

# **Bakteriální degradace polymerních sloučenin**

Bc. Zuzana Harkabuzíková

---

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. Zuzana HARKABUZÍKOVÁ**

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

Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Možnosti přípravy PVA fólií s vneseným aktivním bakteriálním kmenem**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerži na zadané téma s využitím dostupných databází (Web of Science, PubMed, Current Content) a dalších dostupných materiálů.
2. Pokuste se vyměřit metodu pro sledování počtu přežilých buněk kmene OT3.
3. Ověřte odolnost a přežívání kmene OT3 po vysušení a vliv různých faktorů.
4. Dále ověřte možnost a funkčnost aktivace PVA fólií pomocí kmene OT3.
5. Veškerá naměřená data zpracujte přehledně písemnou formou, výsledky s výhodou znázorněte pomocí tabulek a grafů s využitím počítače a dostupného programového vybavení.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Dle pokynů vedoucího diplomové práce**

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marek Koutný, 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.  
dekan



  
doc. Ing. Jaromír Hoffmann, CSc.  
ředitel ústavu

## **ABSTRAKT**

Mikroorganismy, jež jsou schopny degradovat PVA se v přírodě vyskytují jen omezeně. Cílem práce bylo ověřit způsoby, jimiž lze uchovat vitální bakteriální kmen OT3, který rozkládá PVA a to, zda je schopen přežít přiměřenou dobu ve formě vysušeného preparátu. Při testech byl zkoumán i ochranný účinek PVA a sušeného odstředěného mléka. Konečným cílem je příprava PVA fólií, které by na svém povrchu nesly vitální PVA degradující bakterie, takže by po jejich vstupu do prostředí nastala rychlejší biodegradace. Výsledky naznačují, že PVA samotný má pouze slabý ochranný účinek a bylo možno pozorovat rychlé ztrátu vitality bakterií OT3 při skladování. Jako nadějný se ukázal ochranný účinek sušeného mléka, kdy si bakterie uchovaly vitalitu po dobu asi 40 dnů a jejich počet vitálních buněk se stabilizoval na úrovni mezi  $10^7$  a  $10^6$  v ml. Přežívání v dalším časovém horizontu bude dále sledováno.

## **ABSTRACT**

Microorganisms capable to degrade PVA occur relatively rarely in the environment. The aim of the study was to found, how to maintain viability of PVA degrading strain OT3 and verify weather it is capable to survive in the form of dried preparation for reasonable time period. Tests included investigation of preservative effects of PVA itself and dried skim milk. The ultimate goal was to prepare PVA films with viable PVA degrading bacteria on its surface promoting fast biodegradation of the films after their deposition in the environment. The results suggest that PVA alone had only limited protecting effect and relatively fast extinction of OT3 viability during the storage time could be observed. In contrast protective effects of dried milk seemed to be promising because bacteria maintained its viability for about 40 days and counts of viable cells were stable in the interval of  $10^7$  to  $10^6$  cells per mililiter. Longer term survival will be further investigated.

Keywords: polyvinylalcohol, bacteria, survival, drying, biodegradation

## Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za odborné vedení a poskytování cenných rad při vypracování této diplomové práce.

Děkuji celému kolektivu ústavu inženýrství životního prostředí za vytvoření velmi dobrých podmínek při práci. Ráda bych také upřímně poděkovala rodičům, přátelům a kolegům za podporu a povzbuzení při studiu.

## Prohlášení

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

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

Ve Zlíně dne 25.května 2005

.....

Zuzana Harkabuzíková

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	<b>10</b>
1.1 OBECNÝ ÚVOD .....	10
1.1.1 Polyvinylalkohol (PVA).....	10
1.1.2 Výroba PVA .....	10
1.1.3 Formy aplikace PVA .....	11
1.2 BIODEGRADACE .....	12
1.2.1 Podmínky biodegradace .....	12
1.2.2 Biodegradace PVA .....	12
1.2.3 Biodegradace PVA jediným mikroorganismem (nesymbiotická).....	13
1.2.4 Faktory ovlivňující biorozložitelnost PVA: .....	15
1.3 IZOLACE BAKTERIÍ DEGRADUJÍCÍCH PVA .....	16
1.3.1 Vliv katalasy na rozklad PVA .....	16
1.4 PŘEŽÍVÁNÍ VYSUŠENÍ RŮZNÝCH BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK A OCHRANNÝ VLV RŮZNÝCH LÁTEK.....	17
1.5 NÁVAZNOST NA PŘEDCHÁZEJÍCÍ DIPLOMOVOU PRÁCI.....	19
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>20</b>
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>21</b>
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA PRO KULTIVACI BAKTERIÍ .....	21
2.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	27
2.2.1 Kultura OT3 .....	27
2.2.2 <i>Rhodococcus globerulus</i> .....	27
2.2.3 <i>Acetobacter acetii</i> .....	27
2.3 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	28
2.4 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY .....	29
2.4.1 Stanovení počátečního množství buněk .....	29
2.4.2 Stanovení PVA.....	31
2.4.3 Měření pH bakteriálních preparátů.....	32
2.4.4 Počítání buněk ve vysušených preparátech .....	32
2.4.5 Příprava fixovaného preparátu .....	32
2.4.6 Gramovo barvení preparátu.....	33
2.4.7 Sterilizační techniky .....	33
<b>3 VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
3.1 POKUS PRVNÍ – ZJIŠŤOVÁNÍ ÚČINNOSTI PVA JAKO OCHRANNÉ LÁTKY.....	35
3.1.1 Počáteční počty kolonií .....	40
3.1.2 Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a <i>Rhodococcus</i> , které byly uskladněny v lednici 4°C .....	40
3.1.3 Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a <i>Rhodococcus</i> , které byly uskladněny při laboratorní teplotě 25°C .....	44

3.1.4	Celkový časový přehled prvního pokusu .....	48
3.2	POKUS DRUHÝ – OVĚŘENÍ OCHRANNÉHO ÚČINKU SUŠENÉHO MLÉKA .....	52
3.2.1	Počáteční počty kolonií .....	55
3.2.2	Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a <i>Rhodococcus</i> , které byly uskladněny v lednici .....	55
3.2.3	Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a <i>Rhodococcus</i> , které byly uskladněny při laboratorní teplotě 25°C .....	58
3.2.4	Celkový časový přehled druhého pokusu .....	61
3.3	POKUS TŘETÍ – OPAKOVANÝ POKUS S PVA A SUŠENÝM MLÉKEM .....	65
3.3.1	Počáteční počty kolonií .....	70
3.3.2	Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a <i>Rhodococcus</i> , které byly uskladněny v lednici .....	70
3.3.3	Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a <i>Rhodococcus</i> , které byly uskladněny při laboratorní teplotě 25°C .....	73
3.3.4	Celkový časový přehled třetího pokusu .....	76
3.3.5	Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a <i>Rhodococcus</i> III. pokusu s přídavkem sušeného mléka, které byly uskladněny v lednici při 4°C .....	80
3.3.6	Počet narostlých kolonií, které byly uskladněny při laboratorní teplotě 25°C .....	83
3.3.7	Celkový časový přehled třetího pokusu .....	86
3.4	STANOVENÍ SUŠINY BAKTERIÁLNÍCH PREPARÁTŮ .....	90
3.5	DEGRADACE PVA PŮDNÍMI MIKROORGANISMY OBOHACENÝMI O BAKTERII OT3 .....	93
3.6	POKUS S BAKTERIÍ <i>ACETOBACTER ACETI</i> : .....	96
3.7	PVA – FÓLIE .....	98
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>99</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>102</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>105</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>106</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>108</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>110</b>

## ÚVOD

V dnešní době je celosvětovým trendem minimalizace nebo úplná eliminace odpadů vznikajících v důsledku antropogenní činnosti člověka. Zvláštní pozornost je věnována syntetickým odpadům polymerního charakteru, jejichž rozklad v ekosystému probíhá po velmi dlouhou dobu.

Mezi různými syntetickými a polosyntetickými polymerními materiály jsou ve vodě rozpustné polymery, jedny z hlavních zdrojů znečištění potoků, řek a mořských ekosystémů organickými látkami. Tím, že jsou rozpustné, mohou narušovat přirozený životní cyklus vodních organismů i celých ekosystémů. Studie ukázala, že některé typy syntetických polymerů rozpustných ve vodě jsou biodegradovatelné.

Mnoho ve vodě rozpustných polymerů, jako polyvinylalkohol (PVA), se široce využívá v průmyslových aplikacích jako adhezivum, dále jako přísada do dřeva, barviv, papíru, kůží, textilu. PVA je v přírodě rozložitelný, ale jen velmi málo a pomalu.

Tyto materiály lze z prostředí odstranit užitím přirozeného biologického procesu – biodegradace. Množství mikroorganismů, jež jsou schopny degradovat PVA je omezeno, vyskytují se jen v určitých oblastech a nejsou v prostředích, jako je půda, běžné.

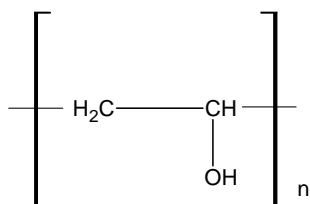


## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

## 1.1 Obecný úvod

### 1.1.1 Polyvinylalkohol (PVA)



Polyvinyl alkohol (PVA) je ve vodě rozpustný syntetický polymer, který má termoplastický charakter. PVA má převážně strukturu 1,3- glykolu a je jako jeden z mála polymerů s kostrou uhlík-uhlík biodegradabilní.

K hlavním veličinám ovlivňující jeho fyzikální, chemické, mechanické i zpracovatelské vlastnosti patří polymerační stupeň a stupeň hydrolyzy resp. reesterifikace. Tyto vlastnosti, které jsou navíc ovlivnitelné přidávkem změkčovadel (glycerol, stearin aj.), závisí především na obsahu hydroxylových skupin –OH a zbytkových acetátových skupin. Obsahuje – li polymer 70% až 80 % zbytkových acetátových skupin je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v aromatických uhlovodících a cyklických esterech. Je-li v polymeru obsaženo 35 % zbytkových acetátových skupin, přestává polymer být rozpustný v organických rozpouštědlech, ale rozpustí se ve studené vodě. V teplé a studené vodě je PVA rozpustný pouze v případě, že obsah zbytkových acetátových skupin je menší než 35 % . Působením tepla se sráží. [1]

### 1.1.2 Výroba PVA

PVA je bílá práškovitá hmota krystalického charakteru. Množství PVA vyrobeného na celém světě se pohybuje kolem 650 000 tun za rok [8]. Je tedy nejrozšířenějším vodou rozpustným polymerem. Tím, že je rozpustný, může narušovat přirozený životní cyklus vodních organismů i celých ekosystémů. PVA je běžným produktem petrochemického průmyslu. [4]

PVA se získává hydrolyzou (zmýdelněním) alkoholického roztoku polyvinylacetátu (PVAc). Polymerizace vinylacetátu (VAc), nastane suspenzní polymerací (jen ve

specifických případech) [2] , nebo radikálovým mechanismem v alkoholu (metanolu, etanolu) sloužícím jako rozpouštědlo [4].

Průmyslová výroba PVA je prováděna hydrolyzou PVAc v reaktoru. Různé druhy PVA jsou získávány v závislosti na stupni hydrolyzy. Polymerizační reakce mohou být provedeny v diskontinuálním procesu (jednorázově) nebo v kontinuálních procesech (pro velkou produkci), kde dochází nejprve k radikálové polymerizaci vinilacetátu a poté následuje alkalická alkoholýza PVAc. Molární hmotnost PVAc je ovlivňována řadou faktorů jako: vhodná doba zdržení PVAc v reaktoru, množstvím vinilacetátu a rozpouštědla, teplotou při polymerizaci a koncentrací radikálového iniciátoru. Podle stupně hydrolyzy mohou vznikat polymery buď úplně hydrolyzované, nebo s různým obsahem zbytkových acetylových skupin. Stupeň hydrolyzy u PVA je závislý hlavně na době zdržení PVAc v reaktoru, na koncentraci katalyzátoru a teplotě. PVA se stupněm hydrolyzy v rozmezí 70 až 99% je běžně dostupný. Průmyslové aplikace mohou případně vyžadovat určitý stupeň polymerizace, bod tání a rychlost rozpustnosti ve vodě. [5].

### 1.1.3 Formy aplikace PVA

PVA se aplikuje ve 3 hlavních formách:

Ve formě vodného roztoku, se využívá jako prostředek na přípravu emulzí, lepidel, šlichtovacích a apretačních materiálů, pro textilní a papírenský průmysl. Můžeme ho použít i jako koloidní roztok pro disperzní polymeraci.

Ve formě fólie a filmu slouží jako separátor forem při odlévání nebo laminování, jako materiál na speciální hadice apod.

Jako vlákno se používá při výrobě filtrů, sítí a speciálních technických vláken ( po úpravě formaldehydem nebo propylalkoholem ), apod.

Používá se také pro různé speciální účely, např. na výrobu mulčovacích fólií, na obaly chemikálií, obaloviny infekčního a znečištěného materiálu v prádelnách.

Při použití se zvláště výhodně projevuje jeho odolnost proti olejům, tukům, uhlovodíkům, chlоровaným rozpouštědlům apod. Výhodné je, že fólie i vlákna je možno připravit jak ve vodo-rozpustné, tak i ve vodo-vzdorné formě.

## 1.2 Biodegradace

### 1.2.1 Podmínky biodegradace

Biodegradace je ovlivňována zejména těmito vlivy prostředí: teplota, světlo, živiny, pH, vlhkost a přítomnost kyslíku. Biodegradace je většinou zapříčiněna enzymy produkovanými mikroorganismy, ale podporují ji i další procesy, např. abiotická hydrolýza, fotodegradace, mechanické narušení struktury apod. V anaerobních podmínkách dochází většinou ke snížení pH vlivem organických kyselin produkovaných mikroorganismy. Naproti tomu v aerobním prostředí může pH i vzrůst (při kompostování dochází obvykle ke zvýšení pH na 8-9). Vlivem ohromných rozdílů v přírodních podmínkách biodegradabilita polymerů silně kolísá. [3]

### 1.2.2 Biodegradace PVA

PVA patří do skupiny vinylových polymerů, kde hlavní řetězec spojují jen uhlíkaté vazby. Jako jeden z mála, v této skupině, je rozpustný ve vodě. V životním prostředí se nerozkládá snadno, a proto je jeho biodegradaci věnována velká pozornost.

Mikrobiální degradace PVA byla zaznamenána před více jak 60 léty. Ovšem rozsáhlé studie biodegradace PVA byly započaty teprve až na začátku 70-tých let [6].

V roce 1936 bylo zjištěno, že houby *Fusarium lini* jsou schopny biodegradovat, pomocí svých enzymů zvaných „dehydratasy“, PVA na oxid uhličitý a vodu. [7].

Rozsáhlé testy degradací PVA se vzorky mikroorganismů z přírodních prostředí ukazují, že mikroorganismy degradující PVA v prostředí nejsou všudypřítomné.

První mikroorganismy schopné asimilovat PVA jako svůj jediný zdroj uhlíku byly izolovány z půdy a identifikovány jako rod *Pseudomonas*.

Dalšími známými rody schopnými využívat PVA jako jediný zdroj uhlíku jsou *Alcaligenes* a *Bacillus*. Tyto bakterie byly izolovány z prostředí kontaminovaného PVA[9,10].

U neadaptovaných mikrobiálních společenstev je odbourávání PVA velmi pomalé až nulové, zato u mikroorganismů dlouhodobě aklimatizovaných je téměř 100% .

Respirometrické testy ukázaly, že by mohl být PVA kompletně zmineralizován v přítomnosti vhodných mikroorganismů za vhodných inkubačních podmínek [9].

Rychlé snížení viskozity vodního média obsahujícího PVA, bylo možné pomocí specifických mikrobiálních druhů. Jejich působení tak mohlo vyvolat náhodné endoštěpení polymerního řetězce. Ve stejnou dobu byly stanoveny oxidační reakce terciárních atomů uhlíku v řetězcích PVA, vedoucích k vytvoření hydrolyzovatelných  $\beta$ -hydroxyketonů a 1,3 diketonových skupin podél hlavního polymerního řetězce. Tyto reakce byly katalyzovány enzymy oxidasami a dehydrogenasami, které byly izolovány většinou jako extracelulární (mimobuněčné) proteiny tvořené různými druhy bakterií [6,10].

### 1.2.3 Biodegradace PVA jediným mikroorganismem (nesymbiotická)

Z kultivačního média bakterie rodu *Pseudomonas* izolované z půdy byl získán čistý PVA-degradující extracelulární enzym. Tento enzym byl schopen dramaticky snížit viskozitu vodného roztoku PVA. Enzym je z chemického hlediska sekundární alkohol oxidasa (SAO). Při reakci spotřebovává kyslík a produkuje peroxid vodíku. Je také schopen rozkládat některé nízkomolekulární sekundární alkoholy. [11]

Široká distribuce nízkomolekulárních produktů degradace PVA také nasvědčuje tomu, že štěpení uhlíkových vazeb v polymerním řetězci je náhodné. Tímto štěpením vzniklé karboxylové kyseliny způsobují pokles pH v reakční směsi.

Další studie naznačily, že uhlíkový řetězec PVA byl rozštěpen dvěma následnými reakcemi. Prvním krokem je katalýza pomocí SAO, vedoucí k vytvoření  $\beta$ -hydroxyketonových skupin, které byly následně rozštěpeny specifickou hydrolázou. Hydrolytická reakce nepotřebuje kyslík nebo nějaký jiný akceptor elektronů, vyvolává rychlý pokles viskozity vodného roztoku PVA, zvyšuje množství přítomných karboxylových skupin a tím pádem vede ke snížení pH.

SAO získaná z uvedeného rodu *Pseudomonas* katalyzuje oxidaci vinyl alkoholových oligomerů o molekulové hmotnosti 220-1500, ale také katalyzuje oxidaci u některých  $\beta$ -hydroxyketonů [19]. Výsledné  $\beta$ -diketony podstoupily hydrolytické štěpení pomocí specifické  $\beta$ -diketonové hydrolázy produkované a vylučované stejnou bakterií v kalové kultuře.

Důkaz jiné biochemické cesty vedoucí k rozštěpení oxidovaného PVA byly provedeny s kmenem mikroorganismů *Alcaligenes faecalis* KK314, které byly už dříve izolovány ze vzorků říční vody. [17]

Specifický enzym těchto mikroorganismů PVA-dehydrogenasa (PVADH) byl izolován z buněčného extraktu použitím isotaktického-typu vinyl alkohol trimeru jako modelového substrátu a Pyrroloquinoline quinone (PQQ) a chloridu vápenatého ( $\text{CaCl}_2$ ) jako esenciálních kofaktorů. Izolovaný enzym katalyzuje tvorbu  $\beta$ -hydroxy ketonových skupin na různých místech polymerního řetězce. Nenásleduje ale jejich další oxidace na  $\beta$ -diketony.

Typy doposud známých enzymů, pomocí kterých se zmiňované bakteriální druhy podílejí na odbourávání PVA:

- Oxidáza sekundárních alkoholů (SAO) oxidující dvě sousední sekundární OH skupiny uvnitř řetězce PVA
- Dehydratáza ( $\beta$ -diketon hydroláza), která uskutečňuje štěpení řetězců
- PVA-dehydrogenáza (PVADH) účinná jen v přítomnosti Pyrroloquinoline quinone (PQQ)
- Oxidáza, která je aktivní jen vůči již oxidovanému PVA

### **Bakteriální rozklad PVA**

Některé bakteriální kultury jsou schopny degradace PVA samy o sobě jako jediný činitel procesu. Klíčový enzym degradující PVA byl produkován bakterií *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH a hromaděn intracelulárně, když bakterie rostly v živném mediu s tryptonem a kvasničným extraktem bez PVA. Aktivita enzymu rostla úměrně s buněčným růstem a byla maximální, až v době maximálního růstu.

Mezi zatím vyčištěné enzymy degradující PVA patří PVA oxidasa, oxidasy sekundárních alkoholů, PVA dehydrogenasa a také hydrolasa oxidovaného PVA. Bakterie degradující PVA *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH v průběhu degradace uvolňuje peroxid vodíku, což svědčí o existenci enzymů oxidujících PVA.

Bakterie nebo enzymy, které degradují PVA se doporučují pro čištění odpadních vod [18].

Častější variantou než rozklad PVA jedinou bakteriální kulturou je rozklad za přítomnosti dvou symbiotických bakteriálních kultur. Důležitou roli zde hraje kofaktor zvaný Pyrroloquinoline quinone (PQQ), který jedna kultura z každého páru poskytuje kultuře druhé, vybavené určitým typem dehydrogenasy. Druhá kultura tak může rozkládat PVA hned po sestavení kompletního enzymu.

Degradace PVA pomocí různých symbiotických kultur a kmenů je blíže uvedena v diplomové práci Alexandry Vlčkové. [19].

#### 1.2.4 Faktory ovlivňující biorozložitelnost PVA:

Rychlost biologického odbourávání PVA je ovlivňována celou řadou faktorů, zjm.pak:

- teplota
- molekulová hmotnost
- rozpustnost.v H<sub>2</sub>O

Schönberger a kol. uvádí, že 90%-ního odstranění TOC z bylo dosaženo při laboratorní teplotě za 42 dnů, a téhož stupně odstranění uhlíku bylo dosaženo při teplotě 15 °C za 81 dní s 12 denní lagovou fází . Při teplotě prostředí 10 °C byla zaznamenána 35 denní lagová fáze a po 100 dnech testu bylo dosaženo 68 %ní odstranění TOC. Z toho vyplývá, že s klesající teplotou dochází ke snížení stupně rozložitelnosti a k prodloužení doby rozkladu. [20].

Podle Sträßnerové se s rostoucí hodnotou molekulové hmotnosti PVA zvyšuje doba lagové fáze a dochází ke zpomalení celého biodegradačního procesu. [12]

Haschke objasňuje závislost molekulové hmotnosti na rychlosti biodegradace existencí dvou na sobě biochemicky nezávislých biomechanismů odbourávání. [22]

Je-li látka rozpustná ve vodě dochází ke zvětšení jejího aktivního povrchu. Enzymatický systém tak lépe difunduje k molekule substrátu [21]

Rychlost rozkladu PVA dále ovlivňuje : pH, mikrobiální zastoupení, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace substrátu, přítomnost toxikantů a přítomnost nutričních prvků. [24]

### 1.3 Izolace bakterií degradujících PVA

#### 1.3.1 Vliv katalasy na rozklad PVA

Při biodegradaci PVA jsou bakteriemi produkovány 2 typy enzymů. Extracelulární PVA-oxidasa a intercelulární na PQQ závislá dehydrogenasa. Při první fázi rozkladu je PVA oxidováno PVA-oxidasou. Jako vedlejší produkt vzniká peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ).

$H_2O_2$  se ukázal jako toxický pro bakteriální kmeny a zapříčinil inhibici růstu kolonií na miskách. Po rozetření katalasy na misky s PVA agarem a opětném přeočkování kolonií bakterií z tekutého minerálního media k očekávanému nárůstu kolonií došlo. Znamená to tedy, že katalasa je schopna rozložit  $H_2O_2$ . Po rozetření inaktivní katalasy (katalasa povařená 10 minut) na misky k nárůstu opět nedošlo. Kvůli ověření toxického účinku  $H_2O_2$  na bakterie byl proveden další podobný test. Na misky s PVA agarem byla místo katalasy rozetřena peroxidasa tedy enzym schopný rozkládat peroxid. Výsledek byl stejný jako u katalasy a stejně jako u ní nedošlo k nárůstu kolonií na misce potřené inaktivní peroxidasou (peroxidasa povařená 10 minut).

Z výsledků pokusů tedy plyne, že PVA-degradující bakterie při rozkladu PVA produkují jako vedlejší produkt  $H_2O_2$  v takovém množství, že se stává toxickým a zabraňuje bakteriím v růstu. V tekutém minerálním mediu rostli bakterie i bez přítomnosti katalasy. To bylo zapříčiněno tím, že  $H_2O_2$  se nevyskytoval v blízkosti bakterií. Přídavek katalasy a peroxidasy se tedy ukázalo jako vhodná metoda použitelná při izolaci bakterií schopných degradovat PVA. [8]



## 1.4 Přežívání vysušení různých bakteriálních buněk a ochranný vliv různých látek

Zkoumáním ochranného vlivu různých látek na přežívání různých druhů bakteriálních kmenů se zabývala řada autorů. Zjišťovali vhodné podmínky pro uchování bakteriálních buněk. Řada z nich zkoumala vhodnou teplotu sušení, ochranný účinek odstředěného mléka, alginátu, gum acacia.

Vliv různých látek na přežívání bakteriálních kmenů, při sušení sprejovací metodou za zvýšené teploty uvádí Wen – Chian Lian a kolektiv. Zkoumanými bakteriemi byly dva kmeny *Bifidobacterium infantis* a tři kmeny *Bifidobacterium longum*. Byl sledován ochranný účinek 10% (w/w) želatiny, gum arabic a odstředěného mléka a jeho vliv na přežití buněk. Každý kmen se projevoval různou citlivostí výše uvedené manipulaci. Během testování v různých vzdušných teplotách a v přítomnosti odstředěného mléka se zaznamenalo nejvyšší přežití u kmene bifidobacteria. Výzkum vlivu koncentrace ochranných látek ukázal, že nejvyšší ochranný účinek měla 10% koncentrace želatiny, gum arabic i odstředěného mléka. [23]

Autoři B.M. Corcoran a kolektiv zkoumali přežití kmene *Lactobacillus rhamnosus* GG po sušení sprejováním a následném skladování, a vliv odstředěného mléka a amylozy na toto přežití. Ve výsledcích uvádí, že nejlépe přežívaly buňky sklizené ve stacionární fázi růstu. Přežití při skladování bylo závislé na teplotě, přičemž dobré přežití bylo zaznamenáno při 4°C a 15°C a to během 8 týdnů. Zde však nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl při použití odstředěného mléka a amylozy. [28]

C. Desmond<sup>1,2</sup> a kolektiv řešili stejný problém, jako je přežití kmene *Lactobacillus paracasei* po vysušení sprejováním, jeho skladování, a ochranný účinek odstředěného mléka a gum acacia.

Během 4 týdnů. skladování se přežití buněk se zlepšilo s použitím gum acacia, a to při všech testovaných teplotách: 4°C, 15°C, 30°C. Po 8 týdenním skladování však poklesly počty bakterií při vyšších teplotách skladování, prakticky na nulu. [29]

Účinkem odstředěného mléka a přežíváním kmene *Azospirillum braslense* Cd (ATCC 29710) v alginátových kukličkách se zabýval Yoav Bashan. Zjistil, že vysušení kuliček snížilo počet bakterií o několik řádů. Ale při liofyzaci byly zaznamenány lepší výsledky. [27]

Další skupinou zkoumající ochranné vlastnosti alginátu byl R.Walker<sup>1</sup>, S. Rossall<sup>2</sup> and M.J.C. Asher<sup>1</sup>, kteří se pokoušeli o zlepšování přežití potenciálně prospěšných bakterií, které zvyšují kvalitu osiva cukrové řepy. Tyto prospěšné bakterie patří do skupiny G-negativních *Pseudomonas*. Ve většině všech případů byla pro buňky nejlepší sklizeň v pozdní log-fázi růstu nebo v časné stacionární-fázi růstu.

Ačkoliv bakterie dobře přežívaly počáteční proceduru sušení, bylo zjištěno, že velká frakce buněk pozbude životaschopnost v průběhu prvních 24 hodin skladování.

Tento pokles byl v rozmezí 2 až 5 řádů. Pro pět zkoumaných izolátů (bakteriálních kmenů) se ukázalo, že enkapsulace v alginátových kuličkách významně zvýšila přežití bakterií. Skladování probíhalo po dobu 300 dnů. Za tuto dobu při teplotě 5°C z původních 10<sup>9</sup> buněk, přežilo 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> buněk.

Autoři dále uvádějí, že zvýšení teploty sušení na 40°C nemělo žádný negativní efekt na přežití. Významná se ukázala pouze teplota 5°C skladování, kde přežilo dostatečné množství bakteriálních buněk. Skladování při teplotě 15°C - 22°C vedlo k rychlému poklesu životnosti. Dalším poznatkem bylo, že pro přežití buněk by mohl být kritický také obsah vody. Vyšší vlhkost totiž vedla ke snížení přežití při skladování. [26]

Pro uchovávání a schopnost podpořit růst bakterií se pokoušeli R. Rabindran and P. Vidhyasekaran. Sledovali přežívání kultur kmene *Pseudomonas fluorescens* Pf ALR2 za účelem ovlivnění pěstování rýže. Při pokusu použili tři nosiče:rašelinu, mastek a lignit. Populace bakterií byla sledována po dobu 60 dnů. Jako nejlepší nosič byla vyhodnocena rašelina. [25]

## 1.5 Návaznost na předcházející diplomovou práci

PVA jeho vlastnostmi a degradací se už zabývalo více studentů. Patří k nim i Jiří Riedl [26], který ve své diplomové práci izoloval kultury OT I, OT II a kulturu OT III a popsal jejich vlastnosti a schopnosti degradovat PVA. Zaměřila jsem se hlavně na výsledky testů u kultury OT III, se kterou jsem rovněž pracovala.

V prvním pokusu byly izolovány dva kmeny, které nazval kmen Ž a B (dle charakteristického zbarvení kmenů).

Dále sledoval vliv molekulové hmotnosti PVA na jeho rozklad v tekutém MM kombinací kmenů z konsorcia OT III a zjistil, že molekulová hmotnost PVA v rozsahu použitých molekulových hmotností nemá vliv na proces biodegradace PVA

V dalším testu pozoroval růst kmenů OT III/Ž a OT III/B konsorcia v tekutém minerálním mediu s PVA a PQQ a pokles PVA a TOC v mediu, způsobený použitými kmeny. Z měření vyplynulo, že směs kmenů Ž+B je schopna za účasti PQQ rozkládat PVA, jeho množství se za 6 dní snížilo o více než polovinu.

Počty kolonií počítal na miskách s PVA agarem. Nárůst kmenů po 7 –denní kultivaci byl rozdílný. Kmen OT III/B rostl z počátku daleko rychleji, ale jen do 3. dne, pak se růst buněk zastavil. U kmene OT III/Ž byl nárůst pozvolný a trval dále.

Na konci pak bylo množství buněk kmene Ž několikanásobně vyšší než u kmene B.

