

Výskyt vybraných mikrobiálních metabolitů v odpadních vodách mlékárenského průmyslu

Bc. Karolína Ceditlová

Diplomová práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Karolína Cedidlová
Osobní číslo: T16597
Studijní program: N2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Inženýrství ochrany životního prostředí
Forma studia: prezenční

Téma práce: Výskyt vybraných mikrobiálních metabolitů v odpadních vodách mlékárenského průmyslu

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat literární rešerši, která se bezprostředně týká daného tématu.
2. Z odpadních vod mlékárenského průmyslu izolovat a následně identifikovat bakterie. Zaměřit pozornost na bakterie s dekarboxylasovou aktivitou a bakterie se schopností degradace biogenních aminů.
3. Věnovat pozornost výskytu vybraných biogenních aminů, volných aminokyselin a dalším parametrům odebraných vzorků vod.
4. Teorii, metodiku, výsledky experimentů a diskusi sepsat do formy diplomové práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2018

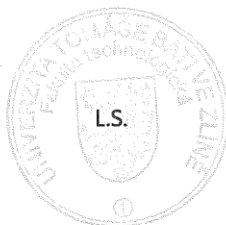
Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



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



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

Příjmení a jméno: CEDIDLOVA' KAROLÍNA

Obor: IOŽP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové 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 práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové 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 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 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 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 práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové 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 25. 2018


.....

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

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

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení 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.*

²¹ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

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

²² *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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Mezi mikrobiální metabolity řadíme i biogenní aminy. Jedná se o nízkomolekulární, přirozeně se vyskytující, dusíkaté látky, které jsou na jedné straně pro organismus nepostradatelné, ale na straně druhé působí na lidské zdraví negativně. Bylo prokázáno, že se tyto látky vyskytují ve velké míře v potravinách s vyšším obsahem bílkovin. Přítomnost biogenních aminů zajišťují bakterie s dekarboxylázovou aktivitou, které byly nalezeny nejen v potravinách, ale i v povrchových vodách.

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na studium dekarboxylázové aktivity u bakterií izolovaných ze vzorků odpadních vod mlékárenského průmyslu (oplachová voda z výroby tavených sýrů, čerstvých sýrů, krémových sýrů typu žervé, tvarohu, oplachová voda ze sýrárny a voda z venkovního kanálu). Z 10 vzorků odpadních vod mlékárenského průmyslu odebraných ve dvou ročních obdobích (léto a podzim) bylo izolováno 155 bakteriálních kmenů. Pomocí metody MALDI/TOF se podařilo identifikovat 77 z nich a 3 kvasinky. Mezi identifikovanými bakteriemi byly v letním odběru v největším zastoupení rody *Acinetobacter*, *Lactococcus* a *Staphylococcus*, v podzimním odběru pak rody *Pseudomonas* a *Aeromonas*. Produkce biogenních aminů byla stanovena nejprve screeningovou metodou (kultivační metoda s jednotlivými aminokyselinami) a následně metodou HPLC – UV/Vis.

Bakterie izolované z odpadních vod z mlékárenského průmyslu (letní odběr) produkovaly nejvíce putrescin, tyramin a spermin, naopak nejméně histamin a spermidin. Ze vzorků odpadních vod odebraných na podzim produkovaly přítomné bakterie nejvíce spermin, tryptamin a tyramin a nejméně, stejně jako v letním odběru, histamin a spermidin. Mezi izolované bakterie s nejvyšší dekarboxylázovou aktivitou patří *Aeromonas caviae*, *Acinetobacter johnsonii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Microbacterium mitrae*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* a *Staphylococcus carnosus*.

Výsledky této diplomové práce dokumentují, že v odpadních vodách mlékárenského průmyslu jsou přítomny bakterie s významnou dekarboxylázovou aktivitou, které jsou schopny produkce biogenních aminů v nezanedbatelných množstvích (až tisíc mg/l).

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

ABSTRACT

Biogenic amines belong to microbial metabolites. Those are low-molecular, naturally occurring, nitrogenous substances that are indispensable for the organism; on the other hand, they negatively affect human health. Those substances have been shown to occur extensively in foods with higher protein content. The presence of biogenic amines is ensured by bacteria with decarboxylase activity, which has been found not only in food but also in surface water.

This thesis is focused on the study of decarboxylase activities in bacteria isolated from samples of waste water from dairy industry (rinsing water from the production of processed cheese, fresh cheese, creamy cheese, cottage cheese, rinsing water from cheese factory and water from outdoor channel). It has been isolated 155 bacterial strains from the 10 samples of waste water from the dairy industry collected at two seasons (summer and autumn). Using the MALDI / TOF method, 77 of those have been identified and also 3 yeast. The most frequent species have been *Acinetobacter*, *Lactococcus* and *Staphylococcus* in the summer sampling and *Pseudomonas* and *Aeromonas* in the autumn sampling. Production of biogenic amines has been determined by screening method (cultivation method with individual amino acids) followed by HPLC - UV / Vis method.

Bacteria isolated from wastewater from the dairy industry (summer sampling) have been produced the most putrescin, tyramine and spermine, on the contrary, the least histamine and spermidine. From wastewater samples taken in autumn, the bacteria present produced the most spermin, tryptamine and tyramine, and the least histamine and spermidine. The isolated bacteria with the highest decarboxylase activity are *Aeromonas caviae*, *Acinetobacter johnsonii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Microbacterium mitrae*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Staphylococcus carnosus*.

The results of this thesis show that bacteria with significant decarboxylase activity are able to produce biogenic amines in quantities which are not negligible (up to 1000 mg/l) in the dairy industry wastewater.

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

Na tomto místě chci poděkovat vedoucí mé diplomové 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, Bc. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za čas, který mně věnovaly při pomoci během zpracování experimentální části diplomové práce v mikrobiologické laboratoři, Ing. Ludmile Zálešákové z Ústavu technologie potravin FT UTB ve Zlíně za spolupráci při identifikaci metabolitů pomocí HPLC – UV/Vis, prof. Ing. Miroslavě Kačániové, Ph.D. ze Slovenské poľnohospodárskej univerzity v Nitre za spolupráci při identifikaci bakteriálních kmenů pomocí MALDI/TOF, Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. a Ing. Khatantuul Pudevдорj za pomoc při zpracování výsledků z HPLC – UV/Vis analýzy v programech Clarity™ a Chromeleon™.

Tato práce vznikla za podpory projektu Ministerstva zemědělství, Národní agentury pro zemědělský výzkum – program aplikovaného výzkumu ZEMĚ, číslo projektu QK1710156.

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

OBSAH

ÚVOD	12
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 AMINOKYSELINY	14
1.1 REAKTIVITA AMINOKYSELIN	15
1.1.1 Peptidová vazba	15
1.2 PROTEINY	15
1.2.1 Struktura proteinů.....	16
1.2.2 Mléčné proteiny	16
2 DEKARBOXYLACE AMINOKYSELIN	19
2.1 BIOGENNÍ AMINY	19
2.1.1 Biogenní aminy v potravinách	21
2.1.1.1 Biogenní aminy v mléce	21
2.1.1.2 Biogenní aminy v sýrech	21
2.2 CHEMICKO – FYZIKÁLNÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANISMŮ S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU	22
2.2.1 Teplota.....	22
2.2.2 pH.....	23
2.2.3 Dostupnost substrátu	23
2.2.4 Koncentrace soli.....	23
2.3 PŘEHLED MIKROORGANISMŮ S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU.....	24
2.3.1 Nežádoucí bakteriální zástupci	24
2.3.1.1 Čeleď Enterobacteriaceae	24
2.3.1.2 Čeleď Bacillaceae	24
2.3.1.3 Čeleď Pseudomonadaceae	25
2.3.1.4 Čeleď Staphylococcaceae	25
2.3.2 Bakterie mléčného kvašení	25
2.3.2.1 Čeleď Lactobacillaceae.....	25
2.3.2.2 Čeleď Streptococcaceae.....	25
2.3.2.3 Čeleď Enterococcaceae.....	26
3 TECHNOLOGIE ZPRACOVÁNÍ MLÉKA	27
3.1 MLÉKO – VÝCHOZÍ SUROVINA PRO MLÉKÁRENSKÝ PRŮMYSL	27
3.2 TECHNOLOGICKÉ POŽADAVKY NA KVALITU MLÉKA	29
3.2.1 Mikrobiologické složení surového mléka	29
3.2.2 Nežádoucí mikrobiologická kvalita surového mléka	30
3.2.3 Podmínky uchovávání mléka před jeho zpracováním	30
3.3 TEPELNÁ OŠETŘENÍ MLÉKA	30
3.4 KONTAMINACE PŘI ZPRACOVÁNÍ MLÉKA.....	31
3.5 STARTOVACÍ KULTURY PŘI ZPRACOVÁNÍ MLÉKA	31
4 ODPADNÍ VODY Z MLÉKÁRENSKÉHO PRŮMYSLU	32
4.1 VODNÍ ZÁKON	32
4.2 KVALITA A MNOŽSTVÍ ODPADNÍCH VOD	32
4.3 ODPADNÍ VODY Z PRŮMYSLU	32
4.3.1 Odpady z produkce a zpracování mléka	34

4.4	CHARAKTER ODPADNÍ VODY	34
4.4.1	Mikrobiální charakter a indikátorové bakterie	34
4.4.1.1	Indikátory organického znečištění	34
4.4.1.2	Indikátory fekálního znečištění	35
II	PRAKTICKÁ ČÁST	37
5	CÍL PRÁCE	38
6	POUŽITÝ MATERIÁL	39
6.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	39
6.2	CHEMIKÁLIE	39
7	ODBĚR VZORKŮ	41
7.1	CHARAKTER ODEBÍRANÝCH VZORKŮ ODPADNÍ VODY	41
7.1.1	Letní odběr	41
7.1.2	Podzimní odběr	42
8	PRACOVNÍ POSTUPY	43
8.1	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DUSITANŮ	43
8.1.1	Princip	43
8.1.2	Použité roztoky a kalibrace	43
8.1.3	Příprava reakční směsi	44
8.2	POTENCIOMETRICKÉ STANOVENÍ DUSIČNANŮ	44
8.2.1	Princip	44
8.2.2	Použité roztoky a kalibrace	44
8.3	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ FOSFOREČNANŮ	45
8.3.1	Princip	45
8.3.2	Použité roztoky a kalibrace	45
8.3.3	Příprava reakční směsi	46
8.4	STANOVENÍ PROTEINŮ DLE BRADFORDOVÉ	46
8.4.1	Princip	46
8.4.2	Použité roztoky a kalibrace	46
8.5	MIKROBIOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ ODPADNÍ VODY	47
8.5.1	Příprava živných půd	47
8.5.2	Kultivace	47
8.6	CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH BAKTERIÁLNÍCH KOLONIÍ	48
8.6.1	Makroskopická charakteristika bakteriálních kolonií	48
8.6.2	Mikroskopická charakteristika bakteriálních kolonií	48
8.6.2.1	Gramovo barvení	48
8.6.2.2	Biochemické testy	49
8.7	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ POMOCÍ METODY MALDI/TOF MS	49
8.8	SLEDOVÁNÍ DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY BAKTERIÍ	49
8.8.1	Kultivační screeningová metoda	50
8.8.2	Stanovení biogenních aminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC s UV/Vis detekcí	50
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
9.1	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DUSITANŮ	52
9.1.1	Letní odběr	52

