

Bakteriální degradace vybraných polysacharidů

Bc. Lenka Dobrovolná

Diplomová práce
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

akademický rok: 2005/2006

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka DOBROVOLNÁ**

Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Bakteriální degradace vybraných polysacharidů**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerži zaměřenou na problematiku bakteriálního rozkladu xanthanu a gellanu.
2. Ověřte výskyt bakterií, rozkládajících uvedené sacharidy, ve vzorcích vnějšího prostředí, zejména půd.
3. Isolujte klíčové kultury bakterií z vybraných vzorků a popište jejich základní vlastnosti.
4. Získané výsledky zpracujte a přehledně uspořádejte, případně navrhnete další postup studia těchto mikroorganismů.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Dle pokynů vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2006

Termín odevzdání diplomové práce:

26. května 2006

Ve Zlíně dne 20. února 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




doc. Ing. Jaromír Hoffmann, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

V práci byl studován počet bakterií rozkládající xanthan a gellan. Výskyt těchto bakterií byl sledován v půdních vzorcích odebraných z Jižního Altaje a také ze vzorku zemědělské zeminy v ČR.

Výsledky ukázaly, že degradační bakterie se vyskytují ve všech půdních vzorcích v různých počtech, avšak pokusy o izolaci degradačních bakterií nebyly zcela úspěšné a byly získány převážně bakterie využívající degradační produkty polymerů.

Klíčová slova: xanthan, gellan, degradace, půda, bakterie

ABSTRACT

In this thesis the counts of bacteria degrading xanthan or gellan were studied. The occurrences of these bacteria were observed in soil samples obtained in South Altaj and also in one sample of agricultural soil from the Czech Republic.

The results showed that degrading bacteria are present in all soil samples in various counts. Advances of isolation of degrading bacteria were not quite successful, only bacteria probably utilizing products of polymers degradation were obtained.

Keywords: xanthan, gellan, degradation, soil, bacteria

Poděkování

Srdečně děkuji vedoucímu diplomové práce RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za trpělivost, vstřícnost, příkladné vedení a veškeré odborné rady udělované po celou dobu měření a zpracovávání diplomové práce.

Dále děkuji pracovníkům ÚIOŽP za vytvoření skvělého pracovního prostředí a pracovních podmínek a všem, kteří mi jakkoli během mé činnosti pomohli.

Prohlášení

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

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

Ve Zlíně dne 26.5. 2006

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD	8
1 LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
1.1 POLYSACHARIDY OBECNĚ	9
1.1.1 Exopolysacharidy obecně.....	9
1.2 XANTHAN.....	9
1.2.1 Strukturální jednotka xanthanu	11
1.2.2 Molekulární struktura xanthanu	11
1.2.3 Funkčnost xanthanu	12
1.3 GELLAN.....	12
1.3.1 Strukturální jednotka gellanu	12
1.3.2 Molekulární struktura gellanu	13
1.3.3 Funkčnost gellanu	13
1.4 BIODEGRADACE OBECNĚ	13
1.4.1 Biodegradace xanthanu	13
1.4.2 Biodegradace gellanu	15
1.5 ASIMILACE XANTHANU A GELLANU	15
1.5.1 Depolymerizační systém pro gellan u bakterie <i>Bacillus sp.</i> GL1.....	16
1.5.2 Depolymerační systém pro xanthan u bakterie <i>Bacillus sp.</i> GL1.....	18
2 MATERIÁLY A METODIKA	21
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	21
2.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	25
2.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	27
2.4 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY.....	28
2.4.1 Sterilizace	28
2.4.2 Výtřep vzorku zeminy	28
2.4.3 Stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN).....	28
2.4.4 Stanovení celkového počtu bakterií	30
2.4.5 Postup při získávání degradačních bakterií (pasážování).....	32
2.4.6 Postup při izolaci kultur z pasáže.....	32
2.4.7 Postup při naočkování získaných čistých kultur	33
2.4.8 Příprava fixovaného preparátu	33
2.4.9 Gramovo barvení preparátu.....	34
2.4.10 Stanovení pH půdy	34
2.4.11 Ztráta žíháním	34
2.4.12 Stanovení vlhkosti gravimetricky.....	34
2.4.13 Měření pH	34
3 VÝSLEDKOVÁ A DISKUZNÍ ČÁST	35
3.1 STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH CHARAKTERISTIK VZORKŮ PŮD	35
3.2 STANOVENÍ POČTU DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ VE VZORCÍCH PŮD METODOU MPN	35
3.2.1 Jednotlivé vzorky	36

3.2.2	Srovnání vzorků	48
3.3	POMNOŽENÍ A ZÍSKÁVÁNÍ DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ (PASÁŽOVÁNÍ, ISOLACE).....	48
ZÁVĚR	52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	55
SEZNAM OBRÁZKŮ	56
SEZNAM TABULEK	57

ÚVOD

Stále nové poznatky a objevy přispívají nejen ke zvyšování našeho pohodlí, zlepšování technologií, výrobě nových strojů, ale také k rychlému rozvoji průmyslu a dalších odvětví. Mimo jiné s sebou přinášejí vznik nových organických látek a spousty odpadů, které představují obrovskou zátěž pro životní prostředí. Člověk jako součást přírody si musí uvědomovat její důležitost pro svoji existenci a tomu také podřídit své jednání. Jelikož člověk stojí na počátku vzniku těchto látek, musí to být zase on, kdo vezme na svá bedra důsledky svého jednání a pomůže se s nimi vypořádat.

Mezi tyto látky se mimo spousty dalších řadí také polysacharidy. K polysacharidům patří např. xanthan, gellan. Vznikají v menší míře například přirozenou činností různých bakterií a plísní, ale také činností člověka průmyslově. Jsou široce používány v průmyslových aplikacích jako zahušťovadla, stabilizátory, želatinační činidla, v kosmetice do krémů a masek, ve farmacii a v potravinářství.

Bylo zjištěno, že tyto průmyslově vyrobené polysacharidy jsou biodegradovatelné a těmto výzkumům začala být věnována velká pozornost. Výzkum o odstranění, tedy rozložení těchto materiálů z půd i odpadních vzorků, se ponejvíc zaměřuje na odstranění biologickými procesy, které jsou vykonány mikroorganismy a jejich enzymy.

Protože znalosti o mikroorganismech schopných rozkladu xanthanu a gellanu jsou doposud omezené či neúplné, a není příliš známo ani jejich rozšíření v prostředí, stala se tato oblast náplní diplomové práce.

„Příroda je neúprosná a nepodplatitelná.
Je jí jedno, zda je lidem srozumitelný či
nepochopitelný smysl jejího konání.“
GALILEO GALILEI

1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1 Polysacharidy obecně

Polysacharidy jsou vysokomolekulové látky sestávající z mnoha desítek až tisíců cukerných jednotek, nejčastěji hexopyranosových. Vznikají jejich kondensací za vzniku glykosidových vazeb. Tvoří tak různě dlouhé, lineární nebo větvené řetězce. Stavebními jednotkami polysacharidů bývají často disacharidy (např. maltosa). U lineárních polysacharidů pouze poslední zbytek řetězce, obsahující volnou poloacetalovou skupinu, je schopen se chovat jako redukující cukr a také vyvolat mutarotaci. Většina v přírodě se vyskytujících polysacharidů nejsou chemická individua, ale směsi podobných polysacharidů vzájemně se lišících molekulovou hmotností. Polysacharidy jsou většinou nerozpustné ve studené vodě, z některých lze v horké vodě připravit koloidní roztoky nebo gely [1].

1.1.1 Exopolysacharidy obecně

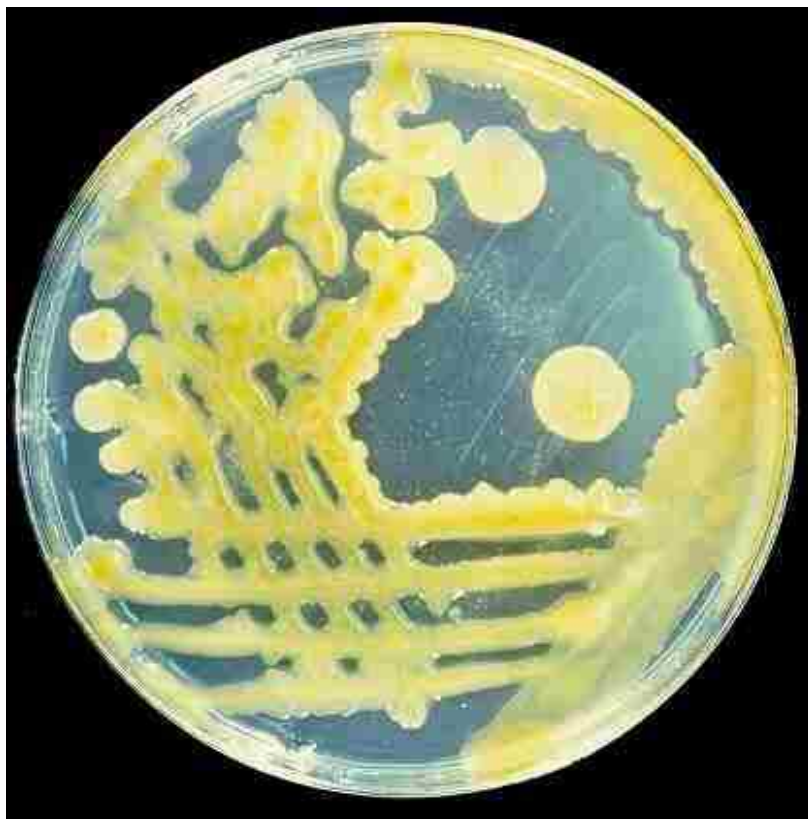
Z pestré škály polysacharidů, vylučovaných různými mikroorganismy (exopolysacharidy), nacházejí uplatnění neutrální polysacharidy (dextran, pullulan, curdlan, skleroglukan) a aniontové heteropolysacharidy (xanthan, alginát, gellan). Tvoří je nižší houby (např. pullulan, skleroglukan) i bakterie (mimo jiné xanthan, gellan, dextran a curdlan). Tvorba exopolysacharidů nastává obecně v neaktivní fázi růstu buněk a lze ji většinou zvýšit vysokým poměrem uhlík / dusík v médiu [1]. Mikrobiální exopolysacharidy jsou třídou extracelulárně produkováných vodorozpustných polymerů produkováných širokým okruhem mikroorganismů. Vzhledem k jejich rozmanitosti ve struktuře a vlastnostech našly mikrobiální polysacharidy širokou použitelnost v potravinářství, ve farmacii a dalších průmyslových odvětvích jako stabilizátory, emulgátory a želatinační činidla. Průmyslově vyráběné mikrobiální polysacharidy jsou např. xanthan, gellan, dextransy, pullulan, curdlan, kvasnicový glukán a bakteriální algináty [2].

