

Produkce extracelulárních polymerních sloučenin u vybraných bakteriálních kultur

Bc. Eva Barošová

Diplomová práce
2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

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

Téma práce: **Produkce extracelulárních polymerních sloučenin
u vybraných bakteriálních kultur**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na popis bakteriálních exopolymerů, jejich vlastnosti a jejich význam pro mikroorganismy i pro člověka. 2. Experimentálně ověřte schopnost tvorby exopolymerů z nesacharidových substrátů u bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. 3. Odzkoušejte možnosti tvorby exopolymerů v tekutých živných prostředích, zejména u bakterií rodů *Rhodococcus* a *Pseudomonas*. 4. Získané výsledky písemně zpracujte a zhodnoťte význam získaných výsledků z technického pohledu.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

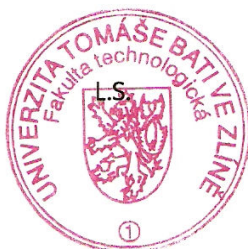
5. února 2007

Termín odevzdání diplomové práce:

25. května 2007

Ve Zlíně dne 1. února 2007


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




doc. Ing. Jaromír Hoffmann, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na produkci extracelulárních polymerních látek a to konkrétně u kultur *Agrobacterium tumefaciens* FR5, *Pseudomonas putida* FR3 a *Rhodococcus erythropolis* FR7. Náplní bylo zjistit, zda jsou poslední dvě zmíněné kultury schopné zahušťovat tekutá živná média a za jakých okolností a zda je kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 schopná zahušťovat nesacharidická tekutá média. Míra zahuštění tekutých médií byla zjišťována měřením viskozit suspenzí, ve kterých byly příslušné bakteriální kultury různým způsobem kultivovány.

Klíčová slova: bakterie, extracelulární polysacharidy, extracelulární proteiny, produkce ECP

ABSTRACT

This work focuses on the production of extracellular polymers in *Agrobacterium tumefaciens* FR5, *Pseudomonas putida* FR3 and *Rhodococcus erythropolis* FR7. The aim was to discover if the last two cultures mentioned were able to thicken up liquid media and under what conditions, and if the *Agrobacterium tumefaciens* FR5 culture was able to thicken up liquid non-saccharidic media. The levels of consistency of liquid media were determined by measuring of the viscosity of suspensions after various cultivation of each culture.

Keywords: bacteria, extracellular polysaccharides, extracellular proteins, ECP production

Poděkování

Upřímné a veliké díky panu RNDr. Janu Ružičkovi, Ph.D. za odborné vedení, příjemnou spolupráci, trpělivost a cenné rady, které mi uděloval v průběhu práce i celého studia na UTB.

Také děkuji všem zaměstnancům ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za vytvoření dobrých pracovních podmínek a Ing. Tereze Václavkové a Ing. Pavlíně Vltavské za zpříjemnění času stráveného v laboratořích.

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

„Život měříme skutky a ne časem.“

Seneca

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem na celé závěrečné práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucího závěrečné práce a vedoucího ústavu. V případě publikace budu uvedena jako spoluautor.

Ve Zlíně 21.května 2007

.....

Bc. Eva Barošová

OBSAH

ÚVOD	9
I. LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
1 EXTRACELULÁRNÍ POLYMERY	10
1.1 MECHANISMUS PRODUKCE HOMOPOLYSACHARIDŮ A HETEROPOLYSACHARIDŮ BAKTERIEMI	12
1.2 DĚLENÍ EXTRACELULÁRNÍCH POLYMERŮ	13
1.3 PODMÍNKY KULTIVACE BAKTERIÍ TVOŘÍCÍ EXTRACELULÁRNÍ POLYMERY	15
1.3.1 Vliv růstových fází na produkci ECP	15
1.3.2 Vliv poměru C:N na produkci ECP	16
1.3.3 Vliv pH na produkci ECP	17
1.3.4 Vliv teploty na produkci ECP	18
1.3.5 Vliv kovových iontů na produkci ECP	18
1.3.6 Vliv způsobu kultivace na produkci ECP	18
1.4 BIOLOGICKÉ FUNKCE EXTRACELULÁRNÍCH POLYMERŮ U BAKTERIÍ	19
2 EXTRACELULÁRNÍ POLYSACHARIDY A PROTEINY	20
2.1 STRUKTURA EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ	20
2.2 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ SKUPINY EPS.....	22
2.3 STRUKTURA A VLASTNOSTI EXTRACELULÁRNÍCH PROTEINŮ	24
2.4 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ EXTRACELULÁRNÍ PROTEINY	24
3 VÝZNAM A VYUŽITÍ BAKTERIÁLNÍCH EXTRACELULÁRNÍCH POLYMERŮ	25
3.1 VÝZNAM A VYUŽITÍ EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ.....	25
3.1.1 Využití konkrétních EPS.....	26
3.2 VYUŽITÍ EXTRACELULÁRNÍCH PROTEINŮ	27
3.3 NEGATIVNÍ DOPAD ECP PRO ČLOVĚKA	27
4 CÍL PRÁCE	28
II. METODICKÁ ČÁST	29
5 PRACOVNÍ POMŮCKY	29
5.1 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA POUŽITÁ PRO KULTIVACI BAKTERIÍ.....	29
5.2 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A DALŠÍ LABORATORNÍ POMŮCKY	35
5.3 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KULTURY	36
5.3.1 <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 a FR6	36
5.3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5.....	36
5.3.3 <i>Pseudomonas putida</i> FR3	36

6	PRACOVNÍ POSTUPY	37
6.1	POSTUPY POUŽÍVANÉ V PRŮBĚHU PRÁCE	37
6.1.1	Sterilizace	37
6.1.2	Centrifugace	37
6.1.3	Měření viskozity na vibračním viskozimetru	37
6.1.4	Příprava očkovací suspenze	38
6.1.5	Měření pH	38
6.2	POSTUPY POUŽITÉ PRO PRVNÍ ORIENTAČNÍ ZKOUŠKY	38
6.2.1	Orientační zkoušky růstu kultur a tvorby ECP na pevných médiích	38
6.2.2	Ověření zahušťujících schopností kultury <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5	38
6.2.3	Vliv přítomnosti buněk na výslednou viskozitu suspenze	39
6.3	POSTUPY POUŽITÉ PŘI KULTIVACI BAKTERIE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> FR5	39
6.3.1	Kultivace v glycerolovém tekutém médiu s 5x ředěným fosfátovým puřem a s řídavky glycerolu v průběhu kultivace	40
6.3.2	Kultivace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 při kontinuálním provzduřňování	40
6.3.3	Posouzení změn viskozity médií po ukončení kultivace	40
6.3.4	Závislost viskozity živného média po kultivaci na pH prostředí	41
6.3.5	Kultivace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 v glycerolovém tekutém médiu s ředěným fosfátového puřru	41
6.3.6	Kultivace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 v glycerolovém tekutém médiu s neředěným fosfátovým puřem a s řídavky glycerolu	41
6.3.7	Stanovení sušiny a počtu buněk kultury <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 a stanovení sušiny živného média	41
6.4	POSTUPY POUŽITÉ PŘI KULTIVACÍCH BAKTERIÍ <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> FR7 A <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> FR3	42
6.4.1	Statická kultivace	42
6.4.2	Dynamická kultivace	42
6.4.3	Pozitivní a negativní kontrola	43
6.4.4	Kultivace za kontinuálního řívodu vzduchu	44
6.4.5	Kultivace kultury <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7	44
6.4.6	Kultivace kultury <i>Pseudomonas putida</i> FR3	45
III.	VÝSLEDKY A DISKUSE	46
7	POČÁTEČNÍ ORIENTAČNÍ ZKOUŠKY	46
7.1	ORIENTAČNÍ ZKOUŠKY RŮSTU A TVORBY ECP KULTURAMI	46
7.2	OVĚŘENÍ ZAHUŠŤUJÍCÍCH SCHOPNOSTÍ KULTURY FR5	48
7.3	VLIV PŘÍTOMNOSTI BUNĚK NA VÝSLEDNOU VSKOZITU SUSPENZE	51

8	POKUSY S KULTUROU <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> FR5	53
8.1	VÝSLEDKY KULTIVACE KULTURY <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> FR5 V GLYCEROLOVÉM MÉDIU S PŘÍDAVKY GLYCEROLU V PRŮBĚHU KULTIVACE.....	53
8.2	VÝSLEDKY KULTIVACE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> FR5 V GLYCEROLOVÉM MÉDIU PŘI KONTINUÁLNÍM PROVZDUŠŇOVÁNÍ	55
8.3	POSOUZENÍ ZMĚN VSKOZITY TEKUTÉHO MÉDIA PO UKONČENÍ KULTIVACE S KULTUROU <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> FR5	57
8.4	ZÁVISLOST VSKOZITY ŽIVNÉHO MÉDIA PO UKONČENÍ KULTIVACE S KULTUROU <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> FR5 NA pH PROSTŘEDÍ.....	59
8.5	VÝSLEDKY KULTIVACE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> FR5 V GLYCEROLOVÉM MÉDIU S RŮZNĚ ŘEDĚNÝM PUFREM.....	60
8.6	VÝSLEDKY KULTIVACE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> FR5 V GLYCEROLOVÉM MÉDIU S NEŘEDĚNÝM PUFREM S PŘÍDAVKY GLYCEROLU V PRŮBĚHU KULTIVACE	62
9	POKUSY S KULTUROU <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> FR7	67
9.1	VÝSLEDKY KULTIVACE <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> FR7 V TEKUTÉM TRYPTON-YEAST MÉDIU SE 2 % SACHAROSY	67
9.2	VÝSLEDKY KULTIVACE <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> FR7 V TEKUTÉM TRYPTON-YEAST MÉDIU SE 2 % JANTARANU	69
9.3	VÝSLEDKY KULTIVACE <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> FR7 NA PŮDĚ OMPA ZALITÉ MPB.....	70
9.4	VÝSLEDKY KULTIVACE <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> FR7 V TEKUTÉM TRYPTON-YEAST MÉDIU SE 2 % LAKTOSY.....	74
10	POKUSY S KULTUROU <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> FR3	77
10.1	VÝSLEDKY KULTIVACE <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> FR3 V TEKUTÉM TRYPTON-YEAST MÉDIU SE 2 % SACHAROSY	77
10.2	VÝSLEDKY KULTIVACE <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> FR3 NA PŮDĚ OMPA ZALITÉ MPB	80
IV.	ZÁVĚR	84
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	92
	SEZNAM OBRÁZKŮ	93
	SEZNAM TABULEK	94
	PŘÍLOHY	97

ÚVOD

Ať člověk chce nebo ne, ovlivňuje přírodu, zasahuje do ní a pomalu ji přetváří. Tyto zásahy mohou být vědomé i nevědomé, ale člověk je natolik vyspělý tvor, aby si uvědomil své činy i následky svých činů. Škody, které lidstvo napáchalo v minulém století se z větší části nedají napravit. Proto by se člověk měl zamyslet nad chováním vůči tomu, co je pro něj nepostradatelné a důležité. Pokud lidé nedělají radikální zásahy do přírody, je ona sama schopna se s tím do jisté míry vyrovnat. Přesahují-li však zásahy jisté meze, může dojít k zásadním změnám v ekosystému Země a příroda se začne bouřit, jak je již dnes bohužel vidět např. na postupné oteplování klimatu Země s jeho následky .

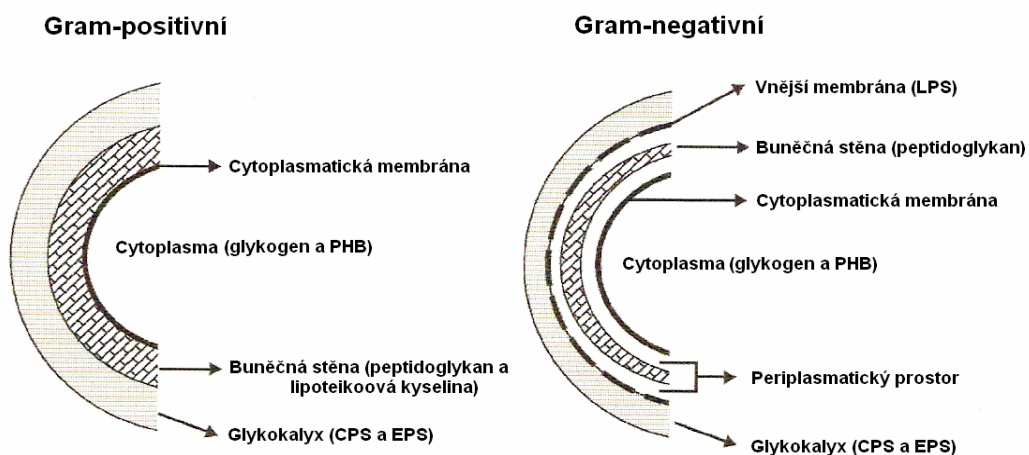
Člověk si v dnešní době dokáže podmanit téměř vše. Dokáže skoro vše zneužít a využít ve svůj prospěch, ve prospěch lidstva. Ale abych nevyzdvihovala jen samé negativa lidského počínání, tak v posledních několika letech se také snaží hledat různé alternativní postupy, které jsou k životnímu prostředí šetrné. Např. náhrada syntetických látek těžko odstranitelných za látky biologicky dobře rozložitelné, odstranitelné. Dnešní svět je zaplaven plasty, syntetickými polymery, které v přírodě přetrvávají několik let téměř beze změny. Jen malá část veřejnosti ví, že dnes již existují polymery ve vlastnostech srovnatelné s umělými plasty. Mají ale velkou výhodu - nezatěžují životní prostředí. Jde totiž o polymery tzv. přírodní, které jsou produkovány některými eukaryotickými a prokaryotickými organismy. Tyto přírodní polymery se nacházejí kolem nás v některých případech již dlouho, např. v jogurtech a některých dalších mléčných výrobcích. A nejen v potravinách, ale také v kosmetice, farmacii, medicíně a mnoha dalších oborech. Doufejme, že v budoucnu budou tyto biopolymery, jejichž problematikou se zabývám ve své diplomové práci, ještě více nahrazovat syntetické plasty, abychom našemu životnímu prostředí ulehčili.

I. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1 EXTRACELULÁRNÍ POLYMERY

V několika posledních letech patří slovo polymery mezi jedno z nejpoužívanějších. Dnes už to neznamená jen syntetické polymery, tedy uměle vyráběné, ale i přírodní polymery tzv. biopolymery. Tyto se získávají mj. i mikrobiální produkcí. Mnoho druhů bakterií produkuje různé typy biopolymerů. Mezi nejznámější a nejvyužívanější patří polysacharidy. Kromě nich však mikroorganismy tvoří také další polymerní látky jako např. bílkoviny a nukleové kyseliny. Biopolymery jsou produkovány za různým účelem, při různých podmínkách a v různých formách.

První nejhrubší dělení mikrobiálních polymerů je rozdělení na polymery **extracelulární** a **intracelulární**. Hlavní odlišnost těchto dvou skupin je v místě jejich účinku či využití. Extracelulární polymery (ECP) bakterie vylučují do vnějšího prostoru mimo své buňky, zatímco intracelulární polymery zůstávají uvnitř bakteriálních buněk (nejčastěji v cytoplasmě) [1],[2]. Některé typy bakteriálních ECP jsou na povrchu buněk vytvářeny v podobě více či méně silné vrstvy silně hydratovaného materiálu s vysokým obsahem vody [3],[4]. Důvodů, proč některé bakterie tvoří tyto ECP ve značných množstvích, je několik např. možnost přichycení buňky k podkladu, ochrana buňky před vyschnutím, fagocytózou, napadením antibiotiky a různými toxickými sloučeninami [2],[5],[6],[7].



Obr. 1. Znárodnění umístění intracelulárních a extracelulárních polymerů u gram-positivních a gram-negativních bakterií. CPS – kapsulární polysacharidy (kapsule), EPS – exopolysacharidy (sliz) (viz [8], upraveno).

U některých druhů bakterií nemusí docházet k produkci biopolymerů jen na povrchu či uvnitř buněk, ale i v tzv. periplasmatickém prostoru anebo mohou být polymery součástí vnějších membrán. U posledních dvou uvedených případů mohou takto mikroorganismy produkovat molekuly oligosacharidů resp. proteinů [9],[10],[11],[12]. Tyto typy polymerů však spolu s extracelulárními enzymy a toxiny obvykle nejsou pojímány jako ECP, stejně tak jako tzv.S-vrstvy, které se vyskytují v podobě velmi tenkého obalu na povrchu mnohých G-positivních a některých G-negativních bakterií [11],[13].

Do skupiny extracelulárních polymerů (ECP) jsou řazeny sloučeniny:

- polysacharidy,
- proteiny,
- lipidy
- hyaluronová kyselina
- glykolipidy a glykoproteiny
- DNA [1],[2],[11],[12],[14],[15],[16],[17].

Z výčtu polymerů spadajících do skupiny ECP se poněkud více vyskytují a nejrozšířenější skupinou jsou polysacharidy a následně proteiny. Mnoho druhů bakterií produkuje polysacharidy ve velkém množství. Naproti tomu některé druhy bakterií jsou schopny produkovat a produkuje extracelulárně proteiny. Ty však již nejsou vytvářeny v takovém množství jako polysacharidy. Schopnost produkce extracelulárních proteinů má méně druhů bakterií než jak je tomu u produkce polysacharidů (viz dále). Ostatní skupiny polymerních sloučenin (tj. lipidy, hyaluronové kyseliny, glykolipidy a glykoproteiny) nejsou již tak hojně zastoupeny a vyskytují se v ECP převážně jako minoritní složky doprovázející polysacharidy či proteiny. Schopnost jejich tvorby nemá tolik druhů bakterií [11],[16],[18]. Nicméně u malého počtu bakterií může v některých případech docházet k tvorbě proteinů či lipidů jako hlavních složek ECP [16]. Např. u sulfát-redukujících bakterií je složení ECP následující: 60 % proteiny, 37 % polysacharidy a 3 % uhlovodíky [18].

Některé druhy bakterií (např. rodu *Streptococcus*) mají schopnost produkovat extracelulárně i hyaluronové kyseliny jako majoritní složku. Jde o sloučeninu skládající se z opakujících se jednotek – kyseliny glukuronové a N-Acetyl-glukosaminu [2],[3],[17].

V poslední době bylo zjištěno, že některé druhy bakterií mají schopnost produkce extracelulární DNA (eDNA). Jejich výskyt a produkce je však velmi omezená a je známa jen u několika málo druhů bakterií (např. u bakterií rodu *Pseudomonas* a *Rhodococcus*) [14],[15],[19].

Autor Sponza [15] navíc ve svém článku popisuje možnost výskytu vyšší hladiny DNA a současně nižší hladiny proteinů v ECP a naopak, tedy nižší výskyt DNA a zároveň vyšší množství proteinů. Která z uvedených dvou sloučeniny bude vyprodukována ve větším množství, záleží na složení substrátu jež bakterie rozkládají a na typu bakterií.

1.1 Mechanismus produkce homopolysacharidů a heteropolysacharidů bakteriemi

Mechanismy produkce ECP, konkrétně polysacharidů, bakteriemi jsou závislé na složení těchto sloučenin. Dle způsobu produkce polysacharidů je možno rozlišit 2 skupiny:

- První skupinu tvoří malý počet homopolysacharidů, konkrétně dextran, mutan, alternan a levan. Proces jejich produkce je závislý na přítomnosti jednoho konkrétního substrátu – sacharosy. V přítomnosti této látky a vysoce specifického enzymu - glykosyl transferasy (např. dextran nebo levan sacharasy) dochází k tvorbě polysacharidů extracelulárně. Buňky tedy, pomocí přítomného enzymu, hydrolyticky štěpí sacharosu vyskytující se v jejich okolí na monomerní sloučeniny. Takto vzniklou fruktosu bakterie transportují do nitra svých buněk a využívají ji pro svůj růst a pro pokrytí energetických potřeb, které vznikají při tvorbě ECP. Z druhé monomerní jednotky – glukosy - syntetizují bakterie na povrchu svých buněk polysacharidy, tedy ECP.
- Druhou skupinu tvoří „zbývající“ homopolysacharidy a veškeré heteropolysacharidy. Tyto sloučeniny vznikají polymerací opakujících se cukerných jednotek utvářených v cytoplazmě. Reakcí se zúčastňuje několik enzymů, které se podílejí jak na syntéze polysacharidů v cytoplazmě tak na jejich pozdější sekreci ven z buňky.

Souhrnně lze tedy říci, že látky zařazené do první skupiny jsou produkovány z jediného substrátu a díky přítomnosti jediného enzymu. Tato skutečnost je velmi důležitá, neboť může značně usnadnit průmyslovou výrobu těchto ECP. Kdežto při bakteriální produkci ECP spadající do druhé skupiny je zapotřebí většího množství látek pro syntézu a většího počtu různých enzymů [6],[20],[21].

1.2 Dělení extracelulárních polymerů

ECP mohou být produkovány jako:

- **kapsule (pouzdra)**, které jsou pevně vázány kovalentní vazbou na povrch buňky,
- **slizy**, které nemají pevně dané okraje a jsou volně produkovány do prostoru.

Forma produkováného ECP záleží na druhu bakterií, podmínkách kultivace a typu použité živné půdy pro růst [1],[2],[5],[6],[21].

Samotné kapsule je možno dále ještě dělit dle jejich tlouštěk na:

- **Makrokapsuly** – tvoří poněkud silnější vrstvu polysacharidu či proteinu s pevným okrajem, jsou velmi dobře pozorovatelné pod mikroskopem
- **Mikrokapsuly** – jde o vrstvu polymeru o tloušťce max. 0,2 nm, někdy je mylně zaměňována za součást buněčné stěny. Tato vrstva je velmi špatně mikroskopicky pozorovatelná [2],[22].

Při sledování produkce a vlastností ECP jsou objektem zájmu především makrokapsule, které, jak již bylo zmíněno, zahrnují větší množství vyprodukovaných polymerů.

S tvorbou kapsulí je také částečně spojen výskyt dvou různých forem kolonií. U jedné bakteriální kultury, kultivované na agarové pevné půdě, lze někdy pozorovat tyto dvě formy:

- tzv. **hladká** („S“, z angl. smooth), tvořící mukoidní kolonie díky tvorbě ECP
- tzv. **drsňá** („R“, z angl. rough), tvořící kolonie bez mukoidního vzhledu, bez tvorby ECP

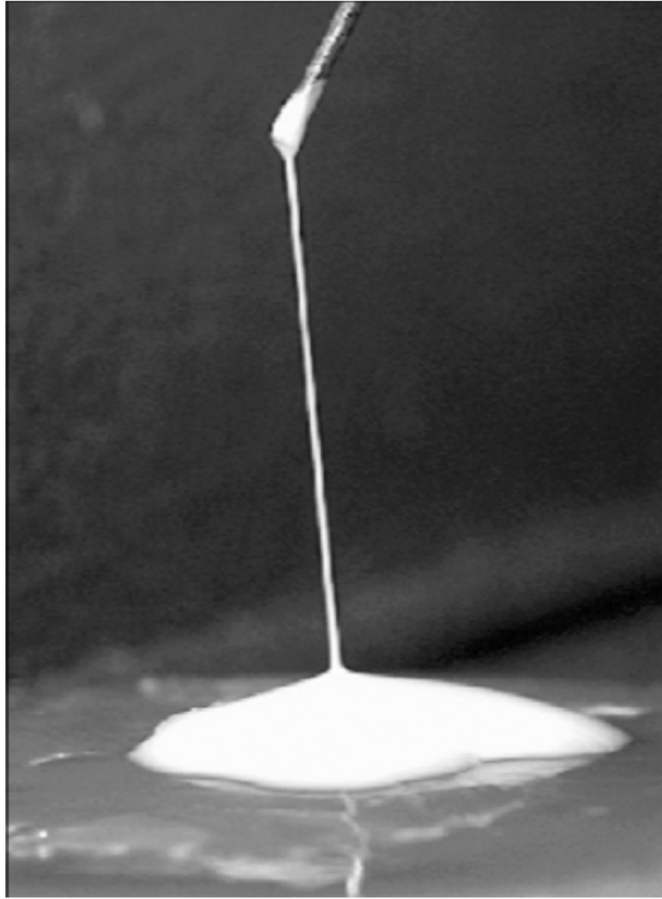
Autoři Rosypal [22] a Bossier a Verstraete [23] uvádějí, že u některých bakteriálních kultur kultivovaných na misce a za různých podmínek je možné sledovat přechod kultur s mukoidním vzhledem (tedy „S“ forma) na kultury s nemukoidním vzhledem (tedy „R“ formu). Přechod mezi těmito dvěma formami je spontánní a je způsoben mutací, což také může vést ke změnám některých biologických vlastností dané bakteriální kultury.

V závislosti na podmínkách kultivace mohou některé bakterie (např. některé bakterie mléčného kvašení) tvořit extracelulární polymery dvou různých fenotypů:

- tzv. „**provázkoidní**“ vzhled kolonií (z angl. ropy) – je způsobován přítomností určitých typů EPS. Tento charakter bakteriální kolonie lze pozorovat pouze při použití očkovací kličky. Pokud se klička oddálí od bakteriální kolonie dochází k vytvoření protáhlého vlákna (viz. Obr. 2.). Bez použití kličky nelze tento charakter kolonie pozorovat.
- tzv. „**neprovázkoidní**“ vzhled kolonií (z angl. nonropy) – zahrnuje mukoidní a slizový vzhled kultury, tzn. EPS jsou zde také přítomny. Bakteriální kultury s tímto charakterem nemají schopnost tvořit vlákna při použití očkovací kličky.

Jak je již výše uvedeno, „ropy“ i „nonropy“ charaktery kolonií se vyskytují u bakteriálních kultur, které produkují EPS. Makrokapsule je tedy pozorována u obou těchto typů charakterů. „Ropy“ charakter se dá rozeznat při použití očkovací kličky nebo jakýchkoliv předmětů tvaru tyčinky. Je možné ho také sledovat u tekutých bakteriálních kultur produkujících EPS při užití pipety. Tvorba viskózních vláken je pozorována u tzv. volného pádu kultury ze špičky pipety. Bakteriální kolonie s „ropy“ charakterem jsou hladší, mají vyšší viskozitu a nižší citlivost k synerzi než je tomu u druhého typu kultur. U některých bakterií může záviset vznik těchto dvou rozdílných charakterů kolonií na podmínkách kultivace. „Ropy“ charakter je však geneticky nestabilní, proto není tolik rozšířen a zastoupen mezi mikroorganismy. Ponejvíce se však vyskytuje u bakterií mléčného kvašení [8].

Přesná podstata tohoto jevu není zatím známa. Některé výsledky však naznačují, že rozdíl mezi ECP „ropy“ a „nonropy“ kultur spočívá v mikrostruktuře polymerů [24].



Obr. 2. Znárodnění „ropy“ charakteru u Lactic acid bakterie kultivované na misce s agarovou živnou půdou [8].

1.3 Podmínky kultivace bakterií tvořící extracelulární polymery

Jak již bylo několikrát uvedeno, produkce ECP je velmi ovlivněna genotypem, fyziologickými podmínkami a vnějším prostředím. Okolí velkou měrou ovlivňuje růst buněk a produkci veškerých látek. Mezi okolní vlivy patří závislost na fyzikálních, chemických a biologických faktorech. Tyto faktory zahrnují např. pH, teplotu, dostupnost živin, charakter substrátu a poměr C:N v nich, přítomnost kyslíku atd. [1],[5],[6],[21].

1.3.1 Vliv růstových fází na produkci ECP

Při statické kultivaci probíhá růst bakterií v šesti různých růstových fázích (lagová fáze, fáze zrychleného růstu, exponenciální fáze, fáze zpomaleného růstu, stacionární fáze a degrační fáze). Jak dlouhé budou jednotlivé fáze a jak budou probíhat závisí na konkrétních bakteriích a také na podmínkách a délce kultivace [22].

Různé bakterie produkují ECP v různých fázích. Některé začínají produkovat ECP na konci, některé na počátku a některé uprostřed exponenciální fáze. Jiné druhy bakterií potřebují delší čas, protože ECP produkují později - až na počátku či na konci stacionární fáze. Další druhy bakterií dokáží produkovat ECP během celé doby svého růstu [1],[2],[21]. Např. u bakterie *Rhodococcus erythropolis* je pozorována tvorba ECP současně na počátku nastupující exponenciální fáze a v jejím průběhu, což u této bakterie odpovídá době kultivace 2 - 6 dní [25]. Poslední fází, kdy jsou ještě schopny některé bakterie produkovat ECP, je konec stacionární fáze. Později již bakterie nemají tolik dostupných živin pro jejich produkci [1],[2],[21],[26].

