

Sacharolytické enzymové aktivity xanthan degradující bakterie

Hana Křemenová

Bakalářská práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Hana Křemenová
Osobní číslo: T11591
Studijní program: B2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Chemie a technologie potravin
Forma studia: prezenční

Téma práce: Sacharolytické enzymové aktivity xanthan
degradující bakterie

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popis struktury xanthanu a jeho využití.
2. Modifikace xanthanu xanthan-lyázou.
3. Xanthan-degradující bakterie.
4. Galaktomanany.
5. Degradace galaktomananu.

II. Praktická část

1. Detekce vybraných aktivit v kultivačním médiu různými metodami.
2. Porovnání detekovatelných enzymových aktivit za různých podmínek kultivace.
3. Diskuse získaných výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

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

[2] Muchová M., Růžička J., Julinová M., a kol.: Xanthan and gellan degradation by bacteria of activated sludge. *Water Science and Technology* 2009, Vol. 60, 965 ? 973.

[3] Palaniraj A., Jayaraman V.: Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering* 2011, vol. 106, 1-12.

[4] Ruijssenaars H. J., Bont J. A. M., Hartmans S.: A pyruvated Mannose-Specific Xanthan Lyase Involved in Xanthan Degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, vol. 65, 2446-2452.

[5] Ruijssenaars, H.J., Sybehartmans, Verdoes, J. A Novel Gene Encoding Xanthan Lyase of *Paenibacillus alginolyticus* Strain XL-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, Vol. 66, 3945-3950.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

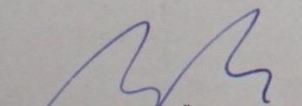
Datum zadání bakalářské práce:

10. ledna 2014

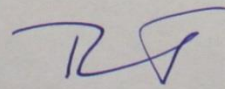
Termín odevzdání bakalářské práce:

2. května 2014

Ve Zlíně dne 3. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: HANA KRĚMENOVÁ

Obor: ČMTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 30. 4. 2014

Hana Krěmenová

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Bakalářská práce se věnovala studiu rozkladu bakteriálního exopolysacharidu xanthanu, také trisacharidu rafinózy a tetrasacharidu stachyózy bakterií *Paenibacillus* sp. XD. Výsledky získané měřením nárůstu biomasy a enzymové aktivity prokázaly schopnost degradace těchto sacharidů a také existenci extracelulárních enzymů při rozkladu xanthanu a rafinózy. Bylo zjištěno, že optimální doba růstu kultury XD v xanthanovém a rafinózovém viskózním médiu byla 3 dny.

Dále byly prováděny testy schopnosti bakterie inhibovat tvorbu biofilmu u vybraných biofilmových kultur. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že bakterie *Paenibacillus* sp. XD má největší vliv na inhibici tvorby biofilmu kulturou *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955.

Klíčová slova: xanthan, rafinóza, degradace, bakterie, enzym, polysacharid

ABSTRACT

Bachelor thesis dealt with the study of bacterial degradation of the exopolysaccharide xanthan gum, also trisaccharide raffinose and the tetrasaccharide stachyose by bacteria *Paenibacillus* sp. XD. Results obtained by measuring the increase of biomass and enzyme activities demonstrated the ability of degradation of these carbohydrates as well as the existence of extracellular enzymes during decomposition of xanthan gum and raffinose. It was found that the optimal time of growth of culture XD in xanthan and raffinose viscous medium was 3 days.

Further tests were conducted ability of bacteria to inhibit biofilm formation of selected biofilm forming cultures. The results showed that the greatest effect on the inhibition of biofilm has *Paenibacillus* sp. XD on the biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 culture.

Keywords: xanthan gum, raffinose, degradation, bacteria, enzyme, polysaccharide

Poděkování:

Velice děkuji vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi byly nápomocny v průběhu celého měření a zpracování bakalářské práce.

Dále děkuji doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. a Ing. Janě Ondrové za pomoc a užitečné rady při měření v laboratořích.

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

Ve Zlíně

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 LITERÁRNÍ REŠERŠE	12
1.1 XANTHAN.....	12
1.1.1 Xanthan-lyáza	13
1.1.2 Využití xanthanu	14
V potravinářství	14
Průmyslové využití	15
1.1.3 Degradace xanthanu	15
1.2 RAFINÓZA	17
1.3 GALAKTOMANANY.....	18
1.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti a charakterizace galaktomananů.....	19
1.3.2 Degradace guarové gumy.....	21
2 CÍLE PRÁCE	22
II PRAKTICKÁ ČÁST	23
3 MATERIÁLY A METODIKA	24
3.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	24
3.2 MATERIÁLY PRO PŘÍPRAVU ŽIVNÝCH MÉDIÍ A TESTOVÁNÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY.....	24
3.3 MIKROORGANIZMY A TYPY ŽIVNÝCH PŮD.....	25
3.3.1 Tekutá živná média	25
3.3.2 Viskózní živná média.....	26
3.3.3 Pevná živná média.....	27
3.4 NAOČKOVÁNÍ KULTUR <i>PAENIBACILLUS</i> SP. XD A JEJICH UCHOVÁNÍ	28
3.5 DETEKCE EXTRACELULÁRNÍCH ENZYMŮ.....	28
3.6 ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ	29
3.7 ZKOUŠKA ROZKLADU RAFINÓZY A STACHYÓZY KULTUROU XD	30
3.8 POSTUP MĚŘENÍ TVORBY BIOFILMU	30
3.9 MĚŘENÍ NÁRŮSTU BIOMASY A AKTIVITY ENZYMŮ V MINERÁLNÍCH MÉDIÍCH S RAFINÓZOU A XANTHANEM.....	33
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	35
4.1 VÝSLEDKY	35
4.1.1 Zkouška rozkladu rafinózy a stachyózy kulturou XD.....	35
4.1.2 Elektroforéza proteinů.....	36
4.1.3 Měření tvorby biofilmu	37
4.1.4 Měření nárůstu biomasy kultury XD v minerálním médiu s xanthanem a rafinózou.....	41
4.1.5 Stanovování enzymových aktivit v minerálním médiu s xanthanem a rafinózou	43

4.2	DISKUZE.....	59
ZÁVĚR	62
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	66
SEZNAM OBRÁZKŮ	67
SEZNAM TABULEK	69

ÚVOD

Mikrobiální polysacharidy, jako je xanthan, gellan, dextran nebo alginát, jsou široce využívány v průmyslových biotechnologických aplikacích. Xanthan je bakteriální exopolysacharid, který je produkován během růstu bakterie *Xanthomonas campestris* a má řadu významných vlastností, k nimž patří vysoká viskozita při nízkých koncentracích nebo stabilita v širokém rozsahu pH a teplot. Díky těmto vlastnostem je využíván zejména v potravinářství, především jako zahušťovadlo a stabilizační činidlo, ale své využití má také v kosmetice i lékařství. Bakterie *Paenibacillus* sp. XD je zajímavá schopností degradovat extracelulární polysacharid xanthan. Cílem výzkumu je získat další informace o sacharolytických vlastnostech tohoto mikroorganismu. Výsledky výzkumu by mohly být využitelné v průmyslových aplikacích, kde je nutné zajistit rozštěpení polysacharidů, případně zamezení tvorby biofilmu, nebo jeho odstranění, např. v oblasti medicíny. Tvorba biofilmu má v oblasti medicíny převážně negativní význam, protože umožňuje patogenním mikroorganismům lepší ochranu před imunitním systémem i léčbou antibiotiky. Stejný význam je možno vidět i v potravinářském průmyslu, kde jsou biofilmy mikroorganismů nežádoucí ve smyslu kontaminace výrobního zařízení. Právě zkoumání inhibice tvorby biofilmu některým bakteriím je věnována část této práce.

Náplní bakalářské práce byl výzkum sacharolytické enzymové aktivity kultury *Paenibacillus* sp. XD. Je to grampozitivní až gramlabilní sporulující tyčinka, která kromě xanthanu rozkládá i alginát sodný a nekompletně i škrob. Tato práce navazuje na disertační práci Ing. Markéty Muchové PhD., která se týkala studie dvou bakteriálních kultur využívajících bakteriální exopolysacharidy xanthan a gellan. Tyto mikrobiální kultury byly získány z aktivovaného kalu a v rámci disertační práce byla bakterie využívající xanthan nazvána kmen XD a bakterie degradující gellan nazvána kmen GD.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1 Xanthan

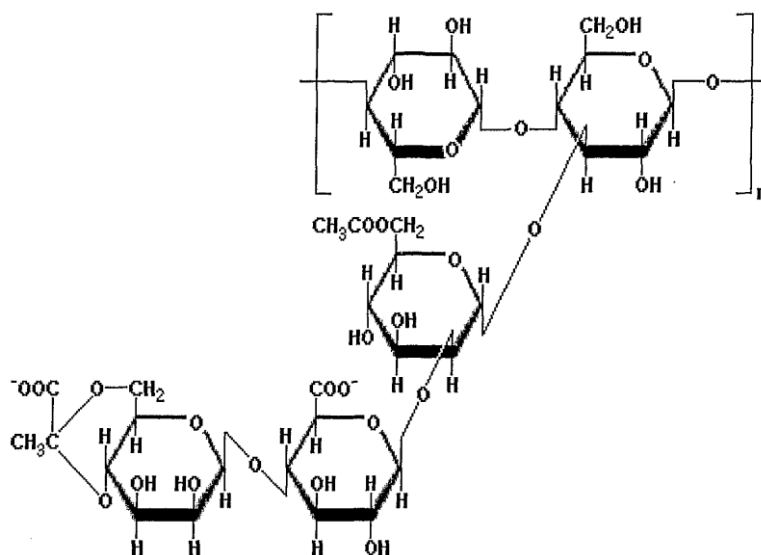
Xanthan je ve vodě rozpustný exopolysacharid, který je průmyslově produkován kultivací gramnegativní bakterie *Xanthomonas campestris* [1], která je patogenní pro rostliny [2]. Byl objeven v roce 1963 v Northern Regional Research Center (nyní The National Center for Agricultural Utilization Research) of the United States Department of Agriculture [1].

Základní struktura xanthanu je lineární, složena z D-glukopyranózových jednotek spojených vazbou $\beta(1\rightarrow4)$ (stejně jako v celulóze). Ze 3. uhlíku každé druhé glukózové jednotky vychází vedlejší trisacharidový řetězec, složený z glukuronové kyseliny, která je spojena se dvěma manózovými jednotkami. S tou, která je navázána na hlavní lineární řetězec, je spojena vazbou $\beta(1\rightarrow2)$, a s terminální manózovou jednotkou se pojí vazbou $\beta(1\rightarrow4)$ [3, 4], viz obrázek 1. Přibližně 50% konečných manózových zbytků je substituovaných pyruvát a neterminální zbytky obvykle nesou acetylovou skupinu na C6 [1]. Vedlejší trisacharidový řetězec je v souladu s hlavním řetězcem složeným z β -D-glukózových jednotek a stabilizuje celkovou konformaci nekovalentními interakcemi, jako jsou vodíkové vazby. V roztoku se boční řetězce ovinou kolem hlavního řetězce a tím chrání $\beta(1\rightarrow4)$ vazby. Tato ochrana je odpovědná za stabilitu xanthanu vůči hydrolyze [1]. Trisacharidové větve jsou spojeny s hlavním řetězcem polymeru. Výsledný řetězec může existovat jako jednošroubovice, nebo jako dvojšroubovice či trojšroubovice [5], které interagují s dalšími polymerními molekulami za vytvoření komplexu. Molární hmotnost je v rozsahu $2 \times 10^6 - 20 \times 10^6$ g/mol [1].

Předpokládá se, že syntéza xanthanu je podobná syntéze exopolysacharidů jiných gramnegativních bakterií. Syntetický postup může být rozdělen do 3 částí: (I) příjem jednoduchých sacharidů a přeměna na nukleotidové deriváty. (II) Shromáždění pentasacharidových podjednotek připojených na isopentylpyrofosfátový nosič. (III) Polymerizace pentasacharidových opakujících se jednotek a jejich sekrece [1].

Hlavní řetězec xanthanu je formován postupným doplňováním D-glukóza-1-fosfátu a D-glukozy ze 2 molů UDP D-glukozy. Následně jsou přidány D-manóza a D-glukuronová kyselina z GDP manózy a UDP-glukuronové kyseliny. O-acetylové skupiny jsou převedeny z acetyl-CoA na vnitřní manózový zbytek a pyruvát z fosfoenolpyruvátu je připojen ke konečné manóze. Každý z těchto kroků vyžaduje pro kompletnost specifické substráty

a specifické enzymy. Pokud jeden substrát nebo enzym chybí, bude tento krok blokován [1].



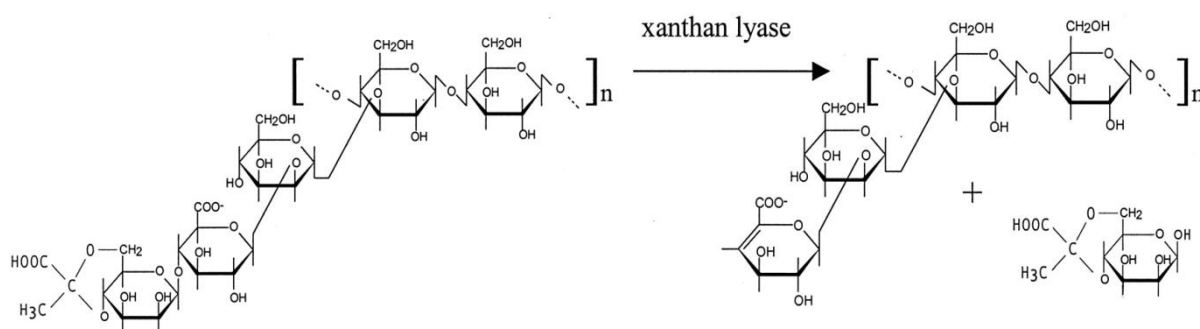
Obr. 1 Struktura xanthanu [6]

1.1.1 Xanthan-lyáza

Smíšené nebo čisté bakteriální kultury, které rostou na xanthanu, obecně produkují směs xanthan-degradujících enzymů. Jeden z těchto enzymů, který je vhodný pro modifikaci xanthanu, je xanthan-lyáza. Ta odstraňuje konečný manozylový zbytek přes β -eliminaci, za vzniku volné manózy a tetrasacharidové opakující se jednotky. Byly popsány nescifická xanthan-lyáza [7] a specifická xanthan-lyáza štěpící pyruvátovanou manózu [8]. Výsledný polytetrasacharid se liší od polytetrasacharidu produkovaného mutanty *X. campestris*: xanthan-lyázou modifikovaný xanthan nese jako koncový zbytek postranního řetězce 4,5-*en*-glukuronovou kyselinu namísto kyseliny glukuronové. Dosud nebyly zveřejněny žádné aminokyselinové sekvence xanthan-lyázy, a tudíž neexistují žádné informace o homologii nebo příbuznosti s jinými enzymy degradujícími polysacharidy [9]. Aktivita xanthan-lyázy může být snadno monitorována měřením nárůstu A_{235} způsobeného konjugací vytvořené vazby C=C s karboxylátovou skupinou ve zbytku uronové kyseliny [10]. Dvojná vazba vytvořená xanthan lyázou může být oxidována iodistanem. Je získán oxidační produkt, který reaguje s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) za vzniku chromoforu při 590 nm [11].

Xanthan-lyáza byla poprvé získána Sutherlandem z *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp. a smíšených kultur [12]. Působení těchto enzymů závisí na stupni pyruvace a acetylce xanthanu.

Již dříve byla izolována bakterie degradující xanthan, *Paenibacillus alginolyticus* Strain XL-1 a byla charakterizována specifická xanthan-lyáza produkovaná tímto mikroorganizmem [9].



Obr. 2 Působení specifické xanthan-lyázy [9]

1.1.2 Využití xanthanu

Xanthan je široce využíván jako stabilizační činidlo v potravinářském, farmaceutickém a ropném průmyslu, protože vykazuje vynikající reologické vlastnosti, jako je např. pseudoplasticita, vysoká viskozita při nízkých koncentracích a tolerance k širokému rozsahu hodnot pH a teplot [13, 14].

V potravinářství

Nejvíce se xanthan využívá v potravinářském průmyslu např. jako zahušťovadlo pro ovocné dřeně a čokolády, do dresingů, kečupů i pečiva. Při výrobě pečiva se xanthan používá pro zvýšení vazby vody během pečení, skladování, prodlužuje trvanlivost pečiva a stabilitu při zmrazování a rozmrazování pečiva. V jemných pečivech může být xanthan také použit jako vaječná náhražka, zejména obsah bílku může být snížen bez ovlivnění vzhledu a chuti. Xanthan také přispívá k „hladkosti“ pečiva a začlenění vzduchu do těsta. Zlepšuje objem, texturu, uvolňování aroma a snižuje kalorie v pečivu a bezlepkovém chlebu [15].

Směs xanthanu, karagenanu, guarové gumy a galaktomananu je výborným stabilizátorem zmrzlin, šerbetů, milkshakeů a vodových zmrzlin. Xanthan se používá také do dre-

singů, ty mají díky němu vynikající dlouhodobou stabilitu emulze a relativně konstantní viskozitu v širokém rozmezí teplot [15].

Vlastnosti xanthanu jsou využívány u sirupů a polev. Máslové sirupy a čokoládové polevy obsahující tento polysacharid mají vynikající konzistenci a tokové vlastnosti a díky jejich vysoké viskozitě se projeví silně a chutně na produktech, jako jsou palačinky, zmrzlina a vařené maso. Mražené šlehačkové koncentráty mají pevnou strukturu a vynikající stabilitu při zmrazování a rozmrazování. Nízké hladiny xanthanu poskytují vysokou viskozitu v omáčkách a šťávách při kyselém i neutrálním pH. Viskozita je také velmi stabilní vůči změnám teploty a je zachována při různých dlouhodobých skladovacích podmínkách [15].

Průmyslové využití

Xanthan má široké využití v chemickém průmyslu, např. v zubních pastách se používá pro dosažení správné konzistence, kromě jiného se může použít i při výrobě výbušnin [1]. Speciální reologické vlastnosti xanthanu jsou technologicky využitelné v ropném průmyslu pro ropné vrty, k čištění potrubí atd. Vzhledem k tomu, že má xanthan vynikající kompatibilitu se solí a odolnost proti tepelné degradaci, může být také použit jako doplňková látka pro vrtné výplachy. V zemědělství je xanthan používán ke zlepšení tokových vlastností roztoků fungicidů, herbicidů a insekticidů. Pomáhá kontrolovat úlet postřikové kapaliny a lepivost, čímž zvyšuje dobu kontaktu mezi pesticidem a plodinou. Díky tokovým vlastnostem xanthanu a jeho stabilitě při širokém rozsahu pH je xanthan využíván i jako přísada do čistících prostředků. Xanthan je používán i jako pomocná suspenze nebo stabilizátor při výrobě papíru a lepenky, a to zejména pokud jsou určeny pro styk s potravinami. Zlepšuje také tokové vlastnosti šampónů a tekutých mýdel, podporuje stabilitu a obohacuje krémovou pěnu [1].