9.1.2	Podzimní odběr	54
9.2	POTENCIOMETRICKÉ STANOVENÍ DUSIČNANŮ	55
9.2.1	Letní odběr	55
9.2.2	Podzimní odběr	56
9.3	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ FOSFOREČNANŮ	57
9.3.1	Letní odběr	57
9.3.2	Podzimní odběr	59
9.4	STANOVENÍ PROTEINŮ	61
9.4.1	Letní odběr	61
9.4.2	Podzimní odběr	62
9.5	CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH KOLONIÍ	64
9.5.1	Makroskopické morfologické znaky	64
9.5.1.1	Letní odběr	64
9.5.1.2	Podzimní odběr	66
9.5.2	Výběr konkrétních kolonií pro další testování	69
9.5.2.1	Letní odběr	69
9.5.2.2	Podzimní odběr	69
9.5.3	Identifikace bakterií pomocí metody MALDI/TOF	70
9.5.3.1	Letní odběr	70
9.5.3.2	Podzimní odběr	72
9.5.4	Screening dekarboxylázové aktivity u izolovaných bakterií kultivační metodou	74
9.5.4.1	Letní odběr	74
9.5.4.2	Podzimní odběr	74
9.5.5	Stanovení produkce biogenních aminů pomocí HPLC – UV/Vis	75
9.5.5.1	Letní odběr	75
9.5.5.2	Podzimní odběr	79
	ZÁVĚR	84
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	93
	SEZNAM OBRÁZKŮ	95
	SEZNAM TABULEK	96
	SEZNAM PŘÍLOH	98

ÚVOD

Biogenní aminy (BA) jsou přirozeně se vyskytující látky, odvozené od aminokyselin. Pro organismus jsou tyto dusíkaté látky nepostradatelné, ale ve vyšších koncentracích jsou pro zdraví člověka nebezpečné. Za normálních podmínek jsou BA v těle detoxikovány ve střevní sliznici za účinku aminových oxidáz. Pokud jsou detoxikační enzymy dysfunkční, dostávají se BA do oběhového systému, kde působí toxicky na konkrétní orgány a způsobují zdravotní komplikace.

Jednou z možností vzniku BA je dekarboxylace aminokyselin za účasti enzymů dekarboxyláz. Některé mikroorganismy mohou produkovat enzymy dekarboxylázy a podílet se tak na vzniku BA, např. druhy rodu *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* a některé bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*.

Výskyt biogenních aminů je sledován především v potravinách s obsahem vyššího množství bílkovin. Běžně se BA vyskytují v mase, v masných výrobcích, v mléce a v sýrech. V dostupné literatuře se pro většinu potravin uvádí limitní množství BA v rozmezí od 100 do 800 mg/kg. Nejčastěji se vyskytující BA v potravinách jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin a tryptamin.

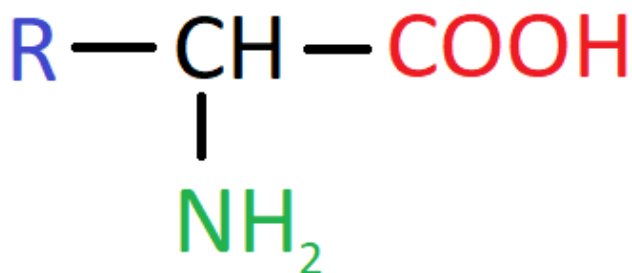
Producenti BA mohou být přítomni i ve vodách. V roce 2016 jsem ve své bakalářské práci zjistila, že v povrchových vodách, které lidé užívají k pití, ve kterých se koupou či loví ryby, jsou přítomny bakterie s dekarboxylázovou aktivitou a je tak velká pravděpodobnost, že by zde mohly být přítomny i biogenní aminy jako je např. spermin, spermidin a kadaverin.

Podnětem pro testování odpadní vody mlékárenského průmyslu bylo nedostatek informací v dostupné literatuře, přítomnost producentů biogenních aminů ve vodách a také přímý kontakt s výrobním procesem mléčných výrobků, ve kterých se biogenní aminy vyskytují.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 AMINOKYSELINY

Aminokyseliny jsou organické kyseliny, které obsahují nejméně jednu aminovou skupinu ($-\text{NH}_2$) a nejméně jednu karboxylovou skupinu ($-\text{COOH}$). Jsou základními stavebními složkami proteinů. Z chemického hlediska jsou to substituční deriváty karboxylových kyselin (Obr. 1), které se liší druhem a vlastnostmi svého postranního řetězce [1].



Obr. 1: Obecný vzorec aminokyseliny

Proteinogenní aminokyseliny (neboli biogenní, kódované) se v proteinech objevují ve formě L- α -aminokyselin (s výjimkou glycinu) a dělíme je podle druhu postranního řetězce a jejich vlastností do 4 skupin:

- aminokyseliny s elektricky nabitými bočními řetězci: pozitivně nabité: arginin, histidin, lysin; negativně nabité: kyselina asparagová, kyselina glutamová;
- aminokyseliny s polárními nenabitými postranními řetězci: serin, treonin, asparagin, glutamin;
- speciální případy: cystein, selenocystein, glycin, prolín;
- aminokyseliny s hydrofobním postranním řetězcem: alanin, valin, leucin, isoleucin, metionin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan [1].

Další aminokyseliny, které se řadí mezi nebílkovinné aminokyseliny:

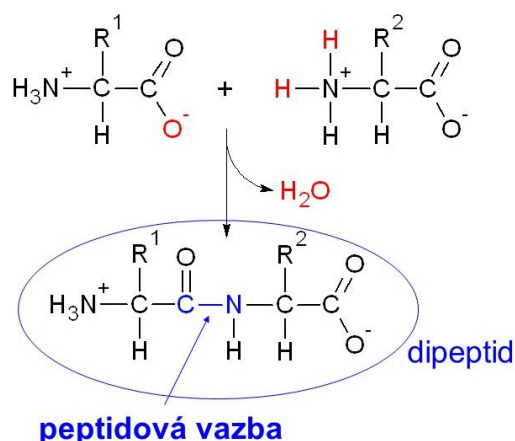
- Sekundární metabolity – produkty různých metabolických pochodů, prekurzory biosyntézy některých nebílkovinných dusíkatých sloučenin, některé látky se specifickými funkcemi (nervové mediátory a hormony), toxické látky (ochrana rostlin před predátory), zásobní a transportní forma dusíku.
- Produkty mikroorganismů – produkty chemické transformace bílkovin (isomerie, hydrolýza nebo volné aminokyseliny) [1].

1.1 Reaktivita aminokyselin

Přítomnost karboxylové skupiny ($-\text{COOH}$) a aminoskupiny ($-\text{NH}_2$) umožňuje aminokyselinám účastnit se řady reakcí. Jedná se např. o tvorbu solí, esterifikaci, acetylaci, transaminaci (reversibilní přenos aminoskupiny z α -aminokyseliny na 2-oxokyselinu) či dekarboxylaci (odstranění karboxylové skupiny) a oxidativní deaminaci (odstranění aminoskupiny, uvolnění amoniaku). Důležitou reakcí je také vznik peptidové vazby [1].

1.1.1 Peptidová vazba

Při vzniku peptidové vazby reaguje karboxylová skupina jedné aminokyseliny s aminovou skupinou druhé za současného odštěpení molekuly vody a vytváří se tak složitější struktura peptidů či proteinů. Peptidová vazba (Obr. 2) je druh kovalentní chemické vazby obsahující seskupení atomů $-\text{CO}-\text{NH}-$ [1].



Obr. 2: Vznik peptidové vazby [1]

Podle počtu aminokyselin, které jsou v molekule takto navázány, rozlišujeme:

- oligopeptidy (obsahují 2–10 aminokyselin),
- polypeptidy (obsahují 11–100 aminokyselin),
- vlastní bílkoviny - proteiny (více než 100 aminokyselin) [1].

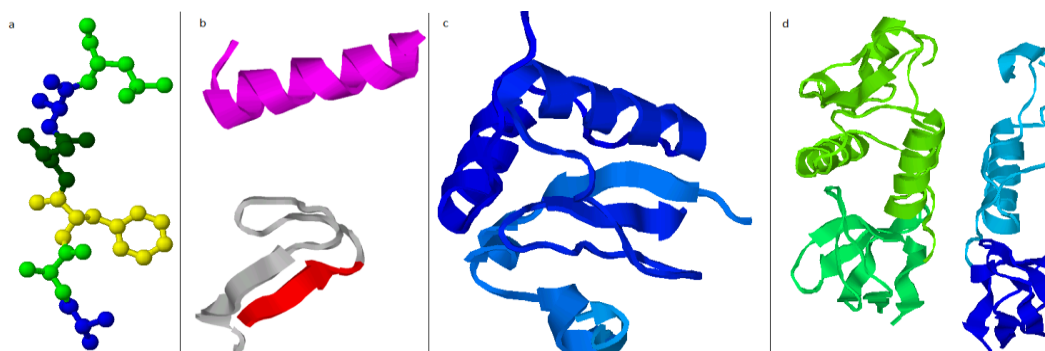
1.2 Proteiny

Proteiny dělíme na jednoduché, které se skládají pouze z aminokyselin a složené, které obsahují mimo aminokyselin ještě další neproteinové složky, např. cukry, nukleové kyseliny, kovy, popřípadě jiné látky. Polypeptidové řetězce jsou základními stavebními jednotkami proteinů a jsou v prostoru orientované vždy určitým způsobem, při kterém tvoří složité prostorové struktury [1].

1.2.1 Struktura proteinů

Z hlediska prostorového uspořádání (Obr. 3) a jejich struktury dělíme proteiny na:

- proteiny primární struktury, ve kterých jsou molekuly polypeptidů tvořeny sekvencí jednotlivých aminokyselin uspořádaných do polypeptidového řetězce proteinu;
- proteiny sekundární struktury, jejichž geometrické uspořádání polypeptidových řetězců je dáno prostřednictvím vodíkových můstků; jednotlivé bílkoviny mohou mít strukturu skládaného listu (β -hřeben) nebo pravotočivé šroubovice (α -helix);
- proteiny terciální struktury, ve kterých je vazba mezi bočními řetězci aminokyselin zprostředkována prostřednictvím vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami a aminoskupinami, iontové vazby mezi kyselými a zásaditými aminokyselinami, disulfidické vazby a van der Waalsovy síly mezi alifatickými či aromatickými bočními řetězci aminokyselin;
- proteiny kvartérní struktury, které tvoří přesné uspořádání polypeptidových řetězců do jedné molekuly [1].