1.3.2 Vliv poměru C:N na produkci ECP

Poměr mezi C a N je velice důležitý nejen při produkci ECP, ale i při růstu samotných buněk. Jako vhodný poměr pro růst buněk je obvykle uváděn poměr 10:1 [27], tvorba většiny ECP je upřednostňována při ještě vyšších poměrech C:N. Bohužel při této nerovnováze (ve prospěch C) dochází k „soutěžení“ o substrát mezi ECP a intracelulárními polymery (kys. poly- β -hydroxymáseľnou a glykogenem), což je poněkud nevýhodné při případné průmyslové produkci ECP [1],[2],[21]. Na kultuře *Zooglea ramigera* lze dokumentovat, že zmiňovaná nerovnováha C:N má vliv na produkci ECP (Tab. 1) [28].

Tab. 1. Vliv poměru C:N na produkci buněk a polysacharidů při obsahu glukosy v substrátu 25 g/l [28].

Poměr C:N	Koncentrace polysacharidu (g/l)	Sušina kultury (g/l)
38	15,5	2,4
26	10,0	3,7
19	5,1	5,0

Všechny bakterie nevyužívají stejný zdroj C a N. Každá bakterie dává přednost jiným substrátovým směsím. Výborné produkce ECP dosahují bakterie, pokud mají k dispozici jako zdroj uhlíku cukerné sloučeniny (např. glukosu, fruktosu, sacharosu, sorbitol, mannitol), taktéž ethanol je pro některé bakterie velmi dobrým zdrojem uhlíku [1]. Např. bakterie *Rhodococcus erythropolis* pro svůj růst a tvorbu ECP upřednostňuje následující uhlíkaté zdroje: sorbitol, mannitol a dále také ethanol [25].

Jako výborné dusíkaté zdroje jsou považovány látky – kasein, síran amonný, močovina, kvasničný extrakt, polypepton a některé amino kyseliny (např. kyselina glutamová a alanin) [1]. Již zmiňovaná bakterie *Rhodococcus erythropolis* využívá pro produkci ECP a svůj růst jako zdroj dusíku např. tyto sloučeniny – močovina, síran amonný, kvasničný extrakt a kyselina kasaminová [29]. Autoři Kambourová, Tangney a Priest [30] ve své práci sledovali vliv různých typů dusíkatých substrátů a jejich množství na produkci extracelulárních proteinů, konkrétně kyseliny poly- γ -glutamové (PGA) u dvou bakterií rodu *Bacillus*. Jejich dosažené výsledky znázorňuje Tab. 2.

Tab. 2. Vliv různých zdrojů dusíku na množství vyprodukovaného PGA [30].

Zdroj dusíku (4 g/l)	PGA (mg/l)
NH ₄ Cl	1.270
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.060
NH ₄ NO ₃	1.180
NaNO ₃	50
Argini	790
Aspartam	580
Glutamin	910
Glutamat	0
(NH ₄) ₂ SO ₄ + glutamat	0
Glutamin + glutamat	370

1.3.3 Vliv pH na produkci ECP

pH, jako ostatní vlivy, je řazeno mezi nejvýznamnější faktor ovlivňující samotný růst bakterií. U všech faktorů velmi záleží na typu bakterií, neboť každá bakterie potřebuje jiné poměry, množství a druhy látek, jiné prostředí a různé délky kultivace.

U vlivu pH ať už na růst bakterií či produkci ECP tomu není jinak. Některé bakterie potřebují pro svůj růst nízké pH některé vysoké či rozmezí 6-8. Avšak většina bakteriálních kultur potřebuje pH neutrální.

Jakékoliv výkyvy od optimálních hodnot způsobují zpomalení, někdy až zastavení růstu či produkce ECP. Avšak, jak již bylo uvedeno, optimální hodnoty pH jsou pro různé bakterie vysoce individuální [1],[21].

Produkce ECP např. u bakterií *Rhodococcus erythropolis* je vyšší v alkalické oblasti, tedy při pH 8,0 – 9,5 [29].

1.3.4 Vliv teploty na produkci ECP

Teplota je dalším velmi důležitým faktorem pro růst bakterií a jejich produkci ECP. Jelikož jsou bakterie děleny do 3 skupin dle teploty, která je pro jejich kultivaci a další pochody uvnitř či vně buněk optimální, nelze souhrnně říci, jaká teplota či teplotní interval je nejvhodnější a optimální. Je tedy zřejmé, že jde opět o velmi individuální teplotní podmínky [1]. Sutherland [21] uvádí, že většinou je pro bohatou produkci ECP potřebná sub-optimální teplota. Již několikrát zmiňovaná bakterie *Rhodococcus erythropolis* vyžaduje např. teplotu 30 °C [29]. Pro velkou většinu bakterií jsou nejpříznivější teploty v intervalu 30-36 °C. Jsou-li však bakterie vystaveny teplotám pro ně nevhodným, může dojít k zastavení růstu a též i produkce ECP [1].

1.3.5 Vliv kovových iontů na produkci ECP

Přítomnost jakýchkoliv kovů či kovových iontů většinou způsobuje inhibici produkce ECP a také růstu buněk. Pro různé druhy bakterií mají inhibiční účinky různé ionty kovů, mezi které patří např. Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} [1],[31]. Pro některé bakterie však některé tyto uvedené ionty nejsou nežádoucí (např. Ca^{2+} , Mn^{2+} a Ba^{2+}) ba naopak mají účinek stimulační. Při jejich působení totiž záleží nejen na typu iontu, ale také ve velké míře na množství (koncentraci) přítomného kovového iontu. Např. některé biogenní prvky přítomné v nadměrném množství, mohou negativně ovlivňovat veškeré pochody v buňkách. Proto nelze souhrnně říci, že všechny kovové ionty jsou inhibitory pro všechny druhy bakterií [31].

1.3.6 Vliv způsobu kultivace na produkci ECP

Jak již bylo v kapitole 1.2 uvedeno, bakterie mohou mutacemi přecházet z „S“ formy (hladké) na „R“ formu (drsňou). Tyto přechody mohou být ovlivňovány také způsobem kultivace, např. zda je kultivace prováděna na pevných agarrech či v tekutých živných médiích [23].

Autoři Bossier a Verstraete [23] sledovali schopnost tvorby ECP kulturou *Comamonas testosteron*, která na pevných agarrech vytvářela jak mukoidní, tak nemukoidní kolonie. Byla-li ovšem kultivace kultury prováděna v tekutém živném médiu a za stálého třepání, nebyly takovéto změny pozorovány. Avšak při kultivaci nemukoidní kultury v tekutém živném médiu bez třepání a v kontaktu se sklem došlo k její přeměně na kulturu s mukoidním vzhledem kolonií. Také bylo možno v tekutém živném médiu pozorovat opačný děj, tedy přemě-

nu z mukoidní kultury na nemukoidní, jestliže byla kultura vystavena nepříznivým vlivům tj. přítomnosti některých chemikálií (peroxidu vodíku, dodecyl sulfátu sodnému) nebo při hladovění buněk.

Mezi způsob kultivace se také řadí možnost přidavků různých látek do médií, ve kterých se kultivují bakteriální kultury. Např. přidavek různých cukrů (sacharosy, glukosy) či L-glutamátu jak je uvedeno v práci autorů Ashiuchi a spol [32]. Tito autoři kultivovali bakterii *Bacillus subtilis* v médiu obsahující 2 % L-glutamatu (tj. 20 g/l). Po pěti dnech kultivace byla zjištěna přítomnost extracelulárního proteinu, kyseliny poly- γ -glutamové (PGA) v množství 13,5 g/l. Je-li tato hodnota porovnána s původním dodaným množstvím substrátu činí výtěžnost 75% PGA. Takovéto zisky ECP by velmi usnadnily průmyslovou výrobu ECP a umožnily by větší dostupnost pro veřejnost či další průmyslové využití těchto produktů.

1.4 Biologické funkce extracelulárních polymerů u bakterií

Mnoho druhů bakterií a za určitých podmínek produkují extracelulární polymery. Důvodů, proč tyto ECP tvoří a v takovém množství, je několik, např. možnost přichycení buněk k podkladu, ochrana buněk před vyschnutím, fagocytózou, napadením antibiotiky a různými toxickými sloučeninami (např. toxické kovové ionty, SO₂, ethanol), ochrana před protozoální predací, osmotickým napětím atd. [2],[4],[5],[6],[7].

Často je také uváděno, že vytvořené extracelulární polymery mohou buňky v dobách nouze (v dobách hladovění) využívat jako zdroj uhlíku a energie. Tento názor však nesdílí všichni mikrobiologové a vědci z této oblasti. Názor na využívání ECP bakteriemi jako možný zdroj uhlíku a energie rozděluje vědce na dvě skupiny. Jedna skupina se s tímto názorem ztotožňuje, jako například autoři Pyrog [7] a Cudlín [33]. Druhou skupinou jsou vědci, kteří tuto domněnku nepodporují, jako například autoři De Vuyst spolu s Degeest [6] a Ruas_Madiedo spolu s G. de los Reyes-Gavilán [8]. Tito autoři ve svých pracích uvádějí, že bakterie nemohou tyto polymery v dobách hladovění využívat jako zásobu energie a uhlíku, a že fyziologická role těchto látek není zatím určena.

Z výše uvedených charakteristik bakteriálních ECP lze však říci, že ECP mají mnoho nezapíratelných funkcí. Jedny z nejdůležitějších jsou ochrana buněk před okolními nepříznivými vlivy a možnost snadnější adheze mikroorganismů na pevné povrchy.

2 EXTRACELULÁRNÍ POLYSACHARIDY A PROTEINY

Jak již bylo řečeno v úvodu kapitoly 1, extracelulární polymery jsou různorodou skupinou látek, kam patří polysacharidy, proteiny, lipidy, hyaluronové kyseliny, glykolipidy a glykoproteidy a DNA. Nejvíce rozšířenými skupinami extracelulárních polymerů jsou extracelulární polysacharidy (EPS) a extracelulární proteiny. V této kapitole jsou uvedeny jejich struktury a nejvýznamnější zástupci.

2.1 Struktura extracelulárních polysacharidů

Mikrobiální exopolysacharidy jsou lineární molekuly s pravidelnou strukturou. Díky své linearitě vytvářejí helikální struktury, které mohou být dvojšroubovicové nebo méně často trojšroubovicové [34].

EPS jsou děleny dle jejich chemické struktury na dvě skupiny:

- *homopolysacharidy*
- *heteropolysacharidy*

Homopolysacharidy jsou oproti druhé skupině jednodušší sloučeniny složené z opakujících se jednotek stejných typů monosacharidů. Homopolysacharidy jsou dále rozděleny dle typu monomerních jednotek a vazeb mezi nimi na 4 podskupiny:

- a) ***α -D-glukany*** (např. dextran) – jsou charakteristické svou hlavní monomerní jednotkou - glukosou s vazbou v poloze α -1,6. Pro tuto skupinu je dále specifické větvení na glukose převážně v pozici 3 a také (méně často) v pozici 2 a 4. Další polysacharidy spadající do této skupiny jsou alternany a mutany se spojením α -1,3 a α -1,6.
- b) ***β -D-glukany*** – tato skupina je charakteristická hlavní glukosovou jednotkou s vazbou v poloze β -1,3 a s bočními vazbami v poloze β -1,2.
- c) ***Fruktany*** – jak již sám název napovídá hlavní jednotkou je D-fruktosa s vazbou v poloze β -2,6. Do této skupiny spadá např. polysacharid levan.
- d) ***Ostatní*** – (např. polygalaktany) polysacharidy spadající do této skupiny se liší typy opakujících se monomerních jednotek a také růzností glykosidických vazeb mezi těmito monomery [6],[8],[21].

Homopolysacharidy jsou tedy poměrně jednoduché látky s opakujícími se monosacharidovými jednotkami ponejvíce glukosovými, fruktosovými či galaktosovými. Vznikající polymerní řetězce homopolysacharidů mohou mít v určitých polohách různé boční řetězce,

kteřé spolu s hlavními polymerními řetězci udělují polymerům jejich specifické vlastnosti [6],[8],[21]. Homopolysacharidy jsou mikroorganismy produkovány ve větším množství než heteropolysacharidy [35].

Heteropolysacharidy – jsou složitější polysacharidy skládající se z opakujících jednotek různých sacharidů. Velikost těchto jednotek je variabilní od disacharidů až po oktasa-
charidy a jsou tvořeny 2 - 4 typy různých monosacharidů. Nejčastější kombinace sacha-
ridových jednotek v polysacharidu jsou následující D-glukosa, D-galaktosa
a L-rhamnosa a v některých případech také skupiny jako N-acetylglukosamin,
N-acetylgalaktosamin, fucosa a glukuronová kyselina [6],[8],[21]. Např. monomerní
cukerné jednotky v EPS u bakterie *Vibro harveyi* jsou tvořeny převážně z galaktosy
a glukosy, v menším množství jsou přítomny rhamnosa, fucosa, ribosa, arabinosa, xylo-
sa a mannosa [26].

Na hlavní polysacharidový řetězec bývá navázáno mnoho různých skupin (bočních ře-
tězců), převážně zbytky organických kyselin např. acetát, glycerát, propionát, pyruvát
či sukcinát. Mezi nejobvykleji vyskytující se substituenty patří acetát vázaný esterovou
vazbou a pyruvát s ketalovou vazbou [6],[8],[21],[34].

Heteropolysacharidy tedy tvoří velkou a velmi rozmanitou skupinu látek dosahující velikosti
molárních hmotností od $4 \cdot 10^4$ do $6 \cdot 10^6$ Da. Jejich produkované množství však nedosahuje
takové úrovně jako je tomu u homopolysacharidů [36].

Některé EPS, homopolysacharidy nebo heteropolysacharidy, mohou být sestaveny ze stej-
ných typů opakujících se jednotek, avšak jejich poměrné zastoupení je různé. Např. bakterie
rodu *Bacillus* sp. má EPS složený z glukosy, mannosy, galaktosy a fukosy v poměru 8:4:2:1.
Jiná bakterie označována jako R-3 produkuje extracelulární polysacharidy ve složení gluko-
sa, galaktosa, sukcinová kyselina a kyselina pyruvátová v poměru 5,6:1:0,6:2,5 [1]. Jaké
typy monomerních jednotek a v jakém množství jsou zastoupeny v EPS záleží na druhu bak-
terií, které je produkují, na podmínkách kultivace a také na různorodosti dostupného sub-
strátu [1],[2],[21].

Složení polysacharidů i s jejich bočními řetězci a s tím související jejich primární, sekun-
dární a terciární struktura velmi ovlivňuje fyzikální vlastnosti těchto látek. Např. u polysa-
charidu xanthanu jsou v jeho struktuře přítomny postranní řetězce. Přítomnost těchto boč-
ních substituentů dává polymeru xanthanu rozpustný charakter. Kdyby tyto boční řetězce

polymer postrádal, stala by se z něj látka nerozpustná (celulosa). Podobně jsou na tom také polysacharidy scleroglukan a curdlan. Scleroglukan je polymer s bočními řetězci a je tedy polymerem rozpustným, kdežto curdlan postranní řetězce postrádá a je tedy vodou špatně rozpustný [21],[34]. U přítomných bočních řetězců je důležité jejich složení. Charakter bočního řetězce spolu se složením hlavní kostry polymeru udělují EPS výsledné vlastnosti. Např. u bakterie *Vibrio harveyi* kultivované v minerálním médiu s přidavkem 1.5 % NaCl a 0.2 % glukosy bylo zjištěno složení EPS následující - cukerné složky, uronová kyselina, proteiny a sulfáty. Další sloučeniny přítomné jako boční řetězce byly identifikovány – skupiny hydroxylová, karboxylová a amidová. Toto složení dává EPS dobré emulsifikační vlastnosti [26]. Kromě přítomnosti či nepřítomnosti bočních řetězců jsou vlastnosti daného biopolymeru závislé také na typu vazby, kterou jsou jednotlivé monomerní jednotky v polysacharidovém řetězci mezi sebou vázány. Např. jsou-li v polymeru dextranu glukosové jednotky vázány vazbou β (1→4) je tento polymer neohebný, jsou-li však monomerní jednotky vázány vazbou α (1→2) stává se dextran polymerem ohebným [21].

Jaké vlastnosti a jaké složení má produkovaný ECP záleží na druhu bakterií a podmínkách jejich kultivace [21].

2.2 Nejvýznamnější skupiny EPS

Extracelulární polysacharidy jsou velmi rozsáhlou skupinou. Patří sem nepřeberné množství různých polymerních látek s hlavním řetězcem složeným z různých cukerných jednotek. Mezi nejvýznamnější a nejrozšířenější zástupce EPS patří následující sloučeniny:

Sukcinoglycany

- Polysacharidy složené z D-glukosy, D-galaktosy, pyruvátu, sukcinátu a acetylu v poměru 7:1:1:1:1 [37].
- Poprvé byly izolovány z půdní bakterie *Alcaligenes faecalis*. Dnes je známo, že je produkuje mnoho jiných druhů bakterií mezi které patří např. *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter* či bakterie rodu *Pseudomonas* sp. [34],[37].
- Díky svým dobrým vlastnostem (zahušřovadlo, emulsní stabilizátor a suspenzní činidlo) jsou dnes průmyslově vyráběny [37].

Curdlan

- Je lineární homopolysacharid složený výhradně z D-glukosy. Tyto opakující se jednotky jsou navzájem spojeny vazbou β (1 \rightarrow 3).
- Schopnost produkovat curdlan mají různé druhy gram-negativních bakterií. Některé jej produkují jako jediný exopolysacharid, jiné druhy, jako např. *Agrobacterium* sp., jej mohou produkovat spolu s dalšími heteropolysacharidy, nejčastěji spolu se scleroglukany [34].

Scleroglukany

- Je skupina plísňových exopolysacharidů se stejnou strukturou hlavního řetězce jako curdlan. Na zhruba každém 3 uhlíku tohoto hlavní řetězce jsou připojeny D-glukosové skupiny, jež jsou navzájem spojené vazbou β (1 \rightarrow 6).
- Typický scleroglukan dosahuje molekulové hmotnosti (5-6).10⁶ Da [34].

Galaktoglukany

- Polysacharidy s poměrně jednoduchým složením – D-glukosa, D-galaktosa a pyruvát v poměru 1:1:1. Jednotlivé disacharidové jednotky jsou v polymeru spojeny vazbou (1 \rightarrow 3).
- Poprvé byly izolovány ze sedimentu na dně vodního toku a z biofilmů vyskytující se ve vodním toku jako produkt bakterií *Agrobacterium radiobacter* a *Pseudomonas* sp.
- Jsou-li tyto EPS vyprodukovány u bakterie kultivované na misce s agarovou živnou půdou, dávají bakteriálním koloniím viskózní vzhled [37].

Algináty

- Lineární polysacharidy složené ze dvou cukerných jednotek – kyseliny β -D-mannouronové a α -L-glukuronové. Tyto jednotky jsou spojeny vazbou (1 \rightarrow 4) [17],[34],[38],[39]. Tvoří je některé bakterie a také některé mořské řasy, přičemž bakteriální a řasové algináty se strukturálně liší přítomností substituentů u bakteriálních alginátů.
- Tyto polysacharidy jsou průmyslově vyráběny extrakcí z hnědých mořských chaluh [17]. Mikrobiálně jsou produkovány bakteriemi *Pseudomonas aruginosa* a *Azotobacter vinelandii* [17],[34].

2.3 Struktura a vlastnosti extracelulárních proteinů

Problematikou extracelulárních proteinů se ve větší míře zabývá několik autorů, např. Higgins. Tento autor uvádí tvorbu a složení extracelulárně produkovaných proteinů: molární hmotnosti exocelulárních proteinů izolovaných ze vzorků aktivovaného kalu se pohybují asi kolem hodnoty 15 kDa [40]. Také další vědci Ashiuchi a Misono [41] se zabývají touto problematikou. Jejich práce je zaměřena již na konkrétní typy exocelulárních proteinů - kyseliny poly- γ -glutamovou (PGA) produkovanou různými druhy bakterií, převážně rodu *Bacillus*. Ve své práci se zabývají převážně syntézou těchto typů bakteriálních proteinů. Jedním z výsledků jejich zkoumání je zjištění molekulové hmotnosti PGA vyprodukované různými druhy bakterií (viz Tab. 3).

Tab. 3. Molekulární hmotnost PGA produkovaná různými druhy bakterií [41].

Druh bakterie (producent)	Molekulová hmotnost (kDa)
<i>Bacillus subtilis</i> (natto)	10 - 1000
<i>Bacillus subtilis</i> (natto)	> 1,000
<i>Bacillus licheniformis</i>	10 - 1000
<i>Bacillus anthracis</i>	-
<i>Bacillus megaterium</i>	> 200
<i>Bacillus halodurans</i>	10 - 15
<i>Natrialba aegyptiaca</i>	> 1000
<i>Hydra</i>	3 - 25

2.4 Nejvýznamnější extracelulární proteiny

Skupina extracelulárních proteinů není moc velká. Zahrnuje jen velmi malý počet sloučenin, mezi něž patří:

Poly - ϵ -lysin (epsilon-PL)

- Jak již sám název napovídá jde o polymerní sloučeninu složenou z aminokyseliny lysinu.
- Jde o látku biodegradabilní, vodou rozpustnou, jedlou a netoxickou vůči člověku a environmentu [42].

Kyselina poly- γ -glutamová

- Opět složení proteinu vyplývá z názvu, je tedy složen z opakujících se jednotek aminokyseliny kys. glutamové. Je produkovaná různými kmeny bakterií *Bacillus*, také jedněmi archei a eukaryoty [41], [43],[44].

3 VÝZNAM A VYUŽITÍ BAKTERIÁLNÍCH EXTRACELULÁRNÍCH POLYMERŮ

Již dlouho dobu jsou známy biopolymery, konkrétně mikrobiální polymery i s jejich různými vlastnostmi. Avšak jejich využití, nejen v průmyslové oblasti, velmi vzrostlo až v několika posledních letech. V následujícím textu uvádím význam a využití nejznámějších extracelulárních polysacharidů a proteinů.

3.1 Význam a využití extracelulárních polysacharidů

Polysacharidy jsou skupinou látek jež mají velmi široké uplatnění. Vyrábějí a využívají se pro mnoho různých účelů. Např. autoři De Vuyst a Degeest [6] ve své práci uvádějí možný význam produkce těchto biopolymerů z pohledu člověka a také některá jejich omezení, kvůli kterým nemohou být tyto biopolymerní látky využívány ve větším měřítku. Hlavním omezujícím faktorem je na prvním místě samotná produkce EPS, jež vyžaduje dokonalé znalosti mikrobiální syntézy těchto látek a také přizpůsobení a převedení těchto bioprocusů do průmyslového měřítku. Dalším limitujícím faktorem je dnes cena [6].

Autor Sutherland ve své práci uvádí důvody, proč jsou tyto EPS produkovány, opět z pohledu člověka. Důvody jsou následující:

- a) Podobnost některých mikrobiálních biopolymerů s eukaryotickými polymery, jako např. hyaluronové kyseliny.
- b) Jsou to vynikající viskosní a suspenzní činidla, které jsou stabilní i při nepříznivých podmínkách pro buňky (např. změny pH či teplot).
- c) Produkce homopolysacharidů β -D-glukanů, které jsou biologicky aktivní a mohou se užít jako imunitní stimulanty nebo jako látky potlačující rakovinu [21].

Tyto uvedené vlastnosti znamenají nemalý výčet toho, proč jsou mikrobiální polymery již hojněji využívány. Další významné uplatnění mikrobiálních biopolymerů je jejich použití jako biologický flokulant v čistírnách odpadních vod [1] nebo také v potravinářství jako zahušťovadlo. V druhém případě se jedná již o konkrétní EPS produkované mléčnými bakteriemi [6],[45]. Bohužel není mnoho biopolymerů, které se takto mohou používat, už jen z důvodu jejich mikrobiálního původu. Pouze polysacharidy xanthan a gellan jsou legisla-

tivně schválené pro užívání v potravinářství. Mají však také svá omezení, neboť tato povolení je možné uplatnit pouze v Evropě a Severní Americe [21].

Některé konkrétní druhy EPS jsou již dnes ve velké míře využívány v různých oblastech průmyslu a pomalu tak nahrazují synteticky vyráběné polymery.

3.1.1 Využití konkrétních EPS

Xanthan – je biopolymer produkovaný ve velkém množství bakterií *Xanthomonas campestris*. Má široké uplatnění v mnoha oblastech již několik let. Jedno z významných užití je v potravinářství, jak již bylo uvedeno. Také je součástí některých kosmetických produktů či chemických přípravků jako např. adheziva, zubní pasty aj. Velkou výhodou xanthanu je jeho nízká cena produkce [6],[21],[34].

Gellan – další významný zástupce biopolymerů je produktem bakterie *Sphingomonas elodea*. Stejně jako xanthan se používá v potravinářství [6],[21]. V poslední době je hodně využíván v dalších oborech jako jsou farmacie, chemický průmysl a mnoho dalších. V průmyslu se využívá jeho výborné vlastnosti, kdy za určitých podmínek (zahřátí, ochlazení) tvoří termoreversibilní gely. Díky tomu se tento biopolymer komerčně využívá zejména v Evropě a v USA pod obchodními názvy – GELRITE, PHYTAGEL, KELCOGEL [46].

Dextran – je dalším rozšířeným mikrobiálním biopolymerem. Je průmyslově vyráběn ve velkém množství a je využíván v potravinářství, biotechnologii, fotografickém průmyslu a ve farmacii [47]. Velmi známý a významný je dextran používaný v analytické chemii jako chromatografická náplň pod názvem Sephadex [3],[48]. Firma Pharmacosmos průmyslově vyrábí Dextran pro tyto uvedené účely. Pro chromatografické účely vyrábí dextran navíc pod názvem GPC Standards (Gel Permeation Chromatography Standards), který se používá pro stanovení molárních hmotností látek velikostí od 1 000 – 670 000 Da [47].

Curdlan – v průmyslu není tolik rozšířeným biopolymerem. Je spíše využíván jako potravinářská přísada, avšak pouze v Japonsku. V Evropě a Severní Americe nemá pro tyto účely povolení [21].

3.2 Využití extracelulárních proteinů

Mikrobiální biopolymery převážně proteinového složení mají poměrně širší uplatnění než jak je tomu u polysacharidových mikrobiálních biopolymerů. Zástupců z této skupiny ECP však není mnoho, avšak jejich uplatnění je velmi rozsáhlé a různorodé. Význam jednotlivých konkrétních typů extracelulárních proteinů pro člověka je následující:

poly- ϵ -lysin – má široké potenciální uplatnění v oblastech medicíny, zemědělství, elektroniky a hlavně v potravinářství. Využívá se jako konzervační činidlo, emulsifikační činidlo, přídatná látka v dietních činidlech, nosič léků, biodegradabilní vlákna nebo jako hydrogel se schopností absorpce velkého množství vody [42].

poly- γ -glutamová kyselina – tento biopolymer má také široké uplatnění v mnoha oblastech, např. v potravinářství, kosmetice, v technologii čištění vod či medicíně. Konkrétně se používá jako zahušťovadlo, cryoprotektant, zvlhčovač, nosič léků, biologické adhezivum, flokulant či jako absorbent těžkých kovů [41],[43].

3.3 Negativní dopad ECP pro člověka

Ne všechny extracelulární polymery jsou pro člověka přínosem. Některé mohou mít také negativní dopad, např. levany. Tyto polymerní látky jsou produkovány některými bakteriemi *Streptococcus mutans* a *Streptococcus salivaris*. Uvedené bakterie, vyskytující se mj. na povrchu zubů, vylučují enzymy (hexosyltransferasy), které přeměňují sacharosu na fruktosové polymery - levany. Tyto vzniklé polysacharidy ulpívají na povrchu zubů a vytváří na nich povlak, v němž se pak hromadí produkty mléčného kvašení streptokoků, především kyselina mléčná a způsobuje tak pro člověka velmi nepříjemný zubní kaz [3].

Další negativní důsledek tvorby extracelulárních polysacharidů pro člověka je snadnější adheze bakterií k podkladům tedy např. k vnitřnímu povrchu respiračních cest. Exopolysacharidy jsou zde produkovány ve formě biofilmu, který chrání bakteriální buňky před napadením fagocyty či proti působení protilátek nebo chemoterapeutiky. Tyto bakterie tak způsobují různé infekční choroby (např. cystickou fibrosu). Dnes již existuje možnost, jak se proti těmto bakteriálním atakům bránit, a to pomocí enzymů, které biofilm tvořený exopolysacharidy naruší a zkapalní, čímž dojde k obnažení buněk a k možnosti jejich dalšího zneškodnění [49].