1.2 Xanthan

Xanthan je extracelulární polysacharid produkováný *Xanthomonas campestris*. Má mnoho průmyslových aplikací jako zahušťovadlo vodných roztoků, stabilizátor emulzí

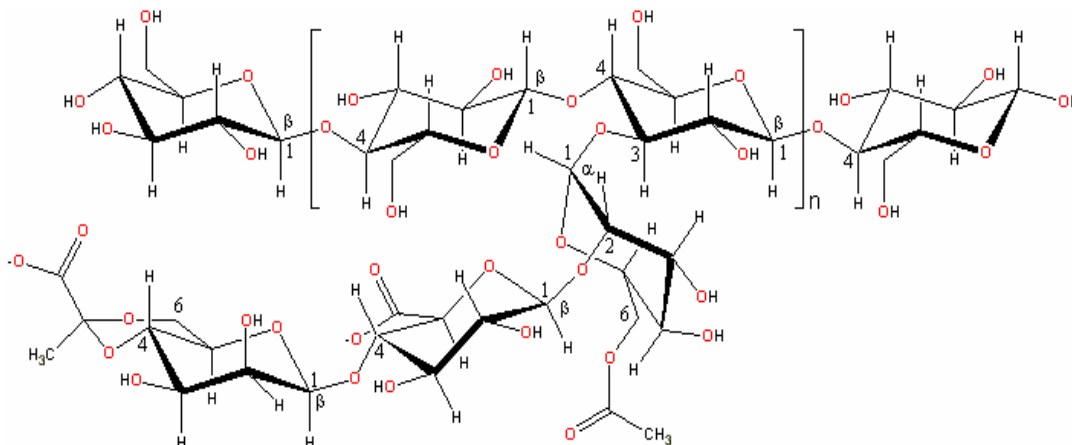
a pěn, dále je používán v mnoha jídlech např. šťáv, nápojů, zmrzliny a salátových dresingů.

Je odolný proti vysušení [3].



Obr.1 Xanthan produkovaný *Xanthomonas campestris*

1.2.1 Strukturální jednotka xanthanu



Obr.2 : Molekulární struktura xanthanu [4]

Xanthan je aniontový elektrolyt s β - (1 \rightarrow 4) D – glukopyranosovou glukonovou kostrou. Postranní řetězce se skládají z (3 \rightarrow 1) α - D – manopyranosy – (2 \rightarrow 1) - β - D – glukuronové kyseliny – (4 \rightarrow 1) - β - D – manopyranosy. Menší polovina (asi 40 %) manosových zbytků obsahují zbytek kyseliny pyrohroznové a vnitřní manosa je většinou acetylována. Některé postranní řetězce mohou chybět [4].

1.2.2 Molekulární struktura xanthanu

Každá molekula se skládá asi ze 7000 pentamerů a xanthan je méně polydisperzní než většina hydrokoloidů. Jeho přírodní stav je bimolekulární antiparalelní dvoušrobovice. Tím může tvořit velmi pevné intramolekulární šroubovitě či dvojšroubovicové konformace. Glukanová kostra je chráněna stabilními postranními řetězci vůči kyselinám, zásadám a enzymům. Použití různých kultur nebo kultivačních podmínek může vést ke vzniku derivátů xanthanu [4].

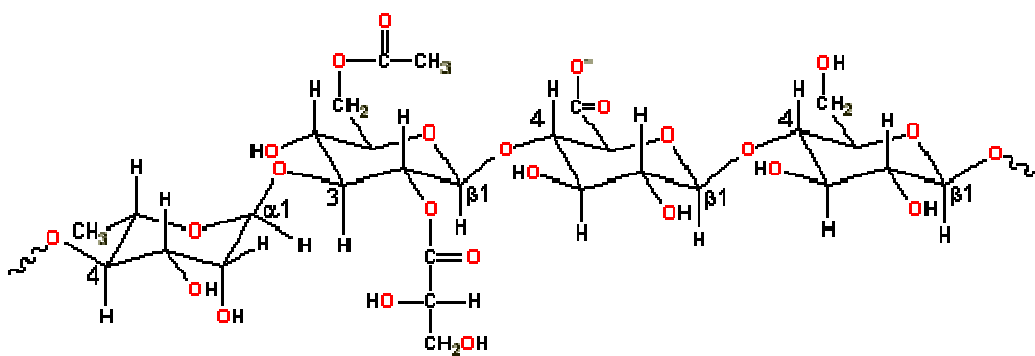
1.2.3 Funkčnost xanthanu

Xanthan je považován za negelující a užívaný pro kontrolu viskozity vzhledem jeho vlastnostem. Ve studené vodě rychle hydratuje bez vytváření shluků. Není příliš ovlivněn (roztok xanthanu) iontovou silou, pH v rozmezí 1 – 13, ani teplotou. Je schopný synergistické interakce s polysacharidy typů galaktomananů a glukomananů. Při těchto interakcích tvoří termoreverzibilní měkké elastické gely [4].

1.3 Gellan

Gellan je extracelulární polysacharid produkovaný *Sphingomonas elodea* (dříve *Sphingomonas paucimobilis* nebo *Pseudomonas elodea*). Má početné průmyslové aplikace jako vysoko viskózní polysacharid jako suspenzní prostředek, želatinační činidlo a jeho benzyl- estery byly ověřeny jako vhodné prostředky pro řízené uvolňování léčiv ze zapouzdřených léčivých přípravků [2].

1.3.1 Strukturální jednotka gellanu



Obr.3: Molekulární struktura gellanu [5]

Gellan je lineární polysacharid složený z tetrasacharidů 4→L- rhamnosa – (α - 1→3) D – glukosa – (β - 1→4) – D – glukosa – (β - 1→4) – D – glukosa. Glukosa vázaná v pozici 3 je acetylována a glycerylována. Gellan má vysokou molekulovou hmotnost, skládající se asi 50 000 sacharidových zbytků a obvykle je při průmyslové výrobě deesterifikován alkalickým zpracováním (před použitím v potravinách) [5].

1.3.2 Molekulární struktura gellanu

Gellan tvoří tříčlennou dvoušroubovici v níž se dva řetězce stáčí kolem sebe a třetí se ovíjí kolem nich. Jednotlivé řetězce jsou provázány vodíkovými vazbami[5].

1.3.3 Funkčnost gellanu

Funkčnost gellanu závisí na stupni acylace a koncentraci přítomných iontů. Jestliže je gellan ponechán v přírodní acylované podobě, tak vytváří měkké, pružné, průhledné a flexibilní gely, ale v deacylované formě vytváří tvrdé, nepružné, křehké gely. Gellanový roztok může udržovat nerozpuštěné částice v suspenzi, ale na rozdíl jiných želatinačních činidel bez výrazné rostoucí viskozity roztoku. Gelová přeměna roztoků nastává přibližně při 50 °C v závislosti na koncentraci sloučeniny. Termoreverzibilní gely tvoří za chladu, v přítomnosti nízkých koncentrací kationtů (0,005 až 0,1 hm.%) [5].

1.4 Biodegradace obecně

Biodegradace (biologický rozklad) je speciálním případem degradace, při níž dochází k rozkladu organických látek působením jakýchkoliv biologických činitelů. Velmi významná je zejména biodegradace mikroorganismy, neboť zabezpečuje rozklad látek ve vnějším prostředí. Co se týká biodegradace polymerních materiálů, na jejich rozkladu se podílí jak bakterie, tak plísně či jiné mikroorganismy. Kromě podmínek potřebných pro biologické procesy (vlhkost, pH prostředí, dostupnost prvků apod.) hrají důležitou roli i další faktory, zejména struktura polymeru, jeho kombinace s jinými materiály, stupeň stárí, molekulová hmotnost a podobně. Enzymy produkované bakteriemi a plísněmi způsobují degradaci samotných polymerů i případných dalších složek plastů. V drtivé většině případů je mikrobiální rozklad polymerních sloučenin zahajován účinkem extracelulárních enzymů, které štěpí polymery na kratší fragmenty, jež jsou poté transportovány do buněk [6].

1.4.1 Biodegradace xanthanu

Biodegradací xanthanu se zabývali Cadmus a kolektiv. Izolovali čistou kulturu *Bacillus sp.* K11 ze směsi půdy a rozkládající se stromové drtě. K produkci enzymu z kmene

K11 byl vyizolován jako pomocný kmen K17. Kmen K17 izolovali ze stejného vzorku půdy a byl identifikován jako *Flavobacterium sp.* Tuto dvoučlennou kulturu nazvali K11 + K17.

Kromě výše uvedené směsné kultury byl vyizolován další producent xanthanasy kmen *Bacillus sp.* 13-4. Byl získán z aktivovaného kalu.

Navíc, na aktivitu xanthanasy byly testovány sbírkové druhy *Bacillus sp.*: *B.adius*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pasteuriana*, *B. polymyxa* a *B. subtilis* [7].

Isolaci prováděli autoři následujícím způsobem. Půdní a kalový vzorek (0,5 g) získali z různých zdrojů a lokalit, které byly přidány po částech k 20 ml pomnožovacího média s xanthanem (dále jen EB) a EB plus s 4% NaCl. Vzorky se nechaly inkubovat při 30°C na rotační třepačce po dobu asi 1 měsíce. Na konci této inkubace došlo k výrazné ztrátě viskozity.

Z aktivovaného kalu vyizolovali kmen 13-4 pomocí pomnoženého EB na EB agarových miskách. Čistá kultura rostla pomalu za standardních laboratorních medií, ale rychleji rostla na agaru, který obsahoval xanthan [7].

Výsledky produkce xanthanasy samotným kmenem K11 byly nižší než ze smíšené kultury. K11 + K17 – tato produkovala dvakrát více xanthanasy než K11 sám. Enzymy z K11 a K11 + K17 byly identické. Ze sbírky kultur bylo získáno deset identifikovaných mikroorganismů nalezených v půdě. Devět z nich vzrostly v přítomnosti kmene K11. Tento efekt signalizuje asociaci mezi kmenem K11 a ostatními mikroorganismy, který nebyl limitovaný na jednotlivé rody nebo druhy.

Obě xanthanasy (z kultur K11 i K 13-4) byly prozkoumány z hlediska pH-optima a bylo zjištěno, že jejich maximální aktivita je při pH = 5,4 [7].

Liu a kolektiv izolovali nový *Cellomonas sp.* XL z půdních vzorků, který byl schopen degradace xanthanu z *Xanthomonas campestris*. Tato degradace však byla potlačena přidáním glukosy. Enzym degradující xanthan byl nalezen v supernatantu kultury, když *Cellomonas sp.* XL byl pěstovaný v médiu s xanthanem jako uhlíkatým zdrojem. Optimální podmínky pro reakci degradace xanthanu bylo pH = 6 a 40 °C [9].

Podle Ruijssenaarse a kol. je rozkladu xanthanu schopna i bakterie *Paenibacillus alginolyticus* XL-1, izolovaná z půdy. Tato bakterie však degradovala jen přibližně 28 % xanthanové molekuly a zanechávala základní řetězec nedotčen. Přesto bylo zjištěno, že bakterie vytváří několik extracelulárních enzymů degradujících xanthan včetně xanthan lyasy. Produkce xanthan lyasy byla potlačena glukosou a rovněž nízkomolekulárními produkty enzymové degradace xanthanu [11].

Kromě popisu konkrétních bakteriálních kultur schopných rozkladu xanthanu jsou i další známky přítomnosti těchto bakterií v půdním prostředí. V antarktických minerálních půdách byl podle Kerryho testován efekt živin a vody k zlepšení biodegradaci petroleje. Dusík, fosfor a draslík byly aplikovány v roztoku s anebo bez xanthanu do uměle znečištěné zeminy. Půda obohacená xanthanem měla na konci pokusu nejvyšší zbytkové uhlíkaté znečištění (xanthan tedy nepodporoval biodegradaci uhlovodíků), avšak tento polysacharid byl spotřebován půdními mikroorganismy jako alternativní uhlíkový zdroj, což indikovalo přítomnost bakterií využívajících xanthan [10].

1.4.2 Biodegradace gellanu

Podle Sutherlanda a Kennedyho existuje mezi bakteriemi rodu *Sphingomonas*, schopných tvorby exopolysacharidu gellanu a příbuzných polymerů, řada kmenů vykazujících konstitutivní gelasanovou aktivitu. V každém případě byla degradace deacylovaného gellanu způsobena extracelulární lyasami, které štěpily vazbu mezi β - D - glukosylovou a 1,4 - β - D - glukuronylovou jednotkou v tetrasacharidu opakující se jednotky polysacharidu [12].

