

Studium vlastností sacharolytické bakterie *Verrucomicrobium* sp. GD

Sylvie Jurečková

Bakalářská práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Sylvie Jurečková
Osobní číslo: T11350
Studijní program: B2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Chemie a technologie potravin
Forma studia: prezenční

Téma práce: Studium vlastností sacharolytické bakterie
Verrucomicrobium sp. GD

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popis kultury Verrucomicrobium sp. GD
2. Jiné bakterie rozkládající gellan
3. Gellan

II. Praktická část

1. Degradace flatulentních polysacharidů luštěnin
2. Využití kultury GD k potlačení tvorby biofilmů vybranými potravinářsky i klinicky významnými druhy bakterií
3. Diskuse získaných výsledků a formulace závěrů práce

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Muchová M., Růžička J., Julinová M., a kol.: Xanthan and gellan degradation by bacteria of activated sludge. *Water Science and Technology* 2009, vol. 60, no. 4, 965-973

[2] Muchová M.: Mikrobiální degradace vybraných polysacharidů. Disertační práce. FT UTB, Zlín 2009

[3] Saha D., Bhattacharya S.: Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of Food Science and Technology* 2010, vol. 47, 587-597

[4] Mikolajczak M. J., Thorne L., Pollock T.J., Armentrout R. W.: Sphingyanase, a new endoglycanase that cleaves specific members of the gellan family of polysaccharides, *Applied and Environmental Microbiology* 1994, 402-407

[5] Jung Y. J., Park C. S., Lee H. G., Cha J.: Isolation of a novel gellan-depolymerizing *Bacillus* sp. strain YJ-1, *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2006, vol. 16, 1868-1873

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

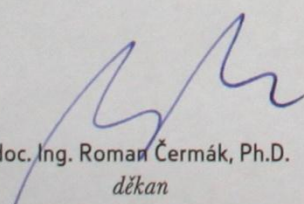
Datum zadání bakalářské práce:

10. ledna 2014

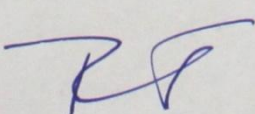
Termín odevzdání bakalářské práce:

2. května 2014

Ve Zlíně dne 3. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: JUREČKOVÁ SYLVIE

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 30.4.2014

Jurečková Sylvie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

V bakalářské práci byla studována gellan degradující bakterie *Verrucomicrobium* sp. GD, charakteristická tvorbou prosték. Experimentálně bylo zjištěno, že tvorba těchto útvarů je pozorovatelná při kultivaci kultury v tekutém minerálním médiu s gellanem. Dále se práce zabývala možností rozkladu flatulentních sacharidů luštěnin kulturou GD. Nejobsáhlejší část byla věnována testování schopnosti kultury *Verrucomicrobium* sp. GD omezovat tvorbu biofilmů u klinicky a potravinářsky významných bakterií, kde bylo zjištěno, že kultura GD inhibuje tvorbu biofilmu u kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a u několika kultur *Pseudomonas aeruginosa*, konkrétně kmenů *Pseudomonas aeruginosa* FT 1, FT 2 a FT 3.

Klíčová slova: *Verrucomicrobium*, biofilm, gellan, degradace.

ABSTRACT

In this thesis were studied gellan-degrading bacteria *Verrucomicrobium* sp. GD which is characterized by the formation of prosthecae. It was experimentally found that the formation of prosthecae is the microscopically visible during the cultivation of culture in liquid mineral medium with gellan. Furthermore, strain GD was tested for its flatulent leguminous carbohydrates degrading ability. The main part was devoted to testing the skills of *Verrucomicrobium* sp. GD to inhibit the biofilm formation of bacteria, which may cause serious infections. Experiment result revealed that the bacterial strain GD decreased biofilm formation in *Staphylococcus aureus* CCM 3953 and in some isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, namely *Pseudomonas aeruginosa* FT 1, FT 2 and FT 3.

Keywords: *Verrucomicrobium*, biofilm, gellan, degradation.

Poděkování

Srdečně děkuji vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vstřícný přístup, cenné rady a připomínky v průběhu měření a zpracování této práce.

Dále děkuji kolektivu Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za vytvoření skvělého pracovního prostředí a v poslední řadě děkuji všem, kteří mi jakkoli během mého studia pomohli.

Prohlašuji, že jsem na své bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala, a že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 LITERÁRNÍ REŠERŠE	11
1.1 BAKTERIÁLNÍ BIOFILMY	11
1.1.1 Vznik biofilmu	11
1.1.2 Faktory podporující adhezi	12
1.1.3 Význam biofilmu v potravinářství	12
1.1.4 Význam biofilmu v medicíně	14
1.2 EXTRACELULÁRNÍ POLYSACHARIDY	14
1.2.1 Gellan	15
1.2.2 Použití gellanu	16
1.2.3 Rozklad gellanu.....	17
1.3 POPIS KULTURY <i>VERRUCOMICROBIUM</i> SP. GD.....	17
1.3.1 Charakteristika rodu <i>Verrucomicrobium</i>	17
1.3.2 Původ a izolace kultury GD.....	18
1.3.3 Sacharolytické vlastnosti	19
1.4 JINÉ BAKTERIE ROZKLÁDAJÍCÍ GELLAN	19
2 CÍLE PRÁCE.....	21
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	22
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1 MATERIÁLY A METODIKA.....	23
3.1.1 Chemikálie, roztoky a živná média	23
3.1.2 Použité kultury mikroorganismů.....	27
3.1.3 Přístrojové vybavení.....	27
3.1.4 Postupy a analýzy.....	28
MİKROSKOPIE KULTURY <i>VERRUCOMICROBIUM</i> SP. GD	28
ROZKLAD RAFFINOSY A STACHYOSY	30
POSTUPY MĚŘENÍ SCHOPNOSTI TVORBY BIOFILMU	31
4 VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST.....	37
4.1 VÝSLEDKY	37
4.1.1 Mikroskopie kultury <i>Verrucomicrobium</i> sp. GD.....	37
4.1.2 Rozklad raffinosy a stachyosy	48
4.1.3 Měření schopnosti tvorby biofilmu	48
4.2 DISKUSE.....	55
4.2.1 Mikroskopie kultury <i>Verrucomicrobium</i> sp. GD.....	55
4.2.2 Rozklad raffinosy a stachyosy	58
4.2.3 Měření schopnosti tvorby biofilmu	59
ZÁVĚR.....	62
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	70
SEZNAM OBRÁZKŮ	71
SEZNAM TABULEK	72

ÚVOD

Polysacharidy hrají významnou roli při tvorbě biofilmů produkovaných některými bakteriemi. Jako biofilmy lze označit přisedlé povlaky mikroorganismů na různých površích a lze je najít prakticky všude, kde k tomu mají alespoň z malé části vhodné podmínky a mohou tak využívat benefity, které jim toto uskupení poskytuje. Mikrobiální buňky, které ulpěly na povrchu pomocí extracelulární gelovité matrix, jsou v biofilmu více či méně chráněny před vyschnutím, toxickými látkami, UV zářením, mechanickým poškozením, bakteriofágy, predací či imunitním systémem hostitele. Zmíněné biofilmy se mohou tvořit v rozvodném potrubí pitné vody, v potravinářských provozech nebo na medicínských implantátech, kde mohou způsobovat závažné zdravotní komplikace zmnožením patogenních mikroorganismů, které na konkrétním povrchu ulpěly. Proto je snahou hledat účinné strategie rozrušování těchto povlaků a vyvíjet materiály se speciální povrchovou úpravou k co největšímu omezení vzniku mikrobiálních biofilmů.

Mezi méně známé extracelulární bakteriální polysacharidy, ale hojně využívané, patří gellan a je mu v této práci věnována pozornost spolu s bakteriální kulturou *Verrucomicrobium* sp. GD, která má mimo jiné schopnost jej degradovat. Uvedený polysacharid se používá v potravinářském, kosmetickém i farmaceutickém průmyslu. Problémem může být (jako u řady dalších látek) jeho pomalý rozklad v čistírnách odpadních vod i v jiných prostředích, neboť schopnost rozkládat tento polysacharid má jen velmi omezené spektrum mikroorganismů, na rozdíl od množství bakterií, kvasinek či vláknitých mikroskopických hub, schopných degradace nejběžnějších polysacharidů, jako jsou škrob, celulóza, pektin či glykogen. Navíc poznatky o možnosti rozkladu složitých sacharidů v biofilmech, tvořenými nežádoucími mikroorganismy, by mohly mít v budoucnu potenciál pro praktické uplatnění samotných degradérů či jejich enzymů, štěpících tyto exopolysacharidy.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1 Bakteriální biofilmy

Jako biofilm lze popsat povlak, jenž je tvořen přisedlými koloniemi především bakterií a polymerními látkami jimi produkovanými. Tyto vysokomolekulární produkty vytváří základní matici, do níž se postupem času zachytávají další mikroorganismy nebo různé látky. V přírodě mají bakteriální populace tendenci adherovat k nejrůznějším povrchům, protože je to pro ně výhodné a v mnoha prostředích je toto uskupení jejich přirozeným způsobem výskytu (např. slizovité biofilmové nárosty na kamenech v řece). Biofilmy můžeme najít i v mnoha odvětvích lidského počínání, kde znečišťují povrchy, které mohou rozrušovat korozi a v neposlední řadě být zdrojem patogenních infekcí. U bakteriálních rodů *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* či *Mycobacterium* se prokázala tvorba patogenních povlaků [1]. Ne vždy je biofilm považován za škodlivý, na příklad v průmyslovém odvětví biotechnologie, čištění odpadních vod či při bioremediaci je jejich přítomnost žádoucí. V posledních 20 letech prodělalo studium mikrobiálních biofilmů velký pokrok a bylo zjištěno mnoho poznatků, ale některé otázky jsou stále nezodpovězeny, např. v souvislosti s adhezí buněk, jak bakterie detekují, že již jsou na povrchu.

V dnešní době je velmi důležitou a nejvíce studovanou otázkou přítomnost biofilmů v medicíně, a to v první řadě výskyt na implantovaných tělesech v lidském organismu (kanyly, katetry a plastové protetiké implantáty) [2].

1.1.1 Vznik biofilmu

Proces vlastní adheze buněk k povrchu je složitý a pro vznik biofilmu nejdůležitější. K přilnutí využívají bakterie adheziny, což jsou specifické, povrchově aktivní molekuly a mohou to být bílkoviny, glykopeptidy a polysacharidy. Ihned po doteku bakteriálních buněk s podkladem dochází k řadě reakcí syntetizujících nové metabolity včetně polysacharidové matrix. Vývoj a stabilizace bakteriálního povlaku má několi fází. V první fázi je stěžejní transport a adsorpce molekul organického substrátu na povrch podkladu, tzv. conditioning, poté probíhá přesun mikrobiálních buněk k povrchu podkladu. Ve třetí fázi dochází k zachytávání mikroorganismů na povrchu, replikace přisedlých buněk a produkce extracelulární matrice s dalšími metabolity, kdy postupem času některé buňky na povrchu biofilmu odumírají a probíhá neustálá replikace dalších částí biofilmu.

V poslední fázi, kdy je biofilm již tak objemný, že nedokáže odolávat vnějším vlivům jako je proud tekutiny kolem, tak dochází k odtrhávání biomasy a disperzi částí biofilmu i buněk do kapaliny [3].

Obecně se po přichycení začnou buňky dělit a shlukovat a tak se vytváří primární biofilm, na který se nabalují další bakteriální buňky tzv. sekundárního biofilmu. Tloušťka biofilmu se pohybuje v řádu desítek až stovek μm a je závislá na mikrobiálních druzích, morfologických vlastnostech biofilmu, jeho stáří a zejména na podmínkách prostředí, kde se tvoří [2].

1.1.2 Faktory podporující adhezi

Bakteriím napomáhají k přilnutí k bázi buněčné struktury, jako jsou fimbrie, které bakterie při dotyku s povrchem tvoří ve větším množství. Neméně důležitým faktorem pro snadnější vznik biofilmu je hydrofobní charakter povrchu, což bylo prokázáno v experimentech s použitím různých podkladů pro růst, kdy byl biofilm vytvořen bakteriemi na teflonu rychleji než na hydrofilním povrchu skla či kovu [4]. Příznivě působí na tvorbu biofilmových povlaků také pestrost živin v médiu, drsnost a poréznost povrchu. Biofilmy se mohou tvořit na rozhraní pevné a vzdušné fáze, kdy živiny a vlhkost obdrží z pevné fáze a potřebný kyslík ze vzduchu. Tato kombinace fází je uskutečněná např. na povrchu sliznice dýchacího ústrojí, kde může způsobovat plicní infekce. Další případ růstu biofilmu je na rozhraní inertní pevné a tekuté fáze, což může být třeba potrubí či kloubní implantát, kde jsou kyslík a nutrienty získávány z tekutého prostředí. Třetí typ povrchu je rozhraní pevné živné a tekuté fáze, ve kterém bakterie získávají živiny a kyslík z pevné nebo tekuté fáze. Tento případ lze registrovat v půdním prostředí či v živočišném nebo rostlinném organismu, kde mohou být příčinou infekcí měkkých tkání [5].

1.1.3 Význam biofilmu v potravinářství

Biofilmy, jakožto funkční konsorcia mikroorganismů upoutaných k povrchu a uložených v extracelulární hmotě mikroorganismy produkované [3], jsou nedílným a ne vždy žádaným jevem vyskytujícím se v různých odvětvích potravinářského průmyslu.

Výroba s použitím biofilmů

V mnoha případech je přítomnost biofilmů prospěšná a žádaná, např. k výrobě octa jsou vhodné bakterie rodu *Acetobacter* spp. [6]. Ve vinařství hraje specifickou roli ušlechtilá plíseň *Botrytis cinerea*, která svým povrchovým nárůstem na bobulích přispívá za

optimálních meteorologických podmínek ke zvýšení aktuální koncentrace sacharidů narušováním svrchní slupky hroznů a tím odpařování vody z obsahu plodů. Aroma vína, připraveného z hroznů napadených touto plísní, označují enologové jako chutnající po zimolezu s trpkým koncem [7]. Alkoholické nápoje, typické pro asijský kontinent jako např. saké, sojová omáčka či kyselina citrónová jsou vyrobené tzv. koji procesem, ve kterém se využívá plíseň *Aspergillus oryzae* – *kōji-kin* (japonské označení) [8]. Klíčovými organismy aplikovanými v pivovarnictví jsou kvasinky [2].

Biofilm jako součást výrobku

Existují potravinářské produkty, jejichž nedílnou součástí jsou mikroorganismy, které svou činností napomáhají vytvářet kýžené organoleptické vlastnosti finálního výrobku. Do této skupiny lze řadit zejména různé mléčné výrobky, a to sýry, k jejichž výrobě jsou vhodné bakterie mléčného kvašení. Na konzistenci, chuti a vzhledu plísňových sýrů se podílí ušlechtilé plísně např. *Penicillium candida* či *Penicillium camemberti*, jež vytváří bílou plíseň na povrchu. Růst mycelií mikroskopických plísní *Penicillium gorgonzola* a *Penicillium roqueforti* je žádoucí při výrobě tzv. sýrů s modrou plísní. Sýry zrající pod mazem mají charakteristické pikantní aroma díky bakteriálnímu kmeni *Brevibacterium linens* [9]. Dalšími produkty s obsahem biofilmu jsou fermentované masné výrobky. Typickým zástupcem trvanlivé uzeniny porostlé dvěma druhy ušlechtilé plísně a mezi českými spotřebiteli dobře znám, je „uherský salám“, který se v Maďarsku vyrábí již od roku 1883 podle receptury původem dovezené z Itálie [10].

Původci nemocí přenosní potravinami a tvořící biofilmy

Mezi známé mikroorganismy způsobující onemocnění, přenášené potravinami patří gramnegativní mikroaerofilní a pohyblivé bakterie rodu *Campylobacter* s 15 identifikovanými druhy, z nichž 12 je patogenních pro člověka [11]. *Campylobacter jejuni* je stěžejním mikroorganizmem zapříčiňující gastroenteritidy [12]. Hlavním zdrojem infekcí je hlavně syrové maso, neošetřené mléko, neošetřená voda, domácí zvířata, a to zejména psi a kočky. *Listeria monocytogenes* je zástupce grampozitivních pohyblivých bakterií, vyskytující se v savcích hostitelích i jiných obratlovcích, v krmivu připraveném silážováním a v půdě. Infekce může vzniknout konzumací kontaminovaných potravin mléčného charakteru, syrového masa a zeleniny a syrové i vařené drůbeže [13]. V neposlední řadě lze jmenovat všudypřítomnou gramnegativní fakultativně anaerobní bakterii rodu *Salmonella*, která může vyvolávat nemoci v rozpětí od gastroenteritid po

tyfus. Do tohoto bakteriálního rodu spadá 2463 sérotypů [14]. *Salmonella* dokáže přežít ve formě biofilmu po dobu čtyř týdnů od provedení sanitčního zákroku a dezinfekce. Bylo zjištěno, že sérovar *Salmonella enterica* označený Enteritidis kooperuje s bakterií *Klebsiella pneumoniae* při vytváření dvoudruhového biofilmu [15].

1.1.4 Význam biofilmu v medicíně

Jak již bylo zmíněno, bakterie nacházející se v biofilmech mohou způsobovat chronická onemocnění a vzhledem ke skutečnosti, že odstraňování takovýchto mikrobiálních nárostů je obtížné, je velmi důležité se tímto problémem dále zabývat. Bakteriální buňky jakožto kooperující konsorcium jsou v biofilmech chráněny v organismu hostitele před mechanismem jeho imunitního systému a také před působením antibiotik. Mezi infekce tkání, na kterých dochází k růstu mikrobiálních biofilmů, lze řadit např. pseudomonádovou pneumonii při cystické fibróze, endokarditidu (enterokoky, stafylokoky, enterobakterie, pseudomonády), stafylokoky způsobenou osteomyelitidu neboli infekční zánět kostní dřeni, zánět středního ucha (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a další) či zánět předstojné žlázy způsobený *Escherichia coli* [16]. I v dnešní době moderního lékařství a vyspělých technologií je stále velkou nesnází výskyt mikrobů především v podobě neselektivně eliminovatelných biofilmů. Závažný je růst těchto povlaků na dlouhodobě zavedených implantátech, umělých kloubních náhradách, katétrech, tracheálních cévkách, umělých srdečních chlopních, kardiostimulátorech nebo nitroděložních těliscích [2].

1.2 Extracelulární polysacharidy

Jedná se o přírodní polymery tvořené monosacharidovými jednotkami, které jsou buňkami některých mikroorganismů produkovány do okolí. Do skupiny bakteriálních exopolysacharidů můžeme řadit mj. xanthan, gellan, curdlan a dextran. Mezi zástupce extracelulárních polysacharidů nižších hub patří pullulan či skleroglukan. Mikroorganismy je tvoří v neaktivním období růstu buněk, kdy je možno jejich produkci zvýšit vysokým poměrem C:N v růstovém médiu [17].

Struktury makromolekul polysacharidů jsou lineární, eventuálně rozvětvené a mohou mít navázané různé substituenty. Pokud se řetězec skládá ze stejných monosacharidů, hovoří se o homoglykanu, a když je seskupen z odlišných cukerných merů, tak o heteroglykanu. Mikrobiální polysacharidy se vyznačují určitou pravidelností opakujících se jednotek

oligosacharidů (2 – 8 monosacharidů). V případě, že mikroorganismy využívají jako zdroj energie polysacharid, produkují enzymy polysacharasy, které štěpí tyto extracelulární polysacharidy na nízkomolekulární štěpy a ty jsou pak do buňky snáze transportovány k následné utilizaci [18].