Obr. 3: Struktura proteinů (a – primární; b – sekundární; c – terciální; d – kvartérní struktura) [2]

1.2.2 Mléčné proteiny

Mléčný protein je specifický protein vyskytující se v kravském mléce v koncentraci od 30 do 35 g/l. Mléčný protein je heterogenní skupina složek s velmi širokým rozsahem struktur a vlastností molekul, které dělíme do 5 kategorií, a to:

- kaseiny,
- syrovátkové proteiny,
- proteiny tukových kuliček,
- proteiny, které jsou součástí enzymů a hormonů,
- minoritní proteiny [5].

I mléčné proteiny jsou strukturálně polypeptidické řetězce složené z aminokyselin. Aminokyseliny dělíme na esenciální a neesenciální. Esenciální aminokyseliny si živočišný organismus nedokáže syntetizovat sám, je závislý na jejich vnějším příjmu a to především pomocí potravy. Složení hlavních typů kaseinů je uvedeno v tabulce 1 [5].

Tab. 1: Složení hlavních typů kaseinů z hlediska aminokyselin [5,6,7]

Aminokyselina	α_{S1} -kasein	α_{S2} -kasein	β -kasein	κ -kasein
Cystein	0	2	0	0
Valin	11	14	19	11
Metionin	5	4	6	2
Leucin	17	13	22	8
Tyrosin	10	12	4	9
Fenylalanin	8	6	9	4
Tryptofan	2	2	1	1
Lysin	14	24	11	9
Histidin	5	3	5	3
Arginin	6	6	4	5
Kyselina asparagová	7	4	4	3
Asparagin	8	14	5	8
Treonin	5	15	9	14
Serin	8	6	11	12
Prolin	17	10	35	20
Alanin	9	8	5	15

Poznámka: Čísla udávají celkový počet reziduí aminokyselin.

Proteiny, které se vyskytují v surovém mléce při pH 4,6 a teplotě 20 °C můžeme podle rozpustnosti rozdělit do dvou skupin:

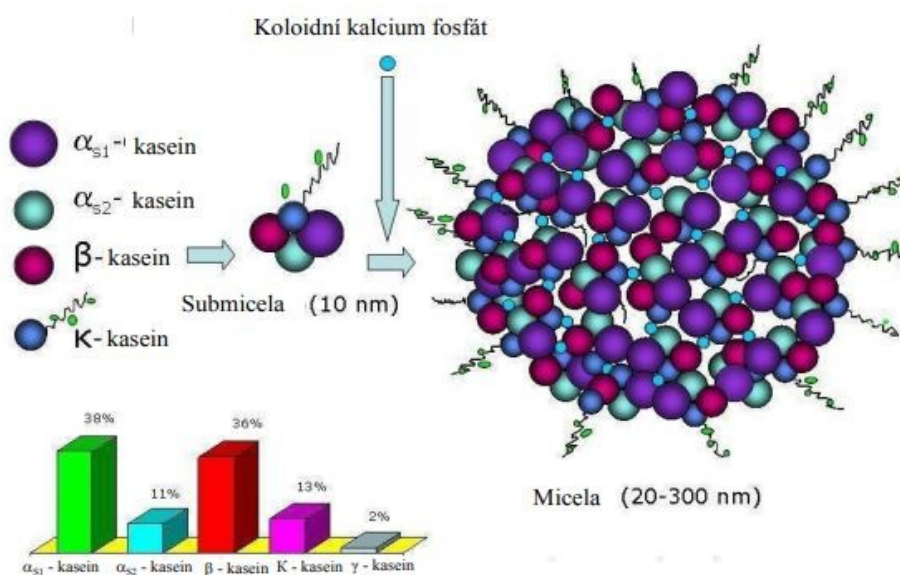
- nerozpustné proteiny,
- rozpustné (syrovátkové) proteiny.

V mléce jsou přítomny mikroskopické částice zvané kaseiny, tyto částice jsou označovány jako micely. Kaseinové micely se skládají ze submicel (podjednotek) a ze 4 typů kaseinů a syrovátka pak obsahuje 4 typy syrovátkových proteinů [4]. Mimo těchto osmi hlavních typů proteinů (Tab. 2) obsahuje mléko ještě dalších asi 80 minoritních proteinů, včetně 60 enzymů. Mléko obsahuje taky nebílkovinné dusíkaté složky v koncentraci 0,2 – 0,4 g/l (např. kyselina močová, močovina) [5].

Tab. 2: Hlavní kategorie mléčných proteinů kravského mléka [5,8]

Protein	Kategorie	Koncentrace v g/l	% z celkového proteinu
α_{S1} -kasein	Kaseiny	10,0	30,6
α_{S2} -kasein		2,6	8,0
β -kasein		9,3	28,4
κ -kasein		3,3	10,1
α -laktalbumin	Sывovátkové proteiny	1,2	3,7
β -laktalbumin		3,2	9,8
Sérový albumin		0,4	1,2
Imunoglobulin		0,7	2,1
Celkový mléčný protein		33,0	100,0

Poznámka: Zůstatek do 100 % celkového proteinu reprezentují minoritní proteiny.

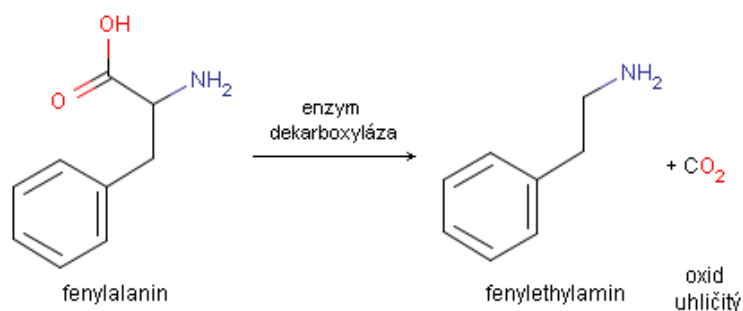


Obr. 4: Kaseinová micela [4]

Degradaci mléčných proteinů způsobuje působení některých enzymů, světla a tepla. Nejvýznamnější skupinou enzymů jsou proteázy. Tyto enzymy jsou přítomné v samotném nativním mléce nebo mohou být vytvořeny bakteriemi, které kontaminují mléko. Proteázy jsou také tvořeny bakteriemi účelně přidávanými do mléka v průběhu fermentačních procesů, taktéž mohou pocházet ze somatických buněk vyskytujících se přirozeně v mléce. Proteázy jsou žádoucí při výrobě jogurtů a sýrů, nicméně pokud dochází k degradaci proteinů, stávají se nežádoucími. Snižují kvalitu mléka, kdy mění především jeho chuť a vůni [5].

2 DEKARBOXYLACE AMINOKYSELIN

Dekarboxylace je proces odštěpení karboxylové skupiny za účasti specifických enzymů dekarboxyláz. Dekarboxylázy jsou enzymy z třídy lyáz a nejčastěji jsou orientované na určitý typ aminokyseliny. Rozhodující složkou enzymů je pyridoxal-5-fosfát, který se jako kofaktor účastní metabolických pochodů spojených s přeměnami aminokyselin během transaminace a dekarboxylace [9]. Dekarboxylace může proběhnout i bez pyridoxal-5-fosfátu, nicméně je potřeba přítomnosti pyruvoylového zbytku, který je navázán na aminoskupinu fenylalaninového zbytku enzymu. V tomto případě se v dekarboxylační reakci chová fenylalaninový zbytek podobně jako pyridoxal-5-fosfát [10,11]. Na obrázku 5 je znázorněna dekarboxylace aminokyseliny fenylalaninu, který je za působení enzymu fenylalanindekarboxylázy přeměňován na bazický fenylethylamin (za uvolnění oxidu uhličitého). Tomuto ději, dekarboxylaci, podléhají jen některé aminokyseliny. Výsledkem dekarboxylace aminokyselin je obecně vznik oxidu uhličitého a příslušného biogenního aminu [1].



Obr. 5: Dekarboxylace aminokyseliny fenylalaninu za vzniku biogenního aminu fenylethylaminu [3]

2.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy řadíme mezi nízkomolekulární bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin. Pro organismus jsou tyto dusíkaté sloučeniny nepostradatelné, ale při vyšších koncentracích působí na organismus negativně [12]. Za normálních podmínek jsou biogenní aminy v těle detoxikovány ve střevní sliznici pomocí aminových oxidáz. Za určitých podmínek, jako např. v důsledku příjmu inhibitorů (alkohol, antidepresiva), mohou být detoxikační enzymy dysfunkční. V tomto případě se biogenní aminy dostávají do oběhového systému organismu, kde působí toxicky na konkrétní orgány a způsobují vážné zdravotní

komplikace. Např. histamin vyvolává u lidí s nízkou aktivitou diaminooxidázy zánětlivá onemocnění jako Crohnovu chorobu, ulcerativní kolitidu nebo kolorektální nádory [13,14].

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin nebo také aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Mikroorganismy, které produkují biogenní aminy, vykazují dekarboxylázovou aktivitu a jsou součástí přirozené mikroflóry potravin nebo jsou přítomny v důsledku kontaminace při výrobě, zpracování a skladování potravin [15].

Nejvíce sledovanými biogenními aminy v potravinách jsou histamin, tyramin, putrescin a kadaverin, zejména kvůli jejich toxicitě [16]. Základní přehled tvorby vybraných biogenních aminů je uveden v tabulce 3.

Tab. 3: Základní přehled biogenních aminů podle Kalače a Křížka (1998) [16,12]

Aminokyselina	Enzym účastnící se dekarboxylace	Decarboxylací vzniklý biogenní amin
Histidin (HIS)	Histidindekarboxyláza	Histamin (HIA)
Lysin (LYS)	Lysindecaboxyláza	Kadaverin (CAD)
Ornitin (ORN)	Ornitindekarboxyláza	Putrescin (PUT) → Spermin (SPM) a Spermidin (SPD)
Arginin (ARG)	Arginindekarboxyláza	Agmatin (AGM)
	Ureohydroláza	Putrescin (PUT) → Spermin (SPM) a Spermidin (SPD)
Tyrosin (TYR)	Tyrosindekarboxyláza	Tyramin (TRA)
Fenylalanin (PHE)	Fenylalanindekarboxyláza	2-fenylethylamin (PEA)
Tryptofan (TRP)	Tryptofandekarboxyláza	Tryptamin (TPA)

Výskyt biogenních aminů v mléce je sporadický [17,18,19]. V sýrech se vyskytují nejčastěji histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin a tryptamin. Zvýšení jejich obsahu je spojeno především se zrácím procesem při výrobě sýrů, udává se až 1g/kg [17,20,21,22,23]. Celkový obsah tyraminu, putrescinu, kadaverinu a histaminu by neměl překročit v dané potravině 900 mg/kg [22].