1.5 Asimilace xanthanu a gellanu

Hashimoto a kolektiv izolovali z vodní stoky bakterii rozkládající jak gellan, tak xanthan a identifikovali ji jako *Bacillus sp.* Zjistili dále, že jde o sporotvorné tyčinky s bičíky. Bakterie byla podobná *Bacillus circulans* a pojmenovali ji *Bacillus sp.* GL1. V důsledku růstu této kultury v gellanovém mediu prudce klesla jeho viskozita, což indikovalo depolymeraci gellanu. Enzym (lyasa) zodpovědný za depolymeraci byl přítomen

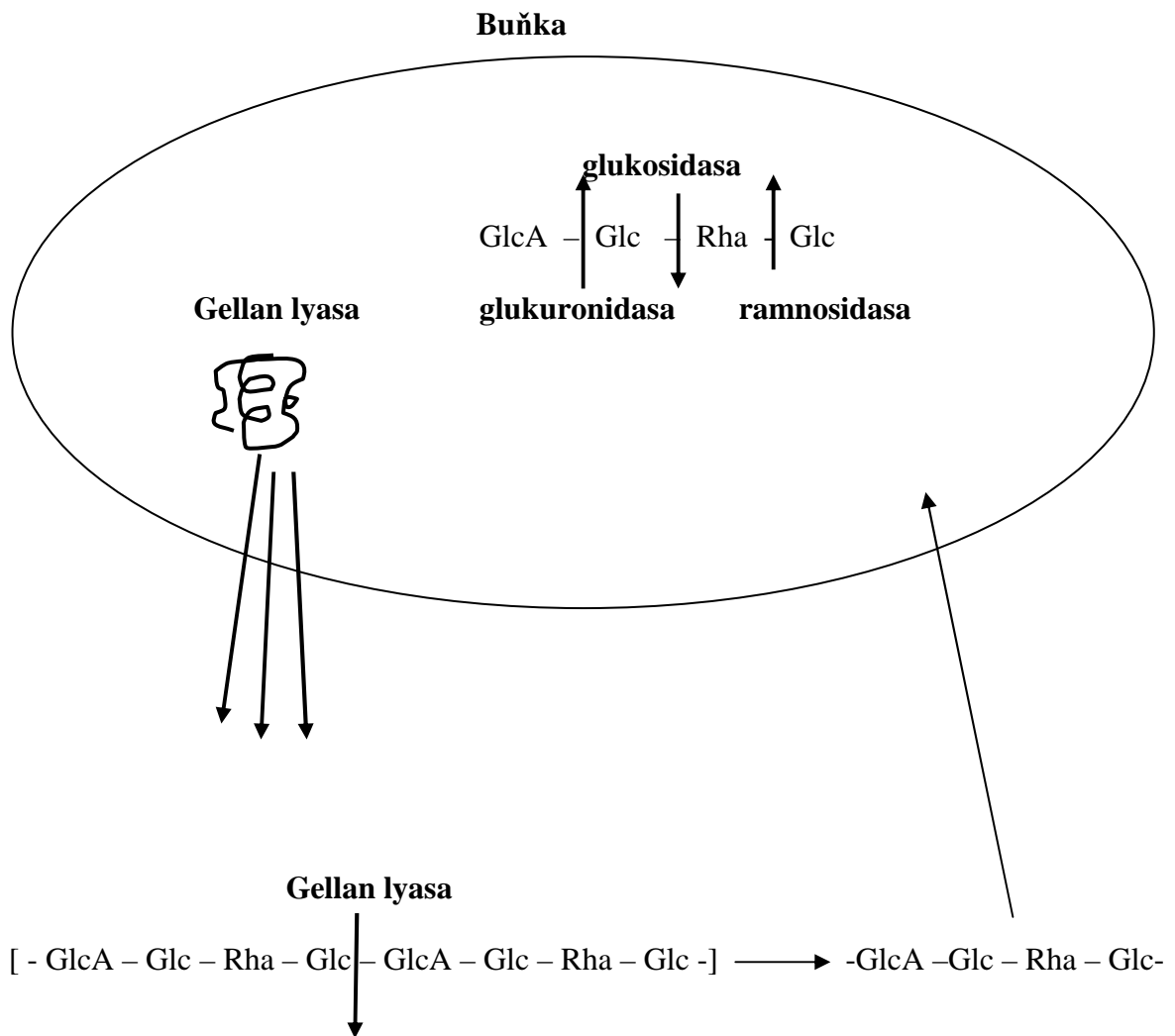
v médiu coby extracelulární enzym a další enzymy potřebné pro rozklad produktů depolymerace (exoglykosidasy jako je α -L-rhamnosidasy a β -D-glukosidasy) byly nalezeny uvnitř buněk.

Autoři navíc uvedli, že některé bakterie jsou známé depolymerací xanthanu pro jejich růst a že v živném médiu se hromadí produkty depolymerace xanthanu. Tuto vlastnost zjistili i u izolované kultury *Bacillus sp. GL1*, neboť asimilovala xanthan v přísadce s gellanem. Když došlo k růstu bakterií v médiu s xanthanem jako jediným uhlíkovým zdrojem, viskozita média klesla jako důsledek buněčného růstu [10].

1.5.1 Depolymerizační systém pro gellan u bakterie *Bacillus sp. GL1*

Autoři popsali celý enzymový systém, který kultura *Bacillus sp. GL1* využívá k utilizaci gellanu.

Tetrasacharid (opakující se uvnitř gelanové molekuly) produkovaný extracelulární gellan lyasou je transportován do buněk a potom hydrolyzovaný na monosacharidy postupnými reakcemi katalysovanými vnitrobuněčnými enzymy glukuronidasou, β -D-glukosidasou a α -L-rhamnosidasou [8]. Schéma rozkladu je znázorněno na obr. 4.

Obr.4 Gellan - depolymerizační systém v *Bacillus sp.*GL1 [8].

Glukuronidasa

Glukuronidasa katalyzuje hydrolýzu tetrasacharidů a byla rovněž izolována z buněk *Bacillus sp.* GL1. Sled nukleotidů genu pro tento enzym byl prozkoumán sekvencí a bylo zjištěno, že se skládá z 1131 bp, která kóduje bílkovinu s molekulovou hmotností 42 859. Čistý enzym z *Bacillus sp.*GL1 je monomer s molekulovou hmotou 42 kDa a je nejaktivnější při pH = 6,5 a 45 °C. Glukuronidasa je považovaná za enzym s širší funkcí pro rozklad oligosacharidů s nenasycenou kyselinou uronovou, působící na produkty vytvářené polysacharidovými lyasami [8].

β-D-glukosidasa

Dva geny pro β-D-glukosidasu byly klonované a jejich sledy nukleotidů byly určeny. Jeden z těchto genů označen jako *bglA* obsahující ORF skládající se 1344 bp, který může zakodovat bílkovinu (BglA) s molekulovou hmotností 51 kDa a druhý označen jako *bglB* skládající se 2268 bp, který koduje protein (BglB) s molekulovou hmotností 82 kDa. BglA a BglB jsou monomerní enzymy a jsou nejaktivnější při pH = 6 a 8. Substrátová specifita BglA je širší než u BglB. Jak však bylo zjištěno, pouze BglA působí na trisacharid (Glc-Rha-Glc) produkovaný z tetrasacharidu glukuronidasou a hydrolyzuje ji na glukosu a disacharid (Rha-Glc) [8].

α-L-rhamnosidasa

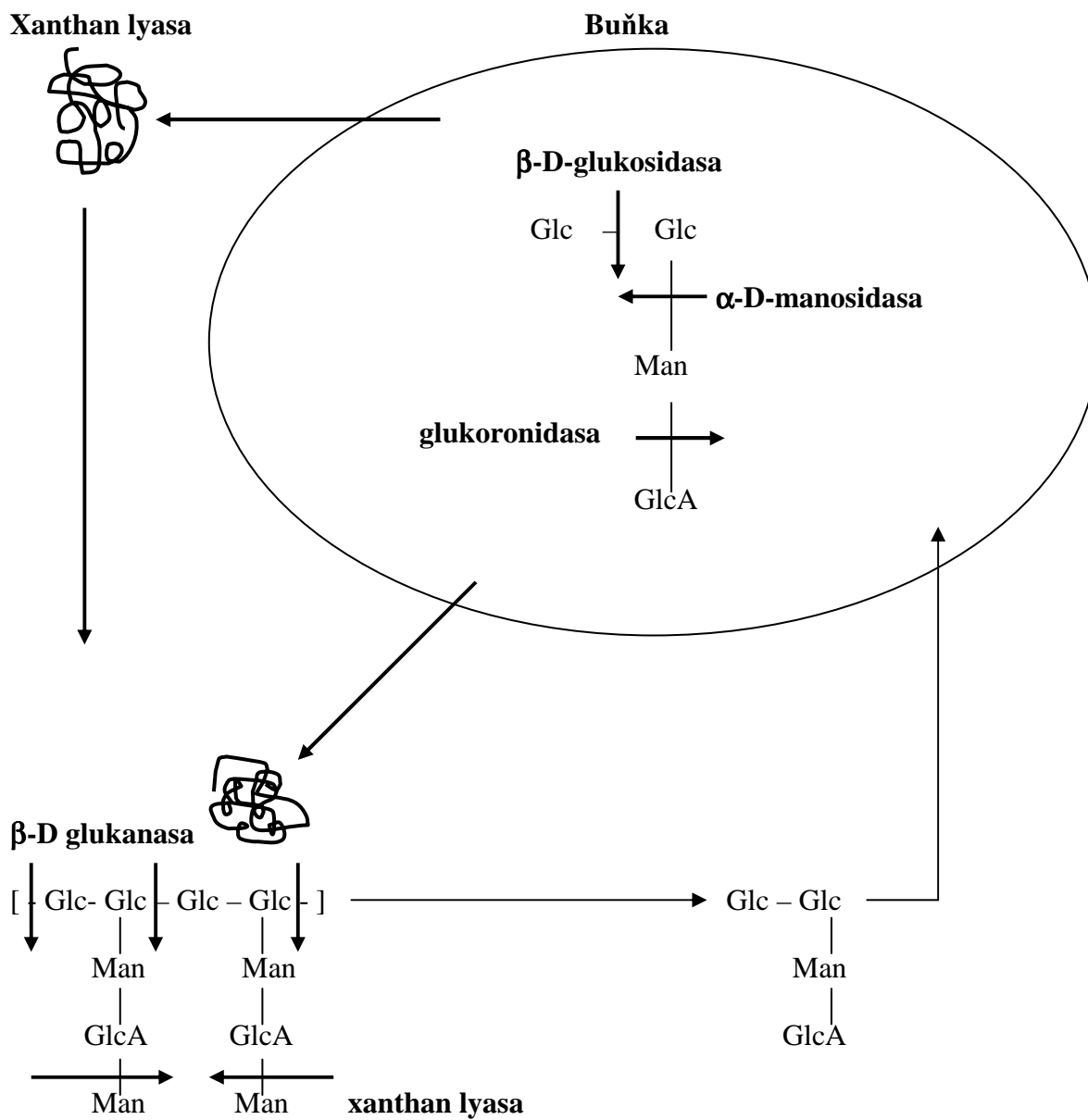
α-L-rhamnosidasa z *Bacillus sp.* GL1 je monomer s molekulární hmotností 100 kDa a je nejaktivnější při pH = 7 a 50°C a uvolňuje rhamnosu z disacharidu (Rha-Glc) produkovaného enzymem BglA.