1.2.1 Gellan

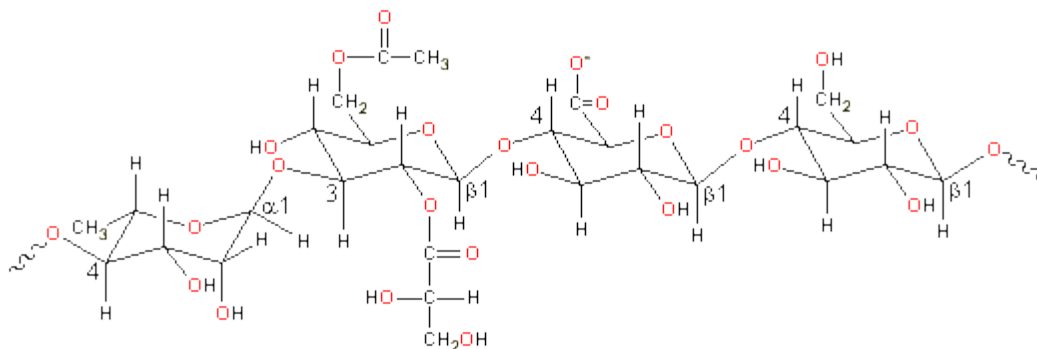
Gellan je extracelulární bakteriální polysacharid vytvářený bakterií *Sphingomonas paucimobilis*, dříve známou jako *Auromonas elodea* nebo *Pseudomonas elodea*. Tento mikroorganismus lze nazvat příležitostným patogenem, jenž může pomocí produkovaného gellanu ulpívat ve formě biofilmu na různých površích [19].

Mezi první práce, které prokázaly možnost jeho komerčního využití, patřil výzkum společnosti Kelco (ta jako první zahájila průmyslovou výrobu xanthanu) z roku 1978, ve kterém je pojmenován tento polysacharid pracovním názvem S-60 [20].

Makromolekula gellanu, jakožto aniontového polymeru, je složena z lineárně opakujících tetrasacharidů [21], $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow)]$. Jednotlivé podjednotky jsou označeny zkratkami Glc (D-glukosa), GlcA (D-glukuronová kyselina) a Rha (L-rhamnosa) a jsou přítomny v poměru 2:1:1 [48]. Nativní gellan produkovaný mikroorganismy obsahuje ještě L-glycerolové skupiny na O(2) třetího glukosového zbytku tetrasacharidové jednotky a alespoň několik z opakujících se jednotek nese acetylovou skupinu na O(6) téhož zbytku [22]. Zmíněné substituenty podmiňují charakteristické reologické chování tohoto polysacharidu a jeho upravených forem. Přírodní gellan se vyskytuje v konformaci levotočivé dvoušroubovice, kdy jsou šroubovice vůči sobě v antiparalelní poloze a každá z obou helix je složena ze tří gellanových řetězců stabilizovaných vodíkovými můstky [23]. V běžné komerční výrobě jsou oba zmiňované typy substituentů (acylů) ve větší či menší míře odstraněny alkalickou cestou. Výsledný deacylovaný polymer je označen jako „gellanová guma“ či obchodním názvem Kelcogel[®] (pro potravinářské účely) nebo Gelrite[®] (pro průmyslové použití) [24].

Deacylovaný gellan poskytuje oproti přírodnímu gellanu pevné a zároveň křehké gely, které jsou termoreversibilní. Významným faktorem pro průběh samotné gelace je povaha kationtů (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), které vyrovnávají náboje karboxylových skupin polymerních řetězců. Maximální pevnost gelu nastává při stejném stechiometrickém poměru karboxylových skupin v gellanu s dvojmocnými kationty (Ca^{2+}), kdy výsledný gel vyniká lepší odolností vůči teplotě, kyselinám i enzymům [25]. Koncentrace

deacylovaného gellanu a solí v roztoku ovlivňuje přímo úměrně teplotu tání i gelace [26]. Deacylovaný bakteriální polysacharid je taktéž složen ze dvou šroubovic, které ale mají souběžné uspořádání [27].



Obrázek 1: Molekulární struktura gellanu [28]

1.2.2 Použití gellanu

Upotřebení gellanu v potravinářském průmyslu je rozličné, může v potravinách plnit funkci stabilizátoru, zahušťovadla či univerzální želírující složky [29]. V seznamu potravinářských emulgátorů a stabilizátorů je ho možno vyhledat pod kódem E 418 [30]. Mezi typické produkty, do kterých se gellan přidává, patří různé náplně pečiva, cukroví, mléčné výrobky, dortové želé, ledové a cukrové polevy, džemy a marmelády, nízkotučné pomazánky, omáčky, topingy a pokrmy určené k přípravě v mikrovlnné troubě [29]. V pudincích zastává roli stabilizátoru, kdy redukuje synerezi při delším skladování a také velmi dobře funguje v zeleninových šťávách [31, 32].

Své uplatnění našel tento exopolysacharid i v odvětví kosmetického průmyslu, kde je přidáván do krémů, zubních past, make-upů, šamponů, sprchových gelů, pleťových mlék a masek. V opalovacích krémech stabilizuje deacylovaný gellan olejovou fázi a umožňuje vytvořit jednolitý homogenní film po nanesení přípravku na pleť. Také je velmi stálý vůči širokému rozpětí teplot a to je u těchto produktů žádaná vlastnost.

Ve farmacii se gellan používá k výrobě tablet a kapslí s povrchem usnadňujícím polykání a s postupným uvolňováním účinné látky [29]. Směs polysacharidu jambilanu a gellanu v poměru 1:1 (oba roztoky polysacharidů měly koncentraci 1%) se ukázala jako výborný nosič probiotik (např. *Lactobacillus plantarum*), které plní svůj účel v tlustém střevě [33]. Potenciál tohoto extracelulárního polysacharidu je zkoumán i v zubním lékařství, kde jsou vyvíjeny nové dentální výplně s gellanovou gumou GG-DF (z anglického *gellan gum*

dental filling). Tato kompozice o koncentraci 1,5% a 1,75% vykazuje stejné vlastnosti (mikrostruktura, poréznost a modul pružnosti) jako komerční výrobek Teruplug® [34].

Gellanová guma je vhodná také pro mikrobiologické účely, při výrobě živných médií jako alternativní náhrada agaru [29, 35]. Živná půda s gellanem je také ideálním médiem pro kultivaci rostlinných pletiv a částečně je vhodná pro růst termofilních kultur mikroorganismů díky své termostabilitě.

Pevné transparentní gely tvoří gellan již při koncentraci 0,1%. Používají se i pro výrobu gelových osvěžovačů vzduchu, protože gellanový gel pojme poměrně velký podíl vonné složky, kterou uvolňuje postupně a zároveň má vysokou teplotu tání, takže je odolný k horkým podmínkám, které mohou nastat např. v interiéru automobilu [29].

1.2.3 Rozklad gellanu

Mikrobiálnímu rozkladu gellanu je v odborné literatuře věnována mnohem menší pozornost než rozkladu běžných polysacharidů, jako jsou škrob, celulóza, pektin či glykogen. Přesto lze najít několik prací, které mikrobiální degradaci gellanu popisují. Gellan, jakožto exopolysacharid produkovaný některými bakteriemi, může být degradován enzymy (polysacharasami) tvořenými samotnými producenty gellanu, tedy bakteriemi rodu *Sphingomonas* [36]. Degradace deacylovaného gellanu je způsobena extracelulárními lyasami, které štěpí vazbu mezi β -D-glukosylovou a 1,4 β -D-glukuronylovou jednotkou v tetrasacharidu opakující se jednotky polysacharidu [37]. Od roku 2005 se bakteriální degradaci gellanu výzkumně věnuje i mikrobiologická část Ústavu inženýrství ochrany ŽP na FT UTB ve Zlíně, čehož výsledkem byla mj. i izolace kultury *Verrucomicrobium* sp. GD, schopné rozkladu a utilizace gellanu.

1.3 Popis kultury *Verrucomicrobium* sp. GD

1.3.1 Charakteristika rodu *Verrucomicrobium*

Taxonomické zařazení této tyčinkovité, gramnegativní (mají obsaženu v peptidoglykanu kyselinu diaminopimelovou), nepohyblivé, chemoheterotrofní, mesofilní fakultativně anaerobní bakterie je dle literatury následující:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Verrucomicrobia*

Třída: *Verrucomicrobiae*

Řád: *Verrucomicrobiales*

Čeleď: *Verrucomicrobiaceae*

Rod: *Verrucomicrobium*

Pro rod *Verrucomicrobium* je typická tvorba prosték, výběžků buněčné stěny obsahujících cytoplasmu, které jsou rozprostřeny rovnoměrně po celém povrchu buňky. Z prosték vystupují fimbrie. Latinské podstatné jméno *verruco* je možno přeložit jako bradavice. Pojmenování tohoto rodu bakterií je tudíž podle jejich bradavičnatého hrbolatého povrchu poněkud výstižné. Zástupcem tohoto rodu je např. *Verrucomicrobium spinosum*. Do čeledi *Verrucomicrobiaceae* patří také rody *Akkermansia* a *Prostheco bacter* [38, 39, 40].

Jako zdroj energie a uhlíku potřebují kmeny rodu *Verrucomicrobium* cukry, některé druhy mají schopnost rozkládat i polysacharidy, např. fucoidan [41] nebo mucin [42]. Optimum růstu kmene GD bylo v práci Muchové a kol. experimentálně stanoveno na teplotu do 30°C při aerobních podmínkách, z čehož vyplývá, že se jedná o psychrofilní organismus. Zkoumaný kmen nemá oxidasu ani katalasu, glukosu sice v živném mediu aerobně využívá, ale OF testem se její fermentace neprokázala [43]. Jak ale uvádí Sedláček v Taxonomii prokaryot, verrukomikrobia fermentují glukosu na kyselinu bez tvorby plynu [38]. U kultury GD se jednoznačně nedá potvrdit, že produkuje extracelulární enzymy pro depolymeraci gellanu. Tyto enzymy jsou pravděpodobně pevně vázány externě na povrchu buněčné stěny [43].

Bakteriální rod *Verrucomicrobium* se vyskytuje běžně v půdě [44, 45, 46, 47] a vodním prostředí [40, 48]. Tyto bakterie byly nalezeny i v čistírnách odpadních vod, v zařízeních pro odstraňování fosforu [49] či dusíku [50], kde však byla jejich přítomnost zaznamenána pouze prostřednictvím specifických sekvencí DNA.

1.3.2 Původ a izolace kultury GD

Prakticky první živou kulturu rodu *Verrucomicrobium* z prostředí čistíren se podařilo získat v roce 2009 Muchové a kolektivu z aktivovaného kalu, který obsahoval mnoho různých mikroorganismů, včetně rozkladačů xanthanu a jiných polysacharidů. Při experimentech byla nejprve získána směsná bakteriální kultura (konsorcium) rostoucí na gellanu jako jediném zdroji uhlíku, a teprve z ní byla izolována čistá kultura *Verrucomicrobium* sp. GD. Ta byla získána vyočkováním konsorcia na měkký gellanový

gel, kde se degradéři gellanu na Petriho miskách projeví po týdenní inkubaci tvorbou malých jamek v povrchu ploten (známka utilizace tohoto polysacharidu). Pozdější testy prokázaly, že bakterie rostoucí v jamkách byla čistá kultura GD využívající gellan.

Kultura GD (gellan degradující) na měkkém gellanovém gelu rostla ve formě kolonií podobných bublinkám či na minerálním mediu s glukosou jako žluté okrouhlé kolonie. Na základě běžných mikrobiologických charakteristik, jako je tvar buňky, Gramovo barvení, požadavky na kyslík a sporulace, bylo zjištěno, že kmen tvoří aerobní, gram-negativní, nesporulující tyčky o různé velikosti v rozmezí 2-10 μm . Zásadním krokem pro jisté zařazení mikroorganismu však bylo použití analýzy sekvence 16S rDNA.

Podle výsledků sekvenování 16S rDNA byla kultura zařazena do čeledi *Verrucomicrobiaceae*, kdy z 98% byla přečtená sekvence shodná s popsáním mikroorganismem *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136 [51]. Kmen s názvem *Verrucomicrobium* sp. GD byl pod katalogovým číslem CCM 7579 uložen do České sbírky mikroorganismů v Brně [43]. Část sekvence 16S rDNA kmene *Verrucomicrobium* sp. GD je uložena v GenBank pod kódem GQ304751 [51].

1.3.3 Sacharolytické vlastnosti

Verrucomicrobium sp. GD kromě gellanu (i nativního acylovaného) rozkládá také xanthan a částečně alginát, nerozkládá škrob, a jen velmi slabě dextran. Bakteriální konsorcium z aktivovaného kalu, z něž byla kultura GD izolována, degradovalo různé polysacharidy tak, že po pomalé iniciační fázi nastal rychlý rozklad substrátu během 3 nebo 4 dnů. Čistá kultura GD (a podobně i čistá kultura *Paenibacillus* XD, která byla získána v téže práci) byly schopné využít velkou část polysacharidu v prvních dvou dnech degradace, ale po čtyřech dnech se jejich degradační schopnost značně zpomalila [51].

1.4 Jiné bakterie rozkládající gellan

Jak již bylo uvedeno, mezi bakterie rozkládající gellan extracelulárními lyasami patří řada kmenů gramnegativních bakterií rodu *Sphingomonas*, což jsou samotní producenti gellanu. Tyto lyasy štěpily vazbu mezi β -D-glukosylovou a 1,4-D-glukuronoylovou jednotkou v tetrasacharidu opakující se jednotky [37]. Někteří autoři používají název sphinganasa pro typ enzymu, který štěpí různé typy polysacharidů náležející do gellanové rodiny (tzv. sphingany) [52]; jeho producentem je např. bakterie *Bacillus* sp. B29, izolovaná z půdy. Hlavní molekulární řetězec sphinganů sestává z β -D-glukosy; 1,4 β -D-glukuronové

kyseliny; 1,4 β -D-glukosy a 1,4 α -L-sacharidu (L-rhamnosa nebo L-mannosa); dále záleží na povaze substituentů, podle kterých mohou vznikat polysacharidy jako gellan, rhamsan, wellan a polysacharidy S-88, S-657, S-196 a NW11 [19]. Mezi další popsání bakteriální kultury, degradující gellan, patří *Bacillus* sp. GL1 [53] a *Bacillus* sp. YJ-1 [54] a také termofilní *Geobacillus stearothermophilus* 98, získaný z horkého pramene v Bulharsku [55].

Kultura *Bacillus* sp. GL1, izolovaná z půdy u stoky, vlastnila kompletní aparát pro rozklad gellanu i xanthanu [53] a produkovanou extracelulární gellan lyasou rozložila polysacharid na tetrasacharidové fragmenty. Intracelulární asimilace byla uskutečněna glukuronidasou (odštěpení glukuronylového kruhu), β -D-glukosidasou (vyjmutí glukosového kruhu) a α -L-rhamnosidasou, jež odděluje glukosu od rhamnosy [56].

Gellan degradujícím mikroorganismem, popsáným Otsukou a kolektivem, je gramnegativní bakterie *Brevifollis gellanilyticus* gen. nov., sp. nov., náležející dle výsledků analýzy genu pro 16S rRNA, do kmene *Verrucomicrobia*, s příbuzností k rodu *Prostheco bacter*. V databázi GenBank lze sekvenci tohoto půdního mikroorganismu najít pod číslem AB552872. Další nově popsání bakterie se schopností rozkládat tento exopolysacharid, která byla izolována z půdy a patří do kmene *Verrucomicrobia*, je označena jako *Roseimicrobium gellanilyticum* gen. nov., sp. nov. (sekvence v GenBank s kódem AB552861). Izolovat tyto bakterie nebylo jednoduché, vzhledem k tomu, že spadají do kmene *Verrucomicrobia*, pro jehož zástupce je charakteristická obtížná kultivace. Japonští vědci v čele s Shigetem Otsukou použili pro kultivaci gellan degradujících konsorcií pevnou půdu s gellanem v koncentraci 2%, obohacenou o živé buňky řasy *Chlorella vulgaris* [57, 58].

2 CÍLE PRÁCE

Verrucomicrobium sp. GD je bakteriální kultura schopná tvorby prosték, rozkladu extracelulárního polysacharidu gellanu a také xanthanu i alginátu.

Literární rešerše pojednává o biofilmech, extracelulárním polysacharidu gellanu a jeho možnosti degradace, o zkoumaném bakteriálním kmenu *Verrucomicrobium* sp. GD a o ostatních degradérech gellanu.

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit a blíže specifikovat podmínky média a hlavního utilizovatelného zdroje uhlíku vhodné pro růst kultury GD a tvorbu prosték.

V dalším bodu mělo být zjištěno, zda kultura GD produkuje enzymy schopné rozkládat flatulentní sacharidy luštěnin – raffinosu a stachyosu.

Bakalářská práce měla prozkoumat možnost kultury *Verrucomicrobium* sp. GD svým růstem inhibovat bakteriální kultury tvořící biofilmy, jež jsou klinicky a potravinářsky významné.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a metodika

3.1.1 Chemikálie, roztoky a živná média

Bylo pracováno s běžným laboratorním sklem a pomůckami. Pokud nebylo uvedeno jinak, byly použity chemikálie čistoty p.a. dodané firmou Lachema Neratovice, ČR. Gellan (Gellan Gum) použitý v práci byl zakoupen od firmy Fluka, SRN.

Fyziologický roztok (FR)

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 8,5 g NaCl v 1000 ml destilované vody. Roztok byl důkladně promíchán a dle účelu použití sterilizován.

Roztok stopových prvků (rSP)

Pro výrobu 1000 ml rSP bylo potřeba:

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

Byla navážena množství těchto chemikálií, rozpuštěna v 1 l destilované vody a vše dostatečně promícháno.

Základ pro minerální agar

1,9 g základu pro minerální agar obsahuje:

K ₂ HPO ₄	0,1 g
NH ₄ Cl.....	0,11 g

MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,02 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,005 g
CaCl ₂	0,002 g
Agar.....	1,6 g

Pro výrobu 100 ml minerálního agaru se přidá 0,1 ml roztoku stopových prvků a 100 ml destilované vody.

Minerální agar s glukosou (MA+glu)

100 ml minerálního agaru bylo připraveno:

Základ pro minerální agar.....	1,9 g
D-glukosa.....	0,5 g
Kvasničný autolyzát (HIMEDIA).....	0,01 g
Roztok stopových prvků.....	0,1 ml

Dané složky byly naváženy do skleněné lahve, rozpuštěny ve 100 ml destilované vody a sterilizovány při 115°C po dobu 30 minut.

Minerální agar s gellanem (MA+gel)

100 ml minerálního agaru bylo připraveno:

Základ pro minerální agar.....	1,9 g
Gellan (deacylovaný, p.a., FLUKA).....	0,5 g
Kvasničný autolyzát (HIMEDIA).....	0,01 g
Roztok stopových prvků.....	0,1 ml

Dané složky byly naváženy a rozpuštěny ve 100 ml destilované vody a sterilizovány při 115°C po dobu 30 minut.

Minerální médium s kvasničným autolyzátem (MM)

100 ml minerálního média bylo připraveno:

Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (23,9 g/l).....	8 ml
Roztok KH_2PO_4 (9,078 g/l).....	2 ml
Roztok NH_4Cl (50 g/l).....	1 ml
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l).....	1 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l).....	1 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l).....	1 ml
Roztok NaCl (50 g/l).....	1 ml
Roztok stopových prvků.....	0,1 ml
Kvasničný autolyzát (HIMEDIA).....	0,01 g
Destilovaná voda.....	85 ml

Do 100 ml lahve byl navážen kvasničný autolyzát a doplněn příslušnými objemy roztoků a destilované vody. Vše bylo důkladně promícháno.

Minerální médium s glukosou (MM+glu)

100 ml minerálního média s glukosou o koncentraci 5 g/l bylo připraveno:

D-glukosa.....	0,5 g
Kvasničný autolyzát (HIMEDIA).....	0,01 g
Minerální médium (MM).....	100 ml

Glukosa a autolyzát byly rozpuštěny ve 100 ml minerálního média. Po dostatečném promíchání bylo médium sterilizováno.

