

# Možnosti degradace polutantů psychrofilními bakteriemi rostoucími na fenolu

Hana Ryšavá

---

Bakalářská práce  
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Hana Ryšavá  
Osobní číslo: T19985  
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie  
Specializace: Ochrana životního prostředí  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Možnosti degradace polutantů psychrofilními bakteriemi rostoucími na fenolu

## Zásady pro vypracování

- Vypracujte rešerši zaměřenou na bakteriální degradaci vybraných polutantů za snížených teplot
- Ověřte růst psychrofilních bakterií, využívajících fenol, na dalších uhlovodících a polutantech (např. na toluenu, oktanu, cyklohexanu, na derivátech fenolu, pyrrolidonu apod.)
- Získané poznatky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v tištěné i elektronické formě v řádném termínu

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

R. Margesin a kol.: Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 2013, 185-191.

R. Margesin a kol.: Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles* 2003, 7:451–458.

Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect a Medline.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

---

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

---

**prof. Mgr. Marek Koutný, 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 bakalářskou 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

Tato práce se zaměřovala na studium šesti kultur bakterií izolovaných ze vzorků stojatých a tekoucích vod. Cílem bylo testovat schopnost těchto kultur růst a degradovat uhlovodíkové polutanty při teplotě 8 °C, což je běžná teplota pro podzemní vody. Testy ukázaly, že se jedná o psychrotrofní bakterie, pravděpodobně *Acinetobacter lwoffii/junii*. Testován byl růst na těchto látkách: toluen, oktan, hexadekan, resorcinol, N-methyl 2-pyrrolidon, tetradekan, dodekan a dekan. Studované kultury na většině substrátů při 8 °C nerostly, pouze hexadekan a tetradekan se ukázaly být za těchto podmínek pro některé z nich využitelnými uhlíkatými zdroji.

Klíčová slova: *Acinetobacter*, organické polutanty, psychrotrofní, růst

## ABSTRACT

This work was focused on the study of six bacterial strains isolated from samples of stagnant or flowing water. The goal was to test the ability of these strains to grow and degrade hydrocarbon pollutants at a temperature of 8 °C, which is a common temperature for many groundwater. The results showed that the strains are psychrotrophic bacteria, probably *Acinetobacter lwoffii/junii*. During the study, the growth of above mentioned bacteria on toluene, octane, hexadecane, resorcinol, N-methyl 2-pyrrolidone, tetradecane, dodecane and decane was tested. The strains were incapable to grow on most of the substrates at 8 °C, but under such condition, hexadecane and tetradecane revealed to be utilizable carbon sources for some of them.

Keywords: *Acinetobacter*, organic pollutants, psychrotroph, growth

Děkuji doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné poznatky a připomínky, díky kterým bylo možno dovést tuto práci ke zdárnému konci.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 RŮST BAKTERIÍ PŘI NÍZKÝCH TEPLOTÁCH</b> .....	<b>11</b>
1.1 PSYCHROFILNÍ A PSYCHROTROFNÍ BAKTERIE.....	11
1.1.1 Výskyt chladnomilných bakterií.....	11
1.1.2 Praktický význam chladnomilných bakterií.....	13
1.2 ADAPTACE BAKTERIÍ NA NÍZKÉ TEPLoty.....	21
1.2.1 Enzymatická kinetika.....	21
1.2.2 Strukturální stabilita enzymů.....	22
1.2.3 Teplotní stabilita enzymů.....	22
1.2.4 Flexibilita enzymů.....	23
1.2.5 Aktivita enzymů.....	24
1.2.6 Souvislost mezi aktivitou, stabilitou a flexibilitou.....	24
1.2.7 Tekutost membrány.....	25
1.2.8 Bílkoviny vázající led.....	25
1.2.9 Alfa-amylázy.....	26
1.2.10 Esteráza.....	27
1.2.11 Lipázy.....	27
<b>2 BIODEGRADACE UHLOVODÍKŮ</b> .....	<b>29</b>
2.1 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE MONOAROMATICÝCH UHLOVODÍKŮ.....	30
2.2 BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE ALIFATICKÝCH UHLOVODÍKŮ ZA NÍZKÝCH TEPLot.....	34
2.3 ZÁVĚR.....	35
<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
<b>3 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>37</b>
3.1 POUŽITÉ KULTURY.....	37
3.2 ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA.....	37
3.3 POSTUPY TESTŮ.....	38
3.3.1 Degradální testy ve zkumavkách.....	38
3.3.2 Degradální testy ve vialkách.....	39
3.3.3 Degradální testy v lahvích.....	39
3.3.4 Růstové, biochemické testy a mikroskopie kultur.....	39
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>41</b>
4.1 RŮST KULTUR 1A, 5A, 5B, 6A, 6B A 12A PŘI 8 °C.....	41

4.2 RŮST KULTUR NA TOLUENU A OKTANU PŘI 8 °C (POKUS 1).....	42
4.3 RŮST KULTUR NA HEXADEKANU A RESORCINOLU PŘI 8 °C (POKUS 2).....	43
4.4 RŮST KULTUR NA N-METHYL 2-PYRROLIDONU PŘI 8 °C (POKUS 3).....	44
4.5 RŮST VŠECH KULTUR PŘI RŮZNÝCH TEPLOTÁCH.....	44
4.6 RŮST KULTUR 1A, 6A A 12A NA HEXADEKANU.....	45
4.7 RŮST KULTUR 1A, 6A A 12A PŘI 23°C A 8°C NA ALIFATICKÝCH UHLOVODÍČÍCH DEKANU, DODEKANU A TETRADEKANU (POKUS 4).....	46
4.8 RŮST KULTUR 1A, 6A A 12A PŘI 8 °C NA TETRADEKANU (POKUS 5).....	48
4.9 RŮST KULTURY 6A PŘI 8°C NA TETRADEKANU: RŮST INOKUL S RŮZNOU PŘEDKULTIVACÍ (POKUS 6).....	51
4.10 NEFERMTEST 24.....	53
4.11 GRAMOVO BARVENÍ.....	53
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>54</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>55</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>57</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>58</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>59</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>60</b>



## ÚVOD

Bakterie se vyskytují všude kolem nás a pro člověka mohou být jak škodlivé, tak přínosné. Rozluštění jejich schopností nás vede k pochopení přirozených procesů a tím k jejich efektivnějšímu využití bez negativních vlivů na člověka a prostředí

V rámci nedokončené diplomové práce Bc. Milana Pekárka byly provedeny testy na kulturách označených jako 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A, které byly izolovány ze vzorků stojatých a tekoucích vod. Tyto bakterie mají schopnost růst na fenolu – a také jej degradovat. Taková schopnost má využití při odstraňování fenolu z prostředí, přesněji řečeno z vodního prostředí. Tato práce má za úkol zjištění dalších možností využití těchto bakterií, tedy zda jsou schopné degradovat i jiné uhlovodíkové polutanty kromě fenolu. Protože vodní prostředí, ve kterém by se tyto polutanty mohly vyskytovat, má často teplotu okolo 8 °C, jako například podzemní vody, byly této skutečnosti přizpůsobeny i prováděné testy degradace.

Také kvůli této teplotě se teoretická část zaměřuje na psychrofilní a psychrotrofní bakterie, jejich výskyt, význam a zvláštní uzpůsobení chladným podmínkám. Praktická část pak obsahuje metodiku testů a jejich výsledky. K testování degradace výše zmíněnými kulturami byly použity substráty: toluen, oktan, hexadekan, resorcinol, N-methyl 2-pyrrolidon, tetradekan, dodekan a dekan.

# I TEORETICKÁ ČÁST

## 1 RŮST BAKTERIÍ PŘI NÍZKÝCH TEPLOTÁCH

### 1.1 Psychrofilní a psychrotrofní bakterie

Farooq a kol. (2021) rozděluje chladnomilné bakterie do dvou prolínajících se skupin na základě jejich optimálního růstu v různých teplotních podmínkách: Psychrofilní bakterie mají optimální teplotu pro růst větší než 15°C a psychrotrofní bakterie mají optimální teplotu růstu vyšší než 20°C. Jak psychrofilní, tak psychrotrofní bakterie dokáží růst při teplotě 0°C, avšak psychrofilové oproti psychrotrofům nedovedou růst v teplotách vyšších než 20°C.

Podobně Dhakar a Pandey (2020) rozdělují mikroorganismy žijící v nízkých teplotách na „cold-tolerant“ (psychrotolerants) a/nebo „cold-loving“ (psychrophiles). Jsou to tedy dvě prolínající se skupiny, z nichž první dovede přežít a růst v nízkých teplotách a druhá ke svému růstu nízké teploty vyžaduje.

Psychrofilní i psychrotrofní bakterie lze zařadit do velké skupiny extremofilů. Tak se označují mikroorganismy, obývající stanoviště s nepříznivými podmínkami pro život. Extrémní fyzikální i geochemické podmínky zahrnují nízké i vysoké teploty (pod nulou, nebo více než 100°C), vysokou salinitu, vysoký tlak (Dhaulaniya a kol., 2018), ale i škodlivé záření, nedostatek živin, mrazivé podmínky. (Dhakar a Pandey, 2020)

Mikroorganismy žijící při nízkých teplotách jsou k nalezení například v Antarktidě, kde, jak zmiňují Aislabie, Foght a Saul (2000), jsou podmínky extrémní nejen kvůli nízkým teplotám, ale také kvůli suchu a větrnému podnebí.

Souhrnně lze tuto skupinu pojmenovat jako chladnomilné bakterie. Tuto skupinu tedy dělíme na psychrofilny a psychrotrofy.

#### 1.1.1 Výskyt chladnomilných bakterií

Naše planeta je přibližně ze 75 % pokryta chladnými prostředími. Ty se mohou navzájem od sebe velmi lišit. Jedná se totiž jak o vodní prostředí, tak i suchozemské. Prostředí s nízkými teplotami se nachází v polárních oblastech, ale jsou umístěna také v nepolárních oblastech ve vysokých polohách, nebo se jedná o prostředí v hloubce oceánů. Teplota těchto míst se pohybuje pod 5°C a svojí plochou tvoří významný podíl naší biosféry. Mimoto samotné ledovce a sněhové příkrývky pokrývají plochu přibližně 10 % zemského povrchu. (Farooq a kol., 2021)

Hu a kol. (2015) odhaduje 25 % pevninského povrchu Země jako věčně zamrzlou půdu – tedy permafrost. To znamená, že teploty jsou dlouhodobě pod bodem mrazu, ale minimálně 2 roky nepřetržitě. Půda může být promrzlá až 1500 metrů do hloubky a zmrzlé těleso může v sobě uchovávat látky a plyny po velmi dlouhou dobu. Ty se při rozmrznutí mohou uvolňovat do ovzduší. Permafrost se nachází na území Kanady, Ruska a Číny vyjádřeno od nejrozlehlejšího podílu v tomto pořadí.

Před počátkem průzkumů těchto zmrzlých oblastí existoval názor, že zde nemohou dlouhodobě přežít žádné formy života, avšak pozdější výzkumy tyto domněnky vyvrátily. Mikroorganismy jsou schopné se adaptovat a dokonce i aktivně žít v těchto extrémních podmínkách permafrostu. Navíc, při současném oteplování je pozorováno tání permafrostu a v budoucnu uvidíme, jestli a jak si s touto změnou chladnomilné mikroorganismy poradí.

V Čínském permafrostu bylo detekováno až  $10^{10}$  mikrobiálních buněk/g. V různých oblastech permafrostu se může tento počet velmi lišit.

Obecně bakterie izolované v čínském permafrostu spadají do šesti velkých bakteriálních skupin: *Actinobacteria*, *Firmicutes*,  $\alpha$ -*Proteobacteria*,  $\beta$ -*Proteobacteria*,  $\gamma$ -*Proteobacteria* a skupina *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB)

Vzorky byly odebrány z následujících lokací: horský průsmyk Kunlun, oblast hraničící s ledovcem Zhadang, Tuotuohe, povodí řeky Beilu, výzkumná stanice permafrostu u řeky Beilu, mokřady Zoige, hora Everest, uhelná pánev Wuli, oblast Mo-He, pohoří Qilian, pohoří Tianshan. Nadmořská výška těchto lokací se pohybovala od 2905 m.n.m. do 6550 m.n.m.

Skoro všechny izolované bakterie z čínského permafrostu jsou aerobní heterotrofové (Hu a kol., 2015)

Shivaji, Chattopadhyay a Reddy (2019) shrnují výzkumy v oblastech Antarktidy, Arktidy a Himalájí. Zatímco na Himalájích a v Arktidě byly studovány vzorky půdy, ledu, vody a sedimentů, v Antarktidě byly navíc studovány i vzorky mořského ledu, příbřežního ledu (fast-ice), sedimentů, vzorky z vrstvy sinic, jezerní vody zpod ledovců, vzduchu a dalších prostředí.

V těchto třech oblastech byl nejvyšší počet buněk nalezen v půdě, dále v sedimentech, vodě a ledu. Počet bakteriálních buněk, zjištěný kultivačními metodami dle počtu kolonií, byl nejvyšší v Himalájských regionech: od  $4,2 \cdot 10^7$  do  $30,7 \cdot 10^8$  CFU/g půdy. Naopak nejnižší počty byly zaznamenány v Arktidě: od  $5,2 \cdot 10^4$  do  $2,5 \cdot 10^5$  CFU/g půdy.

Autoři také zjistili, že počty buněk v různých typech vzorků v Antarktidě mají velké rozpětí. Ve vzorcích ledu se pohybují od  $0,2 \cdot 10^2$  do  $0,6 \cdot 10^{12}$  buněk/g ledu. Podobně byl nalezen značný rozsah od  $0,2 \cdot 10^2$  do  $10^7$  buněk/ml vody a  $10^5$  až  $10^{10}$  buněk/g půdy. Oproti tomu byl zjištěn malý rozsah v sedimentech, kde bylo detekováno  $8 \cdot 10^6$  až  $2,4 \cdot 10^7$  buněk/g sedimentu. Vyšší čísla mohou poukazovat na transport bakteriálních buněk společně s částicemi prachu a mořským aerosolem na pevninu.

V Arktidě byly zaznamenány velmi podobné počty jako na Antarktidě:  $1,2 \cdot 10^7$  až  $2,3 \cdot 10^7$  buněk/g sedimentu,  $5,2 \cdot 10^4$  až  $1,7 \cdot 10^9$  buněk/g permafrostu,  $0,9 \cdot 10^3$  až  $2,4 \cdot 10^6$  buněk/ml ledu a  $5 \cdot 10^5$  buněk/ml vody.

V Himalájských ledovcích byly celkové počty bakteriálních buněk v případě vzorků vody nižší:  $1,1 \cdot 10^4$  až  $2,5 \cdot 10^5$  buněk/ml, v sedimentu od  $0,9 \cdot 10^7$  do  $30,7 \cdot 10^8$  buněk/g sedimentu.

Nejčastěji vyskytující se bakterie patřily do skupin *Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, a *Firmicutes*. Méně obvyklí byli zástupci náležející do skupin *Deinococcus-Thermus* a *Spirochaetes*. Členové podskupiny *Epsilonproteobacteria* nebyli přítomni.

Zároveň byly popsány nové druhy bakterií z oblastí Antarktidy, Arktidy, Himalájského ledovce i ze stratosféry, dohromady 253 nových druhů.

### 1.1.2 Praktický význam chladnomilných bakterií

#### Chladnomilné mikroorganismy jako zdroje antibiotik

Podle Núñez-Monterové a Barrientosové (2018) se lidstvo v současné době potýká s problémem rezistence bakterií proti antibiotikům. Šance na nalezení nových biologicky aktivních látek z různých známých zdrojů se dramaticky zmenšila. Dosud neobjevená a unikátní prostředí se proto stala prostředkem k nalezení nových antimikrobních metabolitů z bakterií. Kvůli extrémním podmínkám prostředí polárních oblastí byly antarktické bakterie zhodnoceny jako potenciální zdroj pro nové antimikrobní složky. Review popisuje, jak různé bakteriální adaptace na extrémní antarktické podmínky vedou ke schopnosti produkovat tyto složky.

Průzkum nových, neprozkoumaných oblastí a neobvyklých prostředí se proto stal důležitým pro objevování nových bakteriálních antimikrobních metabolitů. Extrémní prostředí ještě stále slibují zdroje antibakteriálních sloučenin. Bakterie žijící za těchto podmínek ukazují neobvyklé strategie přežití, jako například antagonistické aktivity, které omezují přítomnost konkurenčních mikroorganismů.

Antarktické mikroorganismy a ostatní extremofilové mohli vyvinout fyziologicky unikátní vlastnosti včetně chemicky komplexních biosyntetizovaných metabolitů zajišťujících jejich přežití ve složitých prostředích. Navíc sekvenování jejich genomu odhalilo, že mikroorganismy s dlouhými genomy obvykle osidlují složitá nehostinná prostředí, a mají tak kapacitu k produkci asi desetinásobku metabolitů než bylo dříve předpokládáno.

Núñez-Monterová a Barrientosová (2018) shrnují nálezy z výzkumu antarktických bakterií produkující antimikrobní sloučeniny proto, aby zdůraznily důležitost antarktického ekosystému jako slibného zdroje pro nalezení nových antibiotik.

Antarktida je známá jako nejchladnější, nejsušší, největrnější a nejvíce nepřístupný kontinent na Zemi. V zimě dosahují teploty na jižním pólu minima od  $-80$  do  $-90^{\circ}\text{C}$  ve vnitrozemí, zatímco maxima nastávají od  $5$  do  $15^{\circ}\text{C}$  v blízkosti oceánu v létě.

Mikroorganismy byly detekovány ve všech typech prostředí včetně jezer, řek, potoků, skal a půdy. Nejčastěji byla nalezena v antarktické půdě skupina *Proteobacteria*. Studie, které se zaměřily na mikrobiální různorodost v antarktických půdách, označily *Proteobacteria* a *Actinobacteria* jako nejvíce zastoupený kmen, zatímco kmene *Cyanobacteria* a *Firmicutes* byly taktéž běžné, ale ne tak časté. Protože *Firmicutes* zahrnují několik sporotvorných rodů, je možné předpokládat, že tato bakteriální skupina je převládající v tuhém antarktickém prostředí, protože dokáže přežít těžké podmínky v dlouhých časových obdobích. Sekvenování genů pro 16S rRNA a následné analýzy odhalily, že anaerobní sporoformní zástupci skupiny *Firmicutes* se ukázaly být nejhojnější skupinou v rhizosféře antarktických cévnatých rostlin.

I když antarktické bakterie rostou při nízkých teplotách a přežijí silný mráz, optimální růstová teplota pro většinu z nich má rozsah mezi  $4^{\circ}\text{C}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ . Z toho plyne, že antarktické bakterie zahrnují psychrotrofní a psychrofilní organismy.

Bakterie s antimikrobní aktivitou byly izolovány z různých antarktických stanovišť, především z půdy a mořské vody.