Celkově je tedy možné shrnout, že bakterie *Bacillus* GL1 vylučující gellan lyasu (140 kDa) do média přemění gellan na tetrasacharidy (GlcA-Glc-Rha-Glc), což jsou opakující se jednotky polymeru. Produkované tetrasacharidy jsou pak transportované do buněk a degradovány na monosacharidy třemi druhy vnitrobuněčných exoglykosidas (glukuronidasa, β-D-glukosidasa a α-L-rhamnosidasa) [8].

1.5.2 Depolymerační systém pro xanthan u bakterie *Bacillus sp.* GL1

Enzymatická cesta depolymerace xanthanu u *Bacillus sp.* GL1 byla analyzována určením depolymerizačních produktů xanthanu. Během růstu bakterie v xanthanovém médiu byly nahromaděné tři druhy produktů (P1, P2, P3). P1 s molekulovou hmotností 250 byla stanovena jako pyruvylovaná manosa uvolněná xanthan lyásou. P2 a P3 s molekulární hmotnostmi 704 a 662 byly zjištěné jako tetrasacharidy (GlcA-Glc-Man-Glc) složené z nenasycené glukuronové kyseliny, manosy a ze dvou glukosových zbytků s nebo bez acetylové skupiny v manosovém zbytku. Proto P2 a P3 byly považované za produkty uvolněné během reakce enzymu β-D-glukanasy na hlavní řetězec xanthanu – tento enzym depolymeruje hlavní řetězec xanthanu mezi glukosovými jednotkami. Formace z pentasacharidu (opakující se jednotka tvořící xanthan) nebyla téměř zaznamenána, což indikuje to,

že u *Bacillus sp.* GL1 jako první reaguje extracelulární xanthan lyasa na xanthanových postranních řetězcích a teprve potom extracelulární β -D-glukonasa hydrolyzuje spojení hlavního řetězce na tetrasacharid. Tetrasacharid produkovaný xanthan lyasou a β -D-glukonasou je degradovaný na monosacharidy pomocí enzymů, které jsou již lokalizovány v buňkách (produkty P4 a P5) [8]. Schéma rozkladu je znázorněno na Obr.5.



Obr.5 Xanthan - depolymerizační systém v *Bacillus sp.* GL1 [8]

2 MATERIÁLY A METODIKA

2.1 Použité chemikálie a roztoky

Není-li uvedeno jinak, byly použity chemikálie čistoty p.a. firmy LACHEMA

Suspendační roztok

100 ml suspenčního roztoku bylo připraveno:

Tween 80.....	0,15 g
Difosforečnan sodný.....	0,4 g
NaCl.....	0,5 g

Dané složky byly naváženy do láhve a bylo přidáno 100 ml destilované vody. Vše bylo promícháno a dáno v uzavřené láhvi do autoklávu vysterilizovat při 120 °C na 15 min. Suspendační roztok se používá k výtřepu zemin k uvolnění půdních bakterií do roztoku.

Roztok A

Bylo naváženo 9,0788 g KH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan draselný) a toto množství bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody.

Roztok B

Bylo naváženo 23,9032 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát) a toto množství bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody.

Roztok stopových prvků

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

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (čistý).....0,040 g

Byla navážena množství těchto látek, rozpuštěna v 1 l destilované vody a vše důkladně promícháno.

Minerální médium pro kultivace (MM), tekuté

Složení minerálního média na 100 ml:

Zásobní roztok A2 ml

Zásobní roztok B8 ml

Destilovaná voda.....85 ml

Zásobní roztok stopových prvků.....0,2 ml

Kvasničný autolysát (IMUNA).....4 mg

Soli:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (zásobní roztok 10 g/l).....1 ml

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (zásobní roztok 3 g/l).....1 ml

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (zásobní roztok 1 g/l).....1 ml

NaCl (zásobní roztok 50 g/l).....1 ml

NH_4Cl (zásobní roztok 30 g/l).....1 ml

Minerální médium s xanthanem / gellanem (MMX / MMG)

Minerální médium.....100 ml

Xanthan (p.a., FLUKA, konečná koncentrace 500 mg/l).....50 mg

Gellan (deacylovaný, p.a., FLUKA, konečná koncentrace 500 mg/l).....50 mg

Rozpuštění xanthanu a gellanu bylo prováděno za tepla ve vodní lázni. Po zchlazení bylo připravené minerální médium rozpipetováno do 50 ml lahvíček po 15 ml. Takto připravené lahvičky byly dány sterilizovat do autoklávu při 115 °C na 20 min.

Fyziologický roztok

Používá se pro přípravu inokula.

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěným 8,5 g NaCl v 1 l destilované vody. Roztok byl důkladně promíchán a dán vysterilizovat do autoklávu při 120 °C na 15 minut.

TYA agar

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

Daná složka byla navážena, do láhve bylo přidáno 100 ml destilované vody. Vše se promíchalo a dáno v uzavřené láhvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut. Po zchládnutí asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do petriho misek a ponechán ztuhnout.

Tento živný agar obsahuje trypton a kvasničný hydrolyzátní a používá se jako univerzální živné médium pro kultivaci heterotrofních bakterií.

TYA agar s glukosou (TYA – GLU)

TYA agar s glukosou (HIMEDIA).....2,4 g
Destilovaná voda.....100 ml

Daná složka byla navážena, do láhve bylo přidáno 100 ml destilované vody. Vše se promíchalo a dáno v uzavřené láhvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut. Po zchládnutí asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do petriho misek a ponechán ztuhnout.

Minerální agar (MA)

Základ pro minerální agar:

K_2HPO_40,1 g
 NH_4Cl0,11 g
 $Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$0,02 g
 $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$0,005 g

CaCl₂.....0,002 g

Agar.....1,6 – 1,8 g

Příprava minerálního agaru:

Bylo naváženo 1,9 -2,1 g základu pro minerální agar na 100 ml destilované vody, přidáno 0,2 ml roztoku stopových prvků (na 100 ml) a vše dobře promícháno. Takto připravený minerální agar byl dán sterilizovat v uzavřené lahvi do autoklávu při 120 °C na 15 minut. Po zchlazení asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do misek a ponechán ztuhnout.

Minerální agar s glukosou (MA – GLU)

Minerální agar.....1,9 g

Glukosa0,5 g

Kvasniční autolysát (IMUNA).....0,02 g

Dané složky byly naváženy, do láhve bylo přidáno 100 ml destilované vody. Vše se promíchalo a dáno v uzavřené láhvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut. Po zchlazení asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do petriho misek a ponechán ztuhnout.

Minerální agar s xanthanem / gellanem (MA – X / MA – G)

Minerální agar2,1 g

Xanthan / Gellan (deacylovaný gellan, p.a., FLUKA).....0,5 g

Kvasniční autolysát (IMUNA).....0,02 g

Dané složky byly naváženy, do láhve bylo přidáno 100 ml destilované vody. Vše se promíchalo a dáno v uzavřené láhvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut. Po zchlazení asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do petriho misek a ponechán ztuhnout.

Gellanový agar (G – agar)

Gellan (deacylovaný, p.a., FLUKA).....2,5 g

Kvasniční autolysát (IMUNA).....0,02 g

Dané složky byly naváženy, do láhve bylo přidáno 100 ml destilované vody. Vše se promíchalo a dáno v uzavřené láhvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut. Po zchládnutí asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do petriho misek a ponechán ztuhnout.

2.2 Biologický materiál

Vzorky půd z jižního Altaje:

- Vzorek A – oblast: Argut, 1281 m.n.m, zemina luvisol – výrazně vyvinutý a relativně mocný (>10 cm) organický profil, tmavě šedo-hnědý s velkým obsahem hlinité frakce a kořenovým systémem hustého travnatého porostu. Minerální hnědá pigmentace vy-srážených oxidů železa je patrná v nižších půdních partiích. Celková mocnost půdního profilu v nížinné periodicky saturované depresi 30-50 cm.
- Vzorek B – oblast: řeka Kužurmubulak, 2201 m.n.m, brunisol (hnědozem) – slabě vyvinutý tmavě hnědý organický horizont, 5-8 cm mocný, překrývající na svažitém terénu světle hnědý minerální horizont s malou strukturní konzistencí a vyšším obsahem písčité frakce a kamenité klastické složky břidlicového podloží. Celková mocnost půdního profilu 15-25 cm.
- Vzorek C – oblast: step Samacha, 1645 m.n.m, černozem – relativně vyvinutý, tmavě hnědý organický profil, cca. 10 cm mocný, stepního travnatého porostu a slabě vyvinutou půdní strukturou, překrývající tmavě šedohnědý minerální horizont s vysokým obsahem písčité frakce a méně kompaktní struktury. Celková mocnost půdního profilu cca. 20-25 cm zformovaného na kamenito-písčité terase.
- Vzorek D – oblast: Katuňský hřeben, 2335 m.n.m, brunisol (hnědozem) – slabě vyvinutý tmavě hnědý organický horizont, cca. 8 cm mocný, překrývající hnědý minerální horizont s vyšším obsahem jílu a kamenité klastické složky podloží. Celková mocnost půdního profilu 20-30 cm.

- Vzorek E – oblast: řeka Kalanegyr, 2200 m.n.m, brunisol (hnědozem) – slabě vyvinutý tmavě hnědý organický horizont, cca. 10 cm mocný, překrývající hnědý minerální horizont s vyšším obsahem jílu a kamenité klastické složky podloží. Celková mocnost půdního profilu 20-25 cm.

Vzorek půdy z ČR:

- Vzorek F – oblast: ornice u Třebčína, 235 m.n.m, hnědozem, v blízkosti listnatých stromů

2.3 Přístrojové vybavení

- Analyzátor uhlíku 5000 A (Shimadzu, Japonsko)
- pH metr OP – 208 + skleněná elektroda (Radelkis, Maďarsko)
- Centrifuga MR 23i (Jouan, Francie)
- Elektrická sušárna (MORA, ČR)
- Elektrická sušárna (Memmert, SRN)
- Elektrická sušárna (Chirana, ČR)
- Chladnička (Ardo, ČR)
- Chladnička (Zanusi, ČR)
- Předvážky KERN 440 – 47 (SRN)
- Analytické váhy KERN 770 (SRN)
- Třepačka GFL 3020 (Polsko)
- Elektrický vaříč ETA (ČR)
- Mikroskop CX 41 (Olympus)
- Mikroskopická komůrka Cyrus II (Meopta, ČR)
- Tlakový hrnec (Tescoma, ČR)
- Kyvety do centrifugy (Nagle Company, USA)
50 ml plastové kyvety s plastovými víčky typ Round centrifuge tube, PC.
- Mikrodávkoč (1-5 ml, 100-1000 μ l, 20-200 μ l) (Biohit, Finsko)
- Laboratorní autokláv St-MCS-203 (Sanoclav, SRN)
- Aseptický laminární box (Telstar, Španělsko)

2.4 Metodika a pracovní postupy

2.4.1 Sterilizace

Během práce bylo nutné dodržovat sterilitu práce s ohledem na maximální eliminace potenciálních kontaminací. Veškeré použité roztoky i zařízení byly předem vysterilizovány. Všechny používané roztoky a destilovaná voda na přípravu minerálních medií byly sterilizovány v autoklávu 15 - 20 minut při teplotě 120 °C, v případě obsahu glukosy byl použit režim 115°C po dobu 20 minut.

Laboratorní sklo s nímž bylo pracováno, bylo sterilizováno v sušárně 2 hodiny při 170 °C.