1.1.3 Degradace xanthanu

Mezi xanthan-degradující bakterie patří *Paenibacillus alginolyticus* kmen XL-1, který byl vyizolován ze směsné kultury z půdy. Získání *Paenibacillus alginolyticus* kmene XL-1 z obohacené kultury probíhalo na minerálním médiu se 3 g/l xanthanu. Kultury byly inkubovány na třepačce při 30°C a každý den byl odebrán 1 ml a přenesen do 100 ml čerstvého média. Po 30-ti každodenních transferech byly izolovány čisté kultury, které byly

přeočkovány na pevné minerální médium obsahující 5g/l manózy nebo xanthanu a kvasničný autolyzát (0,05 g/l). Misky byly obarveny Congo červení, kolem kolonií byly pozorovány červené kruhy, což dokazovalo přítomnost β -1,4-glukanu. To naznačuje, že hlavní řetězec xanthanu zůstal neporušen, zatímco postranní řetězce byly odstraněny, odhalil se hlavní řetězec a umožnila se jeho interakce s Congo červení. Zbarvení Congo červení ukazuje, že enzymy vylučované kmenem XL-1 pouze odstraňují zbytky z xanthanových postranních řetězců, zatímco dlouhé úseky hlavního řetězce s β -1,4-glukanem zůstávají nedotčeny. Vzhledem k tomu, že pouze 28% xanthanového uhlíku bylo přeměněno na CO₂, biomasu, nebo redukující cukry, postranní řetězce byly zřejmě odstraněny jen částečně. Bakterie *Paenibacillus alginolyticus* Strain XL-1 ke svému růstu vyžaduje thiamin a biotin [8].

Liu a kol. zkoumali biodegradaci xanthanu nově vyizolovanou bakterií *Cellulomonas* sp. LX [16]. Tento druh vyizolovali z půdy, a to tak, že 1 g půdního vzorku inokulovali do minerálního média s 0,5 % xanthanu jako jediného zdroje uhlíku a energie a inkubovali kulturu při 30°C na třepačce. Když viskozita média klesla na úroveň vody, bylo 10-násobně zředěno sterilním fyziologickým roztokem a přeneseno na misky s xanthanovým médiem (XY médium), které obsahovalo 0,3 % xanthanu, 0,05 % kvasničného autolyzátu a 1,5 % agaru. Bylo inkubováno při 30°C přes noc. Kolonie byly náhodně vybrány a pěstovány na xanthanovém médiu (XYG médium) obsahujícím 0,3 % xanthanu, 0,05 % kvasničného autolyzátu a 0,08 % glukózy na třepačce při 30°C. Po inkubaci, která trvala 24 hodin, byly izoláty odebrány za testování snížení viskozity supernatantu, ve kterém bylo použito jako kontrola médium bez inokulace. Poté byla stanovena aktivita vyselektovaných kultur. Bylo vybráno okolo 600 kolonií z XY média pro zjištění růstu xanthan-degradujících kmenů na XYG médiu. Glukóza byla v tomto selekčním médiu přidána pro zvýšení rychlosti růstu i přes to, že inhibuje produkci enzymů. Rozsah xanthanové degradace byl tedy mnohem vyšší bez přídavku glukózy (obr. 3) [16]. Izolát prokázal růst na xanthanu jako jediném zdroji uhlíku a energie, ačkoliv bylo po degradaci xanthanu monitorováno zvýšené množství redukujících cukrů [17]. Xanthan-degradující enzymy vykazovaly maximální aktivitu při pH 6 ve fosfátovém pufru a při teplotě 40°C.

Hashimoto a kol. kultivovali kulturu *Bacillus* sp. Strain GL 1 v tekutém médiu obsahujícím xanthan při 30°C a po dobu 36 hodin. Zjistili, že viskozita média se snižovala se zvyšujícím se nárůstem buněk a dosáhla úrovně vody. Tyto výsledky ukazují, že byl xanthan depolymerizován některými degradačními enzymy. Jedním z těchto enzymů je xan-

thanáza (β -D-glukanáza), která katalyzuje hydrolýzu hlavního řetězce xanthanu [14]. Její velikost je 173 kDa a při optimálním pH 6 a teplotě 45 °C je schopna štěpit modifikovaný xanthan na tetrasacharidové jednotky [17]. Druhým enzymem je xanthan-lyáza, která štěpí vazbu mezi terminálními manozylóvými a glukuronovými zbytky v postranním řetězci xanthanu. Tento enzym byl inkubován v 1 ml reakční směsi obsahující 0,05% xanthan a 5 mM pufr fosforečnan draselný. Produkovaná xanthan-lyáza byla monomerní s molekulovou hmotností 75 kDa. Největší aktivitu měla při pH 5,5 a teplotě 50°C. Byla vysoce specifická pro xanthan, ale i jiné polysacharidy, jako jsou alginát, fukoidan, gellan, pektin, avšak polysacharidy strukturně odpovídající gellanu byly jako substrát inertní [14]. Xanthan lyáza se zdála být specifická pro pyruvátovaný xanthan, protože aktivita enzymu k nativnímu xanthanu (100%) byla daleko vyšší než k modifikovanému bez pyruvátových zbytků (69%) [14].

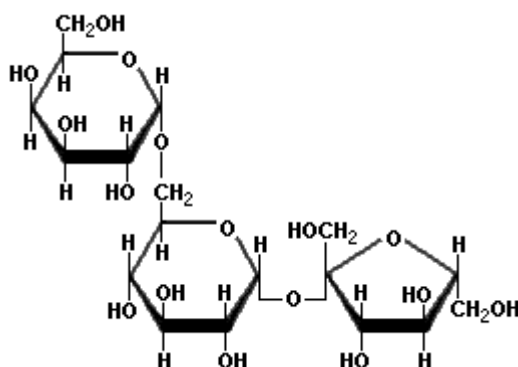
1.2 Rafinóza

Rafinóza je trisacharid složený z galaktózy, glukózy a fruktózy, chemickým názvem α -D-galaktopyranozyl-(1 \rightarrow 6)- α -Dglukopyranozyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruktofuranozid. Je přítomna ve všech zralých a suchých semenech luštěnin. Patří do skupiny oligosacharidů z rodiny rafinózy (RFO), což jsou mono-, di-, tri- a tetra-galaktozidy sacharózy, kam se řadí také stachyóza, verbaskóza a ajugóza [18]. Za normálních okolností není rafinóza převládajícím členem této skupiny oligosacharidů. Je jí stachyóza, která se běžně nachází ve zralých suchých semenech luskovin a je převládajícím oligosacharidem z RFO u mnoha druhů luštěnin [19].

Rafinóza může být hydrolyzována odštěpením D-galaktózy prostřednictvím enzymu α -galaktozidázy, která se nenachází v tlustém střevě [20]. Proto byly RFO identifikovány jako hlavní faktory nadýmání v luštěninách a jiných semenech. Jejich konzumace je důvodem nadýmání lidí a zvířat [21]. Přes nedostatek α -galaktozidázové aktivity ve střevní sliznici lidí a zvířat, jsou RFO metabolizovány bifidobakteriemi a jinými bakteriemi tlustého střeva, což vede k tvorbě převážně vodíku a oxidu uhličitého [21]. Byly doporučeny různé metody pro odstranění nadýmavosti RFO, zahrnující enzymatickou úpravu, namáčení nebo vaření ve vodě a v tlumivých roztocích, klíčení, extrakce rozpouštědlem, loupání

a ozáření [21]. Je také možná redukce těchto oligosacharidů v semenech luskovin způsobem pěstování a genetickou modifikací. Je však pravděpodobné, že odstranění RFO by mělo nepříznivý vliv na toleranci semen k vysychání a skladovatelnost [22].

Několik enzymů, jmenovitě příslušné syntázy nebo galaktozyltransferázy, se podílejí na biosyntéze RFO v semenech luskovin. Rafinóza-syntáza je klíčový enzym, který usměrňuje sacharózu do RFO. Přenáší galaktózovou část z galaktinolu na sacharózu a tvoří rafinózu a *myo*-inozitol [23].



Obr. 3 Chemická struktura rafinózy [24]

1.3 Galaktomanany

Galaktomanany se vyskytují jako zásobní polysacharidy v endospermu semen některých luštěnin. Semenné polysacharidy jsou jedny z nejdůležitějších kategorií gum pocházejících z rostlin, používaných v potravinářském průmyslu. Hrají důležitou roli jak v potravinářském zpracování, tak ve zlepšení textury potravinových výrobků [25]. Výskyt polysacharidů v rostlinných semenech je především ve třech formách: jako neškrobový polysacharid, jako sliz v osemeni a jako materiál buněčné stěny semenných děložních lístků a endospermu. Chemické složení, jemná struktura a fyzikální a funkční vlastnosti těchto polysacharidů se mohou významně lišit s rostlinným zdrojem, podmínkami růstu a metodou produkce. Semenné polysacharidy (neškrobové) jsou také důležitými zdroji vlákniny, která se může projevit například snížením kalorického příjmu, kontrolou hladiny glukózy a inzulínu v krvi a snížením rizika srdečních chorob a rakoviny tlustého střeva [26].

Galaktomanany jsou heteropolysacharidy složené z $\beta(1\rightarrow4)$ -D-mananového hlavního řetězce s D-galaktózovou větví připojenou vazbou $\alpha(1\rightarrow6)$. Liší se od sebe navzájem poměrem manóz/galaktóz. Tyto gummy jsou většinou získávány z endospermu dvouděložných semen mnoha rostlin, zejména z čeledi bobovitých. Endosperm má několik funkcí: slouží jako zásoba živin pro klíčení semen a zadržuje vodu, brání úplnému vysušení se-

men. Jsou čtyři hlavní zdroje semenných galaktomananů: plody rohovníku obecného (*Ceratonia siliqua*), tzv. svatojánské chleby, guarové boby (*Cyamopsis tetragonoloba*), tara (*Caesalpinia spinosa Kuntze*) a pískavice řecké seno (*Trigonella foenum-graecum L.*). Mezi nimi má pouze svatojánský chleba a guarová guma značný průmyslový význam. Využití tary a pískavice je omezeno kvůli dostupnosti a ceně [27].

Galaktomannan tvoří při hydratování ve vodě viskózní, koloidní disperzi. Pro své schopnosti vaznosti vody a zvyšování viskozity je používán v mnoha průmyslových odvětvích, jako je textilní, potravinářský, ropný a farmaceutický průmysl, papírenství, hornictví a pro výbušniny [25].

Molární poměr galaktózy k manóze se liší podle rostlinného původu, ale je obvykle v rozmezí od 1.0 : 1.0-1.1; 1.0 : 1.6-1.8; 1.0 : 3.0; a 1.0 : 3.9-4.0 pro pískavici, guar, taru, a svatojánský chleba, v tomto pořadí. Konformace β -D-mananů v hlavním řetězci, vázaných vazbou (1 \rightarrow 4), je podobná celulóze tím, že se nerozpouští ve vodě. Galaktózové postranní skupiny jsou považovány za prostorové rušitele meziřetězcové asociace a krystalizace, čímž se galaktomananům dodá určitá rozpustnost ve vodě. V důsledku toho se zvyšuje rozpustnost galaktomananů se stupněm galaktózylové substituce: gumy pískavice a guaru se snadno rozpustí ve studené vodě, ale k dostatečnému rozpuštění galaktomananu svatojánského chleba ve vodě je nutný ohřev. Dvě hlavní skupiny galaktomananových polysacharidů jsou získávány z endospermu semen rostlin, z nichž drtivá většina pochází z čeledi bobovitých a z mikrobiálních zdrojů, zejména z kvasinek a hub [25].

Hlavní postup získání galaktomananů ze semen je kombinací extrakčních a purifikačních procesů. Nejpoužívanější separační postupy: filtrace, prosévání, v některých případech jsou od sebe odděleny ručně. Endosperm oddělený ze semen se rozpustí ve vodě (při teplotách, které se mohou pohybovat mezi 20 a 120°C), následuje srážení za použití alkoholu (v poměru voda: alkohol, který se může pohybovat mezi 1:1 a 1:3). Nebyly zaznamenány žádné účinky alkoholu na strukturu galaktomananů [28].

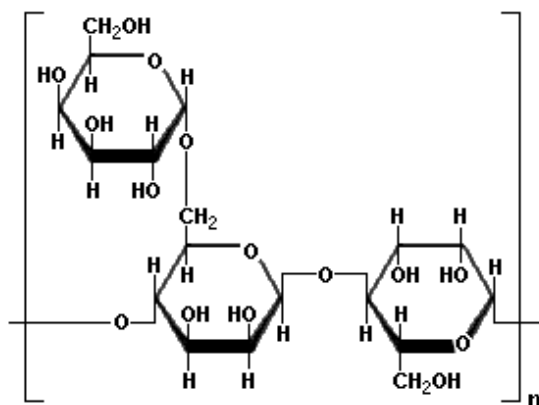
1.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti a charakterizace galaktomananů

Manóza je v galaktomananovém polymeru opatřena cis-OH skupinami. Z tohoto důvodu je očekávána depozice za vzniku vodíkové vazby mezi řetězci polymananu, pokud sousední skupiny jako galaktózy nevyvíjí sterickou překážku zabraňující přiblížení galak-

tomananových řetězců a bránící manózovým cis-OH skupinám ve vytvoření vodíkové vazby [25].

Porovnáním různých galaktomananů je patrné, že dodatečné síťování pomocí vodíkových můstků vede k nižší rozpustnosti, zvýšení substituce způsobuje vyšší rozpustnost. Nejlepší rozpustnost vykazuje galaktomanan-1,1, ve kterém vysoká substituce galaktózou způsobí takovou sterickou překážku, že se snadno rozpouští ve studené vodě a zamezuje na určitou dobu útoku degradujících enzymů. Nicméně, galaktomanan-1,2, kde v průměru každá druhá manózová jednotka je blokována galaktózou, vykazuje mnoho sterických zábran a málo vodíkových vazeb mezi řetězci, které se okamžitě hydratují. Galaktomanan-1,4 se nerozpouští ve studené vodě, ale jeho rozpustnost ve vroucí vodě je již lepší, než galaktomannanu-1,5 vzhledem k mírně vyššímu stupni substituce galaktózových postranních skupin ve srovnání s galaktomannanem-1,5 [25].

Variace ve struktuře galaktomananů, zejména poměr mezi manózami a galaktózami (M/G) a jemná struktura, způsobují významné změny v rozpustnosti, viskozitě, v interakcích mezi galaktomanany a jinými polysacharidy. Galaktomanany s vyšším obsahem galaktózy jsou obvykle rozpustné ve vodě a vykazují menší tendenci tvořit gely v důsledku vzájemného synergického působení, ve srovnání s galaktomanany s nižším poměrem M/G. Vysoká rozpustnost galaktomananů s vyšším obsahem glukózy byla přičítána přítomnosti velkého počtu vedlejších řetězců, které udržují hlavní manózové řetězce dostatečně daleko, aby se zabránilo mezimolekulárním interakcím. Na druhé straně galaktomanany s menšími vedlejšími řetězci (vyšší M/G poměr) mohou interagovat s jinými polysacharidy přes jejich dlouhé bloky nesubstituovaných manózových jednotek [25].



Obr. 4 Chemická struktura guarové gumy [29]

1.3.2 Degradace guarové gummy

V roce 1993 byl poprvé identifikován enzym s názvem "Galaktomananáza", který je schopen hydrolyzovat $\alpha(1\rightarrow6)$ a $\beta(1\rightarrow4)$ vazby v guarovém polymeru. Následně, v roce 1996, Kelly a kol. objevili enzymy α -galaktozidázy a β -mananázy produkované mikroorganismy *Thermotoga neapolitana* 5068a *Thermotoga maritime* [30]. Byly prodávány jako pyrolázy a široce využívány od roku 1999. Tyto enzymy mají vynikající schopnost snižovat viskozitu guarové gummy. Mají ale také nevýhodu v tom, že jsou příliš aktivní při teplotách 20 – 40°C, což vede k nežádoucí předčasné degradaci. Byl objeven nový enzym (DtManB), mananáza produkovaná mikroorganizmem *Dictyoglomus thermophilum* CGMCC 7283, který dokáže štěpit gel při vysokých teplotách a tím zmírnit předčasnou degradaci. Vliv teploty na aktivitu tohoto enzymu byl posuzován inkubací DtManB s 0,35% (w/v) hydroxypropylguarem při teplotách v rozmezí od 50 do 90°C v roztoku pufru fosforečnanu sodného (100 mM, pH 7,0). Teplotní stabilita byla zkoumána inkubací vzorků enzymu při různých teplotách v pufru fosforečnanu sodného (100 mM, pH 6,0). Bylo zjištěno, že excelentní aktivitu a stabilitu má enzym při 80°C, zato při nízkých teplotách má malou aktivitu, což zmírňuje nežádoucí předčasný rozklad [31].

2 CÍLE PRÁCE

- Provéřit rozklad xanthanu sacharolytickou bakterií *Paenibacillus* sp. XD jejím zaočkováním xanthanového pevného a viskózního média a alginátového viskózního média.
- Sledovat změnu rozpuštěného organického uhlíku v médiích se stachyózou a rafinózou, zaočkováných zkoumaným mikroorganismem po 2, 4 a 7 denní kultivaci, a tak prověřit rozklad těchto sacharidů.
- Zjistit aktivity extracelulárních enzymů produkovaných mikroorganismem *Paenibacillus* sp. XD odpovědných za degradaci vybraných sacharidů, konkrétně exopolysacharidu xanthanu a trisacharidu rafinózy.
- Prozkoumat schopnost testovaného mikroorganismu inhibovat tvorbu biofilmu některých biofilmových kultur na základě měření absorbance biofilmů obarvených krystalovou violetí.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 MATERIÁLY A METODIKA

3.1 Přístrojové vybavení

Laminární box Telstar Bio-II-A, výrobce Telstar (Španělsko)

Autokláv SANoclav LaS-3-20-McS-J, výrobce DEKRA (Německo)

Vortex, typ MS1, výrobce IKA (Brazílie)

Váhy typu S1-64A, výrobce DENVER INSTRUMENT (Německo)

Mrazák MY BIO-ULTF-80, výrobce DAIREI (Dánsko)

Biologický termostat BT 120, Laboratorní přístroje, k. p., Praha

Vodní a olejová lázeň – Německo

Zařízení pro horizontální elektroforézu Mini Gel, OWL (USA)

Zdroj pro elektroforézu MP 300V, Major Science

Třepačka s kruhovým pohybem, typ 3020, GFL (Německo)

Třepačka vratná, typ 3018, GFL (Německo)

Automatické pipety, BIOHIT (Finsko)

Centrifuga Jouan-MR23i, výrobce Jouan (Francie)

Centrifuga Rotanta 460 R, výrobce Hettich Zentrifugen (Německo)

Fotometr Sunrise, výrobce TECAN (Rakousko)

TOC analyzátor typu Schimadzu 500 A, Schimadzu (Japonsko)

DensiLaMeter, typ Densi-2, EMO Brno

3.2 Materiály pro přípravu živných médií a testování enzymové aktivity

Xanthan – Xanthan gum, Fluka, Švýcarsko

D-glukosa monohydrát p. a. – Lachema, ČR

Sójový pepton – Soya pepton, Himedia, Indie

Trypton – Casein Enzyme Hydrolysate – Type I, Himedia, Indie

Kvasičný autolysát – Yeast Autolysate, Himedia India

Rafinosa – D-(+)-Raffinose pentahydrate, Fluka, Švýcarsko

Stachyosa – Stachyose hydrate from *Stachys tubrifera*, Sigma Aldrich, Švýcarsko

Alginát sodný – Alginic acid Sodium salt from brown algae, Fluka, Švýcarsko

TYA – Tryptone Yeast Extract Agar, Himedia, Indie

Chlorid sodný p. a. – Sodium chloride G. R., Lach-Ner, ČR

Chromogenní substrát 4-Nitrophenyl β -D-glucoopyranoside, Sigma Aldrich, Švýcarsko

Chromogenní substrát 4-Nitrophenyl α -D-galactopyranoside, Sigma Aldrich, Švýcarsko

Laboratorní chemikálie čistoty p. a. (krystalová violet' apod.) – od běžných dodavatelů

3.3 Mikroorganismy a typy živných půd

Mikroorganismy:

Paenibacillus sp. XD, izolovaná v rámci doktorské práce M. Muchové [17].

