

Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými ze vzorků vod

Karolína Ceditlová

Bakalářská práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karolína Ceditlová**
Osobní číslo: **T13889**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými ze vzorků vod**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat literární rešerši, která se bezprostředně týká zadaného tématu.
2. Izolovat vhodné bakterie ze vzorků různých typů vod.
3. Provést screening dekarboxylasové aktivity (na kultivačním médiu, s jednotlivými aminokyselinami).
4. V závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty se vzorky.
5. 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:

2. února 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

20. května 2016

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ...CEJDLOVÁ KAROLÍNA.....

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 6.3.2016.....

.....Cejdlová.....

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). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

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

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

ABSTRAKT

Biogenní aminy jsou přirozeně se vyskytující dusíkaté nízkomolekulární látky; jsou produktem běžné metabolické aktivity zvířat, rostlin i mikroorganismů. Na základě řady experimentů bylo prokázáno, že se tyto látky mohou ve velké míře vyskytovat v potravinách, kde za jejich výskytem stojí přítomnost bakterií s dekarboxylasovou aktivitou. Biogenní aminy jsou látky, které na jedné straně zajišťují řadu důležitých funkcí, na druhé straně mohou nadměrná množství způsobovat nežádoucí až toxické účinky.

V současné době je v dostupné literatuře velmi málo informací o dekarboxylasové aktivitě bakterií významných v životním prostředí. Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na studium dekarboxylasové aktivity u bakterií izolovaných ze vzorků povrchových vod (voda ze studánek, rybníků nebo vodní nádrže). Z 5 vzorků povrchových vod se podařilo izolovat 55 bakteriálních kmenů, z nichž bylo 37 identifikováno metodou MALDI/TOF. Mezi identifikovanými bakteriemi byly v největším zastoupení rody *Pseudomonas* (35 %) a *Acinetobacter* (30 %). Screening dekarboxylasové aktivity kultivační metodou, byl téměř u všech izolovaných bakterií pozitivní. Pro stanovení koncentrace biogenních aminů (tryptaminu, fenylethylaminu, histidinu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu) byla využita metoda HPLC – UV/Vis. Všechny identifikované kmeny (100 %) produkovaly spermin a spermidin; 70 % identifikovaných kmenů se podílelo na produkci kadaverinu, 30 % na produkci tyraminu a putrescinu, a cca 5 % na produkci histaminu a tryptaminu. Fenylethylamin nebyl produkován žádným izolovaným identifikovaným kmenem. Tyto výsledky dokumentují, že i bakterie významné v životním prostředí vlastní dekarboxylasovou aktivitu a jsou schopny produkovat biogenní aminy v ne zcela zanedbatelných množstvích (jednotky – stovky mg.l⁻¹).

Klíčová slova: biogenní aminy, dekarboxylace, MALDI/TOF, HPLC

ABSTRACT

Biogenic amines are naturally occurring nitrogenous low molecular substances; are products of normal metabolic activity of animals, plants and microorganisms. On the basis of a series of experiments it was shown that these substances may be extensively present in foods where the incidence for standing the presence of bacteria having decarboxylase activity. Biogenic amines are compounds which on the one hand provide a number of important functions, on the other hand, excessive quantities to cause undesirable toxic effects.

Currently, the available literature is very little information about decarboxylase activity of bacteria important in the environment. The bachelor thesis is focused on the study decarboxylase activity in bacteria isolated from samples of surface water (water from wells, ponds or water tanks). Of 5 samples of surface water could be isolated 55 bacterial strains, of which 37 were identified by MALDI/TOF. Among the identified bacteria were most represented genera *Pseudomonas* (35 %) and *Aci-netobacter* (30 %). Screening decarboxylase activity cultivation method, almost all the isolated bacteria positive. For determining the concentration of biogenic amines (tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, spermine and spermidine) method was used HPLC - UV/Vis. All identified strains (100 %) produced by spermine and spermidine; 70 % of identified strains were involved in the production of cadaverine, 30 % for the production of putrescine and tyramine, and about 5 % for the production of histamine and tryptamine. Phenylethyl-lamin has not produced any isolated strain identified. These results demonstrate that even bacteria in the environment significant own decarboxylase activator herein and are capable of producing biogenic amines in a not entirely insignificant amounts (units - hundreds mg.l⁻¹).

Keywords: biogenic amines, decarboxylation, MALDI/TOF, HPLC

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě chci poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Petře Jančové, Ph.D. za odborné rady, vstřícnost při konzultacích a pomoc při zpracování této práce.

Dále pak doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, Lence Machálkové, Bc. Veronice Kučabové a Ing. Ludmile Zálešákové za čas, který mně věnovaly při pomoci během zpracování experimentální části bakalářské práce v mikrobiologické laboratoři.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BAKTERIE	13
1.1 MORFOLOGIE	14
1.2 STAVBA BAKTERIÁLNÍ BUŇKY.....	15
1.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ BAKTERIÁLNÍ BUŇKY.....	15
1.3.1 Buněčná stěna bakteriální buňky	16
1.4 BAKTERIÁLNÍ OSÍDLENÍ SLADKÝCH VOD.....	16
2 AMINY	17
2.1.1 Vlastnosti aminů.....	17
2.2 BIOGENNÍ AMINY	17
2.2.1 Dělení biogenních aminů	18
2.2.2 Vznik biogenních aminů	18
2.2.2.1 Dekarboxylace	18
2.2.3 Reakce a přeměny biogenních aminů	19
2.2.4 Toxicita biogenních aminů.....	20
2.2.5 Biogenní aminy jako karcinogeny	21
2.2.6 Význam	21
2.2.7 Výskyt	22
2.2.7.1 Vstup aminů do životního prostředí.....	23
3 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY IZOLOVANÝCH ZE VZORKŮ POVRCHOVÝCH VOD	24
3.1 METODA MALDI/TOF MS	24
3.1.1 Princip metody MALDI/TOF	24
3.1.1.1 Ionizace.....	25
3.1.1.2 TOF analyzátor	25
3.1.1.3 Detektor	25
3.2 METODA POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE	25
3.2.1 Princip metody PCR.....	26
3.2.2 Využití PCR	27
4 METODY DETEKCE PRODUKOVANÝCH BIOGENNÍCH AMINŮ	28
4.1 HPLC – HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	28
4.1.1 HPLC – UV/Vis	29
4.1.2 HPLC – FD	30
4.1.3 HPLC – MS.....	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
5 CÍL PRÁCE	34
6 PRACOVNÍ POSTUPY	35
6.1 POUŽITÝ MATERIÁL.....	35
6.1.1 Přístroje a pomůcky.....	35
6.1.2 Chemikálie	35

6.2	ODBĚR VZORKŮ.....	35
6.3	ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ.....	36
6.3.1	Příprava Tryptone Yeast Extract Agar = TYA	36
6.3.2	Kultivace vzorků	36
6.4	POPIS JEDNOTLIVÝCH BAKTERIÁLNÍCH KOLONÍ.....	36
6.4.1	Makroskopické morfologické znaky	36
6.4.2	Mikroskopické morfologické znaky	37
6.4.2.1	Gramovo barvení	37
6.4.3	Biochemické testy	37
6.4.3.1	Katalasový test.....	37
6.4.3.2	Oxidasový test.....	37
6.5	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ METODOU MALDI/TOF MS	38
6.6	STUDIUM DEKARBOXYLASOVÉ AKTIVITY U IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ	38
6.6.1	Kultivační screeningová metoda	38
6.6.1.1	Příprava masopeptonového bujónu = MPB	38
6.6.1.2	Příprava dekarboxylačního média	39
6.6.2	Stanovení biogenních aminů pomocí HPLC – UV/Vis	39
6.6.2.1	Příprava MPB s přísávkem aminokyselin	39
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
7.1	CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ	41
7.2	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ POMOCÍ MALDI/TOF	45
7.3	STANOVENÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ KULTIVAČNÍ METODOU	46
7.4	STANOVENÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ METODOU HPLC – UV/VIS.....	47
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	61
	SEZNAM TABULEK.....	62
	SEZNAM PŘÍLOH.....	63

ÚVOD

Biogenní aminy (BA) jsou přirozeně se vyskytující nízkomolekulární látky, které ve své struktuře obsahují dusík. Nejčastěji vznikají enzymatickou dekarboxylací aminokyselin.

V životním prostředí zastupují biogenní aminy několik důležitých funkcí, jsou významným zdrojem dusíku a jsou produkty metabolických aktivit živočichů, rostlinných organismů a mikroorganismů. Důležitou úlohu mají také pro funkci lidského organismu, stabilizují nukleové kyseliny, ovlivňují krevní tlak, jsou prekurzory pro syntézy hormonů, alkaloidů a bílkovin nebo působí jako neurotransmitery v centrálním nervovém systému.

Nicméně ve vysokých koncentracích působí na lidský organismus negativně. Ovlivňují kontraktilitu cév, způsobují bolesti hlavy, migrény, dýchací potíže, hypertenzi nebo hypotenzi. Biogenní aminy jsou také prekurzory *N*-nitrososloučenin, které jsou karcinogenní.

Výskyt biogenních aminů je sledován hlavně v potravinách, kde se běžně vyskytují. Sledovanými aminy jsou např. histamin, putrescin, tyramin nebo spermidin.

V dostupné literatuře je jen málo informací o produkci biogenních aminů bakteriemi vyskytujícími se v životním prostředí.

Tato bakalářská práce se zabývá studiem schopnosti produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými ze vzorků povrchových vod. Sledovanými biogenními aminy jsou – spermin, spermidin, fenylethylamin, histamin, kadaverin, putrescin, tryptamin a tyramin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy. Velikost prokaryotické buňky se obvykle pohybuje mezi desetinami až desítkami mikrometrů. Nikdy netvoří funkčně a morfolologicky diferencované tkáně, ale mohou tvořit kolonie [1].

Podle optimální teploty rozlišujeme:

- psychofilní (chladnomilné) – rostou za nižších teplot od 10 do 20 °C, ale rozmnožují se od -5 do 30 °C, nachází se v hlubokých vodách;
- mezofilní – nejlépe rostou za teploty 37,5 °C, ale rostou v intervalu od 20 do 40 °C;
- termofilní (teplomilné):
 - striktně termofilní – optimální teplota růstu je 55 °C, maximální teplota růstu je 80 °C, při teplotě pod 30 °C už nerostou;
 - fakultativně termofilní – ideálně rostou v intervalu od 45 do 55 °C, aktivní jsou i při teplotách pod 30 °C a růst jsou schopny až do 75 °C [2].

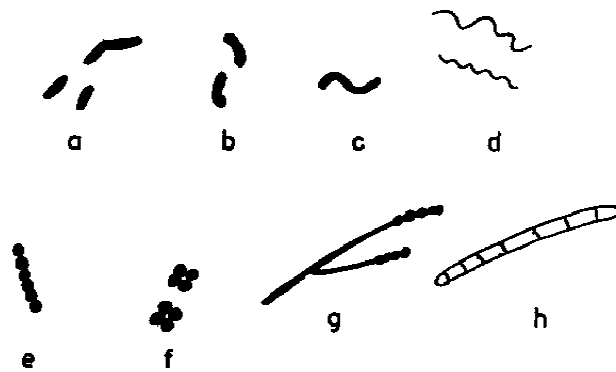
Podle nároku na kyslík rozlišujeme bakterie:

- 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 [2].

Podle nároků na výživu rozdělujeme mikroorganismy:

- autotrofní – kterým k výživě stačí pouze anorganické sloučeniny;
- heterotrofní – které vyžadují přítomnost organických sloučenin v živném prostředí, ať už jako zdroj uhlíku, vodíku nebo energie [1].

1.1 Morfologie



Obrázek 1: Tvar bakteriálních buněk [1]

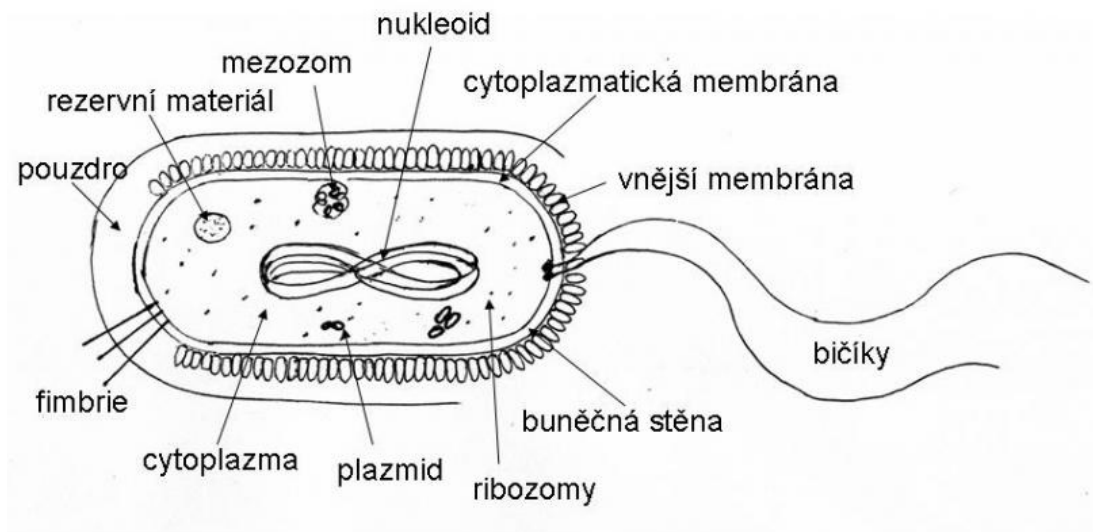
- a) rovné tyčinky; b) zakřivené tyčinky (vibria); c) spirily; d) spirochety;
 e) streptokoky; f) tetrakoky; g) mycelium se sporami (streptomycety);
 h) nevětvená vlákna

Bakterie jsou po fyziologické stránce velmi rozmanité, po morfologické stránce nejsou mezi jednotlivými rody velké rozdíly. Tvar buněk bakterií (viz obrázek 1) je nejčastěji tyčinkovitý, méně často kulovitý [1].

Tyčinkovité buňky jsou buď rovné (obr. 1-a), zakřivené (obr. 1-b), tvaru pravidelné spirály (obr. 1-c) nebo dlouhé nepravidelné spirály (obr. 1-d). Různé druhy bakterií se liší poměrem délky buňky k její šířce. U většiny tyčinkovitých bakterií se délka pohybuje v rozmezí od 1 do 3 μm a šířka od 0,5 do 1,5 μm [1].

Kulovité buňky se nazývají koky. Pokud se rozmnožují dělením pouze v jedné rovině, tvoří řetízky (obr. 1-e), např. rod *Streptococcus*. Dělením koků v různých rovinách vznikají nepravidelné shluky buněk (obr. 1-f), např. rod *Staphylococcus* [1].

1.2 Stavba bakteriální buňky



Obrázek 2: Schéma bakteriální buňky [3]

Bakterie mají buněčnou stěnu, která obklopuje cytoplazmatickou membránu (viz obrázek 2). Cytoplazma má na elektronoptických snímcích granulární vzhled v důsledku přítomnosti většího počtu ribozomů. Uvnitř cytoplazmy je jaderný genetický aparát, též zvaný nukleoid. U mnoha bakterií se vyskytují membránovité struktury zvané mezosomy, které jsou v těsném vztahu k nukleoidu a cytoplazmatické membráně. V cytoplazmě se vyskytují různá granule, jako jsou kapénky lipidů, granula glykogenu nebo zásobní polymery, u fotosyntetických bakterií jsou dále v cytoplazmě přítomny chromatofory, v nichž probíhá fotosyntéza. Buněčná stěna může být pokryta fimbriemi, které slouží především k přichycení a k pohybu. Dalším pohybovým orgánem je bičík. Některé bakterie mohou na povrchu stěny vytvářet vnější pouzdro neboli kapsuli [1].

1.3 Chemické složení bakteriální buňky

Živá biomasa obsahuje 70 – 95 % vody, zůstatek se nazývá sušina. Z té činí 40 – 80 % bílkoviny, 5 – 20 % sacharidy, 10 – 30 % RNA, 5 – 10 % lipidy a zbytek různé organické látky jako jsou intermediáty metabolismu, vitamíny, barviva nebo toxiny. Anorganický podíl činí 5 – 10 % sušiny a obsahuje zejména fosforečnany (2 – 6 %), sírany (1 %), draslík, hořčík, ostatní látky a prvky v podstatně nižším procentuálním zastoupení [1].

