

# **Biodiverzita bakterií produkujících biopolymery v přírodních minerálních vodách**

Martina Brožová

---

Bakalářská práce  
2023

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martina Brožová**  
Osobní číslo: **T20404**  
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**  
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Biodiverzita bakterií produkujících biopolymery v přírodních minerálních vodách**

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

Vypracujte literární rešerši zahrnující následující oblasti:

1. Charakteristika polyhydroxyalkalonátů
2. Biodiverzita
3. Metody detekce polyhydroxyalkalonátů

### II. Praktická část

1. Detekce a identifikace mikroorganismů pomocí sekvenace DNA
2. Screening produkce polyhydroxyalkalonátů molekulárně biologickými metodami
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] FARIQ, Anila a Azra YASMIN. Production, characterization and bioactivities of biosurfactants from newly isolated strictly halophilic bacteria. *Process Biochemistry* [online]. 2020, 98, 1-10. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2020.07.011.
- [2] KOURILOVA, Xenie, Iva PERNICOVA, Karel SEDLAR, Jana MUSILOVA, Petr SEDLACEK, Michal KALINA, Martin KOLLER a Stanislav OBRUCA. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresource Technology*. 2020, 315. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123885.
- [3] MARGESIN, Rosa a Franz SCHINNER. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 2001, 5(2), 73-83. ISSN 1431-0651. Dostupné z: doi:10.1007/s007920100184.
- [4] PARADA-PINILLA, Maria Paula, Maria Alejandra FERREIRA, Juan Camilo RONCALLO, et al. Biopolymer production by halotolerant bacteria isolated from Caatinga biome. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021, 52(2), 547-559. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi:10.1007/s42770-021-00426-1.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Pavel Pleva, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **1. února 2023**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou přírodní polymery, které jsou zajímavé především jako alternativa k polymerům petrochemického původu. Vlastnosti jako biokompatibilita a biodegradabilita jsou vhodné pro aplikace v tkáňovém inženýrství jako biomateriálu nebo při průmyslovém využití jako obalového materiálu pro potraviny. Tyto biopolymery jsou při nutričně nevyvážených podmínkách produkovány širokým spektrem mikroorganismů včetně těch, kteří prosperují v extrémních podmínkách (vysoká teplota, salinita, pH), tzv. extrémofily.

V této práci byla metodou Next generation sequencing (NGS) zkoumána biodiverzita přírodních minerálních pramenů z několika lokalit v České republice. Na základě srovnání s literaturou byly objeveny některé bakteriální rody patřící mezi známé PHA producenty (*Pseudomonas*, *Rhodospirillum rubrum*, *Thermus*). Dále se ze vzorku minerální vody podařilo izolovat bakterii *Pseudomonas putida*, která byla podrobena fenotypovým a genotypovým testům na produkci PHA.

Klíčová slova: biodiverzita, extrémofilové, metagenomika, NGS, polyhydroxyalkanoáty

## **ABSTRACT**

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biopolymers examined as an alternative to petroleum-based polymers. Properties such as biocompatibility and biodegradability are suitable for applications in tissue engineering as a biomaterial or for industrial use as packaging material for food. These biopolymers are produced under nutrient deficient conditions by a wide range of microorganisms, including those that thrive in extreme conditions (high temperature, salinity, pH), so-called extremophiles.

In this work Next generation sequencing (NGS) was used to investigate the biodiversity of natural mineral springs from several locations in the Czech Republic. Based on a comparison with the literature, some bacterial genera belonging to known PHA producers (*Pseudomonas*, *Rhodospirillum rubrum*, *Thermus*) were discovered. Furthermore, it was possible to isolate the bacterium *Pseudomonas putida* from one of the water samples, which was subjected to phenotypic and genotypic tests for PHA production.

**Keywords:** biodiversity, extremophiles, metagenomics, NGS, polyhydroxyalkanoates

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za jeho pomoc, cenné rady, a především za trpělivost. Dále mé díky patří zaměstnancům z Ústavu ochrany životního prostředí za pomoc při práci v laboratoři. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 POLYHYDROXYALKANOÁTY</b> .....	<b>12</b>
1.1 STRUKTURA POLYHYDROXYALKANOÁTŮ.....	12
1.2 BIOSYNTÉZA POLYHYDROXYALKANOÁTŮ.....	14
1.2.1 Biosyntéza ze souvisejících zdrojů .....	15
1.2.2 Biosyntéza z nesouvisejících zdrojů .....	16
1.3 PRODUCENTI POLYHYDROXYALKANOÁTŮ.....	17
1.3.1 Gramnegativní bakterie .....	17
1.3.2 Grampozitivní bakterie.....	18
1.3.3 Archea .....	18
1.3.4 Rekombiantní producenti .....	18
1.4 VLASTNOSTI A VYUŽITÍ POLYHYDROXYALKANOÁTŮ .....	19
1.4.1 Biomedicínské aplikace .....	20
1.4.2 Využití jako obalový materiál.....	21
<b>2 BIODIVERZITA</b> .....	<b>22</b>
2.1 EXTRÉMofilní MIKROORGANISMY .....	22
2.1.1 Adaptace na extrémní podmínky .....	23
2.1.2 Průmyslové využití.....	24
2.2 PŘÍRODNÍ MINERÁLNÍ PRAMENY.....	25
2.2.1 Horní Moštěnice.....	26
2.2.2 Karlovy Vary.....	26
2.2.3 Luhačovice .....	27
2.2.4 Poděbrady.....	28
2.3 NEXT GENERATION SEQUENCING.....	28
<b>3 METODY DETEKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ</b> .....	<b>30</b>
3.1 FENOTYPOVÉ METODY DETEKCE .....	30
3.1.1 Barvení .....	30
3.2 GENOTYPOVÉ METODY DETEKCE .....	31
3.2.1 Polymerázová řetězová reakce .....	31
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
<b>4 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>33</b>
<b>5 MATERIÁL</b> .....	<b>34</b>
5.1 VZORKY .....	34
5.2 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE.....	34
5.3 CHEMIKÁLIE.....	35



5.4	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	36
<b>6</b>	<b>METODIKA .....</b>	<b>37</b>
6.1	VZORKOVÁNÍ .....	37
6.2	NEXT GENERATION SEQUENCING.....	37
6.2.1	Izolace deoxyribonukleové kyseliny .....	37
6.2.2	Příprava knihovny pro NGS.....	39
6.2.3	Sekvenace a analýza dat.....	40
6.3	METODY IZOLACE A IDENTIFIKACE .....	40
6.3.1	Gramovo barvení.....	40
6.3.2	Oxidačně-fermentační test .....	41
6.3.3	NEFERMtest 24 .....	41
6.4	DETEKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ .....	41
6.4.1	Polymerázová řetězová reakce .....	41
6.4.2	Barvení .....	43
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>44</b>
7.1	MIKROBIÁLNÍ DIVERZITA V PŘÍRODNÍCH MINERÁLNÍCH PRAMENECH.....	44
7.1.1	Taxonomická biodiverzita.....	44
7.1.2	Analýza diverzity .....	50
7.2	IZOLACE A IDENTIFIKACE .....	52
7.3	DETEKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ U <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> .....	52
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>54</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>69</b>

## ÚVOD

Snáší neuvěřitelný tlak na dně Mariánského příkopu nebo kruté zimy za polárním kruhem. Jsou odolní vůči silně kyselému či zásaditému prostředí. Dokonce prosperují v horkých termálních pramenech s teplotami blízkými bodu varu. Organismům, které jsou schopné života v takových podmínkách, se označují jako extrémofilní. Nejčastěji mezi ně patří prokaryotické *Archeae*, ale své zástupce mají i mezi bakteriemi, a dokonce i eukaryotami.

Jejich výjimečně stabilní makromolekuly otevírají dveře novým průmyslovým aplikacím díky metodám genového inženýrství. Produkují také mnohé užitečné látky jako jsou barviva, biosurfaktanty nebo nejrůznější biopolymery. A právě mezi takovéto biopolymery se řadí i polyhydroxyalkanoáty (PHA). Nejvíce prozkoumaným je pak polyhydroxybutyrát, který se v mnohých aspektech podobá polypropylenu. Oproti němu je však jednoduše rozložitelný, proto je uvažován jako alternativní materiál pro jednorázové obaly některých potravin. Další zásadní vlastností je dobrá snášenlivost PHA tkáněmi, je tak ceněný především v tkáňovém inženýrství jako biomateriál. Z důvodu vysoké ceny a složité produkce, jsou v současné době PHA využívány nejvíce právě pro tento účel.

Díky nižším nárokům na sterilitu prostředí, oproti běžným bakteriím, by využití extrémofilních producentů mohlo snížit náklady na výrobu. Polyhydroxyalkanoáty by se tak mohly stát konkurenceschopnými pro běžně užívané polymery petrochemického původu.

Tato práce se zabývá analýzou biodiverzity přírodních minerálních pramenů se zaměřením na PHA producenty. U jednoho z izolátů byly provedeny fenotypové a genotypové testy na produkci PHA.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYHYDROXYALKANOÁTY

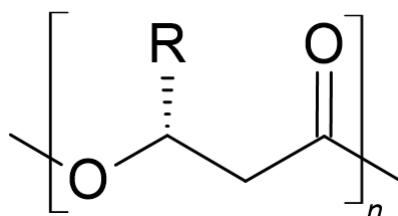
Biopolymery jsou dobrou alternativou pro polymery petrochemického původu, jelikož vykazují podobné chemicko-fyzikální vlastnosti jako některé konvenčně používané plasty. Oproti nim mají však řadu výhod, jako je jejich biodegradabilita, recyklovatelnost a biokompatibilita (Anjum *et al.* 2016). Mezi takové biopolymery se řadí i polyhydroxyalkanoáty (PHA), které jsou přirozeně produkovány velkým množstvím bakterií a některými druhy *Archeae*, jako intracelulární zásobní látka (Goswami *et al.* 2021). V současné době je jejich využití však limitováno vysokou cenou, která se odvíjí od použitého mikroorganismu, substrátu, způsobu extrakce, čistoty biopolymeru a mnoha dalších faktorů. Pro porovnání, americká biotechnologická firma Merck Group ke dni 14.5.2023 nabízí 100 g polyhydroxybutyrát za 28 300 Kč a 1 kg polypropylenu za 3 530 Kč.

### 1.1 Struktura polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty jsou z chemického hlediska biopolyestery, které se obecně skládají z (*R*)-3-hydroxy mastných kyselin s rozličnými bočními řetězci (Obrázek 1). Ty mohou být nasycené, nenasycené, alifatické, rozvětvené nebo mohou obsahovat substituent. Podle počtu uhlíků v monomerní jednotce můžeme PHA rozdělit do tří skupin:

- PHA<sub>scl</sub> s krátkým řetězcem (short chain length), které obsahují 3-5 atomů uhlíku,
- PHA<sub>mcl</sub> se středně dlouhým řetězcem (medium chain length) obsahující 6-14 atomů uhlíku,
- PHA<sub>lcl</sub> s dlouhým řetězcem (long chain length), které obsahují více než 14 atomů uhlíku

Dnes je známo více než 150 druhů monomerních jednotek (Visakh P. M. 2014).

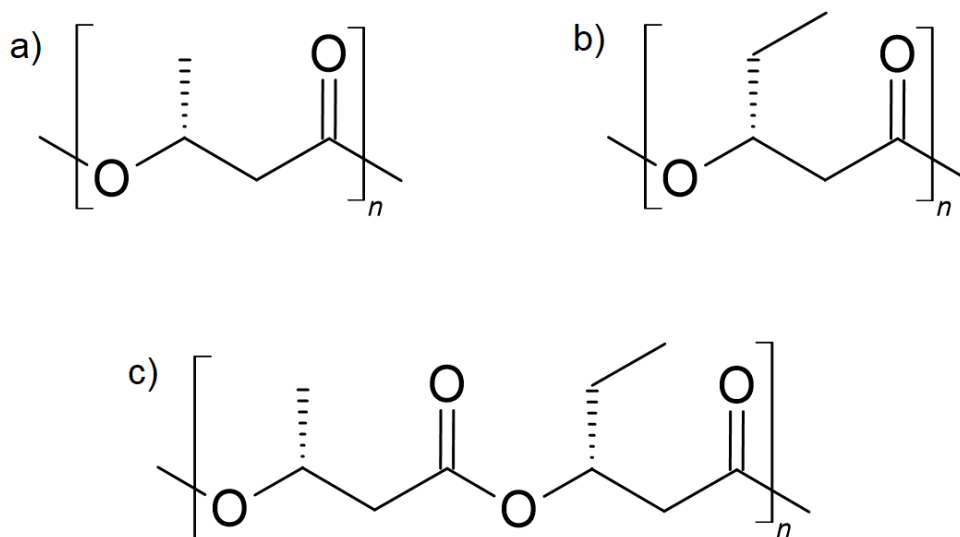


Obrázek 1 Struktura PHA (upraveno dle Emaimo *et al.*, 2022)

Nejvíce rozšířeným a zároveň nejvíce prozkoumaným PHA je poly(3-hydroxybutyrát) (PHB). Jedná se o polyester kyseliny  $\beta$ -hydroxymáselné, který byl jako první objeven u bakterie *Bacillus megaterium* (Lemoigne 1926). Takto produkováný PHB je

semikrystalický a isotakticky stereoregulární polymer, což je také důvodem jeho velmi dobré biodegradability (Bugnicourt *et al.* 2014).

Mezi další známé PHA patří i poly(3-hydroxyvalerát) (PHV), jehož postranní řetězec je tvořen etylovou skupinou. Často průmyslově využívaný a dobře prozkoumaný je pak jeho kopolymer s PHB, poly(3-hydroxybutyrát-*co*-hydroxyvalerát) (PHBV) (Obrázek 2).



Obrázek 2 a) PHB, b) PHV, c) PHBV (upraveno dle Emaimo *et al.*, 2022)

Polyhydroxyalkanoáty se akumulují v cytoplasmě jako ve vodě nerozpustné granulární inkluze o velikosti 100 až 500 nm (Obrázek 3). Jejich struktura v dnešní době stále není dostatečně prozkoumána, na jejím povrchu byla ovšem prokázána přítomnost tzv. Granule-Associated proteins (GAPs). Jmenovitě se jedná o PHA syntázu (*phaC*), PHA depolymerázu (*phaZ*), phasiny (*phaP*) a regulační proteiny (*phaR*) (Goswami *et al.* 2021).

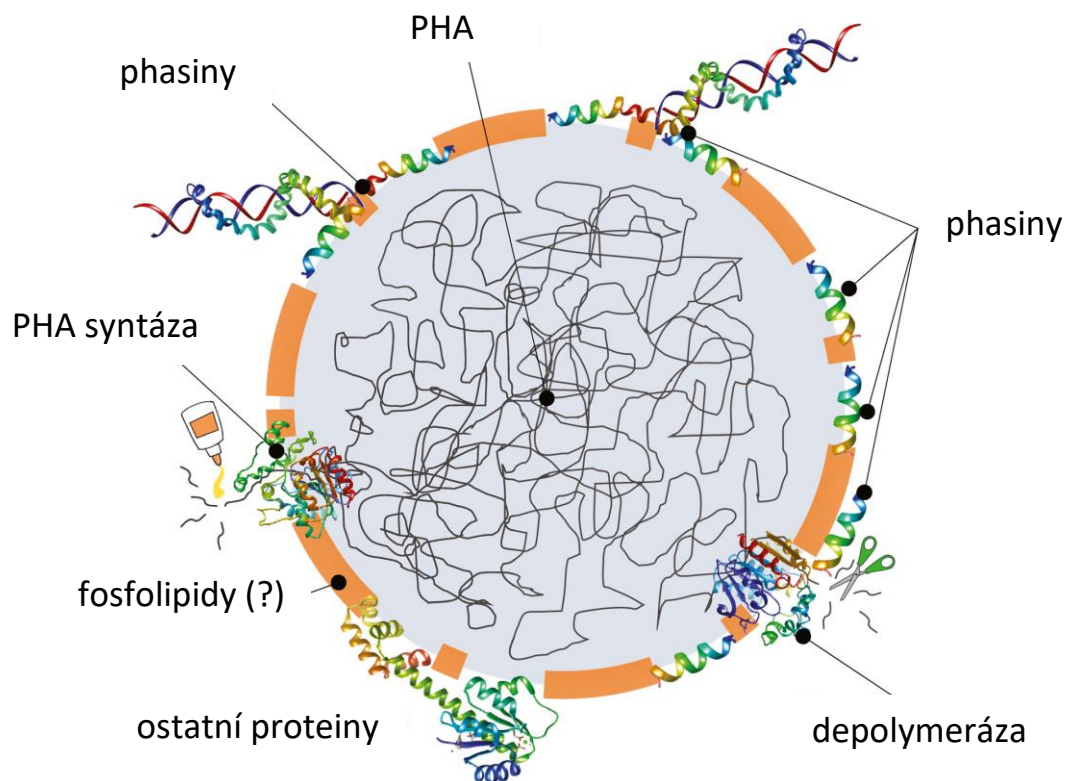
PHA syntáza je klíčový enzym pro biosyntézu PHA, jelikož katalyzuje polymeraci monomeru. Syntázy jsou rozdělené do čtyř tříd na základě jejich primární sekvence, substrátové specifity a jejich kompozice:

- a) Třídy I a II jsou tvořeny jednou *phaC* jednotkou,
- b) Třída III je tvořena heterodimerem z *phaC* a *phaE* podjednotek,
- c) Třída IV je tvořena heterodimerem z podjednotek *phaC* a *phaR*.

Třídy I, III a IV syntetizují PHA<sub>scl</sub> a třída II produkuje PHA<sub>mcl</sub> (Zher Neoh *et al.* 2022).

PHA depolymeráza degraduje intracelulární inkluze, případně rozkládá granule přítomné v prostředí uvolněných například z neživých buněk. Phasiny jsou strukturální proteiny, které

díky své amfifilní struktuře stabilizují jednotlivé granule a nedochází tak k jejich vzájemné koalescenci (Grage *et al.* 2009). Regulační proteiny přímo ovlivňují produkci phasinů a syntézu PHA granulí (Maestro & Sanz 2017). Kromě GAPs některé dřívější studie uvádějí i obsah fosfolipidové složky, ovšem novější data poukazují na to, že by jejich přítomnost v granulích mohla být zapříčiněná způsobem extrakce, a tím pádem se *in vivo* nenachází (Bresan *et al.* 2016).



