy pro přípravu roztoků kalibrační křivky pro stanovení sacharidů.....	41
Tab. 7 Hodnoty absorbance A_{490} pro kalibrační roztoky xanthanu	41
Tab. 8 Příprava kalibračních roztoků - stanovení koncentrace DNA.....	43
Tab. 9 Hodnoty luminiscence pro kalibrační roztoky DNA.....	43
Tab. 10 Doby působení vybarvovacích roztoků při barvení dusičnanem stříbrným.....	47
Tab. 11 Základní biochemické vlastnosti kultury PR	51
Tab. 12 Souhrnné výsledky kultury PR získané biochemickými mikrotesty.....	51
Tab. 13 Růst kultury PR na agarových půdách za různých teplot v aerobním prostředí (7. den kultivace)	52
Tab. 14 Růst kultury PR na agarových půdách v anaerobním a mikroaerobním prostředí (7. den kultivace)	53
Tab. 15 Růst kultury PR na VL agaru s různou koncentrací NaCl (aerobní, anaerobní a mikroaerobní kultivace).....	54
Tab. 16 Kultivace kultury PR na VL agaru při různých teplotách za aerobních podmínek....	55
Tab. 17 Srovnání utilizace sacharidů u kultury PR, s kulturami <i>L. garlicum</i> , GL09, GL67, GL86 a <i>L. lactis</i>	57
Tab. 18 Hodnoty viskozity médií TYM s obsahem sacharosu 2 %, 5 % a 10 % po 6 denní kultivaci kultury PR.....	58
Tab. 19 Viskozita TYM médií s běžným a dvojnásobným množstvím	59
Tab. 20 Viskozita tekutých TYM médií s 10 % sacharosu s různým objemem vzdušné fáze po 7denní kultivaci kultury PR.....	60
Tab. 21 Výťažnost ECP při kultivaci kultury PR v TYM s 10 % sacharosu	65
Tab. 22 Výťažnost exopolymeru z Trypton kvasničných médií obsahujících různé koncentrace tryptonu a kvasničného autolyzátu	68
Tab. 23 Výťažnosti ECP při použití třech různých srážedel ve dvou srážecích poměrech	71
Tab. 24 Ztráty při jednom přesrážení exopolymeru – série 1.....	72
Tab. 25 Základní charakteristiky jedenkrát přečištěných vzorků exopolymeru.....	73
Tab. 26 Ztráty při dvojnásobném přesrážení exopolymeru – série 2	73
Tab. 27 Základní charakteristiky dvakrát přečištěných vzorků exopolymeru	74
Tab. 28 Koncentrace bílkovin v supernatantech, po suspendaci kultury kultivované na TYA s 2 % glukosy a na kaseinovém agaru – metoda v mikrotitračních destičkách.....	89
Tab. 29 Koncentrace bílkovin v supernatantu po suspendaci kultury FR8 z TYA s 2 % glukosy ve fyziologickém roztoku s a bez obsahu ethanolu – zkumavková metoda	89
Tab. 30 Charakteristiky supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 kultivované na TYA s 2 % glukosy	90
Tab. 31 Charakteristiky supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 kultivované na kaseinovém agaru	91
Tab. 32 Množství celkové a extracelulární DNA v biomase kultury FR8	93

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

1B	Zásobní roztok barviva bisBenzimide H 33258
2B	Pracovní roztok barviva bisBenzimide H 33258
1xTNE	Roztok pufru
10xTNE	Zásobní roztok pufru
2xTYM	Trypton kvasničné médium s dvojnásobným množstvím živin
AK	Aktivovaný kal
BSK	Biologická spotřeba kyslíku
CIZ	směs chloroformu a izoamylalkoholu (24:1)
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromidu
ČOV	Čistírna odpadních vod
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECP	Extracelulární polymer
eDNA	Extracelulární deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Kyselina ethylendiaminotetraoctová
ε-PL	Poly-epsilon-lysin
FT-IR	Fourierova transformace infračervené spektroskopie
G+	Grampozitivní
G-	Gramnegativní
HePS	Heteropolysacharid(y)
HoPS	Homopolysacharid(y)
IC	Anorganický uhlík (Inorganic carbon)
KA	Kvasničný autolyzát
KA Himedia	Kvasničný autolyzát fy Himedia
KA Imuna	Kvasničný autolyzát fy Imuna
K extrakt	Kvasničný extrakt (fa Himedia)
KI	Kalový index
NDIR	Nondispersed infrared detector
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OD ₆₀₀	Optical density při 600 nm

OF médium	Oxidačně fermentační médium
OF test	Oxidačně fermentační test
PGA	Poly-gama-glutamová kyselina
PHB	Polyhydroxybutyrát
rDNA	Ribosomální deoxyribonukleová kyselina
RPM	Otáčky za minutu (round per minutes)
rRNA	Ribosomální ribonukleová kyselina
SAV	Slovenská Akademie věd
SDS	Sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza
T	Trypton
TEMED	N,N,N',N'-tetra-methylendiamin
TC	Celkový uhlík (Total carbon)
TRIS pufr	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TYA	Trypton kvasničný agar
TYM	Trypton kvasničné médium
TYM-Ch	Trypton kvasničné médium se sníženým obsahem tryptonu a kvasničného autolyzátu
TYM-K	Trypton kvasničné médium se zvýšeným obsahem kvasničného autolyzátu
TYM-T	Trypton kvasničné médium se zvýšeným obsahem tryptonu

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Aplikace přírodních polymerů (biopolymerů) začíná v posledních letech nabývat na intenzitě. Jejich původ a vhodné vlastnosti jim dávají možnost širokého uplatnění v mnoha oblastech, kde mohou hrát významnou a nezastupitelnou roli.

Za největší a nejznámější producenty biopolymerů jsou považovány rostliny, avšak významnou a intenzivně studovanou skupinou producentů jsou i mikroorganismy. Jelikož jde o zcela odlišnou a rozmanitou skupinu, poskytuje naprosto rozdílné polymery význačných vlastností skýtající velké množství různých aplikací. Našly uplatnění např. v potravinářství (zahušťovadla), kosmetice (základy krémů) či medicíně (nosiče léků, stimulanty imunitního systému) [1,2]. Některé bakteriální polymery (např. polyhydroxybutyrát (PHB), poly- γ -glutamát) mohou dokonce syntetické plasty částečně nahradit. Mají obdobné vlastnosti, ale navíc mají jednu nepřekonatelnou výhodu, jsou rozložitelné a nezatěžují tak životní prostředí.[3]

Další výrazné uplatnění lze najít také v některých technologiích. Jedno z největších je čistírenství, konkrétně biologické části čistíren odpadních vod, kde extracelulární polymery (ECP) významně napomáhají k vyvločkování biomasy a následné sedimentaci aktivovaného kalu. Nicméně tyto prospěšné ECP však někdy mohou mít i nežádoucí vliv na zmiňovanou sedimentaci. Za jistých podmínek může docházet k nadměrné produkci těchto mikrobiálních polymerů, což může vyvolat viskózní bytnění aktivovaného kalu. Výsledkem je částečné vzplývání a zahušťování kalu, způsobující technické obtíže i zhoršení kvality odtoku. Tento negativní jev však může mít i jisté pozitivum – takto zbytnělý biologický kal může být velmi dobrým zdrojem pro získání mikrobiálních kultur s bohatou produkcí zajímavých exopolymerů.

1.1 Mikrobiální polymery

Mikrobiální polymery představují širokou škálu sloučenin, které lze obecně rozdělit na dvě velké základní skupiny, na intracelulární a extracelulární polymery. První z nich se vyskytují uvnitř buněk (v jejich cytoplazmě), kde se účastní celé řady biologických procesů nebo slouží jako zásobní látky (uhlíku, energie, fosfátů) [4]. Druhé se nacházejí na povrchu buněk, kde fungují přednostně jako ochranné sloučeniny buněk před nepříznivými vnějšími vlivy (fagocytózou, toxickými kovy, antibiotiky, vyschnutím, viry) anebo napomáhají adhezi k podkladovému materiálu [5,6].

Vzhledem ke snadnějšímu získávání jsou extracelulární polymery více průmyslově využívány, proto další text bude věnován pouze těmto typům mikrobiálních polymerů.

1.2 Extracelulární polymery

Extracelulární polymery či exopolymery (ECP) jsou produkovány na povrch(u) buněk, v převážné většině bakteriemi, ale v menší míře i kvasinkami a houbami [6] či organismy ze skupiny *Archea* [7,8]. Jde o velmi širokou skupinu látek rozličného chemického zastoupení a podob. Jejich složení a typ je silně závislý na druhu produkujícího organismu a na prostředí, ve kterém se právě nachází.

Bakteriální exopolymery obklopují povrch buněk obvykle v podobě tenší či tlustší vrstvy. Ta může být značně hydratovaná [9,10,11,12] až gelovitá, neboť dokáže zachytit vodu z daného okolí, čímž následně zvyšuje viskozitu prostředí [13,14]. Buňky překryté vrstvou exopolymeru vykazují jisté odlišnosti ve svých vlastnostech, na rozdíl od buněk bez těchto vrstev. Exopolymery mění fyzikálně-chemické charakteristiky povrchu buněk. Bakteriální polymery totiž způsobují změnu povrchového náboje buněk a způsobují tak jejich hydrofobicitu.[9,15]

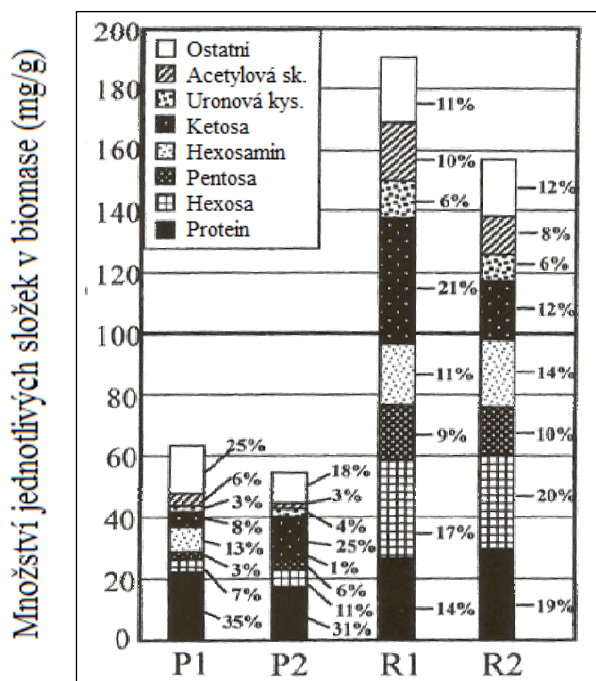
Jak již bylo zmíněno, ECP ponejvíce produkují bakterie. Z historického hlediska jsou nejdéle studované bakterie patogenní, jako např. streptokoky, klebsiely či druh *Pseudomonas aeruginosa* [16] u nichž tvorba ECP přispívá k virulenci opouzdřených kmenů. Nemalý význam z hlediska produkce ECP mají taktéž mléčné bakterie [17]. Pro technickou praxi jsou významné bakterie *Rhodococcus erythropolis* nebo rod *Zooglea*, vyskytující se ponejvíce v aktivovaném kalu, či rody *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. a plísně *Aspergillus* sp. nacházející se v půdním prostředí.[18]

1.2.1 Složení exopolymerů a vliv prostředí na jejich produkci

Extracelulární polymery mají rozmanité složení závislé na různých okolnostech. Produkce a struktura ECP záleží jak na druhu bakterií [18,19,20], tak i na dalších faktorech, jako jsou dostupnost (kvalita a kvantita) přítomného substrátu, poměr C/N, pH a teplota prostředí, přítomnost kyslíku [18,20,21] nebo také v případě kultivace ve fermentoru jeho operační nastavení [18,20].

Molekulová hmotnost exopolymerů se pohybuje od tisíců do několika milionů daltonů [9]. Řada autorů uvádí jako hlavní komponenty mikrobiálních exopolymerů polysacharidy a proteiny. Tyto látky jsou často doprovázeny minoritními složkami - (fosfo)lipidy, glykoproteiny, glykolipidy, DNA a huminovými látkami [10,11,22,23], jejichž výskyt je podmíněn většinou typem producenta. Konkrétní složení vyprodukovaného polymeru tedy nejvíce závisí na druhu organismu a následně na prostředí, ve kterém se nachází.

Podle výsledků získaných Tsunedou a kol. [9] je možné říci, že polysacharidy a proteiny většinou zaujímají 75 - 90 % obsahu ECP. Tento vědecký tým zkoumal složení bakteriálních exopolymerů izolovaných z 27 druhů heterotrofních bakterií získaných z laboratorního reaktoru čistící uměle vyrobenou městskou odpadní vodu. Získané bakterie byly rozděleny na dvě skupiny: bakterie s bohatou (R1, R2) a bakterie s nízkou (P1, P2) produkcí ECP, u jejichž exopolymerů bylo následně určováno chemické složení. Bakterie s bohatou produkcí ECP produkovaly jako hlavní složku polysacharidy (70 - 74 %) a ze 14 - 19 % proteiny. Druhá skupina, bakterie s nízkou produkcí ECP, obsahovala stejné pořadí těchto dvou sloučenin, jejich množství se ale změnilo a to na úkor snížení obsahu polysacharidů (40 - 50 %) a tedy zvýšení obsahu proteinů (31 - 35 %). Složení exopolymerů se u těchto dvou skupiny dále lišilo i v procentuálním zastoupení ostatních složek. Konkrétní data z tohoto výzkumu jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 1).



Obr. 1 Procentuální vyjádření složení ECP u bakterií s bohatou (R1, R2) a chudou (P1, P2) produkcí exopolymeru. Množství složek je vztaženo na 1g suché biomasy [9]

Vlivem okolního prostředí na následné složení ECP se zabývala Sponza [24], která zkoumala aktivované kaly ze 4 různých průmyslových čistíren odpadních vod (dřevozpracující, textilní, petrochemický, vinařský) a jedné městské čistírny, kde sledovala mimo jiné i závislost složení mikrobiálních ECP (proteiny, polysacharidy, DNA) na typu odpadní vody s různě rozmanitými bakteriálními společenstvy. Bylo zjištěno, že v přítomnosti snadno rozložitelných látek (vinařský průmysl, městské odpadní vody) převládá proteinové složení ECP (70 %), které je v menším množství doprovázeno polysacharidy (18 %) a DNA (7 %). V přítomnosti vysokomolekulárních těžce rozložitelných látek (dřevozpracující, textilní a petrochemický průmysl) jsou proteiny také hlavní komponentou, ale již v menším množství (40 %). Zbývající dvě skupiny - polysacharidy a DNA jsou zde výrazněji zastoupeny, v objemu ECP představují 20 % (polysacharidy) a 10 % (DNA) pro petrochemický průmysl, resp. 35 % a 17 % pro textilní a dřevozpracující průmysl.[24] V posledně zmíněných odpadních vodách byl navíc zjištěn vyšší výskyt grampozitivních bakterií jako např. *Micrococcus* sp., *Rhodococcus* sp. a *Bacillus* sp. [25], což naznačuje, že tyto typy bakterií produkují ECP s vyšším obsahem polysacharidů oproti gramnegativním bakteriím vyskytujícím se převážně v aktivovaných kalech zpracovávající odpadní vody městské či z vinařství. Zajímavým zjištěním byl i fakt, že v případě stresových podmínek (přítomnost nerozložitelných a toxických látek) bakterie produkují exopolymery složené převážně z polysacharidů.[24]

Obdobný pokus s aktivovanými kaly provedl Wilén a kol. [26]. Tento tým také zkoumal zastoupení složek v mikrobiálních ECP (proteiny, polysacharidy, huminové sloučeniny, DNA a uronové kyseliny) u 7 aktivovaných kalů z různých čistíren odpadních vod (5 městských čistíren, 2 průmyslové čistírny zpracovávající filtrát ze skládky odpadů a odpadní vodu z ropné rafinérie). Všechny zkoumané ECP produkované bakteriemi z městských čistíren odpadních vod měly téměř totožné obsahy složek – největší podíl zaujímaly proteiny 35 - 55 %, následně huminové sloučeniny 25 - 40 %, polysacharidy 7 - 10 %, DNA 3 - 13 % a nejméně bylo uronových kyselin 1 - 2 %. Pro vzorek ECP z kalu z odpadní vody z ropné rafinérie byly zjištěny totožné výsledky: proteiny (54 %), huminové sloučeniny (30 %), polysacharidy (10 %), DNA (5 %) a uronové kyseliny (1 %). Poslední vzorek ECP kalu z čistírny odpadních vod (ČOV) zpracovávající filtrát ze skládky opadů obsahoval nejvíce huminových sloučenin (38 %), poté následovaly polysacharidy s 29 %, proteiny s 21 %, DNA s 5,5 % a poslední uronové kyseliny s 2,5 %.[26]

Polysacharidy a proteiny nejsou ale vždy hlavními skupinami exopolymerů, tak jak bylo doposud povětšinou uváděno. Kromě zmíněných huminových sloučenin (vzorek z filtrátu ze skládky odpadů) se může ve větší míře v ECP vyskytovat i DNA. Tuto skutečnost potvrzují Steinberger a Holden [27], kteří studovali bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis* a *Variovorax paradoxus*, s domněnkou, že by tyto druhy bakterií mohly produkovat ve větším množství extracelulární DNA (eDNA). Provedené testy jejich předpoklady do jisté míry potvrdily. Obě pseudomonady produkovaly značné množství eDNA (*Pseudomonas putida* téměř ve dvojnásobném množství než *Pseudomonas aeruginosa*) ve srovnání se dvěma zbývajících bakteriemi (*R. erythropolis* a *V. paradoxus*). Tyto dvě posledně zmíněné bakterie produkovaly eDNA jen nepatrně. Množství jejich polymeru odpovídalo pouhé patnáctině množství eDNA vytvořené *Pseudomonas putida*.

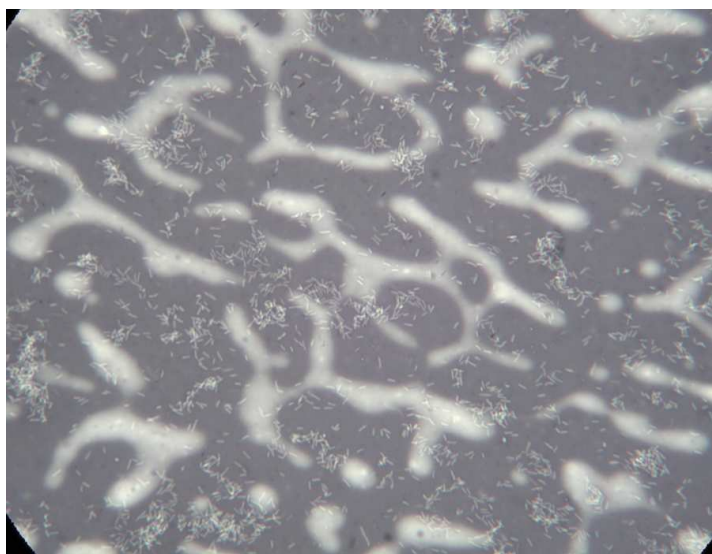
O vyšším výskytu eDNA se také ve svých studiích zmiňují Palmgren a Nielsen [28], ti však produkci exopolymeru s obsahem eDNA zjistili jak u bakterie *Pseudomonas putida*, tak navíc i u směsi mikroorganismů přítomných ve vločkách aktivovaného kalu.

1.2.2 Formy exopolymerů

Extracelulární polymery se mohou vyskytovat v různých formách, jež jsou závislé především na daném bakteriálním druhu. Pokud bakterie vlastní schopnost produkce těchto exopolymerů, vytváří hladké kolonie a jsou označovány jako S-forma (Smooth). Pokud však bakterie tuto vlastnost postrádají, jsou označovány jako R-forma (Rough), tj. tvoří kolonie drsné. [16,21,29]. Někdy je možné pozorovat přechod z S-formy na R-formu [16,21]

např. u bakterie *Gordonia polyisoprenivorans* [21] nebo *Comamonas testosteroni* [29]. Tato změna je způsobena mutací daného bakteriálního kmene a je doprovázena změnami některých jejich biologických vlastností [16,21].

Vyprodukované extracelulární polymery mohou být k buňkám vázány kovalentní vazbou ve formě pouzdra (kapsule), nebo mohou být vylučovány volně do prostředí jako sliz (Obr. 2) [6,16,17,21]. Sutherland [30] a Madigan a kol. [31] se ale ve svých člancích navíc zmiňují ještě o dalším třetím možném typu. Uvádějí, že výše zmíněný slizový ECP je s buňkou lehce spojen, kdežto třetí jimi uváděný typ není s buňkou spojen žádnou vazbou a je do prostředí produkován jako tzv. volný exopolymer.



Obr. 2 Tvorba slizu (bílé oblasti) kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 (negativní barvení Nigrosinem)

U bakterií mléčného kvašení byla dále popsána určitá forma kolonií s tzv. ropy charakterem. Jedná se o zvláštní úkaz jednoznačně rozpoznatelný užitím očkovací kličky či pipety, kdy při nabrání biomasy na kličku vytváří kultura dlouhá viskózní vlákna (Obr. 2). Opakem tohoto jevu je tzv. nonropy charakter kolonií, který výše popsané charakteristiky nevykazuje. Ropy charakter není striktně spojen s výskytem pouzdra, slizu či volného ECP. Některé kultury vytvářející velké množství polymeru (v jakékoliv podobě) se mohou na první pohled jevit jako ropy, ale ve skutečnosti s využitím výše popsaných laboratorních pomůcek se může projevit opak. Pouzderné ECP totiž mohou být nalezeny jak mezi ropy tak i mezi nonropy kulturami.[17]



Obr. 3 Tzv. ropy charakter kolonií vytvořený mléčnou bakterií [17]

Typ ropy je geneticky podmíněný a nestabilní. Při několikanásobném přeočkování dané kultury může dojít k vymizení tohoto rysu.[17] Macura a kol. [32], Garcia-Garibay a Marshall [33] a Toba a kol. [34] uvádějí, že tento ropy charakter je způsoben přítomností komplexu polysacharid–protein nebo výskytem dvou rozdílných exopolysacharidů, jak objevil Knoshaug a kolektiv [35] u bakterie *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

1.2.3 Biologická funkce exopolymerů u bakterií

Exopolymery jsou pro buňky multifunkční. ECP vrstva chrání buňky před fagocytózou, bakteriofágy, toxickými látkami (např. ionty kovů, SO₂), etanolem či antibiotiky [5,12,36], také před vyschnutím nebo před nepříznivým osmotickým tlakem [5,36]. Vrstva rovněž zlepšuje adhezi buněk k přítomnému povrchu. ECP mohou být také v některých případech využity k identifikaci bakterií [19,36].

Pyrog [5] ve své práci uvádí ECP obecně jako možný vhodný dostupný zdroj energie a uhlíku pro bakterie trpící substrátovou nedostatečností. Toto tvrzení doplňují další autoři [37,38]. Popisují bakterie žijící v mořských hlubinách [37] či přisedlé a planktonické [38], které v prostředích bohatých na živiny tvoří ECP jako zásoby a v dobách nouze tyto adsorbované zásobní látky buňky využívají. Madigan a kol. [31] se však domnívá, že tohoto kroku buňky hlavně mléčných bakterií nejsou schopné. Příčina rozporu je pravděpodobně dána rozdílností zkoumaných bakteriálních druhů. Je však potvrzeno, že pokud se buňky produkující ECP dostanou do situace, kdy mají jen málo dostupné energie, přestanou polymery vytvářet a zbytek energie přednostně využijí na růst vlastní biomasy [39].

1.3 Extracelulární polysacharidy

Z výše uvedených studií je zřejmé, že největší podíl v ECP zauímají exopolysacharidy a exoproteiny, proto jejich přesnějšímu popisu budou věnovány i následující kapitoly.

1.3.1 Struktura a dělení exopolysacharidů

Extracelulární bakteriální polysacharidy [mnoha gramnegativních a mléčných bakterií (rody *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus*)] mohou být rozděleny na dvě základní skupiny, na homopolysacharidy (HoPS), které ve svém řetězci obsahují monosacharidy pouze jednoho typu (nejčastěji D-glukosu) a na heteropolysacharidy (HePS), které jsou tvořeny z pravidelně se opakujících oligomerů sestavených z různých monosacharidů [1,6,17].

HoPS se dělí podle použitého monosacharidu na podskupiny: α -Glukany a β -Glukany (např. u *Pediococcus* sp. a *Streptococcus* sp.) s glukosovými monomerními jednotkami a vazbou v poloze α -1,6, resp. β -1,3 [6]. Mezi α -Glukany se řadí dextran (např. u *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* ssp. *dextranicum*), mutan (např. u *Streptococcus mutans* a *S. sobrinus*) [6] a alternan. Další podskupinu tvoří fruktany s monomerní jednotkou fruktosou a s vazbou β -2,6. Zde se řadí polysacharidy jako levan (např. u *Streptococcus salivarius*) [6] či inulin. Všechny uvedené HoPS obsahují v hlavním řetězci různé stupně větvení a různé velké boční řetězce, což je závislé hlavně na bakteriálním druhu, jež daný polymer produkuje.[6,17]

Opakující se jednotky u skupiny HePS produkované mléčnými bakteriemi mesofilními (např. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus casei*) a termofilními (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*) [6] obsahují nejčastěji kombinaci D-glukosy, D-galaktosy a L-ramnosy. V některých případech se zde nacházejí také N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin, fukosa, glukuronová kyselina a necukerné složky jako např. fosfát, acetyl či glyceryl.[40,41,42]

Cerning [43] uvádí pro mléčné bakterie molární hmotnost HePS pohybující se v rozmezí $4 \cdot 10^4 - 6 \cdot 10^6$ Da, HoPS mohou být i delší. Obvykle u této skupiny bakterií jsou HoPS produkovány ve větším množství než HePS [43,44]. Výtěžek a délka vyprodukovaného exopolysacharidu může být ovlivněna jak složením živného média, tak i fyziologickým stavem producentů [45].

Chemické složení, délka řetězce, větvení řetězce a výsledná molární hmotnost – to vše určuje výsledné fyzikální vlastnosti exopolysacharidů [46,47,48].

1.3.2 Mechanismus produkce exopolysacharidů bakteriemi

Produkce exopolysacharidů u bakterií mléčného kvašení může probíhat dvěma různými mechanismy v závislosti na výsledném složení polymeru.

První cesta biosyntézy je typická pro homopolysacharidy, konkrétně dextrany, levany, alternany a mutany. Celý proces probíhá extracelulárně vně buňky. Nutnou podmínkou pro průběh biosyntézy tímto mechanismem je přítomnost sacharosy jakožto specifického substrátu. Ten je v přítomnosti vysoce specifického enzymu glykosyl transferasy použit jak na tvorbu daného homopolysacharidu, tak i na pokrytí energetických potřeb tohoto procesu. Sacharosa je tedy v okolí buňky štěpena na monomery, z nichž jeden (fruktosa) je transportován do nitra buňky, kde slouží jako zdroj živin a energie a druhý (glukosa) je na povrchu buňky využit pro tvorbu exopolysacharidu.[6,36]

Druhý mechanismus probíhá uvnitř buněk a je charakteristický pro všechny heteropolysacharidy a pro homopolysacharidy, které nevznikají první cestou. V tomto případě se na biosyntéze podílí celá řada enzymů, které však nejsou vysoce specifické a unikátní pro vznik exopolysacharidů. Proces probíhá v cytoplasmě, kde dochází k polymeraci opakujících se jednotek mono či oligomerů. Výsledný polymer je poté transportován přes buněčné obaly ven z buňky, kde může být buď přikotven na povrch buněk, nebo vyloučen do prostoru mezi buňkami.[6,36]

1.3.3 Významné skupiny heteropolysacharidů

Skupina extracelulárních polysacharidů je velice obsáhlá. Níže jsou uvedeny jejich nejvýznamnější podskupiny.

Sukcinoglykany jsou složeny z D-glukosy, D-galaktosy, pyruvátu, sukcinátu a acetylu [1] v poměru 7:1:1:1:1 [49]. Jsou produkovány bakteriemi rodů *Agrobacterium*, *Pseudomonas* a *Rhizobium* [1,49] a díky jejich vhodným vlastnostem mají široké uplatnění a jsou tak průmyslově vyráběny [49].

Galaktoglukany mají obdobné složení jako předešlá skupina; jsou složeny z D-glukosy, D-galaktosy a pyruvátu v poměru 1:1:1. Tyto polysacharidy jsou mimo jiné produkovány bakteriemi rodů *Pseudomonas* a *Agrobacterium*. [49]

Algináty obsahují kyselinu mannuronovou a guluronovou jako základní jednotky [1,50,51,52]. Tyto polysacharidy jsou produkovány nejen bakteriemi (např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*), ale i hnědými mořskými řasami, ze kterých jsou průmyslově získávány [53].

Hyaluronany, resp. kyselina hyaluronová obsahuje jednotky kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu. Tento polysacharid je využíván v oblasti medicíny, neboť je nedílnou součástí živočišných těl. Dnes je jedním z nejvíce

průmyslově vyráběných exopolymerů. Získává se kultivací bakterií rodu *Streptococcus*. [53]

1.3.4 Využití exopolysacharidů

Jak již bylo zmíněno výše, extracelulární polysacharidy mají mnoho významných vlastností, které jsou dnes člověkem ve velké míře využívány. Exopolysacharidy našly uplatnění v medicíně (kyselina hyaluronová [53]), v kosmetice (kyselina hyaluronová [53], xanthan [1]), farmacii (gellan [54], dextran [55]), chemickém průmyslu (xanthan [1,6], gellan [1,54], dextran [56]) či potravinářském průmyslu (xanthan [1,6], dextran [55], curdlan [1], gellan [1,54]), kde je však užívání některých bakteriálních polymerů (např. curdlan) povoleno jen v určitých zemích, např. v Japonsku či Severní Americe [1]. V poslední době se také zkoumá průmyslové využití bakteriálních polysacharidů jako adsorbentů těžkých kovů [57].

1.4 Extracelulární proteiny

Skupina extracelulárních proteinů není tak rozsáhlá jako předešle popisované exopolysacharidy. Jde však o velmi nesourodou skupinu, která je tříděna spíše na základě prostorového uspořádání exoproteinů či jejich funkce, kterou zastupují, než na chemickém složení.

1.4.1 Typy exoproteinů

V okolí bakteriálních buněk se nachází velké množství proteinů označovaných jako extracelulární, jejich původ je však různorodý. Na povrchu bakteriálních buněk a v jejich blízkém okolí se vyskytují: bílkovinné S-vrstvy, adhesiny, lektiny, kapsulární proteiny, toxiny, extracelulární enzymy, intracelulární proteiny uvolněné do prostředí lyzí buněk a cizí proteiny přirozeně přítomné v okolním prostředí [20,58]. Většina uvedených exoproteinů (mimo S-vrstvy a kapsulárních proteinů) však netvoří souvislou vrstvu a plní tak jinou funkci než extracelulární polysacharidy. Nejčastěji se vyskytují u patogenních bakterií a jsou rozdělovány na tzv. fibrilární a nefibrilární [8,59].

Fibrilární proteiny jsou složeny z heteropolymerů s navázanými dalšími podjednotkami [8]. Podílejí se na stavbě povrchových struktur, jako jsou např.: pili (*Salmonella enterica* [8], *Corynebacterium diphtheriae* [60]), flagella (*Bacillus subtilis* [60],) curli (*Salmonella* sp., *Escherichia coli* [8]), lektiny (rostliny, mikroorganismy [58]). Všechny uvedené skupiny jsou označovány také jako tzv. přívěsky, neboť jsou jednou stranou zakotvené v buněčné stěně nebo v cytoplasmatické membráně, anebo v případě některých gramnegativních bakterií ve vnější membráně a druhá strana jim vyčnívá volně do prostoru [61].

Převážně se jedná o různě tenká vlákna různého složení. Podle Gerlacha a Hensela [8] jsou povrchové fibrilární proteiny gramnegativních bakterií složeny ze stovek až tisíců podjednotek.

Nefibrilární proteiny gramnegativních bakterií jsou složeny z mono- nebo oligomerních jednotek proteinů [8]. Mezi ně se řadí adhesiny (*Salmonella* [8]), toxiny (*Staphylococcus aureus* [62], *Streptococcus pyogenes* [63]) či enzymy (*Enterococcus faecalis* [64], *Haemophilus influenzae* [65]).

Fibrilární i nefibrilární exoproteiny napomáhající buňkám k lepší kolonizaci určitého prostředí, adhezi, pohybu [8,60], zvyšují patogenitu daného bakteriálního druhu [59,66,67]. V některých případech tvoří tzv. mosty mezi buňkou a další sloučeninou vyskytující se na povrchu buňky (lektiny) a dávají tak této struktuře větší stabilitu [58].

Kromě výše uvedených exoproteinů někteří autoři ještě uvádějí další proteinové sloučeniny: cellulosity (pouze čeledi *Lachnospiraceae* a *Clostridiaceae* [60]), receptory (*Azospirillum brasilense* [59]) a proteiny vnější membrány (poriny) (*Azospirillum brasilense* [68], *Pseudomonas fluorescens* [69]), které mohou za určitých okolností vytvářet adhesiny [68,69].

Poslední skupinou exoproteinů jsou kapsulární proteiny obklopující buňku dokola a mající síťovanou strukturu tvořenou velmi tenkými vlákny daného polymeru [70]. Tyto extracelulární proteiny plní funkci obdobnou jako exopolysacharidy. V odborné literatuře se informace o kapsulárních či pouzderných exoproteinech objevují jen sporadicky. Přesto je možné jisté práce nalézt, např. Ørskov a kol. [70] při zkoumání bakterie *Escherichia coli* A 108 serotypu O21:K4:H4 objevili tvorbu kapsulárního proteinu skládajícího se ze dvou typů adhesinů. Hlavní strukturní úlohu zde hrál protein označený jako Z1 doprovázen v již menším množství adhesinem Z2. Konkrétní složení tohoto směsného kapsulárního proteinu nebylo určeno, avšak elektronovou mikroskopií bylo rozluštěno alespoň jeho prostorové uspořádání. Skládal se z velmi jemných vláken (tloušťky 2 nm), která při bohatém výskytu vytvářela kapsuli. Také bylo zjištěno, že tento typ exoproteinu byl doprovázen i povrchovými sloučeninami typu exopolysacharidů [70,71]. Jejich přesnější funkci objevil vědecký tým Kröneckeho [71], který také studoval kapsulární sloučeniny na povrchu bakterie *Escherichia coli*, a který zjistil, že onen povrchový polysacharid je ve formě velmi tenké vrstvy umístěn mezi buňkou a proteinovou kapsulí a plní tak funkci jakéhosi pojítka.