1.3.1 Buněčná stěna bakteriální buňky

Podle rozdílných složek obsažených v buněčné stěně dělíme bakterie na:

- grampozitivní – jejichž usmrcené buňky po odbarvení Gramovým barvicím roztokem a moření jodovým roztokem neztrácejí toto barvivo působením rozpouštědel;
- gramnegativní – u kterých je toto barvivo z obarvených buněk rozpouštědly vyplavováno a buňky zcela odbarveny, což je příčinou nepřítomnosti teichoové kyseliny v buněčné stěně a poměrně tenkou vrstvou peptidoglykanu [1].

1.4 Bakteriální osídlení sladkých vod

Pro stavbu buněk mikroorganismů a jejich aktivitu je nezbytná přítomnost určitého procenta vody v jejich životním prostředí. Pro většinu z nich je voda nositelem zdrojů výživy a energie [2].

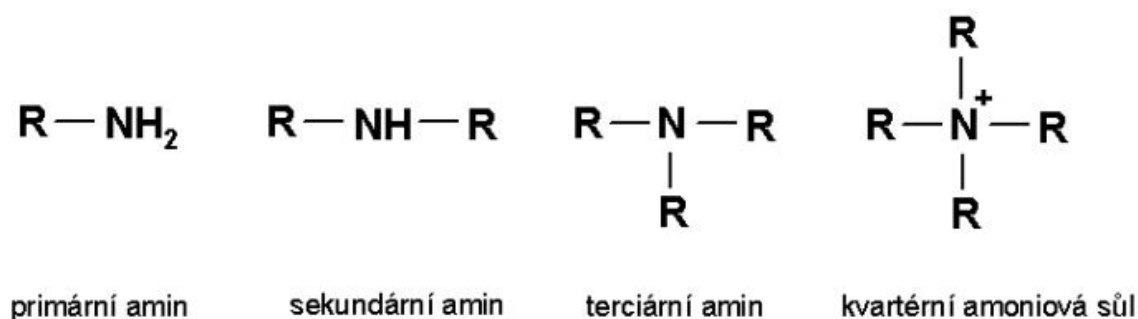
Za nepříznivých podmínek mohou některé bakteriální buňky ztrácet část vody, jejich cytoplazma se zahustí a vytvoří tak další vrstvy chránící buňku. Tyto buňky se změní na spory, které se dále nemnoží. Spory jsou velmi odolné, odolávají teplotám až 100 °C a podchlazení -190 °C. Za příznivých podmínek spora přijme vodu a změní se na buňku s plnou životaschopností [4].

Ve sladkých vodách se vyskytují rozmanité bakterie. Lze je rozdělit do tří hlavních skupin:

- autochtonní vodní bakterie – jsou přirozené vodní bakterie, zejména zde patří rody *Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Micrococcus*, *Sphaerotillus*, *Spirillum* a prostékaté bakterie. Většina autochtonních vodních bakterií je psychrofilních a jsou aerobní či fakultativně anaerobní, avšak tam, kde je dostatek organických látek, lze najít i striktní anaeroby jako rod *Clostridium*, *Desulfovibrio* aj.;
- půdní bakterie – přecházejí do vody nejrůznějšími splachy. Jsou to zejména zástupci rodu *Bacillus*, *Micrococcus*, koryneformní bakterie a aktinomycety;
- střevní bakterie člověka a zvířat – jedná se o enterobakterie a enterokoky, i o četná klostridia. Největší význam mají tzv. koliformní bakterie v čele s *Escherichia coli*, které slouží jako indikátory kontaminace vod fekálním znečištěním [5].

2 AMINY

Aminy jsou dusíkaté deriváty uhlovodíků, v nichž je na uhlovodíkovém zbytku vázána aminoskupina. Současně však aminy můžeme považovat za deriváty amoniaku, v jehož molekule jsou jeden, dva nebo tři atomy vodíku nahrazeny substituentem – uhlovodíkovým zbytkem, který může být alifatický nebo aromatický. Takto lze odvodit tři různé charakteristické skupiny a tři různé typy aminů (viz obrázek 3) – primární amin, sekundární amin, terciální amin. Jsou známy sloučeniny i se čtyřmi uhlíkatými substituenty (R) vázanými na jeden atom dusíku; v tomto případě má atom dusíku kladný náboj a tyto sloučeniny jsou nazývány jako kvartérní amoniové soli [6].



Obrázek 3: Struktura aminů [7]

2.1.1 Vlastnosti aminů

Methanamin a ethanamin jsou plynné látky, anilin je kapalina, aminy odvozené od naftalenu jsou pevné látky. Aminy s krátkým uhlovodíkovým řetězcem jsou rozpustné ve vodě, protože se mezi molekulami aminu a vody vytvářejí vodíkové vazby. Volný elektronový pár na atomu dusíku je příčinou zásaditých a nukleofilních vlastností aminů. Projevují se např. reakcí s kyselinami, kdy vznikají amoniové soli [6].

2.2 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté sloučeniny. Vznikají dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Vykazují biologickou aktivitu a účastní se reakcí jako meziprodukty [8]. Biogenní aminy jsou pro organismus nepostradatelné, nicméně ve vysokých koncentracích působí negativně, projevují se vasoaktivně (ovlivňují kontraktilitu cév, díky čemuž mají účinek na krevní tlak) a psychoaktivně (působí jako neurotransmitery v centrálním nervovém systému). Pokročilejší stádium intoxika-

ce se projevuje bolestí hlavy, migrénou, zvracením, bušením srdce, dýchacími potížemi, hypertenzí nebo hypotenzí [9].

2.2.1 Dělení biogenních aminů

Dělení biogenních aminů není pevně dané, dle chemické struktury se mohou dělit na:

- alifatické – putrescin (PUT), kadaverin (CAD), agmatin (AGM);
- aromatické – tyramin (TRA), 2-fenylethylamin (PEA);
- heterocyklické – histamin (HIA), tryptamin (TPA);
- polyaminy – spermidin (SPD), spermin (SPM), putrescin (PUT) [10].

Polyaminy produkují zvířata, rostliny i mikroorganismy. Z hlediska uplatnění jsou podstatné ve fyziologických procesech, jako je růst nebo diferenciace buněk. Významným zástupcem polyaminů je spermin, který je růstovým faktorem bakterií [12].

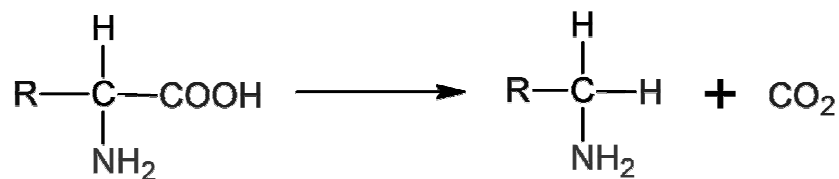
Mezi důležité aromatické biogenní aminy řadíme 2-fenylethylamin, který je prekurzorem některých hormonů nebo tyramin, který má vliv na krevní tlak a kontrakci svalstva [13].

2.2.2 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají jako produkty metabolické činnosti rostlin, zvířat i mikroorganismů. Působením dekarboxylas vznikají z aminokyselin při dekarboxylaci. Dalším způsobem vzniku biogenních aminů je transaminace aldehydů a ketonů [8].

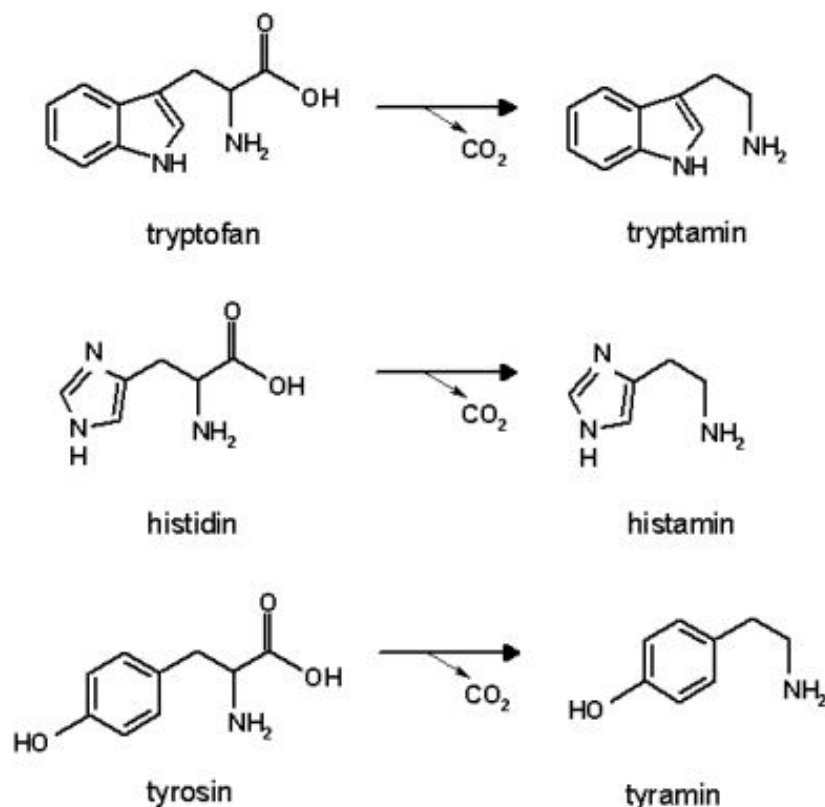
2.2.2.1 Dekarboxylace

Dekarboxylace se uskutečňuje pomocí specifických enzymů dekarboxylas pocházejících především z mikrobů. Dochází k odštěpení CO_2 za vzniku bazického aminu (viz obrázek 4). U člověka se některé aminokyseliny dekarboxylují za vzniku biogenních aminů, např. histaminu, tryptaminu, tyraminu, serotoninu nebo kyseliny 4-aminomáselné (GABA) [9].



Obrázek 4: Obecné schéma dekarboxylace

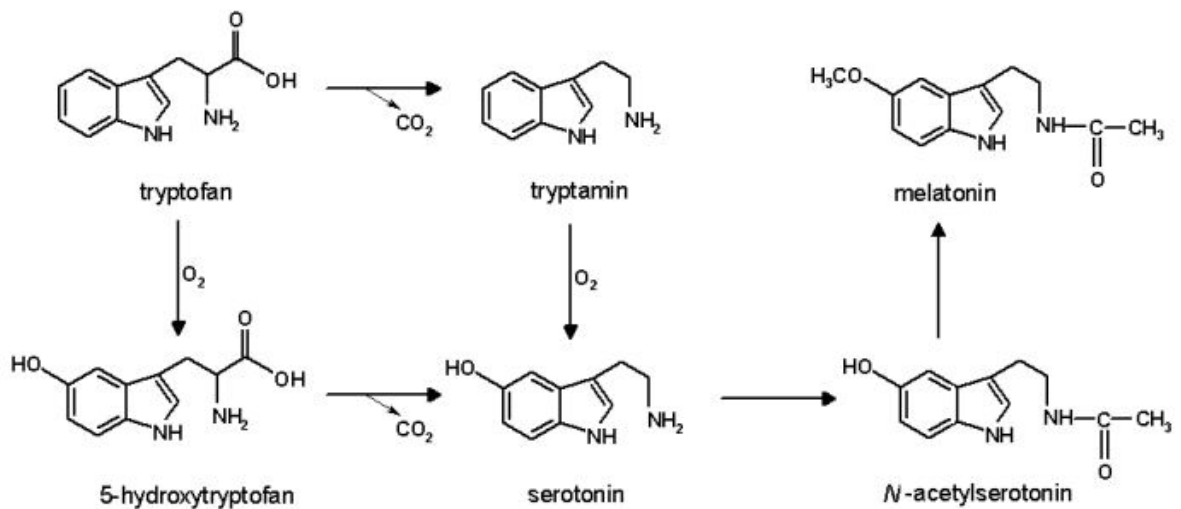
Dekarboxylací argininu vzniká agmatin, putrescin z ornitinu, kadaverin z lysinu, histamin z histidinu, 2-fenylethylamin z fenylalaninu, tyramin z tyrosinu a tryptamin z tryptofanu. Serotonin vzniká z tryptaminu. Z putrescinu vzniká spermidin a dále spermin. Z DOPA vzniká dopamin [14].



Obrázek 5: Dekarboxylace vybraných AMK za tvorby biogenních aminů [15]

2.2.3 Reakce a přeměny biogenních aminů

Biogenní aminy jsou poměrně reaktivní, podléhají především enzymatickým reakcím, při kterých vznikají příslušné deriváty. Další reakcí, které biogenní aminy podléhají, je oxidační deaminace, přičemž vznikají aldehydy. Díky působení tepla a časově náročnějšímu skladování vytváří reakcí s triacylglycerolem amidy mastných kyselin. Reakcí sekundárních aminů s oxidy dusíku vznikají nitrosaminy, které jsou karcinogenní. V alkoholických nápojích může vznikat derivát β -karbolinu, a to reakcí aldehydu s tryptaminem. Fenylethylamin, putrescin, kadaverin, spermidin nebo tyramin zase reagují s bílkovinami, přičemž vznikají β -*N*-substituované deriváty diaminopropionových kyselin [14].



Obrázek 6: Reakce tryptofanu [16]

2.2.4 Toxicita biogenních aminů

Protože jsou biogenní aminy ve větší koncentraci pro organismus toxické, mohou vyvolat intoxikaci organismu. Biogenní aminy jsou oxidovány ve střevech, játrech, ledvinách a plicích a jejich detoxikace probíhá tímto způsobem:



Obrázek 7: Oxidativní deaminace

Pokud se do těla dostává větší množství biogenních aminů, oxidační mechanismus nezvládá detoxikaci a dochází k intoxikaci [17].

K nejtoxičtějším aminům řadíme tyramin a histamin. Histamin způsobuje hypotenzi a následné bolesti hlavy, křeče a zvracení. Tyramin způsobuje zvýšení krevního tlaku, migrény, krvácení do mozku a může dojít až k selhání srdce. Přesné toxické koncentrace biogenních aminů jsou obtížně stanovitelné a záleží na mnoha dalších faktorech, jako je například snížená aktivita enzymů monoaminoxidasy a diaminoxidasy nebo aktuální zdravotní stav organismu a jeho stáří [18, 19].

2.2.5 Biogenní aminy jako karcinogeny

Biogenní aminy jsou prekurzory *N*-nitrososloučenin, které jsou karcinogenní. BA mají schopnost reagovat s dusitany za vzniku nitrosaminů. Aktivním (elektrofilním) činidlem je oxid dusný, který přijímá volné elektrony aminového dusíku a tím vytváří *N*-nitrosamoniový ion. U sekundárních aminů vzniká stabilní *N*-nitrosamin tím, že nitrosamoniový ion odevzdá proton vázaný na dusíkový atom [11]. Nejznámější aminy, které jsou prekurzory karcinogenních *N*-nitrosaminů, jsou sekundární aminy (agmatin) a polyaminy (spermin a spermidin) [20].

Obava před tvorbou karcinogenních *N*-nitrosaminů vedla k podstatnému snížení nitritů používaných v masném průmyslu k vytváření termostabilního nitroxymyoglobinu a nitroxyhemoglobinu [11].

2.2.6 Význam

I přesto, že jsou biogenní aminy ve vyšších koncentracích toxické, jsou významným zdrojem dusíku. Uplatnění nachází také jako prekurzory pro syntézy hormonů, bílkovin či alkaloidů, proto jsou též nazývány jako protoalkaloidy. Biogenní aminy jsou též součástí fosfolipidů a vitamínů [11].

Důležitou úlohu mají i pro funkci lidského organismu. Hlavní úlohou putrescinu je stabilizace nukleových kyselin nebo ribozomů. Histamin má vliv na krevní tlak, který působí jako lokální tkáňový hormon. Tyramin je prekurzorem pro syntézu dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu (viz tabulka I) [21].

Tabulka I: Význam biogenních aminů [11]

Aminokyselina	Dekarboxylací vzniklý biogenní amin	Význam
histidin	histamin	vylučování žaludeční šťávy, účast na alergických a zánětlivých reakcích
lysin	kadaverin	struktura ribozomů, stabilizace biomakromolekul a buněčných struktur, biosyntézy
ornitin	putrescin	
arginin	agmatin	
tyrosin	tyramin	stahy dělohy, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak
fenylalanin	fenylethylamin	regulace odbourávání a syntéza glykogenu, vliv na krevní tlak
tryptofan	tryptamin	vliv na krevní tlak, psychické funkce, podporuje vylučování moči

2.2.7 Výskyt

Biogenní aminy se vyskytují tam, kde jsou přítomny bílkoviny, aminokyseliny a bakterie s dekarboxylasovou aktivitou (viz tabulka II). Aminokyseliny jsou základním stavebním kamenem proteinů, ale jsou to také jejich rozkladné produkty, ze kterých vznikají mikrobiální přeměnou biogenní aminy. Výskyt biogenních aminů je sledován v potravinách, kde se běžně vyskytují. Zejména to jsou potraviny obsahující velké množství bílkovin – maso, masné výrobky, mléko, sýry. Ve vztahu k životnímu prostředí se biogenní aminy vyskytují ve vodách, pokud mají organismy s dekarboxylasovou aktivitou vhodné podmínky pro jejich tvorbu. V pitné vodě je výskyt biogenních aminů nepřijatelný díky úpravám vod, které neumožní podmínky pro růst mikroorganismů. Nicméně ve fázi čištění odpadních vod se vyskytují bakterie, které jsou schopny produkce biogenních aminů. Zejména z důvodu přítomnosti velkého množství dusíkatých látek a metabolických produktů [21].