Obrázek 3 Struktura PHA granule (upraveno dle Maestro a Sanz, 2017)

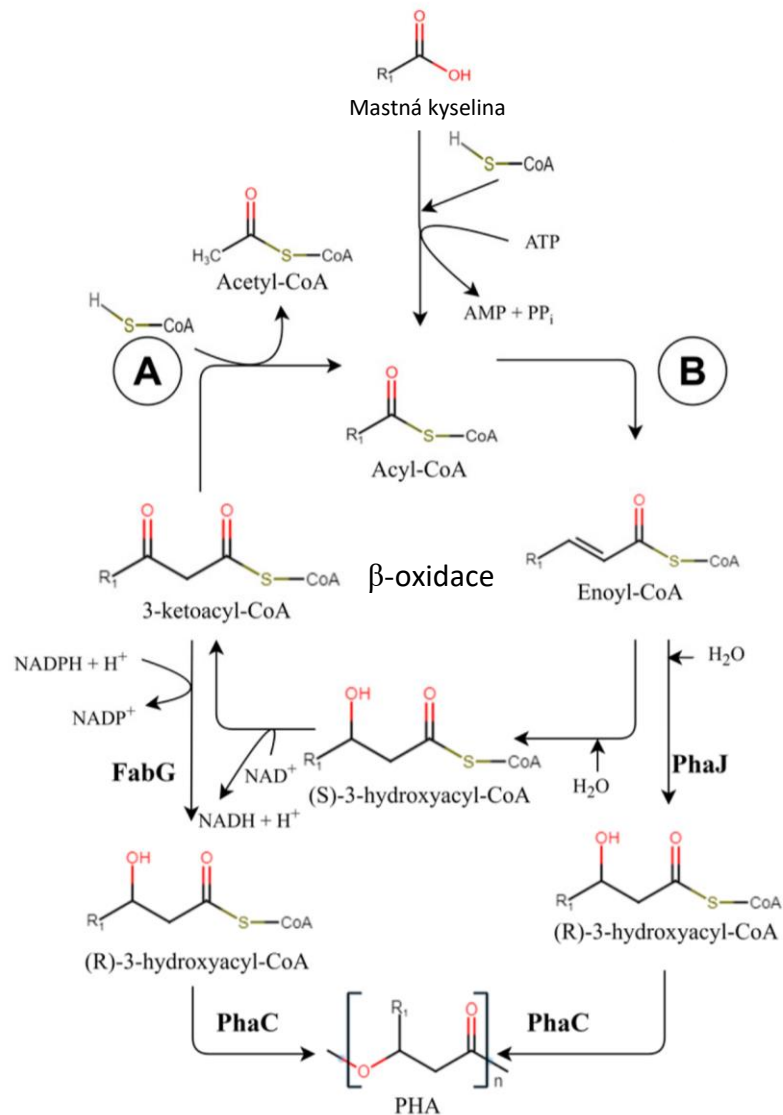
## 1.2 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů je složitý metabolický proces, který úzce souvisí i s dalšími metabolickými drahami (glykolýza, Krebsův cyklus,  $\beta$ -oxidace atd.). Je velmi ovlivněna nutričními podmínkami. Při podmínkách bohatých na živiny dochází k vysoké produkci koenzymu A (CoA), což inhibuje enzym 3-ketothiolázu (*phaA*) a acetyl-CoA je tak přednostně směřován do Krebsova cyklu, kde se přeměňuje na energii a podporuje růst buňky. Naopak, při nadbytku uhlíku a nedostatku základních živin (např. dusík, fosfor) není *phaA* inhibován a acetyl-CoA může být využit na tvorbu PHA granulí (Tan *et al.* 2014).

Znalosti o biosyntetických drahách jsou z velké části omezeny na prekurzory (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA (Tan *et al.* 2014). Čtyři základní cesty metabolismu jsou popsány v následujících řádcích.

### 1.2.1 Biosyntéza ze souvisejících zdrojů

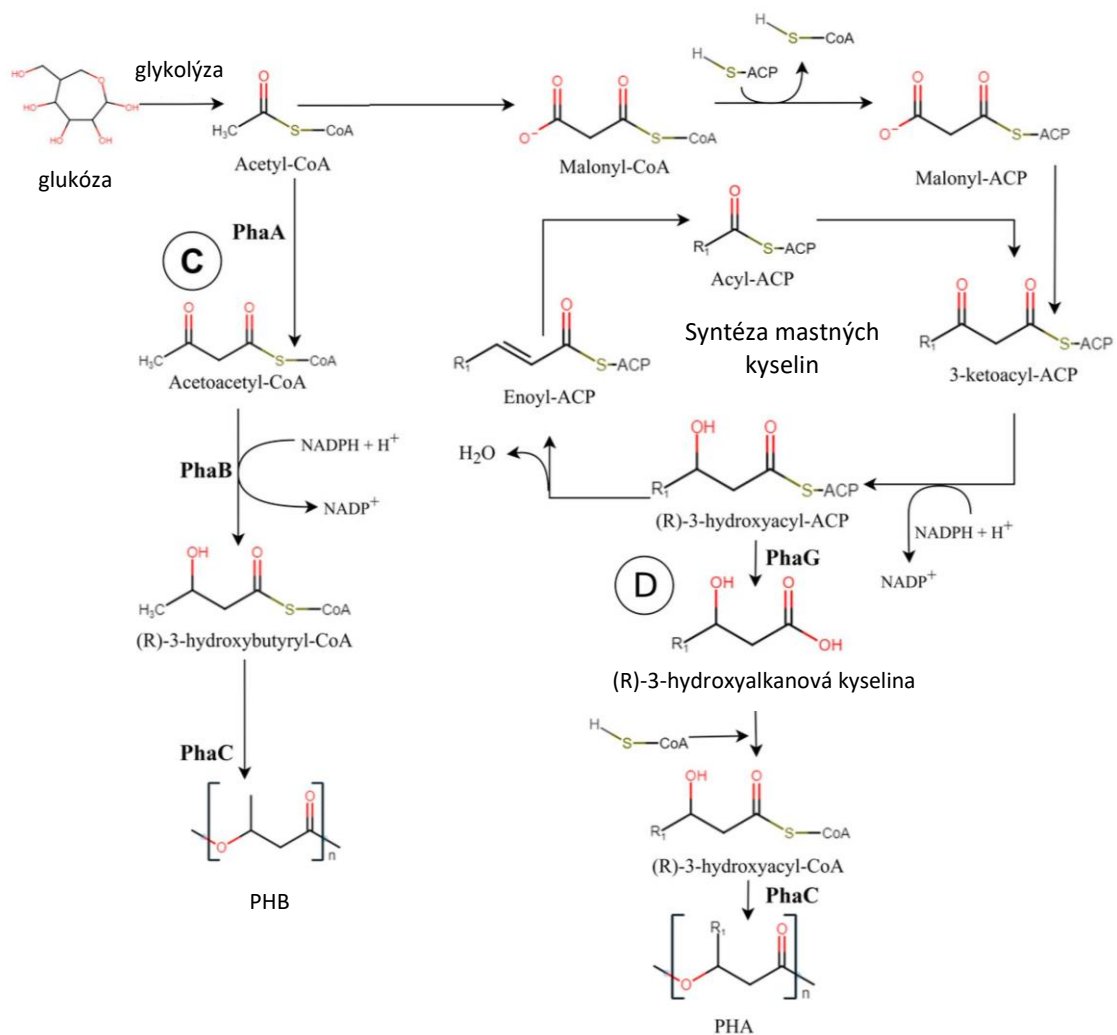
Cesty A a B znázorňují produkci PHA ze souvisejících zdrojů, tzn. výchozí substrát je prekurzorem monomeru. V tomto případě se jedná o mastnou kyselinu, kdy je biosyntéza PHA spojena s  $\beta$ -oxidací. Nejprve je mastná kyselina enzymaticky aktivována acyl-CoA syntázou za spotřeby adenosintrifosfátu (ATP) a CoA. Acyl-CoA poté vstupuje do  $\beta$ -oxidace odkud do biosyntézy PHA mohou vstupovat vzniklé meziproducty. V případě cesty A dochází k redukci 3-ketoacyl-CoA na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA pomocí enzymu 3-ketoacyl reductázy (*fabG*). Cesta B popisuje hydrataci enoyl-CoA opět na (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA za přítomnosti R-specifické enoyl hydratázy (*phaJ*). *PhaC* pak katalyzuje polymerační reakci za vzniku konkrétního polyhydroxyalkanoátu (Máčalová *et al.* 2023).



Obrázek 4 Biosyntéza ze souvisejících zdrojů (upraveno dle Máčalová *et al.* 2023)

### 1.2.2 Biosyntéza z nesouvisejících zdrojů

Biosyntéza z nesouvisejících zdrojů je na schématu znázorněna cestami C a D, zdrojem uhlíku je glukóza. Ta vstupuje do glykolýzy, kde je enzymaticky štěpena na acetyl-CoA. Ten může být 3-ketothiolázou (*phaA*) přeměněn na acetoacetyl-CoA, dále dochází k jeho redukcí NADPH acetoacetyl-CoA reduktázou (*phaB*) na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA a pomocí *phaC* pak dochází k polymeraci na polyhydroxybutyrát (cesta C). Cesta D zahrnuje meziproducty syntézy mastných kyselin. Před vstupem do této metabolické cesty je acetyl-CoA aktivován acetyl-CoA karboxylázou za spotřeby ATP na malonyl-CoA. Biosyntézy PHA se pak účastní meziproduct (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP (acyl carrier protein), a působením enzymu hydroxyacyl-ACP specifické thioesterázy (*phaG*) dochází ke vzniku (*R*)-3-hydroxyalkanové kyseliny. Kondenzací s acyl-CoA vzniká (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, který následně vlivem *phaC* polymeruje na výsledný produkt (Máčalová *et al.* 2023).



Obrázek 5 Biosyntéza PHA z nesouvisejících zdrojů (upraveno dle Máčalová *et al.* 2023)



### 1.3 Producenti polyhydroxyalkanoátů

Schopnost produkovat PHA byla prokázána u více jak 300 druhů, z nichž převážnou většinu tvoří bakterie. Ty můžeme rozdělit do dvou skupin na základě podmínek nutných pro syntézu. První skupinou jsou bakterie, které produkují PHA pouze při nedostatku základních živin jako je dusík, fosfor nebo síra, a naopak vyžadují prostředí bohaté na uhlík. Druhou skupinou jsou bakterie, které pro syntézu PHA nevyžadují omezení nutričních podmínek, tzv. rekombinantní producenti (Anjum *et al.* 2016).

#### 1.3.1 Gramnegativní bakterie

Nejvíce známých PHA producentů se řadí mezi gramnegativní bakterie. Vysoké výtěžky  $PHA_{scl}$  byly prokázány například u rodů *Azohydeomonas*, *Burkholderia* a *Cupriavidus*. *Cupriavidus necator* může získávat energii jak autotrofně, tak i heterotrofně, což je pro produkci PHA velmi výhodné – jako substrát pro PHB lze využít například  $CO_2$ , sacharidy (glukóza, fruktóza) a oleje (olivový, kukuřičný, palmový) s výtěžkem 67 až 88,9 %CDM (hmotnost buněčné sušiny) (Tan *et al.* 2014). *Alcaligenes latus* syntetizuje PHB z glukózy, fruktózy a sacharózy s výtěžkem 50-80 %CDM (Grothe *et al.* 1999), u *Burkholderia* sp. je udávána produkce PHB až 69 %CDM při metabolismu mastných kyselin (Chee *et al.* 2010). Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou typičtí producenti  $PHA_{mcl}$ . U *P. putida* byla pozorována produkce s výtěžkem 83 %CDM  $PHA_{mcl}$  z kyseliny kaprylové (Fontaine *et al.* 2017).

Mezi další producenty PHA patří i některé extrémofilní bakterie. Termofilní *Thermus thermophilus* ze syrovátky při kultivačních podmínkách 70 °C produkuje až 35,6 %CDM kopolymeru  $PHA_{scl}$  a  $PHA_{mcl}$  (Pantazaki *et al.* 2009). Termofilní *Schlegelella thermodepolymerans* dokáže využít z xylózy kopolymer PHBV (Kourilova *et al.* 2020). Halofilní *Halomonas boliviensis* při salinitě prostředí 0,77 M NaCl syntetizuje ze škrobového hydrolyzátu PHB s výtěžkem až 56 %CDM (Quillaguamán *et al.* 2005). Potenciál pro využití halofilů je značný. Hlavní výhodou je nižší riziko kontaminace, kvůli vysoké salinitě kultivačního média. Při použití levných substrátů, například syrovátky, dochází vlivem působení hydrolytických enzymů k okyselení média, které musí být neutralizováno. Při použití NaOH vzniká NaCl, které přispívá k vyšší salinitě, čímž jsou podpořeny podmínky pro růst (Koller 2017).

Nevýhodou při získávání PHA z gramnegativních bakterií je přítomnost lipopolysacharidů (LPS) ve vnější membráně buněčné stěny, které se při extrakci mohou dostat i do PHA polymeru. Při rozpadu buňky se LPS uvolňují a působí jako pyrogen, v lidském organismu

jsou pak zodpovědné za lokální zánětlivé reakce. To je samozřejmě nevyhovující pro využití PHA jako biomateriálu (Raetz & Whitfield 2002). Polymer proto musí být následně purifikován, což vede k redukci molární hmotnosti a zvyšuje jeho cenu (Tan *et al.* 2014).

### 1.3.2 Grampozitivní bakterie

U grampozitivních bakterií byla schopnost produkce PHA pozorována u rodů *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* a *Streptomyces*. Výtěžky PHA jsou oproti gramnegativním bakteriím podstatně nižší, mezi 2 až 50 %CDM. Z tohoto důvodu nejsou zatím komerčně pro produkci PHA využívány. Na druhou stranu buněčná stěna grampozitivních bakterií neobsahuje LPS, což by z nich potenciálně mohlo činit lepší zdroj PHA pro biomedicínské aplikace. (Tan *et al.* 2014)

### 1.3.3 Archea

Schopnost produkovat PHA byla objevena výhradně u halofilních archeí, konkrétně u rodů *Haloferax*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Halopiger*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus* a *Natronomonas*. Jako substrát pro PHA<sub>scl</sub> lze využít glukózu, glycerol, syrovátku nebo škrob. U většiny haloarcheí je výtěžek bohužel velmi nízký (Tan *et al.* 2014). Průmyslově zajímavá je však *Haloferax mediterranei*, která při koncentraci 2 až 5 M NaCl produkuje 50 až 76 %CDM PHA (Bhattacharyya *et al.* 2012).

### 1.3.4 Rekombinantní producenti

Rekombinantní PHA producenti byli geneticky upraveni pro produkci PHA se specifickými vlastnostmi nebo pro zvýšení výtěžku oproti divokým kmenům. Díky genetickým modifikacím dochází i ke snížení ceny, jelikož lze využívat více zdrojů uhlíku.

*Escherichia coli* nepatří mezi přirozené PHA producenty, ale protože je velmi dobře prozkoumána, řadí se mezi vhodné kandidáty pro genetické modifikace. Rekombinantní *E. coli* akumuluje PHB až do 95 %CDM a dokáže produkovat i kopolymer PHBV (Fidler 1992). *Cupriavidus necator* je přirozeným PHB producentem, který byl modifikován vložením genů pro syntézu laktózy získaným z *E. coli* a odstraněním genů pro degradaci PHA (Povolo *et al.* 2010).

Pro produkci PHA byly upraveny kvasinky či rostliny. Z kvasinek lze zmínit rekombinantní *Saccharomyces cerevisiae*, u které byla pozorována akumulace 2,68 % CDM PHB (Abd-El-haleem *et al.* 2007). Z říše rostlin byl geneticky upravován Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) pomocí genů získaných z *Pseudomonas* sp. U této rostliny byly detekovány kopolymery z PHB, PHV a PHHx (Matsumoto *et al.* 2006).

#### 1.4 Vlastnosti a využití polyhydroxyalkanoátů

Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů se liší v závislosti na jejich chemické struktuře. Závisí především na typu obsažené mastné kyseliny, dále zda se jedná o homo nebo kopolymery. Zatímco PHA<sub>scl</sub> jsou krystalické a vykazují vlastnosti typické pro termoplasty, tak PHA<sub>mcl</sub> se dají považovat spíše za elastomery. Molekulární hmotnost polymeru může dosahovat hodnot od 50 000 až po miliony kg/mol, což jsou parametry ovlivněné typem použitého mikroorganismu, podmínkami růstu a metodou extrakce. Obecně se však dají PHA charakterizovat jako polymery ve vodě nerozpustné, relativně rezistentní vůči hydrolytické degradaci, s dobrou odolností vůči UV záření, ale špatně odolné kyselému a zásaditému prostředí. Nejsou toxické a vykazují vysokou biokompatibilitu. (Bugnicourt *et al.* 2014)

Čistý PHB disponuje řadou vlastností porovnatelných s běžnými polymery ropného původu (například s polypropylenem), jako je vysoká teplota tání nebo relativně vysoká pevnost v tahu. Na druhou stranu je PHB také křehký, což se připisuje vysokému stupni krystalizace a sekundární krystalizaci během skladování. Ta má za následek tvorbu nepravidelných pórů na povrchu a dochází tak k omezení flexibility biopolymeru. Další nevýhodou je, že PHB začíná degradovat při teplotě blízké jeho teplotě tání (Bugnicourt *et al.* 2014).

Z těchto důvodů jsou také nutné jeho další modifikace. Nejčastěji se jedná o kopolymery obsahující PHB a jiné 3-hydroxyalkanoátové jednotky, jako je PHBV, který je oproti PHB charakterizován jako méně krystalický a více flexibilní (Bugnicourt *et al.* 2014). Ke zlepšení mechanických vlastností se mohou využívat i směsi PHA s plastifikátory, které bývají také přírodního původu. Mezi běžně užívané plastifikátory se řadí například estery kyseliny citronové, nízkomolekulární polyetylen glykol, oxypropylovaný glycerol, glycerol, glycerol triacetát, 4-nonylfenol, estery kyseliny acetylsalicylové, dibutylftalát, mastné alkoholy nebo di-2-ethylhexylftalát (Emaimo *et al.* 2022). V Tabulce 1 je uvedeno porovnání vybraných mechanických vlastností PHA s polypropylenem.

Tabulka 1 Porovnání vlastností PHA s PP (upraveno dle Rodriguez-Contreras, 2019)

	<b>PHB</b>	<b>PHBV (3%)</b>	<b>PHB4HB (16%)</b>	<b>PP</b>
Teplota tání [°C]	177	145	152	176
Teplota skelného přechodu [°C]	4	-1	-8	-10
Pevnost v tahu [MPa]	40	32	26	38
Modul pružnosti v tahu [GPa]	3,5	1,2	-	1,7
Prodloužení při přetržení [%]	6	50	444	400

\*PHB = poly(3-hydroxybutyrát); PHBV = poly(3-hydroxy-co-3-hydroxyvalerát);

PHB4HB = poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát); PP = polypropylen

### 1.4.1 Biomedicínské aplikace

Jak již bylo zmíněno, oproti běžným syntetickým polymerům se PHA vyznačují dobrou biodegradabilitou, biokompatibilitou a netoxickým charakterem, což z nich dělá velmi atraktivní materiál pro tkáňové inženýrství, případně pro farmacii jako nosiče léčiv.