O kapsulích s aminokyselinovým složením se zmiňují i další autoři - Ashiuchi a Mizino [3] a Shih kol. [72]. První zmínění [3] se zaměřili na zkoumání různých druhů bakterií rodu *Bacillus*, které jsou známými producenty exopolymeru kyseliny poly- γ -glutamové (PGA) jež je hlavní složkou kapsule vytvořené kolem buněk. Druzí [72] uvádějí poly- ϵ -lysin jako hlavní složku

kapsulárního polymeru produkovaného bakterií *Streptomyces albulus* ssp. *lysino polymerus* kmen 346.

1.4.2 Významné typy exoproteinů a jejich průmyslové využití

Mezi dva významné představitele extracelulárních bakteriálních polymerů patří již uvedená kyselina poly- γ -glutamová a poly- ϵ -lysin. Přestože tyto dva homopolymery jsou složeny z aminokyselinových jednotek, ve své podstatě se nejedná o proteiny. Svoji strukturou tomu neodpovídají [2,72], neboť jejich monomerní jednotky (D- a L- glutamová kyselina, resp. L-lysin) jsou spojeny γ -amidovou, resp. ϵ -amidovou vazbou a jedná se tak o homo-polyamidy.[2,72]

Kyselina poly- γ -glutamová (PGA) vzniká spojením jednotek D- nebo L- glutamové kyseliny amidovou vazbou mezi α -amino a γ -karboxylovou skupinou [2]. Je produkována celou řadou různých druhů bakterií rodu *Bacillus*, např. *B. subtilis*, *B. anthracis*, které tvoří polymer s charakteristickým zastoupením D- a L- monomerních jednotek [3,7]. PGA je netypický anionaktivní polyamid rozpustný ve vodě. Je biodegradabilní, není toxický a je jedlý. Samotný polymer a jeho sloučeniny našly velké uplatnění v mnoha průmyslových oblastech, např. v potravinářství (zahušťovadla), kosmetice (zvlhčovadla), medicíně (nosiče léků, kryoprotektivum) či čistírenství (bioflokulanty, adsorbenty těžkých kovů, při bioremediacích).[2,3] Díky jeho biorozložitelnosti a schopnosti značně vázat vodu se také začíná užívat jako náhrada za syntetické hydrogely a termoplasty vyráběné z ropy [3].

Poly- ϵ -lysin (ϵ -PL) byl objeven jako extracelulární produkt bakterie *Streptomyces albulus* ssp. *lysino polymerus* 346. Monomerní jednotky L-lysinu jsou spojovány amidovou vazbou mezi ϵ -amino a α -karboxylovou skupinou. [72] ϵ -PL je neobvyklý kationaktivní, přirozeně se vyskytující homopolyamid, který je rozpustný ve vodě, je biodegradabilní, není toxický a je také jedlý. Čistý ϵ -PL a jeho deriváty, stejně jako PGA, našly uplatnění v průmyslu; v potravinářství (konzervanty, emulgátory, doplňky stravy), medicíně (nosiče léků - náhrada za toxický poly- α -lysin, posilovače účinku protirakovinných látek), čistírenství (absorbent), zemědělství (hydrogely) nebo také v elektronice (biočipy).[72]

Tyto dva výše uvedené biopolymery jsou díky svým vhodným vlastnostem a nepřiliš velké náročnosti na produkci jedny z nejvíce využívaných exopolymerů.

1.5 Extracelulární DNA

Extracelulární polymery jsou rozmanitou skupinou různých sloučenin, jak je popsáno výše. Mimo polysacharidů a proteinů, jako nejzastoupenějších složek ECP, je také v některých vědeckých textech zmiňována extracelulární DNA (eDNA). Jelikož jde o sloučeninu typickou spíše pro intracelulární prostředí, je její výskyt v extracelulární biomase neobvyklý a proto jí bude věnována tato kapitola.

Přítomnost DNA v okolí buňky je nejčastěji vysvětlována jako důsledek lyze buněk, např. u bakterií *Acinetobacter calcoaceticus* [73], *Streptococcus pneumoniae* [74]. Je však již prokázáno, že existují i další dva způsoby, jak se tato látka dostává do vnějšího prostředí buněk. Jedním z nich je sekrece membránových váčků, obsahujících DNA, živými buňkami bez následku jejich lyze (např. u *Pseudomonas aeruginosa* [75], *Staphylococcus aureus* [76]). Tyto dvoumembránové měchýřky obsahují kromě DNA i další intracelulární sloučeniny, např. různé enzymy, toxiny a cytoplazmu [77]. U bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je navíc pravděpodobné, že DNA vstupuje do membránových tělísek jak před jejich odpoutáním od buňky, tak i po jejich uvolnění do prostředí [78]. Druhou cestou je aktivní sekrece DNA [79,80]. Tento proces je velmi složitý a náročný jak na energii, tak na specifické receptory. K aktivní sekreci dochází přes bílkovinné sloučeniny – poriny – např. u bakterie *Neisseria gonorrhoeae* [81]. I v tomto případě je zachována životaschopnost produkujících buněk.

Důvody exkluze tohoto genetického materiálu jsou značné. U mnohých bakterií, stejně jako u *Escherichia coli*, slouží eDNA při substrátové nedostatečnosti jako náhradní zdroj živin [82], některé organismy ji využívají jako strukturní materiál [83]. U fotosyntetických bakterií rodu *Rhodovulum* hraje významnou roli při adhesi buněk [84]. Bakterie *Bacillus cereus* si sekrecí DNA napomáhá k tvorbě a stabilizaci biofilmu, neboť tento produkovaný exopolymer tvoří konstrukci adhezní vrstvy [85].

1.6 Viskózní bytnění aktivovaného kalu

Bakterie produkující extracelulární polymery se ve velkém množství nacházejí v aktivovaných kalech v čistírnách odpadních vod. Přítomnost těchto mikroorganismů je velmi prospěšná a nutná pro správný chod biologické části čistíren. V některých případech, za jistých okolností, mohou tyto organismy, resp. jimi vyprodukované exopolymery, způsobovat nemalé problémy.

Jedním z nich je tzv. viskózní bytnění. Jde o velmi nepříjemný jev způsobovaný nadměrnou produkcí extracelulárních polymerů [86]. Aktivovaný

kal s nadměrným obsahem těchto exopolymerů vytváří velmi specifickou hutnou suspenzi schopnou vázat značné množství vody. Tím dochází ke vzniku gelovité, velmi viskózní, špatně usaditelné vrstvy, která způsobuje nemalé technické problémy, např. obalování měřících přístrojů a zhoršování sedimentace kalu. Příčiny vzniku tohoto jevu nejsou dosud jednoznačně popsány a názory na tuto problematiku se liší. Wanner a kol. [86] označují za možného viníka nedostatečné množství některých nutrientů v čištěné odpadní vodě, přítomnost některých toxických kovů, případně velký koncentrační gradient v aktivační nádrži, s čímž souvisí i nadměrný růst tzv. zoogleí. O posledně zmíněné příčině se ve své studii zmiňuje i Novák a kol. [87], kteří sledovali u syntetické odpadní vody vliv záměny původního substrátu (lecitinu) za nový (kyselinu olejovou) na výskyt zoogleí a s tím spojený vznik viskózního bytnění kalu. Na počátku jejich pokusu byl aktivovaný kal vykazující dobré sedimentační vlastnosti (kalový index – KI 70 ml/g) a obsahující kompaktní dobře sedimentující vločky. Po provedení záměny původního substrátu za kyselinu olejovou byla 61. den kultivace a během následujících 4 dní pozorována změna, jak ve složení kalu, tak i v hodnotě kalového indexu. Nový kal obsahoval zoogleární mikroorganismy produkující velké množství exopolymerů vytvářející viskózní obtížně usaditelnou suspenzi s KI 300 ml/g. Po vyčerpání dodaného substrátu (81.den) začalo pozvolné obnovení původního vzhledu, složení a vlastností aktivovaného kalu. Vločky kalu se měnily na obvyklé kompaktní, dobře sedimentující, a během 3 týdnů došlo k úpravě KI na hodnotu 100 ml/g.

Další možnou příčinou viskózního bytnění může být, jak již bylo zmíněno výše, nedostatek některých nutrientů [86], např. dusíku či fosforu [88]. Tyto hypotézy byly potvrzeny studií Penga a kol. [89]. Ti studovali v průmyslové odpadní vodě vliv poměru BSK/N na vznik viskózního bytnění. Při poměru BSK/N = 100/4 docházelo k dokonalému usazení aktivovaného kalu. Jakmile byl poměr 100/3, začal se objevovat nadměrný výskyt vláknitých bakterií, jejichž počet se časem redukoval a nahrazovaly je viskózní zooglee. Při dalším snížení množství dusíku (BSK/N = 100/2) již přechodová fáze s výskytem vláknitých bakterií nevznikla, a došlo přímo k tvorbě mikroflóry způsobující zvýšenou viskozitu média. Se stále se snižující koncentrací dusíku v odpadní vodě se objevovalo stále výraznější viskózní bytnění kalu. Nejvýraznější výskyt viskózního bytnění byl pozorován při hodnotách 100/0,94. Je tedy patrné, že nedostatek dusíku v přitékající odpadní vodě podněcuje vznik viskózního bytnění aktivovaného kalu, jež tuto vodu zpracovává.

I přes provedené studie je viskózní bytnění kalu stále nedokonale prozkoumanou oblastí. Zmínky o tomto jevu se objevují jen zřídka a ve většině případů jde o studie prováděné se syntetickými odpadními vodami, nikoliv s reálnými vzorky v reálných podmínkách.

2 CÍL PRÁCE

Extracelulární bakteriální polymery jsou nejen v posledních letech významnými a hojně využívanými sloučeninami. Studiu těchto látek je věnována nemalá pozornost, o čemž svědčí i bohatost prací publikovaných v odborných vědeckých časopisech. Hledání dalších nových typů biopolymerů a zkoumání jejich vlastností je velmi častým tématem výzkumných činností, a to jak pro získávání nových poznatků, tak pro jejich pozdější průmyslové využití.

Významným zdrojem mikroorganismů produkujících tyto látky jsou mimo jiné aktivované kaly se znaky viskózního bytnění. Na izolaci nových bakteriálních producentů exopolymerů z takových typů kalů byla zaměřena tato práce. Na počátku zkoumání bylo zpracováno několik vzorků aktivovaných kalů se znaky viskózního bytnění. Z nich bylo získáno několik bakteriálních kultur, z nichž se dvě svým odlišným vzhledem na pevných půdách a některými vlastnostmi jevíly jako vhodné vzorky pro další zkoumání. Jeden z izolátů, kultura označená PR, při růstu na určitých agarových půdách vytvářel velké kolonie s významným množstvím polymeru. Druhý, kultura označená FR8, při růstu na agarových půdách s obsahem tryptonu a kvasničného autolyzátu vytvářel kolonie neobvyklého charakteru. Studium těchto dvou izolovaných bakteriálních kultur se stalo náplní disertační práce.

Cílem bylo tyto dvě kultury popsat, prostudovat jejich základní morfologické, růstové a biochemické vlastnosti a více charakterizovat jejich vlastnost produkce exopolymerního materiálu a případně i samotný exopolymer.

3 ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

3.1 Použité chemikálie

V průběhu práce byly používány běžné laboratorní chemikálie čistoty p.a. od firem Lachema (ČR) a Penta (ČR) .

Všechny chemikálie pro molekulární biologii (v čistotě p.a. nebo čistotě pro molekulární biologii) byly dodány firmou Sigma-Aldrich (USA), popř. Serva (Německo). Veškeré agarové půdy či jejich doplňky pro bakteriologii byly dodány firmou Himedia (Indie) a Imuna (Slovensko).

3.2 Použitá zařízení a pomůcky

Anaerostat 2,5 l objem (Merck, Německo), analytické váhy KERN 770 (Německo), analyzátor uhlíku 5000A (Shimadzu, Japonsko), aseptický laminární box Bio-II-A (Telstar, Španělsko), automatické pipety Transferpette (Brand, Německo), automatické pipety Discovery (PZ HTL, Polsko), běžné laboratorní vybavení (ČR), centrifuga Rotanta 460 R (Hettich Centrifugen, Německo), elektromagnetická míchačka MM2A (ČR), fotoaparát Olympus Camedia C-3040ZOOM, hlubokomrazicí box Chest Freezer (BioTech, Dánsko), chlazená centrifuga MR 23i (JOUAN, Francie), luminometr (Turner BioSystems, USA), mikroskop Olympus CX 41 (Filipíny), minitřepačka MS1 (Brazílie), minicentrifuga Z 100-M (HERMLE, Korea), pH elektroda SenTix 41 (Inolab, Německo), pH metr 730set (Inolab, Německo), programovatelný zdroj k elektroforéze MP-500P (Taiwan), předvážky KERN (Německo), spektrofotometr TECAN pro mikrotitrační destičky (Sunrise, USA), spektrofotometr UV 540 (Unicam, Anglie), stříkačkové filtry Millipore MCE (Milex GS, Irsko), termobox (Mettler, Germany), třepačka Heidolph Promax 1020 (Německo), ultratermostat mLw U2C (Německo), vakuová pumpa KNF typ N86KT (Německo), vertikální elektroforetická aparatura OWL (OWL, USA), vibrační viskozimetr SV-10, (AND Company, Japonsko), vodní lázeň ED 13 JULABO (BioTech, Dánsko), vyhřívaný blok pro biochemii Bio TDB-100 (BioSan, Litva).

3.3 Roztoky a živná média

Bylo-li potřeba, byly roztoky a tekutá a agarová živná média sterilizovány při 125 °C po dobu 25 min., s obsahem glukosy při 115 °C 20 min.

3.3.1 Roztoky

Fyziologický roztok

NaCl v množství 8,5 g byl rozpuštěn v 1 000 ml destilované vody.

Fyziologický roztok s 1 % a s 5 % ethanolu

K 9,9, resp. 9,5 ml fyziologického roztoku bylo přidáno 0,1 resp. 0,5 ml ethanolu.

Destilovaná voda s 1 % ethanolu

K 9,9 ml destilované vody bylo přidáno 0,1 ml ethanolu..

Pufrovaný fyziologický roztok

Navážka 8,5 g NaCl byla rozpuštěna v 800 ml destilované vody, 40 ml roztoku A a 160 ml roztoku B.

Roztok A pro přípravu fosfátového pufru

KH_2PO_4 v množství 9,07 g byl rozpuštěn v 1 000 ml destilované vody.

Roztok B pro přípravu fosfátového pufru

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v množství 23,09 g byl rozpuštěn v 1 000 ml destilované vody.

Fosfátové pufrы o různé molaritě

Pufrы byly připraveny smícháním určitých objemů roztoků A a B a destilované vody (viz. Tab. 1). Takto vykazovaly pH 7,5.

Tab. 1 Složení fosfátových pufrů o různé pufrací kapacitě

Molarita pufru	Objem roztoku A [ml]	Objem roztoku B [ml]	Objem vody [ml]
67,7 mmol/l	200	800	0
26,7 mmol/l	80	320	600
13,3 mmol/l	40	160	800
8,3 mmol/l	25	100	875
6,7 mmol/l	20	80	900

Roztok stopových prvků

Navážky 0,043 g $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,04 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,057 g H_3BO_3 , 0,043 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,037 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 0,025 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ byly postupně rozpuštěny v 1 000 ml destilované vody.

TRIS-HCl pufr o pH=8

K 0,6057 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu bylo přidáno 50 ml destilované vody a po rozpuštění 29,2 ml 0,1M HCl. Poté bylo doplněno na 100 ml destilovanou vodou.

0,5 M, 1M, 3M a 8M roztok močoviny v TRIS-HCl pufru

Navážka 1,502, resp. 3,003, 9,009 a 24,024 g močoviny byla rozpuštěna v TRIS-HCl pufru a doplněna na 50 ml.

1M roztok močoviny v pufrovaném fyziologickém roztoku

3,003 g močoviny bylo rozpuštěno v pufrovaném fyziologickém roztoku a doplněno na 50 ml.

0,2% a 2% roztok Tweenu 80 v TRIS-HCl pufru

0,1, resp. 1 g Tweenu 80 byl rozpuštěn v TRIS-HCl pufru a doplněn na objem 50 ml.

0,2% roztok Tweenu 80 v pufovaném fyziologickém roztoku

0,1 g Tweenu 80 byl rozpuštěn a poté doplněn na objem 50 ml pufovaným fyziologickým roztokem.

Roztok 8M močoviny a 2% Tweenu 80 v TRIS-HCl pufru

Bylo rozpuštěno 24,024 g močoviny a 1 g Tweenu 80 v TRIS-HCl pufru a doplněno na 50 ml.

5M roztok LiCl.H₂O v pufovaném fyziologickém roztoku

15,102 g LiCl.H₂O bylo rozpuštěno v pufovaném fyziologickém roztoku a doplněno na objem 50 ml.

600μM a 10 mM roztok cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB)

2,18, resp. 36,446 mg CTAB bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody.

3.3.2 Agarová média

Všechna agarová média byla připravena navážením příslušných složek, jejich suspendováním v destilované vodě a vysterilizováním po dobu 25 min. při 125 °C, resp. 115 °C (s obsahem glukosy). Po samovolném ochlazení médií na cca 45 °C byla tato asepticky v laminárním boxu rozlita do sterilních Petriho misek a ponechána ztuhnout.

Trypton kvasničný agar (TYA)

Navážka 2,1 g Trypton kvasničného agaru (Himedia, Indie) byla suspendována ve 100 ml destilované vody.

Modifikovaná agarová média TYA s různými přísadkami živin

TYA s 2 % glukosy byl připraven suspendováním 2,1 g TYA agaru a 2 g glukosy ve 100 ml destilované vody.

Analogicky byla připravena média s 2 % sacharosy, maltosy, galaktosy, fruktosy, manitolu, glycerolu, škrobu a mléčnanu a pyrohroznanu.

Základ pro krevní agar

Navážka 4,3 g Základu pro krevní agar (Himedia, Indie) byla smíchána se 100 ml destilované vody.

Minerální agar s 2 % glukosy

Bylo smícháno 0,10 g K_2HPO_4 , 0,11 g NH_4Cl , 0,02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 g $CaCl_2$, 0,1 ml roztoku stopových prvků, 2 g agaru a 100 ml destilované vody.

VL agar

VL agar (Imuna, Slovensko) 4,2 g byl smíchán se 100 ml destilované vody.

VL agar s 4 %, 6,5 %, 10 % a 15 % NaCl

Ke 100 ml VL agaru bylo přidáno 3,5, resp. 6; 9,5 a 14,5 g NaCl.

Kaseinový agar

Bylo smícháno 2,5 g sušeného mléka, 0,1 g NaCl, 0,1 g peptonu, 0,02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g agaru se 100 ml destilované vody a směs byla sterilizována frakcionovaně, tzn. na vodní lázni 20 minut denně po dobu 3 dnů.

3.3.3 Tekutá média

Pufrované minerální médium s 10 % sacharosy

Bylo smícháno 0,2 g K_2HPO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g $CaSO_4$, 0,2 g NaCl, 0,3 g NH_4Cl , 100 g sacharosy, 2 ml roztoku stopových prvků, 40 ml roztoku A, 160 ml roztoku B a 800 ml destilované vody.

Médium pro oxidačně-fermentační test (OF-medium)

Navážky 0,2 g peptonu, 0,5 g NaCl, 0,003 g K_2HPO_4 , 1 g glukosy, 0,006 g bromthymolové modři, 0,3 g agaru byly na vodní lázni rozpuštěny v 100 ml destilované vody. Po upravení pH na 7,2 - 7,4 (barva média tmavě zelená) bylo médium rozplněno po 7 ml do zkumavek, polovina byla překryta 1 cm vrstvou parafinového oleje a všechny zkumavky byly vysterilizovány.

OF-médium s maltosou

Složení média bylo stejné jako u OF-média, zde místo 1 g glukosy však bylo použito 1 g maltosy.

Trypton kvasničné médium (TYM) a jeho modifikace

Tab. 2 Složení modifikovaných TYM médií, na 1 000 ml média

Název média	Trypton	Kvas. autolyzát	Sacharosa	Glukosa	Rozpoušť.
Trypton kvasničné médium (TYM)	6 g	3 g	-	-	Destilov. voda
TYM s 2 % sacharosy	6 g	3 g	20 g	-	
TYM s 5 % sacharosy	6 g	3 g	50 g	-	
TYM s 10 % sacharosy	6 g	3 g	100 g	-	
TYM s dvojnásobným obsahem živin	12 g	6 g	100 g	-	
TYM s 10 % glukosy	6 g	3 g	-	100 g	roztok A 40 ml roztok B 160 ml dest. voda 800 ml
TYM se zvýšeným obsahem tryptonu	9g	3 g	100 g	-	
TYM se zvýšeným obsahem kvas. autolyz.	6 g	6 g	100 g	-	
TYM se sníženým obsahem tryptonu a kvas. autolyz.	3 g	1,5 g	100 g	-	
Různě pufrované TYM s 10 % sacharosy	6 g	3 g	100 g	-	

Tab. 3 Složení TYM a VL média s přidavky různých živin, na 1 000 ml média

Název média	Příslušná složka		Sacharosa	Trypton	Roztok A	Roztok B	Dest. voda
KA Imuna	Kvasničný autolyzát (Imuna)	3 g	100 g	6 g	40 ml	160 ml	800 ml
KA Himedia	Kvasničný autolyzát (Himedia)	3 g	100 g	6 g			
K extrakt	Kvasničný extrakt (Himedia)	3 g	100 g	6 g			
VL Médium*	VL agar (Imuna)	11,5 g	100 g	-			

Pozn. * Médium vytvořeno přefiltrováním (filtr s červenou páskou) roztoku VL agarů rozpuštěného v destilované vodě.

3.4 Použité bakteriální kultury

V této práci byly použity dvě bakteriální kultury – kultura PR a kultura FR8.

3.4.1 Kultura PR

Kultura PR byla izolována v rámci této disertační práce, z aktivovaného kalu z ČOV Babice.

3.4.2 Kultura FR8

Kultura FR8 byla izolována v roce 2003 z aktivovaného kalu se znaky viskózního bytnění z ČOV Fryšták v rámci studentské vědecké práce [90].

Je to gramnegativní drobná aerobní tyčinkovitá bakterie. Na externím pracovišti byla identifikována metodou sekvenace 16S rDNA.

3.4.3 Příprava inokul bakteriálních kultur

Očkovací suspenze jednotlivých bakteriálních kultur byla vždy připravována rozmícháním kultury ve sterilní zkumavce, v cca 1 ml sterilního fyziologického roztoku. Hustota suspenze byla nastavována na 2. stupeň McFarlandovy zákalové stupnice, vytvořený smícháním 200 μ l 1% BaCl₂ a 9,8 ml 1% H₂SO₄.

3.5 Kultivační testy prováděné s kulturou PR

3.5.1 Izolace z aktivovaného kalu

Jedna plná očkovací klička se vzorkem kalu byla přenesena do 5 ml sterilního fyziologického roztoku a třepáním na Vortexu byla vytvořena homogenní suspenze. Takto zředěný vzorek byl vyočkován v objemu 50 μ l na tři typy agarových pěst (TYA agar, TYA s 2 % sacharosy, resp. glukosy) a misky byly inkubovány ve tmě při 25 °C. Mukózní kolonie byly v průběhu kultivace přeočkovávány na čerstvá média a postupně čištěny.

3.5.2 Kultivace na pevných agarových půdách

Kultura PR byla kultivována ve tmě ve sterilních Petriho miskách, na řadě pevných živných pěst (TYA, TYA s 2 % glukosy, resp. sacharosy, maltosy, galaktosy, fruktosy, TYA s 2 % škrobu, resp. glycerolu, pyrohroznanu a mléčnanu, minerální agar s 2 % glukosy, základ pro krevní agar, VL agar), za různých teplot (5, 25, 30, 35, 37, 41 a 58 °C), na půdách s různým obsahem soli (0,5; 4; 6,5; 10 a 15 %) a za aerobních, mikroaerobních a anaerobních podmínek, obvykle po dobu 4 dnů.

Mikroaerobní kultivace

Kultivace byla prováděna v exsikátoru, ze kterého byla většina přítomného kyslíku odstraněna hořením svíčky. Vzdušnou vlhkost zajišťovala kádinka s vodou.

Anaerobní kultivace

Kultivace byla prováděna v Anaerostatu (Merck), kde bylo anaerobní prostředí vytvořeno pomocí setu Anaerocult A (Merck), připraveného dle návodu výrobce.

3.5.3 Gramovo barvení

Barvení bylo prováděno dle Huckerovy modifikace Gramova barvení [91].

3.5.4 Stanovení biochemických vlastností

Oxidačně fermentační test (OF test)

Kultura byla vpichem očkovací kličky naočkována do zkumavek s OF médiem a kultivována při 25 °C po dobu 7 dní. Test je pozitivní (využití glukosy či maltosy přítomných v médiu) v případě změny barvy média ze zelené na žlutou.

Test na přítomnost katalasy

Na podložní mikroskopické sklíčko byla dána kapka 3% peroxidu vodíku, v níž byla kličkou rozmíchána biomasa kultury. Pozitivní test na katalasu je indikován produkcí bublinek vznikajícího kyslíku.

Test na přítomnost oxidasy

Na komerčně vyráběný proužek papírku napuštěný N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminem a α -naftolem (OXItest, Pliva-Lachema), byla nanesena biomasa kultury. V případě pozitivní reakce dochází během jedné minuty ke zmodrání proužku papírku.

Sporulační test

Kultura byla rozmíchána ve sterilním fosfátovém pufru 6,7 mmol/l do vytvoření zákalu odpovídajícímu 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Vytvořená suspenze byla zahřívána při 80 °C po dobu 10 min. Poté byla vyočkována na VL agar a kultivována ve tmě při 25 °C.

VP test

K bakteriální suspenzi ve zkumavce byl na 4 hod. ponořen komerčně vyráběný proužek (Pliva-Lachema, ČR) se 2 testovacími čtverečky obsahujícími pyruvát sodný. Po uplynutí doby byl proužek vytažen a do suspenze byly přidány po třech kapkách činidla VPT I a VPT II a směs byla inkubována

30 min. při 35 °C. Pozitivní reakce, značící přítomnost vyprodukovaného acetoinu, je dána červeným, příp. růžovým zabarvením suspenze.

Destičkové mikrotesty

Byly použity komerčně vyráběné mikrotesty STREPTOtest 16, STAPHYtest 16 a ENTEROtest 24 (Pliva-Lachema, ČR) a bylo postupováno dle instrukcí výrobce.

3.5.5 Testy v tekutých médiích

Kultura PR byla kultivována v médiích různého složení (viz Tab. 2 a 3). Většina testů byla prováděna v uzavřených kultivačních lahvích o objemu 250 ml s objemem živného média 25 ml, obvykle zaočkovaným 25 µl bakteriální suspenze. Kultivace probíhala ve tmě, při teplotě 25 °C, na kruhových, případně vratných třepačkách při 100 rpm v režimu 15/15 (15 min. stání, 15 min. pohyb).

U některých testů došlo k určitým kultivačním modifikacím, které jsou uvedeny níže.

Kultivace v tekutých médiích s různým objemem kyslíkaté fáze

Kultivace probíhala v uzavřených lahvích o objemu 100 ml. Byly použity poměry (objem média:objemu vzdušné fáze) 1:4, 1:1 a 1:0, objem média byl tedy pro jednotlivé poměry 20 ml, 50 ml a 100 ml.

3.5.6 Stanovení prováděná při kultivaci v tekutých médiích

Viskozita živného média

Viskozita tekutého média byla měřena na vibračním viskozimetru (VibroViskometr SV 10, Japan) při temperované teplotě $25 \pm 0,2$ °C. Každý vzorek byl měřen 3x vedle sebe. Na počátku každé série měření byla provedena dvoubodová kalibrace přístroje na standardní roztok sacharosy 65 % a na destilovanou vodu.

Zákal živného média

Zákal živného média byl stanovován turbidimetrickým měřením (Spektrofotometr UV 540, Unicam, Anglie) při vlnové délce 600 nm.

3.6 Kultivační testy prováděné s kulturou FR8

3.6.1 Kultivace na pevných agarových půdách

Kultura FR8 byla pěstována na různých agarových živných médiích (TYA s 2 % glukosy, resp. sacharosy, glycerolu, pyrohroznanu a mléčnanu, kaseinový agar) ve tmě, při 25, 37 nebo 45 °C, nejčastěji po dobu 4 dnů.

3.6.2 Zkoušky ztekucení suspendované biomasy trypsinem

Biomasa kultury FR8 byla po kultivaci na Trypton kvasničném agaru s 2 % glukosy sterilně odebrána a v poměru 1:3 (biomasa:tekutina) rozmíchána ve dvou suspenzačních roztocích (fosfátový pufr 6,7 mmol/l a fyziologický roztok). Po jednom vzorku od každého roztoku byl přidán trypsin (50 mg/l). Zbylé druhé vzorky byly ponechány bez přídavku enzymu (kontrola). Dokonale promíchané suspenze byly inkubovány při 37 °C 2 dny.

3.6.3 Zkoušky ztekucení suspendované biomasy DNA-asou

Biomasa kultury FR8 byla po kultivaci na TYA s 2 % glukosy sterilně odebrána a v poměru 1:3 (biomasa:tekutina) rozmíchána v suspenzačním roztoku (ředěný fosfátový pufr 6,7 mmol/l). K jednomu vzorku byly přidány MgCl₂ (výsledná koncentrace 2,5 mM), CaCl₂ (výsledná koncentrace 0,1 mM) a 10 µl roztoku DNA-asy (DNA-ase, Sigma). Druhý vzorek byl jako kontrolní vzorek ponechán bez přídavku enzymu. Směsi byly důkladně promíchané a inkubovány 1 hod. při 30 °C.

3.7 Stanovení charakteristik exopolymerů produkovaných kulturami PR a FR8

Po kultivaci jednotlivých kultur byly získány vyprodukované exopolymery, u kterých bylo provedeno stanovení sušiny příp. popela, obsahu organického uhlíku, celkových sacharidů a bílkovin.

3.7.1 Postup získání a přečištění exopolymeru kultury PR

Supernatant tekutého média s obsahem exopolymeru byl po odstranění buněk centrifugací (20 000 g, 10 °C, 30 min.) slit a v 3násobném (později 5násobném) množství bylo přidáno ledově vychlazené srážedlo (ethanol, aceton, isopropanol). Směs byla promíchaná, překryta 3vrstvou PE folií a umístěna přes noc do 5 °C. Následující den byl vysrážený exopolymer oddělen centrifugací (4 600 g, 5 °C, 10 min.) a umístěn přes noc do digestoře pro odstranění přebytečného srážedla a vody. Po izolaci byl získaný polymer přečištěn jeho opětovným rozpuštěním v 50 ml destilované vody při 45 °C, vysrážením

v 3násobném množství (tj. 150 ml) vychlazeného srážedla a po promíchání a opětovném překrytí 3vrstvou PE folií byl umístěn přes noc do 5 °C. Druhý den byla suspenze centrifugována (4 600 g, 5 °C, 10 min.) a získaný ECP byl opět umístěn přes noc do digestoře. Úplné dosušení polymeru probíhalo v exsikátoru nad P₂O₅. Takto získaný exopolymer byl druhý den použit na stanovení nebo byl uložen při 5 °C.

3.7.2 Postup suspendace biomasy kultury FR8

Exocelulární materiál kultury FR8 byl získáván po její 4denní kultivaci na TYA agaru s 2 % glukosy. Biomasa byla odebrána a v poměru 1:3 (biomasa:tekutina) smíchána se suspendačním roztokem. Různými postupy třepání (*a*) Vortex 5 min. při 1 400 rpm a poté třepačka 3 hod. při 150 rpm, resp. 300 rpm (GFL 3018), *b*) Vortex 20 min. při 1 400 rpm, *c*) Vortex 5 min. při 1 400 rpm a poté 30 min. stání při 4 °C, *d*) Vortex 5 min. při 1 400 rpm a 30 min. stání při 25 °C – opakováno 4x, *e*) 20 min. temperace při 50 °C a poté Vortex při 1 400 rpm, *f*) Třepačka (Heidolph Promax 1020) při 150 rpm, *g*) Třepačka (GFL 3018) při 300 rpm, *h*) třepání v ruce) byla vytvořena suspenze a buňky byly odstraněny centrifugací (5 000 g, 4 °C, 15 min.).

3.7.3 Stanovení sušiny a popela

Sušina

Suspenze o objemu 2 ml byla v předem vysušených a zvážených žíhacích kelímcích umístěna do sušárny se 70 °C na předsušení, poté byla teplota zvýšena na 105 °C. Sušení probíhalo do konstantní hmotnosti vzorků (cca 3 hod.).

Popel

Suspenze v objemu 2 ml byla sušena dle postupu na sušinu a po cca 3 hod. byla žíhána v peci při 550 °C do získání konstantní hmotnosti (cca 2 hod.).

3.7.4 Stanovení rozpuštěného organického uhlíku

Stanovení probíhalo na analyzátoru uhlíku TOC – 5000S (Shimadzu, Japonsko), kde se celkový uhlík (TC) oxiduje při 680 °C ve spalovací trubici v proudu kyslíku v přítomnosti platinového katalyzátoru. Vzniklý CO₂ je veden do NDIR detektoru (Non-Disperse Infrared Detector), kde se zaznamenává signál ve formě píku, jehož plocha je přímo úměrná koncentraci TC. Anorganický uhlík (IC) je oxidován v proudu kyslíku na inertním nosiči obsahujícím kyselinu fosforečnou. Koncentrace IC je vyhodnocena ve formě píku stejným způsobem jako v případě TC. Rozpuštěný organický uhlík je dán rozdílem TC a IC. Kalibrace přístroje byla provedena na koncentrační rozmezí 20 – 100 mg/l.

