

Studium termofilních mikroorganismů schopných rozkladu xanthanu a gellanu

Bc. Dana Holišová

Diplomová práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Dana HOLIŠOVÁ**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Studium termofilních mikroorganismů schopných rozkladu xanthanu a gellanu**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši s tematikou bakteriální degradace xanthanu a gellanu, se zaměřením na termofilní mikroorganismy.
2. Proveďte pokusy izolace termofilních bakterií (ve formě konsorcií nebo čistých kultur) rozkládajících uvedené polysacharidy.
3. Získané směsné či čisté kultury pomocí základních mikrobiologických testů popište (Gramova reakce, schopnost sporulace), případně ověřte jejich širší degradační vlastnosti.
4. Získané výsledky přehledně zpracujte, dokumentujte tabelárně i graficky pomocí běžného softwaru (Word, Excel).

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

19. února 2008

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2008

Ve Zlíně dne 19. února 2008



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
pověřený ředitel ústavu

ABSTRAKT

V diplomové práci byl studován počet termofilních bakterií rozkládajících xanthan a gellan. Jako zdroje bakterií sloužily vzorky kompostů.

Bylo zjištěno, že všechny použité vzorky obsahovaly degradační bakterie xanthanu a gellanu, avšak v různých počtech. Pokusy o izolaci degradačních bakterií však nebyly zcela úspěšné a byly získány bakterie, které se podílí na degradaci polysacharidů, ale jejich přesné vlastnosti a úloha jako degradérů nebyly objasněny.

Dále byly prováděny degradační testy, pomocí nichž byly zjišťovány schopnosti konsorcií rozkládat i jiné polysacharidy než xanthan a gellan. A to dextran, alginát a škrob.

Klíčová slova: bakterie, xanthan, gellan, kompost, degradace, izolace

ABSTRACT

This thesis presents an investigation of quantity of the thermophilic xanthan and gellan degrading bacteria. Three compost samples were used as the sources of such bacteria.

This investigation resulted in a discovery that the composts contained both the xanthan and the gellan degrading bacteria, however their quantities were different. However, the attempts to isolate degrading bacteria in the state of pure culture(s) were not fully successful. There were obtained bacteria that participate in the polysaccharide degradation, but their exact degrading features and function were not cleared up.

Further, some degradation tests were carried out in which the abilities of two bacterial consortia to degrade the polysaccharides such as dextran, alginate and starch were tested.

Keywords: bacteria, xanthan, gellan, compost, degradation, isolation

Poděkování

Velice děkuji vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za vlídný přístup, odborné vedení, cenné připomínky a rady, bez kterých bych se při zpracování mé práce neobešla.

Ráda bych také poděkovala Ing. Markétě Muchové za pomoc a užitečné rady při přípravě a měření.

Dále děkuji celému kolektivu ÚIOŽP za vytvoření výborných pracovních podmínek.

V neposlední řadě patří díky mé rodině za pomoc, trpělivost a podporu v průběhu studia.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně dne 16.5. 2008

.....
Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	8
1 LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
1.1 POLYSACHARIDY A EXOPOLYSACHARIDY	9
1.2 XANTHAN.....	9
1.2.1 Strukturální jednotka xanthanu	10
1.2.2 Nadmolekulární struktura xanthanu	10
1.2.3 Funkčnost xanthanu	11
1.2.4 Izolace bakterií degradujících xanthan	11
1.3 GELLAN.....	12
1.3.1 Strukturální jednotka gellanu	12
1.3.2 Nadmolekulární struktura gellanu	13
1.3.3 Funkčnost gellanu	13
1.3.4 Izolace mikrobiálních degradérů gellanu	13
1.4 KOMPOSTOVÁNÍ	14
1.4.1 Složení kompostu	14
1.4.2 Fáze kompostování.....	15
1.4.3 Mikrobiologické složení kompostu.....	16
1.5 TERMOFILNÍ BAKTERIE.....	17
2 MATERIÁLY A METODIKA	19
2.1 ŽIVNÁ MÉDIA A ROZTOKY POTŘEBNÉ K JEJICH PŘÍPRAVĚ	19
2.2 POUŽITÉ VZORKY	24
2.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	25
2.4 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY	26
2.4.1 Sterilizace	26
2.4.2 Výtěp vzorku.....	26
2.4.3 Metoda MPN	26
2.4.4 Pasážování.....	29
2.4.5 Izolace kultur z pasáží	30
2.4.6 Naočkování získaných čistých kultur	30
2.4.7 Zakonzervování konsorcií	30
2.4.8 Oživení zakonzervovaných konsorcií	31
2.4.9 Degradční testy	31
2.4.10 Fixace preparátu	31
2.4.11 Gramovo barvení.....	32
3 VÝSLEDKOVÁ A DISKUZNÍ ČÁST	33
3.1 STANOVENÍ POČTU DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ METODOU MPN	33
3.1.1 Jednotlivé vzorky	33
3.2 DEGRADAČNÍ TESTY	43
3.3 IZOLACE DEGRADAČNÍCH KULTUR	47
3.3.1 Etapa 1	49
3.3.2 Etapa 2.....	52

ZÁVĚR.....	55
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	57
SEZNAM OBRÁZKŮ	58
SEZNAM TABULEK.....	59

ÚVOD

O kompostování, jako jedné z nejstarších recyklačních technologií, se dochovaly záznamy již z doby před dvěma tisíci lety. Colomella, římský učenec popsal, jak mají být zemědělské odpady míchány, vrstveny, překopány a využity jako hnojivo. Pojmenování „kompost“ vzniklo z latinského „composta“ (compostium - skladba). S intenzivním využitím půdy a potřebou zdrojů živin docházelo k výraznějšímu rozvoji kompostování.

Protože kompost obsahuje širokou škálu nejrůznějších druhů bakterií, byly v této diplomové práci uskutečňovány pokusy o izolaci termofilních mikroorganismů rozkládajících polysacharidy xanthan a gellan z vybraných vzorků kompostů.

Mikrobiální polysacharidy jsou poměrně novou skupinou polysacharidů. Nabízejí nové vlastnosti, které se dají účelně využít jednak v průmyslových biotechnologických aplikacích, ale také v rychlé a řízené syntéze polysacharidů. Patří mezi ně např. xanthan a gellan, využívající se jako zahušťovadla, stabilizátory a želatinační činidla.

Bylo zjištěno, že tyto polysacharidy jsou biologicky rozložitelné. Proto jim začala být věnována větší pozornost. Výzkum se zaměřuje především na odstranění těchto látek biologickými procesy, které jsou vykonávány mikroorganismy a jejich enzymy. A to je také náplní této diplomové práce.

1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1 Polysacharidy a exopolysacharidy

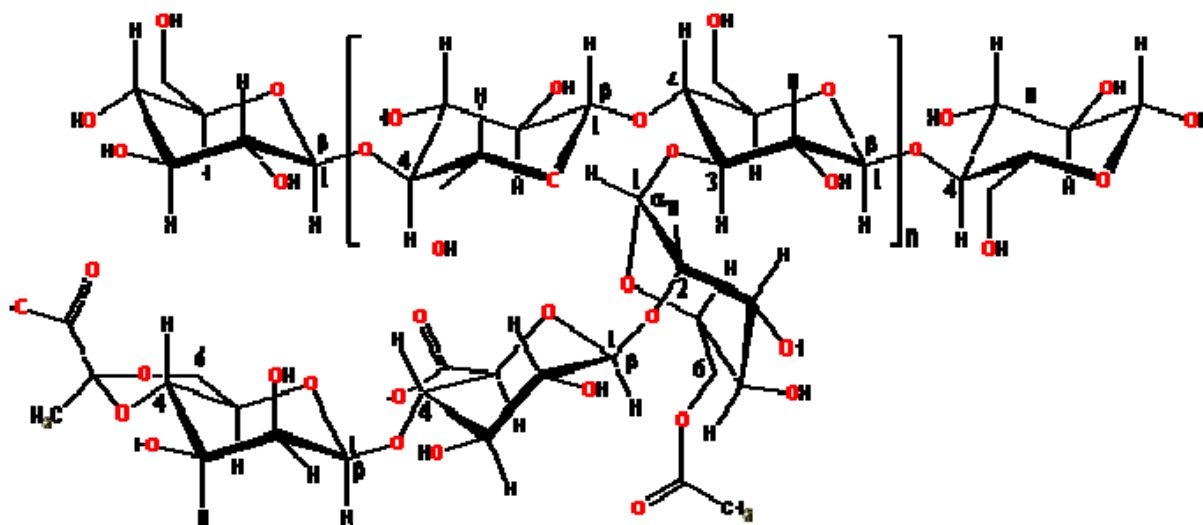
Polysacharidy jsou lineární nebo rozvětvené polymerní molekuly, tvořené monosacharidovými jednotkami, které jsou spojeny glykosidickými vazbami. Polysacharidy mohou obsahovat jeden typ monosacharidů (homoglykany) nebo různé typy monosacharidů (heteroglykany). Kromě toho se zde mohou vyskytovat nesacharidové zbytky jako např. ketalové skupiny pyrohroznové, acetylové nebo sulfátové skupiny. Polysacharidy rostlinného i mikrobiálního původu se intenzivně využívají v průmyslu jako zahušťovadla, želatinační činidla a stabilizátory v emulzích a disperzích.

Na rozdíl od rostlinných polysacharidů, jsou studie o strukturních a reologických vlastnostech bakteriálních exopolysacharidů jen omezené. Některé exopolysacharidy se používají v potravinářském průmyslu jako želatinační činidla. Bakteriální exopolysacharidy mohou být buď homopolymery, které se skládají z jednoduchých sacharidů nebo heteropolymery, ty jsou složeny ze dvou až čtyř různých druhů monosacharidů. Molekuly exopolysacharidů jsou obvykle lineární, i když se v některých strukturách vyskytují různě dlouhé postranní řetězce. Na rozdíl od polysacharidů rostlinného původu jsou struktury mikrobiálních exopolysacharidů v podstatě pravidelné, což způsobuje biosyntéza z opakujících se jednotek oligosacharidů [1].

1.2 Xanthan

Xanthan je polysacharid, který je komerčně vyráběn pomocí aerobního hloubkové kultivace z bakterie *Xanthomonas campestris*. Je nejvýznamnějším extracelulárním bakteriálním hydrokoloidem, který se používá v potravinářství např. do zmrzlin, salátových dressingů nebo nápojů. Má mnoho průmyslových aplikací, jako zahušťovač vodných roztoků, stabilizátor emulzí a pěnidlo. Převážná část xanthanu se využívá při výrobě výbušnin, barev, nátěrů, lesků a kosmetiky [5]. V kombinaci s dalšími hydrokoloidy může být použit jako gelotvorná látka. Xanthan je dobře rozpustný ve vodě, kde tvoří viskózní disperze.[2].

1.2.1 Strukturální jednotka xanthanu



Obr. 1: Molekulární struktura xanthanu [3]

Xanthan má komplikovanou molekulární strukturu, jejíž hlavní řetězec tvoří β - (1 - 4) - D - glukosa. Každý glukosový řetězec obsahuje tři - sacharidové postranní řetězce, které jsou tvořené dvěma manosovými jednotkami s vloženou kyselinou glukuronovou. Tedy postranní řetězce se skládají z (3 - 1) - α - D - manopyranosy - (2 - 1) - β - D - glukuronové kyseliny - (4 - 1) - β - D - manopyranosy. Manosová jednotka, která je umístěna nejbližší k hlavnímu řetězci, může obsahovat acetylovou skupinu na uhlíku C6 a terminální manosa může mezi uhlíky C4 a C6 obsahovat pyrohroznovou kyselinu [3].

