

Screening dekarboxylasové aktivity u bakterií využívaných v biodegradacích

Jitka Bakalová

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jitka Bakalová**
Osobní číslo: **T14366**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Screening dekarboxylasové aktivity u bakterií
využívaných v biodegradacích**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat literární rešerši, která se bezprostředně týká zadaného tématu.
2. Izolovat vhodné biodegradéry v různých biotických prostředích.
3. Provést screening dekarboxylasové aktivity (na kultivačním médiu, s jednotlivými aminokyselinami).
4. Teorii a zjištěné poznatky sepsat do formy bakalářské práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vědecké databáze (Web of Science, Science Direct, PubMed), vědecká a odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání bakalářské práce:

22. května 2015

Ve Zlíně dne 10. února 2015

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan



doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno: BAKALOVÁ JITKA

Obor: IOŽP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 21.5.2015

Bakalová

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky s významnými biologickými účinky. Vznikají převážně dekarboxylací aminokyselin. Kvůli svým toxickým účinným jsou sledovány především v potravinách. Předkládaná práce je zaměřena na studium dekarboxylasové aktivity u bakterií vyskytujících se v biotických prostředích. Bylo izolováno celkem 61 bakteriálních kmenů z půdy a stojaté povrchové vody. Identifikace jednotlivých kmenů byla provedena technikou MALDI/TOF. Podařilo se identifikovat 36 izolovaných bakterií, z nich 44 % patřilo do rodu *Bacillus*. Screening dekarboxylasové aktivity bakterií byl realizován kultivační metodou. Významnou dekarboxylační aktivitu izolovaných bakterií potvrdilo i následné stanovení produkce jednotlivých biogenních aminů metodou HPLC – UV/Vis. Nejčastěji byl detekován spermin (v desítkách mg.l^{-1}) a spermidin (v jednotkách mg.l^{-1}). Obzvláště vysoká byla schopnost bakterií tvořit tyramin (ve stovkách mg.l^{-1}). Žádný ze sledovaných kmenů neprodukoval histamin a tryptamin.

Klíčová slova: biogenní aminy, dekarboxylace, HPLC – UV/Vis, MALDI/TOF.

ABSTRACT

Biogenic amines (BAs) are low molecular weight nitrogen compounds with significant biological effects. They are usually produced by decarboxylation of aminoacids. Because of their toxic effects, BAs are monitored especially in food. Presented thesis concentrates on screening of decarboxylase activity of environmental bacteria. 61 bacterial strains were isolated from soil and standing surface freshwater. The identification of the particular strains was made by the MALDI/TOF technique. We managed to identify 36 isolated bacteria, 44 % of them belonged to the genus *Bacillus*. Screening of decarboxylase activity of the bacteria was realised by the cultivation method. Significant decarboxylation activity was confirmed by HPLC – UV/Vis analysis. Spermine (tens of mg.l^{-1}) and spermidine (units of mg.l^{-1}) were the most frequently detected BAs. The ability of bacteria to produce tyramine was especially high (hundreds of mg.l^{-1}). None of the isolated bacteria produced histamine and tryptamine.

Keywords: biogenic amines, decarboxylation, HPLC – UV/Vis, MALDI/ TOF.

Ráda bych na tomto místě poděkovala zejména vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Petře Jančové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, cenné rady a připomínky. Dále pak doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné rady, doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a Ing. Ludmile Zálešákové z Ústavu technologie potravin FT UTB ve Zlíně za spolupráci při identifikaci metabolitů pomocí HPLC – UV/Vis, Mgr. Attilovi Kántorovi ze Slovenské poľnohospodárskej univerzity v Nitře za spolupráci při identifikaci bakteriálních kmenů pomocí MALDI/TOF a Lence Machálkové a Bc. Veronice Kučabové za trpělivost a ochotnou pomoc během práce v mikrobiologické laboratoři.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům a sourozencům za velkorysou podporu, kterou mi během celého studia poskytovali.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 AMINY	12
1.1 BIOGENNÍ AMINY	12
1.2 DEKARBOXYLASOVÁ AKTIVITA.....	13
1.3 BIOLOGICKÉ ÚČINKY	15
1.3.1 Karcinogenní účinky	15
1.3.2 Detoxikace v lidském organismu	16
1.3.3 Fyziologie a metabolismus rostlin	17
1.3.4 Toxicita pro živé organismy.....	17
1.4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ	17
1.4.1 V potravinách	17
1.4.2 V biotickém prostředí.....	18
2 BAKTERIE	19
2.1 STAVBA BAKTERIÁLNÍ BUŇKY.....	20
3 MIKROBIÁLNÍ PROSTŘEDÍ PŮD A SLADKÝCH VOD	22
3.1 MIKROBIÁLNÍ PROSTŘEDÍ SLADKÝCH VOD	22
3.2 MIKROBIÁLNÍ PROSTŘEDÍ PŮD.....	23
4 ÚLOHA MIKROORGANISMŮ V BIODEGRADAČNÍM PROCESU	24
4.1 AEROBNÍ BIODEGRADACE	24
4.2 ANAEROBNÍ BIODEGRADACE.....	24
4.2.1 Faktory ovlivňující rozložitelnost substrátu	25
II PRAKTICKÁ ČÁST	27
5 CÍL PRÁCE	28
6 PRACOVNÍ POSTUPY	29
6.1 MATERIÁLNÍ VYBAVENÍ	29
6.1.1 Chemikálie	29
6.1.2 Přístrojové vybavení a ostatní pomůcky	30
6.2 ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ	30
6.2.1 Kultivace půdních bakterií	31
6.2.2 Kultivace bakterií z povrchové vody	31
6.3 CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ	31
6.3.1 Morfologické znaky kolonií.....	32
6.3.2 Barvení podle Grama	32
6.3.3 Oxidasový test	33
6.3.4 Katalasový test	33
6.4 IDENTIFIKACE BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ POMOCÍ MALDI/TOF.....	34
6.5 STANOVENÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	34
6.5.1 Screening dekarboxylasové aktivity u bakterií kultivační metodou	34
6.5.2 Stanovení biogenních aminů pomocí HPLC – UV/Vis	35

7	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
7.1	CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ	37
7.2	IDENTIFIKACE BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ POMOCÍ MALDI/TOF	42
7.3	SCREENING DEKARBOXYLASOVÉ AKTIVITY U BAKTERIÍ KULTIVAČNÍ METODOU	43
7.4	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ POMOCÍ HPLC – UV/VIS	47
	ZÁVĚR	50
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	57
	SEZNAM OBRÁZKŮ	59
	SEZNAM TABULEK	60
	SEZNAM PŘÍLOH	61

ÚVOD

Biogenní aminy jsou dusíkaté látky s významnými biologickými účinky vznikající převážně dekarboxylací aminokyselin. Přestože jsou do jisté míry pro člověka nepostradatelné, jelikož tvoří řadu stavebních látek, hormonů nebo prekursorů jiných důležitých sloučenin, ve větším množství je lidský organismus nezládá odbourat přirozenou cestou a mohou tak působit značné zdravotní obtíže [1, 2, 3].

Vzhledem k tomu, že velká část mléčných a hnilobných bakterií přirozeně se vyskytujících v potravinách vykazuje dekarboxylasovou aktivitu, vytváří se ve zrajících, fermentovaných a kazících se produktech vysoké množství biogenních aminů. Z toho důvodu se právě množství těchto látek v daných potravinách stává ukazatelem jejich kvality. Široká skupina odborníků se zabývá stanovováním biogenních aminů v nejrůznějších druzích potravin [1, 4].

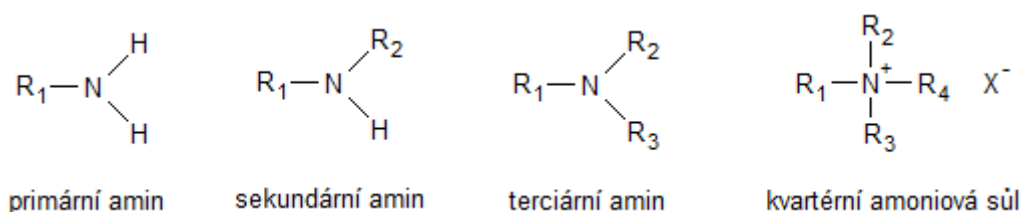
Studium produkce biogenních aminů ve složkách životního prostředí podle dostupných informací dosud neproběhlo. Ačkoli toxikologické hledisko biogenních aminů nejspíš nepředstavuje výrazné riziko pro životní prostředí, jedná se o význačné prekursory karcinogenních nitrosaminů a tudíž mohou znamenat riziko kontaminace např. pitné vody [5].

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium dekarboxylasové aktivity u bakterií přirozeně se vyskytujících v biotických prostředích (tzv. biodegradérů), a to konkrétně na jejich schopnost produkovat stejné biogenní aminy (histamin, putrescin, tyramin, tryptamin, kadaverin, agmatin a fenylethylamin), které nejčastěji vytvářejí bakterie s dekarboxylasovou aktivitou izolované z potravin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 AMINY

Aminy jsou organické sloučeniny obsahující atom dusíku s volnými elektronovými páry. Na rozdíl od amoniaku je atom dusíku substituován jednou nebo více alkylovými či arylovými skupinami, přičemž počet takto navázaných substituentů určuje, zda se jedná o primární amin, sekundární amin, terciární amin nebo kvartérní amoniový kation NR_4^+ , který se vyskytuje ve formě solí (viz obr. 1) [6].



Obr. 1: Obecná struktura aminů.

Existuje celá řada významných aminových sloučenin, které mají využití v různých odvětvích průmyslu, ale také řada aminů vznikajících působením živých organismů. Tato skupina aminů bývá označovaná jako tzv. biogenní aminy.

1.1 Biogenní aminy

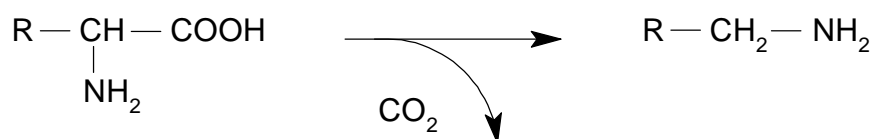
Biogenní aminy jsou dusíkaté nízkomolekulární látky, které vznikají metabolickými činnostmi rostlin, zvířat a mikroorganismů. Mají četné biologické účinky. Jsou součástí různých metabolických pochodů, působí jako hormony, stavební látky nebo jako prekursory dalších významných sloučenin.

Podle chemické struktury se dělí na:

- alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin),
- aromatické (tyramin, fenylethylamin),
- heterocyklické (histamin, tryptamin),
- polyaminy (putrescin, spermidin, spermin) [1].

1.2 Dekarboxylasová aktivita

Dekarboxylace je chemická reakce, během které dochází k odštěpení molekuly oxidu uhličitého ze substrátu. Je katalyzovaná enzymem dekarboxylasou, který se řadí do skupiny lyas a jeho koenzymem je například pyridoxal-5-fosfát (vitamin B6) [7]. Jak je uvedeno na obr. 2, je-li substrátem aminokyselina, odštěpuje se oxid uhličitý z její karboxylové skupiny a dochází ke vzniku aminu.



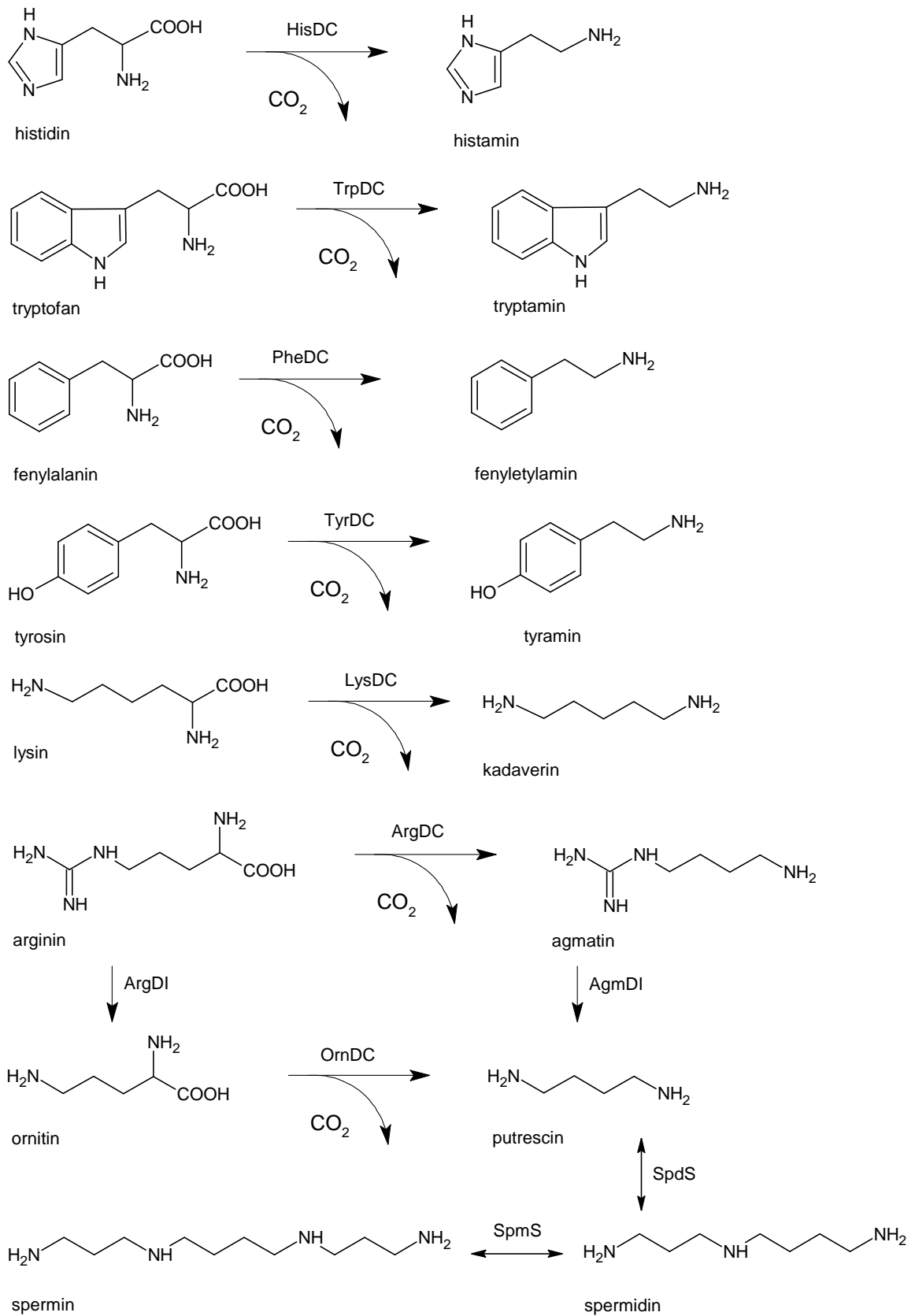
Obr. 2: Obecné schéma dekarboxylace aminokyseliny.