Mikroorganismy potřebují vyvinout různorodé strategie pro přežití polárních podmínek, jako je nedostatek substrátu, vysoká intenzita UV záření, trvale nízké teploty a krátkodobé intenzivní horko během antarktického léta. Tyto složité podmínky představují rozmanité výzvy pro život bakterií, zahrnující sníženou enzymovou aktivitu, sníženou tekutost membrán, změněný transport živin a odpadních produktů přes cytoplasmatickou membránu a buněčnou stěnu, dále sníženou rychlost transkripce, translace a buněčného dělení,

chlادovou denaturaci bílkovin, nevhodné sbalení bílkovin a vnitrobuněčné formování ledových krystalků.

Důkazy z pokusů ukázaly produkci širokého spektra antimikrobních sloučenin antarktickými bakteriemi ze skupiny *Actinobacteria* hlavně při nižších teplotách. Toto chování a genetické důkazy podporují předpoklady, že antarktické bakterie používají antimikrobní sloučeniny z důvodu soupeření o živiny a o místo k životu v chladném prostředí

Bakterie izolované z antarktického prostředí jsou tedy neprozkoumaným zdrojem nových antimikrobních sloučenin, které mohou být v budoucnu výhodně aplikované v potravinách, při ochraně zdraví a v průmyslu.

### **Psychrotrofní mikroorganismy v potravinách skladovaných v chladu**

Psychrotrofní organismy mají schopnost se množit i za podmínek nízké teploty, což je velmi nevýhodné v případě mražených a chlazených potravin. Psychrotrofní organismy mohou produkovat termostabilní lipázy a proteázy v chlazených potravinách. Negativně tak ovlivňují kvalitu, chuť a vůni potravin (Wei a kol., 2019).

Wei a kol.(2019) se soustředí na metody rychlé detekce a kontrolu množení psychrotrofních organismů.

Vysoká poptávka po potravinách je uspokojována i díky rozvoji mrazicích a chladicích technik. Potraviny musí být uloženy a přepravovány v podmínkách, které zabraňují množení mikroorganismů. Psychrotrofní a psychrofilní (chladnomilné mikroorganismy) se mohou množit i v teplotách nižších než 5°C. Většinou tedy nízké teploty znehodnocení potravin nezabrání, ale pouze jej omezí.

Existuje několik skupin mikroorganismů, které mohou být přítomné v chladicích zařízeních, jako například bakterie, plísňe a kvasinky. Nízké teploty jsou sice schopny potlačit růst většiny zástupců, avšak až na psychrotrofní organismy, které částečně rostou v těchto podmínkách.

Nebezpečí růstu mikroorganismů v mražených potravinách spočívá v jimi vylučovaných enzymech, jako jsou lipázy a proteázy. Ty mají za následek snížení kvality masa, mořských plodů, ovoce, mléka a mléčných výrobků. Termostabilní proteázy hydrolyzují mléčné bílkoviny a způsobují neobvyklou chuť a zápach. Kromě snížení kvality potravin mohou mikroorganismy zapříčinit některé neduhy, nemoci: *Escherichia coli* má schopnost

způsobit střevní onemocnění, *Listeria* nese nebezpečí meningitidy a *Salmonella* způsobuje horečku, zvracení a průjem.

Tabulka 1 Běžné psychrotrofní bakterie a jejich přidružená onemocnění (Wei a kol., 2019)

Skupina	Rod bakterie	Zdroj	Onemocnění
Grampozitivní	<i>Bacillus</i>	Rýže, nudle, zelenina, mléko a mléčné výrobky, maso a masné produkty	Zvracení a průjem
Gramnegativní	<i>Streptococcus</i>	Ryby, mléko	meningoencefalitida
	<i>Clostridium</i>	Půda, sladká i slaná voda	Nozokomiální průjem a pseudomembranózní kolitida
	<i>Listeria</i>	Mléko a mléčné výrobky	Horečka, sepse hlavy, meningitida
	<i>Paenibacillus</i>	Syrové mléko a pasterizované mléko	Průjem
	<i>Lactobacillus</i>	Sýr	Horečka, průjem
	<i>Pseudomonas</i>	Potraviny	Sepse, septický šok a intravaskulární koagulace
	<i>Shewanella</i>	Chlazené maso a ryby	Zvracení, průjem
	<i>Alcaligenes</i>	Půda, voda, odpadní voda	Rezistentní vůči běžným antibiotikům a blízce příbuzným s nozokomiálními infekcemi
	<i>Chromobacterium</i>	Půda a voda	Nekrotizující pneumonie
	<i>Yersinia</i>	Drůbež, divoká zvěř, žáby	Průjem, gastroenteritida
	<i>Salmonella</i>	Maso, drůbež, vejce	Horečka, zvracení, průjem
	<i>Aeromonas</i>	Mořské plody	Gastroenteritida, infekce ran a měkkých tkání, svalové infekce, septikémie a kožní onemocnění



Růst mikroorganismů lze omezit několika způsoby. Přídavek CO<sub>2</sub> do ochranné atmosféry balení působí jako antimikrobní činidlo. Prodlužuje čas potřebný pro množení a růst mikroorganismů. Plynný dusík inhibuje růst aerobních mikroorganismů.

Principem sterilizace ionizujícím zářením je způsobení poškození DNA, pigmentů, mastných kyselin a membránových lipidů. Záření je efektivní formou pro zneškodňování bakterií, jako je například *E. coli*, *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus* ve výrobcích s drůbežím masem. Jenomže použití záření může ovlivnit chemickou a sensorickou kvalitu potravin, obzvláště ve vyšších dávkách.

Jako bezpečná a efektivní alternativa k tepelné úpravě se jeví úprava potravin vysokým tlakem. Ta zlepšuje skladovatelnost potravin a má vliv na přítomnost mikroorganismů.

Úpravou potravin pod vysokým tlakem je myšleno jejich vystavení tlaku mezi 300 a 600 MPa při teplotách pod 60 °C. Pod vysokým tlakem může být strukturální integrita buněk zničena, což je hlavní faktor vedoucí k inaktivaci mikroorganismů. Navíc ve srovnání s tepelnou pasterizací mléka je vysokotlaká sterilizace šetrnější k zachování chuti a živin. Tedy úprava vysokým tlakem má slibnou budoucnost při minimalizaci přítomnosti psychrotrofních mikroorganismů.

K dezinfekci jsou široce používány chemické látky, ale také látky přírodního původu mají své výhody nízkých nákladů, dobré biokompability a žádného rizika barvení potravin. Například látky jako chitin a chitosan jsou představiteli přírodních antibakteriálních činidel. Mohou zasahovat do bakteriálního metabolismu elektrostatickými reakcemi na povrchu buněk a také mohou být absorbovány molekulou DNA a blokovat tak proces transkripce. Pomocí chitosanu je možné redukovat růst bakterií v průběhu 12 dní při teplotě 4°C. Použití dalších přírodních přísad pro kontrolu nad psychrotrofními bakteriemi může mít potenciál a může být objeveno ještě mnoho takových přírodních aditiv.

Pro efektivnější kontrolu nad růstem mikroorganismů je potřeba mít vhodné způsoby jejich detekce. Bylo popsáno několik metod pro detekci mikroorganismů včetně psychrofilních bakterií.

V metodě „Direct epi-fluorescent filter technique (DEFT)“ jsou cílové bakterie obarveny akridinovou oranží nebo 4',6-diamidino-2-phenylindolem a spočítány na polykarbonovém filtru za použití epi-fluorescenčního mikroskopu. Pomocí této metody byly např. pozorovány bakterie rodu *Lactobacillus* a *Salmonella*. Metoda DEFT má mezi rychlými metodami lepší výkon než konvenční kultivační metody.

Metoda průtokové cytometrie je založena na obarvení buněk fluorescenčním barvivem, které následně v tekutině protékají jednotlivě skrze elektronické detekční zařízení. To je zodpovědné za spočítání jednotlivých buněk. Pomocí metody průtokové cytometrie lze dobře detekovat psychrotrofní mikroorganismy. Jako příklad může sloužit detekce buněk *Bacillus cereus* v uvařené rýži, skladované při 10°C po 6 dnů za použití metody průtokové cytometrie. Výsledek byl  $10^6$  detekovaných CFU/g.

„Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)“: Metoda qPCR je často používána pro detekci a kvantifikaci mikroorganismů. qPCR používá molekulární oligonukleotidové sondy spojené s fluorescenčním molekulárním nebo chemickým barvivem pro barvení PCR produktů. Někteří výzkumníci také použili metodu qPCR pro detekci psychrotrofních bakterií, a zjistili, že detekční limit pro bakterie rodu *Paenibacillus* v syrovém mléce je  $3,25 \cdot 10^1$  CFU/ml a pro *Listeria monocytogenes* ve vzorcích kontaminovaného mléka je limit  $1,58 \cdot 10^3$  CFU/ml.

Metoda PCR může být spojena s metodou ELISA pro dosažení detekce bakterií v potravinách. Tento komplex je mnohem citlivější než PCR testování samotné, čehož může být použito pro zjištění přítomnosti *Legionella pneumophila* ve vodě a *Listeria monocytogenes* v potravinách. PCR-ELISA se ukazuje být cenným nástrojem pro citlivou detekci bakterií v potravinářském průmyslu.

Fluorescenční in situ hybridizace v sobě spojuje jednoduchost mikroskopického pozorování a specifčnost hybridizace DNA. Fluorescenčně označené oligonukleotidy jsou použity jako sondy, které jsou pak specificky poutány na cílovou sekvenci chromozomu nebo na část DNA. Kvalitativní a kvantitativní analýza specifické sekvence nukleotidu může být provedena detekcí fluorescenčního signálu. K selektivní analýze *Pseudomonas* v mléce byla provedena vícebarevná fluorescenční in situ hybridizace. Proběhla v rámci 7 hodin s detekčním limitem  $2 \cdot 10^3$  CFU/ml.

„Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE)“ Gelová elektroforéza v teplotním gradientu rozděluje a rozeznává jemnost různých fragmentů DNA. Tento přístup typicky zahrnuje extrakci nukleových kyselin (DNA nebo RNA) ze vzorku, amplifikací genu, kódujícího 16S rRNA a následnou analýzu PCR produktů za použití různých genetických metod. Metoda TTGE se dá také použít pro psychrotrofní organismy. Byla založena specifická databáze jednotlivých dat pro každý rod, kde jsou zahrnuty kmeny rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Použití této metody tedy vyžaduje širokou databázi.

Metoda elektrické impedance určuje mikrobiální obsah vzorku díky měření změny elektrické charakteristiky média (mléka), způsobené mikrobiálním metabolismem. Jelikož metabolismus bakterií v mléku způsobuje změny impedance na rozhraní mezi mlékem a elektrodou, je možné použít senzor impedance pro měření koncentrace *E. coli* v mléku, dokonce i při počáteční koncentraci tak nízké, jako je 7 buněk/ml. Tato metoda je spolehlivá pro detekci počtu mikrobů v potravinách skladovaných v chladu.

Také Yuan a kol. (2019) se zabývají výskytem a detekcí psychrofilních bakterií v syrovém mléku. Uskladnění syrového mléka v lednici je sice rozšířeným způsobem, jak zamezit růstu mesofilních a termofilních bakterií, jenomže tento způsob zároveň poskytuje ideální podmínky pro růst psychrotrofních bakterií. Psychrotrofní bakterie vyskytující se v syrovém mléku zahrnují gramnegativní bakterie rodu *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Hafnia* a grampozitivní bakterie rodu *Bacillus*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* a *Carnobacterium* a další, které ještě nebyly prozkoumány.

Potravinářský průmysl, přesněji řečeno mlékárenství, v současné době čelí technologickým problémům způsobeným hydrolytickými enzymy, které produkují psychrotrofní bakterie během skladování v chladu. Termotolerantní enzymy produkované těmito bakteriemi mohou přežít teplotní úpravu aplikovanou na většinu mléčných produktů a vyskytují se tedy v mléce při jeho skladování a transportu.

Pro uspokojení zvyšující se poptávky po mléčných výrobcích vysoké kvality musí být věnována velká pozornost různorodým procesům znehodnocujícím mléko kvůli psychrotrofním bakteriím a jejich negativnímu vlivu na kvalitu mléčných výrobků.

### **Faktory ovlivňující množství a různorodost psychrotrofních bakterií v syrovém mléku**

Množství psychrotrofních bakterií je užíváno jako biologický indikátor pro posouzení kvality syrového mléka. Množství přesahující  $1,3 \cdot 10^5$  CFU/ml je dostatečné, aby způsobilo zhoršení kvality syrového mléka v průběhu jeho uskladnění nebo transportu. Úroveň mikrobiální kontaminace v syrovém mléku jsou silně provázané s prostředím, množstvím mikrobů ve vodě používané pro napájení a pro čištění, dále potravou zvířat a celkovou hygienou vybavení a hygienou procesu dojení mléka.

Dobrá hygiena je rozhodující, ale záleží i na způsobu dojení. Bylo zjištěno, že v mléku získaném mechanickým dojením bylo nalezeno více bakterií než v mléku dojeném ručně. Je to způsobeno vznikem biofilmů na povrchu mechanických zařízení a následnou kontaminací čerstvě nadojeného mléka.

### **Metody pro identifikaci psychrotrofních bakterií v syrovém mléku**

Tradiční fenotypové metody pro bakteriální identifikaci jsou založeny na izolaci a růstu mikroorganismů na pevném substrátu a následném pozorování morfologických a biochemických charakteristik. Jenomže tyto přístupy vyžadují laboratorní kultivační proceduru a často jsou nedostatečné pro identifikaci bakterií. Komerční fenotypové metody byly tradičně používány pro určení bakterií. Nevýhody tohoto postupu zahrnují špatnou reprodukovatelnost, omezené záznamy v odpovídajících databázích a složité určení fenotypických variací mezi kmeny bakterií. Metoda označovaná MALDI (the matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry) umožňuje spolehlivé rozlišení psychrotrofních bakterií do rodu, druhu i kmene skrze porovnávání informací o proteinových profilech referenčních kmenů ve spektrální knihovně jednotlivých farem. Tato technika je drahá ale hodí se lépe k identifikaci gram-pozitivních bakterií a přesnost identifikace je ovlivněna podmínkami, ve kterých se kultura nachází.

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací je rychlá, nedestruktivní a vysoce citlivá technika pro identifikaci psychrotrofních bakterií na různých taxonomických úrovních. Absorbce a emise infračerveného světla buněčnými složkami jsou jedinečné pro každý kmen a může být tedy použit pro identifikaci. Jenomže tato technika je slabá pro identifikaci bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Pseudomonas*. Tyto různé metody spoléhají na izolaci a růst čistých bakteriálních kmenů, což je problematické, neboť jsou některé bakterie nekultivovatelné. Tyto problémy lze vyřešit použitím molekulárních identifikačních metod.

Molekulární metody byly použity pro identifikaci rozmanitých psychrotrofních bakterií v syrovém mléku. Výhody RAPD (random amplified polymorphic DNA – náhodně amplifikované polymorfni DNA) metod jsou ty, že jsou potřeba pouze malá množství DNA a není třeba žádná předchozí informace o DNA sekvencích. Na druhou stranu má tato metoda tu nevýhodu, že je málo reprodukovatelná a také jsou potřeba přísně standardizované podmínky. RAPD metody byly úspěšně použity pro zařazení bakteriální kmenů mléčného původu. Terminal restriction fragment length polymorphism (RFLP) je rychlá a přesná technika pro porovnání dočasných a prostorových změn v bakteriálních komunitách. Poskytuje relativní kvantifikaci bakterií v různorodém vzorku a je vhodný pro profilování vzorků obsahujících směs bakteriální komunity bez nutnosti předchozí kultivace.

## 1.2 Adaptace bakterií na nízké teploty

Naprostá většina druhů bakterií izolovaných z Antarktidy, Arktidy a stratosféry jsou psychrofilní. Psychrofilní bakterie jsou přizpůsobené životu v nízkých teplotách pomocí několika strategií, mezi které patří schopnost miniaturizace, schopnost fragmentace buněk, schopnost tvořit enzymy, které jsou aktivní i v chladu, a schopnost reagovat na změny v teplotě skrze změnu tekutosti membrány. Některé izolované bakterie mají schopnost anabolizovat i katabolizovat i při minusových teplotách. K adaptacím na chladné prostředí patří i tvorba pigmentů. 68 % nových druhů z Antarktidy jsou pigmentované, což značí, že je to na Antarktidě častá vlastnost bakterií. Pigmentace je známá jako jeden ze způsobů přizpůsobení pro stresové situace, mezi které řadíme i vystavení bakterii chladu. Další uzpůsobení bakterií se týká jejich membrán. Například psychrofilní bakterie z Himalájí, *Bacillus cecembensis*, obsahuje alkohol  $C_{16:1\omega 7c}$  v membráně, zatímco u jeho mesofilního protějšku tento alkohol chybí. Všechny psychrofilní bakterie mají v cytoplazmatické membráně převahu nenasycených mastných kyselin na rozdíl od jejich mesofilních protějšků. Také mají enzymy, které jsou aktivní v chladu a labilní v teple, a navíc další geny pro přežití v nízkých teplotách (Shivaji, Chattopadhyay a Reddy, 2019)

### 1.2.1 Enzymatická kinetika

Dhaulaniya a kol. (2018) shrnují také přizpůsobení psychrofilních bakterií chladu a v malé míře je i porovnávají s mesofilními a termofilními bakteriemi. Při bližším pohledu se bakteriální přizpůsobení chladu skládá ze změn v jednotlivých buněčných strukturách a buněčných procesech. Procesy spojené s enzymy jsou popsány Arrheniovou rovnicí, která se používá k definici rychlosti chemické reakce a ukazuje nepřímou úměru mezi rychlostí reakce ( $K$ ) a aktivační energií ( $E_a$ ) a přímou úměru mezi rychlostí reakce a termodynamickou teplotou ( $T$ )

$$K = A \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}} \quad (1)$$

Rychlost reakce obyčejného enzymu klesá k nule, když je reakce pozorována za teploty blízké  $0^\circ\text{C}$ . Možné důvody přispívající k tomuto poklesu reakční rychlosti mohou být změny v pH nebo pokles rychlosti difuze substrátu a produktu. Viskozita systému se také mnohonásobně zvyšuje při nižších teplotách. Zároveň se snižuje rychlosti difuze jak rozpuštěných látek stejně tak jejich rozpouštědel. Obecně enzymy ovlivňují rychlost reakce snížením aktivační energie, což dovoluje substrátům utvořit komplexy s enzymy. Z rovnice

(1) je jasné, že aktivační energie je závislá na teplotě. V důsledku toho následuje významné zvýšení potřebné kinetické energie pro překonání aktivační energetické bariéry. Tento nárůst potřebné aktivační energie nakonec zpomaluje reakční rychlost. Organismy přežívající v nízkých teplotách vyvinuly náhradní strategie pro překonání vlivu nízké teploty na jejich metabolismus. Tyto přizpůsobené strategie zahrnují zvýšení koncentrace enzymů a evoluci enzymů. Reakční rychlost enzymů je pak řízena pouze rychlostí difuze a na teplotě je tedy nezávislá.