1.2.2 Nadmolekulární struktura xanthanu

Přirozeným stavem xanthanu je dvojitá pravotočivá šroubovice. Stabilita této šroubovice je silně závislá na iontovém prostředí a postranních řetězcích, čímž činí tuto strukturu stabilní proti působení kyselin, zásad a enzymů. To je zvláště důležité v případech, kdy preparáty obsahují celulasu. Každá molekula sestává asi ze 7000 pentamerů a xanthan je méně polydisperzní než většina hydrokoloidů. Při zahřívání přechází xanthan do neuspořádaného stavu a po ochlazení se vrací zpět ke šroubovicové struktuře. Všeobecně se však soudí, že přirozený xanthan existuje ve formě, kde řetězce jsou zpárované. Jakmile je však

toto narušeno a molekuly xanthanu mění své uspořádání, není už možné zpárování přesně zachovat a vytvoří se částečně zesítěná struktura tak, že se šroubovice začnou vytvářet kolem různých sousedních objektů [3].

1.2.3 Funkčnost xanthanu

Jeden z enzymů, který se používá pro modifikaci xanthanu je xanthan lyasa. Xanthan je rozkládán čistými kulturami, stejně jako smíšenými. Xanthan se považuje za negelující látku a používá se kvůli možnosti ovlivňovat viskozitu, což je způsobeno slabšími molekulárními vazbami. Ve vodě xanthan rychle hydratuje bez vytváření shluků. Má schopnost dlouhodobě zadržovat vodu, a proto může sloužit k řízení synergie a k pozdržení rekrystalizace, při cyklech zmrazování a rozmrazování. Nejdůležitější vlastností xanthanu je velice vysoká viskozita při nízkém střižném napětí (*shear increase*). Nízká viskozita při vysokém střižném napětí znamená, že roztok lze snadno míchat a nalévat. Zatímco vysoká viskozita při nízkém střižném napětí tvoří dobrou suspenzi a zvyšuje stabilitu koloidních suspenzí. [3].

1.2.4 Izolace bakterií degradujících xanthan

Xanthan lyasa vytvořená bakteriálním konsorciem byla objevena Cadmusem a kolektivem a má poměrně vysokou tepelnou stabilitu. V čisté formě může tato lyasa i delší dobu odolávat teplotě až 60 °C v prostředí s 0,25 M NaCl, které dosud neznámým způsobem tento enzym stabilizuje. Schopnost čisté lyasy působit na intaktní xanthan znamená, že tento enzym může být použit k přípravě modifikovaného xanthanu, kdy se tvoří konečné zbytky nenasycené kyseliny glukuronové, a ke zkoumání vlastností tohoto xanthanu pro jeho případné použití v potravinářském průmyslu. Čistá lyasa může být rovněž užitečná při zkoumání chemické struktury ostatních polysacharidů, u kterých je důležitý výskyt manosy se zbytky kyseliny pyrohroznové [9].

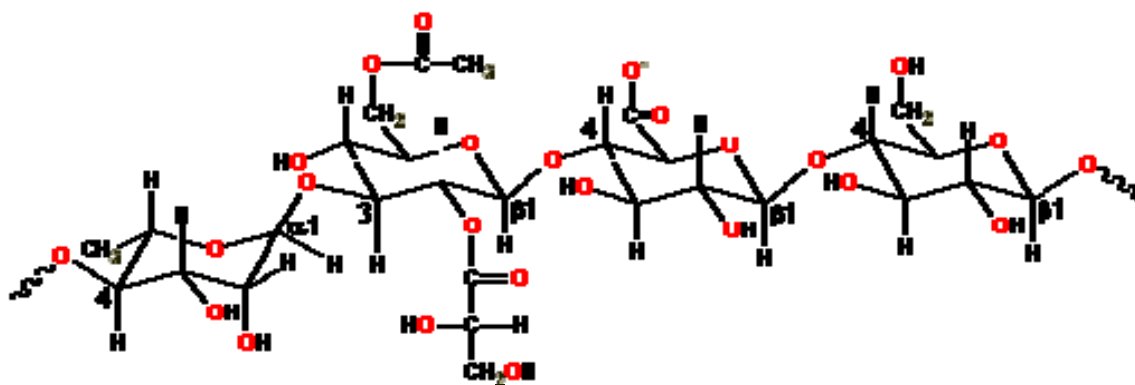
Cadmus a kolektiv izolovali čistou kulturu *Bacillus sp.* K11 ze směsi, která obsahovala půdu a rozkládající se stromovou dřev. K produkci enzymu z kmene K11 byl izolován jako pomocný kmen K17. Kmen K17 byl vyizolován ze stejného vzorku půdy jako kmen K11 a byl identifikován jako *Flavobacterium sp.* Tuto dvoučlennou směsnou kulturu

nazvali K11 + K17. Kromě této kultury byl vyizolován další producent xanthanasy kmen *Bacillus sp.* 13-4. Tento byl získán z aktivovaného kalu [10].

1.3 Gellan

Gellan je bakteriální exopolysacharid s vysokou molekulovou hmotností, produkováný čistou kulturou *Spingomonas elodea* (dříve nazývané *Pseudomonas elodea*) aerobním hloubkovým procesem. Používá se především v průmyslu jako suspenzační prostředek, želatinační činidlo [1].

1.3.1 Strukturální jednotka gellanu



Obr. 2: Molekulární struktura gellanu [4]

Gellan má lineární strukturu. Je složený z tetrasacharidů 4 – L – rhamnosa – (α – 1 – 3) – D – glukosa – (β – 1 – 4) – D – glukosa – (β – 1 – 4) – D – glukosa. Glukosa vázaná v pozici 3 je acetylována a glycerylována. Jelikož má gellan vysokou molekulovou hmotnost, skládá se z 50 000 sacharidových zbytků a běžně se před použitím v potravinářství desterifikuje alkalickým zpracováním [4].

1.3.2 Nadmolekulární struktura gellanu

Gellan vytváří tříčlennou dvojitou šroubovici, v níž se dva levotočivé řetězce otáčejí kolem sebe a třetí se ovíjí kolem nich. Jednotlivé řetězce jsou propojeny vodíkovými vazbami. Dvojice šroubovic mohou vytvářet antiparalelní spojovací zóny s ionty Ca^{2+} [4].

1.3.3 Funkčnost gellanu

Funkčnost gellanu je závislá na stupni acetylace a vyskytujících se iontech. Pokud je gellan ponechán v acetylovaném stavu, vytváří se měkký, elastický, průhledný a vláčný gel. Jestliže však dojde k deacetylaci gellanu, začne se tvořit tuhý, nepružný a křehký gel. Roztoky gellanu nejsou výrazně viskózní. Přeměna gelu na sol probíhá při 50 °C a je závislá na koncentraci sloučeniny. K tvorbě tepelně reverzibilních gelů dochází při chlazení a při nízkých koncentracích (0,005 – 0,1 hm.%) přítomných kationů [4].

1.3.4 Izolace mikrobiálních degradérů gellanu

V současné době není moc informací o enzimech depolymerujících gellan, ani o jejich producentech. Jsou známy dvě zprávy o kmenech Gram negativních bakterií, které jsou schopné produkovat gellan lyasu. Byla popsána syntéza gellan lyasy kmenem mezofilních bakterií rodu *Bacillus* (Hashimoto a kolektiv 1998; Mikolajczak a kolektiv 1994; Miyake a kolektiv 2004) [11].

Z bulharského vřídla byl izolován kmen termofilních bakterií, který je schopen rozkládat gellan. Na základě jeho morfologických a biochemických vlastností byl tento kmen identifikován jako *Geobacillus stearothermophilus*. Vyrostl v syntetickém prostředí spolu s gellanem jako jediným zdrojem uhlíku. Bylo zjištěno, že tento bakteriální kmen extracelulárně produkuje gellan lyasu. Jeho syntéza byla indukovatelná, v roztoku s mikrobiální kulturou bez gellanu nebyl tento enzym zjištěn [11].

1.4 Kompostování

V procesu aerobního kompostování je základem biodegradace organické hmoty účinkem aerobních mikroorganismů, kombinovaná s dalšími reakcemi, mezi které patří zejména oxidace a hydrolyza. Pro rychlejší a efektivnější kompostování je tedy důležitý přívod kyslíku. Na humifikačním procesu se podílí převážně heterotrofní mikroorganismy, které rozkládají organické látky a část z nich oxidují na CO_2 a H_2O . V průběhu jednotlivých fází kompostování převládají různé společnosti mikroorganismů. Nejdůležitějším a snadno měřitelným ukazatelem stavu kompostu je teplota. Pokud teplota v čerstvém kompostu nestoupá, nebo po předešlém zahřívání rychle klesá, je to důkaz nepříznivých podmínek pro život mikroorganismů. Nejčastěji se jedná o nedostatek kyslíku. Teplotu kompostu lze ovlivňovat zavlažováním, přikrýváním a překopáváním.

1.4.1 Složení kompostu

Kvalitní kompost by měl na začátku procesu vykazovat tyto parametry:

- vlhkost 40 – 60 %, pH 6,0 – 6,5
- obsah organických látek v sušině 50 – 82 %
- dusík nad 2 %
- fosfor nad 0,65 %
- draslík nad 1,25 %
- vápník + hořčík nad 4,5 % [12]

1.4.2 Fáze kompostování

1. fáze - mineralizace

Tato fáze trvá po dobu několika dní. Vyznačuje se rychlým nárůstem teploty, za kterým následuje relativně rychlý pokles. Počáteční rozkládání snadno odbouratelné hmoty uskutečňují mezofilní mikroorganismy produkující teplo, které způsobuje rychle stoupající teplotu kompostu. Na začátku jsou odbourávány sacharidy, bílkoviny, z polysacharidů škroby, později také celulóza a další části dřevní hmoty. Jako konečné produkty těchto rozkladů vznikají voda, CO_2 a další látky. Pokud je ve směsi přebytek dusíku může vznikat amoniak. Protože mikroorganismy nejsou schopny odbourávat některé vyšší organické kyseliny, roste jejich relativní zastoupení a dochází k poklesu pH. Mezofilní mikroorganismy jsou nejaktivnější při teplotách 30 - 37 °C. Pokud vzroste teplota nad 40 °C, nastupují termofilní mikroorganismy, které mohou zvýšit teplotu kompostu až na 70 °C. Teplotám nad 65 °C je nutno zamezit, neboť při nich mnoho druhů mikroorganismů hyne a omezuje se rychlost rozkládání, což způsobuje prodloužení doby zrání kompostu. Odborníci využívají provzdušňování a míchání k držení teploty pod touto hranicí. Během mineralizace se příliš nemění vzhled kompostu, dochází k hutnění materiálu, odpařování vody a k poklesu celkové hmotnosti díky produkci CO_2 a dalších plynů. Celková ztráta hmoty může dosáhnout až 30 %. Důležité je, že v této fázi dochází k hygienizaci kompostu, což znamená, že teplota likviduje četné hnilobné a patogenní bakterie.

2. fáze – přeměnná

Doba trvání této fáze může být několik dní až měsíců. Během přeměnné fáze vysoké teploty urychlují rozklad bílkovin, tuků a polysacharidů jako celulózy a hemicelulózy. Protože se však zásoby těchto vysoko-energetických směsí vyčerpávají, pozvolna klesá teplota kompostu až na 25 °C a termofilní bakterie nahrazuje skupina mezofilních mikroorganismů. Při rozkladu hůře dostupných složek se zde uplatňují aktinomycéty. V této fázi jsou organické látky postupně přeměňovány na humusové složky, které se váží na částice jílu a přechází na stabilní formy odolné vůči mikrobiálnímu rozkladu. Struktura a vzhled kompostu se ztrácí a odbourává se dalších asi 10 hmotnostních procent směsi. Tento kompost lze již použít jako hnojivo.