3.7.5 Stanovení bílkovin

Stanovení bílkovin dle Bradfordové

Pracovní činidla a standard:

Pracovní činidlo: Navážka 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 byla rozpuštěna v 50 ml ethanolu, v cca 700 ml destilované vody, 100 ml 85% H_3PO_4 a poté doplněn destilovanou vodou na 1000 ml.

Standard bílkoviny: 1,02 mg lyofilyzovaného albuminu (98%) bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody.

Postup stanovení kalibrační křivky:

Kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 0 - 150 mg/l.

Do uzavíratelných zkumavek bylo k 0,5 ml kalibračního roztoku (vzorku) přidáno 0,5 ml TRIS-HCl pufru a ty byly 10 min. temperovány na teplotu 37 °C. Poté bylo přidáno 5 ml pracovního činidla, obsah byl důkladně promíchán a ponechán temperovat dalších 5 min. Následně byly zkumavky 10 min. chlazeny na teplotu 21 °C ve vodní lázni. Poté byly mírně promíchány a proměřeny na spektrofotometru Unicam UV 500 proti destilované vodě při vlnové délce 578 nm.[92] Pro každý vzorek byla použita nová polystyrenová kyveta, neboť docházelo k absorpci barviva na stěny kyvet.

Stanovení bílkoviny kyselinou bicinchoninovou

Pracovní činidla a standard:

Roztok A: 8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,6 g vinanu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. pH bylo upraveno na hodnotu 11,25 (10M NaOH).

Roztok B: 0,4 g bicinchoninové kyseliny bylo rozpuštěno v 10 ml destil. vody.

Roztok C: 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody.

Pracovní činidlo: Směs 1 dílu roztoku C, 25 dílů roztoku B a 26 dílů roztoku A. Činidlo bylo připraveno vždy čerstvé.

Standard bílkoviny: 1,02 mg lyofilyzovaného albuminu (98%) bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody.

a) Metoda v mikrotitračních destičkách:

Postup stanovení kalibrační křivky:

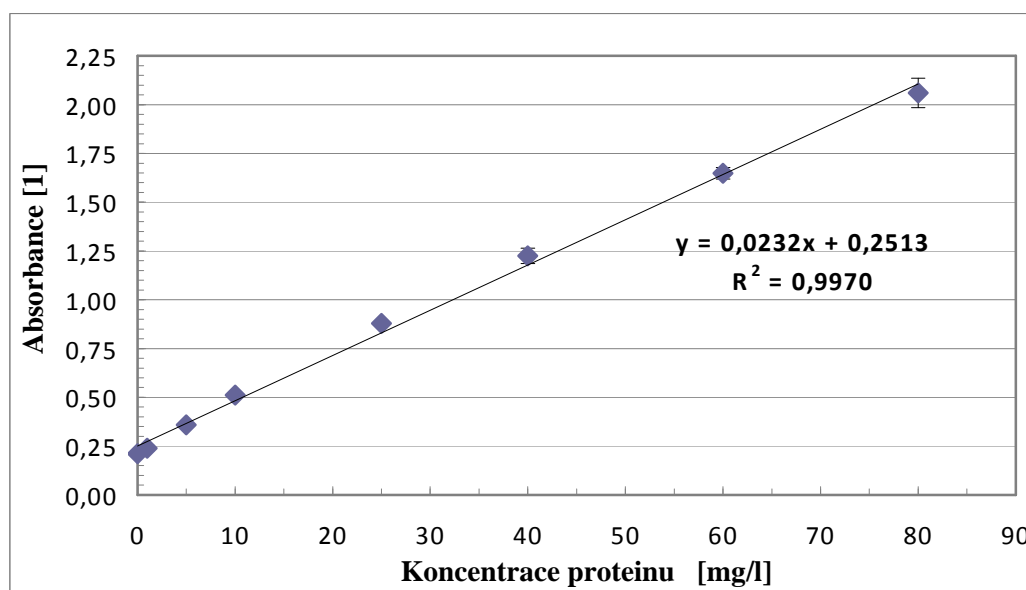
Kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 0 – 80 mg/l.

K 500 μl kalibračních roztoků v mikrotitrační destičce (předem změřené na spektrofotometru) bylo přidáno 500 μl pracovního činidla. Destička byla

protřepána a v PE sáčku byla inkubována při 60 °C v termoboxu po dobu 60 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla měřena absorbance při 562 nm na spektrofotometru TECAN (Sunrise, USA).[93]

Tab. 4 Hodnoty absorbance A_{562} pro kalibrační roztoky albuminu – metoda stanovení kyselinou bicinchoninovou – metoda v mikrotitr. destičkách

C_{albuminu} [mg/l]	Absorbance [1]			Absorbance průměr	Směrodatná odchylka
	A_1	A_2	A_3		
0	0,204	0,231	0,198	0,211	0,014
1	0,224	0,257	0,238	0,240	0,014
5	0,363	0,365	0,349	0,359	0,007
10	0,512	0,495	0,526	0,511	0,013
25	0,879	0,861	0,897	0,879	0,015
40	1,278	1,212	1,185	1,225	0,039
60	1,631	1,689	1,623	1,648	0,029
80	2,035	1,983	2,163	2,060	0,076



Obr. 4 Kalibrační přímka pro stanovení bílkovin – kyselinou bicinchoninovou – metoda v mikrotitračních destičkách

Rovnice kalibrace: $A = 0,0232 c + 0,2513$

b) Zkumavková metoda

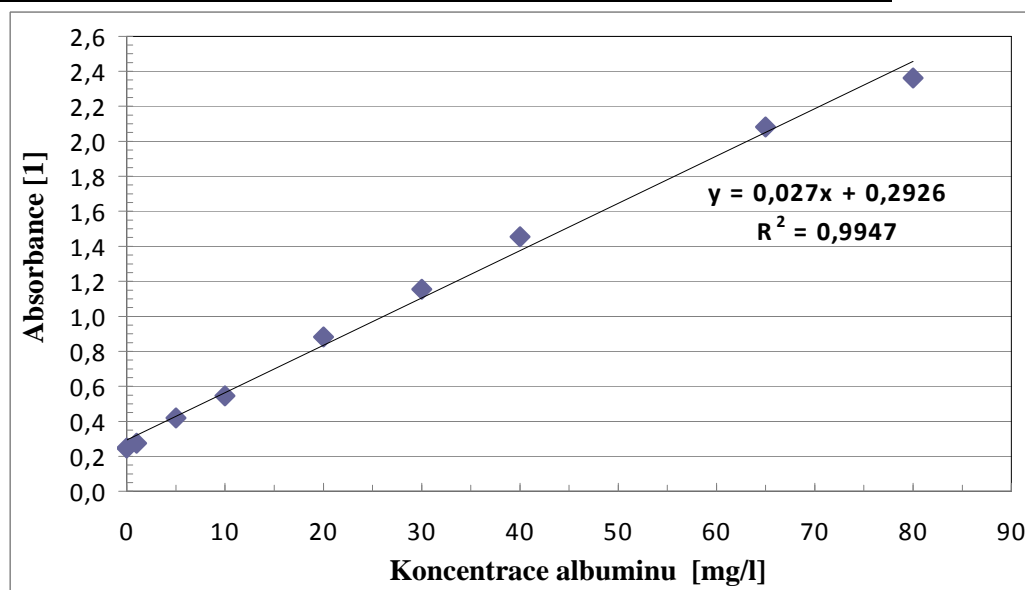
Postup stanovení kalibrační křivky :

Kalibrační roztoky o objemu 0,7 ml byly ve zkumavkách smíchány s 0,7 ml pracovního činidla. Směs byla dokonale promíchána a inkubována v termostatu

s 60 °C po dobu 60 min. Poté byla temperována na teplotu 21°C ve vodní lázni. Po 10 min. byla měřena absorbance proti destilované vodě při vlnové délce 562 nm.[93] Každý vzorek byl proměřen 3x.

Tab. 5 Hodnoty absorbance A_{562} pro kalibrační roztoky albuminu – metoda stanovení kyselinou bicinchinovou – zkumavková metoda

C_{albuminu} [mg/l]	Absorbance [1]			Absorbance průměr	Směrodatná odchylka
	A_1	A_2	A_3		
0	0,244	0,242	0,256	0,247	0,006
1	0,280	0,281	0,263	0,275	0,008
5	0,419	0,411	0,426	0,419	0,006
10	0,536	0,550	0,548	0,545	0,006
20	0,880	0,872	0,895	0,882	0,010
30	1,155	1,158	1,150	1,154	0,003
40	1,449	1,458	1,456	1,454	0,004
65	2,069	2,088	2,091	2,083	0,010
80	2,354	2,366	2,366	2,362	0,006



Obr. 5 Kalibrační přímka pro stanovení bílkovin – kyselinou bicinchinovou – zkumavková metoda

Rovnice kalibrace: $A = 0,027 c + 0,2926$

3.7.6 Stanovení sacharidů fenol-sulfátovou metodou

Pracovní činidla a standard:

Zásobní roztok 5% fenolu: 5 g fenolu bylo rozpuštěno ve 100 ml destil. vody.

Zásobní roztok xanthanu (standard): 20,5 mg xanthanu bylo rozpuštěno v asi 80 ml destilované vody zahříváním na vodní lázni při 60 °C. Po rozpuštění byl objem doplněn destilovanou vodou na 100 ml.

Postup stanovení kalibrační křivky – metoda v mikrotitračních destičkách:

Kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 0 – 205 mg/l.

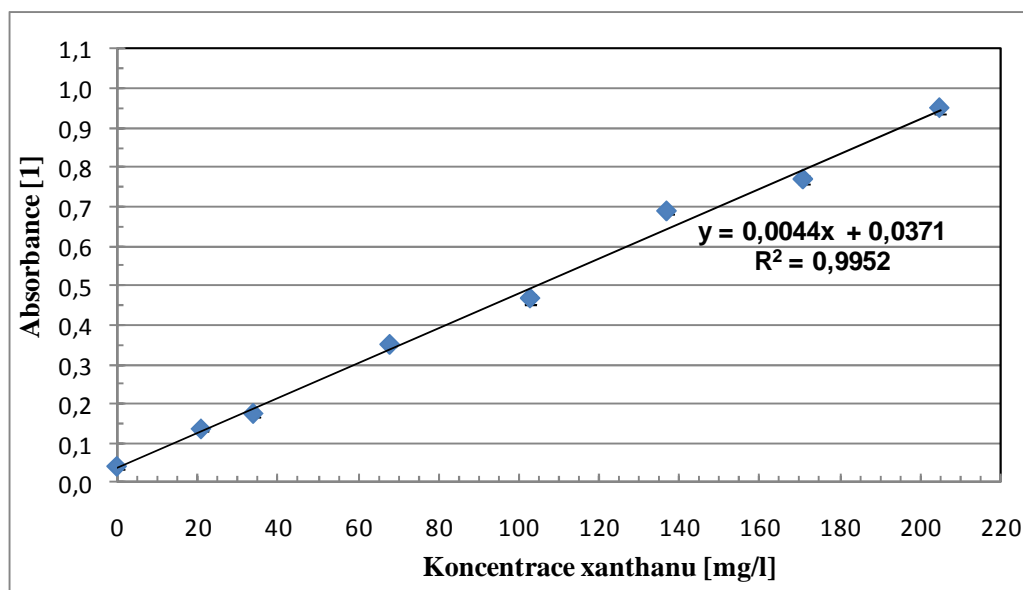
Do předem změřené mikrotitrační destičky byl nadávkován standard a destilovaná voda dle Tab. 6. Poté bylo přidáno 30 µl 5% fenolu a co nejrychleji 150 µl koncentrované H₂SO₄. Obsah jamek byl důkladně promíchán. Zakrytá destička byla inkubována 60 min. při laboratorní teplotě. Poté byla měřena absorbance při 490 nm na spektrofotometru TECAN (Sunrise, USA).[94] Všechny roztoky byly stanovovány 3x vedle sebe.

Tab. 6 Objemy pro přípravu roztoků kalibrační křivky pro stanovení sacharidů

Koncentrace kalibračních roztoků xanthanu [mg/l]	0	21	34	68	103	137	171	205
Objem standardu xanthanu o c = 205 mg/l [µl]	0	3	5	10	15	20	25	30
Objem destilované vody [µl]	30	27	25	20	15	10	5	0

Tab. 7 Hodnoty absorbance A₄₉₀ pro kalibrační roztoky xanthanu

c _{xanthanu} [mg/l]	Absorbance [1]			Absorbance průměr	Směrodatná odchylka
	A1	A2	A3		
0	0,050	0,037	0,033	0,040	0,007
21	0,126	0,136	0,143	0,135	0,007
34	0,175	0,160	0,187	0,174	0,011
68	0,350	0,345	0,352	0,349	0,003
103	0,435	0,497	0,467	0,466	0,025
137	0,680	0,680	0,702	0,687	0,010
171	0,793	0,749	0,762	0,768	0,018
205	0,972	0,952	0,922	0,949	0,021



Obr. 6 Kalibrační přímka pro stanovení sacharidů fenol-sulfátovou metodou

Rovnice kalibrace: $A = 0,0044 c + 0,0371$

3.7.7 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovována fluorescenční metodou s použitím komerčně vyráběného kitu DNA Quantification Kit (Sigma-Aldrich, USA).

Pracovní činidla a standard:

Zásobní roztok pufru (10xTNE): Pufr je součástí kitu.

Roztok pufru (1xTNE): 1 ml pufru 10xTNE bylo smícháno s 9 ml vody pro molekulární biologii (AccuGENE, USA).

Základní roztok barviva: Barvivo (bisBenzimide H 33258) o $c = 10$ mg/ml je součástí kitu.

Zásobní roztok barviva (1B): 10 μ l základního roztoku barviva bylo smícháno s 990 μ l vody pro molekulární biologii. Zásobní roztok je citlivý na světlo.

Pracovní roztok barviva (2B): 10 μ l barviva 1B ($c = 0,1$ mg/ml) bylo smícháno s 4,99 ml pufru 1x TNE. Roztok barviva bylo nutno připravovat vždy čerstvý.

Základní roztok DNA (standard): DNA o $c = 1$ mg/ml je součástí kitu.

Zásobní roztok DNA: 10 μ l základního roztoku DNA bylo smícháno se 100 μ l 10xTNE pufru a 890 μ l vody pro molekulární biologii.

Postup stanovení kalibrační křivky:

Kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 0 – 2000 ng/ml.

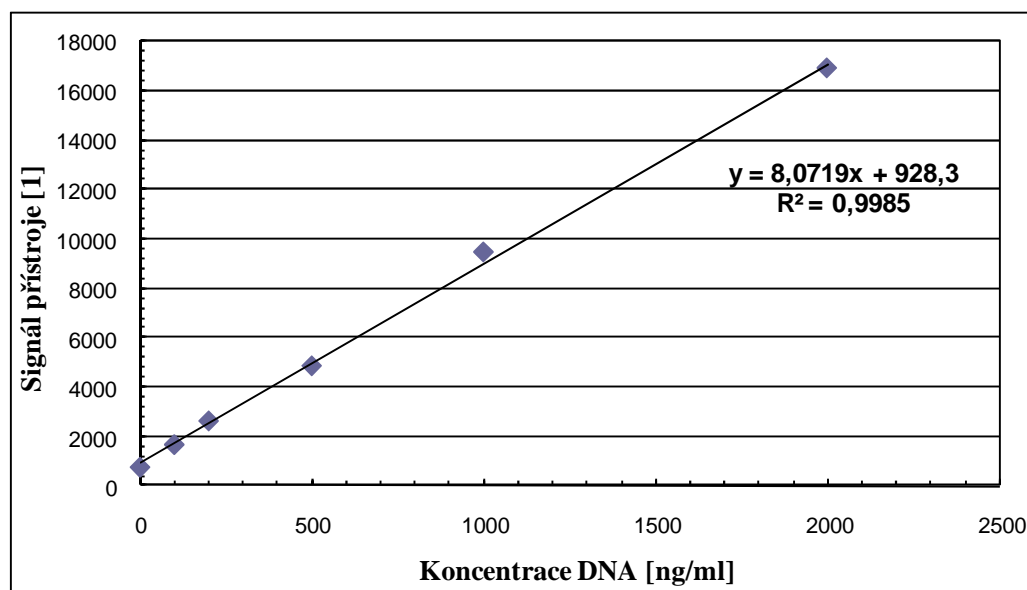
V mikrozkuvkách byl smíchán zásobní roztok DNA s puforem 10xTNE a vodou pro molekulární biologii dle Tab. 8. Kalibrační roztoky o objemu 100 µl byly následně smíchány se 100 µl barvivem 2B a důkladně promíchány. 100 µl směsi bylo nadávkováno do mikrokvet a inkubováno 2 - 5 min. ve tmě. Poté byly roztoky proměřeny na Luminometru s UV fluorescenčním modulem (Turner BioSystems,USA).[95]

Tab. 8 Příprava kalibračních roztoků - stanovení koncentrace DNA

Koncentrace kalibračních roztoků DNA [ng/ml]	0	100	200	500	1000	2000
Objem standardu DNA o c = 10 µg/ml [µl]	0	5	10	25	50	100
Objem pufru 10xTNE [µl]	50	50	50	50	50	50
Objem vody pro molekulární biologii [µl]	450	445	440	425	400	350

Tab. 9 Hodnoty luminiscence pro kalibrační roztoky DNA

Koncentrace DNA [ng/ml]	0	100	200	500	1000	2000
Signál přístroje [1]	765	1674	2631	4856	9447	16870



Obr. 7 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace DNA

Rovnice kalibrace: $A = 8,0719 c + 928,3$

3.7.8 Stanovení živých buněk a celkového počtu buněk

Stanovení celkového počtu buněk (mikroskopicky)

Naředěná buněčná suspenze byla mikroskopována fázovým kontrastem (Olympus CX 41) při zvětšení 400x pomocí počítací komůrky Cyrus II (Prefa, ČR).

Stanovení množství živých buněk (kultivačně)

Promytá buněčná suspenze byla naředěna desetinným ředěním a vybraná ředění byla naočkována na misky a zalita TYA agarem s 2 % glukosy. Po 4 - 5 dnech kultivace při 25 °C byl proveden odečet narostlých kolonií.

3.8 SDS-PAGE

3.8.1 Roztoky a chemikálie potřebné pro separaci SDS-PAGE

TRIS pufr pro separační gel o pH 8,8: 18,15 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml deionizované vody. Po úpravě pH (8,8) konc. HCl bylo doplněno deionizovanou vodou na 100 ml.

TRIS pufr pro koncentrační gel o pH 6,8: 6 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml deionizované vody. Po úpravě pH (6,8) bylo doplněno deionizovanou vodou na 100 ml. Nutno uchovávat při 4 °C.

Elektrodový pufr: 12 g TRIS, 57,6 g glycinu a 4 g sodium dodecyl sulfátu (SDS) bylo rozpuštěno v 4 l deionizované vody. pH pufru 8,3 - 8,6.

30% roztok akrylamidu: 29,2 g akrylamidu, 0,8 g N,N'-metylenbisakrylamidu bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody. Nutno uchovávat při 4 °C.

10% roztok persíranu amonného: 0,1 g persíranu amonného bylo rozpuštěno v 900 μ l deionizované vody. Nutno připravit vždy čerstvé.

Vzorkový pufr: 0,0977 g TRIS, 0,5 g merkaptoethanolu, 1 g glycerolu a 0,01 g bromfenolové modři bylo rozpuštěno v deionizované vody. Po úpravě pH (6,8) byl objem doplněn deionizovanou vodou na 10 ml.

Separační gel 15%: bylo postupně smícháno 11,25 ml 30% roztoku akrylamidu, 5,62 ml TRIS pufru (pH 8,8), 5,17 ml deionizované vody, 225 μ l 10% SDS, 225 μ l 10% persíranu amonného a 9 μ l N,N,N',N'-tetramethyldiamu (TEMED) a dokonale promícháno.

Koncentrační gel 5%: bylo postupně smícháno 1,36 ml 30% roztoku akrylamidu, 2 ml TRIS pufru (pH 6,8), 4,6 ml deionizované vody, 80 μ l 10% SDS, 40 μ l 10% persíranu amonného a 10 μ l TEMEDU a dokonale promícháno.

TEMED byl vždy přidán jako poslední, v jeho přítomnosti docházelo k urychlení tuhnutí gelu.

3.8.2 Příprava vzorků a gelů pro separaci

Příprava vzorků

Ke 250 μ l vzorku bylo přidáno 50 μ l 10% SDS a 200 μ l vzorkového pufru a bylo povařeno při 100 °C 10 min. [96].

Příprava gelů

Pro separaci byl použit 15% separační gel a 5% koncentrační gel. Směs pro separační gel byla opatrně nanášena mezi skla do výšky cca 15 cm. Pro zamezení polymerace na vzduchu byla hladina opatrně převrstvena 700 μ l isobutanolu nasyceného vodou. Gel byl ponechán polymerovat při pokojové

teplotě cca 1 hod. Po ztuhnutí byla vrstva isobutanolu slita a povrch byl opláchnut destilovanou vodou. Na ztuhlý separační gel byl následně nanesen koncentrační gel až po horní hranu skla. Ihned byl vložen teflonový hřeben tak, aby nedošlo k tvorbě či uchycení vzduchových bublin. Gel byl vložen do vlhké komůrky a ponechán k polymeraci do druhého dne při 25 °C.[96]

3.8.3 Vlastní elektroforéza

Ze ztuhlého gelu byl opatrně odstraněn hřeben a silikonové těsnění. Po připevnění skel do aparatury byl do dolní a horní části nalit elektrodový pufr. V horní části došlo k zalití jamek v gelu. Bylo zapnuto chlazení. Poté bylo dávkováno 25 μ l zakonzervovaných vzorků a 15 μ l standardu (Protein Marker, Broad Range 2 - 212 kDa, BioLabs), který byl doplněn 10 μ l vzorkového pufru. Komora byla překryta víkem, připojena ke zdroji stejnosměrného proudu a po nastavení hodnot pro vlastní separaci, tj. 70W a 150 mA byl proces separace spuštěn. Dělení probíhalo cca 4 hod., dokud čelo separace nedosáhlo spodní hranice separačního gelu. Po ukončení separace byl gel ze skel vyjmut a po odstranění koncentračního gelu byl vložen do fixačního roztoku na 20 min. Následovalo barvení gelů.[96]

3.8.4 Barvení gelů

Barvení bylo možné dvěma metodami – dusičnanem stříbrným se zkráceným fixačním časem dle Kirkeby [97] a nebo činidlem Coomassie Brilliant Blue [98].

Roztoky pro barvení gelů dusičnanem stříbrným

Fixační roztok: 30 ml 96% ethanolu, 10 ml kys. octové a 60 ml dest. vody.

Vybarvovací roztoky:

1. *40% ethanol, 10% kyselina octová:* směs 41,6 ml 96% ethanolu a 10 ml kys. octové byla doplněna deionizovanou vodou na 100 ml.
2. *0,05% glutaraldehyd, 0,01% formaldehyd, 40% ethanol:* 41,6 ml 96% ethanolu, 0,2 ml 25% glutaraldehydu a 25 μ l 37% formaldehydu bylo a doplněno deionizovanou vodou na 100 ml.
3. *0,5% Farmerův zeslabovač:* 150 mg ferrokyanidu draselného, 300 mg thiosíranu sodného a 50 mg Na₂CO₃ bylo rozpuštěno v 50 ml deionizované vody a poté doplněno na 100 ml.
4. *0,1% dusičnan stříbrný:* 0,1 g AgNO₃ bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody.
5. *2,5% uhličitan sodný:* 2,5 g Na₂CO₃ bylo rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody.

6. 2,5% uhličitan sodný v 0,02% formaldehydu: 3,75 g Na₂CO₃ a 75 µl 37% formaldehydu bylo rozpuštěno v deionizované vody a doplněno na 150 ml.

7. 1% kyselina octová: směs 1 ml kys. octové a 99 ml deionizované vody.

Odbarvovací roztok: bylo smícháno 25 ml methanolu, 10 ml kys. octové a 65 ml deionizované vody.

Postup barvení:

Po 20min fixaci byly gely barveny v jednotlivých roztocích dle Tab. 10.

Tab. 10 Doby působení vybarvovacích roztoků při barvení dusičnanem stříbrným

Číslo roztoku	Složení (název) roztoku	Doba působení [min]
1	Ethanol + kys. octová	10
2	Glutaraldehyd + formaldehyd + ethanol	5
-	Ethanol	20
-	Destilovaná voda	20
3	Farmerův zeslabovač	2,5
-	Destilovaná voda	3 x 10
4	Dusičnan stříbrný	20
-	Destilovaná voda	Opláchnutí
5	Uhličitan sodný	5
-	Destilovaná voda	Opláchnutí
6	Uhličitan sodný + formaldehyd	3 x 2,5
-	Destilovaná voda	Opláchnutí
7	Kyselina octová	5
-	Destilovaná voda	Opláchnutí

Roztoky pro barvení gelů Coomassie Brilliant Blue

Fixační roztok: směs 5 ml kys. trichlóroctové a 95 ml deionizované vody.

Barvicí roztok: 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 bylo rozpuštěno v 50 ml methanolu a 10 ml kys. octové a doplněno deionizované vody na 100 ml.

Odbarvovací roztok: stejný jako u barvení gelů stříbrem.

Postup barvení:

Zafixovaný a opláchnutý gel (deionizovanou vodou) byl na cca 1 hod. zalit barvicím roztokem. Poté byl gel opláchnut deionizovanou vodou a následně převrstven odbarvovacím roztokem, kde byl za občasné výměny roztoku za čerstvý ponechán do vyblednutí.

3.9 Izolace bakteriální DNA fenol-chloroformovou metodou

3.9.1 Roztoky a chemikálie potřebné pro izolaci

Roztoky

Roztok 1: bylo smícháno 10 mM TRIS-HCl o pH 7,8 (60,57 mg TRIS + 50 ml destilované vody, + 34,5 ml koncentrované HCl a bylo doplněno do 100 ml) a 5 mM EDTA o pH 8,0 (146,1 mg EDTA + 100 ml destilované vody, pH se upraví NaOH).

CIZ: Směs 24 ml chloroformu a 1 ml izoamylalkoholu.

Směs fenol:chloroform (1:1): Směs 5 ml fenolu a 5 ml chloroformu se dokonale promíchá.

3M octan sodný: 2,46 g octanu sodného se rozpustí v 10 ml destilované vody.

Chemikálie:

Lysozym, proteinasa K (100 µg/ml), 20% SDS, 96% ethanol

3.9.2 Postup izolace

Izolace DNA probíhala ve třech krocích - lyze buněk, extrakce DNA odstraněním bílkovin, lipidů a polysacharidů a vlastní vysrážení DNA. Při lyzi buněk se 500 µl suspenze biomasy (fosf. pufr 6,7 mmol/l, poměr 1:10) smíchala s 500 µl roztoku 1. Po přidavku lysozymu (0,3 mg/ml) a dokonalém promíchání byla směs inkubována 1 hod. při 37 °C. Poté bylo přidáno 12,5 µl 20 % SDS a 5 µl proteinasy K. Směs byla dokonale zamíchána a opět inkubována při 55 °C cca 3 hod. do projasnění. Následovalo odstranění proteinů, bílkovin a polysacharidů přidávkem fenolu ve stejném objemu jako vzorku. Směs byla promíchávána kývavým pohybem 4 min., centrifugována (4 °C, 12 000 rpm, 2 min.) a nakonec byla vzniklá horní vodná fáze s DNA odebrána do čisté mikrozkušavky. Tento postup byl opakován 2x. Následně byla přidána směs fenol:chloroform ve stejném objemu jako byl objem vzorku a opět 4 min. promíchávána. Po centrifugaci (4 °C, 12 000 rpm, 2 min.) byla odebrána horní vodná fáze a k ní bylo přidáno 300 µl CIZ, 4 min. promícháváno a znovu centrifugováno (4 °C, 12 000 rpm, 2 min.). V odebrané horní vodné fázi obsahující DNA bylo provedeno srážení. K přesně zjištěnému objemu vzorku byl přidán 3M octan sodný v množství $\frac{1}{10}$ objemu vzorku a směs byla důkladně protřepána. Následně byl přidán 2,5násobek 96% ethanolu a opět důkladně promícháno. Po 30 min. stání při -20 °C byla směs centrifugována (4 °C, 12 000 rpm, 30 min.). Supernatant byl řádně slit a vzorek byl přes noc sušen při 37 °C. Získaný vzorek DNA byl resuspendován ve vhodném objemu TE pufru.[96]

4 HLAVNÍ VÝSLEDKY A JEJICH DISKUSE

Tato disertační práce je zaměřena na popis izolací a na následné studium bakterií produkujících extracelulární polymery, které byly získány z aktivovaných kalů se znaky viskózního bytnění. Během tohoto studia byly zkoumány a zpracovány tři vzorky takových kalů.

Z prvního vzorku kalu pocházejícího z ČOV Fryšták bylo již dříve v rámci SVOC [90] izolováno 10 bakteriálních kultur. Většina z nich však patřila mezi již dobře známé mikroorganismy. Pouze jediná, označená FR8, byla výrazně odlišného vzhledu a charakteru, a proto se studium této bakterie stalo náplní jedné části práce.

Další zkoumaný vzorek aktivovaného kalu pocházel z ČOV Tetčice. Z něj byly postupně izolovány dvě bakteriální kultury pracovně označené T1 a T2. Po prvních kultivačních testech a po jejich biochemické identifikaci však bylo od jejich zkoumání ustoupeno, neboť šlo v obou případech o druh *Klebsiella oxytoca*.

Ze třetího vzorku kalu z ČOV Babice byly izolovány dvě mikrobiální kultury. Po mikroskopování těchto izolátů bylo zjištěno, že jeden z nich je plíseň. Jelikož šlo o ojedinělý výskyt tohoto mikroorganismu a v samotném preparátu vzorku aktivovaného kalu nebyla jeho přítomnost pozorována, byl vyřazen z dalšího zkoumání. Druhý izolát, označen PR, se od počátku jevil značně odlišně. Na agarových půdách vytvářel silně mukózní kolonie. Studium této bakterie a její schopnosti produkce exopolymeru se tak stalo jednou z hlavních částí této práce.

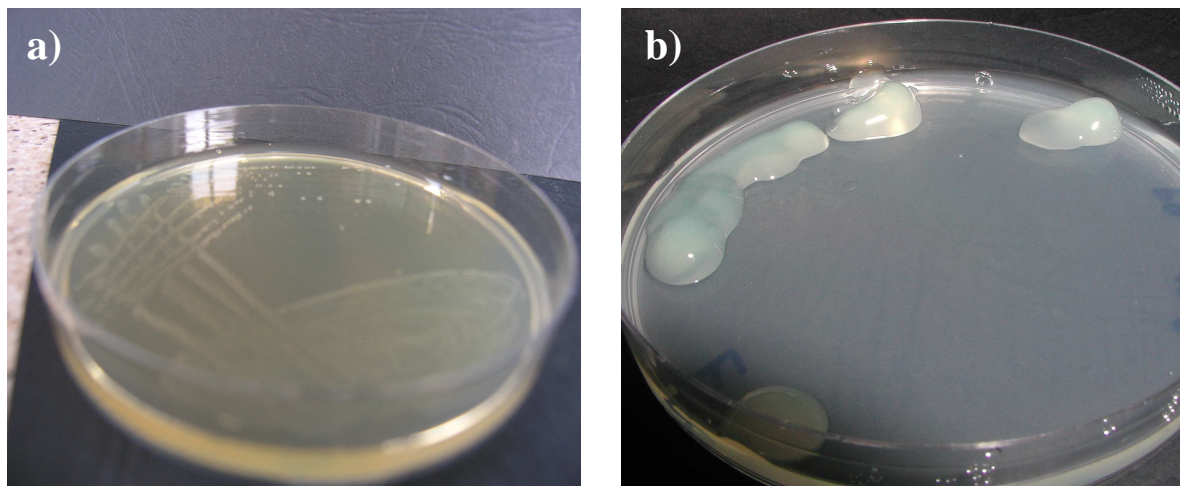
4.1 Výsledky získané zkoumáním kultury PR

4.1.1 Izolace a první testy

Kultura PR byla získána na jaře v roce 2008 ze vzorku aktivovaného kalu vykazujícího viskózní bytnění. Kal pocházel z čistírny odpadních vod Babice, která čistí převážně vody z potravinářského průmyslu. Získaný vzorek kalu byl nejprve kultivován na Trypton kvasničných půdách (TYA), různě obohacených sacharidy (TYA s 2 % glukosy a TYA s 2 % sacharosy). Z nich byla několikanásobným přeočkováním izolována kultura PR, která jako jediná na uvedených sacharidických půdách tvořila velké lesklé kopulovité kolonie se zřetelnou produkcí polymerů.

Prvními podrobnějšími kultivačními testy na pevných půdách bylo zjištěno, že kultura PR rostla během několikadenní kultivace na samotném TYA agaru ve velmi drobných koloniích bez tvorby exopolymeru (Obr. 8 a). Na půdách se sacharidy produkovala exopolymer (ECP) v různém množství v závislosti na typu a koncentraci přítomného sacharidu. Největší nárůst mukózní biomasy byl

zaznamenán na půdě s obsahem 2 % sacharosu, kde kultura vytvářela téměř průhledné, silně vypuklé kolonie gelovitěho charakteru (viz Obr. 8 b).