Minerální médium s gellanem (MM+gel)

100 ml minerálního média s gellanem o koncentraci 5 g/l bylo připraveno:

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

Gellan byl s autolyzátem rozpuštěn ve 100 ml minerálního média. Po dostatečném promíchání bylo médium sterilizováno.

Gellanový gel měkký (GGm)

Ve 100 ml teplého minerálního média (MM) bylo rozpuštěno 1,6 g gellanu, promícháno a poté sterilizováno.

TYA agar

Pro přípravu 100 ml TYA agaru je potřeba:

Tryptonový agar s kvasničným extraktem (HIMEDIA).....	2,1 g
Destilovaná voda.....	100 ml

Agar byl navážen do skleněné lahve, doplněn destilovanou vodou a promíchán. Následně byl sterilizován. Pro výrobu TYA agaru s glukosou o koncentraci 5 g/l je nutno přidat 0,5 g glukosy.

TSB bujón s glukosou (TSB+glu)

Pro přípravu 100 ml bujónu s glukosou o koncentraci 5 g/l bylo použito:

Trypton (HIMEDIA).....	3,4 g
Sojový pepton (HIMEDIA).....	0,6 g
NaCl.....	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
D-glukosa.....	0,5 g
Destilovaná voda.....	100 ml

Všechny tuhé komponenty byly naváženy a smíchány se 100 ml destilované vody, důkladně promíchány a výsledný bujón byl sterilizován.

3.1.2 Použité kultury mikroorganismů

Enterococcus faecalis CCM 2665

Enterococcus faecalis CCM 4224

Enterococcus faecalis CCM 7000

Escherichia coli CCM 3954

Escherichia coli CCM 3988

Klebsiella pneumoniae CCM 4415

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

Pseudomonas aeruginosa FT 0

Pseudomonas aeruginosa FT 1

Pseudomonas aeruginosa FT 2

Pseudomonas aeruginosa FT 3

Pseudomonas aeruginosa FT 4

Staphylococcus aureus CCM 2022

Staphylococcus aureus CCM 3953

Staphylococcus epidermidis CCM 4418

Staphylococcus epidermidis CCM 7221

Staphylococcus epidermidis FT 1

Verrucomicrobium sp. GD (ze sbírky ÚIOŽP)

3.1.3 Přístrojové vybavení

Analyzátor uhlíku, typ 5000 A, výrobce Shimadzu (Japonsko)

Aseptický laminární box, typ Bio-II-A, výrobce Telstar (Španělsko)

Autokláv SANOclav, typ LaS-3-20-MCS-J, výrobce Dekra (Německo)

Biologický termostat, typ BT 120 (ČR)

Centrifuga, typ MR23i, výrobce Jouan (Francie)

Fotoaparát, typ N547, výrobce Olympus (Japonsko)

Fotometr, typ Sunrise, výrobce Tecan (Rakousko)

Mikrodávkače, 1 - 5 ml, 100 - 1000 μ l, 20 - 200 μ l, výrobce Biohit (Finsko)

Mikroskop, typ CX41 RF, výrobce Olympus (Japonsko)

Minishaker, typ MS1, výrobce Ika (Brazílie)

Mrazicí box, typ Mybio, výrobce Dairei (Dánsko)

Software QuickPHOTO PRO 2.0, výrobce Olympus (Japonsko)

Třepačka vratná, typ 3018, výrobce GFL (Německo)

Váhy, typ SI-64 A, výrobce Denver Instrument (Německo)

AFM mikroskop, typ NTEGRA Prima, výrobce NT-MDT

Sonda pro AFM, typ NSG10 pro nekontaktní módy, výrobce NT-MDT

3.1.4 Postupy a analýzy

Kultivace zkoumané bakteriální kultury

Prvním krokem pro výzkum kultury *Verrucomicrobium* sp. GD bylo vyočkování buněk z archivovaného izolátu, který byl uložen při -80°C v mrazicím boxu v laboratoři ÚIOŽP. Po vyjmutí mikroskopavky s biomasou z mrazáku a ohřátí na laboratorní teplotu, byl proveden vyžíhanou a vychladlou kličkou křížový roztěr na plotny gellanového měkkého gelu a minerálního agaru s glukosou. Inokulované Petriho misky byly kultivovány 7 dní při 25°C .

Z takto namnožených kolonií se očkovala další tuhá či tekutá média (inokulace vyžíhanou kličkou) dle potřeby následujících pokusů.

Mikroskopie kultury *Verrucomicrobium* sp. GD

- **Nativní preparát**

Na podložní sklíčko bylo nanášeno 10 - 20 μ l sterilního fyziologického roztoku a v něm dokonale rozmícháno malé množství biomasy kultury GD (v případě kultury v tekutém médiu bylo na sklíčko nanášeno 10 - 20 μ l suspenze přímo).

Vrstva byla přiklopena krycím sklíčkem, na které byl nakápnut imersní olej. Pozorování proběhlo za použití fázového kontrastu při zvětšení 1000x.

- **Barvený preparát**

Na podložní sklíčko bylo kápnuto 10 - 20 μl sterilního fyziologického roztoku a v něm dokonale rozmícháno malé množství biomasy kultury GD (v případě kultury v tekutém médiu bylo na sklíčko naneseo 10 - 20 μl suspenze přímo) a následně byla vrstva usušena (bez fixace). Po dostatečném oschnutí byl preparát barven krystalickou violetí po dobu 1 minuty, opláchnut destilovanou vodou a osušen. Pozorování proběhlo s imersním olejem při zvětšení 1000x.

- **Fixovaný preparát**

Doprostřed podložního sklíčka bylo kápnuto 10 - 20 μl sterilního fyziologického roztoku a v něm dokonale rozmícháno malé množství biomasy kultury GD (v případě kultury v tekutém médiu bylo na sklíčko naneseo 10 - 20 μl suspenze přímo). Sklíčko se nechalo uschnout a poté bylo třikrát protaženo plamenem kahanu nanesenou vrstvou vzhůru. Po vychladnutí se s preparátem dále pracovalo.

- **Preparát dle Grama**

Připravený fixovaný preparát se převrstvil krystalovou violetí po dobu 60 s, po uplynutí této doby bylo barvivo slito a sklíčko opatrně oplachováno destilovanou vodou 5 s tak, aby proud stříčky mířil nad nanesenou vrstvu buněk a voda jemně stékala přes nátěr. Poté se nechal 30 s působit Lugolův roztok, následně slit a opláchnut vodou cca 2 s. Preparát bylo potřeba odbarvovat acetonem nebo ethanolem 20 - 30 s a jako poslední barvicí složka se uplatnil karbolfuchsin či safranin s dobou působení nanejvýš 1 minutu. Barvivo bylo spláchnuto vodou a sklíčko s preparátem opatrně osušeno filtračním papírem a dosušeno vysoko nad plamenem. Na usušený nátěr se aplikoval imersní olej a hotový preparát obarvený Gramovým barvením byl připraven pro mikroskopování při tisícinásobném zvětšení.

- **Příprava preparátu pro AFM mikroskop**

Do každé ze 4 mikroskopavek bylo přidáno 1 ml suspenze GD, z toho do jedné navíc 10 μl glutaraldehydu (výsledná koncentrace GA byla 1 %) a do druhé 10 μl 10% roztoku glutaraldehydu (výsledná koncentrace GA byla 0,1 %). Zbylé 2 mikroskopavky byly ponechány bez přídavku GA. Po 5 minutách působení glutaraldehydu byly všechny suspenze podrobeny centrifugací v režimu 2000g po

dobu 15 minut. Následně byl supernatant slit a k sedimentům bylo do prvních dvou zkumavek přidáno po 1 ml fyziologického roztoku s 0,1% koncentrací GA, do třetí mikrozkušavky 1 ml fyziologického roztoku a 10 μ l GA a do čtvrté 1 ml fyziologického roztoku a 10 μ l 10% roztoku GA. Obsahy plastových mikrozkušavek byly opatrně rozmíchány a centrifugovány 5 minut v režimu 2000g. Po uplynutí pěti minut v odstředivce byly supernatanty opět odstraněny, do každé mikrozkušavky se přidal 1 ml destilované vody, sediment byl jemně promíchán a potřetí centrifugován v režimu 3000g. Supernatant byl opatrně odsát špičkou pipety a do každé mikrozkušavky se pipetovalo 100 μ l destilované vody, opět velmi opatrně byl obsah rozmíchán a následně bylo na krycí skličko přeneseno 10 μ l fixované suspenze buněk kultury GD. Fixovaná suspenze byla pečlivě rozetřena po skličku, pak převrstvena 20 μ l methanolu a vytvořená vrstva se nechala uschnout. Následně byly preparáty transportovány v Petriho miskách vystlaných vatou na Ústav fyziky a materiálového inženýrství (ÚFMI). Zde byly vzorky podrobeny měření metodikou AFM (mikroskopie atomárních sil) v semikontaktním módu při laboratorní teplotě (25°C). Měření provedl Ing. Antonín Minařík, Ph.D.

Rozklad raffinosy a stachyosy

- **Stanovení koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC)**

Ke zjištění, zda kultura GD využívá sacharidy raffinosy a stachyosu, byla použita analýza rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v tekutém médiu, kde zmíněné sacharidy sloužily jako hlavní zdroj uhlíku pro naočkovanou kulturu.

Pro pokus bylo nutno připravit sterilní minerální médium se stachyosou nebo raffinosou. Minerální médium bylo vyrobeno dle postupu v kapitole 3.1.1 (s poloviční koncentrací kvasničného autolyzátu) a do každé z osmi lahvíček o objemu 100 ml se nalilo 9 ml MM. Lahvičky byly sterilizovány při 121°C po dobu 25 minut. Dále byly připraveny zásobní roztoky obou sacharidů o koncentraci 3000 mg/l tak, že 30 mg každého sacharidu bylo rozpuštěno zvlášť v 10 ml destilované vody a roztok byl přes filtr MILLIPORE 0,22 μ m přefiltrován do sterilních zkumavek. Do tří lahvíček se sterilním MM bylo pipetou se sterilní špičkou dávkováno po 1 ml zásobního roztoku stachyosy a do dalších tří lahvíček po 1 ml zásobního roztoku raffinosy, takže výchozí koncentrace sacharidů byla 300

mg/l. Do každé lahvičky byla naočkována kultura *Verrucomicrobium* sp. GD v množství 50 µl suspenze o zákalu 2. stupně McFarlandovy škály. K přípravě suspenze se použily buňky narostené po třech dnech na MA+glu a sterilní fyziologický roztok. Lahvičky byly kultivovány na třepačce při 25°C. Pro stanovení vstupní koncentrace DOC ještě před kultivací byly použity inokulované lahvičky, přesněji 2 se stachyosou, 2 s raffinósou a 2 bez obsahu sacharidu. Do čistých kádinek bylo z každé lahve s MM a daným sacharidem odebráno 2,5 ml a následně se tento objem zředil 5 ml destilované vody (ředění 1:2, tedy 3x) a přefiltroval přes MILLIPORE 0,22 µm do vzorkovnic pro automatický analyzátor uhlíku. Stanovení DOC bylo provedeno i v lahvích s MM bez sacharidu, kde se ovšem obsah již neředil.

Množství rozpuštěného organického uhlíku se poté měřilo po 2, 6 a 14 dnech od počátku kultivace kultury GD, kdy se k analýze používaly tři lahvičky se stachyosou a tři s raffinósou. Asepticky se odebíralo po 2,5 ml suspenze do kádinek, ředilo 5 ml destilované vody, důkladně promíchalo a filtrovalo do vzorkovnic. Na filtraci paralelních lahviček bylo možno použít stejný filtr, pokud nedošlo k jeho ucpání.

Postupy měření schopnosti tvorby biofilmu

- **1. pokus**

Kultivace biofilmových kultur a kultury GD

Byly použity následující biofilmové kultury: *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Staphylococcus epidermidis* FT 1, *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415 a *Pseudomonas aeruginosa* FT 0. Pokud není za latinským názvem mikroorganismu uvedeno katalogové číslo CCM, jedná se o izoláty ze sbírky ÚIOŽP. Bakteriální kmeny se křížovým roztěrem vyočkovaly z mikrozkuvek uložených v mrazáku při -80°C, na plotny s TYA agarem a nechaly kultivovat při 37°C 2 dny před vlastními testy. Kultura *Verrucomicrobium* sp. GD byla již narostená v minerálním médiu s gellanem.

Očkování mikrotitrační destičky

Nejprve bylo nutno připravit suspenze biofilmových kultur ve fyziologickém roztoku o zákalu 2. stupně McFarlandovy škály tak, že bylo v laminárním boxu

z každého agaru s nakultivovanou kulturou asepticky nabráno inokulum a rozmícháno ve zkumavce se sterilním FR. Suspenze kultury GD se odebírala po promíchání přímo z kultivačních lahví (7 dní staré).

Do sloupců 1, 2, 4, 5, 7, 8 a 10, 11 se dávkovalo 160 μ l TSB.

Do jamek sloupců 1, 4, 7 a 10 se přidalo po 20 μ l FR.

Do všech jamek sloupců 2, 5, 8 a 11 bylo nadávkováno 20 μ l suspenze kultury GD.

Do všech jamek sloupců 1 a 2 se dávkovalo 20 μ l suspenze kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Do všech jamek sloupců 4 a 5 se dávkovalo 20 μ l suspenze kultury *Staphylococcus epidermidis* FT 1.

Do všech jamek sloupců 7 a 8 se dávkovalo 20 μ l suspenze kultury *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415.

Do všech jamek sloupců 10 a 11 se dávkovalo 20 μ l suspenze kultury *Pseudomonas aeruginosa* FT 0.

Celkem byl v každé naočkované jamce obsah o objemu 200 μ l. Mikrotitrační destička byla přiklopena víčkem a vložena v plastovém sáčku do termostatu vytemperovaného na teplotu 30°C po dobu 48 hodin.

Příprava destičky pro měření absorbance

Po uplynutí doby kultivace byla mikrotitrační destička vyjmuta z obalu, obsah jamek byl vylit či spíše opatrně ručně vytřepán do plastové vaničky. Jamky se 3x prolily fyziologickým roztokem za jemného protřepávání, s následným vylitím roztoku. Poté se vícekanálovým dávkovačem aplikovalo do všech jamek s kulturami 200 μ l roztoku krystalové violeti. Barvivo se nechalo působit 1 minutu, načech se vylilo a jamky se promyly destilovanou vodou. Důkladně se vytřepal obsah jamek a destička byla opatrně sušena vysoko nad plamenem kahanu otvory dolů. Po dostatečném osušení se pro rozpuštění violeti fixované v ulpělém biofilmu použila 33% kyselina octová. Do všech jamek s kulturami bylo nadávkováno 200 μ l kyseliny a nechalo se 10 minut reagovat. Po deseti minutách se destička transportovala do fotometru, kde byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Nakonec byl obsah jamek po změření potřebné charakteristiky vylit do vaničky, kde se přidalo Savo a destička byla s víčkem v sáčku uložena na určené místo pro nebezpečný odpad k autoklávování.

- **2. pokus**

Kultivace biofilmových kultur a kultury GD

Pro výzkum tvorby biofilmů se použily další biofilmové kultury: *Pseudomonas aeruginosa* FT 1, *Pseudomonas aeruginosa* FT 2, *Pseudomonas aeruginosa* FT 3, *Pseudomonas aeruginosa* FT 4 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Bakteriální kmeny se křížovým roztěrem vyočkovaly z mikrozku mávek uložených v mrazáku na plotny s TYA agarem a nechaly kultivovat při 37°C 2 dny před testy. Kultura *Verrucomicrobium* sp. GD byla již narostená v minerálním médiu s gellanem.

Očkování mikrotitrační destičky

Opět byly připraveny suspenze biofilmových kultur ve fyziologickém roztoku o zákalu 2. stupně McFarlandovy škály. Suspenze kultury GD se odebírala po promíchání přímo z kultivačních lahví (4 dny staré).

Do sloupců 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 se dávkovalo 160 µl TSB.

Do jamek sloupců 2, 4, 6, 8 a 10 se přidalo po 20 µl suspenze kultury GD.

Do všech jamek sloupců 1 a 2 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Pseudomonas aeruginosa* FT 1.

Do všech jamek sloupců 3 a 4 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Pseudomonas aeruginosa* FT 2.

Do všech jamek sloupců 5 a 6 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Pseudomonas aeruginosa* FT 3.

Do všech jamek sloupců 7 a 8 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Pseudomonas aeruginosa* FT 4.

Do všech jamek sloupců 9 a 10 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955.

Do všech jamek sloupců 1, 3, 5, 7 a 9 bylo přidáno 20 µl sterilního fyziologického roztoku.

Mikrotitrační destička byla přiklopena víčkem a vložena v plastickém sáčku do termostatu vytemperovaného na teplotu 30°C po dobu 48 hodin.

Příprava destičky pro měření absorbance

Tento postup byl shodný s postupem při prvním pokusu.

- **3. pokus**

Kultivace biofilmových kultur a kultury GD

Kultury pro výzkum tvorby biofilmů bylo nutné oživit z mikrozkumavek z mrazáku přeočkováním na TYA agar (*Escherichia coli* CCM 3954, *Enterococcus faecalis* CCM 2665) a oživit z lyofilizátů (*Escherichia coli* CCM 3988, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Enterococcus faecalis* CCM 7000). Lyofilizované kmeny byly oživeny tak, že skleněná ampule byla v místě zlomu naříznuta po obvodu nožikem a po přitlačení žhavé skleněné tyčinky na místo řezu byla odlomena špička se silikagelem. Ulomená špička byla vložena do dezinfekčního roztoku se Savem. Do otevřené ampule s kulturou bylo přidáno 250 µl sterilního TSB s glukosou a rozmícháno vychladlou vyžíhanou kličkou, kterou bylo nabráno malé množství suspenze na misku s TYA agarem. Papírek s vytištěným katalogovým číslem kultury byl přiložen na agar v neinokulovaném místě. Otevřená ampule se suspenzí byla zavíčkovaná alobalem a uložena do termostatu k případnému použití. Petriho misky s biofilmovými kulturami se nechaly inkubovat při teplotě 37°C po dobu 72 hodin. Napěstované bakteriální kultury potřebné k pokusu se znovu přeočkovaly na čerstvé TYA agary a uložily se do termostatu s teplotou 25°C na 72 hodin. Kultura *Verrucomicrobium* sp. GD byla již narostená v minerálním médiu s gellanem.

Očkování mikrotitrační destičky

Suspenze biofilmových bakteriálních kultur byly vytvořeny podle standardu zákalu 2. stupně McFarlandovy stupnice. Suspenze kultury GD se odebírala po promíchání přímo z kultivačních lahví (7 dní staré).

Do sloupců 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 se dávkovalo 160 µl TSB.

Do jamek sloupců 2, 4, 6, 8 a 10 se přidalo po 20 µl suspenze kultury GD.

Do všech jamek sloupců 1 a 2 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Escherichia coli* CCM 3954.

Do všech jamek sloupců 3 a 4 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Escherichia coli* CCM 3988.

Do všech jamek sloupců 5 a 6 se dávkovalo 20 µl suspenze *Enterococcus faecalis* CCM 4224.

Do všech jamek sloupců 7 a 8 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Enterococcus faecalis* CCM 7000.

Do všech jamek sloupců 9 a 10 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Enterococcus faecalis* CCM 2665.

Do všech jamek sloupců 1, 3, 5, 7 a 9 bylo přidáno 20 µl sterilního fyziologického roztoku.

Mikrotitrační destička byla přiklopena víčkem a vložena v plastickém sáčku do termostatu vytemperovaného na teplotu 30°C a kultivována po dobu 48 hodin.

Příprava destičky pro měření absorbance

Tento postup byl shodný s postupem při prvním pokusu.