4 CÍL PRÁCE

V říjnu v roce 2003 bylo na čistírně odpadních vod ve Fryštáku zjištěno viskosní bytnění aktivovaného kalu (AK). Tato čistírna čistí zemědělské odpadní vody tzn., že přítomný AK netrpí nedostatkem živin (N a P), což je obecně jedna z možných příčin vzniku onoho nežádoucího jevu [50]. Protože znalosti o tomto bytnění AK jsou zatím nedostatečné, stalo se zkoumání tohoto jevu náplní mé SVOČ [51]. Z AK jsem na širokém spektru živných půdy vyizolovala 8 bakteriálních kultur: 2 izoláty bakterií rodu *Pseudomonas* sp. a *Rhodococcus erythropolis* a dále kultury *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudoxanthomonas* sp., *Corynebacterium aquaticum* a *Leuconostoc mesenteroides*. Tyto kultury tvořily ECP na pevných živných půdách. Některé z nich byly schopny tvorby ECP pouze v přítomnosti sacharidického substrátu a některé i bez jejich přítomnosti. Současně byla, pouze u jedné bakteriální kultury (*Agrobacterium tumefaciens*), zjištěna schopnost produkce ECP i v tekutém živném médiu, ovšem to za přítomnosti manitolu jako substrátu [51],[52].

Ze získaných výsledků nebylo zcela zřejmé, která z izolovaných kultur se podílela či spolu podílela na onom viskosním bytnění kalu. Ze zjištěných vlastností jednotlivých druhů bakterií bylo možno některé vyloučit: kultura *Leuconostoc mesenteroides* tvořila ECP pouze při růstu na sacharose, *Corynebacterium aquaticum* produkovala ECP ve výrazně menším množství než ostatní a *Pseudoxanthomonas* sp. produkovala ECP jen za přítomnosti glukosy [51],[52].

Aby bylo možno určit, která bakterie byla zodpovědná za tvorbu viskosního bytnění, bylo nutno provést ještě další zkoumání, zejména podrobněji prostudovat schopnost zahušťovat tekuté živné médium kulturami *Pseudomonas* sp. a *Rhodococcus erythropolis* a dále schopnost tvorby ECP z nesacharidových zdrojů v tekutém živném médiu u bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Toto další zkoumání se stalo náplní mé diplomové práce.

II. METODICKÁ ČÁST

5 PRACOVNÍ POMŮCKY

5.1 Chemikálie, roztoky a živná média použitá pro kultivaci bakterií

Není-li uvedeno jinak, byly všechny použité chemikálie čistoty p.a. a byly dodané firmou LACHEMA Neratovice, ČR.

A) ROZTOKY

Fosfátový pufr (M/15)

Pufr byl složen ze dvou roztoků: roztok A (KH_2PO_4) o navážce 9,078 g do 1 l destilované vody a roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) o navážce 23,9028 g do 1 l destilované vody. Na přípravu pufru bylo odebráno 20 ml roztoku A a 80 ml roztoku B.

V průběhu pokusu se také používal fosfátový pufr různě ředěný (viz dále).

Roztok stopových prvků

Na přípravu 1000 ml roztoku stopových prvků bylo použito:

$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,043 g
H_3BO_3	0,057 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,043 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,037 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,040 g

Jednotlivé složky byly naváženy a rozpuštěny ve 1000 ml destilované vody a důkladně promíchány.

Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8,5 g NaCl, rozpuštěním v 1000 ml destilované vody, dokonale promíchán a vysterilizován při teplotě 125 °C po dobu 20 min.

B) AGAROVÁ ŽIVNÁ MÉDIA

Pokud není uvedeno jinak, byly všechny agary připraveny navážením jednotlivých složek, jejich dokonalým rozpuštěním v daném množství destilované vody a vysterilizováním při teplotě 125 °C po dobu 20 min. Po ochlazení na teplotu cca 45 °C byly agary rozlity do petriho misek a ponechány ke ztuhnutí.

Trypton-yeast extrakt agar (TYA agar)

TYA agar (Himedia, India)	2,1 g
(Složení: trypton 0,6 g + kvasničný extrakt 0,3 g + agar 1,2 g)	
Destilovaná voda.....	100 ml

TYA agar s 2% sacharosy

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

TYA agar s 2% glycerolu

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

TYA agar s 3% jantaranu

TYA agar (Himedia, Indie)	2,1 g
Jantaran sodný	3 g
Destilovaná voda.....	100 ml

TYA agar s 2% jantaranu

TYA agar (Himedia, Indie)	2,1 g
Jantaran sodný	2 g
Destilovaná voda.....	100 ml

Obohacený masopeptonový agar (oMPA)

Živný agar č. 2 (Imuna, SR)	4,0 g
(Složení: hovězí odvar 0,5 g, pepton 0,5g, živný základ č.1 a č.2 po 0,625 g, NaCl 2,5 g, agar 1,5 g)	
Kvasničný autolyzát (Imuna, SR)	0,3 g
Destilovaná voda	100 ml

TYA agar s 2% laktosy

TYA agar (Himedia, Indie)	2,1 g
Laktosa	2 g
Destilovaná voda.....	100 ml

C) TEKUTÁ ŽIVNÁ MÉDIA

Pokud není uvedeno jinak, byla všechna tekutá živná média připravena navážením jednotlivých složek, rozpuštěna v potřebném množství destilované vody, dokonale promíchána a vysterilizována při teplotě 125 °C po dobu 20 min.

Modifikovaný Ashbyho agar (AS+N)

Manitol	2,0 g
K ₂ HPO ₄ (Ing. P. Lukeš, Uherský Brod).....	0,02 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02 g

CaSO ₄	0,01 g
NaCl	0,02 g
NH ₄ Cl	0,03 g
Kvasničný autolyzát (Imuna, SR)	0,3 g
Roztok stopových prvků	0,2 ml
Fosfátový pufr ředěný	100 ml

Jednotlivé složky byly naváženy a rozpuštěny ve fosfátovém pufru (16 ml roztok B + 4 ml roztok A + 80 ml destilovaná voda). Po dokonalém promíchání bylo živné médium AS+N rozplněno po 25 ml do lahví a ty byly vysterilizovány při teplotě 125 °C po dobu 20 min.

Tekuté trypton-yeast živné médium s 2 % sacharosy (TYM+ 2% sacharosy), ředěné 1:1

Trypton (Himedia, Indie)	0,3 g
Kvasničný autolyzát (Imuna, SR)	0,15 g
Sacharosa	1 g
Destilovaná voda	100 ml

Takto připravené tekuté živné médium bylo použito na zalití agarových misek, které simulovaly tekuté prostředí s pevným (agarovým) podkladem.

Tekuté trypton-yeast živné médium s 2 % jantaranu (TYM+ 2% jantaranu), ředěné 1:1

Trypton (Himedia, Indie)	0,3 g
Kvasničný autolyzát. (Imuna, SR)	0,15 g
Jantaran sodný	1 g
Destilovaná voda	100 ml

Takto připravené tekuté živné médium bylo použito na zalití agarových misek, které simulovaly tekuté prostředí s pevným (agarovým) podkladem.

Tekuté trypton-yeast živné médium s 2 % laktosy (TYM+ 2% laktosy), ředěné 1:1

Trypton (Himedia, Indie)	0,3 g
Kvasničný autolyzát (Imuna, SR)	0,15 g
Laktosa	1 g
Destilovaná voda	100 ml

Takto připravené tekuté živné médium bylo použito na zalití agarových misek, které simulovaly tekuté prostředí s pevným (agarovým) podkladem.

Tekuté trypton-yeast živné médium s 2 % laktosy (TYM+ 2% laktosy) (neředěné)

Trypton (Himedia, Indie)	0,6 g
Kvasničný autolyzát (Imuna, SR)	0,3 g
Laktosa	2 g
Destilovaná voda	100 ml

Masopeptonový bujón (MPB), ředěno 1:1

MPB (Himedia, Indie)	1,25 g
<u>(Složení:</u> masový pepton 1,0 g, hovězí extrakt 1,0 g, NaCl 0,5 g)	
Destilovaná voda	100 ml

Takto připravené tekuté živné médium bylo použito na zalití agarových misek, které simulovaly tekuté prostředí s pevným (agarovým) podkladem.

Masopeptonový bujón (MPB) (neředěný)

MPB (Imuna, SR)	2,5 g
Destilovaná voda	100 ml

Glycerolové živné médium s 5x ředěným pufrem

Glycerol, bezvodý (PENTA, Chrudim).....	2,0 g
K ₂ HPO ₄ (Ing. P. Lukeš, Uherský Brod).....	0,02 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02 g
CaCl ₂ (PENTA, Chrudim)	0,01 g
NaCl	0,02 g
NH ₄ Cl	0,03 g
Kvasničný autolyzát (Imuna, SR)	0,3 g
Stopové prvky	0,2 ml
Fosfátový pufr ředěný	100 ml

Jednotlivé složky byly naváženy a rozpuštěny ve fosfátovém pufru (16 ml roztok B + 4 ml roztok A + 80 ml destilovaná voda). Po dokonalém promíchání bylo glycerolové živné médium rozplněno po 25 ml do lahví a ty byly vysterilizovány při teplotě 125 °C po dobu 20 min.

Glycerolové živné médium s různě ředěným pufrem

Glycerolové živné médium bylo připraveno navážením výše uvedených složek (Viz. glycerolové živné médium s 5x ředěným pufrem). Fosfátový pufr byl připraven smícháním roztoků A a B v různých poměrech. Fosfátové pufrы s různým ředěním:

Roztok A	+	Roztok B	+	Voda	Ředění	Molarita
16 ml		4 ml		80 ml	5x	M/75
32 ml		8 ml		60 ml	2,5x	M/37,5
48 ml		12 ml		40 ml	1,67x	M/25,05
64 ml		16 ml		20 ml	1,25x	M/18,75
80 ml		20 ml		0 ml	--	M/15

Glycerolové živné médium s neředěným pufrem

Toto živné médium bylo připraveno jako Glycerolové živné médium s 5x ředěným pufrem, avšak 100 ml fosfátového pufru bylo připraveno smícháním 80 ml roztoku A a 20 ml roztoku B.

5.2 Přístroje, zařízení a další laboratorní pomůcky**a) PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ**

Akvaristický motorek ELITE 800	SRN
Analytické váhy KERN 770	SRN
Aseptický laminární box Bio-II-A	Telstar, Španělsko
Elektrická sušárna MORA 524	ČR
Elektrický vaříč ETA 0108	ČR
Elektromagnetická míchačka MM2A	ČR
Hlubokomrazicí box Chest Freezer, BioTech.....	Dánsko
Chladnička Zanussi zc 255 R	ČR
Chlazená centrifuga MR 23i	Jouan, Francie
Kombinovaná lednička s mrazákem ARDO	ČR
Laboratorní sterilizátor, SANoclav LaM 3-20-MCS-J	SRN
Mikroskop, Olympus	Filipíny
Mikroskopická podložní sklíčka s komůrkami Cyrus II, Meopta	ČR
pH-metr OK-104 + skleněná elektroda	Maďarsko
Předvážky KERN EW	SRN
Předvážky KERN 440-47	SRN
Spínací hodiny Dehl	SRN
Třepačka GFL 3020	ČR
Termobox na 25 °C	UIOŽP, FT, UTB
Termostat Thermo Haake P5, DC 10 (na UPI)	SRN

Ulترmostat mLw U2C	SRN
Vibrační viskozimetr SV-10, AND Company.....	Japonsko

b) LABORATORNÍ POMŮCKY

Automatické pipetmany, Discovery (0,5-10 μ l , 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l, 200- 1000 μ l, 1-5 ml)	Polsko
Jednorázové pipetmany, Plastomed (10 μ l , 20 μ l , 50 μ l , 200 μ l , 500 μ l).....	Polsko
Mikrobiologické očkovací kličky	UIOŽP, FT, UTB
Sterilizační filtr pro jedno použití (0,20 μ m), Sartorius	SRN
Tlakový hrnec, Tescoma	ČR
Veškeré laboratorní sklo	UIOŽP, FT, UTB
Ubelohdeho kapilární zředovací viskozimetr	UPI, FT, UTB
Skelněný temperovací válec	UPI, FT, UTB

5.3 Použité bakteriální kultury

5.3.1 *Rhodococcus erythropolis* FR7 a FR6

Mikroorganismy *Rhodococcus erythropolis* jsou gram-pozitivní aerobní tyčinky izolované z aktivovaného kalu s viskózním bytněním v rámci SVOČ [51] v roce 2003.

5.3.2 *Agrobacterium tumefaciens* FR5

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* jsou gram-negativní aerobní zaoblené malé tyčky izolované z aktivovaného kalu s viskózním bytněním v rámci SVOČ [51] v roce 2003.

5.3.3 *Pseudomonas putida* FR3

Bakterie *Pseudomonas putida* jsou drobné gram-negativní aerobní tyčinky izolované z aktivovaného kalu s viskózním bytněním v rámci SVOČ [51] v roce 2003.

6 PRACOVNÍ POSTUPY

6.1 Postupy používané v průběhu práce

6.1.1 Sterilizace

a) Mokrý – v autoklávu SANOclav

Sterilizace prováděná v laboratorním autoklávu SANOclav LaM 3-20-MCS-J při teplotě 125 °C po dobu 20 min. Takto byla sterilizována veškerá agarová a tekutá živná média, aparatura pro kultivaci s intenzivním provzdušňováním, kultivační lahve a čistý glycerol.

b) Suchá

a. **Horkým vzduchem** – sterilizace prováděná v horkovzdušné troubě při teplotě 150 °C po dobu 2 hodin. Takto bylo sterilizováno laboratorní sklo a pevný maso-peptonový bujón.

b. **Plamenem** – sterilizovány plamenem byly očkovací mikrobiologické kličky a skleněné hokejky.

6.1.2 Centrifugace

Všechny vzorky byly centrifugovány v 50 ml polykarbonátových kyvetách v chlazené centrifuze MR 23i s programem: přetížení 5 000 g, teplota 25 °C, čas 10 min. Centrifugace byla používána pro odstranění buněk z tekutého média s nakultivovanou bakteriální suspenzí.

6.1.3 Měření viskozity na vibračním viskozimetru

Účelem tohoto měření bylo zjistit hodnotu viskozity kapalného média v průběhu kultivace kultury. Měření viskozity se provádělo při 25 ($\pm 0,2$) °C v nádobkách patřící k viskozimetru s obsahem 10 ml roztoku či suspenze. Měření probíhalo na přístroji VibroViscometr SV-10 a každý vzorek byl měřen triplicitně. Minimálně jednou týdně byl přístroj kalibrován na destilovanou vodu dle pokynů výrobce a na standardní roztok sacharosy. Principem měření viskozity na vibračním viskozimetru je zjišťování míry odporu, který klade měřená kapalina dvěma vibrujícím plíškům.

6.1.4 Příprava očkovací suspenze

Pokud není uvedeno jinak, suspenze kultur se připravovaly podle 2. stupně McFarlandovy stupnice. Ten se připravil smísením 9,8 ml 1% H₂SO₄ s 200 µl 1% vodného roztoku BaCl₂. Suspenze byla připravována tak, že se v určitém potřebném objemu sterilního fyziologického roztoku rozmíchala předem nakultivovaná kultura v takovém množství, dokud zákal této bakteriální suspenze neodpovídal zákalu předem připravené anorganické suspenzi (vzniklé sraženině BaSO₄).

6.1.5 Měření pH

pH bakteriálních suspenzí bylo měřeno skleněnou elektrodou na přístroji pH-metr OK-104. Na počátku měření byl přístroj nakalibrován dvěma různými pufrů (pH=7 a pH=4) a poté byly měřeny vzorky.

6.2 Postupy použité pro první orientační zkoušky

6.2.1 Orientační zkoušky růstu kultur a tvorby ECP na pevných médiích

Byly připraveny 4 různé typy agarové půdy: TYA, TYA+glycerol, TYA+jantaran, TYA+sacharosa navážením jejich jednotlivých složek, dokonalým rozpuštěním v daném množství destilované vody a byly dány ke sterilizaci. Po sterilizaci byly půdy rozlity do petriho misek a nechány ztuhnout. Na takto připravené misky byly naočkovány křížovým rozřetěrem jednotlivé kultury (*Pseudomonas putida* FR3, *Agrobacterium tumefaciens* FR5, *Rhodococcus erythropolis* FR6 a FR7). Vzorky kultur byly odebírány ze zamrazených konzerv (kultury uchovány při -80 °C v glycerolu). Každá kultura byla vyočkována na každý typ půdy. Takto naočkované misky byly dány ke kultivaci do temna při teplotě 25 °C. Poté se provádělo odečítání misek 1., 2., 3., 4. a 7. den kultivace.

6.2.2 Ověření zahušťujících schopností kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5

Bylo připraveno 7 lahví o objemu 250 ml pro tekuté živné médium AS+N a 7 lahví pro glycerolové živné médium. Připravená média byla rozplněna do jednotlivých lahví po 25 ml a ty se daly sterilizovat do autoklávu. Po vychladnutí byly lahve naočkovány 20 µl suspenze kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5, která byla připravená dokonalým rozmícháním 3 plných kliček kultury v 300 µl sterilního fyziologického roztoku. Naočkované lahve byly

dány ke kultivaci při teplotě 25 °C do temna na kruhovou třepačku s režimem 100 otáček/min a časovým režimem 15:15 (15 min pohyb:15 min klid). 2. a 4. den kultivace se měřila viskozita jak na Ubelohdeho kapilárním viskozimetru, tak na vibračním viskozimetru.

Měření viskozity na Ubelohdeho kapilárním viskozimetru

Účelem tohoto měření bylo zjištění změny viskozity kapalného média v průběhu kultivace kultury. Vzorky před vlastním měřením byly filtrovány přes fritu (velikost pórů 400 µm), aby se odstranily hrubší nečistoty (včetně shluků buněk), které by mohly ucpat kapiláru ve viskozimetru. Měření viskozity se provádělo při 25 °C ve zředovacím (kapilárním) Ubelohdeho viskozimetru, ve srovnání s čistým nenaočkovaným médiem. Postup spočíval ve sledování doby, za kterou kapalné médium proteče mezi dvěma ryskami na viskozimetru.

6.2.3 Vliv přítomnosti buněk na výslednou viskozitu suspenze

Vzorky použité pro toto měření byly převzaty z předešlých měření - ověření zahušťujících schopností kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5. Druhý a čtvrtý den kultivace byly nejprve změřeny hodnoty viskozit tekutých médií s obsahem buněk (tyto výsledky byly použity pro oba pokusy), následně byly buňky odstraněny centrifugací a viskozita byla opět změřena. Měření byla prováděna pro obě tekutá živná média (AS+N a glycerolové živné médium). Tato měření byla prováděna na vibračním viskozimetru.

6.3 Postupy použité při kultivaci bakterie *Agrobacterium tumefaciens*

FR5

Všechny testy s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 byly prováděny v glycerolovém živném médiu, jež bylo připraveno rozpuštěním vypočteného množství jednotlivých složek v daném množství různě silného pufru (síla pufru volena dle typu pokusu). Kultivace kultury v příslušném glycerolovém živném médiu byla s jedinou výjimkou prováděna ve tmě při teplotě 25 °C a na kruhové třepačce se 100 otáčkami/min a v režimu 15:15 (15 min pohyb: 15 min klid). Zmíněnou výjimku tvořila kultivace kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 při kontinuálním provzdušňování. Přesný postup této kultivace viz níže. Pokud není uvedeno jinak byl každý vzorek při všech měřeních prováděn duplicitně a každý měřen 3x.

6.3.1 Kultivace v glycerolovém tekutém médiu s 5x ředěným fosfátovým pufrům a s přísady glycerolu v průběhu kultivace

Homogenní glycerolové živné médium s 5x ředěným fosfátovým pufrům bylo rozplněno do 250 ml lahví po 25 ml. Lahve byly následně vysterilizovány a po vychladnutí byly naočkovány 500 μ l bakteriální suspenze kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5. Naočkované lahve byly dány ke kultivaci. Dvě z připravených lahví byly dány ke kultivaci s malou odlišností od ostatních. Nebyly promíchávány na třepačce, ale byly umístěny naležato a jednou denně byly protřepány ručně (přístup kyslíku do tekutiny).

V určitých dnech bylo do lahví s kulturou, kultivovaných za trvalého pohybu, přidáno dané množství sterilního glycerolu a byly zpět dány ke kultivaci (viz schéma – Příloha I). V konkrétních dnech bylo prováděno měření vzorků, jež byly předem centrifugovány (odstranění buněk).

6.3.2 Kultivace *Agrobacterium tumefaciens* FR5 při kontinuálním provzdušňování

200 ml sterilního glycerolového tekutého živného média bylo ve dvou sterilních 700 ml promývačkách s vtavenými fritami naočkováno 200 μ l bakteriální suspenze kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 a bylo dáno ke kultivaci do temna při teplotě 25 °C. Podrobnější popis (viz. kapitola 6.4.4). V určitých časových intervalech bylo asepticky odebíráno cca 13 ml nakultivované suspenze z obou promývaček. Z odebraných vzorků byly odstraněny centrifugací buňky a byla změřena viskozita tekutého živného média.

6.3.3 Posouzení změn viskosity médií po ukončení kultivace

25 ml sterilního glycerolového média ve 250 ml sterilních lahvích bylo naočkováno 20 μ l bakteriální suspenze kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5. Poté byly lahve dány ke kultivaci. Po 7 dnech byl přidán do všech lahví sterilní glycerol (10 g/l, resp. 20 g/l). Po dalších 7 dnech kultivace byly u poloviny vzorků odstraněny centrifugací buňky a takto upravené vzorky byly ve 100 ml sterilních lahvích uchovány následovně: polovina buněčných suspenzí a polovina nebuněčných suspenzí byla dána do temna při teplotě 25 °C, druhé poloviny obou typů suspenzí byly dány do temna při teplotě 5 °C. Ve 14-ti denních časových intervalech byly měřeny uchované vzorky. U vzorků s obsahem buněk byly tyto před měřením odstraněny centrifugací.

6.3.4 Závislost viskozity živného média po kultivaci na pH prostředí

U nakultivované bakteriální suspenze kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v glycerolovém tekutém živném médiu s 5x ředěným fosfátovým pufrům byla změřena viskozita a hodnota pH. Poté byl zbylý objem tekutého živného média rozdělen po cca 13 ml do 4 kádinek, ve kterých bylo následně upraveno pH pomocí 1M NaOH na hodnoty pH = 5, 7, 8, a 10. Takto upravené obsahy kádinek byly ponechány 1,5 hod stát. Po uplynutí nastavené doby byla v jednotlivých kádinkách znovu změřena viskozita..

6.3.5 Kultivace *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v glycerolovém tekutém médiu s různým ředěním fosfátového pufru

Bylo připraveno 5 různých tekutých glycerolových médií, která se lišila v ředění použitého fosfátového pufru. Byly použity pufrů 5x, 2,5x 1,67x 1,25x ředěné a také pufr neředěný. U jednotlivých tekutých médií byla změřena viskozita a pH. Následně byla tekutá média rozplněna po 25 ml do 250 ml lahví a byla dána ke sterilizaci. Vychladlé lahve byly naočkovány 20 μ l bakteriální suspenze kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 a byly dány ke kultivaci. 4. a 7. den kultivace byla u všech vzorků změřena po odstranění buněk centrifugací viskozita a hodnota pH.

6.3.6 Kultivace *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v glycerolovém tekutém médiu s neředěným fosfátovým pufrům a s přísávkou glycerolu

Bylo připraveno glycerolové médium s neředěným fosfátovým pufrům. 250 ml lahve s 25 ml sterilního glycerolového média byly naočkovány 500 μ l bakteriální suspenze kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5. Následovala kultivace a v určitých dnech byl přidáván sterilní glycerol (10 g/l, resp. 20 g/l). V konkrétních časových intervalech byla po odstranění buněk centrifugací měřena viskozita tekutého glycerolového média po kultivaci s kulturou (viz schéma - Příloha II).

6.3.7 Stanovení sušiny a počtu buněk kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 a stanovení sušiny živného média

Stanovení sušiny buněk a vyprodukovaného polymeru

Vzorky suspenze s nakultivovanou kulturou byly zcentrifugovány, supernatant (obsahující polymer) byl opatrně slit do kádinek a z nich byly odebrány cca 2 g do předem vysušených

a zvážených žíhacích kelímků. Odstředěné buňky byly 2x promyty fyziologickým roztokem a byly připraveny suspenze buněk. Z těchto byly odpipetovány 4 ml do předem vysušených a zvážených žíhacích kelímků. Také do dvou kelímků byly odpipetovány 4 ml čistého fyziologického roztoku (pro odečet jeho sušiny). Všechny kelímky byly následně dány na 3 hod do sušárny na 70 °C a po této době byly žíhány při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti.

Sušina buněk je uvedena v jednotkách mg/ml. Sušina média je uvedena v jednotkách mg/g.

Stanovení počtu buněk mikroskopicky

Z připravené promíchané 100x ředěné bakteriální suspenze byly odebrány vzorky a bylo provedeno mikroskopické pozorování buněk na mikroskopickém podložním sklíčku s komůrkami Cyrus II při zvětšení 200x. Buňky byly odečítány z komůrek velikostí 50x50 µm, čemuž odpovídal přepočítávací koeficient (na 1 ml vzorku) 8.000.000.

6.4 Postupy použité při kultivacích bakterií *Rhodococcus erythropolis*

FR7 a *Pseudomonas putida* FR3

6.4.1 Statická kultivace

Připravená a vysterilizovaná agarová půda byla po zchladnutí na 45 °C rozlita po 15 ml do sterilních petriho misek. Ztuhlá půda byla naočkována suspenzí dané kultury tak, že se sterilně na povrch agarové půdy převedlo 20 µl bakteriální suspenze, která byla následně rozetřena sterilní skleněnou hokejkou po celé ploše půdy. Takto naočkované misky byly ponechány 2 hod v aseptickém boxu (předpokládána adheze buněk k agaru). Po uplynutí doby byly misky zality 15 ml sterilního tekutého živného média (ředěného 1:1) stejného složení jako příslušná půda (avšak bez agaru) a byly dány ke kultivaci v klidu do temna při teplotě 25 °C. V den měření se skleněnou hokejkou narostlá kultura spolu s vyprodukovanými ECP rozsuspendovala do celého objemu tekutého média, to bylo opatrně slito a po úpravě objemu na 15 ml následovala centrifugace a měření viskozity. Vždy byla prováděna dvě měření vedle sebe.

6.4.2 Dynamická kultivace

Připravená agarová půda byla před sterilizací rozvařena (zaručení homogenity roztoku) v tlakovém hrnci při 110 °C po dobu 15 min. Homogenní agarová směs byla rozlita

po 30 ml do 500 ml lahví, resp. po 50 ml do 100 ml Erlenmayerových baněk a dána ke sterilizaci do autoklávu. Sterilní lahve, resp. baňky s agarovou půdou byly položeny na 'bok' pro zvětšení plochy povrchu, resp. ponechány stát dokud agarová půda neztuhla. Na ztuhlé půdy bylo naočkováno 20 μ l suspenze dané kultury, rozetřeno skleněnou hokejkou po celém gelovém povrchu a ponecháno kultivovat 2 hod v aseptickém boxu. Po této době byly půdy zality 30 ml, resp. 25 ml sterilního tekutého média (ředěného 1:1) stejného složení jako agarová půda a byly dány ke kultivaci do temna při 25 °C na kruhovou třepačku (80 - 100 ot./min dle velikosti láhví či baněk) v režimu 15:15 (15 min třepání : 15 min klid). V den měření byla skleněnou hokejkou narostená kultura spolu s vyprodukovanými ECP rozsuspendována do celého objemu tekutého média a po úpravě objemu na 30 ml, resp. 25 ml zcentrifugována a změřena viskozita suspenze.

6.4.3 Pozitivní a negativní kontrola

Při statické a dynamické kultivaci byly kromě vzorků měřeny tzv. pozitivní a negativní kontroly.

Pozitivní kontrola

Tato kontrola spočívala v ověření zahušťujících schopností ECP vyprodukovaných danou kulturou. Postup provedení kontroly byl následující:

Misky resp. baňky (lahve) s 15 ml, resp. 30 ml ztuhlé sterilní agarové půdy byly naočkovány 20 μ l bakteriální suspenze, rozetřeny skleněnou hokejkou po celém povrchu živné půdy a byly dány bez zalití tekutým médiem rovnou ke kultivaci v klidu do temna při teplotě 25 °C, resp. do temna při 25 °C na třepačku se 100 ot./min v režimu 15:15. V den měření byly misky, resp. baňky (lahve) zality 15 ml, resp. 30 ml sterilního tekutého živného média (ředěného 1:1) stejného složení jako agarové pevné půdy, skleněnou hokejkou byla narostená kultura s vyprodukovanými ECP rozsuspendována do přidaného tekutého média, opatrně slita do kyvet, zcentrifugována a byla změřena viskozita tekutého média s nakultivovanou kulturou. Měření viskozity bylo prováděno v různých časech s ohledem na růst a chování konkrétní kultury.

Negativní kontrola

Tato kontrola spočívala v ověření, zda se v průběhu kultivace nevyluhovaly do tekutého média z agarové půdy nějaké látky jež se mohly podílet na zahuštění tekutého média. Postup provedení kontroly byl následující:

Misky, resp. baňky (lahve) s 15 ml, resp. 30 ml ztuhlé sterilní agarové půdy nebyly naočkované bakteriální suspenzí, ale byly rovnou zality 15 ml, resp. 30 ml tekutého média (ředěným 1:1) stejného složení jako pevná půda. Následně byly tyto nenačkované zalité misky, resp. baňky (lahve) dány ke kultivaci do temna při teplotě 25 °C, resp. do temna při 25 °C na třepačku se 100 ot./min v režimu 15:15. V den měření byl tekutý obsah misek, resp. baňek (lahví) opatrně přelit do nádobek na měření viskozity a byla změřena jeho viskozita. Měření viskozity bylo prováděno v různých časech.