Tabulka II: Výskyt biogenních aminů v organismu [11]

Aminokyselina	Dekarboxylací vzniklý biogenní amin	Výskyt
histidin	histamin	střevo, plíce, kůže, ledviny, játra, rostliny
lysin	kadaverin	střevo, živočichové, rostliny
ornitin	putrescin	
arginin	agmatin	
tyrosin	tyramin	zvířecí tkáň, mikroorganismy
fenylalanin	fenylethylamin	zvířecí tkáň, rostliny, mikroorganismy
tryptofan	tryptamin	střevo

2.2.7.1 Vstup aminů do životního prostředí

Aminy vstupují do životního prostředí několika možnými cestami. Nejčastější způsob je šíření aminů jako produktů rozkladu proteinů a dusíkatých sloučenin nebo formou výkalů a moči živočichů vypouštěných do odpadních vod. Další možností vstupu aminů do životního prostředí je např. vstup monoethanolaminu při zachycování emisí CO₂ z fosilních paliv při výrobě elektrické energie [23, 24].

Poměrně častým zdrojem je chemický a farmaceutický průmysl. Aminy zde vznikají jako meziprodukty výroby [23, 24].

Nejčastěji vyskytující se aminy v životním prostředí jsou methylamin, dimethylamin, ethylamin, diethylamin a monoethylamin. V ještě nižších koncentracích se vyskytují morfolin, piperazin, piperidin, pyrrolidin, n-propylamin, n-butylamin nebo methylethylamin [25].

V současné době je v dostupné literatuře málo informací o problematice výskytu biogenních aminů v životním prostředí. Pozornost se věnuje především *N*-nitrosodimethylaminu, který byl klasifikován jako karcinogen. Vzniká jako vedlejší produkt chloraminace nebo chlorace za působení amoniaku v čistírnách odpadních vod [22, 23].

3 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY IZOLOVANÝCH ZE VZORKŮ POVRCHOVÝCH VOD

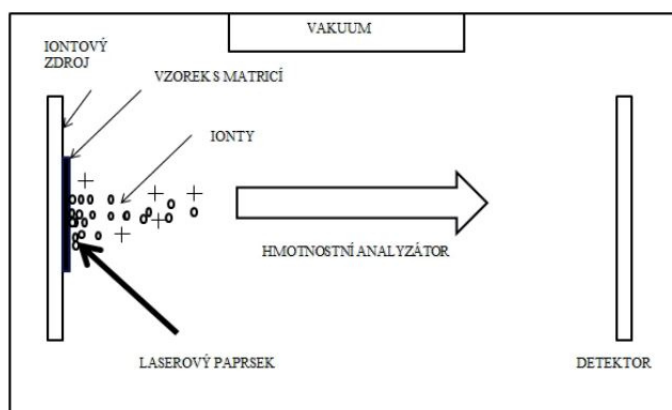
Doposud bylo vyvinuto velké množství metod, které jsou určené k identifikaci mikroorganismů. Každá metoda by měla splňovat několik následujících základních předpokladů – univerzální princip identifikace bakterií, kvantitativní stanovení bakterií ve vzorku, stanovení i doposud neznámých bakterií, vyhledání co nejvíce příbuzných bakteriálních druhů. Dalšími výhodnými předpoklady pro spolehlivou identifikaci jsou flexibilita, rychlost a nízké náklady [26].

3.1 Metoda MALDI/TOF MS

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem patří k jednoduchým, rychlým a poměrně přesným metodám identifikace bakterií. Postup této metody byl poprvé popsán pracovní skupinou Holland a kol. v roce 1996. Principem metody bylo odebrání jedné bakteriální kolonie, následné rozetření na destičku, převrstvení matricí a po následném vysušení provedení samotné analýzy. Tato metoda umožnila určit rod bakterií, druh bakterií a dokonce i některé jednotlivé kmeny. V případě izolace bakterií ze životního prostředí je nezbytná izolace jednotlivých bakteriálních druhů, které jsou reprezentovány jednotlivými koloniemi narostlými na agarovém médiu [26].

3.1.1 Princip metody MALDI/TOF

Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI/TOF (Matrix–Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) je vysoce přesná a rychlá. Tato metoda dokáže rozlišit mikroorganismy na rodové, druhové i kmenové úrovni [27].



Obrázek 8: Schéma MALDI/TOF hmotnostního spektrometru [27]

Na krystaly matrice se vzorkem je aplikováno laserové záření (viz obrázek 8), které způsobí desorpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku a zároveň dojde k ionizaci molekul vzorku předáním H^+ od molekul matrice. Poté je aplikováno extrakční napětí mezi MALDI destičku a vstupní štěrbinu průletového analyzátoru, čímž dojde k extrakci nabitých molekul podle zvolené polaroty napětí a k jejich analýze v průletovém hmotnostním analyzátoru. V závislosti na době letu molekul analyzátořem k detektoru se vypočítá poměr hmotnost/náboj (dále jen m/z) [27].

3.1.1.1 Ionizace

Proces matricí zprostředkované laserové ionizace „matrix assisted laser desorption ionization“ (MALDI) využívá ke své funkci matrici, látku, jejímž prostřednictvím se ionizační energie laseru přenáší na molekuly vzorku a tím brání jejich štěpení. Energie, která je potřebná pro desorpci, závisí na sublimační energii daného vzorku a chemických reakcích probíhajících v kondenzované fázi těsně před expanzí plazmového obláčku. Při jednom střelení se vytvoří řádově několik tisíc iontů [27].

3.1.1.2 TOF analyzátor

Základním principem TOF analyzátoru je extrakce iontů a měření doby jejich letu. Ionty se pomocí vloženého napětí na extrakční mřížku urychlí (extrahují) elektrickým polem a získají rychlost v závislosti na jejich hmotnosti m a velikosti náboje z . Získaná kinetická energie je přímo úměrná náboji iontů a nepřímo úměrná jejich hmotnosti. Výsledkem je rozdílná rychlost iontů s různým poměrem m/z , a proto takto urychlené ionty dopadnou na detektor v rozdílném čase, pokud urazí stejnou vzdálenost [27].

3.1.1.3 Detektor

Detektor je schopen zachytit dopadající ionty, ze kterých vypočítává hmotnost každého iontu, který na něj dopadne. Velká část detektorů je založena na převodu iontů na elektrický signál pomocí scintilační vrstvy, která při dopadu iontů vydává světelné záření [27].

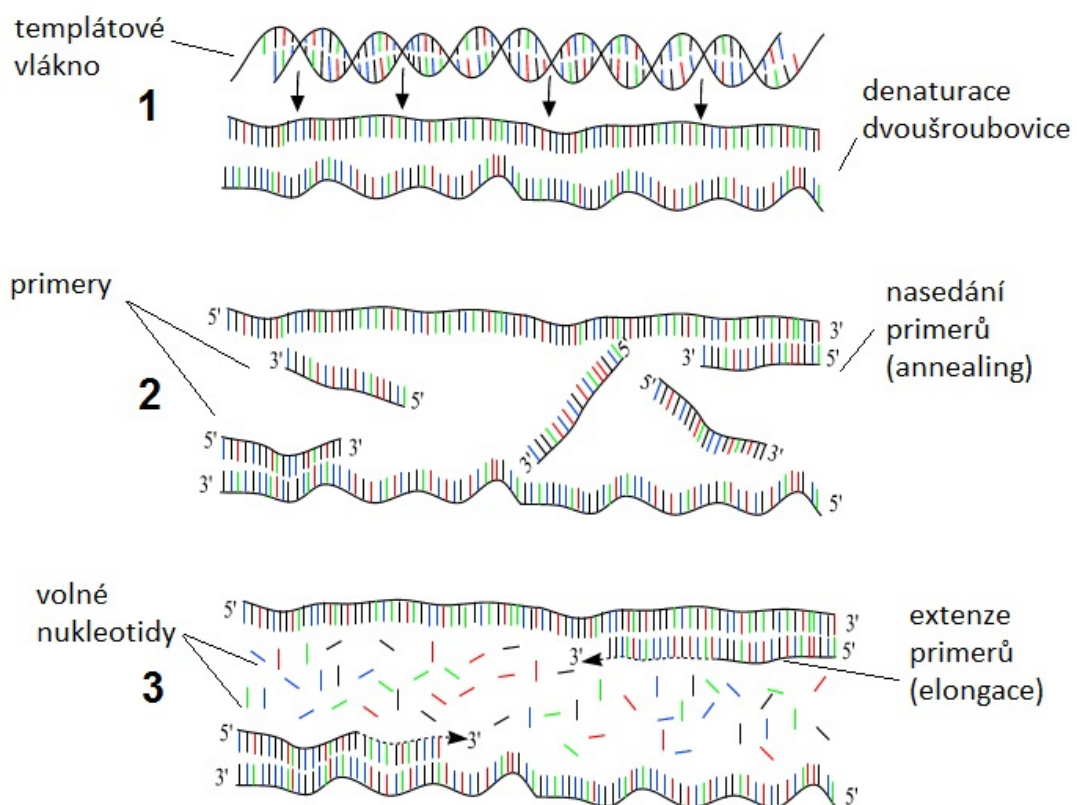
3.2 Metoda polymerázové řetězové reakce

Enzymatické zmnožení specifických úseků DNA *in vitro* nazýváme jako polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Tato metoda je založena na komplementaritě bází obsažených v molekule nukleové kyseliny. Úkolem PCR je namnožení cílového úseku nukleové kyseliny. Samotná přítomnost cílové nukleové kyseliny ve vzorku může být detekována různě

nými metodami, např. elektroforézou v agarosovém gelu s následnou vizualizací v UV světle nebo hybridizací se specifickými sondami s následnou imunoenzymatickou vizualizací [28].

3.2.1 Princip metody PCR

PCR spočívá v cyklickém střídání tří jednoduchých kroků, z nichž každý probíhá za určité teploty:



Obrázek 9: Princip PCR metody [29]

1. teplotní denaturace – rozpojení dvoušroubovice DNA na jednotlivé řetězce, čímž umožní nasednutí primerů, probíhá při teplotách okolo 94 °C;

2. připojení primerů (annealing) – navázání primerů na odpovídající místo rozvinuté DNA, teploty této fáze se nejčastěji pohybují mezi 55 – 65 °C;

3. polymerace (syntéza) – probíhá za přítomnosti DNA-polymerasy, syntetizuje se úsek vymezený navázanými primery a také dochází k dosyntetizování vlákna (vytvoření dvouřetězce), syntéza probíhá při teplotě 72 °C [30,31].

Vzniklé reakční produkty (amplikony) slouží v dalším cyklu jako matrice pro vznik nových kopií. Každý cyklus zdvojnásobí počet kopií původní DNA [31].

PCR se provádí v přístroji, tzv. termocykleru, který je schopen měnit teplotu reakčního prostředí velmi rychle (kolem 1 °C za 1 sekundu). Nastavením specifických teplot se takto spustí jednotlivé kroky jednoho cyklu a jejich opakováním se spouští řetězová reakce. Toto zařízení potom cyklicky opakuje stejný teplotní program (94 °C, 55 – 65 °C, 72 °C). Jeden cyklus netrvá většinou více než 3 minuty. Počet cyklů u běžné PCR se pohybuje od 25 do 40 [32].

3.2.2 Využití PCR

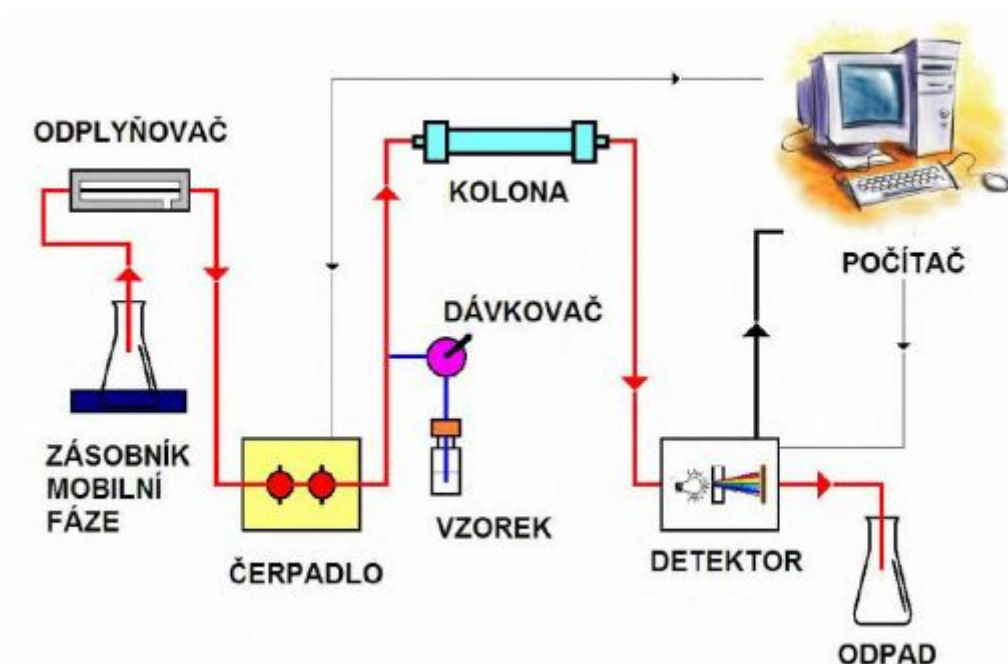
I když metoda umožňuje velmi rychlou, citlivou a specifickou detekci, lze u mikroorganismů identifikovat pouze přítomnost genu kódujícího příslušný enzym (dekarboxylasu a aminokyseliny), jež se podílí na produkci daného biogenního aminu, nikoliv jejich produkované množství. Pro přesnější identifikaci/kvantifikaci biogenních aminů je potřeba použít jinou metodu, např. HPLC [33].

4 METODY DETEKCE PRODUKOVANÝCH BIOGENNÍCH AMINŮ

Pro stanovení produkce biogenních aminů můžeme použít širokou škálu analytických metod. Mezi nejpoužívanější metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), dále infračervená spektroskopie (IR), tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC) nebo kapilární elektroforéza (CE) [34, 35].

4.1 HPLC – High Performance Liquid Chromatography

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační analytickou metodou. Rozdělení složek probíhá tak, že je vzorek unášen mobilní fází analytickou kolonou. Podstatou rozdělení je přenos složek směsi mezi mobilní a stacionární fází [35].



Obrázek 10: Schéma kapalinového chromatografu [36]

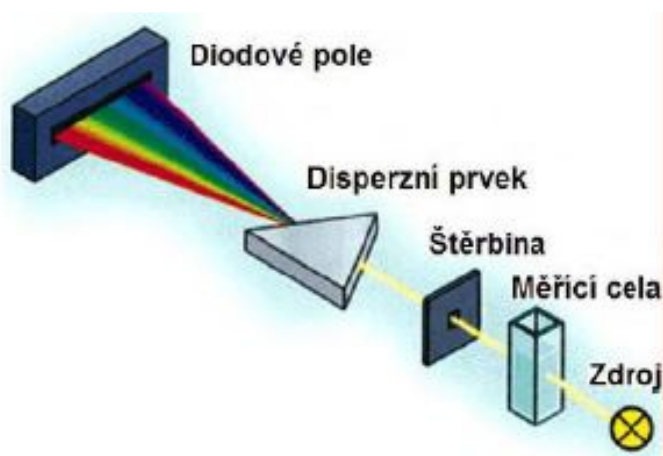
Za průchod složek z mobilní do stacionární fáze zodpovídají fyzikální a chemické pochody, jako je adsorpce, iontová výměna nebo chemická afinita. Díky působení těchto pochodů dochází k rozdělení jednotlivých složek vzorku při průchodu kolonou [35, 37, 38].