Biokompatibilitou se rozumí schopnost materiálu být při specifické aplikaci snášen živým systémem, přičemž musí dojít k odpovídající reakci příjemce (ISO 10993-1:2018). To polymery jako PHB a PHBV splňují, jelikož jejich monomerní jednotky jsou přirozeným metabolitem lidského organismu a mohou být dále štěpeny až na oxid uhličitý. Po implantaci *in vivo* u nich nebyla pozorovaná zánětlivá reakce, kalcifikace, nekróza okolní tkáně ani tvorba abscesů či tumorigeneze (Pulingam *et al.* 2022). Dalším benefitem PHA je jejich konstantní lokální pH i při degradaci, která probíhá kontrolovaně na rozdíl od jiných polymerů, které se v medicínské praxi využívají. Příkladem těchto polymerů mohou být poly( $\epsilon$ -kapolakton), poly(mléčná-co-glykolová kyselina), poly(glykolová kyselina) nebo poly(mléčná kyselina). (Rodriguez-Contreras 2019)

PHA mohou být použity k tvorbě scaffoldů s vyšší mechanickou pevností, které podporují adhezi a proliferaci buněk. Například při použití scaffoldu z PHBVHx byl prokázán významný pozitivní účinek při léčbě jaterní tkáně (Su *et al.* 2014), u kompozitního scaffoldu z PHB a PHBHx bylo pozorováno, že napomáhá při tvorbě chrupavčitých tkání (Ye *et al.* 2009). Kompozity PHB s hydroxyapatitem mohou fungovat jako scaffoldy pro kostní tkáň, kde také napomáhají její regeneraci (Shishatskaya *et al.* 2012). Byly zkoumány i účinky PHA jako nosiče pro antibiotika s pomalým uvolňováním, kdy byl tetracyklin enkapsulován do struktury PHB a PHBV a byla pozorována jeho antibakteriální aktivita. (Panith *et al.* 2016). Jako další možné využití PHA lze jmenovat výroba různých medicínských prostředků, mezi které patří implantáty pojivové, srdeční, cévní či nervové

tkáně, ale také sutury, stenty, náplasti, chirurgické sítě nebo biosenzory (Pulingam *et al.* 2022). V současnosti je také zkoumán jejich účinek při léčbě rakoviny, viru HIV (Thorat Gadgil *et al.* 2017) nebo Alzheimerově chorobě (Ray & Kalia 2017).

#### 1.4.2 Využití jako obalový materiál

Kromě výjimečné biokompatibility disponují PHA také velmi dobrou biodegradabilitou, a díky jejich mechanickým vlastnostem jsou považovány za vhodnou alternativu pro běžně užívané polymery ropného původu v oblasti jednorázových obalových materiálů v potravinářském průmyslu.

Při zkoumání propustnosti vlhkosti, oxidu uhličitého a organických rozpouštědel skrz film tenký 25-50  $\mu\text{m}$  tvořený PHB a PHBV byly pozorovány srovnatelné bariérové schopnosti jako u PET (Mishra 2018). Také byly z PHB připraveny kelímky o objemu 500 ml, které byly vystaveny různým fyzikálním testům a výsledky byly porovnány s polypropylenem. Bylo zjištěno, že PHB je oproti UV záření srovnatelně odolný. Na rozdíl od PP se obal z PHB rozložil během krátkého časového intervalu úplně. Na druhou stranu v tzv. Drop testu vykazoval PHB až o 50 % nižší schopnost deformace než PP, byl tak charakterizován jako více rigidní a méně flexibilní. Při nižších teplotách vykazoval lepší vlastnosti PP, při vyšších teplotách naopak byly lepší mechanické vlastnosti u PHB, což ovšem pro potravinářské využití není limitující. Při sensorické analýze bylo u PHB pozorováno zhoršení organoleptických vlastností u potravin obsahující vyšší procento vody. Ze studie tedy vyplývá, že PHB by mohl nahradit obaly z PP používané pro potraviny s vysokým obsahem tuku (majonézy, margaríny), vhodné jak pro skladování při nízkých teplotách, tak i pro ohřev v mikrovlnné troubě (Bucci *et al.* 2005).

## 2 BIODIVERZITA

Biologická diverzita, zkráceně biodiverzita, kvantitativně popisuje veškerou rozmanitost živé přírody (Storch 2019). Lze jí zkoumat na různých úrovních, od genetické informace až po celé ekosystémy. Nejčastěji je ovšem využívána taxonomická diverzita se zaměřením na počet druhů vyskytujících se v dané lokalitě (Primm 2023).

Pravděpodobně nejpočetnější skupinou na Zemi, co se druhů týče, jsou mikroorganismy. Dvě ze tří známých domén, *Bacteria* a *Archeae*, jsou čistě mikrobiálního charakteru. Třetí doména *Eucarya* je primárně mikrobiální, vzhledem k obrovskému množství druhů protistů a vláknitých mikroskopických hub. Rozmanitost napříč touto skupinou, tedy mikrobiální diverzitu, lze pozorovat zásadními rozdíly v jejich fenotypu, buněčném metabolismu, fyziologii a morfologii, v jejich distribuci v životním prostředí, ve struktuře genomu, expresi a evoluci (Dunlap 2001).

### 2.1 Extrémofilní mikroorganismy

Jako extrémofili se označují organismy, které prospívají v extrémních prostředích. Takové prostředí lze obecně chápat jako netolerovatelné či dokonce letální pro většinu živých soustav. Extrémofily lze najít napříč všemi doménami, kdy nejpočetnější skupinu tvoří mikroorganismy (především *Archeae*), ale existují i zástupci z řad prvků, hub, řas či více buněčných organismů (Merino *et al.* 2019).

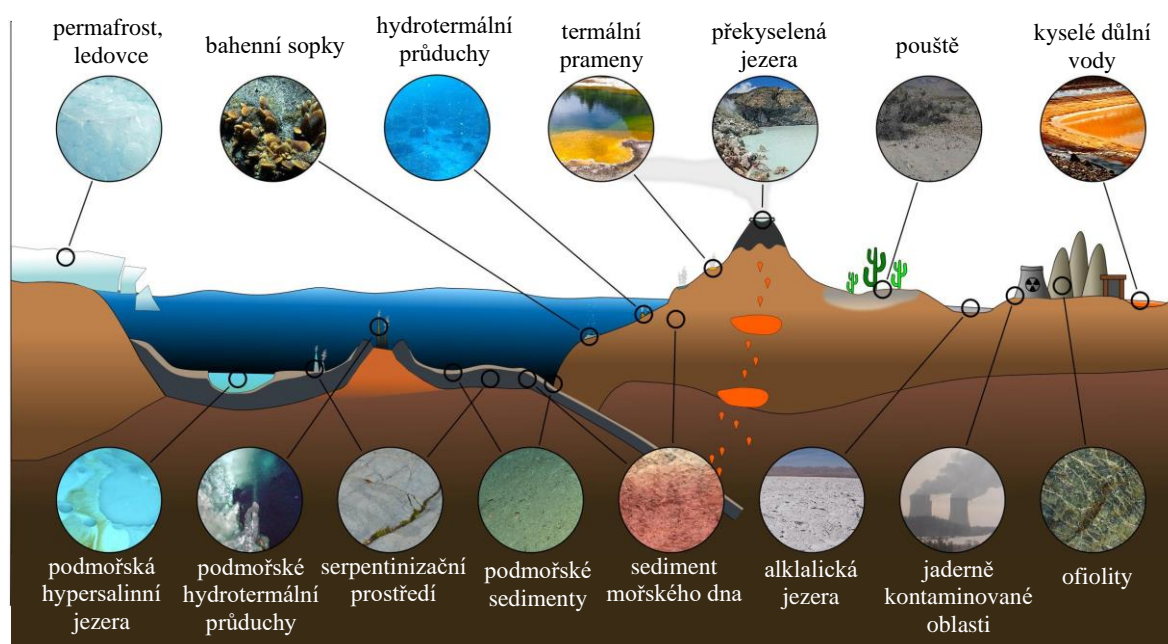
Podle podmínek, ve kterých takové organismy prosperují, jsou dále klasifikovány (Tabulka 2). Bývá obvyklé, že v daném prostředí působí více fyzikálně-chemických parametrů, které dosahují extrémních hodnot, proto se také často používá označení polyextrémofilové. (Merino *et al.* 2019).

Tabulka 2 Klasifikace extrémofilních mikroorganismů (Upraveno dle Merino *et al.*, 2019)

Parametr	Chování	Ideální podmínky
Teplota	Hypertermofil	> 80 °C
	Termofil	45 až 80 °C
	Psychrofil	<20 °C
pH	Acidofil	pH <5
	Alkalofil	pH > 9
Salinita	Halofil	>8,8 %
Tlak	Barofil, Piezofil	10-50 MPa
Aktivita vody	Xerofil	<0,7

### 2.1.1 Adaptace na extrémní podmínky

Řada mikroorganismů byla objevena za extrémních životních podmínek v prostředích od Yellowstonekých termálních pramenů (Marsh & Larsen 1953), přes Sibiřský permafrost (Rivkina *et al.* 2000) až po Mariánský příkop s hloubkou 11 000 metrů (Kato *et al.* 1998). Příklady dalších ekosystémů s extrémními podmínkami jsou na Obrázku 6.



Obrázek 6 Ekosystémy s extrémními podmínkami (Upraveno dle Merino *et al.*, 2019)

Extrémofilové jsou strukturně adaptováni na takové životní podmínky na molekulární úrovni. Proteiny, nukleové kyseliny a membrány mohou oproti neextrémofilním analogům vykazovat změny v relativním zastoupení aminokyselin nebo jinou konformaci, čímž se stávají více stabilní v daném prostředí (Kohli *et al.* 2020). Mohou obsahovat také extremolyty, což jsou malé organické molekuly, které chrání makromolekuly a buněčné struktury před nepříznivými podmínkami (Becker & Wittmann 2020). V prostředí s vysokou koncentrací solí nebo vlivem teplotního stresu tvoří stabilní ochranou vodní vrstvu (Sahle *et al.* 2018). Při stresu způsobeném UV záření dokáží sinice produkovat chemické látky, které se chovají jako fotoprotekce, například mykosporinu podobné aminokyseliny (Fuentes-Tristan *et al.* 2019). Extremozymy, enzymy izolované z extrémofilů, jsou vysoce stabilní za extrémních teplot, pH a jsou často rezistentní vůči detergentům nebo organickým rozpouštědlům (Kochhar *et al.* 2022).

### 2.1.2 Průmyslové využití

Pro své jedinečné vlastnosti a schopnosti přežít v extrémních podmínkách nachází extrémofilové využití při různých průmyslových aplikacích. Patří sem agrikultura, výroba biopaliv, bioremediace, biotechnologie, farmacie, kosmetika, medicína, papírnický průmysl, textilní průmysl a mnoho dalších (Kochhar *et al.* 2022).

Mnoho extrémofilů produkuje enzymy, které vynikají svou stabilitou při extrémních podmínkách. Jsou tedy užitečné například při zpracování potravin, ve farmacii nebo v biotechnologiích. Typickým příkladem takového enzymu je Taq DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Ta při teplotě nutné k denaturaci DNA neztrácí svojí enzymatickou aktivitu a je nedílnou součástí polymerázové řetězové reakce (Chien *et al.* 1976). *T. aquaticus* produkuje i další termostabilní enzymy jako jsou například aldoláza (Freeze & Brock 1970) nebo RNA polymeráza (Air & Harris 1974).

Enzymy psychofilů (proteázy, amylázy, lipázy, celulózy) nachází využití v pracích prašcích. Díky těmto enzymům je možné efektivně prát při nižších teplotách, čímž se zároveň snižuje dopad na životní prostředí. Amylázy a proteázy se uplatňují i v potravinářském průmyslu při zpracování mléka (Kirk *et al.* 2002).

U halofilních archeí byla prokázána schopnost produkce PHA (Mitra *et al.* 2020). Halofilní a halotolerantní bakterie jsou využívány i pro tvorbu dalších biopolymerů jako je kyselina hyaluronová (Parada-Pinilla *et al.* 2021) nebo biosurfaktantů jako furanomycin (Fariq & Yasmin 2020). Jejich další možnou aplikací je využití jejich enzymů při výrobě fermentovaných potravin (Margesin & Schinner 2001).

Důležitým odvětvím je také výroba biopaliv. Mezi vhodné alternativy k fosilním palivům se řadí vodík. Termofilní bakterie *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* je považována za výborného kandidáta pro průmyslovou bioprodukcí vodíku, jelikož degraduje substráty obsahující celulózu a hemicelulózu na jednodušší sacharidy, které jsou poté fermentovány za vysoké produkce H<sub>2</sub> (Bielen *et al.* 2013). Biosurfaktanty z termofilních mikroorganismů mohou sloužit i k bioremediaci průmyslových odpadních vod a půd kontaminovaných ropou (Płaza *et al.* 2006).



## 2.2 Přírodní minerální prameny

Česká republika díky své pestré geologické stavbě oplývá značným přírodním bohatstvím. V důsledku příhodných podmínek se na území České republiky vyskytují prameny minerálních, termálních a radioaktivních vod (MZČR 2020).

Podle tzv. Lázeňského zákona (Zákon č. 164/2001 Sb.) se minerální vodou rozumí přirozeně se vyskytující podzemní voda původní čistoty s obsahem rozpuštěných pevných látek nejméně 1 g/l nebo s obsahem nejméně 1 g/l rozpuštěného oxidu uhličitého nebo s obsahem jiného pro zdraví významného chemického prvku anebo která má u vývěru přirozenou teplotu vyšší než 20 °C nebo radioaktivitu radonu nad 1,5 kBq/l. Zdrojem přírodní minerální vody je přirozeně se vyskytující podzemní voda původní čistoty, stálého složení a vlastností, která má z hlediska výživy fyziologické účinky dané obsahem minerálních látek, stopových prvků nebo jiných součástí, které umožňují její použití jako potraviny a k výrobě balených minerálních vod, a o tomto zdroji bylo vydáno osvědčení podle tohoto zákona.

Vyhláška č. 423/2001 Sb. upravuje způsob hodnocení a využívání přírodních léčivých zdrojů a zdrojů přírodních minerálních vod. Hlavní kritéria hodnocení přírodních minerálních vod je podle celkové mineralizace, podle obsahu rozpuštěných plynů a obsahu významných složek, podle teploty u vývěru a podle osmotického tlaku (Tabulka 3).

Tabulka 3 Kritéria pro hodnocení zdrojů minerálních vod

Celková mineralizace (obsah rozpuštěných látek)		Obsah rozpuštěných plynů a významných složek	
Velmi slabě mineralizované	<50 mg/l	Uhličitě	> 1 g CO <sub>2</sub> /l
Slabě mineralizované	50–500 mg/l	Sírné	> 2 mg titrovatelné síry/l
Středně mineralizované	500–1500 mg/l	Jodidové	> 5 mg jodidů/l
Silně mineralizované	1500 mg/l–5 g/l	Ostatní (zvýšený obsah)	např. fluoridů (> 2mg/l)
Velmi silně mineralizované	>5 g/l		kys. křemičité (>70 mg/l)
Teplota u vývěru		Osmotický tlak	
Studené	<20 °C	Hypotonické	<710 kPa
Termální vlažné	20-35 °C	Izotonické	710-760 kPa
Termální teplé	35-42 °C	Hypertonické	760 kPa
Termální horké	>42 °C		

\*titrovatelná síra = sulfan disociovaný v různém stupni, thiosírany

Minerální voda a plyn u vývěru z ložiska musí být zdravotně nezávadné. Nesmí vykazovat mikrobiální známky fekálního nebo jiného druhu znečištění z vnějšího prostředí a nesmí obsahovat mikroorganismy, jež by mohly představovat zdravotní rizika pro člověka. U zdrojů přírodních minerálních vod určených k plnění do lahví jsou vyhláškou 423/2001 Sb. určeny limity mikrobiologických ukazatelů (Tabulka 4).

Tabulka 4 Požadavky na mikrobiologickou jakost zdrojů minerálních vod

Ukazatel	Jednotka	Limit	Typ limitu
<i>Escherichia coli</i>	KTJ/250 ml	0	NMH
Koliformní bakterie	KTJ /250 ml	0	MH
Enterokoky	KTJ/250 ml	0	NMH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KTJ /250 ml	0	NHM

\*KTJ = kolonii tvořící jednotka, NMH = nejvyšší mezní hodnota, jejíž překročení vylučuje využívání zdroje, MH = mezní hodnota, jejímž překročením ztrácí zdroj vyhovující jakost v daném ukazateli, má indikační funkci

### 2.2.1 Horní Moštěnice

V Horních Moštěnicích (Olomoucký kraj) se nachází zdroj Hanácké kyselky, která je charakterizována jako přírodní minerální voda silně mineralizovaná, uhličitá, hydrogenuhličitano-vápenato-sodná, se zvýšeným obsahem fluoridů. Dále se řadí mezi studené a hypotonické prameny s obsahem volného oxidu uhličitého 1304 mg/l (Ministerstvo zdravotnictví). V Tabulce 5 je uveden výtah chemické analýzy dostupný z informační tabule přímo u zdroje.

Tabulka 5 Chemické složení Hanácké kyselky

ion	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
c [mg/l]	250	15,5	266	69,6	3,2	170	0,165	1578

### 2.2.2 Karlovy Vary

Karlovarské prameny se řadí mezi termální středně mineralizované vody proplyněné oxidem uhličitým s vysokým obsahem iontů HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>. Vyznačují se nižším obsahem železa, zvýšeným obsahem fluoridů a SiO<sub>2</sub>. Obecně se označují také jako hydrouhličitano-sírano-chloridové sodné vody (Vylita 1991).

Komplexními analýzami minerálních zdrojů byla detekována přítomnost více než 60 prvků, jednotlivé prameny liší ve složení pouze výskytem některých stopových prvků (Šolc 2001). Koncentrační stabilitu vykazují F<sup>-</sup>, Li<sup>+</sup>, Be<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup> (Vylita 1991). Obsah iontů Vřídla dle Správy přírodních léčivých zdrojů a kolonád (SPLZaK) je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 6 Chemické složení Vřídla

ion	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Be <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Sr <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>
c [mg/l]	2,9	1699	93,2	0,07	45,2	124	0,48	0,09	1,3
ion	Zn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
c [mg/l]	0,06	0,01	6,4	598,5	1,4	0,03	1629	0,359	2150

Nejvýznamějšími rozdíly mezi jednotlivými prameny jsou jejich teplota, proplyněnost oxidem uhličitým a v neposlední řadě jejich vydatnost. Tyto parametry všech volně přístupných pramenů jsou popsány v Tabulce 7, opět podle (SPLZaK).