6.4.4 Kultivace za kontinuálního přívodu vzduchu

Podle typu tekutého živného média bylo naváženo příslušné množství složek, rozpuštěno v 200 ml destilované vody a toto tekuté médium bylo nalito do dvou 700 ml promývaček s vtavenými fritami. Tyto spolu s hadicemi na přívod vzduchu byly vysterilizovány. Po vychladnutí obsahu byl do aparatury přidán sterilní filtr (velikost pórů 0,22 µm) pro zajištění přívodu sterilního vzduchu. Poté bylo tekuté živné médium naočkováno 200 µl příslušné bakteriální suspenze, aparatura byla napojena na akvaristický motorek ELITE 800 zajišťující stálý přívod vzduchu a dána ke kultivaci do temna při 25 °C. Po určité době kultivace bylo z tekutého média s narostlou kulturou sterilně odebíráno cca 13 ml suspenze. Ta byla centrifugována a v supernatantu byla měřena viskozita.

6.4.5 Kultivace kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7

Kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 byla kultivována všemi třemi uvedenými způsoby – statická kultivace, dynamická kultivace a kultivace s kontinuálním provzdušňováním. Byly při nich používány různé typy jak tekutých živných médií tak i pevných agarových půd. Typy kultivací byly použity pro jednotlivé typy půd a médií následovně:

Statická kultivace:

- TYA + 2% sacharosy
- TYA + 2% jantaranu
- oMPA zalitý MPB
- TYA + 2% laktosy

Kontinuální provzdušňování:

- TYA + 2% laktosy
- MPB

Dynamická kultivace:

- TYA + 2% sacharosy (kultivace v 500 ml lahvích na třepačce s 80 ot./min)
- TYA + 2% jantaranu (kultivace v 500 ml na třepačce s 80 ot./min)
- oMPA zalité MPB (kultivace v Erlenmayerových baňkách na třepačce s 90 ot./min)

6.4.6 Kultivace kultury *Pseudomonas putida* FR3

Kultura *Pseudomonas putida* FR3 byla taktéž kultivována všemi třemi způsoby kultivace (statická, dynamická a kontinuální provzdušňování). Tato kultura byla však kultivována jen na dvou typech pevných půd a médií. Byly tedy použity agarové půdy a tekutá média TYA + 2% sacharosy a oMPA zalitý MPB. Kultura byla kultivována na obou půdách a v obou médiích všemi třemi způsoby kultivací. Způsoby kultivace byly prováděny podle postupu uvedeného výše.

III. VÝSLEDKY A DISKUSE

7 POČÁTEČNÍ ORIENTAČNÍ ZKOUŠKY

7.1 Orientační zkoušky růstu a tvorby ECP kulturami

Než byly zahájeny pokusy s kulturami *Pseudomonas putida* FR3, *Rhodococcus erythropolis* FR6, FR7 a *Agrobacterium tumefaciens* FR5, bylo nutné nejprve zjistit, zda-li tyto kultury mají stále schopnost tvorby mukósních ECP na agarových živných médiích jak bylo zjištěno v rámci SVOČ [51]. Neboť kultury byly téměř 2 roky uschovány v hlubokomrazicím boxu při -80 °C.

Všechny kultury byly rozočkovány ze zamrazených vzorků na 4 různé agarové půdy – TYA, TYA+ 2% glycerolu, TYA+ 3% jantaranu a TYA+ 2% sacharosy a v určitých časových intervalech byly odečítány výsledky, tj. byl hodnocen vzhled narostlých kultur, hlavně mukósní charakter kolonií. Zjištěné výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 4.):

Tab. 4. Kultivace kultur na různých typech agarových půd.

Kultura	Typ půdy	Doba kultivace [dny]				
		1	2	3	4	7
FR3	TYA	+	++	+	+	-
	TYA+glycerol	+	+++	+++	++	+
	TYA+jantaran	+	+++	++++	++++	+
	TYA+sacharosa	++	++++	++++	+++	+
FR5	TYA	-	-	-	-	-
	TYA+glycerol	+	++	++	++	++
	TYA+jantaran	-	++	++	++	++
	TYA+sacharosa	+	++	+++	+++	+++
FR6	TYA	+	+	+	+	+
	TYA+glycerol	+ mat	++ mat	++ mat	+++ mat	++ mat
	TYA+jantaran	-	+	+	++	++
	TYA+sacharosa	++	+++	+++	+++	+++
FR7	TYA	-	-	-	-	-
	TYA+glycerol	+ mat	++ mat	++ mat	++ mat	++ mat
	TYA+jantaran	+	+	+	+	+
	TYA+sacharosa	++	+++	+++	+++	+++

Vysvětlivky: + náznak mukósnosti kolonií

++ mukósní kolonie

+++..... výrazně mukósní kolonie

++++..... velmi výrazná mukósnost kolonií

-nemukósní charakter kolonií

mat matný vzhled kolonií na misce

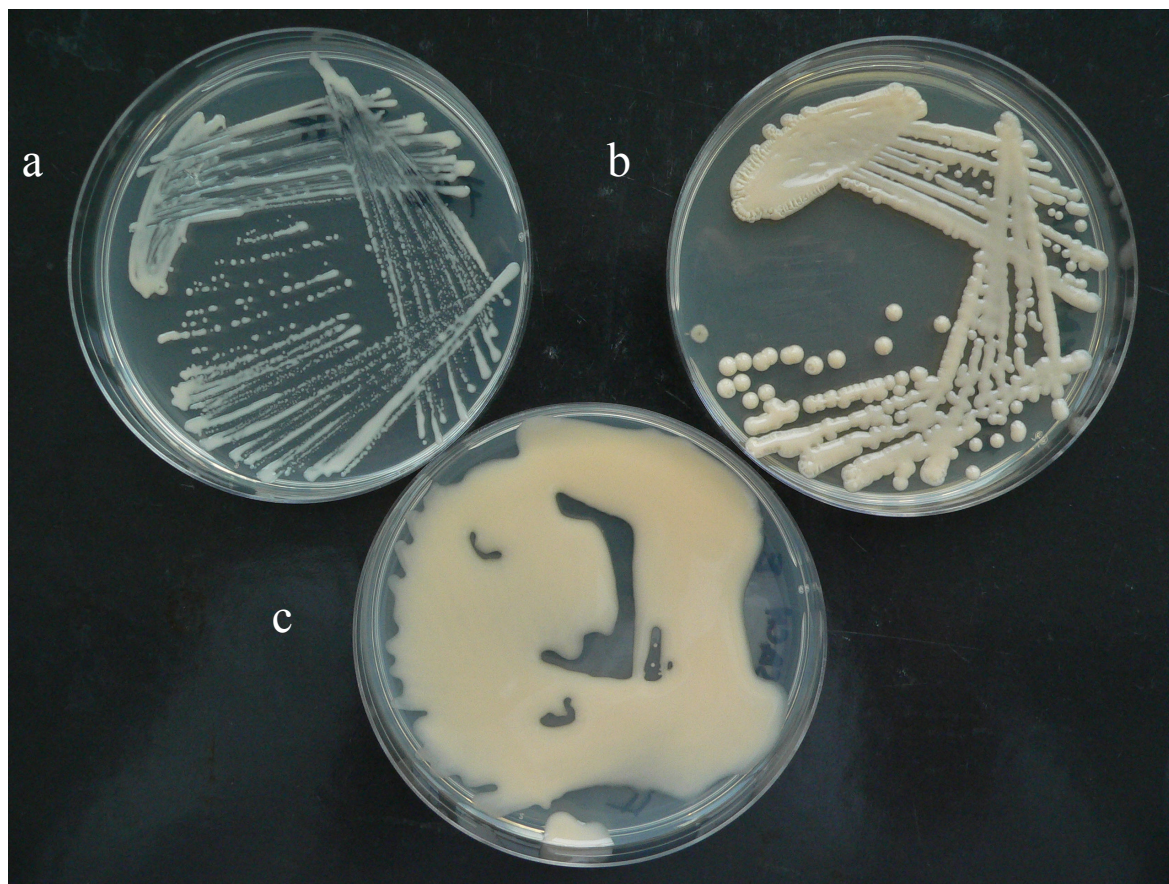
Tučně orámované výsledky v tabulce (Tab. 4.) u jednotlivých kultur značí nejlepší a nejmukósnější charakter kolonií. Obecně lze říci, že všechny sledované kultury si uchovaly i po zamrazení schopnost tvorby ECP na agarových živných médiích. Pro kulturu *Pseudomonas putida* FR3 se ukázala jako nejvhodnější půda TYA+sacharosa a doba kultivace 2 dny, pro *Agrobacterium tumefaciens* FR5 obdobně TYA+sacharosa, ale s dobou kultivace 3-4 dny, kulturám *Rhodococcus erythropolis* FR6 a FR7 nejvíce vyhovoval TYA+sacharosa a doba 4 dny pro FR6 a 3-4 pro FR7. Půda TYA+sacharosa se tak v testu ukázala jako nejvhodnější pro tvorbu kolonií mukósního charakteru u všech kultur.

V průběhu kultivace vytvářely kultury *Rhodococcus erythropolis* FR6 a FR7 na miskách s TYA+glycerol matné kolonie. Na všech ostatních miskách byly kolonie lesklé, stejně jako ve všech případech kultury *Pseudomonas putida* FR3 a *Agrobacterium tumefaciens* FR5. Kultura *Pseudomonas putida* FR3 rostla velice rychle na misce s TYA+Sacharosa, kde již po 1. dnu kultivace porostla polovinu misky a měla mukósní charakter. 2. den kultivace již porostla celou miskou, avšak také začala v oblasti pecky pomalu spotřebovávat vyprodukovaný polymer. Ten postupně spotřebovala všechn jak bylo vidět na misce 7. den kultivace (došlo k vymizení mukósního vzhledu).

Zajímavý jev byl pozorován při kultivaci bakterie *Rhodococcus erythropolis* FR6: 3. den kultivace se na misce s TYA+glycerol objevily 2 formy kultury (drsné a hladké kolonie). Aby bylo potvrzeno, že jde o dvě růstové formy jedné kultury (a nikoliv kontaminace), byla každá z nich přeočkována na nová agarová média TYA a TYA+glycerol a ty byly dány ke kultivaci. Po dvou dnech kultivace bylo zjištěno, že na miskách s TYA+glycerolem vyrostly opět obě dvě formy (drsná i hladká), kdežto na miskách s TYA agarem byly obě kultury hladké. Bylo tedy zřejmé, že jde skutečně o dvě růstové formy téže kultury, pozorovatelné na médiu TYA s glycerolem. Na obyčejném TYA agaru nebyly rozdíly mezi formami viditelné.

Protože kultury *Rhodococcus erythropolis* FR6 a FR7 jsou stejným bakteriálním druhem, bylo dále pracováno jen s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7, právě s ohledem na jistou variabilitu kultury *Rhodococcus erythropolis* FR6.

V uvedeném testu bylo dokázáno, že se změnou prostředí, ve kterém se zkoumané bakterie nachází, dochází i ke změně charakteru kultur – obrazově je tento jev dokumentován na příkladu kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7 rostoucím na různých živných médiích (Obr. 3.).



Obr. 3. Vzhled kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7 na různých typech agarových půd (a – Trypton-yeast extrakt agar (TYA), b - TYA+ 3 % jantaranu, c - TYA+ 2% sacharosy).

7.2 Ověření zahušťujících schopností kultury FR5

V rámci SVOČ [51] bylo zjištěno, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 je schopná zahušťovat tekutá živná média s obsahem manitolu. Nejlepších výsledků dosahovala při kultivaci v tekutém živném médiu Ashbyho agar s dusíkem (AS+N). Zahuštěná tekutá živná média byla měřena na kapilárním Ubelohdeho zřed'ovacím viskozimetru na tehdejšímu ústavu potravinářského inženýrství a chemie (UPICH). Protože byl na Ústav inženýrství ochrany životního prostředí (UIOŽP) pořízen nový vibrační viskozimetr, bylo zapotřebí alespoň částečně srovnat hodnoty naměřené oběma metodami a především bylo zapotřebí zjistit, zda téměř dvouleté zakonzervování kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nezhoršilo její schopnost tvorby ECP zahušťujících tekuté prostředí. Kromě toho byla také použita nová tekutá živná půda již s nesacharidickým substrátem – glycerolem. Jednalo se o první pokusy, zda je kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 schopná zahušťovat tekutá živná média bez přítomnosti sacharidického zdroje.

Výsledky získané z obou různých typů měření ve dvou různých tekutých médiích jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 5, Tab. 6., Tab. 7., Tab. 8., Tab. 9., Tab. 10. a Tab. 11.).

Tab. 5. Doba průtoku tekutého živného média AS+N po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v Ubelohdeho viskozimetru – výsledky ze SVOČ [51].

Doba kultivace [den]	Doba průtoku tekutého živného média AS+N po kultivaci [min]					Průměr [min]	Směrodatná odchylka
0	1,09	1,09	1,10	1,10	1,09	1,09	0,01
2	3,71	3,58	3,73	3,83	3,77	3,72	0,09
4	7,63	7,66	7,57	7,76	7,8	7,68	0,09
6	7,70	7,66	7,66			7,67	0,02
	Čisté médium - AS+N (kontrola)						
0	1,09	1,09	1,10	1,10	1,09	1,09	0,01
2	1,12	1,11	1,10	1,10	1,11	1,11	0,01
4	1,08	1,10	1,09	1,09	1,10	1,09	0,01
6	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	0,00

Tab. 6. Doba průtoku tekutého živného média AS+N po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v Ubelohdeho viskozimetru – nová měření.

Doba kultivace [den]	Doba průtoku tekutého živného média AS+N po kultivaci [min]					Průměr [min]	Směrodatná odchylka
0	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	0,00
2	17,14	17,64	13,86	14,01		15,66	2,01
4	31,87	36,63				34,25	3,37
	Čisté médium - AS+N (kontrola)						
2	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	0,00
4	1,10	1,10	1,10			1,10	0,00

Tab. 7. Doba průtoku tekutého glycerolového živného média po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v Ubelohdeho viskozimetru – nová měření.

Doba kultivace [den]	Doba průtoku tekutého glycerol. živného média po kultivaci [min]					Průměr [min]	Směrodatná odchylka
0	1,18	1,17	1,17	1,18	1,18	1,18	0,01
2	2,31	2,32	2,31	2,16	2,16	2,24	0,08
4	3,70	3,66	4,02	4,11	4,16	3,93	0,23
	Čisté médium - Glycerolové (kontrola)						
2	1,18	1,17	1,17	1,18	1,18	1,18	0,01
4	1,21	1,21	1,21			1,21	0,00

Tabulky (Tab. 5., Tab. 6., Tab. 7.) jsou výsledky z měření viskozit tekutých médií v průběhu kultivace kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 na kapilárním zřed'ovacím viskozimetru. Při porovnání tabulek 5 a 6 (hodnoty získané při měření v rámci SVOČ v roce 2004 a nově naměřené hodnoty), kde jsou výsledky získané z měření viskozit tekutých živných médií AS+N, je vidět, že nové a staré hodnoty jsou značně rozdílné. Výrazně delší průtokové časy získané v „novém“ pokusu svědčily o významně vyšší míře zahuštění tekutého média než v případě experimentu v r. 2004. I když je tento fakt poměrně těžce interpretovatelný, lze toto srovnání uzavřít konstatováním, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 neztratila po dobu zakonzervování své zahušťovací schopnosti, tedy produkovat zahušťující ECP.

V další tabulce (Tab. 7.) jsou hodnoty dob průtoků tekutých živných médií s narostlou kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5, která byla kultivovaná v nově zkoušeném glycerolovém živném médiu. Jak lze vidět, doby průtoku živného média po určité době kultivace a doby průtoku čistého glycerolového živného média (kontrola) jsou odlišné. Vyšší doby průtoku pro živné médium po kultivaci značí, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 má schopnost zahušťovat tekutá média s nesacharidickým substrátem. Hodnoty jsou sice nižší než v případě růstu kultury v médiu s manitolem, ale jsou vyšší než u čistého média.

V následujících tabulkách (Tab. 8. a Tab. 9.) jsou hodnoty viskozity získané již na vibračním viskozimetru. Čímž se mohou srovnat hodnoty získané na kapilárním viskozimetru a na vibračním viskozimetru a je tak možné odhadnout, jaké doby průtoku daných živných médií zhruba odpovídají viskozitě dané suspenze.

Tab. 8. Naměřené hodnoty viskozity tekutého živného média AS+N po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 na vibračním viskozimetru.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média AS+N po kultivaci [mPa.s]				Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0,95	0,94	0,95		0,95	0,01
2	11,00	11,00	7,63	7,59	9,31	1,96
4	15,10	15,20	15,20	15,10	15,15	0,06
Čisté médium - AS+N (kontrola)						
0	0,95	0,94	0,95		0,95	0,01

Tab. 9. Naměřené hodnoty viskozity tekutého glycerolového živného média po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 na vibračním viskozimetru.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého glycerol. živného média po kultivaci [mPa.s]				Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0,99	0,99	0,98		0,99	0,01
2	1,73	1,74	2,12	2,16	1,94	0,23
4	3,61	3,62	3,37	3,46	3,52	0,12
Čisté médium - Glycerolové (kontrola)						
0	0,99	0,99	0,98		0,99	0,01

Tabulky 8 (Tab. 8.) a 9 (Tab. 9.) znázorňují hodnoty viskozit tekutých médií (AS+N a glycerolového živného média) s nakultivovanou kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 získaných již exaktním měřením na vibračním viskozimetru. Výstupy těchto měření jsou nyní v definovaných jednotkách (mPa.s) a je tedy možno srovnávat naměřené výsledky v této práci s výsledky získanými v jiných pracích od různých autorů.

Dále při porovnání tabulek 6 (Tab. 6.) a 8 (Tab. 8.), resp. 7 (Tab. 7.) a 9 (Tab. 9.) je možno do určité míry převést hodnoty viskozit získaných při měření tekutých médií AS+N, resp. glycerolových živných médií s narostenou kulturou na Ubelohdeho viskozimetru (doba průtoku v minutách) na hodnoty viskozit již definovaných jednotek získaných při měření viskozit tekutých médií AS+N, resp. glycerolových médiích s narostenou kulturou na vibračním viskozimetru (mPa.s).

7.3 Vliv přítomnosti buněk na výslednou viskozitu suspenze

Jako další počáteční pokus bylo testování, zda mají buňky přítomné v suspenzi po kultivaci vliv na hodnotu viskozity suspenzí. Nejprve byla po několikadenní kultivaci kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 změřena viskozita tekutého média s buňkami a poté u toho stejného tekutého média s již odstraněnými buňkami centrifugací. V níže uvedených tabulkách (Tab. 10. a Tab. 11.) je srovnání získaných hodnot viskozit u suspenzí s přítomností buněk a bez nich. Měření bylo prováděno u dvou typů tekutých médií.

Tab. 10. Hodnoty viskozit naměřené u vzorků suspenzí tekutého média AS+N s buňkami a bez buněk pro kulturu *Agrobacterium tumefaciens* FR5.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média AS+N po kultivaci [mPa.s]				Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	S buňkami					
2	11,00	11,00	7,63	7,59	9,31	1,96
4	15,10	15,20	15,20	15,10	15,15	0,06
	Bez buněk					
2	9,59	9,59	7,56	7,53	8,57	1,18
4	15,50	15,50	15,90	15,70	15,65	0,19

Tab. 11. Hodnoty viskozit naměřené u vzorků suspenzí glycerolového tekutého média s buňkami a bez buněk pro kulturu *Agrobacterium tumefaciens* FR5.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého glycerol. živného média po kultivaci [mPa.s]				Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	S buňkami					
4	3,61	3,62	3,37	3,46	3,52	0,12
	Bez buněk					
4	3,75	3,73	3,50	3,51	3,62	0,14

Jak je vidět z tabulek (Tab. 10. a Tab. 11) hodnoty viskozit suspenzí před a po odstranění buněk jsou téměř shodné u obou typů živných půd, s jednou výjimkou, průměrná viskozita tekutého média AS+N 2. den kultivace kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 je pro suspenzi s buňkami 9,31 mPa.s a po odstranění buněk 8,57 mPa.s (Tab. 10.). Lze tedy říci, že přítomnost buněk neovlivňuje zásadním způsobem výslednou viskozitu měřené suspenze. I přes všechna tato zjištění byly v průběhu všech dalších experimentů buňky ze suspenzí odstraňovány.

8 POKUSY S KULTUROU *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* FR5

Cílem prováděných pokusů s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 bylo zjistit, zda je tato kultura schopná zahušťovat tekuté živná médium nesacharidického složení. V rámci SVOČ [51] bylo zjištěno, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 jako jediná dokáže zahušťovat tekutá média, avšak obsahující sacharidy či mannitol jako zdroj uhlíku a energie. Tato schopnost byla také potvrzena při počátečních zkouškách (viz kap.7.2), kdy bylo zkoumáno, zda kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 neztratila v průběhu zakonzervování své zahušťující schopnosti. Současně s tekutou půdou AS+N obsahující mannitol bylo též použito nové tekuté médium s již nesacharidickým složením a to s glycerolem. Výsledky z kultivace kultury v tekuté půdě nesacharidického složení ukázaly, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 je schopná mírně zahušťovat glycerolová tekutá média. S tímto médiem bylo tedy dále pracováno a dále se hledal způsob kultivace, při kterém by kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 byla schopná výrazně zahušťovat tekuté glycerolové médium bez gelového podkladu.

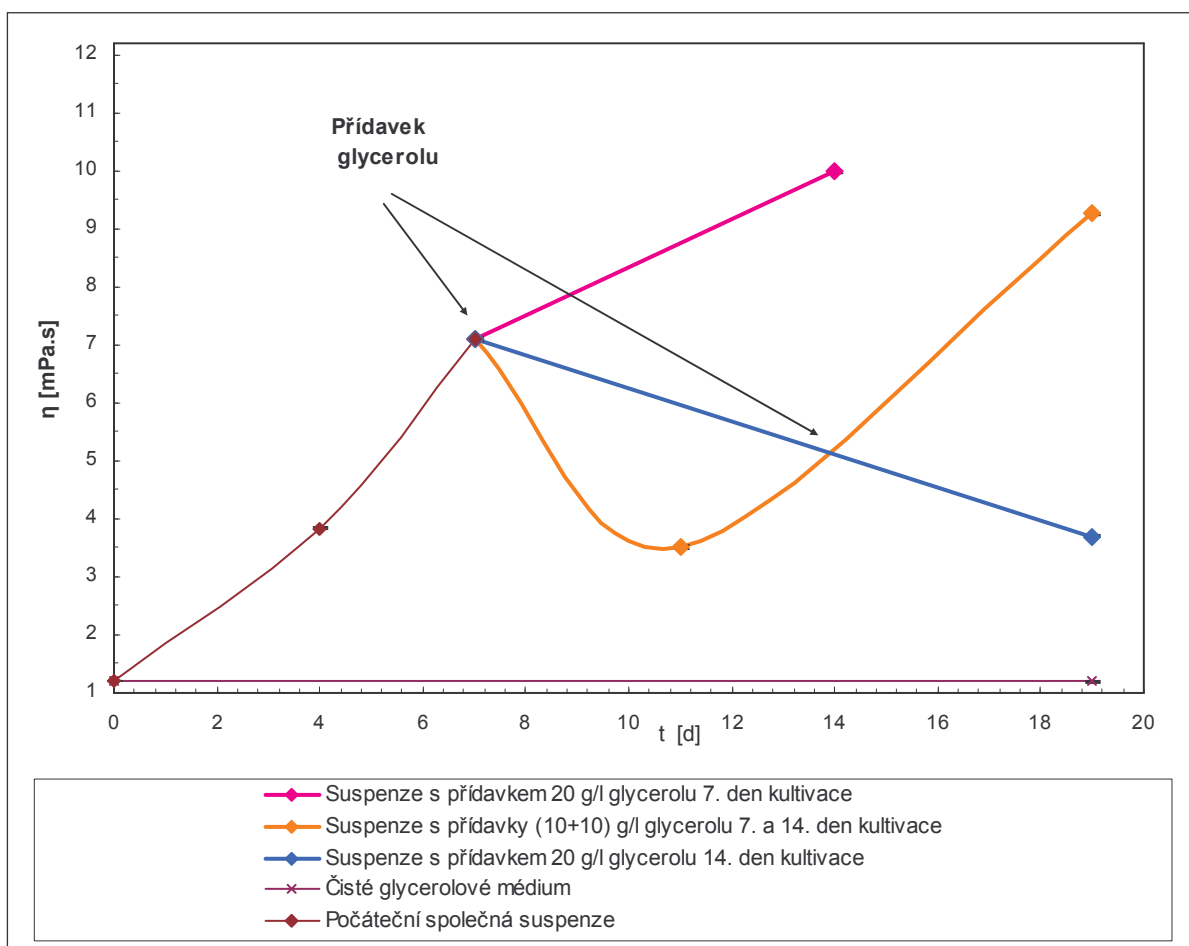
8.1 Výsledky kultivace kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v glycerolovém médiu s přísávkou glycerolu v průběhu kultivace

Jako první pokus prováděný s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 byla kultivace kultury v tekutém glycerolovém médiu s 5x ředěným pufrem a s přísávkou glycerolu. Kultivace probíhala jen v tekutém živném médiu s 2% glycerolu a bez pevného agarového podkladu. Na počátku byla kultura naočkována do lahví a dána ke kultivaci na třepačku do temna. 7. a 14. den kultivace byl do některých lahví přidán sterilní glycerol v různém množství (10 g/l, 20 g/l) a lahve byly opět dány ke kultivaci (viz Příloha I). Výsledky kultivace kultury s přísávkou glycerolu jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 12.) a na následujícím grafu (Obr. 4.).

U tohoto pokusu byly kromě již zmíněných lahví kultivovaných v pohybu také kultivovány dvě lahve, které však nebyly v pohybu, ale ležely v klidu. Byly stejně nachystány a naočkovány jako ostatní, jen se lišily stylem kultivace a byly bez dodatečného přísávku glycerolu. Viskozita těchto lahví byla měřena 9. den kultivace.

Tab. 12. Hodnoty viskozit tekutého glycerolového média s i bez přídavků glycerolu po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5.

Doba kultivace [dny]	Přídavek glycerolu [g/l]	Viskozita tekutého glycerol. živného média po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	-	1,01	1,01	1,01				1,01	0,00
4	-	3,64	3,60	3,62	3,66	3,66	3,63	3,64	0,02
7	-	6,90	6,86	6,92				6,89	0,03
11	10	3,21	3,20	3,21	3,43	3,41	3,42	3,31	0,12
14	20	10,10	10,10	10,10	9,50	9,45	9,43	9,78	0,35
19	10+10	9,10	9,05	9,02				9,06	0,04
19	0+20	3,63	3,62	3,61	3,40	3,34	3,40	3,50	0,13
Čisté médium - glycerolové (kontrola)									
0	-	1,01	1,01	1,01				1,01	0,00
19	-	1,00	0,99	0,99				0,99	0,01



Obr. 4. Závislost viskozity tekutého glycerolového živného média po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 na čase.

Jednotlivé křivky v grafu (Obr. 4.) znázorňují viskozity tekutých glycerolových médií s různými přídávky glycerolu. 7. den kultivace dosahovaly hodnoty viskozit necelých 7 mPa.s a tento den byl do lahví přidán sterilní glycerol v množství 10 g/l, resp. 20 g/l. Dvě lahve však zůstaly bez přídávky glycerolu, ten se pak dodal až 14. den kultivace. Průběh této kultivace znázorňuje modrá křivka. Ta ukazuje, že viskozita tekutého média byla nejvyšší 7. den kultivace a pak již jen klesala. Novému růstu viskozity již nepomohl ani dodatečný přírůstek glycerolu onoho 14. dne kultivace. I po přídávce viskozita klesla a 19. den kultivace dosahovala hodnoty 3,50 mPa.s. Byl-li 7. den kultivace přidán glycerol v množství 20 g/l (růžová křivka) viskozita tekutého média vzrostla a 14. den kultivace dosahovala hodnoty 9,78 mPa.s. Byl-li 7. den kultivace přidán glycerol jen v množství 10 g/l (oranžová křivka), viskozita tekutého média klesla na hodnotu 3,31 mPa.s 11. den kultivace. Poté začala mírně stoupat a po opětovném přídávce 10 g/l glycerolu 14. den kultivace viskozita média vystoupala na hodnotu 9,06 mPa.s.