Při dalších pokusech se zaměřil na zjišťování vlastností směsi a samostatných kmenů OT III/Ž a OT III/B podílejících se na rozkladu PVA. Prokázal, že samostatné kmeny Ž a B nejsou schopny rozkladu. Největší nárůst počtu kolonií, který byl počítán na miskách s PVA agarem obohaceným KA a PQQ a katalasou, byl zaznamenán u směsi kmenů Ž+B. Tento test potvrdil, že kmeny jsou symbiotické a že PVA jsou schopny rozkládat pouze ve směsi.

Dále se ukázalo, že kmen OT III/Ž nevytváří katalasu, kdežto kmen OT III/B ano. Jako vysvětlení uvádí, že kmen B odstraňuje toxický peroxid vodíku produkovaný při rozkladu PVA kmenem Ž [30].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie, roztoky a živná média pro kultivaci bakterií

#### Minerální agar bez bronthymolové modři (bez BTM)

Základ pro minerální agar:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,1 g
NH <sub>4</sub> Cl.....	0,11g
Mg SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O.....	0,02 g
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O.....	0,005 g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,002 g
Agar.....	1,8 g

Minerální agar je bezbarvý s mléčným zákalem. Je – li zapotřebí obohatit agar o indikátor pH, použijeme základ pro minerální agar, obohacený Bromthymolovou modří (BTM) v množství 0,005 g/l.

#### Příprava minerálního agaru:

Základ pro minerální agar.....	4,2g
Destilovaná voda .....	200 ml

Uvedené složky byly naváženy do 400 ml infuzní láhve a poté rozpuštěny destilované vodě. Dále bylo přidáno 400 µl roztoku stopových prvků (na 200 ml) a vše dobře promícháno. Takto připravený minerální agar byl dán sterilizovat v uzavřené lahvi do autoklávu při 120 °C na 15 minut. Po zchladnutí asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do misek a ponechán ztuhnout.

#### **PVA agar**

Polyvinylalkohol (výsledná koncentrace 0,5 g/l ).....	1,0 g
Základ pro minerální agar.....	4,2 g
Destilovaná voda.....	200 ml
Roztok kvasničný autolyzát 50 g/l(výsledná koncentrace 50 mg/l. ).....	400 µl
Zásobní roztok PQQ (výsledná koncentrace PQQ je 50 µl/l ).....	100 µl

Příprava:

Dané složky byly naváženy do 400 ml infúzní láhve a poté rozpuštěny ve 200 ml destilované vody a na závěr bylo přidáno 400 µl kvasničného autolyzátu (50mg/ml) a 100 µl PQQ (0,1mg/ml). Vše se promíchalo a dalo v uzavřené lahvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut. Poté byl agar v laminárním boxu rozlit do misek a ponechán ztuhnout.

Na ztuhlý agar pak bylo přidáváno těsně před nanášením buněk 50 µl roztoku katalázy (1mg/ml), která se rozetřela sterilní skleněnou hokejkou a nechala v laminárním boxu vysušit.

Později se PVA - agar s BTM nahradil PVA - agarem bez BTM, neboť oba sledované kmeny na něm byly lépe rozpoznatelné.

**Agar pro acetobactera**

Kvasničný extrakt.....	5g/l
Trypton.....	3 g/l
Manitol.....	25 g/l
Agar.....	18 g/l
Destilovaná voda	

Příprava:

Jednotlivé složky byly naváženy, byly přidány stopové prvky a vše bylo doplněno 100 ml destilované vody. Po důkladném promíchání bylo vše v uzavřené lahvi sterilizováno v autoklávu při 120 °C na 15 minut. Po zchladnutí asi na 60 °C, byl agar v boxu rozlit do misek a ponechán ztuhnout.

**Fyziologický roztok**

Používá se pro ředění inokula.

Příprava:

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 8,5 g NaCl v 1 litru destilované vody. Roztok byl důkladně promíchán a dán sterilizován v autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 15 minut.

**Minerální médium s PVA a PQQ pro kultivace (MMK), tekuté**

Toto minerální médium bylo používáno pro kultivaci buněk v tekutém médiu.

K přípravě minerálního média bylo použito těchto zásobních roztoků:

Zásobní roztok A.....	2 ml
Zásobní roztok B.....	8 ml
Destilovaná voda.....	100 ml
Soli:	
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O.....	1 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O.....	1 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O .....	1 ml
NaCl .....	1ml
NH <sub>4</sub> Cl .....	1 ml
Stopové prvky.....	0,1 ml
Zásobní roztok PQQ.....	20 µl
PVA.....	50 mg

**Příprava:**

Do 250 ml láhve bylo pipetováno uvedené množství zásobních roztoků a 60 ml vody. Teprve poté byl přidán 1 ml z každého roztoku solí a 0,1 ml stopových prvků a objem byl zbylým množstvím vody doplněn na 100ml. Vše se důkladně promíchalo a bylo rozděleno po 50 ml do dvou 250ml lahví. Na závěr bylo do každé láhve naváženo 25 mg PVA a vše se sterilizovalo. Takto připravené minerální médium bylo zaočkováno bakteriálním kmenem OT3 a *Rhodococcus*. Obě láhve pak byly dány na třepačku do kultivační místnosti v teplotě 25°C, kde oba druhy bakterií po dobu několika dnů rostly.

Příprava jednotlivých složek MM:*Zásobní roztok A*

Získáme navážením 9,0788 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (dihydrogenfosforečnan draselný) a následným rozpuštěním v 1 l destilované vody.

*Zásobní roztok B*

Získáme navážením 23,9032 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát), který je dále rozpuštěn v 1 l destilované vody.

*Stopové prvky:*

$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (čistý).....	0,043 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (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
Destilovaná voda .....	1000 ml

Po navážení množství těchto látek bylo vše důkladně rozpuštěno a promícháno v 1 l destilované vody.

*Příprava roztoků solí*

$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (10 g/l).....	2 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (3 g/l).....	0,6 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1 g/l).....	0,2 g
$\text{NaCl}$ (50 g/l).....	10 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (30 g/l).....	6 g

Každá sůl byla připravena zvlášť. Vždy bylo naváženo dané množství soli doplněno 200 ml destilované vody a promícháno. Pak byly všechny soli dány sterilizovat do autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 15 minut. Roztok  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  byl sterilizován za studena, filtrací přes sterilní membránové filtry Pragopor (o velikosti pórů 0,3  $\mu\text{m}$ ).



**Minerální médium bez PVA a PQQ (MM)**

Takto připravené MM bylo použito na přípravu bakteriálních suspenzí s různým obsahem PVA případně přidavkem sušeného mléka.

K přípravě minerálního média bylo použito těchto zásobních roztoků:

Zásobní roztok A.....	4 ml
Zásobní roztok B.....	6 ml
Destilovaná voda.....	100 ml
<i>Soli:</i>	
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O.....	1 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O.....	1 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O .....	1 ml
NaCl .....	1 ml
NH <sub>4</sub> Cl .....	1 ml
Stopové prvky.....	0,1 ml

Dané složky byly pipetovány a rozpuštěny ve 100 ml destilované vody.Vše se promíchalo a dalo v uzavřené lahvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut.

**Suspendační médium (MMS) pro izolaci půdních mikroorganismů**

Jedná se o dříve popsané MM s přidavkem tenzidu TWEEN 80.

K přípravě suspenčního média bylo použito těchto zásobních roztoků:

Zásobní roztok A.....	4 ml
Zásobní roztok B.....	16 ml
destilovaná voda .....	200 ml
<i>Soli:</i>	
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O.....	2 ml
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O.....	2 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O .....	2 ml
NaCl .....	2 ml
NH <sub>4</sub> Cl .....	2 ml
Stopové prvky.....	0,2ml
Tween 80.....	0,3 g

Dané složky byly pipetovány a rozpuštěny ve 200 ml destilované vody. Vše se promíchalo a dalo v uzavřené lahvi do autoklávu sterilizovat při 120 °C na 15 minut.

### **Příprava dalších zásobních roztoků**

*Zásobní roztok PQQ= Methoxantin* (výsledná koncentrace 0,1mg/ml)

Množství 2 mg PQQ bylo rozpuštěno ve 20 ml fyziologického roztoku. Sterilizace byla provedena skleněnou injekční stříkačkou přes filtr značky MILLEX GP o 0,22µm. Takto připravený roztok byl pipetován po 1,5 ml do sterilních ependorfech a následně uskladněn v mrazáku.

*Zásobní roztok katalasy* (výsledná koncentrace 1 mg/ml)

Množství 15 mg katalázy bylo rozpuštěno v 15 ml fyziologického roztoku. Sterilizace byla opět provedena skleněnou injekční stříkačkou přes filtr značky MILLEX GP o 0,22µm. Takto připravený roztok byl pipetován po 1,5 ml do sterilních ependorfech a následně uskladněn v mrazáku.

*Roztok kvasničného autolyzátu* (výsledná koncentrace 50mg/ml)

Množství 2,5 g kvasničného autolyzátu (žlutý prášek) je rozpuštěno v 50 ml destilované H<sub>2</sub>O. Roztok je pak vysterilizován v autoklávu při 120 °C 15 minut. Sterilní roztok kvasničného autolyzátu je pak uskladněn ve skřínce při laboratorní teplotě.

### Roztoky pro stanovení PVA:

*Kyselina boritá*

Množství 40g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. Roztok byl uchováván ve tmě při laboratorní teplotě.

*Roztok jodu*

Množství 12,7 g J<sub>2</sub> a 25 g KI bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. Roztok byl uchováván ve tmě při laboratorní teplotě.

## **Polyvinyl alkohol (PVA)**

Obchodní označení SLOVIOL P88-08, prášková forma, stupeň hydrolyzy 88%.

## **2.2 Biologický materiál**

### **2.2.1 Kultura OT3**

Jedná se o kmen Gram-negativních aerobních bakterií. Na agaru s PVA+PQQ+KA se vyznačuje jasně žlutým zbarvením. Tato kultura izolována v rámci diplomové práce J. Riedla [30], kde byla označena jako OT III/Ž.

### **2.2.2 *Rhodococcus globerulus***

Jedná se o kmen Gram-pozitivních aerobních bakterií. Na agaru s PVA+PQQ+KA se vyznačuje bílým zbarvením. Během delší doby růstu dochází k tomu, že *Rhodococcus* změní pH v oblasti kolonie, čímž dojde k přechodu v půdě přítomného indikátoru BTM-modři ze zelené barvy do žluté. *Rhodococcus* produkuje kolem sebe sliz, který ho chrání před vysušením.

### **2.2.3 *Acetobacter aceti***

Jedná se o Gram-negativní elipsoidní až tyčinkovitou aerobní bakterii čeledi *Acetobacteraceae*. Kmen pochází z České sbírky mikroorganismů.

## 2.3 Přístroje a zařízení

Analytické váhy KERN 770.....	SRN
Analytické váhy KERN 440-47.....	SRN
Elektrická sušárna.....	MORA, ČR
Elektrický vaříč.....	ETA
Elektrický vaříč ETA 0108 .....	(ČR)
ElektrickývaříčETA110 .....	(ČR)
Třepačka LT2.....	ČR
Třepačka 3018 GFL.....	SRN
Mikrodávkoč ( 2-20 $\mu$ l, 1-5 ml, 20-200 $\mu$ l, 100-1000 $\mu$ l).....	Biohit, Finsko
Mikrodávkoč (10 $\mu$ l , 20 $\mu$ l , 50 $\mu$ l, 200 $\mu$ l).....	Plastomed, Polsko
Laboratorní autokláv.....	Sanoclav, St-MCS-203, SRN
Tlakový hrnc .....	(Tescoma, ČR)
Aseptický laminární box.....	Telstar, Španělsko
Termobox na 25 °C.....	ÚTŽPCH, FT
Chladnička.....	Ardo, ČR
Mikroskop CX41.....	Olympus, Japonsko
Počítač kolonií SCHUTT.....	..SRN
Spektrofotometr TECAN, pro mikrotitrační destičky.....	Sunrise, USA

## 2.4 Metodika a pracovní postupy

### 2.4.1 Stanovení počátečního množství buněk

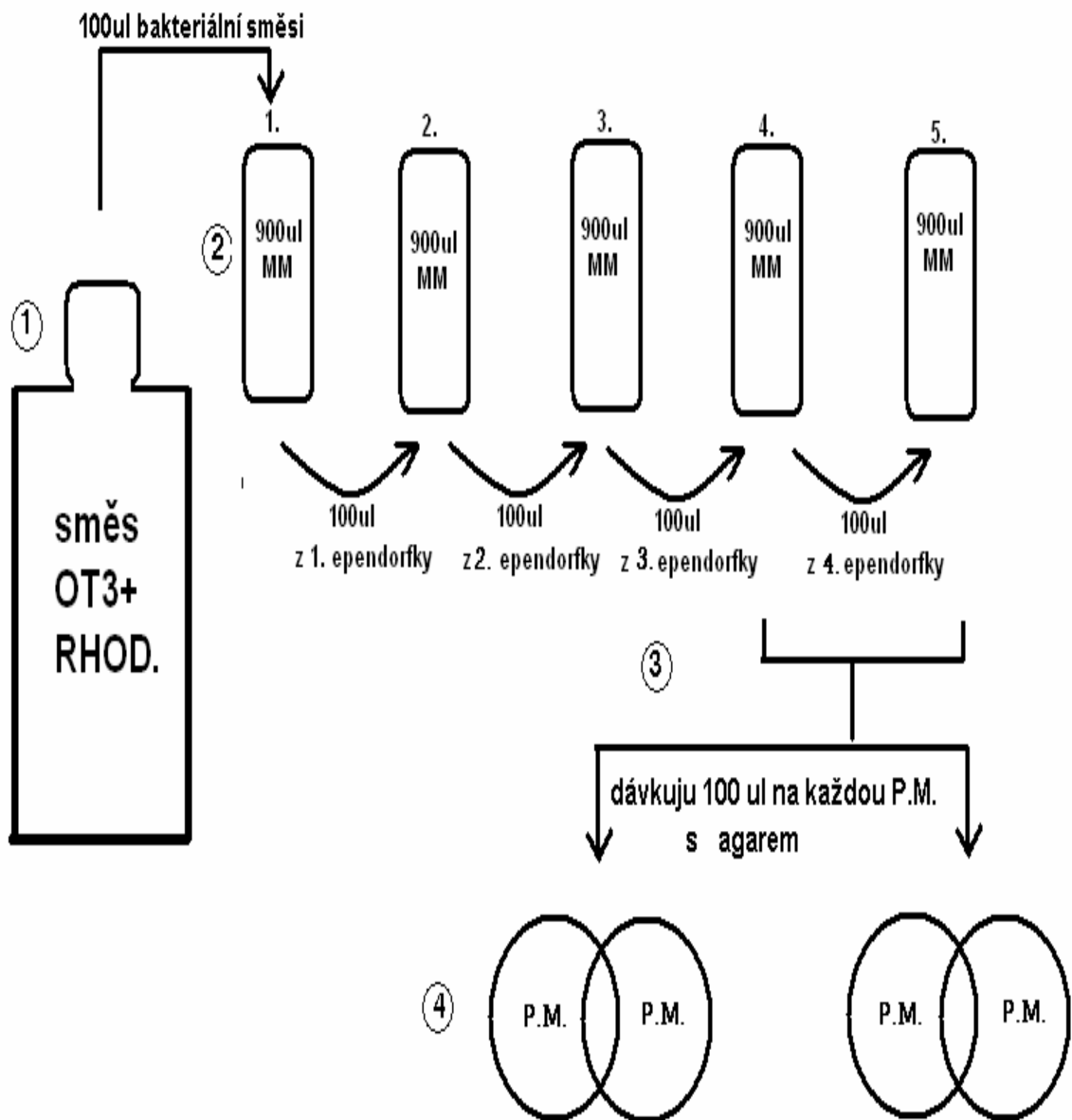
Byla připravena sada 5 ependorfe s 900  $\mu$ l sterilního roztoku MM(2).

Do první ependorfy, která již obsahovala 900  $\mu$ l sterilního roztoku MM, bylo přidáno 100  $\mu$ l bakteriální suspenze (1) (*Rhodococcus*.+ OT3). Získali jsme tedy ředění  $10^{-1}$ .

Z této ependorfy bylo po dokonalém promíchání odebráno novou špičkou opět 100  $\mu$ l a vneseno do další ependorfy s 900 $\mu$ l sterilního roztoku MM bez PVA+PQQ. V druhé ependorfce tedy vzniklo ředění  $10^{-2}$ . Analogickým postupem bylo v dalších ependorfkách získáno ředění až  $10^{-5}$ .

Z takto připravených ependorfe bylo podle množství buněk pod mikroskopem odebráno 100  $\mu$ l z vybraných ředění (3) a rozetřeno předem vyžíhanou hokejkou na misku s agarem s PVA+PQQ+KA s rozetřenými a vysušenými 50  $\mu$ l katalasy (4).

Na misce s agarem s PVA+PQQ+KA (4) bylo tedy získáno ředění o řád vyšší než v ependorfce. Misky byly opatrně vysušeny v boxu a přeneseny do 30 °C. Po zhruba osmi denní kultivaci byl stanoven celkový počet kolonií na miskách spočítáním viditelných kolonií. Počáteční hustota bakterií se pohybovala kolem  $10^8$  až  $10^9$  ml.



Obr.1. Schéma postupu ředění a zjišťování počátečního počtu narostlých bakteriálních kultur: **1**, láhev o objemu 500 ml, ve které proběhla kultivace kmene OT3 + *Rhodococcus*; **2**, ependorfky, v nichž docházelo k ředění  $10^{-1}$  až  $10^{-5}$ ; **3**, dvě poslední ředění  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  a z nich bylo vyséváno na misky s agarem; **4**, misky s PVA+PQQ+KA a s katalázou. Na ně bylo dávkováno 100 µl z vybraných ředění (3)

## 2.4.2 Stanovení PVA

### Stanovení PVA na mikrotitračních destičkách

Nejprve byla změřena prázdná destička na readeru mikrodestiček Tetan (příloha I). Po stanovených časových intervalech byly odebírány vzorky ze zaočkovaných lahví.

Vždy do pěti jamek na mikrotitrační destičce bylo napipetováno:

- 20  $\mu$ l každého vzorku případně MM jako blank
- 42  $\mu$ l roztoku kyseliny borité (přidáno do všech těchto jamek)
- 10  $\mu$ l roztoku jodidu s jodistanem draselným

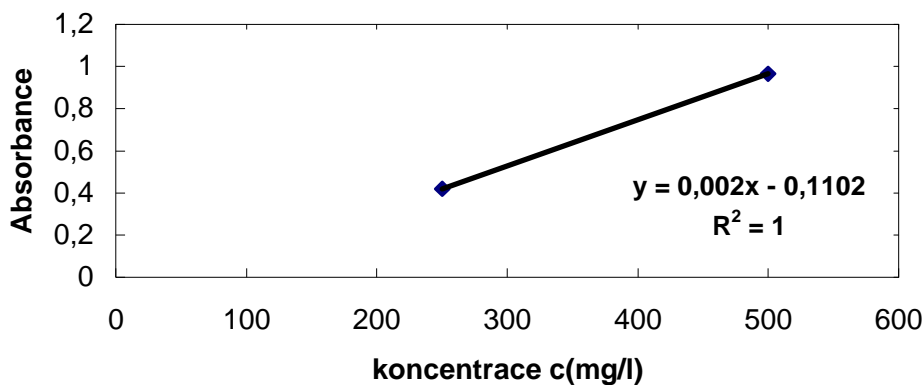
Destička byla ponechána asi 15 minut v klidu a změřena na readeru mikrodestiček Tecan při vlnové délce 660 nm.

Kalibrační přímka byla zpracována z hodnot koncentrací a naměřených absorbancí kalibračních roztoků.

Tabulka 1. Koncentrace PVA a naměřená absorbance

	c PVA(mg/ml)	A (-)					$\Phi$
standard 1	250	0,4202	0,41983	0,4125	0,429	0,4202	0,42035
standard 2	500	0,9988	0,99567	0,953	0,9042	0,9678	0,96389

(-), bezrozměrné číslo;  $\Phi$ , průměrná hodnota



Obr.2. Kalibrační přímka stanovení PVA na mikrotitračních destičkách:

$$\text{Rovnice kalibrační přímky: } A = 0,002c - 0,1102 \quad (1)$$

$$\text{Vzorec pro výpočet PVA ve vzorku: } c = (A + 0,1102) / 0,002 \quad (2)$$

### 2.4.3 Měření pH bakteriálních preparátů

Měření pH bylo prováděno pH-metrem, se skleněnou elektrodou, který byl vždy před každým měřením kalibrován pomocí dvou příslušných pufrů, jejichž pH bylo vyšší a nižší než pH vzorku. Hodnota pH u příslušného vzorku pak byla stanovena za stálého míchání.

### 2.4.4 Počítání buněk ve vysušených preparátech

Na Petriho miskách s agarem s PVA+PQQ+KA vyrostly během 8 dnů, při teplotě 30°C, kolonie kmene OT3 a *Rhodococcus*. Kolonie OT3 se vynikaly žlutým zbarvením a menší velikostí. *Rhodococcus* byl barvy bílé a často početněji zastoupen.

Bakteriální kmeny byly počítány na Petriho miskách pomocí lupy na Počítačce kolonií zn. SCHÜTT. (příloha II).

U některých koncentrací, nejčastěji 5% roztok PVA a 10% roztok PVA, vyrostlo na miskách velké množství kolonií. Pokud byl počet kolonií na miskách velký a tudíž nepočítatelný, tzn. přesáhl – li počet jednoho druhu bakteriálního kmene 1000 kolonií, byla pro počítání použita šablona s čtvercovým členěním. Velikost plochy jednoho čtverce byla 1cm<sup>2</sup>. Kolonie vždy jednoho druhu bakteriálního kmene byly počítány pouze v 3 až 5 sobě podobných čtvercích a získané hodnoty byly zprůměrnovány. Touto hodnotou pak byl vynásoben počet čtverců s přibližně stejnou hustotou kolonií. Výsledek získaný tímto způsobem má sice řádovou přesnost, pro naše účely je však dostačující.

### 2.4.5 Příprava fixovaného preparátu

Podložní sklíčko bylo položeno na čistý filtrační papír. Doprostřed sklíčka byla umístěna kapka fyziologického roztoku a bakteriologickou kličkou do ní bylo nanášeno malé množství mikrobiální kultury. Tato suspenze buněk byla dobře promíchána a rozetřena. Sklíčko bylo necháno vyschnout a pak bylo nátěrem vzhůru třikrát protaženo plamenem kahanu. Po vychladnutí bylo s preparátem dále pracováno.



#### 2.4.6 Gramovo barvení preparátu

Připravený fixovaný preparát na podložním sklíčku byl převrstven roztokem krystalové violeti a ta působila 60 sekund. Po té byl preparát bez oplachování slit a 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 karbolfuchsinem na 60 sekund, opláchnut destilovanou vodou a ponechán uschnout. Mikroskopován byl pomocí inverzního objektivu, zvětšení 100x.

#### 2.4.7 Sterilizační techniky

Lze je rozdělit na:

- 1) Suchá sterilizace - v sušárně po dobu 2 hodin při teplotě 170°C (laboratorní sklo)
- 2) Vyžhání v plameni – tímto způsobem byly sterilizovány mikrobiologické kličky, hokejky, pinzety, skalpel.
- 3) Vlhká sterilizace - v autoklávu, v němž byly při 120 °C na 15 minut sterilizovány kultivační lahve, živné půdy, minerální média.

### 3 VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST

Cílem mé diplomové práce bylo ověřit způsoby, jimiž lze uchovat vitální bakteriální kmen OT3, který jako jeden z mála rozkládá PVA. K biodegradaci PVA jsou zapotřebí speciální kmeny. Je známo, že se takové kmeny se vyskytují málo.

Literatura uvádí že Gram–negativní bakterie špatně snáší vysušení, a proto se pro uchování používají různé metody jako např. lyofizace. Aby se zlepšilo přežívání Gram - negativních bakterií při vysušení, používají se různě ochranné látky. Jednou z nich je např. alginát. V jeho přítomnosti se výrazně zvýšil počet přežilých bakterií.[26, 27]

V průběhu diplomové práce budu zjišťovat, zda bakterie kmene OT3 a *Rodococcus* jsou schopny přežít přiměřenou dobu (asi tak půl roku) ve formě vysušeného preparátu, zda má PVA ochrannou funkci pro přežívání bakterií, případně ověřuji použitelnost dalších přídatných ochranných látek např. sušeného odstředěného mléka.

Odborné články a literatura [26 - 29] uvádí, že přítomnost sušeného mléka, alginátu a gum acacia má ochranný vliv na přežívání a růst bakterií.

Konečným cílem je příprava vitálního bakteriálního preparátu, který by bylo možno uchovávat po přiměřenou dobu a příprava fólií na bázi PVA, které by na svém povrchu nesly vitální PVA- degradující bakterie, takže by po jejich vstupu do prostředí nastala rychlá degradace

### Přežívání kmene OT3 v přítomnosti PVA

V následujících pokusech jsme sledovali schopnost bakterií kmene OT3 a *Rhodococcus*, přežít co nejdélší dobu na povrchu agaru PVA+PQQ+KA ve vysušeném stavu. Byly provedeny celkem tři rozsáhlé pokusy. Na začátku každého z nich byl vždy stanoven počáteční počet bakterií.

Do suspenze obsahující popisované bakterie, byly přidány ochranné látky, z počátku pouze PVA a v průběhu dalších pokusů i sušené odstředěné mléko. Tato směs byla dávkována na prázdné Petriho misky, které byly po vysušení skladovány při dvou teplotách, a to laboratorní teplotě (25°C) a teplotě v lednici (4°C). V předem stanovených časových intervalech byla určena vitalita preparátu.

Všechny 3 pokusy jsou plánovány dlouhodobě, jejich délka trvání se odhaduje zhruba na jeden rok. Já jsem je pozorovala maximálně po dobu 4 měsíců a vše potřebné pro jejich další pokračování jsem připravila.

### 3.1 Pokus první – Zjišťování účinnosti PVA jako ochranné látky

V prvním pokusu jsme se rozhodli vyzkoušet ochranný vliv PVA na přežívání bakteriální kmeny OT3 a *Rhodococcus*, při různých koncentracích PVA. Z volené koncentrace, které jsme v pokusech používali, byly 0% (bez přídavku PVA), dále 5%, 10% a 20%. Vysušené preparáty bez přídavku PVA sloužily jako srovnávací.

Při práci s roztokem o koncentraci 20% PVA se ukázalo, že je tento roztok vysoce viskózní a jakákoliv manipulace s ním byla obtížná. Proto jsme přípravu koncentrovanějších roztoků vyloučili a s koncentrovanějšími roztoky jsme nepracovali. Použití 0% až 20% roztoku PVA nám poskytuje vodítko k určení vhodné koncentrace PVA a rovněž má za úkol poskytnout prvotní informace, jak použité kmeny snášejí skladování ve vysušeném stavu.

Zjišťování počtu kolonií bakteriálních kmenů OT3 a *Rhodococcus* probíhalo po dobu 4 měsíců v těchto časových intervalech: po prvním dnu, prvním týdnu, dvou týdnech, měsíci, 2 měsících a 4 měsících.

Nejprve byla připravena v 500-ml láhvi bakteriální suspenze pro kultivace (1) tak, že: 100 ml MMK bylo zaočkováno bakterií OT3 + *Rhodococcus*, vyrostlou na PVA agaru. Takto připravená láhev byla upevněna v třepačce v kultivační místnosti na dobu cca 10 dnů.

### **Příprava bakteriálních preparátů s obsahem 0% - 20%PVA**

Jednotlivá množství PVA (Tab.2) byla navážena ve vialkách (2) a následně rozpuštěna v MM při sterilizaci v autoklávu, při teplotě 120 °C po dobu 15 minut.

V případě, že se PVA při sterilizaci nerozpustil důkladně, zahřívala jsem vialky s roztoky ještě na vodní lázni. Po ochlazení byly do každé vialky přidány 2 ml bakteriální suspenze (*Rhodococcus* + OT3), kde se předpokládá, že PVA je v podstatě spotřebován. Vše se promíchá.

Tabulka.2.Množství jednotlivých složek potřebných na přípravu bakteriálních preparátů s obsahem 0% - 20%PVA

<b>koncentrace PVA</b>	<b>navážka PVA (mg)</b>	<b>MM (ml)</b>
<b>0%</b>	0	5
<b>5%</b>	250	4,75
<b>10%</b>	500	4,5
<b>20%</b>	1000	4

Během dřívějších pokusů bylo zjištěno, že u vysokých koncentrací PVA v MM klesá hodnota pH. Např. u 10% roztok PVA klesla hodnota pH na 5,8.

Tabulka 3. Naměřené hodnoty pH u různě koncentrovaných bakteriálních preparátů

<b>koncentrace PVA</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>5%</b>	<b>10%</b>
<b>pH</b>	7,5	6,8	6,5	5,8

Nízké pH by tak mohlo negativně ovlivnit přežívání bakterií. Proto jsme se rozhodli zvýšit dávkování fosforečnanů, které mají v médiu funkci pufru, na dvojnásobek dávkování, používaného v předchozích diplomových pracích [19]. Výsledkem bylo zvýšení hodnoty pH u 10% roztok PVA na 6,4.

Tabulka 4. Naměřené hodnoty pH po zvýšení dávky fosforečnanů

koncentrace PVA	0%	2%	5%	10%
pH	6,9	6,6	6,5	6,4

Hodnoty pH MM, které jsme použili pro tento pokus, jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka 5. Hodnoty pH bakteriálních preparátů I. pokusu

koncentrace PVA	0%	5%	10%	20%	MM
pH	7,4	6,7	6,6	5,6	7,4

### **Příprava misek určených pro skladování vysušených bakteriálních preparátů s obsahem PVA**

Pro všechny čtyři bakteriální preparáty bylo připraveno 128 prázdných Petriho misek (3). Na každou z misek byl pomocí mikrodávkovače dávkován objem 100  $\mu$ l, vždy jednoho z různě koncentrovaných preparátů PVA (2). Misky byly umístěny do laminárního boxu, kde byly ponechány přes noc k úplnému vysušení. Poté byla polovina misek od každé koncentrace uskladněna při laboratorní teplotě (25°C) a polovina v ledničce (4°C).

### **Stanovení počátečního množství buněk**

Byla připravena sada 5 endorfeek nutných pro ředění  $10^{-1}$  až  $10^{-5}$ , abychom mohli stanovit počáteční počet bakterií. Celý postup je uveden v kapitole Metodika a pracovní postupy.