3. fáze – dozrávání

Několika- měsíční proces chlazení a zrání kompostu. Teplota zde klesá až na hodnotu teploty okolí. V této konečné fázi opět pracují mezofilní mikroorganismy. Dochází zde k tvorbě kvalitního a stabilního humusu. Není zde pozorován téměř žádný úbytek hmotnosti. Objevují se kokovité bakterie jako představitelé autochtonní mikroflóry, roztoči, žížaly a jiné organismy.

1.4.3 Mikrobiologické složení kompostu

Bakterie

Bakterie jsou nejmenší a nejvíce početné organismy nacházející se v kompostu. Jsou zodpovědné za většinu rozkladů a vytváření tepla v kompostu. Většina z nich jsou metabolicky rozmanité skupiny, které využívají širokou řadu enzymů pro biochemické rozkládání různorodých organických materiálů. Pokud se kompost ohřeje nad 40°C, převládají nad mezofilními bakteriemi termofilní, hlavně z rodu *Bacillus*. Z kompostu byly za nejvyšších teplot izolovány bakterie z rodu *Thermus*. Rozmanitost druhů bakterií je vysoká při teplotách 50 - 55°C, ale rychle se snižuje při 60°C a výše. Řada termofilních bakterií (*Bacillus sp.* a příbuzné rody) má schopnost sporulace. Jakmile dojde k poklesu teploty a ochlazení kompostu, převládají opět mezofilní bakterie.

Aktinomycéty

Jsou to organismy vzhledově vzdáleně podobné houbám, ale patřící mezi bakterie. Stejně jako bakterie i ony postrádají pravá jádra, ale rostou v podobě mycelií jako houby. Mají důležitou roli v degradaci složitých organických látek, jako například celulosy, ligninu, chitinu i proteinů. Díky řadě enzymů mohou biochemicky rozkládat četné obtížně rozložitelné sloučeniny, jak přírodní, tak syntetické. Některé druhy aktinomycét, zvláště termofilní aktinomycéty se objevují v přeměnné fázi a ostatní během chladnější fáze zrání.

Houby

Mezi houby se zahrnují plísně a kvasinky, a společně jsou odpovědné za rozkládání mnoha složitých rostlinných polymerů v půdách a kompostech. Houby jsou pro kompost důležité, protože rozkládají špatně rozložitelné látky a umožňují bakteriím pokračovat v rozkladném procesu, pokud byla většina celulózy již vyčerpána. Šíří se a rozrůstáním mycelií a mohou rozkládat organické zbytky i za podmínek, které jsou již pro bakterie nepříznivé (např. snížená dostupnost vlhkosti, pokles pH, nedostatek dusíku apod.). Většina hub roste saprofytičky, tj. na odumřelém organickém materiálu.

Houby jsou četné během první a druhé fáze kompostování. Nejvíce hub se vyskytuje ve vnější vrstvě kompostu, kde je největší přísun kyslíku.

Prvoci

Prvoci jsou jedno- buněčné mikroskopické organismy, které najdeme v kapičkách vody v kompostu. Hrají relativně menší roli v procesu rozkládání. Prvoci získávají svou potravu ve formě pevných částic hlavně z organického materiálu a drobné drtě vyskytující se v kompostu. Také působí jako sekundární konzumenti, kteří přijímají bakterie a houby.

V kompostu se vyskytují také vířníci, což jsou mikroskopické mnohobuněčné organismy, které se nalézají v tenkých vrstvách vody v kompostu. Živí se organickou hmotou a také přijímají bakterie a houby.

1.5 Termofilní bakterie

V kompostu žijí široké skupiny mikroorganismů. Nejvíce četné jsou bakterie, které se obvykle dělí do několika skupin, založených na základě rozdílných teplot, ve kterých rostou nejvíce. Bakterie rostoucí při nízkých teplotách jsou psychrofilní, jejichž optimální růstová teplota je 15°C, ale mohou růst i pod bodem mrazu až do -10°C. Mezofilní bakterie žijí v průměrných teplotách 20 - 40°C, zahrnují téměř všechny bakterie patogenní pro člověka i zvířata. Bakterie rostoucí ve vyšších teplotách se nazývají termofilní a daří se jim při teplotách 40 - 85 °C. Některé druhy termofilních bakterií, které přežívají extrémně vy-

soké teploty a dokonce teplotu bodu varu vody se nazývají hypertermofilní organismy. Tyto mají teplotní optimum 80°C a výše.

Termofilní bakterie se přirozeně vyskytují v horkých pramenech, kompostech, exkrementech, tropických půdách nebo v odpadcích.

První termofilní bakterie byly izolovány v roce 1879 Miquelem, který objevil bakterie schopné se rozvíjet při teplotě 72°C. Tyto bakterie našel v půdě, prachu, exkrementech a kalech z odpadních vod. Nedlouho poté bylo zjištěno, že nejvíce různorodých termofilních bakterií se vyskytuje v půdách. Protože půdní bakterie dobře prospívají ve vysokých teplotách, ale ne při pokojových.

Zakompostované nebo pohnojené zahradnické půdy mohou obsahovat 1–10 % termofilních druhů bakterií. Zatímco v polních půdách se jich vyskytuje jen 0,25 % a méně. Neobdělávané půdy mohou být zcela bez termofilních bakterií [6].

Japonský profesor Oshima se zajímal o to, že organismy často žijí v místech, která se zdají zničená. (Například, termofilní bakterie žijí v okolí horkých pramenů a podmorských vulkánů, kde teploty mohou převyšovat až 100°C.) Odpovědi hledal ve strukturách z proteinů. V roce 1968 isoloval nový druh termofilní bakterie z horkého pramenu v Izu, a pojmenoval ho *Thermus thermophilus*. Tato bakterie má teplotu růstu větší než 80°C, což byla nejvyšší růstová teplota v té době. Zjistil, že délka těla bakterie jsou 2 μm a struktura buněčného obalu je velmi podobná jako u *Escherichia coli*, která se široce využívá v biochemickém výzkumu [7].



Obr. 3: Bakterie *Thermus thermophilus* [7]

2 MATERIÁLY A METODIKA

2.1 Živná média a roztoky potřebné k jejich přípravě

Fyziologický roztok

Byl připraven rozpuštěním 8,5 g NaCl v 1 l destilované vody. Roztok byl promíchán a dán v uzavřené lahvi sterilizovat do autoklávu na 30 minut při 125 °C.

Suspendační médium

Na 50 ml suspenčního média bylo použito:

Fyziologický roztok	25
ml	
Tween 80	0,05ml
Difosforečnan sodný	0,2 g
Destilovaná voda	25 ml

Všechny látky byly dány do láhve a důkladně promíchány. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 125 °C na 30 minut. Suspendační médium slouží k vytřepávání vzorku kompostu, k uvolnění bakterií do suspence.

Roztok A

Byl připraven rozpuštěním 9 g KH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan draselný) v 1 l destilované vody.

Roztok B

Byl připraven rozpuštěním 24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát) v 1 l destilované vody.

Roztok stopových prvků

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

Navážené množství těchto látek bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody a důkladně promícháno.

Minerální médium (MM)

Na 100 ml minerálního média bylo použito:

Roztok A (KH ₂ PO ₄)	2 ml
Roztok B (Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O)	8 ml
Roztok Mg(SO ₄) · 7 H ₂ O (zásobní roztok 10 g/l)	1 ml
Roztok NH ₄ Cl (zásobní roztok 30 g/l)	1 ml
Roztok CaCl ₂ · 2 H ₂ O (zásobní roztok 1 g/l)	1 ml
Roztok NaCl (zásobní roztok 50 g/l)	1 ml
Roztok Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₆ (zásobní roztok 3 g/l)	1 ml
Roztok stopových prvků	0,2 ml
Kvasničný autolyzát	4 mg
Destilovaná voda	85 ml

Minerální médium s xanthanem / gellanem (MMX / MMG)

Na 100 ml MMX / MMG bylo použito:

Minerální médium (MM)	100
ml	
Xanthan (p.a., FLUKA, SRN)	50 mg
Gellan (deacylovaný p.a., FLUKA, SRN)	50
mg	

Bylo provedeno rozpuštění xanthanu a gellanu v lahvích s minerálním médiem. Rozpuštění se provádí za tepla ve vodní lázni, lahve byly po chvilkách intenzívně protřepávány. Poté bylo po 15 ml minerální média s xanthanem / gellanem rozpipetováno do lahviček o objemu 100 ml. Tyto lahvičky byly dány sterilizovat do autoklávu na 30 minut při 125 °C.

Minerální agar s glukosou (MA – GLU)

Minerální agar	1,9
g	
Glukosa	0,5 g
Kvasničný autolyzát	0,004
g	
Roztok stopových prvků	0,2 ml
Destilovaná voda	100 ml

Všechny složky byly rozpuštěny a promíchány v láhvi. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu na 30 minut při 125 °C. Po zchladnutí byl agar v boxu rozlit do Petriho misek a nechán ztuhnout.

Minerální agar s glukosou s vyšším podílem agaru (MA – GLU + A)

Minerální agar	1,9 g
Glukosa	0,5 g
Kvasničný autolyzát	0,004 g
Roztok stopových prvků	0,2 ml
Čistý agar	2,4 g
Destilovaná voda	100 ml

Všechny složky byly rozpuštěny a důkladně promíchány v láhvi. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu na 30 minut při 125 °C. Po zchladnutí byl agar v boxu rozlit do Petriho misek a nechán ztuhnout.

TYA agar

TYA agar (HIMEDIA, Indie)	2,1 g
Destilovaná voda	100 ml

TYA agar byl navážen a rozpuštěn v destilované vodě. Po důkladném promíchání v láhvi byl dán sterilizovat do autoklávu na 30 minut při 125 °C. Po zchladnutí byl agar v boxu rozlit do Petriho misek a nechán zatuhnout.

TYA agar s vyšším podílem agaru (TYA + A)

TYA agar (HIMEDIA)	2,1 g
Čistý agar	2,5 g
Destilovaná voda	100 ml

Obě látky byly naváženy a rozpuštěny v láhvi s destilovanou vodou. Po promíchání se dala láhev sterilizovat do autoklávu na 30 minut při 125 °C. Po zchladnutí byl agar v boxu rozlit do Petriho misek a nechán ztuhnout.

Xanthanový agar 15 g/l

Xanthan (p.a., FLUKA)	1,5 g
Čistý agar	0,5 g
Kvasničný autolyzát	0,01 g
Minerální médium	100 ml

Všechny složky byly rozpuštěny a důkladně promíchány v láhvi. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu na 30 minut při 125 °C. Agar byl v boxu ještě za horka rozlit do Petriho misek a nechán ztuhnout.

Xanthanový agar 25 g/l

Xanthan (p.a., FLUKA)	2,5 g
Čistý agar	0,8 g
Kvasničný autolyzát	0,01 g
Minerální médium	100 ml

Všechny složky byly rozpuštěny a důkladně promíchány v láhvi. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu na 30 minut při 125 °C. Agar byl v boxu ještě za horka rozlit do Petriho misek a nechán ztuhnout.

Gellanový gel 15 g/l

Gellan (deacylovaný p.a., FLUKA)	1,5 g
Kvasničný autolyzát	0,01 g
Minerální médium	100 ml

Všechny složky byly rozpuštěny a důkladně promíchány v láhvi. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu na 30 minut při 125 °C. Agar byl v boxu ještě za horka rozlit do Petriho misek a nechán ztuhnout.