Kapalinový chromatograf je složen ze zásobníků mobilní fáze, směšovacího zařízení, degaseru, čerpadla, dávkačského zařízení, kolony a detektoru (viz obrázek 10). Mobilní fází je směs tvořená různými rozpouštědly, nejčastěji kyselinou mravenčí, kyselinou octovou,

methanolem, acetonitrilem a vodou. Mobilní fáze je čerpána do směšovacího zařízení, které může měnit poměr rozpouštědel v průběhu analýzy (gradientová eluce), a nebo nechává poměr rozpouštědel v průběhu celé analýzy stejný (isokratická eluce). Čerpadlo mobilní fáze pak zajišťuje konstantní průtok mobilní fáze. Vzorek je dávkován v injektoru, nejčastěji pomocí automatických dávkovačů (autosamplerů). Mobilní fáze spolu se vzorkem vstupuje do analytické kolony. Typy kolon se liší délkou, průměrem, velikostí částic, obsaženou stacionární fází nebo typem materiálu, ze kterého je plášť kolony tvořen (nerezová ocel, plast nebo sklo). Na vlastnosti kolon jsou kladeny požadavky, jako je odolnost vůči vysokým tlakům, dostatečně hladký povrch pláště kolony a také musí být chemicky inertní. Stacionární fáze je tvořena polárními sorbenty (např. oxid hlinitý, silikagel) či nepolárními sorbenty (např. chemicky vázané fáze). K samotné detekci se používají zařízení zvané detektory. Biogenní aminy jsou detekovány např. pomocí spektrofotometrického detektoru v oblasti UV/Vis, dále hmotnostně-spektrometrického detektoru nebo fluorimetrického detektoru [35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42].

4.1.1 HPLC – UV/Vis

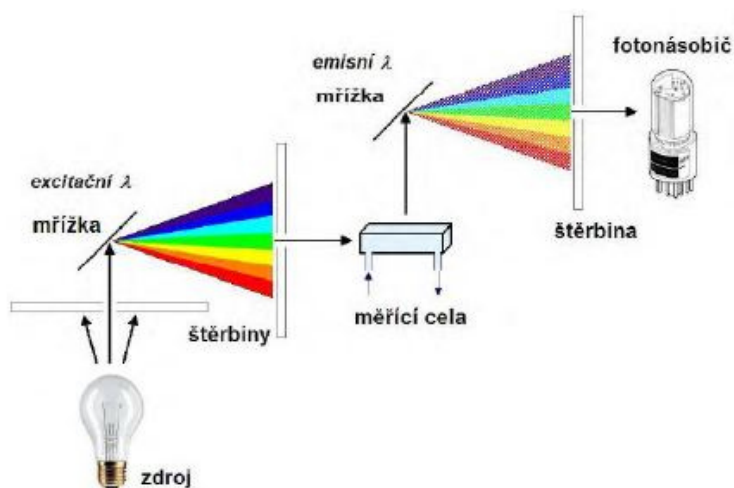
Nejčastěji se používá spektrofotometrický detektor v oblasti UV/Vis (viz obrázek 11), princip je založen na měření absorbance v eluátu v rozmezí vlnových délek od 190 do 800 nm. Detektory mohou měřit absorbanci buď při stálé (fixní, nastavené) vlnové délce nebo jsou schopny snímat celé absorpční spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace (detektor diodového pole, DAD) [38].



Obrázek 11: Schéma detektoru s diodovým polem [43]

4.1.2 HPLC – FD

Fluorescenční detektor je velmi selektivní a citlivý. Použití nachází u látek vykazujících fluorescenci. Při stanovení biogenních aminů je pro tuto metodu nutná derivatizace, za použití dansylchloridu jako derivatizačního činidla. Detekovaná látka absorbuje primární excitační záření, jeho pohlcená energie se zčásti vyzáří ve formě fluorescenčního záření o vyšší vlnové délce než má excitační záření. Vyzářené záření dopadá na násobič, ten produkuje proud, který je úměrný toku vyzářeného fluorescenčního záření a koncentraci detekované látky [35, 41]. Schéma HPLC s FD je znázorněno na obrázku 12.



Obrázek 12: Schéma fluorescenčního detektoru [44]

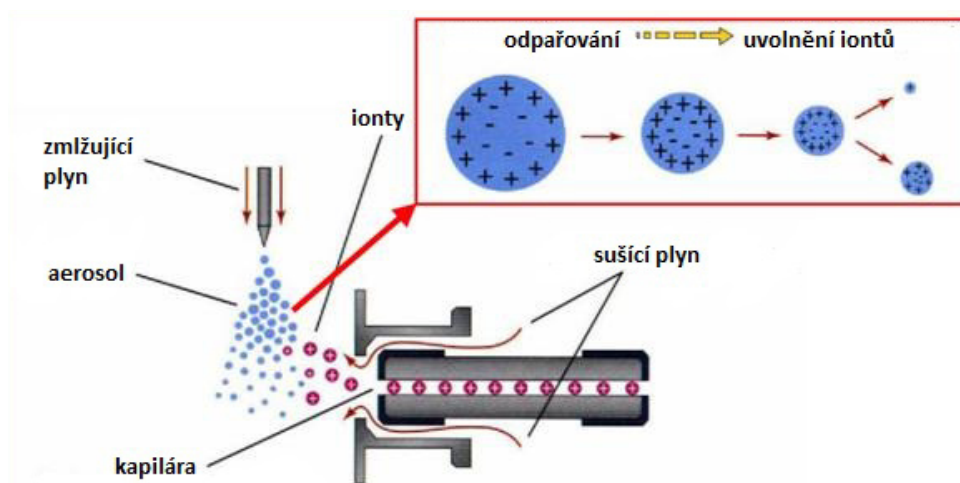
4.1.3 HPLC – MS

Analytická metoda, při které dochází k separaci iontů, které vznikly ionizací molekul. Hmotnostní detektor umožňuje identifikaci analytů na základě jejich rozdílných hmotností ionizovaných částic. Tuto hmotnost značíme m/z , kde „ m “ je hmotnost a „ z “ náboj fragmentu [35, 45].

Hmotnostní spektrometry pracují ve čtyřech základních krocích, a to:

- převedení vzorku do plynného stavu;
- ionizace molekul vzorku v plynné fázi;
- rozdělení iontů dle efektivní hmotnosti m/z ;
- detekce jednotlivých iontů [35, 45].

První dvě fáze, převedení vzorku do plynné fáze a následnou ionizaci molekul, zajišťuje iontový zdroj. Pro stanovení biogenních aminů se provádí ionizace elektrosprejem, ionizace za atmosférického tlaku nebo fotoionizace za atmosférického tlaku. Nejšetrnější a cenově nejdostupnější je ionizace elektrosprejem (viz obrázek 13). Šetrnost spočívá především ve velmi malé fragmentaci iontů. Dochází k vedení rozpuštěného analytu nabitou kapilárou, která je pod napětím až 5 kV. U ústí kapiláry se účinkem zmlžujícího plynu tvoří kapky analytu, které nesou náboj [35, 45, 46].



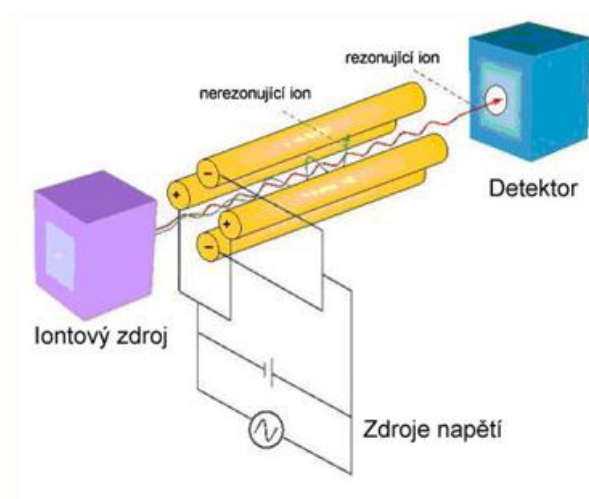
Obrázek 13: Schéma ionizace elektrosprejem [45]

Po odpaření rozpouštědla dochází ke zvětšení hustoty náboje na analytu. Při dosažení kritické hodnoty dochází ke Coulombické explozi, začnou se uvolňovat ionty analytu. Poté dochází k transportu vzniklých iontů analytu z oblasti atmosférického tlaku do oblasti vakua hmotnostního analyzátoru [35, 45, 46].

Třetím krokem analýzy je rozdělení iontů dle efektivních hmotností (m/z) v hmotnostním analyzátoru. Hmotnostní analyzátor tvoří při stanovení biogenních aminů nejčastěji tzv. kvadrupóly, iontové pasti nebo analyzátoru doby letu [35, 46].

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor je složen ze čtyř stejných kovových tyčí (viz obrázek 14). Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na druhé dvě je vloženo záporné stejnosměrné napětí. Principem je přítomnost analyzovaného iontu ve středu kvadrupólu, kde dochází k jeho oscilaci. Oscilace je stabilní pro ion s určitou hodnotou m/z pouze v daný časový okamžik, pro který platí určitý poměr amplitudy V a

napětí U . Ion projde kvadrupólem a dostane se na detektor, přičemž ostatní ionty jsou zachyceny v kvadrupólu. Další změnou velikosti amplitudy V a stejnosměrného napětí U dochází k postupnému propouštění všech iontů dál na detektor [35, 46].



Obrázek 14: Kvadrupólový hmotnostní analyzátor [47]

Pro analýzu biogenních aminů se nabízí použít tandemový hmotnostní analyzátor (MS/MS) s trojitým kvadrupólem (QqQ), na kterém je možno analyzovat biogenní aminy jako kadaverin, histamin, fenylethylamin, putrescin, spermin, spermidin, tyramin a tryptamin [35, 48].

Poslední, čtvrtou součástí hmotnostního spektrometru je detektor. Ten poskytuje analogový signál, který je úměrný počtu dopadajících iontů. Nejčastěji používané jsou násobičové detektory, které využívají efekt násobení elektronů. Mají velmi vysokou citlivost, poskytují signál i pro jednotlivé ionty. Mezi násobičové detektory patří elektronový násobič, elektronový násobič s polem a fotonásobič [35, 49].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla izolace bakterií ze vzorků povrchových vod. U těchto izolovaných bakterií popsat morfologii, identifikovat bakterie pomocí metody MALDI/TOF, provést screening dekarboxylasové aktivity na kultivačním médiu s jednotlivými aminokyselinami (argininem, histidinem, lysinem, ornitinem, fenylalaninem, tryptofanem a tyrosinem). Následně výsledky doplnit o analýzu jednotlivých biogenních aminů produkovanými těmito bakteriemi pomocí metody HPLC – UV/Vis.

6 PRACOVNÍ POSTUPY

6.1 Použitý materiál

6.1.1 Přístroje a pomůcky

- Autokláv SANOclav, Robert Bosch
- Automatické pipety – Hirschmann Laborgeräte
- Centrifuga – ROTANTA 460 R, Schoeller
- Analytické váhy – Adventurer Pro type AV513CM, Schoeller
- Váhy – Kern, 440-45N
- Termostat – Biological Thermostat BT 120, Memmert
- Mikroskop – CX41 (Olympus)
- pH metr – pH Spear Waterproof, Double Junction
- Vortex – Heidolph REAX
- OXItest – PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.
- Mikrotitrační destičky, umělohmotné kličky, hokejky, Petriho misky

6.1.2 Chemikálie

- Pro přípravu živné půdy: Tryptone Yeast Extract Agar = TYA (HiMedia).
- Pro přípravu masopeptonového bujónu = MPB: Masový výtažek (HiMedia); Pepton (HiMedia); Chlorid sodný = NaCl (LachNer).
- Pro přípravu bujónu ke stanovení dekarboxylasové aktivity: Masový výtažek (HiMedia); Pepton (HiMedia); Yeast extrakt (HiMedia); Bromkresolpurpur 0,2% v 50% alkoholu (Sigma Aldrich).
- Pro Gramovo barvení: Krystalová violet (HiMedia); Jód (LachNer); Jodid draselný (LachNer); Ethanol (LachNer); Safranin (HiMedia).
- Ostatní použité chemikálie: Peroxid vodíku (LachNer); Glycerol; Aminokyseliny: Arginin, Histidin, Fenylalanin, Lysin, Ornitin, Tyrosin a Tryptofan (HiMedia).

6.2 Odběr vzorků

Celkem bylo odebráno 5 vzorků povrchových vod, ze kterých byly následně izolovány jednotlivé bakterie. Odběr do sterilních vzorkovnic byl proveden 6. září 2015, vzorky byly následně ponechány v chladničce při 5 °C a během následujících dvou dnů zpracovány. Vzorek č. 1 byl odebraný z vodní nádrže Bystřička, vzorek č. 2 z Lačnovských rybníků,

vzorek č. 3 z rybníku Neratov, vzorek č. 4 z pitné studánky v Prlově a vzorek č. 5 ze studánky Vápenka ve Valašské Polance. Mapa s polohou odběrových míst je uvedena v příloze P I.

6.3 Zpracování vzorků

6.3.1 Příprava Tryptone Yeast Extract Agar = TYA

Bylo rozpuštěno 12,6 g přípravku v 600 ml destilované vody, následně sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 60 minut.

6.3.2 Kultivace vzorků

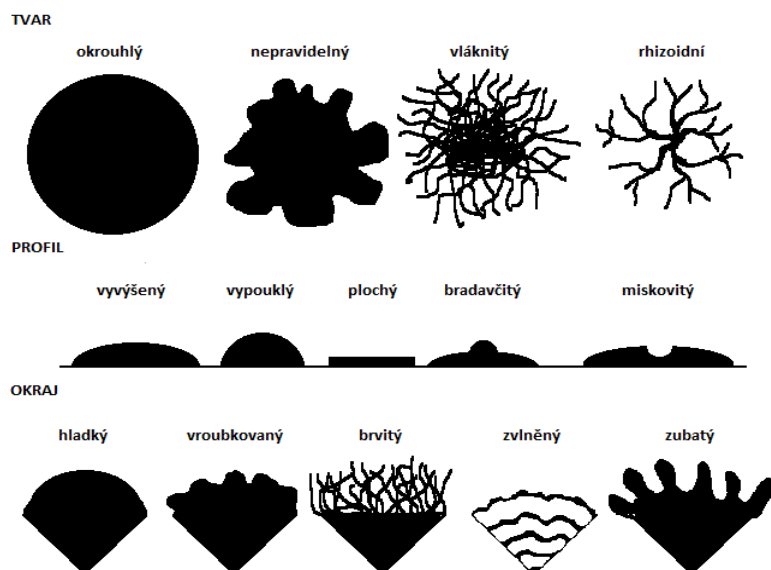
Ze vzorků povrchových vod bylo naočkováno vždy po 1 ml vzorku na TYA půdu. Tyto vzorky byly kultivovány při 25 °C a 37 °C po dobu 48 hodin.

6.4 Popis jednotlivých bakteriálních kolonií

Po dvou dnech kultivace bylo z narostlých kolonií vybráno 46 bakterií, různých velikostí, tvarů a barev, které byly následně očíslovány a křížovým roztěrem naočkovány na TYA půdu. Kultivovány byly při 25 °C a 37 °C opět po dobu 2 dnů.

6.4.1 Makroskopické morfologické znaky

Makroskopické morfologické znaky jsou patrné okem. U izolovaných bakteriálních kolonií byly zjišťovány na TYA půdě znaky jako velikost, barva, profil, tvar a okraj kolonií.



Obrázek 15: Makroskopické morfologické znaky kolonií [49]

6.4.2 Mikroskopické morfologické znaky

6.4.2.1 Gramovo barvení

Diagnostická metoda barvení při určování rodů a druhů bakterií. Založená na základě barvení fixovaného preparátu a moření buněk jodem. Komplex barviva a jodu lze z určitých mikroorganismů vyplavit rozpouštědly (např. ethanol nebo aceton). Příslušné druhy dělíme na:

- grampozitivní mikroorganismy (G+) – jejichž usmrcené buňky po odbarvení Gramovým barvicím roztokem a moření jodovým roztokem neztrácejí toto barvivo působením rozpouštědel, mají fialové zbarvení;
- gramnegativní mikroorganismy (G-) – u kterých je toto barvivo z obarvených buněk rozpouštědly vyplavováno a buňky zcela odbarveny, což je příčinou nepřítomnosti teichoové kyseliny v buněčné stěně a poměrně tenkou vrstvou peptidoglykanu, po dobarvení safraninem mají růžové zbarvení [51].

Fixovaný roztěr na podložním sklíčku byl převrstven krystalovou violetí, která se nechala působit 60 sekund. Poté co byla barva slita, byl preparát převrstven Lugolovým roztokem jež působil 60 sekund. Roztok z preparátu byl slit, poté preparát opláchnut destilovanou vodou a odbarven ethanolem, až do doby, dokud nebylo vymyté veškeré barvivo. Po 30 sekundách byl preparát dokonale opláchnut destilovanou vodou a dobarven zředěným safraninem po dobu 60 sekund. Nakonec byl preparát dokonale opláchnut destilovanou vodou a nechal se vyschnout. Při mikroskopování preparátu byl využit imerzní objektiv.