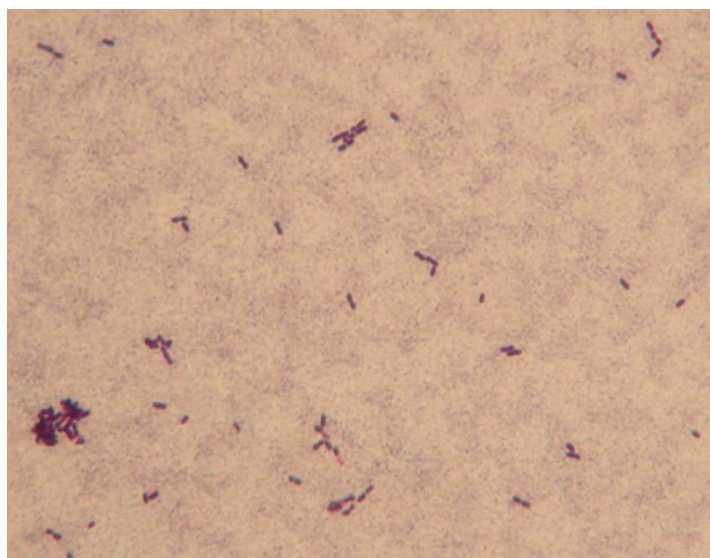
Obr. 8 Tvorba **a)** drobných kolonií kultury PR na TYA agaru (4. den kultivace) a **b)** mukósních kolonií na TYA s 2 % sacharosu (7. den kultivace)

4.1.2 Základní morfologické a biochemické vlastnosti

Po výše uvedených předběžných testech byla kultura podrobena biochemickým testům pro její podrobnější popis a zjištění morfologických vlastností.

Gramovo barvení

Obarvením kultury PR podle Grama s následným měřením velikosti buněk bylo zjištěno, že jde o gram pozitivní drobnou tyčinkovitou bakterii o velikosti buněk 0,2 - 0,4 μm x 0,5 - 1,3 μm , se zakulacenými konci. Buňky tvořily krátké řetězky nebo malé shluky (Obr. 9).



Obr. 9 Gramovo barvení kultury PR z TYA s 2 % sacharosu (7. den kultivace)

Testy pro zjištění biochemických vlastností

Pro první biochemické testy s kulturou PR byly vybrány základní laboratorní testy – OF test, test na přítomnost katalasy a oxidasy a test schopnosti sporulace. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11 Základní biochemické vlastnosti kultury PR

Typ prováděného testu	Výsledek
OF test	Nefermentující
Katalasa	Negativní
Oxidasa	Negativní
Sporulace	Nesporulující

Další biochemické vlastnosti byly sledovány pomocí komerčně vyráběných mikrotestů STAPHYtest 16, STREPTOtest 16 a ENTEROtest 24. Enterotest byl použit i přesto, že je určen pro gramnegativní fermentující bakterie. Tento test umožnil zjištění dalších biochemických vlastností kultury. Těmito zkouškami byly získány výsledky, souhrnně uvedené v Tab. 12.

Tab. 12 Souhrnné výsledky kultury PR získané biochemickými mikrotesty

Reakce	Typ testu		
	Utilizace sacharidů	Utilizace cukerných alkoholů	Ostatní testy
Pozitivní	Sacharosa Glukosa Galaktosa Maltosa Rhamnosa Manosa Rafinosa Melibiosa Cellobiosa Xylosa	-	Acetoin α -galaktosidasa β -galaktosidasa Leucin aminopeptidasa
Negativní	Inulin Ribosa Laktosa Trehalosa	Dulcitol Sorbitol Manitol Inositol Adonitol	Simmons citrát Lysin Arginin Malonát Ornitin Sirovodík Eskulin Nitráty Indol Fenylalanin Fosfatasa β -glukuronidasa Ureasa

Provedenými testy bylo zjištěno, že kultura PR je nesporulující bakterie schopná rozkládat relativně širokou škálu sacharidů (viz Tab. 12). Nemá však enzymové vybavení pro rozklad citrátu, malonátu, tryptofanu či dekarboxylaci lysinu, ani není schopná využívat cukerné alkoholy jako zdroj uhlíku a energie. Je negativní na oxidasu, katalasu i ureasu, byla však zjištěna její rezistence vůči antibiotiku novobiocinu.

4.1.3 Růstové vlastnosti na agarových půdách

Po určení biochemických vlastností byly prováděny kultivační testy nejprve na agarových živných půdách a později v tekutých médiích za různých podmínek.

Při prvních růstových testech na pevných půdách vykazovala kultura slabý růst na Trypton kvasničném agaru (TYA), proto byly hledány jiné živné půdy, kde by byla schopna bohatšího růstu. Kultura tak byla postupně kultivována na různě bohatých půdách (minerální agar s glukosou, základ pro krevní agar, VL agar), dále na půdách s širší škálou sacharidů (sacharosou, glukosou, maltosou, galaktosou, fruktosou) a na TYA agarech s přísádky dalších, dostupných organických sloučenin (škrobu, glycerolu, pyrohroznanu, mléčnanu). V průběhu testů byl také sledován růst kultury v rozmezí teplot 5 - 58 °C a růst v aerobním, anaerobním a mikroaerobním prostředí.

Vyhodnocování bylo prováděno pozorováním charakteru narostlých kolonií na agarových miskách. Výsledky kultivací jsou zaznamenány v tabulkách Tab. 13 a Tab. 14.

Tab. 13 Růst kultury PR na agarových půdách za různých teplot v aerobním prostředí (7. den kultivace)

Typ půdy	Kultivační teplota [°C]				
	5	25	30	37	58
	Růst kolonií				
TYA	+ -	+ -	+ -	+ -	-
TYA s 2 % sacharosy	⊕	⊕ ⊕	⊕ ⊕	++	-
TYA s 2 % glukosy	NT	⊕	⊕	+	-
TYA s 2 % fruktosy	NT	+	+	NT	NT
TYA s 2% mléčnanu a pyrohroznanu	+ -	+	+	+ -	-
TYA s 2 % glycerolu	+	+	+	+ -	-
Základ pro krevní agar	NT	-	NT	NT	NT
Minerální agar s 2% glukosy	NT	-	NT	NT	NT
VL agar	NT	++	NT	-	NT

Pozn. - bez růstu, + - slabý růst, + dobrý růst, ++ velmi dobrý růst, ⊕ růst s produkcí polymeru, ⊕ ⊕ růst s výraznou produkcí polymeru, NT netestováno.

Tab. 14 Růst kultury PR na agarových půdách v anaerobním a mikroaerobním prostředí (7. den kultivace)

Typ půdy	Teplota 25 °C	
	Anaerobní	Mikroaerobní
	Růst kolonií	
TYA	+ -	+ -
TYA s 2 % sacharosy	⊕ ⊕ ⊕	⊕ ⊕ ⊕
TYA s 2 % maltosy	NT	++
TYA s 2 % galaktosy	NT	++
TYA s 2 % fruktosy	NT	+
TYA s 2 % škrobu	NT	++
TYA s 2 % mléčnanu a pyrohroznanu	+ -	+
TYA s 2 % glycerolu	+ -	+ -
VL agar	+++	++

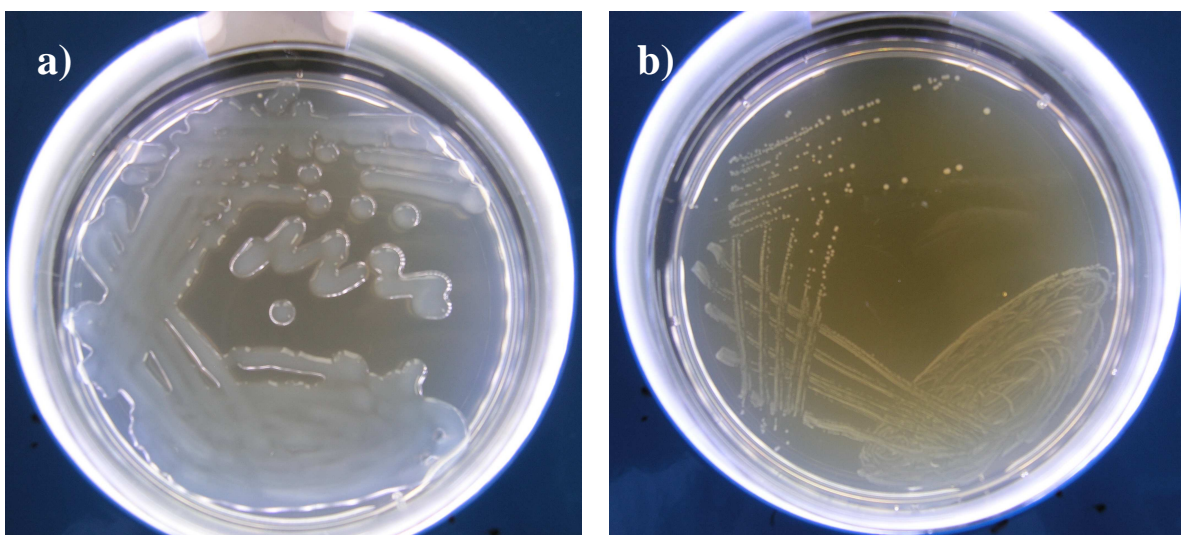
Pozn. + - slabý růst, + dobrý růst, ++ velmi dobrý růst, +++ mimořádný růst, ⊕ ⊕ ⊕ růst s mohutnou produkcí polymeru, NT netestováno.

Podle uvedených testů je zřejmé, že kultura PR roste aerobně v teplotním rozmezí 5 – 37 °C, nejlépe při 25 °C. Růst kultury nebyl omezen poklesem koncentrace kyslíku ani jeho absencí, dokonce v případech kultivace na VL agaru a TYA s 2 % sacharosy za nepřístupu vzduchu a v mikroaerobním prostředí kultura vytvářela největší kolonie – v případě kultivace na TYA s 2 % sacharosy s velmi bohatou tvorbou polymeru. Na základě těchto zjištěných dat se jeví dříve uvedený negativní výsledek OF testu (Tab. 11) jako nelogický. Vysvětlení by však mohlo spočívat v potřebě bohatšího živného média než je médium pro OF test, případně v inhibici kultury bromthymolovou modří.

Z pohledu tvorby ECP na pevných živných půdách ukázaly testy na schopnost tvorby exopolymerů pouze za přítomnosti sacharosy nebo glukosy; při použití sacharosy byla tvorba mukósních kolonií mnohem výraznější.

Na základě výše uvedených pozorování byl jako nejlepší živný agar pro tvorbu ECP dále používán TYA s 2 % sacharosy a pro růst kultury bez produkce exopolymerů VL agar (např. pro získání biomasy pro zakonzervování kultury při -80 °C).

Na následujícím obrázku (Obr. 10) je zachycen rozdílný vzhled mukósních a nemukósních kolonií.



Obr. 10 Vzhled **a)** mukósních a **b)** nemukósních kolonií kultury PR na TYA s 2 % sacharosy a na VL agaru (7. den kultivace)

Růst kultury byl dále testován s ohledem na výši osmotického tlaku. Kultura byla pěstována na VL agaru s různou koncentrací NaCl a při různých kyslíkových poměrech, výsledky jsou uvedeny v Tab. 15.

Tab. 15 Růst kultury PR na VL agaru s různou koncentrací NaCl (aerobní, anaerobní a mikroaerobní kultivace)

Koncentrace NaCl	Aerobní	Mikroaerobní	Anaerobní
	Růst kultury		
0,5 %	++	+++	+++
4,0 %	+	+	+
6,5 %	-	-	-
10 %	-	-	-
15 %	-	-	-

Pozn. - bez růstu, + dobrý růst, ++ velmi dobrý růst, +++ mimořádný růst.

Z uvedených výsledků vyplývá neschopnost kultury PR růst v prostředích s koncentrací NaCl 6,5 % a vyšší. Maximální koncentrace, při které byla ještě schopna růstu, byla koncentrace 4,0 % NaCl, i když i zde byl patrný omezený růst oproti agaru s 0,5 % NaCl. Z pohledu množství kyslíku přítomného při kultivaci se jevílo prostředí anaerobní a mikroaerobní lepší než prostředí aerobní.

Poslední prováděný test na agarových půdách byl zaměřen na hledání optimální délky kultivace při různých teplotách. Kultivace byla prováděna na VL agaru, tedy bez produkce ECP. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 16.

Tab. 16 Kultivace kultury PR na VL agaru při různých teplotách za aerobních podmínek

Délka kultivace	Kultivační teplota [°C]				
	25	30	35	41	45
Růst kolonií					
1. den	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
2.den	+	++	+	+	+
3.den	++	++	++	+	+
4.den	++	++	++	++	++
7.den	++	+++	+++	++	++
8.den	+++	+++	+++	++	++
9.den	++	+++	+++	++	++

Pozn. + - slabý růst, + dobrý růst, ++ velmi dobrý růst, +++ mimořádný růst.

Provedenými testy bylo zjištěno, že kultura rostla na VL agaru nejlépe v rozmezí teplot 30 – 35 °C, tedy poněkud odlišně než při růstu na chudším TYA. Překvapivě kultura rostla i při 45 °C.

4.1.4 Identifikace

Protože získané výsledky morfologických, biochemických a růstových vlastností neumožnily jednoznačnou druhovou ani rodovou identifikaci kultury PR, byla tato v průběhu prací zaslána k identifikaci na externí pracoviště (Státní veterinární ústav Praha, Laboratoř molekulárních metod). Zde byla metodou sekvenace 16S rDNA získána nukleotidová sekvence téměř celého genu (1424 nukleotidů, GenBank No. HQ727993). Získané výsledky byly porovnány s údaji v databázi GenBank pomocí programu BLAST [99]. Toto porovnání ukázalo, že kultura PR náleží k taxonu *Leuconostoc garlicum*, a to s 99% shodou - viz Obr. 11. Jen nepatrně menší shoda (98 %) byla nalezena se sekvencemi druhu *Leuconostoc lactis*.

Sequences producing significant alignments:				
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
DQ239691.1	Leuconostoc garlicum strain L1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	99%
AY456086.1	Leuconostoc garlicum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2614	2614	99%
HM803936.1	Leuconostoc garlicum strain B/C-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2608	2608	99%
AB362722.1	Leuconostoc garlicum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NF	2608	2608	99%
HM058979.1	Lactobacillus parabuchneri culture-collection IMAU:80816 16S ribosomal RNA	2591	2591	98%
HM058726.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80516 16S ribosomal RNA	2591	2591	98%
EU460774.1	Uncultured bacterium clone ECH_aai37g10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	98%
AJ970316.1	Leuconostoc lactis 16S rRNA gene, strain LMG 22650	2588	2588	98%
HM057927.1	Leuconostoc lactis strain MGA32-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2586	2586	98%
HM058633.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80360 16S ribosomal RNA	2584	2584	98%
HM058606.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80326 16S ribosomal RNA	2584	2584	98%
HM057922.1	Leuconostoc lactis strain MGA31-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2584	2584	98%
HM058980.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80817 16S ribosomal RNA	2582	2582	98%
HM058895.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80716 16S ribosomal RNA	2582	2582	98%
HM057930.1	Leuconostoc lactis strain MGA32-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2582	2582	98%
GU125559.1	Leuconostoc lactis strain IMAU80137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2582	2582	98%
AY186084.1	Uncultured bacterium clone LB1C2 16S small subunit ribosomal RNA gene	2582	2582	98%
AJ937759.1	Leuconostoc lactis 16S rRNA gene, strain R-21065	2582	2582	98%
HM058981.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80818 16S ribosomal RNA	2580	2580	98%
HM058840.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80656 16S ribosomal RNA	2580	2580	98%
HM058539.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80256 16S ribosomal RNA	2580	2580	98%
HM058006.1	Leuconostoc lactis strain MGA50-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2580	2580	98%
HM057923.1	Leuconostoc lactis strain MGA32-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2580	2580	98%
HM058929.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80760 16S ribosomal RNA	2579	2579	98%
HM058649.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80380 16S ribosomal RNA	2579	2579	98%
HM058647.1	Leuconostoc lactis culture-collection IMAU:80377 16S ribosomal RNA	2579	2579	98%

Obř. 11 Výřez výsledků z databáze GenBank ke dni 18.01.2011

4.1.5 Diskuse výsledků

Kultura PR svými základními vlastnostmi plně odpovídá rodu *Leuconostoc*, neboť tento je tvořen grampozitivními, fakultativně anaerobními, katalaso negativními, nesporelujícími koky či kokobacily, vyskytujícími se v párech či krátkých řetězcích [100,101].

Zjištěná vlastnost kultury PR, produkce exopolymeru pozorována jen při kultivaci na agarových půdách s obsahem sacharosu nebo glukosu, nebyla zatím u druhu *L. garlicum* popsána. Schopnost tvorby polysacharidů je nicméně u jiných druhů rodu známa již řadu let. Z celé řady publikací lze vybrat následující – Kim a kol. [102] u *L. mesenteroides* popsal tvorbu mukósních kolonií a následné formování biofilmu v prostředí s 5 % sacharosu či glukosu. Dále Kim a kol. [103] našel u kultury *Leuconostoc lactis* IH23 tvorbu mukósních kolonií při kultivaci na agarovém médiu s 5 % sacharosu.

Pro potvrzení druhové identifikace byly výsledky utilizace sacharidů kulturou PR srovnány s vlastnostmi tří kultur *L. garlicum* GL09, GL67 a GL87 izolovanými Kimem a kol. z povrchu česneku [104], jedné kultury *L. garlicum* získané Uhem a kol. [105] a také tří kultur *Leuconostoc lactis* (DSM20202, KCTC3528, IH23) uvedených v práci Hamasakiho a kol. [106]. Srovnání je uvedeno v Tab. 17.

Tab. 17 Srovnání utilizace sacharidů u kultury PR, s kulturami *L. garlicum*, GL09, GL67, GL86 a *L. lactis*

Kultura	Využití sacharidu					
	Rafinosa	Melibiosa	Galaktosa	Ribosa	Xylosa	Laktosa
PR	+	+	+	-	+	-
<i>L. garlicum</i> GL09 [104]	-	+	+	-	+	+
<i>L. garlicum</i> GL67 [104]	+	+	+	-	+	-
<i>L. garlicum</i> GL86 [104]	+	+	+	-	+	+
<i>L. garlicum</i> [105]	+	NT	+	NT	+	NT
<i>L. lactis</i> DSM20202 [106]	-	-	+	NT	-	+
<i>L. lactis</i> KCTC3528 [106]	-	-	+	NT	-	+
<i>L. lactis</i> IH23 [106]	+	+	+	NT	+	+

Pozn. NT netestováno

Porovnáním výsledků z testů uvedených kultur je patrné, že kultura PR se svými sacharolytickými vlastnostmi spíše blíží druhu *L. garlicum* a shoduje se s kulturou *L. garlicum* GL67. Avšak i jednotlivé kmeny druhu *L. lactis* se od sebe odlišují. Dva ze tří uvedených kmenů se ve 4 testech neshodují.

Růstovými testy na agarových půdách bylo zjištěno, že kultura PR roste v rozmezí teplot 5 – 45 °C, optimum má při 25 °C, což odpovídá růstovému optimu většiny leukonostoků (20 – 25 °C) [101]. Kultura PR se však stejně jako kmen *L. garlicum* [104,105] liší od většiny leukonostoků ve svých růstových vlastnostech, neboť vyjma uvedeného shodného růstového optima, roste i při teplotách nad 40 °C, čehož dle [100] nejsou bakterie rodu *Leuconostoc* schopné.

Porovnáním výše uvedených výsledků je patrné, že kultura PR se svými morfologickými a biochemickými vlastnostmi nejvíce podobá druhu *Leuconostoc garlicum*.

4.1.6 První pokusy v tekutých médiích

Testování kultury PR v tekutých médiích bylo prováděno s cílem ověření jejích produkčních schopností za těchto podmínek, neboť kultivace v tekutých médiích je běžně využívána v průmyslové výrobě pro produkci bakteriálních metabolitů.

Kultivace v Trypton kvasničném médiu s různým obsahem sacharosy

Podle testů provedených na agarových půdách vykazovala kultura PR nejbohatší růst s produkcí exopolymeru na TYA agaru s 2 % sacharosy. Jako výchozí tekuté médium bylo proto zvoleno médium stejného složení,

avšak s vyloučením agaru (TYM). Nejprve byly zkoušeny tři různé koncentrace sacharosy 2 % , 5 % a 10 % .

Kultivace probíhala na dvou různých třepačkách – vratné a kruhové. Po 6 dnech kultivace byla měřena viskozita tekutých médií (Tab. 18) jako předpokládaný orientační ukazatel koncentrace exopolymeru. Tento byl také použit v práci Stredanského a kol. [107] popisující studium produkčních schopností kultury *Agrobacterium tumefaciens*.

Tab. 18 Hodnoty viskozit médií TYM s obsahem sacharosy 2 %, 5 % a 10 % po 6 denní kultivaci kultury PR

Typ třepačky	Obsah sacharosy		
	2 %	5 %	10 %
	Viskozita tekutého média [mPa.s] při 25 ± 2 °C		
Kruhová	1,74 ± 0,01	6,07 ± 0,06	108,7 ± 0,5
Vratná	1,83 ± 0,01	6,61 ± 0,14	145,0 ± 0,8

Uvedené testy prokázaly schopnost kultury PR růst a produkovat exopolymer při kultivaci v tekutém médiu s obsahem sacharosy. Nejvyššího zahuštění bylo dosaženo při použití 10 % sacharosy a to 108,7 mPa.s při kultivaci na kruhové třepačce, resp. 145,0 mPa.s na vratné třepačce. Použití vratné třepačky se ukázalo výhodnější při všech testovaných koncentracích sacharosy. Zaznamenaná tolerance kultury PR k relativně vyšší koncentraci sacharidického substrátu (100 g/l) je obdobná jiným kulturám rodu *Leuconostoc*. Např. Santos a kol. [108] zjistili, že bakterie *Leuconostoc mesenteroides* v jimi testovaném rozmezí obsahu sacharosy 10 – 120 g/l produkuje největší množství polysacharidu při nejvyšší výchozí koncentraci sacharosy, tedy 120 g/l.

Další testy v tekutých médiích byly proto dále prováděny na vratné třepačce v TYM médiu s obsahem sacharosy 10 % .

Po ukončení pokusu bylo orientačně vyzkoušeno srážení vyprodukovaného exopolymeru z živného média, a to ethanolem v poměru 1:4 (objem média:objemu srážedla). Z média s nejvyšší viskozitou byly centrifugací odstraněny buňky a poté bylo provedeno srážení vychlazeným ethanolem. Z 30 g supernatantu bylo po vysušení získáno 0,96 g nepřečištěného exopolymeru, což po zahrnutí vstupní koncentrace sacharosy (10 %) činilo výtěžnost cca 32 %.

Kultivace v Trypton kvasničném médiu s dvojnásobnou koncentrací živin

V následujícím testu byl zkoušen vliv zvýšené koncentrace základních složek – tryptonu a kvasničného autolyzátu – na produkci ECP, resp. na zahušťování tekutého média. Byla připravena dvě tekutá Trypton kvasničná média, jedno s běžným množstvím základních složek (TYM s 10 % sacharosy) a jedno s jejich dvojnásobnou koncentrací (2xTYM s 10 % sacharosy). Kultivace

probíhala jak na kruhové, tak na vratné třepačce. V průběhu kultivace bylo prováděno měření viskozit médií, výsledky jsou uvedeny v Tab. 19.

Tab. 19 Viskozita TYM médií s běžným a dvojnásobným množstvím základních složek během kultivace kultury PR

Doba kultivace [den]	Kruhová třepačka	Vratná třepačka	Kruhová třepačka	Vratná třepačka
	2xTYM s 10 % sacharosy		TYM s 10 % sacharosy	
	Viskozita tekutého média [mPa.s] při 25 ± 2 °C			
0	1,11 ± 0,01	1,11 ± 0,01	0,96 ± 0,02	0,96 ± 0,02
3	74,3 ± 0,2	87,6 ± 0,1	5,52 ± 0,02	5,15 ± 0,03
5	166,3 ± 1,5	184,3 ± 0,6	-	-
6	-	-	69,2 ± 0,5	68,0 ± 0,1
10	121,3 ± 0,6	132,7 ± 0,6	175,0 ± 1,0	185,0 ± 1,0

Z uvedené tabulky je patrné, že nejvyšší viskozity média, cca 185 mPa.s, bylo dosaženo nejdříve (5. den kultivace) v médiu s dvojnásobným množstvím obou složek a o pět dní později i v médiu s běžnou koncentrací. V obou případech při kultivaci na vratné třepačce. Z uvedeného testu vyplývá, že zvýšením množství tryptonu a kvasničného autolyzátu v kultivačním médiu dojde k výraznému zkrácení kultivační doby.

Následující kultivační testy v tekutém TYM médiu byly, i přes uvedené skutečnosti, prováděny v médiích s běžným obsahem základních složek. Vliv množství živin, přítomných v médiu, na produkci ECP byl sledován v pozdějších testech (viz 4.1.7).

Kultivace kultury v TYM s různým objemem vzdušné fáze v kultivačních lahvích

Při kultivaci na pevných agarových půdách bylo zjištěno, že kultura PR nejlépe roste a produkuje ECP v anaerobních a mikroaerobních podmínkách. Byla proto ověřena kultivace kultury v lahvích s různým podílem kapalné a vzdušné fáze (1:4, 1:1 a 1:0). Tyto podmínky poskytovaly buňkám jak různé množství kyslíku, tak umožňovaly určitou intenzitu míchání. Po kultivaci na vratné třepačce byla po 7 dnech změřena viskozita (Tab. 20).

Tab. 20 Viskozita tekutých TYM médií s 10 % sacharosu s různým objemem vzdušné fáze po 7denní kultivaci kultury PR

Poměr kapalná a plynná fáze	Viskozita tekutého média [mPa.s] při 25 ± 2 °C
1:4	200,5 ± 26,2
1:1	152,2 ± 37,5
1:0	144,2 ± 5,5

Z naměřených dat je zřejmé, že v případě kultivace v tekutých médiích byla pro vyšší zahuštění média vhodná přítomnost vzdušné fáze. Při 4násobném objemu plynné fáze byla zaznamenána nejvyšší viskozita média 200,5 mPa.s, kdežto při poměrech 1:1 a 1:0 byla viskozita významně nižší.

Veškeré další pokusy kultivace kultury PR v tekutých médiích byly dále prováděny při poměru živného média a vzdušné fáze 1:4.

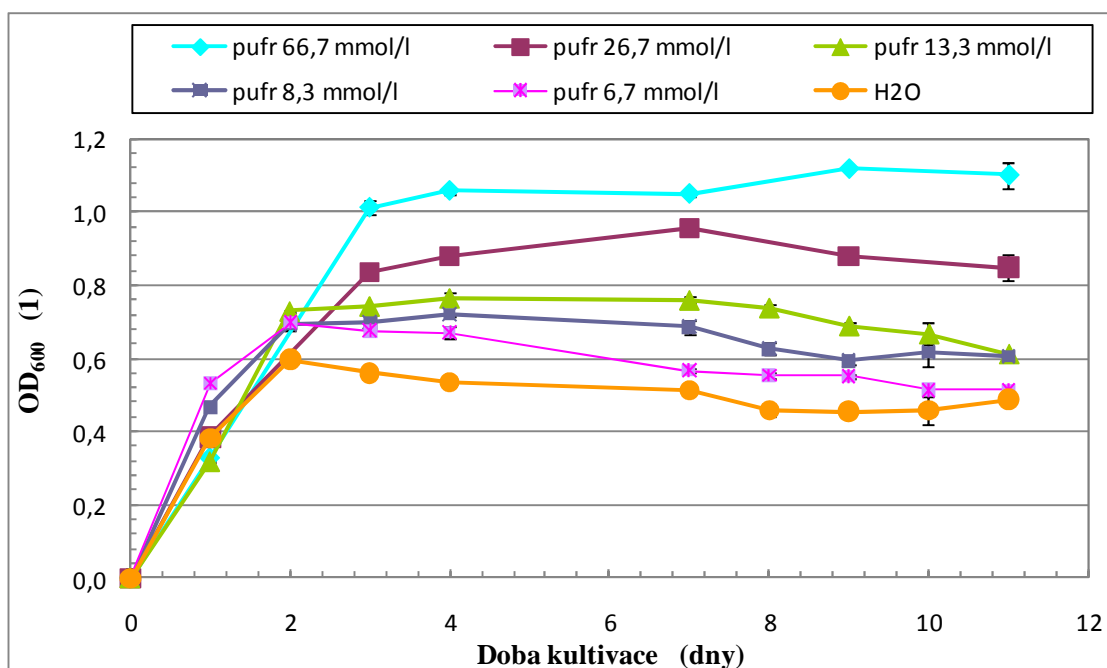
4.1.7 Optimalizace kultivačních podmínek pro produkci exopolymeru

V předcházejících kultivačních testech v tekutých médiích byla prokázána schopnost kultury PR růst v Trypton kvasničném médiu (TYM) a produkovat v něm exopolymer. Jako nejlepší produkční podmínky byly vyhodnoceny TYM s dvojnásobnou koncentrací živin a s 10 % sacharosu, s objemovým poměrem tekutina:vzdušná fáze 1:4.

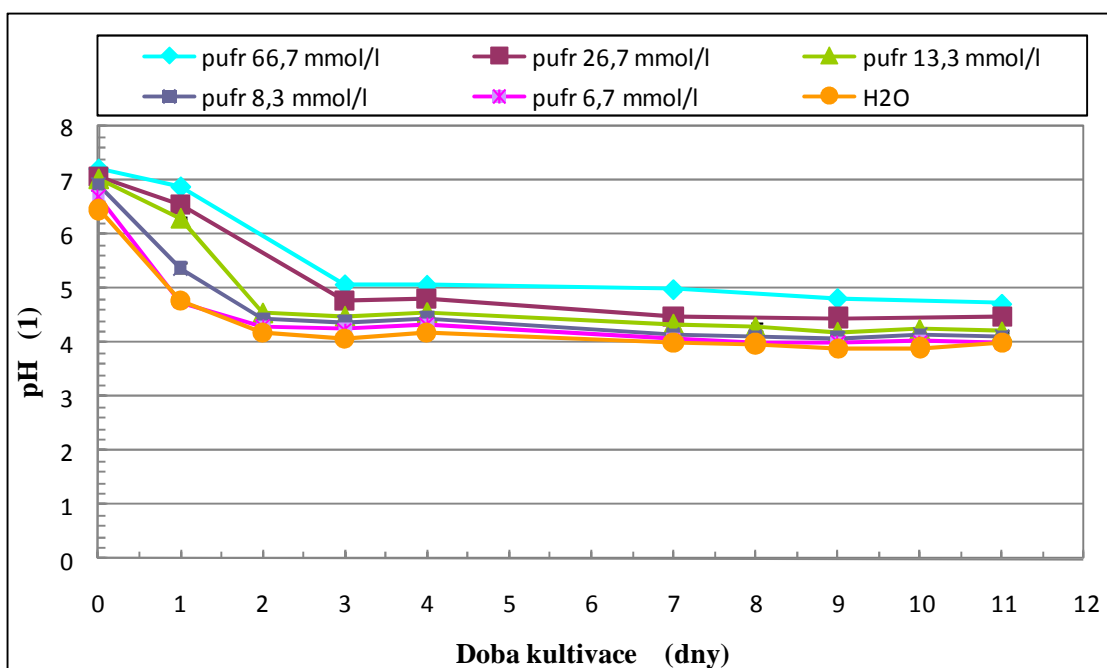
Následující testy byly tedy zaměřeny na optimalizaci tekutého kultivačního média a to jeho pufováním s použitím různě ředěných fosfátových pufrů a dále použitím různých koncentrací základních složek média.

Závislost růstu kultury PR a produkce ECP na pufraci živného média

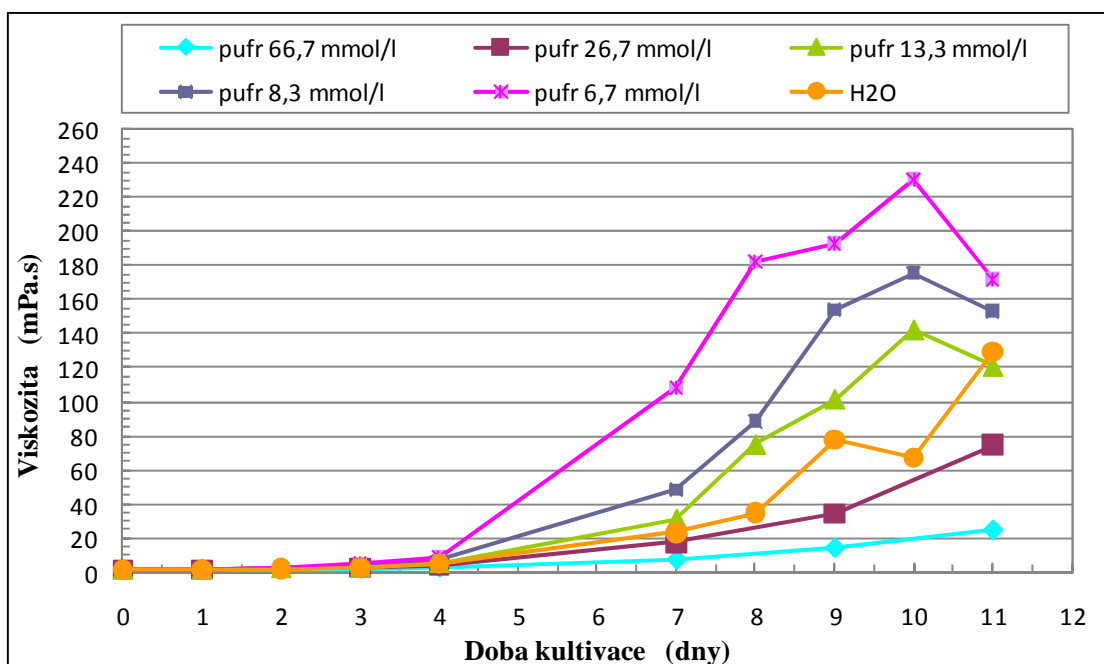
Byla vytvořena sada tekutých TYM médií, ve kterých byly jednotlivé složky (trypton, kvasničný autolyzát, sacharosa) rozpuštěny jednak v destilované vodě a jednak v různě ředěných fosfátových pufrach (66,7 mmol/l – 6,7 mmol/l, pH 7,5). V průběhu kultivace byl sledován růst bakterií pomocí měření OD₆₀₀ (Obr. 12), pH (Obr. 13) a viskozita médií (Obr. 14).