Studie pomocí bodových mutací lipáz bakterie rodu *Bacillus* vysvětluje posun v optimální teplotě (25 °C) směrem k nižším hodnotám teplot (10 °C) a evoluci enzymů, které mají desetinásobně vyšší specifickou aktivitu, což znamená jejich maximální aktivitu i stabilitu v takto extrémně chladném prostředí. Psychrofilní enzymy optimalizují jejich katalytickou efektivitu ( $K_{cat}/K_m$ ) jak zvyšováním  $K_{cat}$  tak i snižováním  $K_m$  a někdy i vylepšováním  $K_{cat}$  na úkor  $K_m$ .

### 1.2.2 Strukturální stabilita enzymů

Při porovnání s jejich mezofilními protějšky, psychrofilové mají ve své enzymatické struktuře několik modifikací přispívajících k nižší strukturální stabilitě. Útlum různých interakcí včetně vodíkových vazeb, iontových vazeb, dipólových interakcí, aromatických interakcí a hydrofobních interakcí nese hlavní zodpovědnost za nízkou strukturální stabilitu. Přítomnost zbytků argininu v mesofilech a termofilech přispívá k formování velkého množství elektrostatických interakcí. Srovnávací přístup ukazuje nedostatek takových interakcí v psychrofilech, což může být jedním z faktorů vysvětlujících, že trend je nedostatek zbytků argininu. I když jsou vodíkové vazby relativně slabé interakce, velké množství těchto vazeb má za následek stabilitu trojrozměrné struktury proteinů. Účast aromatických interakcí v mesofilních enzymech přispívá k jejich vyšší stabilitě ve srovnání s jejich psychrofilními protějšky, které takové interakce nemají. Další důležitý faktor zodpovědný za vysokou stabilitu mesofilních enzymů je shlukování postranních řetězců v jádru proteinu.

### 1.2.3 Teplotní stabilita enzymů

Snížená teplotní stabilita byla pozorována skoro ve všech enzymech adaptovaných na chlad. Hlavní prvky, které jsou náchylné na teplotu, jsou aktivní centra přítomná v těchto enzymech. Mnoho enzymů vázaných i nevázaných na membránu, ukazuje velkou teplotní citlivost nejspíše kvůli poškození lipidové dvojvrstvy a s ní spojených bílkovin. Ty

bílkoviny, které jsou dobře přizpůsobeny nízkým teplotám, mohou být také restrukturalizovány při vyšších teplotách, a to i ty s nízkou molekulovou hmotností. Ve velkých enzymech, jako je například  $\alpha$ -amyláza z *Pseudoalteromonas haloplanktis* se ukazuje, že tato restrukturalizace se objevuje díky malým počtům interakcí zodpovědných za strukturální integritu.

Jiný důležitý fenomén, který je pozorován nejčastěji při teplotě pod  $T_{\max}$ , narušuje enzymovou strukturu a zasahuje do rychlosti reakce v nižší teplotě, je nízkoteplotní denaturace enzymů. Tyto změny ve struktuře bílkovin jsou dočasné nebo reverzibilní a jsou zodpovědné za ztrátu aktivity enzymů v nižších teplotách. Studená denaturace je výsledek rozrušení slabých hydrofobních interakcí, které zodpovídají za sbalení bílkovin v nízkých teplotách. Dalším jevem, pozorovaným při nízkoteplotní denaturaci, je hydratace nepolárních a polárních skupin, což jasně naznačuje, že psychofilní enzymy nebo enzymy přizpůsobené chladu musí být odolné nízkoteplotní denaturaci. Také to naznačuje, že hydrofobní interakce jsou méně významné v enzymech aktivních v chladu.

#### 1.2.4 Flexibilita enzymů

Strukturální a konformační vlastnosti, které poskytují pružnost enzymům psychrotrofních bakterií, jsou obecně protichůdné oproti jejich více stabilním a tužším termofilním a mesofilním protějškům. Různá přizpůsobení získaná evolucí psychrofilních enzymů zahrnují pokles hydrofobicity v aktivním centru enzymů a zároveň zvýšení hydrofobicity na povrchu, ve srovnání s termostabilními enzymy. Přítomnost slabších interakcí mezi podjednotkami a mezi doménami snižuje sílu sekundární struktury, vyvolává delší smyčky mezi slabšími elektrostatickými interakcemi a menší počet disulfidických můstků, to všechno dohromady přispívá k vyšší flexibilitě psychrofilních enzymů. Flexibilitu v těchto bílkovinách můžeme vnímat jako globální a lokální. Globální flexibilita je celkově konformační flexibilita, zatímco lokální flexibilita je omezena na různé části konkrétního proteinu. Také se předpokládá, že globální flexibilita může být zodpovědná za zvýšení aktivity a za nízkou stabilitu s rizikem zvýšení nesprávného sbalení bílkoviny. Na druhou stranu, lokální flexibilita byla vysvětlena studii ukazujícími, že tepelné rozbalování bílkovin začíná z těch nejvíce flexibilních částí, které jsou na koncích, na povrchu nebo v aktivním místě konkrétní bílkoviny.

### 1.2.5 Aktivita enzymů

Studie enzymů, které se vyskytují v extrémně chladných stanovištích, ukázaly molekulární modifikace, které tlumí nebo i ruší škodlivé následky nízkých teplot na specifické aktivity těchto enzymů. Uvážíme-li energetiku aktivity v chladu, nízké teploty mohou velmi zbrzdit rychlost reakce skrze nutné zvýšení volné aktivační energie.

Volná aktivační energie je překážkou mezi základním a přechodným stavem, a čím je nižší energetická bariéra, tím je vyšší výsledná rychlost reakce vyvolávající enzymatickou aktivitu. Podle teorie přechodného stavu se enzym setkává se substrátem, zformuje se tak ES komplex a padne do energetické jámy. Dále je nutno dosáhnout aktivovaného komplexu  $ES^\ddagger$ , který se následně rozpadne na enzym a produkt.



Pro snížení této energetické bariéry a kompenzaci určujícího efektu si enzymy přizpůsobené chladu vybudovaly několik strategií. Jde například o tendenci ke zvýšení jejich afinity k substrátu (vyjádřeno Michaelisovou konstantou  $K_m$ ) pro zrychlení reakce.

### 1.2.6 Souvislost mezi aktivitou, stabilitou a flexibilitou

Oproti termofilům, kteří jsou charakterizováni vysokou termostabilitou díky jejich nápadné molekulární tuhosti vedoucí k slabé specifické aktivitě, vykazují chladnomilné enzymy vysokou komplementaritu při nízkých energetických výdajích díky vysoce flexibilní struktuře a tedy výsledně ve vysokou specifickou aktivitu. Propojení aktivity, stability a flexibility znamená, že každé navýšení enzymové aktivity je doprovázeno poklesem enzymové stability. Tento předpoklad je založen na termofilních homologních enzýmech, které mají malou aktivitu při venkovní teplotě, zatímco chladnomilné enzymy vykazují vysokou vnitřní aktivitu spojenou s navýšením termické nestability. Výzkumy ukazují, že některé prvky enzymu strukturně ovlivňují stabilitu proteinu, zatímco jiné oblasti zlepšují flexibilitu a tím optimalizují katalytickou efektivitu. Dohady mají základ v pozorování zvýšené tuhosti shluků molekul. Ta je způsobena zvýšeným počtem aromatických interakcí, disulfidických a solných můstků, a zvýšením afinity enzymu k vápenatým iontům. Vápenatý ligand je zodpovědný za ochranu proti tepelné denaturaci. Kooperativní podpora specifické aktivity a celkové aktivity byla také pozorována při srovnání s mesofilním subtilisinem, ukazujícím fakt, že termostabilita není nepřímo úměrná specifické aktivitě. V jiné studii enzym z *Pseudomonas mandelii*, nazvaný esteráza EstK, dokazuje výměnu stability a flexibility.



Mutace v bílkovinách, které vytváří rovnováhu mezi flexibilitou lokálního aktivního místa a celkovou tuhostí, jsou považovány za adaptivní, když zvýší jak enzymovou aktivitu, tak i termální stabilitu.

### 1.2.7 Tekutost membrány

Strukturální integrita membrán je závislá na jejich tekutosti. Fyzikální vlastnosti membrán jsou založené na složení lipidů a nízká teplota tak má na membrány nepříznivý vliv. Vyvolává totiž tuhnutí membrán, což má za následek ztrátu funkčnosti. Nižší růstové teploty usnadňují bakteriím tvorbu acylových řetězců s kratší délkou, s methylovanými rozvětvenými mastnými kyselinami a zajišťují vyšší obsah nenasycených mastných kyselin. Složení takto přizpůsobených membrán zvyšuje jejich tekutost zavedením sterického omezení, které zmenšuje množství interakcí. Jiná uzpůsobení, která potencionálně zvyšují tekutost membrány, zahrnují zvýšení obsahu koncových skupin lipidů a bílkovin.

Porovnávací analýza membránových bílkovin z psychofilů a mesofilů odhalila rozdíly v zastoupení aminokyselin v bílkovinách psychofilů. Jeden významný nálezní studie ukázal zvýšení množství isoleucinu v částech sekvence bílkovin, které jsou umístěny na vnější straně membránové dvojvrstvy. Vlivem hydrofobních a helix destabilizujících vlastností isoleucinu tak může dojít ke snížení stability a zvýšení flexibility. Studie také ukázaly trend ve snižování množství alaninu v membránových bílkovinách. Následkem je méně formací helixů a tím i snížení stability.

### 1.2.8 Bílkoviny vázající led

Bílkoviny vázající led, stejně jako nukleační bílkoviny a protimrazové bílkoviny, existují v několika organismech včetně bakterií, hmyzu, hub, rostlin a kvasinek. Protimrazové bílkoviny se váží k malým krystalkům ledu a předchází tak další krystalizaci a růstu ledového krystalu, který by jinak mohl ohrozit život buňky. Tyto polypeptidové řetězce se absorbují do rozpínajícího se ledu a tím omezují jejich růst na oblast mezi dvěma absorbovanými řetězci. Protimrazové bílkoviny, které se vážou na ledové krystalky, vlastně nezpomalují růst ledu, ale místo toho limitují růst na zvládnutelnou velikost, na delší dobu mezi bodem tání a bodem mrznutí. Rozdíl mezi těmito dvěma teplotami se nazývá termální hystereze, která inhibuje růst ledových krystalků. Oproti protimrazovým bílkovinám, ledové nukleační bílkoviny fungují tak, že vyvolávají nukleaci malých krystalků ledu jako prevenci proti tvorbě větších krystalů ledu. Je to řízená tvorba ledových krystalků tam, kde

neohrožují život buňky. Tyto bílkoviny pomáhají při nukleaci ledových krystalů ve teplotě pod nulou (-2 až -10 °C).

První protimrazový protein byl objeven v buňkách *Micrococcus cryophilus* a *Rhodococcus erythropolis*. Od té doby bylo provedeno mnoho průzkumů a izolací, charakterizací a identifikací různých bílkovin vázajících led. Obvykle je bílkovina vázající led malá a rozpustná, ale v nových studiích bílkovin z antarktické bakterie *Marinomonas primorynesis* byla nalezena extrémně dlouhá bílkovina zahrnující 5 různých domén, ze kterých pouze 4 domény byly zodpovědné za protimrazovou aktivitu. To může naznačovat, že tato bílkovina by mohla mít také podíl ještě na jiné funkci pro tuto bakterii. Jiné protimrazové bílkoviny z *Marinomonas primorynesis* ukázaly, že dovedou společnými silami způsobit posun bodu mrazu, který činí pokles i přes 2 °C.

### 1.2.9 Alfa-amylázy

$\alpha$ -Amylázy jsou dlouhodobě známé jako nejlepší model pro studování chladnomilných přizpůsobení enzymů. Tyto enzymy mají významnou roli v průmyslových využitích a tvoří přibližně 25 % celkového obchodu s průmyslovými enzymy. Důkladná porovnávací strukturní studie  $\alpha$ -amylázy z *Alteromonas haloplanktis* s lidskou  $\alpha$ -amylázou poskytla porozumění chladnomilným přizpůsobením na molekulární úrovni. Variace smyček tohoto konkrétního enzymu vysvětlují chladové přizpůsobení podporující určitou rovnováhu mezi aktivitou, stabilitou a flexibilitou a také představují faktory zodpovědné za enzymovou specificitu. Biochemická charakterizace a molekulární klonování  $\alpha$ -amylázy, izolované z chladnomilné bakterie *Exiguobacterium sp.* SH3, ukázalo i další halotolerantní schopnost při nízké teplotě. Aktivita enzymu byla stimulovaná na 103 % při koncentraci soli až 5M NaCl a při teplotě 0 °C bylo zachováno 41 % aktivity. Navíc enzym byl shledán stabilním proti denaturaci jak dodecylsulfátem sodným (SDS), tak acetonem, EDTA nebo alkoholem. V jiné studii byla nová  $\alpha$ -amyláza s optimální aktivitou při 20 °C a pH 5. Byla izolována a charakterizována z psychofilní bakterie *Bifidobacterium longum*. Průlom v jejich studii odhalil, že byl enzym schopen produkce tzv. pomalu stravitelného škrobu, když využíval běžný škrob jako substrát, což ukazuje potenciální aplikaci v potravinářském průmyslu.

Studie mutací  $\alpha$ -amylázy z psychofilní antarktické bakterie *Pseudoalteromonas haloplanktis* úspěšně odhalila faktory zodpovědné za kineticky a termálně řízenou stabilitu, kinetiku, bílkovinné sbalení a termální denaturaci enzymu. Na druhou stranu, chladově přizpůsobená  $\alpha$ -amyláza izolovaná z antarktické bakterie *Arthrobacter agilis* byla klonována a exprimována v různých organismech a ukázala optimální aktivitu při 30 °C,

dokonce při současném zachování vysoké aktivity v širokém rozmezí teplot 30-60 °C, na rozdíl od jiných, chladu přizpůsobených enzymů.

### 1.2.10 Esteráza

Od potravinářského průmyslu až po environmentální biotechnologii a zdravotní průmysl jsou esterázy považovány za důležité enzymy pro jejich roli v různých odvětvích. Byly provedeny různé pokusy a úspěšně prokázaly esterázy jako dokonalý model pro studium enzymů chladových přizpůsobení na molekulární úrovni. Dále byla zkoumána role aromatických zbytků přítomných v aktivním centru esterázy EstSP1 z bakterie *Sphingomonas glacialis*. Bodová mutace Tyr191 na Trp, His, Ala a Phe ukázala redukovanou konformační flexibilitu a katalytickou aktivitu enzymu při nižších teplotách na úkor zvýšené stability, což poukazuje na roli této aromatické aminokyseliny v chladovém přizpůsobení enzymu EstSP1.

Porovnávací studie molekulární dynamiky čtyř esteráz, izolovaných z bakterií přežívajících v teplotách od 10 do 70 °C, ukázaly vliv různých teplot na aktivitu a substrátovou specifitu těchto enzymů. Teplotní optimum enzymu EstS z psychrofilní bakterie *S. halifaxensis* bylo zjištěno okolo teploty 25 °C a její aktivita se snižuje tím víc, čím je teplota vyšší, což ukazuje na psychrofilní povahu enzymu. Podobně charakterizace a klonování chladu přizpůsobené esterázy AstPc z psychrotrofní bakterie *Psychrobacter cryohalolentis* K5<sup>T</sup> odhalilo její maximální aktivitu na teplotě 35 °C a při pH 8,5, nicméně testy v jiných teplotách také odhalily zachování 90 % její maximální aktivity při teplotě mezi 0 až 5 °C. Další nově popsaná a chladu adaptovaná esteráza z mořské psychrofilní bakterie druhu *Thalassospira* byla také charakterizována. Jde o dipeptid a její strukturální analýza v porovnání s termofilními protějšky, jako například z druhů *Pyrobaculum calidifontis* a *Sulfolobus tokodaii*, vysvětlilo chladové adaptace v chování nového enzymu odhalením přítomnosti vyššího obsahu methioninu a nižšího počtu vodíkových vazeb a iontových párů, což zodpovídá za vyšší flexibilitu v nižší teplotě.

### 1.2.11 Lipázy

Mikrobiální lipázy aktivní v chladu jsou další třída enzymů s určitým vyvážením aktivity, flexibility a stability. Proto tato skupina přitahovala pozornost výzkumníků v minulých desetiletích, pro lepší porozumění molekulárních přizpůsobení mikroorganismů pro chladné teploty. Několik lipáz schopných aktivity v chladných podmínkách již bylo identifikováno a charakterizováno pro jejich potenciální využití v různých průmyslových odvětvích.

Interakce lipopolysacharidů s hydrolázami lipidů zde představují hlavní výzvu pro purifikaci bakteriálních lipáz aktivních za chladu. Několik optimalizačních postupů však již bylo vyvinuto pro získání takových lipáz v purifikované formě. Další výsledky přinesly i molekulárně biologické studie, které např. ukázaly, že genem identifikovaným v *Psychrobacter* sp. jsou kódovány dvě rozdílné lipázy, ty byly klonovány a exprimovány pro podrobné studium jejich struktury.

Podrobná studie extracelulární lipázy bakterie *Pseudoalteromonas* sp. NJ70 izolované z antarktického mořského ledu ukázala specifickou vlastnost: 31 % uchování aktivity při teplotě pod 0 °C a nulový efekt oxidantu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na její enzymovou aktivitu. Také při strukturální studii lipázy, aktivní v chladu, z psychrofilní bakterie *Pseudomonas* sp., byly odhaleny zajímavé výsledky. Ty ukázaly, že N konec katalytické oblasti byl více zodpovědný za jeho stabilitu při teplotě 0-5 °C než nekatalytický C konec.

## 2 BIODEGRADACE UHLOVODÍKŮ

Antarktické bakterie dovedou růst na organických polutantech i při nízké teplotě, což dokazuje jejich schopnost vyrovnat se a adaptovat na přítomnost polutantů i v prostředí mírně zasaženém antropogenními vlivy. Porozumění biodegradačním procesům bakterií obývajících prostředí s nízkými teplotami může být prospěšné k porozumění roli, kterou bakterie hrají v ekosystémech a také například k vylepšení možností bioremediace chráněných území, kam se nesmí zavléct cizí organismus. (Lo Giudice a Fani, 2015)

Také Aislabie, Foght a Saul (2000) uvádí, že již dříve bylo z antarktických půd izolováno množství bakterií degradujících alkany. Díky tomu byla charakterizována jejich schopnost degradovat aromatické a alifatické uhlovodíky z kontaminované půdy v Antarktidě. Také byla popsána jejich schopnost růstu v daném rozsahu teplot.