2.1.1 Biogenní aminy v potravinách

Nejvyšší přípustné koncentrace biogenních aminů v potravinách jsou stanoveny ve vyhlášce č. 298/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, a to 200 mg/kg histaminu v rybách a 20 mg/l histaminu v pivu a vínu. Tyramin může být v červeném víně obsažen v koncentraci 50 mg/l, v základních surovinách v množství 100 mg/kg a v sýrech v množství 200 mg/kg. V dostupné literatuře se pro většinu potravin uvádí limitní množství v rozpětí od 100 do 800 mg/kg [16,27,24].

Voda tvoří až 80 % váhy živé bakteriální buňky, je základní složkou živé hmoty. Množství dostupnosti vody charakterizuje vodní aktivita a_w , která je dána podílem tlaku vodní páry nad roztokem ku tlaku vodní páry nad čistou vodou. Vodní aktivita čisté vody se rovná 1. Čím vyšší množství rozpuštěných látek je obsaženo v roztoku, tím nižší je vodní aktivita [24,25]. V mikrobiologii určuje a_w v jakém množství a jestli vůbec může dojít k pomnožení mikroorganismů v potravinách [24,26]. Růst patogenních organismů je nejčastěji inhibován při a_w menší jak 0,9. Mezi a_w a produkcí biogenních aminů prokázal Křížek a Kalač (1998) pozitivní vztah [16]. Vysoké hodnoty vodní aktivity podporují dekarboxylázovou aktivitu a produkci biogenních aminů [24].

2.1.1.1 Biogenní aminy v mléce

Množství biogenních aminů v surovém mléce je nízké, obvykle pod 1 mg/kg. Nejčastěji je přítomen histamin a tyramin. Koncentrace histaminu v surovém mléce se pohybují kolem 0,3 mg/kg [28,24].

2.1.1.2 Biogenní aminy v sýrech

V nižších koncentracích byly biogenní aminy zaznamenány v široké škále sýrů [29,30]. Nejdůležitější biogenní aminy vyskytující se v sýrech jsou tyramin, histamin, putrescin, kadaverin, tyramin a fenylethylamin [29,31]. Během zrání je kasein pomalu degradován proteolytickými enzymy, což vede ke zvýšení obsahu volných aminokyselin [29,32], které mohou být následně vystaveny další rozkladné reakci katalyzované příslušnými bakteriálními dekarboxylázami za vzniku CO_2 a biogenního aminu [29].

Ke vzniku toxického množství biogenních aminů v sýrech vede proces proteolýzy, kterého se účastní nativní proteázy z mléka, proteázy kyslíkových kultur, syřidlové enzymy a proteázy kontaminující mikroflóry. Proteolýza je důležitým pochodem ovlivňujícím kvalitu konečného produktu [17].

Důležitými aspekty pro tvorbu biogenních aminů v sýrech jsou množství přítomných aminokyselin a peptidů v mléce, přítomnost bakterií schopných dekarboxylace, pH mléka, koncentrace soli, aktivita vody, použitá technologie, doba zrání a skladování, množství mikroorganismů a přítomnost kofaktorů (pyridoxal-5-fosfátu) [17].

Nejvyšší koncentrace histaminu v tavených sýrech byla stanovena na množství 105 mg/kg, tyraminu od 13 do 172 mg/kg, kadaverinu 95 mg/kg, putrescinu 77 mg/kg [24]. V tavených sýrech je koncentrace biogenních aminů oproti tvrdým sýrům nižší [24].

2.2 Chemicko – fyzikální faktory ovlivňující růst mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující růst mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou patří aktivita vody, teplota, pH, dostupnost substrátu, koncentrace soli, přístup kyslíku, ale také doba zrání a skladování, hygienické postupy, startovací kultury či tepelné ošetření mléka [24].

Hůlová (2013) zjistila, že dekarboxylázová aktivita a tedy i možná tvorba biogenních aminů je ovlivněna především teplotou a dobou kultivace. Se vzrůstající teplotou a dobou kultivace se dekarboxylázová aktivita zvyšuje. Nejvyšší činnost dekarboxyláz byla zaznamenána při teplotě 30 a 37 °C, naopak při teplotě 6 °C nebyla zjištěna dekarboxylázová aktivita u žádného kmenu z testovaných izolátů [24].

2.2.1 Teplota

Různé skupiny mikroorganismů mají odlišné nároky na teplotu prostředí. Optimální teplota zajišťuje mikroorganismům podmínky pro rozmnožování a správný chod metabolismu. Mimo to má teplota také výrazný vliv na vznik biogenních aminů. Obsah biogenních aminů je přímo závislý na teplotě a vzrůstá i s dobou skladování. Dekarboxylační činnost organismů a vyšší produkce BA se zvyšuje s rostoucí teplotou [24]. Histamin se při 20 °C tvoří řádově více než při 5 °C a sýr skladovaný při 21 °C po roce zrání obsahuje třikrát více histaminu než sýr skladovaný po stejnou dobu při teplotě 9 °C [24]. Dále byl pozorovaný vliv teploty (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C) na produkci BA u *Escherichia coli*. Při všech uvedených teplotách produkovala *E. coli* kadaverin a putrescin. Hned po devíti hodinách začala *E. coli* produkovat kadaverin. Maximální produkce kadaverinu bylo dosaženo po 45 hodinách při teplotě růstu 10 °C. Při teplotě 37 °C, což je optimální teplota pro

růst *E. coli*, začala produkovat putrescin po deseti hodinách. Maximální produkce putrescinu byla pak zaznamenána při 70 °C po 70 hodinách [24].

Některé dekarboxylázy mohou přežít i podmínky pasterace, důsledkem toho pak enzymy působí dále. Histamin je termostabilní a dokáže ho zničit až zahřátí na 116 °C po dobu 90 minut, naopak koncentrace sperminu během tepelného zpracování klesá [24].

2.2.2 pH

Gardini (2001) uvádí, že pH je důležitým faktorem pro růst mikroorganismů [24,38]. Velké výkyvy pH ovlivňují nejen metabolismus organismů, ale může také dojít k usmrcení buňky. Příčinou je poškození cytoplazmatické membrány, inhibice enzymů a inhibice transportních bílkovin [24,25]. Minimální hodnota pH pro správný růst je od 4,4 do 4,6. Vůči nižším hodnotám pH jsou citlivější hlavně patogenní bakterie. Bakterie mléčného kvašení snášejí nejlépe pH v rozmezí 5,5 – 6 a kvasinkám a plísním nejvíce vyhovuje pH od 8 do 9 [24].

Optimální hodnota pH pro dekarboxylaci aminokyselin je v rozmezí od 2,5 do 6,5. Kyselější prostředí inhibuje bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, naopak bakterie mléčného kvašení, plísně a kvasinky jsou schopné růstu i při nižších hodnotách pH [24].

2.2.3 Dostupnost substrátu

Přítomnost cukrů, které mikroorganismy mohou využívat pro svůj růst, je také důležitým faktorem. Nejoptimálnější koncentraci glukózy uvádí Silla-Santos (1996) v rozmezí 0,5 až 2 % [24,36].

2.2.4 Koncentrace soli

Obecně koncentrace soli inhibuje produkci biogenních aminů. Nicméně Komprda (2005) uvádí, že obsah histaminu a tyraminu se v přítomnosti chloridu sodného zvyšuje [22,24]. Koncentrace NaCl do 2,2 % výrazně ovlivňuje rychlost nárůstu tyraminu produkovaného *E. faecium*, nicméně u *E. faecalis* byla zaznamenána klesající rychlost nárůstu tyraminu [15,24]. Schopnost *Lactobacillus buchneri* tvořit histamin byla částečně inhibována při koncentraci NaCl 3,5 % a při koncentraci 5 % se produkce histaminu zcela zastavila. Greifová (2003) potvrdila, že vyšší koncentrace soli přispívá ke snížení schopnosti mikroorganismů produkovat histamin [24].

2.3 Přehled mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou

V mléce a mléčných výrobcích se nejčastěji vyskytují bakterie rodu *Bacillus*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella* a některé bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Tyto bakterie mohou produkovat enzymy dekarboxylázy a podílet se tak na vzniku biogenních aminů [33,24]. Produkce biogenních aminů je vlastnost specifická pro určité kmeny nikoliv pro daný druh [34,24]. Obsah biogenních aminů v konkrétním druhu potraviny kolísá v širokém rozpětí nejenom mezi výrobci, ale také mezi jednotlivými šaržemi stejného výrobce [27,68].

2.3.1 Nežádoucí bakteriální zástupci

2.3.1.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Do této čeledi patří gramnegativní tyčinky, jedná se o fakultativně anaerobní mikroby s teplotním optimem růstu okolo 37 °C. Na oxidázový test jsou negativní a redukují dusičnany na dusitany. Řadí se zde např. *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Klebsiella*, *Enterobacter* a *Citrobacter* vykazující schopnost vázat molekulární dusík [35,24].

K bakteriím, které dekarboxylují aminokyseliny a tvoří tak biogenní aminy patří *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Leclercia*, *Pantoea*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Serratia* [36,24,10]. Tyto druhy jsou spojovány s tvorbou kadaverinu a putrescinu [37,24]. Zvýšené hladiny putrescinu byly zaznamenány u sýrů vyráběných z nepasterovaného mléka jako důsledek kontaminace bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae* [38,24].

2.3.1.2 Čeleď *Bacillaceae*

Nejrozšířenějším zástupcem je rod *Bacillus*, který zahrnuje grampozitivní, fakultativně anaerobní, pohyblivé tyčinky s teplotním optimem pro růst kolem 37 °C [39,24]. Sporulace probíhá pouze za přítomnosti kyslíku, protože důležitou energii ke sporulaci získávají bakterie oxidací lipidů z cytoplazmy [40,24].

Mezofilní *Bacillus cereus* je nenáročná, fakultativně anaerobní bakterie snášející teplotní rozmezí od 8 °C až po 55 °C [40,24]. Na katalázový test je *Bacillus cereus* pozitivní, ale je oxidáza negativní [39,24]. U kmenu *Bacillus licheniformis* byla prokázána dekarboxylázová aktivita pro tyrosin, tryptofan, fenylalanin a ornitin [24].

Dalším významným rodem řadícím se k čeledi *Bacillaceae* je rod *Clostridium*, který je zastoupený grampozitivními tyčinkami. Bylo zjištěno, že bakterie izolovaná z ryb (*Clostridium perfringens*), produkuje histamin [10,24].