Tabulka 7 Vybrané parametry karlovarských pramenů

Pramen	Teplota [°C]	CO <sub>2</sub> [mg/l]	Vydatnost [l/min]
Vřídlo	72	400	2000
Karel IV.	65,8	250-450	2,4
Dolní Zámecký	52,9	600	2,0
Horní zámecký	53,6	600	1,1
Tržní	63,8	500	5,1
Mlýnský	57,8	600	3,7
Rusalka	60,4	600	3,7
Václav I.	66,1	500	4,8
Václav II.	64,5	500	3,8
Libuše	63,4	550	3,1
Svoboda	63,2	550	4,8
Sadový	42,8	750	2,2
Štěpánka	14,2	>1200	0,4
Hadí	28,1	1600	1,8
Skalní	44,9	650	1,2
Železnatý	11,9	1600	1,8

### 2.2.3 Luhačovice

V Luhačovicích se nachází jeden sirný pramen a šestnáct vysoce proplyněných hydrogenuhličitano-chlorido-sodných kyselek. Jejich teplota se pohybuje mezi 10 až 14 °C. Pro pitnou kúru jsou využívány prameny Aloiska, Ottovka, Vincentka a pramen Dr. Šťastného. První tři minerální vody jsou z hlediska tonicity hypotonické, pramen Dr. Šťastného je hypertonický. Výtah z chemické analýzy těchto pramenů je uveden v Tabulce 8 (Luhačovice).

Tabulka 8 Chemické složení vybraných luhačovických pramenů

	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Vincentka	2150	9,6	231	14,8	0,80	1510	7,99	<5	4700
Aloiska	2050	7,7	206	46,1	0,17	1460	7,58	110	3900
Ottovka	1710	5,9	306	54,2	0,21	1320	7	50	3400
Dr. Šťastný	2980	12	224	12,3	0,46	2250	12	<5	6100

Pro pitnou léčbu je využíván i pramen svatého Josefa. Pro balneologické účely jsou určeny prameny Amandka, Viola, Marie, Elektra 1, Bystrica, Nová Čítárna, Nová Janovka, Vladimír, Jaroslava a sirný pramen (Luhačovice). V obci Podhradí u Luhačovic se vyskytuje sirný pramen Sirčena s typickým zápachem po sulfanu (Máčala 2013). Obsah volného CO<sub>2</sub> je 28,6 mg/l. Chemický rozbor pramene je uvedený v Tabulce 9, zdrojem byla infotabule u pramene.

Tabulka 9 Chemické složení Sirčeny

ion	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
c [mg/l]	23,6	1,5	97,9	16,0	0,06	0,16	13	106	299

#### 2.2.4 Poděbrady

Přírodní minerální prameny nacházející se v zřidelní struktuře Poděbrady (Středočeský kraj) se řadí mezi studené vody silně mineralizované, uhličitě, hypotonické a hydrogenuhličitano-chlorido-sodno-vápenaté. Proplyněnost oxidem uhličitým je udávána jako 2200 mg/l a teplota 13,9 °C (Ministerstvo zdravotnictví). Obsah nejčastěji zastoupených iontů minerální vody Poděbradky jsou uvedené v Tabulce 10 (Poděbradka).

Tabulka 10 Chemické složení Poděbradky

ion	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
c [mg/l]	464	58,5	158	63,1	1,2	400	79,3	1320

### 2.3 Next generation sequencing

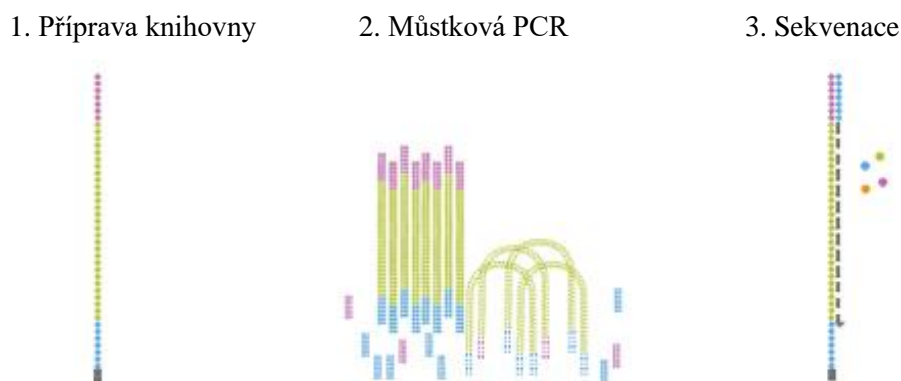
Metagenomika je věda zabývající se studiem genetického materiálu získaného z různých prostředí a dává nám tak informaci o jeho specifické biodiverzitě (Segre 2023). Pro tyto účely je v mikrobiologii hojně využívaná metoda Next generation sequencing (NGS), která umožňuje sekvenaci velkého množství genetické informace i u doposud nekultivovaných mikroorganismů. Technologie Illumina patří, díky své nízké ceně a vysokému výtěžku, mezi

široce užívané techniky NGS (GLENN 2011). Tato metoda je založená na principu můstkové PCR a skládá se ze 3 základních kroků (Obrázek 7).

Prvním krokem je příprava knihovny, kdy je nejprve templátová DNA fragmentována na kratší úseky a poté dochází k navázání dvou typů adaptérů ke koncům fragmentu. Na jednom fragmentu jsou tak oba typy adaptéru, každý z jednoho konce. Vše probíhá v reakční komůrce, která je pokrytá dvěma typy oligonuklidů komplementárním k použitým adaptérům (Illumina).

Druhým krokem je můstková PCR, kdy dojde k navázání fragmentu k povrchu komůrky, amplifikaci a poté denaturaci na ssDNA. Templátové vlákno je vymyto, nové vlákno zůstává vázané na komůrce. Volný konec fragmentu se na základě komplementarity naváže k nejbližšímu oligonukleotidu, čímž se vytvoří můstek. Adaptor na fragmentu funguje jako primer a dochází k syntéze nového vlákna. Dvouřetězcový můstek je denurován a volný konec ssDNA přisedá k volným oligonukleotidům komůrky. Po amplifikaci je vždy reverzní vlákno uvolněno. Proces se cyklicky opakuje (Illumina).

Sekvenace syntézou je třetím krokem. Probíhá pomocí sekvenačních primerů, které přisedají k adaptérům. Nukleotidy ve směsi jsou označeny fluorochromy, kdy každý z nich po navázání k fragmentu vyzáří jinou barvu a signál je zaznamenán detektorem (Illumina).



Obrázek 7 Schéma Illumina NGS (upraveno dle Illumina)

### 3 METODY DETEKCE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ

Mezi základní metody pro detekci bakteriálních producentů PHA patří barvení a polymerázová řetězová reakce (PCR). Tyto metody umožňují analýzu relativně velkého množství vzorků během krátkého časového intervalu a samotná příprava vzorků není příliš náročná. Pokročilejší metodou je transmisní elektronová mikroskopie, která nám navíc umožňuje přímou vizualizaci intracelulární PHA. Na druhou stranu je ale příprava vzorků oproti předešlým metodám časově náročná a také vyžaduje použití radioaktivních chemikálií (Tan *et al.* 2014).

Tyto metody nám však neposkytují informaci o kvantitativním ani kvalitativním složení PHA. Pro tyto účely jsou využívány moderní analytické metody jako infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), kapalinová chromatografie a plynová chromatografie (Tan *et al.* 2014).

#### 3.1 Fenotypové metody detekce

Pro fenotypové testy produkce PHA, jako je barvení nebo FTIR, je nezbytné zvolit především správné kultivační podmínky. Jak již bylo popsáno v kapitole 1.2, PHA jsou produkovány za nevyvážených nutričních podmínek jako je nedostatek dusíku, fosforu nebo síry, a naopak při nadbytku uhlíku (Higuchi-Takeuchi *et al.* 2016).

##### 3.1.1 Barvení

Díky lipidové povaze inkluzí polyhydroxyalkanoátů lze pro jejich snadný primární screening využít barviva jako jsou Nile Blue nebo Sudan Black. U této metody může docházet i k falešně pozitivním výsledkům, kdy se barvivo naváže na jinou lipofilní složku, než jsou inkluze PHA (Higuchi-Takeuchi *et al.* 2016).

Typicky jsou kolonie barveny na Petriho miskách s médiem bohatým na zdroj uhlíku (např. sacharidy, mastné kyseliny). Na ty je nanášeno dostatečné množství barviva, které je rozpuštěné v organickém rozpouštědle. Granule PHA barvivo zadržují a po promytí přebytečného barviva z misky je lze vizuálně identifikovat. Po barvení Nile Blue jsou pozorované PHA inkluze pod UV zářením růžové. Při použití Sudan Black zůstávají kolonie producentů po opláchnutí etanolem zbarvené černě (Solaiman & Ashby 2005). V některých studiích je využívána i metoda, kdy se barvivo přidá přímo do kultivačního média a PHA jsou detekovány po 24 h inkubaci (Chaudhry *et al.* 2011).

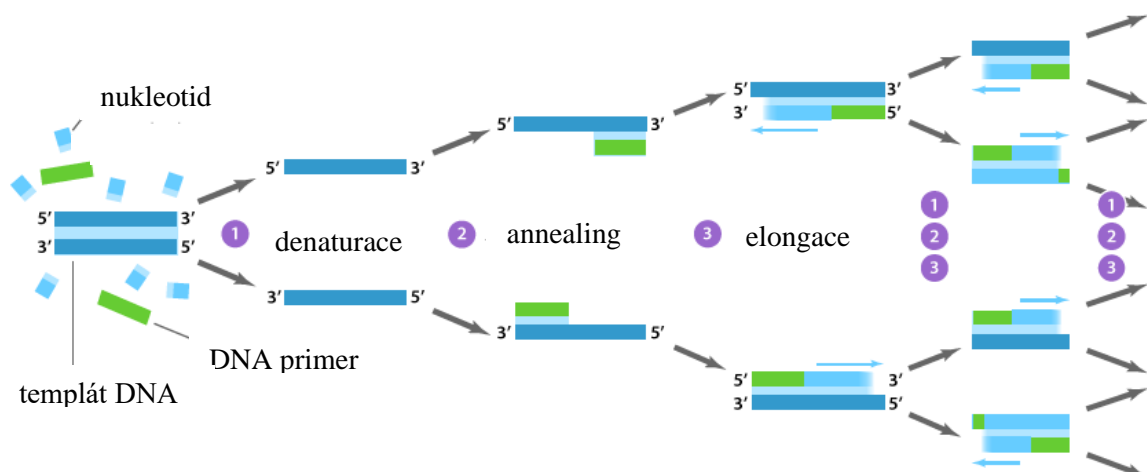
## 3.2 Genotypové metody detekce

Při hledání nových potenciálních producentů PHA jsou využívány genotypové metody jako je PCR. Obvykle jsou primery designovány specificky pro amplifikaci genu *phaC* (Solaiman & Ashby 2005), který byl popsán v kapitole 1.1.

### 3.2.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je molekulárně biologická metoda, která umožňuje amplifikaci specifické sekvence nukleotidů dvouřetězcové DNA (dsDNA). Tato sekvence je identifikována pomocí páru primerů, což jsou oligonukleotidy, které se váží na základě komplementarity ke koncovým úsekům DNA, jež má být amplifikována. Za samotnou syntézu nové DNA je zodpovědná Taq DNA polymeráza (Attwood 2006).

PCR probíhá ve 3 krocích (Obrázek 8). V prvním kroku je dsDNA zahřívána na teplotu 94 °C, kdy dochází k rozrušení vodíkových můstků mezi jednotlivými řetězci, tedy k denaturaci, a tím pádem i ke vzniku dvou jednořetězcových molekul DNA (ssDNA). Dalším krokem je tzv. annealing probíhající při teplotách mezi 50 až 65 °C. V této fázi nasedají primery na komplementární místa templátu ssDNA označující požadovanou sekvenci genetického kódu. Posledním krokem je elongace, kdy při teplotě 72 °C nasedá na úsek označený primerem DNA polymeráza a na základě komplementarity syntetizuje ve směru od 5' konce ke 3' konci nové vlákno. Výsledkem jsou tedy dvě kopie původní DNA. Tyto kroky se následně cyklicky opakují. Teoretický výtěžek je  $2^n$ , kde  $n$  odpovídá počtu cyklů. Z jedné molekuly DNA po 30 cyklech je možné získat až miliardu kopií. Jedná se tak o velice účinnou metodu (Attwood 2006).



Obrázek 8 Schéma PCR (upraveno dle ABM Inc.)

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla analýza biodiverzity přírodních minerálních pramenů lokalizovaných v České republice společně s identifikací producentů PHA, kteří se v těchto biotopech vyskytují. Toho bylo docíleno pomocí literární rešerše, mikrobiologických a molekulárně-biologických metod.

Jednotlivé části práce zahrnovaly:

- detekci a identifikaci mikroorganismů metodou NGS;
- identifikaci vybraných mikroorganismů kultivačními a biochemickými metodami;
- screening *phaC* molekulárně-biologickými metodami
- fenotypizační testy na produkci PHA
- analýzu biodiverzity a nalezení PHA producentů na základě srovnání s literaturou

## 5 MATERIÁL

### 5.1 Vzorčky

Pro praktickou část bakalářské práce bylo použito celkem 11 vzorků minerálních vod z různých lokalit v České republice, které byly získány přímo u povrchového zdroje. Konkrétně se jedná o prameny z Karlových Varů, Poděbrad, Horních Moštěnic a Luhačovic.

Tabulka 11 Charakteristika vzorků a jejich původ

Označení pramene	Teplota [°C]	Obsah CO <sub>2</sub> [mg/l]	Lokalita
KV1	72	400	Karlovy Vary
KV2	64,5	500	
KV3	44,9	650	
KV4	65,8	250-450	
KV5	42,8	750	
KV6	28,1	1600	
KV7	57,8	600	
KV8	14,2	1200	
P9	13,9	2200	Poděbrady
HM10	10	1304	Horní Moštěnice
L11	9,6	28,6	Luhačovice

### 5.2 Laboratorní přístroje

Aeris™ PCR Thermal Cycler	ESCO, Singapur
Bead ruptor elite	Omni, USA
Běžné laboratorní pomůcky a laboratorní sklo	
Binokulární mikroskop	Intarco Micro, Česká republika
Centrifuga Hermle Z 100 M	LaborTechnik GmbH, Rakousko
Digestoř Aura PCR	BioAir, Itálie
Elektroforetická vana	Cleaver Scientific Ltd, UK
InGenius transluminátor	Syngene, UK
Mikropipety	Eppendorf, Německo
NEFERMtest 24	Erba Lachema, Česká republika
QFX Fluorometr	DeNovix Inc., USA
Sekvenátor MiSeq	Illumina, USA

Software ComplexHeatmap	
Software DADA2	
Software SnapGene InGenius	Syngene, UK
Software TNW	
Stolní centrifuga miniSpin	Eppendorf, Německo
Třepačka vortex V-1	Biosan Ltd., Litva
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zdroj energie EV243	Consort, Belgie

### 5.3 Chemikálie

Aceton	Penta, Česká republika
Agaróza	Sigma-Aldrich, USA
DNeasy Blood and Tissue kit	Qiagen, Německo
DNeasy PowerSoil Pro Kit	Qiagen, Německo
dsDNA Hight Sensitivity Assay Kit	DeNovix Inc., USA
EliZyme™ HS Robust Mix RED	Elisabeth Pharmacon, Česká republika
Etanol	Penta, Česká republika
GelRed Nucleic Acid Stain 10 000x Water	Biotium, USA
Glukóza	Sigma-Aldrich, USA
Imerzní olej	Sigma-Aldrich, USA
Indexy i7 a i5	Illumina, USA
Krystalová violet'	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina propionová	Sigma-Aldrich, USA
Lugolův roztok	Lachema, Česká republika
Nile Blue	Sigma-Aldrich, USA
Parafín	Sigma-Aldrich, USA
PBS pufr	
PCR voda	
peqGOLD 100 bp	Avantor, Litva
Primery	Metabion, Německo
Safranin	Himedia, Indie
Sudan Black	Sigma-Aldrich, USA
Tris-acetátový pufr	

## 5.4 Kultivační média

Tabulka 12 Mozko-srdcová infuze (BHI); Himedia, Indie

Látka	Množství [g/l]
Telecí mozek, infuzní forma	200,0
Hovězí srdce, infuzní forma	250,0
Proteázový peptid	10,0
Dextróza	2,0
Chlorid sodný	5,0
Fosforečnan sodný	2,5
Agar	15,0
Destilovaná voda	do 1000 ml

Tabulka 13 Hugh-Leifson médium; Sigma-Aldrich, USA

Látka	Množství [g/l]
Pepton	0,2
NaCl	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,03
Bromthymolová modř	0,006
Glukóza	1,0
Agar	0,3
Destilovaná voda	do 100 ml

## **6 METODIKA**

### **6.1 Vzorkování**

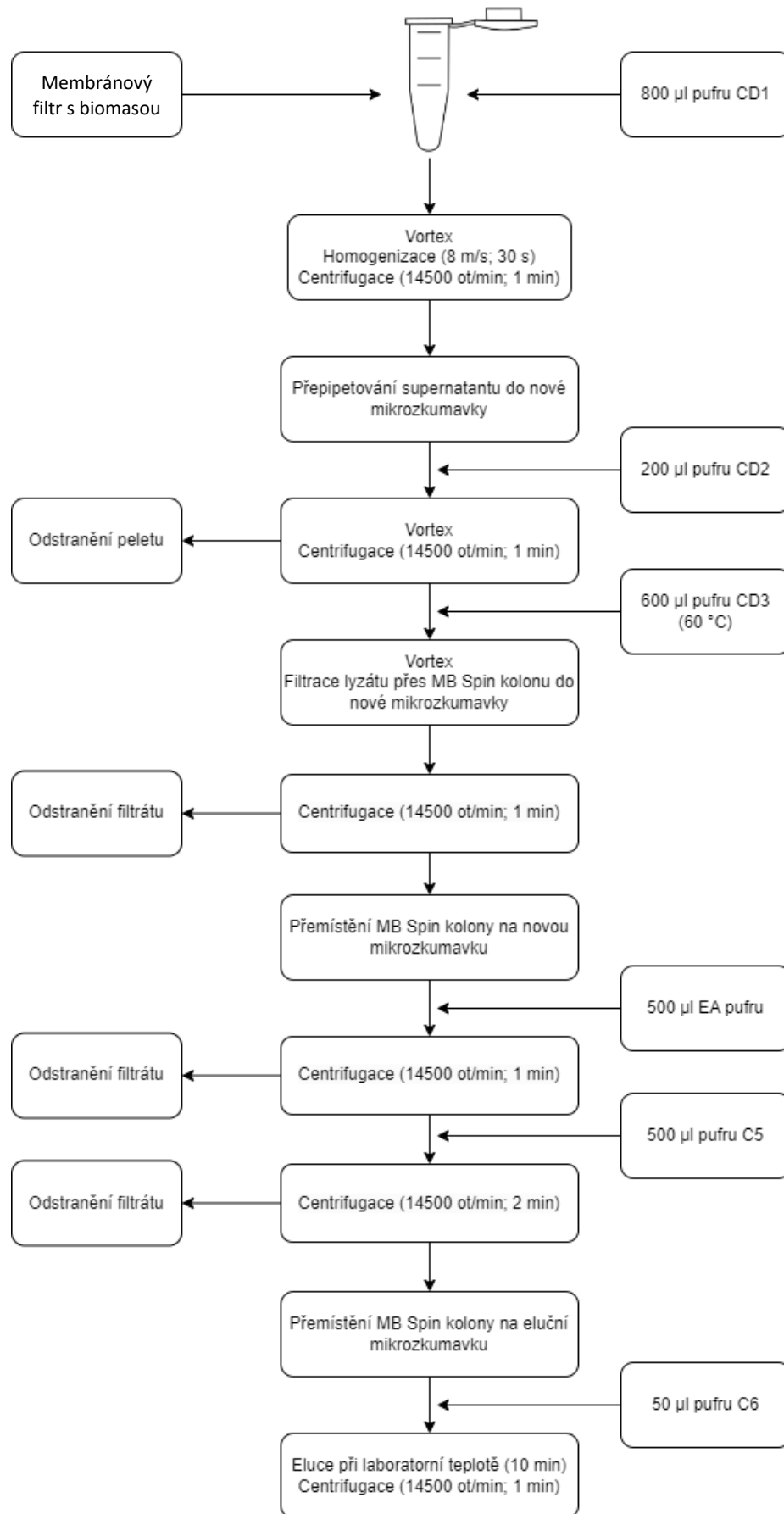
Do sterilní skleněné lahve byl asepticky odebrán u povrchového volně dostupného zdroje vzorek minerální vody o objemu 1 litr. Převážní a skladovací teplota byla dle teploty pramene (Tabulka 11). Z 500 ml byla membránovou filtrací (velikost pórů 0,25  $\mu\text{m}$ ) získána biomasa, určená pro metagenomiku minerálních pramenů metodou NGS. Z dalších 500 ml byla opět membránovou filtrací získána biomasa, která byla použita ke kultivaci, izolaci bakterií a následným testům pro detekci polyhydroxyalkanoátů.