2.4.2 Výtřep vzorku zeminy

Bylo naváženo 10g vzorku zeminy do 100 ml sterilního suspenzačního roztoku a 10 minut bylo intenzivně třepáno v ruce.

2.4.3 Stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN)

Metoda MPN je způsob kvantifikace mikroorganismů ve vzorcích bez použití agarových živných půd. Metoda spočívá v desetinném ředění vzorku a ve vyočkování vybraných ředění do tekutých živných půd, v nichž je po kultivaci růst hledaných mikroorganismů detekován určeným způsobem. Jsou zaznamenávány počty pozitivních paralelních testů v jednotlivých ředěních, přičemž za základ se obvykle použije to zředění, jež má ještě všechny tři výsledky pozitivní a pak dvě zředění následující. Pro odhad počtu mikroorganismů ve vzorku se použije statistické vyhodnocení uvedené v tabulce 1., kde výsledný odhad je vynásoben hodnotou základního ředění [13].

Tab.1: Nejpravděpodobnější počet mikroorganismů při použití tří paralelních vzorků v každém ředění – počet pozitivních výsledků [13]

1.ředění	2.ředění	3.ředění	počet mikroorganismů
0	0	0	0
0	0	1	0,3
0	1	0	0,3
0	1	1	0,6
0	2	0	0,6

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

Přepočet počtu bakterií z metody MPN na sušinu:

počet bakterií1 g vlhkého vzorku
stanovená sušina (%).....x g suchého vzorku

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

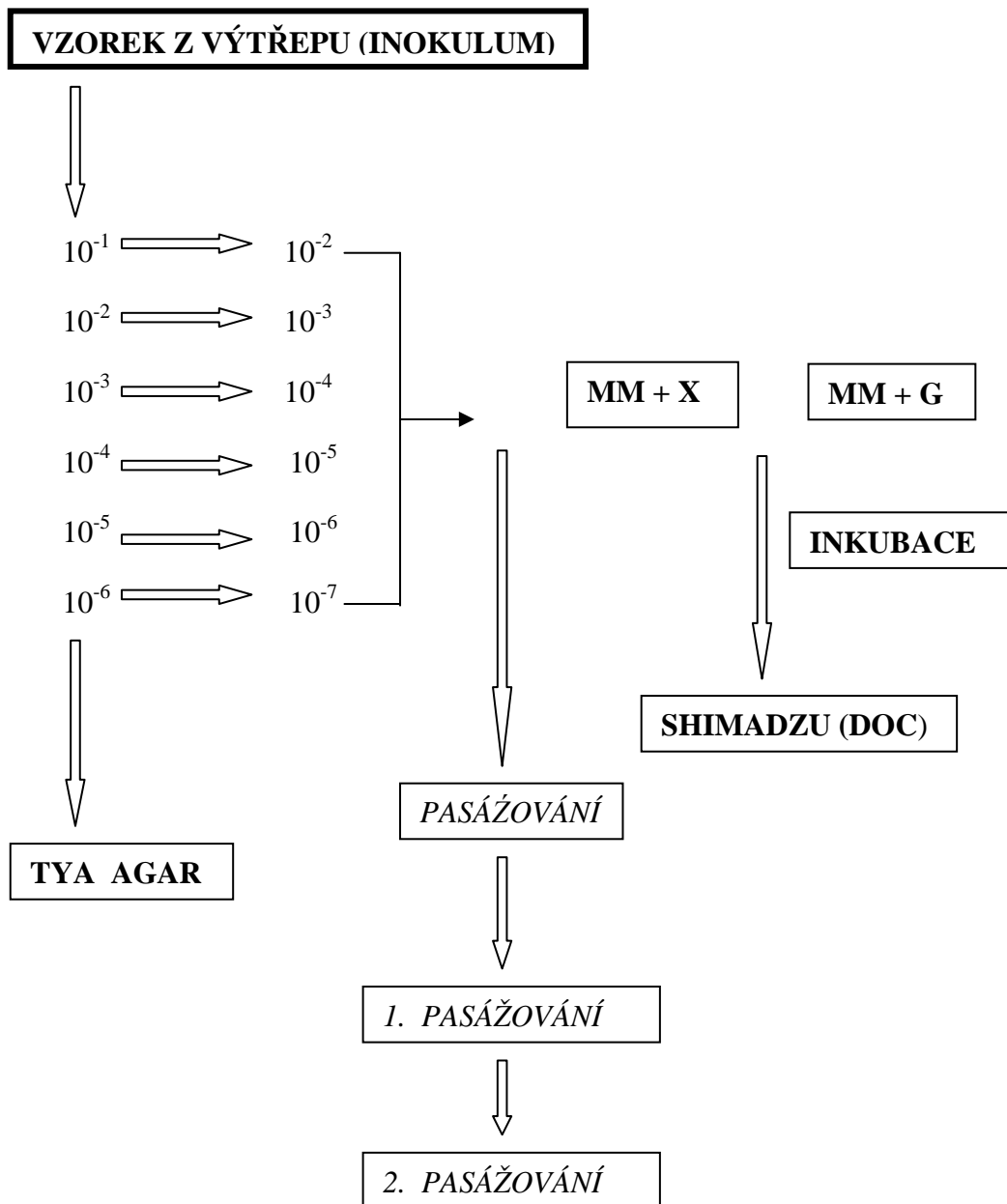
Postup metody MPN

Bylo naváženo 10 g zeminy do suspenzačního roztoku a 10 minut bylo intenzivně třepáno v ruce. Po 1 minutě sedimentace hrubých částí byl supernatant ředěn desetinnou řadou. Do sterilních zkumavek bylo asepticky nadávkováno 4,5 ml fyziologického roztoku. Pipetováno bylo asepticky 0,5 ml z výtřepu zeminy do prvního ředění 10^{-2} až do ředění 10^{-6} . Dále bylo toto připravené ředění naočkováno asepticky po 0,1 ml do připravených sterilních lahviček s minerálním tekutým médiem s xanthanem (MMX) a do lahviček s minerálním tekutým médiem s gellanem (MMG). Každé ředění bylo dávkováno paralelně do tří lahviček. Takto nachystané lahvičky byly nechány inkubovat na třepačce 10 dní při 25 °C. K těmto lahvičkám byly ještě přidány tři nenaočkované lahvičky s MMX a tři s MMG jako kontroly (K_2). V kontrolách (K_1) bez inkubace byly stanoveny hodnoty celkového organického uhlíku na přístroji Shimadzu.

Po uplynulé době inkubace byly zkontrolovány zákaly lahviček se vzorkem, byla provedena centrifugace při režimu 10 000 G, 15 °C po dobu 10 minut, supernatanty byly naředěny destilovanou vodou 1:1 a byly stanoveny hodnoty celkového organického uhlíku stejným přístrojem.

2.4.4 Stanovení celkového počtu bakterií

Vybraná ředění vzorku z metody MPN byla asepticky naočkována po 0,1 ml na připravené TYA agary pro stanovení celkového počtu bakterií v použité půdě. Necháno inkubovat 7 dní při laboratorní teplotě. Po uplynulé době inkubace byl proveden odpočet kolonií.



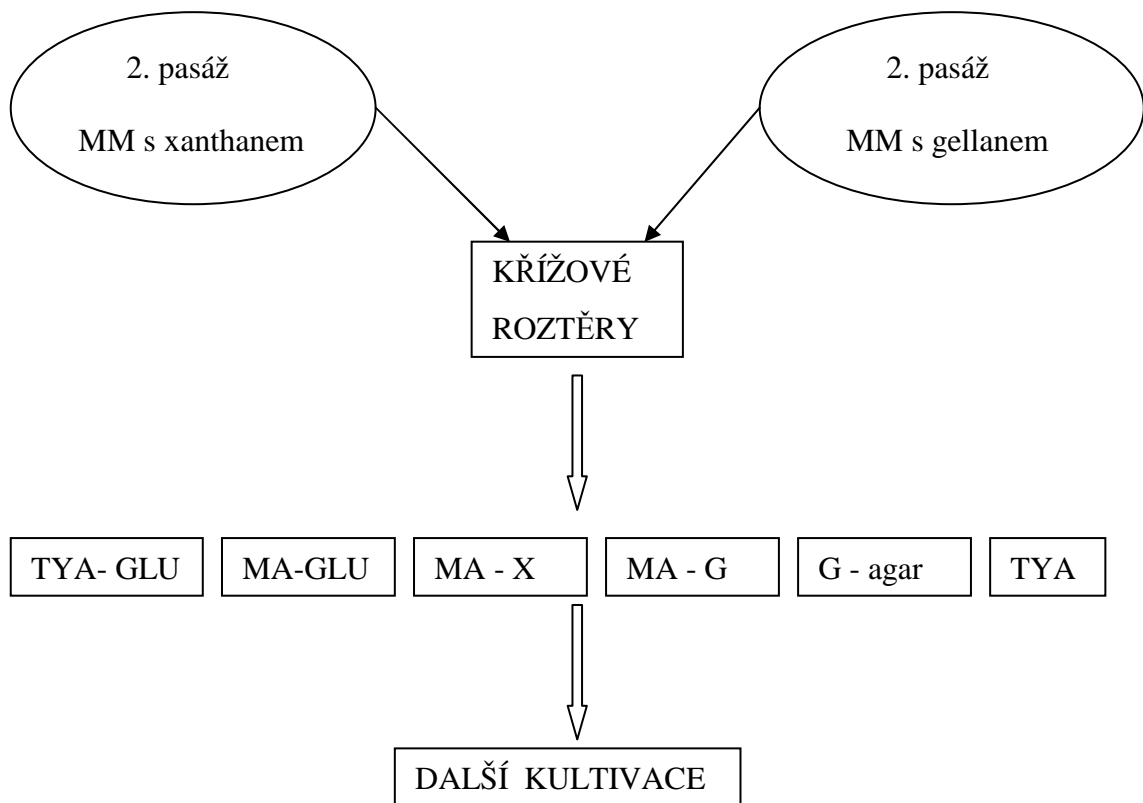
Obr.6 Schéma postupu při metodě MPN

2.4.5 Postup při získávání degradačních bakterií (pasážování)

U vybraných ředěních z metody MPN (lahvičky se zákalem) bylo provedeno první a druhé pasážování. Do sterilní lahvičky s MMX resp. MMG bylo asepticky nadávkováno 10 µl suspenze z vybraných lahviček. Necháno inkubovat na třepačce 10 dní při 25 °C. Po této době inkubace byla provedena další pasáž, která také byla nechána inkubovat na třepačce 10 dní při 25 °C. V některých případech byla po pasáži změřena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku pro ověření spotřebování substrátu mikroorganismy. Z druhé pasáže se provedly izolace přítomných kultur ve vzorku.

2.4.6 Postup při izolaci kultur z pasáže

Nejprve byly připraveny TYA, TYA agar s glukosou, minerální agar s glukosou, minerální agar s xanthanem, minerální agar s gellanem a gellanový agar. Na připravené petriho misky s agary bylo asepticky kličkou udělány křížové roztěry. Takto připravené misky byly nechány podle potřeby a růstu bakterií inkubovat při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo provedeno buď další křížové roztěry pro získání čistých kultur nebo se získané kultury uschovaly do chladničky pro další použití.



Obr.7 Schéma postupu při izolaci kultur

2.4.7 Postup při naočkování získaných čistých kultur

Do sterilních lahviček s minerálním médiem MMX resp. MMG byla asepticky klíčkou odebrána čistá kultura z petriho misky, která byla rozmíchána. Naočkována byla každá kultura zvlášť a také směs těchto vyizolovaných kultur. Necháno inkubovat potřebnou dobu (obvykle 10 – 14 dní) na třepačce při 25 °C. Po uplynulé době inkubace byly lahvičky zcentrifugovány, supernatant byl naředěn destilovanou vodou 1:1 a dán změřit na Shimadzu na zjištění koncentrace rozpuštěného uhlíku.