Obr. 12 Průběh růstu kultury PR v různě pufovaných Trypton kvasničných médiích s 10 % sacharosy



Obr. 13 pH různě pufovaných Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy během kultivace



Obr. 14 Viskozita různě pufrovaných médií v průběhu kultivace

Jak je patrné z Obr. 13, pH všech médií výrazně pokleslo v prvních třech dnech a poté se až do ukončení kultivace jen velmi nepatrně snižovalo. Po 11 dnech se tak ustálilo v rozmezí 3,9 – 4,7 (v závislosti na použitém pufru). Nejvýraznější pokles pH byl pozorován u média, jehož složky byly rozpuštěny v destilované vodě. Naopak nejmenší pokles byl zaznamenán u média s použitým neředěným fosfátovým pufrům 66,7 mmol/l. Stejný efekt, snížení pH kultivačního média během kultivace, byl pozorován i Tsuchiyem a kol. [109] při kultivaci kultury *L. mesenteroides*, kdy došlo k poklesu pH pufrovaného média z počátečních 7,0 na konečných 4,2.

Kultura PR rostla ve všech prostředích. Z dat uvedených na Obr. 12 je patrné, že během kultivace došlo ve všech typech médií v prvních třech dnech ke strmému nárůstu biomasy. Poté se během následujících dní zákal médií jen nepatrně měnil. Kultura rostla nelépe v médiu pufrovaném neředěným pufrům (66,7 mmol/l) a nejhůře v nepufrovaném prostředí (H₂O), které bylo doposud používáno.

Z pohledu zahuštění média bylo dosaženo nejlepších výsledků v médiu s pufrům 6,7 mmol/l, a to 230,0 mPa.s 10. den kultivace. Naopak jako nejhorší prostředí pro produkci exopolymery byl vyhodnocen neředěný fosfátový pufr 66,7 mmol/l, ve kterém bylo naměřeno maximum 24,4 mPa.s 11. den kultivace. Dříve používaná destilovaná voda se tímto pokusem ukázala jako jedna z podprůměrných variant, neboť při nejvyšším zahuštění bylo naměřeno 129,5 mPa.s.

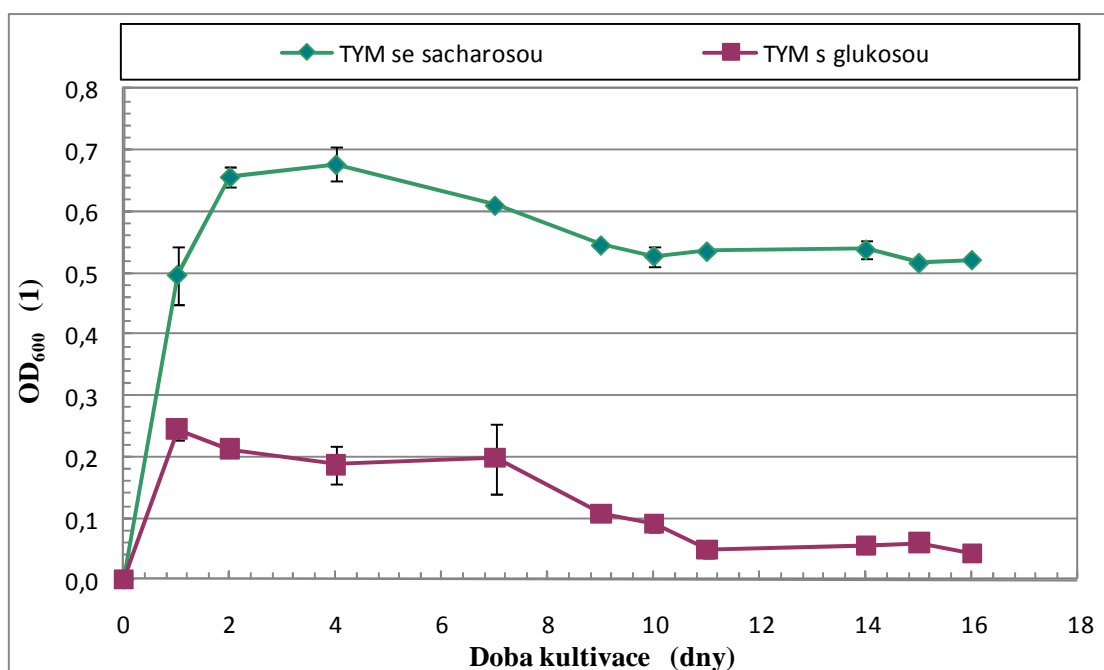
Výsledky dále ukázaly, že nejvyššího zahuštění bylo dosaženo při pH kolem 4,0 (11. den kultivace). Je tedy patrné, že kultuře PR toto nižší pH pro produkci ECP nevadí.

Porovnáním výsledků sledovaných parametrů lze konstatovat, že kultura, za podmínek vhodných pro maximální růst buněk, produkuje nejméně exopolymery a naopak při maximální produkci ECP vykazuje růst podprůměrný. Dále je zřejmé, že kultura pro dobrý růst a produkci ECP vyžaduje určitou koncentraci fosforečnanů, neboť v nepufrovaném prostředí byly dosaženy jedny z nejhorších výsledků.

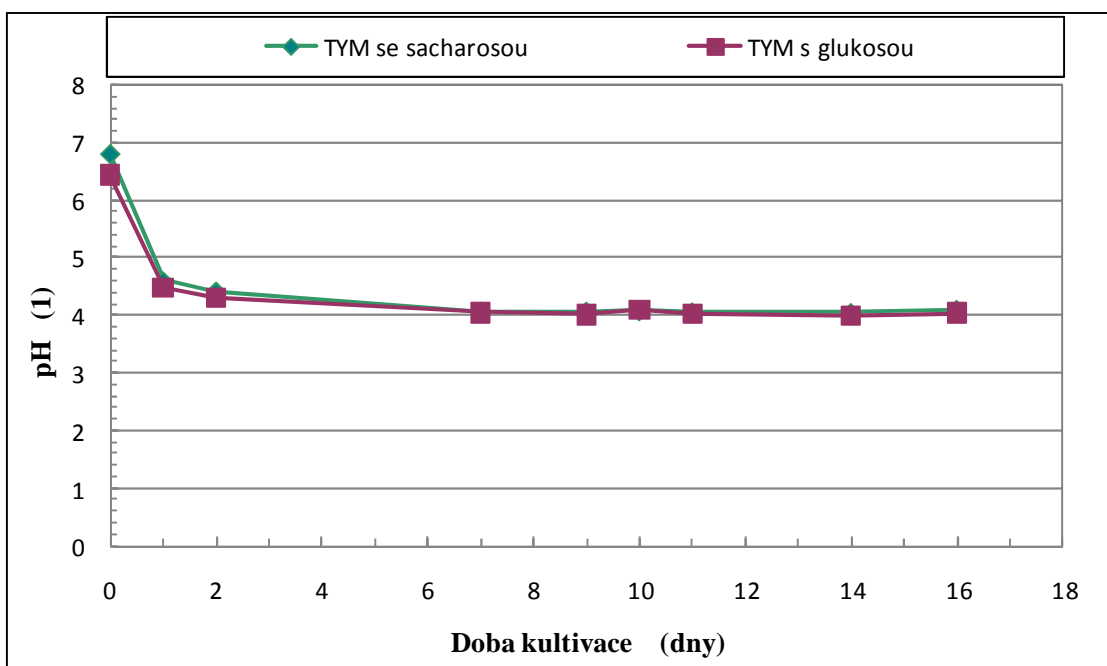
Vzhledem k získaným výsledkům byly další kultivační testy prováděny v tekutém médiu TYM s 10 % sacharosy, které bylo pufrováno ředěným fosfátovým pufrům 6,7 mmol/l.

Závislost růstu bakterie PR a produkce ECP na typu sacharidického substrátu

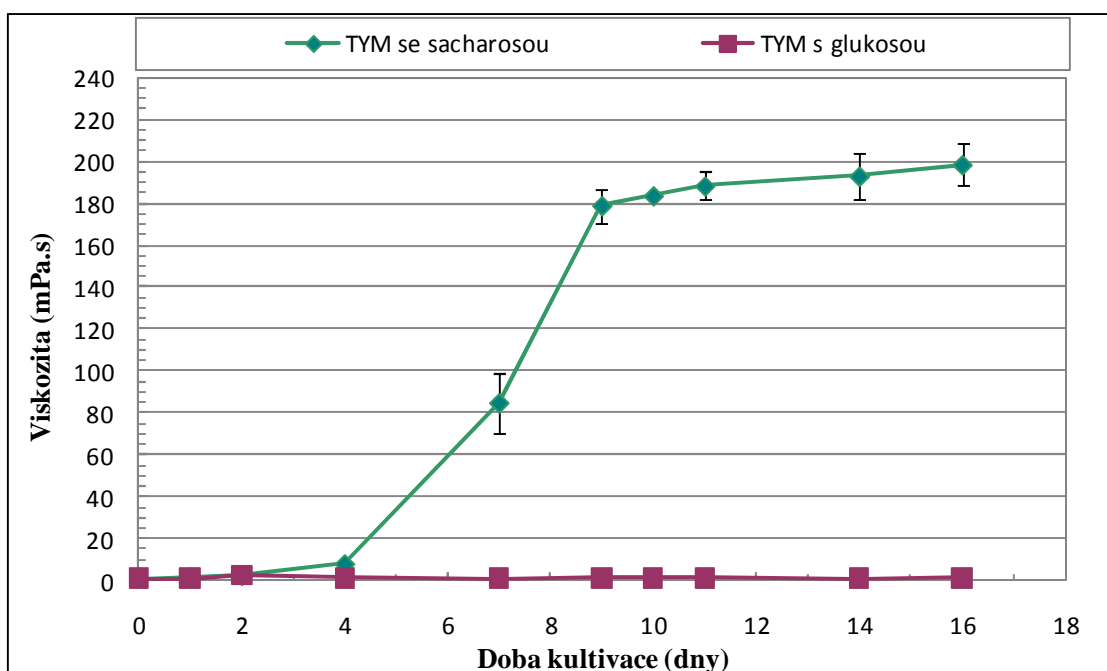
Při testech na pevných agarových půdách bylo zjištěno, že kultura PR je schopná vytvářet mukózní kolonie (Tab. 13) jak na substrátu s obsahem sacharosy, tak i glukosy. Tyto dva sacharidy byly tedy testovány i při kultivaci v pufrovaném TYM médiu a to v koncentraci 100 g/l. V průběhu kultivace byl sledován zákal, pH a viskozita kultivačních médií. Naměřená data jsou uvedena na následujících obrázcích (Obr. 15, 16 a 17).



Obr. 15 Růst kultury PR v tekutém Trypton kvasničném médiu s 10 % sacharosy, resp. s 10 % glukosy



Obr. 16 pH tekutých Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy, resp. s 10 % glukosy během kultivace kultury PR



Obr. 17 Viskozita kultivačních Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy, resp. s 10 % glukosy při kultivaci kultury PR

Z uvedených grafů je patrné, že kultura PR rostla velmi dobře v médiu se sacharosou, ale v médiu s glukosou jen velmi nepatrně. Průběh pH byl u obou médií prakticky stejný. Nejprve došlo během prvních dvou dnů k výraznému poklesu, ze 6,8 na 4,3, a poté následovaly dny ustálení, kdy hodnota pH skončila na 4,1. Nejvýraznější rozdíl v médiích byl zaznamenán v jejich viskozitách. Médium s obsahem sacharosy byla kultura schopna zahustit až na hodnotu

200 mPa.s (poslední den kultivace). Zahušťování bylo patrné již od 4. dne. Druhé médium, obsahující 10 % glukosy, kultura nebyla schopná zahustit vůbec. Jeho viskozita se od počátku až do konce kultivace nezměnila a po celou dobu se pohybovala kolem 1,0 mPa.s.

Tímto pokusem bylo potvrzeno, že sacharosa je jediný substrát, z něhož je kultura PR schopná produkovat v tekutém médiu zahušťující ECP. Stejného výsledku dosáhli i Tsuchiya a kol. [109] s kulturou *L. mesenteroides*, která také pro produkci exopolymeru dextranu vyžaduje výlučně médium s obsahem sacharosy.

Během tohoto pokusu bylo také prováděno i srážení produkovaného polymeru, avšak pouze z média s obsahem sacharosy. Srážení bylo prováděno ledovým acetonem v poměru 1:5 (objem kultivačního média:objem acetonu). Cílem bylo získat první data posuzující vztah mezi viskozitou a koncentrací přítomného polymeru, stejně jak popisuje ve své práci Stredansky a kol. [107]. Jednotlivé výtěžky jsou uvedeny v Tab. 21. Pokusy popisující optimalizaci postupu srážení jsou podrobněji popsány v kapitole 4.1.8.

Tab. 21 Výtěžnost ECP při kultivaci kultury PR v TYM s 10 % sacharosy

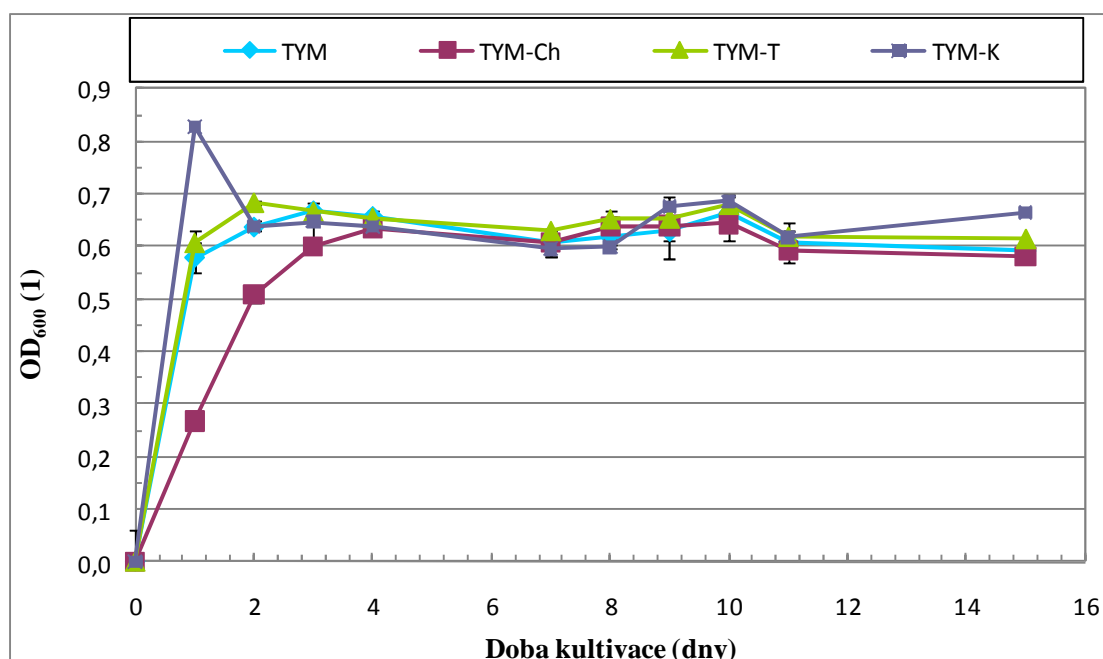
Délka kultivace [den]	Viskozita média [mPa.s]	Hmotnost média [g]	Hmotnost izolovaného ECP [g]	Výtěžnost hrubého ECP [%]
4.	8,0	44,6	2,18 ± 0,12	43,5
7.	84,9	44,5	2,48 ± 0,05	55,7
10.	183,7	48,8	3,03 ± 0,17	62,1
15.	166,0	48,3	2,94 ± 0,12	60,9

Dle uvedených výsledků bylo nejvíce exopolymeru (62,1 %) získáno z kultivačního média vykazujícího nejvyšší viskozitu (183,7 mPa.s, 10. den kultivace).

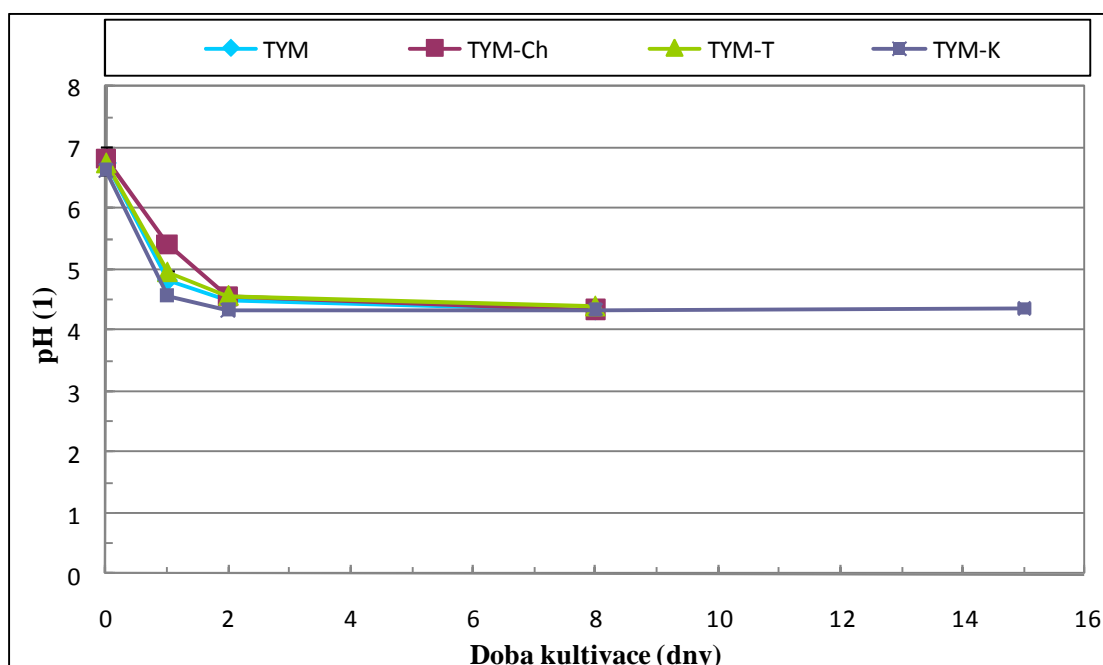
Závislost růstu kultury PR na různém obsahu tryptonu a kvasničného autolyzátu

Při kultivaci kultury PR v tekutém médiu s dvojnásobným množstvím základních látek (kapitola 4.1.6) byly naměřeny jedny z nejvyšších hodnot viskozit během krátké doby (5 dní, Tab. 19). Provedeným testem však nebylo zjištěno, která ze dvou komponent (trypton, kvasničný autolyzát) je za tento jev zodpovědná. Byl tedy přichystán nový pokus, kde byl sledován vliv různé koncentrace obou uvedených složek na viskozitu kultivačního média. Byly přichystány 4 verze pufovaného Trypton kvasničného média s 10 % sacharosy, a to média s běžným obsahem tryptonu a kvasničného autolyzátu (TYM), s dvojnásobným obsahem pouze tryptonu (TYM-T), resp. kvasničného autolyzátu (TYM-K) a s polovičním obsahem obou složek (TYM-Ch). Na níže

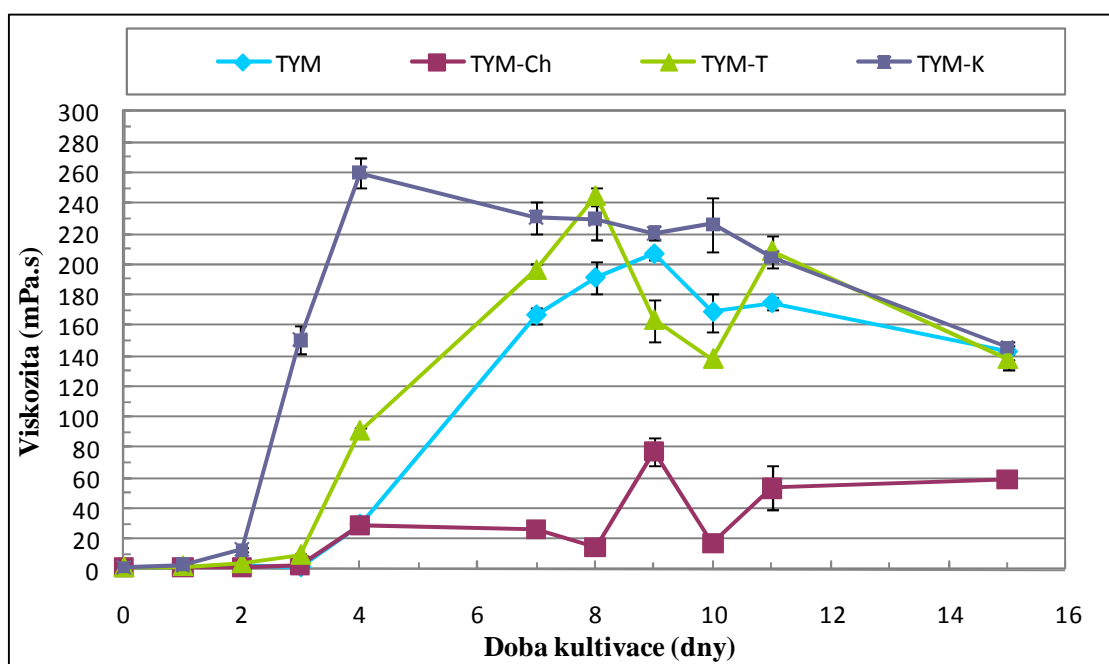
uvedených obrázcích (Obr. 18, 19 a 20) jsou zaznamenána naměřená data. V pokusu bylo také provedeno srážení exopolymeru z médií a to ve dnech maximální viskozity média a na konci kultivace. Získané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 22.



Obr. 18 Růst kultury PR v Trypton kvasničných médiích s 10 % sacharosy, s různým obsahem tryptonu a kvasničného autolyzátu



Obr. 19 pH tekutých Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy a s různým obsahem složek během kultivace kultury PR



Obr. 20 Viskozita Trypton kvasničných médií s 10 % sacharosy a s různým obsahem složek během kultivace kultury PR

Z uvedených výsledků je patrné, že kultura PR dobře rostla při všech použitých koncentracích živin. Velmi rychlý nástup růstu byl pozorován v médiu s dvojnásobným množstvím kvasničného autolyzátu. Nejpomaleji kultura rostla v médiu s polovičním množstvím obou složek (Obr. 18). Průběh pH byl ve všech médiích stejný jako v předešlých testech. Nejprve došlo k výraznému poklesu v prvních dvou dnech a poté k pozvolnému ustálení až na hodnotu 4,3 (Obr. 19). Největší rozdíly mezi médii byly zaznamenány v jejich viskozitách (Obr. 20). Kultura nejlépe zahušťovala médium s dvojnásobnou koncentrací kvasničného autolyzátu (TYM-K). Maximálního zahuštění bylo dosaženo již 4. den kultivace a to 260,0 mPa.s. Naopak nejméně byla kultura schopna zahušťovat médium s polovičním obsahem obou složek (TYM-Ch), a to jen na hodnotu 77,0 mPa.s (9. den kultivace).

Tab. 22 Výtěžnost exopolymeru z Trypton kvasničných médií obsahujících různé koncentrace tryptonu a kvasničného autolyzátu

Typ média	Délka kultivace [den]	Viskozita média [mPa.s]	Hmotnost média [g]	Hmotnost izolovaného ECP [g]	Výtěžnost [%]
TYM	9.	206,5	47,8	2,46 ± 0,03	51,5
	15.	142,5	48,2	2,94 ± 0,09	61,0
TYM-T	8.	244,5	47,1	2,70 ± 0,09	57,3
	15.	137,7	48,8	2,84 ± 0,13	58,2
TYM-Ch	6.	25,87	49,0	2,19 ± 0,15	44,7
	15.	58,6	49,1	2,68 ± 0,04	54,6
TYM-K	6.	260,0	47,3	3,23 ± 0,27	68,3
	15.	145,5	48,4	2,85 ± 0,16	58,9

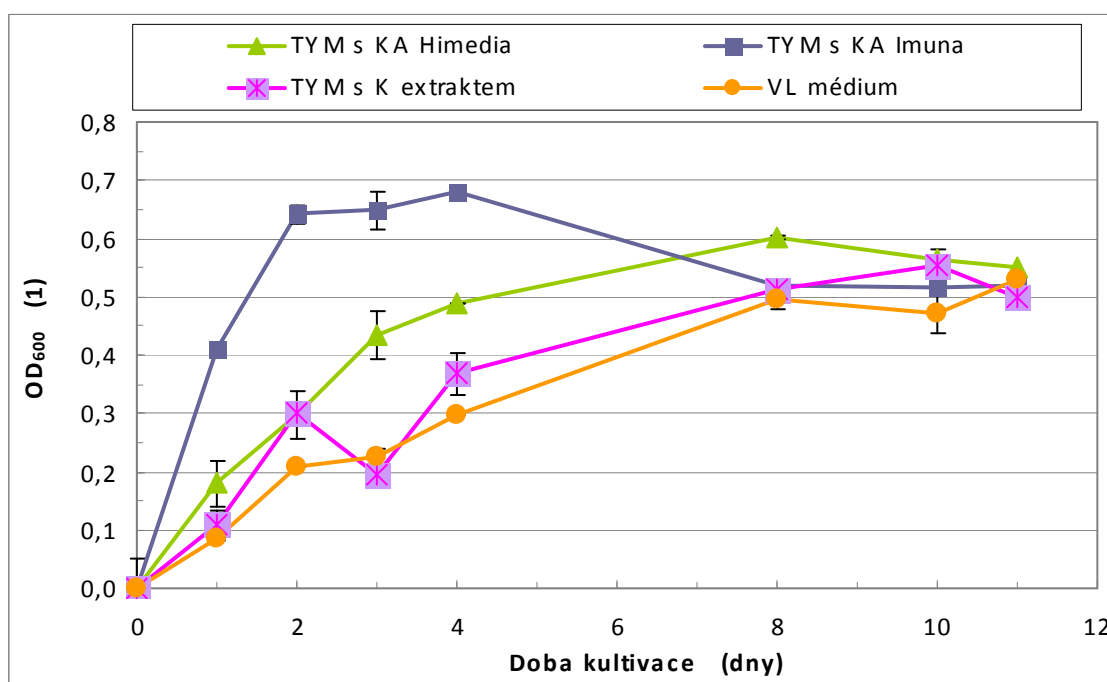
Z pohledu produkce exopolymeru bylo jako nejlepší médium vyhodnoceno opět médium s dvojnásobnou koncentrací kvasničného autolyzátu. Z něj bylo získáno 68,3 % hrubého ECP. Nejmenší výtěžnost (44,7 %) byla zaznamenána z média s polovičním obsahem obou složek. V tomto případě bohužel došlo ke zkreslení výsledků, neboť nebyla provedena izolace ECP při maximu viskozity média. Dva dny před tímto maximem došlo k mírnému poklesu viskozity média, což bylo mylně vyhodnoceno jako konečný pokles a bylo tak provedeno srážení. Bohužel maximum nastalo až v následujících dnech, kdy již nebyl k dispozici potřebný materiál. Přesto, při pozorování charakteru průběhu viskozity a výtěžnosti ECP poslední den kultivace, lze toto médium označit jako nejhorší pro produkci ECP.

V uvedených výsledcích zisku ECP z jednotlivých médií lze zaznamenat jistý nesoulad mezi mírou zahuštění média a množstvím izolovaného polymeru. Např. z média s běžnou koncentrací živin (TYM), mající viskozitu 206,5 mPa.s, bylo získáno 51,5 % exopolymeru a z média s polovičním obsahem obou živin (TYM-Ch) s viskozitou téměř 4x nižší (58,6 mPa.s) byla dosažena téměř totožná výtěžnost 54,6 %. Jedním z možných vysvětlení může být, stejně jako se zmiňuje Stredansky a kol. [107], různá molekulová hmotnost přítomného exopolymeru produkovaného v různou dobu kultivace. Tuto domněnku je však nutno více prozkoumat a prostudovat, což poskytuje námět pro další studium této kultury a jejího polymeru.

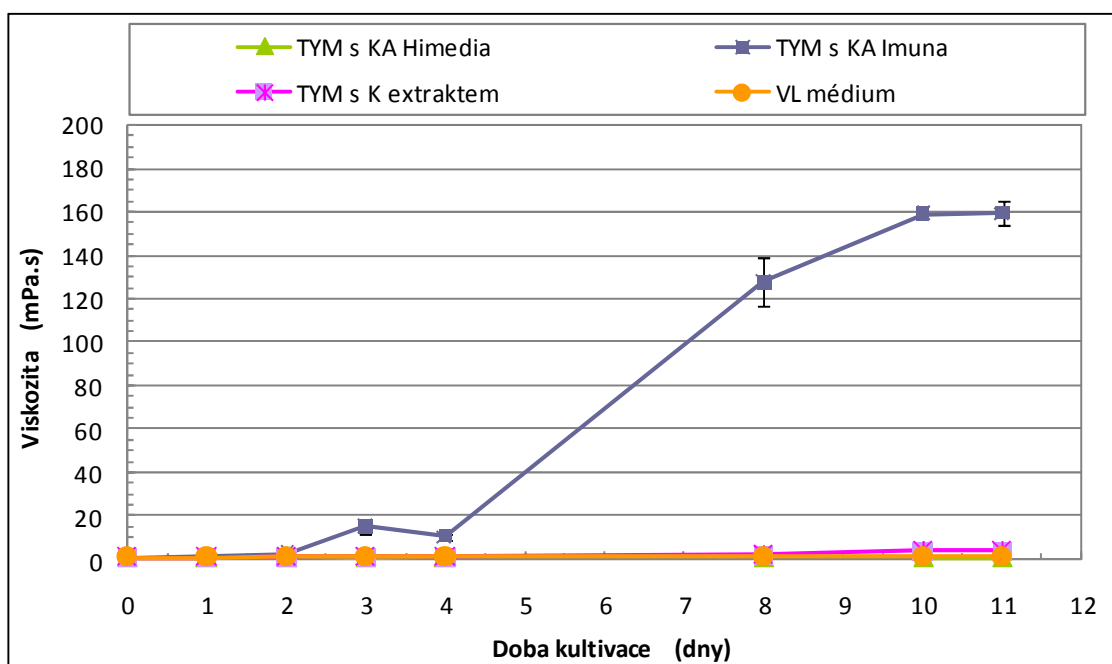
Z uvedených výsledků je patrné, že pro vyšší produkci exopolymeru vyžaduje kultura PR kultivační médium bohatší na živiny a to konkrétně na kvasničný autolyzát. Také bylo zjištěno, že není přímá úměra mezi viskozitou tekutého média a hmotností získaného hrubého polymeru.

Závislost růstu kultury PR a produkce ECP na typu použitého substrátu

V předešlém testu byl upřesněn kvasničný autolyzát jako složka, která kulturu PR podporuje v produkci exopolymery. Poslední kultivační test v tekutých médiích byl proto zaměřen na srovnání kvasničného autolyzátu dodaného od různých výrobců (Himedia a Imuna) a dále na ověření kvasničného extraktu od firmy Himedia. Také bylo nově testováno tekuté VL médium, které se při pokusech na pevných půdách jeví jako nejlepší z pohledu produkce biomasy, bez tvorby exopolymery. Nyní byla do tohoto typu média přidána i sacharosa (10 %). Během kultivace byl sledován růst kultury, pH a viskozita médií. Výsledky jsou uvedeny na následujících obrázcích (Obr. 21 a 22).



Obr. 21 Růst kultury PR v tekutých Trypton kvasničných médiích a VL médiu se sacharosou



Obr. 22 Viskozita Trypton kvasničných médií a VL média během kultivace kultury PR

Ze získaných dat je patrné, že kultura PR rostla ve všech typech médií. Nejlepšího růstu dosahovala v TYM s kvasničným autolyzátem firmy Imuna a nejhoršího ve VL médiu. Průběh pH médií měl stejný trend jako v předešlých testech. Z počáteční hodnoty 6,5 pH během prvních tří dní výrazně pokleslo a nakonec se snížilo na konečné 4,5. Z pohledu zahušťování média bylo vhodné pouze jediné médium - TYM s kvasničným autolyzátem fy Imuna. Toto jediné kultura dokázala zahušťovat, a to už od 3. dne kultivace. Maxima bylo dosaženo 11. den kultivace, kolem 160 mPa.s. Ostatní média nebyla kultura schopná zahustit vůbec, jejich viskozita se bez výjimky pohybovala jen kolem 2 mPa.s.

Jako nejlepší médium se tak ukázalo TYM s kvasničným autolyzátem firmy Imuna. Ostatní použité substráty, ať už kvasničným autolyzátem firmy Himedia, kvasničným extraktem firmy Himedia či samotné VL médium nevedly k uspokojivým výsledkům z pohledu zahušťování média a produkce polymeru.

Jako závěr ze všech provedených testů kultivace kultury PR v tekutých médiích lze tedy za nejvhodnější kultivační médium a postup kultivace z pohledu maximální produkce ECP považovat:

složení média:

- 12 g/l tryptonu
- 6 g/l kvasničného autolyzátem fy Imuna
- 100 g/l sacharosy
- ředěný fosfátový pufr 6,7 mmol/l

kultivace:

- poměr médium:vzduch 1:4
- vratná třepačka
- ve tmě při 25 °C

4.1.8 Optimalizace postupu izolace exopolymeru

První pokusy srážení exopolymeru byly zaměřeny na hledání nejlepších podmínek pro dosažení jeho maximální výtěžnosti. Zkoušky srážení sestávaly z nalezení vhodného centrifugačního režimu a následně z vytipování vhodných srážedel a srážecích poměrů. K pokusům byla použita větší dávka tekutého média, která byla zpracována různými postupy.

Před vlastním srážením ECP bylo potřeba odstranit buňky centrifugací. Byly zkoušeny tři různé intenzity – 10 000 g, 15 000 g a 20 000 g – s délkou centrifugace 30 minut. Vyhodnocení bylo prováděno dle nejvyššího množství zachycených buněk, což bylo určováno stanovením sušiny jejich promyté suspenze. Při 10 000 g bylo zachyceno množství buněk, jejichž suspenze měla sušinu 0,25 g/l, při 15 000 g 0,32 g/l a při 20 000 g 0,43 g/l. Na základě těchto zjištění byl pro odstranění buněk kultury po její kultivaci v tekuté médiu používán program s intenzitou centrifugace 20 000 g.