### **6.2 Next generation sequencing**

Analýza biodiverzity minerálních pramenů byla provedena metodou NGS, jejíž princip byl popsán v kapitole 2.3.

#### **6.2.1 Izolace deoxyribonukleové kyseliny**

Izolace deoxyribonukleové kyseliny byla provedena kitem DNeasy PowerSoil Pro. Postup je schematicky zobrazen na Obrázku 9. U takto získané DNA byla změřena její koncentrace měřením na QFX Fluorometru pomocí kitu dsDNA High Sensitivity.



Obrázek 9 Izolace DNA pomocí kitu DNeasy PowerSoil Pro

### 6.2.2 Příprava knihovny pro NGS

Pro nalezení bakteriální DNA byly použité univerzální primery pro amplifikaci regionů VS-VG genu 16S rRNA (Tabulka 14).

Tabulka 14 Primery na gen 16S rRNA (Šašinková *et al.* 2022)

Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
CCTACGGGAGGCAGCAG	CCGYCAATTYMTTTRAGTTT

Celkový objem reakční směsi připravené podle Tabulky 15 byl 25  $\mu$ l. Dále byla připravena i kontrolní směs primerů bez přítomnosti templátové DNA o celkovém objemu 23  $\mu$ l.

Tabulka 15 Složení první PCR směsi pro NGS

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]	Koncentrace ve směsi
PCR voda	8,5	-
2x EliZyme <sup>TM</sup> HS Robust Mix RED	12,5	1x
Forward primer (10 $\mu$ mol/l)	1	0,4 $\mu$ mol/l
Reverse primer (10 $\mu$ mol/l)	1	0,4 $\mu$ mol/l
Templátová DNA	2	neznámá

PCR směs byla na vortexu promíchána a následně centrifugována. Samotná reakce byla provedena v termocykleru Aeris<sup>TM</sup> při zvolení teplot, časů a počtu cyklů podle Tabulky 16.

Tabulka 16 Průběh PCR pro NGS

Název kroku	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3	1
Denaturace	95	0,5	35
Annealing	55	0,5	
Elongace	72	1	
Závěrečná amplifikace	72	10	1
Chlazení	4	$\infty$	1

Amplifikace DNA byla zkontrolována elektroforeticky na 1,5 % agarozovém gelu v transiluminátoru InGenius LHR, kde byla reakce sledována pod UV světlem pomocí software GeneSnap.

Pro druhou PCR byly použité primery obsahují indexy i7 a i5. Každý vzorek obsahoval jinou kombinaci indexů. Celkový objem reakční směsi podle Tabulky 17 je 50  $\mu$ l.

Tabulka 17 Složení druhé PCR směsi pro NGS

Komponenty	Objem [μl]	Koncentrace ve směsi
PCR voda	19	-
2x EliZyme™ HS Robust Mix RED	25	1x
Forward primer (10 μmol/l)	2	0,4 μmol/l
Reverse primer (10 μmol/l)	2	0,4 μmol/l
Templát PCR 1	2	neznámá

Reakce byla opět provedena v termocykleru podle programu uvedeném v Tabulce 16. Reakce byla zobrazena na 1,5 % agarozovém gelu pomocí transiluminátoru a GeneSnap.

Pooling byl proveden pipetováním 10 μl od každého vzorku do mikrozkušavky, která byla uchována při -20 °C do příjezdu kurýrní služby.

### 6.2.3 Sekvence a analýza dat

Sekvence proběhla v sekvenátoru MiSeq v externí laboratoři SEQme s.r.o. (Dobříš, Česká republika). Data byla poté zpracována pomocí balíčku DADA2 a vizualizována přes software ComplexHeatmap. Taxonomie byla přiřazena pomocí referenční databáze SILVA 132 SSU NR 99.

## 6.3 Metody izolace a identifikace

Druhá polovina membránového filtru byla položena na BHI agar. Kultivace probíhala při 30 °C 72 h. Tato teplota byla vybrána za účelem získání kolonií mezofilních bakterií. Získané kolonie byly identifikovány pomocí Gramova barvení a dále navazujících biochemických metod.

### 6.3.1 Gramovo barvení

Gramovo barvení slouží k základnímu rozlišení bakterií podle typu buněčné stěny na grampozitivní a gramnegativní (Tripathi & Sapra 2023). Na podložní sklíčko byla nanášena bakteriální suspenze, která byla pomocí plamene fixována. Sklíčko bylo obarveno: 60 s v roztoku krystalové violeti, dále bylo 30 s ponořeno do Lugolova roztoku. Na fixovanou kulturu byl nanášen aceton pro odbarvení po dobu cca 2 s. V posledním kroku bylo sklíčko ponořeno do roztoku safraninu 60 s. Sklíčko bylo opláchnuto destilovanou vodou a po oschnutí mikroskopováno.



### 6.3.2 Oxidačně-fermentační test

Touto metodou je sledován způsob využití glukózy za aerobních a anaerobních podmínek. Bakterie oxidující, případně fermentující glukózu, způsobí barvenou změnu pH indikátoru, díky čemuž médium zežloutne. Pokud k barevné změně nedojde, bakterie za daných podmínek není schopná glukózu jako zdroj uhlíku využít (Aryal 2022).

Dvě zkumavky s Hugh-Leifson médiem byly zočkovány zkoumaným mikroorganismem. Jedna ze zkumavek byla přelita parafinovým olejem pro zajištění anaerobních podmínek. Obě zkumavky byly inkubovány 24 h při teplotě 30 °C.

### 6.3.3 NEFERMtest 24

NEFERMtest 24 je diagnostický test určený pro identifikaci gramnegativních nefermentujících bakterií (Erba Lachema s.r.o.). Sterilní destička se 24 jamkami obsahuje specifické typy živných půd. Do každé jamky bylo pipetováno 0,1 ml bakteriální suspenze. Destička byla uzavřena do sterilního sáčku a 48 h kultivována při 30 °C. Identifikace proběhla pomocí software TNW.

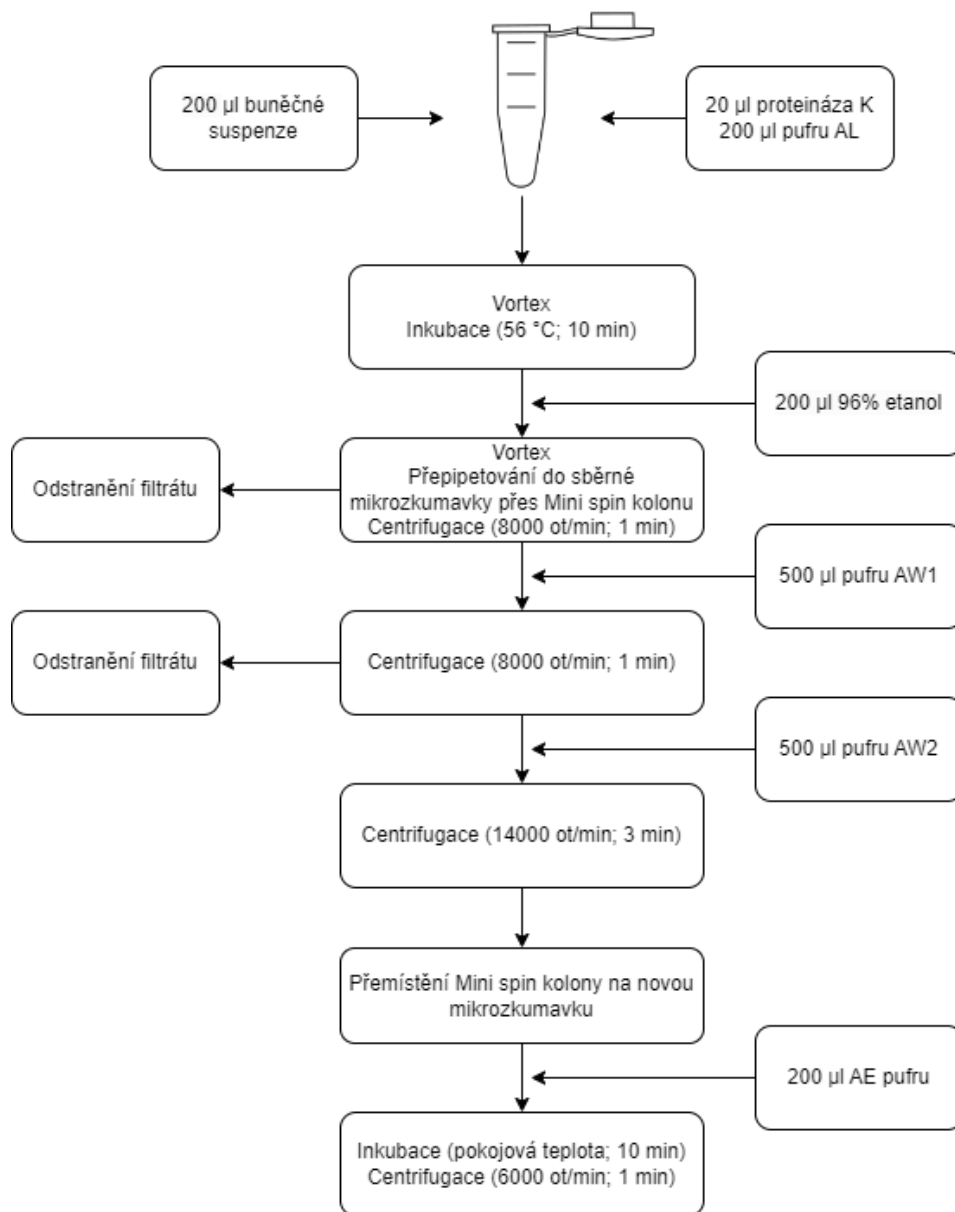
## 6.4 Detekce polyhydroxyalkanoátů

U izolované bakteriální kultury *Pseudomonas putida* byla testována metodou PCR přítomnost genu *phaC* tříd I a II. Poté byla zkoumaná fenotypová schopnost *P. putida* produkovat inkluze PHA barvením.

### 6.4.1 Polymerázová řetězová reakce

*Pseudomonas putida* byla kultivována 72 h na BHI agaru, který obsahoval 20 g/l zdroje uhlíku (glukóza, kyselina propionová). Inokulum bylo rozsuspendováno v 200 µl PBS pufru (Phosphate Buffered Saline).

Pro izolaci DNA byl použitý DNeasy Blood and Tissue kit. Schématický je postup zobrazen na Obrázku 10. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na QFX Fluorometru pomocí dsDNA High Sensitivity Assay kitu.



Obrázek 10 Izolace DNA pomocí Blood and Tissue kit

Pro první PCR byly použity primery pro identifikaci genu *phaC* třídy I a II, které jsou uvedené v Tabulce 18.

Tabulka 18 Primery pro detekci genu *phaC* (Máčalová *et al.* 2023)

Gen	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Produkt
<i>phaC</i> (Třída I)	TGCGCAACATGATGGAAGAC	AGTACTTGTTGATGCACGGC	204 bp
<i>phaC</i> (Třída II)	TACATCGAGGCGCTCAAGGA	GCCGAACAGATGAGCCGATT	594 bp

Celkový objem reakční směsi připravené podle Tabulky 19 byl 25  $\mu\text{l}$ . Dále byla připravena i kontrolní PCR směs bez přítomnosti templátové DNA o celkovém objemu 24  $\mu\text{l}$ .

Tabulka 19 Složení první PCR směsi

Komponenty	Objem [ $\mu\text{l}$ ]	Koncentrace ve směsi
PCR voda	9,5	-
2x EliZyme™ HS Robust Mix RED	12,5	1x
Forward primer (10 $\mu\text{mol/l}$ )	1	0,4 $\mu\text{mol/l}$
Reverse primer (10 $\mu\text{mol/l}$ )	1	0,4 $\mu\text{mol/l}$
DNA	1	neznámá

PCR směs byla promíchána na vortexu. Samotná reakce byla provedena v termocykleru podle Tabulky 20.

Tabulka 20 Program PCR

Název kroku	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	5	1
Denaturace	95	0,5	40
Annealing	55	0,5	
Elongace	72	1	
Závěrečná amplifikace	72	10	1
Chlazení	4	$\infty$	1

Přítomnost genu *phaC* byla vizualizována pomocí elektroforézy na 1,5 % agarozovém gelu v transiluminátoru a sledována pod UV světlem pomocí software GeneSnap.

#### 6.4.2 Barvení

Testovaná bakterie byla kultivována 72 h na BHI agaru s obsahem 20 g/l zdroje uhlíku (glukóza, kyselina propionová).

Na Petriho misku bylo pipetováno 10 ml 0,05% etanolického roztoku Nile Blue. Barva se nechala působit 30 minut ve tmě. Poté byla miska promyta destilovanou vodou a sledována na fluorescenčním mikroskopu.

Při barvení súdánskou černí bylo na Petriho misku pipetováno 10 ml 0,02% roztoku Sudan Black v etylenglykolu. Barva se nechala působit 30 minut, následně byla miska promyta 96% etanolem.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 7.1 Mikrobiální diverzita v přírodních minerálních pramenech

Předpokládá se, že na Zemi žije až  $10^{12}$  mikrobiálních druhů, z nichž 99 % zůstává zatím neobjeveno, a pouze malá část je současnými technikami kultivovatelná (Bodor *et al.* 2020). Nekultivovatelné, ale již dobře charakterizované bakterie se označují provizorním jménem *Candidatus* (Pallen 2021).

Některé současné techniky screeningu, jako je NGS, jsou omezené referenčními sekvencemi, které jsou dostupné ve veřejných databázích. Ty se však zaměřují spíše na potravinářské, klinicky či jinak technologicky využívané mikroorganismy, nikoliv na enviromentální diverzitu. Artefakty jsou také zavedené přítomností DNA z mrtvých a neaktivních organismů (Cordier *et al.* 2021). Ke zkreslení výsledků přispívají i aberace způsobené při přípravě vzorků nebo při samotném sekvenování. Literatura uvádí, že přibližně 0,1 až 1 % bází není určeno správně (Fox *et al.* 2014), což je pro odvětví jako je metagenomika limitující. Z těchto důvodů budou výsledky uvedeny na úrovni domén (Obrázek 11), kmenů (Obrázek 12) a rodů (Obrázek 13).

#### 7.1.1 Taxonomická biodiverzita

Sloupcový graf (Obrázek 11) zobrazuje abundantní rozložení genetické informace ve zkoumaných minerálních vodách na taxonomické úrovni domén. Ve vzorcích KV6, KV8 a P9 byla objevena pouze bakteriální DNA. U vzorků MH10 a L11 byla identifikována i doména *Archeae* s abundancí menší než 5 %. Všechny tyto prameny mají teplotu nižší než 30 °C. U pramenů s vyšší teplotou (43-72 °C), KV1 až KV5 a KV7, je již pozorováno významné zastoupení domény *Archeae* s abundancí mezi 25 až 60 %.

Studie ukazují, že kombinace vysokých teplot a nízkých hodnot pH prostředí, jsou přímo asociovány s vyšší abundancí archeí (Rupasinghe *et al.* 2022). Metogenomická studie (Menzel *et al.* 2015) porovnávala diverzitu několika termálních pramenů, které jsou geograficky vzdálené. U vody odebrané z italského termální pramene (76 °C/pH 3) bylo identifikováno 17,6 % archeální a 78,6 % bakteriální DNA. Jiný termální pramen z Kamčatky (64 °C/pH 5,8) obsahoval 29 % archeí a 54,3 % bakterií. Dalším vzorkem byl i čínský pramen (65 °C/pH 7), kdy 19,3 % sekvencí odpovídalo doméně *Archaea* a 72,1 % doméně *Bacteria*. U vzorku z Yellowstonského národního parku (79 °C/pH 1,8) byla výrazně převažující abundance archeí (96,4 %) nad bakteriemi (0,2 %).