- **4. pokus**

Kultivace biofilmových kultur a kultury GD

V posledním experimentu s biofilmy bylo pracováno s kulturami z lyofilizátů (*Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418) a s kulturou uloženou v mrazáku, přeočkovanou na TYA agar (*Staphylococcus aureus* CCM 2022). Lyofilizované kmeny byly oživeny způsobem popsáným u provedení 3. pokusu. Petriho misky s biofilmovými kulturami byly inkubovány při teplotě 37°C pět dní. Narostené kolonie poté bylo nutno přeočkovat na čerstvé TYA agary a uložit do termostatu s teplotou 37°C na 48 hodin. Kultura *Verrucomicrobium* sp. GD byla již narostená v minerálním médiu s gellanem.

Očkování mikrotitrační destičky

Suspenze biofilmových bakteriálních kultur se připravily podle standardu 2. stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Suspenze kultury GD se odebírala po promíchání přímo z kultivačních lahví (7 dní staré).

Do sloupců 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 a 11 se dávkovalo 160 µl TSB.

Do jamek sloupců 2, 5, 8, 10 a 11 se přidalo po 20 µl suspenze kultury GD.

Do všech jamek sloupců 1 a 2 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Staphylococcus aureus* CCM 2022.

Do všech jamek sloupců 4 a 5 se dávkovalo 20 µl suspenze kultury *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418.

Do všech jamek sloupců 7 a 8 se dávkovalo 20 µl suspenze *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221.

Do všech jamek sloupců 1, 4, 7, 10 a 11 bylo přidáno 20 µl sterilního fyziologického roztoku.

Mikrotitrační destička byla přiklopena víčkem a vložena v plastickém sáčku do termostatu vytemperovaného na teplotu 30°C a kultivována po dobu 48 hodin.

Příprava destičky pro měření absorbance

Tento postup byl shodný s postupem při prvním pokusu.

- **Statistické zpracování výsledků pomocí *t*-rozdělení**

Pro vyhodnocení průkaznosti rozdílu mezi tvorbou biofilmu v kontrolních pokusech a tvorbou biofilmu za přítomnosti kultury *Verrucomicrobium* sp. GD byl použit Studentův nepárový *t*-test, popsáný v publikaci Hendla, který porovnává hodnoty pokusné skupiny (kde byl aplikován pokusný zásah) a kontrolní skupiny (kde aplikace pokusného zásahu provedena nebyla). Nejprve byly z naměřených dat absorbance vyjmuty hodnoty těch jamek, u kterých bylo pozorováno zbarvení krystalovou violetí nad původní hladinou média (a které se výrazně lišily od ostatních). V programu MS Excel byl poté proveden aritmetický průměr hodnot x v jednotlivých souborech μ , určil se počet hodnot v souborech n a počet stupňů volnosti ($n - 1$), směrodatná odchylka SD a rozptyl umocněním SD^2 . Počet stupňů volnosti v souboru vynásobený rozptylem poskytl hodnotu B . Výpočet testovacího kritéria t dle rovnice (1) byl realizován následovně:

$$t = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{\frac{B_1 - B_2}{(n_1 + n_2) - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}} \quad (1)$$

kde:

μ - aritmetický průměr hodnot v souboru

B - počet stupňů volnosti v souboru * rozptyl

n - počet hodnot v souboru.

Pokud je hodnota t vyšší než kritická hodnota tabulková pro počet stupňů volnosti ($n_1 + n_2 - 2$), na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pak lze zamítnout nulovou hypotézu o rovnosti průměrů [59].

4 VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST

4.1 Výsledky

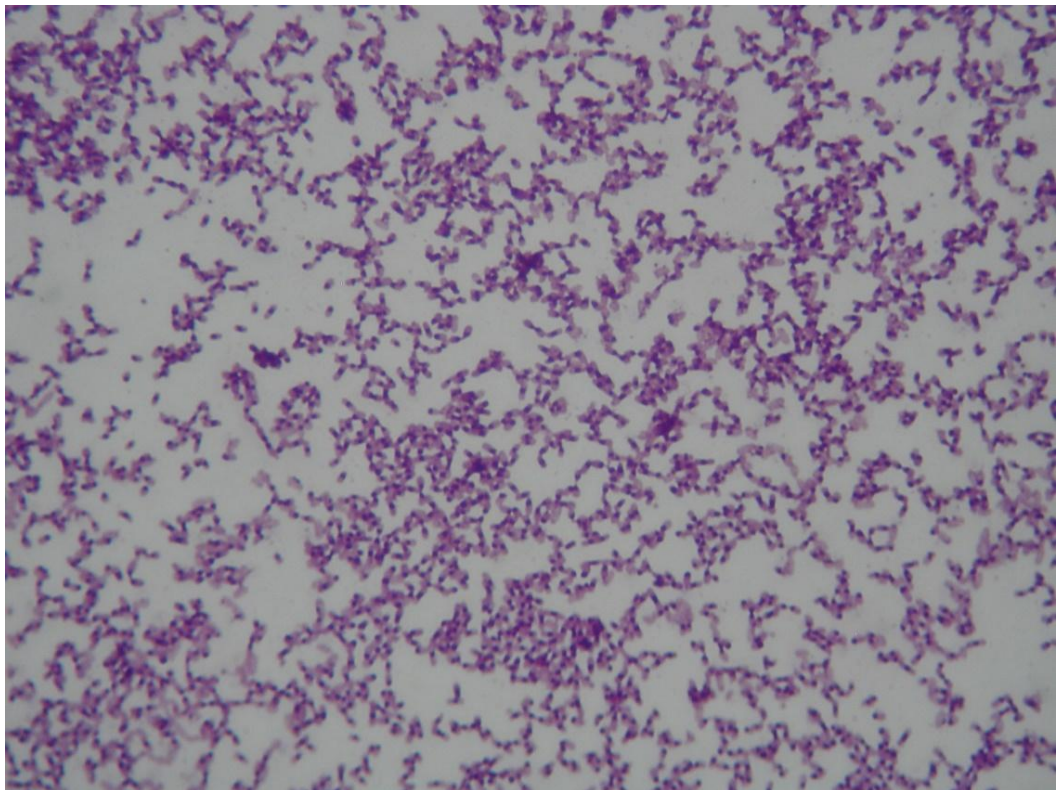
4.1.1 Mikroskopie kultury *Verrucomicrobium* sp. GD

Účelem tohoto postupu bylo zjistit, jaký typ média a jaký charakter hlavního zdroje uhlíku je z hlediska tvorby prosték pro kulturu GD nejvýhodnější.

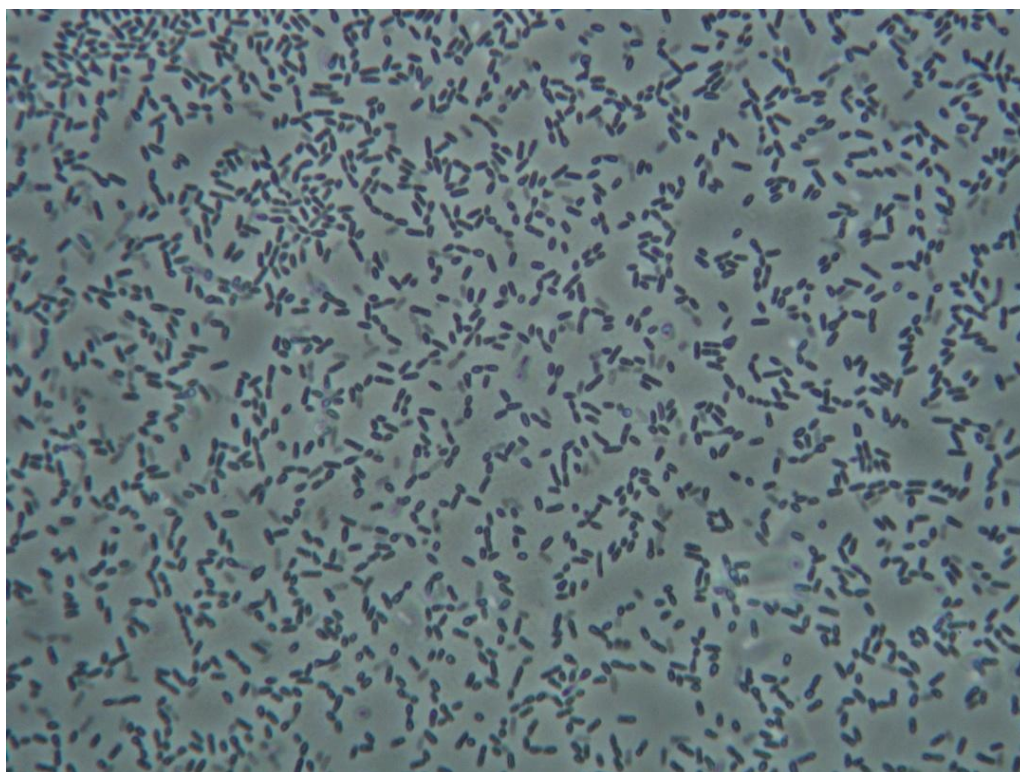
1. série snímků z optického mikroskopu

Preparáty byly zhotoveny z buněk pomnožených na tuhém médiu s gellanem (MA+gel), tuhém médiu s glukosou (MA+glu), v tekutém médiu s gellanem (MM+gel) a v tekutém médiu s glukosou (MM+glu). Všechna média byla kultivována při teplotě 25°C. Tekutá média byla uložena na třepačce. Kultura byla odebírána k přípravě preparátů v časových intervalech tří, pěti, sedmi a dvanácti dnů. Všechny preparáty byly pozorovány při zvětšení 1000x, po obarvení krystalovou violetí. Vzhledem k průkaznosti určitých znaků a názornosti jsou z množství pořízených snímků uvedeny jen některé.

- po 3 dnech kultivace:

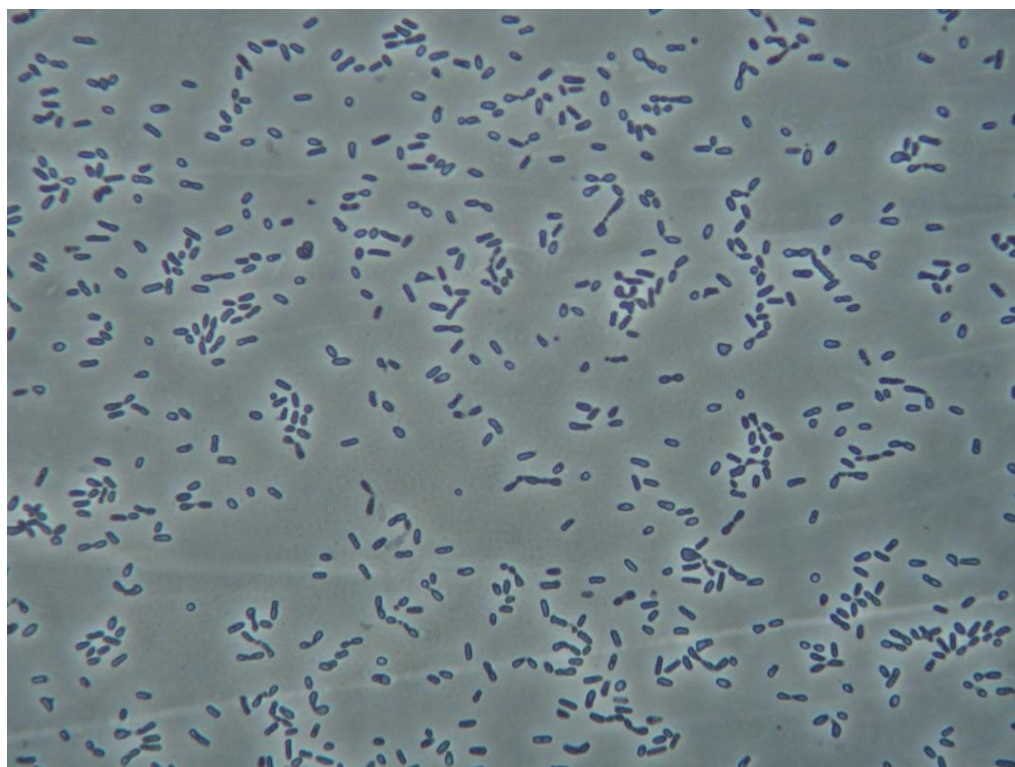


Obrázek 2: Kultura GD z MA+glu, 3. den růstu, krystalová violet'

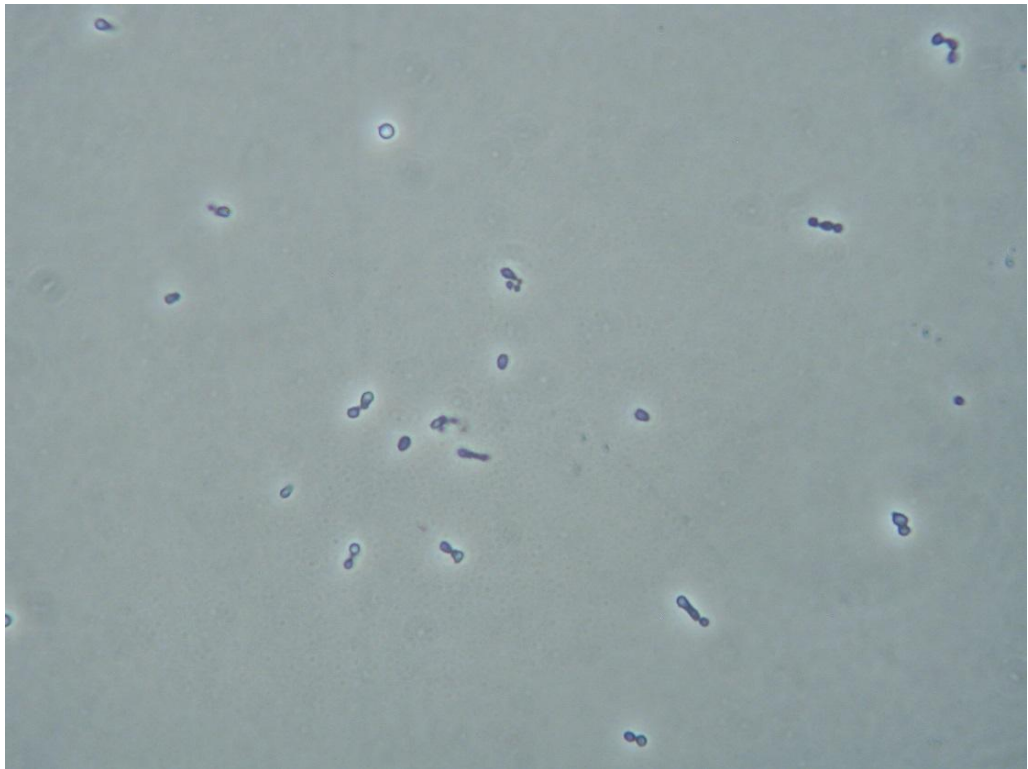


Obrázek 3: Nativní preparát kultury GD z MA+glu, 3. den růstu, fázový kontrast

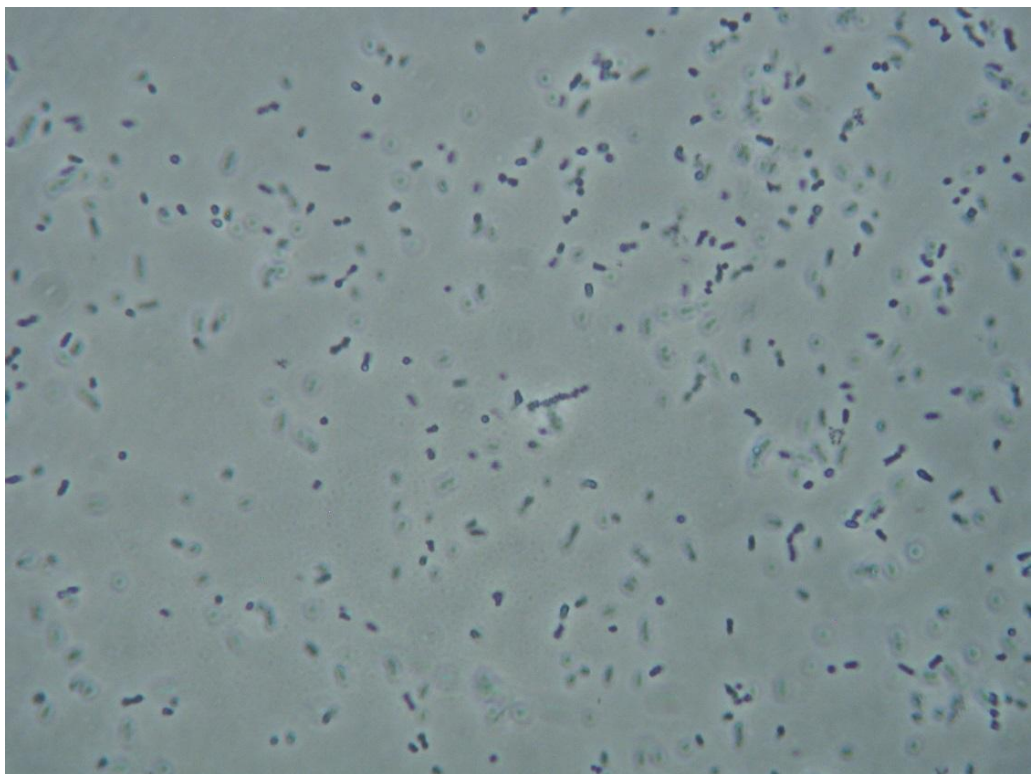
- po 5 dnech kultivace:



Obrázek 4: Nativní preparát kultury GD z MA+glu, 5. den růstu, fázový kontrast

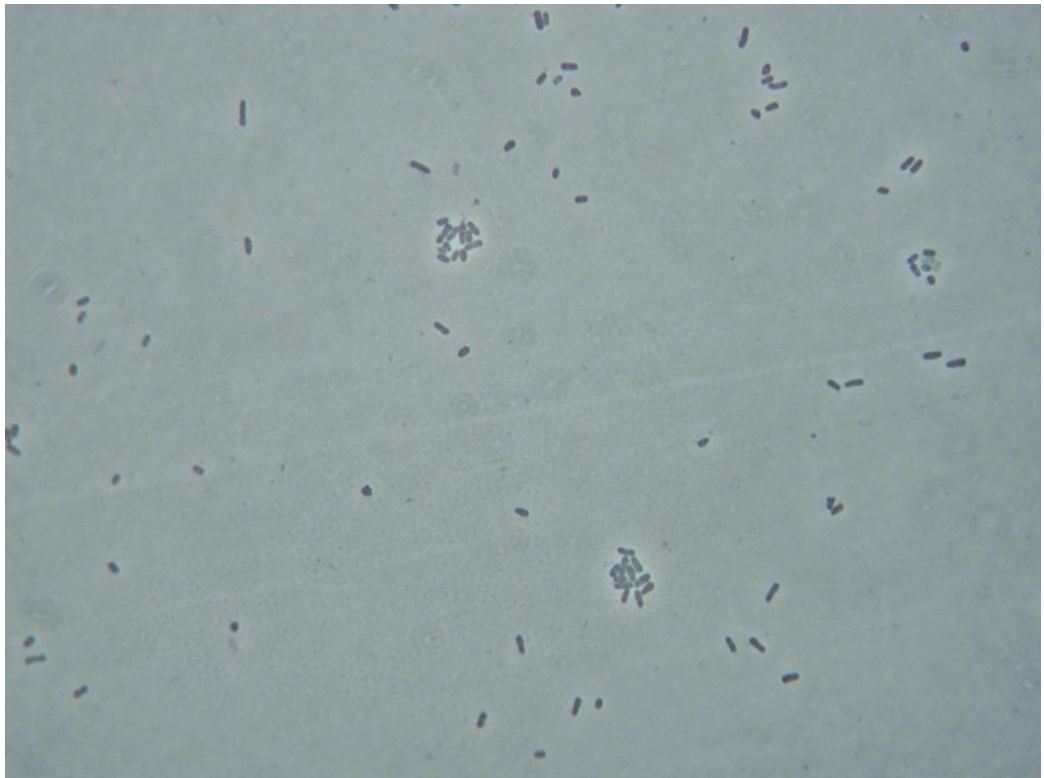


Obrázek 5: Nativní preparát kultury GD z MM+glu, 5. den růstu, fázový režim

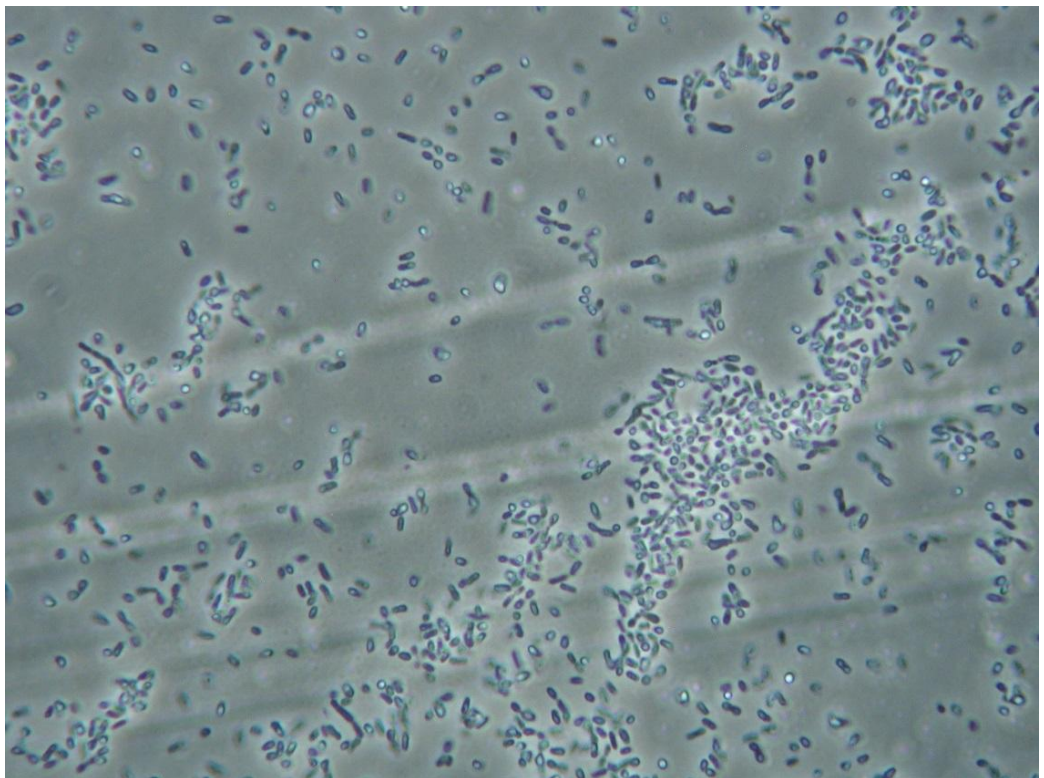


Obrázek 6: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 5. den růstu, fázový kontrast

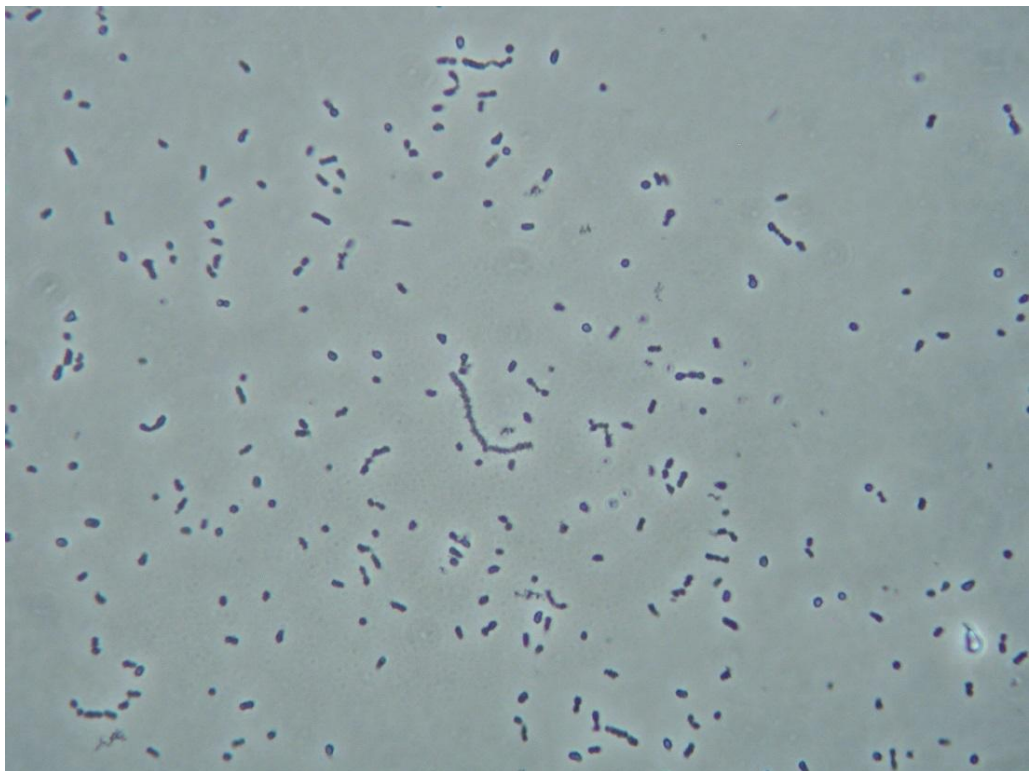
- po 7 dnech kultivace:



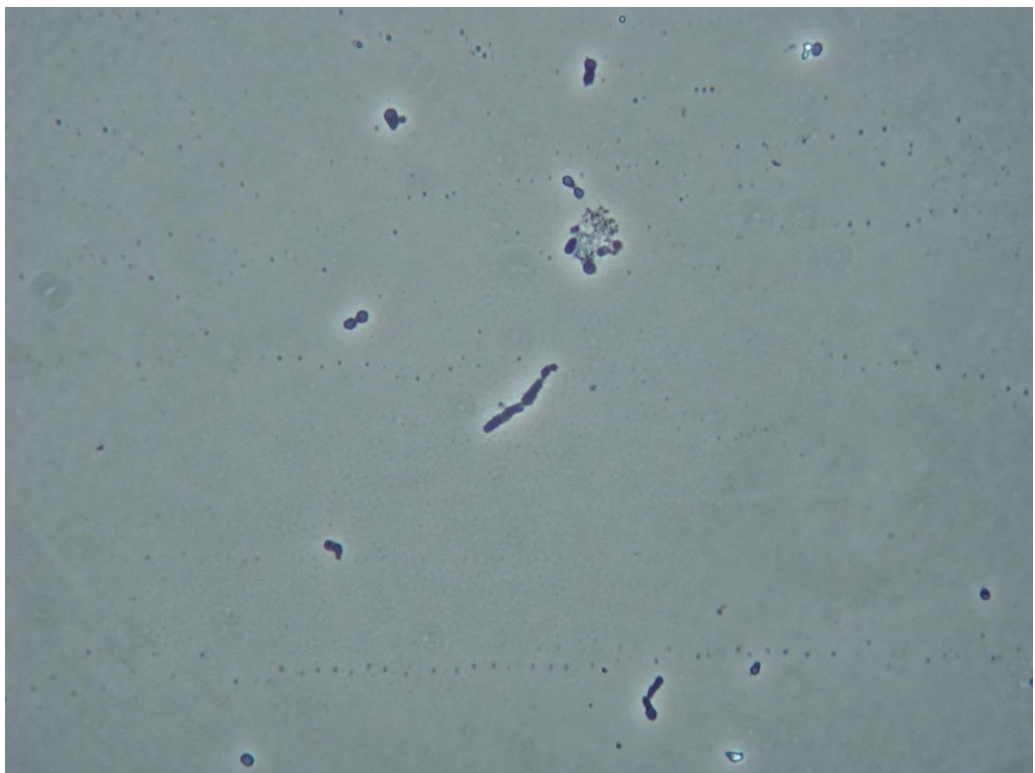
Obrázek 7: Nativní preparát kultury GD z MA+gel, 7. den růstu, fázový kontrast



Obrázek 8: Nativní preparát kultury GD z MA+glu, 7. den růstu, fázový kontrast

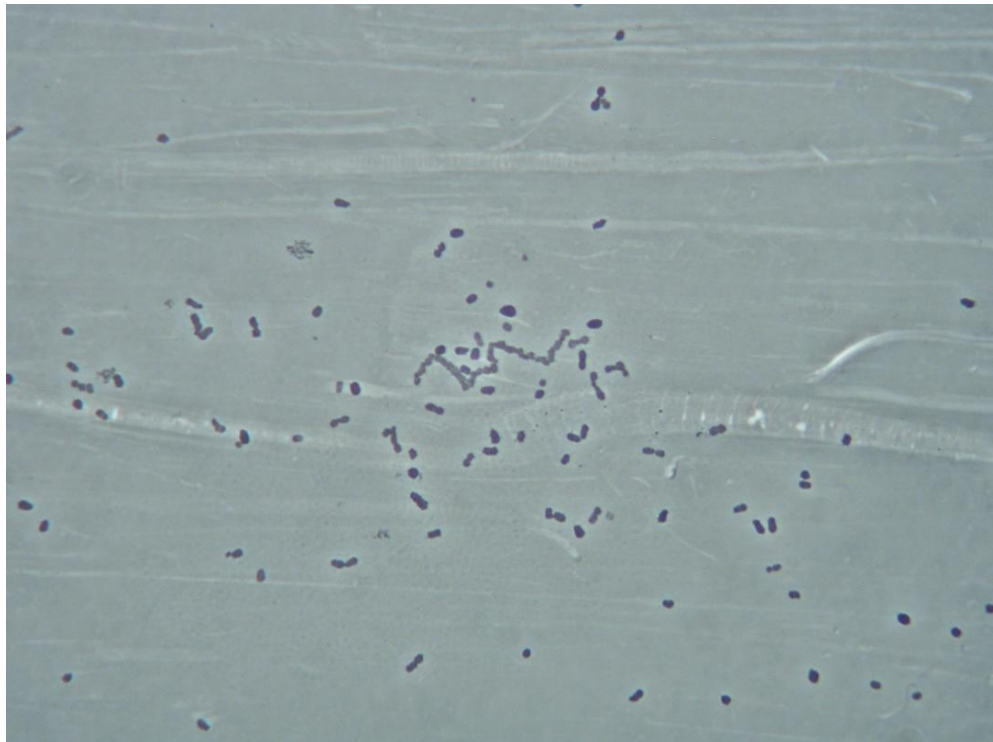


Obrázek 9: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 7. den růstu, fázový kontrast

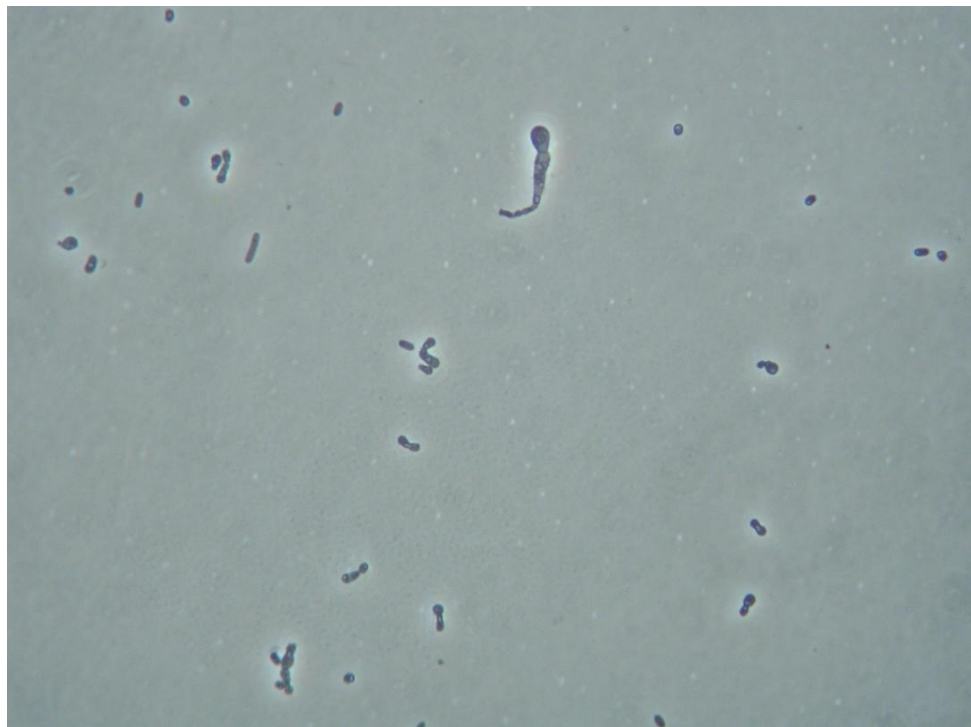


Obrázek 10: Nativní preparát kultury GD z MM+glu, 7. den růstu, fázový kontrast

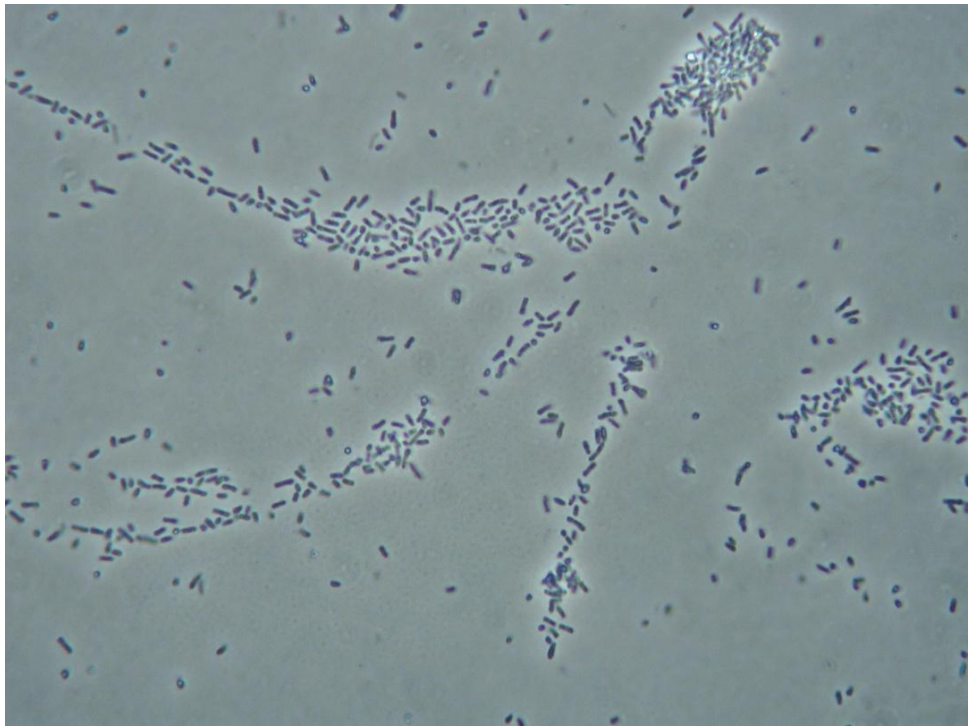
- po 12 dnech kultivace:



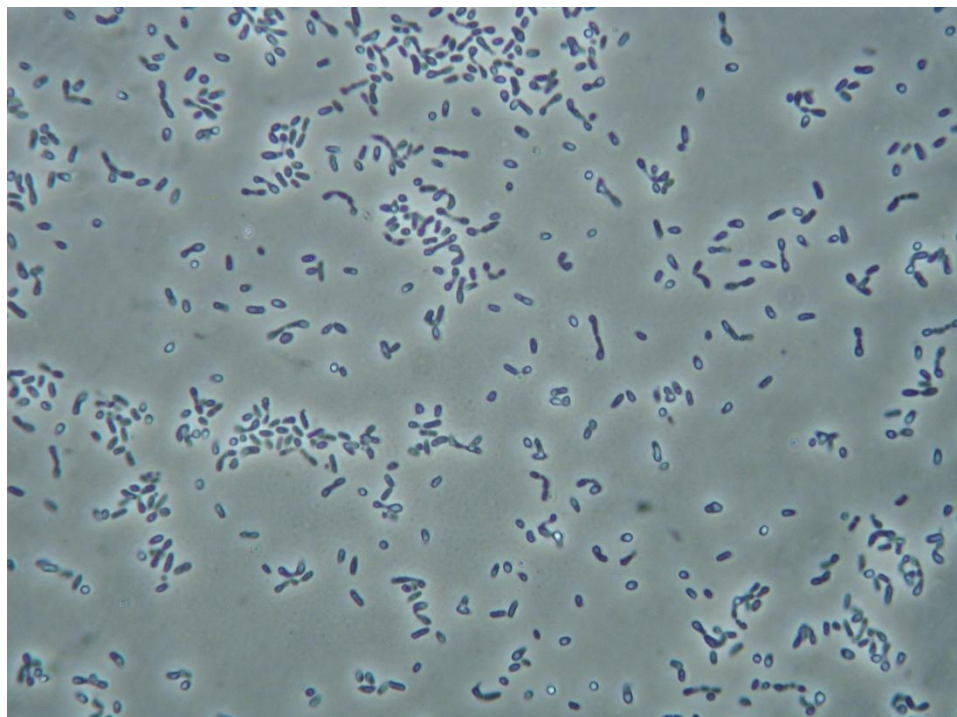
Obrázek 11: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 12. den růstu, fázový kontrast



Obrázek 12: Nativní preparát kultury GD z MM+glu, 12. den růstu, fázový kontrast



Obrázek 13: Nativní preparát kultury GD z MA+gel, 12. den růstu, fázový kontrast

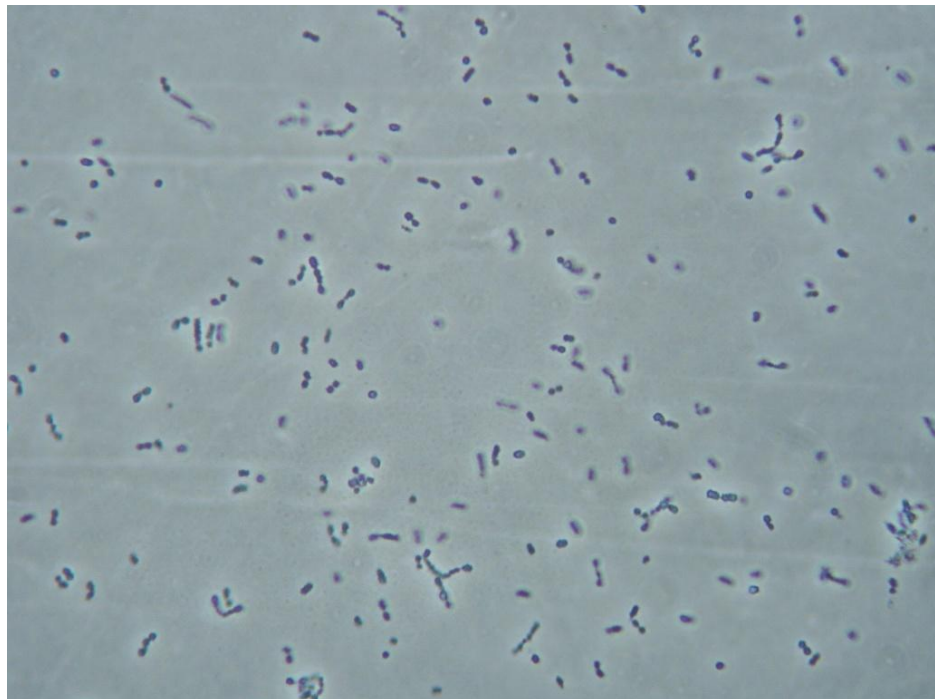


Obrázek 14: Nativní preparát kultury GD z MA+glu, 12. Den růstu, fázový kontrast

2. série snímků z optického mikroskopu

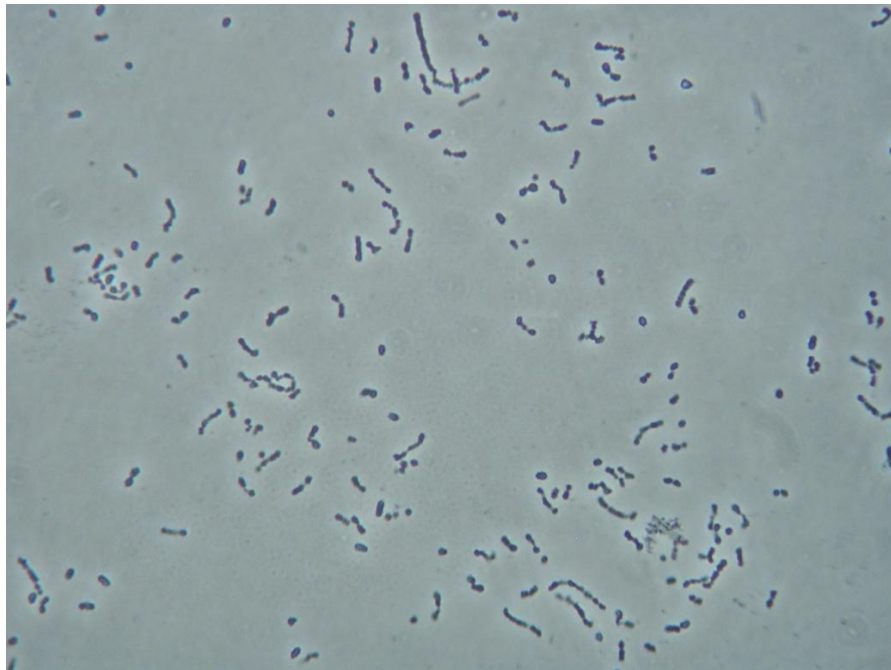
Pro zhotovení preparátů byla použita pouze biomasa kultivovaná při teplotě 25°C v tekutém médiu s gellanem (MM+gel). Lahve s inokulovanými médii byly uloženy na třepačce. Suspenze kultury GD byla odebírána k přípravě preparátů po pěti a sedmi dnech kultivace. Bylo pracováno s tisícinásobným zvětšením.