Všechny takto izolované vzorky byly gramnegativní, oxidáza pozitivní, tyčinkovité bakterie. Reprezentativní kmeny byly identifikovány jako bakterie rodu *Sphingomonas* nebo *Pseudomonas*. Bakterie degradující aromatické uhlovodíky z antarktické půdy byly psychrotolerantní.

Existuje několik studií zabývajících se mikrobiální degradací paliva v půdách Antarktidy, ve kterých byly detekovány mikroby degradující uhlovodíky. Předpokládá se, že právě bakterie, nikoliv plísně, jsou hlavními kolonizátory těchto půd kontaminovaných palivem.

Podle Margesinové, Moertelmaiera a Maira (2012) se základem pro degradaci uhlovodíkových polutantů staly půdní mikroorganismy, u nichž je tato schopnost častá. Díky tomuto jevu bylo možné rozšířit technologie pro bioremediaci a degradaci uhlovodíkových polutantů, kterých se v přírodě nachází celá řada, od lineárních alkanů, cyklických alkanů až po monoaromatické a polyaromatické sloučeniny. Jejich dostupnost pro mikroorganismy závisí na rozpustnosti, na kterou má vliv délka jejich řetězce. Krátké řetězce mohou být pro mikroorganismy toxické, ale dlouhé řetězce jsou zase málo rozpustné ve vodě a tím i méně dostupné mikroorganismům. Degradace alkanů je i ovlivněna dalšími faktory, jako je teplota, pH, vlastnosti prostředí a přítomnost dalších polutantů.

Bakterie ke svému růstu vyžadují zdroj energie, a jestliže dovedou jako svůj jediný zdroj energie použít uhlovodík, jsou velmi vhodnými přírodními degradéry uhlovodíkových polutantů. Intenzitu degradace ovlivňuje množství dalších vlivů, mezi které patří množství dostupných živin, kyslíku, hodnota pH, složení prostředí, koncentrace a biodostupnost.

Teplota ovlivňuje bakteriální metabolismus stejně jako rozpustnost a těkavost některých uhlovodíků.

## 2.1 Bakteriální degradace monoaromatických uhlovodíků

Aislabie, Foght a Saul (2000) se věnovali izolaci a popisu bakterií schopných degradace aromatických uhlovodíků z kontaminované půdy na Antarktidě. U izolovaných kultur byl sledován růst při teplotě 4, 10, 15, 24, 28, 30, 35 a 37 °C. Přehled základních výsledků je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2 Růst kmenů na monoaromatických, polyaromatických a lineárních uhlovodících (Aislabie, Foght a Saul, 1999)

Uhlovodíky	Kmen								
	Ant 5	Ant 9	Ant 10	Ant 11	Ant 17	Ant 20	Ant 30	7/22	8/48
<b>Monoaromatické</b>									
benzen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
toluen	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>o</i> -xylen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>m</i> -xylen	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>p</i> -xylen	-	+	-	-	-	-	+	+	-
ethylbenzen	-	-	+	+	-	-	-	-	-
1,2,4-trimethylbenzen	-	+	-	-	-	-	+	+	-
<b>Polyaromatické</b>									
naftalen	+	+	-	-	-	-	-	-	+
1-methyl naftalen	-	+	-	-	+	+	-	-	-
2-methyl naftalen	+	+	-	-	+	-	-	-	+
fenantren	-	-	-	-	+	+	-	-	-
fluoren	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>Lineární alkany</b>									
heptan	-	-	-	-	+	-	+	-	+
undekan	-	-	-	-	+	-	+	-	+
dodekan	-	-	-	-	±	-	-	-	±
tridekan	-	-	-	-	-	-	-	-	±

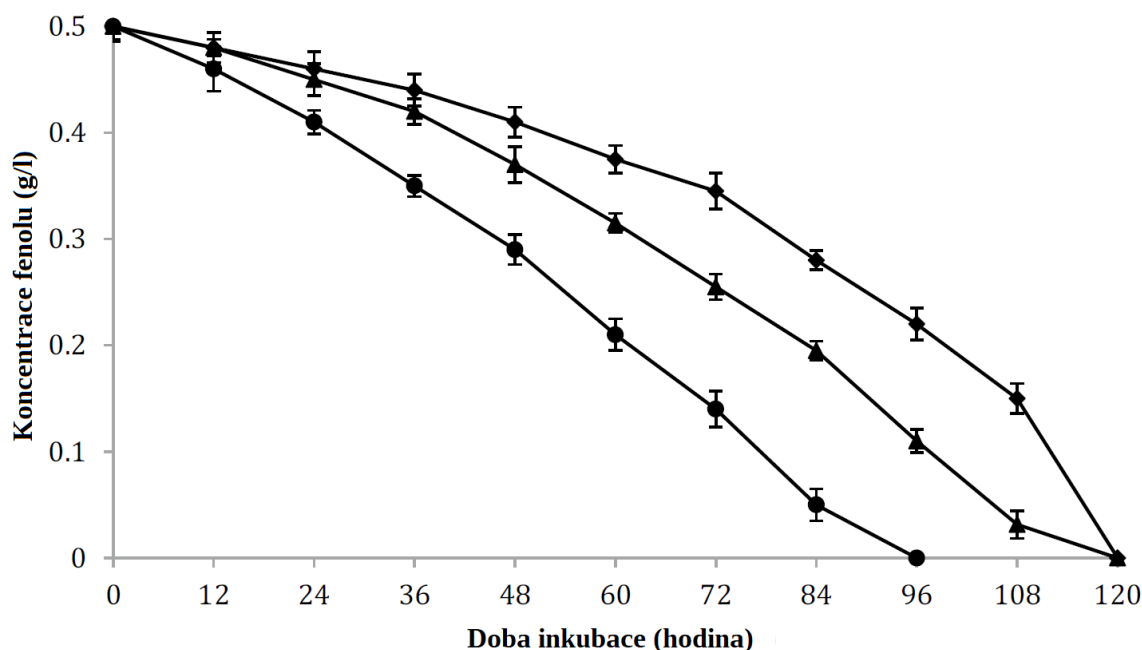
Průzkum se také týkal různých substrátů, jak lze vidět v tabulce 2. Všechny kultury využily více než jeden uhlovodík jako zdroj růstu, ale ani jeden nevyužil benzen ani *o*-xylen. Pouze kultury označené jako Ant17, Ant 30 a 8/48 využily jako substrát lineární alkany: heptan a undekan, v menší míře pak dodekan a tridekan. Kultury Ant 30 a Ant 17 sice mineralizovaly <sup>14</sup>C-toluen, ale kultura Ant 17 ho nevyužila k růstu.

Všechny kultury rostly při teplotě 4 °C, i když pomalu, ale pouze kultury Ant 9 a Ant 17 rostly ve 35 °C. Optimální růst všech kmenů byl mezi teplotami 24-28 °C, až na Ant 17, který měl optimum růstu při 30 °C.

Charakteristika bakterií: všechny byly aerobní, oxidáza a kataláza pozitivní, gramnegativní, nesporulující pohyblivé tyčinky. Všechny využívaly glukózu pro růst. Identifikace bakterií ukázala na bakterie rodů *Pseudomonas* a *Sphingomonas*.

Další práce (Li Yin Lee a kol., 2017) se zaměřila na bakterie rozkládající fenol, protože ten je jedním z častých a rozšířených aromatických uhlovodíkových polutantů. Používá se při výrobě plastů a při rafinaci ropy. Dostává se tak často do odpadních vod, kde si s ním musí poradit přírodní procesy degradace. Ty jsou založeny na činnosti bakterií, které často vyžadují určité rozpětí podmínek, jako je správná teplota, pH, salinita. Zvláštní pozornost je proto třeba věnovat nízkoteplotním podmínkám a procesům, které jsou schopné i za těchto podmínek stále probíhat.

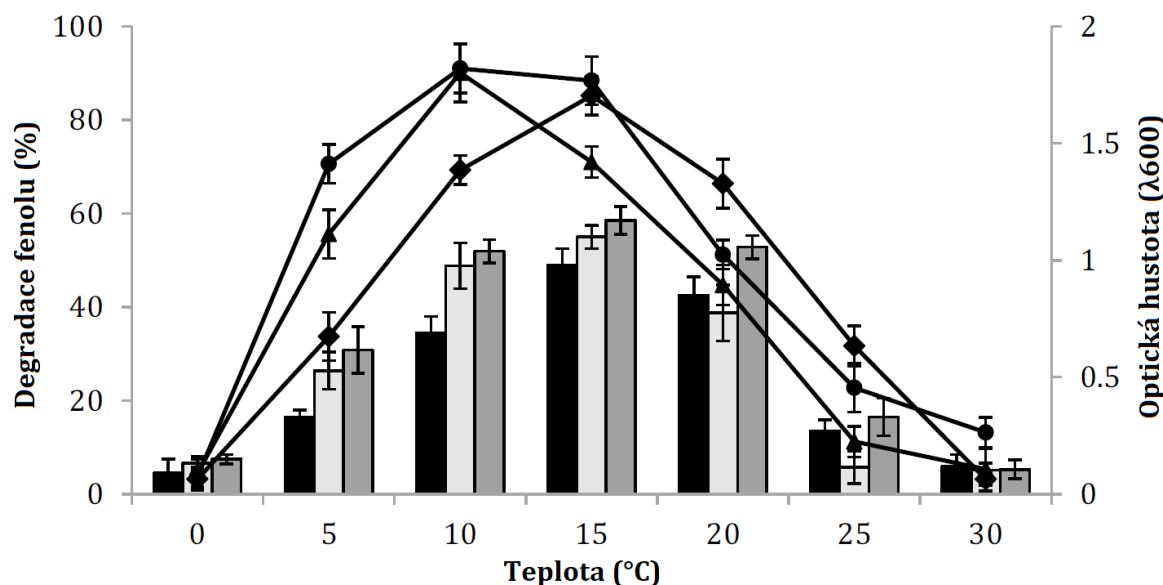
Pro bližší zkoumání byly vybrány tři kmeny bakterií, odebrané v Antarktidě. Jejich výběr proběhl na základě jejich schopnosti rozložit 0,5 g/l fenolu v čase 120 h a to při 10 °C.



Obrázek 1 Degradace 0,5 g/l fenolu kmeny AQ5-05 (plný diamant), AQ5-06 (plný trojúhelník) a AQ5-07 (plný kruh) při teplotě 10 °C (Li Yin Lee a kol., 2017)

Při jejich identifikaci se ukázalo, že jde o dva kmeny bakterie rodu *Arthrobacter* a jeden kmen bakterie rodu *Rhodococcus*. Pro charakterizaci těchto bakterií, které jsou schopné degradovat fenol, bylo použito Gramovo barvení, testy na oxidázu a katalázu a také skenovací elektronová mikroskopie (SEM), díky které bylo možné zobrazit morfologické

charakteristiky buněk těchto bakterií. Pro SEM mikroskopování musí být vzorky fixovány, dehydrovány a nakonec pokryty vrstvičkou vodivého materiálu – zlatem. Následné zkoušky degradací probíhaly při měnící se škále teplot, salinity a pH. Teploty byly 0, 5, 10, 20 a 30 °C (Li Yin Lee a kol., 2017)

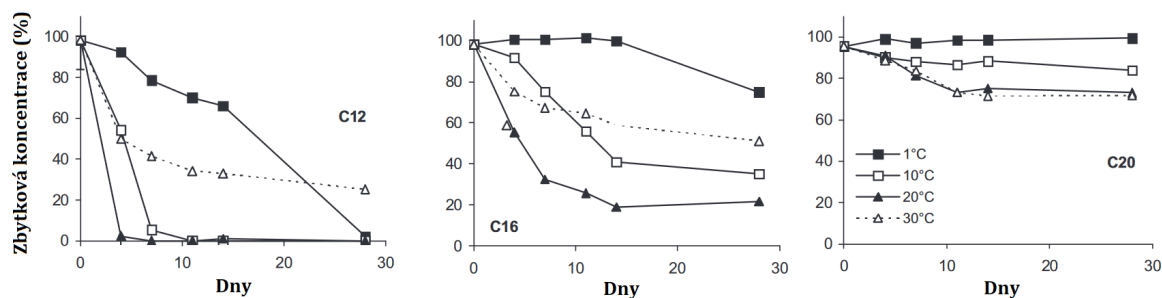


Obrázek 2 Vliv teploty na růst kmenů AQ5-05 (černý sloupec), AQ5-06 (světle šedý sloupec) a AQ5-07 (tmavě šedý sloupec), a na degradaci fenolu kmeny AQ5-05 (plný diamant), AQ5-06 (plný trojúhelník) a AQ5-07 (plný kruh) při teplotě 10 °C (Li Yin Lee a kol., 2017)

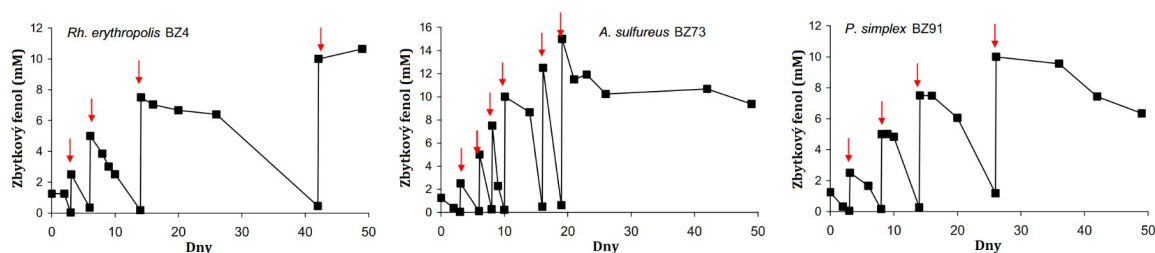
Margesinová, Moertelmaier a Mair (2012) dále uvádí, že kvůli toxicitě fenolických látek jsou tyto někdy příčinou zhroucení biologických čistících systémů tím, že inhibují růst mikroorganismů.

Průzkum biologického rozkladu fenolu v tomto případě probíhal skrze postupné zvyšování jeho koncentrace, takže nakonec bylo zjištěno, jaká je maximální koncentrace fenolu, kterou lze ještě biologicky degradovat. Růst mikroorganismů při tomto bádání standardně probíhal při 15 °C. Zároveň pro zjištění optimální teploty pro degradaci byly jednotlivé kmeny inkubovány při teplotě 1, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 °C za přítomnosti 946 mg/l (10 mM) fenolu.



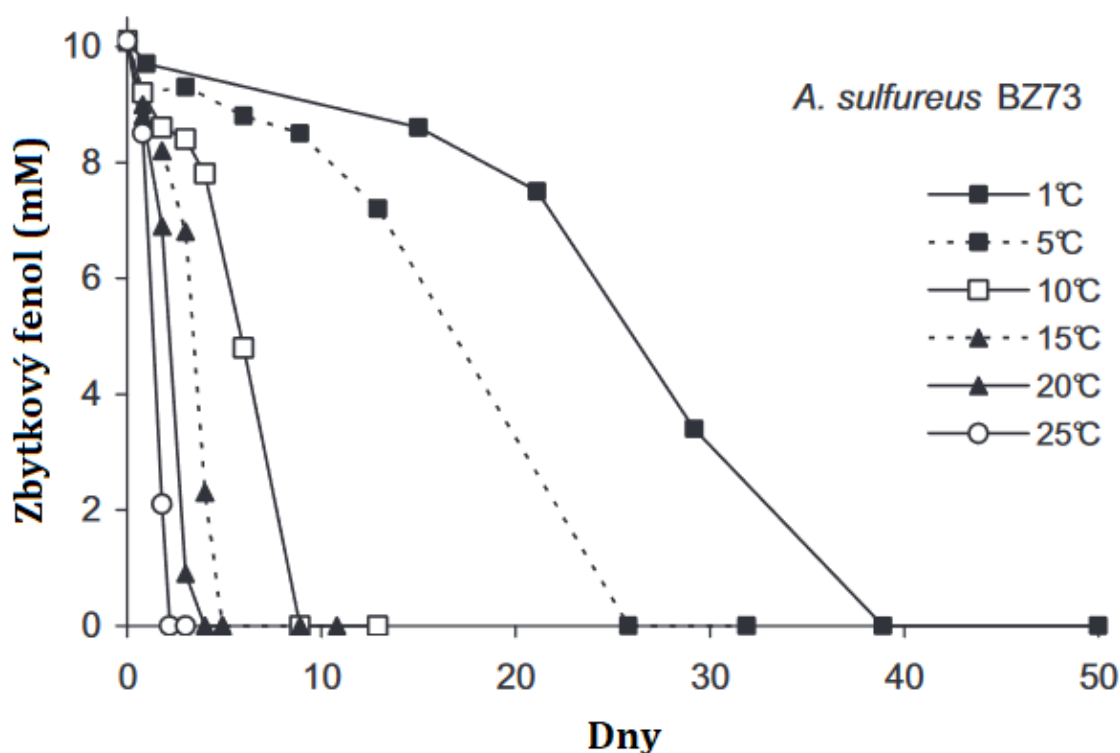


Obrázek 3 Vliv teploty na relativní degradaci *n*-alkanů kmenem *Rhodococcus cercidiphyllus* BZ22. Počáteční koncentrace každého alkanu byla 700 mg/l (Margesinová, Moertelmaier a Mair, 2012)



Obrázek 4 Degradace fenolu při teplotě 15 °C. Šipky označují přidávky fenolu. (Margesinová, Moertelmaier a Mair, 2012)

Výsledky ukázaly, že při zvyšující se koncentraci fenolu se prodlužuje lag fáze, protože fenol svou toxicitou způsobuje inhibici růstu bakterií. Během pokusu probíhala kontrola přítomného množství fenolu. Bylo zjištěno, že během tohoto pokusu fenol není rozkládán žádnými abiotickými procesy, a tedy že *Rhodococcus erythropolis* a *Pimelobacter simplex* rozkládají fenol až do koncentrace 709,5 mg/l (7,5 mM) během 42, 62 dní a *Arthrobacter sulfureus* plně rozloží fenol i při jeho koncentraci 1182,5 mg/l (12,5 mM) v rozmezí 19 dní a to vše při teplotě 15 °C.



Obrázek 5 Vliv teploty na rozklad fenolu kmenem *Arthrobacter sulfureus* BZ73 (Margesinová, Moertelmaier a Mair, 2012)

Co se týká vlivu teploty na rozklad fenolu, na obrázku 5 lze vidět *A. sulfureus* rozkládající fenol v rozmezí 1-25 °C, kdy se mu ve vyšších teplotách daří lépe a v nižších rozkládá spíše pomaleji.