Tímto mechanismem vzniká převážná většina biogenních aminů. Jedná se např. o histamin, tryptamin, fenylethylamin, tyramin, kadaverin nebo agmatin, který vzniká dekarboxylací argininu. Arginin ale může být zároveň působením bakterií degradován na ornitin, jehož následnou dekarboxylací se tvoří putrescin. Putrescin je zároveň prekursorem dvou alifatických polyaminů – sperminu a spermidinu [1, 8]. Schémata vzniku nejčastěji se vyskytujících biogenních aminů jsou uvedena na obr. 3.

Podmínky tvorby biogenních aminů:

- přítomnost aminokyselin,
- přítomnost mikroorganismů s dekarboxylasovou aktivitou,
- výhodné vnější podmínky pro růst mikroorganismů,
- pozitivní předpoklady pro činnost dekarboxylačních enzymů.

Faktory ovlivňující dekarboxylasovou aktivitu tedy závisí především na vytvoření příhodných podmínek k udržení životaschopnosti jednotlivých bakterií a činnosti enzymů. Proto je důležitá zejména hodnota pH, teplota, přístup kyslíku, dostupnost zdrojů živin, fáze růstu, ve které se buňky nacházejí nebo koncentrace NaCl [9, 10, 11]. Např. nejvyšší koncentrace biogenních aminů byly stanoveny v prostředích s mírně kyselým pH [11]. Některé biogenní aminy však mohou vznikat aminací ketonů nebo aldehydů [5].



Obr. 3: Schéma vzniku jednotlivých biogenních aminů.

AgmDI – agmatindeiminasa, ArgDC – arginindekarboxylasa, ArgDI – arginindeiminasa, HisDC – histidindekarboxylasa, LysDC – lysinidekarboxylasa, PheDC – fenylalaninidekarboxylasa, OrnDC – ornitinidekarboxylasa, SpdS – spermidin-synthasa, SpmS – sperminsynthasa, TrpDC – tryptofandekarboxylasa, TyrDC – tyrosinidekarboxylasa.

1.3 Biologické účinky

Biogenní aminy jako např. histamin, tyramin nebo putrescin, jsou nezbytné pro zajištění důležitých funkcí v lidském organismu. Dostanou-li se však ve větším množství do oběhového systému, mají toxické účinky. Některé přímo škodlivě nepůsobí, ale mohou zesilovat nežádoucí účinky jiných aminů [12].

Podle svého vlivu na organismus se biogenní aminy dělí na:

- psychoaktivní látky,
- vazoaktivní látky.

Mezi tzv. psychoaktivní aminy, které působí v centrálním nervovém systému jako neurotransmitéry, se řadí dopamin, serotonin, tyramin a histamin [1, 13]. Některé biogenní aminy bývají často spojovány s migrénami. Jedná se např. o tyramin, tryptamin a fenylethylamin [13]. Látky vazoaktivního charakteru zahrnují převážně aromatické aminy, které způsobují zúžení cév, kapilár a tepen (např. tyramin), zatímco aminy s alifatickou strukturou naopak vyvolávají jejich rozšíření [14].

Sloučeninou s nejvýraznějšími biologickými účinky je histamin, který nejen že je významnou vazoaktivní látkou a způsobuje dilataci periferních cév, kapilár a tepen, což vede k hypotenzi, návalům horka a bolestem hlavy, ale způsobuje také kontrakce hladkého svalstva, což má za následek křeče v břiše, průjem a zvracení. Zároveň spolu s tyraminem působí v těle člověka a zvířat jako hormonální mediátor. Otravu histaminem ještě zesiluje přítomnost sekundárních aminů, jejichž primární biologické účinky se nezdají tolik významné (např. putrescin a kadaverin) [1, 15].

1.3.1 Karcinogenní účinky

Polyaminy, kadaverin a některé další biogenní aminy vytváří reakcí s dusitany karcinogenní nitrosaminy, které ohrožují nejen člověka, ale i různé druhy zvířat [1, 15]. Např. spermidin nebo putrescin mohou v kyselém prostředí reagovat s kyselinou dusitou za vzniku *N*-nitrosopyrrolidinu. Zároveň se ukazuje, že putrescin podporuje maligní transformaci buněk. Jeho zvýšené koncentrace oproti běžné tkáni, byly nalezeny ve tkáních postižených rakovinou žaludku. Zvýšené koncentrace dalších polyaminů byly zjištěny ve tkáních tlustého střeva zasažených rakovinou [16]. Spermidin má také vliv na tvorbu

N-nitrosodimethylaminu [12]. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikovala *N*-nitrosodimethylamin a *N*-nitrosodiethylamin jako pravděpodobné karcinogeny pro člověka (kategorie karcinogenů 2A) a *N*-nitrosomethylethylamin, *N*-nitrosopyrrolidin, *N*-nitrosomorfolin, *N*-nitrosopiperidin, *N*-nitrosodi-*n*-propylamin a *N*-nitrosodi-*n*-butylamin jako podezřelé karcinogeny pro člověka (kategorie karcinogenů 2B) [17, 18].

1.3.2 Detoxikace v lidském organismu

U zdravých jedinců je vysoký obsah biogenních aminů v organismu snižován přirozeným odbouráváním ve střevech a játrech činností řady enzymů. Jako příklady enzymů, které se podílejí na odbourávání biogenních aminů lze uvést:

- monoaminoxidasu (MAO) – katalyzuje např. deaminaci tyraminu a fenylethylaminu
 - MAO – A (deaminuje aminy, které mají ve struktuře vedle aromatického jádra polární funkční skupiny)
 - MAO – B (deaminuje aminy, které mají ve struktuře vedle aromatického jádra nepolární funkční skupiny)
- diaminoxidasu (DAO) – deaminuje např. histamin a putrescin [19, 20],
- histamin *N*-methyltransferasu (HNMT) – je druhým nejdůležitějším enzymem inaktivující histamin; cytosolický enzym, který specificky methyloje imidazolový kruh histaminu a strukturně podobných sloučenin,
- indolethylamin *N*-methyltransferasu (INMT) – katalyzuje *N*-methylovaní tryptaminu a strukturně podobných sloučenin [21].

U alergických jedinců nebo při velkém množství biogenních aminů v organismu může dojít k zahlcení enzymatických systémů a mohou se projevit příznaky intoxikace. Některé biogenní aminy (např. putrescin, kadaverin, spermin nebo spermidin) nemají nežádoucí účinky, ale zablokováním enzymatických systémů mohou snižovat katabolismus toxických aminů a působit tak škodlivě na organismus [2, 3, 22]. Inhibiční efekt na činnost zmíněných enzymů mohou mít také některé druhy léků (např. antihistaminika, antimalarika nebo psychofarmaka) [20].

Stanovit přesnou hodnotu toxické dávky je ale obtížné. Závisí totiž na účinnosti detoxikačních mechanismů každého jedince. V případě biogenních aminů vyskytujících se v alkoholických nápojích je třeba brát zřetel i na zvýšené množství alkoholu v organismu,

po požití těchto nápojů, jelikož znemožňuje správné fungování detoxikačních pochodů [14].

1.3.3 Fyziologie a metabolismus rostlin

Putrescin, spermin a spermidin mají významné biologické účinky také v rostlinných organismech, kde se účastní morfogeneze, diferenciace květů, růstu kořenů, vývoje plodů, embryogeneze a také působí proti stárnutí [23]. Některé aminy jsou také příčinou výrazných chutí či vůní, jež jsou spojeny s určitými druhy rostlin nebo rozkládajícími se organismy [5].

1.3.4 Toxicita pro živé organismy

Vzhledem k nedostatku studií biogenních aminů ve vztahu k životnímu prostředí lze jen těžko vyvozovat závěry, ale na základě několika experimentů se předpokládá, že většina aminů je netoxická pro ryby a bezobratlé živočichy, zatímco některé aminy vykazují mírnou až střední akutní toxicitu vůči fytoplanktonu a některým druhům bakterií. Např. smrtelná koncentrace (LC_{50}) pro bakterie *Vibrio fischeri* je v literatuře uváděna v rozmezí od 6 mg.l^{-1} (pro monoethanolamin) do 36 mg.l^{-1} (pro methyldiethanolamin) [5].

1.4 Výskyt biogenních aminů

1.4.1 V potravinách

Na základě prováděných výzkumů a studií bylo prokázáno, že se biogenní aminy ve velké míře vyskytují v potravinách jak rostlinného, tak i živočišného původu. Např. v mase a masných výrobcích [24], mléce a mléčných výrobcích, zejména pak v sýrech [25], dále v zelenině, ovoci [26, 27, 28] a z něj vyráběných džusech [29], sóji [2], čokoládě [28, 30], octu [31], houbách [32], ořechách [15, 28] a alkoholických nápojích jako je pivo [33] a víno [3]. A to převážně jako důsledek používání nekvalitních syrových surovin, znečištění nebo nevhodných podmínek při zpracování a skladování potravin [1].

Nejčastěji se vyskytujícími biogenními aminy v potravinách jsou histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin, spermidin a spermin [4].

1.4.2 V biotickém prostředí

Aminy se v životním prostředí nachází ve vyšší míře, přičemž do něj vstupují několika možnými cestami. Nejjednodušším způsobem je šíření aminů formou výkalů a moči živočichů a výměšků mikroorganismů a zároveň jako produkty degradace proteinů a dusíkatých sloučenin vypouštěných do městských odpadních vod. Dále pak fotochemickým nebo biologickým štěpením z huminových látek nebo při zachycování emisí CO₂ během výroby elektrické energie z fosilních paliv, kdy dochází k úniku monoethanolaminu. Významným činitelem je i chemický průmysl (a to především farmaceutický), kde aminy vznikají jako meziprodukty výroby, např. při syntéze pesticidů [5, 17, 18].

Podle výsledků uváděných v literatuře, dochází k překročení koncentrace aminů (10 µg.l⁻¹) v povrchových vodách jen zřídka. Zejména v oblastech ovlivněných lidskou činností dosahují jejich koncentrace až několik desítek mg.l⁻¹ [5].

K nejčastěji se vyskytujícím aminům v biotických prostředích patří zejména methylamin, dimethylamin, ethylamin, diethylamin a monoethylamin. V nižších koncentracích (maximálně několik desítek µg.l⁻¹) se vyskytují např. morfolin, piperazin, piperidin, pyrrolidin, *n*-propylamin, *n*-butylamin nebo methylethylamin. A v koncentracích menších než 0,1 µg.l⁻¹ pak např. *n*-pentylamin, *n*-hexylamin nebo difenylamin [5].

V současnosti se vědecké skupiny hojně zabývají sledováním *N*-nitrosodimethylaminu, který byl klasifikován jako pravděpodobný karcinogen. Vzniká totiž jako vedlejší produkt během chloraminace nebo chlorace v přítomnosti amoniaku v čistírnách odpadních vod. Jeho prekurzory jsou např. dimethylamin nebo trimethylamin [17, 34].

2 BAKTERIE

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotní organismy. Jejich velikost je charakteristická pro jednotlivé rody a závisí také na stáří buňky (mladší buňky jsou větší, než starší). Koky mívají průměr od 0,5 do 5,5 μm a rozměry tyčinkovitých bakterií bývají v rozmezí 1 – 5 μm (délka) a 0,2 – 1 μm (šířka) [35, 36]. Jsou nejrozšířenější skupinou organismů, které se vyskytují na nejrůznějších stanovištích. V ovzduší, půdě, vodě, na povrchu i uvnitř mnohobuněčných organismů, ale také třeba ve vroucích pramenech. Jejich rozmanitost se projevuje i v nárocích na optimální prostředí pro růst [35, 37].

Podle vztahu k pH rozlišujeme bakterie na:

- *alkalofilní* – rostoucí v zásaditém prostředí, tedy v prostředí s vyšším pH ($\text{pH} > 8$),
- *neutrofilní* – vyžadující ke svému růstu hodnoty blízké neutrálnímu pH ($\text{pH} 6 - 8$),
- *acidofilní* – dobře snášející kyselé prostředí ($\text{pH} < 6$).

Podle optimální teploty rozlišujeme:

- *psychrofilní (chladnomilné)* – nejlépe rostou za nižších teplot od 10 do 20 $^{\circ}\text{C}$, ale dokážou se rozmnožovat až v intervalu od -5 do 30 $^{\circ}\text{C}$, nachází se v hlubokých vodách;
- *mezofilní* – ideální teplotou pro jejich růst je 37,5 $^{\circ}\text{C}$, ale postačí teplota od 20 do 40 $^{\circ}\text{C}$;
- *termofilní (teplomilné)*:
 - *striktně termofilní* – jejich optimální teplota růstu se pohybuje okolo 55 $^{\circ}\text{C}$, rostou maximálně při 80 $^{\circ}\text{C}$, při teplotě pod 30 $^{\circ}\text{C}$ nerostou;
 - *fakultativně termofilní* – ideálně rostou při 45 – 55 $^{\circ}\text{C}$, aktivní jsou i při teplotách pod 30 $^{\circ}\text{C}$ a růst jsou schopny až do 75 $^{\circ}\text{C}$.