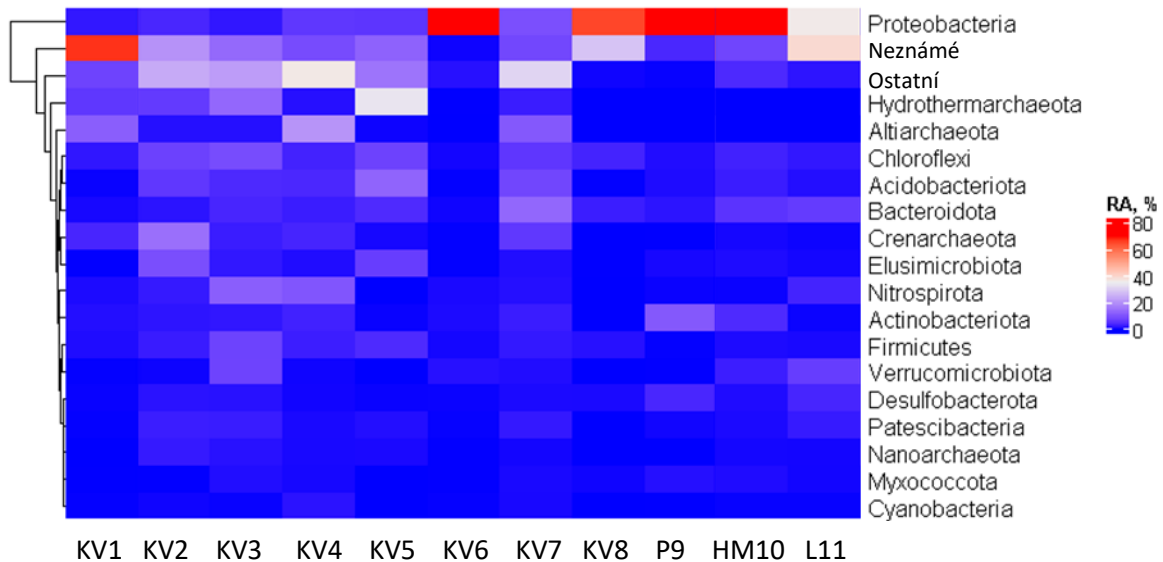
Obrázek 11 Biodiverzita na úrovni domén

Na Obrázku 12 je graficky znázorněna abundance mikroorganismů na úrovni kmenů. U vzorků KV6, KV8, P9 a HM10 má nejvýznamnější podíl zastoupení (>80 %) kmen *Proteobacteria*. Společným fyzikálně-chemickým znakem těchto pramenů je vysoký obsah oxidu uhličitého (>1200 mg/l) a zároveň teplota nižší než 30 °C. Proteobakterie jsou velice rozmanitý kmen bakterií, který se podstatně v minerálních pramenech podílí na dynamice CO<sub>2</sub> (Maheshwari & Sankar 2023). Tyto parametry naznačují přítomnost mezofilních a autotrofních proteobakterií, kam se řadí například *Gallionella*, *Sideroxydans* nebo *Sulfuritalea*, které budou v textu popsány později. U pramenů s teplotou nižší než 15 °C (KV8, P9, HM10, L11) jsou abundantní i kmeny *Acidobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* a *Verrucomicrobiota*.

Na této taxonomické úrovni lze také sledovat podobnost mezi všemi karlovarskými termálními prameny (KV1-KV5, KV7). V těchto vzorcích jsou nejvíce dominantní archeické kmeny *Altiarchaeota*, *Crenarchaeota* a *Hydroxythermarchaeota* a bakteriální kmeny *Acidobacteriota*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* a *Nitrospirota*.

Studie, která se zabývala mikrobiální diverzitou u geotermálních pramenů na Sri Lance s teplotami 36-59 °C, uvádí jako predominantní kmeny *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* a *Firmicutes*. S nízkou abundancí byly ve většině pramenů také detekovány *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* a *Chloroflexi* (Rupasinghe *et al.* 2022). Podobné výsledky zmiňuje i indická studie pramenů s teplotami 39 a 46 °C (Panda *et al.* 2016). Vysokou abundancí kmenů *Firmicutes* a *Proteobacteria* v pramenech s teplotami 54 a 65 °C popisuje

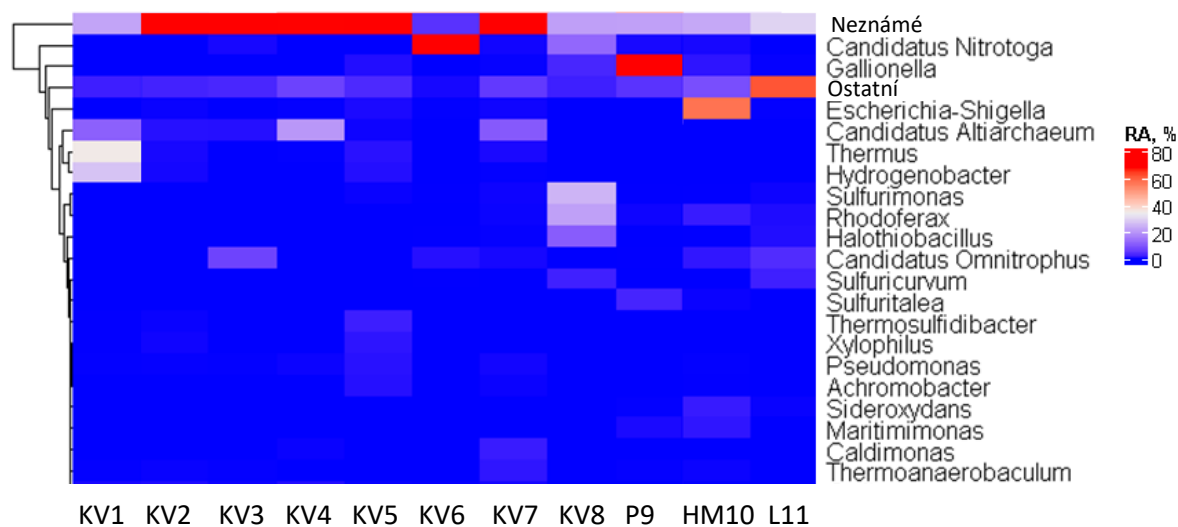
další indická studie (Chaudhuri *et al.* 2017). Pramen o teplotě 44 °C, lokalizovaný v Arménii, vykazoval nejvyšší relativní zastoupení kmenů *Bacterioidota*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* a *Proteobacteria* (Panosyan & Birkeland 2014).



Obrázek 12 Biodiverzita na úrovni kmenů

Na Obrázku 13 je zobrazena taxonomická diverzita na úrovni rodů. Metagenomická studie čtyř vybraných termálních pramenů z Karlových Varů, uvádí výskyt rodů *Rhodofera*, *Sideroxydans*, *Desulfacinum*, *Thiomonas*, *Thermodesulfitimonas*, *Halothiobacillus*, *Sulfurimonas*, *Sulfuricurvum* a *Thermoanaerobaculum* (Smrhova *et al.* 2022). Ve zmíněné studii byly odebrány vzorky ve dvou ročních obdobích (jaro, podzim). Při porovnání mikrobiální kompozice u pramene Štěpánka (14,2 °C) byly mezi vzorky z jara a podzimu významné rozdíly. Rody *Rhodofera* a *Sulfurimonas* představovaly celkové zastoupení přes 60 %. Na jaře byl predominantní rod *Rhodofera*, na podzim *Sulfurimonas*. U zbývajících vzorků zůstalo prokaryotické složení konzistentní.

V této části byl z každého zastoupeného rodu diskutován konkrétní mikrobiální druh, na základě srovnání s literaturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi pramene (kapitola 2.2).



Obrázek 13 Biodiverzita na úrovni rodů

### 7.1.1.1 Termální horké prameny

Mezi termální horké prameny jsou zařazeni zástupci abundantní ve vzorcích s teplotou vyšší než 43 °C (KV1 až KV5 a KV7).

Rod *Candidatus Altiarchaeum* byl přítomný ve vzorcích KV1, KV4 a KV7. Studie (Probst *et al.* 2014) uvádí hojný výskyt *Candidatus Altiarchaeum hamiconexum* hluboko v podzemních vodách při striktně anaerobních podmínkách. Jde zatím o nekultivaného člena domény *Archaea*. Metabolismus není jednoznačně objasněn, data poukazují na autotrofní průběh specificky vyvinuté redukce acetyl-CoA. Díky tomu se předpokládá jeho významná role při fixaci uhlíku ve svých biotopech.

*Candidatus omnitrophus* je nekultivaná, gramnegativní, chemolitoautotrofní, magnetotaktická bakterie (MTB), která byla detekována ve vzorcích KV3 a L11. Kolinko *et al.* uvádí jejich přítomnost ve vodném prostředí s vyšším obsahem železa. MTB syntetizují krystalky Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nebo Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> obalené lipidovou dvojitou vrstvou, tzv. magnetosomy. Ty umožňují bakteriím orientaci podle magnetického pole Země (Kolinko *et al.* 2016). MTB mají potenciál pro využití například v medicíně při léčbě rakoviny nebo pro cílené uvolňování léčiv (Kotakadi *et al.* 2022).

*Hydrogenobacter* byl nejvíce abundantní v prameni KV1 s teplotou 72 °C. *H. thermophilus* byl izolován z termálních pramenů v Japonsku (Kawasumi *et al.* 1984). *H. thermophilus* je gramnegativní, obligátně chemolitotrofní vodíková bakterie. Vodíkové bakterie získávají energii oxidací vodíku za vzniku vody v přítomnosti hydrogenázy. Není sporující a je

nepohyblivá. Optimální teplota pro růst je mezi 70 až 75 °C a řadí se mezi striktně termofilní bakterie.

Rod *Pseudomonas*, přítomný v prameni KV5, reprezentuje fyziologicky a geneticky velmi pestrou skupinu, jejíž zástupci se vyskytují ve všech obvyklých životních prostředích. Jsou gramnegativní, nesporeující, motilní a obligátně aerobní. *Pseudomonas aeruginosa* je podmíněný lidský patogen způsobující například chronické plicní infekce (Zago & Chugani 2009). *Pseudomonas putida* má všestranný metabolismus a je přístupná pro genetické modifikace. Je proto běžně využívána při výzkumu a v různých průmyslových aplikacích, například při produkci PHA nebo biosurfaktantů (Mozejko-Ciesielska 2021). Byla izolována z mnoha prostředí, včetně termálních pramenů (Ghraiiri *et al.* 2015).

V prameni KV5 byl pozorován i rod *Thermosulfidibacter*. Z termálního průduchu u japonského ostrova Okinawa byl izolován *T. takaii*, který patří mezi gramnegativní, pohyblivé, obligátně anaerobní, chemolitoautotrofní, vodíkové a sírné bakterie. Metabolismus tedy spočívá v oxidaci vodíku spojený s redukcí elementární síry, *T. takaii* patří konkrétně mezi síru redukující bakterie. Optimální teplota růstu je 70 °C (Nunoura *et al.* 2008).

Abundanci kolem 30 % vykazoval u pramene KV1 rod *Thermus*. *T. aquaticus* je gramnegativní, aerobní, heterofilní, nesporeující a nepohyblivá bakterie. Patří mezi termofilní bakterie, optimální růstová teplota odpovídá 70 až 75 °C. Jako první byla izolována z termálních pramenů v Yellowstonském národním parku americkým mikrobiologem Thomasem D. Brockem v roce 1969. *T. aquaticus* produkuje karotenoidy, které způsobují žluté zbarvení termálních jezer a zřidel (Brock & Freeze 1969). Z biotechnologického hlediska je významná především pro svou vysoce termostabilní DNA polymerázu používanou při PCR (kapitola 3.2.1) (Chien *et al.* 1976). Dalším zástupcem je bakterie *Thermus thermophilus*, která se běžně vyskytuje v termálních pramenech. Zajímavé je, že ze syrovátky dokáže produkovat PHA (kapitola 1.3.1) (Pantazaki *et al.* 2009).



### 7.1.1.2 Termální vlažné a studené prameny

V této části jsou diskutovány mikroorganismy z pramenů o teplotě 30 °C a nižší, tedy vzorky KV6, KV8, P9, HM10 a L11.

V prameni KV6 byl z více jak 80 % zastoupený rod *Candidatus Nitrotoga*. *C. Nitrotoga fabula* je gramnegativní, nemobilní, chemolitoautotrofní nitrifikační bakterie (NOB). Nitrifikace je proces oxidace amoniaku na dusičnany. Jako jedna z mála NOB byla *C. Nitrotoga fabula* izolovaná, a to z aktivovaného kalu. Jinak jsou velmi důležitou součástí koloběhu dusíku v přírodě, kde jsou široce rozšířené jak v půdě, tak ve vodě. Jsou mezofilní, optimální teplota růstu se pohybuje mezi 24 až 28 °C. Tyto bakterie mají potenciál pro průmyslové využití například v čističkách odpadních vod (Kitzinger *et al.* 2018).

Z více jak 80 % byl ve vzorku P9 abundantní rod *Gallionella*. Hallebeck a Pedersen uvádí výskyt *G. ferruginea* v chladných podzemních vodách s vysokým obsahem železa a CO<sub>2</sub>. Je charakterizována jako chemolitoautotrofní, mikroaerofilní, pohyblivá, železitá bakterie. Železité bakterie získávají energii oxidací Fe<sup>2+</sup> na Fe<sup>3+</sup>. Roste i při teplotách mezi 5 až 10 °C, optimum je 20 °C (Hallbeck & Pedersen 1990).

V prameni KV8 byl pozorován bakteriální rod *Halothiobacillus*. Literatura uvádí výskyt *H. kellyi* ve vodních prostředích s vyšším obsahem síry s teplotou mezi 37 až 42 °C. Je to gramnegativní, striktně aerobní, chemolitoautotrofní, halotolerantní, sirtá, pohyblivá bakterie. Energii získává oxidací elementární síry nebo sirovodíku na thiosířany, siřičitany nebo tetrathionáty, to znamená, že se řadí mezi síru oxidující bakterie (Sievert *et al.* 2000).

Rod *Rhodoferax* byl identifikován ve vzorku KV8. Finneran uvádí výskyt *R. ferrireducens* v podzemních vodách s vyšším obsahem železa. Tato bakterie je gramnegativní, fakultativně anaerobní, psychrotolerantní. Na rozdíl od ostatních zástupců rodu *Rhodoferax* nezískává energii primárně fotosyntézou, ale redukcí Fe<sup>3+</sup>. Teplotní optimum je 25 °C, růst byl však pozorován i při 4 °C. Zajímavé je, že u *R. ferrireducens* byla pozorována produkce PHA inkluzí po nabarvení Nile blue A (Finneran 2003).

V prameni KV8 byl významně zastoupen i rod *Sulfurimonas*. *S. autotrophica* byla již izolována například z hydrotermálního sedimentu v Japonsku. Roste při 10 a 40 °C, s optimem 25 °C. Je to gramnegativní, anaerobní, pohyblivá, chemolitoautotrofní bakterie. Oxiduje elementární síru, sulfidy a thiosířany (Inagaki 2003).

Rod *Sulfuritalea* byl přítomný ve vzorku P9. *S. hydrogenivorans* roste při teplotách mezi 8 až 32 °C, optimum je 25 °C. Tato bakterie byla izolována například ze sladkovodního jezera (Kojima & Fukui 2011) nebo z aktivovaného kalu (McIlroy *et al.* 2016). *S. hydrogenivorans* je gramnegativní, pohyblivá, fakultativně anaerobní a fakultativně autotrofní. Při autotrofním metabolismu využívá energii získanou oxidací vodíku, elementární síry a thiosulfátu. Z dat vyplývá, že je pravděpodobně také schopná využívat  $\text{NO}_2^-$ , a podílí se na procesu denitrifikace (Kojima & Fukui 2011).

*Escherichia coli* a *Shigella* sp. jsou blízcí příbuzní řadící se do čeledi *Enterobacteriaceae*. Fenotypově sdílejí společně velké množství znaků. Obě jsou fakultativně anaerobní, nesporulující gramnegativní tyčinky. Odlišují se naopak v motilitě, kdy *Escherichia* je pohyblivá a *Shigella* nikoliv. Zásadním rozdílem je i jejich epidemiologický a klinický význam (Devanga Ragupathi *et al.* 2018). Tyto rody byly abundantní (~50 %) v prameni HM10. *E. coli* se přirozeně vyskytuje ve střevní mikroflóře teplokrevných živočichů a je podmíněně patogenní. Její teplotní optimum je 37 °C a je značně odolná. Řadí se mezi koliformní bakterie, to znamená, že při teplotě 30 °C zkvašuje laktózu a může způsobovat projímavá onemocnění. Přítomnost koliformních bakterií ve vodě je indikátorem fekálního znečištění (Ministerstvo zemědělství). *Shigella* sp. je původcem bacilární úplavice, shigelózy, což je vysoce nakažlivé průjmové onemocnění (Státní zdravotní ústav). Zde je nutno zdůraznit, že vzorek byl odebrán z veřejně dostupného zdroje, nikoliv ze stáček stanice, která podléhá přísné kontrole hygienické čistoty.

V prameni HM10 byla nalezena také genetická informace o rodu *Sideroxydans*. *S. lithotrophicus* byla izolována z podzemních vod s vyšším obsahem železa. Roste při teplotách mezi 10 až 35 °C, optimální teplota je 30 °C. Bakterie je gramnegativní, mikroaerofilní, chemolitoautotrofní, železitá. Kromě oxidace  $\text{Fe}^{2+}$  dokáže také využít elementární síru a thiosíran jako zdroj energie. (Emerson *et al.* 2013).

### 7.1.2 Analýza diverzity

Mikrobiální diverzita minerálních pramenů je přímo ovlivněna fyzikálně-chemickými parametry. Druhová rozmanitost silně koreluje s teplotou pramene, kdy pík diverzity odpovídá 24 °C a směrem k extrémům klesá. Významným faktorem je také pH (a tím pádem i chemická kompozice pramene), která má na biodiverzitu však podstatně nižší vliv než teplota. Korelace mezi diverzitou a zeměpisnou šířkou u geotermálních vzorků nebyla pozorována (Sharp *et al.* 2014).

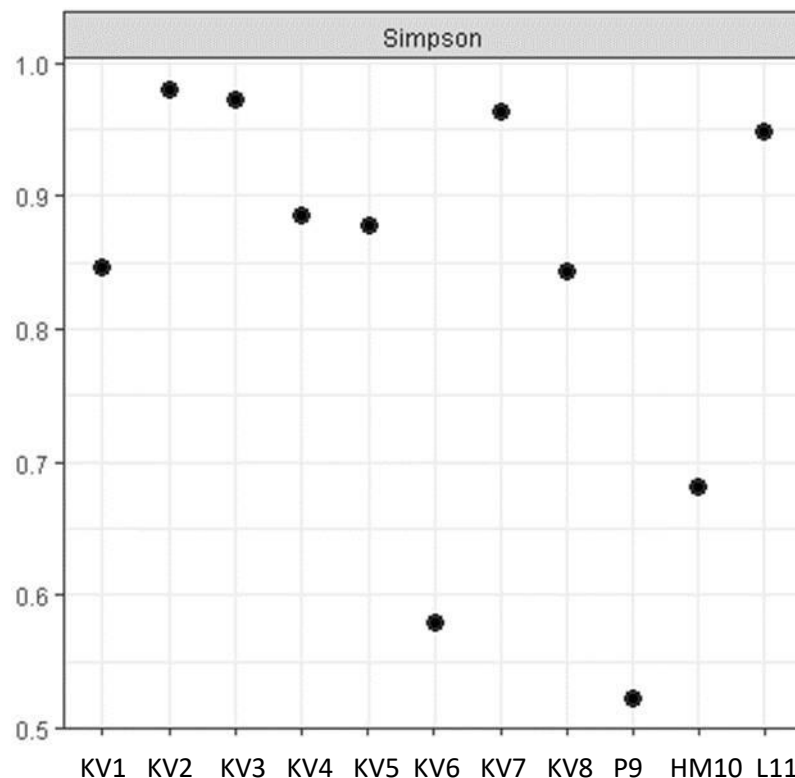
V ekologii je pomocí alfa diverzity vyjadřována průměrná druhová diverzita v konkrétní lokalitě (Whittaker 1960). Simpsonův index ( $D$ ) popisuje pravděpodobnost, že dva náhodně vybraní jedinci budou patřit ke stejnému druhu a klade důraz na vyrovnanost. Ta vypovídá o relativním zastoupení jednotlivých druhů ve vzorku a je dána vztahem (1) (Zelený 2023).

$$D = \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad (1)$$

\* $S$  = počet druhů ve společenstvu;  $p$  = relativní abundance druhu  $i$

Pokud by tedy index nabýval teoretické hodnoty 0, jednalo by se o společenstvo tvořené pouze jedním druhem, naopak při hodnotě 1 by každý druh byl zastoupen právě jedním jedincem.