2.3.1.3 Čeleď *Pseudomonadaceae*

Rod *Pseudomonas* zahrnuje gramnegativní, aerobní tyčinky. Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou kataláza i oxidáza pozitivní. Optimální teplota růstu je 25 – 30 °C. U bakterií *Pseudomonas* spp. byla zaznamenána produkce putrescinu [10,24].

2.3.1.4 Čeleď *Staphylococcaceae*

Rod *Staphylococcus* zahrnuje grampozitivní, fakultativně anaerobní nepohyblivé koky. Optimální teplota růstu je 30 – 37 °C. Hlavním zástupcem stafylokoků je *Staphylococcus aureus*, který produkuje řadu enzymů a toxinů. Mezi potraviny, které mohou způsobovat stafylokokovou otravu, řadíme i mléko a mléčné výrobky. U *Staphylococcus* spp. byl identifikován histamin, jako biogenní amin vzniklý při dekarboxylaci aminokyselin [36,24].

2.3.2 Bakterie mléčného kvašení

Do této skupiny řadíme 13 rodů bakterií, a to *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella* [41,24]. Jedná se o grampozitivní bakterie, jejichž společným znakem je tvorba kyseliny mléčné z fermentovaných sacharidů. Enterokoky mají schopnost dekarboxylovat aminokyseliny na biogenní aminy [42,24]. Laktobacily produkují histamin, putrescin a tyramin [43,24].

2.3.2.1 Čeleď *Lactobacillaceae*

Do této čeledi patří fakultativně anaerobní nepohyblivé tyčinkovité bakterie mléčného kvašení. [42,24]. Jsou kataláza negativní [44,24]. U bakterií *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus helveticus* byla zjištěna přítomnost enzymu histidindekarboxylázy a tvorba biogenního aminu histaminu [10,24].

2.3.2.2 Čeleď *Streptococcaceae*

Nejvýznamnějším zástupcem je rod *Lactococcus*, grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie s optimální teplotou růstu kolem 30 °C. Běžně se vyskytují v čistých mlékárenských kulturách při výrobě smetany, másla, kysaného mléka, tvarohů a sýrů [42,24]. Ně-

které kmeny produkují leucin, aminokyselinu, ze které vzniká 3-methylbutanal. Tato aromatická látka zajišťuje sladkou chuť v mléčných produktech [44,42,24]. Do této čeledi dále řadíme rod *Streptococcus*. *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* se běžně používá v kyselinových kulturách pro výrobu jogurtů, kysaného mléka a mnoha druhů sýrů. Nejvhodnějším prostředím pro jeho růst je mléko. *Streptococcus thermophilus* produkuje tyramin [45,24].

2.3.2.3 Čeleď *Enterococcaceae*

Zástupci čeledi *Enterococcaceae* jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní koky [46,24]. Význam mají při zrání sýrů, kdy tvoří jejich aroma, díky rozkladu kyseliny citrónové na diacetyl a další látky [15,46,24]. Enterokoky produkují zejména 2-fenylethylamin [47,24]. U *E. faecalis* byla prokázána produkce tyraminu. Některé druhy enterokoků vykazují lysindekarboxylázovou, histidindekarboxylázovou a ornitindekarboxylázovou aktivitu [36,42,24]. *E. durans* je nejběžnějším enterokokem vyskytujícím se v mléce, řadí se mezi mikroorganismy, které dokážou odolávat pasteraci. Může růst i během zrání sýru, což vede k akumulaci tyraminu [48,24].

3 TECHNOLOGIE ZPRACOVÁNÍ MLÉKA

3.1 Mléko – výchozí surovina pro mlékárenský průmysl

Mléko je bílá koloidní suspenze, která je sekretována mléčnou žlázou savců. Předpokládá se, že dnešní druh člověka začal konzumovat mléko jiných druhů savců až po domestikování hlavních druhů hospodářských zvířat. Prvotně byly domestikované ovce a kozy, později i hovězí dobytek, který se stal hlavním producentem mléka pro člověka. V současnosti představuje kravské mléko víc jako 85 % celosvětové spotřeby mléka [5].

Hlavní složkou mléka je voda, která tvoří kvantitativně dominantní část. Dále mléko obsahuje víc jako sto druhů proteinů, které můžeme rozdělit do tří skupin:

- kaseiny s obsahem 72 % v mléce,
- syrovátkové proteiny s koncentrací 17 – 20 %,
- neproteinovou dusíkovou frakci s obsahem 5 % v mléce [5].

Další složkou mléka je mléčný tuk, který se skládá z více jak 400 mastných kyselin. Jejich vzájemnou kombinací potom vznikají tisíce triacylglycerolů a komplexních lipidů. Většina druhů savců produkuje mléko s laktózou, která je zástupcem mléčných cukrů. Mezi složky přítomné v mléce dále řadíme glykoproteiny, glykolipidy a oligosacharidy [5].

V nízkých nebo stopových koncentracích obsahuje mléko asi 30 anorganických prvků. Tyto prvky jsou důležité kvůli své výživné hodnotě, stabilitě mléka a efektivitě během jeho technologické výroby. Dalšími složkami obsaženými ještě v nižších koncentracích jsou minerální látky, vitamíny, enzymy, specifické krevní proteiny a další látky produkované mléčnou žlázou. Tyto složky jsou obsažené v mléku všech druhů savců, avšak v rozdílných koncentracích [5].

Všechny tyto složky, jejich struktura a vlastnosti podstatně ovlivňují vlastnosti mléka a také významně působí na technologické procesy během jeho výroby. Fyzikálními a chemickými metodami lze jednotlivé složky v mléce separovat a následně charakterizovat. Pokud dojde k oddělení kaseinových micel a tukových kuliček, získáme mléčné sérum. Tekutá část mléka se nazývá mléčná plazma. Bílkoviny, laktóza, mléčný tuk, vitamíny a minerální látky tvoří celkovou sušinu. Mléko obsahuje složky jako kasein, mléčný tuk a laktózu, které jsou specifické a v jiných biologických tekutinách se nevyskytují [5].

Tab. 4: Složení mléka – charakter disperze složek a jejich koncentrace v 1 litru mléka [5,7,8]

<i>I. Látky přítomné v koloidním stavu:</i>			
kasein		22 – 32 g	
albumíny		5,2 g	
globulíny		0,8 g	
- enzymy		-	
<i>II. Látky přítomné v emulzi mléka:</i>			
Mléčný tuk jako směs		Vitamíny rozpustné v tucích	
- triglyceridy	30 – 45 g	- vitamín A	0,1 – 0,5 mg
- fosfatidy	0,3 g	- vitamín D	0,4 µg
- steriny	0,1 g	- vitamín E	1,0 mg
- glyceridy	0,15 – 0,22 g	- provitamín A	0,1 – 0,6 mg
<i>III. Látky v pravém roztoku:</i>			
Vitamíny rozpustné ve vodě		Kationty	
vitamín B ₁	0,4 mg	Ca	1,25 g
vitamín B ₂	1,3 mg	Mg, Na, K	2,1 g
vitamín B ₆	0,7 mg	Anionty	
vitamín B ₁₂	7,0 µg	fosforečnany, fosfáty	5,3 g
vitamín C	20,0 mg	Laktóza a další cukry	47 – 48 g
<i>IV. Voda:</i>		87,3 %	
<i>V. Plyny:</i>		0,12 g	
<i>VI. Prvky kovů:</i>		stopové koncentrace	

Mléko je poměrně dynamický systém, jehož nestabilita je dána přítomností jednotlivých složek. Enzymy mohou v průběhu proteolýzy, lipolýzy a oxidačně-redukčních reakcí modifikovat jednotlivé složky mléka. Změny v rozpustnosti anorganických solí a proteinů zase způsobují změny teplot a pH. Na složení mléka působí také přítomnost mikroorganismů, které svým růstem ovlivňují pH nebo redox potenciál [5]. Z průmyslově zpracovávaného mléka se používá přibližně 40 % jako konzumní tekuté mléko, 35 % se zpracovává při výrobě sýrů a 10 % se použije na výrobu sušeného mléka [5]. Mléko je v porovnání

s jinými potravinami poměrně lehce technologicky zpracovatelné, proto existuje celá řada různých mléčných výrobků, např. při enzymatickém srážení vznikající různé druhy sýrů, syrovátkové proteinové koncentráty a izoláty, syrovátková sušina, laktóza a její deriváty; při kyselém srážení vznikající čerstvé sýry a další sýrové výrobky; při separaci centrifugací vznikající smetana a máslo; při fermentaci vznikající různé druhy fermentovaných mléčných výrobků jako jogurty a acidofilní mléka; dále zmrzlina, sušené mléka, dětské výživy nebo kondenzované mléka [5].

3.2 Technologické požadavky na kvalitu mléka

Hlavním požadavkem na kvalitu mléka jsou nízké celkové počty mikroorganismů, nízký počet somatických buněk, nepřítomnost inhibičních látek, správné složení mléka, nepřítomnost nežádoucích mikroorganismů [5].

Pojem mléko zahrnuje:

- surové mléko pocházející ze sekretu mléčné žlázy získaného nadojením krav, který nebyl zahřátý na teplotu vyšší než 40 °C;
- mléko určené na zpracování, tekuté nebo zmrazené mléko získané ze surového mléka, které bylo fyzikálně ošetřené autorizovaným procesem jako je tepelné ošetření nebo termizace;
- tepelně ošetřené konzumní mléko určené na prodej konečnému spotřebiteli [5].

3.2.1 Mikrobiologické složení surového mléka

Při výrobě tepelně ošetřeného konzumního mléka musí surové kravské mléko splňovat tyto standardy:

- celkový počet mikroorganismů při 30 °C může být nejvíc 100 000 v 1 ml, přičemž stanovení se provádí jako geometrický průměr za poslední dva měsíce při odběru minimálně dvou vzorků za měsíc;
- počet somatických buněk může být nejvíc 400 000 v 1 ml, přičemž stanovení se provádí jako geometrický průměr za poslední tři měsíce při odběru minimálně jednoho vzorku za měsíc [5].

Surové kravské mléko, které při zpracování nepodléhá žádné tepelné úpravě, může mít maximální počet *Staphylococcus aureus* v 1 ml 500 [5].

3.2.2 Nežádoucí mikrobiologická kvalita surového mléka

Špatnou mikrobiologickou kvalitu mléka způsobují organismy, mezi které řadíme:

- psychrotrofní mikroorganismy;
- termorezistentní mikroorganismy – mikrokoky, některé druhy streptokoků, enterokoky, korynebakterie, aerobně i anaerobně spórotvorné organismy;
- spórotvorné anaerobní bakterie – klostridie;
- spórotvorné aerobní bakterie;
- koliformní bakterie [5].