Poklesem teploty pod 0 $^{\circ}\text{C}$ se v buňkách začínají vytvářet krystaly ledu, které je poškozují. Avšak dojde-li k tomuto poklesu velmi rychle, začnou se v buňkách tvořit jenom malé krystalky a k poškození nedochází [36].

Podle nároku na kyslík rozlišujeme bakterie:

- *aerobní* – vyžadují koncentrace atmosférického kyslíku;
- *mikroaerofilní* – vyžadují přítomnost kyslíku jen v nízkých koncentracích, přičemž vyššími koncentracemi jsou ničeny;
- *fakultativně anaerobní* – preferují růst za přístupu vzduchu, ale dokážou se přizpůsobit prostředí a růst i bez přístupu ke kyslíku;
- *aerotolerantní* – jsou schopné tolerovat nízké koncentrace kyslíku;
- *striktně anaerobní* – žijí pouze v prostředí bez přístupu ke kyslíku.

Podle nároků na zdroj uhlíku rozlišujeme:

- *autotrofní bakterie* – zdrojem uhlíku je oxid uhličitý a zdrojem dusíku amonné soli, dusitany a dusičnany;
- *heterotrofní bakterie* – zdrojem uhlíku jsou organické látky, např. polysacharidy, bílkoviny nebo organické kyseliny a zdrojem dusíku jsou i organické sloučeniny, např. bílkoviny.

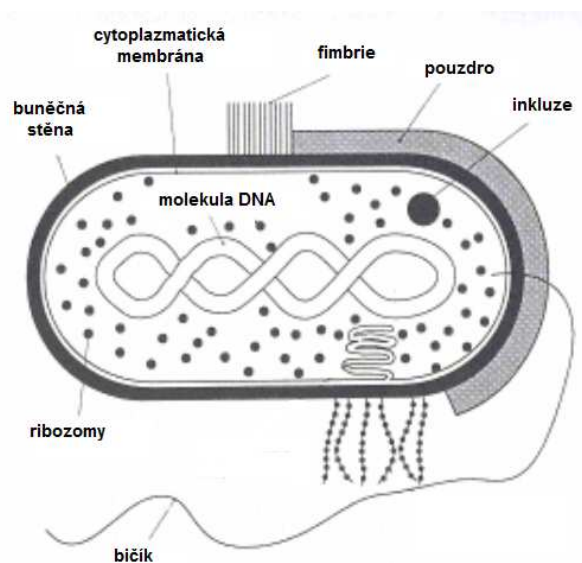
Zároveň podle zdroje energie rozlišujeme:

- *fotoautotrofní bakterie* – energii získávají ze slunečního záření;
- *chemoautotrofní bakterie* – energii získávají oxidací anorganických látek;
- *fotoheterotrofní bakterie* – získávají energii také ze slunečního záření;
- *chemoheterotrofní bakterie* – energii získávají oxidací organických látek [35, 36, 37].

2.1 Stavba bakteriální buňky

Informačním centrem prokaryotní buňky, uvedené na obr. 4, je molekula DNA, nazývaná nukleoid, který je analogický k jádru eukaryotních buněk. V prostoru cytoplazmy mohou být rozptýleny pomocné, ale ne nepostradatelné úseky DNA – tzv. plazmidy, dále se v ní nachází ještě ribozomy, různé inkluze, metabolity, proteiny a buněčný skelet. Samotná cytoplazma tak tvoří prostředí pro metabolické děje probíhající uvnitř buňky. Povrch je tvořen cytoplazmatickou membránou z fosfolipidové dvojvrstvy s proteiny, která odděluje vnitřní prostředí buňky od okolního a umožňuje transport látek mezi nimi.

Na cytoplazmatickou membránu naléhá buněčná stěna, jejíž základní složkou je peptidoglykan (murein). Podle jeho množství můžeme následně rozlišovat bakterie na grampozitivní a gramnegativní. Některé bakterie mají ještě proteinové nebo polysacharidové ochranné pouzdro (tzv. kapsulu) různé tloušťky, které zároveň brání vysušení buňky. Je-li tvořeno řídkou a vláknitou sítovinou, nazývá se glykokalyx. Z povrchu buňky pak vystupují vláscité fimbrie a bičíky, což jsou orgány sloužící k pohybu nebo zachycení buňky [35, 37].



Obr. 4: Schéma bakteriální buňky [37].

Přestože jsou bakteriální buňky mnohem jednodušší, jejich metabolismus je pestřejší a rychlejší, než je tomu u eukaryotních organismů.

3 MIKROBIÁLNÍ PROSTŘEDÍ PŮD A SLADKÝCH VOD

3.1 Mikrobiální prostředí sladkých vod

Mezi tři hlavní domény osidlující sladkovodní prostředí patří Bakterie, Archea a Eukarya. Sladkovodní mikroorganismy se také rozlišují podle jejich výživových nároků na:

- *autotrofní mikroorganismy*, ke kterým se řadí řasy a fotosyntetizující bakterie a jsou primárními producenty sladkovodního ekosystému;
- *heterotrofní mikroorganismy*, k nimž se zařazují bakterie, prvoci a houby, které mají ve vodním ekosystému roli predátorů.

Jednou z nejčetnějších skupin mikroorganismů vyskytujících se v prostředí sladkých vod jsou bakterie. Jsou rozšířené po celém sladkovodním prostředí a tvoří rozsáhlé pelagické a bentické populace. Především pak bakterie s heterotrofním způsobem výživy.

Na složení vodních bakteriálních společenstev má vliv několik zásadních faktorů, jako například teplota vody, predace zooplanktonem a prvoky, složení fytoplanktonu, přísun organické hmoty nebo intenzita UV-záření [38, 39].

Ve sladkovodním ekosystému stojatých vod výrazně převažují gramnegativní bakterie, nad grampozitivními. Jedná se především o zástupce čeledí *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae* a rodů *Proteus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Achromobacter* a *Alcaligenes*. Často se vyskytují také *Zooglea*, *Beggiatoa*, *Sphaerotilus* a methanogenní bakterie rodu *Methanococcus*, *Methanobacterium* a *Methanosarcina* [39]. Některé studie ale dokázaly i výskyt grampozitivních bakterií. Konkrétně rodu *Actinobacter* a kmenu *Firmicutes* [40]. Z fyziologických skupin jsou pravidelně nacházeny např. celulolytické bakterie a chemosyntetické bakterie jako nitrifikační, vodíkové, methanové a oxidující síru (thionové) [41]. Mnohdy do vody přecházejí vlivem různých splachů i půdní bakterie, např. rody *Micrococcus*, nebo střevní bakterie živočichů, např. *Escherichia coli*, či rody *Salmonella* a *Shigella*, které ale během několika dnů ve vodním prostředí odumírají [42].

Ve stojatých vodách je zásobování organickou hmotou z okolí omezené. Výhradním zdrojem substrátu je fytoplankton. Během jarních měsíců fytoplankton narůstá v horních vrstvách vody. Bakterie se koncentrují právě v těchto vrstvách a využívají jeho extracelulární produkty fotosyntézy. V následujících měsících, kdy dochází k nárůstu zooplanktonu, je organická hmota dopravována k bakteriím skrze nespoteřované zbytky v jeho exkrementech. Na konci sezóny fytoplankton odumírá, rozkládá se a klesá ke dnu, kde se kolem

něj soustřeďují i bakterie. Po celou sezónu odpovídají počty bakterií ve stojatých vodách množství fytoplanktonu [41].

3.2 Mikrobiální prostředí půd

Stejně jako voda i půda je obrovským rezervoárem nejrůznějších mikroorganismů. Osidlují ji převážně vláknité houby (plísňe), prvoci, mikroskopické řasy a sinice. Nejpočetnější skupinu mikroorganismů osidlující půdní prostředí tvoří právě bakterie [42].

Převážná většina bakterií se nachází v horní vrstvě půdy bohaté na živiny. Přestože prosakující půdní vlhkost způsobuje pasivní unášení části bakteriálních buněk vrstvami půdy, s narůstající hloubkou počet bakterií výrazně klesá a zároveň se mění jejich druhové zastoupení. Zónou s nejvyšší mikrobiální aktivitou je rhizosféra, tedy půda těsně obalující kořeny rostlin. Sekrety uvolňované z kořenů vytvářejí prostředí bohaté na živiny a bakterie tak současně pomáhají rostlinám například fixovat molekuly dusíku z půdního vzduchu, rozpouštět minerály a jsou také důležitými reducenty. Rozkládají totiž odumřelou organickou hmotu, čímž navrací jednotlivé prvky do přirozeného koloběhu. Tento způsob výživy je typický pro heterotrofní bakterie a jejich zastoupení v půdním prostředí tak výrazně převyšuje výskyt bakterií autotrofních [43, 44, 45].

Osídlení půd bakteriemi je ovlivňováno řadou faktorů, např. přítomností organických látek, přístupem kyslíku, vlhkostí, druhem zakořeněných rostlin nebo hodnotou pH. Nejrozmanitější druhy bakterií žijí v půdách neutrálních a slabě kyselých. Písčitého půdy nejsou zdaleka tolik osidlovány bakteriemi jako půdy jílovitého charakteru.

Mezi bakterie s nejčastějším výskytem v půdním prostředí se řadí rody *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* [42], *Nitrobacter*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Azotobacter* nebo *Azospirillum* [44]. V půdách se často přirozeně objevují i některé patogenní bakterie, např. rody *Clostridium*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Streptococcus* nebo *Neisseria*. Poslední tři jmenované rody bakterií přežívají v půdách jen několik týdnů [42].

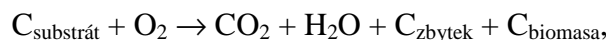
4 ÚLOHA MIKROORGANISMŮ V BIODEGRADAČNÍM PROCESU

Biodegradace je proces způsobený biologickou aktivitou mikroorganismů, který vede k výrazné změně chemické struktury materiálu.

Mikroorganismy koexistují s řadou organických sloučenin už miliardy let, během kterých docházelo k vývoji enzymů schopných tyto látky přeměňovat. Ve volné přírodě probíhá biodegradační proces častěji za přístupu vzduchu, ale může probíhat i za anaerobních podmínek. Definice popisuje, že biodegradace je biologický proces. Běžně ale zároveň probíhá nebo je iniciován nebiologickými pochody, např. tepelnou degradací, fotodegradací nebo hydrolýzou [46].

4.1 Aerobní biodegradace

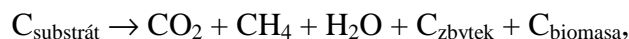
Biodegradační procesy probíhající za přístupu kyslíku jsou považovány za jednodušší a efektivnější. Jsou katalyzovány enzymy s nižší specifitou a vyvinutými pro katabolismus přírodních substrátů [46]. Následující schéma popisuje proces aerobní biodegradace:



kde $C_{\text{substrát}}$ vyjadřuje molekulu substrátu nebo fragmentu degradačního procesu (C_{zbytek}), ze kterého se za přístupu kyslíku uvolňuje oxid uhličitý a voda za vzniku biomasy [47]. K tomuto rozkladu polymerů dochází například ve vodě, půdě, kompostu nebo v čistírenských kalech. V praxi se aerobní rozklad využívá např. při biologickém čištění odpadních vod.

4.2 Anaerobní biodegradace

Vzhledem k tomu, že metabolismus anaerobních mikroorganismů je pomalejší, zpomaluje se tím i proces rozkladu za těchto podmínek. Děj vyjadřuje následující schéma:



kde $C_{\text{substrát}}$ vyjadřuje molekulu substrátu degradačního procesu, z níž se postupným rozkládáním vlivem jednotlivých bakterií uvolňuje oxid uhličitý, methan a voda za vzniku biomasy [47].

Anaerobní digesce (anaerobní fermentace) je proces, při kterém mikroorganismy rozkládají organický materiál bez přístupu vzduchu. Celý proces probíhá v sekvenci čtyřech kroků:

1. *Hydrolyza* – fermentační bakterie produkují extracelulární hydrolytické enzymy, které štěpí makromolekulární látky na nerozpustné nízkomolekulární látky.
2. *Acidogeneze* – látky vzniklé hydrolyzou jsou dále rozkládány na mastné kyseliny a alkoholy, za současného uvolňování oxidu uhličitého a vodíku.
3. *Acetogeneze* – rozklad vzniklých látek za vzniku kyseliny octové.
4. *Methanogeneze* – kyselina octová je metabolizována methanogenními bakteriemi na methan. Tyto bakterie jsou striktně anaerobní mikroorganismy. Ke svému růstu a činnosti potřebují stále okolní podmínky [48, 49].

Rozklad substrátu bez přístupu vzduchu probíhá zejména ve vodních sedimentech, ale můžeme se s ním setkat i na skládkách odpadů.

Jako příklady využití anaerobního rozkladu v praxi lze uvést:

- řízenou anaerobní fermentaci v bioplynových stanicích s energetickým využitím,
- zpracování bioodpadů,
- první fázi biologického čištění odpadních vod [48].

4.2.1 Faktory ovlivňující rozložitelnost substrátu

Průběh biologického odbourávání organických látek i jeho rychlost ovlivňuje celá řada faktorů. Mezi nejvýznamnější patří chemická struktura rozkládané látky, její koncentrace, druhové zastoupení a počet mikroorganismů, ale také fyzikálně-chemický charakter prostředí, ve kterém procesy probíhají. Velký vliv na průběh rozkladu substrátu má zejména teplota a pH prostředí. Oba faktory zásadně ovlivňuje výskyt a interakci jednotlivých druhů mikroorganismů v daném prostředí. Např. methanogenní bakterie vyžadují pro svůj růst neutrální hodnoty pH (6,5 – 7,5). Stejně důležité je rozpětí intervalu, ve kterém teplota kolísá, aby nedošlo k porušení dynamické rovnováhy děje [49, 50].