Další kultury mikroorganismů byly získány buď z České sbírky mikroorganismů (CCM) nebo ze sbírky Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, kde jsou uchovávány při -80°C v glycerolu.

3.3.1 Tekutá živná média

Fyziologický roztok

Připraven rozpuštěním 8,5 g NaCl v 1000 ml destilované vody. Byl použit pro měření tvorby biofilmu a pro tvorbu buněčných suspenzí o zákalu 2. stupně McFarlandovy stupnice.

Minerální médium

Pro přípravu 100 ml minerálního média byly použity roztoky $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (23,9 g/l) 8 ml, KH_2PO_4 (9,078 g/l) 2 ml, NH_4Cl (50 g/l) 1 ml, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l) 1 ml, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l) 1 ml, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l) 1 ml, NaCl (50 g/l) 1 ml, destilovaná voda 85 ml, roztok stopových prvků ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,043 g/l; H_3BO_3 0,057 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,043 g/l; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,037 g/l; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,040 g/l) 0,1 ml a kvasničný autolyzát 10 mg

Roztoky a gely pro elektroforézu:

Separční gel: 3 ml 30% roztoku akrylamidu; 1,5 ml Tris pufru, pH 8,8; 1,4 ml deionizované vody; 30 µl 20% SDS; 2,5 µl *N, N, N', N'*-tetra-methylendiamid (TEMED); 60 µl 10% persíranu amonného.

Koncentrační gel: 0,8 ml 30% roztoku akrylamidu; 1,2 ml Tris pufru, pH 6,8; 2,8 ml deionizované vody; 25 µl 20% SDS; 6 µl *N, N, N', N'*-tetra-methylendiamid (TEMED); 25 µl 10% persíranu amonného.

30% roztok akrylamidu (2,67% C): 29,2 g akrylamidu; 0,8 g *N, N'*-metylenbisakrylamidu, doplnit do 100 ml deionizovanou vodou

Vzorkový pufr: 0,062 M Tris-HCl; 5% merkaptoethanol; 10% glycerol; 0,01 g bromfenolové modři, upravit pH na 6,8, doplnit deionizovanou vodou do požadovaného objemu

Tris pufr, pH 8,8: Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), deionizovaná voda, upravit pH na 8,8, doplnit deionizovanou vodou do požadovaného objemu

Tris pufr, pH 6,8: Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), deionizovaná voda, upravit pH na 6,8, doplnit deionizovanou vodou do požadovaného objemu

Elektrodový pufr: Tris, glycin, SDS, doplnit deionizovanou vodou do požadovaného objemu, popř. upravit pH na hodnotu 8,3-8,6

Odbarvovací roztok: 25% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová

Tryptózo-sójový bujón (TSB) s glukózou

Pro testování tvorby biofilmu. Na 200 ml bylo naváženo 3,4 g tryptonu, 0,6 g sójového peptonu, 1 g chloridu sodného, 0,5 g fosforečnanu draselného a 1 g glukózy (množství glukózy upraveno na koncentraci 5 g/l dle práce Schlag a kol.). Sterilizace přefiltrováním přes membránový filtr MILLIPORE MCE s velikostí pórů 0,22 µm.

3.3.2 Viskózní živná médiaXanthanové médium

Pro kultivaci *Paenibacillus* sp. XD a získání extracelulárních enzymů pro elektroforézu. Bylo připraveno rozpuštěním 1 g xanthanu ve 100 ml minerálního média (10 g/l). Pro měření nárůstu biomasy a aktivity enzymů bylo připraveno médium o koncentraci 300 mg/l tak, že v 80 ml minerálního média bylo rozpuštěno 0,024 g xanthanu.

Přidaný xanthan se vždy nechal v minerálním médiu přes noc nabobtnat při laboratorní teplotě a 2. den se provádělo jeho rozpouštění, kdy se lahvička s nabobtnaným xanthanem v minerálním médiu vložila do vodní lázně o 60°C a za občasného protřepání byl xanthan přibližně po 1 hodině rozpuštěn. Poté bylo médium rozplněno a sterilizováno v autoklávu při 121 °C 20 minut. Pro koncentraci 300 mg/l nebylo třeba xanthan rozpouštět v horké lázni, pouze stačilo protřepat lahvičku po nabobtnání xanthanu.

Minerální médium s alginátem

Pro kultivaci a získání extracelulárních enzymů. Pro přípravu 100 ml média byl rozpuštěn 1 g alginátu sodného ve 100 ml minerálního média (10 g/l).

Minerální médium se stachyózou a rafinózou

Pro zkoušku rozkladu stachyózy a rafinózy (stanovením rozpuštěného organického uhlíku DOC). Bylo připraveno 180 ml minerálního média: Na₂HPO₄·12H₂O (23,9 g/l) 16 ml, KH₂PO₄ (9,078 g/l) 4 ml, NH₄Cl (50 g/l) 2 ml, MgSO₄·7H₂O (10 g/l) 2 ml, Fe(NH₄)₂·(SO₄)₂·6H₂O (3 g/l) 2 ml, CaCl₂·2H₂O (1 g/l) 2 ml, NaCl (50 g/l) 2 ml, destilovaná voda 150 ml, roztok stopových prvků (MnSO₄·5H₂O 0,043 g/l; H₃BO₃ 0,057 g/l; ZnSO₄·7H₂O 0,043 g/l; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,037 g/l; Co(NO₃)₂·6H₂O 0,025 g/l; CuSO₄·5H₂O 0,040 g/l) 0,2 ml a kvasničný autolyzát 10 mg. Toto minerální médium bylo rozplněno do 18 lahviček (objem 100 ml) po 9 ml a ty sterilizovány při 121°C 25 minut.

Zásobní roztoky stachyózy a rafinózy byly připraveny tak, že se 30 mg každého sacharidu rozpustilo v 10 ml destilované vody. Tyto roztoky byly sterilizovány filtrací přes mikrofiltr (MILLIPORE MCE 0,22 μm) do sterilních zkumavek. Po sterilizaci bylo do 8 lahví s minerálním médiem dávkováno po 1 ml zásobního roztoku rafinózy a do 8 lahví po 1 ml zásobního roztoku stachyózy. Po dokonalém promíchání tak vznikla koncentrace 300 mg/l.

Pro měření nárůstu biomasy a aktivity enzymů bylo připraveno 80 ml minerálního média s rafinózou o koncentraci 300 mg/l.

3.3.3 Pevná živná média

Tryptonový agar s kvasničným extraktem a glukózou (TYA-GLU)

Použit pro naočkování biofilmových kultur. Byl připraven navážením 4,2 g TYA do 200 ml destilované vody za přídavku 1 g glukózy.

Tryptonový agar s kvasičným extraktem (TYA)

Pro kultivaci *Paenibacillus* sp. XD. Navážka 2,1 g TYA byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody.

Minerální agar s xanthanem

Připraven navážením 1,9 g základu pro minerální agar (1 g K_2HPO_4 ; 1,1 g NH_4Cl ; 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g $CaCl_2$; 16,6 g agaru), 0,5 g xanthanu, 0,01 g kvasničného autolyzátu a 0,1 ml roztoku stopových prvků. Rozpuštění ve 100 ml destilované vody a sterilizace při 115°C 35 minut.

3.4 Naočkování kultur *Paenibacillus* sp. XD a jejich uchování

Zdrojem byla kultura *Paenibacillus* sp. XD uchovávaná od roku 2009 v glycerolu v mrazáku při -80°C. Tato kultura byla sterilní kličkou naočkována do tekutého minerálního média s xanthanem a na xanthanový agar na Petriho misce. Inkubace probíhala několik dní při 25°C, přičemž tekuté médium bylo dáno na třepačku. Nárůst biomasy se projevil ztekucením média a mléčným zákalem, v případě xanthanového agaru tvorbou jamek.

Naočkované minerální médium s xanthanem se po ztekucení (po 3 dnech kultivace) rozlilo po 10 ml do centrifugačních zkumavek, které byly centrifugovány při 4°C a 10 000 g po dobu 15 minut. Supernatant se poté slil do zkumavek, přefiltroval přes mikrofiltr do plastových zkumavek, které se poté vložily do mrazáku s -80°C.

K biomase usazené na dně centrifugačních zkumavek se přidaly 2 ml sterilního fyziologického roztoku, směs se promíchala a následně se přidalo 0,5 ml sterilního glycerolu a opět promíchalo. Takto uchované buňky se rozpipetovaly do eppendorfek (do každé 0,2 ml) a daly do mrazáku s -80°C.

3.5 Detekce extracelulárních enzymů

Bylo provedeno naočkování minerálního média s xanthanem a alginátem. Z nakultivované kultury XD na Petriho misce se sterilní kličkou přeneslo inokulum do 2 ml fyziologického roztoku tak, aby zákal suspenze odpovídal 2. Stupni McFarlandovy stupnice. 200 µl této suspenze se nadávkovalo do médií a lahvičky se daly inkubovat na třepačky při 25 °C.

Po 5 dnech kultivace byla kultura už dost narostlá. Z obou lahviček se nadávkoval 1 ml do 2 eppendorfek a provedla se centrifugace na zbavení buněk (režim centrifugace: tep-

lota 20°C, 10 000 g, 15 minut). Supernatant se odlil do zahušťovacích kolonek, ty se vložily do nových eppendorfek a byla provedena 2. centrifugace, při níž nízkomolekulární látky a voda protekly přes filtr kolonek a zůstaly jen vysokomolekulární látky větší, než 3000 Da. Kolonky se daly do nových eppendorfek a obrátily dnem vzhůru, aby při 3. centrifugaci ztekly látky z kolonek do eppendorfek. Ty se poté daly do mrazáku do -80°C.

3.6 Elektroforéza proteinů

SDS-PAGE (sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza)

Nejprve byl připraven 15% separační gel pro separaci proteinů a 15% koncentrační gel. Roztoky gelů byly dobře promíchány a separační gel byl ihned aplikován pomocí kapátka mezi 2 skla elektroforetické aparatury do výšky cca 3 cm od horního okraje tak, aby nedošlo ke vzniku bublin. Povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou a její zbytky poté vysušeny filtračním. Na ztuhlý separační gel byl nadávkován gel koncentrační až těsně pod horní hranu skla. Poté se opatrně vsunul teflonový hřeben a takto připravený gel i se stojanem se vložil do vlhké komůrky a nechal polymerovat do druhého dne.

Druhý den byl z gelu opatrně vyjmut hřebínek a odstraněn dolní spacer. Do spodního prostoru aparatury byl nalit elektrodový pufr a zároveň bylo puštěno chlazení. Do horní části vany byl nalit elektrodový pufr tak, aby došlo k převrstvení jamek. Příslušné vzorky byly nanášeny v objemu 20 µl. Kromě nich se nanas i standard molekulových hmotností. Následně byla elektroforetická komora překryta víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Pro koncentrační gel byla nastavena hodnota proudu na 30 mA. Jakmile vzorky se standardy prošly koncentračním gelem a doputovaly k rozhraní obou gelů (trvalo to asi 20 minut), zvýšila se hodnota proudu na 40 mA, poté na 55 mA. Po doputování čela elektroforézy ke spodní hranici separačního gelu byl dělicí proces ukončen, koncentrační gel byl odříznut a zbylý gel se dal na půl hodiny do fixačního roztoku (10% kyselina trichloroctová). Poté se fixační roztok slil a gel byl opláchnut destilovanou vodou. Přidal se barvicí roztok, který se nechal 1 hodinu působit. Poté se odstranil, gel byl opláchnut destilovanou vodou a přelit odbarvovacím roztokem, který byl během odbarvování vyměňován za nový. Gel se poté zdokumentoval a vyhodnotil.

Pro elektroforézu byly použity vzorky s alginátem a xanthanem, které byly centrifugovány v zahušťovacích kolonkách a následně dány do mrazáku při -80°C. Ke 100 µl těchto rozmražených vzorků bylo přidáno 25 µl 25% SDS; 12,5 µl merkptoethanolu a 115 µl vzorkového pufru. Vše bylo vortexováno a vzorky byly následně naředěny v poměru

1:3, tzn., že 50 μ l vzorku bylo nadávkováno do nových eppendorfek, k tomu přidáno 150 μ l vzorkového pufru a promícháno na vortexu.

Standard:	Relativní molekulová hmotnost:
Fosforyláza B	97 400
Hovězí albumin (BSA)	67 000
Vaječný albumin	45 000
Karboanhydráza	29 000
Trypsin inhibitor (sójový)	21 000
Cytochrom C	12 500
Trypsin inhibitor (hovězí plicní)	6 500

3.7 Zkouška rozkladu rafinózy a stachyózy kulturou XD

Do 3 lahví s 10 ml sterilního MM se stachyózou a rafinózou bylo naočkováno 50 μ l suspenze XD (inokulum z Petriho misky rozmíchané ve fyziologickém roztoku na zákal 2. st. McFarland. st.). Kultivace byla provedena na třepačce při 25°C. Z dalších 2 lahví s MM a sacharidem byl odebrán vzorek 2,5 ml, zředěn 5 ml destilované vody (ředění 1:2, tedy 3x) a po důkladném promíchání přefiltrován přes MILLIPORE MCE 0,22 μ m do vzorkovnic pro automatický analyzátor uhlíku, ke stanovení vstupní koncentrace DOC (rozpuštěného organického uhlíku). DOC byl také stanoven ve 2 lahvích s MM bez sacharidu (bez ředění).

Po 2, 6 a 14 dnech kultivace byl z každé lahve odebrán vzorek 2,5 ml, zředěn 5 ml destilované vody (ředění 1:2, tedy 3x), důkladně promíchán a přefiltrován přes MILLIPORE 0,22 μ m do vzorkovnic pro automatický analyzátor uhlíku, ke stanovení aktuální koncentrace DOC.

3.8 Postup měření tvorby biofilmu

Všechny biofilmové kultury byly překultivovány po dobu 2 dnů při 37°C na pevných půdách s glukózou (TYA-GLU), kultura XD v minerálním médiu s xanthanem. Jako

živná média dávkovaná do mikrotitračních destiček byl použit TSB bujon, s glukózou (pro biofilmové kultury).

Rozpis očkování mikrotitrační destičky pro kultury *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415, *Pseudomonas aeruginosa* FT 0, *Staphylococcus aureus* CCM 4415, *Staphylococcus epidermidis* FT 1:

a) Příprava suspenzí biofilmových kultur ve fyziologickém roztoku do 2. stupně McFarlandovy stupnice

b) Suspenze kultury XD – přímo z kultivačních lahví, po promíchání

Postup:

1. Do sloupců 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11 dávkovat 160 μ l TSB
2. Do všech jamek sloupců 2, 5, 8, 11 dávkovat 20 μ l suspenze kultury XD
3. Do všech jamek sloupců 1, 2 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *S. aureus* CCM 3953
4. Do všech jamek sloupců 4, 5 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Ps. aeruginosa* FT 0
5. Do všech jamek sloupců 7, 8 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Kl. pneumoniae* CCM 4415
6. Do všech jamek sloupců 10, 11 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *S. epidermidis* FT 1
7. Do všech jamek sloupců 1, 4, 7, 10 dávkovat 20 μ l sterilovaného fyziologického roztoku

Po nadávkování se mikrotitrační destička dala inkubovat na 48 hodin do termostatu vytemperovaného na 30°C. Poté byl obsah jamek vylit a jamky 3x promyty fyziologickým roztokem – po 250 μ l (důkladně protřepáváno, poté vylito). Následně bylo do jamek nadávkováno 200 μ l roztoku krystalické violeti (Gram) a necháno 1 minutu působit. Proběhlo promytí destilovanou vodou s usušením destičky vysoko nad plamenem kahanu. Do suchých jamek bylo nadávkováno 200 μ l 33% kyseliny octové pro rozpouštění barviva a nechalo se 10 minut působit. Poté byla měřena absorbance při 595 nm na přístroji TECAN SUNRISE.

Stejný postup se provedl i pro další biofilmové kultury: *Pseudomonas aeruginosa* FT 1, *Ps. aeruginosa* FT 2, *Ps. aeruginosa* FT 3, *Ps. aeruginosa* FT 4 a *Ps. aeruginosa* CCM 3955, s následným naočkováním mikrotitrační destičky:

1. Do sloupců 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dávkováno 160 μ l TSB
2. Do všech jamek sloupců 2, 4, 6, 8, 10 dávkováno 20 μ l suspenze kultury XD
3. Do všech jamek sloupců 1, 2 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Ps. aeruginosa* FT 1
4. Do všech jamek sloupců 3, 4 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Ps. aeruginosa* FT 2
5. Do všech jamek sloupců 5, 6 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Ps. aeruginosa* FT 3
6. Do všech jamek sloupců 7, 8 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Ps. aeruginosa* FT 4
7. Do všech jamek sloupců 9, 10 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Ps. aeruginosa* CCM 3955
8. Do všech jamek sloupců 1, 3, 5, 7, 9 dávkovat 20 μ l sterilovaného fyziologického roztoku

Pro biofilmové kultury *E. coli* CCM 3954, 3988, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, 7000, 2665:

1. Do sloupců 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dávkovat 160 μ l TSB
2. Do všech jamek sloupců 2, 4, 6, 8, 10 dávkovat 20 μ l suspenze kultury XD
3. Do všech jamek sloupců 1, 2 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *E. coli* CCM 3954
4. Do všech jamek sloupců 3, 4 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *E. coli* CCM 3988
5. Do všech jamek sloupců 5, 6 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Enterococcus faecalis* CCM 4224
6. Do všech jamek sloupců 7, 8 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Enterococcus faecalis* CCM 7000
7. Do všech jamek sloupců 9, 10 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *Enterococcus faecalis* CCM 2665
8. Do všech jamek sloupců 1, 3, 5, 7, 9 dávkovat 20 μ l sterilovaného fyziologického roztoku

Pro biofilmové kultury *Staphylococcus aureus* CCM 2022, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418, *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221

Rozpis očkování mikrotitrační destičky:

1. Do sloupců 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 a 11 dávkovat 160 μ l TSB
2. Do všech jamek sloupců 2, 5, 8, 10, 11 dávkovat 20 μ l suspenze kultury XD
3. Do všech jamek sloupců 1, 2 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *S. aureus* CCM 2022

4. Do všech jamek sloupců 4, 5 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *S. epidermidis* CCM 4418
5. Do všech jamek sloupců 7, 8 dávkovat 20 μ l suspenze kultury *S. epidermidis* CCM 7221
6. Do všech jamek sloupců 1,4,7,10, 11 dávkovat 20 μ l sterilovaného fyziologického roztoku

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny *t*-testem, pro který bylo nutno vypočítat průměr, směrodatnou odchylku, rozptyl, počet stupňů volnosti, z nich se vypočetla hodnota *B*, což je součet čtverců odchylek jednotlivých hodnot od průměru. Z těchto výsledků byla poté spočítána hodnota *t* podle vzorce:

$$t = \frac{\text{průměr 1} - \text{průměr 2}}{\sqrt{\frac{B_1 + B_2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}}$$

n.....počet hodnot v souboru

n – 1...počet stupňů volnosti

Výsledek se poté porovnával s tabulkou kritických hodnot pro *t*-rozdělení. Porovnávalo se s tabulkovou hodnotou pro (*n*₁ + *n*₂)-2 počet stupňů volnosti, na hladině významnosti 0,05. Je-li hodnota *t* vyšší než tabulková, pak se zamítá nulová hypotéza o rovnosti průměrů.