2.4.8 Příprava fixovaného preparátu

Podložní sklíčko bylo položeno na čistý filtrační papír. Doprostřed sklíčka byla umístěno dávkovačem kapka ze zakalené lahvičky. Sklíčko bylo necháno vyschnout a pak bylo nátěrem vzhůru třikrát protaženo plamenem kahanu. Po vychladnutí bylo s preparátem dále pracováno.

2.4.9 Gramovo barvení preparátu

Připravený fixovaný preparát na podložním sklíčku byl převrstven roztokem krystalové violeti a ta působila 60 sekund. Po té byl převrstven Lugolovým roztokem, který působil také 60 sekund. Preparát byl opláchnut destilovanou vodou a odbarven v šikmé poloze etanolem 20 – 25 sekund a opět opláchnut destilovanou vodou. Dále byl převrstven karbol-fuchsinem 60 sekund, opláchnut destilovanou vodou a ponechán uschnout. Mikroskopován byl pomocí inverzního objektivu, celkové zvětšení 1000x.

2.4.10 Stanovení pH půdy

Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 20 g půdy, přidáno 50 ml roztoku 0,2 M KCl a rozmícháno skleněnou tyčinkou. Za 24 hodin byla suspenze přefiltrována přes řídký filtr (červená páska) a bylo změřeno pH.

Roztok 0,2 M KCl byl připraven navážením 15 g KCl, který byl rozpuštěn v 1000 ml destilované vody [14].

2.4.11 Ztráta žíháním

Vzorek půdy byl nejdříve vysušen v mělké misce při teplotě 105 °C po dobu dvou hodin. Po vychladnutí v exsikátoru byl do vyžíhaného a zváženého spalovacího kelímku naváženo asi 10 g tohoto vysušeného vzorku s přesností $\pm 0,0001$ g a kelímek byl žíhán při 550 °C po dobu čtyř hodin [15].

2.4.12 Stanovení vlhkosti gravimetricky

Do váženky bylo naváženo 5 – 10 g vzorku půdy s přesností $\pm 0,001$ g. Váženka byla umístěna do sušárny nejprve na 2 hodiny při 40 – 60 °C a potom ještě na 6 hodin při 105 °C. Po této době byla váženka uzavřena víčkem a nechána v exsikátoru nejméně 30 minut. Vychladlá váženka byla zvážena s přesností $\pm 0,001$ g [15].

2.4.13 Měření pH

Měření pH bylo prováděno pH-metrem, se skleněnou elektrodou. pH-metr byl před měřením kalibrován pomocí příslušných pufrů.

3 VÝSLEDKOVÁ A DISKUZNÍ ČÁST

3.1 Stanovení základních charakteristik vzorků půd

Stanovení pH, stanovení sušiny, stanovení ztráty žháním

Tab. 2: Naměřené a vypočítané hodnoty vzorků půd

vzorek	A (lesostep)	B (mokrý hnědozem)	C (step)	D (chudá a kamenitá zemina)	E (svah)	F (hnědozem)
pH	5,6	4,6	4,0	3,4	4,0	5,8
S (%)	28,11	82,62	77,22	54,13	79,80	64,33
Z (%)	76,87	8,87	6,55	9,58	22,30	8,95

S = sušina v %

Z = ztráta žháním v % sušiny

Z výsledků vyplynulo, že díky nízkému pH jde o půdy mírně kyselé. Z vypočítaných hodnot sušiny má nejmenší sušinu vzorek A, neboť půda byla velmi mokrá. Dále z výsledků vyplývá, že nejvíce bylo spáleno vzorku A, který obsahoval nejvíce organického substrátu.

3.2 Stanovení počtu degradačních bakterií ve vzorcích půd metodou

MPN

Cílem této části práce bylo zjistit kolik je přítomných bakterií rozkládající xanthan či gellan ve vybraných vzorcích půd, odebraných v oblasti Jižního Altaje a ze vzorku zemědělské zeminy v ČR. Metoda byla provedena podle postupu podrobně popsáno v kapitole 2.4.3. Princip spočíval v naočkování sady ředění vzorků do tekutých živných médií s obsahem xanthanu nebo gellanu, v nichž byla po inkubaci hodnocena přítomnost či absence degradačních bakterií pomocí zbytkových koncentrací rozpuštěného organického uhlíku (DOC). V jednotlivých tabulkách uvedených níže jsou silným tiskem (**bold**) označena ta ředění vzorků, která byla použita pro výpočet počtu degradačních bakterií v jednotlivých půdách. Za pozitivní vzorky byly považovány ty, v nichž hodnoty DOC dosahovaly maximálně 30 mg/l.

3.2.1 Jednotlivé vzorky

Vzorek A

- oblast: Argut, 1281 m.n.m, zemina luvisol – výrazně vyvinutý a relativně mocný (>10 cm) organický profil, tmavě šedo-hnědý s velkým obsahem hlinité frakce a kořenovým systémem hustého travnatého porostu. Minerální hnědá pigmentace vysrážených oxidů železa je patrná v nižších půdních partiích. Celková mocnost půdního profilu v nížinné periodicky saturované depresi 30-50 cm.

Tab.3: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		xanthan				
		nález				
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	24,98	+	15,00	+	19,12	+
10^{-3}	8,97	+	19,05	+	9,84	+
10^{-4}	13,10	+	15,94	+	10,15	+
10^{-5}	120,0	-	110,0	-	23,54	+
10^{-6}	59,08	-	158,7	-	118,0	-
K1	124,2	-	134,9	-	145,6	-
K2	131,2	-	130,8	-	201,4	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po uplynulé době inkubace bylo zaznamenáno, že lahvičky se zředěním 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} byly všechny zakalené, tudíž došlo k jistému namnožení mikroorganismů, u zředění 10^{-5} došlo k zákalu jen v jedné paralelce a ve dvou zbývajících nedošlo, u zředění 10^{-6} k zakalení nedošlo. Z výsledků DOC je zřejmé, že zákal odpovídá hodnotám uvedených v tabulce č.3. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících xanthan je $1,6 \cdot 10^5$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $6,0 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

Tab.4: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		gellan			
		nález			
ředění	1		2		3
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)
10^{-2}	25,84	+	13,69	+	26,64
10^{-3}	74,66	-	119,3	-	50,57
10^{-4}	72,50	-	80,68	-	123,3
10^{-5}	88,64	-	155,2	-	147,1
10^{-6}	119,4	-	150,7	-	157,6
K1	181,3	-	210,2	-	118,8
K2	215,4	-	221,6	-	214,6

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} došlo k zákalu, u zředění 10^{-6} byl zaznamenán jen jemný zákal. Z výsledků DOC je však vidět, že zákal neodpovídají hodnotám v tabulce č.4 a že tedy v některých ředěních došlo jen k částečnému rozkladu substrátu. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících gellan je $8,9 \cdot 10^3$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $6,0 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

Vzorek B

- oblast: řeka Kužurmubulak, 2201 m.n.m, brunisol (hnědozem) – slabě vyvinutý tmavě hnědý organický horizont, 5-8 cm mocný, překrývající na svažitém terénu světle hnědý minerální horizont s malou strukturální konzistencí a vyšším obsahem písečné frakce a kamenité klastické složky břidlicového podloží. Celková mocnost půdního profilu 15-25 cm.

Tab.5: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		xanthan				
		nález				
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	9,17	+	8,02	+	9,15	+
10^{-3}	7,03	+	8,58	+	8,57	+
10^{-4}	4,35	+	4,47	+	7,81	+
10^{-5}	76,10	-	78,32	-	72,58	-
10^{-6}	77,58	-	91,12	-	82,59	-
K2	51,00	-	58,70	-	69,28	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} došlo k zákalu, u zředění 10^{-5} , 10^{-6} k zákalu nedošlo. Z výsledků DOC je zřejmé, že zákal odpovídá hodnotám uvedených v tabulce č.5. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících xanthan je $3,0 \cdot 10^4$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $2,7 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

Tab.6: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		gellan				
			nález			
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	24,92	+	17,39	+	12,82	+
10^{-3}	11,18	+	7,16	+	5,87	+
10^{-4}	9,65	+	92,54	-	102,7	-
10^{-5}	97,82	-	94,56	-	89,42	-
10^{-6}	102,4	-	88,80	-	66,48	-
K2	71,42	-	82,72	-	77,86	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} , 10^{-3} došlo k zákalu, u zředění 10^{-4} došlo k zakalení u jedné paralelky a ve dvou ostatních k zákalu nedošlo, u zředění 10^{-5} , 10^{-6} k zákalu nedošlo. Z výsledků DOC je zřejmé, že zákaly odpovídají hodnotám uvedených v tabulce č.6. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících gellan je $5,4 \cdot 10^3$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $2,7 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

Při měření hodnot DOC došlo pravděpodobně ke špatnému dávkování všech vzorků v přístroji Shimadzu, neboť koncentrace DOC v kontrolách i ve vzorcích vysokých ředění byly neúměrně nízké (viz tabulky 5 a 6). Skutečná přítomnost degradačních bakterií v započítaných ředěních (10^{-4} u degradátorů xanthanu a 10^{-3} u degradátorů gellanu) byla proto potvrzena při pozdějším pasážování, kdy byly hodnoty DOC po kultivaci překontrolovány (po opravě přístroje), a kdy bylo zjištěno, že v obou případech byl vložený substrát zcela spotřebován (koncentrace DOC pod 30 mg/l).

Vzorek C

– oblast: step Samacha, 1645 m.n.m, černozem – relativně vyvinutý, tmavě hnědý organický profil, cca 10 cm mocný, stepního travnatého porostu a slabě vyvinutou půdní strukturou, překrývající tmavě šedohnědý minerální horizont s vysokým obsahem písčité frakce a méně kompaktní struktury. Celková mocnost půdního profilu cca 20-25 cm zformovaného na kamenito-písčité terase.

Tab.7: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		xanthan				
			nález			
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	22,82	+	20,94	+	30,3	+
10^{-3}	26,38	+	17,27	+	13,64	+
10^{-4}	170,3	-	169,3	-	171,3	-
10^{-5}	169,7	-	171,5	-	169,2	-
10^{-6}	172,5	-	169,5	-	168,6	-
K2	186,7	-	180,7	-	182,6	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} , 10^{-3} došlo k zákalu, u zředění 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} k zákalu nedošlo. Z výsledků DOC bylo usouzeno, že některé zákalové odpovídají zcela spotřebovaným substrátům u některých zředění však nikoliv. Lze tedy předpokládat, že v takových případech došlo jen k částečné degradaci polysacharidu, protože hodnoty koncentrací DOC byly nižší než u kontrol. Na základě získaných výsledků bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících xanthan je $3,2 \cdot 10^3$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $3,8 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

Tab.8: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		gellan				
		nález				
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	18,35	+	19,22	+	19,35	+
10^{-3}	22,22	+	21,84	+	19,02	+
10^{-4}	81,26	-	38,08	+	171,2	-
10^{-5}	174,5	-	178,1	-	178,5	-
10^{-6}	178,1	-	176,5	-	178,6	-
K2	192,5	-	190,7	-	190,2	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} , 10^{-3} došlo k zákalu, u zředění 10^{-4} došlo k zakalení u dvou paralelek a v jedné k zákalu nedošlo, u zředění 10^{-5} , 10^{-6} k zákalu nedošlo. Z výsledků DOC bylo posouzeno, že některé zákaly odpovídají hodnotám a u některých zředění došlo k částečné degradaci, proto jsou hodnoty nižší než kontroly. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících gellan je $5,8 \cdot 10^3$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $3,8 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

Vzorek D

– oblast: Katuňský hřeben, 2335 m.n.m, brunisol (hnědozem) – slabě vyvinutý tmavě hnědý organický horizont, cca. 8 cm mocný, překrývající hnědý minerální horizont s vyšším obsahem jílu a kamenité klastické složky podloží. Celková mocnost půdního profilu 20-30 cm.