Z hlediska živin, je potřebný správný poměr dusíku a fosforu vzhledem k organickým látkám (je uváděn jako poměr CHSK : N : P – 300 : 6,7 : 1), dále pak přítomnost stopových množství prvků (Na, K, Ca, Se, Mg, Se, W) a růstových faktorů. Toxické a inhibující látky se projevují v závislosti na hodnotě pH a jejich koncentraci v prostředí. Jedná se především o nižší mastné kyseliny, při nízkém pH nebo naopak při vysokém pH o amoniak [50].

Protože molekuly polymerů jsou v přírodních podmínkách nerozpustné a jejich řetězce jsou příliš dlouhé, je nemožné dopravit je do buněk mikroorganismů. Proto musí mikroorganismy během rozkladu polymerních látek nejdříve uvolnit extracelulární enzymy, které začnou rozkládat polymer mimo buňku. Tyto enzymy jsou natolik velké, že nedokážou proniknout do molekuly polymeru a působí pouze na jeho povrchu. Následně jsou vzniklé meziprodukty přepraveny do buňky k příslušné metabolické dráze.

Ke kompletní biodegradaci dochází až ve chvíli, kdy je původní substrát zcela převeden na plynné produkty a soli. Tedy až proběhne i proces mineralizace. Ten je však za přírodních podmínek u některých typů substrátu velice pomalý, a proto je cílem při posuzování odstranění materiálu ze životního prostředí právě biodegradace [46].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo izolovat vhodné biodegradéry ze vzorků stojaté povrchové vody a různých typů půd. Následně provést screening dekarboxylasové aktivity na kulturačním médiu s jednotlivými aminokyselinami a usoudit, jestli bakterie přirozeně se vyskytující v biotických prostředích produkují stejné biogenní aminy (tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin), jako bakterie s dekarboxylasovou aktivitou izolované z potravin.

6 PRACOVNÍ POSTUPY

6.1 Materiální vybavení

6.1.1 Chemikálie

Složky pro přípravu živných pūd a bujónů:

- Minerální agar (HiMedia)
- Kvasniční autolyzát (HiMedia)
- Trypton (HiMedia)
- Tryptone Yeast Extract Agar – TYA (HiMedia)
- Masový výtazek (HiMedia)
- Pepton (HiMedia)
- NaCl (LachNer)
- Yeast extrakt (HiMedia)
- Bromkresolpurpur 0,2% v 50% alkoholu (Sigma Aldrich)
- Masopeptonový bujón – MPB (HiMedia)

Ostatní chemikálie:

- Ethanol (LachNer)
- Krystalová violet² (HiMedia)
- Jód (LachNer)
- Jodid draselný (LachNer)
- Safranin (HiMedia)
- Peroxid vodíku (LachNer)
- 1,7-heptandiamin (Sigma Aldrich)
- Karbonátový pufr (Merck)
- Dansylchlorid (Sigma Aldrich)
- Aceton (Sigma Aldrich)
- Heptan (Sigma Aldrich)
- Acetonitril (Sigma Aldrich)
- Dusík 5,0 – tlaková lahev (Linde Gas a.s.)

Aminokyseliny:

- Arginin, Histidin, Lysin, Ornitin, Fenyylalanin, Tyrosin, Tryptofan a Prolin (HiMedia)

6.1.2 Přístrojové vybavení a ostatní pomůcky

- Autokláv SANOclav (Robert Bosch)
- Automatické pipety (Hirschmann Laborgeräte, Biohit)
- Analytické váhy – Adventurer Pro type AV513CM (Schoeller)
- Mikroskop CX41 (Olympus)
- Centrifuga ROTANTA 460 R (Schoeller)
- Třepačka LT2 (Kavalierglass, a.s.)
- Vyhřívací blok (Labicom s.r.o.)
- OXItest (PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.)
- Mikrotitrační destičky

6.2 Odběr a zpracování vzorků

Pro screening dekarboxylasové aktivity u bakterií využívaných v biodegradacích byly odebrány tři vzorky zeminy a tři vzorky povrchové vody, ze kterých byly následně izolovány jednotlivé bakterie.

Odběr půdních vzorků byl provedený 2. listopadu 2014 na katastrálním území Žopy. Vzorek č. 1 byl odebraný ze zahradního záhonu, vzorek č. 2 na okraji dubového lesa a vzorek č. 3 z pole po sklizni obilí. Odběr vzorků stojaté povrchové vody byl provedený 3. listopadu 2014. Vzorek č. 4 byl odebraný z vodní nádrže v Přílepích, vzorek č. 5 z vodní nádrže Skalka ve Fryštáku – Horní Vsi a vzorek č. 6 z Dolního bělovodského rybníka v Lukově. Poloha odběrových míst je vyznačena na mapě v příloze P I.

Všechny vzorky byly odebrány do sterilních vzorkovnic a převezeny do laboratoře, kde byly uchovány v lednici při 4 °C a během dvou dnů zpracovány.

6.2.1 Kultivace půdních bakterií

Z odebraných vzorků zeminy bylo odváženo vždy 5 g, které byly následně suspendovány v 50 ml sterilního suspenzačního roztoku, zředěny, naneseny na kultivační média a kultivovány při 25 °C po dobu 48 hodin.

Agar pro stanovení půdních bakterií (APB) – na 350 ml:

Minerální agar.....	6,7 g
Kvasniční autolyzát.....	175 mg
Trypton.....	175 mg
Roztok stopových prvků	0,35 ml

K přípravě APB bylo naváženo vždy odpovídající množství složek, které byly rozpuštěny v 350 ml destilované vody, sterilovány v autoklávu a nakonec za horka rozlity na Petriho misky.

6.2.2 Kultivace bakterií z povrchové vody

Ze vzorků povrchových vod bylo naočkováno vždy po 1,0 ml a 0,1 ml na TYA půdu a tyto vzorky byly kultivovány při 25 °C a 37 °C po dobu 5 dnů.

Tryptone Yeast Extract Agar (TYA):

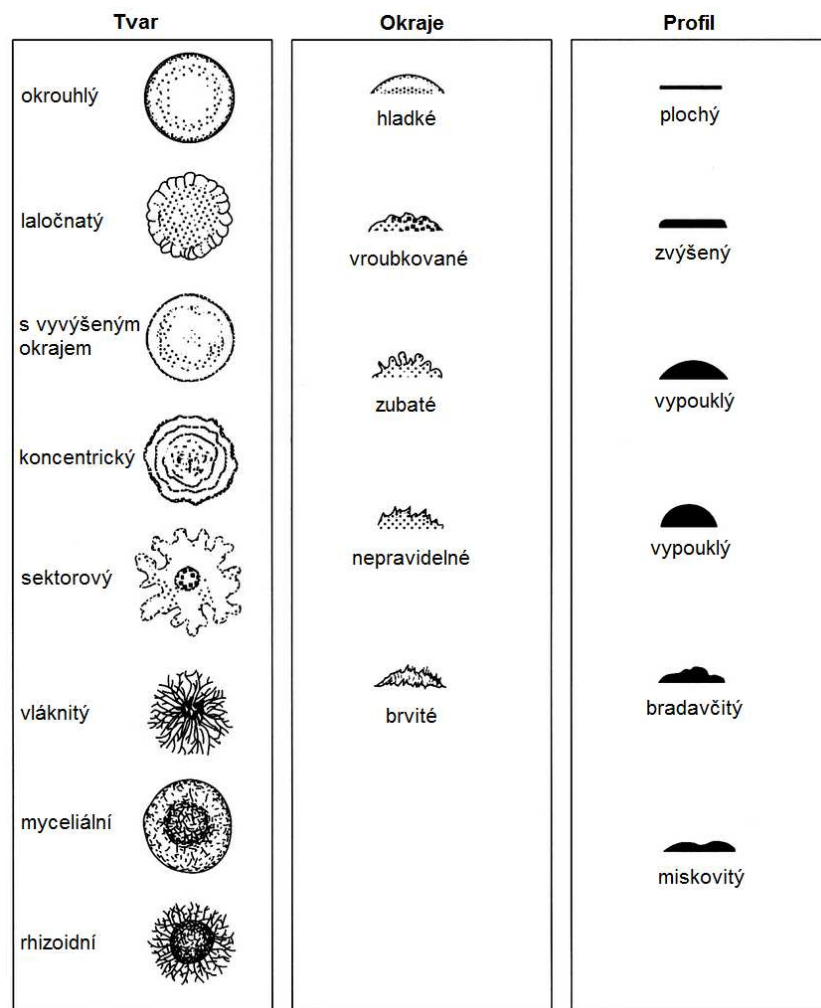
K přípravě 800 ml TYA bylo rozpuštěno 16,8 g přípravku v destilované vodě a sterilováno v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C.

6.3 Charakteristika izolovaných bakterií

Z narostlých kolonií byly vybrány bakterie makroskopicky různých morfologických znaků pro každý zkoumaný vzorek zeminy a povrchové vody. Takto získané bakterie byly systematicky očíslovány, křížovým roztěrem jednotlivě naočkovány na Petriho misky s TYA půdou a kultivovány při 25 °C po dobu 3 dnů.

6.3.1 Morfologické znaky kolonií

Bakteriální kolonie byly sledovány po 48 hodinové kultivaci při 25 °C na TYA půdě. Hodnocena byla velikost kolonie, dále její barva, profil, tvar a okraj a to podle rozdělení uvedeném na obr. 5.



Obr. 5: Morfologické znaky kolonií [51].

6.3.2 Barvení podle Grama

Jednou z nejdůležitějších metod uplatňovanou při určování bakterií je barvení podle Grama, které využívá rozdílného chemického složení jejich buněčné stěny. Fixovaný preparát se barví roztokem jódu, přičemž vzniká komplex barviva, jódu a složek buněčné stěny. Takto vzniklý komplex je možné z některých druhů bakteriálních buněk vymýt ethanolem nebo acetonem. Jedná se o gramnegativní bakterie (G-). Pro snadnější

mikroskopické pozorování bývají jejich buněčné stěny ještě dobarčovány safraninem nebo karbolfuchsinem. Tyto bakterie jsou potom zbarveny růžově. V případě, že komplex barviva, jódu a složek buněčné stěny zůstává zachycený, jedná se o bakterie grampozitivní (G+), které jsou zbarveny fialově. Při Gramově barvení bylo postupováno podle metodiky Jandové a Kotoučkové [52].

Sterilní očkovací kličkou byl odebrán bakteriální kmen, který byl suspendován v kapce fyziologického roztoku na podložním sklíčku a zafixován protažením v plameni. Takto připravený preparát byl převrstven krystalovou violetí. Po 60 vteřinách byla krystalová violet' slita a preparát byl převrstven Lugolovým roztokem, který se nechal působit opět po dobu 60 vteřin. Následně byl preparát pečlivě omytý destilovanou vodou a ethanolem a dobarven safraninem. Po dalších 60 vteřinách byl safranin pečlivě vymytý destilovanou vodou a preparát vysušen.

6.3.3 Oxidasový test

Při stanovování cytochromoxidasy bylo postupováno podle pracovního návodu uvedeného v průvodním listu OXItestu vyráběného firmou PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.

Přítomnost cytochromoxidasy je detekována barevnou reakcí *N,N*-dimethyl-1,4-fenylendiaminu s α -naftolem za vzniku indofenolové modři. Z agarové půdy byl sterilní očkovací kličkou odebrán bakteriální kmen a nanesen do impregnované zóny proužku, která byla nasycena činidlem. Při pozitivní reakci na cytochromoxidasu se projevilo tmavě fialové zbarvení.

6.3.4 Katalasový test

Aerobní bakterie tvoří enzym katalasu, která rozkládá peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík. Do kapky 3% peroxidu vodíku na podložním sklíčku byla kličkou nanesena bakteriální kolonie. Přítomnost katalasy se projevila uvolňováním bublinek kyslíku ihned po umístění bakterií.

6.4 Identifikace bakteriálních kmenů pomocí MALDI/TOF

Čerstvé kmeny bakterií byly suspendovány ve 150 μ l destilované vody. Pak bylo přidáno 450 μ l absolutního ethanolu a takto připravené vzorky byly zamrazeny.

Bezprostředně před analýzou byly jednotlivé vzorky připraveny extrakcí (99% ethanol, 70% kyselina mravenčí a 100% acetonitril). Samotná analýza byla provedena na přístroji MALDI/TOF MS Biotyper Microflex system LT/SH (Bruker Daltonics, Německo). Hmotnostní spektra byla zpracována pomocí softwaru Flexcontrol verze 3.4 a porovnána s knihovnou spekter v databázi Taxonomy.

6.5 Stanovení produkce biogenních aminů

6.5.1 Screening dekarboxylasové aktivity u bakterií kultivační metodou

Při zkoumání produkce biogenních aminů kultivační metodou bylo postupováno podle metodiky uvedené v bakalářských pracích Khatantuul Purevdorj [53] a Zuzany Svobodové [54].

Nejprve byly kmeny izolovaných bakterií zaočkovány do 5 ml sterilního masopeptonového bujónu a kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin.

Masopeptonový bujón (MPB):

Masový výtažek	0,93 g
Pepton	1,55 g
NaCl	0,93 g
Destilovaná voda.....	310 ml
pH.....	6,8 – 7,0

K přichystání MPB bylo naváženo příslušné množství jednotlivých složek, které byly rozpuštěny v destilované vodě. Následně bylo upraveno pH na hodnotu v rozmezí 6,8 – 7,0 a takto připravený bujón byl sterilován v autoklávu.

Tvorba biogenních aminů byla sledovaná na mikrotitračních destičkách, kdy bylo do každé příslušné jamky napipetováno 10 μ l suspenze bakteriálního kmenu v masopeptonovém

bujónu a 200 µl dekarboxylačního média s příslušnou aminokyselinou. Takto připravené destičky byly uzavřeny víčkem a kultivovány v mikrotenovém sáčku při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Při pozitivní reakci na biogenní aminy se projevila barevná změna z původní hnědé na fialovou.