3.9 Měření nárůstu biomasy a aktivity enzymů v minerálních médiích s rafinózou a xanthanem

Nejprve bylo připraveno 40 ml MM s rafinózou a MM s xanthanem o koncentraci 300 mg/l. Tato média byla zaočkována 100 μ l kultury XD a kultivována na třepačce při teplotě 25°C. Prováděly se odběry po 10 a 14 hodinách po dobu 3 dnů. První vzorky byly odebrány v čase 0. Z každé lahvičky bylo odebíráno 75 μ l do 12 sterilních eppendorfek. Ty byly dány do mrazáku při -80°C.

Zároveň se v každém odběrovém čase změřil nárůst biomasy tak, že se nadávkovaly 3 jamky mikrotitrační destičky suspenzí z lahvičky s xanthanovým médiem a 3 jamky suspenzí s rafinózovým médiem (200 μ l). Také bylo jako kontrola nadávkováno do 3 jamek 200 μ l minerálního média. Následně byla změřena absorbance takto nadávkované

destičky při 550 nm. (Před samotným dávkováním byla nejprve změřena absorbance prázdne destičky).

Po dokončení odběrů byla měřena aktivita enzymů β -D-glukozidázy a α -D-galaktozidázy pomocí dvou chromogenních substrátů: 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside (substrát 1) pro stanovení β -D-glukozidázové aktivity a 4-Nitrophenyl α -D-galactopyranoside (substrát 2) pro stanovení α -D-galaktozidázové aktivity.

1. Měření aktivity média s buňkami:

Do tří rozmrazených eppendorfků s xanthanovou suspenzí bylo nadávkováno 50 μ l substrátu 1 a do dalších 3 50 μ l substrátu 2, oba o koncentraci 3,0125 g/l. Totéž pro rafinózovou suspenzi. Eppendorfky se substráty byly dány do inkubátoru o 30°C na 30 minut. Poté byly zcentrifugovány (10 000 g, 5 minut, 25°C) a z každé bylo nadávkováno 100 μ l do již předem změřené mikrotitrační destičky. Byla změřena absorbance při 410 nm a následně do každé jamky nadávkováno 50 μ l báze Na₂CO₃ o koncentraci 125 g/l. Opět byla změřena absorbance při stejné vlnové délce. Jako kontrola sloužila samotná minerální média, která byla také měřena s barvami a poté s bází.

2. Měření aktivity samotného média:

Rozmrazené eppendorfky s oběma médii byly zcentrifugovány (10 000 g, 5 minut, 25°C) a ze supernatantu odebráno 50 μ l do destičky. Do tří jamek obou médií bylo přidáno 50 μ l barvy 1 a do dalších 3 50 μ l barvy 2. Destička byla dána do inkubátoru o 30°C na 30 minut, poté byla změřena absorbance při 410 nm a následně bylo do všech zaplněných jamek nadávkováno 50 μ l báze a znova změřena absorbance při 410 nm. Totéž se provedlo i pro kontrolní vzorky minerálních médií.

3. Měření aktivity samotných promytých buněk:

Biomasa v eppendorfkách po předchozí centrifugaci byla promyta 100 μ l příslušného minerálního média a opět centrifugována (10 000 g, 5 minut, 25°C). Supernatant byl vylit a následně se do každé eppendorfky nadávkovalo 75 μ l minerálního média, obsah se promíchal a opět proběhla centrifugace. Poté bylo z každé eppendorfky nadávkováno 50 μ l do změřené destičky a další postup probíhal stejně, jako v předchozím bodě, tj. byla získána aktivita celé suspenze, supernatantu a promytých buněk.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Výsledky

4.1.1 Zkouška rozkladu rafinózy a stachyózy kulturou XD

Podstatou testu bylo sledování rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v tekutém médiu s příslušným sacharidem v průběhu kultivace, po zaočkování média kulturou XD. Nejprve bylo provedeno měření DOC při založení pokusů, pro získání vstupní koncentrace. V prvních dvou vzorkovnicích byla měřena koncentrace zaočkovaného MM s rafinózou (R + XD), ve druhých dvou se nacházel odebraný vzorek ze zaočkovaného MM se stachyózou (S + XD), jak je uvedeno v tabulce 1. Vzorky byly 3x zředěny destilovanou vodou (viz výše) a po promíchání přefiltrovány přes MILLIPORE MCE 0,22 μm . Po 2, 6 a 14 dnech kultivace bylo provedeno měření DOC zaočkovaných médií se sacharidy, a to v 6 vzorkovnicích, přičemž v prvních 3 vzorkovnicích se nacházel vzorek odebraný ze zaočkovaného MM s rafinózou (R + XD) a ve druhých 3 vzorkovnicích vzorek odebraný ze zaočkovaného MM se stachyózou (S + XD), viz tab. 2. Odběry byly provedeny stejným způsobem jako u prvního měření.

Tab. 1 Hodnoty DOC v médiích na začátku

	Obsah vzorkovnic	DOC (mg/l)	Průměr
1	R + XD	190,08	185,22
2	R + XD	180,36	
3	S + XD	180,99	180,21
4	S + XD	179,43	

Tab. 2 Hodnoty DOC v médiích po 2, 6 a 14 denní kultivaci

	Obsah vzorkovnic	Po 2 dnech			Po 6 dnech			Po 14 dnech		
		DOC (mg/l)	Průměr	Sm. odch.	DOC (mg/l)	Průměr	Sm. odch.	DOC (mg/l)	Průměr	Sm. odch.
1	R + XD	120,06	131,95	12,99	59,64	60,12	0,53	58,62	54,95	3,03
2	R + XD	125,76			59,85			55,02		
3	R + XD	150,03			60,87			51,21		
4	S + XD	55,47	55,97	1,94	65,34	68,96	4,37	68,13	65,84	2,07
5	S + XD	58,56			75,12			66,27		
6	S + XD	53,88			66,42			63,12		

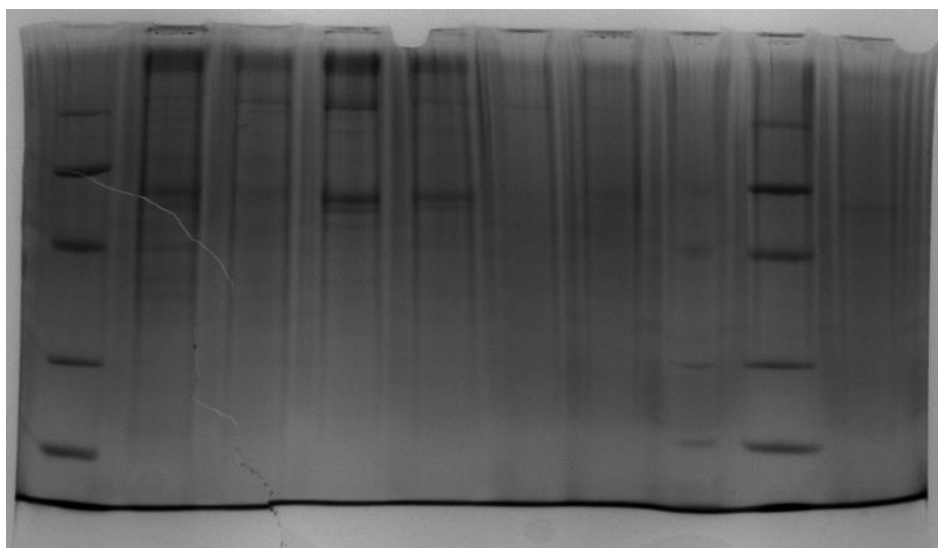
V tabulce 1 lze vidět vstupní koncentraci DOC, která dosahovala u minerálního média se stachyózou i rafinózou podobnou hodnotu DOC, a to 180 – 185 mg/l. V průběhu kultivace byly pozorovány v lahvičkách bakteriální vločky, v médiu se stachyózou byl jejich výskyt znatelnější. Tomu také odpovídá snížení hodnoty DOC, která už po dvou dnech kultivace klesla u stachyózy na 55,97 mg/l. V případě média s rafinózou byl tento pokles méně výrazný, na 131,95 mg/l.

4.1.2 Elektroforéza proteinů

Dávkování jamek:

1. jamka: 15 μ l standardu
2. jamka: 20 μ l neředěného vzorku supernatantu (XD v xanthanovém médiu)
3. jamka: 20 μ l neředěného vzorku supernatantu (XD v xanthanovém médiu)
4. jamka: 20 μ l neředěného vzorku supernatantu (XD v alginátovém médiu)
5. jamka: 20 μ l neředěného vzorku supernatantu (XD v alginátovém médiu)
6. jamka: 20 μ l ředěného vzorku supernatantu (XD v xanthanovém médiu)
7. jamka: 20 μ l ředěného vzorku supernatantu (XD v xanthanovém médiu)
8. – (bez vzorku z důvodu přehoupnutí vzorku z 9. jamky)
9. jamka: 15 μ l standardu
10. jamka: 20 μ l ředěného vzorku supernatantu (XD a alginátovém médiu)

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.



Obr. 5 Výsledek gelové elektroforézy

V separačním gelu elektroforézy na obrázku 5 se nachází mnoho signálů a z takto širokého spektra proteinů se nedá určit, zda se jedná o enzymy rozkládající xanthan a alginát.

4.1.3 Měření tvorby biofilmu

V této sérii experimentů byla sledována intenzita tvorby biofilmů vybranými potravinářsky i medicínsky významnými kulturami bakterií, a to jak samotnými kulturami, tak i těmito kulturami v přítomnosti kultury *Paenibacillus* sp. XD. Cílem bylo zjistit, zda sacharolytické vlastnosti kultury XD nepovedou ke snížení intenzity tvorby biofilmů, neboť bakteriální polysacharidy jsou významnou složkou biofilmových struktur. V závěru těchto pokusů byla také sledována schopnost tvorby biofilmu samotnou kulturou XD.

V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty tvorby biofilmu jednotlivými kulturami, a to vždy v levém sloupci, zatímco v pravém sloupci jsou uvedeny hodnoty tvorby biofilmu stejnou kulturou, avšak za přítomnosti kultury XD. V tab. 6 jsou potom v posledních dvou sloupcích uvedeny hodnoty tvorby biofilmu samotnou kulturou XD. Pro posouzení průkaznosti vlivu kultury XD na tvorbu biofilmů jednotlivými kulturami byl použit *t*-test; vypočtené hodnoty (na hladině významnosti 0,05) jsou uvedeny v jednotlivých tabulkách spolu s kritickými hodnotami pro příslušný počet stupňů volnosti. Prázdná políčka v tabulkách jsou hodnoty jamek, které byly vyřazeny, neboť u nich došlo k usazení neodstranitelného barviva nad hladinou média; naměřené hodnoty tak nevyjadřovaly míru tvorby biofilmu a také se výrazně lišily od ostatních hodnot v daných sloupcích.

Tab. 3 Hodnoty absorbancí pro biofilmové kultury rodů *Staphylococcus*, *Pseudomonas* a *Klebsiella* a výpočet t-testu z těchto hodnot

	S. aureus CCM 3953		Ps. aeruginosa FT 0		Kl. pneumoniae CCM 4415		S. epidermidis FT 1	
A	0,215	0,109	0,341	0,146	0,927	0,284	0,218	0,081
B	0,192	0,120	0,359	0,154	0,827	0,429	0,089	0,108
C	0,256	0,123	0,357	0,158	0,702		0,072	0,106
D	0,211	0,132	0,343	0,201	0,788	0,388	0,105	0,115
E	0,195	0,119	0,410	0,186	0,658	0,606	0,083	0,102
F	0,282	0,211	0,317		0,713	0,678	0,154	0,128
G		0,136	0,332	0,203		0,497	0,072	0,113
H		0,122	0,371	0,185		0,329	0,113	0,134
průměr	0,225	0,134	0,354	0,176	0,769	0,459	0,113	0,111
smoch p.	0,033	0,030	0,026	0,022	0,090	0,133	0,047	0,015
rozptyl	0,001	0,001	0,001	0,000	0,008	0,018	0,002	0,000
stup. vol.	5	7	7	6	5	6	7	7
B	0,005	0,006	0,005	0,003	0,041	0,107	0,015	0,002
(n1+n2)-2	12		13		11		14	
krit. hodnota	2,179		2,16		2,201		2,145	
t	5,394		14,118		4,823		0,136	

Z tabulky 3 vyplývá, že všechny rozdíly průměrů naměřených absorbancí tvorby biofilmu u zmíněných kultur, kromě *S. epidermidis* FT 1, jsou statisticky významné, protože hodnoty t-testu jsou významně vyšší, než kritické. V pravých sloupcích, kde jsou uvedeny hodnoty tvorby biofilmu kultur za přítomnosti kultury XD, jsou absorpance významně nižší, než v levých sloupcích, což naznačuje, že kultura XD má negativní vliv na tvorbu biofilmu zmíněných kultur, tedy jim v jeho tvorbě zabraňuje. Tato schopnost se projevila nejvíce u *Ps. aeruginosa* FT 0.

Tab. 4 Hodnoty absorbancí pro biofilmové kultury bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a výpočet *t*-testu z těchto hodnot

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
	FT 1		FT 2		FT 3		FT 4		CCM 3955	
A	0,131	0,099		0,186	0,229	0,199	0,401	0,241	2,051	
B	0,104	0,101	0,312	0,159	0,214	0,188	0,323	0,252	1,817	0,686
C	0,108	0,110	0,329	0,212	0,201	0,196	0,373	0,230	1,797	
D	0,108	0,095	0,288	0,131	0,196	0,215	0,331	0,252	1,990	0,614
E	0,109	0,098	0,363	0,249	0,179	0,216	0,365	0,285	1,906	0,520
F	0,113	0,111	0,303	0,255	0,173	0,207	0,339	0,235		0,760
G	0,102	0,093	0,335	0,147	0,187	0,195	0,332	0,259	1,781	
H	0,111	0,100	0,273	0,121	0,151	0,164	0,367	0,222		0,598
průměr	0,111	0,101	0,315	0,183	0,191	0,198	0,354	0,247	1,890	0,636
smodch p.	0,008	0,006	0,028	0,048	0,023	0,016	0,025	0,018	0,102	0,082
rozptyl	0,000	0,000	0,001	0,002	0,001	0,000	0,001	0,000	0,010	0,007
stup. vol.	7	7	6	7	7	7	7	7	5	4
B	0,000	0,000	0,005	0,016	0,004	0,002	0,004	0,002	0,052	0,027
(n1+n2)-2	14		14		14		14		9	
krit. hodnota	2,145		2,145		2,145		2,145		2,821	
t	2,709		6,324		0,638		9,687		22,215	

Kultura XD má podle provedeného *t*-testu v tabulce 4 vliv na tvorbu biofilmu všech kultur, kromě *Ps. aeruginosa* FT 3. U CCM 3955 se jedná o velký rozdíl mezi oběma sloupci s hodnotami naměřených absorbancí, u ostatních je rozdíl jen nepatrný. V pravých sloupcích jsou hodnoty opět významně nižší, než v levých, kultura XD tedy inhibuje tvorbu biofilmu těmito kulturám, přičemž největší vliv má na CCM 3955.

Tab. 5 Hodnoty absorbancí pro biofilmové kultury rodů *Escherichia* a *Enterococcus* a výpočet t-testu z těchto hodnot

	<i>E. coli</i>				<i>Enterococcus faecalis</i>					
	CCM 3954		CCM 3988		CCM 4224		CCM 7000		CCM 2665	
A	0,272	0,756	0,579		0,117	0,148		0,170	0,283	0,129
B	0,213	0,702		1,449	0,110	0,143	0,317	0,147	0,215	0,109
C	0,217	0,875	0,572	1,229	0,118	0,132	0,590	0,129	0,197	0,128
D	0,125	0,633	0,499		0,122	0,200	0,550	0,109		0,114
E	0,131	0,731	0,440	1,183	0,127	0,132	0,414	0,114	0,205	0,114
F	0,143		0,411	0,976	0,126	0,199	0,515	0,122	0,166	0,112
G	0,092	0,759	0,594	1,192	0,117	0,136	0,489	0,113	0,180	0,117
H	0,154	0,530	0,628	1,146	0,123	0,129		0,106	0,178	0,114
průměr	0,168	0,712	0,532	1,196	0,120	0,152	0,479	0,126	0,203	0,117
smodch p.	0,056	0,100	0,077	0,139	0,005	0,028	0,091	0,021	0,036	0,007
rozptyl	0,003	0,010	0,006	0,019	0,000	0,001	0,008	0,000	0,001	0,000
stup. vol.	7	6	6	5	7	7	5	7	6	7
B	0,022	0,060	0,035	0,097	0,000	0,005	0,041	0,003	0,008	0,000
(n1+n2)-2	13		11		14		12		14	
krit. hodnota	2,160		2,201		2,145		2,179		2,145	
t	13,201		10,894		3,234		10,792		6,665	

Všechny hodnoty t-testu v tabulce 5 jsou statisticky významné. V případě *E. coli* CCM 3954, 3988 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224 jsou hodnoty tvorby biofilmu v pravých sloupcích významně vyšší, než v levých. To naznačuje, že kultura XD může mít pozitivní vliv na jejich tvorbu biofilmu, nebo může biofilm sama tvořit. U *E. coli* CCM 3954 je tento vliv nejvyšší. U ostatních kultur se jedná opět o inhibici tvorby biofilmu, protože průměry naměřených absorbancí jsou v pravých sloupcích významně nižší, než v levých. Nejvíce je tvorba biofilmu inhibována u kultury *Enterococcus faecalis* CCM 7000.