Gellanový gel 30 g/l

Gellan (deacylovaný p.a., FLUKA)	3
g	
Kvasničný autolyzát	0,01
g	
Minerální médium	100 ml

Všechny složky byly rozpuštěny a důkladně promíchány v láhvi. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu na 30 minut při 125 °C. Agar byl v boxu ještě za horka rozlit do Petriho misek a nechán ztuhnout.

2.2 Použité vzorky

Vzorky kompostů:

- **Vzorek č. 1** – Zahradnický kompost , Agro cs akciová spol. a Česká Skalice, deklarované pH = 6,0 – 8,5 sušina 49 %
- **Vzorek č. 2** – Kompost z ovčí farmy Prlov , sušina 50,6 %
- **Vzorek č. 3** – Zahradnický kompost, Agro cs, deklarované pH = 6,0 – 8,5 sušina 39,5 %
spalitelné látky min 45 % sušiny

2.3 Přístrojové vybavení

- Analyzátor uhlíku 5000 A (Shimadzu, Japonsko)
- Centrifuga Rotanta 460 (SRN)
- Centrifuga MR 23i (Jouan, Francie)
- Elektrická sušárna (Memmert)
- Termostat (Medingen)
- Chladnička (Ardo, ČR)
- Chladnička (Zanussi, ČR)
- Mrazicí box (Mybio)
- Předvážky KERN 440-47 (SRN)
- Předvážky KERN EW (SRN)
- Analytické váhy KERN 700 (SRN)
- Elektrický vaříč (ETA, ČR)
- pH metr OP – 208 + skleněná elektroda (Radelkis, Maďarsko)
- Spekol 11 (bývalá NDR)

- Mikroskop CX 41 (Olympus)
- Tlakový hrnec (Tescoma, ČR)
- Laboratorní autokláv St-MCS-203 (Sanoclav, SRN)
- Aseptický laminární box (Telstar, Španělsko)
- Mikrodávkočáče (1-5 ml, 100-1000 μ l, 20-200 μ l, 2-20 μ l) (Biohit, Finsko)

2.4 Metodika a pracovní postupy

2.4.1 Sterilizace

Při práci bylo nutno dodržovat zásady tzv. aseptické práce, aby bylo zamezeno potenciální kontaminaci mikroorganismy. Což vyžadovalo sterilizaci všech používaných roztoků a pomůcek. Sterilizace minerálních médií a živných půd probíhala v autoklávu po dobu 30 minut při teplotě 125 °C. Aby se zabránilo případné kontaminaci z ovzduší většina na práci byla prováděna v boxu.

2.4.2 Výtřep vzorku

Bylo naváženo 5 g vzorku kompostu do sterilní lahvičky s 50 ml suspenzačního média. A 10 minut bylo intenzivně třepáno v ruce.

2.4.3 Metoda MPN

Jedná se o stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů ve vzorku. Metoda MPN je způsob kvantifikace mikroorganismů ve vzorcích bez použití pevných živných půd. Princip metody spočívá v desetinném naředění vzorku a poté ve vyočkování vybraných ředění do tekutých minerálních médií. Po uplynutí inkubační doby se určeným

způsobem zjistí růst mikroorganismů. A poté se zaznamenávají počty pozitivních paralelních testů pro jednotlivá ředění. Jako základ pro výpočet se obvykle používá to ředění, které má všechny tři paralelní výsledky pozitivní a pak dvě následující ředění. Ke zjištění počtu mikroorganismů ve vzorku se používá tabulka 1., kde je výsledek vynásoben hodnotou základního ředění. A poté dosazen do následující rovnice [8].

Tab. 1: Nejpravděpodobnější počet mikroorganismů při použití tří paralelních vzorků v každém ředění [8]

1. ředění	2. ředění	3. ředění	počet mikroorganismů
0	0	0	0
0	0	1	0,3
0	1	0	0,3
0	1	1	0,6
0	2	0	0,6
1	0	0	0,4
1	0	1	0,7
1	0	2	1,1
1	1	0	0,7
1	1	1	1,1
1	2	0	1,1
1	2	1	1,5
1	3	0	1,6
2	0	0	0,9
2	0	1	1,4
2	0	2	2,0
2	1	0	1,5
2	1	1	2,0
2	1	2	3,0

2	2	0	2,0
2	2	1	3,0
2	2	2	3,5
2	2	3	4,0
2	3	0	3,0
2	3	1	3,5
2	3	2	4,0
3	0	0	2,5
3	0	1	4,0
3	0	2	6,5
3	1	0	4,5
3	1	1	7,5
3	1	2	11,5
3	1	3	16,0
3	2	0	9,5
3	2	1	15,0
3	2	2	20,0
3	2	3	30,0
3	3	0	25,0
3	3	1	45,0
3	3	2	110,0
3	3	3	140,0

Přepočet počtu bakterií z metody MPN na sušinu:

počet bakterií1 g vlhkého vzorku

stanovená sušina (%).....x g suchého vzorku

$$x = (\text{počet bakterií} / \text{stanovená sušina}) * 100$$

Postup metody MPN:

Bylo naváženo 5 g vzorku kompostu do lahvičky s 50 ml suspenčního média a 10 minut bylo intenzivně třepáno v ruce. Poté byla lahvička nechána 1 minutu stát dokud hrubé částice vzorku nesedimentovaly a supernatant byl naředěn desetinným ředěním.

Desetinné ředění bylo provedeno tak, že do sterilních zkumavek bylo asepticky nadávkováno 4,5 ml fyziologického roztoku. A poté bylo asepticky nadávkováno 0,5 ml vytřepávaného vzorku z lahvičky se suspenčním médiem. Takto bylo získáno ředění 10^{-2} . Z něhož bylo asepticky odebráno 0,5 ml, přidáno do zkumavky ke 4,5 ml fyziologického roztoku a tím získáno ředění 10^{-3} . Stejným způsobem bylo pokračováno až do ředění 10^{-5} . (U vzorku č. 1)

Takto připravená ředění byla po 0,1 ml naočkována do připravených sterilních lahviček s tekutým minerálním médiem s xanthanem a gellanem. Každé ředění bylo nadávkováno paralelně do tří lahviček. Takto připravené lahvičky byly dány inkubovat do sušárny při 58 °C po dobu 7 dní. K těmto lahvičkám byly přidány ještě dvě nenaočkované, jedna s minerálním médiem s xanthanem a druhá s gellanem, které sloužily jako kontroly.

Během doby inkubace byly kontrolovány vznikající zákaly v lahvičkách, které dokazovaly množení bakterií. Po uplynutí inkubační doby byla provedena centrifugace při režimu 4550 ot/min (Rotanta 460, rotor 4 x 800 ml), 15 °C po dobu 20 minut. Supernatanty byly naředěny destilovanou vodou v poměru 1:2 a byly stanoveny hodnoty rozpuštěného organického uhlíku na Analyzátoru uhlíku 5000 A Shimadzu.

2.4.4 Pasážování

Je to postup při získávání degradačních bakterií. Jeho smyslem je pomnožení degradačních bakterií v definovaných médiích a příprava bakterií pro další experimenty. Např. pro zakonzervování.

Postup při pasážování:

Do sterilní lahvičky s čistým minerálním médiem xanthanovým nebo gellanovým bylo asepticky nadávkováno 10 µl suspenze z vybraných lahviček. Pak probíhala inkubace při 58 °C. Po uplynutí inkubační doby bylo z některých lahviček opět asepticky odebráno 10 µl suspenze a naočkováno do lahviček s čerstvým stejným médiem. Pak znovu probíha-

la inkubace za stejných podmínek. V některých případech byla po pasáži změřena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku, aby bylo ověřeno zda bakterie spotřebovávají substrát.

2.4.5 Izolace kultur z pasáží

Z konsorcia získaného z metody MPN bylo provedeno desetinné ředění a vybraná ředění byla asepticky vyočkována na misky s pevnými živnými půdami. A to na Xanthanový agar 15 g/l, Xanthanový agar 25 g/l, Gellanový gel 15 g/l, Gellanový gel 30 g/l a Minerální agar s glukosou. Takto připravené misky byly nechány podle potřeby a růstu bakterií inkubovat v sušárně při 58 °C. Po inkubaci byly provedeny buď křížové roztěry pro získání čistých kultur nebo se získané kultury uschovaly do chladničky pro další použití.

2.4.6 Naočkování získaných čistých kultur

Z Petriho misky byla asepticky kličkou odebrána předpokládaná čistá kultura, která byla rozmíchána ve sterilní lahvičce s minerálním médiem s xanthanem nebo gellanem. Stejným způsobem byla také naočkována směs takto vyizolovaných kultur. Poté byla provedena inkubace potřebnou dobu (obvykle 7 dní) v sušárně při 58 °C. Po uplynutí inkubační doby byla změřena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku na Analyzátoru uhlíku 5000 A Shimadzu.

2.4.7 Zakonzervování konsorcií

Vybraná konsorcia byla zcentrifugována ve zkumavkách o objemu 15 ml při režimu 4550 ot/min (Rotanta 460, rotor 4 x 800 ml), 4° C po dobu 20 minut. Poté byly supernatanty slity a ve zkumavkách nechány jen sedimenty buněk. Tyto sedimenty byly spolu s několika kapkami médií asepticky kličkou promíchány a přelity do mikrozkupek o objemu 1,5 ml a dány centrifugovat při 14 500 ot/min (Rotanta 460, rotor 30 x 1,5 ml), 4

°C po dobu 20 minut. Poté byl znovu slit odstředěný roztok a usazenina byla asepticky zakápnuta kapkou glycerolu. Mikroskopické preparáty byly zmrazeny při -80 °C a uschovány pro pozdější použití.

2.4.8 Oživení zakonzervovaných konsorcií

Vybraná zmrazená konsorcia byla vytažena z mrazícího boxu a asepticky kličkou naočkována do sterilních lahví s minerálním médiem s xanthanem nebo gellanem. Pak probíhala inkubace při 58 °C. Po uplynutí inkubační doby byla změřena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku na Analyzátoru uhlíku 5000 A Shimadzu, aby bylo zkontrolováno, zda je možno s konsorcií dále pracovat.

2.4.9 Degradční testy

Pomocí nichž byly zjišťovány schopnosti konsorcií rozkládat i jiné polysacharidy než xanthan a gellan. A to dextran, alginát a škrob.

Postup testů:

Do sterilních lahví s minerálními médii, ke kterým byl přidán konkrétní polysacharid o koncentraci 500 mg/l bylo asepticky naočkováno xanthanové nebo gellanové konsorcium. Takto připravené láhve byly dány inkubovat do sušárny při 58 °C. Na základě průběhu testů byla měřena absorbance při 600 nm jako indikace množení bakterií a byla sledována koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v čase.

2.4.10 Fixace preparátu

Na čistý filtrační papír bylo položeno podložní sklíčko. Doprostřed sklíčka byla dávkovačem nanášena kapka fyziologického roztoku. Asepticky byla kličkou odebrána mikrobiální kultura a dobře rozmíchána v kapce fyziologického roztoku na podložním sklíčku. Poté bylo sklíčko opatrně odsušováno vysoko nad plamenem. Pak bylo nátěrem vzhůru třikrát protaženo plamenem kahanu a ponecháno vychladnout.