Dekarboxylační médium:

Pepton	0,5 g
Yeast extrakt	0,3 g
Bromkresolpurpur 0,2% v 50% alkoholu	1 ml
Příslušná aminokyselina	0,75 g
Destilovaná voda.....	150 ml
pH.....	5 – 5,3

K přípravě dekarboxylačního média bylo použito sedmi aminokyselin (arginin, histidin, lysin, ornitin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan). Bylo naváženo vždy odpovídající množství složek, které byly, vyjma pH indikátoru, rozpuštěny v destilované vody a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 5 – 5,3. Nakonec byl přidán pH indikátor bromkresolpurpur a přichystané médium bylo sterilováno v autoklávu.

6.5.2 Stanovení biogenních aminů pomocí HPLC – UV/Vis

Z izolovaných bakterií bylo vybráno 21 zástupců. Jejich kmeny byly naočkovány do zkumavky obsahující 5 ml MPB s přidavkem aminokyselin a kultivovány při 30 °C po dobu 72 hodin. Následně byly znovu přeočkovány do 5 ml čerstvého MPB s přidavkem aminokyselin a to vždy do dvou zkumavek stejně. Opět byly kultivovány při 30 °C po dobu 72 hodin. Bakteriální suspenze byla poté centrifugována při 15 °C a 4600 RCF po dobu 15 minut a z její kapalné fáze pak bylo ve dvou opakováních odebráno 650 µl, ke kterým bylo přidáno 650 µl kyseliny chloristé. Před dalším zpracováním byly takto připravené vzorky zamrazeny.

MPB s přísávkem aminokyselin:

MPB4,420 g

Jednotlivé aminokyseliny0,102 g

Destilovaná voda.....340 ml

Bylo rozpuštěno 4,420 g přípravku a vždy po 0,102 g jednotlivých aminokyselin (arginin, histidin, lysin, ornitin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan) v destilované vodě a sterilováno v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C.

Následná derivatizace, separace a detekce byla provedena modifikovanou, již dříve publikovanou metodou Dadákové a kol. [55].

Po rozmrazení vzorků při laboratorní teplotě bylo vždy k 1 ml ve dvou paralelních stanoveních přidáno 100 µl vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu o koncentraci 500 mg.l⁻¹, 1,5 ml karbonátového pufru o pH = 11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu v acetonu o koncentraci 5 g.l⁻¹. Takto připravené vzorky byly uzavřeny v derivatizačních nádobkách a vytřepávány v temnu po dobu 20 hodin. Po přidání 200 µl prolinu byly vzorky vytřepávány ještě po dobu 1 hodiny. Následně byly přidány 3 ml heptanu a vzorky byly 3 minuty ručně vytřepávány. Pak byl odebrán 1 ml heptanové vrstvy a při teplotě 60 °C se nechaly do sucha odpařit pod proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu. Před dalším zpracováním byly vzorky zamrazeny a bezprostředně před analýzou byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm.

Stanovení jednotlivých biogenních aminů bylo realizováno systémem HPLC (LabAlliance, USA; Agilent Technologies, USA), který byl vybaven degasserem 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA), binární pumpou (LabAlliance, USA), UV/Vis detektorem ($\lambda = 254$ nm) a automatickým dávkovačem (LabAlliance, USA). Separace byla provedena na koloně Agilent Eclipse Plus C18 RRHD (50 mm x 3,0 mm), přičemž byla použita gradientová eluce s následujícími poměry mobilní fáze A (10% acetonitril) a B (100% acetonitril): 0 – 0,1 min 39 % A, 61 % B; 0,1 – 1,4 min 39 % A, 61 % B; 1,4 min – 3,5 min 30 % A, 70 % B; 1,4 min – 3,5 min 17 % A, 83 % B; 3,5 – 9 min 0 % A, 100 % B a 9,5 – 11,5 min 10 % A, 61 % B; 11,5 – 15,5 min 39 % A, 61 % B, průtokem mobilní fáze 0,45 ml.min⁻¹ a teplotou kolony 30 °C.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Z odebraných vzorků půd a povrchové stojaté vody bylo izolováno celkem 61 kmenů bakterií, přičemž 5 izolátů ze vzorku zahradní půdy (vzorek č. 1), 10 izolátů ze vzorku lesní půdy (vzorek č. 2), 14 izolátů ze vzorku půdy odebrané na poli (vzorek č. 3), 6 izolátů ze vzorku vody odebrané z vodní nádrže v Přílepečích (vzorek č. 4), 13 izolátů ze vzorku vody odebrané z vodní nádrže Skalka ve Fryštáku – Horní Vsi (vzorek č. 5) a 13 izolátů z Dolního bělovodského rybníka v Lukově (vzorek č. 6). Izolované kmeny byly podrobeny screeningové kultivační metodě na dekarboxylačním médiu s jednotlivými aminokyselinami a pH indikátorem.

7.1 Charakteristika izolovaných bakterií

Z výsledků uvedených v tabulce I plyne, že převážná většina bakterií izolovaných z půdního prostředí tvořila kolonie bílé nebo oranžové barvy. Vyskytovaly se však i kolonie narůžovělé (kmen č. 12) nebo světle hnědé (kmen č. 11). Převážná většina kolonií pak také měla hladký a lesklý povrch. Přes 50 % sledovaných kolonií mělo okrouhlý tvar, druhou polovinu pak tvořily kmeny vláknité, laločnaté, popř. se sektorovým (kmen č. 21) nebo koncentrickým tvarem (kmen č. 17 a 24). Asi u jedné třetiny kolonií byl pozorován zvýšený, druhé třetiny plochý profil a zbylou jednu třetinu tvořily kmeny s miskovitým (kmen č. 1, 6 a 26) nebo vypouklým (kmen č. 12, 22, 24, 25 a 28) profilem. Dvě třetiny kolonií pak měly hladký okraj. Zbylou jednu třetinu tvořily kmeny s brvitým, vroubkovaným a v jednom případě i laločnatým okrajem (kmen č. 17).

Tabulka I: Makroskopické morfologické znaky bakterií izolovaných z půdního prostředí.

Číslo kmenu	Číslo vzorku	Velikost [mm]	Barva	Povrch	Tvar	Profil	Okraj
1	1	3,0	bílá	hladký, lesklý	vláknitý	miskovitý	brvitý
2	1	0,5	bílá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	hladký
3	1	0,5	naoranžovělá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	hladký
4	1	1,0	bílá	drsňý, matný	vláknitý	plochý	brvitý
5	1	1,0	bílá	drsňý, matný	vláknitý	plochý	brvitý
6	2	1,0	bílá	drsňý, matný	vláknitý	miskovitý	brvitý
7	2	1,0	průhledná	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	hladký
8	2	0,5	naoranžovělá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	hladký
9	2	2,0	naoranžovělá	hladký, lesklý	laločnatý	zvýšený	hladký

Číslo kmenu	Číslo vzorku	Velikost [mm]	Barva	Povrch	Tvar	Profil	Okraj
10	2	1,0	nažloutlá	hladký, lesklý	laločnatý	plochý	hladký
11	2	2,0	světle hnědá	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	hladký
12	2	0,5	narůžovělá	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	vroubkovaný
13	2	0,5	bílá	hladký, lesklý	laločnatý	zvýšený	hladký
14	2	1,0	naoranžovělá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	hladký
15	2	0,3	naoranžovělá	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	hladký
16	3	0,2	nažloutlá	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	vroubkovaný
17	3	0,2	nažloutlá	drsňý, lesklý	koncentrický	zvýšený	laločnatý
18	3	0,5	průsvitná	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	hladký
19	3	0,2	bílá	hladký, lesklý	laločnatý	plochý	vroubkovaný
20	3	0,2	bílá	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	hladký
21	3	3,0	bílá	drsňý, lesklý	sektorový	plochý	vroubkovaný
22	3	1,0	sytě oranžová	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	hladký
23	3	0,5	žlutá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	hladký
24	3	0,3	bílá	hladký, lesklý	koncentrický	vypouklý	hladký
25	3	0,3	bílá	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	hladký
26	3	1,0	průhledná	hladký, lesklý	okrouhlý	miskovitý	hladký
27	3	1,0	oranžová	hladký, lesklý	laločnatý	zvýšený	hladký
28	3	1,0	oranžová	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	hladký
29	3	0,1	bílá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	vroubkovaný

V tabulce II jsou shrnuty výsledky pozorování makroskopických vlastností bakteriálních kolonií izolovaných ze stojatých povrchových vod. Asi 25 % hodnocených kolonií bylo oranžového zabarvení, více jak 25 % žlutého zabarvení a dalších více jak 25 % kolonií bylo průsvitných nebo průhledných. Stejně jako u půdních bakterií, i tady byla převážná většina kolonií s hladkým a lesklým povrchem. Převážná většina kolonií pak měla také okrouhlý tvar. Jedna čtvrtina měla tvar mírně zvlněný a jen výjimečně se projevil laločnatý (č. 34, 59 a 60) nebo sektorový (č. 50 a 55) tvar kolonií. Nejčastěji se objevovaly bakteriální kolonie s vypouklým nebo plochým profilem, v šesti případech s profilem zvýšeným a v jediném případě s profilem miskovitým (kmen č. 43). Velkou rozmanitost vykazovaly bakterie z povrchových vod z hlediska okraje jejich kolonií. Přestože asi jedna třetina kolonií měla hladký okraj, ostatní vykazovaly okraje vroubkované, brvité, nepravidelné, laločnaté, koncentrické i zubaté.

Tabulka II: Makroskopické morfologické znaky bakterií izolovaných ze stojatých povrchových vod.

Číslo kmenu	Číslo vzorku	Velikost [mm]	Barva	Povrch	Tvar	Profil	Okraj
30	4	1,0	naoranžovělá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	vroubkovaný
31	4	0,5	průhledná	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	hladký
32	4	0,3	průsvitná	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	nepravidelný
33	4	0,5	bílá	drsňý, matný	vláknitý	plochý	brvitý
34	4	0,5	nažloutlá	hladký, lesklý	laločnatý	zvýšený	hladký
35	4	0,1	oranžová	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	hladký
36	5	1,0	bílá	drsňý, matný	okrouhlý	plochý	vroubkovaný
37	5	0,2	průsvitná	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	vroubkovaný
38	5	0,5	průsvitná	hladký, lesklý	koncentrický	vypouklý	laločnatý
39	5	0,2	průsvitná	hladký, lesklý	laločnatý	vypouklý	vroubkovaný
40	5	1,0	průhledná	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	hladký
41	5	0,5	nažloutlá	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	hladký
42	5	1,0	sytě oranžová	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	hladký
43	5	1,0	oranžová	hladký, lesklý	koncentrický	miskovitý	laločnatý
44	5	1,0	nažloutlá	hladký, lesklý	koncentrický	vypouklý	laločnatý
45	5	0,5	nažloutlá	hladký, lesklý	koncentrický	vypouklý	laločnatý
46	5	0,5	průsvitná	drsňý, lesklý	vláknitý	plochý	brvitý
47	5	1,0	nažloutlá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	hladký
48	5	1,0	nažloutlá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	hladký
49	6	0,2	naoranžovělá	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	hladký
50	6	1,0	bílá	hladký, lesklý	sektorový	plochý	nepravidelný
51	6	0,5	nažloutlá	hladký, lesklý	koncentrický	vypouklý	hladký
52	6	0,5	oranžová	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	hladký
53	6	0,5	průsvitná	drsňý, matný	vláknitý	plochý	brvitý
54	6	0,3	průsvitná	hladký, lesklý	laločnatý	plochý	zubatý
55	6	3,0	našedlá	drsňý, matný	sektorový	plochý	zubatý
56	6	0,5	sytě oranžová	hladký, lesklý	myceliální	vypouklý	hladký
57	6	1,0	nažloutlá	hladký, lesklý	okrouhlý	vypouklý	hladký
58	6	0,3	naoranžovělá	hladký, lesklý	okrouhlý	plochý	koncentrický
59	6	2,0	našedlá	drsňý, matný	myceliální	zvýšený	laločnatý
60	6	3,0	bílá	drsňý, matný	myceliální	plochý	laločnatý
61	6	0,3	sytě žlutá	hladký, lesklý	okrouhlý	zvýšený	hladký

Jak je patrné z tabulky III, nejčastěji se vyskytovaly grampozitivní tyčinky v počtu 12 kmenů, potom gramnegativní tyčinky v počtu 10 kmenů, 2 kmeny byly gramnegativní koky a 2 kmeny gramnegativní kokotyčinky. V izolovaných kmenech byl také pozorován jeden kmen grampozitivních koků a jeden kmen grampozitivních kokotyček. Přítomnost

cytochromoxidasu se fialovým zabarvením projevil u 5 kmenů. Pozitivní reakce na přítomnost katalasy proběhla celkem u 20 kmenů.

Tabulka III: Mikroskopické morfologické znaky a biochemická aktivita bakterií izolovaných z půdního prostředí.