### **Stanovení počtu přežilých buněk**

V předem určených časových intervalech byly odebírány misky s vysušenými bakteriálními preparáty, v nichž byly stanoveny počty přežilých buněk.

Nejdříve byly připraveny agary s PVA+PQQ+KA. Na ztuhlý agar pak bylo před nanášením buněk dávkováno 50  $\mu$ l katalázy, která byla rozetřena sterilní skleněnou hokejkou a následně vysušena v laminárním boxu.

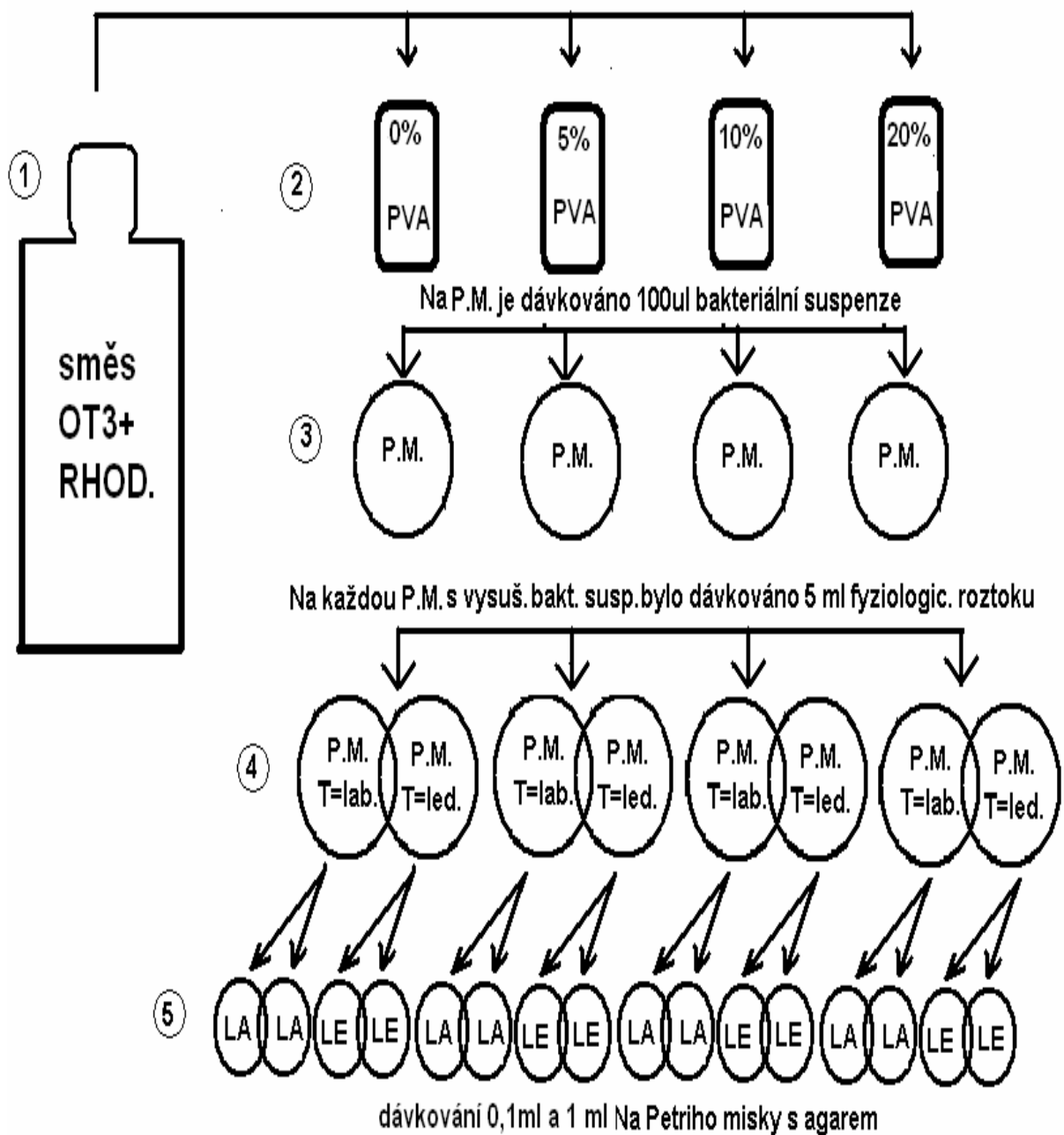
Kataláza je růstový faktor pro OT3. Bez jeho přítomnosti OT3 v čisté kultuře nevyroste.

Nejprve byl pro stanovení počtu používán PVA - agar s BTM, ale ukázalo se, že na něm oba druhy kolonií byly velmi obtížně rozpoznatelné. Později se PVA - agar s BTM nahradil PVA - agarem bez BTM, protože na něm oba sledované kmeny lépe vynikly.

V každém časovém bodě, ve kterém bylo provedeno stanovení, se postupovalo zhruba následujícím způsobem:

Bylo vybráno 8 misek s vysušeným bakteriálním preparátem, čili od každé koncentrace jedna miska skladovaná při laboratorní teplotě a jedna při teplotě z lednice (4). Pro některé časové body byly od každé koncentrace odebrány misky dvě. Do těchto misek (4) bylo pipetováno 5 ml sterilního fyziologického roztoku, ve kterém se vysušený bakteriální preparát zhruba po 15 minutách rozpustil a zředil. Pomocí dávkovače (200-1000 $\mu$ l) se vše důkladně promíchalo.

Na Petriho misky s agarem s PVA+PQQ+KA a s 50  $\mu$ l katalázy (5) pak bylo dávkováno 100 $\mu$ l a 1000 $\mu$ l, vždy jednoho druhu rozpuštěného bakteriálního preparátu (4). Toto množství se rozetřelo sterilní skleněnou hokejkou a ponechalo v laminárním boxu vysušit. Misky pak byly skladovány při teplotě 30°C po dobu 7-9 dnů. Ze zjištěného množství kolonií kmene *Rhodococcus* a OT3 bylo po započítání ředění při jednotlivých manipulacích vypočten počet přežilých buněk připadajících na 1 ml vstupní bakteriální suspenze.



Obr.3.Schéma přípravy bakteriální suspenze a vysévání na misky:

1, láhev o objemu 500 ml, ve které proběhla kultivace bakterií OT3+ *Rhodococcus*;  
 2, vialky obsahující sterilní 0%-20% roztok PVA; 3, prázdné Petriho misky (P.M.), na které bylo dávkováno 100 µl vždy jednoho druhu bakteriálního preparátu; 4, P.M. s vysušenou bakteriální suspenzí, které byly uskladněny při teplotě laboratorní a teplotě v lednici. Na takto připravené misky bylo pipetováno 5ml sterilního fyz.; 5, Petriho misky s agarem s PVA+PQQ+KA a s katalázou. Na ně je dávkováno 100 µl a 1000 µl bakteriálního preparátu (4). LA= laboratorní teplota, LE = teplota v lednici

### 3.1.1 Počáteční počty kolonií

Následující tabulka uvádí zjištěné koncentrace bakterií ve vstupní bakteriální suspenzi

Tabulka 6. Počáteční počty bakteriálního kmene OT3

Počet kolonií OT3	Ředění 10 <sup>+5</sup>		Ředění 10 <sup>+6</sup>	
		4,70E+02	3,50E+02	8,70E+01
CFU/ml OT3	4,70E+08	3,50E+08	8,70E+08	1,10E+09
ΦCFU/ml OT3	4,10E+08		9,70E+08	

Průměrný počet bakterií kmene OT3 na počátku I.pokusu byl stanoven na  $9,7 \cdot 10^8$

Tabulka 7. Počáteční počty bakteriálního kmene *Rhodococcus*

Počet kolonií RHODO	Ředění 10 <sup>+5</sup>		Ředění 10 <sup>+6</sup>	
		1,0E+02	5,7E+01	2,0E+01
CFU/ml RHODO	1,0E+08	5,7E+07	2,0E+08	4,0E+07
ΦCFU/ml RHODO	8,0E+07		1,2E+08	

Průměrný počet bakterií kmene *Rhodococcus* na počátku I.pokusu byl stanoven na  $8,0 \cdot 10^7$

### 3.1.2 Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a *Rhodococcus*, které byly uskladněny v lednici 4°C

Následující tabulky shrnují výsledky získané při zjišťování počtu přežilých bakterií v jednotlivých časových intervalech. Výsledky získané po prvním dnu měly za úkol vykreslit situaci v jakém množství bakterie přežily, respektive jak dobře snášely samotnou manipulaci, zjm. nanesení bakteriálního preparátu na misky a jeho vysušení v laminárním boxu. Následně byl zjištěn počet CFU/ml na počátku pokusu. Návaznost jednotlivých měření byla volena podle exponenciální řady, v uvedených časových intervalech, při dvou teplotách 4°C a 25°C.



Tabulka 8.1 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* bezprostředně po manipulaci

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	Φ CFU/ml	ΦCFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
1.DEN	0% PVA	1000	5,8E+02	2,0E+02	1,8E+06	5,9E+05	1,6E+06	6,0E+05
		100	4,9E+01	2,0E+01	1,5E+06	6,0E+05		
	5% PVA	1000	3,6E+02	8,5E+01	1,1E+06	2,6E+05	1,6E+06	1,0E+06
		100	7,1E+01	6,1E+01	2,1E+06	1,8E+06		
	10% PVA	1000	4,7E+02	1,6E+02	1,4E+06	4,8E+05	1,5E+06	1,1E+06
		100	5,1E+01	5,4E+01	1,5E+06	1,6E+06		
	20% PVA	1000	2,0E+00	1,8E+02	6,0E+03	5,3E+05	3,0E+03	1,2E+06
		100	0	6,0E+01	0	1,8E+06		

Φ, průměrná hodnota

Tabulka 8.2 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 7. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	Φ CFU/ml	ΦCFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODOC
7.DEN	0% PVA	1000	0	9,2E+01	0	2,8E+04	0	2,3E+04
		100	0	6,0E+00	0	1,8E+04		
	5% PVA	1000	1,2E+03	9,5E+02	3,7E+05	2,9E+05	8,6E+05	9,9E+05
		100	4,5E+02	5,7E+02	1,4E+06	1,7E+06		
	10% PVA	1000	9,2E+02	1,1E+03	2,8E+05	3,3E+05	1,4E+05	6,3E+05
		100	0	3,1E+02	0	9,3E+05		
	20% PVA	1000	0	7,8E+02	0	2,3E+05	0	4,3E+05
		100	0	2,1E+02	0	6,2E+05		

Φ, průměrná hodnota

Tabulka 8.3 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 14. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	Φ CFU/ml	ΦCFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
14.DEN	0% PVA	1000	1,0E+01	3,5E+02	3,0E+03	1,1E+05	3,0E+03	1,7E+05
		100	1,0E+00	7,6E+01	3,0E+03	2,3E+05		
	5% PVA	1000	9,2E+02	6,6E+02	2,8E+05	2,0E+05	5,4E+05	3,2E+05
		100	2,7E+02	1,5E+02	8,0E+05	4,5E+05		
	10% PVA	1000	9,8E+02	7,5E+02	2,9E+05	2,3E+05	8,8E+05	6,4E+05
		100	4,9E+02	3,5E+02	1,5E+06	1,1E+06		
	20% PVA	1000	0	3,8E+02		1,1E+05	0	2,5E+05
		100	0	1,3E+02	0	4,0E+05		

Φ, průměrná hodnota

Tabulka 8.4 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 21. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	Φ CFU/ml	ΦCFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
21.DEN	0% PVA	1000	4,0E+00	3,9E+01	1,2E+03	1,2E+04	6,0E+02	1,0E+04
		100	0	3,0E+00	0	9,0E+03		
	5% PVA	1000	1,4E+03	1,4E+03	4,3E+05	4,1E+05	7,9E+05	5,3E+05
		100	3,8E+02	2,2E+02	1,1E+06	6,5E+05		
	10% PVA	1000	2,3E+01	7,3E+02	6,9E+03	2,2E+05	6,5E+03	4,2E+05
		100	2,0E+00	2,1E+02	6,0E+03	6,3E+05		
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x	x	x	

Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.5 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 28. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	Φ CFU/ml	ΦCFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
28.DEN	0% PVA	1000	0	6,3E+03	0	1,9E+06	0	4,5E+06
		100	0	2,4E+03	0	7,1E+06		
	5% PVA	1000	6,5E+03	8,4E+03	2,0E+06	2,5E+06	7,2E+06	6,9E+06
		100	4,2E+03	3,7E+03	1,3E+07	1,1E+07		
	10% PVA	1000	7,7E+02	8,9E+03	2,3E+05	2,7E+06	5,8E+05	8,0E+06
		100	3,1E+02	4,5E+03	9,3E+05	1,3E+07		
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x	x	x	

Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.6 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 56. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet	φCFU/ml	φ CFU/ml
			OT3	OT3	OT3	OT3	OT3
56.DEN	0% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	5% PVA	1000	2,1E+02	7,6E+02	4,9E+02	1,5E+05	3,7E+05
		100	1,5E+02	2,5E+02	2,0E+02	5,9E+05	
	10% PVA	1000	1,0E+02	9,0E+01	9,5E+01	2,9E+04	3,4E+04
		100	1,9E+01	7,0E+00	1,3E+01	3,9E+04	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x	x	

Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.7 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 56. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
56.DEN RHODO	0% PVA	1000	4,6E+03	6,4E+03	5,5E+03	1,6E+06	8,5E+05
		100	2,1E+01	1,0E+00	2,1E+01	6,3E+04	
	5% PVA	1000	1,2E+03	1,0E+03	1,1E+03	3,4E+05	4,5E+05
		100	1,5E+02	2,3E+02	1,9E+02	5,6E+05	
	10% PVA	1000	6,6E+02	5,4E+02	6,0E+02	1,8E+05	3,2E+05
		100	1,4E+02	1,7E+02	1,6E+02	4,7E+05	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x	x	

φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.8 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a po 85. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
85.DEN OT3	0% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	5% PVA	1000	4,0E+00	7,0E+00	5,5E+00	1,7E+03	2,4E+04
		100	1,2E+01	1,9E+01	1,6E+01	4,7E+04	
	10% PVA	1000	1,0E+00	0,0E+00	5,0E-01	1,5E+02	1,6E+03
		100	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	3,0E+03	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x	x	

φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.9 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 85. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
85.DEN RHODO	0% PVA	1000	4,4E+02	5,2E+02	4,8E+02	1,4E+05	2,4E+05
		100	9,0E+01	1,3E+02	1,1E+02	3,3E+05	
	5% PVA	1000	6,0E+02	7,6E+02	6,8E+02	2,0E+05	4,1E+05
		100	1,8E+02	2,3E+02	2,1E+02	6,2E+05	
	10% PVA	1000	8,4E+02	9,2E+02	8,8E+02	2,6E+05	5,7E+05
		100	2,6E+02	3,2E+02	2,9E+02	8,7E+05	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x	x	

φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.10 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 96. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
96.DEN	0% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	5% PVA	1000	4,0E+00	0	2,0E+00	6,0E+02	1,1E+03
		100	1,0E+00	0	5,0E-01	1,5E+03	
OT3	10% PVA	1000	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	3,0E+02	1,5E+02
		100	0	0	0	0	
	20% PVA	1000	x	x	X	x	x
		100	x	x	X	x	

φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.11 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 96. dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
96.DEN	0% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	5% PVA	1000	4,3E+02	5,2E+02	4,8E+02	1,4E+05	2,0E+05
		100	9,1E+01	8,6E+01	8,9E+01	2,7E+05	
RHODO	10% PVA	1000	3,5E+02	2,9E+02	3,2E+02	9,6E+04	1,3E+05
		100	4,7E+01	6,4E+01	5,6E+01	1,7E+05	
	20% PVA	1000	x	x	x	x	x
		100	x	x	x	x	

φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

### 3.1.3 Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a *Rhodococcus*, které byly uskladněny při laboratorní teplotě 25°C

Tabulka 8.12 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* bezprostředně po manipulaci

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	φCFU/ml	φ CFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
1 .DEN	0% PVA	1000	4,3E+02	3,3E+02	1,3E+06	9,9E+05	3,0E+06	1,7E+06
		100	1,6E+02	8,0E+01	4,8E+06	2,4E+06		
	5% PVA	1000	4,5E+02	1,2E+02	1,4E+06	3,6E+05	1,1E+06	4,2E+06
		100	2,9E+01	2,7E+02	8,7E+05	8,0E+06		
	10% PVA	1000	7,3E+02	1,7E+02	2,2E+06	5,0E+05	2,9E+06	1,8E+06
		100	1,2E+02	1,1E+02	3,6E+06	3,2E+06		
20% PVA	1000	0	1,1E+02	0	3,2E+05	0	4,4E+05	
	100	0	1,9E+01	0	5,7E+05			

Tabulka 8.13 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 7. dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	ΦCFU/ml	Φ CFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
7.DEN	0% PVA	1000	0	3,9E+02	0	1,2E+05	0	1,3E+05
		100	0	5,0E+01	0	1,5E+05		
	5% PVA	1000	2,9E+01	4,2E+02	8,7E+03	1,3E+05	1,9E+04	2,1E+05
		100	1,0E+01	1,0E+02	3,0E+04	3,0E+05		
	10% PVA	1000	0	7,9E+02	0	2,4E+05	0	2,7E+05
		100	0	1,0E+02	0	3,0E+05		
20% PVA	1000	0	3,9E+02	0	1,2E+05	0	1,7E+05	
	100	0	7,6E+01	0	2,3E+05			

Tabulka 8.14 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 14. dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	ΦCFU/ml	ΦCFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
14.DEN	0% PVA	1000	4,0E+01	1,1E+02	1,2E+04	3,4E+04	1,2E+04	2,2E+05
		100	4,0E+00	1,4E+02	1,2E+04	4,1E+05		
	5% PVA	1000	8,9E+02	1,4E+03	2,7E+05	4,1E+05	8,2E+05	1,1E+06
		100	4,6E+02	5,7E+02	1,4E+06	1,7E+06		
	10% PVA	1000	6,2E+01	6,3E+02	1,9E+04	1,9E+05	1,4E+04	2,5E+05
		100	3,0E+00	1,0E+02	9,0E+03	3,1E+05		
20% PVA	1000	0	4,2E+02	0	1,3E+05	0	2,9E+05	
	100	0	1,5E+02	0	4,6E+05			

Tabulka 8.15 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 21. dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	ΦCFU/ml	Φ CFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
21.DEN	0% PVA	1000	2,0E+00	8,9E+01	6,0E+02	2,7E+04	3,0E+02	3,1E+04
		100	0	1,2E+01	0	3,6E+04		
	5% PVA	1000	1,1E+02	4,8E+02	3,3E+04	1,4E+05	4,7E+04	3,4E+05
		100	2,0E+01	1,8E+02	6,0E+04	5,3E+05		
	10% PVA	1000	2,0E+00	9,5E+02	6,0E+02	2,9E+05	3,0E+02	3,8E+05
		100	0	1,6E+02	0	4,7E+05		
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x			

Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.16 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 28. dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml	CFU/ml	ΦCFU/ml	Φ CFU/ml
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
28.DEN	0% PVA	1000	0	1,3E+04	0	3,8E+06	0	1,3E+07
		100	0	7,4E+03	0	2,2E+07		
	5% PVA	1000	3,9E+02	1,2E+04	1,2E+05	3,5E+06	1,0E+05	9,9E+06
		100	3,0E+01	5,4E+03	9,0E+04	1,6E+07		
	10% PVA	1000	0	9,0E+03	0	2,7E+06	0	7,7E+06
		100	0	4,2E+03	0	1,3E+07		
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x	x	x	

Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.17 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 56. dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet	CFU/ml	φ CFU/ml
			OT3	OT3	OT3	OT3	OT3
56.DEN	0% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	5% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	10% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x	x	

Tabulka 8.18 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 56. dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet	CFU/ml	φ CFU/ml
			RHODO	RHODO	RHODO	RHODO	RHODO
56.DEN	0% PVA	1000	5,9E+03	4,4E+03	5,1E+03	1,5E+06	8,1E+05
		100	2,5E+01	3,0E+00	2,5E+01	7,5E+04	
	5% PVA	1000	3,8E+03	4,1E+03	3,9E+03	1,2E+06	1,3E+06
		100	7,8E+02	1,4E+02	4,6E+02	1,4E+06	
	10% PVA	1000	3,1E+02	2,8E+02	3,0E+02	8,9E+04	1,4E+05
		100	7,1E+01	5,7E+01	6,4E+01	1,9E+05	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x	x	

Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.19 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 85. dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
85.DEN OT 3	0% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	5% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	10% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x		

Tabulka 8.20 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 85. dnu uskladnění při T=25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
85.DEN RHODO	0% PVA	1000	2,6E+02	3,4E+02	3,0E+02	8,9E+04	2,0E+05
		100	8,7E+01	1,2E+02	1,1E+02	3,2E+05	
	5% PVA	1000	6,7E+02	5,2E+02	5,9E+02	1,8E+05	3,0E+05
		100	1,3E+02	1,5E+02	1,4E+02	4,3E+05	
	10% PVA	1000	6,3E+02	7,5E+02	6,9E+02	2,1E+05	3,0E+05
		100	1,5E+02	1,1E+02	1,3E+02	3,9E+05	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x		

Tabulka 8.21 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 96. dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
96.DEN OT 3	0% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	5% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	10% PVA	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x		

Tabulka 8.22 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 96. dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
96.DEN RHODO	0% PVA	1000	0	0	0	0	0,0E+00
		100	0	0	0	0	
	5% PVA	1000	1,2E+02	9,7E+01	1,1E+02	3,2E+04	3,7E+04
		100	1,3E+01	1,5E+01	1,4E+01	4,2E+04	
	10% PVA	1000	3,3E+01	4,5E+01	3,9E+01	1,2E+04	1,9E+04
		100	6,0E+00	1,2E+01	9,0E+00	2,7E+04	
20% PVA	1000	x	x	x	x	x	
	100	x	x	x	x		

### 3.1.4 Celkový časový přehled prvního pokusu

Pro lepší přehlednost jsem výsledné hodnoty všech pokusů shrnula do následujících tabulek:

Tabulka 8.23 .Počet baterií OT3 (CFU/ml) kultivované v lednici

koncentrace	1.DEN	7.DEN	14.DEN	21.DEN	28.DEN	56.DEN	85.DEN	96.DEN
<b>0% PVA</b>	1,6E+06	0	3,0E+03	6,0E+02	0	0	0	0
<b>5% PVA</b>	1,6E+06	8,6E+05	5,4E+05	7,9E+05	7,2E+06	3,7E+05	2,4E+04	1,1E+03
<b>10% PVA</b>	1,5E+06	1,4E+05	0	6,5E+03	5,8E+05	3,4E+04	1,6E+03	1,5E+02
<b>20% PVA</b>	3,0E+03	0	0	x	x	x	x	x

x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.24 Počet baterií *Rhodococcus* (CFU/ml) kultivované v lednici

koncentrace	1.DEN	7.DEN	14.DEN	21.DEN	28.DEN	56.DEN	85.DEN	96.DEN
<b>0% PVA</b>	6,0E+05	2,3E+04	1,7E+05	1,0E+04	4,5E+06	8,5E+05	2,4E+05	0
<b>5% PVA</b>	1,0E+06	9,9E+05	3,2E+05	5,3E+05	6,9E+06	4,5E+05	4,1E+05	2,0E+05
<b>10% PVA</b>	1,1E+06	6,3E+05	6,4E+05	4,2E+05	8,0E+06	3,2E+05	5,7E+05	1,3E+05
<b>20% PVA</b>	1,2E+06	4,3E+05	2,5E+05	x	x	x	x	x

x, stanovení nebylo provedeno

Tabulka 8.25 Počet baterií OT3 (CFU/ml) kultivované při laboratorní teplotě

koncentrace	1.DEN	7.DEN	14.DEN	21.DEN	28.DEN	56.DEN	85.DEN	96.DEN
<b>0% PVA</b>	3,0E+06	0	1,2E+04	3,0E+02	0	0	0	0
<b>5% PVA</b>	1,1E+06	1,9E+04	8,2E+05	4,7E+04	1,0E+05	0	0	0
<b>10% PVA</b>	2,9E+06	0	1,4E+04	3,0E+02	0	0	0	0
<b>20% PVA</b>	0	0	0	x	x	x	x	x

x, stanovení nebylo provedeno

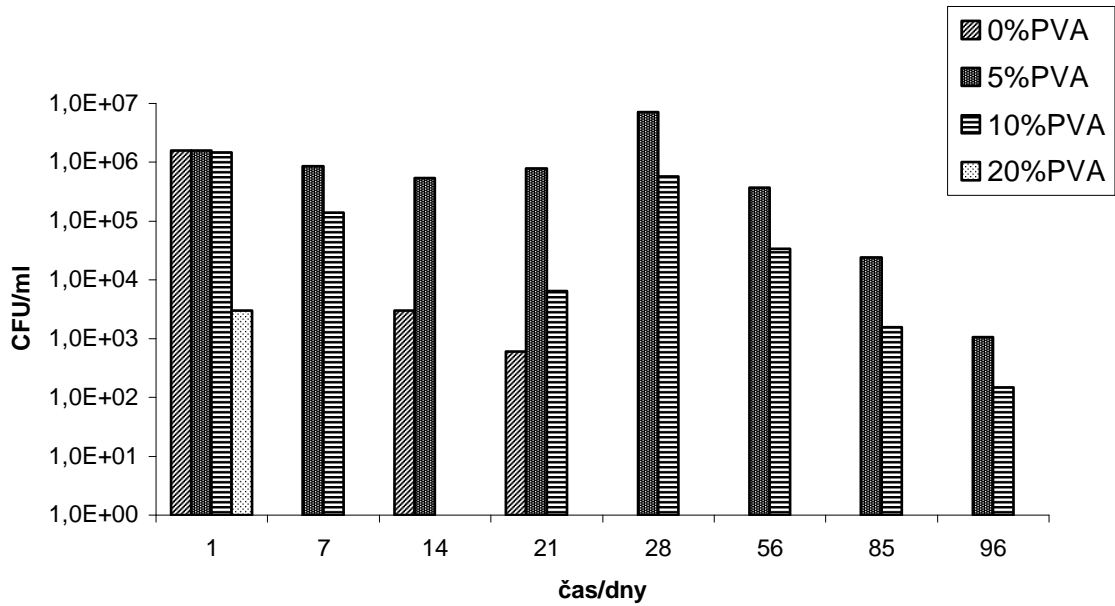
Tabulka 8.26 Počet baterií *Rhodococcus* (CFU/ml) kultivované při laboratorní teplotě

koncentrace	1.DEN	7.DEN	14.DEN	21.DEN	28.DEN	56.DEN	85.DEN	96.DEN
<b>0% PVA</b>	1,7E+06	1,3E+05	2,2E+05	3,1E+04	1,3E+07	8,1E+05	2,0E+05	0
<b>5% PVA</b>	4,2E+06	2,1E+05	1,1E+06	3,4E+05	9,9E+06	1,3E+06	3,0E+05	3,7E+04
<b>10% PVA</b>	1,8E+06	2,7E+05	2,5E+05	3,8E+05	7,7E+06	1,4E+05	3,0E+05	1,9E+04
<b>20% PVA</b>	4,4E+05	1,7E+05	2,9E+05	x	x	x	x	x

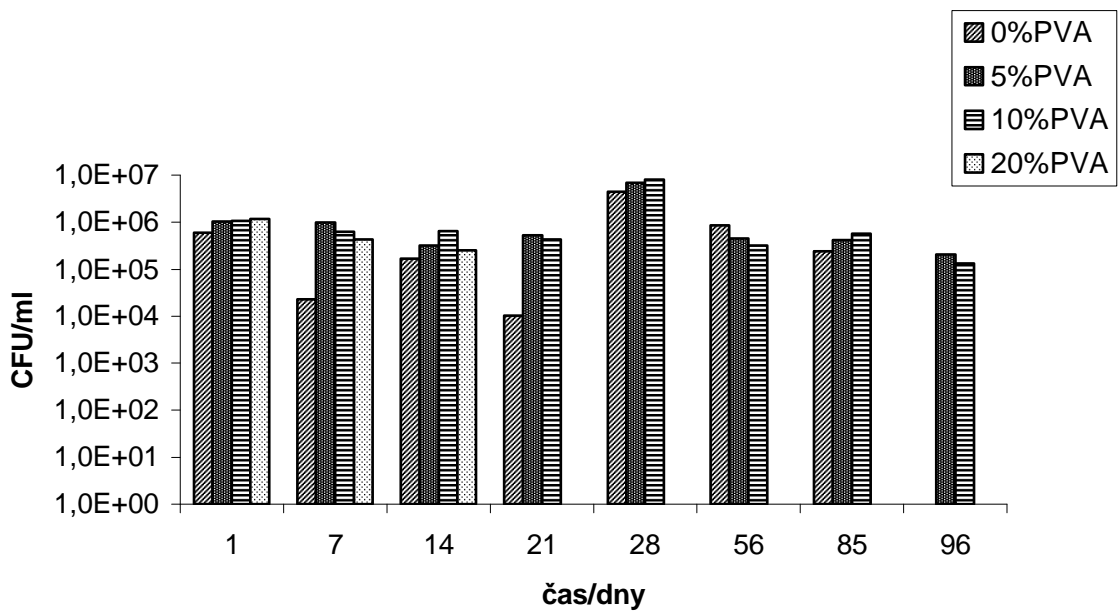
x, stanovení nebylo provedeno



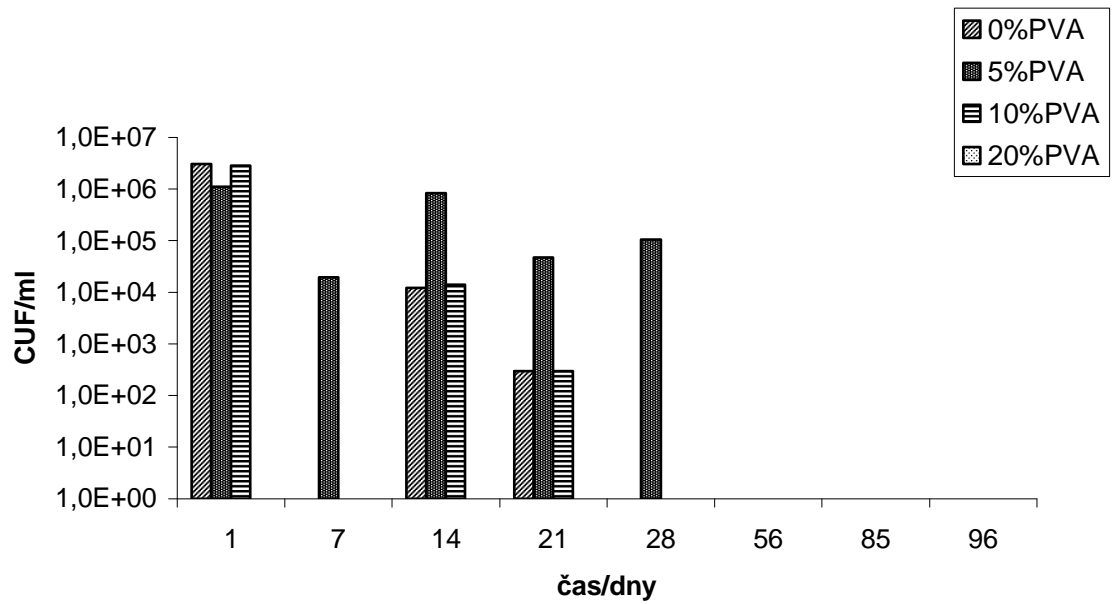
Pro snadnou orientaci byly výsledky prvního pokusu graficky znázorněny:



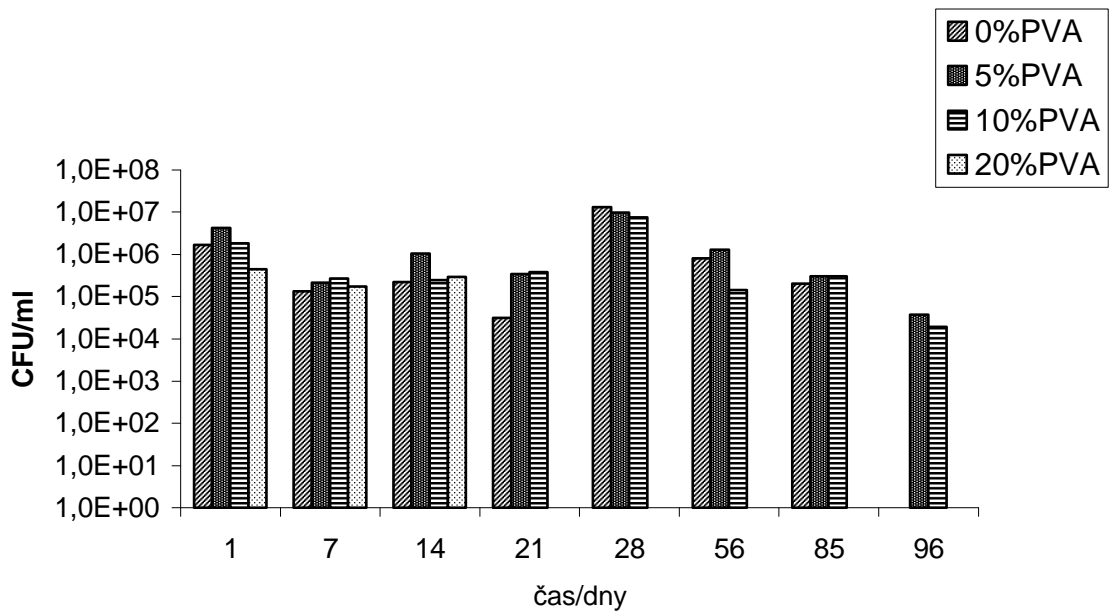
Obr.4: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C



Obr.5: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) na na čase při teplotě 4°C



Obr.6: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C



Obr. 7: Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C

Z výsledků se dá odvodit, že při teplotě lednice 4°C, je přežívání obou bakteriálních kmenů lepší. Dále je vidět, že koncentrace přežilých buněk kmene *Rhodococcus* se drží poměrně stabilně, naproti tomu počet přežilých buněk kmene OT3 výrazně klesá. Lze říci, že přítomnost PVA neměla vliv na přežívání bakteriálního kmene *Rhodococcus*, zatímco u bakterií OT3 při teplotě 4°C prokázaly největší ochranný účinek koncentrace 5% PVA a 10% PVA, kde se počet přežilých bakterií pohyboval průměrně v rozmezí  $10^{+5}$  až  $10^{+6}$  buněk/ml. Při laboratorní teplotě tomu ale tak není. Došlo zde k výraznému skoku ve snížení počtu bakterií vlivem vysušení o 2 až 3 řády.