9. den kultivace byly změřeny dva vzorky z kultivace v klidu. K těmto vzorkům nebyl přidáván glycerol. Z hodnoty viskozity ($2,36 \text{ mPa.s} \pm 0,3$), které tekuté médium dosahovalo onen 9. den je zřejmé, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 při kultivaci v klidu vytváří podstatně menší množství zahušťujících ECP.

Z uvedených výsledků tedy vyplývá, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 dokáže zahušťovat tekutá živná média nesacharidického složení, míra zahuštění je výrazně vyšší při kultivaci za pohybu a při určitých způsobech přísunu zdroje uhlíku dochází k navýšování viskozity média i při prodloužené kultivaci. Nejvýraznějšího zahuštění, s hodnotou viskozity 9,78 mPa.s po 14-ti denní kultivaci, bylo dosaženo při kultivaci v pohybu a při přídávce 20 g/l glycerolu 7. den kultivace

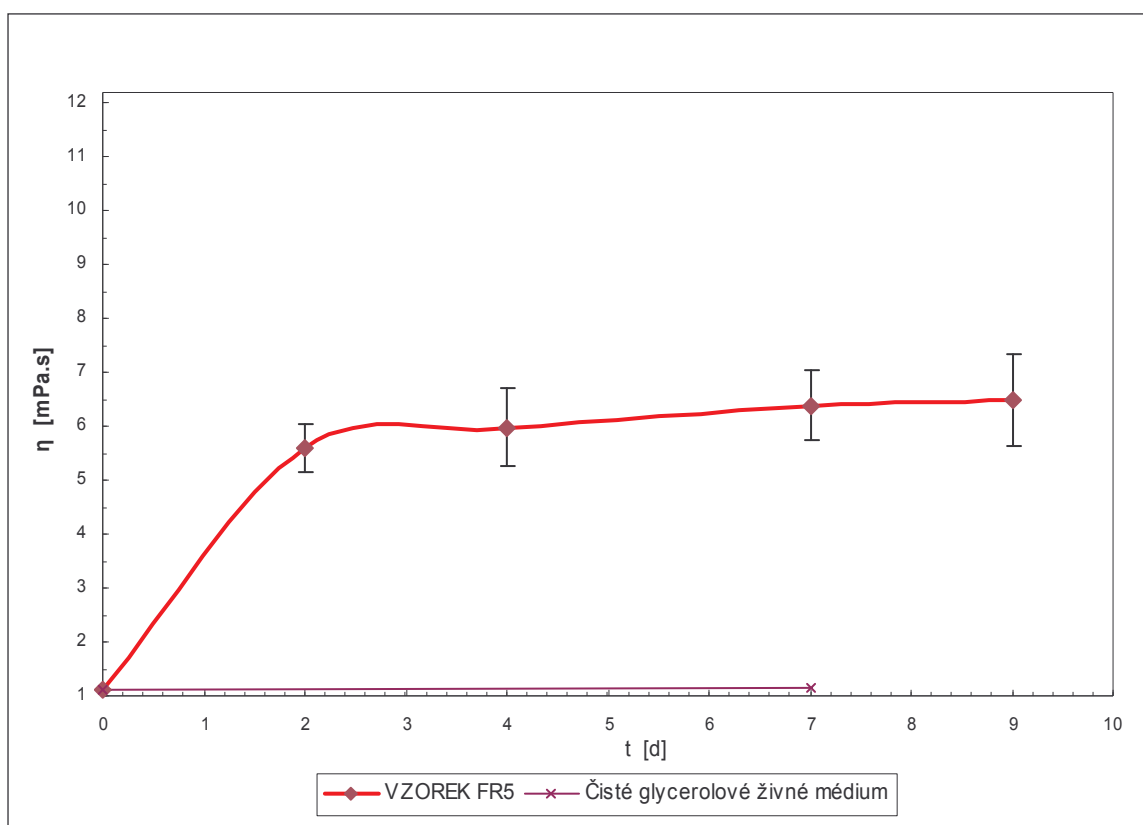
8.2 Výsledky kultivace *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v glycerolovém médiu při kontinuálním provzdušňování

V předešlém pokusu bylo zjištěno, že pro produkci polymerů zahušťujících tekuté glycerolové médium vyžaduje kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 pohyb a tím tedy neustálý přísun kyslíku do celého objemu. Byl tedy proveden nový pokus, kdy byla kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 kultivována ve dvou lahvích v tekutém glycerolovém médiu s 5x ředěným pufrem za neustálého přísunu vzduchu. Obsah lahví (naočkované tekuté médi-

um) byl neustále provzdušňován sterilním vzduchem ve formě jemných bublin. Výsledky získané z této kultivace jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 13.) a grafu (Obr. 5.).

Tab. 13. Hodnoty viskozit tekutého glycerolového média po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 při kontinuálním provzdušňování.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého glycerol. živného média po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0,91	0,90	0,90				0,90	0,01
2	5,01	5,00	4,94	5,81	5,82	5,82	5,40	0,46
4	5,15	5,11	5,10	6,50	6,45	6,40	5,79	0,73
7	5,62	5,56	5,60	6,81	6,76	6,75	6,18	0,65
9	5,53	5,51	5,48	7,05	7,06	7,07	6,28	0,85
Čisté médium - Glycerolové (kontrola)								
0	0,91	0,90	0,90				0,90	0,01
7	0,95	0,96	0,96				0,96	0,01



Obr. 5. Závislost viskozity tekutého glycerolového média po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 při kontinuálním provzdušňování na čase.

Tabulka (Tab. 13.) i graf (Obr. 5.) ukazují nárůst viskozit s nejvyšší hodnotou 6,28 mPa.s 9. den kultivace. Tyto hodnoty ale nejsou tak vysoké jako tomu bylo v předešlém pokusu - kultivace kultury v pohybu s přísávkou glycerolu. Křivka závislosti viskozity tekutého média na čase při kontinuálním provzdušňování naznačuje strmý nárůst viskozity v prvních 2 dnech kultivace a po dosažení hodnoty 5,40 mPa.s se již viskozita média 4.den nemění tak výrazně. Tento den byl také proveden nový přísávek sterilního glycerolu v množství 20 g/l, který však už nevedl k dalšímu výraznějšímu zahuštění média.

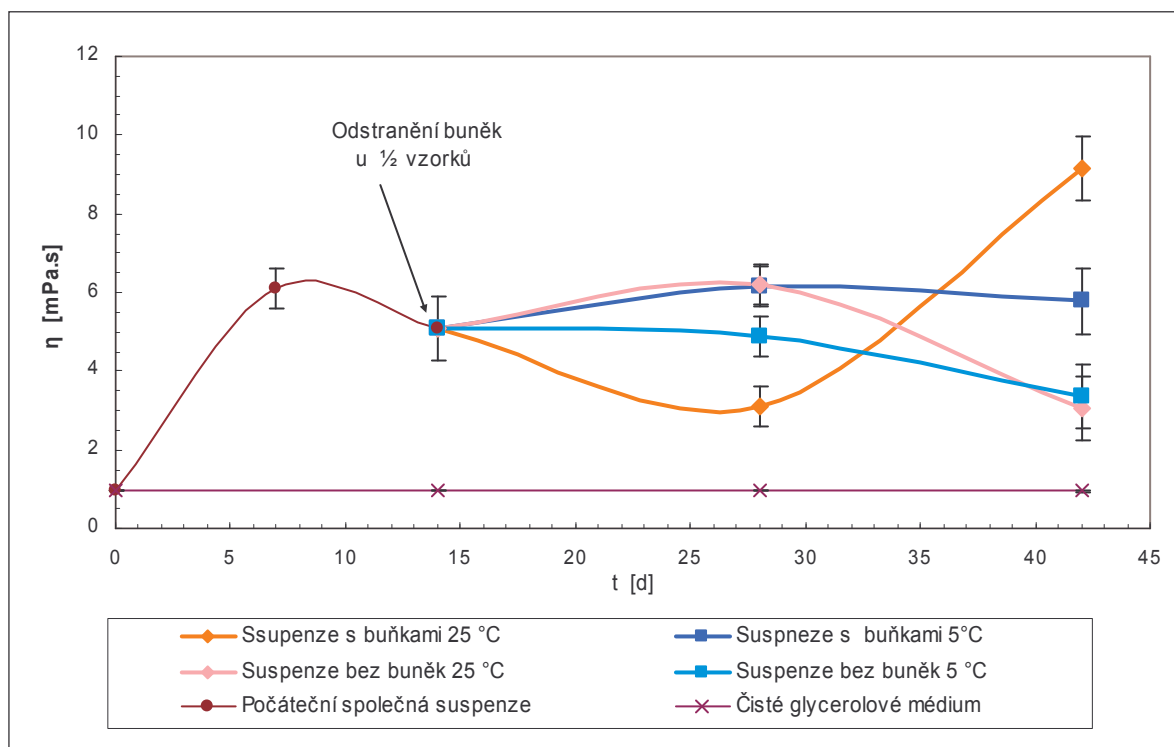
Z výsledků lze říci, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 kultivovaná v tekutém živném médiu s 2% glycerolu za stálého přívodu vzduchu produkuje polymery zahušťující ne-sacharidové tekuté médium rychleji než při kultivaci na třepačce. Ve srovnání s předchozím pokusem však byly absolutní hodnoty viskozit poněkud nižší.

8.3 Posouzení změn viskozity tekutého média po ukončení kultivace s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5

Jako další pokus prováděný s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 byl zaměřen na zjištění, zda se viskozita tekutého média v průběhu jeho uchování zvyšuje či nějak mění. V první části zkoumání byla kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 kultivována klasicky v tekutém živném médiu s 2% glycerolu a s 5x ředěným fosfátovým pufrem na třepačce ve tmě a při teplotě 25 °C (připravena série láhví). Druhá část nastala 14. den, kdy byly u poloviny vzorků s nakultivovanou kulturou odstraněny buňky centrifugací. Poté byla sledována viskozita u dvou typů vzorků: u buněčných tekutých médií a u nebuněčných tekutých médií. Uchování bylo dvojí: při dvou různých teplotách 5°C a 25 °C. Výsledky získané z tohoto pokusu ukazují tabulka (Tab. 14.) a graf (Obr. 6.).

Tab. 14. Hodnoty viskozit buněčných i nebuněčných suspenzí tekutých médií po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého glycerol. živného média po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	VZOREK FR5 - počáteční							
0	0,95	0,96	0,96				0,96	0,01
7	6,53	6,58	6,60	5,65	5,66	5,61	6,11	0,51
14	5,80	5,83	5,90	4,47	4,33	4,25	5,10	0,82
	Vzorek suspenze S BUNĀKAMI 25 °C							
28	3,13	3,12	3,11	3,12	3,10	3,12	3,12	0,01
42	10,30	10,30	10,30	8,09	7,98	7,85	9,14	1,28
	Vzorek suspenze S BUNĀKAMI 5 °C							
28	6,97	6,95	6,98	5,33	5,33	5,34	6,15	0,89
42	7,96	7,89	7,90	3,74	3,63	3,55	5,78	2,34
	Vzorek suspenze BEZ BUNĀK 25 °C							
28	7,95	7,94	7,94	4,56	4,46	4,30	6,19	1,92
42	3,00	3,00	3,01	3,09	3,10	3,10	3,05	0,05
	Vzorek suspenze BEZ BUNĀK 5 °C							
28	6,29	6,28	6,28	3,52	3,53	3,51	4,90	1,51
42	3,41	3,39	3,38	3,32	3,30	3,28	3,35	0,05
	Čisté médium - Glycerolové (kontrola)							
0	0,95	0,96	0,96				0,96	0,01
14	0,95	0,95	0,94				0,95	0,01
28	0,96	0,95	0,96				0,96	0,01
42	0,95	0,95	0,93				0,94	0,01



Obr. 6. Závislost viskozity buněčné a nebuněčné suspenze tekutého média s 2% glycerolu po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 na čase.

Jednotlivé křivky v grafu (Obr. 6.) znázorňují různé suspenze uchované při teplotě 5 °C nebo 25 °C. Suspenze (buněčná i nebuněčná) uchované při 5 °C (dvě modré křivky) mají stejný charakter, i když se od sebe liší hodnotami viskozit suspenzí. Kdežto suspenze (buněčná a nebuněčná) uchované při 25 °C (oranžová a růžová křivka) mají odlišný průběh.

Při prohlédnutí si charakterů jednotlivých křivek je možné říci, že viskozity suspenzí bez buněk nerostou či klesají (při 25 °C i 5 °C), obdobně jako buněčná suspenze uchovaná při 5 °C. Pouze u vzorků obsahující buňky došlo při uchování po určité fázi poklesu k opětovnému nárůstu viskozity média.

8.4 Závislost viskozity živného média po ukončení kultivace s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 na pH prostředí

Tento pokus se prováděl ve vzorku s již vyprodukovanými polymery kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v návaznosti na již ukončený pokus kultivace kultury s kontinuálním provzdušňováním. V tomto pokusu bylo zjišťováno, zda se při změně pH prostředí (tekutého glycerolového média), ve kterém se vyprodukované ECP nacházejí, změní i jeho viskozita.

23. den kultivace kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v tekutém glycerolovém médiu s 5x ředěným fosfátovým pufrem při kontinuálním provzdušňování byla po odstranění buněk změřena hodnota viskozity tohoto tekutého média a poté bylo změřeno jeho pH, jehož hodnota byla pH = 4,65. Tekuté médium pak bylo rozděleno na 4 části a pomocí 1M NaOH se upravilo pH na vyšší hodnoty (pH = 5, 7, 8, 10). Po 1,5 hod stání se viskozity opět změřily. Výsledky získané měřením jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 15.).

Tab. 15. Hodnoty viskozit tekutého glycerolového média po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 a po úpravě pH.

pH média [-]	Viskozita tekutého glycerolového média [mPa.s]			Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
4,65 (výchozí)	7,06	7,04	7,00	7,03	0,03
5,05	7,10	7,11	7,09	7,10	0,01
7,10	5,59	5,72	5,84	5,72	0,13
8,00	4,56	5,04	5,21	4,94	0,34
9,55	5,94	5,99	6,02	5,98	0,04

Z předložené tabulky lze vidět, že se změnou pH se také změnila viskozita tekutého média. Počáteční viskozita tekutého média 7,03 mPa.s po 1,5 hod se úpravou na pH 5 změnila jen nepatrně, avšak při úpravě pH na 7,10 se snížila na hodnotu 5,72 mPa.s. Další pokles byl zaznamenán při úpravě na pH 8, ale při dalším zvyšování alkality došlo k mírnému zpětnému nárůstu viskozity. Pokus lze tedy uzavřít tvrzením, že změna pH prostředí se poněkud nepravidelně podepisuje na viskozitě média s obsahem ECP.

8.5 Výsledky kultivace *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v glycerolovém médiu s různě ředěným pufrem

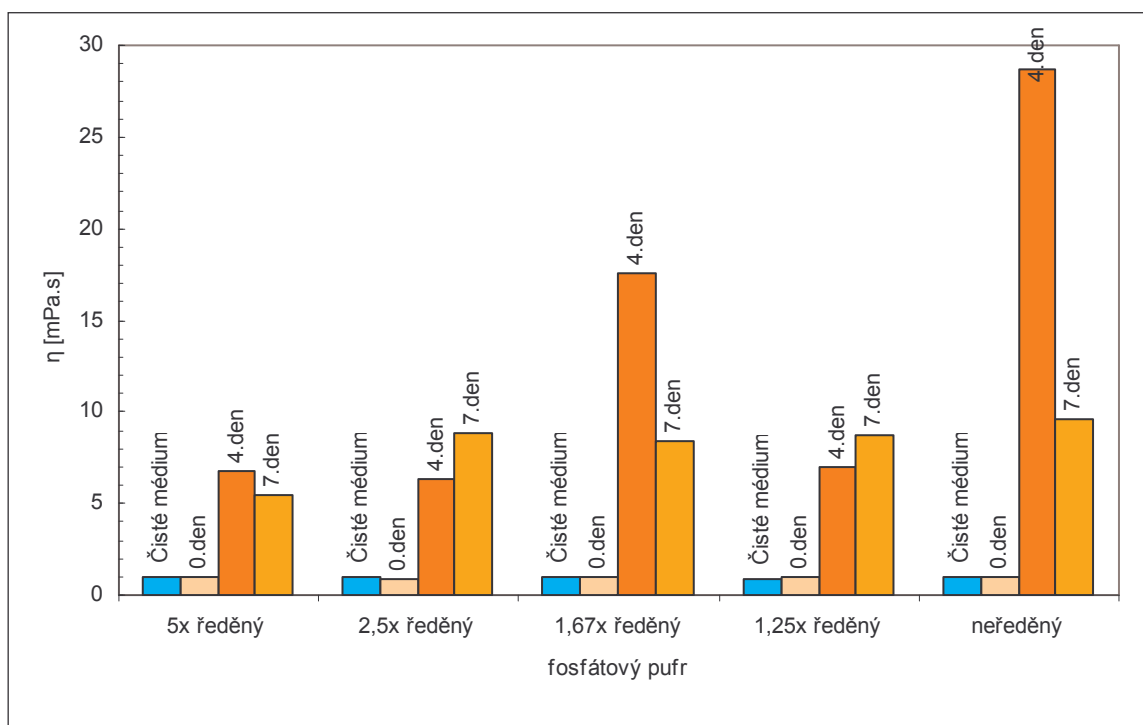
Protože bylo v předešlém pokusu zjištěno, že pH prostředí, ve kterém je kultivovaná kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 je 4,65 a mělo by být 7,5 (jako na počátku) byl proveden další pokus. V něm bylo připraveno několik tekutých glycerolových médií s různě ředěným fosfátovým pufrem, aby se zjistilo, který z nich dokáže udržet stále stejnou hodnotu pH, tedy cca 7,5. V závislosti na pufru byla také sledována viskozita tekutého média. Výsledky měření pH a viskozit tekutých půd jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 16. a Tab. 17.) a závislost viskozity různě pufrovaného glycerolového média po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 na čase uvádí obrázek Obr. 7.

Tab. 16. Naměřené hodnoty pH pro tekutá glycerolová média s pufrů různě ředěnými.

Typ fosfátového pufru	0. den kultivace	4. den kultivace	7. den kultivace
	pH [-]		
5x ředěný	7,35	4,62	4,45
2,5x ředěný	7,45	5,95	4,95
1,67x ředěný	7,45	6,40	6,02
1,25x ředěný	7,50	6,70	6,42
neředěný	7,55	6,88	6,54

Tab. 17. Hodnoty viskozit tekutých různě pufrovaných glycerolových médií po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5.

Doba kultivace [dny]	Viskozita tekutého glycerolového média po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	5x ředěný fosfátový pufr							
0	0,96	0,95	0,94				0,95	0,01
4	6,15	6,38	6,50	7,14	7,28	7,44	6,82	0,54
7	5,42	5,52	5,58	5,27	5,30	5,38	5,41	0,12
7 (Čisté médium)	0,95	0,95	0,94				0,95	0,01
	2,5x ředěný fosfátový pufr							
0	0,92	0,93	0,93				0,93	0,01
4	7,02	7,03	7,37	5,52	5,54	5,59	6,34	0,88
7	9,44	9,55	9,70	7,93	8,06	8,17	8,81	0,83
7 (Čisté médium)	0,92	0,92	0,93				0,92	0,01
	1,67x ředěný fosfátový pufr							
0	0,98	0,98	0,97				0,98	0,01
4	16,50	16,90	17,20	18,10	18,30	18,50	17,58	0,83
7	7,56	7,58	7,62	9,19	9,18	9,12	8,38	0,86
7 (Čisté médium)	0,94	0,95	0,95				0,95	0,01
	1,25x ředěný fosfátový pufr							
0	0,97	0,98	0,98				0,98	0,01
4	7,03	7,31	7,47	6,67	6,64	6,76	6,98	0,35
7	8,46	8,60	8,72	8,84	8,96	9,03	8,77	0,22
7 (Čisté médium)	0,96	0,95	0,95				0,95	0,01
	neředěný fosfátový pufr							
0	0,96	0,96	0,95				0,96	0,01
4	28,90	29,00	29,10	28,00	28,40	29,00	28,73	0,44
7	8,85	8,94	9,00	10,10	10,40	10,60	9,65	0,80
7 (Čisté médium)	1,00	1,00	0,99				1,00	0,01



Obr. 7. Závislost tekutého glycerolového média s různě ředěným pufrům po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 na čase.

Jak je patrné z tabulky Tab. 16. nejlepší pufrací schopnost má pufr neředěný, během kultivace kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 u něj hodnota pH klesla ze 7,5 na necelých 7 (6,88) 4. den kultivace a 6,54 7. den kultivace. V ostatních případech byla hodnota pH tekutého média ještě nižší. Nejhorší pufrací schopnost měl pufr ředěný 5x, u kterého klesla hodnota pH po 4 dnech kultivace až na 4,62. Také lze z tabulky vypožorovat, že nejvyšší změna hodnoty pH je v prvních 4 dnech kultivace, poté již pokles hodnot pH není tolik výrazný.

Také v případě měření viskozity tekutých médií s různě silnými pufrými se ukázal neředěný pufr jako nejlepší. Tekutá glycerolová média s neředěným pufrém vykazovala hodnotu viskozity po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 4. den kultivace až 28,73 mPa.s. Také tekuté médium s pufrém 1,67x ředěným mělo viskozitu vysokou - 17,58 mPa.s 4. den kultivace. Tekuté půdy s ostatními ředěnými pufrými měly hodnoty viskozity 4. den kultivace velice blízké, necelých 7 mPa.s.

7. den kultivace hodnoty viskozity u všech typů tekutých médií klesly na hodnotu kolem 9 mPa.s až na jednu výjimku, tu tvořilo tekuté médium s 5x ředěným pufrém, zde byla hodnota viskozity tekuté půdy ještě nižší, 5,41 mPa.s.

Z prováděného testu vyšla jako nejlepší tekutá půda s neředěným pufrém a jako nejhorší tekutá půda s 5x ředěným pufrém. Další testy s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 byly tedy prováděny v glycerolovém tekutém médiu obsahující neředěný fosfátový pufr.

8.6 Výsledky kultivace *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v glycerolovém médiu s neředěným pufrém s přídatky glycerolu v průběhu kultivace

V předešlém pokusu bylo zjištěno, že nejlepších výsledků viskozit tekutých médií bylo dosaženo při použití neředěného pufru. Byl tedy znovu zopakován pokus prováděný na počátku: kultivace kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v tekutém glycerolovém médiu s přídatky glycerolu, ale nyní již s pufrém neředěným.

Bylo tedy naočkováno několik lahví suspenzí kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 a tyto byly dány při 25 °C ke kultivaci do temna na třepačku. 4. den kultivace byl do některých lahví přidán sterilní glycerol v množství 10 g/l, resp. 20 g/l. a množství 20 g/l bylo ještě jednou přidáno 11. den kultivace do lahví s dřívějším přídatkem 20 g/l glycerolu (viz. Příloha II).

Po určitých dnech se měřila viskozita tekutých médií. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 18).

Tab. 18. Hodnoty viskozit tekutých glycerolových živných médií s neředěným pufrem po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5.

Doba kultivace [dny]	Přídavek glycerolu [g/l]	Viskozita tekutého glycerol. média po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0	0,94	0,94	0,94				0,94	0,00
4	0	23,40	23,70	23,80	14,00	14,20	14,20	18,88	5,21
8	10	22,00	22,00	21,90	7,88	7,90	7,88	14,93	7,71
8	20	36,60	36,70	36,90	7,12	7,11	7,10	21,92	16,23
11	10	7,27	7,27	7,36	43,90	43,90	44,00	25,62	20,06
11	20	30,40	30,90	31,20	7,59	7,58	7,58	19,21	12,74
14	20+20	7,89	7,92	7,99	44,30	44,80	45,20	26,35	20,18
Čisté médium - glycerolové (kontrola)									
0	-	0,94	0,94	0,94				0,94	0,00
8	-	0,94	0,95	0,95				0,95	0,01
11	-	1,00	1,00	1,00				1,00	0,00
14	-	0,94	0,95	0,95				0,95	0,01

Při měření jednoho typu vzorku byla vždy měřena tekutá média ze 2 paralelních lahví (měření 3x). V tabulce (Tab. 18.) jde vidět, že již 4. den kultivace byly hodnoty viskozit tekutého média po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 ze dvou lahví (paralelně měřených) značně rozdílné (23,63 mPa.s a 14,13 mPa.s). I další dny kultivace tomu nebylo jinak, např. 8. den kultivace s přídavkem 10 g/l glycerolu byly hodnoty viskozit tekuté půdy v jedné lahvi téměř trojnásobné (22 mPa.s) než v druhé (7,88 mPa.s). V jiných případech byly rozdíly ještě větší.

Z důvodu rozdílných hodnot dvou vzorků suspenzí stejně naočkovaných a inkubovaných, byl pokus proveden znovu s kulturou čerstvě vyočkovanou ze zakonzervovaného vzorku v hlubokomrazícím boxu (při neustálém přeočkovávání kultury v předchozích pokusech z jedné půdy na druhou mohlo dojít k jejím změnám), navíc byly u všech variant kultivací s přídavky glycerolu provedeny nejméně 4 paralelní stanovení. Nové výsledky s čerstvě vyočkovanou kulturou jsou uvedeny v tabulce Tab. 19.

Tab. 19. Hodnoty viskozit tekutých glycerolových živných médií s neředěným pufrem po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 – nová měření.

Doba kultivace [dny]	Přídavek glycerolu [g/l]	Viskozita tekutého glycerol. média po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0	0,96	0,95	0,96				0,96	0,01
4	0	9,05	9,07	9,10	6,16	6,19	6,21	7,63	1,58
7	10	8,70	8,76	8,80	9,20	9,21	9,20	8,98	0,25
	10	20,20	20,40	20,60	8,76	8,79	8,80	14,59	6,36
7	20	8,68	8,71	8,76	30,40	30,30	30,40	19,54	11,86
	20	6,49	6,50	6,51	13,90	14,20	14,30	10,32	4,18
	20	5,92	5,90	5,94	32,80	32,80	32,90	19,38	14,74
		Čisté médium - Glycerolové (kontrola)							
0	-	0,96	0,95	0,96				0,96	0,01
7	-	0,95	0,96	0,96				0,96	0,01

Při zopakování pokusu s čerstvě vyočkovanou kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 byly výsledky podobné jako v předešlém případě. Výrazné rozdíly viskozit tekutých médií po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v paralelních lahvích se vyskytovaly již v počátcích kultivace, ještě výraznější rozdíl byl patrný 7. den. Zde bylo měřeno již více vzorků tekutých médií z paralelních lahví. Pro tekuté půdy s přídavkem 10 g/l glycerolu byly měřeny 4 vzorky, kde jeden z nich vykazovala dvojnásobně vysoké hodnoty viskozit (20,4 mPa.s) než u ostatních třech vzorků (8,76 – 9,21 mPa.s). Pro tekuté půdy s přídavkem 20 g/l glycerolu bylo měřeno 6 vzorků, kde bylo zjištěno velmi široké rozmezí hodnot viskozit od 6 mPa.s až po 33 mPa.s. Protože byly pozorovány takové rozdílné hodnoty viskozit tekutých médií v paralelních vzorcích, bylo 7. den kultivace z těchto vzorků vyočkováno malé množství suspenze na dva typy pevných půd (oMPA a TYA se 2% sacharosy) pro kontrolu čistoty přítomné bakteriální suspenze. Po dvou dnech kultivace pevných půd ve tmě při teplotě 25 °C byly zjištěny následující výsledky: všechny kultury byly na obou půdách mikrobiologicky čisté a všechny kolonie byly až na drobné výjimky (větší kolonie buněk na konci roztěru) vzhledově stejné.

Jelikož bylo do všech lahví dáno stejné množství tekutého živného média o stejném složení a tato média byla naočkována stejným množstvím stejné bakteriální suspenze (stejný pracovní postup pro všechny vzorky) a protože dodatečně vyočkovaná bakteriální suspenze z jednotlivých lahví byly čisté, byl pokus opět opakován. Při tomto opakování pokusu se vyloučila kontaminace lahví cizorodými látkami (lahve byly velmi důkladně mechanicky i chemicky promyty) a příprava tekutého média byla provedena pečlivěji (veškeré nerozpuštěné drobné částice v připravovaném tekutém médiu byly rozpuštěny v horké vodní lázni).

Rozplnění homogenního tekutého glycerolového média, jeho sterilizace a následné naočkování bakteriální suspenzí kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 (použito inokulum z předchozího pokusu, ze vzorku s vysokou hodnotou viskozity média) bylo provedeno stejně jako v předešlých dvou případech přípravy. Takto připravené lahve byly dány ke kultivaci a 4. den byl přidán glycerol v množství 20 g/l. 4. a 7. den bylo provedeno měření viskozity tekutého média, výsledky jsou uvedeny v následující tabulce Tab. 20.

Tab. 20. Hodnoty viskozit tekutého glycerolového média s neředěným pufrem po kultivaci s kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 – poslední měření.