Číslo kmenu	Číslo vzorku	Morfologické znaky		Biochemické testy	
		Barvení podle Grama	Tvar buňky	Oxidasa	Katalasa
1	1	G +	tyčinky	-	+
2	1	G +	tyčinky	-	+
3	1	G +	tyčinky	-	+
4	1	G +	tyčinky	-	-
5	1	G +	tyčinky	-	+
6	2	G +	tyčinky	-	-
7	2	G -	tyčinky	-	-
8	2	G -	kokotyčinky	-	+
9	2	G +	tyčinky	-	+
10	2	G -	tyčinky	+	+
12	2	G +	tyčinky	-	+
13	2	G -	tyčinky	+	+
14	2	G -	tyčinky	-	-
15	2	G -	tyčinky	-	+
16	3	G -	tyčinky	+	-
17	3	G -	tyčinky	-	+
18	3	G +	kokotyčinky	+	+
19	3	G +	tyčinky	-	+
20	3	G -	koky	-	-
21	3	G +	tyčinky	-	+
22	3	G +	tyčinky	+	-
23	3	G -	tyčinky	-	+
24	3	G -	kokotyčinky	-	+
25	3	G +	koky	-	+
26	3	G +	tyčinky	-	-
27	3	G -	tyčinky	-	+
28	3	G -	tyčinky	-	+
29	3	G -	koky	-	+

V dále uvedené tabulce IV je vidět, že z bakterií izolovaných z vodního prostředí se nejčastěji objevovaly grampozitivní tyčinky v počtu 17 kmenů, pak gramnegativní tyčinky v počtu 10 kmenů, 2 kmeny byly vyhodnoceny jako grampozitivní koky a vyskytl se také 1 kmen gramnegativních kokotyčinek a 1 kmen grampozitivních kokotyčinek. Zajímavé

pozorování bylo u kmene č. 52, který tvořil grampozitivní tyčinky se spórami. Přítomnost cytochromoxidasy se prokázala u 9 izolovaných kmenů. Pozitivní reakce na přítomnost katalasy proběhla celkem u 25 bakteriálních kmenů.

Tabulka IV: Mikroskopické morfologické znaky a biochemická aktivita bakterií izolovaných z prostředí sladkých vod.

Číslo kmenu	Číslo vzorku	Morfologické znaky		Biochemické testy	
		Barvení podle Grama	Tvar buňky	Oxidasa	Katalasa
30	4	G +	tyčinky	-	+
31	4	G -	tyčinky	+	+
32	4	G +	tyčinky	-	+
33	4	G +	tyčinky	-	-
34	4	G -	tyčinky	+	+
35	4	G +	kokotyčinky	-	-
36	5	G -	tyčinky	-	+
37	5	G -	tyčinky	-	+
38	5	G +	tyčinky	+	-
39	5	G -	tyčinky	-	+
40	5	G -	tyčinky	-	-
41	5	G -	tyčinky	+	+
42	5	G +	tyčinky	+	+
43	5	G +	tyčinky	+	+
44	5	G -	tyčinky	+	+
45	5	G +	tyčinky	-	+
46	5	G +	tyčinky	+	-
47	5	G +	tyčinky	-	+
48	5	G +	tyčinky	-	+
49	6	G -	tyčinky	-	+
50	6	G +	tyčinky	-	+
51	6	G +	tyčinky	-	+
52	6	G+	tyčinky se spórami	-	+
53	6	G +	tyčinky	-	-
54	6	G -	kokotyčinky	-	+
55	6	G +	tyčinky	-	+
56	6	G -	tyčinky	-	+
57	6	G +	tyčinky	-	+
58	6	G +	koky	-	+
59	6	G +	tyčinky	+	+

Během přeočkovávání jednotlivých bakterií na čerstvé půdy došlo ke ztrátě kolonie č. 11, u které se nepodařilo provést Gramovo barvení, biochemické testy na přítomnost oxidasy a katalasy, ani stanovení produkce biogenních aminů pomocí HPLC – UV/Vis.

7.2 Identifikace bakteriálních kmenů pomocí MALDI/TOF

Snahou této práce bylo také identifikovat jednotlivé izolované kmeny bakterií. K tomu byla využita metoda MALDI/TOF, která v současné době představuje nový způsob identifikace mikroorganismů. Výsledky provedeného experimentu jsou uvedeny v tabulce V.

Tabulka V: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z půdy (kmeny č. 1 – 29) a ze stojaté povrchové vody (kmeny č. 30 – 61).

Číslo kmenu	Název bakterie	Číslo kmenu	Název bakterie
1	nespolehlivá identifikace	32	<i>Viridibacillus neidei</i>
2	<i>Bacillus pumilus</i>	33	nespolehlivá identifikace
3	<i>Bacillus pumilus</i>	34	<i>Pseudomonas antarctica</i>
4	nespolehlivá identifikace	35	<i>Microbacterium oleivorans</i>
5	nespolehlivá identifikace	36	<i>Bacillus cereus</i>
6	<i>Bacillus mycooides</i>	37	<i>Pseudomonas libanensis</i>
7	nespolehlivá identifikace	38	<i>Bacillus licheniformis</i>
8	<i>Microbacterium maritopicum</i>	39	<i>Enterobacter cloacae</i>
9	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	40	nespolehlivá identifikace
10	<i>Pseudomonas koreensis</i>	41	<i>Pseudomonas libanensis</i>
12	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	42	nespolehlivá identifikace
13	<i>Pseudomonas koreensis</i>	43	nespolehlivá identifikace
14	nespolehlivá identifikace	44	<i>Serratia fonticola</i>
15	nespolehlivá identifikace	45	<i>Bacillus pumilus</i>
16	nespolehlivá identifikace	46	<i>Bacillus mycooides</i>
17	nespolehlivá identifikace	47	nespolehlivá identifikace
18	nespolehlivá identifikace	48	nespolehlivá identifikace
19	nespolehlivá identifikace	49	nespolehlivá identifikace
20	<i>Citrobacter gillenii</i>	50	<i>Bacillus cereus</i>
21	<i>Bacillus cereus</i>	51	nespolehlivá identifikace
22	nespolehlivá identifikace	52	<i>Bacillus idriensis</i>
23	nespolehlivá identifikace	53	<i>Bacillus cereus</i>
24	<i>Alcaligenes faecalis</i>	54	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
25	<i>Alcaligenes faecalis</i>	55	<i>Bacillus cereus</i>
26	nespolehlivá identifikace	56	<i>Bacillus idriensis</i>
27	nespolehlivá identifikace	57	nespolehlivá identifikace
28	<i>Flavobacterium hibernum</i>	58	nespolehlivá identifikace
29	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	59	<i>Bacillus mycooides</i>
30	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	60	<i>Bacillus mycooides</i>
31	<i>Bacillus cereus</i>	61	<i>Micrococcus luteus</i>

Zelená: spolehlivá identifikace na úrovni druhu; oranžová: spolehlivá identifikace na úrovni rodu.

Z výsledků je patrné, že se nepodařilo identifikovat všechny bakteriální kmeny. Důvodů, proč tomu tak je, může být několik. Například, že se ze vzorků půd a stojatých povrchových vod nepodařilo dostatečně odkultivovat a rozizolovat čisté kolonie, ale mohlo se také stát, že daná bakterie nebyla nalezena v použité databázi, která vyhodnocuje naměřená hmotnostní spektra.

V daných vzorcích byl nejpočetněji zastoupen rod *Bacillus*, který byl izolován zejména ze vzorků stojatých povrchových vod. Z celkového počtu šedesáti izolovaných bakteriálních kmenů z biotického prostředí jich bylo šest identifikováno jako *Bacillus cereus* (viz tabulka V) a to v půdním vzorku č. 3 (kmen č. 21) a ve vzorcích povrchové vody č. 4, 5 i 6 (kmeny č. 31, 36, 50, 53 a 55). Dále byl identifikován *Bacillus idriensis* (ve vzorku stojaté povrchové vody č. 6 – kmen č. 52 a 56), *Bacillus licheniformis* (ve vzorku č. 5 – kmen č. 38), *Bacillus mycoides* (půdní vzorek č. 2 – kmen č. 6 a vzorky vody č. 5 a 6 – kmeny č. 46, 59 a 60) a *Bacillus pumilus* v půdním vzorku č. 1 – kmeny č. 2 a 3. Ve vzorcích odebraných půd byl dále identifikován kmen *Alcaligenes faecalis* (vzorek č. 3 – kmeny č. 24 a 25), *Acinetobacter calcoaceticus* (vzorek č. 3 – kmen č. 29), *Citrobacter gillienii* (vzorek č. 3 – kmen č. 20) a *Flavobacterium hibernum* (vzorek č. 3 – kmen č. 28). Rod *Microbacterium* byl identifikován ve dvou případech, a sice v půdním vzorku č. 2 *Microbacterium maritpicum* (kmen č. 8) a ve vzorku vody č. 4 *Microbacterium oleivorans* (kmen č. 35). V dalších vzorcích, odebraných ze stojatých povrchových vod, byl identifikován kmen *Enterobacter cloacae* (vzorek č. 6 – kmen č. 39), *Micrococcus luteus* (vzorek č. 6 – kmen č. 61) a *Acinetobacter lwoffii* (vzorek č. 6 – kmen č. 54).

7.3 Screening dekarboxylasové aktivity u bakterií kultivační metodou

Schopnost dekarboxylovat sedm vybraných aminokyselin (arginin, tryptofan, fenylalanin, ornitin, lysin, histidin, tyramin) byla kultivační metodou zjišťována u všech 61 izolovaných bakterií. Pozitivní reakce byla pozorovatelná změnou zabarvení dekarboxylačního média vlivem přítomnosti pH indikátoru (bromkresolpurpu) do fialova.

Jak je patrné z výsledků uvedených v tabulkách VI a VII, byla touto metodou prokázána poměrně vysoká dekarboxylační schopnost zkoumaných bakteriálních kmenů. Zejména u ornitinu, argininu, tyrosinu a fenylalaninu. Naopak tryptofan dokázaly dekarboxylovat jenom asi dvě třetiny zkoumaných bakteriálních kmenů a histidin pouhá třetina.

Ornitin byl dekarboxylován celkem šedesáti bakteriálními kmeny. Pouze u kmenu č. 1 nebyla pozitivní reakce pozorována. Jednalo se o kmen získaný z půdního prostředí. Arginin byl dekarboxylován 97 % bakteriálních kmenů. Tuto schopnost neprojevily jenom dva kmény č. 1 a 5, které byly izolovány z půdy. Schopnost dekarboxylovat tyrosin prokázalo 93 % bakteriálních kmenů. Kmeny izolované z půdy č. 1 a 6 a kmény izolované z rybníční vody č. 60 a 61 tuto schopnost neprokázaly. Dekarboxylace fenylalaninu byla pozitivní u 85 % bakteriálních kmenů. Zbýlých 15 % kmenů fenylalanin netvořilo; tyto bakterie byly izolovány z půdního prostředí. Schopnost dekarboxylovat lysin projevilo změnou barvy média na fialovou 84 % bakteriálních kmenů. Ostatních 16 % kmenů, které tuto schopnost neprojevily, byly izolovány taktéž z půdního prostředí. Mnohem menší míra dekarboxylace byla pozorována u aminokyseliny tryptofanu. Pozitivní reakce byla patrná u 67 % bakterií. Zbýlých 33 % představovalo dvacet bakteriálních kmenů. Čtyři z nich byly izolovány ze stojatých povrchových vod a šestnáct ze vzorků půdy. Nejméně dekarboxylován byl histidin. U 66 % kmenů byla prokázána negativní reakce, přičemž se jednalo o 21 kmenů izolovaných z půdy a 19 kmenů z vodního prostředí.

Tabulka VI: Výsledky dekarboxylace jednotlivých aminokyselin bakteriemi izolovanými z půdního prostředí.

Číslo kmenu	Číslo vzorku	Dekarboxylace aminokyseliny						
		ARG	TRP	PHE	ORN	LYS	HIS	TYR
1	1	+-	-	-	+-	-	-	+-
2	1	++	-	-	++	+-	+-	++
3	1	++	-	+-	++	++	+-	++
4	1	++	-	-	++	-	+-	+
5	1	+-	-	-	+	+-	-	+-
6	2	+	-	-	++	-	-	+
7	2	++	-	-	+	+-	+-	+
8	2	++	-	-	++	-	+	++
9	2	++	-	+-	++	+-	+	+
10	2	++	++	++	++	++	+	++
11	2	++	+	++	+	++	+-	++

++ výrazná pozitivní reakce, + pozitivní reakce, +- negativní reakce, - výrazná negativní reakce.

Číslo kmenu	Číslo vzorku	Dekarboxylace aminokyseliny						
		ARG	TRP	PHE	ORN	LYS	HIS	TYR
12	2	++	-	++	++	++	+ -	++
13	2	++	++	++	++	++	+	++
14	2	++	++	++	++	++	+ -	++
15	2	++	++	++	++	++	+ -	++
16	3	++	++	++	++	++	+ -	++
17	3	++	+	++	++	++	+ -	+
18	3	++	++	++	++	++	+	+
19	3	++	+ -	++	++	++	+	++
20	3	++	+	++	++	++	+ -	++
21	3	++	+ -	++	++	++	+ -	++
22	3	++	+	++	++	++	+ -	++
23	3	++	+	++	++	++	+ -	++
24	3	++	+	++	++	++	+ -	++
25	3	++	-	++	++	+ -	++	++
26	3	++	+	++	++	++	+ -	++
27	3	++	+ -	++	++	++	+ -	++
28	3	++	+ -	++	++	++	+ -	++
29	3	++	-	++	++	-	++	++

++ výrazná pozitivní reakce, + pozitivní reakce, + - negativní reakce, - výrazná negativní reakce.

Tabulka VII: Výsledky dekarboxylace jednotlivých aminokyselin bakteriemi izolovanými ze stojatých povrchových vod.