Kvalitu mléka lze zabezpečit zlepšením mikrobiologické kvality za použití:

- tepelných postupů při ošetření mléka jako např. termizace, pasterizace;
- dále mikrofiltrací (účinnost redukce spor o víc jako 97 %), bakterofugací (účinnost redukce spor 90 až 95 %) nebo postupy s použitím vysokého hydrostatického tlaku [5].

3.2.3 Podmínky uchovávání mléka před jeho zpracováním

Kvalitu finálních mléčných výrobků určují podmínky při skladování a uchovávání surového mléka. Pokud jsou podmínky porušeny, dochází k množení psychrofilních mikroorganismů, které způsobují zhoršení technologických i sensorických vlastností mléka [5].

Mléko, které mlékárna přijme, se musí do 4 hodin vychladit na teplotu maximálně 6 °C a při této teplotě se uchovává až do doby tepelného ošetření. Před samotným ošetřením se provádí kontrola stanovení celkového počtu mikroorganismů. Při teplotě 30 °C nesmí přesáhnout 300 000 v 1 ml mléka. Pokud přesáhne, nesmí se mléko dále využívat k výrobě tepelně neošetřených produktů [5].

3.3 Tepelná ošetření mléka

Tepelné ošetření mléka je důležité z hlediska zabezpečení zdravotní nezávadnosti (především k inaktivaci patogenních mikroorganismů), deaktivace enzymů (nativních, případně syntetizovaných kontaminující mikroflórou), prodloužení trvanlivosti mléka či standardizaci podmínek při výrobě mléka. Nejpoužívanější metodou tepelného ošetření mléka je pasterizace. Při pasteraci se snižuje mikrobiální zátěž surového mléka, včetně producentů biogenních aminů, nicméně bakteriální spóry nejsou devitalizovány. Mléčné produkty vyrobené ze syrového mléka vykazují podstatně vyšší hodnoty biogenních aminů než výrob-

ky z pasterovaného mléka [5]. V sýrech ze syrového mléka byla naměřena 30x vyšší koncentrace tyraminu než v sýrech z pasterovaného mléka [49].

O účinku tepelného ošetření rozhoduje především výchozí množství mikroorganismů v mléce před záhřevem. Snížení počtu mikroorganismů tepelným ohřevem je založeno na denaturaci bílkovinných částí enzymů [50].

3.4 Kontaminace při zpracování mléka

Existují tři způsoby kontaminace: mikrobiální, fyzikální a chemická. K mikrobiálnímu znečištění dochází v důsledku výskytu bakterií jako např. *Campylobacter*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* a *Shigella*, které mohou vniknout do hotových mléčných výrobků po pasterizaci prostřednictvím špinavého vybavení, dopravních vozíků nebo ze špinavých rukou a bot zaměstnanců. Fyzikální kontaminace je obvykle způsobena poškozením obalů a náčiní, do výrobku se tak mohou dostat úlomky plastů, lepenky, kovů nebo skla. Chemická kontaminace nejčastěji pochází z čistících a dezinfekčních prostředků, které nebyly dokonale opláchnuty vodou [50].

3.5 Startovací kultury při zpracování mléka

Startovací kultury jsou při výrobě mléčných produktů používány k produkci kyseliny mléčné v průběhu fermentace. Enzymy startovacích kultur se také využívají ke zrání sýrů, kdy se účastní procesu proteolýzy a přeměňují aminokyseliny na chuťové látky [51]. Startovací kultury určené k fermentaci je vhodné testovat na dekarboxylázovou aktivitu. Mikroorganismy s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou nejsou vhodné pro použití jako startovacích kultur [22]. Dekarboxyláza pozitivní startovací kultury přispívají ke zvýšeným koncentracím biogenních aminů buď přímou dekarboxylací aminokyselin nebo nepřímo, ovlivněním pH, proteolýzou nebo zvýšením volných aminokyselin [52].

Použitím některých startovacích kultur v technologii výroby sýrů je možné významně snížit koncentraci histaminu, putrescinu a kadaverinu. Použitím *Lactococcus lactis* a *Enterococcus faecalis* dochází k inhibici růstu mikroorganismů produkujících histamin v sýrech, jakož jsou *Lactobacillus buchneri* a *Lactobacillus brevis* [15,24].

4 ODPADNÍ VODY Z MLÉKÁRENSKÉHO PRŮMYSLU

4.1 Vodní zákon

Podle zákona č. 254/2001 Sb., zákon o vodách; je účelem chránit povrchové a podzemní vody, stanovit podmínky pro hospodárné využívání vodních zdrojů a pro zachování i zlepšení jakosti povrchových a podzemních vod, vytvořit podmínky pro snižování nepříznivých účinků povodní a sucha a zajistit bezpečnost vodních děl v souladu s právem Evropských společenství. Účelem tohoto zákona je též přispívat k zajištění zásobování obyvatelstva pitnou vodou a k ochraně vodních ekosystémů a na nich přímo záviselých suchozemských ekosystémů [53].

4.2 Kvalita a množství odpadních vod

Znečištění splašků je závislé na způsobu života obyvatel, životní úrovni a technické vybavenosti domácnosti i obce. Kvalita odpadních vod se klasifikuje pomocí několika ukazatelů. Organické znečištění se hodnotí biochemickou spotřebou kyslíku za 5 dní (BSK_5). Je to rozdíl obsahu kyslíku ve vodě v mg/l v okamžiku odebrání vzorku a za 5 dní. Čím bude tato hodnota vyšší, tím je voda znečištěnější organickými látkami, protože se kyslík spotřeboval biochemickými procesy samočištění vody. BSK_5 je mírou obsahu organických látek těch biologicky rozložitelných oproti $CHSK$ (chemická spotřeba kyslíku), kde se organické znečištění stanovuje titrací chemickým oxidovadlem, a které oxiduje i látky biologicky nerozložitelné. Platí, že $BSK_5 < CHSK$ [54,55].

V odpadních splaškových vodách jsou látky rozpuštěné i nerozpuštěné. Kvalita odpadních látek je poměrně stálá, např. u BSK_5 se pohybuje přibližně v rozmezí 50 – 70 g/osobu/den. Koncentrace BSK_5 bývá 150 – 400 mg/l. Nerozpuštěných látek je asi 90 g/osobu/den. V České republice jde zhruba 95 % odpadní vody z domácností do čistíren odpadních vod, díky kterým může být přečištěná voda opět použita [54,55].

4.3 Odpadní vody z průmyslu

Potravinářský průmysl produkuje velké množství odpadů, které zahrnují objemné tuhé odpady, plynné polutanty a odpadní vody. Největším problémem zasahujícím do životního prostředí jsou odpadní vody, které obsahují vysoké koncentrace rozpustných organických látek a suspendovaných pevných látek. V mlékárenském průmyslu se spotřebovává velké množství vody, s čímž přímo souvisí vznik velkého množství odpadních vod. Vysoká spo-

třeba vody v mlékárenství je dána především udržení potřebné úrovně hygieny a čistoty. Přiměřená spotřeba vody, činí přibližně 1 až 5 l vody na kg zpracovaného mléka. Používají se různé technologické postupy, které v průběhu zpracování mléka a výroby sýrů mění charakter a složení odpadní vody [54].

Charakteristika odpadů z některých potravinářských výroby je uvedena v následující tabulce 5. V masném, rybím a drůbežářském průmyslu je největším problémem zpracování odpadu s vysokým obsahem bílkoviny a tuku. Odpadní vody z potravinářství se zpracováním ovoce a zeleniny zase obsahují velké množství suspendovaných pevných látek [54].

Tab. 5: Charakteristika odpadů z potravinářských výroby [56]

Odpad	Parametry kontaminace [mg/l]			
	BSK ₅	SL	Bílkoviny	Tuky
Mlékárenství	1 000 – 4 000	1 000 – 2 000	6 – 82	30 - 100
Rybný průmysl	500 – 2 500	100 – 1 800	300 – 1 800	100 – 800
Zpracování ovoce	1 200 – 4 200	2 500 – 6 700	-	-
Masný průmysl	1 000 – 6 500	100 – 1 500	350 – 950	15 – 600
Drůbežářský průmysl	200 – 1 500	75 – 1 100	300 – 650	100 – 400
Zpracování zeleniny	1 000 – 6 800	100 – 4 000	-	-
Komunální odpad	100 – 300	100 – 500	150 – 530	0 – 40

Poznámka: BSK₅ = biologická spotřeba kyslíku za 5 dní – obsah biologicky rozložitelných organických látek v odpadních vodách; SL = celkový obsah suspendovaných pevných látek v roztoku.

U nečištěných odpadních vod se pohybuje průměrná hodnota BSK v rozmezí od 0,8 do 2,5 kg BSK/t mléka. Dalšími kontaminanty v odpadní vodě z mlékárenského průmyslu jsou dusík, fosfor a chloridy. V těchto odpadních vodách se z kontaminovaných materiálů a výrobních procesů objevují také patogenní mikroorganismy [54,56].

Mezi významné patogenní mikroorganismy, které způsobují, vážné infekční onemocnění patří *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli*, *Legionella* spp., améby a další prvoci [54].

Mycí a oplachové vody z výrobních procesů tvoří největší podíl odpadních vod. Během provozu přejde do odpadních vod až 1,5 % produktu (mléka), celkové ztráty mléka dosahují až 4 %. K těmto ztrátám dochází při čištění mléka, během provozu při spouštění, vypouštění, odstavování nebo při úplných změnách provozu [54].

Cílem práce s odpadními vodami v mlékárenském průmyslu je odstranit pevné podíly, kontaminanty a všechny patogeny, aby se mohla dále využívat v provozu. Nejúčinnější je podle dostupných technologií v průmyslu potravin kombinace fyzikální separace a aerobního či anaerobního biologického čištění [54,58].

4.3.1 Odpady z produkce a zpracování mléka

Pro hospodárné využití vody v mlékárenském průmyslu by měla být spotřeba vody přibližně 3 litry na 1 litr mléka. Z přijatého mléka odchází do odpadních vod průměrně 1 %.

Při zpracování mléka vznikají 3 typy odpadních vod:

- syrovátka, která je tekutým odpadem při výrobě mléčných produktů (lze ji použít v původním stavu na pití nebo pro přípravu nápojů),
- chladicí vody, které jsou neškodné a lze je recyklovat,
- mycí a oplachové vody, které jsou velmi znečištěny zbytky mléka a mléčnými výrobky [69].

4.4 Charakter odpadní vody

Charakter odpadních vod z mlékárenství závisí na průtoku vypouštěné odpadní vody, který během dne kolísá a na hodnotě pH, která je stejně jako průtok během dne proměnlivá. Pokud se používá kyselina dusičná nebo pokud má surová voda vysoký obsah dusičnanů, může být v odpadních vodách vysoká koncentrace dusíku. Běžně se k čištění při výrobě využívá kyselina fosforečná, která má za následek zvýšení obsahu fosforu v odpadních vodách [54,56].