6.4.3 Biochemické testy

6.4.3.1 Katalasový test

Určité bakterie produkují enzym katalasu. Katalasa rozkládá peroxid vodíku na molekulární kyslík a vodu. Na podložní sklíčko do kapky 3% peroxidu vodíku byla pomocí kličky rozetřena část bakteriální kolonie z Petriho misky. Při uvolňování bublinek kyslíku se jedná o pozitivní reakci [49, 51].

6.4.3.2 Oxidasový test

Aerobní bakterie produkují enzym cytochromoxidasu - ta se v buňce podílí na oxidativních procesech. Přítomnost cytochromoxidasu lze prokázat barevnou reakcí *N,N*-dimethyl-1,4-fenyldiaminu s α -naftolem; vzniká indofenolová modř. Očkovací kličkou se odebere

dobře izolovaná kolonie testovaného kmene z agarové půdy a vetře se do impregnované zóny proužku. Pokud je test pozitivní, dochází k tmavě fialovému zbarvení na impregnované zóně testovacího proužku. Přítomnost cytochromoxidasy je tedy určena barevnou reakcí [22, 51].

6.5 Identifikace bakterií metodou MALDI/TOF MS

Prvním krokem bylo suspendování kmenů bakterií v 150 µl destilované vody. Následně přidání 450 µl absolutního ethanolu a zamrazení vzorků. Před samotnou analýzou prošly vzorky extrakcí, nejprve do 99% ethanolu a 70% kyseliny mravenčí, poté do 100% acetonitrilu. Analýza vzorků byla provedena na přístroji MALDI/TOF MS Bruker Daltonik Biotyper Microflex (Německo). Výsledná hmotnostní spektra byla porovnávána se spektry z databáze Taxonomy [22].

6.6 Studium dekarboxylasové aktivity u izolovaných bakterií

Pro sledování dekarboxylasové aktivity u bakterií byly využity dvě metody – kultivační metoda (screeningová) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC pro kvantifikaci jednotlivých biogenních aminů.

6.6.1 Kultivační screeningová metoda

První metodou byl screening dekarboxylasové aktivity u izolovaných bakterií na kultivačním médiu. Bakteriální kmeny byly zaočkovány do 5 ml masopeptonového bujónu a kultivovány při 25 °C a 37 °C po dobu 48 hodin.

6.6.1.1 Příprava masopeptonového bujónu = MPB

Masový výtažek	0,93 g
Pepton	1,55 g
NaCl	0,93 g
H ₂ O	310 ml
pH	6,8 – 7,0

Tato metoda využívá reakce na mikrotitračních destičkách. Do příslušné jamky bylo napietováno vždy po 10 µl suspenze (bakteriální kmen + MPB) a 200 µl dekarboxylačního

média s jednotlivými aminokyselinami. Mikrotitrační destičky byly uzavřeny a kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 2 dnů.

6.6.1.2 Příprava dekarboxylačního média

Pepton	0,3 g
Yeast Extract	0,2 g
Bromkresopurpur (0,2% v 50% alkoholu)	0,7 ml
L – aminokyselina	0,5 g
H ₂ O	100 ml
pH	5 – 5,3

Pro přípravu dekarboxylačního média bylo použito celkem 7 aminokyselin, a to arginin, fenylalanin, histidin, lysin, ornitin, tryptofan a tyrosin. V případě pozitivního výsledku dochází při reakci na mikrotitračních destičkách díky pH indikátoru – bromkresopurpu k barevné změně z hnědé na fialovou.

6.6.2 Stanovení biogenních aminů pomocí HPLC – UV/Vis

Bylo vybráno 37 bakteriálních kmenů, u kterých proběhlo stanovení produkce biogenních aminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Bakterie byly naočkovány do 5 ml MPB s příslušnými aminokyselinami a kultivovány při 25 °C a 37 °C po dobu 3 dnů.

6.6.2.1 Příprava MPB s přidavkem aminokyselin

MPB	6,6 g
Pepton	3,0 g
NaCl	1,8 g
BE	1,8 g
L – aminokyselina	1,2 g
H ₂ O	600 ml

Bylo rozpuštěno 6,6 g MPB v 600 ml destilované vody a přidáno vždy po 1,2 g příslušné aminokyseliny – arginin, fenylalanin, histidin, lysin, ornitin, tryptofan a tyrosin a sterilizováno v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C.

Nejprve byly bakteriální kmeny z Petriho misek naočkovány do 5 ml čerstvého MPB s přidavkem aminokyselin a kultivovány při 25 °C a 37 °C po dobu 3 dnů. Následně bylo odebráno po 1 ml bakteriální suspenze a opět naočkováno do 5 ml čerstvého MPB. Stejný postup byl proveden i potřetí. Suspenze byla následně centrifugována při 20 °C a 5000 RCF po dobu 5 minut. Do eppendorfek bylo napipetováno 650 µl suspenze, ke které bylo přidáno 650 µl kyseliny chloristé. Následně byly vzorky zamrazeny na teplotu -70 °C.

Pro stanovení biogenních aminů bylo potřeba provést derivatizaci a separaci. Po rozmrazení vzorků bylo napipetováno 100 µl vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu o koncentraci 500 mg.l⁻¹ do derivatizační nádoby o objemu 16 ml, ke kterým bylo přidáno vždy po 1 ml vzorku. Dále 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1 – 11,2. Po přidání 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 g.l⁻¹ v acetonu byly derivatizační nádoby uzavřeny a třepány v temnu po dobu 20 hodin. Následně bylo do derivatizačních nádobek přidáno 200 µl prolinu a opět následovalo třepání vzorků tentokrát po dobu 60 minut. Následně byly přidány 3 ml heptanu, po jejichž přidání se v nádobkách vytvořily tři zřetelné vrstvy kapalin. Z horní heptanové vrstvy bylo odebráno po 1 ml do vialek. Směs ve vialkách byla odpařena do sucha pod proudem dusíku při teplotě 60 °C. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu. Poté byly vzorky zamrazeny při teplotách pod -18 °C až do doby analýzy. Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a byly nadávkovány do chromatografického systému.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Charakteristika izolovaných bakterií

Z 5 vzorků povrchových vod kultivovaných při 25 °C a 37 °C bylo izolováno celkem 46 kolonií, a to 5 kolonií ze vzorku č. 1 z vodní nádrže Bystřička, 7 kolonií ze vzorku č. 2 z rybníku Lačnov, 9 kolonií z rybníku Neratov (vzorek č. 3), 13 kolonií ze vzorku č. 4 ze studánky Prlov a 12 kolonií ze vzorku č. 5 ze studánky Vápenka.

Z tabulky III vyplývá, že většina izolovaných kolonií byla žluté, béžové a narůžovělé barvy. Vyskytovala se i kolonie modrého zbarvení (vzorek 2A) nebo nazelenalého zbarvení (vzorky 5J, 5K a 5L). Téměř 80 % všech kolonií mělo plochý nebo vypouklý profil, šest kolonií mělo miskovitý profil a pouze 4 kolonie (vzorek 1E, 3A, 3B a 3E) profil zvýšený. 63 % kolonií mělo okrouhlý tvar, vyskytoval se i tvar sektorový (vzorek 1E). Vzorky 5J, 5K a 5L byly plazivé a neměly zřetelně ohraničené okraje. Okraje u asi 50 % izolovaných kmenů byly hladké nebo vroubkované. Osm kolonií mělo koncentrické okraje, pět kolonií okraje zvrásněné a okraje zbylých kolonií byly zubaté (vzorek 2B, 4B, 4D, 5A) a myceliální (vzorek 4E).

Tabulka III: Makroskopické morfologické znaky.

Vzorek	Kolonie	Celkový počet	Teplota [°C]	Velikost [cm]	Barva	Profil	Tvar	Okraj
1	A	4	25	0,2	oranžová	vypouklý	okrouhlý	hladké
1	B	20	25	0,3	žlutá	plochý	okrouhlý	vroubkované
1	C	66	25	0,5	béžová	vypouklý	okrouhlý	hladké
1	D	70	25	0,1	bílá	vypouklý	laločnatý	koncentrické
1	E	1	37	1	bílá	zvýšený	sektorový	zvrásnělé
2	A	6	25	0,2	modrá	vypouklý	okrouhlý	hladké
2	B	20	25	0,4	oranžová	plochý	okrouhlý	zubaté
2	C	195	25	0,5	béžová	plochý	okrouhlý	hladké
2	D	2	25	0,1	bílá	vypouklý	okrouhlý	vroubkované
2	E	10	25	0,6	bílá	plochý	okrouhlý	hladké
2	F	23	37	0,7	oranžová	plochý	zvlňný	vroubkované
2	G	15	37	0,6	béžová	plochý	zvlňný	vroubkované
3	A	8	25	0,1	růžová	zvýšený	okrouhlý	vroubkované
3	B	2	25	0,2	žlutá	zvýšený	okrouhlý	vroubkované
3	C	149	25	0,4	mléčná	miskovitý	okrouhlý	koncentrické
3	D	2	25	0,1	bílá	vypouklý	laločnatý	zvrásnělé
3	E	41	25	0,4	mléčná	zvýšený	laločnatý	hladké
3	F	147	25	0,2	béžová	vypouklý	okrouhlý	hladké

3	G	48	37	0,3	žlutá	vypouklý	laločnatý	hladké
3	H	37	37	0,5	narůžovělá	vypouklý	okrouhlý	vroubkované
3	I	3	37	0,4	bílá	vypouklý	okrouhlý	vroubkované
4	A	2	25	0,1	žlutá	ploché	zvlněný	vroubkované
4	B	41	25	0,7	narůžovělá	ploché	zvlněný	zubaté
4	C	3	25	0,4	žlutá	vypouklý	okrouhlý	koncentrické
4	D	13	25	0,2	béžová	ploché	zvlněný	zubaté
4	E	3	25	0,1	bílá	ploché	okrouhlý	myceliální
4	F	10	25	0,3	oranžová	vypouklý	okrouhlý	hladké
4	G	15	25	0,3	mléčná	vypouklý	okrouhlý	hladké
4	H	12	25	0,2	oranžová	ploché	zvlněný	hladké
4	I	2	37	0,3	žlutá	vypouklý	laločnatý	vroubkované
4	J	15	37	0,7	narůžovělá	ploché	okrouhlý	hladké
4	K	1	37	0,4	oranžová	vypouklý	laločnatý	vroubkované
4	L	39	37	0,2	žlutá	vypouklý	okrouhlý	vroubkované
4	M	139	37	0,3	bílá	miskovitý	okrouhlý	koncentrické
5	A	1	25	1,2	bílá	ploché	zvlněný	zubaté
5	B	3	25	0,3	béžová	miskovitý	okrouhlý	koncentrické
5	C	58	25	0,4	bílá	ploché	okrouhlý	hladké
5	D	230	25	0,1	bílá	vypouklý	okrouhlý	hladké
5	E	63	37	0,4	béžová	ploché	okrouhlý	hladké
5	F	2	37	0,5	žlutá	miskovitý	okrouhlý	koncentrické
5	G	3	37	1,1	průhledná	vypouklý	okrouhlý	hladké
5	H	2	37	0,3	narůžovělá	miskovitý	okrouhlý	koncentrické
5	I	2	37	0,2	mléčná	miskovitý	okrouhlý	koncentrické
5	J	1	37	0,4	nazelenalá	ploché	plazivé	zvrásnělé
5	K	1	37	4	nazelenalá	ploché	plazivé	zvrásnělé
5	L	1	37	3	nazelenalá	ploché	plazivé	zvrásnělé

Legenda: 1, 2, 3 – označení dané lokality; A, B, C – jednotlivé kolonie

Z původních 46 kolonií bylo 10 vybraných kolonií rozočkováno (značení x,y), protože už podle makroskopických morfologických znaků nebyly čistými kmeny. Naopak bakteriální kmen číslo 3A a 3G byl vyřazen, z důvodu slabého růstu při následných kultivacích.

Dále bylo pracováno s 55 bakteriálními koloniemi, z toho 7 kolonií ze vzorku č. 1 (vodní nádrž Bystřička), 7 kolonií ze vzorku č. 2 (rybník Lačnov), 10 kolonií ze vzorku č. 3 (rybník Neratov), 16 kolonií ze vzorku č. 4 (studánka Prlov) a 15 kolonií ze vzorku č. 5 (studánka Vápenka).

Jak je patrné z tabulky IV, 71 % kmenů kultivovaných při 25 °C je gramnegativních, což znamená, že bakterie jsou růžové (obarvené safraninem), protože při barvení se komplex jodu a krystalové violeti vymývá v důsledku nepřítomnosti teichoové kyseliny. 57 % kmenů bylo na oxidasový test pozitivní, tyto bakterie obsahovaly enzym cytochromoxidasu,

který se v buňce podílí na oxidativních procesech. Dvě třetiny kmenů kultivovaných při 25 °C bylo katalasa pozitivní, tyto bakterie produkovaly enzym katalasu, který rozkládá peroxid vodíku na kyslík a vodu. Převážná část bakterií, 67 %, měla tvar tyčinek. Zbylé bakterie měly tvar kokotyčinek.

Tabulka IV: Mikroskopické morfologické znaky a biochemická aktivita bakterií, jež byly izolovány během kultivace při 25 °C.

Kultivace při 25 °C					
		Biochemické testy		Mikroskopické morfologické znaky	
číslo zkumavky	označení vzorku	oxidasa	katalasa	barvení dle Grama	tvar buňky
1	1A	-	+	G-	tyčinky
2	1Bx	+	-	G+	tyčinky
3	1Cx	+	+	G-	kokotyčinky
4	1Dx	-	+	G+	kokotyčinky
5	1Dy	-	+	G+	kokotyčinky
6	2Ax	+	-	G+	tyčinky
7	2B	-	+	G+	koky
8	2C	+	-	G-	kokotyčinky
9	2D	+	-	G-	kokotyčinky
10	2E	-	+	G+	tyčinky
11	3A	+	+	G+	tyčinky
12	3Bx	+	-	G+	tyčinky
13	3By	+	-	G-	tyčinky
14	3D	+	-	G-	tyčinky
15	3Ex	+	+	G+	tyčinky
16	3Ey	+	+	G+	tyčinky
17	3F	-	-	G-	tyčinky
18	4Ax	-	+	G+	kokotyčinky
19	4Ax'	-	+	G+	kokotyčinky
20	4Ay	-	+	G-	kokotyčinky
21	4Bx	+	-	G-	kokotyčinky
22	4C	-	+	G-	kokotyčinky
23	4D	+	+	G-	kokotyčinky
24	4Ex	+	+	G-	kokotyčinky
25	4F	+	+	G-	tyčinky
26	4G	-	+	G+	koky
27	4Hx	+	+	G+	tyčinky
28	4Hy	-	+	G+	tyčinky

Legenda: 1, 2, 3 – označení dané lokality; A, B, C – jednotlivé kolonie; x, y – první rozizolování vzorku, x' – druhé rozizolování vzorku

Z tabulky V vyplývá, že všechny bakterie kultivované při 37 °C byly na katalasový test pozitivní a produkovaly enzym katalasu. 44 % bakterií bylo na oxidasový test negativní, tyto bakterie neobsahovaly enzym cytochromoxidasu. Pouze 8 z 27 kolonií kultivovaných při 37 °C bylo grampozitivních. Nejčastěji se vyskytovaly bakterie ve tvaru tyčinek v počtu 15 kmenů, dále se vyskytovaly tvary koků (5 kmenů), sporulátů (5 kmenů) a 2 kmeny ve tvaru kokotyčinek.

Tabulka V: Mikroskopické morfologické znaky a biochemická aktivita bakterií, jež byly izolovány během kultivace při 37 °C.