Tab. 6 Hodnoty absorbancí pro biofilmové kultury rodu *Staphylococcus* a výpočet *t*-testu z těchto hodnot

	<i>S. aureus</i> CCM 2022		<i>S. epidermidis</i> CCM 4418		<i>S. epidermidis</i> CCM 7221		XD	
A	0,401		0,358	0,474	0,189	0,130	0,158	0,232
B	0,312		0,177	0,284	0,112	0,219	0,171	0,363
C	0,497	0,295	0,186	0,373	0,115	0,157	0,124	0,311
D	0,456	0,180	0,155	0,227	0,180	0,444	0,108	
E	0,336	0,447	0,364		0,170	0,269		0,115
F	0,272	0,155	0,225		0,214	0,149		
G	0,221	0,162		0,249	0,450	0,421	0,493	0,401
H	0,393	0,312	0,169	0,208	0,133	0,243	0,340	0,575
průměr	0,361	0,259	0,233	0,303	0,195	0,254	0,283	
smoch p.	0,087	0,105	0,083	0,093	0,102	0,113	0,150	
rozptyl	0,008	0,011	0,007	0,009	0,010	0,013		
stup. vol.	7	5	6	5	7	7		
B	0,053	0,055	0,041	0,044	0,073	0,089		
(n1+n2)-2	12		11		14			
krit. hodnota	2,179		2,201		2,145			
t	2,000		1,413		1,091			

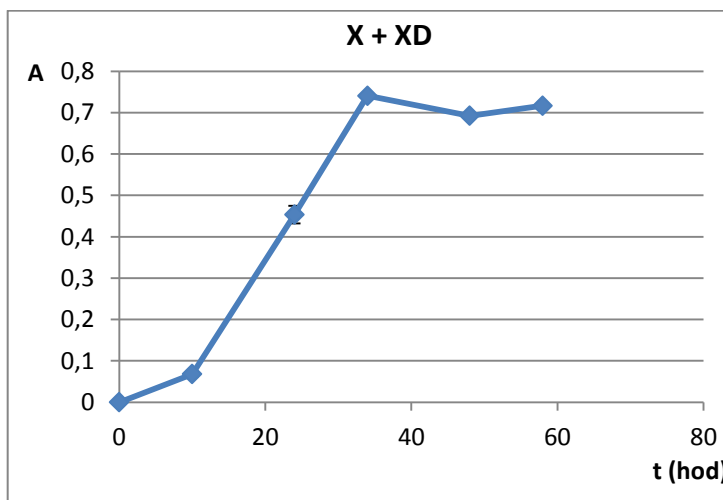
Všechny hodnoty *t*-testu, jak vyplývá z tabulky 6, jsou významně menší, než hodnoty kritické. Ani rozdílnost absorbancí biofilmových kultur a samotné kultury XD není nijak velká, dá se říci, že *Paenibacillus* sp. XD tedy neovlivňuje tvorbu biofilmu těchto kultur.

4.1.4 Měření nárůstu biomasy kultury XD v minerálním médiu s xanthanem a rafinózou

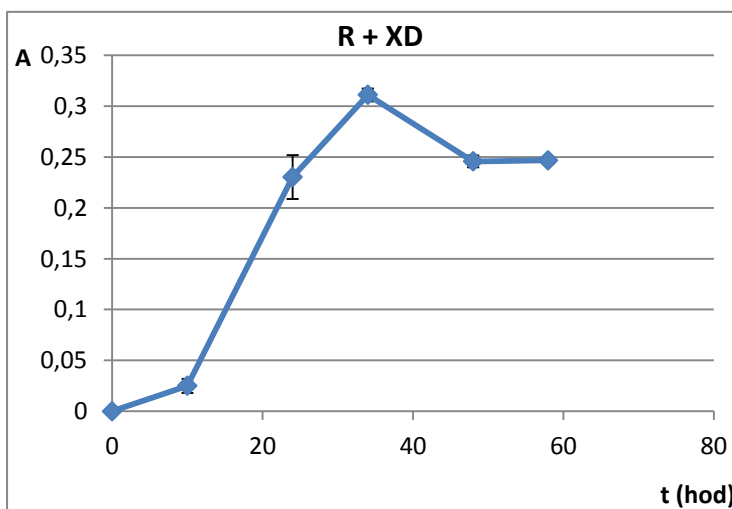
Ze zaočkovaných médií s xanthanem (X + XD) a rafinózou (R + XD) se prováděly odběry vzorků po 10 a 14 hodinách v průběhu kultivace po dobu 3 dnů. Každý vzorek byl nadávkován do 3 jamek mikrotitrační destičky. Následně byla změřena jejich absorbance při 550 nm, jejíž hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7. Tyto 3 hodnoty se po odečtení absorbancí prázdné destičky zprůměrovaly a vynesly do grafu v závislosti na čase (Obr. 6, 7). Grafy jsou zobrazeny s chybovými úsečkami odpovídajícími dvojnásobku směrodatných odchylek. Hodnoty výrazně se lišící od ostatních ve sloupci nebyly do průměru započítány. Jako kontrola bylo použito minerální médium bez sacharidů.

Tab. 7 Hodnoty absorbancí změřené z odběrů vzorků v daných časech v průběhu kultivace

Čas (hod)	Absorbance										
	X + XD			průměr	R + XD			průměr	MM bez sacharidu		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,003	0,010
10	0,067	0,07	0,067	0,068	0,017	0,034	0,024	0,025	0,005	0,005	0,013
24	0,401	0,461	0,498	0,453	0,200	0,244	0,247	0,230	0,001	0,014	0,001
34	0,727	0,754	0,306	0,741	0,306	0,307	0,320	0,311	0,002	0,003	0,001
48	0,657	0,671	0,749	0,692	0,239	0,245	0,253	0,246	0,002	0,004	0,005
58	0,679	0,702	0,769	0,717	0,242	0,250	0,248	0,247	0,010	0,005	0,000



Obr. 6 Hodnoty absorbance zobrazující nárůst biomasy kultury XD v xanthanovém médiu v závislosti na době kultivace



Obr. 7 Hodnoty absorbance zobrazující nárůst biomasy kultury XD v rafinózovém médiu v závislosti na době kultivace

V tabulce 7 lze vidět, že se hodnoty absorbancí od druhého dne kultivace a v jeho průběhu u obou médií zvyšovaly, což dokazovala také přítomnost vloček kultury XD. Od třetího dne se začala absorbance snižovat (viz obrázky 6 a 7). V médiích se tato změna projevila tvorbou bakteriálních agregátů. Křivky obou grafů odpovídají základní křivce růstu bakterií, zhruba do 25 hodin se bakterie intenzivně množily, což je důkazem exponenciální fáze, a po této době přecházely do rané stacionární fáze, kdy se postupně vyčerpávalo živné médium a bakterie začaly agregovat. V případě kultivace v xanthanovém médiu jsou hodnoty absorbancí ve všech fázích vyšší, než u média s rafinózou.

4.1.5 Stanovování enzymových aktivit v minerálním médiu s xanthanem a rafinózou

1. Měření aktivity média s buňkami

Rozmražené vzorky z jednotlivých odběrů zpracované podle postupu popsaného výše, byly dávkovány do mikrotitrační destičky. Vzorky s xanthanovým médiem obsahující chromogenní substrát 1 (4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside) byly nadávkovány do 3 jamek, vzorky obsahující chromogenní substrát 2 (4-Nitrophenyl α -D-galactopyranoside) do dalších 3 jamek. Taktéž pro rafinózové médium (viz Tab. 8, 9). Následně byly změřeny hodnoty absorbance při 410 nm a po odečtení absorbancí prázdné destičky se každé 3 hodnoty zprůměrovaly a vynesly do grafu v závislosti na době kultivace (Obr. 8, 9). Výrazně se lišící hodnoty nebyly započítávány. Jako kontrola bylo použito minerální médium se substrátem 1 a 2. Pro stanovení aktivity enzymů se hodnoty absorbancí přepočítaly na aktivitu dle vzorce:

$$a = \frac{\frac{\Delta A}{\varepsilon} * 10^6 * V_1}{t * V_2}$$

ΔAzměna absorbance při 410 nm

V_1objem kyvety [500 μ l]

V_2objem média v kyvetě [75 μ l]

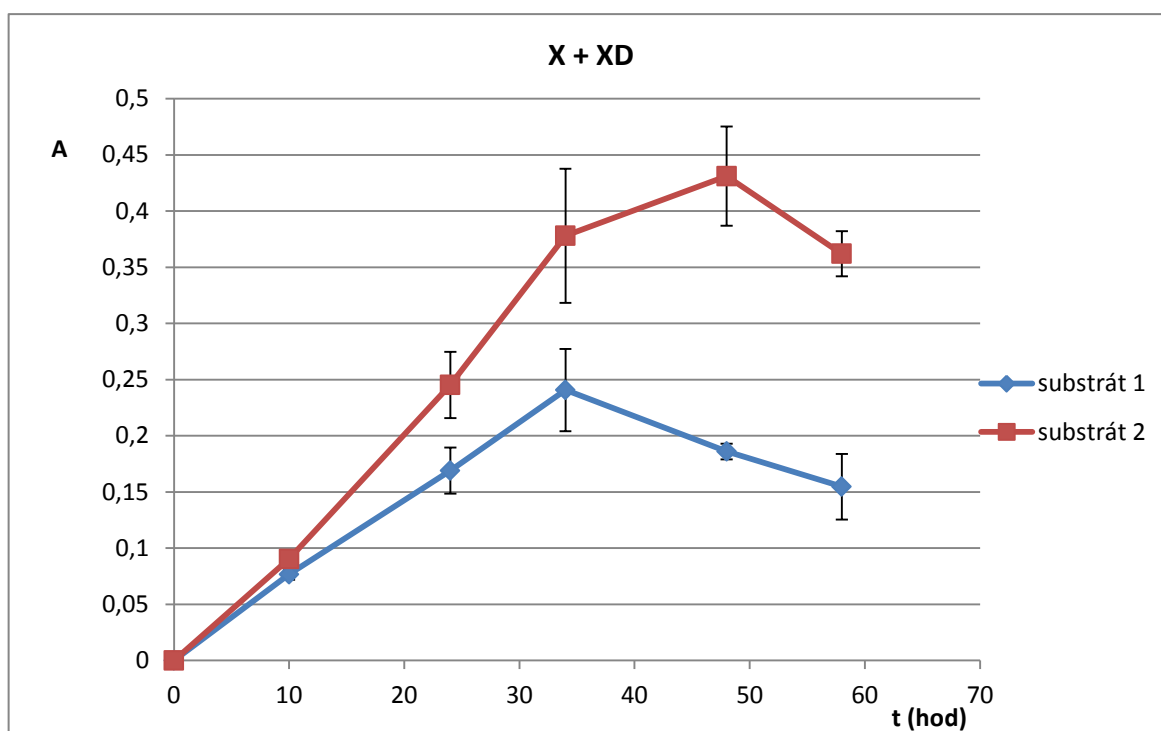
t.....čas reakce se substrátem 1 a 2 [30 min]

εabsorbční koeficient [18,1 M.cm⁻¹]

Vypočítané aktivity (viz Tab. 10, 11) byly vyneseny do grafu v závislosti na době kultivace (Obr. 10, 11). Grafy závislosti absorbance na době kultivace obsahují chybové úsečky, které odpovídají dvojnásobku směrodatných odchylek.

Tab. 8 Hodnoty absorbancí pro xanthanové médium se substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktózidázovou aktivitu) a pro MM

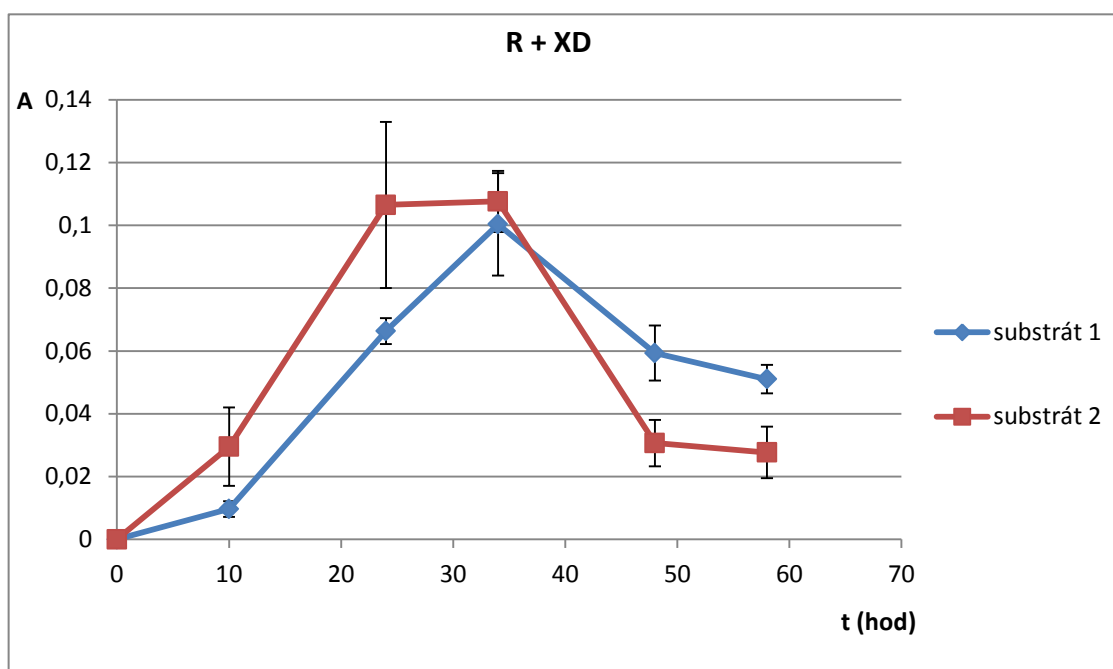
Čas (hod)	X + XD substrát 1			průměr	X + XD substrát 2			průměr	MM substrát 1	MM substrát 2
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,062	0,083
10	0,080	0,080	0,070	0,077	0,094	0,08	0,097	0,090	0,049	0,086
24	0,272	0,231	0,004	0,169	0,283	0,242	0,211	0,245	0,043	0,080
34	0,280	0,250	0,192	0,241	0,323	0,35	0,461	0,378	0,051	0,085
48	0,179	0,368	0,193	0,186	0,451	0,411	0,344	0,431	0,068	0,086
58	0,196	0,135	0,133	0,155	0,382	0,669	0,342	0,362	0,068	0,084



Obr. 8 Hodnoty absorbance xanthanového média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktózidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace

Tab. 9 Hodnoty absorbancí pro rafinóзовé médium se substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) a pro MM

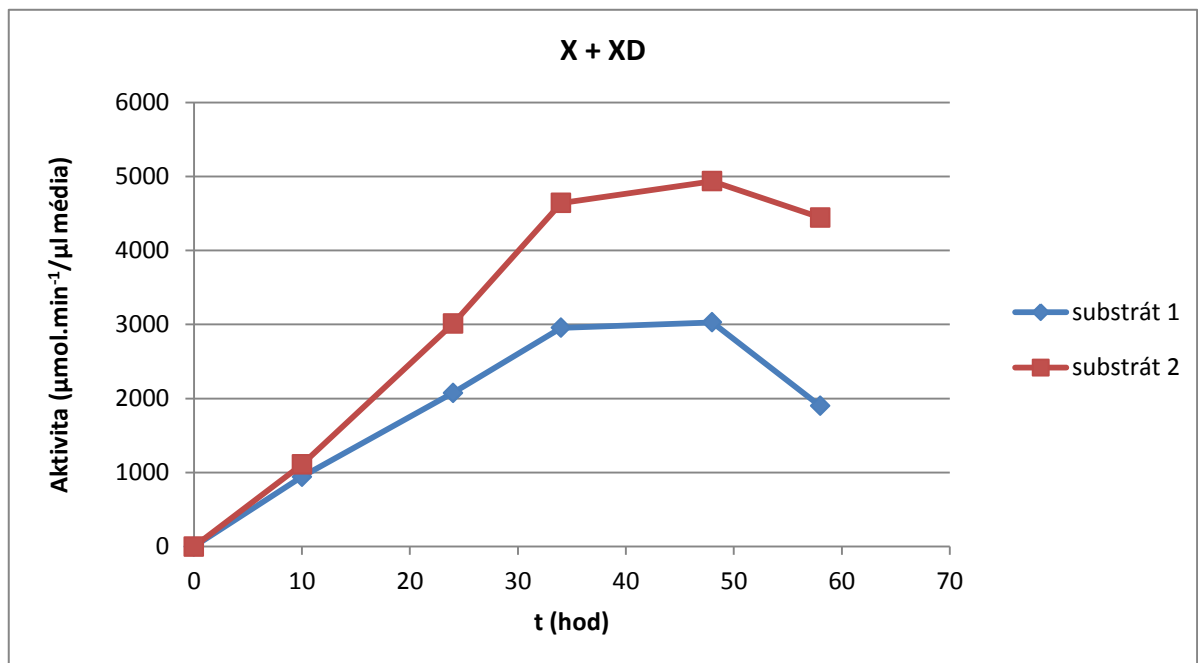
Čas (hod)	R + XD substrát 1			průměr	R + XD substrát 2			průměr	MM substrát 1	MM substrát 2
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,035	0,040
10	0,009	0,013	0,007	0,010	0,017	0,172	0,042	0,030	0,044	0,042
24	0,071	0,061	0,067	0,066	0,133	0,059	0,08	0,107	0,044	0,049
34	0,120	0,080	0,101	0,100	0,104	0,098	0,121	0,108	0,043	0,039
48	0,050	0,057	0,071	0,059	0,03	0,022	0,04	0,031	0,049	0,042
58	0,052	0,056	0,045	0,051	0,017	0,029	0,037	0,028	0,034	0,037



Obr. 9 Hodnoty absorbance rafinóзовého média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace

Tab. 10 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro xanthanové médium