4.4.1 Mikrobiální charakter a indikátorové bakterie

Podle koncepce indikátorových organismů, jejichž výskyt ve vodách je odrazem mikrobiologické kvality vod, existují 2 skupiny běžně stanovovaných indikátorů: indikátory organického znečištění a indikátory fekálního znečištění [59,60,61,62].

4.4.1.1 Indikátory organického znečištění

Indikátory organického znečištění jsou organotrofní mikroorganismy, které zahrnují bakterie, kvasinky a plísňe. Tato skupina mikroorganismů je schopná růstu při definované teplotě na obohacených neselektivních půdách bez inhibičního účinku selektivních činidel. Z hygienického hlediska se nejedná o závažné mikroorganismy. Přítomnost těchto orga-

nismů ve vodách určuje celkové mikrobiální oživení a odpovídá míře znečištění vodního zdroje rozložitelnými organickými látkami. Řadíme zde mikroorganismy rostoucí na definovaných neselektivních půdách při 20 – 37 °C [59,62,63,64]. Nejčastěji se jedná o zástupce rodu *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* a zástupce enterobakterií a vibrií [59,65].

Dle české legislativy jsou rozděleny do tří skupin [59,62]:

- Psychofilní bakterie – organotrofní bakterie s růstovým optimem kolem 20 °C, které vytvářejí kolonie na neselektivním živném médiu (masopeptonový agar) po inkubaci po dobu 3 dnů [ČSN 75 7842].
- Mezofilní bakterie – organotrofní bakterie, které mají optimum růstu na definovaném neselektivním živném médiu při teplotě 37 °C a tvoří kolonie po 2 dnech [ČSN 75 7841].
- Kultivovatelné mikroorganismy – bakterie, kvasinky a plísně, které se množí nejlépe při teplotě 22 °C a 36 °C a na definovaném kultivačním médiu (tryptonový agar s kvasničným extraktem) tvoří kolonie po 3 dnech [ČSN EN ISO 6222].

4.4.1.2 Indikátory fekálního znečištění

Mikroorganismy, které řadíme mezi indikátory fekálního znečištění, by měly splňovat následující znaky: nepatogenitu, vysokou početnost v exkrementech teplokrevných živočichů, snadnou stanovitelnost, nemnožit se ve vodě, přetrvávat ve vodě minimálně stejně dlouhou dobu jako patogeny, být rezistentní k dezinfekčním činidlům a vlivům okolního prostředí podobně jako střevní patogeny [59,60].

Dle české legislativy jsou rozděleny do čtyř skupin [59]:

- Koliformní bakterie – gramnegativní tyčinky, které mají negativní cytochromoxidázový test a za aerobních podmínek tvoří kolonie během 1 dne kultivace při 36 °C na selektivním diferenačním médiu s laktózou za současné tvorby kyselin nebo aldehydu [TNV 75 7837]. Do této skupiny patří bakterie rodu *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* a *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* a *Rahnella* [59].
- Termotolerantní koliformní bakterie – gramnegativní tyčinky netvořící spóry, s negativním cytochromoxidázovým testem, které tvoří za aerobních podmínek kolonie během 1 dne kultivace při 44 °C na selektivním diferenačním médiu s laktózou

za současné tvorby kyselin nebo aldehydu [TNV 75 7835]. Do této skupiny patří bakterie rodu *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* a *Enterobacter* [59].

- Intestinální enterokoky – grampozitivní fakultativně anaerobní koky s negativní katalázou, které rostou i při zvýšené teplotě (45 °C), zvýšené koncentraci solí (6,5 %) a žluči (40 %) a vysokém pH (9,6) [59,64]. Jsou odolnější vůči vysušení a dezinfekci, ale ve vodách jsou citlivější vůči vlivům okolního prostředí než koliformy a málokdy se zde pomnožují [59,67].
- *Clostridium perfringens* – grampozitivní, anaerobní bakterie. Přítomné v trávicím traktu živočichů, v půdě či odpadní vodě. Průkaz klostridií bývá považován za indikaci možného výskytu parazitických prvoků a střevních virů [59].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla izolace bakterií ze vzorků odpadních vod mlékárenského průmyslu. U těchto izolovaných bakterií popsat morfologii, identifikovat bakterie pomocí MALDI/TOF, provést screening dekarboxylázové aktivity na kultivačním médiu s jednotlivými aminokyselinami (argininem, fenylalaninem, histidinem, lysinem, ornitinem, tryptofanem, tyrosinem). Následně pomocí metody HPLC – UV/Vis analyzovat jednotlivé biogenní aminy produkované těmito bakteriemi. Odběr vzorků odpadních vod probíhal ve dvou ročních obdobích, cílem této práce je také zjistit, jaký vliv má teplota na přítomnost bakterií a kolik dusitanů, dusičnanů, fosforečnanů a proteinů obsahují vzorky odpadní vody.

6 POUŽITÝ MATERIÁL

6.1 Přístroje a pomůcky

- Autokláv SANOclav, Robert Bosch
- Centrifuga ROTANTA 460 R, Schoeller
- Spektrofotometr Spekol 11, Carl Zeiss Jena
- Spektrofotometr Tecan Infinite M200 PRO, Schoeller
- Termostat, Biological Thermostat BT 120, Memmert
- Kombinovaná ISE elektroda, pH Electrode SenTix 41D
- Odparka Digital Dry Bath NK 200-1B, Hangzhon Miu Instruments
- Dusíková bomba UN 1066, GA 221, Linde
- Třepačka LT2, Verkon
- Chromatografický systém Dionex HPLC UltiMate 3000, s detektorem Thermo-FisherScientific, Waltham a s kolonou Agilent, Paolo Alto + software Clarity™ Lite a Chromeleon™ 6.8
- MALDI/TOF MS Bruker Daltonik Biotyper Microflex
- Automatické pipety, Hirschmann Laborgeräte
- Analytické váhy, Adventurer Pro type AV513 CM, Schoeller
- Váhy, Kern 440-45N
- Mikroskop, CX41 (Olympus)
- Vortex, Heidoplph REAX
- pH metr, pH Spear Waterproof, Double Junction
- OXItest, PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.
- Mikrotitrační destičky, skleněné zkumavky, Eppendorfovy zkumavky, umělohmotné kličky, umělohmotné hokejky, Petriho misky

6.2 Chemikálie

- Pro stanovení dusičnanů: oktadekahydrát síranu hlinitého (LachNer), dusičnan draselný (LachNer).
- Pro stanovení dusitanů: sulfanilová kyselina (LachNer), hydrogensíran draselný (EuroChem), dihydrochlorid*N*-(1-naftyl)-ethylendiamin (NED) (EuroChem).

- Pro stanovení fosforečnanů: dihydrogenfosforečnan draselný (LachNer), kyselina sírová (EuroChem), molybdenan amonný (Penta), vinan antimonylo-draselný (Penta), kyselina askorbová (Penta).
- Pro stanovení proteinů: Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich), kyselina fosforečná (Penta), Bovine Serum Albumine (Sigma Aldrich).
- Pro přípravu živných pūd: masopeptonová živná pūda (MPA), M.R.S. živná pūda, M17 živná pūda, živná pūda Brain Heart Infusion (BHI), Endova živná pūda (ENDO), Sabouradova živná pūda (SAB) a Slanetz-Bartleyho živná pūda (SB) (HiMedia).
- Pro přípravu masopeptonového bujónu = MPB: masový výtazek (HiMedia), pepton (HiMedia), chlorid sodný = NaCl (LachNer).
- Pro přípravu bujónu ke stanovení dekarboxylázové aktivity: masový výtazek (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).
- Pro stanovení BA pomocí HPLC: dansylchlorid (Sigma Aldrich), aceton (Honeywell), prolin (Merck), heptan (Honeywell) a acetonitril (Sigma Aldrich).
- Ostatní použité chemikálie: peroxid vodíku (LachNer), glycerol a aminokyseliny: Arginin, Histidin, Fenylalanin, Lysin, Ornitin, Tyrosin a Tryptofan (HiMedia).

7 ODBĚR VZORKŮ

Celkem bylo odebráno 10 vzorků odpadních vod mlékárenského průmyslu (z různých částí provozu, viz kapitola 7.1), ze kterých byly následně izolovány jednotlivé bakterie. Odběr vzorků do sterilních vzorkovnic byl proveden 13. července 2017 (letní odběr) a 15. listopadu 2017 (podzimní odběr). Vzorky byly po odběru ponechány v chladničce při 5 °C a během následujících tří dnů zpracovány.

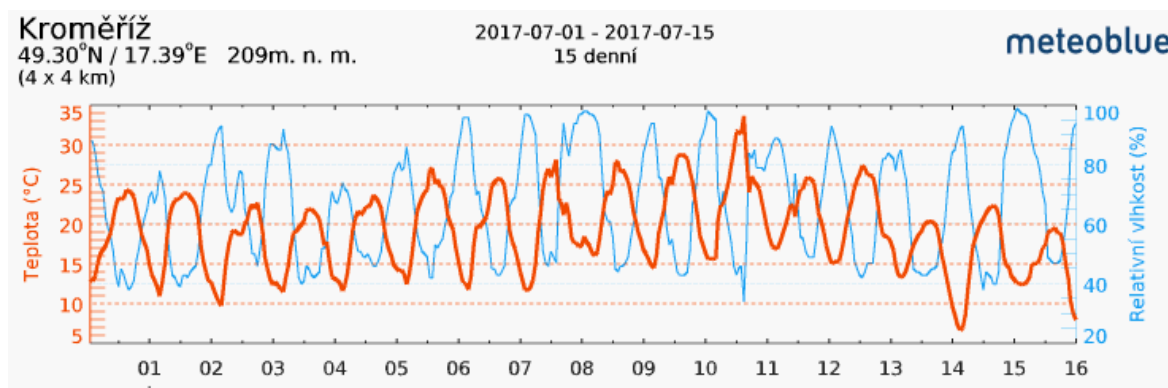
7.1 Charakter odebíraných vzorků odpadní vody

Vzorky odpadní vody byly odebrány z mlékárny sídlící ve Zlínském kraji. Mlékárna v současné době vyrábí především čerstvé sýry, krémové tvarohové sýry, terminované smetanové sýry, polotvrdé sýry typu eidam a gouda a v doplňkovém programu také roztíratelné tavené sýry. Denní příjem mléka pro výrobu sýrových specialit je cca 25 000 litrů [70].

7.1.1 Letní odběr

Dne 13. července 2017 bylo odebráno celkem 5 vzorků odpadní vody. Vzorek A z oplachové vody v tavírně. Vzorek B z oplachové vody formiček pro výrobu čerstvých sýrů (teplá voda). Vzorek C z oplachové vody u krémových sýrů typu žervé. Vzorek D byl odebrán z venkovního kanálu a vzorek E ze sýrárny (tzv. syrovátka).