Nejnižší druhová diverzita ( $<0,7$ ) byla detekována ve vzorcích KV6, P9 a HM10. Všechny tyto vzorky mají nízkou teplotu mezi 10 až 28 °C a obsahují vysoký podíl volného oxidu uhličitého ( $>1300$  mg/l). Možným vysvětlením může být to, že s rostoucí koncentrací  $\text{CO}_2$  klesá pH vody a biodiverzita je tak limitovaná dalším přírodním faktorem (Boyd 2015).



Obrázek 14 Alfa diverzita, index Simpson

## 7.2 Izolace a identifikace

Ze vzorku KV5 se podařilo získat 11 kolonií. Všechny byly metodou Gramova barvení určeny jako gramnegativní tyčinky.

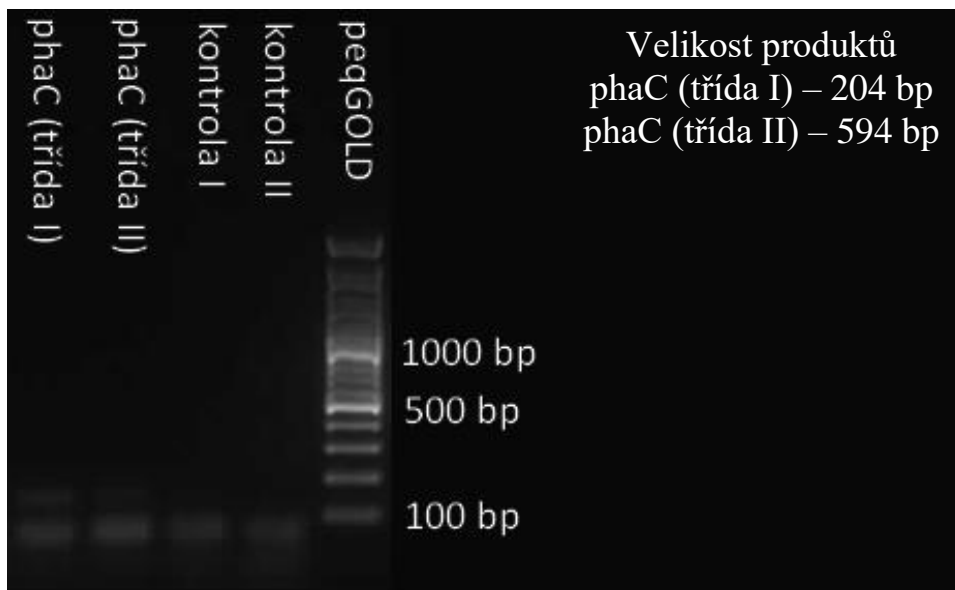
Tři vybrané kolonie byly poté podrobeny oxidačně-fermentačnímu testu, u kterého všechny vykazovaly stejnou reakci. Při anaerobních podmínkách nedošlo k barevné změně média, za aerobních podmínek byla barevná změna pozorována. Bakterie byly vyhodnoceny jako striktně aerobní, nefermentující.

Pomocí NEFERMtestu 24 a software TNW byly všechny bakterie identifikovány jako *Pseudomonas putida* s pravděpodobností 99,78 %.

## 7.3 Detekce polyhydroxyalkanoátů u *Pseudomonas putida*

U bakterií z rodu *Pseudomonas* byla prokázána tvorba PHA z různých substrátů. Pro tento rod je typická přítomnost PHA syntázy třídy II, díky níž dokáže vytvářet PHA<sub>mcl</sub> (Mozejko-Ciesielska *et al.* 2019). Například u *P. medocina* byla pozorována schopnost generovat PHA<sub>mcl</sub> z poly(3-hydroxyoktanoátu) (Rai *et al.* 2011).

Izolovaná bakterie *Pseudomonas putida* z pramene KV5 byla testována na přítomnost PHA syntáz třídy I a II. V našem případě nebyl žádný ze sledovaných genů u *P. putida* prokázán (Obrázek 15). Stejný případ byl již popsán v literatuře (Mácalová 2021), kdy autorka prováděla screening i pro geny zbývajících PHA syntáz a dalších enzymů podílejících se na biosyntéze PHA. V její práci byla u jednoho z testovaných kmenů *P. putida* prokázána přítomnost genů *phaG* a *phaC* třídy III, z čehož lze předpokládat, že dokáže produkovat PHA i z nesouvisejích zdrojů podle cesty D (Obrázek 5). To bylo pozorováno i v dalších studiích, kde *P. putida* syntetizovala PHA z glukózy (Borrero-de Acuña *et al.* 2014), glycerolu (Escapa *et al.* 2013) nebo kyseliny glukonové (Follonier *et al.* 2011). Zdroje ovšem uvádí nejčastěji tvorbu PHA<sub>mcl</sub>, z čehož lze usuzovat, že přítomnost *phaC* třídy II je kmenově závislá.



Obrázek 15 Výsledek PCR pro primery na gen *phaC* třídy I a II

Při fenotypovém stanovení metodou barvení, byla prokázána schopnost *P. putida* produkovat inkluze PHA z glukózy a kyseliny propionové (Tabulka 21). Shodné výsledky uvádí i studie, kde bylo vyšetřováno 24 kmenů *P. putida*, a všechny po barvení Sudan Black vyšly z glukózy PHA pozitivní (Agrawal *et al.* 2015). Kyselina propionová patří také mezi možné substráty (Cerrone *et al.* 2014), což potvrzuje i další zdroj (Mácalová *et al.* 2023).

Tabulka 21 Výsledky fenotypizace barvením u *P. putida*

Sudan Black		Nile Blue	
Glukóza	Kys. propionová	Glukóza	Kys. propionová
+	+	+	+

## ZÁVĚR

V praktické části této práce byla metodou NGS prozkoumána a zhodnocena mikrobiální diverzita jedenácti minerálních pramenů ze čtyř různých lokalit v České republice. Zvláštní pozornost poté byla věnována producentům biodegradabilního a biokompatibilního polymeru PHA. Bohužel, výroba PHA je stále drahá a složitá. Jednou z možností, jak snížit výrobní náklady, je využití extrémofilních mikroorganismů, které mají nižší nároky na sterilitu prostředí.

Porovnáním s literaturou byly v minerálních vodách identifikovány rody *Pseudomonas*, *Rhodospirillum* a *Thermus*, u kterých již produkce PHA byla pozorována. Kromě PHA producentů byly v pramenech zastoupeny i různé vodíkové, sírné a nitrifikační bakterie, které mají potenciál především pro průmyslové environmentální využití (bioremediace, čističky odpadních vod). Další zajímavou bakterií je *Candidatus omnitrophus*, která je specifická svou schopností tvořit magnetické nanočástice. Uplatnění by mohla nalézt například při léčbě rakoviny.

U izolované bakterie *Pseudomonas putida* byly provedeny zkoušky na fenotypovou a genotypovou vybavenost pro produkci PHA. Přítomnost genů *PhaC* tříd I a II u *P. putida* nebyla prokázána. Ovšem při fenotypových testech byla pozorována produkce inkluzí PHA jak z glukózy, tak z kyseliny propionové.

Výzvou však dále zůstává zajistit extrémofilním mikroorganismům vhodné kultivační podmínky pro další možné zkoumání.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

Abd-El-haleem, D. *et al.*, 2007. Biosynthesis of biodegradable polyhydroxyalkanotes biopolymers in genetically modified yeasts. *International Journal of Environmental Science & Technology*, vol. 4(issue 4), pp.513-520. Dostupné z: doi:10.1007/BF03325988 [2023-05-10].

ABM Inc., Polymerase Chain Reaction (PCR) - An Introduction. In *Applied Biological Materials (ABM) Inc.* Dostupné z: [https://old.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/polymerase\\_chain\\_reaction\\_introduction.php](https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php) [2023-05-16].

Agrawal, T., Kotasthane, A. & Kushwah, R., 2015. Genotypic and phenotypic diversity of polyhydroxybutyrate (PHB) producing *Pseudomonas putida* isolates of Chhattisgarh region and assessment of its phosphate solubilizing ability. *3 Biotech*, vol. 5(issue 1), pp.45-60. Dostupné z: doi: 10.1007/s13205-014-0198-9 [2023-05-16].

Air, G. & Harris, J., 1974. DNA-dependent RNA polymerase from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*. *FEBS Letters*, vol. 38(issue 3), pp.277-281. Dostupné z: doi: 10.1016/0014-5793%2874%2980072-4 [2023-05-06].

Anjum, A. *et al.*, 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 89, pp.161-174. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016303774> [2022-11-17].

Aryal, S., 2022. OF (Oxidation-Fermentation) Test. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/of-test/> [2023-05-16].

Attwood, T., 2006. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* revised Edit., New York: Oxford University Press. [2023-05-03]

Becker, J. & Wittmann, C., 2020. Microbial production of extremolytes — high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 65, pp.118-128. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166920300203> [2023-05-03].

Bhattacharyya, A. *et al.*, 2012. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Express*, vol. 2(issue 1). Dostupné z: doi: 10.1186/2191-0855-2-34 [2023-05-15].

Bielen, A. *et al.*, 2013. Biohydrogen Production by the Thermophilic Bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*: Current Status and Perspectives. *Life*, vol. 3(issue 1), pp.52-85. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2075-1729/3/1/52> [2023-05-06].

Bodor, A. *et al.*, 2020. Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 19(issue 1), pp.1-22. Dostupné z: doi: 10.1007/s11157-020-09522-4 [2023-05-12].

- Borrero-de Acuña, J. *et al.*, 2014. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microbial Cell Factories*, vol. 13(issue 1). Dostupné z: doi: 10.1186/1475-2859-13-88 [2023-05-16].
- Boyd, C., 2015. pH, Carbon Dioxide, and Alkalinity. In *Water Quality*. Cham: Springer International Publishing, pp. 153-178. Dostupné z: doi: 10.1007/978-3-319-17446-4\_8 [2023-05-16].
- Bresan, S. *et al.*, 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*, vol. 6(issue 1). Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep26612> [2023-02-01].
- Brock, T. & Freeze, H., 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. *Journal of Bacteriology*, vol. 98(issue 1), pp.289-297. Dostupné z: doi: 10.1128/jb.98.1.289-297.1969 [2023-04-26].
- Bucci, D., Tavares, L. & Sell, I., 2005. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*, vol. 24(issue 5), pp.564-571. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941805000334> [2023-03-21].
- Bugnicourt, E. *et al.*, 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, vol. 8(issue 11), pp.791-808. Dostupné z: <http://www.expresspolymlett.com/letolt.php?file=EPL-0005219&mi=c> [2022-12-06].
- Cerrone, F. *et al.*, 2014. Medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production from volatile fatty acids derived from the anaerobic digestion of grass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 98(issue 2), pp.611-620. Dostupné z: doi: 10.1007/s00253-013-5323-x [2023-05-16].
- Cordier, T. *et al.*, 2021. Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: A review of current strategies with an implementation roadmap. *Molecular Ecology*, vol. 30 (issue 13), pp.2937-2958. Dostupné z: doi: 10.1111/mec.15472 [2023-05-13].
- Devanga Ragupathi, N. *et al.*, 2018. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella serogroups*: challenges and strategies. *New Microbes and New Infections*, vol. 21, pp.58-62. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2052297517300744> [2023-05-01].
- Dunlap, P., 2001. Microbial Diversity. In *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier, pp. 280-291. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847195004354> [2023-05-15].
- Emaimo, A. *et al.*, 2022. Polyhydroxyalkanoates Composites and Blends: Improved Properties and New Applications. *Journal of Composites Science*, vol. 6(issue 7). Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2504-477X/6/7/206> [2022-12-04].
- Emerson, D. *et al.*, 2013. Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: implications for physiology, ecology, and systematics. *Frontiers in Microbiology*, vol. 4. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2013.00254 [2023-05-01].



Escapa, I. *et al.*, 2013. The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol. *Environmental Microbiology*, vol. 15(issue 1), pp.93-110. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02790.x [2023-05-16].

Fariq, A. & Yasmin, A., 2020. Production, characterization and bioactivities of biosurfactants from newly isolated strictly halophilic bacteria. *Process Biochemistry*, vol. 98, pp.1-10. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511320304712> [2023-05-15].

Fidler, S., 1992. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 103(2-4), pp.231-235. Dostupné z: doi: 10.1016/0378-1097(92)90314-E [2023-05-08].

Finneran, K., 2003. *Rhodoferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, vol. 53(issue 3), pp.669-673. Dostupné z: doi: 10.1099/ijs.0.02298-0 [2023-05-02].

Follonier, S., Panke, S. & Zinn, M., 2011. A reduction in growth rate of *Pseudomonas putida* KT2442 counteracts productivity advances in medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from gluconate. *Microbial Cell Factories*, vol. 10(issue 1). Dostupné z: doi: 10.1186/1475-2859-10-25 [2023-05-16].

Fontaine, P., Mosrati, R. & Corroler, D., 2017. Medium chain length polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Pseudomonas putida* mt-2 is enhanced by co-metabolism of glycerol/octanoate or fatty acids mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 98, pp.430-435.

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016309576> [2023-05-15].

Fox, E. *et al.*, 2014. Accuracy of Next Generation Sequencing Platforms. *Next Gener Seq Appl*. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25699289/> [2023-05-16].

Freeze, H. & Brock, T., 1970. Thermostable Aldolase from *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, vol. 101(issue 2), pp.541-550. Dostupné z: doi: 10.1128/jb.101.2.541-550.1970 [2023-05-06].

Fuentes-Tristan, S. *et al.*, 2019. Bioinspired biomolecules: Mycosporine-like amino acids and scytonemin from *Lyngbya* sp. with UV-protection potentialities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 201. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134419310693> [2023-05-03].

Ghraiiri, T., Braiek, O. & Hani, K., 2015. Detection and characterization of a bacteriocin, putadycin T01, produced by *Pseudomonas putida* isolated from hot spring water. *APMIS*, vol. 123(issue 3), pp.260-268. doi:10.1111/apm.12343 [2023-05-14].

GLENN, T., 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, vol. 11(issue 5), pp.759-769. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x [2023-05-15].

Goswami, M. *et al.*, 2021. Microbial Polyhydroxyalkanoates Granules: An Approach Targeting Biopolymer for Medical Applications and Developing Bone Scaffolds. *Molecules*, vol. 26(issue 4). Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/860> [2022-12-06].

Grage, K. *et al.*, 2009. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, vol. 10(issue 4), pp.660-669. Dostupné z: doi: 10.1021/bm801394s [2023-02-01].

Grothe, E., Moo-Young, M. & Chisti, Y., 1999. Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 25(1-2), pp.132-141. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014102299900023X> [2023-05-15].

Hallbeck, L. & Pedersen, K., 1990. Culture parameters regulating stalk formation and growth rate of *Gallionella ferruginea*. *Journal of General Microbiology*, vol. 136(issue 9), pp.1675-1680. doi: 10.1099/00221287-136-9-1675 [2023-04-29].

Higuchi-Takeuchi, M., Morisaki, K. & Numata, K., 2016. A Screening Method for the Isolation of Polyhydroxyalkanoate-Producing Purple Non-sulfur Photosynthetic Bacteria from Natural Seawater. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2016.01509/abstract [2023-05-16].

Chaudhry, W. *et al.*, 2011. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. *Annals of Microbiology*, vol. 61(issue 3), pp.623-629. Dostupné z: doi: 10.1007/s13213-010-0181-6 [2023-05-16].

Chaudhuri, B., Chowdhury, T. & Chattopadhyay, B., 2017. Comparative analysis of microbial diversity in two hot springs of Bakreshwar, West Bengal, India. *Genomics Data*, vol. 12, pp.122-129. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213596017300296> [2023-05-13].

Chee, J. *et al.*, 2010. Isolation and Characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) Capable of Producing Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Triglycerides, Fatty Acids and Glycerols. *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 18(issue 4), pp.584-592. Dostupné z: doi: 10.1007/s10924-010-0204-1 [2023-05-15].

Chien, A., Edgar, D. & Trela, J., 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, vol. 127(issue 3), pp.1550-1557. Dostupné z: doi: 10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976 [2023-04-26].

Illumina, 2020. Illumina: A beginner's guide to NGS. *Illumina*. Dostupné z: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners.html> [2023-05-16].

Inagaki, F., 2003. *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing - proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, vol. 53(issue 6), pp.1801-1805. Dostupné z: doi: 10.1099/ijs.0.02682-0 [2023-05-13].

Kato, C. *et al.*, 1998. Extremely Barophilic Bacteria Isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a Depth of 11,000 Meters. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64(issue 4), pp.1510-1513. Dostupné z: doi: 10.1128/AEM.64.4.1510-1513.1998 [2023-05-04].

Kawasumi, T. *et al.*, 1984. *Hydrogenobacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., an Extremely Thermophilic, Aerobic, Hydrogen-Oxidizing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 34(issue 1), pp.5-10. Dostupné z: doi: 10.1099/00207713-34-1-5 [2023-04-30].

Kirk, O., Borchert, T. & Fuglsang, C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13(issue 4), pp.345-351. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166902003282> [2023-05-04].

Kitzinger, K. *et al.*, 2018. Characterization of the First “*Candidatus Nitrotoga*” Isolate Reveals Metabolic Versatility and Separate Evolution of Widespread Nitrite-Oxidizing Bacteria. *mBio*, vol. 9(issue 4), pp.e01186-18. Dostupné z: doi: 10.1128/mBio.01186-18 [2023-04-30].

Kodama, Y. & Watanabe, K., 2004. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54(issue 6), pp.2297-2300. Dostupné z: doi: 10.1099/ijs.0.63243-0 [2023-05-13].

Kohli, I. *et al.*, 2020. Extremophile – An Adaptive Strategy for Extreme Conditions and Applications. *Current Genomics*, vol. 21(issue 2), pp.96-110. Dostupné z: <https://www.eurekaselect.com/180626/article> [2023-05-03].

Kochhar, N. *et al.*, 2022. Perspectives on the microorganism of extreme environments and their applications. *Current Research in Microbial Sciences*, vol. 3. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666517422000311> [2023-05-03].

Kojima, H. & Fukui, M., 2011. *Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 61(issue 7), pp.1651-1655. Dostupné z: doi: 10.1099/ijs.0.024968-0 [2023-05-01].

Kolinko, S. *et al.*, 2016. Single-cell genomics of uncultivated deep-branching magnetotactic bacteria reveals a conserved set of magnetosome genes. *Environmental Microbiology*, vol. 18(issue 1), pp.21-37. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.12907 [2023-04-29].