Doba kultivace [dny]	Přídavek glycerolu [g/l]	Viskozita tekutého glycerol. média po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0	0,98	1,00	0,99				0,99	0,01
4	0	7,60	7,61	7,60	7,00	7,01	6,99	7,30	0,33
	0	7,73	7,72	7,72	7,29	7,30	7,28	7,51	0,24
7	20	26,90	26,90	27,00	10,30	10,40	10,50	18,67	9,06
	20	8,99	8,96	9,00	9,38	9,39	9,40	9,19	0,22
Čisté médium - Glycerolové (kontrola)									
0	-	0,98	1,00	0,99				0,99	0,01
7	-	0,99	0,98	0,99				0,99	0,01

Při tomto měření byly měřeny vždy 4 stejné (paralelní) vzorky tekutých médií. 4. den kultivace ukázaly všechny 4 vzorky tekutých médií přibližně stejnou hodnotu viskozity 7,0 - 7,7 mPa.s, avšak 7. den kultivace byly opět vidět rozdílné hodnoty viskozit tekutých glycerolových médií u paralelních vzorků - 3 vzorky ze čtyř jsou si hodnotami viskozit relativně podobné (8,98 mPa.s, 9,39 mPa.s a 10,4 mPa.s), čtvrtý vzorek suspenze měl viskozitu 26,93 mPa.s.

I v tomto posledním případě byl pracovní postup proveden správně a i přes pečlivější přípravu médií byly hodnoty viskozit pro jednotlivé paralelní vzorky rozdílné. Možným vysvětlením by tak mohla být jen variabilita kmene *Agrobacterium tumefaciens* FR5, která je případně geneticky podmíněná. I přes tuto velkou rozdílnost hodnot viskozit tekutých médií (paralelních vzorků), je možné vypořádat stále se opakující jev společný pro všechna prováděná měření 7. den kultivace - přítomnost minimálně jednoho vzorku s velmi vysokou hodnotou viskozity (min 20 mPa.s, maximálně až nad 44 mPa.s). Je tedy zřejmé, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 dokáže za jistých okolností výrazně zahustit tekutá média bez přítomnosti sacharidů.

Protože byla zjištěna i při posledním měření u jednoho vzorku (ze čtyř) velmi vysoká hodnota viskozity, bylo provedeno ve všech čtyřech paralelních vzorcích stanovení: sušiny buněk, počtu buněk a sušinymédia. Zjištěné výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 21. a Tab. 22.).

Tab. 21. Odečtené množství počtu buněk zjištěné mikroskopickým pozorováním.

Číslo vzorku kultury FR5	Počet buněk v komůrce velikosti 50x50 μm [-]					Průměr [mPa.s]	Počet buněk v 1 ml suspenze	Směrodatná odchylka
1	14	15	14	17	14	14,80	$11,84 \cdot 10^9$	1,30
2	12	11	10	12	10	11,00	$8,8 \cdot 10^9$	1,00
3	11	11	13	12	13	12,00	$9,6 \cdot 10^9$	1,00
4	13	13	12	12	12	12,40	$9,9 \cdot 10^9$	0,55

Tab. 22. Naměřené hodnoty sušiny buněk a média po kultivaci *Agrobacterium tumefaciens* FR5.

Číslo vzorku kultury FR5	Sušina buněk [mg/ml]	Sušina média [mg/g]
1	2,8335	47,18
2	2,4735	45,06
3	N	48,63
4	1,936	48,04

N nestanoveno

Číslo vzorku 1 (v tabulkách Tab. 21. a Tab. 22.) odpovídá vzorku suspenze s nejvyšší hodnotou viskozity (26,9 mPa.s). Ostatní vzorky (2-4) měly přibližně stejnou viskozitu (viz Tab. 20.). Tabulka Tab. 21. naznačuje, že počet buněk v nejhustší suspenzi byl o něco vyšší než u ostatních vzorků i sušina buněk vzorku 1 byla největší. Rozdíl však byl malý a je diskutabilní, zda by mohl být důvodem vyšší viskozity média. Odporuje tomu i stanovení sušiny médií jednotlivých vzorků, kde nebyly zaznamenány rozdíly. Ani v tomto pokusu se tak nepodařilo vysvětlit rozdíl mezi paralelními vzorky a z časových důvodů již nebylo možno uspořádat rozsáhlejší pokusy s velkým počtem paralelních vzorků, které by tento problém objasnily.

9 POKUSY S KULTUROU *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* FR7

Hlavním úkolem u kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7 bylo zjistit, zda-li je vůbec schopná a za jakých podmínek zahušťovat tekutá živná média. V rámci SVOČ [51] bylo zjištěno, že bakterie *Rhodococcus erythropolis* FR7 tvoří na agarových pevných půdách silně mukósní kolonie. Tato schopnost byla také potvrzena při orientačních testech v této práci (viz. kapitola 7.1), zejména na živné půdě TYA + 2% sacharosy.

Byly tedy simulovány různé podmínky kultivace (statická, dynamická, kontinuální provozování) v různých typech půd a byla sledována viskozita suspenze v různých časových intervalech.

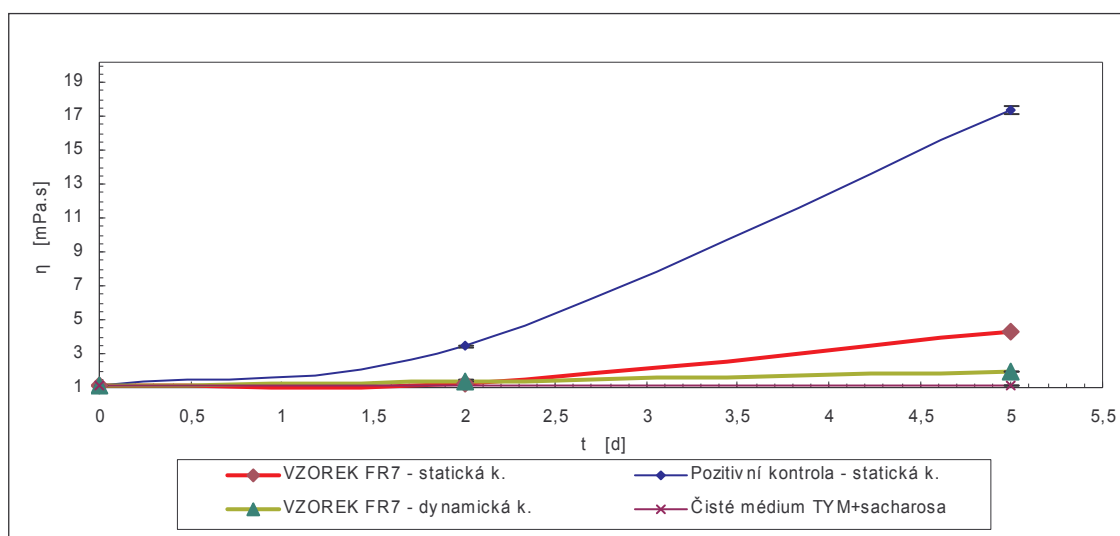
9.1 Výsledky kultivace *Rhodococcus erythropolis* FR7 v tekutém trypton-yeast médiu se 2 % sacharosy

Kultivace kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7 v tekutém trypton-yeast médiu (TYM) se sacharosou byla dvojí: statická a dynamická. Jak sám název napovídá rozdíl je ve stylu kultivace, statická kultivace – v klidu na miskách se zalitou agarovou půdou, dynamická – v pohybu v lahvích, na zalitých agarových půdách.

Po naočkování agarů kulturou a jejich zalití tekutým živným médiem byly v určitých časových intervalech měřeny viskozity suspenzí. Spolu se vzorky bylo také prováděno měření tzv. pozitivních kontrol, které spočívaly v kultivaci kultury na nezalitem agarovém médiu a suspendací narostené biomasy (včetně vyprodukovaných polymerů) v tekutém médiu bezprostředně před měřením. Cílem této kontroly byl průkaz, že ECP vytvořené kulturou jsou opravdu schopné zahušťovat tekutá média. Jako slepý pokus zde bylo používáno čisté živné médium. Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v následující tabulce (Tab. 23.), průběh viskozity v čase znázorňuje následující obrázek (Obr. 8.).

Tab. 23. Hodnoty viskozit trypton-yeast média s 2% sacharosy po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 -statická a dynamická kultivace.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média TYM+sacharosa po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	VZOREK FR7 - statická kultivace							
0	0,96	0,94	0,96				0,95	0,01
2	1,06	1,06	1,06	1,08	1,08	1,07	1,07	0,01
5	4,05	4,06	4,02	4,18	4,17	4,18	4,11	0,07
	POZITIVNÍ KONTROLA - statická kultivace							
0	0,96	0,94	0,96				0,95	0,01
2	3,24	3,29	3,2	3,18	3,28	3,3	3,25	0,05
5	17	17	16,9	17,4	17,2	17,5	17,17	0,24
	VZOREK FR7 - dynamická kultivace							
0	0,96	0,94	0,96				0,95	0,01
2	1,22	1,21	1,21	1,22	1,21	1,2	1,21	0,01
5	1,73	1,74	1,75	1,82	1,81	1,81	1,78	0,01
	Čisté médium - TYM se sacharosou (kontrola)							
0	0,96	0,94	0,96				0,95	0,01
5	0,97	0,97	0,97				0,97	0,00



Obr. 8. Graf průběhu změny viskozit trypton-yeast suspenze s 2% sacharosy po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 v čase (statická a dynamická kultivace).

Z grafu (Obr. 8.) je patrné, že suspenze kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7 kultivovaná na TYA+sacharosa při statické kultivaci (červená křivka) dosáhla vyšších hodnot viskozit, než při dynamické kultivaci (zelená křivka). Nejvyšší hodnota viskozity zahuštěného tekutého média po kultivaci byla 4,11 mPa 5. den kultivace u statické kultivace. Pokud však byla kultura kultivována na pevném médiu bez převrstvení tekutinou (pozitivní kontrola, modrá

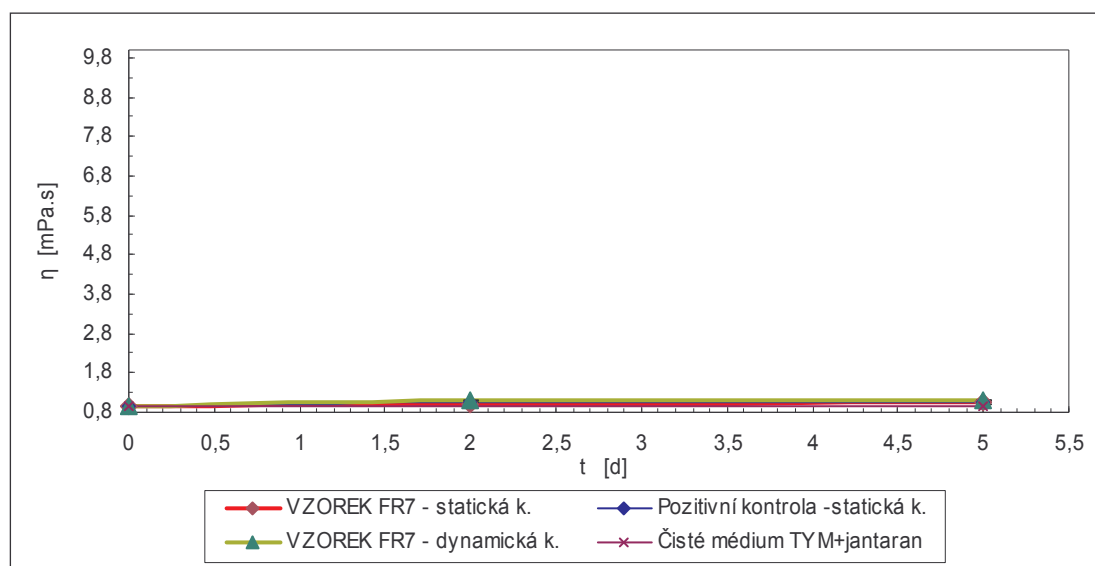
křivka), byly vyprodukované polymery schopny zahustit dodatečně přidanou tekutinu až na hodnotu viskozity 17,17 mPa.s. Je tedy zřejmé, že kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 kultivovaná v TYM se sacharosou potřebuje pro tvorbu zahušťujících ECP kromě gelového podkladu nepřetržitý kontakt se vzdušnou fází a je-li kultura při kultivaci překryta vrstvou tekutiny není hodnota viskozity tohoto tekutého média natolik vysoká, aby bylo možno říci, že kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 je schopná zahušťovat tekutá Trypton-yeast živná média se sacharosou, ve kterých sama roste. Při dynamické kultivaci byla tvorba ECP téměř inhibována, hodnoty viskozit byly oproti statické kultivaci poloviční, je tedy zřejmé, že kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 tento způsob dynamické kultivace v tekutém trypton-yeast médiu se sacharosou pro produkci zahušťujících ECP nevyhovuje.

9.2 Výsledky kultivace *Rhodococcus erythropolis* FR7 v tekutém trypton-yeast médiu se 2 % jantaranu

Jako další typ půdy pro kultivaci bakterie *Rhodococcus erythropolis* FR7 bylo použito TYM s jantaranem coby nesacharidická živná půda. Způsob kultivace byl stejný jako u předešlé půdy TYM+sacharosa. Byla porovnávána statická a dynamická kultivace, tedy kultivace na miskách a v lahvích se zalitou pevnou půdou. Taktéž byla měřena pozitivní kontrola a čisté tekuté živné médium. Z toho pokusu byly získány následující výsledky (Tab. 24., Obr. 9.).

Tab. 24. Hodnoty viskozity trypton-yeast suspenze s 2% jantaranu po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 - statická i dynamická kultivace.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média TYM+jantaran po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	VZOREK FR7 - statická kultivace							
0	0,96	0,95	0,95				0,95	0,01
2	1,01	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,01
5	1,01	1,02	1,02	1,04	1,05	1,05	1,03	0,02
	POZITIVNÍ KONTROLA - statická kultivace							
0	0,96	0,95	0,95				0,95	0,01
2	1,03	1,03	1,04	1,04	1,05	1,03	1,04	0,01
5	1,08	1,07	1,07	1,06	1,07	1,07	1,07	0,01
	VZOREK FR7 - dynamická kultivace							
0	0,96	0,95	0,95				0,95	0,01
2	1,10	1,09	1,10	1,07	1,08	1,07	1,09	0,01
5	1,08	1,09	1,09	1,10	1,13	1,13	1,10	0,02
	Čisté médium - TYM + jantaran (kontrola)							
0	0,96	0,95	0,95				0,95	0,01
5	0,96	0,96	0,95				0,96	0,01



Obr. 9. Graf průběhu změny viskozity suspenze TYM se 2% jantaranu po kultivaci s *Rhodococcus erythropolis* FR7 v čase (statická a dynamická kultivace)

Graf (Obr. 9.) a výsledky v tabulce Tab. 24. jasně ukazují velmi nízké hodnoty viskozity tekutých médií kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7. Ty se pohybují kolem 1 mPa.s, což jsou hodnoty srovnatelné s hodnotami pro čisté nenačkované živné médium a to ve všech případech, tj. pro vzorek při statické kultivaci, při dynamické kultivaci a i pro pozitivní kontrolu. Již nízká hodnota pozitivní kontroly naznačuje, že kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 kultivovaná v TYM s jantaranem není schopna vůbec produkovat ECP zahušťující tekutá média.

9.3 Výsledky kultivace *Rhodococcus erythropolis* FR7 na půdě oMPA zalité MPB

V tomto testu byla kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 kultivovaná na obohaceném masopeptonovém agaru (oMPA) zalitém masopeptonovým bujónem (MPB). Taktéž jako ve dvou předešlých pokusech byla prováděna statická i dynamická kultivace. U těchto kultivací byla nově provedena tzv. negativní kontrola, která spočívala v „kultivaci“ nenačkované zalité pevné půdy. Tato kontrola dokazovala, že samotný agar se nijak nepodílel na zahušťování tekutého média.

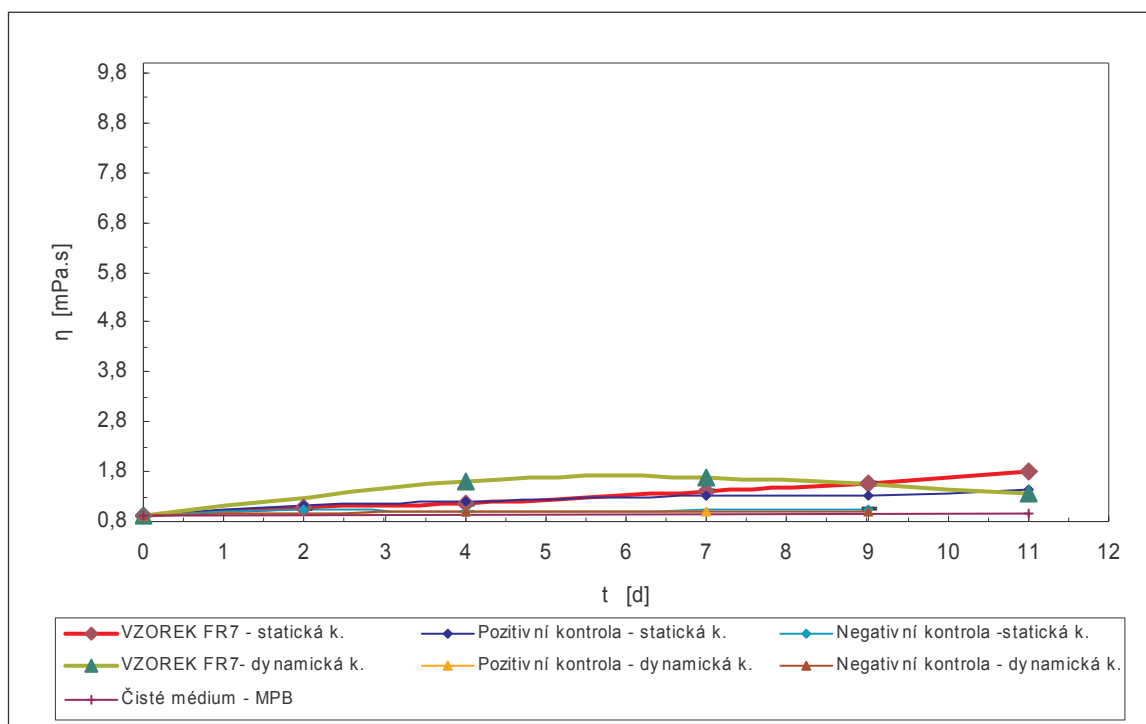
Při kultivaci kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7 v tekutém médiu MPB byl navíc proveden nový způsob kultivace, a to kultivace za stálého provzdušňování. Bylo připraveno sterilní neředěné tekuté živné médium MPB v promývačkách obsahující vtavenou fritu rozloženou po celém jejich dnu naočkováno kulturou a bylo dáno ke kultivaci do temna při 25 °C. Do těchto lahví byl stále přiváděn sterilní vzduch, který byl přítomnou fritou rozměňován na velmi jemné bublinky procházející celým objemem naočkovaného živného média. Získané výsledky ze všech tří způsobů kultivací jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 25., Tab. 26., Tab. 27.) a jejich závislost na čase naznačují grafy (Obr. 10.)

Tab. 25. Hodnoty viskozit suspenzí MPB po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 - statická kultivace.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média MPB po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka	
	VZOREK FR7 - statická kultivace								
0	0,94	0,94	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,01	
2	1,07	1,08	1,08	1,07	1,08	1,07	1,08	0,01	
4	1,14	1,15	1,14	1,16	1,14	1,14	1,15	0,01	
7	1,38	1,39	1,40	1,42	1,42	1,43	1,41	0,02	
9	1,53	1,51	1,51	1,60	1,59	1,60	1,56	0,04	
11	1,82	1,81	1,81				1,81	0,01	
	POZITIVNÍ KONTROLA - statická kultivace								
0	0,94	0,94	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,01	
2	1,11	1,10	1,10	1,14	1,14	1,14	1,12	0,02	
4	1,25	1,24	1,25	1,16	1,16	1,15	1,20	0,05	
7	1,28	1,29	1,28	1,33	1,33	1,34	1,31	0,03	
9	1,28	1,28	1,27	1,36	1,36	1,34	1,32	0,04	
11	1,48	1,47	1,48	1,41	1,42	1,41	1,45	0,04	
	NEGATIVNÍ KONTROLA- statická kultivace								
0	0,94	0,94	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,01	
2	1,03	1,03	1,04	1,05	1,04	1,04	1,04	0,01	
4	1,00	1,00	1,00	1,01	1,02	1,01	1,01	0,00	
9	1,05	1,02	1,05	1,05	1,06	1,05	1,05	0,02	
	Čisté médium - MPB (kontrola)								
0	0,94	0,94	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,01	
11	0,96	0,96	0,95	0,94	0,93	0,93	0,95	0,01	

Tab. 26. Hodnoty viskozit tekutých médií MPB po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 - dynamická kultivace.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média MPB po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	VZOREK FR7- dynamická kultivace							
0	0,94	0,94	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,01
4	1,60	1,59	1,59	1,60	1,60	1,62	1,60	0,01
7	1,68	1,69	1,69	1,69	1,70	1,70	1,69	0,01
11	1,34	1,36	1,36	1,34	1,35	1,37	1,35	0,01
POZITIVNÍ KONTROLA - dynamická kultivace								
0	0,94	0,94	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,01
4	1,60	1,62	1,63	1,59	1,57	1,58	1,60	0,02
7	2,24	2,25	2,22	2,40	2,39	2,41	2,32	0,09
NEGATIVNÍ KONTROLA - dynamická kultivace								
0	0,94	0,94	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,01
4	0,98	0,98	0,98	1,02	1,02	1,01	1,00	0,02
9	1,03	1,01	1,01	1,02	1,01	1,01	1,02	0,01
Čisté médium - MPB (kontrola)								
0	0,94	0,94	0,93	0,92	0,93	0,93	0,93	0,01
11	0,96	0,96	0,95	0,94	0,93	0,93	0,95	0,01



Obr. 10. Graf průběhu hodnot viskozit suspenzí MPB po kultivaci s *Rhodococcus erythropolis* FR7 na oMPA v čase (statická a dynamická kultivace).

Změny viskozit tekutých živných médií MPB ze zalitých misek s oMPA v průběhu kultivace kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7 znázorňuje Obr. 10. Je zde vidět srovnání statické

(červená křivka) a dynamické kultivace (zelená křivka). Při dynamické kultivaci je pozorován nepatrný nárůst viskozity tekutého média na počátku a po 9. dnu kultivace je již náznak mírného poklesu. U statické kultivace je sice průběh křivky trochu odlišný, hodnoty viskozit mírně stoupají po celou dobu kultivace již od počátku, avšak je možno říci, že způsob kultivace nemá přílišný vliv na výslednou viskozitu tekutého média, neboť nejvyšší hodnota viskozity při statické kultivaci je 1,81 mPa.s 11. den kultivace a při dynamické 1,69 mPa.s 7. den kultivace. Tyto dvě čísla jsou si velmi blízká a jsou z absolutního pohledu velmi nízká, čímž dokazují to, že kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 není schopná zahušťovat tekutý MPB. Toto potvrzuje i pozitivní kontrola s nejvyšší viskozitou tekutého média 2,32 mPa.s při dynamické kultivaci.

Protože výsledky ze statické a dynamické kultivace neukázaly na významnější schopnost tvorby ECP za daných podmínek, byl proveden pokus s jiným způsobem kultivace, tzv. kultivace s kontinuálním provzdušňováním. Zde bakterie neměly žádný gelový podklad, byly kultivovány čistě jen v tekutém médiu MPB, který byl neustále silně provzdušňován sterilním vzduchem. Hodnoty viskozit suspenzí médií MPB s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 získané měřením jsou znázorněny v následující tabulce (Tab. 27.).

Tab. 27. Hodnoty viskozit pro tekuté médium MPB po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 při kontinuálním provzdušňování.

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média MPB po kultivaci [mPa.s]			Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0,96	0,95	0,96	0,96	0,01
2	1,03	1,06	1,04	1,04	0,02
4	1,09	1,08	1,09	1,09	0,01
7	1,15	1,14	1,14	1,14	0,01
Čisté médium - MPB (kontrola)					
0	0,96	0,95	0,96	0,96	0,01
7	0,96	0,98	0,97	0,97	0,01

Podobné hodnoty průměrných viskozit pro tekutá živné médium MPB po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 (Tab. 28.) jasně dokazují, že se v průběhu kultivace viskozita tekutého média prakticky nezměnila. Všechny její hodnoty se pohybovaly kolem 1 mPa.s, stejně jako kontrola, tedy čisté živné médium. Při porovnání výsledku z kultivace statické, dynamické a s kontinuálním provzdušňováním, vyznívá poslední zmi-

ňovaný druh jako nejhorší způsob kultivace z pohledu zahuštění tekutých médií kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7.

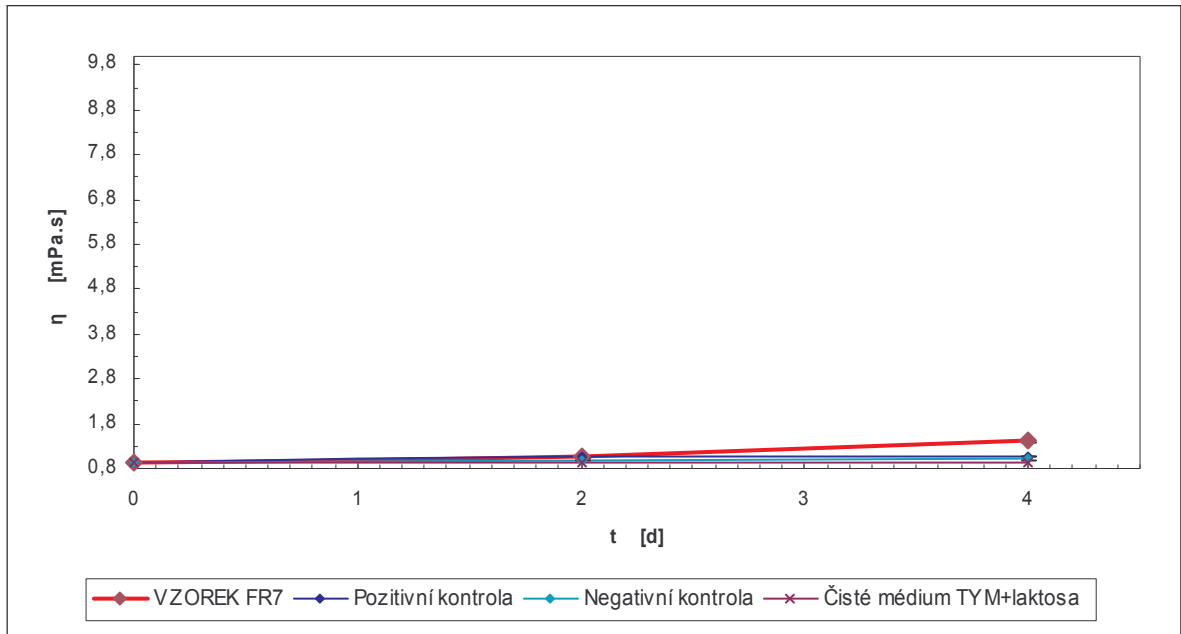
Jako možný závěr z těchto měření lze uvést, že bakterie *Rhodococcus erythropolis* FR7 není schopná zahušťovat tekuté médium MPB v žádném ze zkoušených typů kultivací a pro tvorbu zahušťujících ECP potřebuje gelový podklad a stálý přístup ke vzdušné fázi.

9.4 Výsledky kultivace *Rhodococcus erythropolis* FR7 v tekutém trypton-yeast médiu se 2 % laktosy

Poslední pokus prováděný s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 byl prováděn v tekuté půdě TYM+ 2% laktosy. V tomto případě byla prováděna pouze statická kultivace (misky se zalitou agarovou půdou) a kultivace s kontinuálním provzdušňováním. Výsledky získané v tomto pokusu jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 28, Tab. 29.) a na následujících obrázcích (Obr. 11., Obr. 12.).

Tab. 28. Hodnoty viskozit suspenze TYM+ 2% laktosy po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 – statická kultivace.