2.4.11 Gramovo barvení

Připravený fixovaný roztěr na podložním sklíčku byl převrstven roztokem krystalové violeti a nechán působit asi 60 vteřin. Poté byla barva slita a preparát převrstven Lugolovým roztokem, který působil také 60 vteřin. Pak byl preparát opláchnut destilovanou vodou a odbarvován v šikmé poloze ethanolem po dobu 20 - 25 vteřin a znovu byl důkladně opláchnut destilovanou vodou. Dále byl převrstven karbolfuchsinem, který byl nechán působit 60 vteřin. Nakonec byl preparát důkladně opláchnut destilovanou vodou a velmi opatrně usušen vysoko nad plamenem kahanu. Mikroskopie byla prováděna pomocí imerzního objektivu při zvětšení 1000 x.

3 VÝSLEDKOVÁ A DISKUZNÍ ČÁST

3.1 Stanovení počtu degradačních bakterií metodou MPN

Cílem této části experimentální práce bylo zjistit počet xanthanových a gellanových degradačních bakterií ve zkoumaných vzorcích kompostů. Metoda byla provedena podle postupu již popsáno v kapitole 2.4.3. Principem metody bylo převedení mikroorganismů z kompostu do suspence, její desetinné ředění a naočkování tekutých médií s xanthanem či gellanem. Degradace substrátů byla po kultivaci vyhodnocována úbytkem rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

V tabulkách uvedených níže jsou barevně označena ta ředění vzorků, která byla použita pro výpočet počtu degradačních bakterií xanthanu a gellanu v jednotlivých vzorcích kompostů. Za pozitivní výsledky byly považovány ty, jejichž hodnoty DOC dosahovaly pod 40 mg/l, u ředění 10^{-1} byl zohledňován vliv vnesených organických látek ze vzorku.

3.1.1 Jednotlivé vzorky

Vzorek č. 1

Zahradnický kompost, Agro cs akciová spol. a Česká Skalice,

pH = 6 – 8,5 sušina 49 %

Tab. 2: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace

Ředění	MM s XANTHANEM	
	Koncentrace DOC (mg/l)	Přítomnost degra- dačních bakterií
10 ⁻²	18,111	+
	124,95	-
	18,657	+
10 ⁻³	140,76	-
	139,62	-
	142,68	-
10 ⁻⁴	174,75	-
	174,12	-
	171,33	-
10 ⁻⁵	175,44	-
	177,15	-
	183,57	-
10 ⁻⁶	196,08	-
	188,49	-
	186,39	-
Kontrola	209,19	-

+ degradace proběhla

- degradace neproběhla

Po uplynutí doby inkubace, kdy byly průběžně kontrolovány zákaly v lahvičkách, jako důkaz množení bakterií, bylo zaznamenáno, že dvě lahvičky z ředění 10⁻² byly zakažené a u zbývajících k zákalu nedošlo. Lahvičky s ředěním 10⁻³ byly všechny jen slabě zakažené a v dalších ředěních už k zákalům nedošlo. Z tabulky 2 je zřejmé, že sledované zákaly přibližně odpovídají výsledkům DOC. Pro výpočet metody MPN byly vzaty do úvahy výsledky v ředění 10⁻², 10⁻³ a 10⁻⁴ (pozitivní výsledky: 2; 0; 0, viz. Tab. 1). Dále bylo vyhodnoceno, že počet termofilních mikroorganismů rozkládajících xanthan je $1,8 \cdot 10^2$ bakterií /g suchého vzorku.

Tab. 3: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace

Ředění	MM s GELLANEM	
	Koncentrace DOC (mg/l)	Přítomnost degra- dačních bakterií
10 ⁻²	17,385	+
	16,164	+
	19,146	+
10 ⁻³	17,355	+
	25,182	+
	17,235	+
10 ⁻⁴	26,841	+
	174,39	-
	179,58	-
10 ⁻⁵	178,32	-
	176,25	-
	177,66	-
10 ⁻⁶	192,03	-
	200,46	-
	186,66	-
Kontrola	196,92	-

+ degradace proběhla

- degradace neproběhla

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že lahvičky s ředěním 10⁻² a 10⁻³ byly všechny zakalené. U ředění 10⁻⁴ došlo k zákalu jen v jedné lahvičce a ve dvou zbývajících ne. V lahvičkách s ředěním 10⁻⁵ a 10⁻⁶ zákaly pozorovány nebyly. Z tabulky 3 je zřejmé, že sledované zákaly odpovídají výsledkům DOC. Pro výpočet metody MPN byly použity výsledky v ředění 10⁻³, 10⁻⁴ a 10⁻⁵ (pozitivní výsledky: 3; 1; 0, viz. Tab. 1). Bylo vyhodnoceno, že počet termofilních mikroorganismů rozkládajících gellan je $9,2 \cdot 10^3$ bakterií /g suchého vzorku.

Vzorek č. 2

Kompost z ovčí farmy Prlov , sušina 50,6 %

Tab. 4: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace

Ředění	MM s XANTHANEM	
	Koncentrace DOC (mg/l)	Přítomnost degra- dačních bakterií
10 ⁻¹	159,81	-
	156,66	-
	145,71	-
10 ⁻²	146,19	-
	148,23	-
	118,71	-
10 ⁻³	142,89	-
	153,15	-
	147,42	-
10 ⁻⁴	146,28	-
	148,98	-
	-	-
10 ⁻⁵	164,37	-
	147,96	-
	158,31	-
Kontrola	161,64	-

- degradace neproběhla

Již během inkubace bylo sledováno, že se v lahvičkách vytváří jen velmi slabé zákal nebo se netvoří vůbec. Po uplynutí doby inkubace bylo zaznamenáno, že ve dvou lahvičkách s ředěním 10⁻¹ je slabý zákal. U ředění 10⁻² a 10⁻³ došlo k slabému zákalu ve všech lahvičkách. V lahvičkách s ředěním 10⁻⁴ se slabě zakalily dvě lahvičky. A lahvičky s ředěním 10⁻⁵ byly slabě zakaleny všechny. Protože se u vzorku č. 2 nevytvořil ani v jedné lahvičce tak silný zákal jako u jiných vzorků, můžeme konstatovat, že výsledky DOC v tabulce 4 odpovídají sledovaným zákalům. Nakonec bylo vyhodnoceno, že počet termofilních mikroorganismů rozkládajících xanthan je < 10¹ bakterií /g suchého vzorku.

Tab. 5: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace

Ředění	MM s GELLANEM	
	Koncentrace DOC (mg/l)	Přítomnost degra- dačních bakterií
10 ⁻¹	179,79	-
	49,89	+
	166,02	-
10 ⁻²	152,79	-
	157,65	-
	153,69	-
10 ⁻³	162,09	-
	151,86	-
	158,25	-
10 ⁻⁴	153,93	-
	167,82	-
	148,23	-
10 ⁻⁵	161,28	-
	172,44	-
	157,29	-
Kontrola	177,60	-

- degradace neproběhla

+ degradace proběhla

Po uplynutí inkubační doby bylo zaznamenáno, že u ředění 10⁻¹ byla zakalená jen jedna lahvička. U ředění 10⁻², 10⁻³ a 10⁻⁴ došlo k slabému zákalu ve všech lahvičkách. V lahvičkách s ředěním 10⁻⁵ byl slabý zákal pouze v jedné lahvičce. Můžeme říct, že výsledky DOC v tabulce 5 odpovídají sledovaným zákalům. Nakonec bylo vyhodnoceno, že počet termofilních mikroorganismů rozkládajících gellan je < 10¹ bakterií /g suchého vzorku.

Vzorek č. 3

Zahradnický kompost, Agro cs, sušina 39,5 %

Tab. 6: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace

Ředění	MM s XANTHANEM	
	Koncentrace DOC (mg/l)	Přítomnost degra- dačních bakterií
10 ⁻¹	74,28	+
	58,20	+
	42,87	+
10 ⁻²	39,54	+
	9,237	+
	39,90	+
10 ⁻³	39,87	+
	12,159	+
	129,75	-
10 ⁻⁴	166,83	-
	139,56	-
	182,70	-
10 ⁻⁵	190,41	-
	189,12	-
	175,98	-
Kontrola	-	-

+ degradace proběhla

- degradace neproběhla

Po uplynutí doby inkubace bylo zaznamenáno, že u ředění 10⁻¹ a 10⁻² došlo ve všech lahvičkách k zákalu. U ředění 10⁻³ byla jedna lahvička zakalená a ve zbývajících dvou byly bakteriální vločky bez zákalu. Lahvičky s ředěním 10⁻⁴ a 10⁻⁵ byly bez zákalu, ale byly v nich přítomny bakteriální vločky. Z výsledků DOC v tabulce 6 lze usoudit, že některé zákaly odpovídají hodnotám a u některých ředění došlo k částečné degradaci. Pro výpočet metody MPN byly vzaty do úvahy výsledky v ředění 10⁻², 10⁻³ a 10⁻⁴ (pozitivní výsledky: 3; 2; 0, viz. Tab. 1). Dále bylo vyhodnoceno, že počet termofilních mikroorganismů rozkládajících xanthan je $2,4 \cdot 10^3$ bakterií /g suchého vzorku.

Tab. 7: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace

Ředění	MM s GELLANEM	
	Koncentrace DOC (mg/l)	Přítomnost degra- dačních bakterií
10 ⁻²	12,930	+
	12,642	+
	10,941	+
10 ⁻³	20,712	+
	17,475	+
	14,724	+
10 ⁻⁴	135,99	-
	16,041	+
	50,16	-
10 ⁻⁵	178,65	-
	166,35	-
	180,93	-
10 ⁻⁶	163,81	-
	170,04	-
	163,17	-
Kontrola	-	-

+ degradace proběhla

- degradace neproběhla

Po uplynutí inkubační doby bylo zaznamenáno, že u ředění 10⁻², 10⁻³ a 10⁻⁴ došlo k zákalu ve všech lahvičkách. U ředění 10⁻⁵ byly dvě lahvičky zakalené a ve zbývajících byl slabý zákal. V lahvičkách s ředěním 10⁻⁶ došlo k slabému zákalu ve všech paralelkách. Z výsledků DOC v tabulce 7 lze usoudit, že některé zákaly odpovídají hodnotám jiné nikoliv. Pro výpočet metody MPN byly použity výsledky v ředění 10⁻³, 10⁻⁴ a 10⁻⁵ (pozitivní výsledky: 3; 1; 0, viz. Tab. 1). Bylo vyhodnoceno, že počet termofilních mikroorganismů rozkládajících gellan je $1,1 \cdot 10^4$ bakterií /g suchého vzorku.

U vzorku č.3 byl zjišťován také počet mezofilních degradačních bakterií rozkládajících xanthan a gellan. Metoda byla provedena podle stejného postupu jako při stanovení termofilních bakterií, který je popsán v kapitole 2.4.3 pouze se lišila teplota inkubace, která v tomto případě byla 37 °C. Princip spočíval v převedení mikroorganismů z kompostu do suspense, jejího desetinného vyředění a naočkování do tekutých živných médií s obsahem xanthanu nebo gellanu, v nichž byla po inkubaci hodnocena přítomnost degradačních bakterií pomocí zbytkových koncentrací rozpuštěného organického uhlíku (DOC).

V tabulkách uvedených níže jsou barevně označena ta ředění vzorků, která byla použita pro výpočet počtu degradačních bakterií xanthanu a gellanu v jednotlivých vzorcích kompostů. Za pozitivní výsledky byly považovány ty, jejichž hodnoty DOC dosahovaly pod 40 mg/l.