Po třech týdnech skladování vysušeného preparátu s koncentrací 20% PVA jsme usoudili, že všechny bakterie kmene OT 3 už vyhynuly. Dvacátý první den bylo tedy počítání bakterií u této koncentrace ukončeno (v tabulkách vyznačeno křížkem „x“). Domníváme se tedy, že koncentrace 20% PVA měla zřejmě baktericidní účinek, a tudíž se ukázala jako nevhodná. Proto jsme ji z dalších pokusů vyloučili.

### 3.2 Pokus druhý – ověření ochranného účinku sušeného mléka

V návaznosti na předchozí experiment byl proveden pokus s přidavkem sušeného mléka. Z prvního pokusu jsme zjistili, že přežívání bakterií jen v bakteriálním preparátu s obsahem PVA není tak úspěšný a počty přežilých bakterií jsou nízké. Odborná literatura uvádí [27-29], že sušené odstředěné mléko je používáno pro uchovávání kultur a podporuje přežívání bakterií ve vysušeném stavu. Proto jsme se rozhodli vyzkoušet ochranný vliv sušeného odstředěného mléka na přežívání kmenů OT3 a *Rhodococcus*, při koncentracích: 0% bez přidavku PVA a sušeného mléka, 0% bez přidavku PVA, ale s přidavkem sušeného mléka, dále 5% a 10% s přidavkem sušeného mléka. Sušené mléko bylo přidáno ke každému koncentrovanému roztoku po sterilizaci a následném vychlazení.

Dále byl na základě výsledků prvního pokusu vyřazen 20% roztok PVA. Tento roztok je vysoce viskózní, byla s ním obtížná manipulace a bakterie v něm vyhynuly velmi brzy. I tento pokus byl sledován opět při laboratorní teplotě 25°C a teplotě lednice 4°C.

Zjišťování počtu kolonií dvou sledovaných kultur probíhalo po dobu 2 měsíců v těchto časových intervalech: po prvním dnu, prvním týdnu, dvou týdnech, měsíci, dvou měsících. Tento pokus probíhal podobným způsobem jako předcházející pokus.

#### Příprava bakteriálních preparátů s obsahem 0% - 10%PVA a přidavkem sušeného odstředěného mléka

Uvedené množství PVA (Tab.9) bylo naváženo do vialek (2) a následně rozpuštěno v MM při sterilizaci v autoklávu, při teplotě 120 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí bylo do vialek – B, C, D (2) přidáno 1000 mg sušeného odstředěného mléka a vše se promíchalo sterilní skleněnou tyčinkou. Takto připravená směs se ještě 20-25 min vařila na vodní lázni. Po ochlazení byly do každé vialky pipetovány 2 ml bakteriální suspenze (*Rhodococcus* + OT3) a vše se promíchá.

Tabulka 9: Množství jednotlivých složek potřebných na přípravu koncentrovaných roztok PVA s obsahem sušeného mléka

vialka	koncentrace PVA	navážka PVA (mg)	MM (ml)	navážka sušeného mléka (mg)
A	0%	0	5	0
B	0% + ml	250	4,75	1000
C	5% + ml	500	4,5	1000
D	10% + ml	1000	4	1000

Tabulka 10: Hodnoty pH u roztoků bakteriální suspenze s obsahem sušeného mléka

koncentrace PVA	0%	0%+ ml	5%+ ml	10%+ ml	MM
pH	7,4	6,7	6,4	6,2	7,4

### **Příprava misek určených pro skladování vysušených bakteriálních preparátů s obsahem PVA a sušeného mléka**

Bylo připraveno 128 ks prázdných Petriho misek. Na jednu koncentraci tak připadlo 32 misek. Do každé z misek (3) bylo dávkováno 100  $\mu$ l, vždy jednoho z různě koncentrovaných bakteriálních preparátů ve vialkách A, B, C, D (2) a toto množství bylo následně vysušeno v laminárním boxu. Poté byla polovina misek od každé koncentrace uskladněna při laboratorní teplotě a polovina v ledničce.

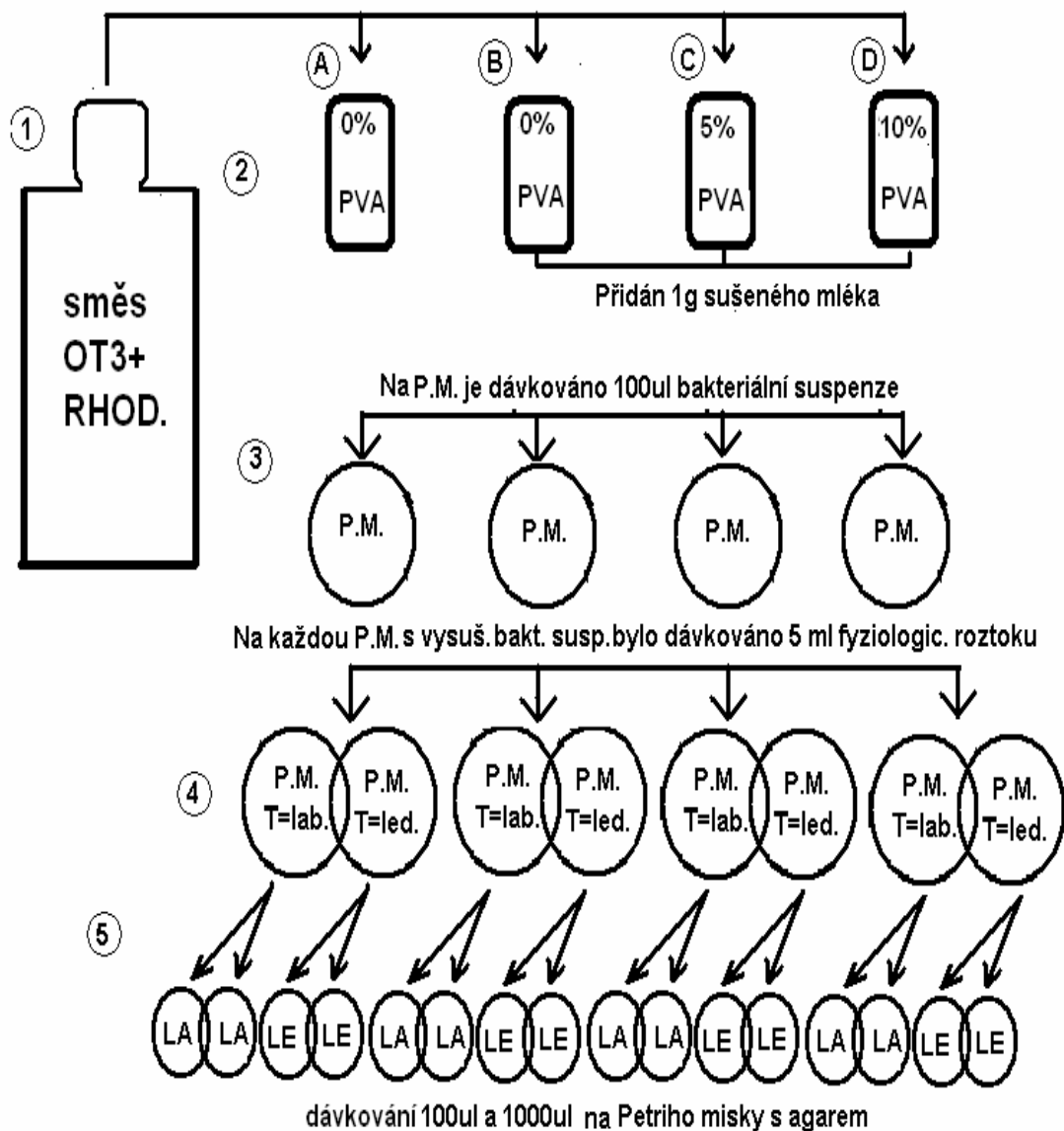
### **Stanovení počátečního množství buněk**

5 endorfeek sloužilo pro ředění  $10^{-1}$  až  $10^{-5}$ , abychom mohli stanovit počáteční počet bakterií. Celý postup je uveden v kapitole Metodika a pracovní postupy.

### **Stanovení počtu přežilých buněk**

Stejně jako v prvním pokusu tak i v pokusu druhém byly misky s vysušenými bakteriálními preparáty, v nichž byly stanoveny počty přežilých buněk, odebírány v předem určených časových intervalech.

Do 8 misek s vysušeným bakteriálním preparátem (4), bylo pipetováno 5 ml sterilního fyziologického roztoku. Na Petriho misky s agarem s PVA+PQQ+KA a s 50  $\mu$ l katalázy (5) pak bylo dávkováno 100 $\mu$ l a 1000 $\mu$ l, vždy jednoho druhu bakteriálního preparátu (4) a rozetřeno sterilní skleněnou hokejkou. Po vysušení byly misky skladovány při teplotě 30°C po dobu 7-9 dnů. Ze zjištěného množství kolonií kmene *Rhodococcus* a OT3 bylo po započítání ředění při jednotlivých manipulacích vypočten počet přežilých buněk připadajících na 1 ml vstupní bakteriální suspenze.



Obr.8: Schéma postupu přípravy bakteriálních suspenzí s přidavkem sušeného mléka: **1**, láhev o objemu 500 ml, ve které proběhla kultivace bakterií OT3+ *Rhodococcus*; **2**, vialky obsahující sterilní 0%-10% roztok PVA, vialky: B, C, D obsahují 1g sušeného mléka; **3**, prázdné Petriho misky (P.M.), na které je dávkováno 100 µl vždy jednoho druhu bakteriálního preparátu; **4**, P.M. s vysušenou bakteriální suspenzí, které byly uskladněny při teplotě laboratorní a teplotě v lednici. Na takto připravené misky bylo pipetováno 5 ml fyz. roztoku; **5**, P.M. s agarem s PVA+PQQ+KA a katalázou. Na ně je pak dávkováno 100 µl a 1000 µl bakt. preparátu (4). LA= laboratorní teplota, LE = teplota v lednici

### 3.2.1 Počáteční počty kolonií

Následující tabulky obsahují zjištěné koncentrace bakterií ve vstupní bakteriální suspenzi

Tabulka 11. Počáteční počty bakteriálního kmene OT3

Počet kolonií OT3	Ředění 10 <sup>+5</sup>		Ředění 10 <sup>+6</sup>	
		3,6E+02	4,2E+02	4,0E+00
CFU/ml OT3	3,6E+08	4,2E+08	4,0E+07	1,2E+08
ΦCFU/ml OT3	3,9E+08		7,9E+07	

Průměrný počet bakterií kmene OT3 na počátku II.pokusu byl stanoven na  $3,9 \cdot 10^8$

Tabulka 12. Počáteční počty bakteriálního kmene *Rhodococcus*

Počet kolonií RHODO	Ředění 10 <sup>+5</sup>		Ředění 10 <sup>+6</sup>	
		3,3E+02	2,7E+02	6,5E+01
CFU/ml RHODO	3,3E+08	2,7E+08	6,5E+08	8,9E+08
ΦCFU/ml RHODO	3,0E+08		7,7E+08	

Průměrný počet bakterií kmene *Rhodococcus* na počátku II.pokusu byl stanoven na  $3,0 \cdot 10^8$

### 3.2.2 Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a *Rhodococcus*, které byly uskladněny v lednici

V následující tabulkách jsou shrnuty výsledky získané při zjišťování počtu přežilých bakterií v uvedených časových intervalech. Výsledky získané po prvním dnu měly za úkol vykreslit situaci v jakém množství bakterie přežily, respektive jak dobře snášely samotnou manipulaci, zejm. smíchání preparátů a sušeného odstředěného mléka, zahřívání této suspenze a následné dávkování a vysušení na miskách. Další stanovení byla volena podle exponenciální řady, v uvedených časových intervalech, při dvou teplotách 4°C a 25°C a jejich účelem bylo ukázat, jak dobře snášejí přežilé bakterie skladování.

Tabulka 13.1 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* bezprostředně po manipulaci

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty kolonií		CFU/ml		φ CFU/ml	
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
1.DEN	0% č	1000	2,7E+03	2,5E+03	8,0E+05	7,6E+05	1,2E+06	6,9E+06
		100	5,2E+02	4,4E+02	1,6E+06	1,3E+07		
	0% ml	1000	3,8E+03	3,7E+03	1,1E+06	1,1E+06	1,7E+06	8,5E+06
		100	7,6E+02	5,3E+02	2,3E+06	1,6E+07		
	5% ml	1000	2,6E+03	3,9E+03	7,7E+05	1,2E+06	1,1E+06	1,3E+07
		100	5,0E+02	8,6E+02	1,5E+06	2,6E+07		
	10% ml	1000	9,9E+03	9,0E+03	3,0E+06	2,7E+06	4,8E+06	2,1E+07
		100	2,2E+03	1,3E+03	6,7E+06	4,0E+07		

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.2 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 7.dnu uskladnění při T=4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml		φ CFU/ml	
			OT3	RHODO	OT3	RHODO	OT3	RHODO
7.DEN	0% č	1000	6,9E+01	7,9E+01	2,1E+04	2,4E+04	1,8E+04	2,1E+05
		100	5,0E+00	1,3E+01	1,5E+04	3,9E+05		
	0% ml	1000	1,0E+04	1,3E+04	3,0E+06	3,8E+06	8,0E+06	1,0E+08
		100	4,4E+03	6,5E+03	1,3E+07	2,0E+08		
	5% ml	1000	2,1E+04	2,5E+04	6,3E+06	7,6E+06	2,2E+07	2,4E+08
		100	1,3E+04	1,6E+04	3,8E+07	4,8E+08		
	10% ml	1000	8,0E+03	7,7E+03	2,4E+06	2,3E+06	5,0E+06	3,1E+07
		100	2,5E+03	2,0E+03	7,6E+06	6,0E+07		

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.3 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 14.dnu uskladnění při T=4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		CFU/ml		φ CFU/ml	
			OT3	RHODO	OT3	RH	OT3	RHODO
14.DEN	0% č	1000	1,8E+02	1,3E+04	5,5E+04	3,8E+06	4,8E+04	8,2E+07
		100	1,4E+01	5,3E+03	4,2E+04	1,6E+08		
	0% ml	1000	1,7E+04	1,8E+04	5,0E+06	5,3E+06	1,8E+07	1,1E+08
		100	1,0E+04	6,8E+03	3,1E+07	2,1E+08		
	5% ml	1000	9,6E+03	1,9E+04	2,9E+06	5,6E+06	8,4E+06	1,5E+08
		100	4,7E+03	9,8E+03	1,4E+07	2,9E+08		
	10% ml	1000	1,3E+04	1,6E+04	3,8E+06	4,9E+06	9,0E+06	1,3E+08
		100	4,8E+03	8,6E+03	1,4E+07	2,6E+08		

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka



Tabulka 13.4 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 28.dnu uskladnění při T=4°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
28.DEN	0% č	1000	3,0E+00	2,4E+01	1,4E+01	4,1E+03	2,0E+03
		100	0	0	0	0	
	0% ml	1000	5,3E+02	1,4E+03	9,8E+02	2,9E+05	1,5E+05
		100	0	0	0	0	
OT3	5% ml	1000	6,9E+03	9,4E+02	6,9E+03	2,1E+06	4,0E+06
		100	1,6E+03	2,3E+03	2,0E+03	5,9E+06	
	10% ml	1000	9,7E+03	9,7E+03	9,7E+03	2,9E+06	4,5E+06
		100	4,0E+03	2,0E+01	2,0E+03	6,1E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.5 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 28.dnu uskladnění při T=4°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
28.DEN	0% č	1000	6,3E+03	5,7E+03	6,0E+03	1,8E+06	2,5E+06
		100	1,0E+03	1,1E+03	1,0E+03	3,1E+06	
	0% ml	1000	3,2E+03	4,3E+03	3,8E+03	1,1E+06	6,4E+06
		100	3,9E+03	1,4E+04	3,9E+03	1,2E+07	
RHODO	5% ml	1000	9,2E+03	1,5E+04	1,2E+04	3,6E+06	1,1E+07
		100	5,2E+03	6,8E+03	6,0E+03	1,8E+07	
	10% ml	1000	1,5E+04	1,5E+04	1,5E+04	4,5E+06	1,2E+07
		100	6,8E+03	5,8E+03	6,3E+03	1,9E+07	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.6 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 56.dnu uskladnění při T=4°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
56.DEN	0% č	1000	5,4E+02	1,2E+03	8,5E+02	2,6E+05	3,8E+05
		100	2,6E+02	7,8E+01	1,7E+02	5,0E+05	
	0% ml	1000	2,3E+02	7,0E+02	4,7E+02	1,4E+05	6,9E+05
		100	4,2E+02	4,0E+02	4,1E+02	1,2E+06	
OT3	5% ml	1000	1,2E+03	5,0E+02	8,4E+02	2,5E+05	5,7E+05
		100	4,3E+02	1,6E+02	2,9E+02	8,8E+05	
	10% ml	1000	1,1E+03	8,3E+02	9,5E+02	2,9E+05	1,1E+06
		100	4,6E+02	7,9E+02	6,2E+02	1,9E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.7 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 56.dnu uskladnění při T=4°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml		φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO		RHODO	RHODO	
56.DEN RHODO	0% č	1000	1,7E+03	2,5E+03	2,1E+03	6,3E+05	6,1E+05	
		100	7,7E+01	3,2E+02	2,0E+02	5,9E+05		
	0% ml	1000	4,8E+03	2,9E+03	3,8E+03	1,1E+06	5,1E+06	
		100	3,0E+03	3,1E+03	3,0E+03	9,0E+06		
	5% ml	1000	1,7E+03	2,0E+03	1,9E+03	5,6E+05	4,4E+06	
		100	2,5E+03	3,1E+03	2,8E+03	8,3E+06		
10% ml	1000	2,8E+03	2,7E+03	2,7E+03	8,2E+05	3,2E+06		
	100	1,4E+03	2,3E+03	1,9E+03	5,6E+06			

### 3.2.3 Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a *Rhodococcus*, které byly uskladněny při laboratorní teplotě 25°C

Tabulka 13.8 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* bezprostředně po manipulaci

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		CFU/ml		φ CFU/ml	
			OT3	RHODO	OT3	RH	OT3	RHODO
1.DEN	0% č	1000	7,2E+02	1,0E+03	2,2E+05	3,1E+05	3,8E+05	3,9E+06
		100	1,8E+02	2,5E+02	5,4E+05	7,5E+06		
	0% ml	1000	9,2E+03	9,0E+03	2,7E+06	2,7E+06	4,1E+06	2,1E+07
		100	1,8E+03	1,3E+03	5,4E+06	3,9E+07		
	5% ml	1000	8,8E+03	1,0E+04	2,6E+06	3,0E+06	4,5E+06	4,6E+07
		100	2,1E+03	2,9E+03	6,4E+06	8,8E+07		
10% ml	1000	2,6E+03	1,0E+04	7,7E+05	3,0E+06	9,3E+05	4,7E+07	
	100	3,6E+02	3,0E+03	1,1E+06	9,1E+07			

Tabulka 13.9 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 7.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		CFU/ml		φ CFU/ml	
			OT3	RHODO	OT3	RH	OT3	RHODO
7.DEN	0% č	1000	4,6E+01	1,8E+02	1,4E+04	5,3E+04	1,9E+04	4,8E+05
		100	8,0E+00	3,0E+01	2,4E+04	9,0E+05		
	0% ml	1000	8,5E+03	4,7E+03	2,5E+06	1,4E+06	4,9E+06	2,3E+07
		100	2,5E+03	1,5E+03	7,4E+06	4,5E+07		
	5% ml	1000	1,0E+04	1,9E+04	3,0E+06	5,7E+06	8,4E+06	1,1E+08
		100	4,6E+03	6,9E+03	1,4E+07	2,1E+08		
10% ml	1000	2,6E+03	9,4E+03	7,8E+05	2,8E+06	9,9E+05	6,0E+07	
	100	4,0E+02	3,9E+03	1,2E+06	1,2E+08			

Tabulka 13.10 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a *Rhodococcus* po 14.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		CFU/ml		φ CFU/ml	
			OT3	RHODO	OT3	RH	OT3	RHODO
14.DEN	0% č	1000	4,3E+01	6,5E+03	1,3E+04	1,9E+06	1,8E+04	1,1E+08
		100	8,0E+00	7,2E+03	2,4E+04	2,2E+08		
	0% ml	1000	9,6E+03	2,0E+04	2,9E+06	6,0E+06	1,1E+07	2,1E+08
		100	6,3E+03	1,4E+04	1,9E+07	4,2E+08		
	5% ml	1000	1,1E+04	2,0E+04	3,3E+06	6,0E+06	9,6E+06	1,4E+08
		100	5,3E+03	9,1E+03	1,6E+07	2,7E+08		
10% ml	1000	1,0E+04	1,9E+04	3,0E+06	5,6E+06	1,4E+07	1,6E+08	
	100	8,2E+03	1,0E+04	2,5E+07	3,1E+08			

Tabulka 13.11 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 28.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
28.DEN	0% č	1000	1,3E+01	7,0E+00	1,0E+01	3,0E+03	1,5E+03
		100	0	0	0	0	
	0% ml	1000	9,2E+03	0	4,6E+03	1,4E+06	3,4E+06
		100	3,5E+03	9,6E+01	1,8E+03	5,4E+06	
OT3	5% ml	1000	2,8E+02	2,8E+02	2,8E+02	8,3E+04	2,8E+06
		100	2,3E+01	3,6E+03	1,8E+03	5,4E+06	
	10% ml	1000	9,3E+03	1,2E+02	1,2E+02	3,7E+04	1,9E+04
		100	1,9E+03	0	0	0	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.12 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 28.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
28.DEN	0% č	1000	1,2E+04	4,5E+02	4,5E+02	1,4E+05	4,5E+05
		100	2,5E+03	2,6E+02	2,6E+02	7,7E+05	
	0% ml	1000	1,4E+04	6,8E+03	1,0E+04	3,0E+06	9,8E+06
		100	4,9E+03	6,1E+03	5,5E+03	1,7E+07	
RHODO	5% ml	1000	7,5E+03	7,5E+03	7,5E+03	2,2E+06	7,8E+06
		100	3,9E+03	5,0E+03	4,5E+03	1,3E+07	
	10% ml	1000	1,3E+04	7,2E+03	7,2E+03	2,2E+06	1,5E+06
		100	2,5E+03	2,7E+02	2,7E+02	8,2E+05	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.13 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 56.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
56.DEN	0% č	1000	1,3E+03	7,8E+02	7,9E+02	2,3E+05	1,1E+06
		100	7,1E+02	6,2E+02	6,6E+02	2,0E+06	
	0% ml	1000	1,2E+02	2,0E+02	1,6E+02	4,8E+04	1,5E+05
		100	1,3E+02	3,1E+01	8,2E+01	2,5E+05	
OT3	5% ml	1000	1,0E+03	1,4E+03	1,2E+03	3,6E+05	1,4E+06
		100	8,7E+02	7,3E+02	8,0E+02	2,4E+06	
	10% ml	1000	6,7E+02	5,3E+02	6,0E+02	1,8E+05	9,4E+05
		100	6,5E+02	4,8E+02	5,7E+02	1,7E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.14 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 56.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrae PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
56.DEN	0% č	1000	1,9E+03	2,7E+03	2,3E+03	6,8E+05	3,6E+06
		100	2,0E+03	2,3E+03	2,1E+03	6,4E+06	
	0% ml	1000	1,3E+03	1,3E+03	1,3E+03	3,9E+05	2,2E+06
		100	9,8E+02	1,7E+03	1,3E+03	4,0E+06	
RHODO	5% ml	1000	2,6E+03	2,8E+03	2,7E+03	8,1E+05	3,6E+06
		100	2,5E+03	1,8E+03	2,1E+03	6,3E+06	
	10% ml	1000	4,1E+03	2,3E+03	3,2E+03	9,6E+05	2,9E+06
		100	1,8E+03	1,5E+03	1,6E+03	4,8E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

### 3.2.4 Celkový časový přehled druhého pokusu

V tabulkách jsou shrnuty všechny výsledné hodnoty druhého pokusu.