Tab.9: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		xanthan				
			nález			
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	31,78	+	32,36	+	143,6	-
10^{-3}	141,0	-	150,4	-	151,8	-
10^{-4}	158,3	-	151,3	-	151,7	-
10^{-5}	151,8	-	157,1	-	153,7	-
10^{-6}	175,1	-	169,2	-	165,5	-
K2	169,4	-	167,2	-	166,1	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} byla velká přítomnost vloček bez zákalu, u zředění 10^{-3} byla menší přítomnost vloček bez zákalu, u zředění 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} byla malá přítomnost vloček také bez zákalu. Výsledky DOC jsou uvedené v tabulce č.9. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících xanthan je $1,6 \cdot 10^2$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $9,2 \cdot 10^5$ CFU / g suchého vzorku.

Tab.10: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

			gellan			
			nález			
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	143,6	-	52,20	+	118,9	-
10^{-3}	37,56	+	195,6	-	165,5	-
10^{-4}	167,5	-	171,7	-	175,4	-
10^{-5}	173,5	-	173,9	-	184,4	-
10^{-6}	193,4	-	176,7	-	191,4	-
K2	193,8	-	192,2	-	194,8	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} , 10^{-3} byly ve dvou paralelkách velká přítomnost vloček bez zákalu a jedna paralelka byla zakalená s velkou přítomností vloček, u zředění 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} byla malá přítomnost vloček bez zákalu. Výsledky DOC jsou uvedené v tabulce č.10. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících gellan je $1,3 \cdot 10^2$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $9,2 \cdot 10^5$ CFU / g suchého vzorku.

Vzorek E

– oblast: řeka Kalanegyr, 2200 m.n.m, brunisol (hnědozem) – slabě vyvinutý tmavě hnědý organický horizont, cca. 10 cm mocný, překrývající hnědý minerální horizont s vyšším obsahem jílu a kamenité klastické složky podloží. Celková mocnost půdního profilu 20-25 cm.

Tab. 11: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		xanthan				
			nález			
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	25,7	+	16,75	+	13,27	+
10^{-3}	9,56	+	10,87	+	12,79	+
10^{-4}	19,42	+	78,64	-	21,16	+
10^{-5}	119,8	-	17,34	+	97,34	-
K2	136,5	-	148,3	-	146,5	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} , 10^{-3} došlo k zákalu, u zředění 10^{-4} došlo k mírnému zákalu, u zředění 10^{-5} k mírnému zákalu došlo u jedné paralelky u dvou ne. Z výsledků DOC je zřejmé, že zákal odpovídají hodnotám uvedených v tabulce č.11. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících xanthan je $1,8 \cdot 10^4$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $8,4 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

Tab. 12: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

			gellan			
			nález			
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	17,51	+	14,08	+	95,6	-
10^{-3}	147,2	-	160,74	-	168,1	-
10^{-4}	68,78	-	78,38	-	108,5	-
10^{-5}	138,1	-	149,8	-	177,9	-
K2	80,52	-	115,3	-	148,1	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} došlo k zákalu, u zředění 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} k zákalu nedošlo. Z výsledků DOC je zřejmé, že zákal odpovídají hodnotám uvedených v tabulce č.12. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících gellan je $1,1 \cdot 10^2$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $8,4 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

Vzorek F

– oblast: ornice u Třebčína, hnědozem, v blízkosti listnatých stromů

Tab. 13: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		xanthan				
			nález			
ředění	1		2		3	
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení
10^{-2}	14,68	+	25,58	+	16,44	+
10^{-3}	13,8	+	13,81	+	22,6	+
10^{-4}	18,52	+	32,54	+	13,17	+
10^{-5}	20,32	+	140,06	-	78,58	-
10^{-6}	120,24	-	142,8	-	146,84	-
K2	121,34	-	139,44	-	135,76	-

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} došlo k vyvločkování a mírnému zákalu, u zředění 10^{-3} došlo u jedné paralelky k vyvločkování a mírnému zákalu, u dvou došlo k zákalu i k vyvločkování, u zředění 10^{-4} došlo k zákalu, u zředění 10^{-5} došlo u jedné paralelky k zákalu, u druhé paralelky došlo k mírnému zákalu a u třetí paralelky došlo k vyvločkování, u zředění 10^{-6} došlo u jedné paralelky k mírnému zákalu a u dvou paralelek ne. Výsledky DOC jsou uvedené v tabulce č.13. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících xanthan je $6,9 \cdot 10^4$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $5,7 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

Tab. 14: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění

		gellan			
		nález			
ředění	1		2		3
	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)	hodnocení	DOC (mg/l)
10^{-2}	16,44	+	16,18	+	10,1
10^{-3}	16,59	+	88,96	-	30,38
10^{-4}	10,74	+	90,2	-	12,17
10^{-5}	107,1	-	121,28	-	85,3
10^{-6}	146,46	-	170,88	-	158,12
K2	146,42	-	167,52	-	169,14

+ přítomnost degradačních bakterií (úplná degradace substrátu)

- nepřítomnost degradačních bakterií (úplná degradace neproběhla)

Po inkubaci bylo zaznamenáno, že u lahvíček se zředěním 10^{-2} , 10^{-3} došlo u jedné paralelky k zákalu i k vyvločkování, u druhé paralelky došlo k mírnému zákalu i k vyvločkování a u třetí paralelky došlo k vyvločkování, u zředění 10^{-4} došlo u dvou paralelek k zákalu a v jedné paralelce nedošlo k zákalu, u zředění 10^{-5} došlo k zákalu u jedné paralelky a ve dvou nedošlo k zákalu, u zředění 10^{-6} došlo k vyvločkování bez zákalu. Výsledky DOC jsou uvedené v tabulce č.14. Bylo vyhodnoceno, že počet mikroorganismů rozkládajících gellan je $3,1 \cdot 10^3$ bakterií / g suchého vzorku. Orientační počet mikroorganismů na TYA agaru byl $5,7 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku.

3.2.2 Srovnání vzorků

V následující tabulce č.15 jsou souborně uvedeny získané výsledky pro porovnání počtů degradačních bakterií ve zpracovaných vzorcích a pro jejich srovnání s celkovými počty bakterií v půdách.

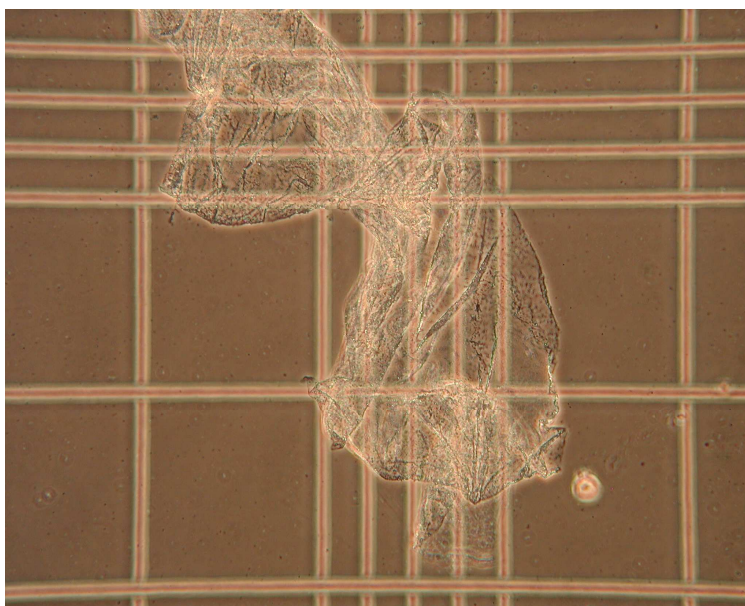
Tab.15: Přehledová tabulka výsledků

	A	B	C	D	E	F
pH	5,6	4,6	4,0	3,4	4,0	5,8
sušina (%)	28,11	82,62	77,22	54,13	79,80	64,33
ztráta žíháním (% sušiny)	76,87	8,87	6,55	9,58	22,30	8,95
odhad počtu bakterií (CFU/g)	$6,0 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$	$9,2 \cdot 10^5$	$8,4 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^6$
MPN – bakterie rozkládající xanthan (bakt./g such.vzorku)	$1,6 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^4$	$6,9 \cdot 10^4$
MPN – bakterie rozkládající gellan (bakterie /g such.vzorku)	$8,9 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$	$3,1 \cdot 10^3$

3.3 Pomnožení a získávání degradačních bakterií (pasážování, izolace)

Pasážování bylo provedeno za účelem najít určité mikroorganismy nebo směsi mikroorganismů rozkládající xanthan či gellan. Postup pasážování byl proveden podle postupu podrobně popsáno v kapitole 2.4.4. Pasážování bylo provedeno u půdních vzorků označených jako A, B, C a bylo následováno izolací jednotlivých kultur na pevných živných médiích.

U vzorku A bylo vyizolováno pět „xanthanových“ kultur (AX1, AX2, AX3, AX4 a AX5). Kultury byly naočkovány každá zvlášť do minerálního média s xanthanem. Ještě byla naočkována směs těchto kultur. Při průběhu inkubace byl sledován stav v lahvičkách. Po 7 dnech inkubace byly v lahvičce s kulturou AX1 okem viděny vlákna. Tyto vlákna byla mikroskopována a bylo usouzeno, že jde pravděpodobně o vlákna celulosy. Tyto vlákno je vyfotografováno na obr.č. 8. Pravděpodobně tedy kultura AX1 spotřebovává postranní řetězce xanthanu a tím jej přeměňuje na nerozpustnou celulosu.



Obr.8: Vlákna celulosy (200x zvětšené)

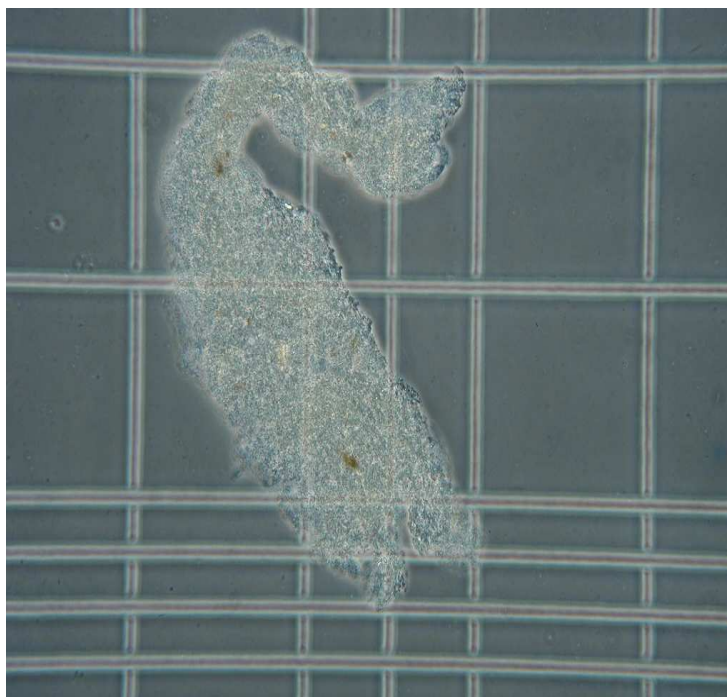
Tab.16: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci kultur

kultura	AX1	AX2	AX3	AX4	AX5	směs
DOC (mg/l)	57,62	74,52	141,7	144,3	148,3	136,3
hodnocení	-	-	-	-	-	-

Po uplynulé době inkubace byly suspenze z lahvíček s naočkovanými kulturami zcentrifugovány, naředěny a dány změřit na přístroj Shimadzu. Z výsledků je vidět, že došlo k částečné degradaci substrátu u kultur AX1 a AX2, ale úplné spotřebování substrátu nebylo zaznamenáno u žádné z kultur ani u použité směsi. Bylo tedy zřejmé, že pokus o získání degradačních kultur se nevydařil.