Kultivace při 37 °C					
		Biochemické testy		Mikroskopické morfologické znaky	
číslo zkumavky	označení vzorku	oxidasa	katalasa	barvení dle Grama	tvar buňky
1	1Ex	+	+	G-	tyčinky
2	1Ey	+	+	G+	tyčinky
3	2F	-	+	G+	koky
4	2G	+	+	G-	tyčinky
5	3Hy	+	+	G-	tyčinky
6	3Hy'	+	+	G-	tyčinky
7	3I	+	+	G-	tyčinky
8	4I	+	+	G-	koky
9	4J	-	+	G-	koky
10	4K	-	+	G+	sporuláty
11	4L	-	+	G+	sporuláty
12	4M	-	+	G-	sporuláty
13	5A	+	+	G+	tyčinky
14	5B	+	+	G-	tyčinky
15	5C	-	+	G-	tyčinky
16	5D	-	+	G-	tyčinky
17	5E	-	+	G+	tyčinky
18	5Fx	+	+	G-	tyčinky
19	5Gx	+	+	G+	tyčinky
20	5Gy	+	+	G-	koky
21	5H	-	+	G-	tyčinky
22	5I	-	+	G-	tyčinky
23	5Jx	-	+	G+	sporuláty
24	5Jy	+	+	G-	sporuláty
25	5Kx	+	+	G-	kokotyčinky
26	5Ky	-	+	G-	koky
27	5Lx	+	+	G-	kokotyčinky

Legenda: 1, 2, 3 – označení dané lokality; A, B, C – jednotlivé kolonie; x, y – první rozizolování vzorku, y' – druhé rozizolování vzorku

7.2 Identifikace bakterií pomocí MALDI/TOF

Identifikace jednotlivých izolovaných kmenů bakterií proběhla pomocí metody MALDI/TOF. Z přehrady Bystřička byly identifikovány 4 kmeny (vzorek č. 1), z rybníku Lačnov 4 kmeny (vzorek č. 2), z rybníku Neratov 6 kmenů (vzorek č. 3), ze studánky v Prlově 13 kmenů (vzorek č. 4) a ze studánky ve Valašské Polance 10 kmenů (vzorek č. 5). Celkem bylo pomocí MALDI/TOF identifikováno 37 kmenů (viz tabulka VI).

Tabulka VI: Výsledky identifikace bakterií pomocí MALDI/TOF

Kultivace při 37 °C		Kultivace při 25 °C	
Číslo vzorku	Název bakterie	Číslo vzorku	Název bakterie
1Ex	nespolehlivá identifikace	1A	<i>Brevundimonas sp.</i>
1Ey	<i>Bacillus sp.</i>	1Bx	nespolehlivá identifikace
2F	nespolehlivá identifikace	1Cx	<i>Aeromonas veronii</i>
2G	<i>Aeromonas veronii</i>	1Dx	nespolehlivá identifikace
3Hy	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1Dy	<i>Enterobacter cloacae</i>
3Hy'	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	2Ax	nespolehlivá identifikace
3I	<i>Pseudomonas composti</i>	2B	nespolehlivá identifikace
4I	<i>Pseudomonas sp.</i>	2C	<i>Aeromonas veronii</i>
4J	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2D	<i>Aeromonas veronii</i>
4K	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2E	<i>Acinetobacter sp.</i>
4L	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	3A	nespolehlivá identifikace
4M	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	3Bx	nespolehlivá identifikace
5A	nespolehlivá identifikace	3By	nespolehlivá identifikace
5B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3D	<i>Acidovorax sp.</i>
5C	<i>Acinetobacter sp.</i>	3Ex	<i>Pseudomonas sp.</i>
5D	nespolehlivá identifikace	3Ey	<i>Pseudomonas sp.</i>
5E	<i>Acinetobacter sp.</i>	3F	nespolehlivá identifikace
5Fx	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4Ax	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
5Gx	nespolehlivá identifikace	4Ax'	<i>Acinetobacter sp.</i>
5Gy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4Ay	<i>Pseudomonas sp.</i>
5H	nespolehlivá identifikace	4Bx	<i>Shewanella sp.</i>
5I	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	4C	nespolehlivá identifikace
5Jx	nespolehlivá identifikace	4D	<i>Aeromonas popoffii</i>
5Jy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4Ex	<i>Shewanella sp.</i>
5Kx	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4F	<i>Flavobacterium sp.</i>
5Ky	<i>Acinetobacter sp.</i>	4G	<i>Acinetobacter sp.</i>
5Lx	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4Hx	nespolehlivá identifikace
		4Hy	nespolehlivá identifikace

Legenda: 1, 2, 3 – označení dané lokality; A, B, C – jednotlivé kolonie; x, y – první rozizolování vzorku; x', y' – druhé rozizolování vzorků; zelená – identifikace na úrovni druhu; červená – identifikace na úrovni rodu.

Z 28 kmenů kultivovaných při 25 °C se podařilo identifikovat 17 bakterií a z 27 kmenů kultivovaných při 37 °C se podařilo identifikovat 20 bakterií.

Velká část identifikovaných bakterií byla gramnegativních. Identifikované grampozitivní bakterie zastupuje např. rod *Bacillus* (1Ey), který byl izolovaný z přehradní nádrže Bystřička. Na rozdíl od výsledků Jitky Bakalové [22], která ve své práci vyizolovala převážně bakterie rodu *Bacillus*, se ve vzorcích této bakalářské práce nejčastěji vyskytovaly bakterie rodu *Pseudomonas* (v 13 vzorcích) a bakterie rodu *Acinetobacter* (v 11 vzorcích).

Celkem 6 kmenů bylo identifikováno jako *Pseudomonas aeruginosa* (ve vzorku č. 5 – studánka Vápenka ve Valašské Polance, kmeny 5B, 5Gy, 5Jx, 5Kx, 5Lx), dva vzorky jako *Pseudomonas oryzihabitans* (vzorek č. 4, studánka Prlov, kmeny 4Ax a 4I), dva vzorky jako *Pseudomonas oleovorans* (vzorek č. 3 – rybník Neratov, kmeny 3Hy a 3Hy´), další dva vzorky jako *Pseudomonas anguilliseptica* (vzorek č. 3 – rybník Neratov, kmeny 3Ex a 3Ey) a vzorek 3I jako *Pseudomonas composti*. Celkem 7 kmenů bylo identifikováno jako *Acinetobacter radioresistens* (ve vzorku č. 4 – studánka Prlov s pitnou vodou, kmeny 4Ax, 4Ax´, 4G, 4J, 4K, 4M a ve vzorku č. 5 – studánka Vápenka, kmen 5I) a jeden kmen (vzorek č. 2, rybník Lačnov, kmen 2E) jako *Acinetobacter Johnsonni*. Převážná většina bakterií rodu *Pseudomonas* a *Acinetobacter* pochází ze studánky ve Valašské Polance a ze studánky v Prlově.

Dalším hojně zastoupeným rodem je rod *Aeromonas* v počtu 5 kmenů. Nejhojnější je *Aeromonas veronii* (vzorek č. 1Cx, 2C, 2D, 2G), také se vyskytla *Aeromonas popoffii* (ve vzorku č. 4 – studánka s pitnou vodou, kmen 4D). Dále byly identifikovány bakterie *Bacillus licheniformis* (vzorek č. 1Ey), *Brevundimonas vesicularis* (vzorek č. 1A), *Leclercia adecarboxylata* (vzorek č. 4L), *Enterobacter cloacae* (vzorek 1Dy), *Acidovorax delafieldii* (vzorek č. 3D), *Flavobacterium saccharophilum* (vzorek č. 4F) a *Shewanella baltica* (vzorek č. 4Bx, 4Ex).

7.3 Stanovení produkce biogenních aminů kultivační metodou

U všech 55 izolovaných bakterií byla zjišťována produkce biogenních aminů pomocí kultivační metody. V případě pozitivního výsledku lze sledovat změnu zbarvení dekarboxylačního média z hnědé na fialovou barvu.

Z výsledků vyplynulo, že všechny testované bakterie vykazují schopnost dekarboxylace jednotlivých aminokyselin (arginin, fenylalanin, histidin, lysin, ornitin, tryptofan a tyro-

sin). Screening dekarboxylasové aktivity na kultivačním médiu je velmi jednoduchá a poměrně rychlá metoda, velkou nevýhodou této metody je její nepřesnost. Prvním problémem je, že kultivační metodou nelze zachytit malá množství vznikajících biogenních aminů. A druhým velkým problémem kultivační metody je tvorba alkalických produktů, které způsobují falešně pozitivní zabarvení dekarboxylačního média.

7.4 Stanovení produkce biogenních aminů metodou HPLC – UV/Vis

U vybraných 37 bakteriálních kmenů, identifikovaných na MALDI/TOF, byla stanovena produkce biogenních aminů - tryptaminu, fenylethylaminu, histaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím UV/Vis detekce. Jak je patné z tabulky VII, u všech vybraných kmenů byla zjištěna produkce alespoň některého ze stanovovaných aminů.

Tabulka VII: Výsledky analýzy produkce jednotlivých biogenních aminů metodou HPLC – UV/Vis v mg.l^{-1} .

Číslo vzorku	Produkce jednotlivých biogenních aminů v mg.l^{-1}							
	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM
1A	ND	ND	ND	2,0 ± 0,0	ND	3,9 ± 0,1	27,1 ± 0,6	33,7 ± 0,2
1Cx	ND	ND	20,2 ± 0,1	5,9 ± 0,1	ND	3,8 ± 0,0	28,2 ± 0,5	20,8 ± 0,5
1Dy	ND	ND	308,5 ± 2,0	1,2 ± 0,0	ND	2,7 ± 0,0	21,5 ± 0,1	15,9 ± 0,3
1Ey	12,4 ± 0,1	ND	4,7 ± 0,1	30,1 ± 0,1		ND	30,1 ± 0,1	25,0 ± 0,4
2C	ND	ND	17,2 ± 0,3		49,3 ± 0,7	1,7 ± 0,1	22,5 ± 0,1	18,1 ± 0,9
2D	ND	ND	17,7 ± 0,1	ND	8,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0	4,7 ± 0,1	28,1 ± 0,0
2E	ND	ND	ND	1,6 ± 0,0	ND	ND	32,2 ± 1,3	26,5 ± 0,6
2G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	26,5 ± 1,4	33,2 ± 0,4
3D	ND	ND	ND	1,6 ± 0,0	ND	ND	28,2 ± 0,0	33,2 ± 0,3
3Ex	ND	ND	ND	0,8 ± 0,0	ND	ND	28,4 ± 1,3	25,3 ± 0,6
3Ey	ND	ND	ND	9,4 ± 0,1	ND	ND	25,5 ± 1,2	39,2 ± 0,6
3Hy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	17,5 ± 0,1	20,0 ± 0,3
3Hy'	ND	ND	ND	1,9 ± 0,1	ND	ND	31,4 ± 0,9	31,9 ± 0,2
3I	ND	ND	ND	2,7 ± 0,4	ND	ND	35,6 ± 1,5	26,9 ± 0,2
4Ax	ND	ND	ND	1,8 ± 0,0	ND	9,2 ± 0,0	24,5 ± 1,1	20,4 ± 1,6
4Ax'	ND	ND	ND	1,7 ± 0,2	ND	ND	31,9 ± 0,1	23,0 ± 0,3
4Ay	ND	ND	ND	2,3 ± 0,0	ND	ND	37,0 ± 0,7	33,3 ± 1,0
4Bx	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25,1 ± 1,2	21,1 ± 2,4
4D	ND	ND	24,4 ± 0,0	2,8 ± 0,23	ND	ND	30,8 ± 0,1	20,4 ± 0,9
4Ex	ND	ND	210,7 ± 2,2	2,0 ± 0,0	ND	ND	29,9 ± 0,5	25,6 ± 1,4
4F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	30,1 ± 0,4	23,5 ± 0,8
4G	ND	ND	ND	2,7 ± 0,3	ND	ND	18,7 ± 1,4	29,9 ± 0,2

4I	ND	ND	29,1 ± 0,7	25,0 ± 3,3	ND	ND	45,5 ± 9,7	35,4 ± 0,1
4J	ND	ND	ND	1,5 ± 0,1	ND	ND	30,2 ± 0,1	27,0 ± 1,0
4K	ND	ND	ND	1,8 ± 0,0	ND	ND	29,8 ± 0,4	24,0 ± 0,4
4L	ND	ND	2,9 ± 0,1	2,0 ± 0,0	ND	ND	28,3 ± 0,7	16,6 ± 0,3
4M	ND	ND	ND	ND	ND	3,3 ± 0,7	24,6 ± 0,5	20,6 ± 0,6
5B	ND	ND	ND	1,9 ± 0,2	ND	1,4 ± 0,0	25,9 ± 1,4	19,9 ± 1,1
5C	ND	ND	ND	2,1 ± 0,1	ND	ND	38,1 ± 1,2	31,1 ± 1,5
5E	ND	ND	ND	2,4 ± 0,2	ND	ND	26,1 ± 0,9	28,5 ± 0,7
5Fx	ND	ND	8,2 ± 0,0	2,4 ± 0,0	ND	37,7 ± 0,0	33,1 ± 0,4	22,5 ± 0,7
5Gy	ND	ND	ND	0,8 ± 0,0	ND	7,3 ± 0,2	15,2 ± 0,7	16,8 ± 0,5
5I	ND	ND	ND	2,5 ± 0,3	ND	ND	40,3 ± 2,1	34,4 ± 0,1
5Jy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22,5 ± 0,9	13,3 ± 0,3
5Kx	ND	ND	ND	ND	ND	3,9 ± 0,2	10,9 ± 0,4	12,0 ± 2,4
5Ky	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34,0 ± 0,0	26,1 ± 0,2
5Lx	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21,6 ± 0,8	24,8 ± 1,1

Legenda: 1, 2, 3 – označení dané lokality; A, B, C – jednotlivé kolonie; x, y – první rozizolování vzorku; x', y' – druhé rozizolování vzorků; TPA - tryptamin; PEA - fenylethylamin; HIA - histamin; PUT - putrescin; CAD - kadaverin; TRA - tyramin; SPD - spermidin; SPM - spermin; ND - bez detekce aminu

Mezi nejčastěji detekované biogenní aminy patřil spermidin a spermin, jejichž produkci prokázaly všechny sledované kmeny (viz tabulka VII). Spermidin byl produkován v množství 4,5 – 45,5 mg.l⁻¹ a spermin v množství 12 – 34,4 mg.l⁻¹. Dalším poměrně často detekovaným biogenním aminem se ukázal kadaverin, který produkovalo 26 kmenů z celkových 37 sledovaných kmenů. Vyšší produkce kadaverinu byla zaznamenána u kmene č. 1Ey z přehradní nádrže Bystřička (*Bacillus licheniformis*) 30,1 ± 0,1 mg.l⁻¹ a u kmene č. 4I ze studánky Prlov (*Pseudomonas oryzihabitans*) 25,0 ± 3,3 mg.l⁻¹. Produkce tyraminu byla zaznamenána u 11 sledovaných kmenů. Vyšší hodnoty produkce tyraminu byly přítomny u kmene č. 5Fx ze studánky Vápenka (*Pseudomonas aeruginosa*) 37,7 ± 0,0 mg.l⁻¹. Zbýlých 10 kmenů vykazovalo produkci tyraminu v množství 1,1 – 7,3 mg.l⁻¹. Putrescin produkovalo 10 kmenů z 37 sledovaných kmenů. Poměrně vysoké množství (308,5 ± 2,0 mg.l⁻¹) produkoval kmen č. 1Dy z přehradní nádrže Bystřička (*Enterobacter cloacae*). Zvýšenou produkci putrescinu vykázal také kmen č. 4Ex ze studánky Prlov (*Shewanella baltica*), a to 210,7 ± 2,2 mg.l⁻¹. Naopak histamin produkovaly pouze 2 kmeny, které byly izolovány z Lačnovských rybníků. Jednalo se o izoláty č. 2C (*Aeromonas veronii*) a č. 2D (*Aeromonas veronii*). Pouze u jednoho sledovaného kmene (č. 1Ey, přehradní nádrž Bys-

tříčka, *Bacillus licheniformis*) byla detekována produkce tryptaminu, a to v množství $12,4 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Posledním sledovaným aminem byl fenylethylamin, který neprodukoval žádný ze sledovaných kmenů.

Množství produkovaných biogenních aminů nepřekročilo v žádném z případů limitní koncentraci $750 - 900 \text{ mg.l}^{-1}$, která je uváděna v literatuře jako nebezpečná pro zdraví člověka [52].

Tabulka VIII: Celková suma produkce biogenních aminů pro jednotlivé kmeney.