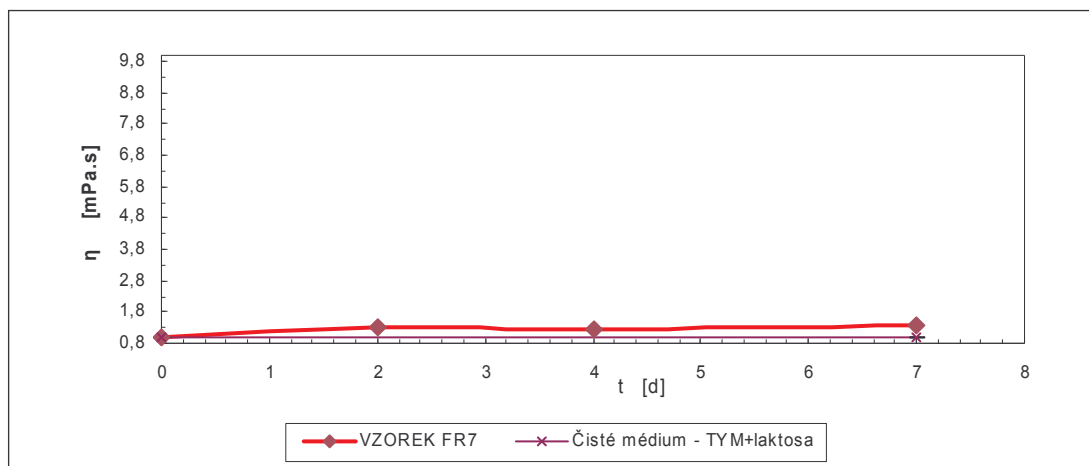
Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média TYM+laktosa po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	VZOREK FR7 - statická kultivace							
0	0,93	0,94	0,93				0,93	0,01
2	1,05	1,06	1,05	1,06	1,06	1,05	1,06	0,01
4	1,40	1,40	1,40	1,46	1,42	1,44	1,42	0,03
	POZITIVNÍ KONTROLA - statická kultivace							
0	0,93	0,94	0,93				0,93	0,01
2	1,05	1,06	1,04	1,05	1,04	1,04	1,05	0,01
4	1,06	1,05	1,05	1,06	1,05	1,06	1,06	0,01
	NEGATIVNÍ KONTROLA- statická kultivace							
0	0,93	0,94	0,93				0,93	0,01
2	0,98	0,98	0,99	0,94	0,97	0,96	0,97	0,01
4	1,02	1,00	1,01	1,02	1,01	1,00	1,01	0,01
	Čisté médium - TYM + laktosa (kontrola)							
0	0,93	0,94	0,93				0,93	0,01
2	0,94	0,93	0,93				0,93	0,01
4	0,92	0,92	0,93				0,92	0,01



Obr. 11. Graf průběhu viskozity suspenze TYM+2 % laktosy po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 v čase (statická kultivace).

Tab. 29. Hodnoty viskozity tekutého živného média TYM+ 2% laktosy po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 – kontinuální provzdušňování .

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média TYM+laktosa po kultivaci [mPa.s]			Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0,98	0,98	0,97	0,98	0,01
2	1,30	1,28	1,30	1,29	0,01
4	1,26	1,26	1,27	1,26	0,01
7	1,40	1,39	1,40	1,40	0,01
Čisté médium - TYM+laktosa (kontrola)					
0	0,98	0,98	0,97	0,98	0,01
7	0,97	0,97	0,98	0,97	0,01



Obr. 12. Graf průběhu viskozity suspenze TYM+ 2% laktosy po kultivaci s kulturou *Rhodococcus erythropolis* FR7 při kontinuálním provzdušňování v čase.

Jak ukazují oba grafy, statická kultivace (Obr. 11.) a kontinuální provzdušňování (Obr. 12.) nedokázala kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 ani v tomto případě zahušťovat tekutá živná média. Zde se také hodnoty viskozit pohybovaly těsně nad 1 mPa.s, což je viskozita čistého nenačkovaného živného média. Kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 tedy není schopna zahušťovat tekuté médium TYM+laktosa.

Souhrnně lze ke kultuře *Rhodococcus erythropolis* FR7 říci, že její schopnost zahušťovat tekutá živná média se neprokázala. Nejvyšší viskozitu měla kultura při statické kultivaci v TYM+sacharosa 4,11 mPa.s, i pozitivní kontrola zde měla nejvyšší hodnotu až 17,17 mPa.s. Při kultivaci na jiných zalitých agarových živných půdách ať již při kultivaci v klidu či v pohybu, nebo při kultivaci v tekutých půdách bez pevného podkladu za stálého přístupu vzduchu byla naměřena viskozita suspenze vždy kolem 1 mPa.s, což je hodnota čistého živného média. Jen v ojedinělých případech (na oMPA zalitý MPB – statická i dynamická kultivace) se viskozita vyšplhala na 2 mPa.s. Tyto hodnoty však nejsou natolik vysoké, aby se dalo říci, že kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 výrazně zahušťuje tekutá živná média. Ani viskozity pozitivních kontrol u jednotlivých typů pevných médií nebyly vysoké, s výjimkou půdy TYM se sacharosou. Nízké hodnoty viskozit u ostatních pozitivních kontrol svědčí o neschopnosti polymerů vyprodukovaných kulturou kultivovanou na nezalitých agarových půdách dodatečně zahušťovat tekutá média. Ze získaných výsledků je tedy možné říci, že pro tvorbu zahušťujících ECP potřebuje kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 sacharidový substrát a neustálý kontakt se vzdušnou fází.

10 POKUSY S KULTUROU *PSEUDOMONAS PUTIDA* FR3

S kulturou *Pseudomonas putida* FR3 byly prováděny různé testy ze stejných důvodů a se stejným cílem jako tomu bylo u kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7. Podstatou prováděných testů bylo zjistit, zda kultura dokáže zahušťovat tekutá živná média jednak s obsahem sacharidů jako zdrojem uhlíku, jednak i média nesacharidická. V rámci SVOČ [51] v roce 2004 bylo zjištěno, že kultura *Pseudomonas putida* FR3 tvoří na pevných agarových půdách (zejména oMPA) silně mukósní kolonie. Toto zjištění bylo rozšířeno při počátečním testování kultur (viz. kapitola 7.1). Nejvíce mukósní kolonie vytvářela kultura na pevné půdě TYA se sacharosou a to již 2. den kultivace. V testech se tedy zkoumalo, zda vyprodukované mukósní kolonie dokáže kultura *Pseudomonas putida* FR3 produkovat také pod či ve vrstvě tekutiny a zda tyto vyprodukované polymery dokážou zahustit tekuté médium.

Kultura *Pseudomonas putida* FR3 byla proto testována na dvou typech půd – v tekutém trypton-yeast médiu se sacharosou a na obohaceném masopeptonovém agaru (oMPA) zalitým masopeptonovým bujónem (MPB). Na těchto půdách byla kultura kultivována třemi různými způsoby kultivace – statická, dynamická a při kontinuálním provzdušňování.

10.1 Výsledky kultivace *Pseudomonas putida* FR3 v tekutém trypton-yeast médiu se 2 % sacharosy

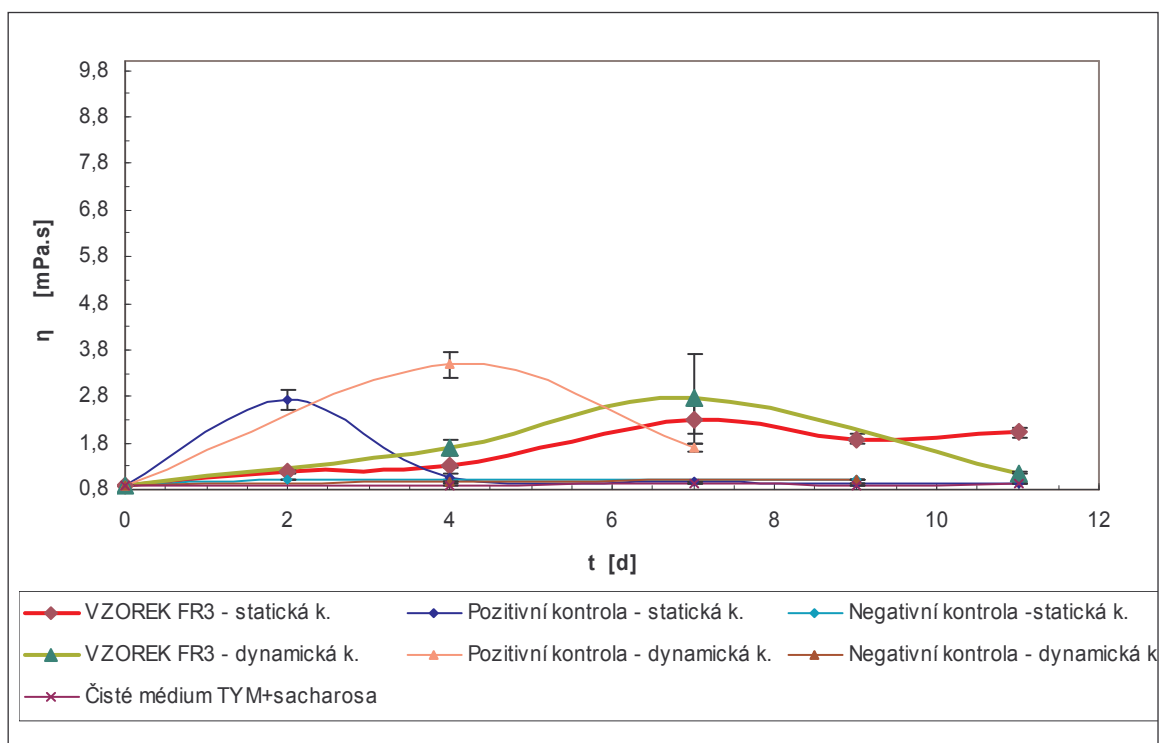
Kultivace kultury *Pseudomonas putida* FR3 v TYM+2% sacharosy byla prováděna třemi různými způsoby – statická na zalitých agarových půdách v klidu, dynamická na zalitých agarových půdách v pohybu a při kontinuálním provzdušňování naočkovaného tekutého média. Při kultivaci kultury byla vždy prováděna pozitivní kontrola - kultivace naočkované nezalité agarové půdy, negativní kontrola - „kultivace“ zalité nenačkované agarové půdy a v neposlední řadě byla také prováděna kontrola, tedy měření čistého nenačkovaného živného média. To vše bylo prováděno u každé kultivace mimo kontinuálního provzdušňování. Výsledky z jednotlivých měření různých kultivací jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 30., Tab. 31. a Tab. 32.) a závislost viskozity tekutého média po kultivaci s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 na čase jsou na následujícím obrázku (Obr. 13).

Tab. 30. Hodnoty viskozit tekutého živného média TYM + 2% sacharosy po kultivaci s kulturou Pseudomonas putida FR3 (statická kultivace).

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média TYM+sacharosa po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	VZOREK FR3 - statická kultivace							
0	0,90	0,89	0,90				0,90	0,01
2	1,15	1,16	1,16	1,22	1,23	1,23	1,19	0,04
4	1,32	1,31	1,32	1,28	1,29	1,28	1,30	0,02
7	2,59	2,58	2,59	2,05	2,03	2,04	2,31	0,30
9	1,78	1,77	1,78	1,98	1,97	1,98	1,88	0,11
11	1,93	1,93	1,94	2,11	2,12	2,12	2,03	0,10
	POZITIVNÍ KONTROLA - statická kultivace							
0	0,90	0,89	0,90				0,90	0,01
2	2,90	2,91	2,91	2,57	2,53	2,52	2,72	0,20
4	1,03	1,02	1,02	1,11	1,12	1,12	1,07	0,05
7	0,96	0,95	0,95	0,96	0,96	0,95	0,96	0,01
9	0,95	0,95	0,94	0,92	0,91	0,92	0,93	0,02
11	0,94	0,93	0,93	0,94	0,94	0,94	0,94	0,01
	NEGATIVNÍ KONTROLA- statická kultivace							
0	0,90	0,89	0,90				0,90	0,01
2	1,02	1,02	1,03	0,98	0,98	0,98	1,00	0,01
9	1,01	1,00	1,00	1,01	1,00	1,00	1,00	0,01
	Čisté médium - TYM+sacharosa (kontrola)							
0	0,90	0,89	0,90				0,90	0,01
4	0,91	0,91	0,90				0,91	0,01
7	0,92	0,92	0,92				0,92	0,00
9	0,89	0,88	0,89				0,89	0,01
11	0,95	0,94	0,94				0,94	0,01

Tab. 31. Hodnoty viskozit tekutého živného média TYM + 2% sacharosy po kultivaci s kulturou Pseudomonas putida FR3 (dynamická kultivace).

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média TYM+sacharosa po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	VZOREK FR3 - dynamická kultivace							
0	0,90	0,89	0,90				0,90	0,01
4	1,58	1,54	1,56	1,85	1,86	1,86	1,71	0,16
7	1,89	1,88	1,88	3,62	3,61	3,63	2,75	0,95
11	1,18	1,18	1,16	1,16	1,15	1,14	1,16	0,02
	POZITIVNÍ KONTROLA - dynamická kultivace							
0	0,90	0,89	0,90				0,90	0,01
4	3,21	3,26	3,25	3,70	3,72	3,73	3,48	0,26
7	1,78	1,78	1,79	1,62	1,61	1,61	1,70	0,09
	NEGATIVNÍ KONTROLA - dynamická kultivace							
0	0,90	0,89	0,90				0,90	0,01
4	0,95	0,95	0,95				0,95	0,00
9	1,01	1,00	1,00	1,01	1,00	1,00	1,00	0,01
	Čisté médium - TYM+sacharosa (kontrola)							
0	0,90	0,89	0,90				0,90	0,01
4	0,91	0,91	0,90				0,91	0,01
7	0,92	0,92	0,92				0,92	0,00
9	0,89	0,88	0,89				0,89	0,01
11	0,95	0,94	0,94				0,94	0,01



Obr. 13. Graf závislosti viskozity tekutého média TYM + 2% sacharosu po kultivaci s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 na čase (statická a dynamická kultivace).

Změny viskozit tekutých médií po kultivaci kultury *Pseudomonas putida* FR3 znázorňuje obrázek 13 (Obr. 13.). Jak je vidět, charaktery křivek pro statickou kultivaci (červená křivka) a pro dynamickou kultivaci (zelená křivka) jsou značně podobné. I samotné hodnoty viskozit se od sebe příliš neliší (Tab. 30. a Tab. 31.), jsou si velice podobné. Nejvyšší viskozity dosahovala tekutá média u obou kultivací 7. den a to 2,31 mPa.s při statické kultivaci a 2,75 mPa.s při dynamické kultivaci. Při dynamické kultivaci již hodnota viskozity nestoupala, jen se mírně snižovala, při statické kultivaci viskozita poklesla 9. den kultivace a 11. den již opět stoupla. Absolutní hodnoty viskozit tekutých médií po kultivaci však nebyly žádný den natolik vysoké, aby se daly vyprodukované ECP kulturou *Pseudomonas putida* FR3 charakterizovat jako polymery zahušťující přítomné tekuté médium. I viskozity pozitivních kontrol tomu odpovídaly. Sice byly o něco vyšší (2,72 mPa.s 2. den statické kultivace a 3,48 mPa.s 4. den dynamické kultivace) než měřené zalité vzorky, ale šlo pouze o hodnoty v prvních 4. dnech kultivace a poté již viskozita tekutého média dodaného ke kultuře těsně před měřením vykazovala

nízké hodnoty. Tomu odpovídal také charakter kultury na miskách tomu odpovídal. 4. den kultivace bylo na miskách pozorováno vytrácení mukósního charakteru kolonií (u pozitivní kontroly).

Následující tabulka (Tab. 32.) poukazuje na výsledky získané při kultivaci kultury *Pseudomonas putida* FR3 v neředěném tekutém živném médiu TYM se sacharosou za kontinuálního přívodu sterilního vzduchu.

Tab. 32. Hodnoty viskozit tekutého živného média TYM + 2% sacharosy po kultivaci s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 (kontinuální provzdušňování).

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média TYM+sacharosa po kultivaci [mPa.s]			Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0,96	0,95	0,95	0,95	0,01
2	0,98	0,97	0,98	0,98	0,01
4	0,96	0,96	0,97	0,96	0,01
7	0,96	0,97	0,97	0,97	0,01
Čisté médium - TYM+sacharosa (kontrola)					
0	0,96	0,95	0,95	0,95	0,01
4	0,92	0,92	0,92	0,92	0,00
7	0,95	0,94	0,96	0,95	0,01

Hodnoty viskozit tekutého živného média TYM se sacharosou po kultivaci s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 (Tab. 32.) ukazují, že při stálém přívodu vzduchu a bez pevného podkladu nedokáže kultura *Pseudomonas putida* FR3 produkovat polymery zahušťující tekuté médium. Viskozita tekutého média ve všech dnech kultivace nepřesála 1 mPa.s, měla tedy naprosto stejné hodnoty jako čisté živné médium. Ze získaných výsledků při měření hodnoty viskozity tekutého živného média TYM+sacharosa po kultivaci s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 bylo zjištěno, že kultura není schopná v žádném z použitých typů kultivací v TYM + 2% sacharosy produkovat ECP zahušťující tekuté médium.

10.2 Výsledky kultivace *Pseudomonas putida* FR3 na půdě oMPA zalité

MPB

V druhém a posledním typu pokusu prováděném s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 byla tato kultivována na obohaceném masopeptonovém agaru (oMPA) zalitém masopeptonovým bujónem (MPB). Taktéž byla kultura na této půdě kultivována všemi třemi uvedenými způsoby a také byly měřeny pozitivní a negativní kontroly a čisté nenaočkované živné médium.

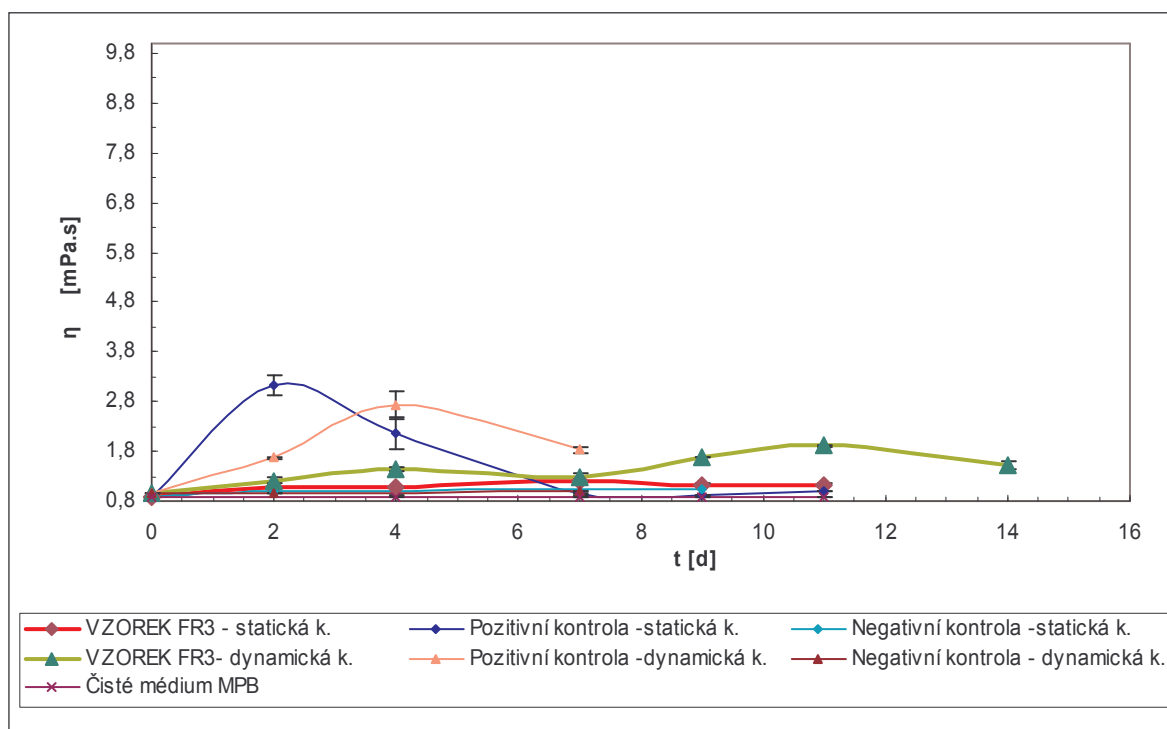
Výsledky získané z jednotlivých měření jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 33., Tab. 34. a Tab. 35.) a grafu (Obr. 14.).

Tab. 33. Hodnoty viskozit tekutého živného média MPB po kultivaci s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 (statická kultivace).

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média MPB po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	VZOREK FR3 - statická kultivace							
0	0,90	0,90	0,90				0,90	0,00
2	1,08	1,07	1,09	1,07	1,08	1,07	1,08	0,01
4	1,08	1,08	1,08	1,10	1,09	1,09	1,09	0,01
7	1,21	1,23	1,21	1,17	1,16	1,16	1,19	0,03
9	1,06	1,06	1,07	1,16	1,17	1,17	1,12	0,06
11	1,14	1,13	1,13	1,14	1,15	1,14	1,14	0,01
	POZITIVNÍ KONTROLA - statická kultivace							
0	0,90	0,90	0,90				0,90	0,00
2	3,30	3,32	3,30	2,98	2,96	2,95	3,14	0,19
4	1,86	1,89	1,90	2,42	2,45	2,46	2,16	0,31
7	0,94	0,92	0,94	0,95	0,96	0,96	0,95	0,02
9	0,94	0,92	0,93	0,93	0,94	0,93	0,93	0,01
11	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	0,01
	NEGATIVNÍ KONTROLA - statická kultivace							
0	0,90	0,90	0,90				0,90	0,00
2	1,02	1,01	1,01	1,01	1,00	1,00	1,01	0,01
9	1,06	1,06	1,07	1,03	1,02	1,02	1,04	0,01
	Čisté médium - MPB (kontrola)							
0	0,90	0,90	0,90				0,90	0,00
4	0,90	0,89	0,90				0,90	0,01
7	0,89	0,88	0,88				0,88	0,01
9	0,90	0,90	0,90				0,90	0,00
11	0,90	0,90	0,90				0,90	0,00

Tab. 34. Hodnoty viskozit tekutého živného média MPB po kultivaci s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 (dynamická kultivace).

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média MPB po kultivaci [mPa.s]						Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
	VZOREK FR3 - dynamická kultivace							
0	0,96	0,96	0,96				0,96	0,00
2	1,15	1,18	1,18	1,26	1,26	1,27	1,22	0,05
4	1,46	1,48	1,48	1,40	1,39	1,4	1,44	0,04
7	1,20	1,20	1,21	1,35	1,36	1,35	1,28	0,08
9	1,70	1,68	1,69	1,69	1,70	1,69	1,69	0,01
11	1,88	1,89	1,90	1,92	1,94	1,94	1,91	0,03
14	1,46	1,45	1,46	1,61	1,60	1,61	1,53	0,08
	POZITIVNÍ KONTROLA - dynamická kultivace							
0	0,96	0,96	0,96				0,96	0,00
2	1,63	1,65	1,67	1,69	1,68	1,69	1,67	0,02
4	2,97	2,98	3,00	2,49	2,48	2,49	2,74	0,27
7	1,77	1,76	1,78	1,90	1,90	1,89	1,83	0,07
	NEGATIVNÍ KONTROLA - dynamická kultivace							
0	0,96	0,96	0,96				0,96	0,00
2	0,96	0,95	0,96	0,97	0,98	0,98	0,97	0,01
7	1,00	1,01	1,01				1,01	0,01



Obr. 14 .Graf závislosti viskozity tekutého živného média MPB po kultivaci s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 na čase (statická a dynamická kultivace).

Při kultivaci kultury *Pseudomonas putida* FR3 na oMPA zalitém MPB je již vidět rozdíl mezi statickou a dynamickou kultivací. Při statické kultivaci je hodnota tekutého živného média po kultivaci kolem 1 mPa.s, což značí, při tomto stylu kultivace, že kultura *Pseudomonas putida* FR3 neprodukuje polymery zahušťující tekuté médium. Při dynamické kultivaci je situace o něco lepší, nejvyšší viskozity dosahuje tekuté médium 11. den kultivace 1,91 mPa.s, po tomto dnu viskozita opět klesá. Vyšší hodnoty viskozit MPB při dynamické kultivaci mohly být způsobeny buď stylem kultivace a nebo přítomností neředěného tekutého MPB. Při statické kultivaci byl totiž použit tekutý MPB ředěný 1:1. Křivka dynamické kultivace (zelená křivka) má také poněkud odlišný tvar než křivka statické kultivace (červená křivka). Křivka znázorňující statickou kultivaci po dosažení nejvyšší hodnoty začala nepatrně klesat. Při dynamické kultivaci viskozita MPB pomalu stoupala a 4. den kultivace začala klesat. 7. den kultivace však nastal zlom a viskozita tekutého média začala opět pomalu stoupat. Tato situace nastala nejspíš proto, že 7. den kultivace byl do lahví s kulturou přidán pevný sterilní MPB v množství 20 g/l.. Avšak i přes veškeré změny v dynamické kultivaci není viskozita tekutého MPB nikterak vysoká. Hodnoty viskozit pozitivní kontroly

na půdě oMPA mají podobný charakter jako pozitivní kontroly v TYM+sacharosa. Nejvyšší viskozita pozitivní kontroly pro statickou kultivaci je 3,14 mPa.s 2. den kultivace a při dynamické kultivaci 2,74 mPa.s 4. den kultivace. U tohoto typu pevné půdy byla také na miskách s pozitivní kontrolou těsně před zalitím tekutým médiem pozorována změna charakteru kolonií: mukósní kolonie viditelné 2. den kultivace ztratily ve 4. den kultivace svůj mukósní charakter. Ztrátám mukósnosti kolonií na miskách s agarovou půdou odpovídaly také hodnoty viskozit tekutých médií přidaných těsně před měřením.

Poslední pokus prováděný s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 bylo kontinuální provzdušňování živného tekutého média MPB naočkovaného kulturou. Výsledky získané při této kultivaci jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 35.).

Tab. 35. Hodnoty viskozit tekutého živného média MPB po kultivaci s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 (kontinuální provzdušňování).

Doba kultivace [den]	Viskozita tekutého živného média MPB po kultivaci [mPa.s]			Průměr [mPa.s]	Směrodatná odchylka
0	0,97	0,97	0,96	0,97	0,01
2	0,99	1,01	1,01	1,00	0,01
4	0,98	0,96	0,97	0,97	0,01
7	0,97	0,98	0,98	0,98	0,01
Čisté médium - MPB (kontrola)					
0	0,97	0,97	0,96	0,97	0,01
4	0,94	0,94	0,93	0,94	0,01
7	0,94	0,94	0,93	0,94	0,01

Výsledky statické a dynamické kultivace kultury *Pseudomonas putida* FR3 na oMPA zalitím MPB byly podobné výsledkům kultivace v TYM+sacharosa. Kultivace kultury s kontinuálním provzdušňováním v MPB je naprosto shodná s kultivací v TYM+sacharosa. Hodnoty viskozit z obou pokusů jsou totožné, tzn. viskozita tekutého živného média MPB po určitých dnech kultivace s kulturou *Pseudomonas putida* FR3 je pod 1 mPa.s s jedinou výjimkou a to 2. den kultivace, kdy byla hodnota viskozity tekutého média rovna 1 mPa.s. Nelze tedy říci, že by kultura *Pseudomonas putida* FR3 byla schopná za kontinuálního přívodu vzduchu zahušťovat tekuté živné médium MPB.

Pokud se shrnou výsledky veškerých pokusů prováděných s kulturou *Pseudomonas putida* FR3, je možno dojít k závěru, že kultura pro tvorbu ECP zahušťujících tekutá média potřebuje agarový podklad a dostatečný kontakt se vzdušnou fází.

IV. ZÁVĚR

Hlavní náplní této práce bylo rozšířit a dokončit výzkum započatý v roce 2004 v rámci SVOČ. Zde bylo zjištěno, že kultury *Pseudomonas putida* FR3 a *Rhodococcus erythropolis* FR6 a FR7 vyizolované z aktivovaného kalu s viskózním bytněním tvoří zahušťující exopolymery, pokud rostou na pevných půdách, a dále bylo zjištěno, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 (izolována ze stejného kalu) zahušťuje sacharidová případně manitolová tekutá živná média. V této diplomové práci jsem se již zabývala dalším zkoumáním těchto kultur a zaměřila jsem na zkoumání, zda jsou kultury *Pseudomonas putida* FR3 a *Rhodococcus erythropolis* FR7 schopné zahušťovat tekutá živná média a za jakých okolností, a zda je kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 schopná zahušťovat tekutá živná média nesacharidického složení.

Na počátku bylo provedeno otestování zmíněných kultur, jestli jsou schopné i po 2 letech zakonzervování při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ produkovat extracelulární polymery na pevných agarových půdách. Bylo zjištěno, že všem kulturám nejvíc vyhovuje pevná půda TYA s 2% sacharosy, jen každá z nich k tomu potřebuje jinou délku kultivace.

Rovněž bylo dokázáno, že kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 zůstala schopná zahušťovat manitolové tekuté médium ve významné míře a že tedy ani v tomto případě kulturu téměř dvouleté období zakonzervování nijak nepoškodilo.