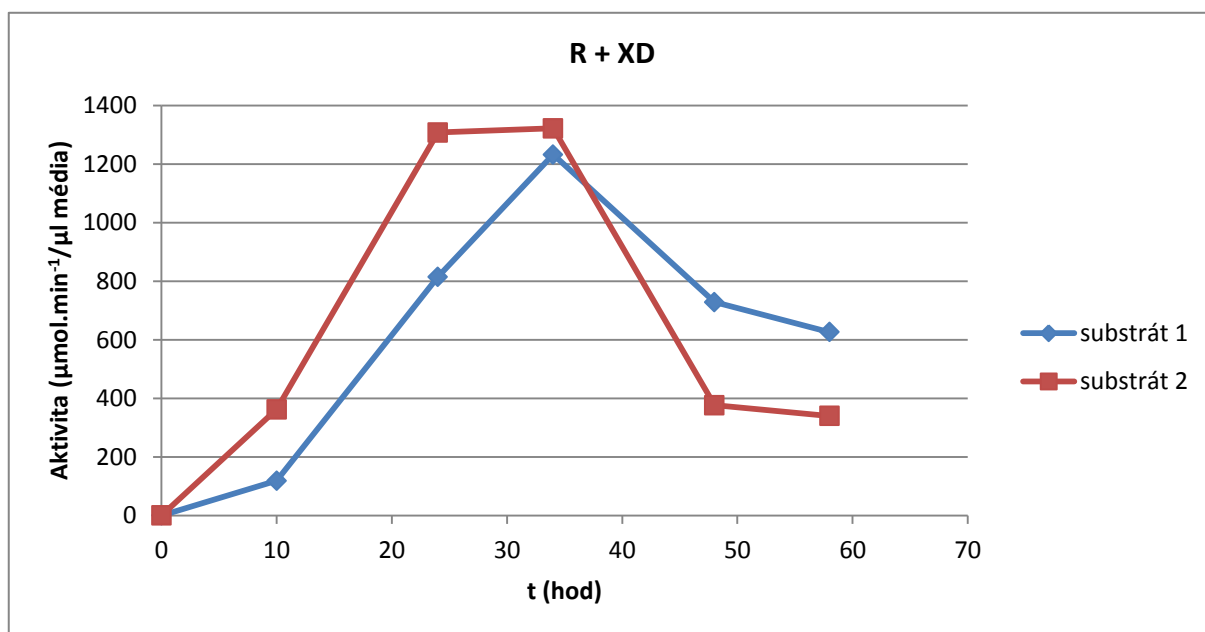
X + XD substrát 1		X + XD substrát 2	
Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)	Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)
0,000	0,000	0,000	0,000
0,077	941,273	0,090	1109,065
0,169	2074,893	0,245	3012,073
0,241	2954,778	0,378	4640,884
0,247	3028,443	0,402	4935,543
0,155	1898,915	0,362	4444,444



Obr. 10 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u xanthanového média

Tab. 11 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro rafinózo-
vé médium

R + XD substrát 1		R + XD substrát 2	
Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)	Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)
0,000	0,000	0,000	0,000
0,010	118,682	0,030	362,185
0,066	814,406	0,107	1307,551
0,100	1231,840	0,108	1321,874
0,059	728,463	0,031	376,509
0,051	626,151	0,028	339,677



Obr. 11 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u rafinózo-
vého média

Křivky všech vyobrazených grafů (Obr. 8, 9, 10 a 11) mají opět charakter základní křivky růstu bakteriální populace. Všechny růstové fáze se nacházejí přibližně ve stejném časovém rozmezí, jako tomu bylo v případě nárůstu biomasy a to platí jednak pro grafy, kde je vynesena závislost absorbance na době kultivace (Obr 8, 9), ale také pro grafy se závislostí aktivity na době kultivace (Obr 10, 11). Hodnoty absorbancí i aktivit, jak dokládají tabulky 8, 9, 10 a 11, jsou v případě kultivace v xanthanovém médiu vždy vyšší, než u rafinózo-
vého média, rovněž hodnoty naměřených α -D-galaktozidázových aktivit stanovených substrátem 2 (4-Nitrophenyl α -D-galactopyranoside), jsou vyšší, než β -D-glukozidázová akti-

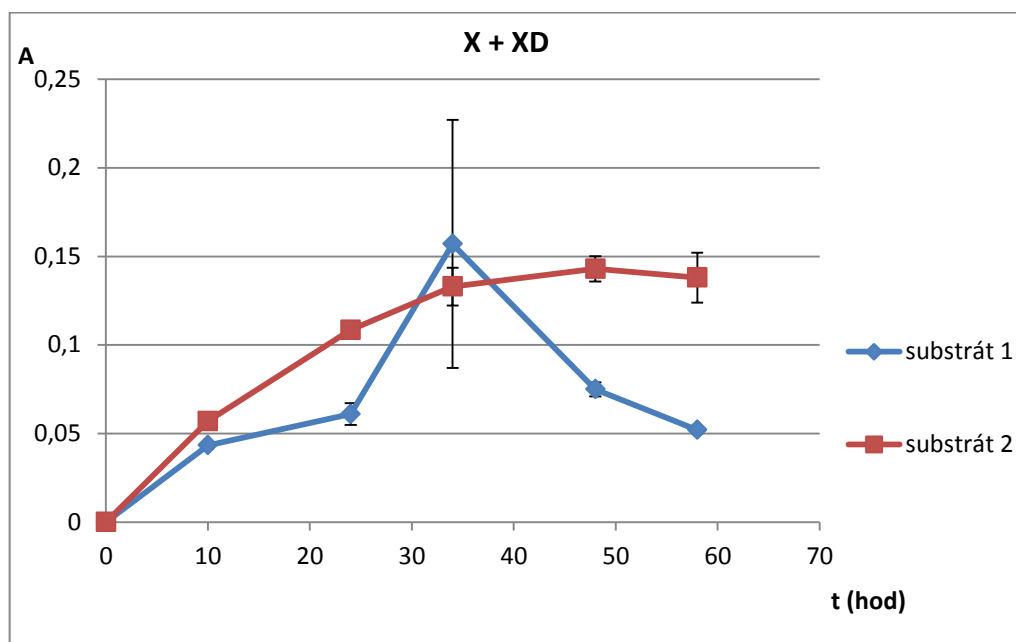
vita stanovovaná substrátem 1 (4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside) a to v případě obou živných médií. Nejvyšších hodnot aktivity dosahovaly oba enzymy v rafinózovém médiu po 34 hodinách kultivace a v xanthanovém médiu po 48 hodinách kultivace.

2. Měření aktivity samotného média

Rozmražené a zpracované vzorky byly nadávkovány do mikrotitrační destičky stejným způsobem, jako v předchozím bodě. Následně byly změřeny hodnoty absorbance při 410 nm a po odečtení absorbancí prázdné destičky byly opět každé 3 hodnoty zprůměrovány a vyneseny do grafu v závislosti na době kultivace (Tab. 12, 13, obr. 12, 13). Grafy obsahují chybové úsečky, které odpovídají dvojnásobku směrodatných odchylek. Výrazně se lišící hodnoty nebyly započítávány. Jako kontrola bylo použito minerální médium se substrátem 1 a 2. Z hodnot absorbancí byla vypočítána aktivita (Tab. 14, 15) a vynesena do grafu v závislosti na době kultivace (Obr. 14, 15).

Tab. 12 Hodnoty absorbancí pro xanthanové médium se substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) a pro MM

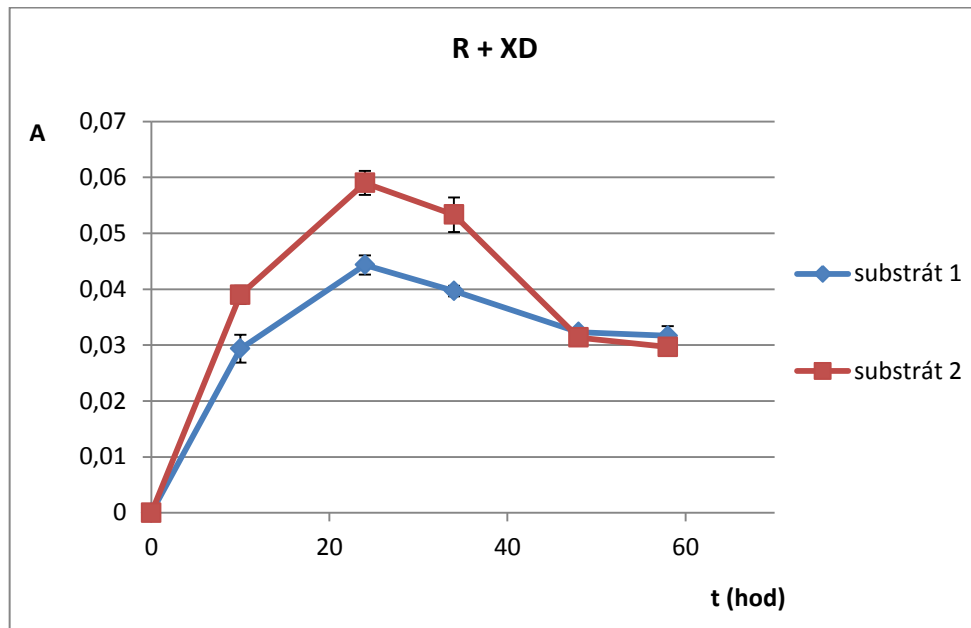
Čas (hod)	X + XD substrát 1			průměr	X + XD substrát 2			průměr	MM substrát 1	MM substrát 2
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,053
10	0,046	0,043	0,041	0,043	0,262	0,057	0,057	0,057	0,047	0,052
24	0,053	0,062	0,068	0,061	0,104	0,113	0,701	0,109	0,052	0,061
34	0,466	0,087	0,227	0,157	0,124	0,127	0,148	0,133	0,053	0,058
48	0,071	0,049	0,079	0,075	0,133	0,147	0,149	0,143	0,052	0,059
58	0,050	0,054	0,293	0,052	0,119	0,142	0,153	0,138	0,057	0,057



Obr. 12 Hodnoty absorbance xanthanového média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktózidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace

Tab. 13 Hodnoty absorbancí pro rafinóзовé médium se substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktózidázovou aktivitu) a pro MM

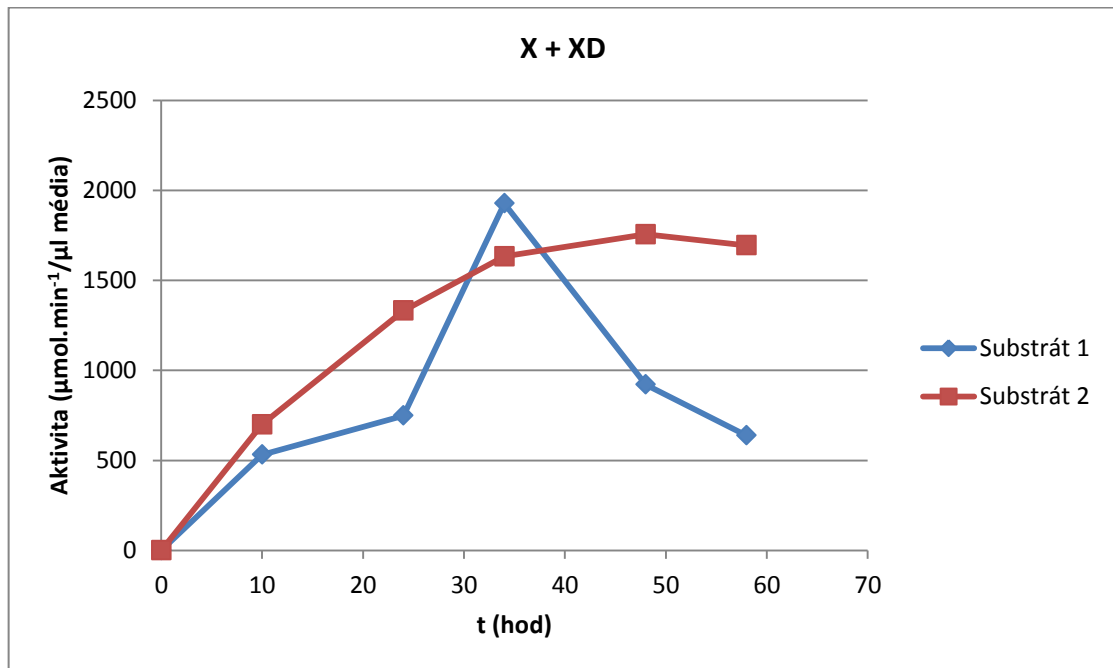
Čas (hod)	R + XD substrát 1			průměr	R + XD substrát 2			průměr	MM substrát 1	MM substrát 2
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,05	0,049
10	0,030	0,032	0,026	0,029	0,039	0,041	0,037	0,039	0,047	0,051
24	0,045	0,046	0,042	0,044	0,061	0,056	0,06	0,059	0,052	0,046
34	0,041	0,039	0,039	0,040	0,056	0,055	0,049	0,053	0,049	0,052
48	0,032	0,033	0,032	0,032	0,032	0,031	0,031	0,031	0,051	0,049
58	0,034	0,031	0,030	0,032	0,029	0,03	0,03	0,030	0,048	0,049



Obr. 13 Hodnoty absorbance rafinóзовého média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktózidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace

Tab. 14 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro xanthanové médium

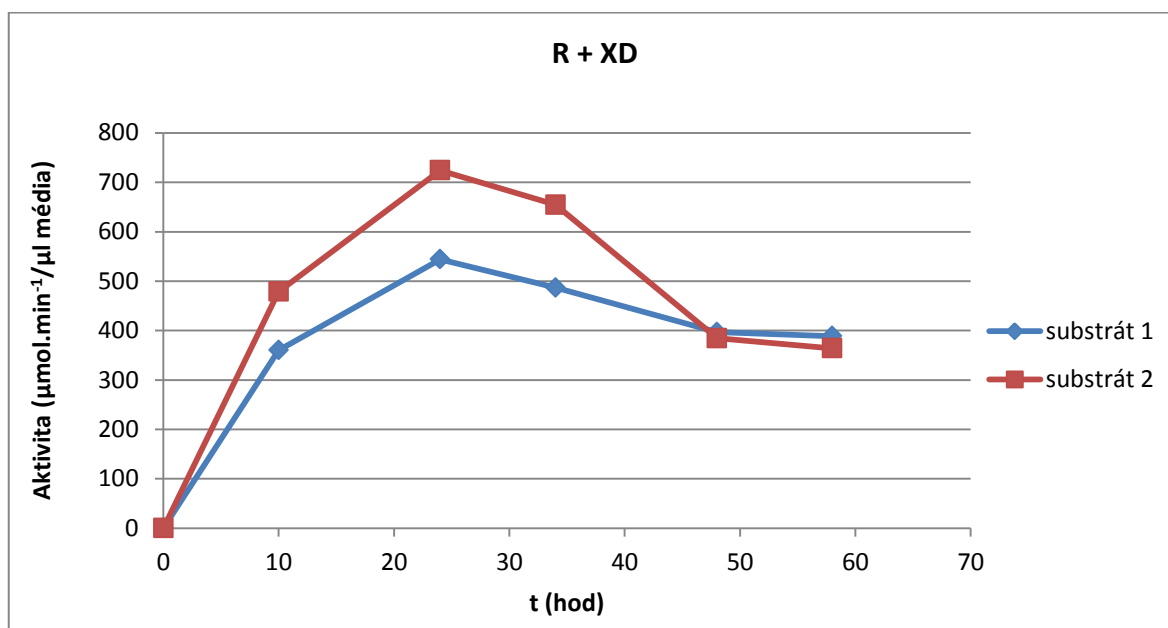
X + XD substrát 1		X + XD substrát 2	
Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)	Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)
0,000	0,000	0,000	0,000
0,043	532,024	0,057	699,816
0,061	748,926	0,109	1332,106
0,157	1927,563	0,133	1632,904
0,075	920,810	0,143	1755,678
0,052	638,428	0,138	1694,291



Obr. 14 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u xanthanového média

Tab. 15 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro rafinózo-
vé médium

R + XD substrát 1		R + XD substrát 2	
Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)	Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)
0,000	0,000	0,000	0,000
0,029	360,139	0,039	478,821
0,044	544,301	0,059	724,371
0,040	487,006	0,053	654,798
0,032	396,972	0,031	384,694
0,032	388,787	0,030	364,232



Obr. 15 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u rafinóзовého média

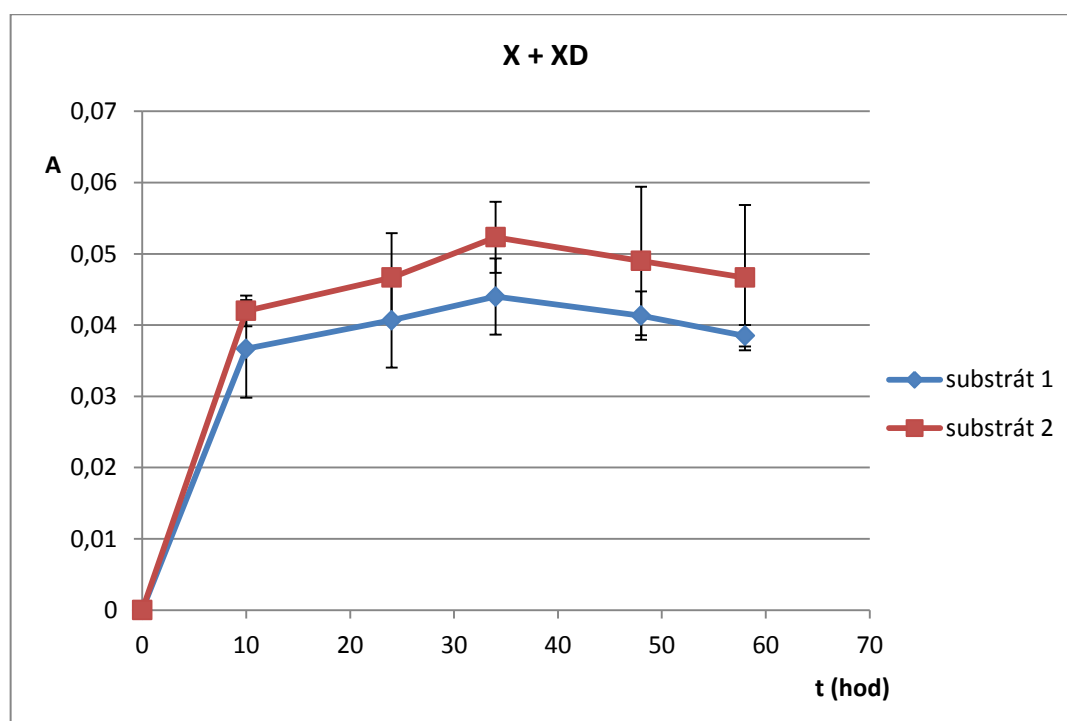
Křivky vyobrazených grafů (Obr. 12, 13, 14 a 15) mají také charakter základní křivky růstu bakteriální populace. Růstové fáze se nacházejí přibližně ve stejném časovém rozmezí, jako v předešlém případě. Hodnoty absorbancí i aktivit, jak dokládají tabulky 12, 13, 14, 15, jsou v případě kultivace v xanthanovém médiu také vyšší, než u rafinóзовého média, a opět je stanovaná α -D-galaktózidázová aktivita vyšší, než β -D-glukozidázová. Hodnoty absorbancí i aktivit jsou nižší, než v případě stanovování aktivity média s buňkami.

3. Měření aktivity samotných promytých buněk

Zpracované vzorky byly opět nadávkovány do mikrotitrační destičky stejným způsobem, jako v předchozím bodě. Byly změřeny hodnoty absorbance při 410 nm a po odečtení absorbancí prázdné destičky byly opět každé 3 hodnoty zprůměrovány a vyneseny do grafu v závislosti na čase (Tab. 16, 17, obr. 16, 17). Grafy obsahují chybové úsečky, které odpovídají dvojnásobku směrodatných odchylek. Výrazně se lišící hodnoty nebyly započítávány. Z hodnot absorbancí byla opět vypočítána aktivita (Tab. 18, 19) a vynesena do grafu v závislosti na době kultivace (Obr. 18, 19).