Tabulka 13.15 Počet baterií kmene OT3 kultivované v lednici

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>21.DEN</b>	<b>56.DEN</b>
<b>0% PVA</b>	1,2E+06	1,8E+04	4,8E+04	2,0E+03	3,8E+05
<b>0% + ml PVA</b>	1,7E+06	8,0E+06	1,8E+07	1,5E+05	6,9E+05
<b>5% + ml PVA</b>	1,1E+06	2,2E+07	8,4E+06	4,0E+06	5,7E+05
<b>10% + ml PVA</b>	4,8E+06	5,0E+06	9,0E+06	4,5E+06	1,1E+06

Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.16 Počet baterií kmene *Rhodococcus* kultivované v lednici

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>21.DEN</b>	<b>56.DEN</b>
<b>0% PVA</b>	6,9E+06	2,1E+05	8,2E+07	2,5E+06	6,1E+05
<b>0% + ml PVA</b>	8,5E+06	1,0E+08	1,1E+08	6,4E+06	5,1E+06
<b>5% + ml PVA</b>	1,3E+07	2,4E+08	1,5E+08	1,1E+07	4,4E+06
<b>10% + ml PVA</b>	2,1E+07	3,1E+07	1,3E+08	1,2E+07	3,2E+06

Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.17 Počet baterií kmene OT3 kultivované při laboratorní teplotě

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>21.DEN</b>	<b>56.DEN</b>
<b>0% PVA</b>	3,8E+05	1,9E+04	1,8E+04	1,5E+03	1,1E+06
<b>0% + ml PVA</b>	4,1E+06	4,9E+06	1,1E+07	3,4E+06	1,5E+05
<b>5% + ml PVA</b>	4,5E+06	8,4E+06	9,6E+06	2,8E+06	1,4E+06
<b>10% + ml PVA</b>	9,3E+05	9,9E+05	1,4E+07	1,9E+04	9,4E+05

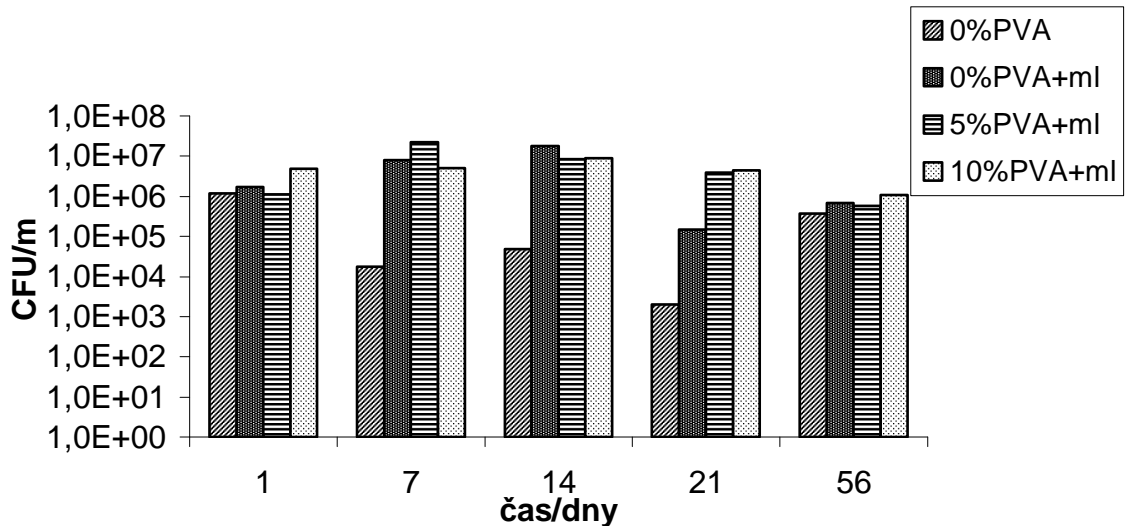
Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno; ml, přídavek mléka

Tabulka 13.18 Počet baterií kmene *Rhodococcus* kultivované při laboratorní teplotě

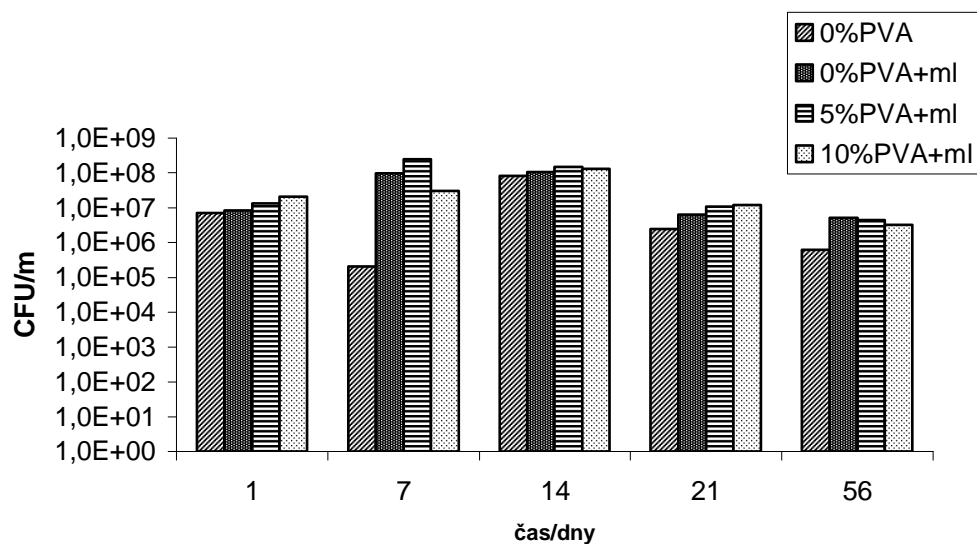
<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>21.DEN</b>	<b>56.DEN</b>
<b>0% PVA</b>	3,9E+06	4,8E+05	1,1E+08	4,5E+05	3,6E+06
<b>0% + ml PVA</b>	2,1E+07	2,3E+07	2,1E+08	9,8E+06	2,2E+06
<b>5% + ml PVA</b>	4,6E+07	1,1E+08	1,4E+08	7,8E+06	3,6E+06
<b>10% + ml PVA</b>	4,7E+07	6,0E+07	1,6E+08	1,5E+06	2,9E+06

Φ, průměrná hodnota; x, stanovení nebylo provedeno; ml, přídavek mléka

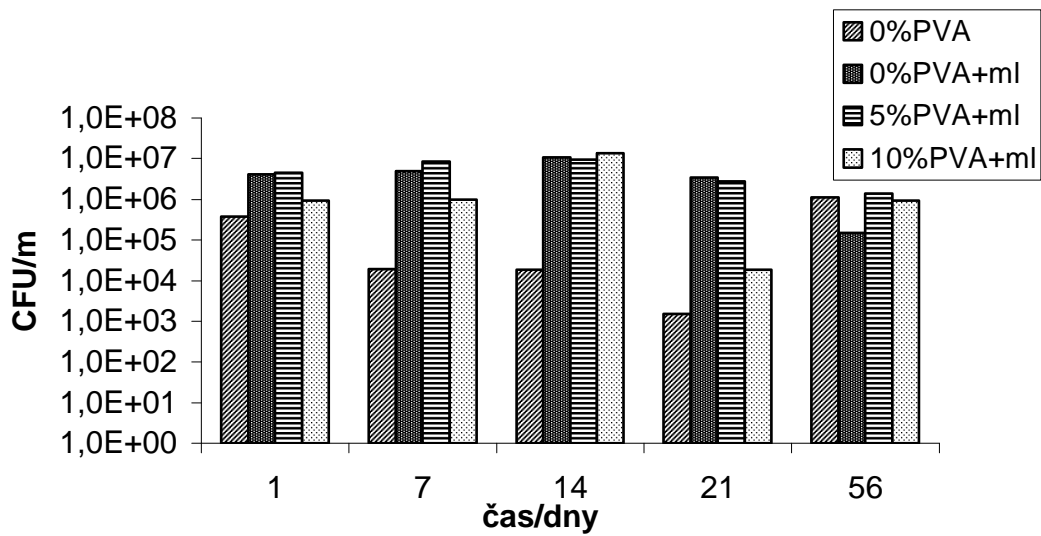
Grafické znázornění výsledků umožňuje rychlý přehled ochranného účinku sušeného mléka u II. pokusu. Už pouhým okem je patrné, bakterie v přítomnosti sušeného mléka snáší skladování ve vysušeném stavu mnohem lépe než v pokusu předcházejícím.



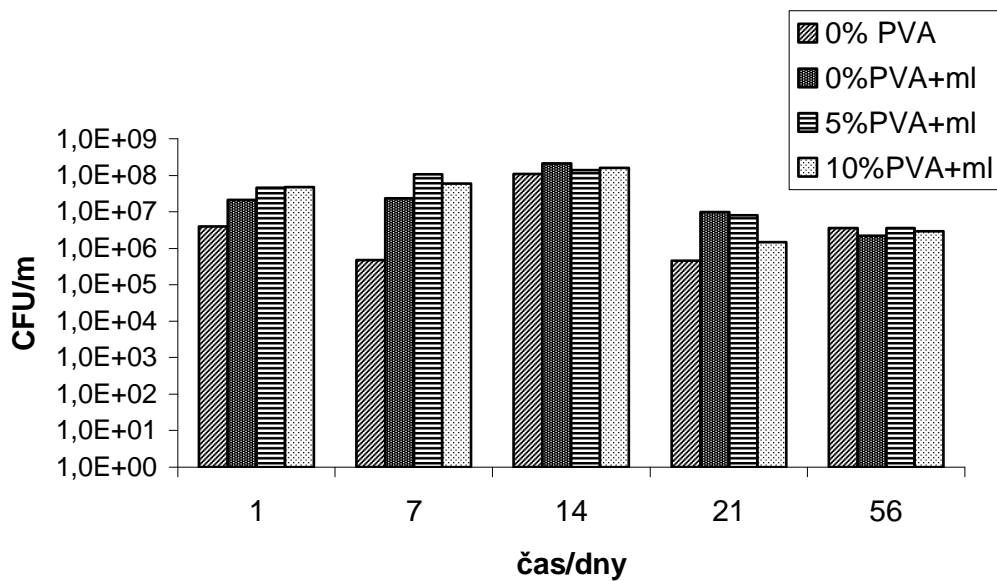
Obr. 9: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C. ml, přídavek sušeného mléka.



Obr. 10: Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C. ml, přídavek sušeného mléka.



Obr.11: Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C. ml, přídavek sušeného mléka.



Obr. 12: Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C. ml, přídavek sušeného mléka.

Výsledky tohoto pokusu jsou v rozporu s předcházejícím pokusem, proto v podstatě není možno vysledovat vliv přídavku PQQ či sušeného mléka, na přežívající bakterie.

V přežívání obou bakteriálních kmenů, ať už při teplotě 4°C nebo 25°C, nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl. Počet přežilých bakterií OT3 se nejčastěji pohyboval řádově kolem  $10^6 - 10^7$  v ml a u bakterií kmene *Rhodococcus* kolem  $10^8 - 10^7$  v ml. Může to být způsobeno nějakou experimentální chybou nebo jinými neznámými okolnostmi.



### 3.3 Pokus třetí – opakovaný pokus s PVA a sušeným mlékem

Třetí pokus jsme zahájili na základě výsledků získaných z obou předcházejících pokusů. V prvním i druhém pokusu vyšlo najevo, že jako nejvhodnější koncentrace PVA je 5%. Dále se potvrdilo, že přítomnost sušeného mléka má pro bakterie ochranný účinek a jejich počet značně vzrostl (viz příloha IV, V). Proto jsme pro tentokrát zvolili jen ty koncentrace, které se jevíly v obou pokusech jako nejúspěšnější, a to 5% roztok PVA a 10% roztok PVA a pro porovnání ještě 0% roztok PVA. Pokus byl sledován opět při laboratorní teplotě 25°C a teplotě lednice 4°C, po dobu jeden a půl měsíce v následujících časových intervalech: po prvním dnu, prvním týdnu, dvou týdnech, měsíci, a měsíci a půl. Postupovali jsme stejně jako u předcházejících pokusů.

Nejprve byla připravena v 500-ml láhvi bakteriální suspenze pro kultivace (1). Dále byly ve vialkách (2) připraveny bakteriální preparáty o nejvhodnějších koncentracích PVA, a to: 0%, 5% a 10% Tab.14

Tabulka 14: Množství jednotlivých složek potřebných na přípravu bakteriálních preparátů

<b>koncentrace PVA</b>	<b>navážka PVA (mg)</b>	<b>MM (ml)</b>
<b>0%</b>	0	5
<b>5%</b>	250	4,75
<b>10%</b>	500	4,5

Tabulka 15: Hodnoty pH použitých bakteriálních preparátů

<b>koncentrace PVA</b>	<b>0%</b>	<b>5%</b>	<b>10%</b>
<b>pH</b>	7,3	6,7	6,5

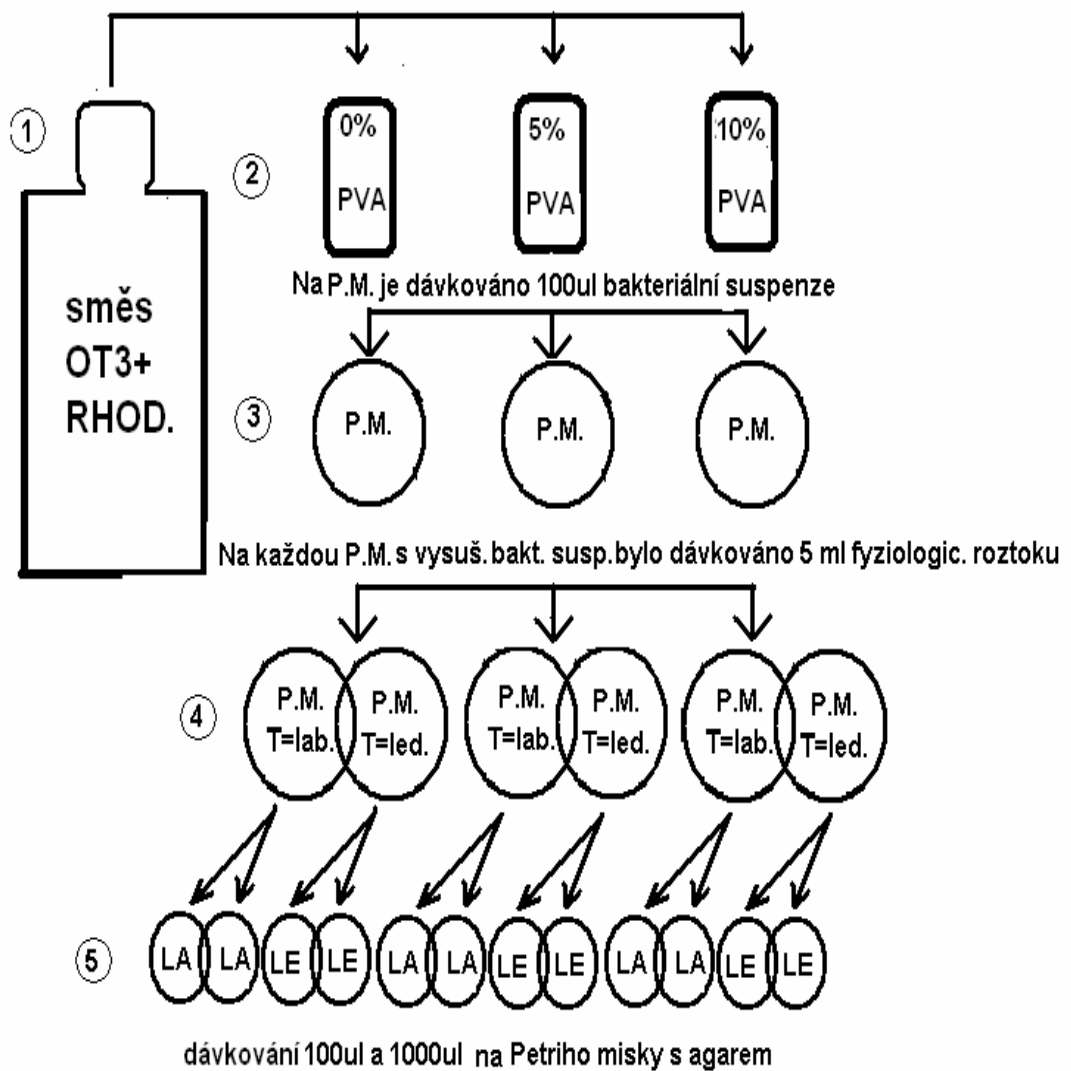
### **Příprava misek určených pro skladování vysušených bakteriálních preparátů s obsahem PVA**

Bylo připraveno 96 ks (32ks/na jednu koncentraci) prázdných Petriho misek (3), na nichž byly bakteriální preparáty (2) vysušeny. Další postup byl už stejný jako u pokusu I.

### **Stanovení počtu přežilých buněk**

V předem určených časových intervalech byly odebírány misky s vysušenými bakteriálními preparáty, v nichž byly stanoveny počty přežilých buněk.

Na 6 misek s vysušeným bakteriálním preparátem (4) bylo pipetováno 5 ml sterilního fyziologického roztoku. Na misky s agarem s PVA+PQQ+KA a s katalázou (5) bylo dávkováno 100 $\mu$ l a 1000 $\mu$ l vždy jednoho druhu rozpuštěného bakteriálního preparátu (4). Po vysušení v laminárním boxu byly misky opět skladovány při teplotě 30°C po dobu 7-9 dnů na závěr bylo spočítáno množství narostlých kolonií.



Obr. 13: Schéma přípravy bakteriální suspenze a vysévání na misky:

1, láhev o objemu 500 ml, ve které proběhla kultivace bakterií OT3+ *Rhodococcus*;

2, vialky obsahující bakteriální preparáty 0%-10% PVA ; 3, prázdné Petriho misky (P.M.), na které je dávkováno 100 µl vždy jednoho druhu bakteriálního preparátu; 4, P.M. s vysušeným bakteriálním preparátem. Na takto připravené misky bylo pipetováno 5ml sterilního fyz. roztoku.; 5, P.M. s agarem s PVA+PQQ+KA a s katalázou. Na ně je dávkováno 100 µl a 1000 µl bakteriálního preparátu (4). LA= laboratorní teplota,

LE = teplota v lednici

V návaznosti na druhý pokus byly připraveny stejné bakteriální preparáty o koncentracích 0% - 10% PVA a přidavkem sušeného odstředěného mléka. (Tab.16). Postup přípravy bakteriálních preparátů se nelišil od II. pokusu.

Tabulka 16: Množství jednotlivých složek potřebných na přípravu bakt. preparátů s obsahem sušeného mléka

koncentrace PVA	navážka PVA (mg)	MM (ml)	navážka sušeného mléka (mg)
0% + ml	250	4,75	1000
5% + ml	500	4,5	1000
10% + ml	1000	4	1000

ml, obsah mléka

Tabulka 17: Hodnoty pH použitých bakteriálních preparátů

koncentrace PVA	0% + ml	5% + ml	10% + ml
pH	6,7	6,4	6,2

ml, obsah mléka

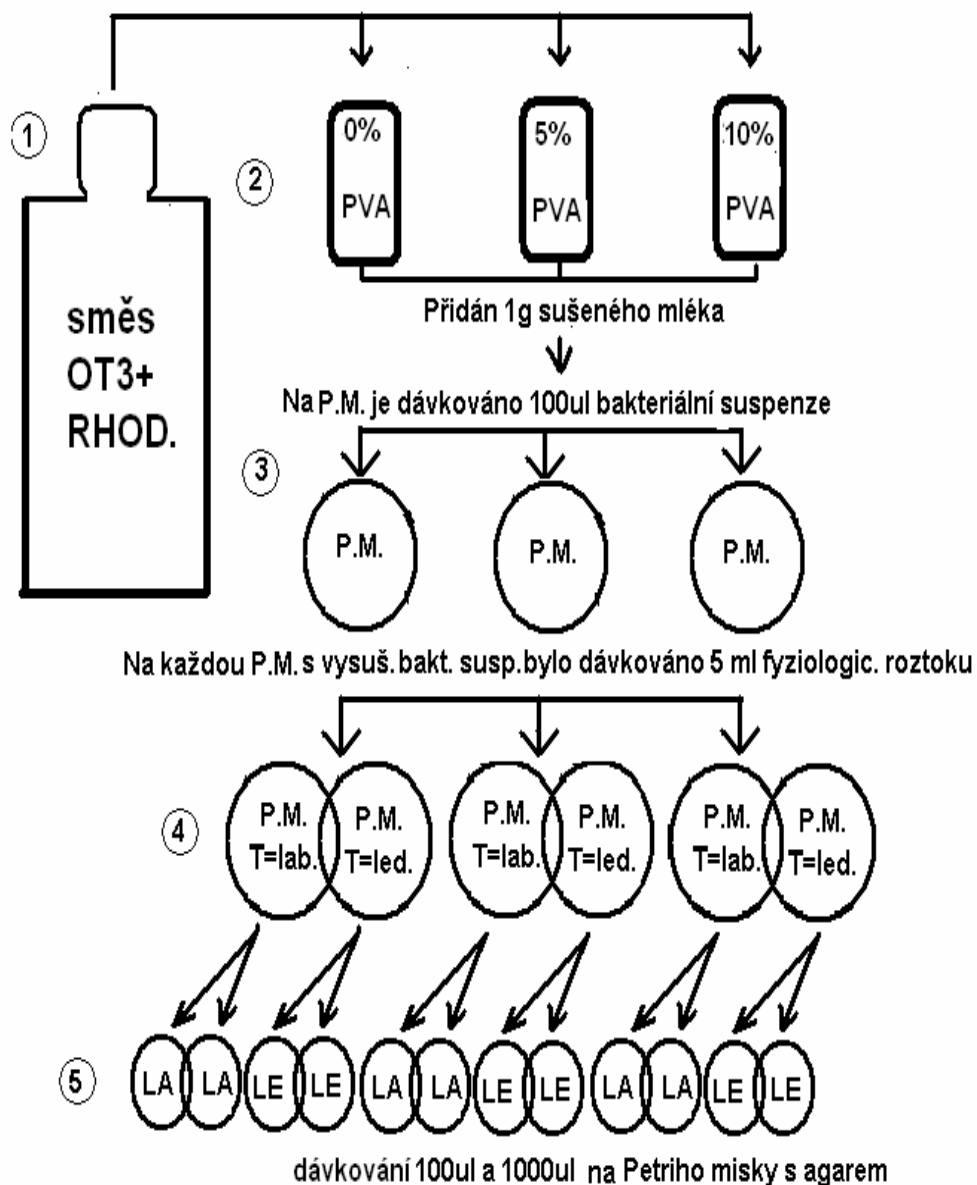
### **Příprava misek určených pro skladování vysušených bakteriálních preparátů s obsahem PVA a sušeného mléka**

Připravila jsem si 96 prázdných Petriho misek. Na jednu koncentraci tak připadlo 32 misek. Další postup byl už stejný jako u pokusu II.

### **Stanovení počtu přežilých buněk**

V předem určených časových intervalech byly odebírány misky s vysušenými bakteriálními preparáty, v nichž byly stanoveny počty přežilých buněk.

Bylo vybráno 6 misek s vysušenou bakteriální suspenzí (4), kam bylo pipetováno 5 ml sterilního fyziologického roztoku. Na misky s agarem s PVA+PQQ+KA a s katalázou (5) se dávkovalo tentokrát 10 $\mu$ l a 100 $\mu$ l, vždy jednoho druhu rozpuštěného bakteriálního preparátu (4). Toto množství jsme na základě pokusu II zmenšili, z důvodu přesnějšího počítání velkého množství narostlých kolonií. Misky pak byly skladovány při teplotě 30°C po dobu 7-9 a na závěr bylo spočítáno množství narostlých kolonií.



Obr 14: Schéma postupu přípravy bakteriálních suspenzí s přidavkem sušeného mléka : **1**, láhev o objemu 500 ml, ve které proběhla kultivace bakterií OT3+ *Rhodococcus*; **2**, vialky obsahující bakteriální preparáty 0%-10% PVA s 1g sušeného mléka; **3**, prázdné Petriho misky(P.M.), na které je dávkováno 100 µl vždy jednoho druhu druhu bakteriálního preparátu (2); **4**. P.M. s vysušeným bakteriálním preparátem, na které bylo pipetováno 5ml fyz. roztoku; **5**. P.M. s agarem s PVA+PQQ+KA na ně je dávkováno 10 µl a 100 µl bakteriálního preparátu (4).

### 3.3.1 Počáteční počty kolonií

Tyto hodnoty byly získány na počátku třetího pokusu. Zjištěné koncentrace bakterií ve vstupní bakteriální suspenzi je stejné pro oba druhy bakteriálních preparátů III. pokusu.

Tabulka 18: Počáteční počty bakteriálního kmene OT3

Počet kolonií OT3	Ředění 10 <sup>+5</sup>		Ředění 10 <sup>+6</sup>	
	2,0E+03	2,4E+03	1,3E+02	1,3E+02
CFU/ml OT3	2,0E+09	2,4E+09	1,3E+09	1,3E+09
ΦCFU/ml OT3	2,2E+09		1,3E+09	

Průměrný počet bakterií kmene OT3 na počátku pokusu byl stanoven na  $1,3 \cdot 10^9$

Tabulka 19: Počáteční počty bakteriálního kmene *Rhodococcus*

Počet kolonií RHODO	Ředění 10 <sup>+5</sup>		Ředění 10 <sup>+6</sup>	
	1,4E+01	1,8E+01	1,0E+00	0,0E+00
CFU/ml RHODO	1,4E+07	1,8E+07	1,0E+07	0,0E+00
ΦCFU/ml RHODO	1,6E+07		5,0E+06	

Průměrný počet bakterií kmene *Rhodococcus* na počátku pokusu byl stanoven na  $1,6 \cdot 10^7$

### 3.3.2 Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a *Rhodococcus*, které byly uskladněny v lednici

V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky získané při zjišťování počtu přežilých bakterií obou kmenů. Získané hodnoty v tabulkách uvádí, jak velký ochranný účinek měl PVA pro přežití bakterií v uvedených časových intervalech, při dvou teplotách 4°C a 25°C.

Tabulka 20.1 Vyhodnocení přežití kmene OT3 bezprostředně po manipulaci

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
1.DEN	0%	1000	4,5E+02	7,2E+02	5,9E+02	1,8E+05	3,0E+05
		100	2,2E+02	6,2E+01	1,4E+02	4,2E+05	
OT3	5%	1000	4,4E+03	4,3E+03	4,4E+03	1,3E+06	1,6E+06
		100	1,7E+01	6,1E+02	6,1E+02	1,8E+06	
	10%	1000	9,6E+01	1,0E+02	9,9E+01	3,0E+04	3,4E+04
		100	1,3E+01	4,0E+00	1,3E+01	3,9E+04	

Tabulka 20.2 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* bezprostředně po manipulaci

DNY počet	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
1.DEN	0%	1000	6,4E+02	9,7E+02	8,0E+02	2,4E+05	4,2E+05
		100	2,5E+02	1,5E+02	2,0E+02	6,0E+05	
RHODO	5%	1000	4,8E+03	1,7E+03	1,7E+03	5,2E+05	1,4E+06
		100	7,4E+02	7,8E+02	7,6E+02	2,3E+06	
	10%	1000	2,5E+03	2,8E+03	2,6E+03	7,9E+05	2,2E+06
		100	1,3E+03	1,1E+03	1,2E+03	3,5E+06	

φ, průměrná hodnota

Tabulka 20.3 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 7.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
7.DEN	0%	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
OT3	5%	1000	3,0E+03	5,4E+03	4,2E+03	1,3E+06	4,1E+06
		100	3,0E+03	1,6E+03	2,3E+03	6,8E+06	
	10%	1000	2,3E+03	6,7E+02	1,5E+03	4,4E+05	1,1E+06
		100	1,0E+03	1,3E+02	5,7E+02	1,7E+06	

Tabulka 20.4 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 7.dnu uskladnění při T= 4°C

DNY počet	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
7.DEN	0%	1000	3,1E+03	1,3E+03	2,2E+03	6,5E+05	5,9E+05
		100	1,8E+02	2,9E+01	1,8E+02	5,4E+05	
RHODO	5%	1000	2,9E+03	4,6E+03	3,8E+03	1,1E+06	1,0E+06
		100	3,1E+02	3,2E+02	3,1E+02	9,4E+05	
	10%	1000	2,4E+03	2,1E+03	2,3E+03	6,8E+05	8,9E+05
		100	3,7E+02	3,6E+02	3,7E+02	1,1E+06	

φ, průměrná hodnota

Tabulka 20.5 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 14.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
14.DEN	0%	1000	3,2E+02	7,4E+01	7,4E+01	2,2E+04	4,4E+04
		100	9,5E+01	2,2E+01	2,2E+01	6,6E+04	
OT3	5%	1000	1,6E+03	1,5E+03	1,6E+03	4,8E+05	1,3E+06
		100	7,4E+02	6,9E+02	7,2E+02	2,1E+06	
	10%	1000	5,0E+02	1,0E+03	7,6E+02	2,3E+05	5,9E+05
		100	3,3E+02	3,0E+02	3,2E+02	9,5E+05	

Tabulka 20.6 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 14.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
14.DEN	0%	1000	1,5E+03	1,2E+02	1,2E+02	3,6E+04	3,9E+04
		100	9,7E+01	1,4E+01	1,4E+01	4,2E+04	
RHODO	5%	1000	1,0E+03	8,9E+02	9,4E+02	2,8E+05	4,8E+05
		100	2,5E+02	2,0E+02	2,3E+02	6,8E+05	
	10%	1000	7,9E+02	3,7E+02	5,8E+02	1,7E+05	8,3E+05
		100	5,0E+02	4,8E+02	4,9E+02	1,5E+06	

Φ, průměrná hodnota

Tabulka 20.7 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 28.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
28.DEN	0%	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
OT3	5%	1000	2,3E+02	3,1E+02	2,7E+02	8,1E+04	5,3E+05
		100	3,5E+02	3,1E+02	3,3E+02	9,9E+05	
	10%	1000	1,7E+02	2,3E+02	2,0E+02	6,0E+04	6,3E+05
		100	4,5E+02	3,5E+02	4,0E+02	1,2E+06	

Tabulka 20.8 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 28.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
28.DEN	0%	1000	2,7E+02	3,5E+02	3,1E+02	9,3E+04	3,2E+05
		100	6,7E+01	9,0E+01	1,8E+02	5,4E+05	
RHODO	5%	1000	7,8E+02	6,0E+02	6,9E+02	2,1E+05	7,3E+05
		100	3,4E+02	5,0E+02	4,2E+02	1,3E+06	
	10%	1000	5,1E+02	6,6E+02	5,8E+02	1,8E+05	6,5E+05
		100	3,9E+02	3,6E+02	3,8E+02	1,1E+06	

Φ, průměrná hodnota



Tabulka 20.9 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 39.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
39.DEN	0%	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
OT3	5%	1000	5,3E+02	2,5E+02	3,9E+02	1,2E+05	4,7E+05
		100	2,5E+02	3,0E+02	2,8E+02	8,3E+05	
	10%	1000	4,5E+02	3,2E+02	3,9E+02	1,2E+05	2,6E+05
		100	1,2E+02	1,6E+02	1,4E+02	4,1E+05	

Tabulka 20.10 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 39.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
39.DEN	0%	1000	7,8E+01	8,2E+01	8,0E+01	2,4E+04	6,9E+04
		100	3,6E+01	4,0E+01	3,8E+01	1,1E+05	
RHODO	5%	1000	1,0E+03	3,3E+02	6,6E+02	2,0E+05	6,5E+05
		100	3,2E+02	4,1E+02	3,6E+02	1,1E+06	
	10%	1000	1,7E+03	1,2E+03	1,5E+03	4,4E+05	4,7E+05
		100	1,4E+02	2,0E+02	1,7E+02	5,1E+05	

Φ, průměrná hodnota

### 3.3.3 Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a *Rhodococcus*, které byly uskladněny při laboratorní teplotě 25°C

Tabulka 20.11 Vyhodnocení přežití kmene OT3 bezprostředně po uskladnění

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
1.DEN	0%	1000	1,8E+03	1,9E+03	1,9E+03	5,6E+05	1,1E+06
		100	6,3E+02	5,2E+02	5,7E+02	1,7E+06	
OT3	5%	1000	3,9E+03	3,8E+03	3,8E+03	1,1E+06	3,0E+06
		100	1,9E+03	1,3E+03	1,6E+03	4,8E+06	
	10%	1000	2,3E+03	1,9E+03	2,1E+03	6,3E+05	2,1E+06
		100	1,1E+03	1,3E+03	1,2E+03	3,6E+06	

Tabulka 20.12 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* bezprostředně po uskladnění