Tab. 8: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace

Ředění	MM s XANTHANEM	
	Koncentrace DOC (mg/l)	Přítomnost degra- dačních bakterií
10 ⁻¹	49,35	+
	30,84	+
	27,57	+
10 ⁻²	6,645	+
	6,402	+
	4,221	+
10 ⁻³	7,380	+
	2,628	+
	3,300	+
10 ⁻⁴	11,793	+
	14,865	+
	12,63	+
10 ⁻⁵	179,67	-
	176,58	-
	211,50	-
Kontrola	-	-

+ degradace proběhla

- degradace neproběhla

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u ředění 10⁻¹ došlo v lahvičkách jen ke slabému zákalu. U ředění 10⁻², 10⁻³ a 10⁻⁴ došlo k zákalu ve všech paralelkách. V lahvičkách s ředěním 10⁻⁵ byl slabý zákal. Můžeme říct, že výsledky DOC v tabulce 8 odpovídají sledovaným zákalům. Pro výpočet metody MPN byly použity výsledky v ředění 10⁻³, 10⁻⁴ a 10⁻⁵ (pozitivní výsledky: 3; 3; 0, viz. Tab. 1). Bylo vyhodnoceno, že počet mezofilních mikroorganismů rozkládajících xanthan je 6,3 · 10⁴ bakterií /g suchého vzorku.

Tab. 9: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace

Ředění	MM s GELLANEM	
	Koncentrace DOC (mg/l)	Přítomnost degra- dačních bakterií
10 ⁻²	15,657	+
	14,478	+
	28,05	+
10 ⁻³	15,15	+
	21,93	+
	18,81	+
10 ⁻⁴	29,445	+
	17,064	+
	13,398	+
10 ⁻⁵	177,09	-
	179,73	-
	24,654	+
10 ⁻⁶	181,14	-
	32,10	+
	121,47	-
Kontrola	-	-

+ degradace proběhla

- degradace neproběhla

Po uplynutí inkubační doby bylo zaznamenáno, že u ředění 10⁻² a 10⁻³ došlo k zákalům ve všech lahvičkách. U ředění 10⁻⁴ byla zakalená jen jedna lahvička, ve zbývajících dvou byly přítomny vločky. V lahvičkách s ředěním 10⁻⁵ byl jen slabý zákal. A u ředění 10⁻⁶ byly přítomny jen bakteriální vločky bez zákalu. Z výsledků DOC je vidět, že některé zákaly neodpovídají hodnotám v tabulce 9, a že tedy v některých ředěních došlo jen k částečnému rozkladu substrátu. Pro výpočet metody MPN byly použity výsledky v ředění 10⁻⁴, 10⁻⁵ a 10⁻⁶ (pozitivní výsledky: 3; 1; 1, viz. Tab. 1). Bylo vyhodnoceno, že počet mezofilních mikroorganismů rozkládajících gellan je 1,9 · 10⁵ bakterií /g suchého vzorku.

3.2 Degradční testy

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda vybraná konsorcia z metody MPN ze vzorku č.1 jsou schopna rozkládat kromě xanthanu a gellanu také další polysacharidy. A to dextran, alginát a škrob. Metoda byla provedena podle postupu již popsáno v kapitole 2.4.9. Principem metody bylo naočkování xanthanového a gellanového konsorcia do lahví s minerálními médii, ke kterým byl přidán konkrétní polysacharid. V průběhu testů byla měřena absorbance při 600 nm jako důkaz množení bakterií a byla sledována koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v čase.

Použitá živná média:

MMX – minerální médium s xanthanem

MMD – minerální médium s dextranem

MMG – minerální médium s gellanem

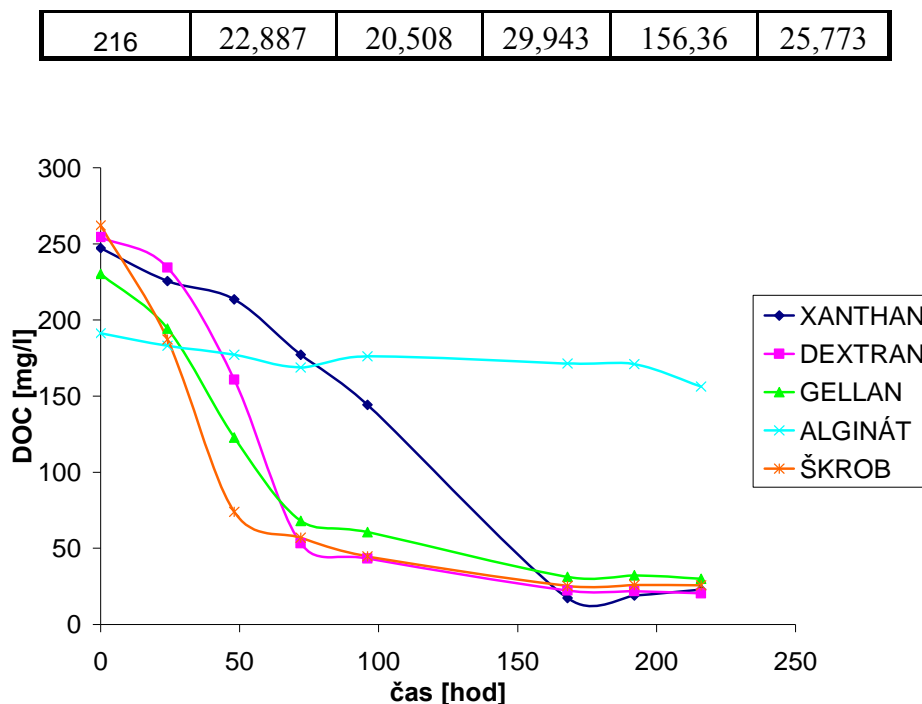
MMA – minerální médium s alginátem

MMŠ – minerální médium se škrobem

Tab. 10: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) pro **xanthanové** kon-

sorcium

Čas [hod]	XANTHAN	DEXTRAN	GELLAN	ALGINÁT	ŠKROB
0	247,35	254,34	230,25	191,25	262,14
24	225,69	234,42	194,37	183,09	187,17
48	213,48	160,77	122,79	177,12	74,04
72	177,12	53,35	68,13	168,78	57,06
96	144,36	43,26	60,63	176,25	44,82
168	17,445	22,236	31,35	171,45	25,32
192	19,047	21,816	32,37	171	25,914



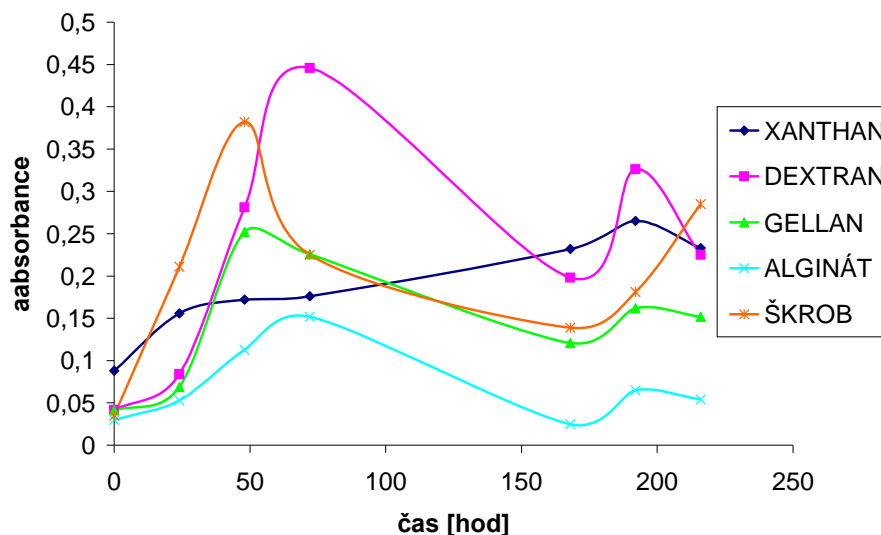
Obr. 4: Degradace substrátů konsorciem X na základě DOC v čase

Po uplynutí doby inkubace bylo z výsledků DOC a grafu vyhodnoceno, že nejrychleji došlo k rozložení minerálního média se škrobem (MMS), minerálního média s gellanem (MMG) a s dextranem (MMD). U minerálního média s xanthanem (MMX) nastávala degradace v prvních dnech inkubace pozvolna a zlom přišel 7 den (po 168 hodinách) inkubace, kdy koncentrace rozpuštěného uhlíku prudce klesla. U minerálního média s alginátem (MMA) je z vysokých hodnot DOC a grafu patrné, že xanthanové konsorcium alginát nerozkládá, nebo jen částečně.

Tab. 11: Naměřené hodnoty absorbance pro **xanthanové** konsorcium

čas [hod]	XANTHAN	DEXTRAN	GELLAN	ALGINÁT	ŠKROB
0	0,088	0,042	0,041	0,03	0,035
24	0,156	0,084	0,069	0,053	0,211
48	0,172	0,281	0,252	0,113	0,382
72	0,176	0,446	0,226	0,152	0,225

168	0,232	0,198	0,121	0,025	0,139
192	0,265	0,326	0,162	0,065	0,181
216	0,233	0,225	0,152	0,054	0,285



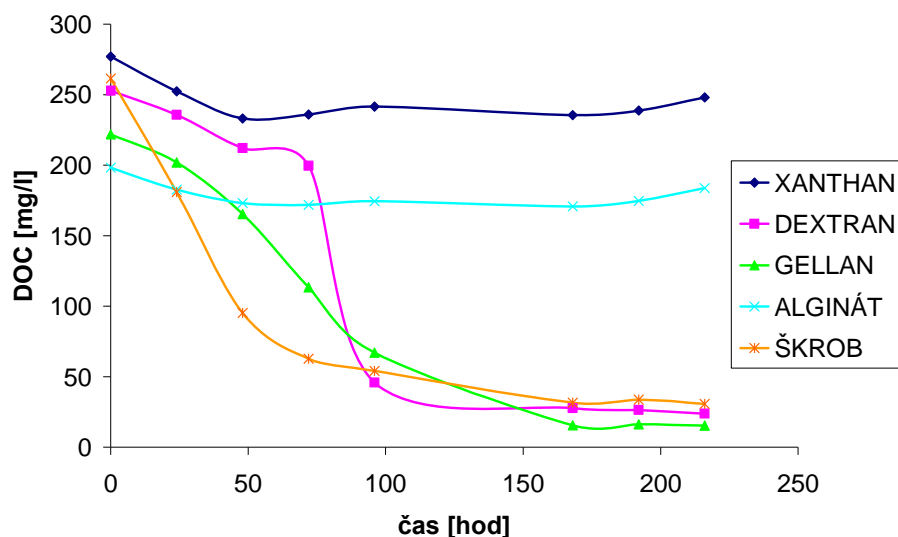
Obr. 5: Degradace substrátů konsorciem X na základě absorbance v čase

Během inkubace byla měřena absorbance jako důkaz množení bakterií. Ve všech lahvích došlo k zákalu. Nejsilnější byl v láhvi s MMS a nejslabší zákal byl v MMA, což odpovídá výsledkům degradace uvedeným na Obr. 4. Poklesy absorbancí v čase u některých křivek lze vysvětlit vyvločkováním suspence a tedy snížením hodnoty zákalů takových médií.