Číslo kmenu	Číslo vzorku	Dekarboxylace aminokyseliny						
		ARG	TRP	PHE	ORN	LYS	HIS	TYR
30	4	++	+	++	++	++	+ -	++
31	4	++	+	++	++	++	+	++
32	4	++	-	++	++	++	+ -	++
33	4	++	-	++	++	++	+ -	++
34	4	++	+	++	++	++	+	++
35	4	++	+	++	++	++	+	++
36	5	++	-	++	++	++	+ -	++
37	5	++	++	++	++	++	+	++
38	5	++	+ -	++	++	++	+ -	++
39	5	++	++	++	++	++	+	++
40	5	++	++	++	++	++	+	++
41	5	++	++	++	++	++	++	++
42	5	++	++	++	++	++	+ -	++
43	5	++	++	++	++	++	+ -	++
44	5	++	++	++	++	++	++	++
45	5	++	++	++	++	++	++	++

++ výrazná pozitivní reakce, + pozitivní reakce, + - negativní reakce, - výrazná negativní reakce

Číslo kmenu	Číslo vzorku	Dekarboxylace aminokyseliny						
		ARG	TRP	PHE	ORN	LYS	HIS	TYR
46	5	++	++	++	++	++	+-	++
47	5	++	++	++	++	++	+	++
48	5	++	++	++	++	++	++	++
49	6	++	++	++	++	++	+-	++
50	6	++	++	++	++	++	+	++
51	6	++	++	++	++	++	+-	++
52	6	++	++	++	++	++	+-	++
53	6	++	++	++	++	++	+-	++
54	6	++	+	++	++	++	+	+
55	6	++	+	++	++	++	+-	++
56	6	++	+	++	++	++	+-	+
57	6	++	+	++	++	++	+-	++
58	6	++	+	++	++	++	+-	+
59	6	++	+	++	++	++	+-	+
60	6	++	+	++	+	++	+-	+-
61	6	++	+	++	+	++	+-	+-

++ výrazná pozitivní reakce, + pozitivní reakce, +- negativní reakce, - výrazná negativní reakce

Na základě provedeného screeningového testu lze konstatovat, že bakterie izolované ze stojatých povrchových vod mají mnohem vyšší schopnost dekarboxylovat vybrané aminokyseliny, než bakterie půdní.

Velkou nevýhodou této poměrně jednoduché a rychlé metody je její nepřesnost. Ta vzniká vlivem tvorby dalších alkalických produktů, které způsobují falešně pozitivní zbarvení média. Zároveň kultivační metoda není schopná zachytit malá množství vzniklých biogenních aminů [10]. Jak bylo pozdějším chromatografickým stanovením zjištěno, u více než poloviny zkoumaných bakteriálních kmenů byly prokázány falešně pozitivní reakce u dekarboxylačních médií obsahujících aminokyselinu histidin, tryptofan a fenylalanin. Kultivační metodou také nebylo prokázáno, že by bakteriální kmen č. 1 produkoval některý z biogenních aminů, zatímco z analýzy HPLC – UV/Vis je však patrné, že se jedná o falešně negativní výsledek, protože i tento kmen produkoval biogenní aminy, konkrétně pak kadaverin, tyramin, spermin a spermidin (viz tabulka VIII).

7.4 Stanovení biogenních aminů pomocí HPLC – UV/Vis

U 21 vybraných bakteriálních kmenů byla stanovena produkce osmi biogenních aminů (tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím UV/Vis detekce.

V případě všech vybraných kmenů byla zjištěna produkce některého ze stanovovaných biogenních aminů (viz tabulka VIII). Nejčastěji byl detekován spermidin a spermin, které byly produkovány všemi kmeny. Naopak tryptamin a histamin žádný ze sledovaných kmenů neprodukoval.

Tabulka VIII: Výsledky analýzy produkce jednotlivých biogenních aminů metodou HPLC – UV/Vis.

Č. km.	Produkce jednotlivých biogenních aminů [mg.l ⁻¹]								ΣBA [mg.l ⁻¹]
	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	
1	ND	ND	ND	124,9 ± 1,5	ND	264,2 ± 11,6	2,1 ± 0,2	28,4 ± 0,9	419,6
3	ND	ND	ND	3,6 ± 0,1	ND	290,9 ± 8,7	2,2 ± 0,1	28,9 ± 1,4	325,5
5	ND	ND	ND	4,3 ± 0,2	ND	290,7 ± 5,7	1,5 ± 0,1	34,4 ± 0,9	330,9
6	ND	ND	ND	3,4 ± 0,1	ND	300,5 ± 16,0	1,6 ± 0,0	38,9 ± 1,7	344,5
10	ND	ND	17,1 ± 0,3	3,5 ± 0,1	ND	297,4 ± 8,3	1,0 ± 0,0	36,4 ± 0,5	355,4
13	ND	ND	17,5 ± 0,8	4,7 ± 0,1	ND	264,4 ± 14,1	1,5 ± 0,1	31,4 ± 0,3	319,6
17	ND	ND	ND	ND	ND	319,5 ± 16,2	1,5 ± 0,0	36,5 ± 1,0	357,5
18	ND	ND	ND	ND	ND	329,0 ± 8,4	1,7 ± 0,0	33,0 ± 1,2	363,7
19	ND	ND	ND	ND	ND	297,0 ± 2,9	1,8 ± 0,1	30,7 ± 1,0	329,5
25	ND	ND	38,6 ± 1,0	ND	ND	243,8 ± 7,5	2,0 ± 0,1	28,9 ± 1,4	313,3
29	ND	13,3 ± 0,6	ND	ND	ND	283,1 ± 11,1	1,5 ± 0,1	31,3 ± 1,5	329,2
32	ND	ND	18,7 ± 0,6	9,3 ± 0,3	ND	320,3 ± 9,2	0,9 ± 0,0	30,6 ± 1,9	379,8
34	ND	ND	13,1 ± 0,3	ND	ND	136,8 ± 3,9	1,2 ± 0,0	27,0 ± 1,7	178,0
36	ND	ND	14,0 ± 0,5	4,8 ± 0,2	ND	317,7 ± 7,7	1,0 ± 0,0	27,8 ± 1,2	365,4
38	ND	ND	23,1 ± 0,7	4,7 ± 0,1	ND	345,2 ± 6,7	1,9 ± 0,1	31,4 ± 1,3	406,2
44	ND	ND	376,3 ± 22,7	61,3 ± 3,5	ND	218,6 ± 5,5	1,5 ± 0,0	21,6 ± 0,8	679,3
47	ND	ND	14,1 ± 0,2	3,3 ± 0,2	ND	ND	1,5 ± 0,0	34,0 ± 1,1	52,9
50	ND	ND	16,7 ± 0,4	4,5 ± 0,2	ND	322,4 ± 25,8	2,2 ± 0,1	30,1 ± 0,5	375,8
52	ND	ND	6,5 ± 0,4	ND	ND	322,6 ± 6,3	1,9 ± 0,1	40,1 ± 1,6	371,2
56	ND	ND	ND	ND	ND	291,7 ± 15,2	2,5 ± 0,1	29,9 ± 0,5	324,1
57	ND	ND	ND	ND	ND	315,4 ± 11,2	1,5 ± 0,0	36,1 ± 2,0	353,0

Č. km. – číslo kmene, TPA – tryptamin, PEA – fenylethylamin, PUT – putrescin, CAD – kadaverin, HIA – histamin, TRA – tyramin, SPD – spermidin, SPM – spermin, ΣBA – celkové množství produkovaných biogenních aminů, ND – biogenní amin nebyl detekován. Výsledky jsou uváděny jako průměr čtyř měření ± směrodatná odchylka. (Kmeny č. 1 – 29 byly izolovány z půdy a č. 32 – 57 ze stojaté povrchové vody.)

U bakteriálního kmene č. 29 byla jako u jediného zjištěna produkce fenylethylaminu, a sice v množství $13,3 \pm 0,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Jednalo se o půdní bakterii *Acinetobacter calcoaceticus*. U jedenácti ze sledovaných bakteriálních kmenů byla prokázána tvorba putrescinu. U bakteriálního kmene č. 44 (*Serratia fonticola*), izolovaného z vodní nádrže, detekované množství putrescinu ($376,3 \pm 22,7 \text{ mg.l}^{-1}$) výrazně převyšovalo množství zjištěná u ostatních kmenů. Naopak nejnižší produkce putrescinu byla detekována v množství $6,5 \pm 0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ u kmene č. 52 (*Bacillus idriensis*) izolovaného z rybníční vody. U ostatních devíti bakteriálních kmenů byl putrescin produkován v množství $13,1 - 38,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Dvanáct ze sledovaných kmenů projevilo schopnost dekarboxylovat lysin za vzniku kadaverinu. Nejčastěji se hodnoty detekovaných množství pohybovaly v rozmezí $3,3 - 4,8 \text{ mg.l}^{-1}$, a to zejména u bakterií rodu *Bacillus*. Zatímco produkce kadaverinu bakteriemi *Pseudomonas koreensis* se pohybovala také v tomto rozmezí, u druhu *Pseudomonas antarctica* žádná produkce toho biogenního aminu vyzorována nebyla. Nepatrně vyšší množství ($9,3 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$) bylo naměřeno u bakteriálního kmene č. 32 (*Viridibacillus neidei*) izolovaného z vodního prostředí. Výrazně vyšší byla produkce kadaverinu ($61,3 \pm 3,5 \text{ mg.l}^{-1}$) zjištěná u kmene č. 44 (*Serratia fonticola*) a u kmene č. 1 ($124,9 \pm 1,5 \text{ mg.l}^{-1}$), který se nepodařilo identifikovat. Tvorba tyraminu byla zaznamenána u dvaceti ze sledovaných kmenů. Jediný kmen, u kterého zaznamenána nebyla (č. 47) se nepodařilo identifikovat. Nejnižší množství vytvořeného tyraminu ($136,8 \pm 3,9 \text{ mg.l}^{-1}$) bylo detekováno u kmene č. 34 (*Pseudomonas antarctica*). Ostatní hodnoty se pohybovaly převážně v rozmezí $218,6 - 345,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Produkce spermidinu i sperminu byla detekována u všech sledovaných bakteriálních kmenů. Hodnoty naměřených množství spermidinu se bez výjimky pohybovaly v rozmezí $0,9 - 2,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Ani žádná z naměřených hodnot tvorby sperminu sledovanými bakteriálními kmeny se výrazně nevymykala. Pohybovaly se v rozmezí $21,6 - 40,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Vyzorována nebyla žádná závislost na původu bakterií ani na jejich taxonomickém zařazení.

Celkové množství produkováných biogenních aminů v žádném z případů nepřekročilo mezní hodnotu ($750 - 900 \text{ mg.kg}^{-1}$), která je uváděna v literatuře jako množství nebezpečné pro zdraví člověka [19].

Informace o dekarboxylasové aktivitě bakterií vyskytujících se v životním prostředí se v dostupné literatuře objevují jen zřídka. Výjimečně jsou zmiňovány některé druhy bakterií, které se v této práci také podařilo izolovat, ale v jiných souvislostech.

Ve spojení s možným využitím kmene *Bacillus pumilus* jako biokatalyzátoru při přípravě 4-vinyl-guaiacolu z kyseliny ferulové zmiňuje Lee a kol. [56] jeho schopnost kyselinu ferulovou dekarboxylovat. Také v této bakalářské práci byla zjištěna jeho schopnost dekarboxylovat některé aminokyseliny. Jak prokázala analýza vznikajících metabolických produktů pomocí HPLC – UV/Vis, byl u kmene č. 3 detekován kadaverin, tyramin, spermidin a spermin. Min a kol. [57] sledovali tvorbu biogenních aminů bakteriemi *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae* a *Alcaligenes faecalis*. U všech tří zmíněných prokázali, mimo jiné, tvorbu putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu. Rovněž Lorenzo a kol. [58] ve své práci prokázali schopnost kmene *Enterobacter cloacae* tvořit histamin, kadaverin, putrescin a tyramin. S výjimkou histaminu byla u všech tří uvedených kmenů zmíněná zjištění potvrzena i v této bakalářské práci.

Analýzou vznikajících biogenních aminů byla zjištěna poměrně vysoká schopnost sledovaných biodegradérů tuto skupinu látek vytvářet. Vzhledem k jejich výrazným biologickým účinkům se jedná o potenciální rizikové faktory. Kontaminací užitkové vody, by mohlo dojít k případnému transferu při zavlažování plodin, což by mohlo mít za následek zvýšený výskyt biogenních aminů v potravinách. Stejný dopad by mohlo mít její využití při napájení hospodářských zvířat. Jelikož je většina biogenních aminů rozpustná ve vodě, nehrozí jejich případná akumulace v tukových tkáních ryb nebo dalších živočichů obývajících vodní ekosystémy.

Tato práce poukázala na schopnost bakterií vyskytujících se v životním prostředí (v půdách a v povrchových stojatých vodách) produkovat stejné biogenní aminy (a to relativně významná množství), které jsou diskutované v souvislosti s bezpečností potravin. Práce ale nepodává žádné informace o tom, jaká množství těchto látek se reálně ve stojatých povrchových vodách vyskytují. Proto by bylo možné využít metodu HPLC – UV/Vis a další analytické instrumentální metody pro stanovení jednotlivých biogenních aminů přímo ve vzorcích vod.

ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce byla zaměřena na studium dekarboxylasové aktivity u bakterií vyskytujících se v biotických prostředích (tzv. biodegradérů). Izolované bakterie byly identifikovány pomocí MALDI/TOF. Z výsledků identifikace a z výsledků získaných kultivační metodou a následným stanovením produkce biogenních aminů (tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) metodou HPLC – UV/Vis lze konstatovat:

- Ze vzorků půd i povrchových stojatých vod byly nejčastěji izolovány a identifikovány bakterie rodu *Bacillus*.
- Kultivační metodou byla schopnost dekarboxylovat vybrané aminokyseliny (arginin, histidin, lysin, ornitin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan) ve větší míře zjištěna u bakterií izolovaných ze stojatých povrchových vod, než u půdních bakterií.
- Stanovení vznikajících biogenních aminů metodou HPLC – UV/Vis potvrdilo u všech 21 sledovaných kmenů schopnost dekarboxylovat aminokyseliny. Žádný ze sledovaných bakteriálních kmenů netvořil histamin ani tryptamin. V největších množstvích produkovaly sledované kmeny tyramin a spermin. Všechny ze sledovaných bakteriálních kmenů tvořily spermin a spermidin.
- Chromatografické stanovení potvrdilo výskyt falešně pozitivních i falešně negativních výsledků u kultivační metody.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ÖNAL, A.: *A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods*. Food Chem. **103**, 1475-1486 (2007).
- [2] TORO-FUNES, N., BOSCH-FUSTE, J., LATORRE-MORATALLA, M. L., VECIANA-NOGUÉS, M. T., VIDAL-CAROU, M. C.: *Biologically active amines in fermented and non-fermented commercial soybean products from the Spanish market*. Food Chem. **173**, 1119-1124 (2015).
- [3] ARRIETA, M. P., PRATS-MOYA, M. S.: *Free amino acids and biogenic amines in Alicante Monastrell wines*. Food Chem. **135**, 1511-1519 (2012).
- [4] ERIM, F. B.: *Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples*. TRAC-Trend. Anal. Chem. **52**, 239-247 (2013).
- [5] POSTE, A. E., GRUNG, M., WRIGHT, R. F.: *Amines and amine-related compounds in surface waters: A review of sources, concentration and aquatic toxicity*. Sci. Total Environ. **418**, 274-279 (2014).
- [6] MCMURRY, J.: *Organická chemie*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2007, 1176, 61, 31 s., ISBN 978-80-214-3291-8.
- [7] LONVAUD-FUNEL, A.: *Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol. Lett. **199**, 9-13 (2001).
- [8] SHALABY, A. R.: *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. Food Res. Int. **29**, 675-690 (1996).
- [9] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., KLČOVSKÁ, P., MRKVIČKA, V., DOLEŽALOVÁ, M., KRÁČMAR, S.: *Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin*. Food Chem. **121**, 203-206 (2010).
- [10] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., DRÁB, V., HLOBILOVÁ, M., KRÁČMAR, S.: *Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení*. Potravinářstvo **4**, 372-380 (2010).
- [11] SILLA-SANTOS, M. H.: *Biogenic amines: their importance in foods*. Int. J. Food Microbiol. **29**, 213-231 (1996).
- [12] KALÁČ. P.: *Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005 – 2013*. Food Chem. **161**, 27-39 (2014).

- [13] VIEIRA, S. M., THEODORO, K. H., GLÓRIA, M. B. A.: *Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink*. Food Chem. **100**, 895-903 (2007).
- [14] NUNEZ, M., MEDINA, M.: *Biogenic amines*. In: FUQUAY, J. W.: *Encyclopedia of dairy science, second edition*. Boston, MA: Elsevier, 2011. 451-456, ISBN 9780123744029.
- [15] LANDETE, J. M., RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R.: *Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods*. Int. J. Food Microbiol. **117**, 258-269 (2007).
- [16] ALVAREZ, M.A., MORENO-ARRIBAS, M.V.: *The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution*. Trends Food Sci. Tech. **39**, 146-155 (2014).
- [17] BUSHAW-NEWTON, K. L., MORAN, M. A.: *Photochemical formation of biologically available nitrogen from dissolved humic substances in coastal marine systems*. Aquat. Microb. Ecol. **18**, 285-292 (1999).
- [18] MA, F., WAN, Y., YUAN, G., MENG, L., DONG, Z., HU, J.: *Occurrence and source of nitrosamines and secondary amines in groundwater and its Adjacent Jialu River Basin, China*. Environ. Sci. Technol. **46**, 3236-3243 (2012).
- [19] LADERO, V., CALLES, M., FERNÁNDEZ, M., ALVAREZ, M.A.: *Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines*. Curr. Nutr. Food Sci. **6**, 145-156 (2010).
- [20] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z.: *Biogenic Amines in Food*. **59**, 70-79 (2005).
- [21] JANČOVÁ, P., ŠILLER, M.: *Phase II Drug Metabolism*. Topics on Drug Metabolism. James Paxton (Ed.). InTech. ISBN 978-953-51-0099-7. Feb 2012. [cit. 3. 5. 2015] Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism/phase-ii-drug-metabolism>
- [22] STRATTON, J.E., HUTKINS, R.W., TAYLOR, S.L.: *Biogenic Amines in Cheese and other Fermented Foods: A Review*. J. Food Protect. **54**, 460-469 (1991)
- [23] KITASHIBA, H., HAO, Y., HONDA, CH., MORIGUCHI, T.: *Two types of spermine synthase gene: MdACL5 and MdSPMS are differentially involved in apple fruit development and cell growth*. Gene **361**, 101-111 (2005).

- [24] SUZZI, G., GARDINI, F.: *Biogenic amines in dry fermented sausages: a review*. Int. J. Food Microbiol. **88**, 41-54 (2003).
- [25] BUŇKOVÁ, L., ADAMCOVÁ, G., HUDCOVÁ, K., VELICHOVÁ, H., PACHLOVÁ, V., LORENCOVÁ, E., BUŇKA, F.: *Monitoring of biogenic amines in cheese manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic*. Food Chem. **141**, 548-551 (2013).
- [26] SANTIAGO-SILVA, P., LABANCA, R. A., GLORIA, M. B.A.: *Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines*. Food Res. Int. **44**, 1264-1268 (2011).
- [27] KALACĚ, P., ŠVECOVÁ, S., PELIKÁNOVÁ, T.: *Levels of biogenic amines in typical vegetable products*. Food Chem. **77**, 349-351 (2002).
- [28] LAVIZZARI, T., VECIANA-NOGUÉS, M. T., BOVER-CID, S., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M. C.: *Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr., A. **1129**, 67-72 (2006).
- [29] BASHEER, CH., WONG, W., MAKAHLEH, A., TAMEEM, A. A., SALHIN, A., SAAD, B., LEE, H.K.: *Hydrazone-based ligands for micro-solid phase extraction-high performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in orange juice*. J. Chromatogr., A. **1218**, 4332-4339 (2011).
- [30] PASTORE, P., FAVARO, G., BADOCCO, D., TAPPARO, A., CAVALLI, S., SACCANI, G.: *Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode*. J. Chromatogr., A **1098**, 111-115 (2005).
- [31] ORDÓÑEZ, J. L., CALLEJÓN, R. M., MORALES, M. L., GARCÍA-PARRILLA, M.C.: *A survey of biogenic amines in vinegars*. Food Chem. **141**, 2713-2719 (2013).
- [32] KALACĚ, P., KRÍŽEK, M.: *Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions*. Food Chem. **58**, 233-236 (1997).

- [33] KALACĚ, P., HLAVATÁ, V., KRÍŽEK, M.: *Concentrations of five biogenic amines in Czech burs and factors affecting their formation*. Food Chem. **58**, 209-214 (1997).
- [34] ASAMI, M., OYA, M., KOSAKA, K.: *A nationwide survey of NDMA in raw and drinking water in Japan*. Sci. Total. Environ. **407**, 3540-3545 (2009).
- [35] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M.: *Obecná mikrobiologie*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2007, 190 s., ISBN 978-80-7318-516-9.
- [36] AMBROŽOVÁ, J.: *Mikrobiologie v technologii vod*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004, 252 s., ISBN 978-80-7080-676-0.
- [37] BEDNÁŘ, M. et al.: *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996, 558 s.
- [38] RULÍK, M. et al.: *Mikrobiální ekologie vod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2013, 292 s., ISBN 9788024434773.
- [39] LELLÁK, J., KUBÍČEK, F.: *Hydrobiologie*. 1. vyd. Praha, Karolinum, 1991, 260 s., ISBN 80-7066-530-0.
- [40] HAHN, M. W.: *The microbial diversity of inland waters*. Curr. Opin. Biotech. **17**, 256-261 (2006).
- [41] STRAŠKRABOVÁ, V.: *Mikrobiální ekologie vody*. Praha: Ministerstvo životního prostředí ČR, 1996, 119 s., ISBN 80-85368-88-9.
- [42] RŮŽIČKA, J.: *Mikrobiologie pro technologii životního prostředí*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, Technologická fakulta ve Zlíně, 1999, 124 s., ISBN 80-214-1374-3.
- [43] GRUBINGER, V.: *Soil Microbiology: A Primer* [online]. University of Vermont Extension. University of Vermont, Nov 2004 [cit. 11. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.uvm.edu/vtvegandberry/factsheets/SoilMicrobes.html>
- [44] ABBOTT, L., SLATER, J.: *Soils are Alive* [online]. The University of Western Australia. Crawley, Feb 2005 [cit. 11. 4. 2015]. Dostupné z: <http://www.soilhealth.see.uwa.edu.au/index>
- [45] RŮŽEK, L., VOŘÍŠEK, K.: *Pedobiologie a mikrobiologie – vybrané kapitoly*. 2. vyd. Praha 6 – Suchdol: Česká zemědělská univerzita, 2010, 184 s., ISBN 978-80-213-2126-7.

- [46] DUA, M., SINGH, A., SETHUNATHAN, N., JOHRI, A.K.: *Biotechnology and bioremediation: successes and limitations*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **59**, 143-152 (2002).
- [47] BASTIOLI, C.: *Handbook of biodegradable polymers*. Shrewsbury: Rapra Technology, 2005, 534s., ISBN 1-85957-389-4, [cit. 13. 1. 2015]. Dostupné z: http://www.academia.edu/4243818/Handbook_of_Biodegradable_Polymers
- [48] GARTISER, S., WALLRABENSTEIN, M., STEINE, G.: *Assessment of Several Test Methods for the Determination of the Anaerobic Biodegradability of Polymers*. J. Environ. Polym. Degr. **6**, 159-173 (1998).
- [49] SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E.P., WEILAND, P., BORJA, R.: *The effect of biogas sparging on cow manure characteristics and its subsequent anaerobic biodegradation*. Int. Biodeter. Biodegr. **83**, 10-16 (2013).
- [50] LYČKOVÁ, B., FEČKO, P., KUČEROVÁ, R.: *Multimediální učební texty zaměřené na problematiku zpracování kalů* [online]. VŠB – TU. Ostrava, 2008 [cit. 4. 5. 2015]. Dostupné z: <http://homen.vsb.cz/hgf/546/Materialy/Bara/index.html>
- [51] MISRA, E., MEW, T.W.: *A manual of rice seed health testing*. Manila: International rice research institute (IRRI), 1994, 113 s., ISBN 9712200493 [cit. 8. 5. 2015]. Dostupné z: http://books.irri.org/9712200493_content.pdf
- [52] JANDOVÁ, B., KOTOUČKOVÁ, L.: *Praktikum z mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1996, 67 s., ISBN 8021013745.
- [53] PUREVDORJ, K. *Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z masných výrobků a produktů studené kuchyně*. Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati. Fakulta technologická. Vedoucí práce Leona Buňková.
- [54] SVOBODOVÁ, Z. *Dekarboxylázová aktivita bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků*. Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati. Fakulta technologická. Vedoucí práce Leona Buňková.
- [55] DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T.: *Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC)*. Food Chem. **116**, 365-370 (2009).

- [56] LEE, I.Y., VOLM, T.G., ROSAZZA, J.P.N.: *Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by Bacillus pumilus in aqueous-organic solvent two-phase systems*. Enzyme Microb. Tech. **23**, 261-266, 1998.
- [57] MIN, J.S., LEE, S.O., JANG, A., JO, C., LEE, M.: *Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork*. Food Chem. **104**, 791-799 (2007).
- [58] LORENZO, J.M., CACHALDORA, A., FONSECA, S., GÓMEZ M., FRANCO, I., CARBALLO, J.: *Production of biogenic amines „in vitro“ in relation to the growth phase by Enterobacteriaceae species isolated from traditional sausages*. Meat Sci. **86**, 684-691 (2010).

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

APB	Agar pro stanovení půdních bakterií
ARG	Arginin
CAD	Kadaverin
DAO	Diaminooxidasa
G-	Gramnegativní
G+	Grampozitivní
HIA	Histamin
HIS	Histidin
HNMT	Histamin <i>N</i> -methyltransferasa
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHSK	Chemická spotřeba kyslíku
LC ₅₀	Smrtelná koncentrace
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
INMT	Indolethylamin <i>N</i> -methyltransferasa
LYS	Lysin
MALDI	Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MAO	Monoaminoxidasa
MPB	Masopeptonový bujón
ND	Biogenní amin nebyl detekován
ORN	Ornitin
PEA	Fenylethylamin
PHE	Fenylalanin
PUT	Putrescin
RCF	Relativní centrifugační zrychlení

SPD	Spermidin
SPM	Spermin
TOF	Analyzátor doby letu
TPA	Tryptamin
TRA	Tyramin
TRP	Tryptofan
TYA	Tryptone Yeast Agar
TYR	Tyrosin
UV/Vis	Spektrofotometrický detektor v oblasti UV a viditelného záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Obecná struktura aminů.....	12
Obr. 2: Obecné schéma dekarboxylace aminokyseliny	13
Obr. 3: Schéma vzniku jednotlivých biogenních aminů.....	14
Obr. 4: Schéma bakteriální buňky [37].....	21
Obr. 5: Morfologické znaky kolonií [51].....	32

SEZNAM TABULEK

Tabulka I: Makroskopické morfologické znaky bakterií izolovaných z půdního prostředí.	37
Tabulka II: Makroskopické morfologické znaky bakterií izolovaných ze stojatých povrchových vod.....	39
Tabulka III: Mikroskopické morfologické znaky a biochemická aktivita bakterií izolovaných z půdního prostředí.....	40
Tabulka IV: Mikroskopické morfologické znaky a biochemická aktivita bakterií izolovaných z prostředí sladkých vod.....	41
Tabulka V: Výsledky identifikace bakterií izolovaných z půdy (kmeny č. 1 – 29) a ze stojaté povrchové vody (kmeny č. 30 – 61).	42
Tabulka VI: Výsledky dekarboxylace jednotlivých aminokyselin bakteriemi izolovanými z půdního prostředí.	44
Tabulka VII: Výsledky dekarboxylace jednotlivých aminokyselin bakteriemi izolovanými ze stojatých povrchových vod.....	45
Tabulka VIII: Výsledky analýzy produkce jednotlivých biogenních aminů metodou HPLC – UV/Vis.....	47

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Mapa odběrových míst

PŘÍLOHA P I: MAPA ODBĚROVÝCH MÍST