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
1.DEN	0%	1000	2,8E+03	3,0E+03	2,9E+03	8,7E+05	2,5E+06
		100	1,7E+03	1,1E+03	1,4E+03	4,1E+06	
RHODOC	5%	1000	3,0E+03	3,1E+03	3,1E+03	9,2E+05	2,0E+06
		100	1,0E+03	9,9E+02	1,0E+03	3,0E+06	
	10%	1000	2,0E+03	1,8E+03	1,9E+03	5,7E+05	2,2E+06
		100	1,3E+03	1,3E+03	1,3E+03	3,9E+06	

Φ, průměrná hodnota

Tabulka 20.13 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 7.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
7.DEN	0%	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
OT3	5%	1000	5,4E+01	2,0E+00	2,8E+01	8,4E+03	3,6E+04
		100	2,3E+01	2,0E+01	2,2E+01	6,5E+04	
	10%	1000	1,5E+03	1,5E+03	1,5E+03	4,5E+05	5,1E+05
		100	1,4E+02	2,4E+02	1,9E+02	5,7E+05	

Tabulka 20.14 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 7.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
7.DEN	0%	1000	2,4E+02	1,5E+01	1,3E+02	3,8E+04	1,8E+05
		100	1,8E+02	3,7E+01	1,1E+02	3,3E+05	
RHODOC	5%	1000	1,5E+03	1,3E+03	1,4E+03	4,2E+05	1,8E+06
		100	9,4E+02	1,1E+03	1,0E+03	3,1E+06	
	10%	1000	2,1E+03	2,3E+03	2,2E+03	6,6E+05	1,7E+06
		100	1,2E+03	5,8E+02	9,0E+02	2,7E+06	

Φ, průměrná hodnota

Tabulka 20.15 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 14.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
14.DEN	0%	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
OT3	5%	1000	5,9E+02	2,5E+02	4,2E+02	1,3E+05	1,6E+05
		100	3,2E+01	9,8E+01	6,5E+01	2,0E+05	
	10%	1000	2,1E+01	1,2E+01	1,7E+01	5,0E+03	1,3E+04
		100	1,1E+01	3,0E+00	7,0E+00	2,1E+04	

Tabulka 20.16 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 14.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
14.DEN	0%	1000	3,5E+03	8,0E+01	3,5E+03	1,1E+06	5,4E+05
		100	6,0E+00	8,0E+00	7,0E+00	2,1E+04	
RHODOC	5%	1000	1,5E+03	2,7E+03	2,1E+03	6,3E+05	8,9E+05
		100	3,5E+02	4,2E+02	3,9E+02	1,2E+06	
	10%	1000	1,3E+03	1,4E+03	1,3E+03	4,0E+05	6,1E+05
		100	2,5E+02	2,9E+02	2,7E+02	8,1E+05	

Φ, průměrná hodnota

Tabulka 20.17 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 28.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
28.DEN	0%	1000	2,7E+01	3,1E+01	2,9E+01	8,7E+03	2,8E+04
		100	1,3E+01	1,9E+01	1,6E+01	4,8E+04	
OT3	5%	1000	0	1,0E+00	5,0E-01	1,5E+02	1,6E+03
		100	2,0E+00	0,0E+00	1,0E+00	3,0E+03	
	10%	1000	0	2,0E+00	1,0E+00	3,0E+02	3,2E+03
		100	4,0E+00	0,0E+00	2,0E+00	6,0E+03	

Tabulka 20.18 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 28.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
28.DEN	0%	1000	7,4E+02	6,9E+02	7,2E+02	2,1E+05	3,8E+05
		100	1,3E+02	2,5E+02	1,8E+02	5,4E+05	
RHODOC	5%	1000	1,1E+03	1,1E+03	1,1E+03	3,3E+05	6,0E+05
		100	2,2E+02	3,6E+02	2,9E+02	8,7E+05	
	10%	1000	7,5E+02	8,5E+02	8,0E+02	2,4E+05	7,4E+05
		100	4,6E+02	3,6E+02	4,1E+02	1,2E+06	

Φ, průměrná hodnota

Tabulka 20.19 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 39.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
39.DEN	0%	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
OT3	5%	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	
	10%	1000	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	

Tabulka 20.20 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 39.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
39.DEN	0%	1000	2,7E+01	3,4E+01	3,1E+01	9,2E+03	1,2E+04
		100	6,0E+00	4,0E+00	5,0E+00	1,5E+04	
RHODOC	5%	1000	6,3E+02	5,2E+02	5,8E+02	1,7E+05	5,7E+05
		100	3,0E+02	3,5E+02	3,2E+02	9,7E+05	
	10%	1000	1,0E+03	9,8E+02	1,0E+03	3,0E+05	5,8E+05
		100	3,2E+02	2,5E+02	2,9E+02	8,6E+05	

Φ, průměrná hodnota

### 3.3.4 Celkový časový přehled třetího pokusu

Následující tabulky slouží pro přehlednost nejdůležitějších hodnot III. pokusu získaných během průběhu mého pozorování

Tabulka 20.21 Počet bakterií kmene OT3 (CFU/ml) kultivovaných v lednici

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>28.DEN</b>	<b>39.DEN</b>
0% PVA	3,0E+05	0,0E+00	4,4E+04	0,0E+00	0,0E+00
5% PVA	1,6E+06	4,1E+06	1,3E+06	5,3E+05	4,7E+05
10% PVA	3,4E+04	1,1E+06	5,9E+05	6,3E+05	2,6E+05

Tabulka 20.22 Počet bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) kultivované v lednici

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>28.DEN</b>	<b>39.DEN</b>
0% PVA	4,2E+05	5,9E+05	3,9E+04	3,2E+05	6,9E+04
5% PVA	1,4E+06	1,0E+06	4,8E+05	7,3E+05	6,5E+05
10% PVA	2,2E+06	8,9E+05	8,3E+05	6,5E+05	4,7E+05

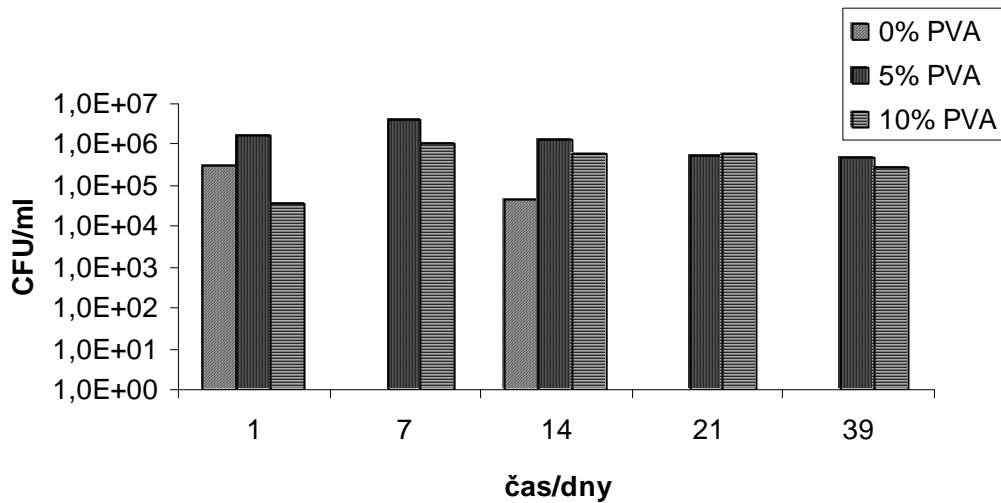
Tabulka 20.23 Počet bakterií kmene OT3 (CFU/ml) kultivované při laboratorní teplotě

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>28.DEN</b>	<b>39.DEN</b>
0% PVA	1,1E+06	0,0E+00	0,0E+00	2,8E+04	0,0E+00
5% PVA	3,0E+06	3,6E+04	1,6E+05	1,6E+03	0,0E+00
10% PVA	2,1E+06	5,1E+05	1,3E+04	3,2E+03	0,0E+00

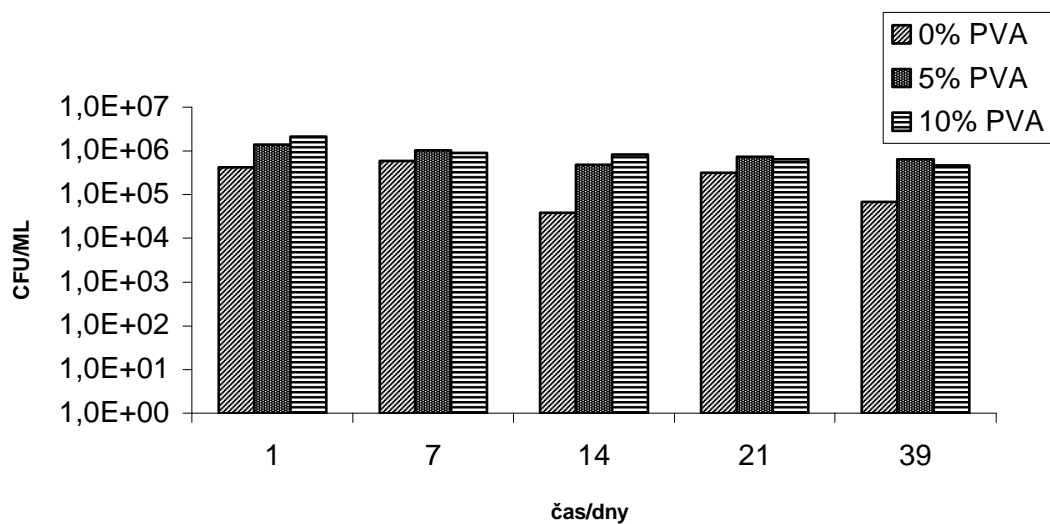
Tabulka 20.24 Počet bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) kultivované při laboratorní teplotě

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>28.DEN</b>	<b>39.DEN</b>
0% PVA	2,5E+06	1,8E+05	5,4E+05	3,8E+05	1,2E+04
5% PVA	2,0E+06	1,8E+06	8,9E+05	6,0E+05	5,7E+05
10% PVA	2,2E+06	1,7E+06	6,1E+05	7,4E+05	5,8E+05

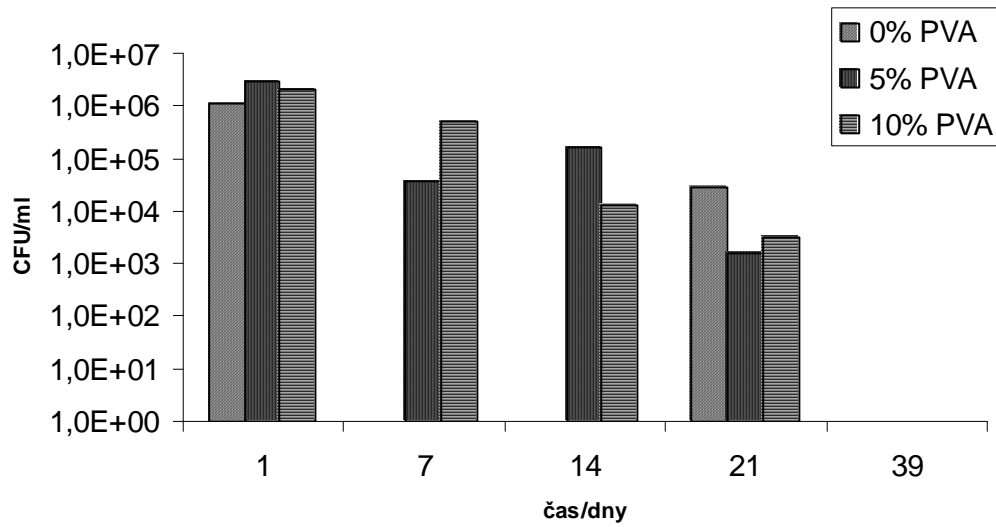
Níže uvedené grafy slouží pro rychlou orientaci v počtech přežilých bakterií obou kmenů III. pokusu:



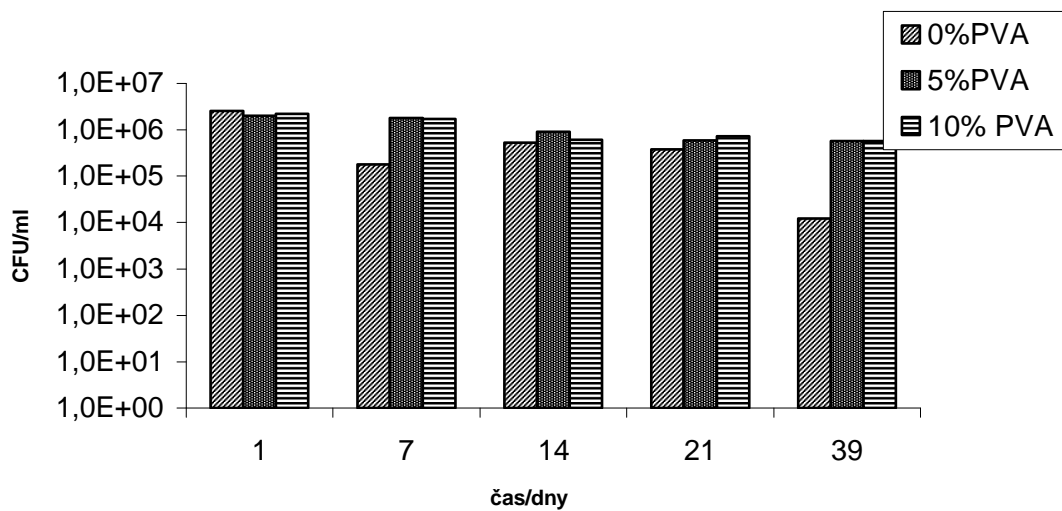
Obr. 15: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C



Obr. 16: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C



Obr.17: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C



Obr. 18: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C

Na základě těchto výsledků se potvrdilo, že má PVA ochranný vliv pro přežívání bakterií kmene OT3 ve vysušeném stavu, což se projevilo i v prvním pokusu

U bakteriálních preparátů bez přídavku PVA, které byly skladovány při teplotě 4°C, došlo k vymizení bakterií OT3 asi po 20 dnech skladování. Ještě výraznější vymizení této bakterie se projevilo při teplotě 25°C, kde počet přežilých bakterií na ml klesl z hodnoty  $1,1 \cdot 10^6$  na 0, a to už po týdenním skladování. Poněkud matoucí je výsledek ve 21. dnu, kdy se bakterie kmene OT3 náhodně objevily.

Překvapivé je, že ve 39. dnu skladování vysušených preparátů při teplotě 25°C, nebyly nalezeny žádné bakterie kmene OT3. Aby se potvrdilo, že se nejedná o náhodnou experimentální chybu, pokusím se ještě stanovení opakovat. Bohužel už výsledky stanovení nebudou do diplomové práce z časových důvodů doplněny.

Bakterie kmene *Rhodococcus* přežívaly ve větších a stabilnějších počtech, a tím se potvrzuje fakt, že Gram-pozitivní organismy přežívají vysušení lépe. Z dostupných výsledků plyne, že by mohl mít PVA, při dlouhodobém skladování, ochranný efekt i na bakterie kmene *Rhodococcus*.

### 3.3.5 Počty narostlých kolonií bakteriálních kmenů OT3 a *Rhodococcus* III. pokusu s přídatkem sušeného mléka, které byly uskladněny v lednici při 4°C

V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky získané při zjišťování počtu přežilých bakterií obou kmenů. Získané hodnoty v tabulkách uvádí, jak velký ochranný účinek měl přídatkem sušeného mléka na přežilé bakterie v uvedených časových intervalech, při dvou teplotách 4°C a 25°C.

Tabulka 21.1 Vyhodnocení přežití kmene OT3 bezprostředně po uskladnění

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
1.DEN	0% ml	100	9,7E+02	8,9E+02	9,3E+02	2,8E+07	1,8E+07
		10	3,0E+03	2,3E+03	2,6E+03	7,9E+06	
OT3	5% ml	100	9,3E+02	7,8E+01	5,0E+02	1,5E+07	1,1E+07
		10	2,1E+03	2,2E+03	2,1E+03	6,3E+06	
	10% ml	100	3,2E+01	1,4E+02	8,6E+01	2,6E+06	2,1E+06
		10	5,6E+02	4,6E+02	5,1E+02	1,5E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídatkem mléka

Tabulka 21.2 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* bezprostředně po uskladnění

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
1.DEN	0% ml	100	6,5E+02	7,5E+02	7,0E+02	2,1E+07	1,4E+07
		10	2,7E+03	1,5E+03	2,1E+03	6,3E+06	
RHODO	5% ml	100	5,6E+02	4,3E+02	5,0E+02	1,5E+07	1,2E+07
		10	2,9E+03	3,0E+03	2,9E+03	8,8E+06	
	10% ml	100	2,1E+03	4,5E+02	1,3E+03	3,8E+07	2,1E+07
		10	2,1E+03	1,4E+03	1,7E+03	5,2E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídatkem mléka

Tabulka 21.3 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 7.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
7.DEN	0% ml	100	1,0E+00	6,4E+02	6,4E+02	1,9E+07	1,0E+07
		10	3,7E+02	4,4E+02	4,1E+02	1,2E+06	
OT3	5% ml	100	2,9E+03	1,0E+03	2,0E+03	5,9E+07	3,4E+07
		10	3,1E+03	3,1E+03	3,1E+03	9,4E+06	
	10% ml	100	2,7E+03	1,8E+03	2,2E+03	6,7E+07	4,0E+07
		10	4,3E+03	4,1E+03	4,2E+03	1,3E+07	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídatkem mléka



Tabulka 21.4 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 7.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
7.DEN	0% ml	100	1,1E+02	8,0E+02	4,6E+02	1,4E+07	1,3E+07
		10	3,9E+03	4,6E+03	4,3E+03	1,3E+07	
RHODO	5% ml	100	8,7E+02	8,9E+02	8,8E+02	2,6E+07	1,4E+07
		10	8,8E+02	8,8E+02	8,8E+02	2,6E+06	
	10% ml	100	1,3E+03	2,0E+03	1,7E+03	5,0E+07	2,8E+07
		10	2,1E+03	2,2E+03	2,1E+03	6,4E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.5 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 14.dnu uskladnění při T= 4°C

DNY počet	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
14.DEN	0% ml	100	7,4E+02	3,2E+02	5,3E+02	1,6E+07	1,0E+07
		10	2,0E+03	1,2E+03	1,6E+03	4,8E+06	
OT3	5% ml	100	5,7E+02	6,6E+02	6,1E+02	1,8E+07	1,0E+07
		10	8,1E+02	8,9E+02	8,5E+02	2,5E+06	
	10% ml	100	5,0E+02	7,5E+02	6,3E+02	1,9E+07	1,1E+07
		10	1,0E+03	7,9E+02	9,1E+02	2,7E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.6 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 14.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
14.DEN	0% ml	100	9,0E+02	1,1E+03	1,0E+03	3,0E+07	1,9E+07
		10	2,7E+03	2,5E+03	2,6E+03	7,8E+06	
RHODO	5% ml	100	1,5E+03	1,3E+03	1,4E+03	4,1E+07	2,7E+07
		10	3,6E+03	4,8E+03	4,2E+03	1,3E+07	
	10% ml	100	3,4E+03	2,3E+03	2,8E+03	8,5E+07	4,5E+07
		10	9,2E+02	2,2E+03	1,6E+03	4,7E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.7 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 28.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
28.DEN	0% ml	100	7,4E+02	3,2E+02	5,3E+02	1,6E+07	1,1E+07
		10	2,0E+03	1,4E+03	1,7E+03	5,1E+06	
OT3	5% ml	100	1,1E+03	5,0E+02	7,9E+02	2,4E+07	1,3E+07
		10	7,5E+02	7,9E+02	7,7E+02	2,3E+06	
	10% ml	100	5,7E+02	6,6E+02	6,1E+02	1,8E+07	1,0E+07
		10	8,9E+02	6,7E+02	7,8E+02	2,3E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.8 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 28.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
28.DEN	0% ml	100	9,0E+02	6,4E+02	7,7E+02	2,3E+07	1,5E+07
		10	2,7E+03	1,8E+03	2,2E+03	6,7E+06	
RHODO	5% ml	100	1,1E+03	1,9E+03	1,5E+03	4,5E+07	2,6E+07
		10	2,3E+03	2,2E+03	2,2E+03	6,7E+06	
	10% ml	100	1,6E+03	1,3E+03	1,4E+03	4,3E+07	2,7E+07
		10	4,0E+03	3,6E+03	3,8E+03	1,1E+07	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.9 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 56.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
56.DEN	0% ml	100	5,3E+02	5,7E+02	5,5E+02	1,7E+07	1,4E+07
		10	4,2E+03	4,0E+03	4,1E+03	1,2E+07	
OT3	5% ml	100	1,1E+03	1,2E+03	1,1E+03	3,4E+07	2,0E+07
		10	1,9E+03	1,8E+03	1,8E+03	5,5E+06	
	10% ml	100	1,5E+03	1,5E+03	1,5E+03	4,5E+07	2,8E+07
		10	3,8E+03	3,5E+03	3,7E+03	1,1E+07	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.10 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 56.dnu uskladnění při T= 4°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
56.DEN	0% ml	100	3,4E+02	4,2E+02	3,8E+02	1,1E+07	7,9E+06
		10	1,6E+03	1,4E+03	1,5E+03	4,5E+06	
RHODO	5% ml	100	3,5E+02	4,8E+02	4,2E+02	1,2E+07	7,0E+06
		10	5,1E+02	5,4E+02	5,3E+02	1,6E+06	
	10% ml	100	2,4E+02	4,5E+02	3,5E+02	1,0E+07	6,2E+06
		10	6,5E+02	6,8E+02	6,7E+02	2,0E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

## 3.3.6 Počet narostlých kolonií, které byly uskladněny při laboratorní teplotě 25°C

Tabulka 21.11 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 1.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
1.DEN	0% ml	100	2,3E+02	3,5E+02	2,9E+02	8,7E+06	6,1E+06
		10	3,3E+02	2,1E+03	1,2E+03	3,6E+06	
OT3	5% ml	100	1,3E+03	1,3E+03	1,3E+03	3,8E+07	2,3E+07
		10	2,8E+03	2,6E+03	2,7E+03	8,1E+06	
	10% ml	100	3,1E+02	7,1E+02	5,1E+02	1,5E+07	1,0E+07
		10	1,6E+03	1,6E+03	1,6E+03	4,8E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.12 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 1.dnu uskladnění při T= 25°C

DNY počet	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
1.DEN	0% ml	100	2,0E+02	3,6E+02	2,8E+02	8,4E+06	6,7E+06
		10	1,6E+03	1,7E+03	1,6E+03	4,9E+06	
RHODO	5% ml	100	1,9E+03	2,2E+03	2,1E+03	6,2E+07	3,4E+07
		10	2,0E+03	1,8E+03	1,9E+03	5,6E+06	
	10% ml	100	1,5E+03	8,1E+02	1,2E+03	3,5E+07	2,0E+07
		10	1,4E+03	2,1E+03	1,7E+03	5,2E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.13 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 7.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
7.DEN	0% ml	100	7,9E+02	8,3E+02	8,1E+02	2,4E+07	1,7E+07
		10	3,1E+03	2,8E+03	3,0E+03	8,9E+06	
OT3	5% ml	100	1,2E+03	2,1E+03	1,6E+03	4,9E+07	2,7E+07
		10	1,7E+03	1,9E+03	1,8E+03	5,3E+06	
	10% ml	100	8,8E+02	1,1E+03	1,0E+03	3,0E+07	1,8E+07
		10	1,7E+03	1,9E+03	1,8E+03	5,5E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.14 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 7.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
7.DEN	0% ml	100	8,9E+02	9,2E+02	9,1E+02	2,7E+07	1,5E+07
		10	8,9E+02	6,7E+02	7,8E+02	2,3E+06	
RHODO	5% ml	100	6,8E+02	3,5E+02	5,2E+02	1,5E+07	1,1E+07
		10	2,7E+03	2,3E+03	2,5E+03	7,5E+06	
	10% ml	100	1,6E+03	1,7E+03	1,7E+03	5,0E+07	3,0E+07
		10	3,7E+03	3,4E+03	3,5E+03	1,1E+07	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.15 Vyhodnocení přežití kmene po 14.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
14.DEN	0% ml	100	5,8E+02	3,2E+02	4,5E+02	1,4E+07	7,5E+06
		10	6,5E+02	3,6E+02	5,1E+02	1,5E+06	
OT3	5% ml	100	5,6E+02	4,4E+02	5,0E+02	1,5E+07	8,4E+06
		10	7,8E+02	5,0E+02	6,4E+02	1,9E+06	
	10% ml	100	3,1E+02	4,0E+02	3,6E+02	1,1E+07	6,1E+06
		10	4,8E+02	5,4E+02	5,1E+02	1,5E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.16 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 14.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
14.DEN	0% ml	100	1,8E+02	4,5E+02	3,2E+02	9,5E+06	6,5E+06
		10	1,1E+03	1,3E+03	1,2E+03	3,5E+06	
RHODO	5% ml	100	1,9E+03	2,1E+03	2,0E+03	6,0E+07	3,5E+07
		10	3,5E+03	4,0E+03	3,7E+03	1,1E+07	
	10% ml	100	1,1E+03	1,5E+03	1,3E+03	3,8E+07	2,3E+07
		10	2,9E+03	3,1E+03	3,0E+03	8,9E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.17 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 28.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
28.DEN	0% ml	100	5,8E+02	4,5E+02	5,2E+02	1,6E+07	8,6E+06
		10	6,5E+02	5,2E+02	5,9E+02	1,8E+06	
OT3	5% ml	100	5,6E+02	6,9E+02	6,2E+02	1,9E+07	1,1E+07
		10	7,3E+02	8,0E+02	7,6E+02	2,3E+06	
	10% ml	100	3,1E+02	4,3E+02	3,7E+02	1,1E+07	6,3E+06
		10	4,5E+02	5,0E+02	4,8E+02	1,4E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.18 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 28.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
28.DEN	0% ml	100	1,8E+02	3,6E+02	2,7E+02	8,2E+06	6,0E+06
		10	1,1E+03	1,5E+03	1,3E+03	3,8E+06	
RHODO	5% ml	100	1,9E+03	1,7E+03	1,8E+03	5,5E+07	3,2E+07
		10	3,5E+03	2,7E+03	3,1E+03	9,3E+06	
	10% ml	100	1,1E+03	1,3E+03	1,2E+03	3,5E+07	2,0E+07
		10	2,2E+03	1,9E+03	2,0E+03	6,0E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.19 Vyhodnocení přežití kmene OT3 po 56.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet OT3	CFU/ml OT3	φ CFU/ml OT3
			OT3	OT3			
56.DEN	0% ml	100	9,4E+02	1,0E+03	9,8E+02	2,9E+07	1,9E+07
		10	3,2E+03	3,0E+03	3,1E+03	9,3E+06	
OT3	5% ml	100	1,1E+03	1,0E+03	1,1E+03	3,2E+07	2,2E+07
		10	4,0E+03	4,1E+03	4,1E+03	1,2E+07	
	10% ml	100	1,2E+03	1,1E+03	1,2E+03	3,5E+07	2,0E+07
		10	2,1E+03	2,0E+03	2,0E+03	6,1E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

Tabulka 21.20 Vyhodnocení přežití kmene *Rhodococcus* po 56.dnu uskladnění při T= 25°C

čas	koncentrace PVA	objem ul	počty		φ počet RHODO	CFU/ml RHODO	φ CFU/ml RHODO
			RHODO	RHODO			
56.DEN	0% ml	100	1,5E+02	2,5E+02	2,0E+02	6,0E+06	3,9E+06
		10	5,1E+02	6,2E+02	5,7E+02	1,7E+06	
RHODO	5% ml	100	1,7E+02	2,5E+02	2,1E+02	6,4E+06	4,1E+06
		10	5,7E+02	6,5E+02	6,1E+02	1,8E+06	
	10% ml	100	5,1E+02	6,8E+02	6,0E+02	1,8E+07	1,0E+07
		10	7,6E+02	8,4E+02	8,0E+02	2,4E+06	

Φ, průměrná hodnota; ml, přídavek mléka

### 3.3.7 Celkový časový přehled třetího pokusu

Tabulky uvádí nejdůležitější hodnoty III. pokusu získané průběhu mého pozorování po dobu 39. dnů

Tabulka 21.21 Počet baterií OT3 (CFU/ml) kultivovaných v lednici

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>28.DEN</b>	<b>39.DEN</b>
<b>0% ml PVA</b>	1,8E+07	1,0E+07	1,0E+07	1,1E+07	1,4E+07
<b>5% ml PVA</b>	1,1E+07	3,4E+07	1,0E+07	1,3E+07	2,0E+07
<b>10% ml PVA</b> ml, přidavek mléka	2,1E+06	4,0E+07	1,1E+07	1,0E+07	2,8E+07

Tabulka 21.22 Počet baterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) kultivované v lednici

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>28.DEN</b>	<b>39.DEN</b>
<b>0% ml PVA</b>	1,4E+07	1,3E+07	1,9E+07	1,5E+07	7,9E+06
<b>5% ml PVA</b>	1,2E+07	1,4E+07	2,7E+07	2,6E+07	7,0E+06
<b>10% ml PVA</b> ml, přidavek mléka	2,1E+07	2,8E+07	4,5E+07	2,7E+07	6,2E+06

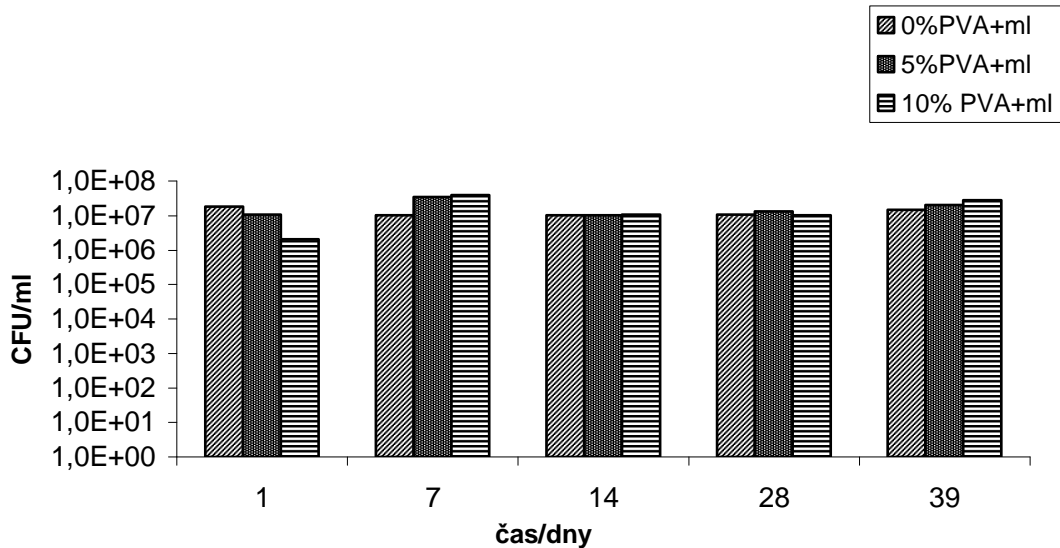
Tabulka 21.23 Počet baterií OT3 (CFU/ml) kultivované při laboratorní teplotě