Tab. 12: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) pro **gellanové** konsorcium

čas [hod]	XANTHAN	DEXTRAN	GELLAN	ALGINÁT	ŠKROB
0	277,08	252,81	221,91	198,33	261,48
24	252,48	235,71	201,93	182,67	180,87
48	233,04	212,13	165,36	173,13	95,13
72	235,92	199,56	113,34	171,96	62,85
96	241,62	45,84	67,08	174,54	54,2

168	235,41	27,735	15,681	170,7	31,59
192	238,8	26,361	16,191	174,57	33,75
216	248,1	23,832	15,339	183,84	30,69

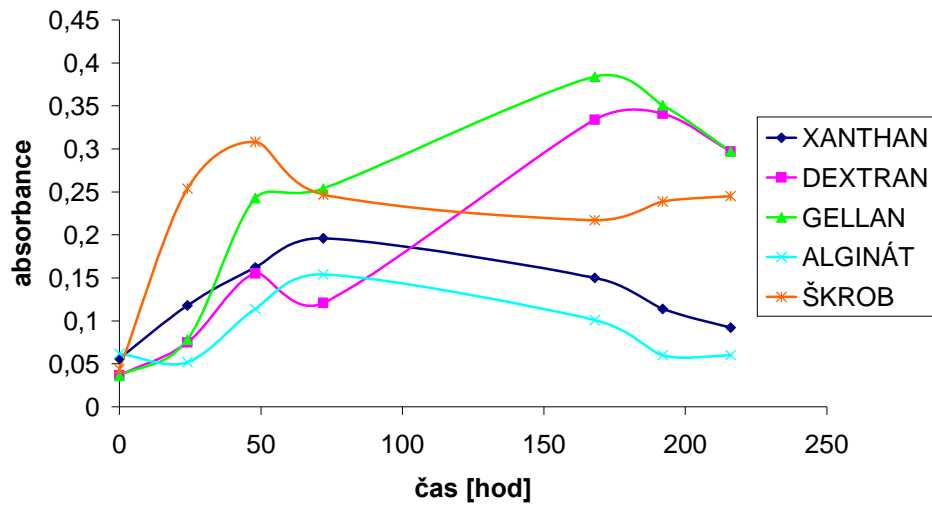


Obr. 6: Degradace substrátů konsorciem G na základě DOC v čase

Po inkubaci bylo z výsledků DOC a grafu vyhodnoceno, že gellanové konsorcium nejrychleji rozložilo minerální médium se škrobem (MMSŠ), pak minerální médium s gellanem (MMG) a s dextranem (MMD). U minerálních médií s alginátem (MMA) a s xanthanem (MMX) je z vysokých hodnot DOC patrné, že gellanové konsorcium nerozkládají.

Tab. 13: Naměřené hodnoty absorbance pro **gellanové** konsorcium

čas [hod]	XANTHAN	DEXTRAN	GELLAN	ALGINÁT	ŠKROB
0	0,056	0,037	0,036	0,062	0,044
24	0,118	0,075	0,078	0,052	0,254
48	0,162	0,155	0,243	0,114	0,308
72	0,196	0,121	0,254	0,154	0,247
168	0,15	0,334	0,384	0,101	0,217
192	0,114	0,341	0,351	0,06	0,239
216	0,092	0,297	0,297	0,06	0,245



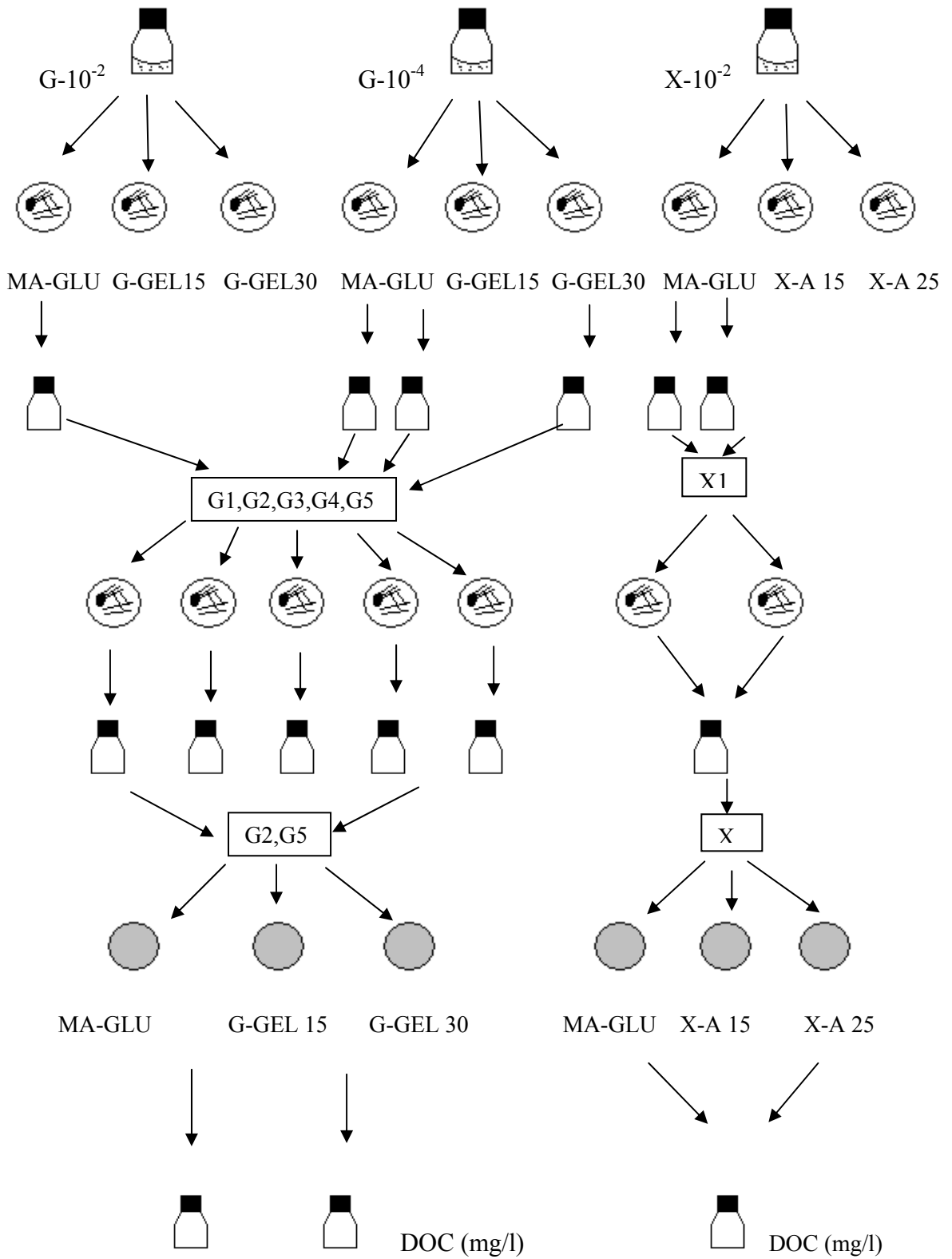
Obr. 7: Degradace substrátů konsorciem G na základě absorbance v čase

Po uplynutí doby inkubace došlo ve všech lahvích k zákalu. Nejsilnější byl v lahvích s MMŠ a MMG a nejslabší zákal byl v láhvi s MMA, což přibližně odpovídá výsledkům degradace uvedeným na Obr. 7.

3.3 Izolace degradačních kultur

Získávání degradačních bakterií bylo prováděno ve dvou etapách. Postup izolace u obou etap je znázorněn na schématech na Obr. 8 a 11.

ETAPA 1



Obr. 8: Schéma postupu při izolaci kultur

3.3.1 Etapa 1

Ze vzorku č. 1 byla z metody MPN získána tři konzorcía (dvě gellanová- ředění 10^{-2} a 10^{-4} a jedno xanthanové-ředění 10^{-2}). Tato konzorcía byla křížovými roztěry naočkována na misky s pevnými živnými půdami. A to na Xanthanový agar 15 g/l, Xanthanový agar 25 g/l, Gellanový gel 15 g/l, Gellanový gel 30 g/l a na Minerální agar s glukosou. Takto připravené misky byly nechány podle potřeby a růstu bakterií inkubovat při 58 °C. Kultury, které na miskách vyrostly byly smíšené a proto byly několikrát opakovanými křížovými roztěry na misky se stejnými živnými půdami pro vyčištění kultur. Poté byly vybrané kolonie asepticky naočkovány do lahvíček s minerálními médii xanthanovým či gellanovým a dány inkubovat při 58 °C. Po 7 dnech inkubace byla změřena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku na Analyzátoru uhlíku Shimadzu 5000 A. Dále bylo pracováno jen s lahvíčkami, ve kterých se koncentrace DOC výrazně snížila. Byly to kultury G1, G2, G3, G4, G5 a X1. Všechny byly paralelně křížovým roztěrem vyočkovány na Minerální agar s glukosou a nechány inkubovat při 58 °C. Tyto křížové roztěry byly prováděny dle potřeby několikrát. Poté byly opět jednotlivé kultury naočkovány do lahvíček a dány inkubovat při 58 °C. Po 7 denní inkubaci byla změřena koncentrace DOC a bylo zjištěno, že degradace částečně proběhla jen v lahvíčkách G2, G5 a X1, tak bylo dále pracováno jen s těmito kulturami. Ze všech tří lahvíček byl asepticky naočkován na misky 1 ml suspence a hokejkou byl lehce rozetřen. Kultury G2 a G5 byly naočkovány na misky s pevnými živnými půdami s Minerálním agarem s glukosou, Gellanovým gelem 15 g/l a 30 g/l. Kultura X1 byla naočkována na Minerální agar s glukosou, Xanthanový agar 15 g/l a 25 g/l. Pak probíhala inkubace při 58 °C. Po určité době se na některých miskách začaly tvořit jamky.(viz. Obr. 9 a 10) Proto byly provedeny pokusy izolovat předpokládané degradační kolonie z jamek. Ukázalo se, že tyto kultury nejsou čisté, ale smíšené. Byly opět naočkovány do lahvíček s minerálními médii (MMX a MMG), dány inkubovat a po určité době byla změřena koncentrace DOC pro ověření degradačních vlastností.