- po 5 dnech kultivace:



Obrázek 15: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 5. Den růstu, fázový kontrast

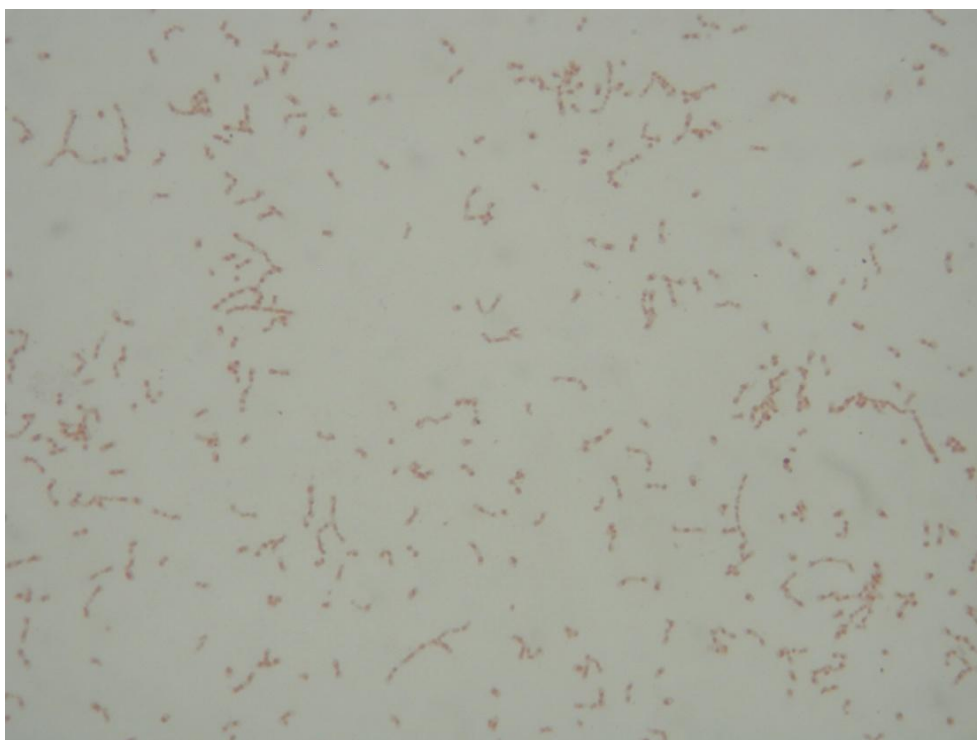
- po 7 dnech kultivace:



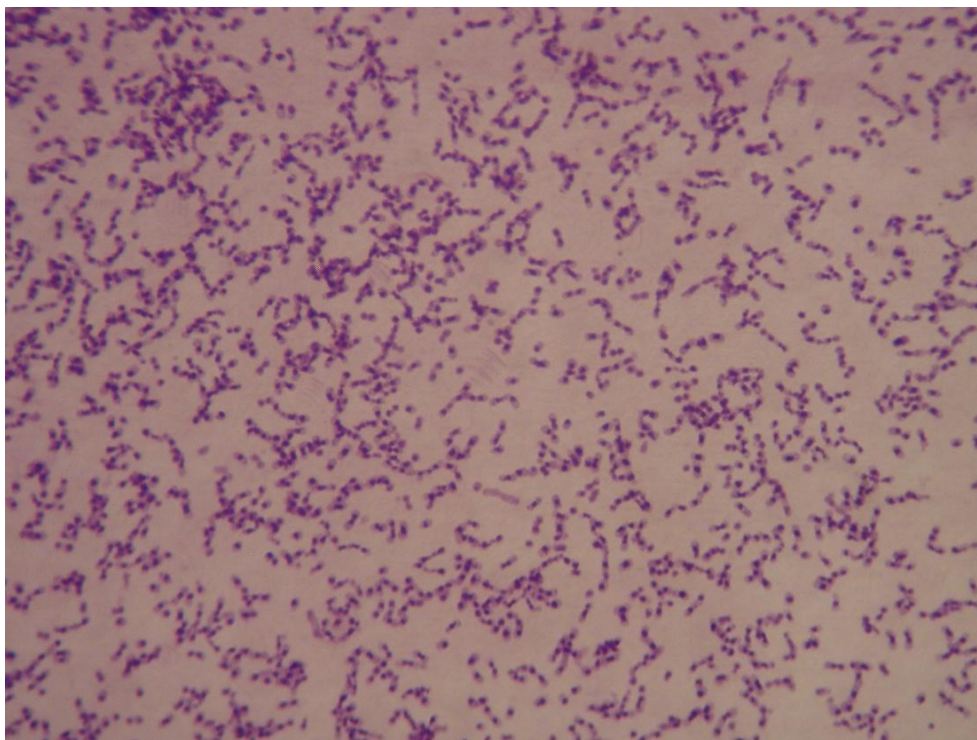
Obrázek 16: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 7. den růstu, fázový kontrast

3. série snímků z optického mikroskopu

Pro zhotovení preparátů barvených Gramovou metodou a pouze krystalovou violetí byla použita biomasa kultivovaná při teplotě 25°C v tekutém médiu s gellanem (MM+gel). Lahve s inokulovanými médii byly uloženy na třepačce. V době odběru suspenze byla narostená kultura GD stará 8 dnů. Bylo pracováno s tisícinásobným zvětšením.



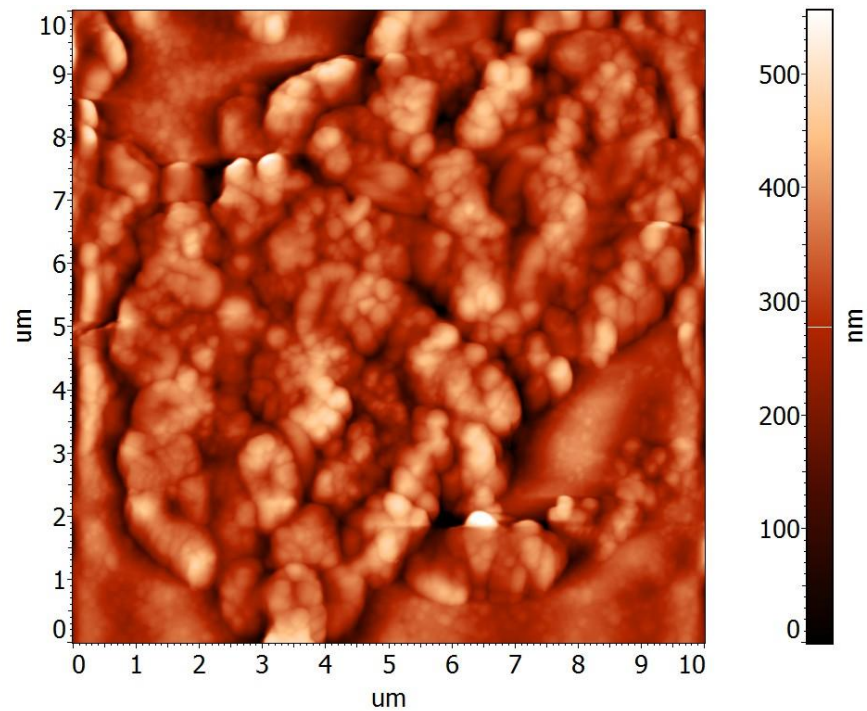
Obrázek 17: Kultura GD z MM+gel, Gramovo barvení, 8. den růstu



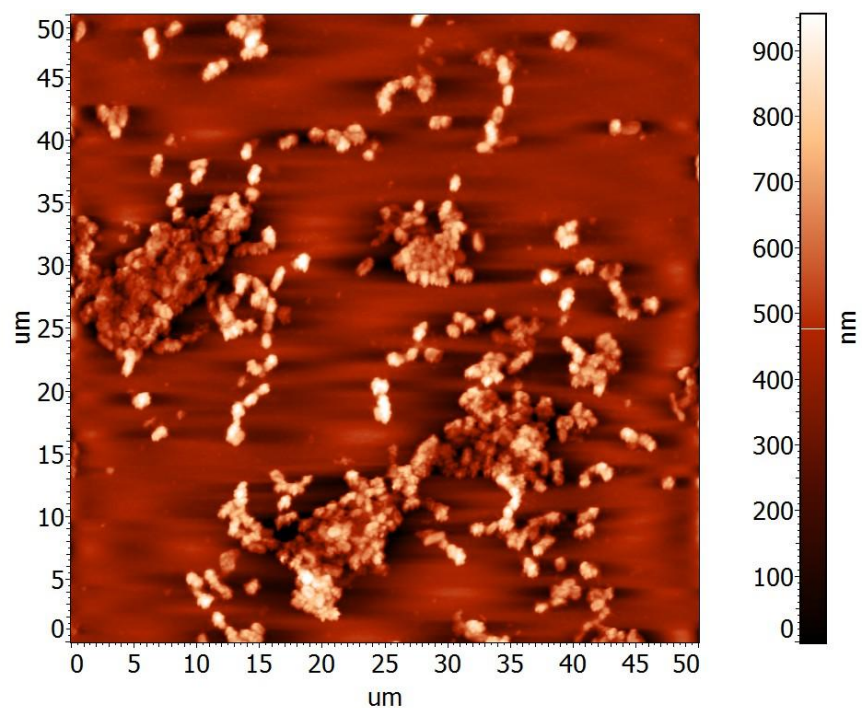
Obrázek 18: Kultura GD z MM+gel, krystalová violet, 8. den růstu

Snímky z AFM mikroskopu

Glutaraldehydem fixované preparáty byly podrobeny topografickému měření povrchu pomocí mikroskopu skenující sondou. Byly pořízeny snímky skenování plochy o rozměru 10x10 μm a 50x50 μm .



Obrázek 19: Povrch preparátu o velikosti 10x10 μm



Obrázek 20: Povrch preparátu o velikosti 50x50 μm

4.1.2 Rozklad raffinosy a stachyosy

V této části experimentu byla sledována schopnost kultury *Verrucomicrobium* sp. GD rozkládat raffinosu a stachyosu, a to pomocí sledování změn koncentrací rozpuštěného organického uhlíku v inokulovaném růstovém médiu v průběhu kultivace. Minerální médium obsahovalo raffinosu či stachyosu jakožto hlavní zdroj uhlíku. Motivací této části práce bylo případné budoucí využití mikrobiálních enzymů k rozkladu flatulentních sacharidů luštěnin před jejich kuchyňskou úpravou.

Tabulka 1: Hodnoty koncentrace DOC v průběhu kultivace kultury GD, MM+RAF

	DOC (mg/l)			
Čas (dny)	0	2	6	14
Médium	MM + RAF			
	190,08	181,68	187,05	171,30
	180,36	177,09	184,47	178,44
		172,29	182,13	174,36
Průměr hodnot	185,2	177,0	184,6	174,7
SD	-	3,8	2,0	2,9

Tabulka 2: Hodnoty koncentrace DOC v průběhu kultivace kultury GD, MM+STA

	DOC (mg/l)			
Čas (dny)	0	2	6	14
Médium	MM + STA			
	180,99	186,72	178,41	198,72
	179,43	163,14	181,05	174,00
		169,14	186,99	182,52
Průměr	180,2	173,0	182,2	185,1
SD	-	10,0	3,6	10,3

4.1.3 Měření schopnosti tvorby biofilmu

Některé bakteriální kultury mají schopnost vytvářet souvislé povlaky na rozličných površích. V sérii čtyř pokusů byla věnována pozornost tvorbě biofilmů zkoumanými biofilmovými kulturami samotnými a v interakci s kulturou *Verrucomicrobium* sp. GD. Účelem experimentu bylo posoudit vliv degradačních schopností mikrobiálního kmene *Verrucomicrobium* sp. GD na tvorbu biofilmu potravinářsky a klinicky významnými kulturami bakterií.

Jako první byly testovány kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Staphylococcus epidermidis* FT 1, *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415 a *Pseudomonas aeruginosa* FT 0. Kultura GD byla inokulovaná vždy v každém pravém ze dvou sloupců s biofilmovými kulturami a před testy byla kultivovaná po dobu 7 dní v minerálním médiu s gellanem.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 1. experimentu

Obsah jamek	20 μ l <i>S. aureus</i> CCM 3953		20 μ l <i>S. epidermidis</i> FT 1		20 μ l <i>K. pneumoniae</i> CCM 4415		20 μ l <i>P. aeruginosa</i> FT 0	
	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l FR	20 μ l GD
	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB
A	0,278	0,298	0,136	0,135	0,836	0,952	0,501	0,373
B	0,297		0,111	0,141	0,730	1,077	0,458	0,317
C	0,321	0,221	0,108	0,117	0,866	1,061	0,472	0,363
D	0,384	0,160	0,114	0,150	0,864	1,157		0,351
E	0,432	0,179	0,096	0,092	0,693	1,058	0,541	0,284
F	0,297	0,233	0,145	0,103	0,758	0,749	0,704	0,590
G	0,394	0,174	0,118		0,946	0,453	0,704	0,444
H	0,350	0,229	0,113	0,085	1,043	1,203	0,511	0,383
μ	0,344	0,213	0,118	0,118	0,842	0,964	0,556	0,388
n	8	7	8	7	8	8	7	8
n-1	7	6	7	6	7	7	6	7
SD	0,051	0,044	0,015	0,023	0,108	0,233	0,097	0,088
B	0,019	0,012	0,002	0,003	0,082	0,379	0,056	0,054
(n1+n2)-2	13		13		14		13	
kritická hodnota	2,160		2,160		2,145		2,160	
t	5,253		0,005		1,342		3,513	

V průběhu druhého pokusu s biofilmy bylo sledováno pět bakteriálních kmenů pseudomonád. Zjištěné hodnoty tvorby biofilmu kulturami *Pseudomonas aeruginosa* FT 1, *Pseudomonas aeruginosa* FT 2 a *Pseudomonas aeruginosa* FT 3 a porovnání dat *t*-testem jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 2. experimentu

Obsah jamek	20 μ l <i>P. aeruginosa</i> FT 1		20 μ l <i>P. aeruginosa</i> FT 2		20 μ l <i>P. aeruginosa</i> FT 3	
	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l FR	20 μ l GD
	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB
A						
B	0,770	0,486	0,914	0,522	0,661	0,340
C	0,765	0,505	0,495	0,467	0,482	0,515
D	0,601	0,456	0,710	0,361	0,800	0,505
E	0,723	0,425	0,518	0,339	0,754	0,572
F	0,757	0,215	0,550	0,269	0,659	0,575
G	0,704	0,503	0,577	0,362	0,668	0,551
H		0,486	0,824	0,350	0,487	0,547
μ	0,720	0,439	0,655	0,381	0,644	0,515
n	6	7	7	7	7	7
n-1	5	6	6	6	6	6
SD	0,058	0,095	0,151	0,079	0,112	0,075
B	0,017	0,054	0,137	0,037	0,076	0,034
(n1+n2)-2	11		12		12	
kritická hodnota	2,201		2,179		2,179	
t	6,260		4,252		2,529	

Další bakterie aplikované spolu s kulturou *Verrucomicrobium* sp. GD byly *Pseudomonas aeruginosa* FT 4 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Výsledky jejich tvorby biofilmu a vypočítané parametry pro určení koeficientu Studentova *t*-testu jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 2. experimentu

Obsah jamek	20 μ l <i>P. aeruginosa</i> FT 4		20 μ l <i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	
	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l FR	20 μ l GD
	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB
A	0,135	0,126	0,221	0,354
B	0,560	0,155	0,178	0,325
C		0,623	0,157	0,467
D	0,481	0,497	0,248	0,507
E	0,218	0,368	0,290	0,452
F	0,126	0,116	0,243	0,311
G	0,419	0,516	0,177	0,324
H	0,466	0,541	0,193	0,476
μ	0,344	0,368	0,213	0,402
n	7	8	8	8
n-1	6	7	7	7
SD	0,166	0,194	0,042	0,076
B	0,165	0,263	0,012	0,040
(n1+n2)-2	13		14	
kritická hodnota	2,160		2,145	
t	0,257		6,161	

Pro třetí testování vlivu kultury GD na mikroorganismy tvořící biofilmy bylo potřeba kultivovat celkem pět kultur. V tabulce 6 byly použity kultury *Escherichia coli* CCM 3954 a *Escherichia coli* CCM 3988. Kultura GD byla opět inokulovaná vždy v každém pravém ze dvou sloupců s biofilmovými kulturami a byla 7 dní stará.