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>28.DEN</b>	<b>39.DEN</b>
<b>0% ml PVA</b>	6,1E+06	1,7E+07	7,5E+06	8,6E+06	1,9E+07
<b>5% ml PVA</b>	2,3E+07	2,7E+07	9,7E+06	1,1E+07	2,2E+07
<b>10% ml PVA</b> ml, přidavek mléka	1,0E+07	1,8E+07	6,1E+06	6,3E+06	2,0E+07

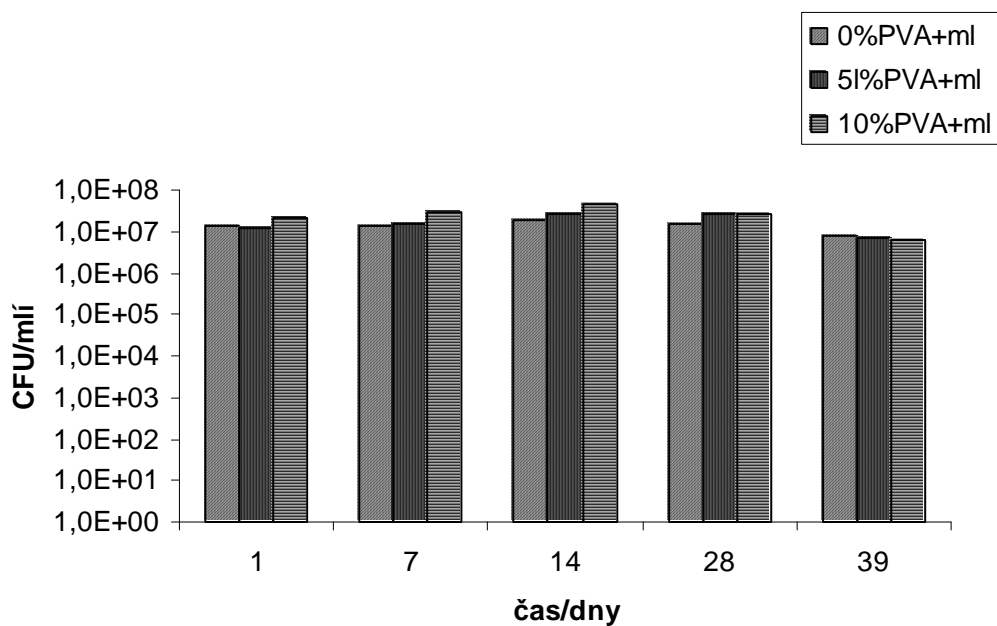
Tabulka 21.24 Počet baterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) kultivované při laboratorní teplotě

<b>koncentrace</b>	<b>1.DEN</b>	<b>7.DEN</b>	<b>14.DEN</b>	<b>28.DEN</b>	<b>39.DEN</b>
<b>0% ml PVA</b>	6,7E+06	1,5E+07	6,5E+06	6,0E+06	3,9E+06
<b>5% ml PVA</b>	3,4E+07	1,1E+07	3,8E+07	3,2E+07	4,1E+06
<b>10% ml PVA</b> ml, přidavek mléka	2,0E+07	3,0E+07	2,3E+07	2,0E+07	1,0E+07

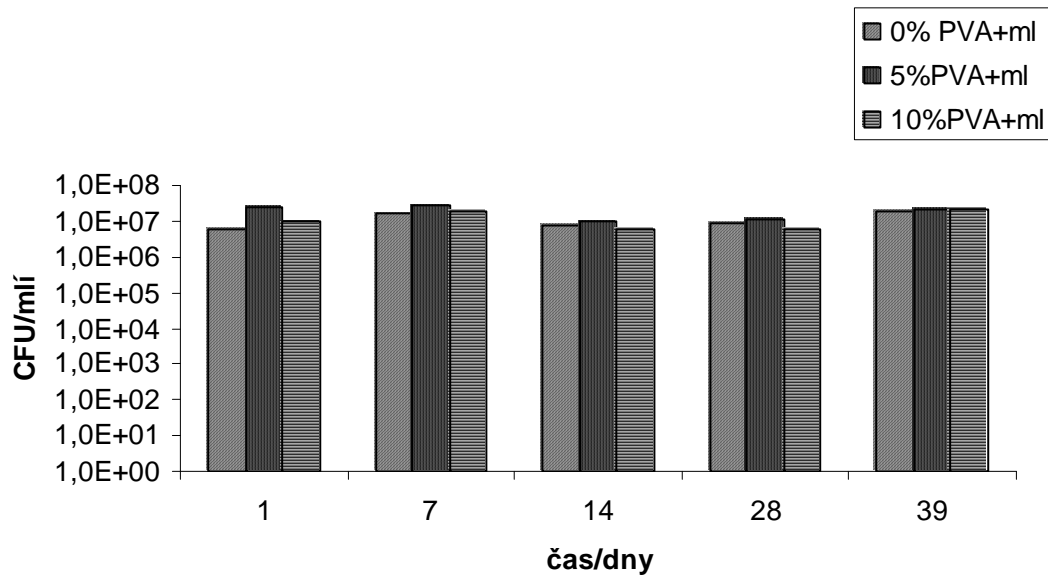
Níže uvedené grafy slouží pro rychlou orientaci v počtech přežilých bakterií obou kmenů III. Pokusu a ochranný účinek sušeného mléka:



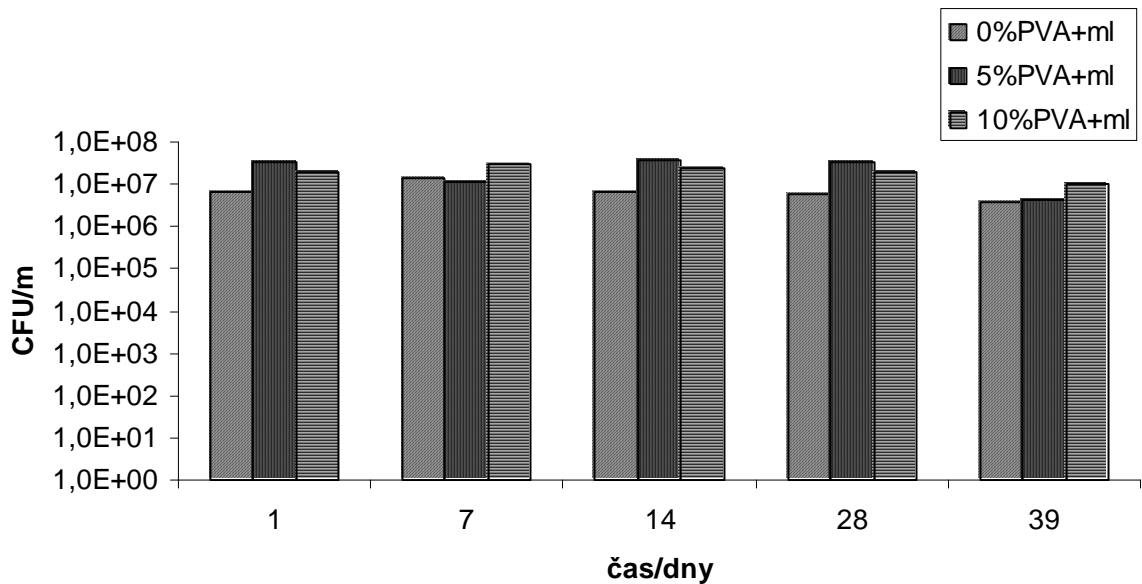
Obr. 19: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C. ml, přídavek sušeného mléka



Obr. 20: Graf Závislosti počtu vitálních bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C. ml, přídavek sušeného mléka



Obr. 21: Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C. ml, přídavek sušeného mléka



Obr. 22: Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene *Rhodococcus* (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C. ml, přídavek sušeného mléka



V posledním pokusu se zdá, že přídavek sušeného odstředěného mléka, výrazně zvýšil počty přežilých bakterií ve vysušeném stavu, a to u obou druhů bakteriálních kmenů. Zatímco v předchozím II.pokusu se počty bakterií OT3 po 1. dnu skladování pohybovaly řádově kolem  $10^6$  ve třetím pokusu se jejich počet zvýšil na  $10^7$ .

Z časové řady je patrné, že počet přežilých bakterií je velmi stabilní a nedochází k výraznému poklesu v průběhu času. Počty bakterií se drží stále v rozmezí  $10^6$  -  $10^7$ .

Zdá se, že ochranný účinek PVA se příliš neprojevuje. Je ale možné, že ochranný účinek PVA je překryt ještě výraznějším účinkem sušeného mléka.

### 3.4 Stanovení sušiny bakteriálních preparátů

Z prostudované literatury plyne [26], že významným faktorem který ovlivňuje přežití bakteriálních buněk ve vysušených preparátech je obsah vlhkosti. Zjednodušeně se dá říct, že čím je obsah vlhkosti menší, tím je přežívání lepší. Obsah vlhkosti by bylo možno ovlivnit způsobem vysušení, případně skladováním. My jsme se pouze pokusili stanovit, jaký je obsah vlhkosti v námi vytvořených bakteriálních preparátech.

Sušina byla stanovena jak v bakteriálních preparátech s obsahem PVA, tak i v preparátech s obsahem sušeného mléka o koncentracích 0% PVA, 5% PVA, 10% PVA a 20% PVA.

Byly připraveny čisté skleněné misky, předem vysušené při teplotě 105°C po dobu 3 hodin. Po zchladnutí vysušených misek v exikátoru byla zapsána jejich hmotnost a na každou z nich bylo mikrodávkovačem přeneseno 100 µl, daného bakteriálního preparátu. Misku i s obsahem suspenze jsme nejprve nechali sušit v laminárním boxu na 60.minut, abychom se přesvědčili k jakému % vysušení v něm běžně dochází. Poté byly misky dosušeny v sušárně při 105°C opět po dobu 3 hodin. Doba sušení se počítá od dosažení teploty 105°C. Aby sušina nenabrala vlhkost nechali jsme misky vychladnout v exikátoru na laboratorní teplotu a opět je zvážili.

V tabulkách jsou nejprve zaznamenány sušiny a obsah vody u preparátů s obsahem sušeného mléka.

Tabulka 22: Hmotnosti misek prázdných i s obsahem preparátů

koncentrace PVA	hmotnost misky			
	prázdné po vysušení	prázdné před vysušením	s bakter.prep. před vysušením	s bakter. susp. Po vysušení
0%+ml	28,744	28,7407	29,26317	29,2093
0%+ml	28,4879	28,487	29,01195	28,9564
0%+ml	28,4912	28,4899	29,00319	28,9419
5%+ml	27,928	27,9279	28,6676	28,5881
5%+ml	27,7799	27,7793	28,52159	28,4464
5%+ml	27,5347	27,5347	28,21129	28,1418
10%+ml	27,5795	27,579	28,12268	28,0773
10%+ml	26,974	26,9734	27,70052	27,6318
10%+ml	27,8967	27,8967	28,57692	28,5196

ml, přídavek sušeného mléka

Tabulka 23: Vypočtené hodnoty sušiny u jednotlivých preparátů a obsah vody

koncentrace PVA	sušina (g)	obsah vody %	Φsušina (g)	Φ obsah vody %
0%+ml	89,0577449	10,9422551		
0%+ml	89,2465949	10,7534051	88,70348445	11,29651555
0%+ml	87,8061135	12,1938865		
5%+ml	89,2388806	10,7611194		
5%+ml	89,7897048	10,2102952	89,58598789	10,41401211
5%+ml	89,7293782	10,2706218		
10%+ml	91,5612125	8,43878752		
10%+ml	90,466498	9,53350204	91,20034165	8,799658347
10%+ml	91,5733145	8,42668548		

ml, přídavek sušeného mléka; Φ průměrná hodnota

Tabulka 24: Hmotnosti misek prázdných i s obsahem preparátů

koncentrace PVA	hmotnost misky			
	prázdné po vysušení	prázdné před vysušením	s bakter.prep. před vysušením	s bakter.prep. po vysušení
0%	27,6902	27,6882	27,70352	27,7008
0%	27,743	27,7387	27,75406	27,752
0%	28,7836	28,7816	28,7969	28,7946
5%	28,0145	28,0124	28,27812	28,2545
5%	28,8075	28,805	28,07939	29,0563
5%	28,1483	28,1474	28,41154	28,3877
10%	27,9777	27,9738	28,48577	28,4445
10%	28,8924	28,8927	29,40062	29,3595
10%	28,7485	28,7486	29,2317	29,1934
20%	27,2439	27,2434	27,73886	27,6997
20%	27,4783	27,4782	28,03208	27,9866
20%	27,5003	27,5008	28,05033	28,0051

Tabulka 25: Vypočtené hodnoty sušiny u jednotlivých preparátů a obsah vody

koncentrace PVA	sušina (g)	obsah vody %	φsušina (g)	φ obsah vody %
0%	69,1906005	30,8093995		
0%	58,59375	41,40625	70,54301268	29,45698732
0%	71,8954248	28,1045752		
5%	90,3206383	9,67936173		
5%	NEUVEDENO	NEUVEDENO	90,47719655	9,522803454
5%	90,6337548	9,36624517		
10%	91,1772174	8,82278258		
10%	91,9633013	8,03669869	91,74441772	8,255582285
10%	92,0927344	7,90726558		
20%	91,9953175	8,00468252		
20%	91,7707807	8,22921933	91,87547172	8,124528282
20%	91,860317	8,139683		

Φ průměrná hodnota

Z jednotlivých pokusů plyne, že obsah vody se vysušených preparátech činí zhruba 10%. V misách s preparátem o koncentraci 0% PVA, nastala chyba, protože obsah vody je příliš vysoký, činí 30%. Mohlo to být způsobeno tím, že misky zůstaly dlouho na vzduchu při jejich manipulaci ze sušárny do exikátoru, a částečně nabraly vlhkost.

Přesto je ale 10% obsah vody značně vysoký. Může tedy negativně ovlivňovat přežívání. Pokud bychom ho chtěli ještě více snížit, mohly bychom zkusit misky se 100  $\mu$ l bakteriálního preparátu vysušit při zhruba 50°C. Vzniká zde ovšem riziko, že by bakterie nemusely tak vysokou teplotu dobře snášet.

### 3.5 Degradace PVA půdními mikroorganismy obohacenými o bakterii OT3

Cílem pokusu bylo zjistit, zda půdní mikroorganismy obohacené o živou bakterii OT3 budou schopny degradace PVA, bez přídavku PQQ nebo dalšího růstového faktoru. Pravděpodobnost, že půdní mikroorganismy budou schopné sami o sobě degradovat PVA, je velmi malá. Naproti tomu bakterie kmene OT3 neumí sama osobě PVA degradovat a vyžaduje dodávku specifických růstových faktorů.

Proto bude zajímavé pozorovat, zda po doplnění půdních mikroorganismů o živý kmen OT3, bude docházet k degradaci.

#### Odběr půdy:

Svrchní vrstva půdy byla odebrána v přírodě do hloubky 15 cm. Půda byla barvy světlejší a byly z ní odstraněny kořínky a hrubé nečistoty.

#### Příprava půdního výluhu

Do 500-ml láhve bylo připraveno 100 ml sterilního MMS, které se dále sterilizovalo v autoklávu při 120 °C 15 minut. Po chlazení bylo do láhve naváženo 10g půdy. Navážka neobsahovala žádné větší kousky půdního materiálu ani kamínky apod. Celá směs byla po dobu 15 min ručně protřepávána a dalších 5 min. ponechána sedimentovat

#### Příprava vzorků:

Do dvou 500-ml láhví, které obsahovaly 100 ml nově připraveného MM, bylo naváženo 50 mg PVA. Po sterilizaci a následném ochlazení byl do každé z láhví pipetován 1 ml půdního výluhu. Na závěr byl obsah jedné z láhví zaočkován pouze bakterií OT3, která vyrostla na Petriho miskách s agarem PVA+PQQ+KA.

Lahve byly upevněny na třepačku s režimem 15 minut / 15 minut (pohyb / klid) v místnosti s 25 °C. Z lahví byly odebírány po určitých časových intervalech asi 4 ml vzorku, v nichž byla stanovována koncentrace PVA na mikrotitračních destičkách.

Tabulka 26: Složení – obsah láhví

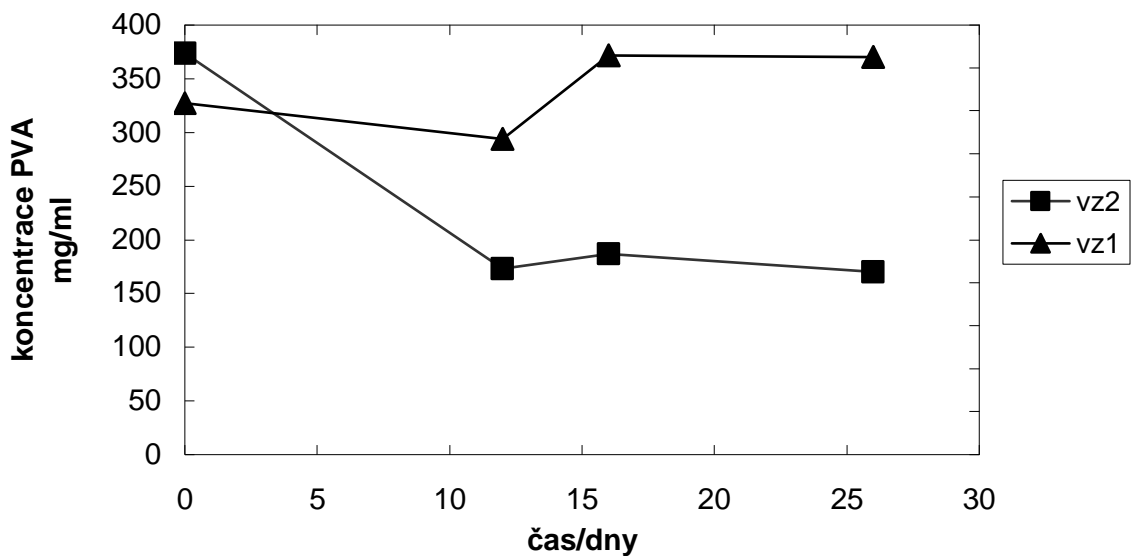
	MM+PVA	půdní výluh	zaočkováno bakterií
1.láhev = vz1	100 ml	1 ml	-----
2. láhev =vz2	100 ml	1 ml	OT3

Tabulka 27: Hodnoty koncentrace 1.vzorku v průběhu testu

čas dny	absorbance A	koncentrace c	degradace PVA %
0	0,7774	409,157895	0
12	0,698	367,368421	10,21353
16	0,8828	464,631579	-13,558
26	0,8794	462,842105	-13,1207

Tabulka 28: Hodnoty koncentrace 2.vzorku v průběhu testu

čas dny	absorbance A	koncentrace c	degradace %
0	0,7098	373,5789474	0
12	0,3288	173,0526316	53,67709
16	0,3548	186,7368421	50,01409
26	0,3232	170,1052632	54,46605



Obr. 23: Graf závislosti koncentrace PVA v průběhu 26 dnů

Z výsledků vyšlo najevo, že v 1.vzorku, kde byly samotné půdní mikroorganismy, nedocházelo k degradaci PVA. Záporné výsledky procent degradace, které se objevily v pozdějších časech, by mohly být způsobeny vznikajícím zákalem kultury. Zákal se postupem času stále více zvětšoval.

Naproti tomu u druhého, který byl zaočkován bakterií OT3, došlo ke zřetelné degradaci PVA, která po 12 dnech dosáhla asi 50% a dále se již nezvyšovala.

K pokusu je nutno dodat, že v obou láhvích se vzorky docházelo ke vzniku hnědé sraženiny. Domníváme se, že sraženina mohla obsahovat PVA a proto je nutné brát dosažené výsledky s rezervou.

### 3.6 Pokus s bakterií *Acetobacter aceti*:

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda je bakterie kmene OT3 schopna růstu spolu s bakterií *Acetobacter aceti* bez přídavku PQQ. K vlastnostem acetobactera patří schopnost syntézy PQQ, proto by nás zajímalo, zda je bakterie kmene OT3 schopna růst spolu s tímto mikroorganismem bez uměle dodaného PQQ.

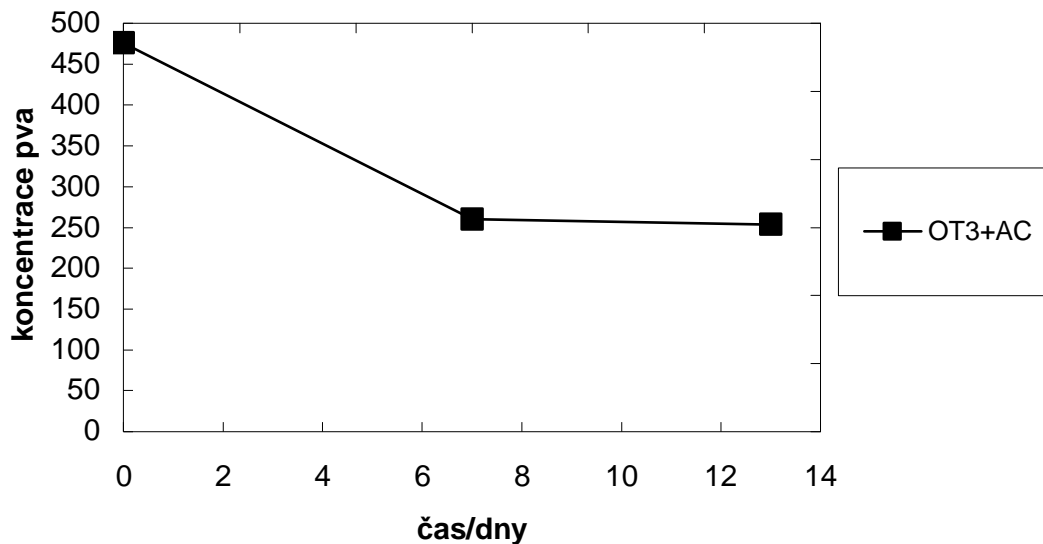
#### Příprava:

Do 250-ml láhve, bylo připraveno 50 ml sterilního MMK (s PVA bez PQQ) a toto médium bylo zaočkováno oběma druhy již zmíněných kmenů (OT3+*Acetobakter*), které vyrostly na agaru. Láhev byla upevněna na třepačku s režimem 15 minut / 15 minut (pohyb / klid) v místnosti s 25 °C. Vždy po určitém časovém úseku byl z láhve odebrán sterilní špičkou objem 2 ml bakteriální směs, a na mikrotitračních destičkách pak byla stanovována koncentrace PVA. Postup stanovení koncentrace pomocí mikrotitračních destiček je stejný jako v kapitole Stanovení PVA

Tabulka 29: Koncentrace PVA v průběhu testu bakteriální směs OT3+*Acetobakter*

čas dny	absorbance A	koncentrace c	degradace %
0	0,9042	475,894737	0
7	0,4936	259,789474	45,410307
13	0,482	253,684211	46,693209





Obr. 24: Graf znázornění klesající koncentrace PVA v přítomnosti *Acetobacteria*

Z výsledků je patrné, že zhruba po 6 dnech došlo k 50% degradaci PVA. Procento degradace se dále příliš neměnilo. Zdá se tedy, že je *Acetobacter* schopen dodávat bakterii OT3 oba růstové faktory. Aby však nedošlo k milným spekulacím, a my se přesvědčili, že kultura nebyla kontaminována během pokusu, byl proveden test sterility, kdy byla tato bakteriální směs vyočkována na agar pro acetobacteria.

Potvrdilo se však to, že kultura obsahovala pouze dané bakteriální kmeny. Překvapilo nás, že na agaru pro acetobacteria vyrostla navíc i bakterie OT3 ve formě typických žlutých kolonií.

### 3.7 PVA – fólie

Cílem tohoto pokusu bylo vyrobit PVA-fólii a nanést na ni aerosol bakteriálního preparátu o vhodné koncentraci. Nejprve jsme se pokoušeli najít cestu, jak PVA-fólii správně vyrobit a kterou koncentraci PVA použít na přípravu bakteriálních preparátů.

Pro přípravu PVA folií se nám osvědčila jako nejvhodnější kombinace PVA a destilované vody v tomto poměru:

Polyvinyl alkohol .....6 g

Destilovaná voda (ÚTŽPCH, UTB, Zlín).....60 ml

#### Příprava:

Navážené množství PVA bylo rozpuštěno v 60 ml destilované vody nejprve na vodní lázni. Po úplném rozpuštění PVA se vše dalo v infuzní láhvi s teflonovým uzávěrem (nebo PVA přes obyčejné uzávěry při sterilizaci unikalo) do autoklávu sterilizovat, při teplotě 120 °C na 15 minut. Na prázdné Petriho misky bylo po vychladnutí pipetováno 10 ml fólie v tekutém stavu. Tento objem je pro dobrou manipulaci s vyrobenou fólií ideální. V poslední fázi byly misky s fólií v tekuté formě vysušeny v sušárně při teplotě 60 °C. Nesmím opomenout, že pro sušení při vyšší teplotě musí být dvířka sušárny otevřena.

Podle výsledků, kterých jsme dosáhli v předcházejících pokusech při zjišťování počtu přežilých buněk, jsme zvolili jako nejvhodnější koncentraci 5% PVA s přidávkou sušeného mléka.

Takto připravená bakteriální suspenze byla na základě odborných článků [23] na fólii nanášena „sprejováním“. Abychom zachovali sterilitu bakteriálního preparátu, byla plastová lahvička promyta ethanolem a vysušena v sušárně.

V závěru byl na fólii ze vzdálenosti asi 20cm nanášen aerosol bakteriálního preparátu. Následně byly fólie v boxu vysušeny a poté uskladněny při laboratorní teplotě 25°C a v lednici při teplotě 4°C.

V dalším průběhu se bude sledovat, zda si bakteriální preparát na povrch fólie určoval schopnost degradovat PVA v průběhu skladování.

## ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo ověřit způsoby, jimiž lze uchovat vitální bakterie kmene OT3, který jako jeden z mála rozkládá PVA.

Z počátku jsem se zaměřila na to, zda bakterie kmene OT3 a *Rhodococcus* jsou schopny přežít přiměřenou dobu, asi tak půl roku, ve formě vysušeného preparátu a zda má PVA ochrannou funkci pro přežívání bakterií. Tuto problematiku jsem řešila ve třech na sebe navazujících pokusech. Všechna stanovení byla volena podle exponenciální řady v uvedených časových intervalech, při dvou teplotách 4°C a 25°C a jejich účelem bylo ukázat, jak dobře snáší přežilé bakterie skladování ve vysušeném stavu.

První pokus byl zavádějící, v něm jsme testovali ochranný vliv PVA na přežívání bakteriálních kmenů OT3 a *Rhodococcus*, při různých koncentracích PVA. Z volené koncentrace, které jsme použili, byly 0% (bez přídavku PVA), dále 5%, 10% a 20% PVA. Během pokusu však vyšlo najevo, že 20% roztok PVA, byl vysoce viskózní a jakákoliv manipulace s ním byla obtížná. Po třech týdnech skladování vysušeného preparátu jsme usoudili, že všechny bakterie kmene OT 3 už vyhynuly. Domníváme se tedy, že koncentrace 20% PVA měla zřejmě baktericidní účinek, a tudíž se ukázala jako nevhodná. Proto jsme ji z dalších pokusů vyloučily.

Sledování počtu přežilých bakterií obou druhů bakteriálních kmenů probíhalo nejdéle, a to po dobu 4 měsíců. Z výsledků prvního pokusu se dá tedy usoudit, že přítomnost PVA neměla vliv na přežívání bakteriálního kmene *Rhodococcus*, zatímco u bakterií OT3 při teplotě 4°C prokázaly největší ochranný účinek koncentrace 5% PVA a 10% PVA, kde se počet přežilých bakterií pohyboval průměrně v rozmezí  $10^{+5}$  až  $10^{+6}$  buněk/ml. Při laboratorní teplotě však přežívání bakterií nebylo už tak úspěšné, což se projevilo postupným snižováním počtu vitálních bakterií v průběhu času až k jejich úplnému vymizení.

V návaznosti na předchozí experiment byl proveden II. pokus s přídavkem sušeného mléka. Z prvního pokusu jsme zjistili, že přežívání bakterií jen v bakteriálním preparátu s obsahem PVA není tak úspěšné a počty přežilých bakterií jsou nízké. Na základě odborných článků [27,28], které uvádí, že sušené odstředěné mléko je používáno pro uchovávání kultur a podporuje přežívání bakterií ve vysušeném stavu, jsme se rozhodli o tom v dalším pokusu přesvědčit. Pokus byl sledován po dobu 2 měsíců.

Potvrdilo se, že přítomnost sušeného mléka má pro bakterie ochranný účinek, neboť jejich počet značně vzrostl. Rozpor s pokusem prvním nastává v počtu přežilých bakterií skladovaných při teplotě 4°C a 25°C, kdy u druhého pokusu nebyl mezi oběma teplotami pozorován žádný výrazný rozdíl. Rovněž bylo překvapivé, že preparát bez přídavku ochranných látek vykazoval oproti předchozímu pokusu vysoké počty přežilých bakterií. Může to být způsobeno nějakou experimentální chybou nebo jinými neznámými okolnostmi. Počet přežilých bakterií OT3 se nejčastěji pohyboval řádově kolem  $10^6 - 10^7$  a u bakterií kmene *Rhodococcus* kolem  $10^8 - 10^7$ .

Pro ověření získaných výsledků byl proveden na závěr III. pokus. Byly vybrány jen ty koncentrace, které se jeví v obou předcházejících pokusech jako nejúspěšnější, a to 5% roztok PVA a 10% roztok PVA a pro porovnání ještě 0% roztok PVA, a to přídavkem i bez přídavku sušeného mléka. Pokus byl sledován nejkratší dobu - jeden a půl měsíce.