## 2.2 Bakteriální degradace alifatických uhlovodíků za nízkých teplot

Alkany mohou být lineární, cyklické nebo rozvětvené. Až 50 % ropy může být tvořeno alkany. Protože jsou alkany nepolární molekuly, které jsou v určité míře chemicky inertní, jsou charakterizovány nízkou rozpustností ve vodě a mají tendenci k akumulaci v buněčných membránách.

Schopnost bakteriálních kmenů aerobně degradovat *n*-alkany byla testována v rozsáhlé studii Margesinové a kol. (2012), aby bylo zjištěno, jestli využívají uhlovodíky jako svůj jediný zdroj uhlíku a energie.

Biodegradace *n*-alkanů byla testována na lineárních uhlovodících C<sub>12</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> a C<sub>22</sub>. Z toho C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> a C<sub>22</sub> jsou při 20 °C v pevném stavu, takže byly převedeny do roztoku při 55 °C.

Inkubace probíhala při 15 °C po dobu 7 a 15 dní. Kmen, který si při degradaci vedl nejlépe, byl vybrán pro určení optimální teploty pro degradaci. Byly použity teploty 1, 10, 20

a 30 °C a směs *n*-alkanů C<sub>12</sub>, C<sub>16</sub> a C<sub>20</sub>. Jejich zbytková koncentrace byla odečtena po 4, 7, 11, 14 a 28 dnech.

Během biologické degradace byla zaznamenána i abiotická degradace alkanů v řádu jednotkách procent a to po 14 dnech.

Tři kmeny (*R. erythropolis*, *R. cercidiphyllus*, *P. simplex*) byly schopné využít *n*-alkany jako jediného zdroje uhlíku a energie. Délka řetězce ovlivnila rozložitelnost *n*-alkanu ve viditelném rozsahu. Po čtrnáctidenní inkubaci při 15 °C byl C<sub>12</sub> kompletně nebo téměř kompletně degradován, C<sub>16</sub> byl degradován ze 75 nebo 59 %, ale C<sub>18</sub> maximálně do 29% a C<sub>20</sub> byl degradován jen z 18 %.

Nejefektivnější degradér, *R. cercidiphyllus* byl blíže testován pro určení vlivu teploty na rozklad *n*-alkanů. Díky tomu bylo zjištěno, že se obecně lag fáze prodlužuje se zvyšující se délkou řetězce a se snižující se teplotou.

V této práci je hodnotný především průběh rozkladu při nízkých teplotách. Z výsledků pokusů lze vidět, že vybraná teplota 1 °C pro degradaci se ukázala být minimální teplotou, při které je kmen schopen růstu. Tato teplota byla příznivá pro rozklad C<sub>12</sub>, rozklad alkanu C<sub>16</sub> byl však pomalejší a C<sub>20</sub> zůstal netknutý.

Při identifikaci kmenů bylo zjištěno, že všechny 4 studované kmeny byly reprezentanty kmene *Actinobacteria*. Byli to zástupci druhů *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus cercidiphyllus*, *Arthrobacter sulfureus* a *Pimelobacter simplex*. Všechny tyto druhy jsou adaptované na chlad.

Bakterie kmene *Actinobacteria* jsou grampozitivní bakterie a jsou typickými zástupci mikrobiálního života v půdách, včetně půd v nehostinných podmínkách s nízkými teplotami. Hrají zde důležitou roli při rozkladu materiálu organického původu. Oproti ostatním mikroorganismům mají výhodnou schopnost přežít i s malým množstvím zdrojů. (Margesinová, Moertelmaier a Mair, 2012)

### 2.3 Závěr

V chladných oblastech mohou někdy teploty průmyslové odpadní vody, podzemní vody a půdy klesnout až na teplotu 15 °C a někdy i na nižší. Je to způsobeno sezónní nebo denní fluktuací. Aktivita mesofilních degradérů je v této teplotě omezená, kdežto adaptované druhy bakterií si vyvinuly strategie, které jim umožňují kompenzovat vlivy nízkých teplot na jejich biochemické reakce. (Margesinová, Moertelmaier a Mair, 2012)

## II PRAKTICKÁ ČÁST

### 3 MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Použité kultury

V letech 2020 – 2021 byly v mikrobiologické laboratoři Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí (ÚIOŽP) FT UTB ve Zlíně izolovány z různých vzorků povrchových vod bakteriální kultury rostoucí na fenolu při teplotě 8°C. Tyto práce byly provedeny v průběhu nedokončené diplomové práce Bc. Milana Pekárka. Získané bakteriální kmeny byly předběžně označeny jako kultury 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A a pocházely jak z tekoucích, tak i stojatých vod.

Kultura 1A pocházela z řeky Dřevnice ve Zlíně. Kultury 5A a 5B z řeky Štávnice v Luhačovicích. Kultury 6A a 6B měly původ v bahnitě kaluži v Březůvkách a kultura 12A byla izolována ze vzorku vody lesního potoka v Provodově.

Kultury byly zakonzervovány a jsou dlouhodobě uchovávány v glycerolu při -80°C a před zahájením prací v rámci této bakalářské práce byly oživeny na agarových živných půdách (R2A agar, TYA agar).

Kromě schopnosti využívat při nízké teplotě fenol jako růstový substrát (tedy jako jediný zdroj uhlíku a energie) nebyly před zahájením této bakalářské práce známy žádné další schopnosti těchto kultur rozkládat jiné alifatické či aromatické uhlovodíky, a tak se ověření těchto vlastností stalo námětem této kvalifikační práce.

#### 3.2 Roztoky a živná média

Pro oživení kultur a jejich namnožení byly použity dva typy agaru: R2A agar a Tryptone yeast extract (TYA) agar. Postup přípravy těchto dvou agarů byl totožný s postupem od jejich výrobce – HIMEDIA.

Pro vlastní pokusy bylo používáno minerální médium:

Složení použitého minerálního média (zkráceně MM) pro 100 ml byl následující:

Destilovaná voda.....	85 ml
Roztok <b>A</b> (9,07 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /l).....	2 ml
Roztok <b>B</b> (23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /l).....	8 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l).....	1 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l).....	1 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l).....	1 ml

NH <sub>4</sub> Cl (30 g/l).....	1 ml
NaCl (10 g/l).....	1 ml
Roztok stopových prvků.....	0,2 ml
Složení roztoku stopových prvků:	

V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno:

0,043 g MnSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O

0,057 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

0,043 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

0,037 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O

0,025 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

0,040 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O

pH bylo zkontrolováno, muselo se pohybovat v rozmezí 7,4 – 7,6.

### 3.3 Postupy testů

#### 3.3.1 Degradční testy ve zkumavkách

Testy degradace hexadekanu, resorcinolu, N-methyl 2-pyrrolidonu, tetradekanu, dodekanu a dekanu probíhaly mimo jiné ve zkumavkách. Postup práce byl následující:

Připravené minerální medium bylo sterilizováno. Následovalo rozplnění do sterilních zkumavek. V pokusech bylo napipetováno po 3,5 ml do každé zkumavky, kromě dvou pokusů: v pokusu 3 byly napipetovány 3 ml MM a v pokusu 6 byly napipetovány 4 ml MM.

Suspenze kultur byly připraveny ve sterilním fyziologickém roztoku.

Do zkumavek byly přidány vybrané substráty. Při testu růstu kultur na hexanu, tetradekanu, dodekanu a dekanu bylo asepticky přidáno 10 μl těchto substrátů přímo z lahviček od výrobců (Sigma-Aldrich, Merck). Pro test růstu kultur na resorcinolu bylo použito 50 μl 1% roztoku resorcinolu a v případě N-methyl 2-pyrrolidonu byl tento přidán již do MM v množství 1 g/l.

Poté byly jednotlivé zkumavky zaočkovány suspenzí kultur v objemu 15 μl tak, aby pro každou jednotlivou kulturu a substrát byly připraveny alespoň 2 zkumavky. Při testu růstu kultur na hexadekanu a resorcinolu byly pro kontrolu růstu kultur připraveny zkumavky s 7,5 μl 5% roztoku fenolu, vždy jedna pro každou kulturu, jako kontrola jejich růstu v použitém minerálním médiu s jediným organickým substrátem.

Při posledním testu tetradekanu bylo přidáno pouze 5 µl tohoto substrátu. Zkumavky byly zaočkovány 10 µl zkoumaného inokula.

Takto připravené kultury ve zkumavkách byly inkubovány při 8 °C ve vertikální poloze v chladničce umístěné na velké laboratorní třepačce s naprogramovaným režimem pohybu 15 minut pohyb a 45 minut klid, při rychlosti 35 otáček za minutu. V chladničce byl trvale umístěn teploměr ke kontrole teploty.

Při opakovaných zkouškách růstu na hexadekanu a při testu růstu na tetradekanu, dodekanu a dekanu probíhala inkubace jak při 8 °C tak současně i při 23 °C pro kontrolu růstu na daném substrátu.

### 3.3.2 Degradční testy ve vialkách

Pouze jeden pokus byl prováděn ve vialkách. Bylo to z důvodu těkavosti dvou substrátů: toluenu a oktanu. Po sterilizaci připraveného MM následovala sterilizace 30 vialek v horkovzdušné sušárně při 180 °C po dobu 4 hodin. Sterilizace 35 víček se septy byla uskutečněna expozicí UV-zářením v aseptickém boxu po dobu 3 hodin. Po zchlazení bylo MM asepticky rozplněno do 30 vialek po 10 ml. Zkoumané kultury bakterií byly připraveny jako suspenze ve 2 ml fyziologického roztoku. Kultury byly zaočkovány po 10 µl do vialek. Substráty byly poté přidány plynotěsným dávkovačem, a to v objemu 1,2 µl toluenu do 2 vialek pro každou kulturu a 1,4 µl oktanu do 2 vialek pro každou kulturu. Následovala inkubace při 8 °C.

### 3.3.3 Degradční testy v lahvích

Test růstu kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu probíhal ve 13 kultivačních lahvích. Připravené MM bylo rozplněno do lahví po 20 ml a poté sterilizováno. Do 9 lahví bylo přidáno 10 µl tetradekanu a byly zaočkovány 20 µl kulturami 1A, 6A a 12A vždy po třech lahvích. 2 další kultivační lahve bez tetradekanu byly zaočkovány pouze kulturou 12A jako negativní kontrola a 2 lahve byly ponechány pouze s tetradekanem kontrolu sterility tohoto substrátu.

Následovala inkubace při 8 °C ve výše popsané chladničce.

### 3.3.4 Růstové, biochemické testy a mikroskopie kultur

Jako první se odehrálo oživení kultur. Ty byly zamrazeny při -80 °C v glycerolu. Kultury 1A, 5A, 5B, 6A, 6B, 12A byly nanášeny křížovým roztěrem na R2A agar a Tryptone yeast

extract agar. To znamená, že na agar byla nejprve mikrobiologickou kličkou s kulturou nanesena oblast ve tvaru oválu u okraje petriho misky a z ní vycházející první čáry, druhé čáry, třetí čáry a koncová část, ve které byla hustota buněk tak řídká, že bylo možné po kultivaci pozorovat kolonie vyrůstající z jednotlivých buněk. Kultivace probíhala při 8 °C a byl pozorován růst po 1 dni, 2 dnech, 5 dnech a 7 dnech. Pro přípravu kultur před jednotlivými biochemickými a růstovými testy byly kultury obvykle předpěstovány na TYA agaru.

#### **NEFERMtest 24**

Pro předběžnou identifikaci kultur byl použit NEFERMtest 24. Jedná se o mikrotitrační destičku od firmy Erba Lachema. V každé jamce se nachází vysušené testovací médium. Na destičce je umístěno 3x8 jamek. Postup identifikace odpovídal postupu od výrobce. Do každé jamky bylo napipetováno 0,1 ml inokula, čímž byla suspenze zkoumané kultury ve fyziologickém roztoku. Destička byla uzavřena do PE sáčku a následovala inkubace.

#### **Růst kultur při různých teplotách**

Na TYA agar v Petriho miskách byly kličkami naneseny zkoumané kultury. Inkubace probíhala při teplotách 7, 13, 23, 30, 37 a 43 °C.

#### **Gramovo barvení**

Na každé z 6 podložních sklíček byla nanesena jednotlivá kultura v suspenzi (ve fyziologickém roztoku). Preparát s buňkami byl odsušen při laboratorní teplotě a pak jemně fixován plamenem. Na zchlazeném podložním sklíčku s roztěrem byla poté provedena série barvení podle Grama: nabarvení krystalovou violetí, sklíčko vystaveno jejímu působení po 60 sekund. Opláchnutí violeti Lugolovým roztokem a pak namočení do Lugolova roztoku, opět po dobu 60 sekund. Následovalo opláchnutí destilovanou vodou a odbarvení acetonem, dokud byla patrná odcházející barva ze sklíčka, ne déle než 20 sekund. Opět opláchnutí destilovanou vodou a konečné barvení safraninem po dobu 60 sekund. Následovalo opláchnutí destilovanou vodou a oschnutí podložního sklíčka.

Takto připravené buňky jednotlivých kultur byly mikroskopovány pod imerzním objektivem mikroskopu (objektiv 100x) a byly pořízeny jejich snímky.



## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Díky jednotlivým uskutečněným pokusům se podařilo vypořádat růst vybraných kultur, přesněji řečeno rozdílný růst kultur v různých podmínkách: kultury byly vystaveny škále teplot a byl pozorován jejich růst na různých uhlovodíkových substrátech při teplotě 8 °C a někdy pro ověření i při teplotě 23 °C.

### 4.1 Růst kultur 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A při 8 °C

Byl pozorován růst těchto kultur poté, co byly vytaženy ze stavu zamražení při -80 °C.

Tabulka 3 Růst kultur při 8 °C po 1 dni

Kultura	TYA agar	R2A agar
1A	Roste v oválu	Roste v oválu
5A	Roste v oválu	Roste v oválu, víc než na TYA
5B	Roste v oválu	Roste v oválu
6A	Roste v oválu, silně Roste i v 1. čarách	Roste v oválu
6B	Roste slabě v oválu	Roste slabě v oválu, méně než na TYA
12A	Roste v oválu, silně	Roste v oválu, silně

Po 24 hodinách inkubace kultur při 8 °C všechny kultury rostou na místě oválu. Kultury 6A a 12A rostou více než ostatní, zato kultura 6B roste méně.

Tabulka 4 Růst kultur při 8 °C po 2 dnech

Kultura	TYA agar	R2A agar
1A	Roste více než 1. den	Roste více než 1. den
5A	Roste více než 1. den, slabá růžová pigmentace	Roste více než 1. den, lépe než na TYA, slabá růž. pigmentace
5B	Roste více než 1. den a lépe než na R, slabá růžová pigmentace	Roste více než 1. den, slabá růžová pigmentace
6A	Roste více než 1. den	Roste více než 1. den
6B	Roste méně než ostatní kultury, na TYA lépe než na R	Roste méně než ostatní kultury
12A	Roste více než 1. den	Roste více než 1. den

Po 48 hodinách rostou kultury více a u kultur 5A, 5B se objevila slabě růžová pigmentace.

Tabulka 5 Růst kultur při 8 °C po 5 dnech

Kultura	TYA agar	R2A agar
1A	Roste celý křížový roztěr, čistá	Roste celý křížový roztěr, čistá, mukóznější než na TYA
5A	Roste celý křížový roztěr, čistá, růžový pigment	Roste celý křížový roztěr, čistá, růžový pigment, roste lépe než na TYA
5B	Roste celý křížový roztěr, čistá, růžový pigment	Roste celý křížový roztěr, čistá, růžový pigment, roste lépe než na TYA
6A	Roste celý křížový roztěr + ojediněle mikrokolonie	Roste celý křížový roztěr + ojediněle mikrokolonie
6B	Roste celý křížový roztěr, čistá	Roste celý křížový roztěr, čistá
12A	Roste celý křížový roztěr, čistá	Roste celý křížový roztěr, čistá

Pátý den kultivace při 8 °C kultury rostou po celé naočkované ploše. Kultury 5A a 5B mají jasný růžový pigment a rostou lépe na R2A agaru než na TYA. Lze již říci, že kultury jsou čisté – tedy pracujeme s kulturami, ve kterých se nenachází žádná cizí buňka.

Tabulka 6 Růst kultur při 8 °C po 7 dnech

Kultura	TYA agar	R2A agar
1A	Roste celý křížový roztěr, čistá	Roste celý křížový roztěr, čistá
5A	Roste celý křížový roztěr, čistá, růžový pigment	Roste celý křížový roztěr, čistá, růžový pigment
5B	Roste celý křížový roztěr, čistá, růžový pigment	Roste celý křížový roztěr, čistá, růžový pigment
6A	Roste celý křížový roztěr, čistá	Roste celý křížový roztěr, čistá
6B	Roste celý křížový roztěr, čistá	Roste celý křížový roztěr, čistá
12A	Roste celý křížový roztěr, čistá	Roste celý křížový roztěr, čistá

Ze sedmidenního pozorování vyšlo najevo několik zjištění. Kultury jsou schopné růstu při 8 °C na R2A agaru a na Tryptone yeast extract agaru. Kultury jsou čisté. Kultury lze uchovávat zamražené při -80 °C v glycerolu. Kultury 5A a 5B se jeví jako identické, což bylo později potvrzeno při současně probíhajících pokusech Karolíny Linhartové (Linhartová, 2023).

## 4.2 Růst kultur na toluenu a oktanu při 8 °C (pokus 1)

Pro první pokus degradace byly zvoleny dva uhlovodíky. Aromatický uhlovodík toluen a lineární uhlovodík oktan. Bylo tak zvoleno s ohledem na skutečnost, že zkoumané kultury mají schopnost degradovat aromatický uhlovodík fenol, který má podobnou stavbu molekuly jako dva vybrané uhlovodíky.

Tabulka 7 Růst kultur na toluenu

Doba (dny)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-

14	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-

Tabulka 8 Růst kultur na oktanu

Doba (dny)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-

- Bez růstu                      + Slabší růst                      ++ Výrazný růst

Výsledky tohoto pokusu ukázaly, že kultury 1A, 5A, 5B, 6A, 6B ani 12A nejsou schopné růstu za 21 dní na toluenu ani na oktanu.

### 4.3 Růst kultur na hexadekanu a resorcinolu při 8 °C (pokus 2)

Předchozí pokus vedl k dalšímu výběru uhlovodíků, tentokrát přírodní sloučenina resorcinol a lineární hexadekan. Navíc byl přidán pro pozitivní kontrolu pro všechny kultury pokus růstu na fenolu.

Tabulka 9 Růst kultur na hexadekanu

Doba (dny)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
38	+ jedna zkumavka	-	-	-	-	++
45	+ jedna zkumavka	-	-	-	-	++
90	+ jedna zkumavka	-	-	++	-	++

Až 38. den byl pozorován růst na hexadekanu. Každá kultura byla nasazena ve dvou zkumavkách pro každý substrát. Kultura 1A vyrostla pouze v jedné zkumavce a kultura 12A vyrostla v obou zkumavkách. Po 45. dnu pokus pokračoval bez kontroly, 90. den byl zjištěn růst kultury 6A.