Po počátečním testování již byly prováděny různé pokusy s jednotlivými kulturami. S kulturou *Agrobacterium tumefaciens* FR5 byly prováděny testy ve stále stejném typu tekutého média – glycerolovém médium, ale při kultivaci v lahvích na třepačce a v klidu a také v provzdušňovaných promývačkách. Při pokusech v lahvích bylo zjištěno, že vyšší míra zahuštění média (s výchozí viskozitou 0,99 – 1,01 mPa.s) je dosahována při kultivaci na třepačce, je-li v průběhu přidáván další uhlíkatý substrát (až 9,78 mPa.s 14. den kultivace). Při dalším způsobu kultivace bylo zjištěno, že pokud je kultura neustále provzdušňována, dokáže zahustit tekutou půdu rychleji než při kultivaci na třepačce (2. den kultivace), avšak s menší mírou zahuštění média (6,28 mPa.s i po přidavku dalšího substrátu). Nejvyšších hodnot zahuštění média (28,73 mPa.s již 4. den kultivace) bylo dosaženo, pokud byla kultura pěstována v prostředí neředěného fosfátového pufru (molarity M/15), který jako jediný dokázal udržet téměř stálou hodnotu pH tekutého média. Jako poslední pokusy prováděné s touto kulturou bylo testování nárůstu viskozity tekutého média při kultivaci kultury v glycerolovém médiu

s neředěným fosfátovým pufrům a s přísávkou glycerolu v průběhu kultivace. Tyto pokusy však přinesly velmi rozdílné výsledky paralelních kultivací, ve kterých se hodnoty viskozity velmi lišily. V některých z nich byly zjištěny velmi vysoké hodnoty zahuštění média nad 40 mPa.s. Příčinu rozdílných paralelních výsledků se nepodařilo v průběhu práce objasnit, což může být další náplní studia tohoto mikroorganismu.

Další testovaná kultura *Rhodococcus erythropolis* FR7 byla zkoumána v několika různých tekutých médiích (Trypton-yeast médium s 2% sacharósy, jantaranu či laktósy a masopeptonový bujón) s gelovým podkladem a při kontinuálním provzdušňování. Tato kultura nevykazovala za žádného způsobu kultivace výrazné zahušřující schopnosti, nejvyšší hodnoty viskozity 4,11 mPa.s (5. den kultivace) bylo dosaženo při statické kultivaci v tekutém trypton-yeast médiu s 2% sacharósy, za přítomnosti agarového podkladu.

Podobné výsledky byly získány i při testování kultury *Pseudomonas putida* FR3. Ta byla kultivována všemi třemi uvedenými způsoby a ve dvou médiích – Trypton-yeast médium s 2% sacharósy a MPB, s gelovým podkladem či bez něj. Nejvyšší viskozity dosahovala při dynamické kultivaci v tekutém trypton-yeast médiu se sacharósu s agarovým podkladem, její absolutní hodnota (2,75 mPa.s 7. den kultivace) však byla mnohem nižší než hodnoty zjištěné jak u bakterie *Rhodococcus erythropolis* FR7 tak u bakterie *Agrobacterium tumefaciens* FR5.

Na závěr lze tedy říci, že kultury *Rhodococcus erythropolis* FR7 a *Pseudomonas putida* FR3 jsou schopné zahušřovat tekutá média jen velmi nepatrně a jen v přítomnosti sacharidického substrátu, takže kultura *Agrobacterium tumefaciens* FR5 dokáže jako jediná za jistých okolností zahušřovat nesacharidická tekutá média a byla tedy pravděpodobně původcem viskózního bytnění kalu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SALEHIZADEH, H., SHOJAOSADATI, S.A. Extracellular biopolymeric flocculants. Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*. 2001, roč. 19, č. 5, s.371-385.
- [2] BAROŠOVÁ, Eva. *Vybrané bakteriální polymery a jejich význam pro čištění odpadních vod*. Bakalářská práce. Zlín: UTB ve Zlíně, 2006. 37s.
- [3] SCHLEGEL, Hans G. *Allgemeine Mikrobiologie*. 6. přepracované vydání. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1985, s. 60-62.
- [4] COSTERTON, J.W. The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1999, roč. 22, č. 4 -5, s. 551-563.
- [5] 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. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006, roč. 37, č. 2, s. 168-174.
- [6] DE VUYST, L., DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999, roč. 23, č. 2, s.153-177.
- [7] PYROG, TP. Biological function of microbial exopolysaccharides. *Mikrobiologichmyi Zhurnal*. 2001, roč. 63, č. 5, s.80-101.
- [8] RUAS-MADIEDO, P. and DE LOS REYES-GAVILIÓN, C.G. Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *American Dairy Science Association*. 2005, roč. 88, č. 3, s. 843-856.
- [9] CORONADO, C., SANCHEZ ANDUJAR, B., PALOMARES, A.J. Rhizobium extracellular structures in the symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1996, roč. 12, č. 2, s. 127-136.
- [10] LORCA, G., TORINO, M. I., DE VALDEZ, G. F. and LJUNGH, A. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, roč. 206, č. 1, s. 31-37.

- [11] DESVAUX, M., DUMAS, E., CHAFSEY, I. and HÉBRAUD, M. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, roč. 256, č. 1, s. 1-15.
- [12] KOSTER, M., BITTER, W., TOMMASSEN, J. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. 2000, roč. 290, č. 4-5, s. 325-331.
- [13] FERNÁNDEZ, L.A. and BERENQUER, J. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, roč. 24, č.1, s. 21-44.
- [14] STEINBERGER, R.E. and HOLDEN, P.A. Extracellular DNA in single- and multiple- species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, roč. 71, č. 9, s.5404-5410.
- [15] SPONZA, D.T. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, roč. 32, č. 3-4, s. 375-385.
- [16] FLEMMING, H.C., WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*. 2001, roč. 43, č.6, s. 1-8.
- [17] RUFFING, A. and CHEN, R.R. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. *Microbial Cell Factories*. 2006, roč. 5, č. 25.
- [18] CHAN, K.Y., XU, L.C., FANG, H.H.P. Anaerobic electrochemical corrosion rug of mild steel in the presence of extracellular polymeric substances produced by a culture enriched in sulfate-reducing bacteria. *Environmental Science and Technology*. 2002, roč. 36, č. 8, s. 1720-1727.
- [19] PALMGREN, R., NIELSEN, P.H. Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures. *Water Science and Technology*. 1996, roč. 34, č. 5-6, s. 233-240.

- [20] DE VUYST, L., DE VIN, F., VANINGELGEM, F., DEGEEST, B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2001, roč. 11, č. 9, s. 687-707.
- [21] SUTHERLAND, I.W. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*. 2001. roč. 11, č. 9, s. 663-674.
- [22] ROSYPAL, Stanislav. *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Praha: SPN, 1981. s. 71.
- [23] BOSSIER, P., VERSTRAETE, W. Comamonas testosteroni colony phenotype influences exopolysaccharide production and coaggregation with yeast cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, roč. 62, č. 8, s. 2687-2691.
- [24] HASSAN, A.N., FRANK, J.F., ELSODA, M. Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryoscanning electron microscopy. *International Dairy Journal*. 2003, roč. 13, č. 9, s. 755-762
- [25] KURANE, R., HATAKEYAMA, S., TSUGENO, H. Microbial flocculant.6. Correlation between flocculation production and morphological changes in *Rhodococcus erythropolis* S-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1991, roč. 72, č. 6, s. 498-500.
- [26] BRAMHACHARI, P.V., DUBEY, S.K. Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, roč. 43, č. 5, s. 571-577.
- [27] HOFFMANN, J., ŘEZNÍČKOVÁ, I., RŮŽIČKA, J. *Technologická cvičení z ochrany prostředí, část II*. Učební texty vysokých škol. 1. vydání. Zlín: VUT v Brně, FT ve Zlíně. 2000. s. 65-66. ISBN 80-214-1709-9.
- [28] NORBERG, A.B. and ENFORS, S.O. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982, roč. 44, č. 5, s. 1231-1237.
- [29] KURANE, R., TOEDA, K., TAKEDA, K., SUZUKI, T. Microbial flocculant.2. Culture condition for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1986, roč. 50, č. 9, 2309-2313.

- [30] KAMBOUROVA, M., TANGNEY, M. and PRIEST, F.G. Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, roč. 67, č. 2, s. 1004-1007.
- [31] GOTTSCHALK, G. *Bacterial metabolism*. 2. vydání. New York: Springer-Verlag, 1986. s. 3. ISBN 0-387-96153-4.
- [32] ASHIUCHI, M., KAMEI, T., BAEK, D.H., SHIN, S.Y., SUNG, M.H. SODA, K., YAGI, T., MISONO, H. Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2001, roč. 57, č. 1, s.764-769.
- [33] CUDLÍN, J. *Vybrané metody v mikrobiologii*. 1. vyd., Praha: Academia, 1981. 492s.
- [34] SUTHERLAND, I.W. Structure-function-relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*. 1994, roč. 12, č. 2, s. 393-448.
- [35] CERNING, J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*. 1995, roč. 75, č. 4-5, s. 463-472.
- [36] CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1990, roč. 87, č. 1-2, s. 113-130.
- [37] ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydrate Polymers*. 1997, roč. 33, č. 2-3, s.139-144.
- [38] LEONE, S., MOLINARO, A., ALFIERI, F., CAFARO, V., LANZETTA, R., DI DONATO, A. and PARRILLI, M. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydrate Research*. 2006, roč. 341, č. 14, s. 2456-2461.
- [39] RASZKA, A., CHORVATOVA, M., WANNER, J. The role and significance of extracellular polymers in activated sludge. Part I: Literature review. *ACTA Hydrochimica et Hydrobiologica*. 2006, roč. 34, č. 5, s. 411-424.
- [40] HIGGINS, M.J., NOVAK, J.T. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *Journal of Environmental Engineering-ASCE*. 1997, roč. 123, č. 5, s. 479-485.

- [41] ASHIUCHI, M., MISONO, H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2002, roč.59, č.1, s.9-14.
- [42] SHIH, I.L. SHEN, M.H., VAN, Y.T. Microbial synthesis of poly(epsilon-lysine) and its various applications. *Bioresource Technology*. 2006. roč. 97, č. 9, s. 1148 - 1159.
- [43] SHIH, I.L., VAN, Y.T. The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*. 2001, roč. 79, č. 3, s. 207-225.
- [44] CANDELA, T., FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*. 2006, roč, 60, č. 5, s. 1091-1098.
- [45] LAWS, A. GU, Y.C., MARSHALL, V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*. 2001, roč. 19, č. 8, s. 597-625.
- [46] BANIK, R.M., KANARI, B. UPADHYAY, S.N. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2000, roč, 16, č. 5, s. 407-414.
- [47] *About Dextran by Pharmacosmos A/S* [online]. [cit. 2007-1-11]. Dostupný z WWW: <http://www.dextran.net/>.
- [48] HAFEX, M.B. and SAIED, F.I.A. Radiochemical determination of gross alpha activity in urine by adsorption on dextran gel sephadex. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 1973, roč. 24, č. 5, s. 241-244.
- [49] HASHIMOTO, W., MOMMA, K., MIKI, H., MISHIMA, Y., KOBAYASHI, E., MIYAKE, O., KAWAI, S., NANKAI, H., MIKAMI, B. and MURATA, K. Enzymatic and genetic bases on assimilation, depolymerization, and transport of heteropolysaccharides in bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, roč. 87, č. 2, s. 123-136.
- [50] SEVIOUR, R. J., BLACKALL, L. L. *The microbiology of activated sludge*. 1. vyd., Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1999. 424 s. ISBN: 0-412-79380-6.

- [51] BAROŠOVÁ, Eva. *Růstové a metabolické vlastnosti vybraných mikroorganismů izolovaných z aktivovaného kalu s viskózním bytněním*. Studentská vědecká práce. Zlín: UTB ve Zlíně, 2004, 25 s.
- [52] RŮŽIČKA, J., BAROŠOVÁ, E., MIKEŠ, M., DURNOVÁ, E., HALABALOVÁ, V., ŠIMEK, L. *Isolace bakteriálních kultur z aktivovaného kalu s viskózním bytněním*. Sborník z konference "Vodárenská biologie 2005", konané ve dnech 2. – 3. února 2005 v Praze. Sborník ISBN 80-86832-07-4.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AK	Aktivovaný kal
AS+N	Modifikovaný Ashbyho agar s dusíkem
ECP	Extracelulární polymery
EPS	Extracelulární polysacharidy
Epsilon-PL	Poly- ϵ -lysin
FT	Fakulta technologická
MPB	Masopeptonový bujón
oMPA	Obohacený masopeptonový agar
PGA	Kyselina poly- γ -glutamová.
TYA	Trypton-yeast agar
TYM	Trypton-yeast medium
UIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
UPICH	Ústav potravinářského inženýrství a chemie
UPI	Ústav potravinářského inženýrství
UTB	Univerzita Tomáše Bati

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Znázornění umístění intracelulárních a extracelulárních polymerů u gram-positivních a gram-negativních bakterií. CPS – kapsulární polysacharidy (kapsule), EPS – exopolysacharidy (sliz) (viz [8], upraveno).....	10
Obr. 2. Znázornění „ropy“ charakteru u <i>Lactic acid</i> bakterie kultivované na misce s agarovou živnou půdou [8].....	15
Obr. 3. Vzhled kultury <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 na různých typech agarových půd (a – Trypton-yeast extrakt agar (TYA), b - TYA+ 3 % jantaranu, c - TYA+ 2% sacharosy).	48
Obr. 4. Závislost viskozity tekutého glycerolového živného média po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 na čase.	54
Obr. 5. Závislost viskozity tekutého glycerolového média po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 při kontinuálním provzdušňování na čase.....	56
Obr. 6. Závislost viskozity buněčné a nebuněčné suspenze tekutého média s 2% glycerolu po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 na čase.....	58
Obr. 7. Závislost tekutého glycerolového média s různě ředěným pufrem po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 na čase.....	61
Obr. 8. Graf průběhu změny viskozit trypton-yeast suspenze s 2% sacharosy po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 v čase (statická a dynamická kultivace).....	68
Obr. 9. Graf průběhu změny viskozit suspenze TYM se 2% jantaranu po kultivaci s <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 v čase (statická a dynamická kultivace)	70
Obr. 10. Graf průběhu hodnot viskozit suspenzí MPB po kultivaci s <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 na oMPA v čase (statická a dynamická kultivace).	72
Obr. 11. Graf průběhu viskozity suspenze TYM+2 % laktosy po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 v čase (statická kultivace).....	75
Obr. 12. Graf průběhu viskozity suspenze TYM+ 2% laktosy po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 při kontinuálním provzdušňování v čase.....	76
Obr. 13. Graf závislosti viskozity tekutého média TYM + 2% sacharosy po kultivaci s kulturou <i>Pseudomonas putida</i> FR3 na čase (statická a dynamická kultivace).	79
Obr. 14. Graf závislosti viskozity tekutého živného média MPB po kultivaci s kulturou <i>Pseudomonas putida</i> FR3 na čase (statická a dynamická kultivace).	82

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Vliv poměru C:N na produkci buněk a polysacharidů při obsahu glukosy v substrátu 25 g/l [28].....	16
Tab. 2. Vliv různých zdrojů dusíku na množství vyprodukovaného PGA [30].	17
Tab. 3. Molekulární hmotnost PGA produkovaná různými druhy bakterií [41].	24
Tab. 4. Kultivace kultur na různých typech agarových půd.	46
Tab. 5. Doba průtoku tekutého živného média AS+N po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 v Ubelohdeho viskozimetru – výsledky ze SVOČ [51].	49
Tab. 6. Doba průtoku tekutého živného média AS+N po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 v Ubelohdeho viskozimetru – nová měření.	49
Tab. 7. Doba průtoku tekutého glycerolového živného média po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 v Ubelohdeho viskozimetru – nová měření.	49
Tab. 8. Naměřené hodnoty viskozity tekutého živného média AS+N po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 na vibračním viskozimetru.	50
Tab. 9. Naměřené hodnoty viskozity tekutého glycerolového živného média po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 na vibračním viskozimetru....	51
Tab. 10. Hodnoty viskozit naměřené u vzorků suspenzí tekutého média AS+N s buňkami a bez buněk pro kulturu <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5.	52
Tab. 11. Hodnoty viskozit naměřené u vzorků suspenzí glycerolového tekutého média s buňkami a bez buněk pro kulturu <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5.	52
Tab. 12. Hodnoty viskozit tekutého glycerolového média s i bez přísad glycerolu po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5.....	54
Tab. 13. Hodnoty viskozit tekutého glycerolového média po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 při kontinuálním provzdušňování.	56
Tab. 14. Hodnoty viskozit buněčných i nebuněčných suspenzí tekutých médií po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5.....	58
Tab. 15. Hodnoty viskozit tekutého glycerolového média po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 a po úpravě pH.	59
Tab. 16. Naměřené hodnoty pH pro tekutá glycerolová média s pufrů různě ředěnými....	60
Tab. 17. Hodnoty viskozit tekutých různě pufovaných glycerolových médií po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5.....	61

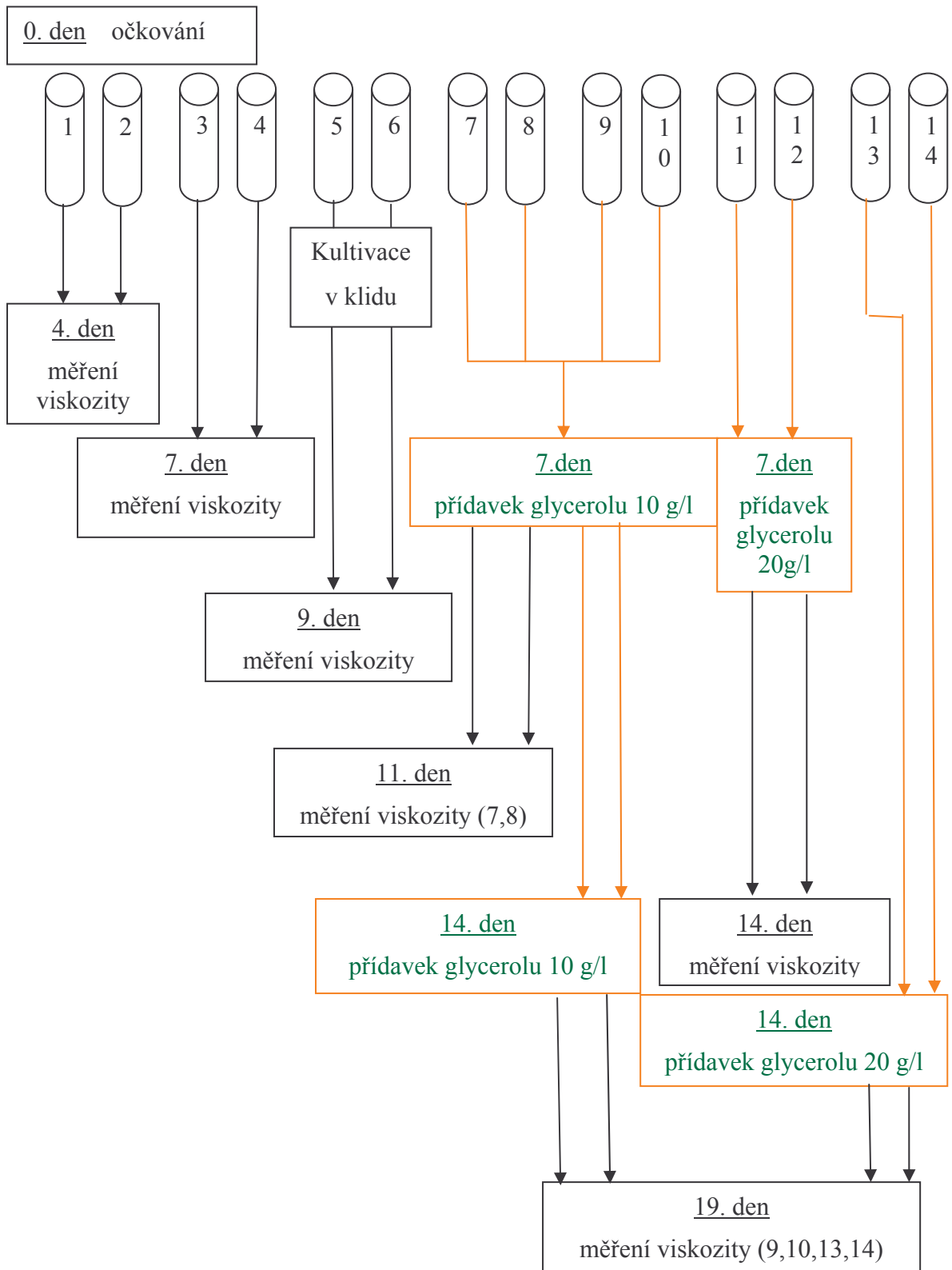
Tab. 18. Hodnoty viskozit tekutých glycerolových živných médií s neředěným pufrem po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5.....	63
Tab. 19. Hodnoty viskozit tekutých glycerolových živných médií s neředěným pufrem po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 – nová měření.....	64
Tab. 20. Hodnoty viskozit tekutého glycerolového média s neředěným pufrem po kultivaci s kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 – poslední měření.....	65
Tab. 21. Odečtené množství počtu buněk zjištěné mikroskopickým pozorováním.	66
Tab. 22. Naměřené hodnoty sušiny buněk a média po kultivaci <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5.....	66
Tab. 23. Hodnoty viskozit trypton-yeast média s 2% sacharosy po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 -statická a dynamická kultivace.....	68
Tab. 24. Hodnoty viskozity trypton-yeast suspenze s 2% jantaranu po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 - statická i dynamická kultivace.	69
Tab. 25. Hodnoty viskozit suspenzí MPB po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 - statická kultivace.	71
Tab. 26. Hodnoty viskozit tekutých médií MPB po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 - dynamická kultivace.....	72
Tab. 27. Hodnoty viskozit pro tekuté médium MPB po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 při kontinuálním provzdušňování.....	73
Tab. 28. Hodnoty viskozit suspenze TYM+ 2% laktosy po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 – statická kultivace.	74
Tab. 29. Hodnoty viskozity tekutého živného média TYM+ 2% laktosy po kultivaci s kulturou <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 – kontinuální provzdušňování	75
Tab. 30. Hodnoty viskozit tekutého živného média TYM + 2% sacharosy po kultivaci s kulturou <i>Pseudomonas putida</i> FR3 (statická kultivace).....	78
Tab. 31. Hodnoty viskozit tekutého živného média TYM + 2% sacharosy po kultivaci s kulturou <i>Pseudomonas putida</i> FR3 (dynamická kultivace).....	78
Tab. 32. Hodnoty viskozit tekutého živného média TYM + 2% sacharosy po kultivaci s kulturou <i>Pseudomonas putida</i> FR3 (kontinuální provzdušňování).	80
Tab. 33. Hodnoty viskozit tekutého živného média MPB po kultivaci s kulturou <i>Pseudomonas putida</i> FR3 (statická kultivace).....	81
Tab. 34. Hodnoty viskozit tekutého živného média MPB po kultivaci s kulturou <i>Pseudomonas putida</i> FR3 (dynamická kultivace).....	81

Tab. 35. Hodnoty viskozit tekutého živného média MPB po kultivaci s kulturou

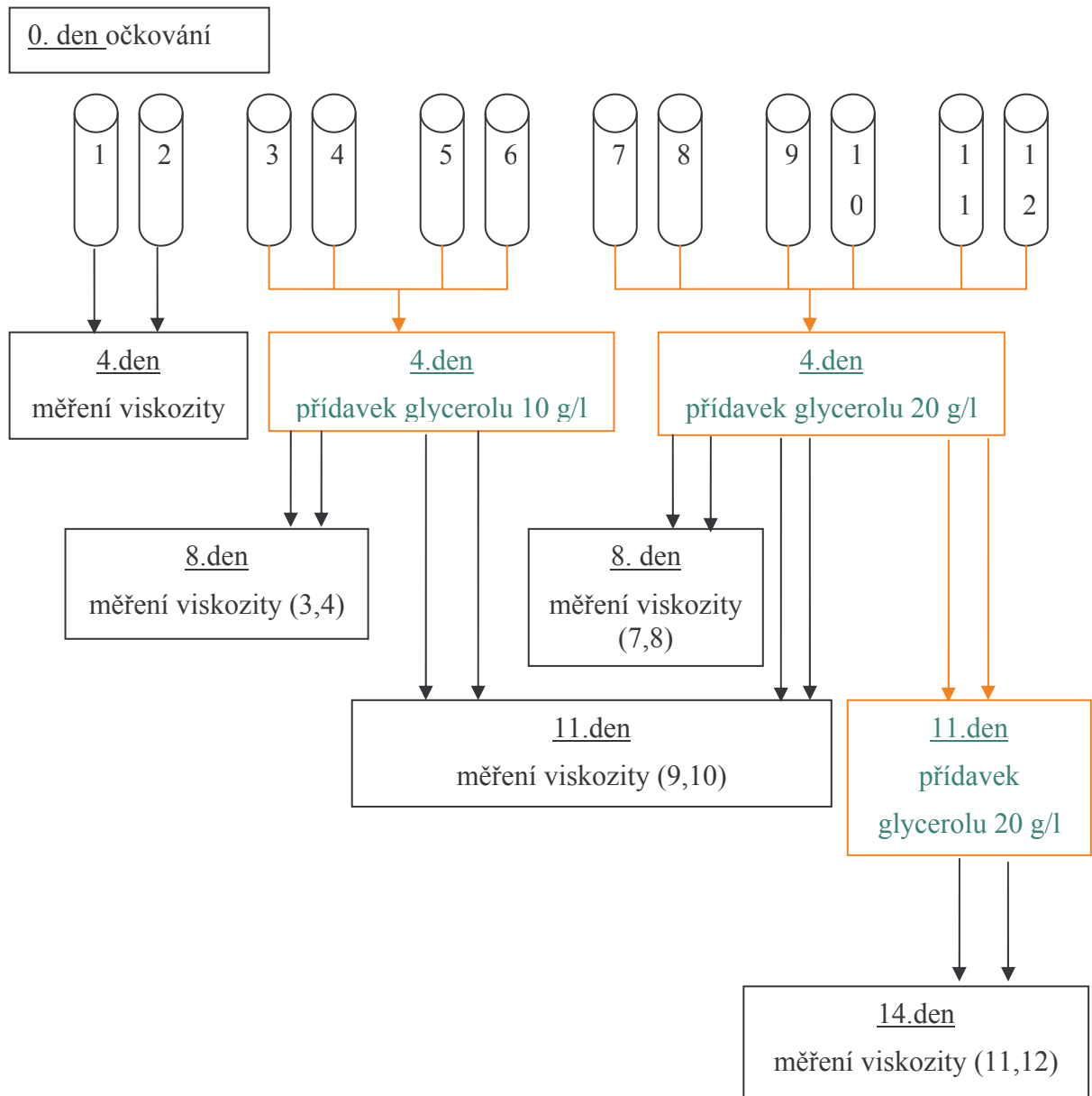
Pseudomonas putida FR3 (kontinuální provzdušňování) 83

PŘÍLOHY

Příloha P I: Schéma kultivace kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v glycerolovém tekutém médiu s 5x ředěným fosfátovým puforem a s přidavky glycerolu.



Příloha P II: Schéma kultivace kultury *Agrobacterium tumefaciens* FR5 v glycerolovém tekutém médiu s neředěným fosfátovým pufrům a s přidavky glycerolu (první měření).



EVIDENČNÍ LIST MAGISTERSKÉ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Místo uložení práce: Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Autor práce: Bc. Eva Barošová
Název práce česky: Produkce extracelulárních polymerních látek u vybraných bakteriálních kultur anglicky: Production of extracellular polymer compounds in selected bacterial cultures
Vedoucí práce: RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
Vysoká škola (název a adresa): Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Mostní 5139, 760 01 Zlín Fakulta technologická, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení práce: 2007
Počet stran, obrázků, tabulek: 99 stran, 14 obrázků, 35 tabulek
Předmětová hesla: česky: extracelulární polymery, ECP, EPS, produkce exopolysacharidů anglicky: extracellular polymers, ECP, EPS, production of exopolysaccharides
Souhrn česky: Ve své práci jsem se nejprve zabývala kulturou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 a její schopností zahušťovat tekutá média nesacharidického složení. Při práci na SVOČ bylo totiž zjištěno, že tato kultura jako jediná dokázala zahušťovat tekutá média, ovšem pouze v přítomnosti sacharidového či manitolového substrátu. Cílem další části práce bylo zjistit, zda kultury <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 a <i>Pseudomonas putida</i> FR3 jsou schopné a za jakých okolností produkovat extracelulární polymery zahušťující tekutá média. Dříve bylo totiž zjištěno, že při kultivace na pevných agarových půdách vytváří silně mukózní kolonie. anglicky: In my work I firstly dealt with <i>Agrobacterium tumefaciens</i> FR5 culture and its ability to thicken up the liquid media of non-saccharidic composition. During the student's work it was discovered that this culture was the only one able to thicken up liquid media but only in the presence of saccharidic or mannitol substrate. The aim of the second part was to discover if the <i>Rhodococcus erythropolis</i> FR7 and <i>Pseudomonas putida</i> FR3 cultures are able to produce extracellular polymers which thicken up the liquid media and under what conditions. In my early study it was detected that these bacteria formed thick mucoid colonies during cultivation on agar media.