Tabulka 6: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 3. experimentu

Obsah jamek	20 μ l <i>E. coli</i> CCM 3954		20 μ l <i>E. coli</i> CCM 3988	
	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l FR	20 μ l GD
	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB
A		0,467		
B	0,085	0,474	0,364	0,270
C	0,094			0,237
D		0,455	0,272	0,350
E	0,099	0,441	0,308	0,296
F	0,080		0,236	0,341
G	0,089	0,495	0,278	0,248
H	0,097	0,358	0,217	0,248
μ	0,091	0,448	0,279	0,284
n	6	6	6	7
n-1	5	5	5	6
SD	0,007	0,044	0,048	0,043
B	0,000	0,010	0,012	0,011
(n1+n2)-2	10		11	
kritická hodnota	2,228		2,201	
t	19,829		0,204	

Tři sbírkové kultury enterokoků (*Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Enterococcus faecalis* CCM 7000 a *Enterococcus faecalis* CCM 2665) byly podrobeny dalšímu testu na schopnost tvorby biofilmů, a to opět samostatně a spolu s kulturou *Verrucomicrobium* sp. GD.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty absorpance biofilmových kultur při 3. experimentu

Obsah jamek	20 µl <i>E. faecalis</i> CCM 4224		20 µl <i>E. faecalis</i> CCM 7000		20 µl <i>E. faecalis</i> CCM 2665	
	20 µl FR	20 µl GD	20 µl FR	20 µl GD	20 µl FR	20 µl GD
	160 µl TSB	160 µl TSB	160 µl TSB	160 µl TSB	160 µl TSB	160 µl TSB
A	0,126		0,269	0,164	0,161	0,110
B	0,111	0,289	0,297	0,275	0,216	0,212
C	0,118	0,107	0,288	0,171	0,169	0,241
D	0,114	0,118	0,287	0,123	0,180	0,241
E	0,109	0,106	0,299	0,190	0,174	0,241
F	0,112	0,253	0,307	0,096	0,143	0,261
G	0,107	0,101	0,307	0,208	0,146	0,141
H	0,114	0,312	0,320	0,117	0,197	0,246
µ	0,114	0,184	0,297	0,168	0,173	0,212
n	8	7	8	8	8	8
n-1	7	6	7	7	7	7
SD	0,006	0,089	0,015	0,054	0,023	0,052
B	0,000	0,048	0,001	0,020	0,004	0,019
(n1+n2)-2	13		14		14	
kritická hodnota	2,160		2,145		2,145	
t	2,227		6,506		1,912	

Jako poslední se testovaly kultury stafylokoků a to konkrétně *Staphylococcus aureus* CCM 2022, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221. Kromě sledování tvorby biofilmu u uvedených kultur byl kultivován i samotný kmen *Verrucomicrobium* sp. GD jen v TSB bujónu pro posouzení schopnosti samotné kultury GD tvořit za daných podmínek biofilm.

Tabulka 8: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 4. experimentu

Obsah jamek	20 μ l <i>S. aureus</i> CCM 2022		20 μ l <i>S. epidermidis</i> CCM 4418		20 μ l <i>S. epidermidis</i> CCM 7221		místo kultury 20 μ l FR	
	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l FR	20 μ l GD	20 μ l GD	20 μ l GD
	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB	160 μ l TSB
A	0,225		0,155	0,504	0,111	0,407	0,341	0,477
B	0,258	0,429	0,242	0,400	0,249	0,348	0,544	0,759
C	0,240	0,616	0,136	0,346	0,135	0,420	0,564	0,531
D	0,138	0,412	0,215	0,178	0,145	0,292	0,453	0,594
E	0,149	0,402	0,149	0,422	0,223	0,469	0,514	0,505
F	0,153	0,413	0,160	1,071	0,173	0,521	0,508	0,472
G	0,262	0,495	0,138	0,413	0,141	0,437	0,762	0,603
H	0,101	0,410	0,273	0,353	0,133	0,348	0,622	0,621
μ	0,191	0,454	0,184	0,461	0,164	0,405	0,554	
n	8	7	8	8	8	8		
n-1	7	6	7	7	7	7		
SD	0,058	0,072	0,049	0,247	0,045	0,069		
B	0,024	0,031	0,017	0,426	0,014	0,033		
(n1+n2)-2	13		14		14			
kritická hodnota	2,160		2,145		2,145			
t	7,801		3,120		8,287			

4.2 Diskuse

4.2.1 Mikroskopie kultury *Verrucomicrobium* sp. GD

Prvním seznámením se zkoumanou bakteriální kulturou se schopností degradace mikrobiálního exopolysacharidu gellanu bylo pozorování jejího růstu na živných médiích. Nejprve byl pro kultivaci kultury *Verrucomicrobium* sp. GD použit gellanový měkký gel (GGm) z důvodu předchozího použití v práci Muchové. Záhy se od jeho použití upustilo, protože byl příliš křehký a manipulace s plotnami z měkkého gelu byla nevyhovující. Na minerálním agaru s glukosou (MA+glu) po týdenní kultivaci při 25°C narostly světle žluté okrouhlé lesklé vypouklé kolonie.

Po zhlédnutí makroskopických znaků byla pozornost orientována k výzkumu mikroskopických charakteristik buněk rostoucích za různých podmínek – na pevných i v tekutých živných médiích, a s nízkomolekulárním a vysokomolekulárním substrátem. Cílem těchto prací bylo posoudit, zda je tvorba prosték u této kultury vázána na některé z těchto podmínek.

Jako první byla kultura pozorována světelným optickým mikroskopem.

1. série snímků z optického mikroskopu

Růst na minerálním agaru s glukosou

Buňky ze tři dny starých kolonií na minerálním agaru s glukosou se v preparátu barveném krystalovou violetí zbarvily bipolárně. Tuto skutečnost je možno vidět na obrázku 2. V nativním preparátu (viz. obrázek 3) pozorovaném s použitím fázového kontrastu byly buňky pravidelného, převážně oválného až tyčinkovité tvaru s hladkým povrchem. Z těchto preparátů bylo také zřejmé, že povrch buněk je lépe pozorovatelný pomocí nativního preparátu fázovým kontrastem, a proto bylo od preparátů barvených krystalovou violetí v dalším průběhu upuštěno.

Na obrázku 4 jsou zachyceny buňky ze suspenze kultury GD na minerálním agaru s glukosou odebrané při 5. dni kultivace. Bakterie měly kulatý až oválný protáhlý tvar, celkově však měly buňky stále hladký povrch.

Sedm dní stará kultura GD byla tvořena buňkami s kulatým či mírně protáhlým tvarem a povrchem bez nerovností. Tvořila dvou až čtyřbuněčné řetízky, jak lze vidět na obrázku 8.

Z obrázku 14 je patrné, že buňky kultivované po dobu dvanácti dnů byly stále charakteristické hladkým povrchem a kulatým či mírně protáhlým tvarem. V preparátu byly nalezeny shluky buněk, a také útvary připomínající čtyřbuněčný řetízek, sestávající ze dvou krajních větších buněk a dvou menších uprostřed.

Celkově na tuhém médiu s glukosou byly buňky spíše kulatého až oválného tvaru s hladkým povrchem a ani po 12 dnech nebyly pozorovány buňky s prostékami. Bylo zde možno pozorovat bujný růst kultury oproti jejímu růstu na tuhém médiu s gellanem (viz níže). Tato skutečnost je pravděpodobně dána tím, že glukosa, jakožto nízkomolekulární organická sloučenina, je snáze přístupná a užitelná, než složitá molekula gellanu.

Růst v minerálním médiu s glukosou

Preparát z tekutého minerálního média s glukosou obsahoval po pěti dnech výrazně kulaté bakteriální buňky s hladkým povrchem, jak lze vidět na obrázku 5. Je možno shledat určitou podobnost s dobrým růstem na tuhém médiu s tímto monosacharidem.

Po sedmi dnech kultivace kultury GD v tomto médiu byly v preparátu vidět kulaté, tyčinkovité buňky, ale i nepravidelné větší buňky s jemně zvrásněným povrchem buněčné stěny (viz. obrázek 10).

Na obrázku 12 jsou vyfotografovány 12 dnů staré buňky *Verrucomicrobií*, které po takto dlouhé době kultivace měly stále hladký povrch, avšak poněkud různorodý tvar buněk, od kulatých po kyjovité až tyčinkovité.

Růst v tekutém médiu s glukosou byl celkově rovněž považován z hlediska tvorby prosték za nevýznamný, proto nebyla v pozdějších experimentech tato živná půda spolu s minerálním agarem s glukosou dále použita.

Růst v minerálním médiu s gellanem

Již po 5. dnu kultivace byly u kultury GD mírně znatelné prostěky, které je možno spatřit na obrázku 6 jako hrbolatý povrch řetízku buněk.

Sedmý den růstu, zachycený na obrázku 9, byly buňky kulaté či oválné a tvořily řetízky; u některých jsou již dobře znatelné výběžky buněčné stěny.

V preparátu připraveném ze 12 dnů staré kultury *Verrucomicrobium* sp. GD byly buňky kulatého, nepravidelného tvaru a buňky s nepravidelným povrchem se shlukovaly do řetízků, jak lze vidět na obrázku 11.

Růst na minerálním agaru s gellanem

Na tuhém médiu s gellanem měly po sedmi dnech kultivace bakteriální buňky tyčinkovitý tvar s hladkým povrchem (viz. obrázek 7).

Dvanáctidenní kultura GD se vyznačovala také rovnoměrnými tyčinkovitými buňkami s hladkým povrchem, které jsou zachyceny na obrázku 13.

Z důvodu absence náznaků tvorby prosték u buněk kultury GD při růstu byl minerální agar s gellanem jakožto růstové médium z další práce vyloučen.

Ze získaných snímků v první sérii fotografování preparátů bakteriální kultury *Verrucomicrobium* sp. GD bylo možno usoudit, že pro tvorbu prosték je nejvhodnějším kultivačním prostředím minerální médium s gellanem.

2. série snímků z optického mikroskopu

V této části pokusu byly fotografovány preparáty zhotovené z bakteriálních buněk kultivovaných v minerálním médiu s gellanem. Toto živné médium bylo zvoleno na základě získaného poznatku z první série snímků, kdy se pro pozorování tvorby prosték neosvědčila tuhá média s gellanem i glukosou a také tekuté minerální médium s glukosou.

Na snímku č. 15 lze vidět buňky kultury GD s nepravidelnými tvary buněk, kulatým počínaje a dlouze tyčinkovitým konče. Bakterie měly nerovný povrch, u některých buněk s viditelným výskytem prosték. Na preparátu je možno pozorovat shluky kulatých menších buněk s tyčinkovitými.

V sedmém dnu růstu měly opět některé buňky velmi dobře viditelné prostěky, které se ve větší míře tvořily u řetízujících buněk (viz. obrázek 16).

Pořízením druhé série snímků růstu kmene *Verrucomicrobium* sp. GD bylo opět prokázáno, že tekuté minerální médium s gellanem je pro tuto bakteriální gellan degradující kulturu vyhovující a výběžky buněčné stěny v něm buňky tvoří. Je možné, že tekutost média a tím možnost obklopení buněk médiem v celém objemu je pro kulturu výhodné už z toho důvodu, že prostěky jsou buňkami tvořeny po celém povrchu buněčné stěny a tudíž je rozpuštěný gellan v tekutém médiu lépe utilizovatelný než na tuhé agarové plotně. Domnívám se, že i kmitavý pohyb lahví na třepačce přispěl k provzdušňování média a k příznivějšímu vlivu na vytváření výběžků buněčné stěny typických pro rod *Verrucomicrobium*.

3. série snímků z optického mikroskopu

Cílem této série bylo pokusit se o ještě lepší znázornění prosték na povrchu buněk, a to základními barvicími metodami – Gramovým barvením a krystalovou violetí. Pro přípravu preparátu byla použita biomasa narostená po 8 dnech v minerálním médiu s gellanem. Na obrázku 17 lze pozorovat řetízkující prostékaté buňky zbarvené slabě červeně. Z tohoto zjištění se dá potvrdit, že se jedná o gramnegativní, avšak slabě barvitelné bakterie.

Z osmidenní kultury byl pořízen i preparát obarvený krystalovou violetí a zachycen na snímku č. 18. Buňky kultury GD však nebyly homogenně zbarvené, nýbrž bipolárně. Světle fialové buňky měly obarvené středy či konce tmavě fialově. Pravděpodobně se nejedná o spory, neboť jejich tvorba není pro zkoumaný bakteriální rod příznačná; příčinu tohoto jevu však nebylo možné podrobněji zkoumat.

Snímky z AFM mikroskopu

Pro důkladnější zachycení morfologie prosték byla provedena malá séra mikroskopie skenující sondou. Na obrázku 19 je zachycena plocha preparátu o velikosti 10x10 μm , na které jsou buňky kultury GD, fixované pomocí glutaraldehydu. Jeho použití má svůj původ opět v dřívější práci Muchové na ÚIOŽP, kde byl tento způsob fixování použit pro přípravu preparátu pro skenovací elektronový mikroskop. Na snímku je možno vidět velmi zvrásněný povrch, kde se jedná o vrstvu biomasy buněk, které jsou opatřeny prostékami. Z obrázku lze vyčíst hloubku reliéfu, kdy nejexponovanější části buněk jsou ve vzdálenosti od podkladu 500 a více nm. Poněkud lépe jsou jednotlivé buňky zachyceny na obrázku 20, kde je naskenována větší plocha (50x50 μm) a kde je také poněkud patrné, že jejich povrch je hrboletý, což napovídá o výskytu prosték. Ze získaných snímků lze odečíst přibližnou velikost bakteriálních buněk kultury GD, a to 1x2 μm .

Celkově je však nutno konstatovat, že postup fixace buněk, jejich přípravy k mikroskopování pomocí AFM i samotné použití tohoto mikroskopu by vyžadovalo důkladnou optimalizaci, která již nebyla v rámci této práce možná, a která by lépe prostéky na povrchu buněk znázornila. Je také možné, že vhodnější mikroskopickou technikou pro tyto účely by bylo použití tzv. environmentální skenovací elektronové mikroskopie.

4.2.2 Rozklad raffinosy a stachyosy

V této práci bylo jedním z cílů zaměřit se na schopnost kmene *Verrucomicrobium* sp. GD degradovat flatulentní sacharidy luštěnin, raffinosu a stachyosu. Tento experiment byl

uskutečněn na základě domněnky, že by mohla zkoumaná kultura také rozkládat jiné, jednodušší sacharidy než je gellan. Z tabulky 1 lze usoudit, že koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v inokulovaném minerálním médiu s raffinósou se nijak významně neměnila v průběhu kultivace a oscillovala kolem hodnoty 180 mg/l. Zcela podobné výsledky byly naměřeny i při experimentu s rozkladem stachyosu, jak je uvedeno v tabulce 2. Na základě těchto dat je možné konstatovat, že kultura *Verrucomicrobium* sp. GD tedy raffinósou ani stachyosu nedegraduje.

Naopak významným degradérem těchto sacharidů se ukázala být bakteriální kultura *Paenibacillus* sp. XD rozkládající xanthan. Tato kultura a také schopnost rozkládat stachyosu a raffinósou byly zkoumány v práci Křemenové [60], ve které bylo zjištěno, že v minerálním médiu s raffinósou poklesla díky růstu kultury *Paenibacillus* sp. XD koncentrace DOC z původních průměrných 185 mg/l na zhruba 60 mg/l za 7 dní. Pokles koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v minerálním médiu se stachyosou byl v průběhu sedmi dní obdobný, ze 180 mg/l na průměrných 65 mg/l. Jelikož byly tyto pokusy rozkladu raffinósy a stachyosu prováděny s kulturou GD a XD paralelně, bylo tak možné vzájemně porovnat zjištěné hodnoty a dobře vidět rozdílné schopnosti obou kultur.

4.2.3 Měření schopnosti tvorby biofilmu

Jak již bylo zmíněno, schopností tvořit biofilmy oplývají některé druhy bakterií. V mnoha případech se jedná o patogenní mikroorganismy, které mohou ohrozit zdraví člověka i komplikovat průmyslovou výrobu potravin či farmaceutik. V souvislosti se schopností kultury *Verrucomicrobium* sp. GD degradovat extracelulární polysacharidy gellan, xanthan i alginát, vyskytující se jako součást bakteriálních biofilmů, byly provedeny pokusy omezit tvorbu biofilmu u významných druhů. Samotné biofilmy však nejsou tvořeny jen polysacharidy, ale jsou složeny ze směsi více druhů makromolekulárních látek, tudíž bylo nutno získat experimentální výsledky účinku kultury GD. Pro výzkum její schopnosti rozkladu biofilmů tvořených jinými bakteriemi byly navrženy postupy uvedené v kapitole 3.1.4, kdy byla v tekutém živném médiu porovnávána tvorba biofilmu při růstu biofilmové kultury samotné a při jejím růstu v přítomnosti buněk kultury GD. Aby bylo možné zhodnotit míru odlišnosti tvorby biofilmu, bylo použito statistické zpracování dat *t*-testem. O průkaznosti vlivu kultury GD na kulturu biofilmovou hovoří skutečnost, jestli je hodnota vypočítaného testovacího kritéria *t* vyšší než tabulková kritická hodnota. Pokud ano, tak

lze potvrdit, že daná kultura verrukomikrobií snižuje tvorbu biofilmu tvořeného zkoušenými biofilmovými kulturami.

V tabulce 3 jsou uvedeny bakteriální kmeny, které byly testovány jako první. Vliv gellan degradující kultury GD na tvorbu biofilmu bakterií *Staphylococcus aureus* CCM 3953 je prokazatelný, testovací kritérium s hodnotou 5,253 je vyšší než tabulková hodnota. Naopak u výsledku experimentu s kmenem *Staphylococcus epidermidis* FT 1 nebyl zjiště prakticky žádný rozdíl mezi růstem kultury samotné a růstem s kulturou GD, je možno se tedy domnívat, že se bakteriální kultury nijak vzájemně neovlivňují; míra tvorby biofilmu touto kulturou je však velmi nízká (jedny z nejnižších získaných hodnot). *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415 nebyla v tvorbě biofilmu bakteriemi kultury GD výrazně bržděna, nýbrž bylo možné vidět mírný nárůst absorbance v případě společného růstu. Jak lze dále zjistit z tabulky 3, *Pseudomonas aeruginosa* FT 0 byla kultura, jejíž tvorba biofilmu byla v přítomnosti *Verrucomicrobium* sp. GD z určité části potlačena.

Na základě výsledku testu kultury *Pseudomonas aeruginosa* FT 0 v prvním experimentu, byly následně otestovány i další archivované kultury pseudomonád. Z dat uvedených v tabulce 4 lze vyvodit poznatek, že kultura GD má vliv na tvorbu biofilmu kmenem *Pseudomonas aeruginosa* FT 1. Všechny tři použité kultury rodu *Pseudomonas* samy o sobě tvořily biofilm dobře ($A \sim 0,650$). I *Pseudomonas aeruginosa* FT 2 tvořila bakteriální povlak v přítomnosti verrukomikrobií méně než v porovnávacích jamkách; i v tomto případě je možno tvrdit, že ve společnosti kultury GD je tvorba jejího biofilmu omezena. Kultura GD měla vliv i na kulturu *Pseudomonas aeruginosa* FT 3, i když ne v takovém měřítku, jako u kmene *P. aeruginosa* FT 1.

Na značnou variabilitu mezi jednotlivými kmeny jednoho bakteriálního druhu poukazuje výsledek pokusu s kulturou *Pseudomonas aeruginosa* FT 4, uvedený v tabulce 5, kde je patrné, že se tvorba biofilmu kultury samotné a v přítomnosti *Verrucomicrobium* sp. GD nijak nelišila, na rozdíl od výsledků ostatních použitých kultur *Pseudomonas aeruginosa*. Rozdíl mezi výsledky *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 samotné a spolu s kulturou GD byl shledán významným. Je však zajímavé, že v přítomnosti kultury GD byla absorbance dvojnásobná než u biofilmové kultury. Tato hodnota mohla být způsobena navíc tvorbou biofilmu kulturou GD, která sama o sobě celkem významně tvoří biofilm (viz. tabulka 8).

Tabulka 6 obsahuje hodnoty tvorby biofilmů kultur *Escherichia coli* CCM 3954 a CCM 3988. Zajímavý výsledek byl získán při experimentu s kulturou *E. coli* CCM 3954, ve kterém kultura samotná tvořila biofilm velmi slabě ($A = 0,091$) a v přítomnosti s kulturou GD byla naměřena absorbance $A = 0,448$. Tento velký rozdíl mohl být rovněž způsoben vytvořeným biofilmem kultury *Verrucomicrobium* sp. GD. Při pokusu s kmenem *E. coli* 3988 nebyla zjištěna významná odlišnost mezi jejím samotným růstem a růstem současně s kulturou GD.