Rostoucí kultury byly vyočkovány na TYA agar pro potvrzení, že zákal skutečně způsobují rostoucí buňky, popřípadě v jaké míře je následkem nerozpuštěného emulgovaného substrátu hexadekanu. Kultury ukázaly silný růst na TYA agaru a při mikroskopickém

pozorování byly k vidění kokovité buňky. Bylo tak potvrzeno, že zákal byl skutečně způsoben množением kultur.

Tabulka 10 Růst kultur na resorcinolu

Doba (dny)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-

Oproti očekávání růst na resorcinolu, přírodě vlastním uhlovodíku s obdobnou strukturou, jakou má fenol, neproběhl ani po 38. dnu.

#### 4.4 Růst kultur na N-methyl 2-pyrrolidonu při 8 °C (pokus 3)

Kultury 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A byly zkoumány, zda dovedou degradovat a růst na substrátu N-methyl 2-pyrrolidonu.

Tabulka 11 Růst kultur na N-methyl 2-pyrrolidonu

Doba (dny)	Kultura					
	1A	5A	5B	6A	6B	12A
0	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-

Pokus probíhal po 38 dní, ale ani po této době nebyl růst u žádné kultury na tomto substrátu pozorován.

#### 4.5 Růst všech kultur při různých teplotách

V průběhu pokusů degradace substrátů proběhla kontrola růstu všech kultur při teplotách 7, 13, 23, 30, 37 a 43 °C. Všechny kultury rostly při teplotách 7, 13, 23 a 30 °C. Při teplotách 37 a 43 °C žádná z kultur nerostla.

Následující testy růstu na různých substrátech kombinovaly jak růst při 8 °C, tak při laboratorní teplotě, tedy při 23 °C. To bylo vhodné především ke kontrolnímu zjištění růstu na vybraném substrátu, které mohlo nastat mnohem dříve než při nižší teplotě. Tím bylo

ověřeno, zda některá kultura dovede růst na určitém substrátu. Zároveň probíhal tentýž pokus při teplotě 8 °C a očekávaný růst se v některých případech později projevil.

#### 4.6 Růst kultur 1A, 6A a 12A na hexadekanu

Jelikož při pokusu 2 kultury 1A, 12A a nakonec i 6A projevily růst na hexadekanu, byly tyto kombinace zopakovány jak při 8 °C, tak i při teplotě 23 °C. Zároveň byl pozorován stav hexadekanu pro určení míry jeho biodostupnosti pro buňky jednotlivých kultur, a to z důvodu vysrážení hexadekanu při 8 °C v předchozím pokusu. Takto vysrážený hexadekan byl ve formě makroskopicky viditelných nerozpuštěných částic.

Tabulka 12 Růst kultur 1A a 12A na hexadekanu při 23 °C a 8 °C

Inkubace (dny)	Růst při 23°C		Růst při 8°C		Hexadekan při 8°C
	1A	12A	1A	12A	
3	-	+	-	-	vysrážený
5	+	++	-	-	vysrážený
7	++	++	-	-	vysrážený
10	++	++	-	-	vysrážený
14	++	++	-	-	vysrážený
17	ukončeno	ukončeno	-	-	vysrážený
19	ukončeno	ukončeno	-	slabě +	vysrážený
21	ukončeno	ukončeno	-	+	vysrážený
24	ukončeno	ukončeno	-	++	vysrážený u 1A
28	ukončeno	ukončeno	-	++	vysrážený u 1A
31	ukončeno	ukončeno	-	++	vysrážený u 1A
35	ukončeno	ukončeno	-	++	vysrážený u 1A
42	ukončeno	ukončeno	-	++	vysrážený u 1A
45	ukončeno	ukončeno	-	++	vysrážený u 1A

Tabulka 13 Růst kultury 6A na hexadekanu při 23 °C

Inkubace (dny)	Růst 6A při 23°C
2	Slabě +
5	++
7	++
9	ukončeno

Ukázalo se, že při 23 °C jsou kultury 1A, 6A a 12A schopné růstu na hexadekanu a to velmi rychle a dobře. Kultura 6A již slabě 2. den, 5. den rostla silně. Kultura 12A 3. den slabě rostla, 5. den více a kultura 1A začala růst 5. den a 7. den rostla silně.

Při 8 °C byl růst kultur 1A a 12A více rozdílný: kultura 12A začala růst slabě až 19. den, 24. den již rostla silně, zatímco u kultury 1A nenastal růst ani po 45 dnech.

Opakované zkoumání růstu kultury 6A na hexadekanu při 8 °C nebylo provedeno.

Na rozdílný růst při různých teplotách může mít vliv pomalejší metabolismus buněk při nižší teplotě, ale také nižší schopnost emulgace substrátu. Při nízké teplotě substrát tvoří velké vysrážené shluky a tím je snížena jeho dostupnost pro buňky.

#### 4.7 Růst kultur 1A, 6A a 12A při 23°C a 8°C na alifatických uhlovodících dekanu, dodekanu a tetradekanu (pokus 4)

Na základě zkušenosti s růstem kultur na hexadekanu byly vybrány tři kultury, 1A, 6A a 12A a byly provedeny testy jejich růstu na uhlovodíkových substrátech blízkých hexadekanu: na tetradekanu, dodekanu a dekanu. Tento pokus skrýval určitou šanci k odhalení, jaký počet uhlíků v uhlovodíkovém řetězci je ještě degradovatelný těmito kulturami a jaký už ne. Při tomto pokusu byl pro objektivizaci výsledků měřen růst kultur v médiích pomocí densilometru.

Tabulka 14 Růst kultur 1A, 6A a 12A na dekanu

Inkubace (dny)	Růst na dekanu při 23°C			Růst na dekanu při 8°C			Dekan při 8°C
	1A	6A	12A	1A	6A	12A	
1	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulze</b>
2	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulze</b>
3	0,0+0,0	0,0+0,0	0,0+0,0	-	-	-	<b>Jemná emulze</b>
4	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulze</b>
7	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulze</b>
9	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulze</b>
11	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulze</b>
14	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulze</b>
17	0,0+0,0	0,0+0,0	0,0+0,0	0,0+0,0	0,0+0,0	0,1+0,0	
24	0,0+0,0	0,1+0,0	0,1+0,0	0,0+0,1	0,1+0,0	0,2+0,0	
31	0,0+0,0	0,1+0,0	0,1+0,0	0,0+0,0	0,0+0,0	0,2+0,0	
45	0,0+0,0	0,1+0,0	0,1+0,0	0,0+0,0	0,0+0,0	0,2+0,0	
45	Pokus ukončen						

Růst kultur na dekanu při 23 °C se neprojevil vůbec. Při 8 °C byl naměřen zákal u kultury 12A v jedné zkumavce, ovšem tak slabý, že jej nelze za růst považovat.

Tabulka 15 Růst kultur 1A, 6A a 12A na dodekanu

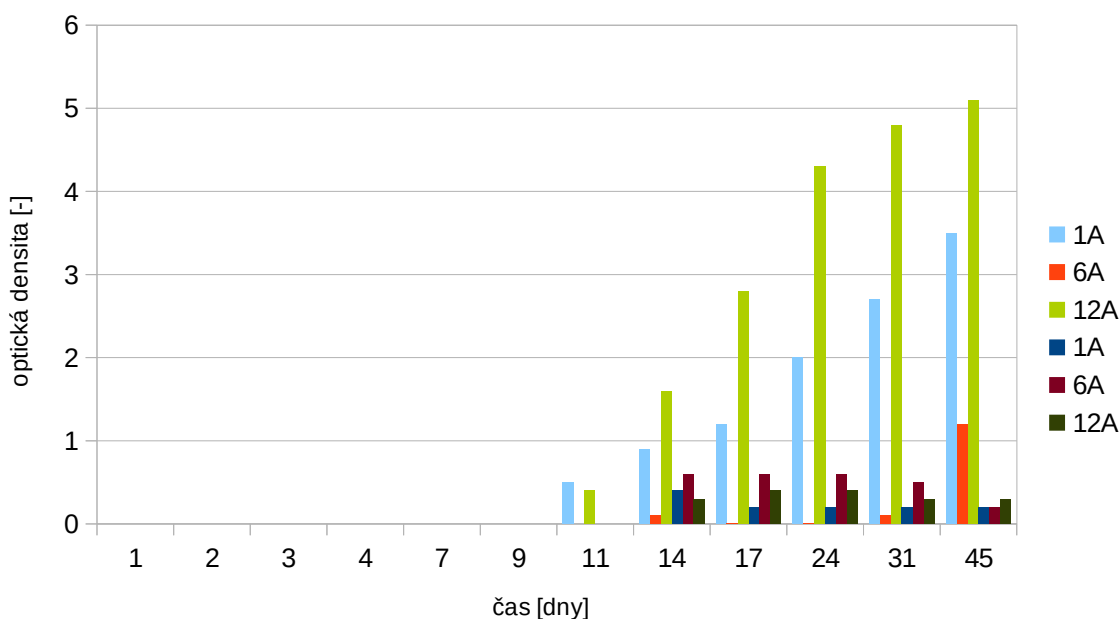
Inkubace (dny)	Růst na dodekanu při 23°C			Růst na dodekanu při 8°C			Dodekan při 8°C
	1A	6A	12A	1A	6A	12A	
1	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
2	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
3	0,0+0,0	0,0+0,0	0,0+0,0	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
4	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
7	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
9	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
11	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
14	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
17	0,0+0,0	0,1+0,0	0,1+0,1	0,0+0,0	0,0+0,0	0,1+0,0	
24	0,0+0,0	0,1+0,0	0,3+0,3	0,0+0,1	0,1+0,1	0,1+0,0	
31	0,0+0,0	0,1+0,0	0,3+0,4	0,0+0,1	0,1+0,1	0,1+0,0	
45	0,0+0,0	0,1+0,0	0,3+0,4	0,0+0,1	0,1+0,1	0,1+0,0	
45	Pokus ukončen						

Růst kultur 1A, 6A a 12A na dodekanu při 8 °C byl minimální až žádný. Při 23 °C se projevil slabý zákal pouze u kultury 12A a to 24. den růstu, avšak zákal způsobený abiotickými částicemi.

Tabulka 16 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu

Inkubace (dny)	Růst na tetradekanu při 23°C			Růst na tetradekanu při 8°C			Tetradekan při 8°C
	1A	6A	12A	1A	6A	12A	
1	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
2	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
3	0,0+0,0	0,0+0,1	0,0+0,0	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
4	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
7	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
9	-	-	-	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
11	0,3+0,5	0,0+0,0	0,3+0,4	-	-	-	<b>Jemná emulse</b>
14	0,4+0,9	0,1+0,1	0,8+1,6	0,3+0,4	0,4+0,6	0,3+0,2	
17	0,3+1,2	0,0+0,0	0,9+2,8	0,2+0,0	0,1+0,6	0,3+0,4	
24	0,4+2,0	0,0+0,1	1,7+4,3	0,2+0,0	0,1+0,6	0,3+0,4	
31	0,6+2,7	0,1+0,1	3,0+4,8	0,2+0,0	0,1+0,5	0,3+0,3	
45	2,8+3,5	1,2+0,1	4,1+5,1	0,2+0,1	0,1+0,2	0,3+0,3	

Kultury 1A a 12A rostly na tetradekanu již 11. den velmi slibně při 23 °C a 14. den také při 8 °C, v této nižší teplotě ovšem v menší míře. Bylo patrné, že v případě růstu kultur dosahují měřené hodnoty zákalu vysokých hodnot, značně převyšující úroveň několika desetin. Kultura 6A rostla nejprve dobře při 8 °C a to 14. den, ale pouze v jedné zkumavce. Ve druhé byl zaznamenán slabší růst. Další dny byl však měřený zákal kultury 6A při 8 °C slabší a výsledky byly tak nejednoznačné. Oproti tomu růst kultury 6A při 23 °C se silněji projevil až 45. den a to jen v jedné zkumavce.



Obrázek 6 Vybrané hodnoty zákalu zkumavek s kulturami 1A, 6A a 12A při růstu na tetradekanu. Světlé barvy pro teplotu 23 °C, tmavé barvy pro teplotu 8 °C

Na grafu je vidět očekávaný silnější růst kultur 1A a 12A při teplotě 23 °C a nižší při 8 °C. U kultury 6A se projevil nejprve nárůst při 8 °C a až později při teplotě 23 °C.

Tetradekan se tedy stal předmětem bližšího zkoumání pro další testy degradace kulturami 1A, 6A a 12A.

#### 4.8 Růst kultur 1A, 6A a 12A při 8 °C na tetradekanu (pokus 5)

Při tomto pokusu byly použity kultivační lahve o objemu 10 ml. Kultury 1A, 6A a 12A byly naočkovány každá do třech lahví s MM a tetradekanem jako substrátem. Inkubace probíhala pouze při 8 °C. Kontrola probíhala skrze stanovení počtu jednotek tvořících kolonie - „Colony Forming Units“ (CFU) – tedy inokulace vzorků z kultivačních lahví na Petriho misky a následný odečet počtu narostlých kolonií.

Dvě lahve s kulturou 12A byly ponechány bez substrátu jako negativní kontrola (NEG).

Tabulka 17 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu při 8 °C, odečet při nasazení

Vzorek	Ředění	Miska 1	Miska 2	Výsledek / ml (po přepočtu)
12A NEG	$10^{-4}$	3	4	$3,5 \cdot 10^4$ CFU
1A	$10^{-4}$	0	0	Méně než $10^4$ CFU
6A	$10^{-4}$	6	3	$4,5 \cdot 10^4$ CFU
12A	$10^{-4}$	3	3	$3 \cdot 10^4$ CFU



Tabulka 18 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu při 8 °C, 22. den inkubace

Vzorek	Ředění	Miska 1	Miska 2	Výsledek / ml (po přepočtu)
12A NEG	$10^{-4}$	141	113	$1,3 \cdot 10^6$ CFU
1A	$10^{-4}$	7	8	$7,5 \cdot 10^4$ CFU
1A	$10^{-4}$	4	2	$3 \cdot 10^4$ CFU
6A	$10^{-4}$	146	142	$1,4 \cdot 10^6$ CFU
6A	$10^{-4}$	109	87	$9,8 \cdot 10^5$ CFU
12A	$10^{-4}$	152	76	$1,1 \cdot 10^6$ CFU
12A	$10^{-4}$	47	53	$5 \cdot 10^5$ CFU

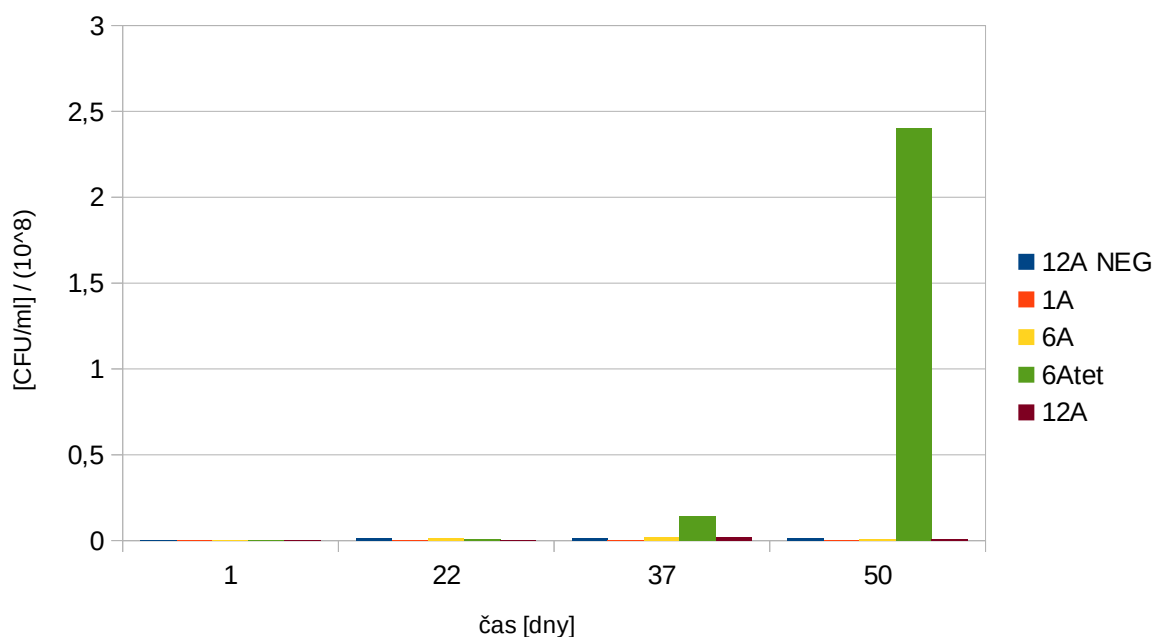
Tabulka 19 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu při 8 °C, 37. den inkubace

Vzorek	Ředění	Miska 1	Miska 2	Výsledek / ml (po přepočtu)
12A NEG	$10^{-4}$	110	134	$1,2 \cdot 10^6$ CFU
1A	$10^{-4}$	1	1	$1 \cdot 10^4$ CFU
1A	$10^{-4}$	4	8	$6 \cdot 10^4$ CFU
6A	$10^{-5}$	14	22	$1,8 \cdot 10^6$ CFU
6A	$10^{-5}$	145	127	$1,4 \cdot 10^7$ CFU
12A	$10^{-5}$	12	11	$1,2 \cdot 10^6$ CFU
12A	$10^{-5}$	17	18	$1,8 \cdot 10^6$ CFU

Tabulka 20 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu při 8 °C, 50. den inkubace

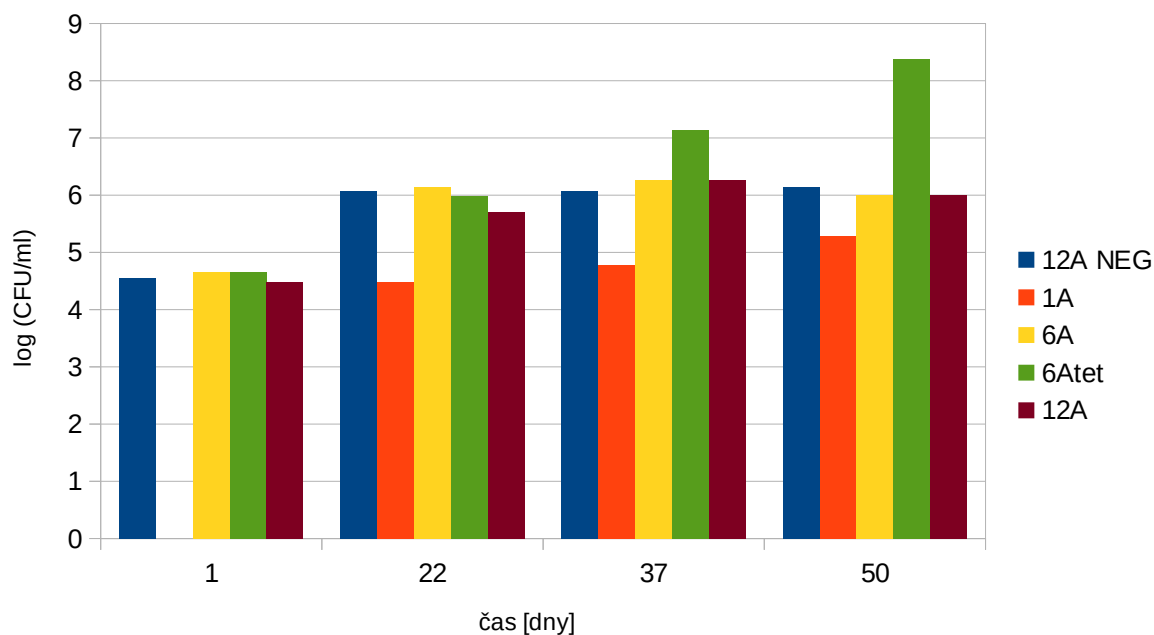
Vzorek	Ředění	Miska 1	Miska 2	Výsledek / ml (po přepočtu)
12A NEG	$10^{-5}$	17	11	$1,4 \cdot 10^6$ CFU
1A	$10^{-4}$	5	9	$7 \cdot 10^4$ CFU
1A	$10^{-4}$	16	21	$1,9 \cdot 10^5$ CFU
6A	$10^{-5}$	12	8	$1 \cdot 10^6$ CFU
6A	$10^{-6}$	232	240	$2,4 \cdot 10^8$ CFU
12A	$10^{-5}$	12	12	$1,2 \cdot 10^6$ CFU
12A	$10^{-5}$	7	14	$1 \cdot 10^6$ CFU

Z tabulek je vidět masivní nárůst kultury 6A při 8 °C v jedné ze dvou kultivačních lahví, projevující se od 37. dne kultivace; na konci inkubačního období v ní převyšoval počet buněk o dva řády hodnoty jiných lahví včetně kontroly. Proto byla kultura, vyrostlá v této kultivační lahvi, označena jako subkultura 6A<sub>tet</sub>.