Po odstranění buněk bylo potřeba najít nejvhodnější srážedlo a srážecí poměr. Byl testován ethanol, aceton a isopropanol, a to ve srážecích poměrech 1:3 a 1:5 (objem živného média:objem srážedla). Izolace byla prováděna dle postupu Pištěkové [110]. K médiím zbavených buněk bylo přilito vychlazené srážedlo v uvedených poměrech a byl sledován vzhled vznikající sraženiny. Při použití ethanolu byla získána bílá sraženina a při acetonu a isopropanolu slabě žlutá. Po centrifugaci získaných směsí byly pozorovány rozdíly také v supernatantech. Supernatant s obsahem ethanolu byl mírně zakalený, s acetonem byl čirý a s isopropanolem byl velmi zakalený. Všechny vysrážené a následnou centrifugací izolované ECP byly vysušeny, zváženy a vyhodnoceny (Tab. 23).

Tab. 23 Výtěžnosti ECP při použití třech různých srážedel ve dvou srážecích poměrech

Typ srážedla	Srážecí poměr	Hmotnost suspenze [g]	Hmotnost izolovaného ECP [g]	Výtěžnost [%]
Ethanol	1:3	36,37	1,88	51,69
	1:5	36,80	2,03	55,16
Aceton	1:3	36,27	2,21	60,93
	1:5	36,11	2,50	69,23
Isopropanol	1:3	35,31	2,33	65,99
	1:5	35,80	2,37	66,20

Jako nejlepší srážedlo se dle uvedených dat ukázal aceton, a to v poměru 1:5. Za těchto podmínek bylo získáno téměř 70 % pevného nepřečištěného ECP (přepočítáno na vstupní množství sacharosy 100 g/l). Nejnižší hmotnosti exopolymeru byly dosaženy při použití ethanolu, v poměru 1:3, kdy bylo získáno cca 52 % ECP. Pro další srážení ECP byl tak používán aceton v poměru 1:5.

4.1.9 Základní charakteristiky částečně přečištěného exopolymeru

Získané vzorky exopolymeru byly podrobeny základním stanovením ke zjištění jejich charakteru. U vzorků byla provedena stanovení sušiny, popela v sušině, organického uhlíku v sušině, bílkovin v sušině a sacharidů v sušině. Výsledky jsou rozděleny do dvou sérií, v nichž bylo pracováno vždy se dvěma různými vzorky.

Série 1

V první sérii bylo pracováno se vzorky ECP, které byly získány po kultivaci kultury z tekutých Trypton kvasničných médií s normálním a s polovičním obsahem základních složek (TYM, TYM-Ch). Srážení polymeru proběhlo v čase maximálního zahuštění média.

Před vlastními stanoveními uvedených charakteristik byly vzorky ECP nejprve jedenkrát přečištěny (přesráženy) jejich znovurozpuštěním v 50 ml destilované vody, vysrážením acetonem, izolací centrifugací a následným vysušením. Tímto procesem došlo k určitým ztrátám, které jsou uvedeny v Tab. 24.

Tab. 24 Ztráty při jednom přesrážení exopolymeru – série 1

Izolace z tekutého média	Izolace z kultivačního dne	Hmotnost surového ECP [g]	Hmotnost přesráženého ECP [g]	Ztráty [%]
TYM	9	2,68	1,69	36,94
		2,64	1,73	34,47
TYM-Ch	6	2,46	1,57	36,18
		2,14	1,27	40,65

Jak je uvedeno v tabulce, přesrážením získaných exopolymerů vznikly 36 - 40% ztráty tohoto materiálu. Také došlo k určitým změnám ve vzhledu polymerů. Původně žluté až hnědé lepkavé polymery těžší než voda se přečištěním změnilly na bílo-žluté nelepkavé plovoucí na vodě.

Po uvedeném odstranění nečistot z polymerního materiálu byl tento znovu rozpuštěn a to v 500 ml destilované vody pro odstranění viskozity koloidního roztoku. Vzniklý roztok polymeru byl použit pro následná stanovení. Získaná data jsou uvedena Tab. 25 a jsou přepočítána na sušinu pevného ECP.

Tab. 25 Základní charakteristiky jedenkrát přečištěných vzorků exopolymeru

Označení vzorku	Sušina [%]	Popel [% _{v sušině}]	Obsah uhlíku [mg/g _{sušiny}]	Obsah bílkovin [mg/g _{sušiny}]	Obsah sacharidů [mg/g _{sušiny}]
TYM	86,22± 1,41	9,38± 0,97	450,9± 11,7	65,7± 0,3	1021,5± 1,3
TYM-Ch	86,01± 1,50	8,78± 0,56	441,2± 5,8	42,7± 7,3	1044,0± 209,6

Částečně přečištěné vzorky, získané při maximu viskozit tekutého média, obsahovaly cca 86 % sušiny a v této bylo obsaženo kolem 9 % nespalitelných složek. Vyšší hodnota popela v sušině polymeru může být dána nedostatečným přečištěním, kdy nebyly odstraněny všechny nečistoty přítomné v tekutém médiu. Z dalších stanovených charakteristik vyplývá vysoký obsah sacharidů, přes 1000 mg/g_{sušiny} a přítomnost malého množství bílkovin, v průměru 50 mg/g_{sušiny}. Uvedená naměřená vyšší koncentrace sacharidů je nereálné číslo a je pravděpodobně ovlivněna nepřesností stanovení a nedokonalým přečištěním polymeru. Stanovené množství bílkovin jsou také pravděpodobně nečistoty pocházející z kultivačního média či extracelulární produkty kultury. Předpokládá se, že zjištěné bílkovinné sloučeniny nejsou součástí ECP. Na základě zjištění výše uvedených nepřesností, byla provedena druhá série stanovení, ve kterém však byly použité vzorky exopolymerů přečištěny dvakrát.

Série 2

Druhá série byla provedena za účelem vylepšení izolační procedury a získání čistšího vzorku exopolymeru. Pro tuto sérii byly použity dva vzorky ECP získané srážením z tekutých médií s běžným obsahem živin (TYM) a s vyšším obsahem kvasničného autolyzátu (TYM-K). Srážení exopolymeru proběhlo na konci kultivace kultury PR. Přečištění vzorků probíhalo stejně jako v předešlém případě. Spočívalo v rozpuštění ECP v 50 ml destilované vody, jeho vysrážení acetonem, v separaci centrifugací a v sušení. U těchto vzorků však bylo provedeno toto čištění 2x za sebou a vzorky byly při jakémkoliv přemísťování z kyvet odebrány s maximální pečlivostí, pro vysokou výtěžnost. I přes pozornější zpracování byly zjištěny ztráty, které jsou uvedeny v Tab. 26.

Tab. 26 Ztráty při dvojnásobném přesrážení exopolymeru – série 2

Izolace z tekutého média	Izolace z kultivačního dne	Hmotnost surového ECP [g]	Hmotnost přesráženého ECP [g]	Ztráty [%]
TYM-K	15	2,46	1,71	30,5
		2,78	1,78	36,0
TYM	15	2,90	1,84	36,6
		2,75	1,74	36,7

Dvakrát přečištěné vzorky polymerů byly opět znovu rozpuštěny v 500 ml destilované vody a ve vzniklých roztocích polymeru byly stanoveny charakteristiky. Jejich výsledky jsou uvedeny v Tab. 27.

Tab. 27 Základní charakteristiky dvakrát přečištěných vzorků exopolymeru

Označení vzorku	Sušina [%]	Popel [% v sušině]	Obsah uhlíku [mg/g _{sušiny}]	Obsah bílkovin [mg/g _{sušiny}]	Obsah sacharidů [mg/g _{sušiny}]
TYM-K	76,30± 0,25	1,12± 0,12	482,5± 4,6	21,7± 2,1	850,2± 32,7
TYM	81,98± 1,45	1,57± 0,11	477,0± 10,8	31,1± 4,0	958,6± 3,6

Oproti vzorkům z předešlé série byla ve vzorcích série 2 zjištěna nižší sušina (cca 79 %) a mnohem nižší obsah popelovin v sušině, kolem 1,5 %. U vzorků dvakrát přečištěných bylo také stanoveno mnohem menší množství bílkovin a sacharidů. Bílkovin bylo nalezeno téměř o polovinu méně a sacharidů o desetinu méně ve srovnání se vzorky přečištěnými jedenkrát. Rozdíly v zastoupení stanovených sloučenin mohly být dány jednak rozdílným přečištěním, jednak dobou kultivace, ve které byl exopolymer srážen, ale taktéž i různým složením kultivačních médií, ze kterých bylo srážení prováděno.

Uvedená stanovení znamenají jen základní popis. Nevypovídají nic o složení, struktuře, ani o molekulové hmotnosti. Pro jejich zjištění byl navázán kontakt se specializovaným pracovištěm Chemického ústavu Slovenské akademie věd (SAV) v Bratislavě.

4.1.10 Strukturní testy prováděné s exopolymerem

Pro objasnění struktury získaného vzorku exopolymeru bylo spolupracováno s externím pracovištěm – Chemickým ústavem SAV. Pro toto pracoviště byla provedena velkoobjemová kultivace (v 1100 ml tekutého média) s cílem získání většího množství ECP kultury PR. Kultivace probíhala v Trypton kvasničném médiu s běžnou koncentrací základních látek a s 10 % sacharosy, na výkyvné třepačce, ve tmě, při 25 °C. Kultivace byla ukončena 9. den, kdy dle výše uvedených testů kultura vykazovala nejvyšší produkci exopolymeru. Z média byly odstraněny buňky centrifugací (20 000 g, 30 min.) a ze získaných 800 ml viskozního supernatantu bylo vychlazeným acetonem vysráženo 48 g hrubého ECP. Takto získaný vysušený vzorek exopolymeru byl odeslán na SAV, Centrum Glykomiky. Zde byl vzorek nejprve purifikován dialýzou a poté byla zkoumána jeho struktura za použití různých metod. Ve vzorku exopolymeru bylo provedeno stanovení neutrálních sacharidů, obsahu uronových kyselin, velikosti oligosacharidů po částečné hydrolýze, molekulové hmotnosti, dále analýza typu vazeb či zjištění specifické optické otáčivosti. ECP tak byl zkoumán za použití GC-MS, gelové filtrační chromatografie, NMR a FT-IR spektroskopie. Těmito stanoveními bylo zjištěno, že získaný exopolymer je téměř lineární homopolysacharid typu glukopyranosy s převažujícími (91 %)

vazbami α -1,6 a s velmi krátkými a málo četnými postranními řetězci. Ve struktuře neobsahuje žádné dusíkaté sloučeniny. Jeho molekulová hmotnost převyšuje $2 \cdot 10^7$ Da. Tento polymer je novým typem dextranu a řadí se mezi dextransy 1. třídy. Uvedené výsledky a podrobnější popis struktury polymeru jsou uvedeny ve společné publikaci [111]. V současné době se dále provádí testování polymeru, pro jeho možnou aplikaci ve farmacii, např. jako antioxidant nebo látka mající antitusické účinky.

4.2 Výsledky získané zkoumáním kultury FR8

4.2.1 Izolace kultury a výsledky získané v průběhu studentské vědecké činnosti

Kultura FR8 byla izolována spolu s několika dalšími bakteriálními kulturami v roce 2004 v rámci studentské vědecké práce [90] a to z aktivovaného kalu ČOV Fryšták, který vykazoval známky viskózního bytnění. Většina získaných izolátů patřila k běžným bakteriálním druhům, jež byly z pohledu tvorby extracelulárních polymerů již relativně dobře popsány (*Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Leuconostoc mesenteroides*). Kultura FR8 se však od ostatních poněkud odlišovala v charakteru kolonií – na rozdíl od silně mukózních kolonií výše uvedených kmenů byla její biomasa na pevných půdách značně soudržná, špatně odejíratelná a velmi obtížně suspendovatelná ve fyziologickém roztoku. Tato vlastnost byla nejvýraznější na Trypton kvasničném agaru (TYA) s 1,5 % glukosy a 1,5 % sacharosy. Na těchto půdách kultura vytvářela drobné, lesklé a velmi hladké žlutě pigmentující kolonie. Preparát připravený barvením dle Hisse naznačoval možnou přítomnost nepříliš silného, slabě barvitelného pouzdra (Obr. 23).



Obr. 23 Kultura FR8 s obarvenými pouzdry - barvení dle Hisse

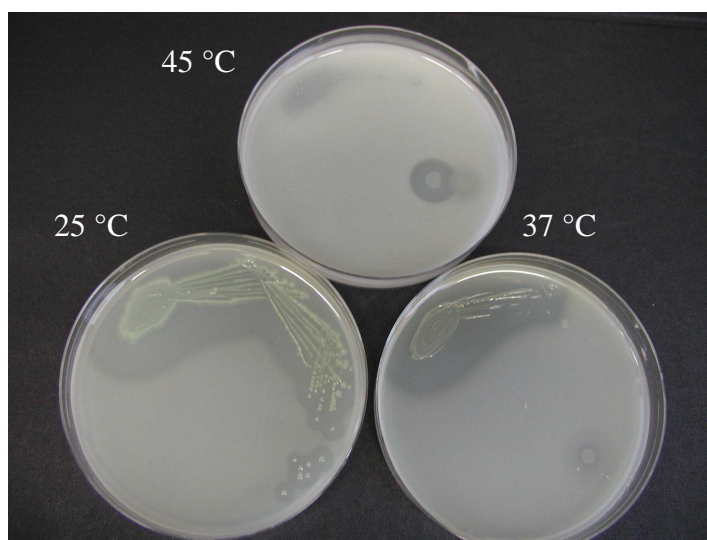
Kultura byla na základě sekvence části genu pro 16S rRNA identifikována v mikrobiologické laboratoři VŠCHT Praha jako *Pseudoxanthomonas* sp.

Protože v odborné literatuře nebyly doposud publikovány žádné práce týkající se tvorby extracelulárních polymerů u tohoto bakteriálního rodu, stalo se studium kultury FR8 náplní další části disertační práce. Cílem bylo také posouzení, zda běžné metody, používané při studiu bakteriálních producentů ECP, budou použitelné i u této kultury.

4.2.2 Růstové vlastnosti kultury *Pseudoxanthomonas* sp. FR8

Barvením dle Grama bylo zjištěno, že kultura je tvořena gramnegativními drobnými tyčinkami. Měřením jejich velikostí pomocí softwaru QuickPHOTO PRO 2,0 (Olympus) byla zjištěna jejich šířka 0,2 - 0,5 μm a délka 0,7 - 1,9 μm .

Růstové vlastnosti kultury byly sledovány na Trypton kvasničných agarrech (TYA) s přidavky různých živin. Kultura tak byla kultivována na TYA agarrech s přidavky 2 % glukosy nebo sacharosy, dále s přidavky 2 % glycerolu nebo pyrohroznanu a mléčnanu a také na kaseinovém agaru. Kultivace probíhala při teplotách 25 °C a 37 °C. Po 4 dnech kultivace dosahovala kultura nejlepšího růstu na TYA s 2 % glukosy při 25 °C. Dobrý růst vykazovala také na TYA s 2 % glycerolu a nebo s 2 % sacharosy a na kaseinovém agaru. Na půdě TYA s 2 % pyrohroznanu a mléčnanu rostla jen velmi neochotně. Při kultivační teplotě 37 °C byl, oproti teplotě 25 °C, růst kultury omezený na všech testovaných půdách. Kultura byla také kultivována při teplotě 45 °C, ale pouze na kaseinovém agaru, kde však rostla jen nepatrně. Při kultivaci na kaseinovém agaru byla při všech teplotách pozorována schopnost rozkladu kaseinu (indikováno vznikem prosvětlených zón v okolí narostené biomasy – Obr. 24).



Obr. 24 Kultura FR8 na kaseinovém agaru při různých teplotách, 4. den kultivace

Během růstových testů na agarových půdách byly pozorovány rozdíly v charakteru biomasy nakultivované na různých půdách. Na TYA s 2 % glukosy vytvářela kultura velmi soudržnou a kompaktní biomasu, která při nabírání na kličku tvořila tenká pružná vlákna (Obr. 25), naproti tomu na kaseinovém agaru se narostená biomasa kultury podobala běžným bakteriím, byla spíše pastovitého charakteru, krémovitá, bez soudržnosti a schopnosti tvorby vláken, jak dokládá Obr. 26.



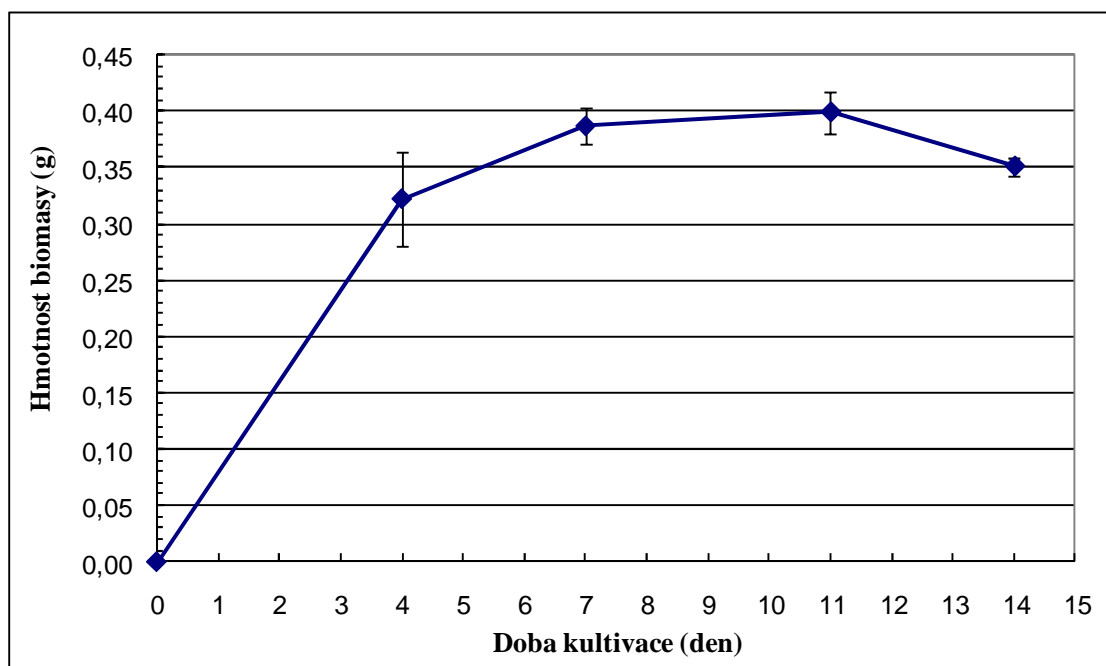
Obr. 25 Vzhled soudržné biomasy kultury FR8 na TYA s 2 % glukosy při použití kličky



Obr. 26 Vzhled biomasy kultury FR8 na kaseinovém agaru

Bylo tedy patrné, že kultura *Pseudoxanthomonas* sp. FR8 je schopná vytvářet na různých pevných půdách biomasu se značně odlišnou konzistencí.

Vzhledem k pomalému růstu kultury na agarových půdách byla zjištěna vhodná délka kultivace. Kultura byla kultivována na TYA s 2 % glukosy při 25 °C. Během kultivace bylo vážkovým stanovením biomasy sledováno její vyprodukované množství. Naměřená data jsou uvedena na Obr. 27.



Obr. 27 Produkce biomasy kultury FR8 během kultivace na TYA s 2 % glukosy

Dle provedeného testu kultura produkovala nejvíce biomasy až 11. den kultivace. V dalších testech však byla používána délka kultivace 4 dny, kdy již bylo množství biomasy dostačující a přitom kultura ještě nedospěla do stacionární fáze růstu.

4.2.3 Druhov^á identifikace kultury

Druhov^á identifikace kultury FR8 byla provedena metodou sekvenace genu pro 16S rRNA v Laboratoři molekulárních metod Státního veterinárního ústavu Praha. Zde byla získána sekvence téměř celého úseku 16S rDNA (1509 nukleotidů, GenBank No. HQ727994), která byla srovnána s údaji v GenBank pomocí programu BLAST [99]. Porovnávaná sekvence se nejvíce shodovala s druhem *Pseudoxanthomonas mexicana*, a to s 99% pravděpodobností.

4.2.4 Diskuse výsledků s odbornou literaturou

Rod *Pseudoxanthomonas* byl uznán jako vědecky platný rod v roce 2000. Jde o gramnegativní aerobní tyčinky, které na Trypton kvasničných půdách vytváří žlutě pigmentující kolonie [112]. Během posledních let byly popsány 4 druhy tohoto rodu, které byly většinou izolovány z různých technologických zařízení či provozů. Byly to *Pseudoxanthomonas broegbernensis*, izolovaná v roce 2000 z biofiltrů čistících odpadní vzduch z kafilérie [112], *Ps. taiwanensis* izolovaná v roce 2002 z horkých pramenů ve východním Taiwanu [113] a o dva roky později z různých částí celulózy ve Finsku [114] a *Ps. japonensis* nalezená v roce 2004 ve znečištěné městské půdě v Japonsku [115]. Posledním doposud izolovaným druhem tohoto rodu byla *Ps. mexicana* nalezená v roce 2004

v Mexiku, v anaerobním digestoru [115], a v roce 2005 ve Španělsku jako součást bakteriálního konsorcia schopného degradovat v půdách přítomný herbicid simazin [116]. Všechny uvedené bakterie vykazují schopnost redukce NO_2^- (ale nikoli NO_3^-) na N_2O .

V literatuře jsou v současné době zmínky o dvou konkrétních kulturách druhu *Pseudoxanthomonas mexicana*. První, kultura *Ps. mexicana* AMX 26B^T, byla izolována z anaerobní vyhnívací nádrže zpracovávající odpadní vody ze sýrárny. Druhá, kultura *Ps. mexicana* UR374_02, byla nalezena v moči desetiletého chlapce. Přítomnost bakterie v tomto klinickém vzorku byla vysvětlována jako důsledek kontaminace způsobené dlouhodobým zavedením katetru u pacienta. Není tedy nutné na tento druh pohlížet jako na patogena. [115] Bakterie *Ps. mexicana* obsahuje bičík a je tedy schopná pohybu. Roste při 10 °C ale ne při 41 °C. Její růstové teplotní optimum je uváděno 30 – 37 °C. [112]

Kultura FR8 je gramnegativní tyčinka, tvořící při růstu na TYA agaru žluté kolonie, což odpovídá obecnému popisu rodu *Pseudoxanthomonas*. Kultura FR8 vykazuje nejlepší růst při teplotě 25 °C a nepatrný i při 45 °C. Stejně jako *Ps. mexicana* hydrolyzuje kasein. Pozorovaná rozdílná konzistence biomasy kultury FR8 rostoucí na TYA s glukosou a na kaseinovém agaru nebyla dosud v žádné publikaci zmiňována. Jde tedy o dosud nepopsanou vlastnost bakterie *Pseudoxanthomonas mexicana*.

4.2.5 Suspendační pokusy s biomasou kultury FR8 a elektroforetická separace

Po růstových testech byly další pokusy s kulturou FR8 zaměřeny na zkoumání biomasy různé konzistence, kterou kultura vytvářela při růstu na TYA agaru s glukosou a na kaseinovém agaru. Nejdříve byly testy zaměřeny na soudržnou biomasu rostoucí na TYA agaru s glukosou s cílem objasnit, jaký typ sloučeniny je za uvedenou soudržnost zodpovědný. Následně bylo studium orientováno na srovnání vlastností biomasy získané z obou typů výše zmíněných agarových pěstí.

Jelikož se literatura u druhu *Ps. mexicana* nezmiňuje o přítomnosti extracelulárního materiálu, bylo nutné pro další studium kultury nejdříve ověřit vhodné metody. Nejprve byly zkoušeny postupy běžně užívané při studiu extracelulárních sloučenin, a které již byly odzkoušeny u exopolymeru kultury PR.

První kroky vedly k převedení případného exomateriálu do roztoku a to suspendací narostené biomasy ve vhodném roztoku. Jako první suspendační roztok byl použit fyziologický roztok. Biomasa rostoucí 4 dny na TYA s 2 % glukosy byla kvantitativně odebrána z agarových misek a v poměru 1:1,5 (biomasa:roztok) byla suspendována. Intenzivním ručním třepáním docházelo k velmi pozvolné a velmi neochotné suspendaci biomasy. Ani po několika

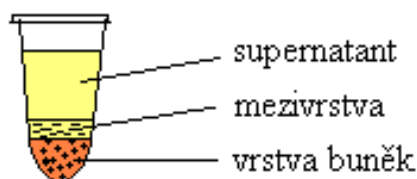
hodinách třepání (4 hod.) však nedošlo k vytvoření homogenní suspenze. Stále byly přítomny malé kousky nerozsuspendované biomasy. S tímto vzorkem bylo přesto dále pracováno.

Dalším krokem bylo oddělení buněk od tekutiny centrifugací.

Hledání vhodného centrifugačního programu

V této části bylo hlavním úkolem najít nejvhodnější centrifugační program pro oddělení buněk a extracelulárních látek uvolněných do tekutiny. Pro vzorky suspenzí byly použity dvě různé centrifugy – jedna pro mikrokyvety (vzorky biomasy smíchané s roztokem v poměru 1:1,5) a druhá pro 15 ml kyvety (vzorky biomasy smíchané s roztokem v poměru 1:5).

Byly zkoušeny různé intenzity centrifugace, od 3 000 g po 30 000 g. U nízkých intenzit (3 000 g) byla sledována jen minimální sedimentace biomasy. Při použitých středních přetíženích (5 000 g – 10 000 g) došlo k dobré sedimentaci buněk a vytvoření tzv. mezivrstvy, nejlepších výsledků však bylo dosaženo u nejvyššího použitého přetížení 30 000 g (mikrokyvety), resp. 16 000 g (15 ml kyvety) s dobou centrifugace 15 min. Za těchto podmínek došlo k vytvoření silné vrstvy buněk, tenké mezivrstvy a viskózního, žlutě zabarveného, ale čirého supernatantu - viz Obr. 28.



Obr. 28 Schéma rozvrstvení suspenze biomasy kultury FR8 po centrifugaci (30 000 g, 15 min.)

Získané mezivrstvy byly podrobeny mikroskopickému pozorování. Ve všech zkoumaných preparátech byla zaznamenána přítomnost značného množství buněk, což ukázalo na jejich nedostatečné oddělení od předpokládaného extracelulárního pojivového materiálu přítomného v této mezivrstvě. Mikroskopie byla také provedena u velmi viskózního supernatantu získaného centrifugací s parametry 30 000 g, 15 min. Zde nebyly nalezeny žádné buňky. Takto získaný supernatant byl dále použit jako vzorek pro testování složení přítomných rozpuštěných látek.

Vytvořená mezivrstva nebyla však ani při nejvyšších otáčkách centrifugace dokonale ohraničena. Při odebírání supernatantu docházelo postupně k jejímu odtrhávání a znehodnocování vzorku supernatantu. Navíc byla prakticky neoddělitelná od spodní vrstvy buněk, a tak při jejím odjímání ji nebylo možné získat bez kontaminace přisedlými buňkami.

Suspendace biomasy v různých suspendačních činidlech a první zkoušky separace SDS-PAGE

Jelikož se při použití fyziologického roztoku nepodařilo získat homogenní suspenze biomasy, bylo další testování zaměřeno na hledání vhodného roztoku, který by zlepšil suspendaci soudržné biomasy a separaci produkovaného extracelulárního materiálu pravděpodobně stále přítomného v mezivrstvě. V následujících pokusech proto byly zkoušeny roztoky různých složení. V první sérii byly použity následující:

- TRIS pufr o pH 8
- 8M roztok močoviny v TRIS
- 2% roztok Tweenu 80 v TRIS
- směs 8M roztoku močoviny a 2% roztoku Tweenu 80 v TRIS
- fyziologický roztok

Postup suspendace byl obdobný jako v předešlém případě. Napěstovaná biomasa byla odebrána z misek a k ní byl přidán příslušný roztok v poměru 1:1,5. Směs byla třepána na třepáče (300 rpm), avšak po téměř tříhodinové suspendaci byly stále ve všech suspenzích přítomny kousky kompaktní, špatně oddělitelné biomasy. Všechny vzorky byly přesto zcentrifugovány (30 000 g, 15 min., 25 °C). Při použití čistého TRIS pufru, Tweenu v TRIS a fyziologického roztoku došlo k sedimentaci buněk a k vytvoření velmi tenké mezivrstvy. Ve zbylých suspenzích byl pouze náznak vrstvy buněk bez ostrých hranic, která postupně přecházela přímo do supernatantu. V těchto vzorcích nebyla mezivrstva pozorována. Pomocí žádného činidla nebyl získán viskózní supernatant.

Na základě získaných výsledků byl pokus suspendace opakován s méně koncentrovanými roztoky a se dvěma roztoky použitými v předešlé sérii – TRIS pufr a fyziologickým roztokem. Byly tedy použity tyto roztoky:

- TRIS pufr o pH 8
- 0,5M roztok močoviny v TRIS
- 1M roztok močoviny v TRIS
- 3M roztok močoviny v TRIS
- 0,2% roztok Tweenu 80 v TRIS
- fyziologický roztok

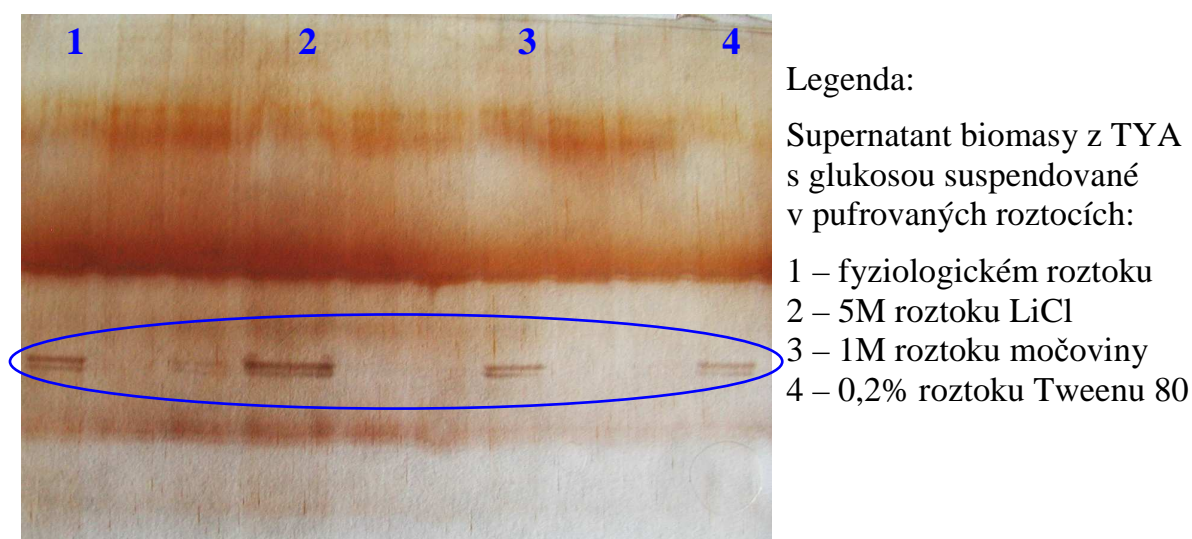
Při této sérii suspendací biomasy byly navíc zkoušeny nové postupy, které by mohly napomoci lepšímu uvolňování extracelulárních látek do roztoku. Nyní byla směs biomasy a příslušného suspendačního roztoku nejprve 5 min. protřepávána na Vortexu a poté byla umístěna do 25 °C na výkyvnou třepáčku (300 rpm). Ani v těchto roztocích o nižších koncentracích a při upraveném postupu však nebyly po 2 hod. třepání vytvořeny homogenní suspenze. Ve všech vzorcích byla pozorována nerozsuspendovaná biomasa vláknitého charakteru. Byla tak provedena nová série suspenadcí. Jako suspendační roztoky byly

použity opět některé roztoky testované v předešlých pokusech, ale nyní byly pufovány fosfátovým puforem a navíc byl nově použit i roztok lithných iontů, který dle literatury [117] napomáhá uvolnění špatně oddělitelných extracelulárních struktur. V této sérii tak byly použity následující suspenzační roztoky:

- pufovaný fyziologický roztok
- 1M roztok močoviny v pufovaném fyziologickém roztoku
- 0,2% roztok Tweenu 80 v pufovaném fyziologickém roztoku
- 5M LiCl v pufovaném fyziologickém roztoku

I při tomto pokusu byl pozměněn suspenzační postup. Biomasa smíchaná s příslušným roztokem byla nejprve 10 min. protřepávána na Vortexu a poté byla umístěna do 4 °C, kde byla za občasného promíchání ponechána 30 min. Poté byly vzorky znovu protřepány a zcentrifugovány. V žádném vzorku nebyla zaznamenána přítomnost mezivrstvy.

Po této suspenzační sérii byly navíc vzorky čirých neviskózních supernatantů dány k elektroforetické separaci sodium dodecyl sulfát polyakrylamidovou gelovou elektroforezou (SDS-PAGE), která by mohla do jisté míry poukázat na přítomnost a množství bílkovinných sloučenin. Získaný záznam je uveden na Obr. 29.

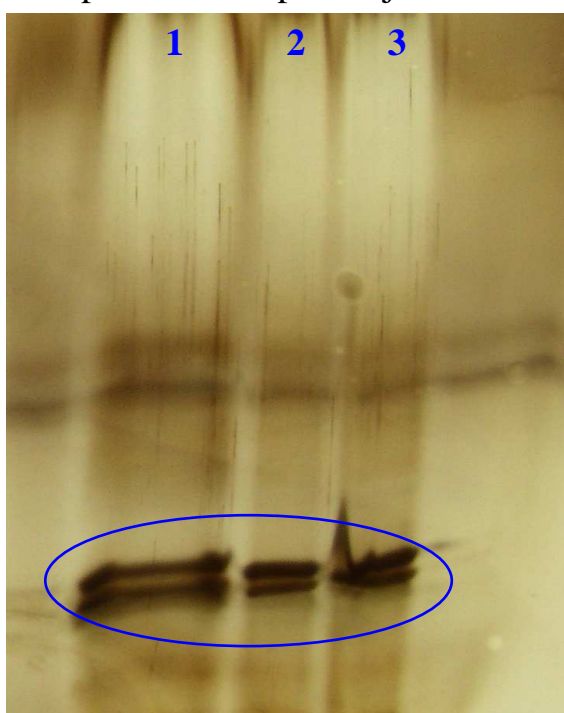


Obr. 29 První SDS-PAGE separace vzorků supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 napěstované na TYA s glukosou – barvení stříbrem

Jak je vidět na obrázku výřezu gelu, byly pomocí všech použitých činidel do supernatantů převedeny dvě bílkovinné sloučeniny velmi blízkých molekulových hmotností. Je tedy zřejmé, že kultura při růstu na TYA s glukosou produkuje extracelulární materiál bílkovinné povahy, který je možné použitými roztoky a postupy převést do roztoku.