Obr. 9: Xanthanový agar 25 g/l



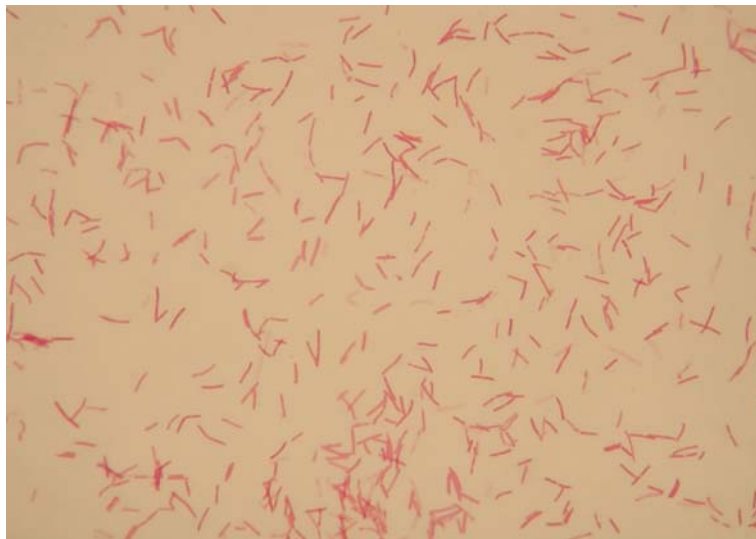
Obr. 10: Gellanový gel 30 g/l

3.3.2 Etapa 2

V této etapě se dále pracovalo s kulturami získanými z etapy 1. Postup izolace je schematicky popsán na Obr. 9. Na rozdíl od etapy 1 se v této kultury G2, G5 a X1 naředily desetinným ředěním a byly vybrány ředění 10^{-3} a 10^{-4} , které byly asepticky vyočkovány po 0,1 ml na misky s pevnými živnými půdami, rozetřeny hokejkou a nechány lehce odsušit v boxu. Živné půdy, na které se vyočkování provedlo byly Xanthanový agar 25 g/l, Gellanový gel 30 g/l, Minerální agar s glukosou, TYA a Minerální agar s glukosou s vyšším podílem agaru. Protože v etapě 1 byly pokusy o rozizolování smíšených kultur neúspěšné díky plazivému růstu některých bakterií, byly připravovány živné půdy s vyšším podílem agaru, které měly zabránit přerůstání kolonií přes sebe a plazení. Naočkované misky byly dány inkubovat při 58 °C. Kultury, které na miskách vyrostly, byly opět čistěny, tak že byly asepticky přeočkovávány na misky s TYA, TYA s vyšším podílem agaru a na Minerální agar s glukosou. Poté byly vybrané kolonie asepticky naočkovány do lahvíček s minerálními médii xanthanovým či gellanovým a dány inkubovat při 58 °C. Po 7 dnech inkubace byla změřena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku na Analyzátoru uhlíku Shimadzu 5000 A. Po změření bylo dále pracováno jen s lahvíčkami, ve kterých se koncentrace DOC výrazně snížila. Všechny tyto byly křížovým roztěrem vyočkovány na misky. Gellanové kultury byly vyočkovány na Minerální agar s glukosou s vyšším podílem agaru, na TYA agar s vyšším podílem agaru a na Gellanový gel 30 g/l, kultura X1 byla vyočkována na TYA agar, na Minerální agar s glukosou a na TYA agar s vyšším podílem agaru a všechny byly nechány inkubovat při 58 °C. Tyto křížové roztěry byly prováděny dle potřeby několikrát. Na miskách s gellanovými kulturami narostly žluté a bílé kolonie, u kterých vzniklo podezření, že jde o degradéry gellanu. Byly pracovními názvy označeny jako B – bílá, Ž - žlutá, B+Ž – bílá + žlutá, protože nebylo jisté zda jedna kultura nepotřebuje k degradaci tu druhou. Poté byly opět jednotlivé kultury naočkovány do lahvíček a dány inkubovat při 58 °C. Po 7 denní inkubaci byla změřena koncentrace DOC a bylo zjištěno, že v lahvíčce s bakteriální kulturou X1 degradace proběhla. A jelikož narostené kultury X1 na miskách vypadaly jako čisté, byla izolace degradačních bakterií xanthanu ukončena. Takže můžeme říci, že kultura X1 je předpokládáný degradér xanthanu. Gellanové kultury B, Ž a B+Ž byly asepticky křížovými roztěry naočkovány na misky s Minerálním agarem s glukosou, s TYA agarem a s Minerálním agarem s glukosou s vyšším podílem agaru. Tyto křížové roztěry byly podle potřeby prováděny několikrát. Poté byly opět vybrané kultury z misek naočkovány do lahvíček s minerálními médii (MMX a MMG),

dány inkubovat a po určité době byla změřena koncentrace DOC pro ověření degradačních vlastností. Z výsledků bylo zjištěno, že kultury B a Ž samostatně gellan nerozkládají. Ale kultury B+Ž mohou být předpokládání degraděři gellanu v symbiotickém stavu.

Z bakteriálních kultur B, Ž a X1 byly udělány Gramovy preparáty podle postupů popsaných v kapitolách 2.4.10 a 2.4.11 a byly mikroskopovány na mikroskopu CX 41 Olympus při zvětšení 1000x.



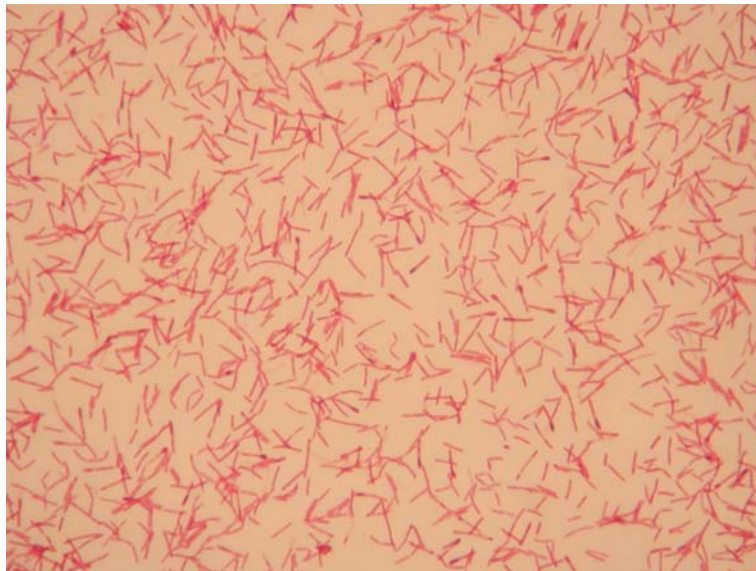
Obr. 12: Bakteriální kultura B

Kultura B – Gram negativní, tyčinky, dlouhé a tenké



Obr. 13: Bakteriální kultura Ž

Kultura Ž - Gram pozitivní, tyčinky, dlouhé a tenké, ojediněle se vyskytovala i kratší malá vlákna



Obr. 14: Bakteriální kultura X1

Kultura X1 – Gram negativní, tyčinky, velmi dlouhé a tenké, některé sporující s terminálně umístěnou sporou

ZÁVĚR

V této diplomové práci byl studován výskyt termofilních mikroorganismů rozkládajících xanthan a gellan. Jako zdroje bakterií sloužily vzorky zahradních kompostů a jeden vzorek kompostu z ovčí farmy. Výskyt bakterií byl stanovován metodou nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN). Bylo zjištěno, že 2 ze tří použitých vzorků obsahovaly významné množství degradačních bakterií xanthanu a gellanu. Z výsledků bylo zřejmé, že počet termofilních bakterií rozkládajících xanthan se pohyboval od $<10^1 - 2,4 \cdot 10^3$ bakterií / g suchého vzorku. A počet termofilních bakterií rozkládajících gellan byl v rozmezí od $<10^1 - 1,1 \cdot 10^4$ bakterií / g suchého vzorku. Dále bylo zjištěno, že počet mezofilních bakterií rozkládajících xanthan ve vzorku č. 3 byl $6,3 \cdot 10^4$ bakterií / g suchého vzorku a počet mezofilních bakterií rozkládajících gellan v tomtéž vzorku byl $1,9 \cdot 10^5$ bakterií / g suchého vzorku. Znamená to, že v tomto vzorku byl počet mezofilních degradačních bakterií přibližně o jeden řád vyšší než počet termofilních degradérů. Bylo zjištěno, že největší počet termofilních bakterií rozkládajících xanthan obsahoval vzorek č.3. A tentýž vzorek obsahoval i nejvíce termofilních bakterií rozkládajících gellan.

Mezi cíle práce patřilo získání směsných konsorcií schopných rozkladu xanthanu a gellanu. Tato konsorcia byla získána ze vzorku č.1 a dále s nimi byly prováděny degradační testy, ve kterých se zjistilo, že xanthanové a gellanové konsorcium dokáže kromě xanthanu a gellanu rozkládat také škrob a dextran. Dalším cílem byly pokusy o izolaci klíčových degradačních kultur. Ze vzorku č.1 byly vyizolovány dvě kultury X1 a B+Ž. V obou případech jde o předpokládané degradační kultury. Se vzorkem č.2 se vzhledem k nízkým výsledkům metody MPN dále nepracovalo. Protože izolace ze vzorku č.1 byla časově náročná, na izolaci ze vzorku č.3 nebyla z časových důvodů možná.

Na základě těchto výsledků lze říci, že izolace degradačních bakterií není jednoduchá. Znalosti o bakteriích schopných rozkladu xanthanu a gellanu jsou velmi omezené a proto jim bude muset být věnována další výzkumná činnost.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Nampoothiri K. M., Singhanian R. R., Sabarinath C., Pandey A.: Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*, PROCESS BIOCHEMISTRY, 38, 2003, str. 1513 – 1519
- [2] Ruijssenaars H. J., Bont de J. A. M., Hartmans S., A Pyruvated Mannose – Specific Xanthan Lyase Involved in Xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1, Applied and Environmental Microbiology, 65, 1999, str. 2446 – 2452
- [3] www.Isbu.ac.uk/water/hyxan.html
- [4] www.Isbu.ac.uk/water/hygellan.html
- [5] <http://aem.asm.org/cgi/content/full/65/6/2446>
- [6] http://weblife.org/humanure/chapter3_8.html
- [7] <http://www.nanonet.go.jp/english/mailmag/2005/052a.html>
- [8] Harrigan W.F., Laboratory methods in food microbiology, Academic Press San Diego, 1998
- [9] Ahlgren A. J., Purification and Characterization of a Pyruvated – Mannose – Specific Xanthan Lyase from Heat – Stable, Salt – Tolerant Bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 57, 1991, str. 2523 – 2528
- [10] Cadmus M.C., Jackson L. K., Burton K. A., Plattner R. D., Slodki M. E., Biodegradation of Xanthan Gum by *Bacillus sp.*, Applied and Environmental Microbiology, 44, 1982, str. 5 – 11
- [11] Derekova A., Sjöholm C., Mandeva R., Michailova L., Kambourova M., Biosynthesis of a thermostable gellan lyase by newly isolated and characterized strain of *Geobacillus stearothermophilus* 98. Extremophiles, 10, 2006, str. 321- 326
- [12] <http://stary.biom.cz/index.html>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ÚIOŽP	- Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
MMX	- Minerální médium s xanthanem
MMG	- Minerální médium s gellanem
MMD	- Minerální médium s dextrans
MMA	- Minerální médium s alginátem
MMŠ	- Minerální médium se škrobem
TYA+A	- TYA agar s vyšším podílem agaru
MA-GLU	- Minerální agar s glukosou
MA-GLU+A	- Minerální agar s glukosou s vyšším podílem agaru
X-A 15	- Xanthanový agar 15 g/l
X-A 25	- Xanthanový agar 25 g/l
G-GEL 15	- Gellanový gel 15 g/l
G-GEL 30	- Gellanový gel 30 g/l
MPN	- Metoda nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů
DOC	- Rozpuštěný organický uhlík (mg/l)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Molekulární struktura xanthanu [3].....	10
Obr. 2: Molekulární struktura gellanu [4].....	12
Obr. 3: Bakterie <i>Thermus thermophilus</i> [7].....	18
Obr. 4: Degradace substrátů konsorciem X na základě DOC v čase.....	44
Obr. 5: Degradace substrátů konsorciem X na základě absorbance v čase	45
Obr. 6: Degradace substrátů konsorciem G na základě DOC v čase.....	46
Obr. 7: Degradace substrátů konsorciem G na základě absorbance v čase	47
Obr. 8: Schéma postupu při izolaci kultur	48
Obr. 9: Xanthanový agar 25 g/l	50
Obr. 10: Gellanový gel 30 g/l	50
Obr. 11: Schéma postupu při izolaci kultur.....	51
Obr. 12: Bakteriální kultura B	53
Obr. 13: Bakteriální kultura Ž	54
Obr. 14: Bakteriální kultura X1	54

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Nejpravděpodobnější počet mikroorganismů při použití tří paralelních vzorků v každém ředění [8]	27
Tab. 2: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace.....	34
Tab. 3: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace.....	35
Tab. 4: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace.....	36
Tab. 5: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace.....	37
Tab. 6: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace.....	38
Tab. 7: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace.....	39
Tab. 8: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace.....	41
Tab. 9: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po 7 dnech inkubace.....	42
Tab. 10: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) pro xanthanové konsorcium	43
Tab. 11: Naměřené hodnoty absorbance pro xanthanové konsorcium.....	44
Tab. 12: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) pro gellanové konsorcium	45
Tab. 13: Naměřené hodnoty absorbance pro gellanové konsorcium	46