Tab. 16 Hodnoty absorbancí pro xanthanové médium se substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktózidázovou aktivitu)

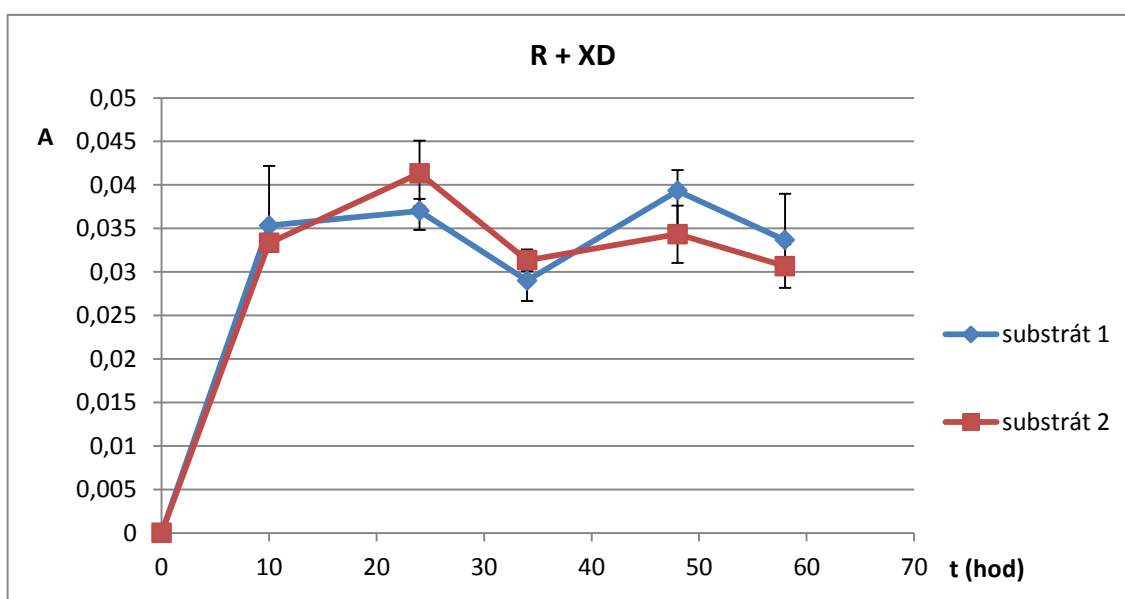
Čas (hod)	X + XD substrát 1			průměr	X + XD substrát 2			průměr
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,027	0,041	0,042	0,037	0,045	0,04	0,041	0,042
24	0,035	0,050	0,037	0,041	0,045	0,055	0,04	0,047
34	0,038	0,051	0,043	0,044	0,051	0,059	0,047	0,052
48	0,046	0,040	0,038	0,041	0,052	0,035	0,06	0,049
58	0,040	0,037	0,262	0,039	0,061	0,041	0,038	0,047



Obr. 16 Hodnoty absorbance xanthanového média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktózidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace

Tab. 17 Hodnoty absorbancí pro rafinóзовé médium se substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktózidázovou aktivitu)

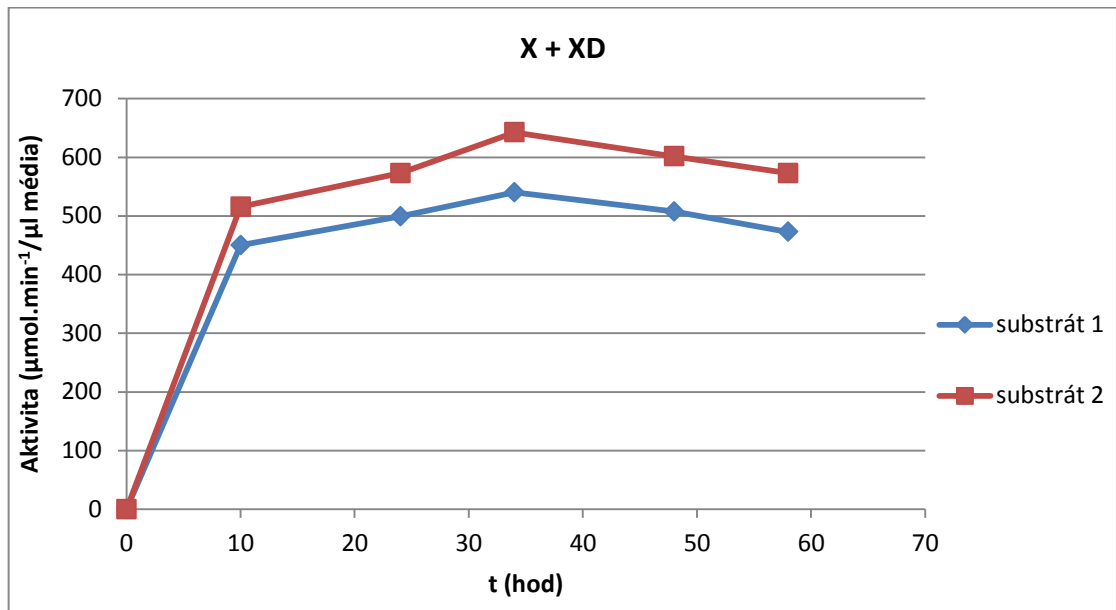
Čas (hod)	R + XD substrát 1			průměr	R + XD substrát 2			průměr
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,030	0,031	0,045	0,035	0,033	0,033	0,034	0,033
24	0,038	0,038	0,035	0,037	0,044	0,044	0,036	0,041
34	0,026	0,031	0,030	0,029	0,031	0,03	0,033	0,031
48	0,036	0,041	0,041	0,039	0,038	0,03	0,035	0,034
58	0,027	0,034	0,040	0,034	0,028	0,034	0,03	0,031



Obr. 17 Hodnoty absorbance rafinóзовého média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktózidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace

Tab. 18 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro xanthanové médium

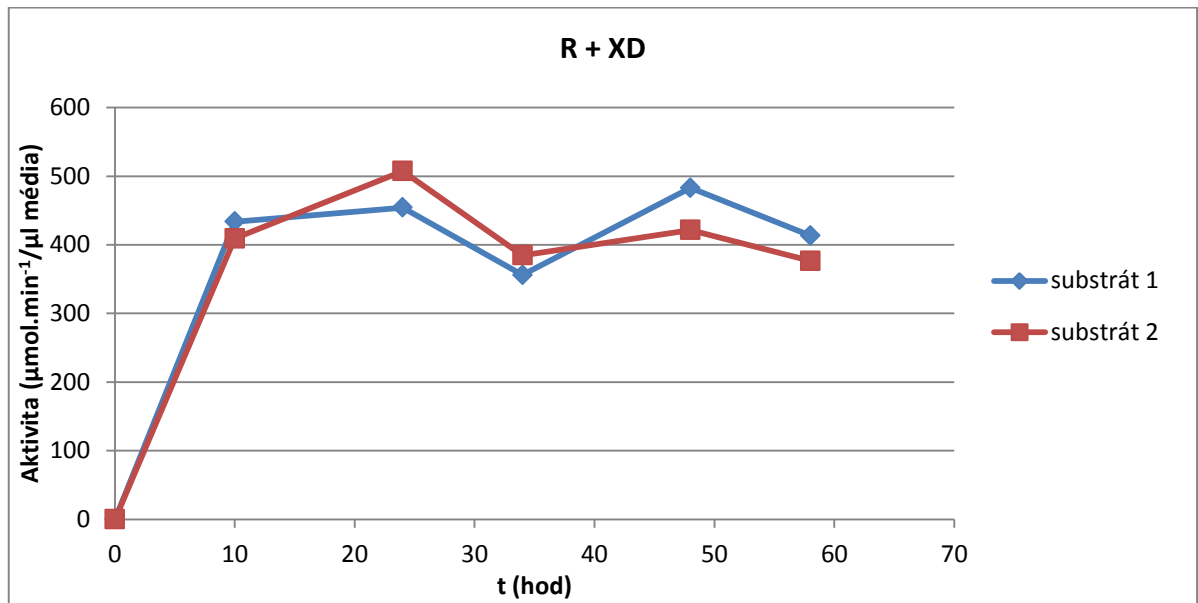
X + XD substrát 1		X + XD substrát 2	
Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)	Absorbance	Aktivita ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\mu\text{l}$ média)
0,000	0,000	0,000	0,000
0,037	450,174	0,042	515,654
0,041	499,284	0,047	572,949
0,044	540,209	0,052	642,521
0,041	507,469	0,049	601,596
0,039	472,683	0,047	572,949



Obr. 18 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u xanthanového média

Tab. 19 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro rafinózo-
vé médium

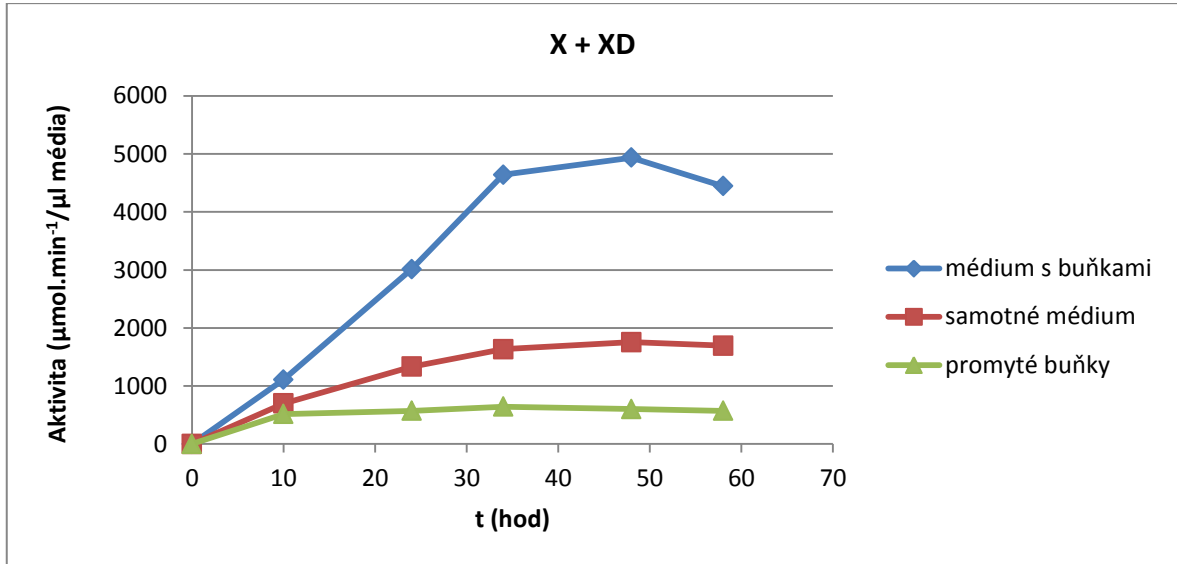
R + XD substrát 1		R + XD substrát 2	
Absorbance	Aktivita (μmol.min ⁻¹ /μl média)	Absorbance	Aktivita (μmol.min ⁻¹ /μl média)
0,000	0,000	0,000	0,000
0,035	433,804	0,033	409,249
0,037	454,266	0,041	507,469
0,029	356,047	0,031	384,694
0,039	482,914	0,034	421,526
0,034	413,342	0,031	376,509



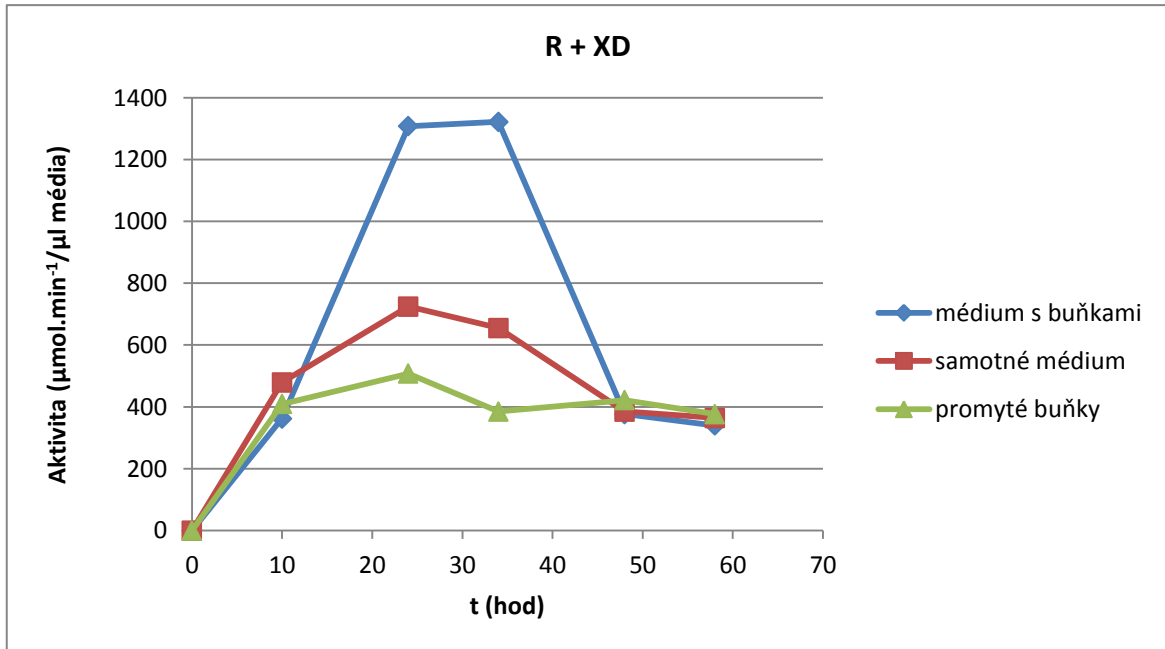
Obr. 19 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u rafinóзовého média

Křivky grafů na obrázcích 16, 17, 18, 19 mají charakter základní křivky bakteriálního růstu, avšak hodnoty absorbancí a z nich vypočítaných aktivit u těchto vzorků s promytými buňkami dosahovaly velmi nízkých hodnot, jak dokládají tabulky 16, 17, 18 a 19. Dá se říci, že tyto aktivity byly ve srovnání s aktivitami neměřenými v médiu a buňkách zanedbatelné.

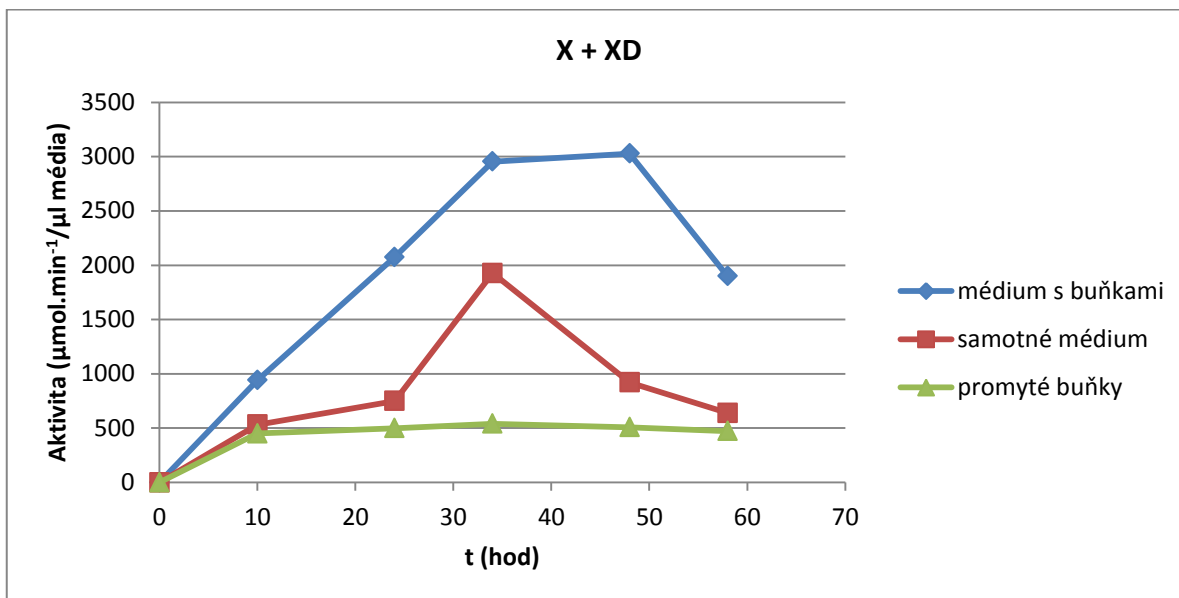
Pro srovnání aktivit byly do jednoho grafu vyneseny závislosti α -D-galaktosidázových (Obr. 20, 21) a β -D-glukosidázových aktivit (Obr. 22, 23) na dobách kultivace u média s buňkami, samotného média a samotných promytých buněk.



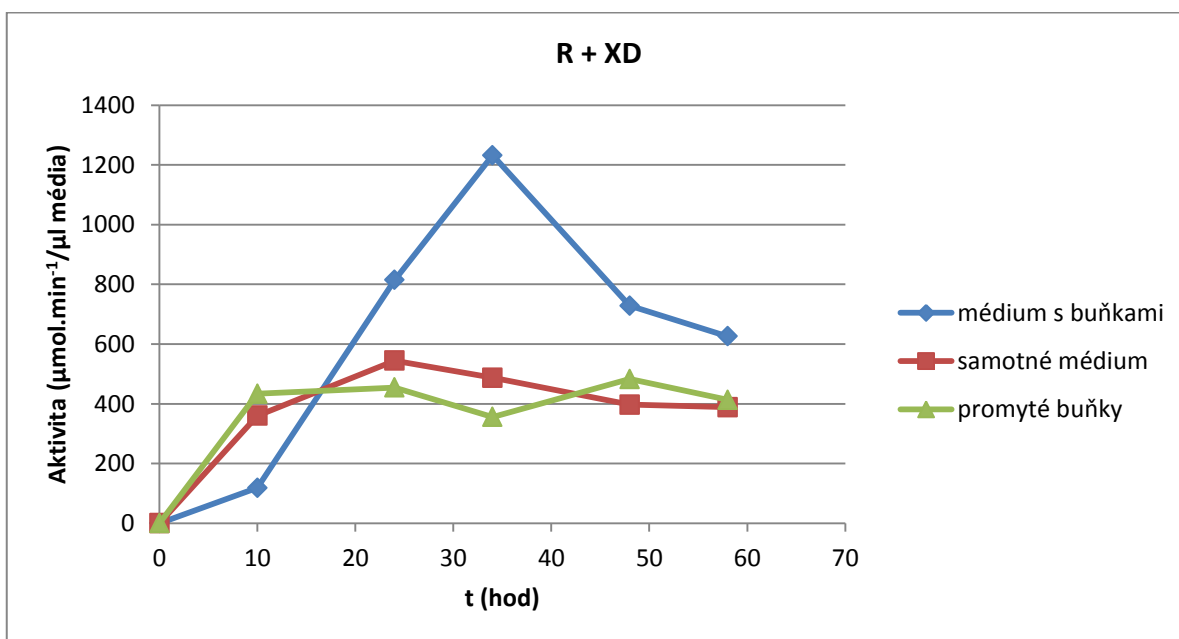
Obr. 20 Srovnání α -D-galaktosidázových aktivit v xanhanovém médiu



Obr. 21 Srovnání α -D-galaktosidázových aktivit v rafinóзовém médiu



Obr. 22 Srovnání β -D-glukozidázových aktivit v xanthanovém médiu



Obr. 23 Srovnání β -D-glukozidázových aktivit v rafinózovém médiu

Z grafů pro srovnání enzymových aktivit lze říci, že detekovaná enzymová aktivita byla patrně v médiu, případně extracelulární, ale asociovaná s bučkami.