Opět se potvrdil ochranný účinek PVA a sušeného mléka na přežívání bakterií. Bakterie kmene *Rhodococcus* přežívaly ve větších a stabilnějších počtech v rozmezí řádů,  $10^5$  až  $10^6$  a tím se potvrzuje fakt, že Gram-pozitivní organismy přežívají vysušení lépe. Bakterie kmene OT3 byly na přežívání náchylnější. K úplnému vymizení této bakterie došlo asi po 20 dnech skladování ve vysušených preparátech o koncentraci 0% PVA, které byly skladovány při teplotě 4°C. Ještě výraznější vymizení se projevilo už po týdenním skladování při teplotě 25°C, kde počet přežilých bakterií na ml klesl z hodnoty  $1,1 \cdot 10^6$  na 0. Poněkud matoucí je výsledek ve 21. dnu, kdy se bakterie kmene OT3 náhodně objevily. Při vyhodnocení počtů z 39. dnu skladování, máme podezření že nastala experimentální chyba, neboť nebyly nalezeny žádné bakterie kmene OT3. Proto se bude poslední stanovení opakovat. Výsledky však z časových důvodů už nebudou zahrnuty do diplomové práce.

V posledním pokusu projevil přídavek sušeného odstředěného mléka ještě výrazněji. Zvýšil se počet přežilých bakterií ve vysušeném stavu u obou druhů bakteriálních kmenů. Zatímco v předchozím II. pokusu se počty bakterií OT3 po 1. dnu skladování pohybovaly řádově kolem  $10^6$  ve třetím pokusu se jejich počet zvýšil na  $10^7$ . V úvahu je ovšem nutno vzít i to, že v posledním pokusu byla bakteriální suspenze na počátku o něco hustější. Z časové řady je patrné, že počet přežilých bakterií je velmi stabilní a nedochází k výraznému poklesu v průběhu času. Počty bakterií se drží stále

v rozmezí  $10^6$  -  $10^7$ . Je pravděpodobné, že ochranný účinek PVA je překryt ještě výraznějším účinkem sušeného mléka.

V závěru byla u jednotlivých bakteriálních preparátů stanovena sušina. Obsah vody se vysušených preparátech je dosti vysoký, činí zhruba 10%, a může negativně ovlivňovat přežívání.

V další části mé diplomové práce bylo zkoumáno, zda půdní mikroorganismy obohacené o živou bakterii OT3 budou schopny degradace PVA, bez přídavku PQQ nebo dalšího růstového faktoru.

Z výsledků vyšlo najevo, že v 1.vzorku, kde byly samotné půdní mikroorganismy k biodegradaci nedocházelo. Záporné výsledky procent degradace, které se objevily v pozdějších časech, by mohly být způsobeny vznikajícím zákalem kultury. Zákal se postupem času stále více zvětšoval

Naproti tomu u druhého vzorku, který byl zaočkován bakterií OT3, došlo ke zřetelné degradaci PVA, která po 12 dnech dosáhla asi 50% a dále se již nezvyšovala.

To naznačuje, že přídavek bakterie OT3 do prostředí by mohl vyvolat zlepšení biodegradability PVA.

V dalším pokusu jsme se chtěli přesvědčit, zda je bakterie kmene OT3 schopna růstu spolu s bakterií *Acetobacter aceti* bez uměle dodaného PQQ. Z výsledků je patrné, že zhruba po 6 dnech došlo k 50% degradaci PVA. Procento degradace se dále příliš neměnilo. Zdá se tedy, že je *Acetobacter* schopen dodávat bakterii OT3 oba růstové faktory.

V poslední části diplomové práce jsme se snažili vyrobit PVA-fólii a nanést na ni aerosol bakteriálního preparátu o koncentraci 5 % PVA s přídavkem sušeného mléka, která se jevila jako nejvhodnější. Formou aerosolu byl tento preparát nanesen na fólie ze vzdálenosti 20cm a po vysušení byly fólie uskladněny při teplotě 4°C a 25°C. V dalším průběhu se bude sledovat, zda si bakteriální preparát na povrch fólie udržel vitalitu a zda bude podporovat rychlou degradaci fólie.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Kováčič L., Bína J. : Plasty, Alfa Bratislava, 30-32, 1974
- [2] Sato T., Yamuchi J., Okaya T.: Process for producing polyvinyl ester and polyvinylalcohol having high degree of polymerization. Eur Patent Appl EP 250, 607, 1988. CA108: 205283.
- [3] Slejška A.: Testování biodegradability, Časopis Biom, 1997
- [4] Marten F.L., Zvanut C.W. In: Finch CA, editor. Polyvinylalcohol development. Chichester: Wiley, 1992. chapters 2 and 3
- [5] Doležal V.: Plastické hmoty. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1965
- [6] Suzuki T, Ichihara Y, Yamada M, Tonomura K. Some characteristics of Pseudomonas O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. Agric Biol Chem 1973;37:747–56.
- [7] Nord FF.: Dehydrogenation activity of Fusarium lini B., Naturwiss 1936;24:763
- [8] Tokiwa Y., Kawabata G., Jareret A.: A modified Method for isolating poly(vinyl alcohol) –degrading bacteria and study of their degradation patterns. *Biotechnology Letters, Vol. 23, p. 1937-1941, 2001*
- [9] Casey JP, Manly DG. Polyvinyl alcohol biodegradation by oxygen-activated sludge. In: Sharpley JM, Kaplan AM, editors. Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium. Appl Sci: Barking, England; 1975. p.819–33. CA 87: 106411.
- [10] Watanabe Y, Morita M, Hamada N, Tsujisaka Y. Formation of hydrogen peroxide by a polyvinyl alcohol degrading enzyme. Agric Biol Chem 1975;39:2447–8.
- [11] Watanabe Y., Hamada N., Morita M., Tsujisaka Y.: Purification and properties of a polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain of Pseudomonas. Arch Biochem Biophys 1976;174:575–81.

- [12] Sträßner JP: Optimierung des mikrobielen Abbaus von Polyvinylalkohol. Dissertation, Technische Universität, Hamburg, 1995
- [13] Sakai K, Hamada N, Watanabe Y, : Agric. Biolo. Chem., 1985, 49, 827 - 833
- [14] Sakai K, Hamada N, Watanabe Y, : Agric. Biolo. Chem., 1985, 49, 1901 - 1902
- [15] Sakai K, Hamada N, Watanabe Y. Studies on the poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme. Part VI. Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and b-diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp. Agric Biol Chem 1986;50:989–96.
- [16] Matsumura S., Tomizawa N., Toki A., Nishikawa K., Toshiba K.: 32Novel Poly(vinyl alcohol)-Degrading Enzyme and the Degradation
- [17] Matsumura S., Shimura Y., Terayama K., Kiyohara T.: Effects of molecular weight and stereoregularity on biodegradation of poly(vinyl alcohol) by *Alcaligenes faecalis*. Biotechnik Lett 1994;16:1205–10.
- [18] Kawagoshi Y., Fujita M.: Purification and properties of polyvinyl alcohol oxidase with broad substrate range obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 13, p. 273-277, 1997
- [19] Alexandra Vlčková: Studium bakterií rozkládajících PVA, Diplomová práce, UTB Zlín, 2005
- [20] Schönberger H., Baumann A., Keller W.: Study of microbial degradation of polyvinylalcohol in wastewater treatment plants. *American Dyestuff Repost*, 9-18, 1997.
- [21] Haschke H., Tomka I., Keilbach A.: Systematische Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit von Verpackungsmaterial, 1. Mitt. Zur tatsächlichen biologischen Abbaubarkeit von sogenannten bioabbaubaren Kunststoffolien, *Monatshefte für Chemie*, 129, 253-279, 1998.

- [22] Haschke H., Tomka I., Keilbach A.: Systematische Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit von Verpackungsmaterial, 2. Mitt. Zur biologischen Abbaubarkeit von auf Polyvinylalkohol basierenden Verpackungsfolien, Monatshefte für Chemie 129, 365-386, 1998.
- [23] Wen-Chian Lian, Hung-Chi Hsiao, Cheby-Chun Chou: Survival of bifidobacteria after spray-drying. Graduate Institute of Food Science & Technology 79-81, 2001
- [24] Ishigaki, T., Kawagoshi, Y., Ike, M., Fujita, M.: Biodegradation of a polyvinylalcohol-starch blend plastic film. World Journal of microbiology & biotechnology 15, p 321-327, 1999.
- [25] R. Rabindran and P. Vidhyasekaran: Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight, Department of Plant Patology, Tamil Nadu Agricultural University, India
- [26] R.Walker<sup>1</sup>, S. Rossall<sup>2</sup> and M.J.C. Asher<sup>1</sup>: Comparison of application methods to prolong the survival of potential biocontrol bacteria on stored sugar – beet seed, Suffolk and University of Nottingham, 293, 294, 298-303, 2004
- [27] Yoav Bashan: Alginate Beads as Synthetic Inoculant Carriers for Slow Release of Bacteria That Affect Plant Growth, Department of Plant Genetics, The Weizmann Institute of Science, 1986
- [28] B.M.Corcoran<sup>1,2</sup>, R.P. Ross<sup>1,3</sup>, G.F. Fitzgerald<sup>2,3</sup> and C. Stanton<sup>1,3</sup>: Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances, p 1024, 1029-1031, 1034-1037, 2003
- [29] C. Desmond<sup>1,2</sup>, R.P. Ross<sup>1</sup>, E. O'Callaghan<sup>1,2</sup>, G.F. Fitzgerald<sup>2</sup> and C. Stanton<sup>1</sup>: Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia, p 1003, 1005. 2002
- [30] Riedl J.: Biodegradace polyvinylalkoholu. Diplomová práce, UTB Zlín, 2004



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BDH	- $\beta$ -diketonová hydroláza
BTM	- bromhtymolová modř
ČOV	- čistírna odpadních vod
CFU/ml	- počet bakterií v 1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- peroxid vodíku
HD	- stupeň hydrolýzy
HPLC	- vysokotlaká kapalinová chromatografie
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- peroxid vodíku
KA	- kvasniční autolyzát
MM	- minerální medium
MMK	Minerální medium s PVA a PQQ pro kultivace
MMS	Suspendační médium
MM	- minerální medium
MMS	Suspendační médium
MMK	Minerální medium s PVA a PQQ pro kultivace
PVA	- polyvinylalkohol
PVADH	- polyvinylalkohol dehydrogenáza
PVAc	- polyvinyl acetát
PHB	- polyhydroxybutyrát
PEG	- polyethylenglykol
PQQ	- pyrrolochinolin chinon
SAO	- oxidáza sekundárních alkoholů
TOC	- zbytkový organický uhlík
VAc	- vinyl acetát

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Schéma postupu ředění a zjišťování počátečního počtu narostlých bakteriálních kultur.....	30
Obr. 2. Kalibrační přímka stanovení PVA na mikrotitračních destičkách.....	31
Obr. 3. Schéma přípravy bakteriální suspenze a vysévání na misky .....	39
Obr. 4. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C .....	49
Obr. 5. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene <i>Rhodococcus</i> (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
Obr. 6. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C .....	50
Obr.7. Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene <i>Rhodococcus</i> (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C .....	50
Obr. 8. Schéma postupu přípravy bakteriálních suspenzí s přidavkem sušeného mléka.....	54
Obr. 9. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C. ml, přidavek sušeného mléka.....	62
Obr. 10. Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene <i>Rhodococcus</i> (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C. ml, přidavek sušeného mléka .....	62
Obr. 11. Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C. ml, přidavek sušeného mléka.....	63
Obr. 12. Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene <i>Rhodococcus</i> (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C. ml, přidavek sušeného mléka.....	63
Obr. 13. Schéma přípravy bakteriální suspenze a vysévání na misky .....	67
Obr. 14. Schéma postupu přípravy bakteriálních suspenzí s přidavkem sušeného mléka .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b> 69
Obr. 15. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C .....	77
Obr. 16. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene <i>Rhodococcus</i> (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C .....	77
Obr. 17. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C .....	78

Obr. 18. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene <i>Rhodococcus</i> (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C .....	78
Obr. 19. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C. ml, přídavek sušeného mléka.....	87
Obr. 20. Graf Závislosti počtu vitálních bakterií kmene <i>Rhodococca</i> (CFU/ml) na čase při teplotě 4°C. ml, přídavek sušeného mléka .....	87
Obr. 21. Graf závislosti počtu vitálních bakterií kmene OT3 (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C. ml, přídavek sušeného mléka í .....	88
Obr. 22 Graf závislost počtu vitálních bakterií kmene <i>Rhodococca</i> (CFU/ml) na čase při teplotě 25°C. ml, přídavek sušeného mléka .....	88
Obr. 23. Graf závislosti koncentrace PVA v průběhu 26 dnů.....	94
Obr. 24. Graf znázornění klesající koncentrace PVA v přítomnosti <i>Acetobacteria</i> .....	97

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Koncentrace PVA a naměřená absorbance].....	31
Tabulka 2. Množství jednotlivých složek potřebných na přípravu bakteriálních preparátů s obsahem 0% - 20% PVA.....	36
Tabulka 3. Naměřené hodnoty pH u různě koncentrovaných bakteriálních preparátů.....	36
Tabulka 4. Naměřené hodnoty pH po zvýšení dávky fosforečnanů.....	37
Tabulka 5. Hodnoty pH bakteriálních preparátů I. pokusu.....	37
Tabulka 6. Počáteční počty bakteriálního kmene OT3.....	40
Tabulka 7. Počáteční počty bakteriálního kmene <i>Rhodococcus</i> .....	40
Tabulka 8.1-8.11 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a <i>Rhodococcus</i> v průběhu celého I.pokusu uskladnění při T= 4°C.....	<b>Chyba! Záložka není definována.1</b>
Tabulka 8.12-8.22 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a <i>Rhodococcus</i> v průběhu celého I.pokusu uskladnění při T= 25°C.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
Tabulka 8.23 Počet bakterií OT3 (CFU/ml) kultivované v lednici.....	48
Tabulka 8.24 Počet bakterií <i>Rhodococca</i> (CFU/ml) kultivované v lednici.....	48
Tabulka 8.25 Počet bakterií OT3 (CFU/ml) kultivované při laboratorní teplotě.....	48
Tabulka 8.26 Počet bakterií <i>Rhodococca</i> (CFU/ml) kultivované při laboratorní teplotě.....	48
Tabulka 9. Množství jednotlivých složek potřebných na přípravu koncentrovaných roztoků PVA s obsahem sušeného mléka.....	52
Tabulka 10. Hodnoty pH u roztoků bakteriální suspenze s obsahem sušeného mléka.....	53
Tabulka 11. Počáteční počty bakteriálního kmene T3.....	55
Tabulka 12. Počáteční počty bakteriálního kmene <i>Rhodococcus</i> .....	55
Tabulka 13.1-13.7 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a <i>Rhodococcus</i> v průběhu celého II.pokusu uskladnění při T= 4°C.....	56
Tabulka 13.8 -13.14 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a <i>Rhodococcus</i> v průběhu celého II.pokusu uskladnění při T= 25°C.....	58
Tabulka 13.15 Počet bakterií kmene OT3 kultivované v lednici.....	61
Tabulka 13.16 Počet bakterií kmene <i>Rhodococcus</i> kultivované v lednici.....	61
Tabulka 13.17 Počet bakterií kmene OT3 kultivované při laboratorní teplotě.....	61
Tabulka 13.18 Počet bakterií kmene <i>Rhodococcus</i> kultivované při laboratorní teplotě.....	61
Tabulka 14. Množství jednotlivých složek potřebných na přípravu bakteriálních preparátů.....	65

Tabulka 15. Hodnoty pH použitých bakteriálních preparátů .....	65
Tabulka 16. Množství jednotlivých složek potřebných na přípravu bakt. preparátů s obsahem sušeného mléka.....	68
Tabulka 17. Hodnoty pH použitých bakteriálních preparátů .....	68
Tabulka 18. Počáteční počty bakteriálního kmene OT3.....	70
Tabulka 19. Počáteční počty bakteriálního kmene <i>Rhodococcus</i> .....	70
Tabulka 20.1.-20.10 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a <i>Rhodococcus</i> v průběhu celého III.pokusu uskladnění při T= 4°C bez přídavku mléka .....	71
Tabulka 20.11.-20.20 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a <i>Rhodococcus</i> v průběhu celého III.pokusu uskladnění při T= 25°C bez přídavku mléka .....	73
Tabulka 20.21 Počet baterií kmene OT3 (CFU/ml) kultivovaných v lednici.....	76
Tabulka 20.22 Počet baterií kmene <i>Rhodococcus</i> (CFU/ml) kultivované v lednici.....	76
Tabulka 20.23 Počet baterií kmene OT3 (CFU/ml) kultivované při LE teplotě.....	76
Tabulka 20.24 Počet baterií kmene <i>Rhodococca</i> (CFU/ml)kultivované při LAteplotě .....	76
Tabulka 21.1-21.10 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a <i>Rhodococcus</i> v průběhu celého III.pokusu uskladnění při T= 4°C s přídavkem mléka.....	80
Tabulka 21.11-21.20 Vyhodnocení přežití kmene OT3 a <i>Rhodococcus</i> v průběhu celého III.pokusu uskladnění při T= 25°C s přídavkem mléka.....	83
Tabulka 21.21 Počet baterií OT3 (CFU/ml) kultivovaných v lednici.....	86
Tabulka 21.22 Počet baterií <i>Rhodococca</i> (CFU/ml) kultivované v lednici .....	86
Tabulka 21.23 Počet baterií OT3 (CFU/ml) kultivované při laboratorní teplotě .....	86
Tabulka 21.24 Směrodatná odchylka při měření koncentrace PVA.....	86
Tabulka 22. Hmotnosti misek prázdných i s obsahem preparátů .....	90
Tabulka 23. Vypočtené hodnoty sušiny u jednotlivých preparátů a obsah vody .....	91
Tabulka 24. Hmotnosti misek prázdných i s obsahem preparátů .....	91
Tabulka 25. Vypočtené hodnoty sušiny u jednotlivých preparátů a obsah vody .....	91
Tabulka 26. Složení – obsah láhví.....	94
Tabulka 27. Hodnoty koncentrace 1.vzorku v průběhu testu .....	94
Tabulka 28. Hodnoty koncentrace 2.vzorku v průběhu testu .....	94
Tabulka 29. Koncentrace PVA v průběhu testu bakteriální směsy OT3+ <i>Acetobakter</i> .....	96

**SEZNAM PŘÍLOH**

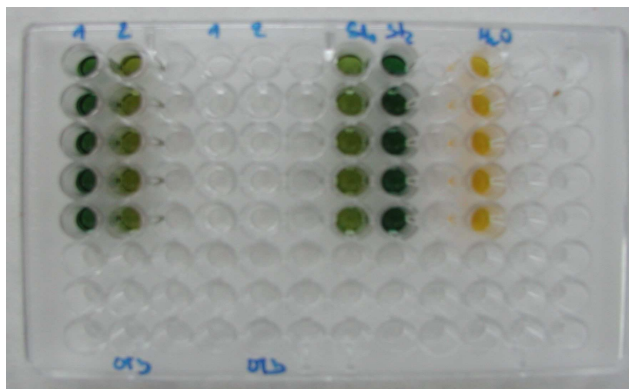
PŘÍLOHA P I: Stanovení koncentrace PVA na mikrotitrační destičce

PŘÍLOHA P II: počítáč kolonií

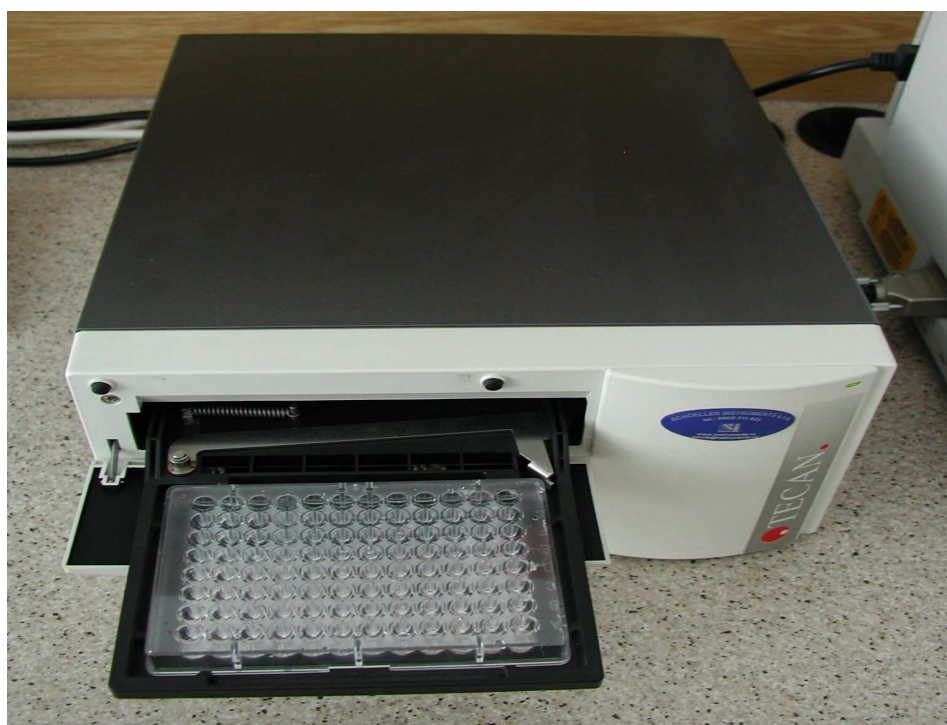
PŘÍLOHA P III: fotografie bakteriálního kmene OT3 +*Rhodococcus*

PŘÍLOHA P IV: Fotografie bakteriálních kmenů OT3 +*Rhodococcus* při koncentraci  
0% PVA bez přídavku sušeného mléka uskladněných v lednici

PŘÍLOHA P V: Fotografie bakteriálních kmenů OT3 +*Rhodococcus* při koncentraci  
5% PVA bez přídavku sušeného mléka uskladněných při 25°C

**PŘÍLOHA P I:** Stanovení koncentrace PVA na mikrotitrační destičce

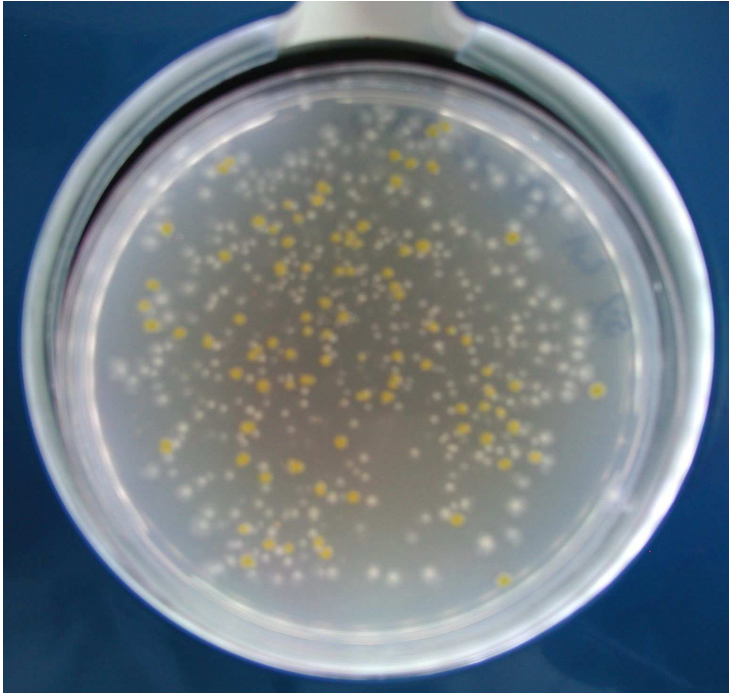
Měřicí přístroj TEKAN



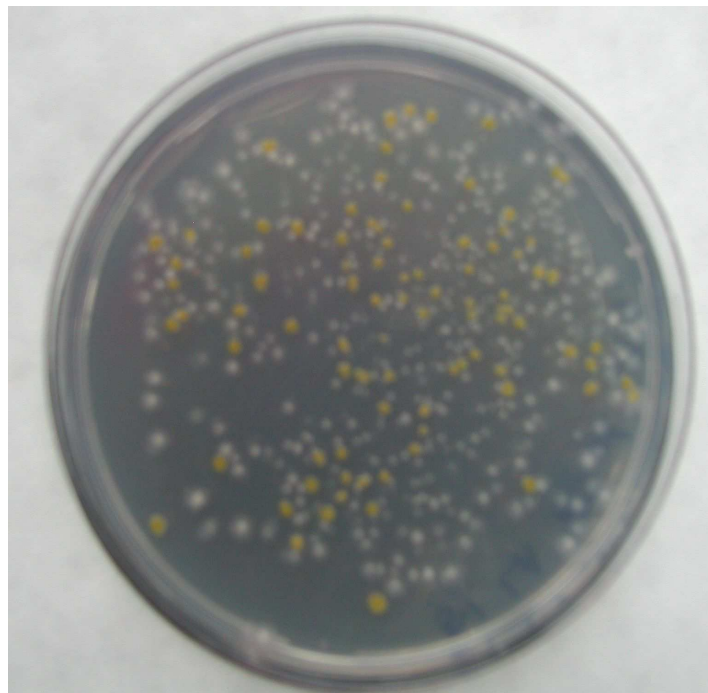
**PŘÍLOHA P II:** počítač kolonií





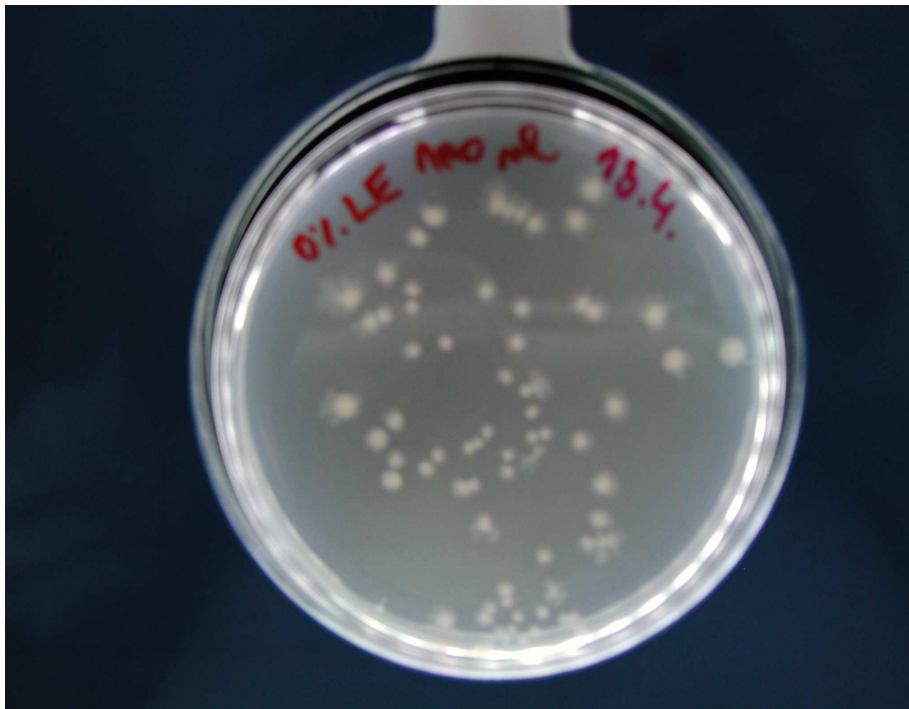
**PŘÍLOHA P III:** fotografie bakteriálního kmene OT3 +*Rhodococcus*

Na fotografiích jsou dobře rozeznatelné kolonie kmene OT3“ žluté“ a kolonie kmene *Rhodococcus* „bílé“.

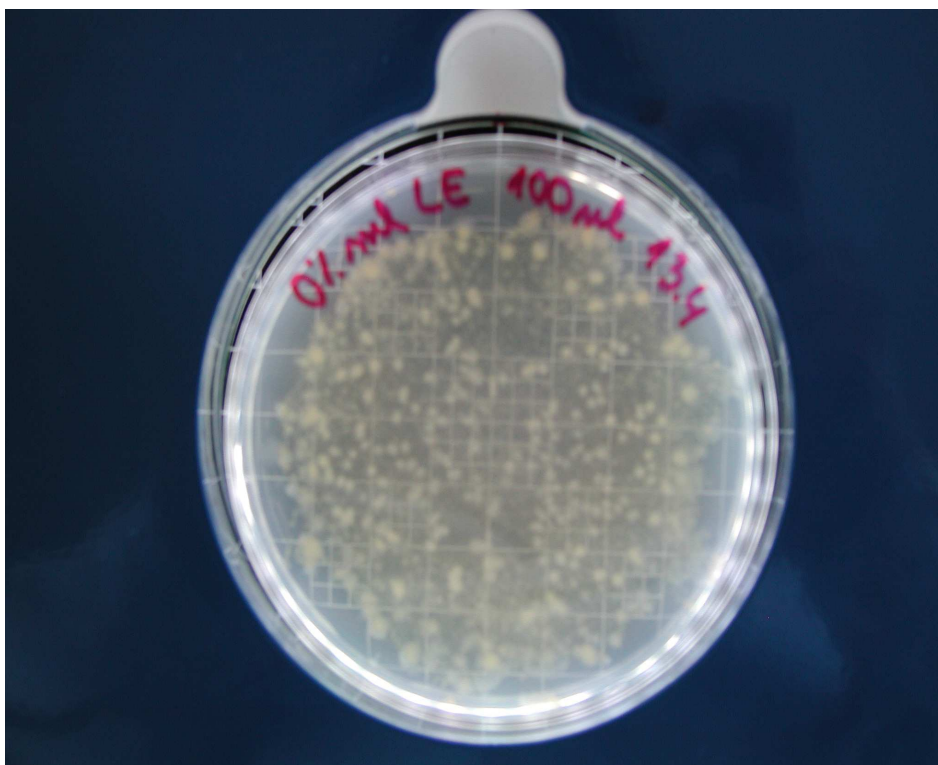


**PŘÍLOHA P IV:**

Fotografie bakteriálních kmenů OT3 +*Rhodococcus* při koncentraci 0% PVA bez  
přídavku sušeného mléka uskladněných v lednici



Fotografie bakteriálních kmenů OT3 +*Rhodococcus* při koncentraci 0% PVA s přídavkem  
sušeného mléka uskladněných v lednici



**PŘÍLOHA P V:**

Fotografie bakteriálních kmenů OT3 +*Rhodococcus* při koncentraci 5% PVA bez  
přídavku sušeného mléka uskladněných při 25°C



Fotografie bakteriálních kmenů OT3 +*Rhodococcus* při koncentraci 5% PVA s  
přídavkem sušeného mléka uskladněných při 25°C