Obrázek 7 Počet CFU/ml ve vybraných kultivačních lahvích. Rychle rostoucí kultura 6A je označena jako 6Atet.

Na obrázku 7 je vidět naprosto jiné tempo růstu kultury 6Atet, a to i proti paralelní kultivační lahvi obsahující kulturu 6A. Ovšem i u ostatních kultur, včetně negativní kontroly, byl zaznamenán nárůst počtu buněk oproti stavu při zahájení pokusu. Právě vzhledem k výsledku negativní kontroly však nelze u ostatních kultivačních lahví (kromě 6Atet) uvažovat o skutečném růstu buněk na tetradkanu.



Obrázek 8 Logaritmus počtu CFU/ml ve vybraných kultivačních lahvích. Rychle rostoucí kultura 6A je označena jako 6Atet.

Rozdílné chování kultury 6A v obou paralelních lahvích za podmínek nízké teploty vedlo k poslednímu testu degradace tetradekanu touto kulturou.

#### 4.9 Růst kultury 6A při 8°C na tetradekanu: růst inokul s různou předkultivací (pokus 6)

Pokus 6 byl proveden tak, aby objasnil nejasnosti růstu kultury 6A. Byly tedy připraveny tři varianty suspenze této kultury:

- a 6A80: kultura vyočkována na R2A agar ze zamražené konzervy uchovávané při teplotě -80°C. Předpokladem bylo, že tyto buňky nikdy nepřišly s tetradekanem do kontaktu.
- b 6ATET1: několik kolonií z R2A agaru, na němž vyrostly kolonie po vyočkování z MM s tetradekanem. Tyto buňky byly bezprostředními potomky buněk, které vyrostly na tetradekanu v pokusu 5.
- c 6ATET2: inokulum přímo z MM s tetradekanem. Tyto buňky vyrostly na tetradekanu jako jediném zdroji uhlíku a energie v pokusu 5.

Pro každou ze tří variant bylo připraveno 10 zkumavek s MM a tetradekanem jako jediným organickým substrátem. Růst buněk byl sledován vizuálně a měřením optické hustoty pomocí densilometru a v následujících tabulkách a v grafu na obrázku 9 jsou uvedeny výsledky.

Tabulka 21 Optická densita varianty 6A80:

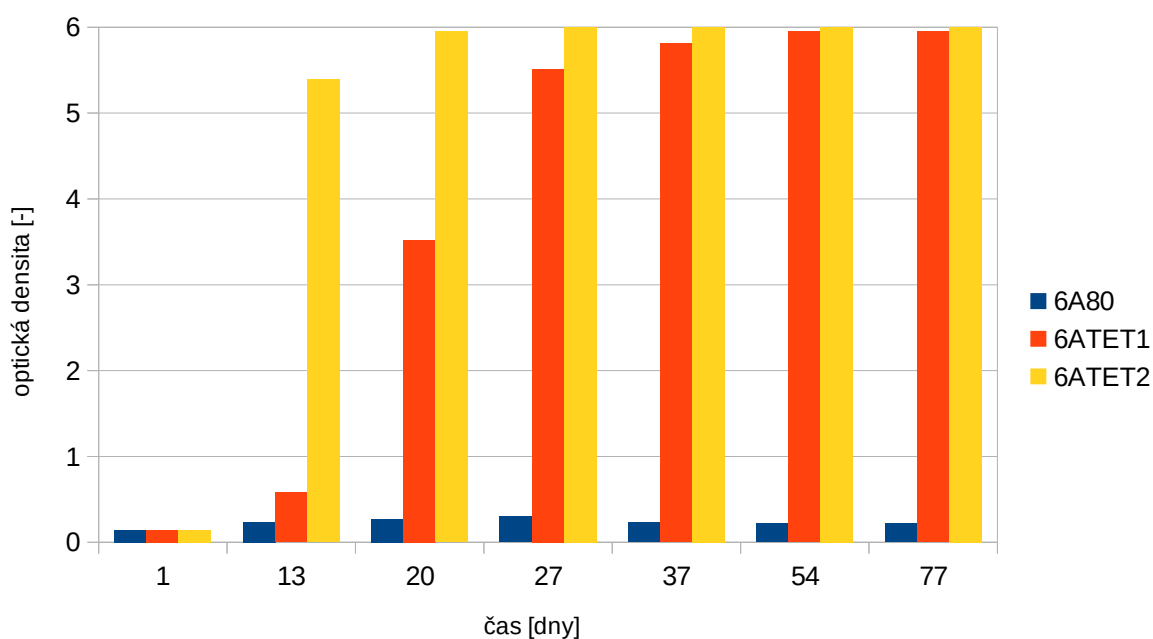
	Optická densita						
	Začátek 8.12.	20.12.	27.12.	3.1.	13.1.	30.1.	22.2.
1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
4	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2
5	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
6	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
7	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3
8	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
9	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3
10	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2

Tabulka 22 Optická densita varianty 6ATET1:

	Optická densita						
	Začátek 8.12.	20.12.	27.12.	3.1.	13.1.	30.1.	22.2.
1	0,1	0,5	2,9	4,0	5,1	5,9	5,9
2	0,2	0,6	3,6	6,0	6,0	6,0	6,0
3	0,1	0,5	3,1	4,4	5,3	5,9	5,9
4	0,2	0,7	4,8	5,9	5,9	5,9	5,9
5	0,1	0,5	3,1	5,5	5,9	5,9	5,9
6	0,1	0,6	3,4	5,8	6,0	6,0	6,0
7	0,2	0,7	4,6	6,1	6,1	6,1	6,1
8	0,1	0,5	3,1	5,8	6,0	6,0	6,0
9	0,2	0,6	3,1	5,8	5,9	5,9	5,9
10	0,1	0,6	3,5	5,8	5,9	5,9	5,9

Tabulka 23 Optická densita varianty 6ATET2:

	Optická densita						
	Začátek 8.12.	20.12.	27.12.	3.1.	13.1.	30.1.	22.2.
1	0,1	5,2	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
2	0,2	5,5	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
3	0,1	5,3	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0
4	0,2	5,6	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
5	0,1	5,3	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0
6	0,1	5,4	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0
7	0,2	5,6	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1
8	0,1	5,2	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0
9	0,2	5,5	6,0	6,1	6,1	6,1	6,1
10	0,1	5,3	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0



Obrázek 9 Optická densita zkumavek variant kultury 6A v rozmezí 77 dnů inkubace

Hodnoty jednotlivých paralelních zkumavek si byly velmi blízké, takže jejich zprůměrováním vznikl výše uvedený graf na obrázku 9. Na něm si lze povšimnout, že zatímco varianty 6ATET1 a 6ATET2 nakonec ukázaly výrazný růst (s rychlým zahájením růstu u varianty 6ATET2), varianta 6A80 prakticky nerostla.

Tyto výsledky naznačují, že část původní kultury 6A, se kterou jsme začínali při prvních testech, nakonec ukázala dobrou schopnost rozkládat tetradekan, a v této vlastnosti se odlišila od zbytku zamražené kultury 6A uchované při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tento proces musel proběhnout za dobu, kdy testy probíhaly. Na začátku to byla jedna zkumavka kultury 6A rozkládající tetradekan málo a jedna velmi rychle, a na konci měly všechny zkumavky se stejnou variantou kultury 6A téměř stejný průběh růstu. Vysvětlení tohoto jevu není jednoznačné, lze se však domnívat, že na počátku mohla mít původní kultura 6A nestejně genetické vybavení v různých buňkách, (například mohl být v některých buňkách přítomen plazmid umožňující využití tetradekanu jako substrátu), což vedlo k nestejným výsledkům v degradačních testech s kulturou 6A. V každém případě bude nutné uchovávat odděleně subkulturu 6Atet od původní kultury 6A.

#### 4.10 NEFERMtest 24

Kultury 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A byly testovány pro jejich identifikaci za pomoci NEFERMtestu 24. Test na fosfatázu vyšel pozitivně u všech kultur. Test argininu byl pozitivní u kultur 6A, 6B a 12A, zatímco u kultur 1A, 5A, 5B byly výsledky tohoto testu slabě pozitivní. Všechny ostatní testy obsažené v NEFERMtestu 24 byly negativní. Díky těmto výsledkům lze usuzovat, že zkoumané kultury patří k druhu *Acinetobacter lwoffii* nebo *Acinetobacter junii*.

#### 4.11 Gramovo barvení

Buňky jednotlivých kultur, napěstované na TYA agarech, byly barveny Gramovým barvením a mikroskopovány imerzním mikroskopem. Z této práce byly pořízeny fotografie jednotlivých kultur, uvedené v přílohách. Toto mikroskopické pozorování odhalilo, že se jedná o gramnegativní bakterie ve tvaru koků a také kokotyčinek (může se ovšem jednat o zrovna dělicí se buňky). Tento tvar buněk odpovídá zcela přesně rodu *Acinetobacter* (Sedláček, 2007).

## ZÁVĚR

V této práci byly provedeny testy kultur označených jako 1A, 5A, 5B, 6A, 6B a 12A. Tyto kultury byly dříve izolovány ze vzorků stojatých a tekoucích vod. Kultury snášejí zamražení při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v glycerolu a mohou být takto uchovávány. Také bylo zjištěno, že tyto kultury dovedou růst při teplotách 7, 13, 23 a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při teplotách 37 a  $43\text{ }^{\circ}\text{C}$  nerostou. Tyto psychrotrofní bakterie dovedou jako zdroj energie pro růst využít fenol.

Cílem této práce bylo nalezení dalších substrátů - polutantů, které by tyto bakterie také dovedly degradovat při teplotě  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tato teplota je totiž běžná pro některé podzemní vody. Testy při této teplotě tak mohou sloužit pro případ, kdy by bylo například potřeba odstranit studované polutanty při této teplotě.

Na toluenu a resorcinolu, N-methyl 2-pyrrolidonu a oktanu však růst za 21 ani 38 dní nenastal. Teprve hexadekan přinesl pozitivní výsledek: růst kultury 1A a 12A 38. den kultivace a kultury 6A, který byl pozorován až v 90. den kultivace při  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Schopnost těchto tří kultur rozkládat hexadekan byla ověřena i při teplotě  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  a ukázalo se, že je velmi dobrá, protože rostly na hexadekanu při této teplotě již po 3-5 dnech.

Dále proběhlo testování růstu na tetradekanu, dodekanu a dekanu. Významný růst na dekanu a dodekanu nebyl pozorován, zato tetradekan se ukázal jako substrát využitelný testovanými kulturami a to jak při teplotě  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  tak i při  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kultuře 1A a 12A se dařilo lépe při vyšší teplotě, zatímco kultura 6A rostla lépe právě při teplotě  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poslední test odhalil, že zatímco původní kultura 6A, po celou dobu uchována při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , svou schopnost rozkládat tetradekan ztratila, její určitá subkultura, s níž bylo pracováno v testech s tetradekánem, si tuto schopnost uchovala. Tato subkultura od původní kultury 6A růstem na tetradekanu odlišovala, proto byla samostatně označena (6ATET) a zakonzervována.

Předběžná identifikace kultur, provedená biochemickými testy a Gramovým barvením, naznačila, že všechny studované kultury patří k druhu *Acinetobacter lwoffii/junii*. Jedná se o gramnegativní kokovité až kokotyčinkovité bakterie.

Provedené testy v rámci této práce ukázaly, že dříve získané bakteriální kultury rostoucí na fenolu při  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  sice nedisponují schopností využívat širší škálu dalších organických polutantů, některé z nich však přece jenom mohou na určitých lineárních uhlovodících růst. Jejich utilizace tetradekanu a hexadekanu naznačují možnost rozkladu ještě delších uhlovodíků, která by měla být otestována, a zároveň nabízí práce na zmapování jejich schopnosti růstu na uhlovodících mezi teplotami  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , např. při mírně chladných teplotách mezi 10 až  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AISLABIE, Jackie, Julia FOGHT a David SAUL, 2000. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica. *Polar Biology*. 183-188.
2. DHAKAR, Kusum a Anita PANDEY, 2020. Microbial Ecology from the Himalayan Cryosphere Perspective. *Microorganisms* [online]. **2020**(8), 257 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020257>
3. DHAULANIYA, Amit et al., 2018. Cold survival strategies for bacteria, recent advancement and potential industrial applications. *Archives of Microbiology* [online]. **2019**(201), 1-16 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1602-3>
4. FAROOQ, Saleem et al., 2021. Psychrophilic and psychrotrophic bacterial diversity of Himalayan Thajwas glacial soil, India. *Biologia*. **2022**(77), 203-213.
5. HU, Weigang et al., 2015. The microbial diversity, distribution, and ecology of permafrost in China: a review. *Extremophiles* [online]. **2015**(19), 693-705 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0749-y>
6. LI YIN LEE, Gillian et al., 2017. Biodegradation of phenol by cold-adapted bacteria from Antarctic soils. *Polar Biol* [online]. **2018**(41), 553-562 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2216-y>
7. LINHARTOVÁ, Karolína, 2023. *Studium psychrofilních bakterií rostoucích na fenolu*. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
8. LO GIUDICE, Angelina a Renato FANI, 2015. Cold-adapted bacteria from a coastal area of the Ross Sea (Terra Nova Bay, Antarctica): linking microbial ecology to biotechnology. *Hydrobiologia*. **2015**(761), 417-441.
9. MARGESIN, Rosa, Christoph MOERTELMAIER a Johannes MAIR, 2012. Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. **2013**(84), 185-191 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.004>
10. NÚÑEZ-MONTERO, Kattia a Leticia BARRIENTOS, 2018. Advances in Antarctic Research for Antimicrobial Discovery: A Comprehensive Narrative Review of Bacteria from Antarctic Environments as Potential Sources of Novel Antibiotic Compounds Against Human Pathogens and Microorganisms of Industrial

- Importance. *Antibiotics* [online]. **2018**(7), 90 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040090>
11. SEDLÁČEK, Ivo, 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-4207-9.
  12. SHIVAJI, Sisinthy, Madhab CHATTOPADHYAY a Gundlapally REDDY, 2019. Diversity of Bacteria from Antarctica, Arctic, Himalayan Glaciers and Stratosphere. *Proc Indian Natn Sci Acad.* **2019**(85), 909-923.
  13. WEI, Qingyi et al., 2019. Rapid detection and control of psychrotrophic microorganisms in cold storage foods: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **2019**(86), 453-464 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.009>
  14. YUAN, Lei et al., 2019. Insights into Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk: A Review. *Journal of Food Protection* [online]. **82**(7), 1148-1159 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-032>



## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1A, 5A, 5B, 6A, 6B, 12A, 6Atet      pracovní označení kultur

CFU    colony forming units – jednotky tvořící kolonie

MM    minerální médium

R2A    název agaru pro kultivaci buněk

TYA    Tryptone yeast extract agar

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Degradace 0,5 g/l fenolu kmeny AQ5-05 (plný diamant), AQ5-06 (plný trojúhelník) a AQ5-07 (plný kruh) při teplotě 10 °C (Li Yin Lee a kol., 2017).....	33
Obrázek 2 Vliv teploty na růst kmenů AQ5-05 (černý sloupec), AQ5-06 (světle šedý sloupec) a AQ5-07 (tmavě šedý sloupec), a na degradaci fenolu kmeny AQ5-05 (plný diamant), AQ5-06 (plný trojúhelník) a AQ5-07 (plný kruh) při teplotě 10 °C (Li Yin Lee a kol., 2017).....	34
Obrázek 3 Vliv teploty relativní degradaci <i>n</i> -alkanů kmenem <i>Rhodococcus cercidiphyllus</i> BZ22. Počáteční koncentrace každého alkanu byla 700 mg/l (Margesinová, Moertelmaier a Mair, 2012).....	35
Obrázek 4 Degradace fenolu při teplotě 15 °C. Šipky označují přídavky fenolu. (Margesinová, Moertelmaier a Mair, 2012).....	35
Obrázek 5 Vliv teploty na rozklad fenolu kmenem <i>Arthrobacter sulfureus</i> BZ73 (Margesinová, Moertelmaier a Mair, 2012).....	36
Obrázek 6 Vybrané hodnoty zákalu zkumavek s kulturami 1A, 6A a 12A při růstu na tetradekanu. Světlé barvy pro teplotu 23 °C, tmavé barvy pro teplotu 8 °C.....	50
Obrázek 7 Počet CFU/ml ve vybraných kultivačních lahvích. Rychle rostoucí kultura 6A je označena jako 6Atet.....	52
Obrázek 8 Logaritmus počtu CFU/ml ve vybraných kultivačních lahvích. Rychle rostoucí kultura 6A je označena jako 6Atet.....	53
Obrázek 9 Optická densita zkumavek variant kultury 6A v rozmezí 77 dnů inkubace.....	55