4.2 Diskuze

Při testování koncentrace rozpuštěného organického uhlíku bylo zjištěno, že se v médiích se sacharidy rafinózou a stachyózou tato koncentrace v průběhu kultivace snižuje. Naměřená vstupní koncentrace DOC se pohybovala okolo 180 mg/l (Tab. 1). Jak je patrné v tabulce 2, už po dvou dnech kultivace tato koncentrace znatelně poklesla, u MM se stachyózou je tento pokles výraznější (okolo 55,97 mg/l), než u MM s rafinózou (131,95). Skutečnost daná snižující se koncentrací DOC v průběhu kultivace kultury XD je důkazem, že kultura *Paenibacillus* sp. XD rozkládá rafinózu i stachyózu, přičemž stachyóza je zpočátku degradována rychleji, než rafinóza. Souběžně s tímto experimentem prováděla Jurečková měření koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v minerálním médiu se stachyózou a rafinózou kulturou *Verrucomicrobium* sp. GD, která využívá bakteriální polysacharid gellan. Podmínky kultivace byly stejné, jako u kultury XD. Vstupní koncentrace DOC se pohybovala také okolo 180 mg/l, ale v průběhu kultivace se prakticky nezměnila, což nasvědčuje tomu, že kultura GD nerozkládá ani stachyózu, ani rafinózu [32].

Schopnost rozkladu extracelulárních polysacharidů xanthanu a alginátu kulturou XD byla testována také elektroforézou proteinů. Předpokladem tohoto testu bylo zjistit, zda jsou oba polysacharidy degradovány stejným enzymem, čili se předpokládalo, že přítomných signálů v separačním gelu bude jen několik. Tato domněnka se ale nepotvrdila, protože jak dokládá obrázek 5, v supernatantu se nachází široké spektrum proteinů, z nichž některé mohou být zkoumanými enzymy.

Schopnost inhibice tvorby biofilmu kulturou XD je dána výsledky *t*-testu, který ukazuje, zda je rozdíl mezi dvěma průměry z naměřených hodnot statisticky významný na dané hladině významnosti. U *Staphylococcus epidermidis* FT 1 v tabulce 3, *Pseudomonas aeruginosa* FT 3 v tabulce 4, *Staphylococcus aureus* CCM 2022, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a 7221 v tabulce 6 vyšly hodnoty *t*-testu menší než kritické, tedy rozdíly průměrů sloupců s XD a bez něj byly statisticky nevýznamné. Z toho lze usoudit, že XD nemá vliv na tvorbu biofilmu těchto kultur. Nepatrný nebo malý vliv má na kultury *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (Tab. 3), *Pseudomonas aeruginosa* FT 1, FT 2 (Tab. 4) a *Enterococcus faecalis* CCM 4224, 2665 (Tab. 5), kdy se rozdíly průměrů liší maximálně o 0,1. Na ostatní kultury má XD větší vliv, zejména na *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (Tab. 4) a *E. coli* CCM 3988 (Tab. 5), u kterých se průměry absorpce liší velmi výrazně. U většiny kultur jsou hodnoty průměrů ve druhých sloupcích významně nižší, než v prvních. To je důkazem, že *Paenibacillus* sp. XD inhibuje tvorbu biofilmu těchto testo-

vaných biofilmových kultur, a to buď spotřebováváním živin, nebo předpokládaným rozkladem polysacharidové složky biofilmů. Naopak je tomu u *E. coli* CCM 3954, 3988, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (Tab. 5), u nichž je hodnota průměru ve druhých sloupcích významně vyšší. V případě *E. coli* CCM 3988 je rozdíl zvláště výrazný. Z tohoto poznatku lze usoudit, že *Paenibacillus* sp. XD buď napomáhá tvorbě biofilmu těmto třem zmíněným kulturám, nebo jde o tvorbu biofilmu samotnou kulturou XD, jak dokládají výsledky v tab. 6.

Nárůst biomasy v xanthanovém a rafinózovém médiu je vyobrazen v grafech na obrázcích 6 a 7. Křivky obou grafů zobrazují nárůst absorbance v průběhu kultivace *Paenibacillus* sp. XD a odpovídají základní křivce růstu bakteriální populace. Výsledky ukazují, že během druhého dne se bakterie intenzivně množily, což dokazují změřené absorbance, které u xanthanového média dosáhly nejvyšší hodnoty 0,741 a u rafinózového média 0,311. Od třetího dne začaly hodnoty absorbance u obou médií klesat. Tento pokles souvisí se stacionární fází růstu, kdy se zpomaluje rychlost množení buněk, dochází k akumulaci metabolitů a živné médium je vyčerpáno.

Aktivita stanovených enzymů β -D-glukozidázy a α -D-galaktozidázy je vyobrazena na obrázcích 10, 11, 14, 15, 18 a 19. Křivky grafů na obrázcích 8, 9, 12, 13, 16 a 17 představují závislost absorbance, která byla následně přepočítána na aktivity stanovených enzymů β -D-glukozidázy a α -D-galaktozidázy, na odběrových časech v průběhu kultivace. Všechny křivky mají rostoucí charakter, což vypovídá o tom, že se začala projevovat aktivita těchto extracelulárních enzymů, které nejvíce rozkládaly živná média se sacharidem v průběhu druhého dne a třetí den tyto hodnoty aktivit začaly klesat. Pokles byl způsoben vyčerpáním živného média, tedy snížením enzymové aktivity odpovědné za degradaci. Ze všech grafů je také patrné, že vzorky obsahující chromogenní substrát 1 (4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside pro stanovení β -D-glukozidázové aktivity) dosahuje nižších hodnot aktivit, než substrát 2 (4-Nitrophenyl α -D-galactopyranoside pro stanovení α -D-galaktozidázové aktivity). Enzym α -D-galaktozidáza je tedy produkován bakterií *Paenibacillus* sp. XD více, než β -D-glukozidáza. Domněnkou, proč se tento enzym nachází ve větším množství i v xanthanovém médiu, které neobsahuje galaktózu, by mohlo být, že enzymy pro rozklad galaktózy jsou konstitutivní, tzn., že je buňka tvoří za každých okolností v konstantním množství, dalším důvodem může být, že některý z enzymů podílejících se na rozkladu xanthanu má také galaktozidázovou aktivitu. Nejvyšších hodnot aktivit dosahovaly enzymy při měření aktivity média a buněk (Obr. 8, 9), naopak nejnižších

hodnot dosáhly při měření aktivity u promytých buněk (Obr. 12, 13). Z toho se dá usuzovat, že naměřené aktivity byly extracelulární. Enzymová aktivita β -D-glukozidázy a α -D-galaktozidázy vykazovala vyšší hodnoty v xanthanovém médiu, než v médiu s rafinózou.

ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla studována schopnost degradace bakteriálního exopolysacharidu xanthanu a trisacharidu rafinózy grampozitivní bakterií *Paenibacillus* sp. XD. Degradční testy byly prováděny měřením nárůstu biomasy v minerálních médiích s xanthanem a rafinózou, kdy byla bakterie do těchto médií zaočkována a ve stanovených časech v době kultivace byly z této suspenze prováděny odběry vzorků. Výsledky zjištěné ze změřené absorbance ukázaly, že bakterie degraduje tyto sacharidy, přičemž největší růst vykazovala v průběhu druhého dne kultivace. Schopnost degradace byla měřena také stanovením rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v minerálních médiích s rafinózou a stachyózou, kdy snižující se koncentrace DOC v průběhu kultivace byly důkazem, že bakterie rozkládala tyto dva sacharidy.

Paenibacillus sp. XD byl testován také pro existenci extracelulárních enzymů β -D-glukozidázy a α -D-galaktozidázy při rozkladu xanthanu a rafinózy. Tato existence byla prokázána zvyšujícími se hodnotami aktivit těchto enzymů v průběhu kultivace v xanthanovém a rafinózovém médiu. Vyšší aktivitu vykazoval u obou sacharidových substrátů enzym α -D-galaktozidáza.

U bakterie byl také sledován vliv na tvorbu biofilmu vybraných biofilmových kultur. Ze statistického zhodnocení změřených absorbancí vyplývá, že u kultur *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas aeruginosa* FT 2 a FT 4, *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415 a *Enterococcus faecalis* CCM 7000 inhibuje tvorbu jejich biofilmu a kulturám *E. coli* CCM 3954, 3988 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224 buď napomáhá v tvorbě biofilmu, nebo se jedná o tvorbu biofilmu samotnou kulturou *Paenibacillus* sp. XD.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Palaniraj, A., Vijayakumar, J., Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*, *Journal of Food Engineering*, 2011, 106, 1–12.
- [2] Nankai, H., Hashimoto, W., Murata, K., Molecular Identification of Family 38 α -Mannosidase of *Bacillus* sp. Strain GL1, Responsible for Complete Depolymerization of Xanthan, *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68, 2731–2736.
- [3] Jansson, P. E., Kenne, L., Lindberg, B., Structure of the exocellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*, *Carbohydrate Research*, 1975, 45, 275–282.
- [4] Melton, L. D., Mindt, L., Rees, D., Sanderson, G. R., Covalent structure of the polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies, *Carbohydrate Research*, 1976, 46, 245–257.
- [5] Milas, M., Rinaudo, M., Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan, *Carbohydrate Research*, 1979, 76, 189–196.
- [6] *Xanthomonas campestris* [online] [cit. 2013-11-17]. Dostupné z: https://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/hanson_tori/interactions.htm
- [7] Sutherland, I. W., Xanthan lyases – novel enzymes found in various bacterial species, *J. Gen. Microbiol.*, 1987, 133, 3129–3134.
- [8] Ruijssenaars, H. J., J. A. M. de Bont, and S. Hartmans., A pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 2446–2452.
- [9] Ruijssenaars, H. J., Sybehartmans, Verdoes, J., A Novel Gene Encoding Xanthan Lyase of *Paenibacillus alginolyticus* Strain XL-1, *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66, 3945–3950.
- [10] Ruijssenaars, H. J., Bont, J. A. M., Hartmans, S. A Pyruvated Mannose-Specific Xanthan Lyase Involved in Xanthan Degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65, 2446–2452.
- [11] Sutherland, I. W., Polysaccharide lyases, *FEMS Microbiol. Rev.* 1996, 16, 323–347.
- [12] Sutherland, I. W., Xanthan lyases - novel enzymes found in various bacterial species, *J. Gen. Microbiol.*, 1987, 133, 3129–3134.

- [13] Muchová M., Růžička J., Julinová M., Doležalová M., Houser J., Koutný M. and Buňková L.: Xanthan and gellan degradation by bacteria of activated sludge, *Water Science and Technology* - odesláno listopad 2008.
- [14] Hashimoto W., Miki H., Tsuchiya N., Nankai H., Murata K., Xanthan Lyase of *Bacillus* sp. Strain GL1 Liberates Pyruvylated Mannose from Xanthan Side Chains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 3765–3768.
- [15] Sharma, B. R., Naresh, L., Dhuldhoya, N. C., Merchant, S. U., Merchant, U. C., Xanthan gum - a boon to food industry, *Food Promotion Chronicle*, 2006, 1, 27–30.
- [16] Liu H., Huang Ch., Dong W., Du Y., Bai X., Li X., Biodegradation of xanthan by newly isolated *Cellulomonas* sp. LX, releasing elicitor-active xantho-oligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons, *Process Biochemistry* 2005, 40, 3701–3706.
- [17] Muchová, M. Mikrobiální degradace vybraných polysacharidů. Disertační práce, 2009
- [18] Obendorf, R. L., Ryszard J. G., Soluble carbohydrates in legume seeds, *Seed Science Research*, 2012 22, 219–242.
- [19] Amuti, K. S., Pollard, C. J. The metabolism of galactose and the raffinose oligosaccharides by germinating Bambarra groundnut seeds, *Phytochemistry* 1977, 16, 533–537.
- [20] Use of non-digestible oligosaccharides [online] [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/WO2011027128A1?cl=en>
- [21] Naczka, M., Amarowicz, R., Shahidi, F., α -Galactosides of sucrose in foods: composition, flatulence-causing effects, and removal, *American Society of Chemistry Symposium Series*, 1997, 662, 127–151.
- [22] Horbowicz, M. and Obendorf, R. L. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey, *Seed Science Research*, 1994, 4, 385–405.
- [23] Peterbauer, T., Mach, L., Mucha, J., Richter, A., Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthe-

- sis, *Planta*, 2002, 215, 839–846.
- [24] *Scientific psychic* [online] [cit. 2014-01-20]. Dostupné z:
<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos1.html>
- [25] V. D. Prajapati. a kol., Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 60, 83– 92.
- [26] Kők, M. S., Hill, S. E., Mitchell, J. R., Viscosity of galactomannans during high temperature processing: influence of degradation and solubilisation, *Food Hydrocolloids*, 1999, 13, 535–542.
- [27] Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., Vicenta, A. A., Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications, *Trends in Food Science & Technology*, 2011, 22, 662–671.
- [28] Cerqueira, M. A., Pinheiro, A. C., Souza, B. W. S., Lima, A. M., Ribeiro, C., Miranda, C., Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources, *Carbohydrate Polymers*, 2009, 75, 408–414.
- [29] *Scientific psychic* [online] [cit. 2014-01-20]. Dostupné z:
<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>
- [30] McCutchen, C. M., Duffaud, G. D., Leduc, P., Petersen, A. R. H., Tayal, A., Khan, S. A., & Kelly, R. M, Characterization of extremely thermostable enzymatic breakers (α -1,6-galactosidase and beta-1,4-mannanase) from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 for hydrolysis of guar gum, *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 52, 332–339.
- [31] Hu, K., Li, Ch., Pan, J., Ni, Y., Zhang, X., Xu, J., Performance of a New Thermostable Mannanase in Breaking Guar-Based Fracturing Fluids at High Temperatures with Little Premature Degradation, *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 172, 121 –1226.
- [32] JUREČKOVÁ S., *Studium vlastností sacharolytické bakterie Verrucomicrobium sp. GD*. Zlín, 2014. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
TBA	Kyselina thiobarbiturová
XY	Xanthanové médium
XYG	Xanthanové médium s přidavkem glukózy
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
XD	Kultura <i>Paenibacillus</i> sp. XD (XD – xanthan degradation, pracovní název)
RFO	Oligosacharidy z rodiny rafinózy (Raffinose family oligosacharides)
TYA	Tryptonový agar s kvasičním extraktem
TYA-GLU	Tryptonový agar s kvasičním extraktem a glukózou
SDS	Dodecylsulfát sodný
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetra-methylendiamid
TSB	Tryptózo-sójový bujón
X + XD	Minerální médium s xanthanem a kulturou XD
R + XD	Minerální médium s rafinózou a kulturou XD
DtManB	Enzym mananáza produkovaná mikroorganizmem <i>Dictyoglomus thermophilum</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Struktura xanthanu [6]	13
Obr. 2 Působení specifické xanthan-lyázy [9]	14
Obr. 3 Chemická struktura rafinózy [24]	18
Obr. 4 Chemická struktura guarové gumy [29]	20
Obr. 5 Výsledek gelové elektroforézy	36
Obr. 6 Hodnoty absorbance zobrazující nárůst biomasy kultury XD v xanthanovém médiu v závislosti na době kultivace	42
Obr. 7 Hodnoty absorbance zobrazující nárůst biomasy kultury XD v rafinózovém médiu v závislosti na době kultivace	42
Obr. 8 Hodnoty absorbance xanthanového média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace	44
Obr. 9 Hodnoty absorbance rafinózového média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace	45
Obr. 10 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u xanthanového média	46
Obr. 11 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u rafinózového média	47
Obr. 12 Hodnoty absorbance xanthanového média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace	49
Obr. 13 Hodnoty absorbance rafinózového média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace	50
Obr. 14 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u xanthanového média	51
Obr. 15 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u rafinózového média	52
Obr. 16 Hodnoty absorbance xanthanového média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace	53

Obr. 17 Hodnoty absorpance rafinóзовého média s chromogenním substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) v závislosti na době kultivace.....	54
Obr. 18 Závislost enzymových aktivit na době kultivaceu xanthanového média	55
Obr. 19 Závislost enzymových aktivit na době kultivace u rafinóзовého média.....	56
Obr. 20 Srovnání α -D-galaktozidázových aktivit v xanthanovém médiu	57
Obr. 21 Srovnání α -D-galaktozidázových aktivit v rafinóзовém médiu.....	57
Obr. 22 Srovnání β -D-glukozidázových aktivit v xanthanovém médiu	58
Obr. 23 Srovnání β -D-glukozidázových aktivit v rafinóзовém médiu	58

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Hodnoty DOC v médiích na začátku	35
Tab. 2 Hodnoty DOC v médiích po 2, 6 a 14 denní kultivaci	35
Tab. 3 Hodnoty absorbancí pro biofilmové kultury rodů <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> a <i>Klebsiella</i> a výpočet t-testu z těchto hodnot	38
Tab. 4 Hodnoty absorbancí pro biofilmové kultury bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a výpočet t-testu z těchto hodnot	39
Tab. 5 Hodnoty absorbancí pro biofilmové kultury rodů <i>Escherichia</i> a <i>Enterococcus</i> a výpočet t-testu z těchto hodnot	40
Tab. 6 Hodnoty absorbancí pro biofilmové kultury rodu <i>Staphylococcus</i> a výpočet t- testu z těchto hodnot	41
Tab. 7 Hodnoty absorbancí změřené z odběrů vzorků v daných časech v průběhu kultivace	42
Tab. 8 Hodnoty absorbancí pro xanthanové médium se substrátem 1 (pro β -D- glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) a pro MM	44
Tab. 9 Hodnoty absorbancí pro rafinóзовé médium se substrátem 1 (pro β -D- glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) a pro MM	45
Tab. 10 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro xanthanové médium	46
Tab. 11 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro rafinóзовé médium	47
Tab. 12 Hodnoty absorbancí pro xanthanové médium se substrátem 1 (pro β -D- glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) a pro MM	48
Tab. 13 Hodnoty absorbancí pro rafinóзовé médium se substrátem 1 (pro β -D- glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu) a pro MM	49
Tab. 14 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro xanthanové médium	50
Tab. 15 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro rafinóзовé médium	51
Tab. 16 Hodnoty absorbancí pro xanthanové médium se substrátem 1 (pro β -D- glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu)	53

Tab. 17 Hodnoty absorbancí pro rafinóзовé médium se substrátem 1 (pro β -D-glukozidázovou aktivitu) a 2 (pro α -D-galaktozidázovou aktivitu)	54
Tab. 18 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro xanthanové médium	54
Tab. 19 Hodnoty enzymových aktivit vypočítaných z naměřených absorbancí pro rafinóзовé médium	55