Ačkoliv byly v tomto pokusu zaznamenány bílkovinné látky, byla odzkoušena další úprava postupu suspendace, která by mohla získání

extracelulárního materiálu ještě zvýšit či usnadnit. Jako suspendační činidla byly opět použity pufovaný fyziologický roztok a roztok lithných iontů (5M LiCl v pufovaném fyziologickém roztoku), které byly smíchány s biomasou v poměru 1:3 (biomasa:roztok). Byly přichystány 3 vzorky, z nichž každý byl podroben jinému procesu suspendace. Jeden vzorek s pufovaným fyziologickým roztokem byl 20 min. třepán pouze na Vortexu, druhý vzorek s pufovaným fyziologickým roztokem byl 20 min. temperován na 50 °C a poté byl dalších 20 min. roztřepáván na Vortexu. Poslední vzorek s roztokem lithných iontů byl 20 min. roztřepáván na Vortexu a poté byl za občasného promíchávání ponechán 30 min. ve 4 °C. Po provedených procedurách byly všechny vzorky zcentrifugovány a supernatanty byly podrobeny elektroforetické separaci. U žádného vzorku nebyla opět po centrifugaci pozorována mezivrstva. Záznam z provedené separace je uveden na Obr. 30.



Legenda:

Supernatant biomasy z TYA s glukosou suspendované v roztocích pufovaných fosf. puforem:

- 1 – 5M LiCl
- 2 – fyziologický roztok
- 3 – fyziologický roztok (směs při suspendaci zahřáta na 50 °C)

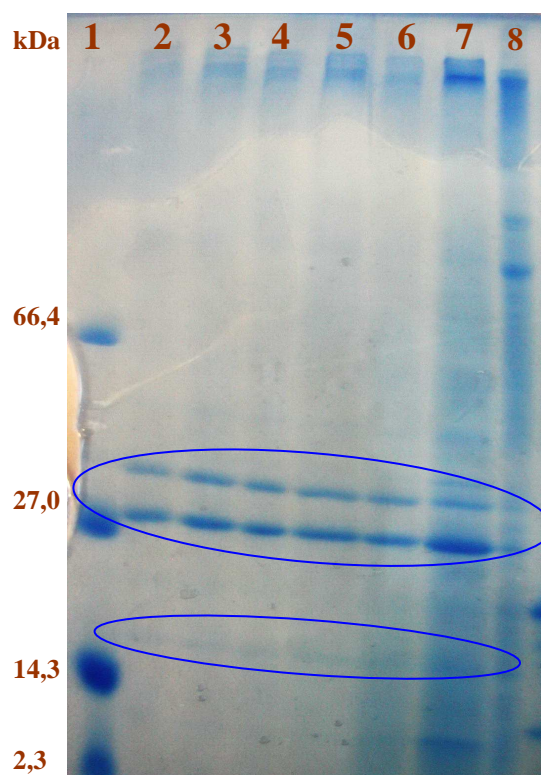
Obr. 30 Elektroforetická separace vzorků supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 z TYA s glukosou v pufovaném fyziologickém roztoku a 5M LiCl -barvení stříbrem

Podle uvedeného obrázku byly v této sérii ve všech třech případech opět získány dvě bílkovinné sloučeniny. Tímto pokusem bylo navíc prokázáno, že pro převedení těchto látek do roztoku postačuje použití pouze pufovaného fyziologického roztoku a 20 min. třepání na Vortexu.

V poslední sérii byly zkoušeny šetrnější procesy suspendace s použitím kationaktivního detergentu cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB), ve dvou různých koncentracích (600 μ M a 10 mM) [118]. Mimo těchto činidel byly zkoušeny s ověřeným pufovaným fyziologickým roztokem nové postupy suspendace. Vzorky biomasy byly smíchány s pufovaným fyziologickým roztokem v poměru 1:3 a byly suspendovány následujícími čtyřmi způsoby.

Jeden vzorek byl 5 min. roztřepáván na Vortexu a poté byl ponechán 30 min. stát, tento proces byl opakován 4x. Druhý vzorek byl třepán 3 hod. na třepáče při 300 rpm a třetí při 150 rpm. Poslední vzorek v pufovaném fyziologickém roztoku byl cca 3 hod. suspendován ručně. Vzorky biomasy v roztocích CTAB obou koncentrací (poměr 1:3) byly třepány na třepáče při 150 rpm 3 hod. Všechny vzorky byly nakonec zcentrifugovány. U všech byla po centrifugaci pozorována tenší či silnější mezivrstva. Odebrané supernatanty byly dány k elektroforetické separaci, jejíž záznam je uveden na Obr. 31.

Mimo připravených vzorků byla provedena separace směsi rozbitých buněk, pro porovnání profilu bílkovinných sloučenin podílejících se na stavbě buněk (Obr. 31, sloupec 8). Buňky kultury byly rozbity jejich zmrazením v -20 °C po dobu 30 min. a následným rozmrazením (opakováno 3x) a v posledním kroku 10 min. povařením s 200 µl detergentu sodium dodecyl sulfátu (SDS).



Legenda:

1– proteinový marker (2 - 212 kDa)

Supernatant biomasy rozsuspendované v pufovaném fyziologickém roztoku postupem:

2 – na Vortexu 5 min., 30 min. stání (4x)

3 – na třepáče při 300 rpm

4 – na třepáče při 150 rpm

5 – ruční třepání

Supernatant biomasy rozsuspendované v CTAB na třepáče při 150 rpm. Použitá koncentrace roztoku CTAB:

6 – 600 µM

7 – 10 mM

8 – rozbité buňky

Obr. 31 Separace SDS-PAGE vzorků supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 z TYA s glukosou v pufovaném fyz. roztoku a v kationaktivním detergentu – bavení Coomassie Brilliant Blue

Podle uvedených výsledků separace se u všech vzorků a všech způsobů suspendace podařilo detekovat dvě bílkovinné sloučeniny o molekulové hmotnosti cca 34 kDa a 27 kDa a jedna o nižší molekulové hmotnosti cca 18 kDa. Je zřejmé, že při použití ať již různých suspenčních postupů nebo roztoků, bylo v tomto pokusu vždy dosaženo stejných výsledků.

V této sérii, ve srovnání s předešlými, byla zkoušena jiná metoda barvení, a to pomocí Coomassie Brilliant Blue. Jak je patrné z Obr. 31, gel obarvený touto metodou vykazoval jisté odlišnosti. Namísto dvou bílkovinných sloučenin zaznamenaných při barvení stříbrem byly při této metodě vybarveny bílkoviny tři. Navíc vzdálenosti dvou bílkovin o vyšší molekulové hmotnosti byly větší než vzdálenosti proužků u gelů obarvených první metodou. Při další elektroforetické separaci a barvení gelů, tak bylo provedeno srovnání těchto dvou barvicích metod (viz. kapitola 4.2.6).

Při této sérii testování byl získán také záznam ze separace rozbitých buněk, který poukazoval na přítomnost několika různě velkých bílkovinných sloučenin (Obr. 31, sloupec 8). Proužky, charakteristické pro testované vzorky suspenziatantů značí přítomnost extracelulárního materiálu, byly u vzorku rozbitých buněk jen velmi nepatrné.

Shrnutím všech provedených suspenzačních pokusů bylo možno konstatovat, že v závislosti na barvicí metodě, použitím roztoků různého složení a postupů suspendace byly získány dvě až tři rozpustné bílkovinné sloučeniny detekovatelné elektroforetickou separací metodou SDS-PAGE. Navíc úpravami suspenzačních podmínek byla také ve zcentrifugovaných vzorcích pozorována přítomnost či absence viskózní mezivrstvy. Tento jev však neměl vliv na následně stanovený počet rozpustných bílkovinných sloučenin.

V žádném roztoku ani při žádném postupu nebylo během procesu suspendace biomasy dosaženo vytvoření homogenní suspenze. Pro separaci rozpustných extracelulárních látek bílkovinné povahy produkované kulturou FR8 rostoucí na TYA s glukosou se tedy jevilo jako dostačující činidlo pufrovaný fyziologický roztok (poměr 1:3) a postup třepání směsi na Vortexu po dobu 20 min.

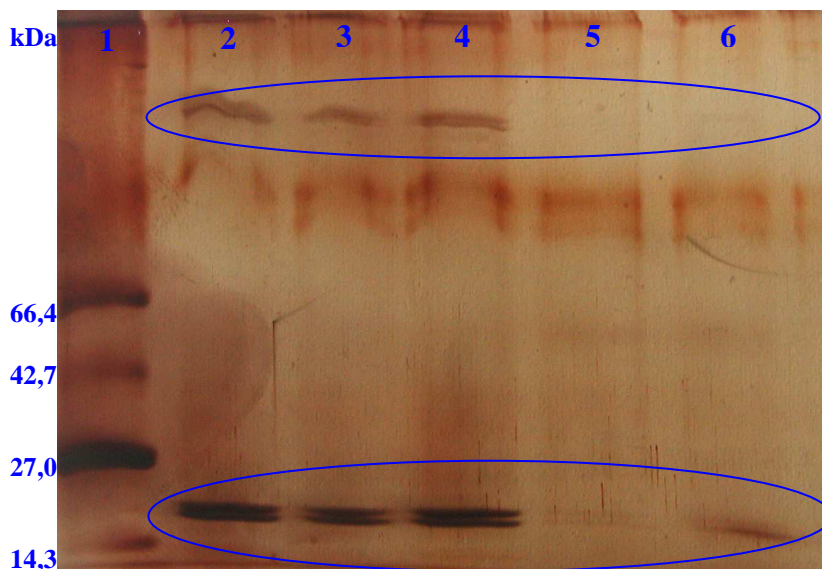
Další výzkum byl zaměřen na popis biomasy různé konzistence, kterou kultura *Pseudoxanthomonas mexicana* FR8 vytváří při růstu na TYA agaru s 2 % glukosy a na kaseinovém agaru.

4.2.6 Testování biomasy kultury FR8 o rozdílné konzistenci

Předešlými testy byla prokázána přítomnost extracelulárních látek bílkovinného charakteru, které kultura produkuje při růstu na TYA agaru s 2 % glukosy, na kterém vytváří biomasu značně kompaktní a velmi špatně oddělitelnou. Jelikož kultura rostoucí na kaseinovém agaru produkuje biomasu snadno odebíratelnou a velmi dobře suspendovatelnou ve fyziologickém roztoku, byly další testy zaměřeny na znázornění rozdílnosti těchto dvou různých vzorků biomasy, a to nejprve provedením elektroforetické separace jejich extracelulárních rozpustných složek (bílkovin).

Biomasa narostená na obou typech půd byla smíchána v poměru 1:3 s pufrovaným fyziologickým roztokem. Kompaktní biomasa z TYA s glukosou

byla opět problematicky suspendovatelná, bez výsledného vytvoření homogenní suspenze. Biomasa z kaseinového agaru byla převedena do homogenní suspenze bez obtíží po velmi krátké době (cca 15 min.). Obě suspenze byly zcentrifugovány a bylo pozorováno jejich rozvrstvení. Zcentrifugovaný vzorek biomasy z TYA s glukosou byl tvořen vrstvou buněk, mezivrstvou a neviskózním supernatantem. Vzorek biomasy z kaseinového agaru byl složen pouze z vrstvy buněk a neviskózního supernatantu. Mezivrstva přítomna nebyla. Získané supernatanty byly následně podrobeny metodě SDS-PAGE. Fotografie vybarveného gelu je uvedena na Obr. 32.



Legenda:

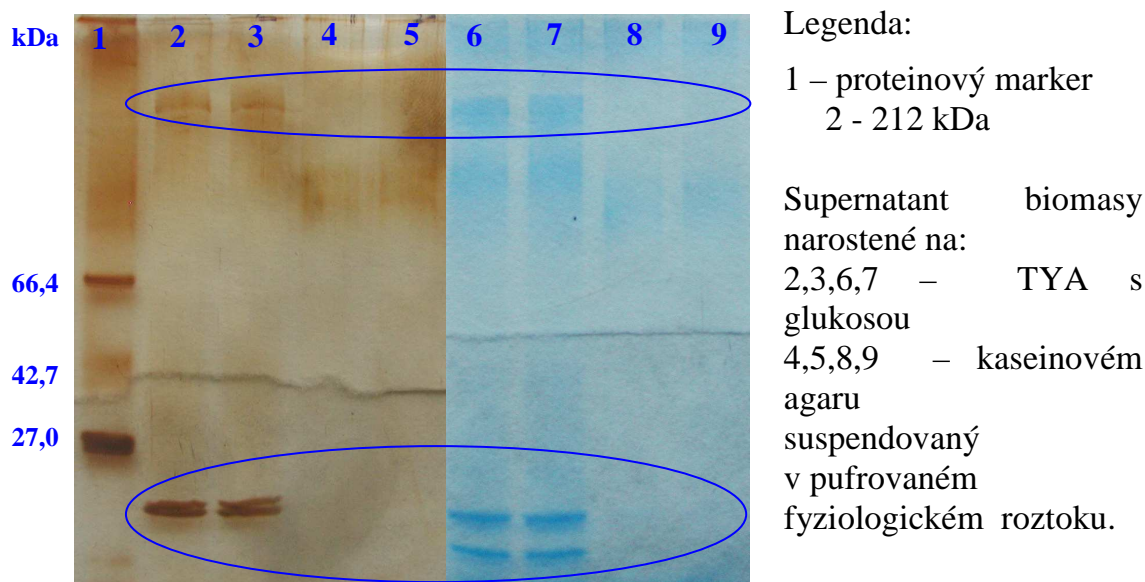
1 – Standard 2-212 kDa

Supernatant biomasy kultivované 4 dny na:
2,3,4 – TYA s glukosou
5,6 – kaseinovém agaru suspendované v pufovaném fyziolog. roztoku.

Obr. 32 Elektroforetická separace vzorků supernatantů po suspendaci kultury FR8 narostené na TYA s 2 % glukosy a na kaseinovém agaru – barvení stříbrem

Z uvedeného obrázku je zřejmé, že se po provedené suspendaci biomasy z TYA s glukosou podařilo separovat 3 sloučeniny bílkovinné povahy o různé molekulové hmotnosti, které byly elektroforeticky dobře detekovatelné. Ve vzorku z kaseinového agaru byla také zaznamenána přítomnost bílkovinné sloučeniny, avšak jen nepatrně.

Pro detekci bílkovinných sloučenin ve vzorcích supernatantů podrobených elektroforetické separaci byla mimo barvení stříbrem zkoušena i metoda barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue. V předešlých separacích bylo pozorováno, že při použití různých barvicích metod jsou získány odlišné záznamy. Bylo tedy provedeno porovnání těchto dvou barvení. Gel po separaci vzorků supernatantů byl rozdělen na polovinu. Jenda polovina gelu byla barvena stříbrem, druhá Coomassie Brilliant Blue. Získané výsledné záznamy jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 33).



Obr. 33 Elektroforetická separace vzorků supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8, srovnání barvení stříbrem a Coomassie Brilliant Blue

Jak je vidět na obrázku, oběmi barvicími metodami se podařilo u vzorku supernatantu z biomasy z TYA s glukosou zachytit dvě nízkomolekulární bílkoviny a jednu vysokomolekulární, která byla ale slabě barvitelná Coomassie Brilliant Blue. U druhého vzorku supernatantu z biomasy z kaseinového agaru nebyly zaznamenány žádné významné bílkovinné sloučeniny ani při jedné barvicí metodě. Tímto srovnávacím pokusem bylo také dokázáno, že způsob barvení ovlivňuje vzdálenosti obarvených proužků.

Z provedených elektroforetických stanovení lze učinit následující závěry. Kultura FR8 rostoucí na TYA s 2 % glukosy pravděpodobně produkuje extracelulárně látky, které lze převést do pufovaného fyziologického roztoku; dle SDS-PAGE jde o tři bílkovinné sloučeniny různých molekulových hmotností. Rovněž se lze domnívat, že kultura FR8 rostoucí na kaseinovém agaru výše zmíněnou látku buď netvoří a nebo jen ve velmi malém obtížně detekovatelném množství.

4.2.7 Stanovení koncentrace bílkovin

Předěle provedenými elektroforetickými separacemi byly mezi vzorky supernatantů z biomasy rozdílných konzistencí zjištěny významné rozdíly v přítomnosti bílkovinných sloučenin. Následující pokus tak byl zaměřen na kvantifikaci těchto rozpustných bílkovin v testovaných vzorcích supernatantů.

Stanovení koncentrace bílkovin dle Bradfordové

Při stanovení koncentrace bílkovin dle Bradfordové po přidavku okyseleného reakčního činidla Coomassie Brilliant Blue ke vzorku supernatantu z biomasy z TYA s glukosou došlo k precipitaci pevného podílu. Od této metody bylo tedy upuštěno.

Stanovení koncentrace bílkovin kyselinou bicinchoninovou

a) Metoda v mikrotitračních destičkách

Stanovení koncentrace bílkovin bylo prováděno v obou vzorcích supernatantů po suspendaci biomasy ve fyziologickém roztoku v poměru 1:5. Naměřené hodnoty koncentrace bílkovin v supernatantech jsou uvedeny v Tab. 28.

Tab. 28 Koncentrace bílkovin v supernatantech, po suspendaci kultury kultivované na TYA s 2 % glukosy a na kaseinovém agaru – metoda v mikrotitračních destičkách

Typ kultivační půdy	Koncentrace bílkovin [mg/l]
TYA s 2 % glukosy	1059,0 ± 5,7
Kaseinový agar	386,4 ± 5,8

Použitou metodou byla ve vzorcích supernatantů zaznamenána přítomnost bílkovin, a to i ve vzorku supernatantu z biomasy napěstované na kaseinovém agaru. Toto zjištění do jisté míry potvrzuje výsledek dříve provedené elektroforetické separace o přítomnosti bílkovin v obou vzorcích.

Během realizace stanovení se i u této metody vyskytly určité technické problémy. Ty by, i přes hodnoty koncentrací bílkovin s malou směrodatnou odchylkou, způsobovaly nereprodukovatelnost metody při opakovaných stanoveních. Pro zajištění spolehlivosti získaných dat byla metoda stanovení koncentrace bílkovin nahrazena standardní variantou ve zkumavkách.

b) Zkumavková metoda

Zkumavková metoda byla nejprve použita pouze pro supernatanty získané suspendací biomasy narostené na TYA s glukosou. Jako suspenzační činidlo byl v tomto případě použit fyziologický roztok samotný a s obsahem ethanolu (1 % a 5 %), který může zvyšovat rozpustnost některých bílkovin [119]. Pro suspendaci biomasy v roztocích byl použit poměr 1:3. Stanovené hodnoty koncentrace bílkovin jsou uvedeny v Tab. 29.

Tab. 29 Koncentrace bílkovin v supernatantu po suspendaci kultury FR8 z TYA s 2 % glukosy ve fyziologickém roztoku s a bez obsahu ethanolu – zkumavková metoda

Typ suspenzačního činidla	Koncentrace bílkovin [mg/l]
Fyziologický roztok	2583,4 ± 78,0
Fyziologický roztok s 1 % ethanolu	2813,4 ± 60,0
Fyziologický roztok s 5 % ethanolu	2424,4 ± 41,0

Zkumavkovou metodou stanovení koncentrace bílkovin bylo v supernatantech stanoveno kolem 2 500 mg/l bílkovin. Nejvíce jich bylo stanoveno ve vzorku získaném suspendací biomasy ve fyziologickém roztoku s 1 % ethanolu a v roztoku s vyšším obsahem ethanolu naopak nejméně.

4.2.8 Základní charakteristiky vzorků supernatantů

V tomto pokusu byla ve vzorcích supernatantů provedena stanovení obsahu sušiny, organického uhlíku, bílkovin a sacharidů.

Jako suspenzační činidla byly pro biomasu z TYA s glukosou použity následující roztoky:

- fyziologický roztok
- destilovaná voda
- fosfátový pufr 6,7 mmol/l (pH 7,5)
- fosfátový pufr 66,7 mmol/l (pH 7,5)
- fyziologický roztok s 1 % ethanolu
- destilovaná voda s 1 % ethanolu

Pro biomasu z kaseinového agaru bylo použito užší spektrum roztoků, a to:

- fyziologický roztok
- destilovaná voda
- fosfátový pufr 6,7 mmol/l (pH 7,5)

Vzorky biomas byly smíchány s příslušným roztokem v poměru 1:3. Data získaná ze stanovení jsou uvedena v následujících tabulkách Tab. 30 a 31.

Tab. 30 Charakteristiky supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 kultivované na TYA s 2 % glukosy

Suspendační činidlo	Obsah sušiny [g/l]	Obsah organ. uhlíku [mg/l]	Koncentrace bílkovin [mg/l]	Koncentrace sacharidů [mg/l]
Fyziologický roztok	3,96 ± 0,23	2310,3 ± 6,5	1759,4 ± 39,0	806,2 ± 47,1
Destilovaná voda	7,97 ± 0,23	3281,9 ± 82,8	2821,1 ± 16,4	999,1 ± 29,0
Fosfátový pufr 6,7 mmol/l	6,05 ± 0,15	2512,1 ± 28,8	1900,1 ± 36,3	856,6 ± 45,8
Fosfátový pufr 66,7 mmol/l	2,54 ± 0,15	2385,5 ± 32,3	1341,5 ± 20,5	826,9 ± 52,3
Fyz. roztok s 1 % ethanolu	4,77 ± 0,26	1547,5 ± 141,5	2991,6 ± 21,2	807,7 ± 63,9
Dest. voda s 1 % ethanolu	6,98 ± 0,12	2352,0 ± 146,5	5532,4 ± 36,3	1053,4 ± 33,2

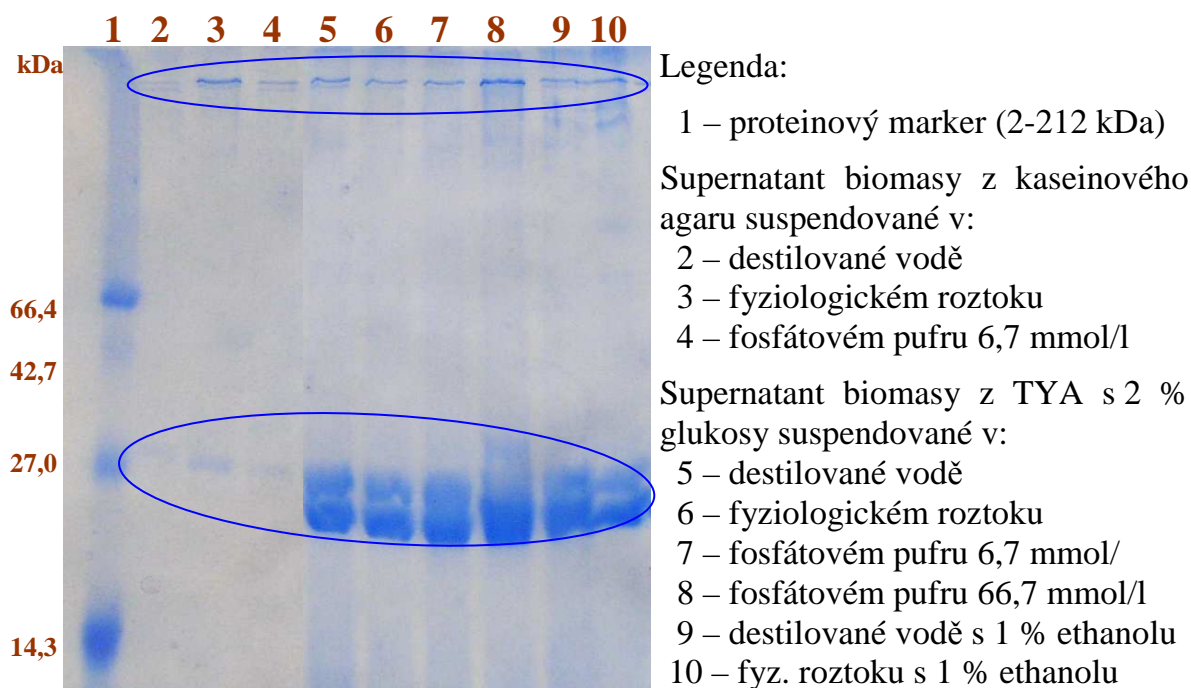
Tab. 31 Charakteristiky supernatantů po suspendaci biomasy kultury FR8 kultivované na kaseinovém agaru

Suspendační činidlo	Obsah sušiny [g/l]	Obsah organ. uhlíku [mg/l]	Koncentrace bílkovin [mg/l]	Koncentrace sacharidů [mg/l]
Fyziologický roztok	3,33 ± 0,07	1046,9 ± 0,5	681,6 ± 13,0	2005,4 ± 80,6
Destilovaná voda	2,82 ± 0,11	1172,8 ± 3,0	925,9 ± 24,2	1903,4 ± 45,4
Fosfátový pufr 6,7 mmol/l	3,34 ± 0,16	933,4 ± 0,5	591,8 ± 6,3	1714,7 ± 132,8

Stanovením sušiny ve vzorcích supernatantů bylo zjištěno, že suspendací biomasy kultury rostoucí na TYA s glukosou přešlo do supernatantu více rozpustných složek než z biomasy kultivované na kaseinovém agaru. Vyšší sušinu supernatantů z biomasy z TYA s glukosou u suspendačních činidel destilované vody s ethanolem a bez něj a fosfátového pufru 6,7 mmol/l je možno částečně připsat hypotonickému charakteru těchto roztoků než jen jejich lepší rozpouštěcí schopnosti. Avšak přídavek ethanolu do suspendačních roztoků destilované vody a fyziologického roztoku zvýšil výtěžnost rozpustných bílkovinných sloučenin u tohoto vzorku supernatantu až dvojnásobně. Obsah rozpustných bílkovin v druhém vzorku z biomasy z kaseinového agaru byl zjištěn jako třetinový ve srovnání s prvním vzorkem supernatantu. Tyto dva vzorky se také významně lišily v obsahu sacharidů. Supernatanta z biomasy z TYA s glukosou obsahoval poloviční množství sacharidů oproti supernatantu z biomasy z kaseinového agaru.

Srovnáním uvedených dat je zřejmé, že kultura FR8 rostoucí na TYA s glukosou produkuje extracelulárně sloučeniny obsahující ponejvíce bílkoviny, kdežto při růstu na kaseinovém agaru je při stejném postupu zaznamenáno výrazně vyšší množství sacharidů.

Oba vzorky supernatantů byly následně zpracovány elektroforetickou separací, metodou SDS-PAGE. Výsledek je uveden na Obr. 34.



Obr. 34 Separace SDS-PAGE vzorků supernatantů z biomasy kultury FR8 kultivované na TYA s glukosou a na kaseinovém agaru – barvení Coomassie Brilliant Blue

Provedenou elektroforetickou separací byly, tak jako při posledně provedené separaci, zaznamenány rozdílné výsledky u obou vzorků supernatantů. V supernatantech z biomasy z TYA s glukosou byly zaznamenány 3 různé bílkoviny, kdežto u druhého vzorku (supernatantu z biomasy z kaseinového agaru) pouze 2 a to jen nepatrně. Při předešlé elektroforetické separaci však v supernatantu z biomasy z kaseinového agaru nebyla zaznamenána přítomnost bílkovinných sloučenin. To může být do jisté míry způsobeno odlišnou výtěžností bílkovin při těchto dvou stanoveních.

Tímto pokusem tak byla potvrzena produkce extracelulární sloučeniny nejen bílkovinné povahy při růstu kultury na TYA s glukosou.

4.2.9 Zkouška ztekucení suspendované biomasy trypsinem

Provedenými zkouškami byla kromě bílkovinných sloučenin prokázána i přítomnost sacharidů u obou vzorků supernatantů, avšak v rozdílné koncentraci. Jelikož mohlo toto zjištění hrát významnou roli v pozorovaném rozdílném charakteru biomasy narostené na TYA s glukosou a na kaseinovém agaru, byl uspořádán pokus pro zjištění, zda bílkovinná složka má hlavní účast na soudržnosti biomasy narostené na TYA s glukosou.

Biomasa kultury FR8 byla po kultivaci na TYA s 2 % glukosy suspendována jednak v ředěném fosfátovém pufru 6,7 mmol/l a jednak ve fyziologickém roztoku. Do jedné poloviny zkumavek byl přidán trypsin. Druhá polovina zkumavek byla ponechána jako kontrola bez přídavku trypsinu. Dokonale promíchané suspenze byly inkubovány 2 dny při 37 °C. Po uplynutí doby

nedošlo ke ztekucení obsahu a sedimentaci biomasy na dno u žádného vzorku (ani kontroly). Nedošlo tedy k rozrušení soudržnosti biomasy. Výsledek pokusu tedy ukázal, že za kompaktností biomasy kultury FR8 tedy nejsou bílkoviny rozložitelné trypsinem.

4.2.10 Zkouška ztekucení suspendované biomasy DNA-asou

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou spojovány s produkcí a přítomností DNA v extracelulárním materiálu [75][78]. Výskyt této sloučeniny a její možný vliv na soudržnost biomasy byl proto testován v dalším pokusu s kulturou *Pseudoxanthomonas mexicana* FR8.

Biomasa kultury FR8 nakultivovaná na TYA s glukosou byla rozmíchána v ředěném fosfátovém pufru 6,7 mmol/l a k jednomu vzorku byla přidána DNA-asa spolu s MgCl₂ a CaCl₂. Druhý vzorek byl jako kontrolní ponechán bez přídavku enzymu. Suspenze byly důkladně promíchány a inkubovány 1 hod. při 30 °C. Po uplynutí doby došlo ve vzorku s přídavkem enzymu ke ztekucení biomasy a k sedimentaci buněk. V případě kontrolního vzorku tento jev zaznamenán nebyl. Je tedy zřejmé, že účinkem DNA-asy došlo k rozrušení soudržnosti biomasy, a že tedy DNA významně přispívá ke kompaktnosti biomasy rostoucí na TYA s glukosou.

4.2.11 Stanovení koncentrace DNA

Po odhalení významu DNA pro konzistenci biomasy kultury FR8 bylo provedeno stanovení množství této látky. Byla stanovena koncentrace jak celkové DNA, tedy směsi extracelulární DNA (eDNA) a buněčné DNA, tak pouze eDNA. Celková DNA byla stanovována ve vzorcích biomas podrobených fenol-chloroformové izolaci DNA. eDNA byla stanovována v supernatantech biomasy suspendované v ředěném fosfátovém pufru 6,7 mmol/l (poměr 1:10). Stanovení bylo prováděno u vzorků biomasy narostené na obou typech půd. Získané výsledky jsou zpracovány v následující tabulce Tab. 32.

Tab. 32 Množství celkové a extracelulární DNA v biomase kultury FR8

Kultivace kultury na	Sušina vzorku [%]	Koncentrace celkové DNA		Koncentrace eDNA	
		[µg/ml]	[mg/g _{suš.biomasy}]	[µg/ml]	[mg/g _{suš.biomasy}]
TYA s glukosou	27,0 ± 1,2	417,3 ± 28,4	7,73 ± 0,53	22,2 ± 1,3	0,824 ± 0,047
Kaseinový agar	28,6 ± 0,7	513,6 ± 36,4	8,95 ± 0,64	5,1 ± 0,6	0,180 ± 0,021

Provedeným stanovením byla prokázána přítomnost eDNA v extracelulárním materiálu kultury rostoucí jak na TYA s glukosou, tak na kaseinovém agaru. Ve vzorku supernatantu zcentrifugované suspenze biomasy z TYA s glukosou bylo

zjištěno cca 4,5x více eDNA než u druhého testovaného vzorku. Obsah celkové DNA byl však nalezen vyšší u vzorku biomasy rostoucí na kaseinovém agaru.

U bakterií rodu *Pseudoxanthomonas* nebyla produkce extracelulárního materiálu v literatuře zatím popsána a diskutována, ani se žádná z odborných prací studiu charakteru biomasy nevěnovala. Uvedené výsledky tak znamenají prvotní data s jistou mírou originality, které však bude nutno ještě rozpracovat. Během zkoumání bylo také zjištěno, že běžně užívané metody jsou pro studium této kultury použitelné jen částečně a pravděpodobně bude potřeba nalézt či vyvinout metody vhodnější, specificky zaměřené na separaci extracelulárních složek a jejich kvantifikaci.

ZÁVĚR

Disertační práce byla zaměřena na izolaci a základní popis nových producentů bakteriálních extracelulárních polymerů a na charakterizaci těchto polymerních látek.