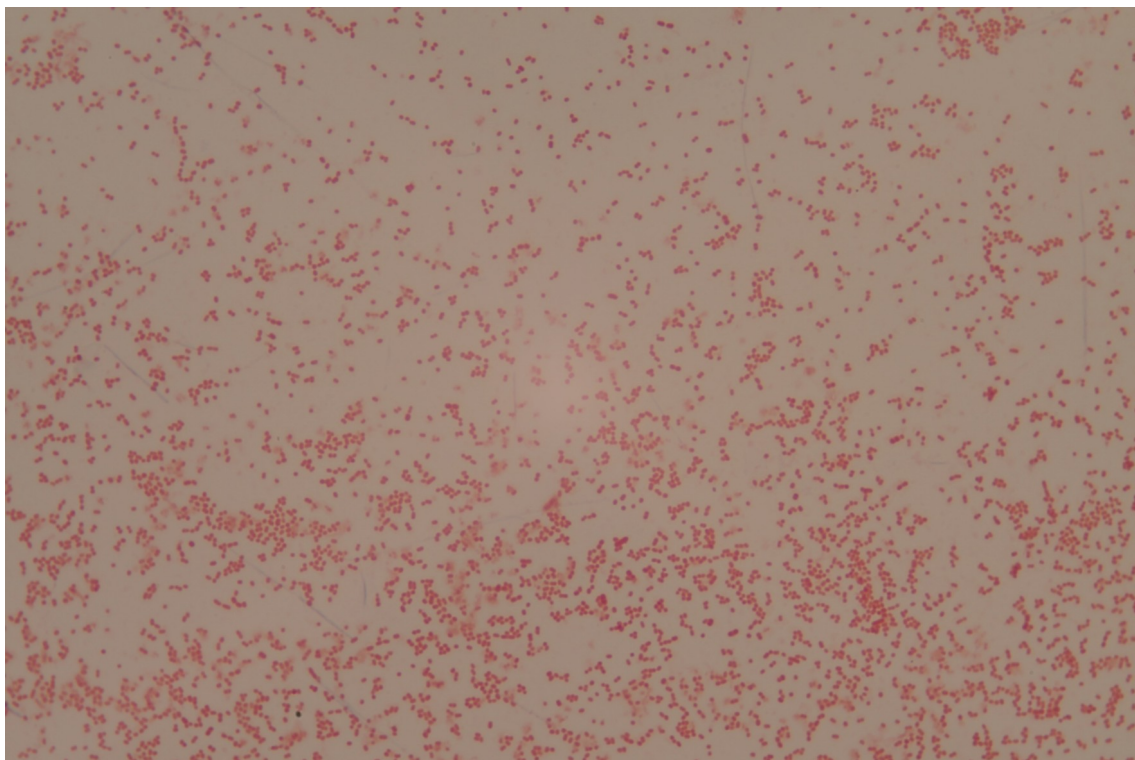
**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Běžné psychrotrofní bakterie a jejich přidružená onemocnění (Wei a kol., 2019)	17
Tabulka 2 Růst kmenů na monoaromatických, polyaromatických a lineárních uhlovodících (Aislabie, Foght a Saul, 1999)	32
Tabulka 3 Růst kultur při 8 °C po 1 dni	44
Tabulka 4 Růst kultur při 8 °C po 2 dnech	44
Tabulka 5 Růst kultur při 8 °C po 5 dnech	44
Tabulka 6 Růst kultur při 8 °C po 7 dnech	45
Tabulka 7 Růst kultur na toluenu	45
Tabulka 8 Růst kultur na oktanu	45
Tabulka 9 Růst kultur na hexadekanu	46
Tabulka 10 Růst kultur na resorcinolu	46
Tabulka 11 Růst kultur na N-methyl 2-pyrrolidonu	47
Tabulka 12 Růst kultur 1A a 12A na hexadekanu při 23 °C a 8 °C	48
Tabulka 13 Růst kultury 6A na hexadekanu při 23 °C	48
Tabulka 14 Růst kultur 1A, 6A a 12A na dekanu	49
Tabulka 15 Růst kultur 1A, 6A a 12A na dodekanu	49
Tabulka 16 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu	50
Tabulka 17 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu při 8 °C, odečet při nasazení	51
Tabulka 18 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu při 8 °C, 22. den inkubace	52
Tabulka 19 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu při 8 °C, 37. den inkubace	52
Tabulka 20 Růst kultur 1A, 6A a 12A na tetradekanu při 8 °C, 50. den inkubace	52
Tabulka 21 Optická densita varianty 6A80	54
Tabulka 22 Optická densita varianty 6ATET1	55
Tabulka 23 Optická densita varianty 6ATET2	55

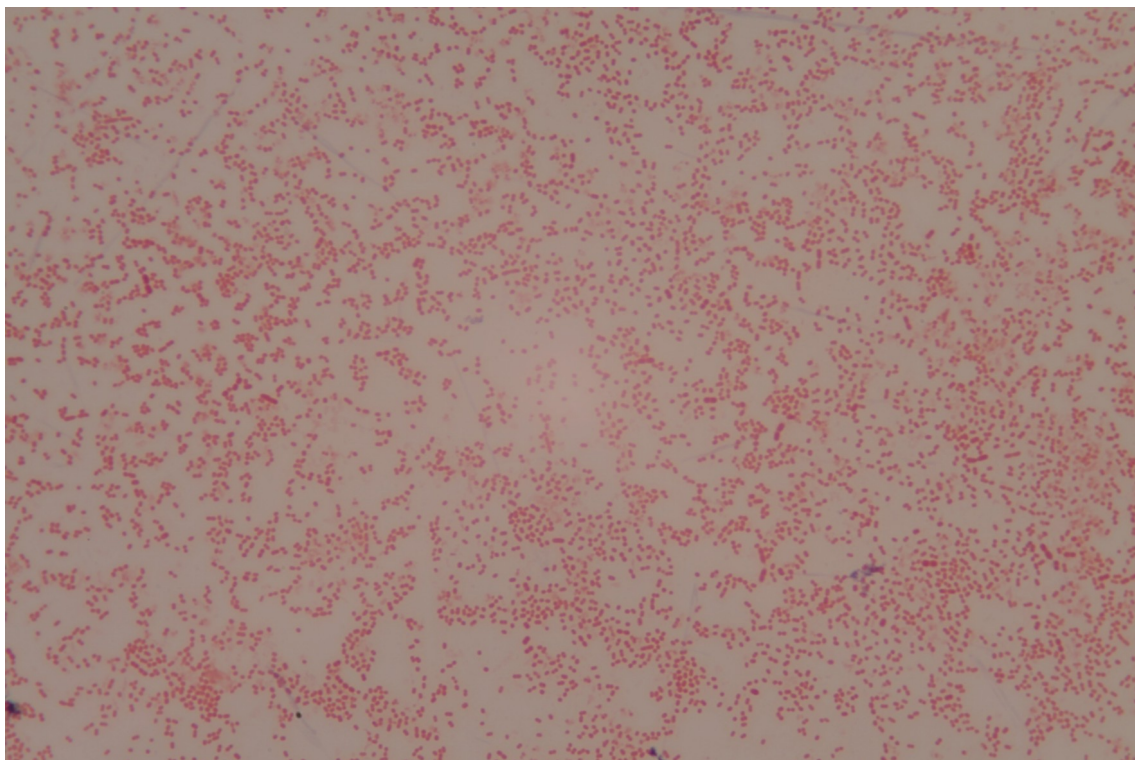
## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: mikroskopie a Gramovo barvení

## PŘÍLOHA P I: MIKROSKOPIE A GRAMOVO BARVENÍ

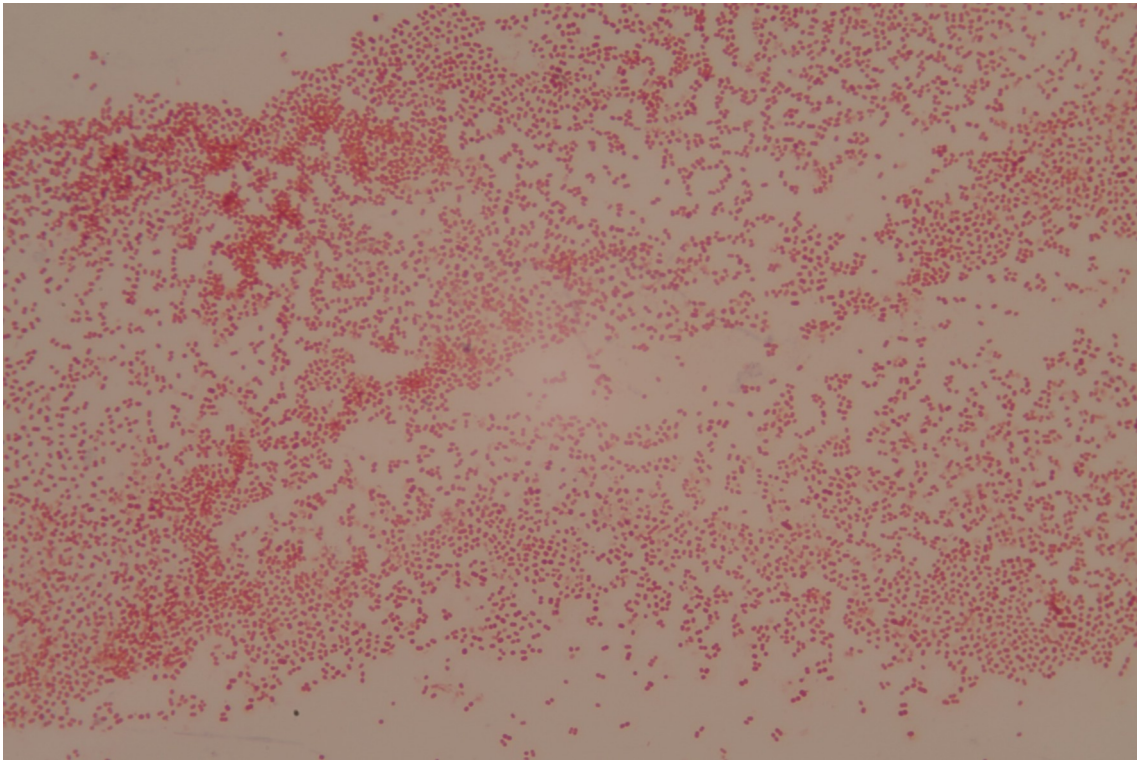


Kultura 1A

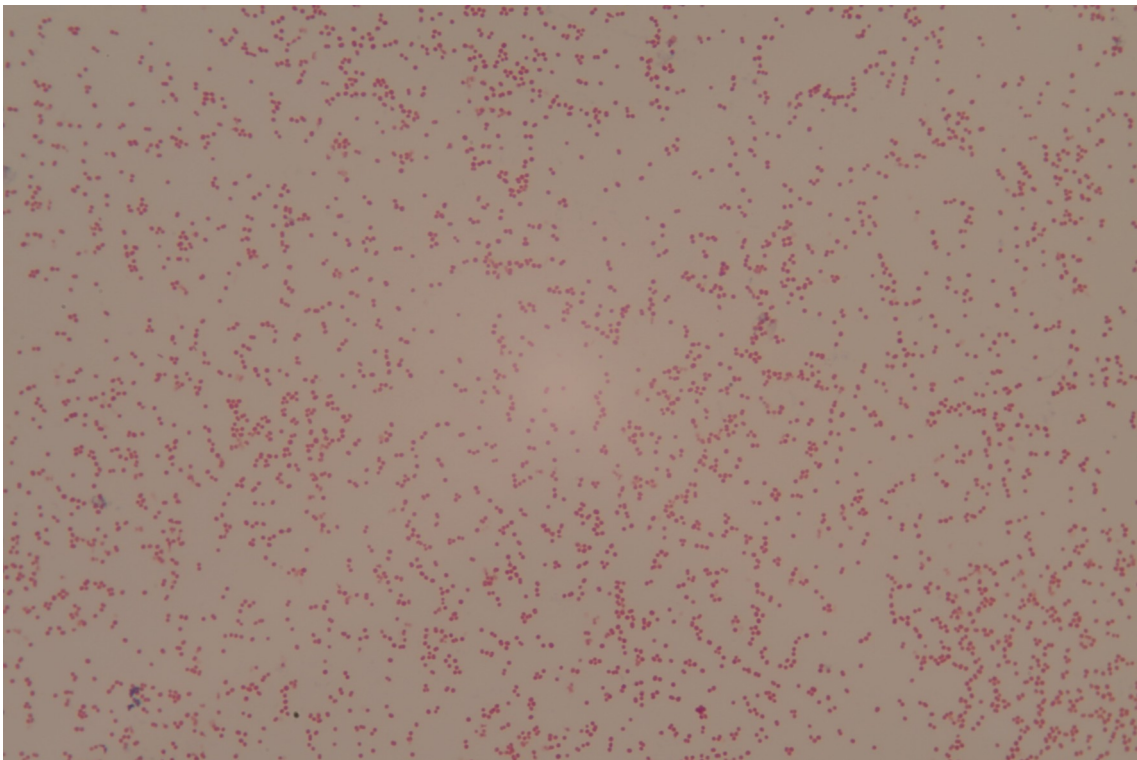


Kultura 1A

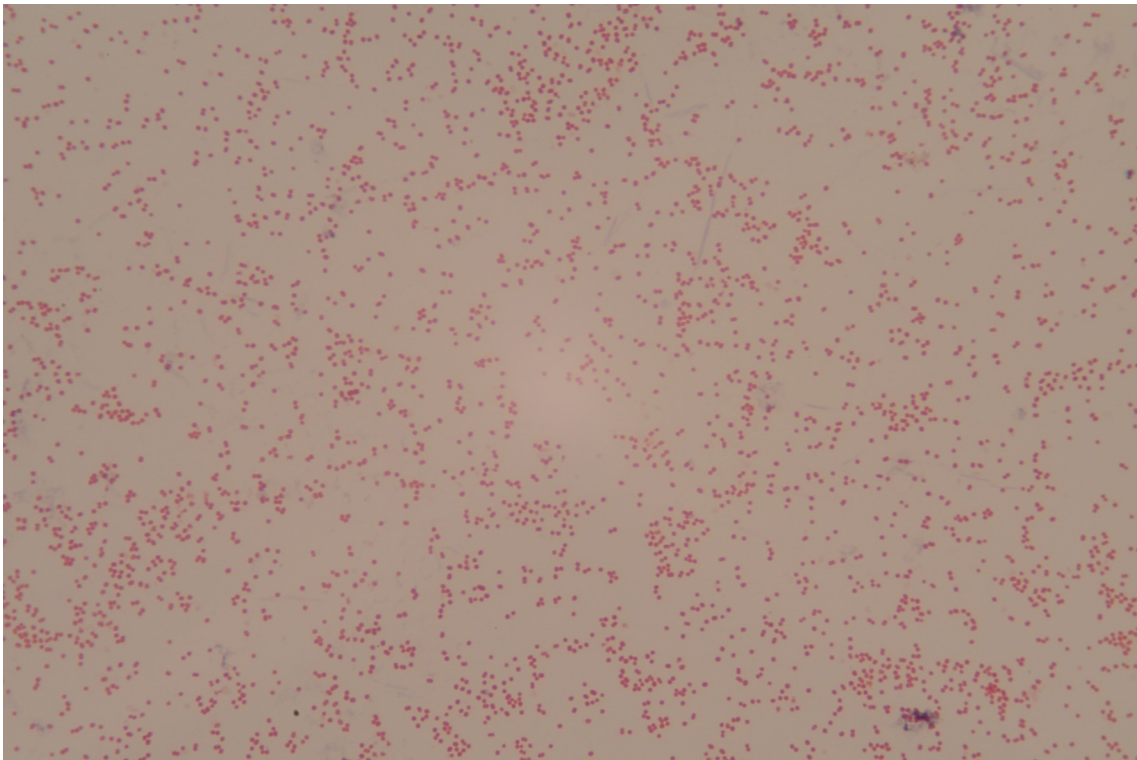




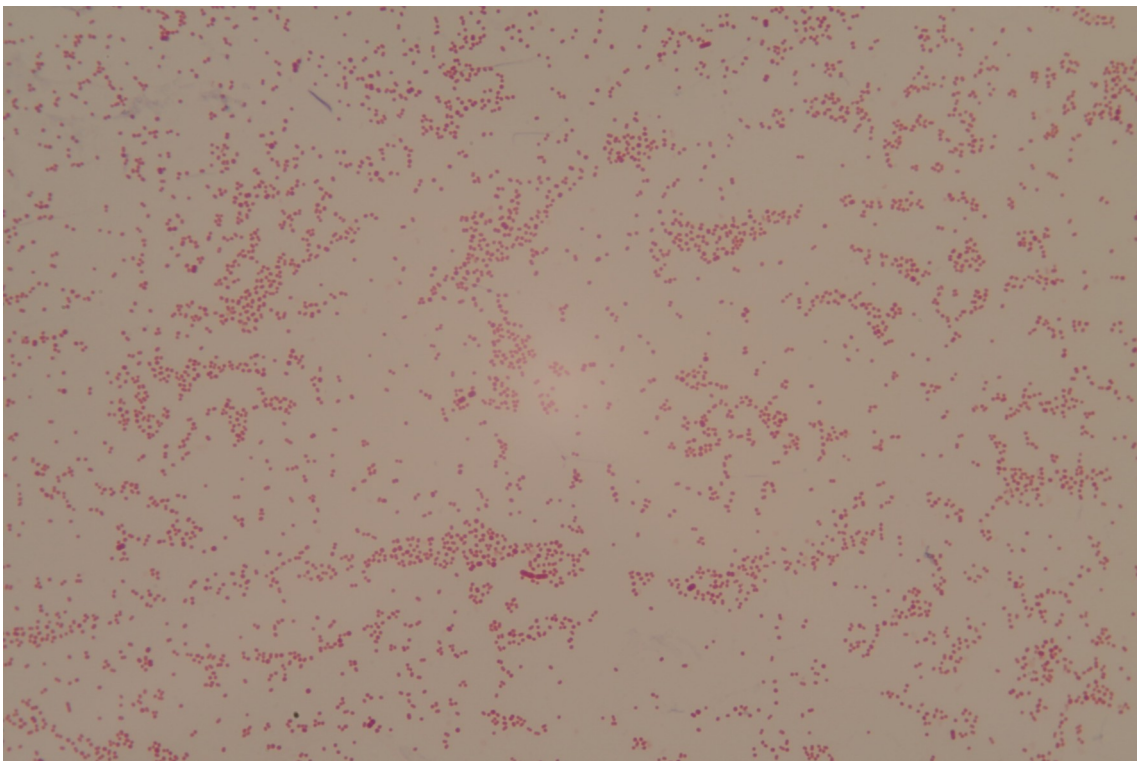
Kultura 5A



Kultura 6A



Kultura 6B



Kultura 12A