U vzorku B bylo vyizolováno šest „xanthanových“ kultur (BX1, BX2, BX3, BX4, BX5 a BX6). Kultury byly naočkovány každá zvlášť do minerálního média s xanthanem. Ještě byla naočkována směs těchto kultur. Při průběhu inkubace byl sledován stav v lahvíčkách. Asi po 5 dnech inkubace byly v lahvíčce s kulturou BX3 okem viděny vlož-

ky. Tyto vločky byly mikroskopovány a bylo zjištěno, že jde o bakteriální vločky. Tato vločka je vyfotografována na obr.č.9.



Obr.9: Bakteriální vločka (200x zvětšené)

Tab.17: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci kultur

kultura	BX1	BX2	BX3	BX4	BX5	BX6	směs
DOC (mg/l)	159,3	153,7	154,2	167,6	157,1	156,8	140,56
hodnocení	-	-	-	-	-	-	-

Po uplynulé době inkubace byly suspenze z lahvíček s naočkovanými kulturami zcentrifugovány, naředěny a dány změřit na přístroj Shimadzu. Z výsledků je vidět, že opět nedošlo k úplné degradaci substrátu a degradační bakterie tedy opět chyběly.

U vzorku C bylo vyizolováno devatenáct „gellanových“ kultur (CG1 – CG19). Vzhledem k vysokému počtu kultur byla do minerálního média s gellanem naočkována pouze směs těchto kultur.

Po uplynulé době inkubace byla suspenze s naočkovanou směsí zcentrifugována, supernatant byl naředěn a byla změřena koncentrace DOC na přístroji Shimadzu. Přístro-

jem bylo změřeno, že rozpuštěného organického uhlíku bylo 132,8 mg/l. Z toho vyplynulo, že nedošlo k úplné degradaci substrátu.

Tyto neúspěšné pokusy o izolaci bakteriálních kultur či konsorcií degradujících použité bakteriální polysacharidy tedy ukázaly, že v pomnožených vzorcích pravděpodobně převládaly bakterie bez schopnosti polysacharidy depolymerovat. Tyto bakterie zřejmě využívaly produkty rozkladu polysacharidů, vytvořené růstově náročnějšími kulturami, které se izolovat nepodařilo. Tyto práce tak ukázaly na relativní náročnost získávání depolymerovaných bakterií z pomnožených vzorků a na nutnost změny metodiky při získávání těchto mikroorganismů.

ZÁVĚR

V mé diplomové práci jsem studovala výskyt bakterií rozkládající xanthan resp. gellan. Výskyt těchto bakterií jsem sledovala v půdních vzorcích odebraných z Jižního Altaje a také ze vzorku zemědělské zeminy v ČR. Výskyt těchto bakterií jsem stanovovala metodou nejpravděpodobnějšího počtu (MPN). Bylo zjištěno, že degradační bakterie se vyskytovaly ve všech půdních vzorcích. Výsledky ukázaly, že počet bakterií rozkládajících xanthan se pohybovaly od $1,6 \cdot 10^2$ – $1,6 \cdot 10^5$ bakterií / g suchého vzorku. Dále zkoušky ukázaly, že počet bakterií rozkládajících gellan byl od $1,1 \cdot 10^2$ – $8,9 \cdot 10^3$ / g suchého vzorku. Byly také orientačně stanoveny celkové počty bakterií, které kolísaly od $9,2 \cdot 10^5$ – $8,4 \cdot 10^6$ CFU / g suchého vzorku. Z výsledků vyplývá, že největší počet bakterií rozkládající xanthan resp. gellan byl zjištěn ve vzorku A (lesostep). Domnívám se, že vzorek A byl bohatý na živiny i organické substráty pro namnožení bakterií.

Cílem také bylo pokusit se o izolaci čistých kultur z půdních vzorků a dále tyto kultury testovat v tekutém minerálním médiu s xanthanem, resp. s gellanem. Z půdního vzorku označovaného jako vzorek A se nám podařilo izolovat pět „xanthanových“ kultur AX1, AX2, AX3, AX4 a AX5. Tyto kultury rostly na miskách s TYA agarem, v lahvičkách s minerálním médiem s xanthanem jako jediným substrátem však projevíly jen nepatrný růst. Dále jsme izolovali šest „xanthanových“ kultur BX1, BX2, BX3, BX4, BX5 a BX6 z půdního vzorku označeného jako vzorek B. Tyto kultury rovněž v podobě samostatných kultur neprojevily schopnost xanthan rozkládat, a to ani ve směsi. Dále jsme izolovali devatenáct „gellanových“ kultur CG1 – CG19 z půdního vzorku označeného jako vzorek C. Tyto kultury také neprojevily žádné degradační účinky vůči použitému polysacharidu. Z výsledků lze říci, že kultury nedegradovaly xanthan resp. gellan, nýbrž pravděpodobně využívaly degradační produkty polymerů.

Na základě těchto výsledků je možno zdůraznit, že izolace degradačních bakterií není jednoduchá a bude jí muset být věnována další výzkumná činnost.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Vodrážka Z.: Biochemie. Academia, 2002
- [2] Nampoothiri K.M., Singhanian R.R., Sabarinath C., Pandey A.: Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*, PROCESS BIOCHEMISTRY, 38, 2003, str. 1513 - 1519
- [3] Ruijsenaars H.J., Bont de J. A. M., Hartmans S., A Pyruvated Mannose-Specific Xanthan Lyase Involved in Xanthan Degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1, Applied and Environmental Microbiology, 65, 1999, str.2446 - 2452
- [4] www.Isbu.ac.uk/water/hyxan.html. Dostupné on line 15.1.2006
- [5] www.Isbu.ac.uk/water/hygellan.html Dostupné on line 15.1.2006
- [6] Rosypal S. a kol.: Obecná bakteriologie, SPN Praha, 1981
- [7] Cadmus M.C., Jackson L.K., Burton K.A., Plattner R.D., Slodki M.E., Biodegradation of Xanthan Gum by *Bacillus sp.*, Applied and Environmental Microbiology, vol.44, 1982, str. 5-11
- [8] Hashimoto W., Momma K., Miki H., Mishima Y., Kobayashi E., Miyake O., Kawai S., Nankai., Mikami B., Murata K., Enzymatic and Genetic on Bases on Assimilation, Depolymerization, and Transport of Heteropolysaccharides in Bacteria, Journal of Bioscience and Bioengineering, 87, 1999, str. 123-136
- [9] Liu H.L., Huang C.D., Dong W.X., Du Y.G., Bai X.F., Li X.Z., Biodegradation of xanthan by newly isolated *Cellulomonas sp.* LX, releasing elicitor-active xantho-oligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons, PROCESS BIOCHEMISTRY, 40, 2005, str.3701 – 3706
- [10] Kerry E., Bioremediation of experimental petroleum spills on mineral soils in the vestfold hills, Antarctica, POLAR BIOLOGY, 13, str.163 – 170
- [11] Ruijsenaars H.J., Bont J.A.M., Hartmans S., A Pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1, Applied and Environmental Microbiology, 65, 1999, str. 2446 – 2452
- [12] Sutherland I.W., Kennedy L., Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas sp.*, Microbiology, 142, 1996, str. 867 – 872.

- [13] Harrigan W.F., Laboratory methods in food microbiology, Academic Press San Diego, 1998.
- [14] Zbiral J.: Analýza půd I. Státní kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 1995.
- [15] Zbiral J.: Analýza půd III. Státní kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 1997.

.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ÚIOŽP	– ústav inženýrství ochrany životního prostředí
EB	– pomnožovací médium
MM	– minerální médium
MMX	– minerální médium s xanthanem
MMG	– minerální médium s gellanem
TYA – GLU	– TYA agar s glukosou
MA	– minerální agar
MA – GLU	– minerální agar s glukosou
MA – X	– minerální agar s xanthanem
MA – G	– minerální agar s gellanem
G – agar	– gellanový agar
MPN	– metoda nejpravděpodobnější počtu mikroorganismů
DOC	– rozpuštěný organický uhlík (mg/l)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1 Xanthan produkovaný <i>Xanthomonas campestris</i>	10
Obr.2 : Molekulární struktura xanthanu.....	11
Obr.3: Molekulární struktura gellanu.....	12
Obr.4 Gellan - depolymerizační systém v <i>Bacillus sp.</i> GL1.....	17
Obr.5 Xanthan - depolymerizační systém v <i>Bacillus sp.</i> GL1.....	20
Obr.6 Schéma postupu při metodě MPN.....	31
Obr.7 Schéma postupu při izolaci kultur.....	33
Obr.8: Vlákna celulosy (200x zvětšené).....	49
Obr.9: Bakteriální vločka (200x zvětšené).....	50

SEZNAM TABULEK

Tab.1: Nejpravděpodobnější počet mikroorganismů při použití tří paralelních vzorků v každém ředění – počet pozitivních výsledků.....	28
Tab. 2: Naměřené a vypočítané hodnoty vzorků půd.....	35
Tab.3: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění...	36
Tab.4: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	37
Tab.5: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	38
Tab.6: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	39
Tab.7: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	40
Tab.8: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	41
Tab.9: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	42
Tab.10: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	43
Tab.11: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	44
Tab.12: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	45
Tab.13: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	46
Tab.14: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci ředění..	47
Tab.15: Přehledová tabulka výsledků.....	48
Tab.16: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci kultur..	49
Tab.17: Naměřené hodnoty rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po kultivaci kultur..	50

EVIDENČNÍ LIST MAGISTERSKÉ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Místo uložení práce: Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Autor práce: Lenka Dobrovolná
Název práce česky: Bakteriální degradace vybraných polysacharidů anglicky: Bacterial degradation of some polysaccharides
Vedoucí práce: RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
Vysoká škola (název a adresa): Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Mostní 5139, 760 01 Zlín Fakulta technologická, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení práce: 2006
Počet stran, obrázků, tabulek: 57, 9, 16
Předmětová hesla: česky: xanthan, gellan, degradace, půda, bakterie anglicky: xanthan, gellan, degradation, soil, bacteria
Souhrn česky: V práci byl studován počet bakterií rozkládající xanthan a gellan. Výskyt těchto bakterií byl sledován v půdních vzorcích odebraných z Jižního Altaje a také ze vzorku zemědělské zeminy v ČR. <p>Výsledky ukázaly, že degradační bakterie se vyskytují ve všech půdních vzorcích v různých počtech, avšak pokusy o izolaci degradačních bakterií nebyly zcela úspěšné a byly získány převážně bakterie využívající degradační produkty polymerů.</p> anglicky: In this thesis the counts of bacteria degrading xanthan or gellan were studied. The occurrences of these bacteria were observed in soil samples obtained in South Altaj and also in one sample of agricultural soil from the Czech Republic. <p>The results showed that degrading bacteria are present in all soil samples in various counts. Advances of isolation of degrading bacteria were not quite successful, only bacteria probably utilizing products of polymers degradation were obtained.</p>