Celková suma produkce biogenních aminů pro jednotlivé kmeney					
Číslo kmenu	SUMA	Číslo kmenu	SUMA	Číslo kmenu	SUMA
	[mg.l ⁻¹]		[mg.l ⁻¹]		[mg.l ⁻¹]
1A	66,8 ± 0,3	3I	65,2 ± 2,1	4M	48,5 ± 0,8
1Cx	80,0 ± 0,9	4Ax	55,8 ± 0,5	5B	49,1 ± 0,2
1Dy	349,8 ± 2,1	4Ax'	56,5 ± 0,1	5C	71,3 ± 0,1
1Ey	72,2 ± 0,7	4Ay	72,6 ± 0,2	5E	57,0 ± 1,8
2C	108,9 ± 1,9	4Bx	46,5 ± 3,6	5Fx	99,0 ± 0,4
2D	60,1 ± 0,1	4D	78,4 ± 1,1	5Gy	40,0 ± 0,4
2E	60,2 ± 1,0	4Ex	268,0 ± 3,1	5I	77,2 ± 1,9
2G	59,7 ± 1,0	4F	53,6 ± 1,3	5Jy	35,8 ± 0,7
3D	62,9 ± 1,3	4G	51,0 ± 2,0	5Kx	26,7 ± 2,1
3Ex	59,8 ± 5,7	4I	134,9 ± 12,4	5Ky	60,1 ± 0,2
3Ey	74,0 ± 0,5	4J	58,7 ± 1,0	5Lx	46,4 ± 0,3
3Hy	37,5 ± 0,4	4K	55,7 ± 0,7		
3Hy'	65,1 ± 1,1	4L	49,9 ± 0,9		

Legenda: 1, 2, 3 – označení dané lokality; A, B, C – jednotlivé kolonie; x,y – první rozizolování vzorku; x',y' – druhé rozizolování vzorků

Nicméně v některých případech byla zjištěna poměrně vysoká celková produkce stanovených biogenních aminů (viz tabulka VIII). Nejvyšší hodnota ($349,8 \text{ mg.l}^{-1}$) detekovaného množství byla zaznamenána u kmene č. 1Dy. Jednalo se o rod *Enterobacter*, který byl izolován z povrchové vody z přehradní nádrže Bystřička. Zvýšená hodnota ($268,0 \text{ mg.l}^{-1}$) produkce biogenních aminů byla naměřena i u kmene č. 4Ex izolovaného ze studánky Prlov, ten byl reprezentován rodem *Shewanella*. U kmene č. 4I zastoupeného rodem *Pseudomonas* (izolace ze studánky Prlov) byla naměřena hodnota $134,9 \text{ mg.l}^{-1}$. A zvýšená hod-

nota ($108,9 \text{ mg.l}^{-1}$) produkce biogenních aminů byla zaznamenána i u rodu *Aeromonas*, kmen č. 2C, který byl izolován z Lačnovských rybníků.

Pokud sečteme celkové množství produkovaných biogenních aminů bakteriemi z jednotlivých lokalit. Dostaneme se na podstatně vysoké hodnoty. U vzorku č. 4 (studánka Vápenka) je suma naměřených hodnot 1030 mg.l^{-1} a je nadlimitní. U ostatních vzorků povrchových vod se celková suma biogenních aminů pohybuje v rozmezí $288,9 - 568,8 \text{ mg.l}^{-1}$.

Rizikem pro lidské zdraví může být především konzumace masa z ryb, které se běžně vyskytují ve sladkých vodách. Pokud je maso špatně skladováno a upravováno, dochází k jeho mikrobiálnímu kažení. Na mikrobiálním kažení rybího masa se podílejí především mikroorganismy rodu *Pseudomonas* a *Alteromonas*. Během kažení rybího masa se dobře množí také kmeny rodu *Moraxella - Acinetobacter* [53]. Pokud je rybí maso uchováváno při vyšších teplotách, dochází k množení rodů *Bacillus* a *Micrococcus*. U ryb skladovaných při chladírenských teplotách jsou to *Pseudomonas spp.* a *Shewanella putrefaciens* [54]. Dochází k odbourávání vodorozpustných dusíkatých sloučenin rybího masa, přičemž vznikají nepříjemně zapáchající látky jako amoniak, sirovodík, dimethylsulfid, dimethylamin apod. Typický pro kažení rybího masa je trimethylamin, který je podstatnou složkou rybího aroma [53].

U ryb s vysokým obsahem histidinu vzniká v důsledku dekarboxylace biogenní amin histidin, který může způsobit otravy rybím masem. Koncentrace histaminu je v maso zmíněných ryb indikátorem čerstvosti [53]. Ústav potravinářských věd na Tchaj-wanu se zabýval zkoumáním solených rybích výrobků, přítomností histaminu a histamin tvořících bakterií. Mez přípustná pro množství histaminu ve výrobku je 50 mg.kg^{-1} výrobku. Tuto mez překročilo téměř 11 % odebraných vzorků. Nejvýznamnějším mikrobiálním producentem histaminu obecně je *Bacillus megaterium* [55]. U kmene č. 2C byla zvýšená produkce právě histidinu a to v množství $108,9 \text{ mg.l}^{-1}$. Tento kmen (rod *Aeromonas*) byl izolovaný z Lačnovských rybníků, které jsou pro chov sladkovodních ryb určeny.

Skladování při nízké teplotě snižuje rychlost tvorby biogenních aminů v rybách. Yoshida a Nakamura (1982) zjistili, že v čerstvých rybách nebyla zjištěna žádná stopa histaminu, ale když čerstvé makrely ponechali stát při pokojové teplotě, hladina histaminu se zvýšila až na $28,4 \text{ mg.l}^{-1}$ po 24 hodinách a na 1540 mg.l^{-1} po 48 hodinách. Histamin narostl o 37,8 % ($38 \text{ }^\circ\text{C}$) a byl závislý na mikrobiální činnosti [56]. Obsah biogenních aminů v sardinkách

skladovaných v chladničce se sice postupně zvyšoval, ale toxická úroveň histaminu byla vyvinuta pouze tehdy, když byly sardinky v pokročilém stádiu rozkladu [56].

Putrescin, kadaverin a histamin byly detekovány v syrových rybách – k rychlému nárůstu jejich koncentrací docházelo vlivem nevhodných skladovacích podmínek (36 h při 21 °C) [56].

Problém může nastat taky při úpravě rybího masa uzením. Udící proces probíhá ve třech fázích – nasolení, částečné vysušení a působení chemické složky kouře. Pomocí kouře z tvrdého dřeva se zabraňuje pomnožování mikroorganismů a tvoří se typické aroma a chuť. Při nedodržení technologického způsobu uzení může docházet k infekci střevního traktu ryb bakterií *Aeromonas hydrophila*. Tato bakterie je přítomna zejména u makrel, kde může při špatném technologickém postupu vytvářet biogenní aminy [52].

I když je přítomnost jednotlivých biogenních aminů ve výrobcích z ryb spojována s jejich špatným skladováním nebo technologickým postupem při zpracování výrobku, je možné si položit otázku, zda jednotlivé biogenní aminy nebo bakterie s dekarboxylasovou aktivitou nejsou přítomny i prostředí, kde tyto ryby žijí. Tato bakalářská práce dokumentuje, že bakterie s dekarboxylasovou aktivitou, které se podílejí na produkci BA, jako např. *Pseudomonas sp.* nebo *Shewanella sp.* (bakterie izolované z ryb), jsou přítomny v povrchových vodách (např. ve studánce s pitnou vodou nebo v chovném rybníku). Jaké množství jednotlivých BA se nachází přímo v povrchových vodách, mohou zjistit analýzy vzorků pomocí různých instrumentálních metod (např. HPLC nebo UPLC/MS).

ZÁVĚR

Z 5 vzorků povrchových vod bylo izolováno celkem 55 kolonií – 7 kolonií z vodní nádrže Bystřička, 7 kolonií z rybníku Lačnov, 10 kolonií z rybníku Neratov, 16 kolonií ze studánky Prlov a 15 kolonií ze studánky Vápenka.

Více než polovina kolonií kultivovaných jak při 25 °C, tak při 37 °C byly na oxidasový test pozitivní. 2/3 kolonií kultivovaných při 25 °C bylo katalasa pozitivní a bakterie, které byly kultivovány při 37 °C byly všechny katalasa pozitivní.

70 % všech izolovaných kolonií bylo gramnegativních, barvivo z buněk se odbarvilo, což je příčinou nepřítomnosti teichoové kyseliny v buněčné stěně a zbylých 30 % kolonií bylo grampozitivních. Převážná většina bakterií (61 %) měla tvar tyčinek, 20 % tvar kokotýčinek a vyskytovaly se i bakterie ve tvaru koků a sporulátů.

Identifikace bakterií byla provedena metodou MALDI/TOF a z původních 55 kolonií bylo spolehlivě identifikováno 37 bakteriálních kmenů. Nejčastěji se vyskytovaly bakterie rodu *Pseudomonas* (ve 13 vzorcích) a bakterie rodu *Acinetobacter* (v 11 vzorcích).

Screening dekarboxylasové aktivity u izolovaných bakterií probíhal kultivační metodou, která se projevila jako ne moc spolehlivá. Výsledky této metody ukázaly, že všechny izolované bakterie vykazují schopnost produkovat biogenní aminy. Z toho důvodu byly stanoveny množství jednotlivých biogenních aminů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/Vis detekcí. Mezi nejčastěji detekované biogenní aminy patřil spermin a spermidin, které produkovaly všechny izolované bakterie. Dalším poměrně často detekovaným biogenním aminem byl kadaverin, který produkovalo 26 kmenů. Produkce tyraminu byla zaznamenána u 11 sledovaných kmenů a produkce putrescinu u 10 sledovaných kmenů. Naopak produkce histaminu byla zaznamenána jen u dvou kmenů a produkce tryptaminu pouze u jednoho kmenu. Poslední stanovovaný biogenní amin – fenylethylamin, neprodukuje žádný ze sledovaných kmenů.

V experimentech prováděných v rámci této bakalářské práce bylo zjištěno, že množství vyprodukovaných jednotlivých biogenních aminů nepřekročilo v žádném z testovaných vzorků koncentrace, které by byly nadlimitní z hlediska bezpečnosti pro zdraví člověka. Nicméně celková suma biogenních aminů, které mohou všechny bakterie přítomné v jednotlivých vzorcích povrchových vod vyprodukovat, se této hranici velmi blížila.

Bylo prokázáno, že v povrchových vodách, které užívají lidé k pití (studánky), nebo ve kterých se koupou (rybníky) či loví ryby (chovné rybníky), jsou přítomny bakterie s významnou dekarboxylasovou aktivitou a je zde velká pravděpodobnost, že v těchto vodách budou přítomny biogenní aminy, jako je např. spermin, spermidin či kadaverin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [2] OTTOVÁ, Vlasta, Jiří HÄUSLER a František KUNC. *Mikrobiologie pro posluchače studijního oboru technologie vody*. 2., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991, 120 s. ISBN 80-7080-136-0.
- [3] *Obrázek* [online] [cit. 2016-01-08]. Dostupný z WWW: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/8/562.jpg
- [4] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007, 575 s. ISBN 978-80-7182-213-4.
- [5] RŮŽIČKA, Jan. *Mikrobiologie pro technology životního prostředí*. Fakulta technologická ve Zlíně, 1999, 124 s. ISBN 80-214-1374-3.
- [6] KOLÁŘ, Karel, Milan KODÍČEK a Jiří POSPÍŠIL. *Chemie pro gymnázia*. 2., upr. a dopl. Praha: SPN - pedagogické nakladatelství, 2005, 128 s. ISBN 80-7235-283-0.
- [7] *Obrázek* [online] [cit. 2016-01-12]. Dostupný z WWW: <http://home.tiscali.cz/chemie/dusikder/aminy.gif>
- [8] SMĚLÁ, Dana, Pavla PECHOVÁ, Tomáš KOMPRDA, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*. Chemické listy, roč. 98, 2004, s. 432-437. ISSN 1213-7103.
- [9] MUSIL, Jan a Olga NOVÁKOVÁ. *Biochemie v obrazech a schématech*. 2., zcela přeprac. vyd. Praha: Avicenum, 1990, 394 s.
- [10] KAROVIČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. *Biogenic Amines in Food* [online]. Bratislava, 2003. [cit. 2016-1-25], Chem. Pap. 59, s. 70-79. Dostupné z: http://www.chempap.org/file_access.php?file=591a70.pdf
- [11] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996, 186, 134, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [12] KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004, 145 s. ISBN 80-7157-757-7.

- [13] KOMPRDA, Tomáš, et al. *Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese*. Food Chemistry, 2006, Volume 102, Issue 1, p. 129-137.
- [14] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999, 3 sv. ISBN 80-902391-4-5.
- [15] *Obrázek* [online] [cit. 2016-01-05]. Dostupný z WWW: <https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTU8sRdrMIAonvuLBk9nYnlAXbK4PPfP5BvL4hoixyPdoalGcXb9A>
- [16] *Obrázek* [online] [cit. 2016-01-12]. Dostupný z WWW: https://is.muni.cz/th/214944/lf_b/BIOGENNI_AMINY.pdf
- [17] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín: princípy mikrobiológie požívateľín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrobní, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívateľinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [18] ZAMAN Muhammad Z., et al. *A review: Microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce*. American Journal of Sciences, 2009, Volume 6, Issue 6, p. 1199-1211.
- [19] SLÁDKOVÁ, Pavla. *Vybrané faktory ovplyvňujúce obsah biogenných aminů ve fermentovaných masných výrobcích* [online]. Brno. [cit. 2016-1-30]. Dostupné z: https://mnet.mendelu.cz/mendelnet08agro/files/articles/techpot_sladkova.pdf
- [20] SILLA Santos, M.H. *Biogenic amines: their importance in food*. International Journal of Food Microbiology, roč. 29, 1996, s. 213-231. ISSN 0168-1605.
- [21] HUDCOVÁ, Kateřina. *Stanovení biogenních aminů v produktech živočišného původu z farmářské produkce*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Helena Velichová, Ph.D.
- [22] BAKALOVÁ, Jitka. *Screening dekarboxylasové aktivity u bakterií využívaných v biodegradacích*. Zlín, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Mgr. Petra Jančová, Ph.D.
- [23] BUSHAW-NEWTON, Karel L. and MORAN, Mary Ann: *Photochemical formation of biologically available nitrogen from dissolved humic substances in coastal marine systems* [online]. 1999 [cit. 2016-1-26], Aquatic Microbial Ecology 18, p. 285-292.

- [24] MA, Fujun, Yi WAN, Guanxiang YUAN, Liping MENG, Zaomin DONG and Jianying HU. *Occurrence and source of nitrosamines and secondary amines in groundwater and its Adjacent Jialu River Basin, China*. 2012 Environ. Sci. Technol. 46, p. 3236-3243.
- [25] POSTE, Amanda E., Merete GRUNG and Richard F. WRIGHT. *Amines and amine-related compounds in surface waters: A review of sources, concentration and aquatic toxicity*. 2014, Sci. Total Environ. 418, p. 274-279.
- [26] Štursa, Petr aj. *MALDI-TOF MS snadný a rychlý způsob pro identifikaci bakterií izolovaných ze životního prostředí* [online]. VŠCHT v Praze, 2012. [cit. 2016-01-27]. Dostupné z: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/412-413.PDF
- [27] HUONG, Truong Thanh aj. *Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS* [online]. 2014, Brno. [cit. 2016-1-24]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/d-microbial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf
- [28] KANKI, Masashi, Tomoko YODA, Teizo TSUKAMOTO and Eiichiroh BABA. *Histidine Decarboxylases and Their Role in Accumulation of Histamine in Tuna in Dried Saury* [online]. 2007 [cit. 2016-1-24] Applied and Environmental Microbiology 73 (5), p. 1467-1473. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828783/pdf/1907-06.pdf>
- [29] *Obrázek* [online] [cit. 2016-01-01]. Dostupný z WWW: <http://www.chempoint.cz/data/imgs/01065m.gif>
- [30] HLOBILOVÁ, Michaela. *Využití molekulárně - biologických metod při zkoumání kvality potravin*. Zlín, 2007. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. RNDr. Buňková Leona, Ph.D.
- [31] HOUF, Kurt, Ann TUTENEL, Lieven De ZUTTER, Jan Van HOOF and Peter VANDAMME. *Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of Arcobacter butzleri, Arcobacter cryaerophilus and Arcobacter skrinowlii* [online]. 2000. [cit. 2016-1-20], FEMS Microbiology Letters 5, p. 89-94. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/femsle/193/1/89.full.pdf>
- [32] SCHWAGELE, Fredi. *Polymerase Chain Reaction – PCR – Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung in der Lebensmittelanalytik*. 1998. Roche Magazine 40, p. 121-123, Mittlungsblatt der BAFF.

[33] BURDYCHOVÁ, Radka a Tomáš KOMPRDA. *Skríning vybraných startovacích kultur na přítomnost DNA sekvencí kódujících dekarboxylázy účastnící se tvorby biogenních aminů.* [online]. Praha, 2007. [cit. 2016-01-20]. Dostupné z: http://tresen.vscht.cz/tmt/prehliidky/2007/souhrn_MaS_2007.pdf

[34] BECK, Martin. *Stanovení vybraných biogenních aminů metodou kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí.* Zlín, 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Vydrová Lucie, Ph.D.

[35] NĚMCOVÁ, Irena, Ludmila ČERMÁKOVÁ a Petr RYCHLOVSKÝ. *Spektrometrické analytické metody I.* Praha: Karolinum, 1997.

[36] CVAČKA, Josef. *Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii* [online]. Univerzita Karlova v Praze: Přírodovědecká fakulta, 2010. [cit. 2016-01-23]. Dostupné z: www.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf

[37] CHURÁČEK, Jaroslav. *Pokroky v teorii a instrumentaci moderních analytických metod.* 2. přeprac. vyd. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická, 1988, 193 s.