V rámci práce byly pro získání nových kmenů využity tři vzorky aktivovaných kalů se znaky viskózního bytnění. Z těchto bylo získáno celkem 14 bakteriálních kultur, z nichž však pouze dvě byly následně podrobněji studovány. Zkoumáním těchto izolátů byly získány následující výsledky:

- Ze vzorku aktivovaného kalu z ČOV zpracovávající potravinářské odpadní vody byla izolována kultura PR vyznačující se výraznou produkcí extracelulárního polymeru.
- Biochemickými, morfologickými a růstovými testy bylo zjištěno, že kultura PR je grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující a katalaso negativní tyčinka se zakulacenými konci. Vyskytuje se obvykle v krátkých řetízcích či shlucích.
- Na pevných živných půdách roste kultura nejlépe na VL agaru, kde vytváří drsné kolonie, kdežto na Trypton kvasničném agaru se sacharosu tvoří kolonie výrazně mukósní.
- V tekutém Trypton kvasničném médiu produkuje kultura PR exopolymer pouze za přídavku sacharosy, s maximem při vstupní koncentraci sacharosy 10 %.
- Ledově vychlazeným acetonem lze produkovaný exopolymer z tekutého média vysrážet. Vhodný poměr je 1:5 (tekuté médium:aceton).
- Provedenými pokusy bylo nejvíce polymeru získáno z tekutého Trypton kvasničného média s 10 % sacharosy pufovaného fosfátovým pufrům 6,7 mmol/l, a to v množství 68,3 mg nepřečištěného polymeru z 1 g kultivační suspenze.
- Ve spolupráci s Chemickým ústavem SAV s Centrem glykomiky bylo zjištěno, že exopolymer kultury PR je dextran o vysoké molekulové hmotnosti (nad 10^7 Da) se značnou mírou linearitou.
- Kultura PR byla identifikována metodou sekvenace 16S rDNA jako *Leuconostoc garlicum*.

Zkoumáním druhého izolátu byly získány následující výsledky:

- Kultura, pracovně označená FR8, byla izolována již dříve v rámci SVOČ z aktivovaného kalu z ČOV zpracovávající odpadní vody z živočišné výroby.

- Při růstu na Trypton kvasničném agaru s glukosou vytváří kultura FR8 charakteristicky kompaktní biomasu, kdežto na kaseinovém agaru je spíše pastovité konzistence, podobně jako u řady běžných druhů bakterií.
- Při kultivaci na TYA s glukosou je možno u biomasy barvením dle Hisse zaznamenat přítomnost slabě zřetelné vrstvy extracelulárního materiálu.
- Různými suspenzními pokusy bylo zjištěno, že pomocí pufrovaného fyziologického roztoku a třepáním suspenze 20 min na Vortexu lze přítomný extracelulární materiál částečně převést do roztoku.
- Kvantitativními stanoveními bylo v supernatantu kompaktní biomasy zjištěno vyšší množství bílkovin, naproti tomu u pastovité biomasy vyšší zastoupení sacharidů.
- Kompaktní biomasu kultury FR8 rostoucí na TYA s glukosou lze ztekutit DNA-azou, nikoliv trypsinem.
- Kultura FR8 byla identifikována metodou sekvenace genu pro 16S rRNA jako *Pseudoxanthomonas mexicana*.

PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Bakteriální polymery jsou nejen v dnešní době intenzivně studovanou oblastí. Výzkum těchto látek a jejich producentů je tak neustále pozitivně vnímán a to jak z vědeckého tak i praktického hlediska.

V práci zkoumané a popisované izoláty *Leuconostoc garlicum* PR a *Pseudoxanthomonas mexicana* FR8 patří mezi kmeny, u kterých nebyla schopnost produkce extracelulárního polymerního materiálu doposud v odborné literatuře popsána. Studium těchto kultur tak přineslo nové vědecké poznatky.

Velká část studia kultury *Leuconostoc garlicum* PR, byla zaměřena na popis jejích morfologických, biochemických a růstových vlastností, které jsou z pohledu vědeckého velmi cennými informacemi. Tyto výsledky mohou navíc do značné míry přispět k předpokládanému budoucímu ustanovení druhu *Leuconostoc garlicum* jako vědecky platného biologického druhu (v současné době není tento zatím uznán). Kultura PR má i značné praktické využití, především její schopnost produkce exopolysacharidu (dextranu), a to v nemalém množství. Přestože je tvorba dextranu známá a popsána u řady bakterií rodu *Leuconostoc*, je produkovaný polysacharid kultury PR významný hlavně díky jeho vysoké míře linearitě a značné molekulové hmotnosti (vyšší než $2 \cdot 10^7$ Da). V současné době je získaný polysacharid testován na pracovištích Slovenské akademie věd v Bratislavě pro možné farmaceutické využití jako antitusikum či antioxidant. Mimo toho je možné uvažovat i o využití této látky v technické oblasti, např. po chemické modifikaci jako bioflokulant pro čistírenské či jiné průmyslové účely.

Výsledky získané zkoumáním kultury FR8 jsou v současné době přínosem spíše pro oblast vědeckou, neboť druh *Pseudoxanthomonas mexicana* byl objeven teprve před 6 lety. Praktické využití této kultury tak bude patrné až v průběhu času. Významným zjištěním u této kultury je její schopnost produkce exopolymeru odlišného charakteru než u většiny jiných bakteriálních producentů, neboť se nejedná o polysacharid. Významným zjištěním je také to, že metody běžně užívané pro získávání bakteriálních exopolysacharidů jsou pro tuto kulturu a její polymer nedostačující a omezeně využitelné. Pro podrobnější popis exomateriálu produkovaného kulturou FR8 je tak nutno hledat či vyvíjet nové a jiné metody.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SUTHERLAND, I.W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int Dairy J.* 2001, vol. 11, no. 9, p. 663-74.
- [2] SHIH, I.L., VAN, Y.T., YEH, L.C., LIN, H.G., CHANG, Y.N. Production of biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresour Technol.* 2001, vol. 78, p. 267-72.
- [3] ASHIUCHI, M., MISONO, H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002, Vol. 59, p. 9-14.
- [4] GOTSCHALK, G. *Bacterial metabolism*. 2. vydání. New York: Springer-Verlag, 1986. ISBN 0-387-96153-4.
- [5] PYROG, T.P. Biological functions of microbial exopolysaccharides. *Mikrobiol Z.* 2001, vol. 63, no. 5, p. 80-101.
- [6] DE VUYST, L., DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1999, vol. 23, no. 2, p. 153-77.
- [7] CANDELA, T., FOUET, A. Poly- γ -glutamate in bacteria. *Mol Microbiol.* 2006, vol. 60, no. 5, p. 1091-98.
- [8] GERLACH, R.G., HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2007, vol. 297, no. 6, p. 401-15.
- [9] TSUNEDA, S., AIKAWA, H., HAYASHI, H., YUASA, A., HIRATA, A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol Lett.* 2003, vol. 223, p. 287-92.
- [10] WINGENDER, J., NEU, T.R., FLEMMING, H.C. *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, Berlin, 1999, p. 1-53.
- [11] CLOETE, T.E., OOSTHUIJSE, D.J. The role of extracellular exopolymers in the removal of phosphorus from activated sludge. *Water Res.* 2001, vol. 35, p. 3595-98.
- [12] COSTERTON, J.W. The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *J Ind Microbiol Biot.* 1999, vol. 22, no. 4-5, p. 551-63.
- [13] URBAIN, V., BLOCK, J.C., MANEM, J. Bioflocculation in activated sludge: An analytic approach. *Water Res.* 1993, vol. 27, p. 829-38.
- [14] KAKII, K., SHIRAKASHI, T., KURIYAMA, M. Some properties of mucilage polysaccharides extracted from sewage activated sludge. *J Ferment Technol.* 1984, vol. 62, p. 429-35.
- [15] GÖRNER, T. DE DONATO, P., AMEIL, M.H., MONTARGES-PELLETIER, E., LARTIGES, B.S. Activated sludge exopolymers: Separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Res.* 2003, vol. 37, p. 2388-2393.
- [16] ROSYPAL, S. *Obecná bakteriologie*. 1. vydání. Praha: SPN, 1981, 752 s.
- [17] RUAS-MADIEDI, P., DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 2005, vol. 88, no. 3, p. 843-56.

- [18] SALEHIZADEH, H., SHOJAOSADATI, S.A. Extracellular biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol Adv.* 2001, vol.19, no 5, p.371-85.
- [19] RASZKA, A., CHORVATOVA, M., WANNER, J. The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: Literature review. *Acta Hydroch Hydrob.* 2006, vol. 34, p. 411-24.
- [20] PARK, CH., NOVAL, J.T., HELM, R.F., AHN, Y., ESEN, A. Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges. *Water Res.* 2008, vol.42, p.3879-89.
- [21] FUSCONI, R., GODINHO, M.J.L., HERNÁNDEZ, I.L.C., BOSSOLAN, N.R.S. *Gordonia polyisoprenivorans* from groundwater contaminated with landfill leachate in a subtropical area: Characterization of the isolate and exopolysaccharide production. *Braz J Microbiol.* 2006, vol. 37, no. 2, p. 168-74.
- [22] KURANE, R., MATSUYAMA, H. Production of a bioflocculant by mixed culture. *Biosci Biotech Bioch.* 1994, vol. 58, p. 1589-94.
- [23] WINGENDER, J., NEU, T.R., FLEMMING, H.C. *What are bacterial extracellular polymeric substances? Microbial extracellular polymeric substances.* Springer. 1999, p.1-19.
- [24] SPONZA, D.T. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocks under steady-state conditions. *Enzyme Microb Tech.* 2003, vol. 32, no. 3-4, p. 375-85.
- [25] ARDA, M. *General bacteriology.* Turkey: Ankara university publications.1978, p. 1-236.
- [26] WILÉN, B.M., JIN, B., LANT, P. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Res.* 2003, vol.37, p.2127-39.
- [27] STEINBERGER, R.E., HOLDEN, P.A. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microb.* 2005, vol.71, no.9, p. 5404-10.
- [28] PALMGREN, R., NIELSEN, P.H. Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures. *Water Sci Technol.* 1996, vol.34, no.5-6, p.233-40.
- [29] BOSSIER, P., VERSTRAETE, W. *Comamonas testosteroni* colony phenotype influences exopolysaccharide production and coaggregation with yeast cells. *Appl Environ Microb.* 1996, vol. 62, no. 8, p. 2687-91.
- [30] SUTHERLAND, I.W. *Biotechnology of microbial exopolysaccharides.* Cambridge university press, Cambridge. 1990, p. 163.
- [31] MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. *Brock biology of microorganisms.* 8. vydání, Prentice Hall International Ltd., London, UK, 1997.
- [32] MACURA, D., TOWNSLEY, P.M. Scandinavian rosy milk – identification and characterization of endogenous rosy lactic streptococci and their extracellular excretion. *J Dairy Sci.* 1984, vol. 67, p. 735-44.

- [33] GARCIA-GARIBAY, M., MARSHALL, V.M.E. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J Appl Bacteriol.* 1991, vol.70, p. 325-28.
- [34] TOBA, T., UEMURA, H., MUKAI, T., FUJI, T., ITOH, T., ADACHI, S. A new fermented milk using capsular polysaccharides-producing *Lactobacillus kefirifacies* isolated from kefir grains. *J Dairy Res.* 1991, vol. 58, p. 497.
- [35] KNOSHAUG, E.P., AHLGREN, J.A., TREMPY, J.E. Growth associated exopolysaccharide expression in *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* Ropy352. *J Dairy Sci.* 2000, vol. 83, p. 633-40.
- [36] CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1990, vol. 87, no. 1-2, p. 113-30.
- [37] NOVITSKY, J.A., MORITA, R.Y. Morphological characteristic of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio. *Appl Environ Microb.* 1976, vol. 32, p. 617-22.
- [38] OSBORNE, L.L., DAVIES, R.W., VENTULLO, R.M., LADD, T.I., COSTERTON, W.J. The effects of chlorinated municipal sewage and temperature on the abundance of bacteria in the Sheep River, Alberta. *Can J Microbiol.* 1983, vol. 29, p. 261-70.
- [39] KREFT, J.U., WIMPENNY, J.W. Effect of EPS on biofilm structure and fiction as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Sci Technol.* 2001, vol. 43, no. 6, p. 135-41.
- [40] LOW, D., AHLGREN, J.A., HORNE, D., MCMAHON, D.J., OBERG, C.J., BROADBENT, J.R. Role of *Streptococcus thermophilus* MR.1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl Environ Microb.* 1998, vol.64, p. 2147-51.
- [41] SIKKEMA, J., OBA, T. Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria. *Snow brand R&D reports.* 1998, vol. 107, p. 1-31.
- [42] DE VUYS, T.L.F., DE VIN, F., VENINGELGEM, F., DEGEEST, B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 2001, vol. 11, p. 687-708.
- [43] CERNING, J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait.* 1995, vol. 75, no. 4-5, p. 463-72.
- [44] VAN GEEL-SCHUTTEN, G.H., FABER, E.J., SMIT, E., BONTING, K., SMITH, M.R., TEN BRINK, B., KAMERLING, J.P., Vliegenthart, J.F.G., DIJKHUIZEN, L. Biochemical and structure characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by *lactic acid reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl Environ Microb.* 1999, vol. 65, p. 3008-14.
- [45] DEGEEST, B., VANINGELGEM, F., DE VUYST, L. Microbial physiology, fermentation kinetics and process engineering of heteropolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 2001, vol. 11, p. 747-58.
- [46] LAWS, A., GU, Y., MARSHALL, V. Biosynthesis, characterization and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol Adv.* 2001, vol.19, p.597-625.

- [47] TUINIER, R., VAN CASTEREN, W.H.M., LOOIJESTEIJN, P.J., SCHOLS, H.A., VORAGEN, A.G.J., ZOON, P. Effects of structural modifications on some physical characteristic of exo-polysaccharides from *Lactococcus lactis*. *Biopolymers*. 2001, vol. 59, p. 160-66.
- [48] RUAS-MADIEDO, P., TUINIER, R., KANNING, M., ZOON, P. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* on the viscosity of fermented milks. *Int Dairy J*. 2002, vol. 12, p. 689-95.
- [49] ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydr Polym*. 1997, vol. 33, no. 2-3, p. 139-44.
- [50] SOBECK, D., HIGGINS, M. Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Res*. 2002, vol. 36, p. 527-38.
- [51] BRUUS, J.H., NIELSEN, P.H., KEIDING, K. On the stability of activated sludge flocks with implications of dewatering. *Water Res*. 1992, vol. 26, p. 1597-1604.
- [52] ERTESVAG, H., HOIDAL, H.K., SCHJERVEN, H., SVANEM, B.I., VALLA, S. Mannuronan C-5-epimerases and their supplication for in vitro and in vivo design of new alginates useful in biotechnology. *Metab Eng*. 1999, vol.1, no.3, p.262-69.
- [53] RUFFING, A., CHEN, R.R. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. *Microb Cel Fact*. 2006, vol.5, no.25, p.1 -9.
- [54] BANIK, R.M., KANARI, B., UPADHYAY, S.N. Exopolysaccharide of the gellan family: Prospects and potential. *World J Microb Biot*. 2000, vol.16, no.5, p.407-14.
- [55] About Dextran by Pharmacosmos A/S [online]. [cit. 20. dubna 2009]. Dostupné na WWW: <http://www.dextran.net/>
- [56] HAFEX, M.B., SAIED, F.I.A. Radiochemical determination of gross alpha activity in urine by adsorption on dextran gel sephadex. *Int J Appl Radiat Is*. 1973, vol.24, no.5, p.241-44.
- [57] NORBERG, A.B., ENFORS, S.O. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea*. *Appl Environ Microb*. 1982, vol. 44, no. 5, p. 1231-37.
- [58] HIGGINS, J.M., NOVAK, J.T. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J Environ Eng*. 1997, vol. 123, no. 5, p. 479-85.
- [59] DUFRENE, Y.F., BOONAERT, CH.J.P., ROUXHET, P.G. Adhesion of *Azospirillum brasilense*: Role of proteins at the cell-support interface. *Colloid Surface B*. 1996, vol. 7, p. 113-28.
- [60] DESVAUX, M., DUMAS, E., CHAPSEY, I., HÉBRAUD, M. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: From single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett*. 2006, vol. 256, p. 1-15.
- [61] DUFRENE, Y.F., VERMEIREN, H., VANDERLEYDEN, J., ROUXHET, P.G. Direct evidence for the involvement of extracellular proteins in the adhesion of *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*. 1996, vol. 142, p. 855-65.
- [62] KAWANO, Y., ITO, Y., YAMAKAWA, Y., YAMASHIO, T., HORII, T., HASEGAWA, T., OHTA, M. Rapid isolation and identification of staphylococcal

- exoproteins by reverse phase capillary high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *FEMS Microbiol Lett.* 2000, vol. 189, p. 103-8.
- [63] SAWAI, J., HASEGAWA, R., KAMIMURA, T., OKAMATO, A., OHMORI, D., NOSAKA, N., YAMADA, K., TORII, K., OHTA, M. Growth phase-dependent effect of clindamycin on production of exoproteins by *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Ch.* 2007, vol. 51, no. 2, p. 461-67.
- [64] BURLAK, CH., HAMMER, C.H., ROBINSON, M.A., WHITNEY, A.R., MCGAVIN, M.J., KREISWIRTH, B.N., DELEO, F.R. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced *in vitro* and during infection. *Cell Microbiol.* 2007, vol. 9, no. 5, p. 1172-90.
- [65] HENDRIXON, D.R., DE LA MORENA, M.L., STATHOPOULOS, CH., ST GEME III, J.W. Structural determinants of processing and secretion of the *Haemophilus influenzae* Hap protein. *Mol Microbiol.* 1997, vol. 26, no. 3, p. 505-18.
- [66] LATASA, CH., SOLANO, C., PENADÉS, J.R., LASA, I. Biofilm-associated proteins. *C R Biol.* 2006, vol. 329, no. 11, p. 849-57.
- [67] JOHNSON, A.B., NORMARK, S., RHEN, M. Fimbriae, pili, flagella and bacterial virulence. *Contrib Microbiol.* 2005, vol. 12, p. 67-89.
- [68] BURDMAN, S., DULGUEROVA, G., OKON, Y., JURKEVITCH, E. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001, vol. 14, no. 4, p. 555-61.
- [69] HEMERY, G., CHEVALIER, S., BELLON-FONTAINE, M.N., HARAS, D., ORANGE, N. Growth temperature and OprF porin affect cell surface physicochemical properties and adhesive capacities of *Pseudomonas fluorescens* MF37. *J Ind Microb Biot.* 2007, vol. 34, p. 49-54.
- [70] ØRSKOV, I., BIRCH-ANDERSEN, A., DUGUID, J.P., STENDERUP, J., ØRSKOV, F. An adhesive protein capsule of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1985, vol. 47, no. 1, p. 191-200.
- [71] KRÖNCKE, K.D., ØRSKOV, I., ØRSKOV, F., JANN, B., JANN, K. Electron microscopic study of coexpression of adhesive protein capsules and polysaccharide capsule in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1990, vol. 10, p. 2710-14.
- [72] SHIH, I.L., SHEN, M.H., VAN, Y.T. Microbial synthesis of poly(ϵ -lysine) and its various applications. *Bioresource Technol.* 2006, vol. 97, no. 9, p. 1148-59.
- [73] PALMEN, R., Hellingwerf, K.J. *Acinetobacter calcoaceticus* liberates chromosomal DNA during induction of competence by cell lysis. *Curr Microbiol.* 1995, vol. 30, p. 7-10.
- [74] STEINMOEN, H., KNUTSEN, E., HAVARSTEIN, L.S. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002, vol. 99, p. 7681-86.

- [75] KADURUGAMUWA, J.L., BEVERIDGE, T.J. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol.* 1995, vol. 177, no. 14, p.3998-4008.
- [76] RICE, K.C., MANN, E.E., ENDERS, J.L., WEISS, E.C., CASSAT, J.E., SMELTZER, M.S., BAYLES, K.W. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, vol. 104, no. 19, p. 8113-8118
- [77] SCHOOLING, S.R., BEVERIDGE, T.J. Membrane vesicles: An overlooked component of the matrices of biofilm. *JBacteriol.* 2006, vol.188, no. 16, p. 5945-57.
- [78] RENELLI, M., MATIAS V., LO, R.Y., BEVERIDGE, T.J. DNA containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology.* 2004, vol. 150, p. 2161-9.
- [79] HARA, T., UEDA, S. A study on the mechanism of DNA excretion from *P. aeruginosa* KYU-1. Effect of mitomycin C on extracellular DNA production. *Agric Biol Chem.* 1981, vol. 45, no. 11, p. 2457-61.
- [80] CHEN, I., DUBNAU, D. DNA uptake during bacterial transformation. *Microbiology.* 2004, vol. 2, p. 241-9.
- [81] DILLARD, J.P., SEIFERT, H.S. A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *MolMicrobiol.*2001, vol.41, p.263-77.
- [82] FINKEL, S.E., KOLTER, R. DNA as a nutrient: Novel role for bacterial competence gene homologs. *J Bacteriol.* 2001, vol. 183, no. 21, p. 6288-93.
- [83] BJÖRN, D.H., PICHLER, F.F., LIANG, Q., BLAZA, R.G., TURNER, S. Extracellular DNA and type IV pili mediate surface attachment by *Acidovorax temperans*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2009, vol. 95, p. 343-9.
- [84] WATANABE, M., SUZUKI, Y., SASAKI, K., NAKASHIMADA, Y., NISHIO, N. Flocculating property of extracellular polymeric substance derived from a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. *J Biosci Bioeng.*1999, vol.87, p.625-9.
- [85] VILAIN, S., PRETORIUS, J.M., THERON, J., BRÖZEL, V.S. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl Environ Microb.* 2009, vol. 75, no. 9, p. 2861-8.
- [86] WANNER, J., RŮŽIČKOVÁ, I., KRHŮTKOVÁ O., BENEŠ, O. *Biologická kontrola čištění odpadních vod. Technické doporučení.* AČE ČR, s. 24, 2000. ISBN 80-238-5456-9.
- [87] NOVÁK, L., LARREA, L., WANNER, J., GARCIA-HERAS, J.L. Non-filamentous activated sludge bulking in a laboratory scale system. *Water Res.* 1993, vol. 27, no. 8, p. 1339-46.
- [88] SEVIOUR, R.J., BLACKALL, L.L. *The microbiology of activated sludge.* Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1999. s. 100. ISBN 0-412-79380-6.

- [89] PENG, Y., GAO, C., WANG S., OZAKI, M., TAKIGAWA, A. Non-filamentous sludge bulking caused by a deficiency of nitrogen in industrial wastewater treatment. *Water Sci Technol.* 2003, vol. 47, no. 11, p. 289- 95.
- [90] BAROŠOVÁ, E. *Růstové a metabolické vlastnosti vybraných mikroorganismů izolovaných z aktivovaného kalu s viskózním bytřením.* Studentská vědecká práce. Zlín: UTB ve Zlíně, 2004, 25 s.
- [91] HÄUSLER, J. *Mikrobiologické metody kontroly jakosti vody II.* 1. vydání. Praha:Brázda, 1991. ISBN 80-85368-01-3.
- [92] BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976, vol. 72, no. 1-2, p. 248-54.
- [93] SMITH, P.K. *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Foreign Patent documents, 1960. 436/80,86,87,88,164.
- [94] DUBOIS, M., GILLES, K.S., HAMILTON, J.K. REBERS, P.S., SMITH, F. *Colorimetric method for determination of sugar and related substances.* Analytical chemistry, 1955.
- [95] Manuál pro přístroj Luminometr. Turner BioSystems. 2007
- [96] SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 3. vydání. New York: Cold Spring Harbor Press, 2001. ISBN 0-87969-577-3.
- [97] KIRKEBY, S., MOE, D., BOG-HANSEN, T.C. The silver staining procedure of sodium dodecyl sulfate gels may be accelerated by shortening fixation time. *Electrophoresis.* 1993, vol. 14, p. 51-5.
- [98] POT, B., VANDAMME, P., KERSTERS, K. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. p. 493-522. In: Goodfellow M.M O'Donnel A.G. (ed.), *Modern microbial methods. Chemical methods in procaryotic systematics.* Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd., 1994.
- [99] On-line nukleotidová databáze: NCBI - National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (cit. 18.01.2011)
- [100] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot.* 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9, str. 250.
- [101] BJORKROTH, HOLZAPFEL: *Genera Leuconostoc, Oenococcus and Waisella.* In: M. Dworkin, et. Al. /Eds.). *The prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community.* 3. vydání, Berlin:Springer. 2003.
- [102] KIM, D.S., THOMAS, S., SCOTT-FOGLER, H. Effect of pH nad trace metals on log-term starvation of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microb.* 2000, vol. 66, p. 976-81.
- [103] KIM, B.J., MON B.H., KIM, J., HAN H.U. Isolation of dextran-producing *Leuconostoc lactis* from kimchi. *J Microbiol.* 2001, vol 39, no.1, p. 11-16.
- [104] KIM, M.E., SHIM, S.T., KIM, Y.S., KYUNG, K.H. Diversity of *Leuconostocs* on garlic surface, an extreme environment. *J Microbiol Biotechn.* 2002, vol. 12, no.3, p. 497-502.

- [105] UH Y., LEE, H.G, JANG, I.H., YOON, K.J., KIM, H.Y., KIM Y,K, A case of bacteremia caused by *Leuconostoc garlicum*. *Infect Chemother*. 2009, vol.41, no.6, p.375-9.
- [106] HAMASAKI, Y., AYAKI, M., FUCHU, H., SUGIYAMA, M., MORITA H. Behaviour of psychotropic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Appl Environ Microb*. 2003, vol. 69, p. 3668-71.
- [107] STREDANSKY, M., CONTI, E., BERTOCCHI, C., MATULOVA, M., ZANETTI, F. Succinoglycan production by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Ferment Bioeng*. 1998, vol. 85, no. 4, p. 398-403.
- [108] SANTOS, M., TEIXEIRA, J., RODRIGUES, A. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochem Eng J*. 2000, vol. 4, p. 177-88.
- [109] TSUCHIYA, H.M., KOESELL, H.J., CORMAN, J., BRYANT, M.O., FEGER, V.H., JACKSON, R.W. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *J Bacteriol*. 1952, vol. 64, p. 521-6.
- [110] PIŠŤEKOVÁ, H. *Možnosti izolace a charakterizace bakteriálních polysacharidů*. Diplomová práce. Zlín:UTB ze Zlíně, 2007, s. 30.
- [111] CAPEK, P., HLAVOŇOVÁ, E., MATULOVÁ, M., MISLOVICOVÁ, D., RŮŽIČKA, J., KOUTNÝ, M., KEPRDOVÁ, L. Isolation and characterization of an extracellular glucan produced by *Leuconostoc garlicum* PR. *Carbohydr Polym*. 2011, vol. 83, p. 88-93.
- [112] FINKMANN, W., ALTENDORF, K., STACKEBRANDT, E., LIPSKI, A. Characterization of N₂O-producing Xanthomonas-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microb*. 2000, vol. 50, p. 273-82.
- [113] CHEN, M.Y., TSAY S.S., CHEN K.Y., SHI, Y.CH., LIN, Y.T., LIN, G.H. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N₂O-producing species isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microb*. 2002, vol.52, p.2155-61.
- [114] SUIHKO, M.L., SINKKO, H., PARTANEN, L., MATTILA-SANDHOLM, T., SALKINOJA-SALONEN, M., RAASKA, L. Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. *J Appl Microbiol*. 2004, vol.97, p.1228-35.
- [115] THIERRY, S., MACARIE, H., LIZUJA, T., GEISSDÖRFER, W., ASSIH, E.A., SPANEVELLO, M., VERHE, F., THOMAS, P., FUDOU, R., MONROY, O., LABAT, M., OUATTARA, A.S. *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. *Int J Syst Evol Microb*. 2004, vol. 54, p. 2245-55.
- [116] MORA, R.S., LAURENT, F.M., DE PRADDO, R., FRANCO, A.R. Degradation of simazine by microorganisms isolated from soils of Spanish olive fields. *Pest Manag Sci*. 2005, vol. 91, p. 917-21.

- [117] SCHÄR-ZAMMARETTI, P., DILLMANN, M.L., D'AMICO, N., AFFOLTER, M., UBBINK, J. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microb.* 2005, vol. 71, no. 12, p. 8165-73
- [118] POLATI, R., ZAPPAROLI, G., GIUDICI, P., BOSSI, A. A CTAB based method for the preparation of total protein extract of wine spoilage microorganisms for proteomic analysis. *J Chromatogr B.* 2009, vol. 877, no. 10, p 887-91.
- [119] CUDLÍN, J. *Vybrané metody v mikrobiologii*. 1. vyd., Praha: Academia, 1981.

SEZNAM PUBLIKACÍ A AKTIVIT

PŘÍSPĚVKY NA KONFERENCÍCH

Hlavoňová E., Keprdová L., Růžička J. *Leuconostoc garlicum* jako původce viskózního bytnění aktivovaného kalu. Přednáška na „Mikrobiológia vody a životného prostredia 2009“, Poprad, Slovenská republika, 30.09. - 02.10.2009.

Barošová E., Růžička J., Muchová M. *Studium faktorů prostředí ovlivňující tvorbu extracelulárních polymerů bakterií aktivovaného kalu*. XVIII. konference mladých mikrobiologů, TOMÁŠKOVY DNY 2009, Brno, 4. - 5. června 2009.

Barošová E., Muchová M. *Význam bakterie Agrobacterium tumefaciens při viskózním bytnění*. Konference „Mezinárodní Bařova konference pro doktorandy a mladé vědecké pracovníky“, 4. ročník, Zlín, 10. dubna 2008, ISBN 978-80-7318-663-0

Růžička J., **Barošová E.**, Mikeš M., Durnová E., Halabalová V., Šimek L. *Isolace bakteriálních kultur z aktivovaného kalu s viskózním bytněním*. Konference „Vodárenská biologie 2005“, Praha, 2. – 3. února 2005, ISBN 80-86832-07-4

PUBLIKACE V ODBORNÝCH ČASOPISECH

P. Čapek, **E. Hlavoňová**, M. Matulová, D. Mislovicová, J. Růžička, M. Koutný, L. Keprdová: *Isolation and characterization of an extracellular glucan produced by Leuconostoc garlicum* PR. Carbohydrate polymers, vol. 83, p. 88-93, 2011. IF = 3,167 (2009)

Janča J., Kašpárková V., Halabalová V., Šimek L., Růžička J., **Barošová E.** *Micro-thermal field-flow fractionation of bacteria*. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, vol. 852, is. 1-2, p. 512-518, 2007. IF = 2,777 (2009)

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

Konzultace diplomových prací:

Keprdová L.: *Produkce exopolymerů bakteriální kulturou PR*. FT UTB Zlín, 2009

Husárová L.: *Bioflokulační vlastnosti bakteriálních exopolymerů*. FT UTB Zlín, 2009

Výuka předmětů:

Školní rok 2009/2010 letní semestr: Biochemie (laboratoře)

2008/2009 zimní semestr: Obecná mikrobiologie (laboratoře)

2007/2008 letní semestr: Biochemie (laboratoře)

CURRICULUM VITAE

Jméno: Ing. Eva HLAVOŇOVÁ

Datum narození: 12.02.1983

Adresa: Hlína 46, 664 91 Ivančice

E-mail: hlavonovae@seznam.cz

PRAXE:

- 1.9. – 31.12.2010 **AMEC s.r.o.** (Křenová 58, Brno)
- Specialista na odpadové hospodářství, EIA
- 1.4. - 30.9.2010 **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta Technologická,** (FT UTB Zlín), Ústav inženýrství ochrany životního prostředí (nám. T.G.Masaryka 275, Zlín)
- Odborný vědecký pracovník
- 1.10.2008-30.9.2009 **FT UTB Zlín,** Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
- Odborný vědecký pracovník
- srpen 2008 **AMEC s.r.o.** (dříve INVEST projekt NNC) (Křenová 58, Brno)
- Administrativní a technický asistent
- srpen - říjen 2007 **INVEST projekt NNC, s.r.o.** (Špitálka 16, Brno)
- Administrativní a technický asistent
- 2003 – 2006 **FT UTB Zlín** (nám. T.G.Masaryka 275, Zlín)
- Pomocná vědecká síla v laboratořích na Ústavu inženýrství ochrany ŽP

VZDĚLÁNÍ:

- 2007 – dnes FT UTB Zlín (nám. T.G.Masaryka 275, Zlín)
Program: Chemie a technologie materiálů, Obor: Technologie makromolekulárních látek (doktorské studium)
- 2005 – 2007 FT UTB Zlín (nám. T.G.Masaryka 275, Zlín)
Program: Chemie a technologie materiálů, Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí (magisterské studium, titul **Ing.**),
- 2002 – 2005 FT UTB Zlín (nám. T.G.Masaryka 275, Zlín)
Program: Chemie a technologie materiálů, Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí (bakalářské studium, titul **Bc.**)
- 1998 – 2002 Střední průmyslová škola chemická (Vranovská 65, Brno)
Obor: Farmaceutické substance

DALŠÍ ZKUŠENOSTI:

Kurzy:

A) Jazykové a Environmentální kurzy:

- srpen 2009 „*Efficient Energy Use*“ a „*Solar Heating Technology*“, Halmstad Univerzity, Falkenberg, Švédsko
- dva 14 denní intenzivní kurzy zaměřené na efektivní využití energie a na možnosti využití sluneční energie (získány certifikáty)
- 09.-19.6. 2008 „*Bioenergy course*“, Halmstad Univerzity, Falkenberg, Švédsko
- 14 denní intenzivní kurz zaměřený na obnovitelné zdroje energie (získán certifikát)

B) Odborný kurz:

- Leden-květen 2010 „*Odpadové hospodářství*“, VŠCHT, Praha
- Třítýdenní kurz zaměřený na problematiku odpadového hospodářství (získáno osvědčení)
- 6.-10.10.2008 „*Základy vědecké práce*“, Akademie věd ČR, Praha
- Kurz zaměřený na psaní a prezentaci odborných prací (získán certifikát)

C) Vzdělávací program:

- 2006 – 2007 „*Doplňující studium v oblasti pedagogických věd pro učitele odborných předmětů*“, UTB Zlín, Fakulta Humanitních studií (získáno osvědčení)

Účasti na vědeckých soutěžích:

- 2004, 2006 Účasti ve Studentské vědecké konferenci FT UTB Zlín (Umístění: 2. a 3. místo)

OSTATNÍ:

Jazyky: anglický jazyk: slovem i písmem - schopnost komunikace (B1)
německý jazyk: základy (A1)

Práce s PC: MS Windows, Word, Excel, PowerPoint, Outlook, Internet, E-mail

REFERENCE:

Doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ředitel ústavu a vědecko-pedagogický pracovník

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí, FT UTB Zlín

nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín

e-mail: ruzickaj@ft.utb.cz tel.: 576 031 210