Koller, M., 2017. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles?. *MOJ Polymer Science*, vol. 1(issue 2). Dostupné z: <https://medcraveonline.com/MOJPS/production-of-poly-hydroxyalkanoate-pha-biopolyesters-by-extremophiles.html> [2023-05-04].

Kotakadi, S., Borelli, D. & Nannepaga, J., 2022. Therapeutic Applications of Magnetotactic Bacteria and Magnetosomes: A Review Emphasizing on the Cancer Treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10. Dostupné z: doi: 10.3389/fbioe.2022.789016/full [2023-05-14].

Kourilova, X. *et al.*, 2020. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a thermophilic strain of *Schlegelella thermodepolymerans* from xylose rich substrates. *Bioresource Technology*, vol. 315. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852420311573> [2023-05-15].

Anon., Léčivé minerální prameny v Luhačovicích. *Luhačovice*. Dostupné z: <https://luhacovice.cz/mineralni-prameny/> [2023-05-15].

Lemoigne, M., 1926. Produits de déshydratation et de polymerisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique*, pp.770-782. ISSN 0037-9042 [2023-05-13].

Luhačovice, L., 2022. Analýza přírodních léčivých pramenů. *Lázně Luhačovice*. Dostupné z: <https://www.lazneluhacovice.cz/25050-analyza-prirodnich-lecivych-pramenu> [2023-05-15].

Máčala, P., 2013. *Podhradí 1563-2013* Vyd. 1., Praha: Portál, ISBN 978-80-262-0463 [203-05-10]

Máčalová, D., 2021. *Screening genů produkujících biomateriály - polyhydroxyalkanoáty*. Diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/46918>. [2023-05-11]

Máčalová, D. *et al.*, 2023. Genotypic and Phenotypic Detection of Polyhydroxyalkanoate Production in Bacterial Isolates from Food. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24(issue 2). Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/2/1250> [2023-02-11].

Maestro, B. & Sanz, J., 2017. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology*, vol. 10(issue 6), pp.1323-1337. Dostupné z: doi:10.1111/1751-7915.12718 [2023-02-01].

Maheshwari, P. & Sankar, P., 2023. Culture-independent and culture-dependent approaches in symbiont analysis. In *Microbial Symbionts*. Elsevier, pp. 743-763. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323993340000189> [2023-05-12].

Margesin, R. & Schinner, F., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, vol. 5(issue 2), pp.73-83. Dostupné z: doi: 10.1007/s007920100184 [2023-05-15].

Marsh, C. & Larsen, D., 1953. Characterization of some thermophilic bacteria from the hot springs of Yellowstone National Park. *Journal of Bacteriology*, vol. 65(issue 2), pp.193-197. Dostupné z: doi: 10.1128/jb.65.2.193-197.1953 [2023-05-04].

Matsumoto, K. *et al.*, 2006. Synthesis of Short-chain-length/Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoate (PHA) Copolymers in Peroxisome of the Transgenic *Arabidopsis Thaliana* Harboring the PHA Synthase Gene from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 14(issue 4), pp.369-374. Dostupné z: doi: 10.1007/s10924-006-0035-2 [2023-05-10].

McIlroy, S. *et al.*, 2016. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. *Environmental Microbiology*, vol. 18(issue 1), pp.50-64. Dostupné z: doi: 10.1111/1462-2920.12614 [2023-05-01].

Menzel, P. *et al.*, 2015. Comparative Metagenomics of Eight Geographically Remote Terrestrial Hot Springs. *Microbial Ecology*, vol. 70(issue 2), pp.411-424. Dostupné z: doi: 10.1007/s00248-015-0576-9 [2023-05-16].

Merino, N. *et al.*, 2019. Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology*, vol. 10. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2019.00780 [2023-03-17].

Ministerstvo zdravotnictví. Přírodní léčivé zdroje minerální vody a zdroje přírodní minerální vody. *Ministerstvo zdravotnictví České republiky*. <https://www.mzcr.cz/prirodni-lecive-zdroje-mineralnich-vod-a-zdroje-prirodnich-mineralnich-vod/> [2023-02-18].

Ministerstvo zemědělství, *Escherichia coli*. *Bezpečnost potravin*. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/termin/escherichia-coli/> [2023-05-16].

Mishra, M., 2018. Encyclopedia of Polymer Applications. In *Encyclopedia of Polymer Applications*. p. 40. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=buiCDwAAQBAJ&lpg=PR4&hl=cs&pg=PR3#v=onepage&q&f=false> [2023-05-15].

Mitra, R. *et al.*, 2020. Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories*, vol. 19(issue 1). Dostupné z: doi: 10.1186/s12934-020-01342-z [2023-05-04].

Mozejko-Ciesielska, J., 2021. *Pseudomonas putida*-based cell factories. In *Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules*. Elsevier, pp. 165-181. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128214770000258> [2023-05-14].

Mozejko-Ciesielska, J., Szacherska, K. & Marciniak, P., 2019. *Pseudomonas* Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 27(issue 6), pp.1151-1166. Dostupné z: doi: 10.1007/s10924-019-01422-1 [2023-05-14].

Český inspektorát lázní a zřidel (ČIL). *Ministerstvo zdravotnictví České republiky*. Dostupné z: <https://www.mzcr.cz/cesky-inspektorat-lazni-a-zridel-cil/> [2023-05-15].

Anon., NEFERMtest 24: Příbalový leták. *Erba Lachema s.r.o.* Dostupné z: [https://www.erbalachema.com/attachments/MLT00010%20NEFERMtest%2024\\_G-70MGecE7sI.pdf](https://www.erbalachema.com/attachments/MLT00010%20NEFERMtest%2024_G-70MGecE7sI.pdf) [2023-05-16].

Nunoura, T. *et al.*, 2008. *Thermosulfidibacter takaii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, vol. 58(issue 3), pp.659-665. doi: 10.1099/ijs.0.65349-0 [2023-04-29].

Pallen, M., 2021. The status Candidatus for uncultured taxa of Bacteria and Archaea: SWOT analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 71(issue 9). Dostupné z: doi: 10.1099/ijsem.0.005000 [2023-05-16].

Panda, A. *et al.*, 2016. Bacterial and archeal community composition in hot springs from Indo-Burma region, North-east India. *AMB Express*, vol. 6(issue 1). Dostupné z: doi: 10.1186/s13568-016-0284-y [2023-05-13].

Panith, N. *et al.*, 2016. Development of tunable biodegradable polyhydroxyalkanoates microspheres for controlled delivery of tetracycline for treating periodontal disease. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 133(issue 42). Dostupné z: doi: 10.1002/app.44128 [Accessed 2023-03-21].

Panosyan, H. & Birkeland, N., 2014. Microbial diversity in an Armenian geothermal spring assessed by molecular and culture-based methods. *Journal of Basic Microbiology*, vol. 54(issue 11), pp.1240-1250. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.201300999> [2023-05-13].

Pantazaki, A. *et al.*, 2009. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry*, vol. 44(issue 8), pp.847-853. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511309001123> [2023-04-29].

Parada-Pinilla, M. *et al.*, 2021. Biopolymer production by halotolerant bacteria isolated from Caatinga biome. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 52(issue 2), pp.547-559. Dostupné z: doi:10.1007/s42770-021-00426-1 [2023-05-15].

Park, S. *et al.*, 2009. *Maritimimonas rapanae* gen. nov., sp. nov., isolated from gut microflora of the veined rapa whelk, *Rapana venosa*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, vol. 59(issue 11), pp.2824-2829. Dostupné z: doi: 10.1099/ijs.0.010504-0 [2023-05-01].

Płaza, G., Zjawiony, I. & Banat, I., 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, vol. 50(issue 1), pp.71-77. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920410505001646> [2023-05-15].

Poděbradka, *Lázně Poděbrady*. Dostupné z: <https://www.lazne-podebrady.cz/podebradka> [2023-03-18]

- Povolo, S. *et al.*, 2010. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *Bioresource Technology*, vol. 101(issue 20), pp.7902-7907. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410008655> [2023-05-10].
- Primm, S., 2023. Biodiversity. *Encyclopedia Britannica*. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/biodiversity> [2023-05-15].
- Probst, A. *et al.*, 2014. Biology of a widespread uncultivated archaeon that contributes to carbon fixation in the subsurface. *Nature Communications*, vol. 5(issue 1). Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/ncomms6497> [2023-04-25].
- Pulingam, T. *et al.*, 2022. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoate in Tissue Engineering. *Polymers*, vol. 14(issue 11). Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/11/2141> [2023-03-20].
- Quillaguamán, J. *et al.*, 2005. Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 99(issue 1), pp.151-157. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jambio/article/99/1/151/6720345> [2023-05-15].
- Raetz, C. & Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 71(issue 1), pp.635-700. Dostupné z: doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414 [2023-03-26].
- Rai, R. *et al.*, 2011. Poly-3-hydroxyoctanoate P(3HO), a Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Homopolymer from *Pseudomonas mendocina*. *Biomacromolecules*, vol. 12(issue 6), pp.2126-2136. Dostupné z: doi: 10.1021/bm2001999 [2023-05-16].
- Ray, S. & Kalia, V., 2017. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology*, vol. 57(issue 3), pp.261-269. Dostupné z: doi: 10.1007/s12088-017-0651-7 [2023-03-04].
- Rivkina, E. *et al.*, 2000. Metabolic Activity of Permafrost Bacteria below the Freezing Point. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66(issue 8), pp.3230-3233. Dostupné z: doi: 10.1128/AEM.66.8.3230-3233.2000 [2023-05-04].
- Rodriguez-Contreras, A., 2019. Recent Advances in the Use of Polyhydroxyalkanoates in Biomedicine. *Bioengineering*, vol. 6(issue 3). Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2306-5354/6/3/82> [2022-12-06].
- Rupasinghe, R. *et al.*, 2022. Microbial diversity and ecology of geothermal springs in the high-grade metamorphic terrain of Sri Lanka. *Environmental Advances*, vol. 7. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666765722000023> [2023-05-13].
- Sahle, C. *et al.*, 2018. Hydration in aqueous solutions of ectoine and hydroxyectoine. *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 20(issue 44), pp.27917-27923. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8CP05308A> [2023-05-03].

Segre, J., 2023. Metagenomics. *National Human Genome Research Institute*. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Metagenomics> [2023-05-15].

Sharp, C. *et al.*, 2014. Humboldt's spa: microbial diversity is controlled by temperature in geothermal environments. *The ISME Journal*, vol. 8(issue 6), pp.1166-1174. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ismej2013237> [2023-05-12].

Shishatskaya, E., Khlusov, I. & Volova, T., 2012. A hybrid PHB–hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 17(issue 5), pp.481-498. Dostupné z: doi: 10.1163/156856206776986242 [2023-03-04].

Sievert, S., Heidorn, T. & Kuever, J., 2000. *Halothiobacillus kellyi* sp. nov., a mesophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea, and emended description of the genus *Halothiobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 50(issue 3), pp.1229-1237. Dostupné z: doi: 10.1099/00207713-50-3-1229 [2023-04-30].

Smrhova, T. *et al.*, 2022. Prokaryotes of renowned Karlovy Vary (Carlsbad) thermal springs: phylogenetic and cultivation analysis. *Environmental Microbiome*, vol. 17(issue 1). Dostupné z: doi:10.1186/s40793-022-00440-2 [2023-05-18].

Solaiman, D. & Ashby, R., 2005. Rapid Genetic Characterization of Poly(hydroxyalkanoate) Synthase and Its Applications. *Biomacromolecules*, vol. 6(issue 2), pp.532-537. Dostupné z: doi: 10.1021/bm0493640 [2023-03-31].

SPLZaK, 2020. Prameny. *Správa přírodních léčivých zdrojů a kolonád*. Dostupné z: <https://splzak.cz/en/node/595> [2023-01-29].

Státní zdravotní ústav, Shigelóza. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1376-shigeloza> [2023-05-16].

Storch, D., 2019. Biodiverzita: co to je, jak ji měřit, co ji podmiňuje a k čemu je to všechno dobré. *Živa AVČR*, 2019(5), pp.194-197. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/biodiverzita-co-to-je-jak-ji-merit-co-ji-podminuje.pdf> [2023-05-15].

Su, Z. *et al.*, 2014. PHBVHHx scaffolds loaded with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells or hepatocyte-like cells differentiated from these cells for liver tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, vol. 45, pp.374-382. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092849311400592X> [2023-03-04].

Šašinková, D. *et al.*, 2022. Evaluation of the biodegradation of polymeric materials in the freshwater environment—An attempt to prolong and accelerate the biodegradation experiment. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 203. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391022002634> [2023-05-16].

Šolc, P., 2001. *Karlovarská lázeňská léčba* 1. vyd., Praha: Galén, ISBN 978-80-7262-107-1. [2023-03-18]



Tan, G. *et al.*, 2014. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, vol. 6(issue 3), pp.706-754. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/6/3/706> [2023-02-12].

Thorat Gadgil, B., Killi, N. & Rathna, G., 2017. Polyhydroxyalkanoates as biomaterials. *MedChemComm*, vol. 8(issue 9), pp.1774-1787. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7MD00252A> [2023-03-04].

Tripathi, N. & Sapra, A., 2023. Gram Staining. *National Library of Medicine* Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/> [2023-05-06]

Visakh P. M., V., 2014. CHAPTER 1. Polyhydroxyalkanoates (PHAs), their Blends, Composites and Nanocomposites: State of the Art, New Challenges and Opportunities. In I. Roy & V. P M, eds. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) based Blends, Composites and Nanocomposites*. Green Chemistry Series. Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 1-17. Dostupné z: doi: 10.1039/9781782622314-00001 [2022-11-17].

Vylita, B., 1991. In *Nové poznatky o karlovarské zřidelní struktuře*. Praha : Ústřední ústav geologický: Knihovna Ústředního ústavu geologického, pp. 81-92, ISBN 80-7075-021-9 [2023-03-18]

Whittaker, R., 1960. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, vol. 30(issue 3), pp.279-338. Dostupné z: doi: 10.2307/1943563 [2023-05-14].

Ye, C. *et al.*, 2009. PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, vol. 30(issue 26), pp.4401-4406. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209004761> [2023-03-04].

Zago, A. & Chugani, S., 2009. *Pseudomonas*. In *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, pp. 245-260. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123739445002030> [2023-05-14].

Zelený, D., 2023. Indices of diversity and evenness. *Analysis of community ecology data in R*. Dostupné z: <https://www.davidzeleny.net/anadat-r/doku.php/en:div-ind> [2023-05-16].

Zher Neoh, S. *et al.*, 2022. Polyhydroxyalkanoate synthase (*PhaC*): The key enzyme for biopolyester synthesis. *Current Research in Biotechnology*, vol. 4, pp.87-101. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590262822000028> [2023-02-02].

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

%CDM	hmotnost buněčné sušiny
ACP	acyl carrier protein
ATP	adenosintrifosfát
BHI	mozko-srdcová infuze
CoA	koenzym A
D	Simpsonův index
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
<i>fabG</i>	3-ketoacyl reduktáza
FTIR	infračervená mikroskopie s Fourierovou transformací
GAPs	granule-Associated proteins
KTJ	kolonii tvořící jednotka
LPS	lipopolysacharidy
MH	mezní hodnota
MTB	magnetotaktické bakterie
MZCR	ministerstvo zdravotnictví České republiky
NADPH	fosforylovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NGS	next generation sequencing
NMH	nejvyšší mezní hodnota
NOB	nitrifikační bakterie
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PET	polyetylentereftalát
PHA	polyhydroxyalkanoáty
<i>phaA</i>	3-ketothioláza
<i>phaC</i>	PHA syntáza
<i>phaJ</i>	R-specifická enoyl hydratáza
PHA <sub>lcl</sub>	polyhydroxyalkanoáty s dlouhým řetězcem
PHA <sub>mcl</sub>	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem
<i>phaP</i>	phasiny
<i>phaR</i>	regulační proteiny

---

PHA <sub>scl</sub>	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem
<i>phaZ</i>	PHA depolymeráza
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHBHx	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -hydroxyhexanoát)
PHBV	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -hydroxyvalerát)
PHBVHx	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -hydroxyvalerát- <i>co</i> -hydroxyhexanoát)
PHHx	poly(3-hydroxyhexanoát)
PHV	poly(3-hydroxyvalerát)
PP	polypropylen
RA%	ratio
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SPLZaK	Správa přírodních léčivých zdrojů a kolonád
ssDNA	jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Struktura PHA .....	12
Obrázek 2 a) PHB, b) PHV, c) PHBV .....	13
Obrázek 3 Struktura PHA granule .....	14
Obrázek 4 Biosyntéza ze souvisejících zdrojů .....	15
Obrázek 5 Biosyntéza PHA z nesouvisejících zdrojů .....	16
Obrázek 6 Ekosystémy s extrémními podmínkami .....	23
Obrázek 7 Schéma Illumina NGS .....	29
Obrázek 8 Schéma PCR .....	31
Obrázek 9 Izolace DNA pomocí kitu DNeasy PowerSoil Pro .....	38
Obrázek 10 Izolace DNA pomocí Blood and Tissue kit .....	42
Obrázek 11 Biodiverzita na úrovni domén .....	45
Obrázek 12 Biodiverzita na úrovni kmenů .....	46
Obrázek 13 Biodiverzita na úrovni rodů.....	47
Obrázek 14 Alfa diverzita, index Simpson.....	51
Obrázek 15 Výsledek PCR pro primery na gen <i>phaC</i> třídy I a II.....	53

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Porovnání vlastností PHA s PP.....	20
Tabulka 2 Klasifikace extrémofilních mikroorganismů .....	22
Tabulka 3 Kritéria pro hodnocení zdrojů minerálních vod.....	25
Tabulka 4 Požadavky na mikrobiologickou jakost zdrojů minerálních vod .....	26
Tabulka 5 Chemické složení Hanácké kyselky .....	26
Tabulka 6 Chemické složení Vřídla.....	27
Tabulka 7 Vybrané parametry karlovarských pramenů.....	27
Tabulka 8 Chemické složení vybraných luhačovických pramenů.....	28
Tabulka 9 Chemické složení Sirčeny.....	28
Tabulka 10 Chemické složení Poděbradky.....	28
Tabulka 11 Charakteristika vzorků a jejich původ .....	34
Tabulka 12 Mozko-srdcová infuze (BHI).....	36
Tabulka 13 Hugh-Leifson médium.....	36
Tabulka 14 Primery na gen 16S rRNA.....	39
Tabulka 15 Složení první PCR směsi pro NGS.....	39
Tabulka 16 Průběh PCR pro NGS .....	39
Tabulka 17 Složení druhé PCR směsi pro NGS .....	40
Tabulka 18 Primery pro detekci genu <i>phaC</i> .....	42
Tabulka 19 Složení první PCR směsi .....	43
Tabulka 20 Program PCR .....	43
Tabulka 21 Výsledky fenotypizace barvením u <i>P. putida</i> .....	53