[38] High Performance Liquid Chromatography, HPLC. Vysoká škola chemicko - technologická v Praze. [online]. [cit. 2014-01-23]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/6%20HPLC%202012%20detektory.pdf>

[39] HONG, Joo Yeon. *Profiling analysis of biogenic amines and their acidic metabolites in mouse brain tissue using gas chromatography–tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography B. 2013, Volume 940, p. 94–103.

[40] DANG, Andy et al. *The use of aqueous normal phase chromatography as an analytical tool for food analysis: Determination of histamine as a model system.* Food Chemistry. 2013, Volume 141, Issue 4, p. 4226–4230.

[41] ORDÓÑEZ, Jose Luis, et al. *A survey of biogenic amines in vinegars.* Food Chemistry. 2013, Volume 141, Issue 3, p. 2713–2719.

[42] H.A. DE JONG, Wilhelmina, et al. *Current status and future developments of LCMS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines.* Clinical Biochemistry. 2011, č. 44, s. 95-103.

[43] *Obrázek* [online] [cit. 2016-01-10]. Dostupný z WWW: <http://image.slidesharecdn.com/detectors-hplc-140928235931-phpapp01/95/detectors-hplc-18-638.jpg?cb=1411948883>

- [44] *Obrázek z materiálů k předmětu Instrumentální analýza. Vyučující Ing. Lenka Veverková, Ph.D. Univerzita Tomáše Bati.*
- [45] HOLČAPEK, Michal et al. *Ionizační techniky. Universita Pardubice [online]. 2012 [cit. 2014-01-30]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf*
- [46] HOLČAPEK, Michal. *Hmotnostní analyzátory. Universita Pardubice [online]. 2012 [cit. 2016-01-30]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf*
- [47] *Obrázek [online] [cit. 2016-01-22]. Dostupný z WWW: http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/JVATK_soubory/image001.jpg*
- [48] SAGRATINI, Gianni et al. *Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Elsevier: Food Chemistry. 2011, č. 132, 537–543.*
- [49] POUSTKA, Jan. *METODY SEPARACE A DETEKCE IONTŮ [online]. VŠCHT v Praze, 2007 [cit. 2016-01-27]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-19%20MS%20SEPARACE%20A%20DETEKCE%20IONTU%20112014.pdf>*
- [50] *Obrázek [online] [cit. 2016-02-02]. Dostupný z WWW: http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/MicroBio_Interpreting_Plates.shtml*
- [51] JANDOVÁ, Božena a Ludmila KOTOUČKOVÁ. *Praktikum z mikrobiologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1996, 67 s. ISBN 80-210-1374-5.*
- [52] LADERO, V., CALLES, M., FERNÁNDEZ, M., ALVAREZ, M.A.: *Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. Curr. Nutr. Food Sci. 6, 145-156 (2010).*
- [53] GÖRNER, F., VALÍK, L'. *Aplikovaná mikrobiológia potravín. Vydavateľstvo MALÉ CENTRUM, Bratislava 2004. ISBN 80-967064-9-7, 528 s.*
- [54] PIPOVÁ, M., *Hygiena a technológia spracovania sladkovodných a morských rýb. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva, 2006. ISBN 80-8077-048-4, 417 s.*
- [55] LIN, C.-S., LIU, F.-L., LEE, I.-C., HWANG, C.-C., TSAI, Y.-H. *Histamine contents of salted seafood products in Taiwan and isolation of halotolerant histamine forming bacteria. 2012, Volume 131, Issue 2, p. 574–579.*
- [56] YOSHIDA, A., NAKAMURA, A. *Quantitation of histamine in fishes and fishes products by high performance liquid chromatography. 1982, J. Food Hyg. S.J.23, 339.*

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AGM	Agmatin
AMK	Aminokyselina
ARG	Arginin
BA	Biogenní amin
CAD	Kadaverin
CE	Kapilární elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FD	Fluorescenční detektor
G-	Gramnegativní
G+	Grampozitivní
GABA	Gama aminomáselná kyselina
GC	Plynová chromatografie
HIA	Histamin
HIS	Histidin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR	Infračervená spektrometrie
LYS	Lysin
MALDI	Laserová ionizace za účasti matrice
MPB	Masopeptonový bujón
MS	Hmotnostní detektor
ORN	Ornitin
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PEA	Fenylethylamin
PHE	Fenylalanin

PUT	Putrescin
RNA	Ribonukleová kyselina
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
TOF	Analyzátor doby letu
TLC	Tenkvrstevná chromatografie
TPA	Tryptamin
TRA	Tyramin
TRP	Tryptofan
TYA	Tryptone Yeast Extract Agar
TYR	Tyrosin
UV/Vis	Spektrofotometrický detektor v oblasti UV záření a viditelného záření
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Tvar bakteriálních buněk [1]	14
Obrázek 2: Schéma bakteriální buňky [3]	15
Obrázek 3: Struktura aminů [7]	17
Obrázek 4: Obecné schéma dekarboxylace	18
Obrázek 5: Dekarboxylace vybraných AMK za tvorby biogenním aminů [15].....	19
Obrázek 6: Reakce tryptofanu [16].....	20
Obrázek 7: Oxidativní deaminace.....	20
Obrázek 8: Schéma MALDI/TOF hmotnostního spektrometru [27].....	24
Obrázek 9: Princip PCR metody [29]	26
Obrázek 10: Schéma kapalinového chromatografu [36]	28
Obrázek 11: Schéma detektoru s diodovým polem [43].....	29
Obrázek 12: Schéma fluorescenčního detektoru [44].....	30
Obrázek 13: Schéma ionizace elektrosprejem [45]	31
Obrázek 14: Kvadrupólový hmotnostní analyzátor [47]	32
Obrázek 15: Makroskopické morfologické znaky kolonií [49].....	36

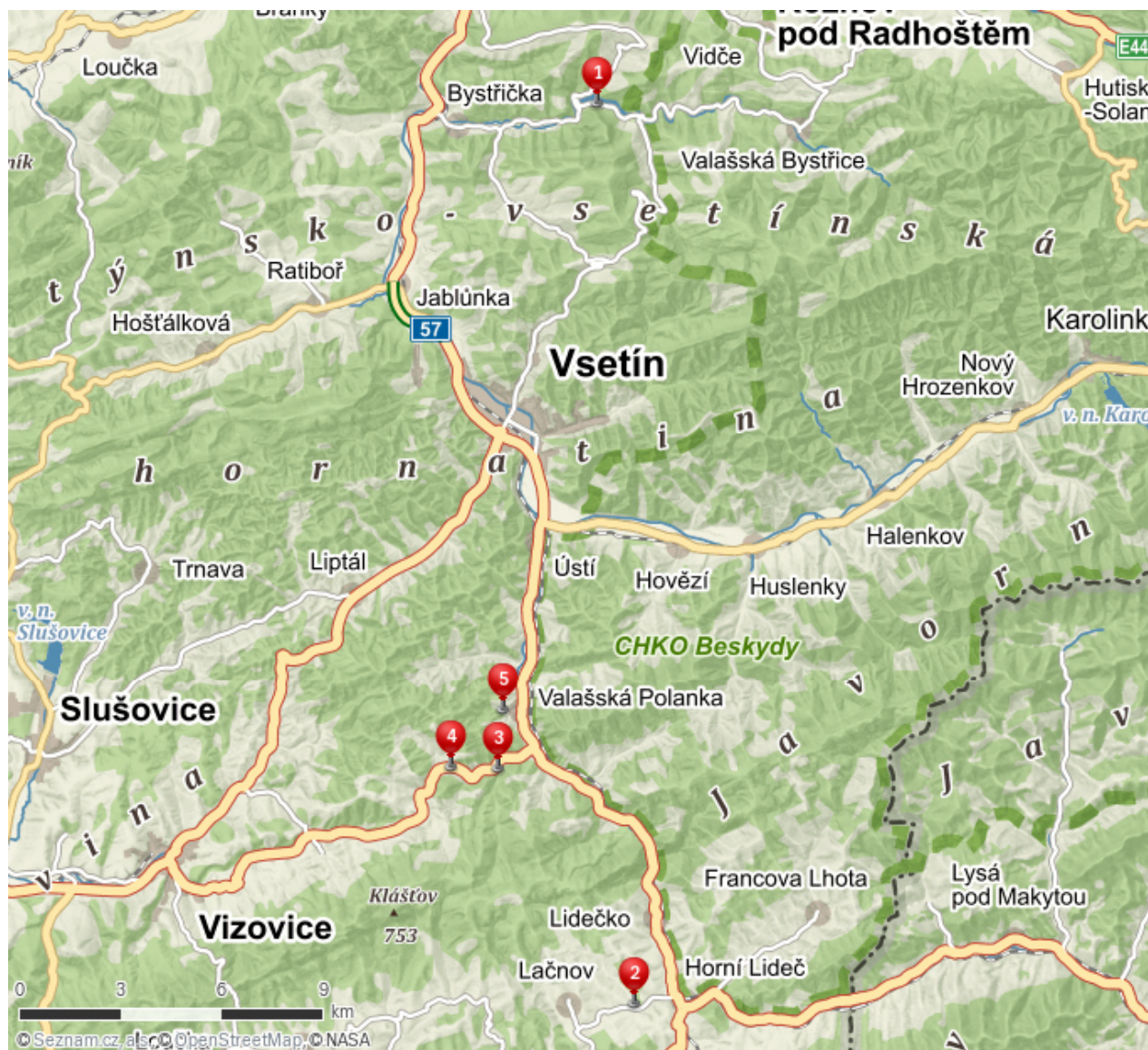
SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka I: Význam biogenních aminů [11].....</i>	22
<i>Tabulka II: Výskyt biogenních aminů v organismu [11].....</i>	23
<i>Tabulka III: Makroskopické morfologické znaky.</i>	41
<i>Tabulka IV: Mikroskopické morfologické znaky a biochemická aktivita bakterií, jež byly izolovány během kultivace při 25 °C.</i>	43
<i>Tabulka V: Mikroskopické morfologické znaky a biochemická aktivita bakterií, jež byly izolovány během kultivace při 37 °C.</i>	44
<i>Tabulka VI: Výsledky identifikace bakterií pomocí MALDI/TOF</i>	45
<i>Tabulka VII: Výsledky analýzy produkce jednotlivých biogenních aminů metodou HPLC – UV/Vis v mg.l⁻¹.</i>	47
<i>Tabulka VIII: Celková suma produkce biogenních aminů pro jednotlivé kmeny.....</i>	49

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P 1: Mapa odběrových míst vzorků.....	64
Příloha P 2: Přesná poloha odběrových míst vzorků	65

PŘÍLOHA P 1: MAPA ODBĚROVÝCH MÍST VZORKŮ



Legenda: vzorek č. 1 – vodní nádrž Bystřička (Bystřička); vzorek č. 2 – Prostřední lačnovský rybník (Lačnov); vzorek č. 3 – rybník Neratov (Prlov), vzorek č. 4 – studánka Prlov (Prlov); vzorek č. 5 – studánka Vápenka (Valašská Polanka)

PŘÍLOHA P 2: PŘESNÁ POLOHA ODBĚROVÝCH MÍST VZORKŮ

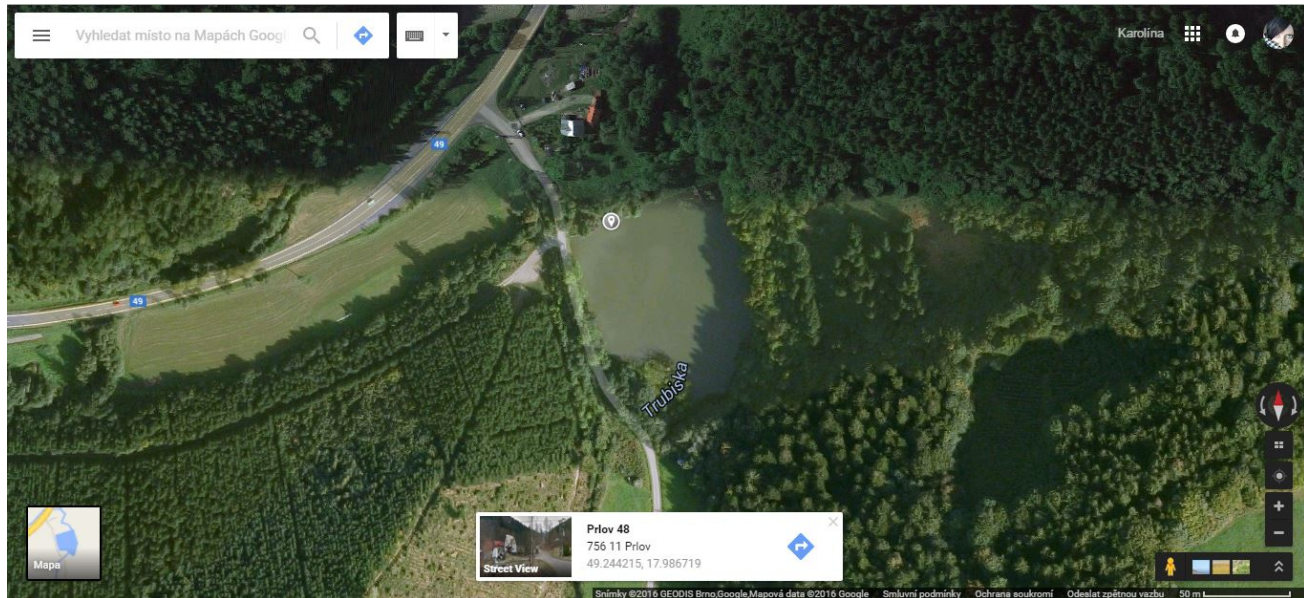
Vzorek č. 1 – vodní nádrž Bystřička, Bystřička (49.421998, 18.032578)



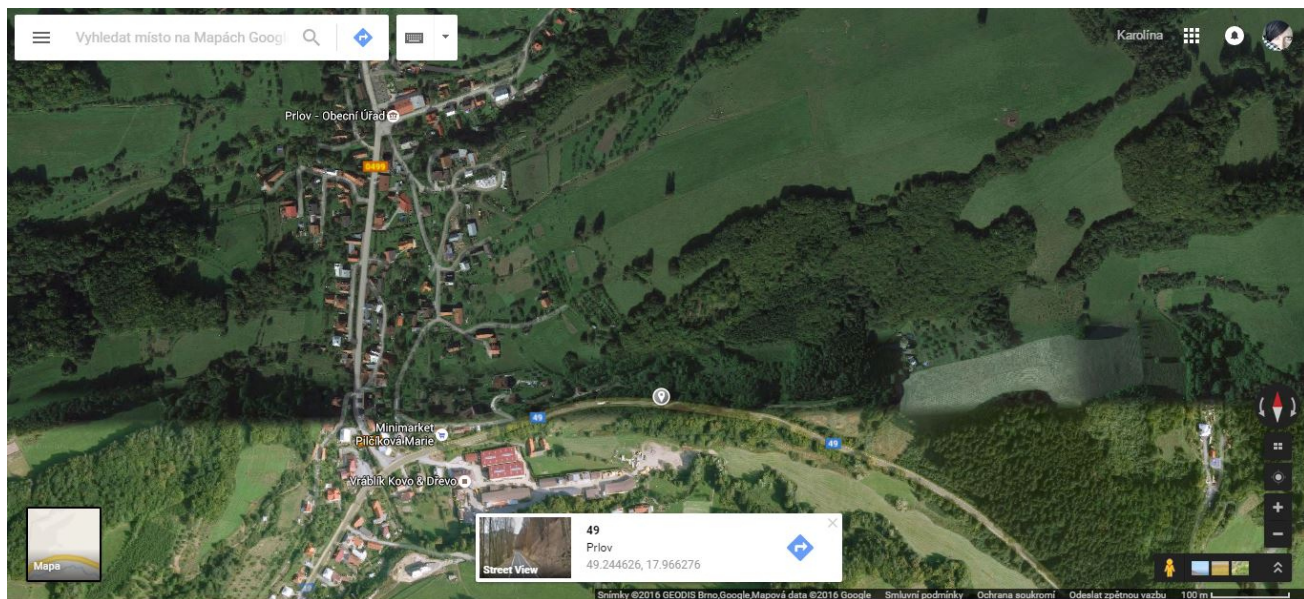
Vzorek č. 2 – Prostřední lačnovský rybník, Lačnov (49.181397, 18.042538)



Vzorek č. 3 – rybník Neratov, Prlov (49.244215, 19.986719)



Vzorek č. 4 – studánka Prlov, Prlov (49.244626, 17.966276)



Vzorek č. 5 – studánka Vápenka, Valašská Polanka (49.259832, 17.987715)