Enterokoky netvořily biofilm nijak významně, jak je možno vyčíst z tabulky 7. Podle výsledku *t*-testu byla tvorba biofilmu *Enterococcus faecalis* CCM 4224 ovlivněn kulturou GD, kdy byl biofilm mírně významnější ve společnosti kultury GD, než při samotném růstu *E. faecalis* CCM 4224. Naopak lze tvrdit, že kultura GD potlačuje tvorbu biofilmu kultury *Enterococcus faecalis* CCM 7000. Biofilmová kultura *Enterococcus faecalis* CCM 2665 nebyla kulturou GD ovlivněna. Celkově bylo možné v pokusech s enterokoky zaznamenat, že při kultivaci kultury GD spolu s enterokoky nebyla zaznamenána významná tvorba biofilmu *Verrucomicrobium* sp. GD (pravé sloupce pokusů), což poněkud kontrastovalo s výsledky získanými při testování stafylokoků (viz. tabulka 8), při kterých společná kultivace stafylokoků a kultury GD vedla k podstatně významnější tvorbě biofilmů. Je tedy možné, že enterokoky mohou vylučovat určité metabolity, které kulturu GD potlačují v růstu, který je u verrukomikrobií již tak pomalý.

Tabulka 8 pojednává o výsledcích experimentu s kulturami stafylokoků a jsou zde rovněž pro srovnání uvedena data tvorby biofilmu kulturou GD samotnou. Podle hodnot tvorby biofilmů všech testovaných kultur rodu *Staphylococcus* je možno usoudit, že samotné kultury biofilmy moc netvoří. U růstu kultury *Staphylococcus aureus* CCM 2022 byl zjištěn velký nárůst tvorby biofilmu při inokulaci s kulturou GD ($A = 0,454$) oproti jejímu růstu bez této gellan degradující kultury ($A = 0,191$). Obdobné výsledky byly získány také při experimentu s kulturou *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221.

V posledním pokusu byla kultura GD naočkována samotná do jamek obou sloupců mikrotitrační destičky a byl sledován její růst nezávisle na jiné biofilmové kultuře. Bylo zjištěno, že kultura *Verrucomicrobium* sp. GD tvoří biofilm významně, jak je z hodnoty průměrné absorbance v tabulce 8 zřejmé.

ZÁVĚR

Práce se zabývala studiem vlastností sacharolytické bakterie *Verrucomicrobium* sp. GD. Charakteristickým znakem zástupců tohoto bakteriálního rodu je tvorba prosték, výběžků buněčné stěny obsahujících cytoplazmu. Tato vlastnost však není u bakterií obvyklá. Kultivací kultury GD v tekutém médiu s glukosou a gellanem a na pevném médiu s glukosou a gellanem mělo být v průběhu této práce zjištěno, jaký typ živné půdy a jaký hlavní zdroj organického uhlíku je pro tvorbu prosték nejvhodnější. Experimentálně bylo určeno, že kultura *Verrucomicrobium* sp. GD má optimální podmínky k vývinu prosték v tekutém médiu s gellanem (minerálním médiu obsahujícím gellan), zatímco na tuhých půdách s glukosou či gellanem nebo v tekutém médiu s glukosou byly buňky hladké, bez náznaku tvorby prosték.

Dalším bodem experimentální části této bakalářské práce bylo ověřit schopnost zkoumaného kmene verrukomikrobií degradovat flatulentní sacharidy luštěnin. Luštěniny jsou nutričně hodnotná potravina, avšak existuje mnoho lidí, kteří je kvůli problémům způsobených při jejich trávení nekonzumují. Experiment byl proveden, aby se zjistilo, zda kultura GD produkuje enzym, který by mohl degradovat stachyosu či raffinosu a mohl by být potenciálně v budoucnu využit pro inovaci kuchyňské úpravy luštěnin. Sledováním změny koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v inokulovaném tekutém médiu s raffinosou či stachyosou byla zkoumána schopnost rozkladu těchto sacharidů kulturou GD v průběhu kultivace. Ze zjištěných výsledků však vyplývá, že *Verrucomicrobium* sp. GD tyto dva sacharidy vyskytující se v luštěninách neutilizuje.

Třetí, stěžejní část práce byla věnována výzkumu eliminace tvorby biofilmů u klinicky a potravinářsky významných bakterií pomocí kultury GD. Testy prováděné v mikrotitračních destičkách s biofilmovými kulturami ukázaly, že bakteriální kultura *Verrucomicrobium* sp. GD výrazně omezuje tvorbu biofilmu u kultur *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Pseudomonas aeruginosa* FT 0, *Pseudomonas aeruginosa* FT 1, *Pseudomonas aeruginosa* FT 2 a mírně u *Pseudomonas aeruginosa* FT 3 a také *Enterococcus faecalis* CCM 7000. Naopak bakteriální kultury, na jejichž tvorbu biofilmu neměla *Verrucomicrobium* sp. GD prakticky žádný vliv, byly *Staphylococcus epidermidis* FT 1, *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415, *Escherichia coli* CCM 3988 a *Enterococcus faecalis* CCM 2665. Poněkud zajímavé výsledky byly obdrženy při experimentech s kulturami *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Escherichia coli* CCM 3954,

Staphylococcus aureus CCM 2022, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221, které vykazovaly větší tvorbu biofilmu v přítomnosti kultury *Verrucomicrobium* sp. GD; v takových případech ovšem nelze vyvodit, zda se na biofilmu z větší části podílela kultura GD či testovaná biofilmová kultura. Provedení dalších testů pro objasnění objemového složení dvoudruhového biofilmu by bylo již nad rámec této bakalářské práce.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HALL-STOODLEY L, STOODLEY P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, vol. 13, 228-233.
- [2] RULÍK M. a kol. *Mikrobiální biofilmy*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2011. ISBN: 978-80-244-2747-8.
- [3] COSTERTON J. W. *et. al.* Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. 1987, vol. 41, 435-464.
- [4] DONLAN R. M., COSTERTON J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, vol. 15, 167-193.
- [5] GILBERT P., ALLISON D. G. Laboratory methods for biofilm production. 1993, 29-49. In: DENYER S. P., GORMAN S. P., SUSSMAN M., eds. *Microbial biofilms: Formation and control*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993, 336 pp.
- [6] BRYERS J. D. Biofilms in biotechnology. 1990, 733-770. In: CHARACKLIS W. G., MARSHALL K. C., eds. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, 796 pp.
- [7] DONECHE B. J. Botrytized wine. 1993, 327-352. In: FLEET G. H., eds. *Wine microbiology and biotechnology*. London: Taylor and Francis, 510 pp.
- [8] GAUNTNER J. *The saké handbook*. Boston: Tuttle Publishing, 2002.
- [9] VARNAM A. H., SUTHERLAND J. P. *Milk and milk products*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2001, 454 pp.
- [10] KOCH H., FUCHS H. *Die Fabrikation feiner Fleisch und Wurstwaren*. Frankfurt am Main: Deutscher Fachverlag, 2004, 830 pp.
- [11] LASTOVICA A. J., SKIRROW M. B. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. 2000, 139-153. In: NACHAMKIN I., LASER M. J., eds. *Campylobacter*. Washington: ASM Press.
- [12] LECLERC H., SCHWARTZBROD L, DEI-CAS E. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainlesssteel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, vol. 28, 594-605.
- [13] WALKER *et. al.* Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 1990, vol. 68, 157-162.

- [14] GRAHAM S. M., Salmonellosis in children in developing and developer countries and population. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2002, vol. 15, 507-512.
- [15] JONES K., BRADSHAW S. B. Synergism in biofilm formation between *Salmonella enteritidis* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*. 1997, vol. 82, 663-668.
- [16] COSTERTON J. W. *et. al.* Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 1995, vol. 49, 711-745.
- [17] VODRÁŽKA Z. *Biochemie*. Academia, 2002. ISBN: 80-200-0600-1.
- [18] HASHIMOTO W., MOMMA K., MIKI H., MISHIMA Y., KOBAYASHI E., MIYAKE O., KAWAI S., NANKAI H., MIKAMI B., MURATA K. Enzymatic and genetic bases on assimilation, depolymerization, and transport of heteropolysaccharides in bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, vol. 87, no. 2, 23-136.
- [19] POLLOCK T. J. Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. *Journal of General Microbiology*. 1993, vol. 139, 1939-1945.
- [20] SANDERSON G. R. Gellan gum. In: HARRIS P., eds. *Food gels*. London: Elsevier, 1990, 201-232.
- [21] JANSON P., LINDBERG B., SANDFORD P. A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*. 1983, vol. 124, 135-139.
- [22] KUO M. S., MORT A. J., DELL A. Identification and location of L-glycerate, an unusual acyl substituent in gellan gum. *Carbohydrate Research*. 1986, vol. 156, no. 15, 173-187.
- [23] SUTHERLAND I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advance*. 1994, vol. 12, 339-448.
- [24] GIBSON W., SANDERSON G. R. Gellan gum. In: IMESON A., eds. *Thickening and gelling agents for food*. London: Blackie, 1997, is. 2, 119-143.
- [25] SANDERSON G. R., BELL V. I., CLARK R. C., ORTEGA D. The texture of gellan gum gels. In: PHILLIPS G. O., WILLIAMS P. A., WEDLOCK D. J., eds. *Gums and stabilisers for the food industry*. Oxford, UK: IRL Press, 1988, vyd. 4, 219-229.
- [26] ASAI I., OMOTO T., THORNE L., KODA H. Forming of physical property in food with

- polysaccharides. *Journal of Applied Glycoscience*. 1996, vol. 43, 385-392.
- [27] RINAUDO M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloids*. 2001, vol. 15, no. 4-6, 433-440.
- [28] *Water Structure And Science* [online] [cit. 2014-04-1]. Dostupné z: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/hygellan.html>
- [29] PRAJAPATI V. D., JANI G. K., ZALA B. S., KHUTLIWALA T. A. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 93, 670-678.
- [30] TO K. M. Novel textures with gellan gum. *Agro Food Industry Hi-Tech*. 1998, vol. 9, no. 2, 23-24.
- [31] SWORN G. Gellan gum. In: PHILIPS G. O., WILLIAMS P. A., eds. *Handbook of hydrocolloids*. New York:Woodhead Publ Ltd, 2000, 117-134.
- [32] LIANG C., HU X., NI Y., WU J., CHEN F., LIAO X. Effect of hydrocolloids on pulp sediment, white sediment, turbidity and viscosity of reconstituted carrot juice. *Food hydrocolloids*. 2006, vol. 20, 1190-1197.
- [33] JIMÉNEZ-PRANTEDA M. L., AGUILERA M., MCCARTNEY A. L., HOYLES L., JIMÉNEZ-VALERA M., NÁDER-MACÍAS M. E., RAMOS-CORMENZANA A., MONTEOLIVA-SÁNCHEZ M. Investigation of the impact of feeding *Lactobacillus plantarum* CRL 1815 encapsulated in microbially derived polymers on the rat faecal microbiota. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, vol. 113, is. 2, 399-410.
- [34] CHANG S. J., HUANG Y.-T., YANG S.-C., KUO S. M., LEE M.-W. In vitro properties of gellan gum sponge as the dental filling to maintain alveolar space. *Carbohydrate Polymers*. 2012, vol. 88, is. 2, 684-689.
- [35] DEDYSH S. N., KULICHEVSKAYA I. S., SERKEBAEVA Y. M., MITYAEVA M. A., SOROKIN V. V., SUZINA N. E. *Bryocella elongata* gen. nov., sp. nov., a member of subdivision 1 of the *Acidobacteria* isolated from a methanotrophic enrichment culture, and emended description of *Edaphobacter aggregans* Koch et al. 2008. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012, vol. 62, is. 3, 654-664.
- [36] CEYHAN N. Evaluation of enzymatic removal of cooling water system biofilm using its

- own producer bacteria. *Asian Journal of Chemistry*. 2013, vol. 25, is. 1, 251-256.
- [37] SUTHERLAND I. W., KENNEDY L. Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. *Microbiology*. 1996, vol. 142, 867-872 part 4.
- [38] SEDLÁČEK I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [39] STALEY J. T. *Prothesomicrobium* and *Ancalomicrobium*: new freshwater prosthecate bacteria. *Journal of Bacteriology*. 1968, vol. 95, 1921-1942.
- [40] SCHLESNER H. *Verrucomicrobium spinosum* gen. nov., sp. nov: a fimbriated prosthecate bacterium. *Systematic Applied Microbiology*. 1987, vol. 12, 54-56.
- [41] SAKAI T., ISHIZUKA K., KATO I. Isolation and characterization of a fucoidandegrading marine bacterium. *Marine Biotechnology*. 2003, no. 5, 409-416.
- [42] DERRIEN M., VAUGHAN E. E., PLUGGE C. M., DE VOS W. M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, vol. 54, 1469-1476.
- [43] MUCHOVÁ M. *Mikrobiální degradace vybraných polysacharidů*. Zlín, 2009. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí disertační práce doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
- [44] FELSKE A., AKKERMANS A. D. L. Prominent occurrence of ribosomes from an uncultured bacterium of the *Verrucomicrobiales* cluster in grassland soils. *Letters in Applied Microbiology*. 1998, vol. 26, 219–223.
- [45] MCCAIG A. E., GLOVER L. A., PROSSER J. I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, vol. 65, 1721–1730.
- [46] SESSITSCH A., WEILHARTER A., GERZABEK M. H., KIRCHMANN H., KANDELER E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a longterm fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, vol. 67, 4215–4224.
- [47] SANGWAN P., CHEN X., HUGENHOLZ P., & JANSSEN P. H. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the First Pure-Culture Representative of Subdivision Two,

- Spartobacteria* classis nov., of the Phylum Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, vol. 70, 5875–5881.
- [48] HEDLUND B. P., GOSINK J. J. & STALEY J. T. Phylogeny of *Prostheco bacter*, the fusiform caulobacters: members of a recently discovered division of the *Bacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996, vol. 46, 960–966.
- [49] LIU Y., ZHANG T., FANG H. P. H. Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge. *Bioresource Technology*. 2005, vol. 96, 1205-1214.
- [50] JURETSCHKO S., LOY A., LEHNER A., WAGNER M. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analysed by the Full-Cycle rRNA-approach. *Systematic and Applied Microbiology*. 2002, vol. 25, no. 1, 84-99.
- [51] MUCHOVÁ M., RŮŽIČKA J., JULINOVÁ M., DOLEŽALOVÁ M., HOUSER J., KOUTNÝ M., BUŇKOVÁ L. Xanthan and gellan degradation by bacteria of activated sludge. *Water Science and Technology*. 2009, vol. 60, is. 4, 965-972.
- MIKOLAJCZAK M. J., THORNE L., POLLOCK T. J., ARMENTROUT R. W.
- [52] Sphingnanase, a new endoglycanase that cleaves specific members of the gellan family of polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, 402-407.
- HASHIMOTO W., MAESAKA K., SATO N., KIMURA S., YAMAMOTO K., KUMAGAI H., MURATA K. Microbial system for polysaccharide depolymerization:
- [53] enzymatic route for gellan depolymerization by *Bacillus* sp. GL1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997, vol. 339, no. 1, 17-23.
- JUNG Y.J., PARK C.S., LEE H.G., CHA J. Isolation of a novel gellan-depolymerizing
- [54] *Bacillus* sp. strain YJ-1. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006, vol. 16, 1868-1873.
- DEREKOVA A., Biosynthesis of a thermostabile gellan lyase by newly isolated and
- [55] characterized strain of *Geobacillus stearothermophilus* 98. *Extremophiles*. 2006, vol. 10, 321-326.
- HASHIMOTO W., NANKAI H., SATO N., KAWAI S., MURATA K. Characterization
- [56] of alfa L-rhamnosidase of *Bacillus* sp. GL1 responsible for the complete depolymerization of gellan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1999, vol. 368, no. 1, 56-60.

- [57] OTSUKA S., SUENAGA T., VU THI H., UEDA H., YOKOTA A., SENOO K. *Brevifollis gellanilyticus* gen. nov., sp. nov., a gellan-gum-degrading bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*. 2013, vol. 63, 3075-3078.
- [58] OTSUKA S., UEDA H., SUENAGA T., UCHINO Y., HAMADA M., YOKOTA A., SENOO K. *Roseimicrobium gellanilyticum* gen. nov., sp. nov., a new member of the class *Verrucomicrobiae*. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*. 2013, vol. 63, 1982-1986.
- [59] HENDL J. *Přehled statistických metod (analýza a mataanalýza dat)*. Praha: Portál, 2009. ISBN: 978-80-7367-482-3.
- [60] KŘEMENOVÁ H. *Sacharolytické enzymové aktivity xanthan degradující bakterie*. Zlín, 2014. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí bakalářské práce doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ÚIOŽP Ústav inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB

ÚFMI Ústav fyziky a materiálového inženýrství FT UTB

GD gellan degradující

sp. species

DOC koncentrace rozpuštěného organického uhlíku

AFM mikroskopie atomárních sil

CCM Česká sbírka mikroorganismů

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Molekulární struktura gellanu [28].....</i>	<i>16</i>
<i>Obrázek 2: Kultura GD z MA+glu, 3. den růstu, krystalová violeť.....</i>	<i>37</i>
<i>Obrázek 3: Nativní preparát kultury GD z MA+glu, 3. den růstu, fázový kontrast</i>	<i>38</i>
<i>Obrázek 4: Nativní preparát kultury GD z MA+glu, 5. den růstu, fázový kontrast</i>	<i>38</i>
<i>Obrázek 5: Nativní preparát kultury GD z MM+glu, 5. den růstu, fázový režim.....</i>	<i>39</i>
<i>Obrázek 6: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 5. den růstu, fázový kontrast</i>	<i>39</i>
<i>Obrázek 7: Nativní preparát kultury GD z MA+gel, 7. den růstu, fázový kontrast.....</i>	<i>40</i>
<i>Obrázek 8: Nativní preparát kultury GD z MA+glu, 7. den růstu, fázový kontrast</i>	<i>40</i>
<i>Obrázek 9: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 7. den růstu, fázový kontrast.....</i>	<i>41</i>
<i>Obrázek 10: Nativní preparát kultury GD z MM+glu, 7. den růstu, fázový kontrast.....</i>	<i>41</i>
<i>Obrázek 11: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 12. den růstu, fázový kontrast</i>	<i>42</i>
<i>Obrázek 12: Nativní preparát kultury GD z MM+glu, 12. den růstu, fázový kontrast.....</i>	<i>42</i>
<i>Obrázek 13: Nativní preparát kultury GD z MA+gel, 12. den růstu, fázový kontrast</i>	<i>43</i>
<i>Obrázek 14: Nativní preparát kultury GD z MA+glu, 12. Den růstu, fázový kontrast.....</i>	<i>43</i>
<i>Obrázek 15: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 5. Den růstu, fázový kontrast</i>	<i>44</i>
<i>Obrázek 16: Nativní preparát kultury GD z MM+gel, 7. den růstu, fázový kontrast</i>	<i>45</i>
<i>Obrázek 17: Kultura GD z MM+gel, Gramovo barvení, 8. den růstu.....</i>	<i>46</i>
<i>Obrázek 18: Kultura GD z MM+gel, krystalová violeť, 8. den růstu</i>	<i>46</i>
<i>Obrázek 19: Povrch preparátu o velikosti 10x10 μm</i>	<i>47</i>
<i>Obrázek 20: Povrch preparátu o velikosti 50x50 μm</i>	<i>47</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Hodnoty koncentrace DOC v průběhu kultivace kultury GD, MM+RAF</i>	<i>48</i>
<i>Tabulka 2: Hodnoty koncentrace DOC v průběhu kultivace kultury GD, MM+STA</i>	<i>48</i>
<i>Tabulka 3: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 1. experimentu</i>	<i>49</i>
<i>Tabulka 4: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 2. experimentu</i>	<i>50</i>
<i>Tabulka 5: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 2. experimentu</i>	<i>51</i>
<i>Tabulka 6: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 3. experimentu</i>	<i>52</i>
<i>Tabulka 7: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 3. experimentu</i>	<i>53</i>
<i>Tabulka 8: Naměřené hodnoty absorbance biofilmových kultur při 4. experimentu</i>	<i>54</i>