Jak je patrné z grafu (Obr. 6), týden před odběrem panovaly vysoké denní teploty, a to v průměru od 25 do 34 °C.

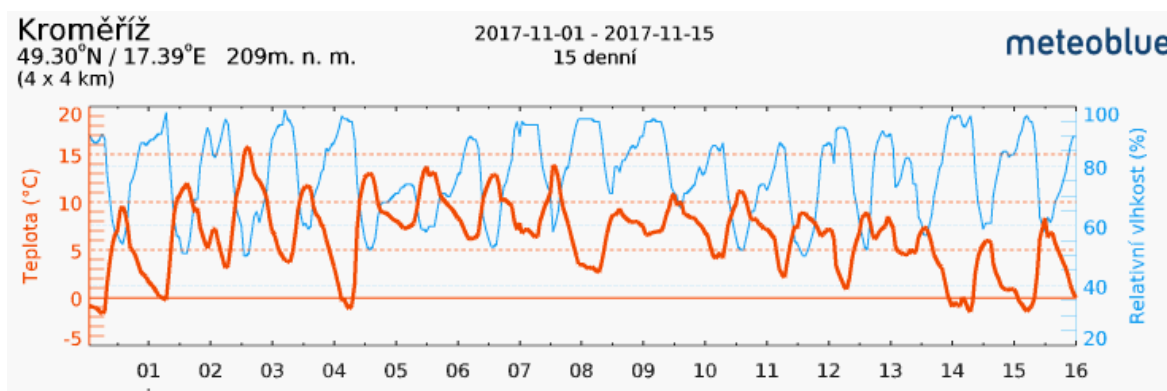


Obr. 6: Vývoj teplot v Kroměříži v období od 1. do 15. července 2017 [71]

7.1.2 Podzimní odběr

Dne 15. listopadu 2017 bylo odebráno, stejně jako v letním odběru, celkem 5 vzorků odpadní vody. Vzorek F z oplachové vody specialit (tavené a terminované sýry). Vzorek G z oplachové vody formiček pro výrobu čerstvých sýrů (teplá voda). Vzorek H z oplachové vody u krémových sýrů typu žervé. Vzorek I byl odebrán z venkovního kanálu a vzorek J z oplachové vody z výroby tvarohu.

Druhý odběr se uskutečnil především z důvodu srovnání mikrobiálního oživení v odpadních vodách při vyšších a nižších denních teplotách. Na rozdíl od vysokých teplot, které panovaly v červenci 2017, se v listopadu 2017 pohybovaly teploty týden před odběrem v rozmezí od 2 °C do 14 °C (Obr. 7).



Obr. 7: Vývoj teplot v Kroměříži v období od 1. do 15. listopadu 2017 [72]

8 PRACOVNÍ POSTUPY

8.1 Spektrofotometrické stanovení dusitanů

8.1.1 Princip

Dusitany přítomné ve vzorku reagují s kyselinou sulfanilovou za vzniku diazoniové soli. Ta je následně kopulována s *N*-(1-naftyl)-ethylendiaminem (NED) za vzniku červeně zbarveného produktu vhodného k fotometrickému stanovení. Intenzita vzniklého zbarvení je úměrná koncentraci dusitanů ve vzorku [73].

8.1.2 Použité roztoky a kalibrace

Diazotační roztok: Do 250ml odměrné baňky bylo převedeno 0,865 g sulfanilové kyseliny, 6,8 g hydrogensíranu draselného a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Kopulační roztok: Do 100ml odměrné baňky bylo převedeno 0,040 g dihydrochloridu *N*-(1-naftyl)-ethylendiaminu (NED) a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Zásobní roztok dusitanů o koncentraci $c = 800 \text{ mg/l}$: Do 100ml odměrné baňky převedeno 0,08 g KNO_2 a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Pracovní roztok dusitanů o koncentraci $c = 8 \text{ mg/l}$: Pracovní roztok byl připraven ze zásobního roztoku o koncentraci dusitanů $c = 800 \text{ mg/l}$. Byl odpipetován 1 ml zásobního roztoku dusitanů o $c = 800 \text{ mg/l}$ do 100ml odměrné baňky a tato byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Byla vytvořena kalibrační řada standardů dusitanů o koncentraci 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 mg/l dle tabulky 6.

Tab. 6: Příprava kalibračních standardů pro stanovení dusitanů

Standard	$V_{\text{PRAC.ROZTOKU}} [\text{ml}]$	$V_{\text{H}_2\text{O}} [\text{ml}]$	$c_{\text{standu.}} [\text{mg/l}]$
1	0	50	0
2	1,25	48,75	0,2
3	2,5	47,5	0,4
4	3,75	46,25	0,6
5	5	45	0,8

8.1.3 Příprava reakční směsi

Do 25ml odměrné baňky bylo nadávkováno buď 15 ml příslušného standardu (0, 0,2, 0,4, 0,6 a 0,8 mg/l) pro kalibraci nebo 15 ml vzorku odpadní vody pro konkrétní stanovení a bylo přidáno 1,5 ml diazotačního roztoku. Baňka byla promíchána a nechala se 10 minut stát. Poté bylo přidáno 1,5 ml kopulačního roztoku, promícháno a 20 minut se nechaly roztoky dovybarvit. Po 20ti minutách byla baňka doplněna po rysku destilovanou vodou. Absorbance byla měřena na spektrofotometru při 550 nm.

8.2 Potenciometrické stanovení dusičnanů

8.2.1 Princip

Pro stanovení koncentrace dusičnanů ve vodných roztocích se používá jednoduchá, ale přesná metoda s využitím potenciometrického měření s kombinovanou dusičnanovou iontově selektivní elektrodou (ISE). Ke kvantitativní stanovení je možné využít metodu kalibrační závislosti: $U = f(pX)$, kde $pX = -\log c(\text{NO}_3^-)$ [74].

8.2.2 Použité roztoky a kalibrace

Vyluhovací roztok: 10 g/l $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$

Kalibrační roztok KNO_3 o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/l: Do 50ml odměrné baňky bylo převedeno 0,0506 g KNO_3 a doplněno po rysku vyluhovacím roztokem.

Kalibrační roztok KNO_3 o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l: Z kalibračního roztoku o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/l bylo odebráno 5 ml do 50ml odměrné baňky a doplněno po rysku vyluhovacím roztokem.

Následujícím způsobem byl připraven kalibrační roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l a kalibrační roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l – vždy bylo odpipetováno 5 ml z předcházejícího kalibračního roztoku do 50ml odměrné baňky a doplněno po rysku vyluhovacím roztokem. Kalibrační roztoky byly měřeny pomocí kombinované dusičnanové elektrody ISE, kdy bylo zaznamenáváno elektromotorické napětí článku. Elektroda byla vždy řádně opláchnuta destilovanou vodou.

8.3 Spektrofotometrické stanovení fosforečnanů

8.3.1 Princip

Fosforečnany reagují v prostředí kyseliny sírové v přítomnosti antimonitých iontů s molybdenanem amonným za vzniku kyseliny molybdátofosforečné. Následně přechází žlutý komplex redukcí kyselinou askorbovou na roztok fosfomolybdenanové modři [75].

8.3.2 Použité roztoky a kalibrace

Zásobní roztok KH_2PO_4 o koncentraci $c = 500 \text{ mg/l}$: Do 100ml odměrné baňky bylo převedeno 0,05 g KH_2PO_4 a doplněno po rysku destilovanou vodou.

Pracovní roztok KH_2PO_4 o koncentraci $c = 25 \text{ mg/l}$: Ze zásobního roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného bylo odpipetováno 5 ml do 100ml odměrné baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou.

Směsný roztok: 75 ml kyseliny sírové o $c = 9 \text{ mol/l}$ + 25 ml roztoku molybdenanu amonného (3,25 g molybdenanu amonného rozpuštěného ve 25 ml vody) + 25 ml roztoku vinanu-antimonylo-draselného (0,0875 g vinuantimonylo-draselného ve 25 ml vody)

10% roztok kyseliny askorbové: 10 g kyseliny askorbové rozpuštěné ve 100ml baňce a doplněno po rysku vodou.

Byla vytvořena kalibrační řada standardů fosforečnanů o koncentraci 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 a 1 mg/l dle tabulky 7.

Tab. 7: Příprava kalibračních standardů pro stanovení fosforečnanů

Standard	$V_{\text{PRAC.ROZTOKU}} [\text{ml}]$	$V_{\text{H}_2\text{O}} [\text{ml}]$	$c_{\text{standu.}} [\text{mg/l}]$
1	0	50	0
2	0,4	49,6	0,2
3	0,8	49,2	0,4
4	1,2	48,8	0,6
5	1,6	48,4	0,8
6	2	48	1

8.3.3 Příprava reakční směsi

Pro kalibraci: 40 ml standardu + 1 ml 10% kyseliny askorbové + 2 ml směsného roztoku – do 50ml odměrné baňky, doplněno po rysku destilovanou vodou a ponecháno 15 minut stát.

Pro vzorky: 40 ml vzorku + 1 ml 10% kyseliny askorbové + 2 ml směsného roztoku – do 50ml odměrné baňky, doplněno po rysku destilovanou vodou a ponecháno 15 minut stát. Absorbance byla měřena na spektrofotometru při 698 nm.

V některých vzorcích byla koncentrace fosforečnanů výrazně vyšší, než byl nejvyšší bod kalibrace. Z tohoto důvodu bylo potřeba vzorky vhodně naředit. Korekční faktory ředění byly ve finále následující: vzorek B (800), vzorek C (400), vzorek D (40), vzorek E (2400), vzorek F (40), vzorek I (40) a vzorek J (80).

8.4 Stanovení proteinů dle Bradfordové

8.4.1 Princip

Metoda je založená na interakci proteinů s Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) v kyselém prostředí. Při navázání CBB na protein se mění barva roztoku z červeno-hnědé na modrou, za změnu barvy jsou zodpovědné převážně některé bazické aminokyseliny v polypeptidovém řetězci – jde o lysin, arginin a histidin. Dochází k posunu absorpčního maxima ze 465 nm na 610 nm, přičemž nejvyšší rozdíl absorpčních maxim jednotlivých forem CBB je při 595 nm (ideální vlnová délka pro měření). Volné AMK, peptidy a nízkomolekulární proteiny s CBB neinteragují [76].

8.4.2 Použité roztoky a kalibrace

Bradfordovo činidlo: 10 mg Coomassie Brilliant Blue bylo rozpuštěno v 5 ml ethanolu, bylo přidáno 10 ml koncentrované kyseliny fosforečné a doplněno do 100 ml destilovanou vodou.

Standard – zásobní roztok: 150 mg Bovine Serum Albumine (BSA) bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody (koncentrace 15 mg/ml).

Pracovní roztok o koncentraci 1,5 mg/ml: Byl odpipetován 1 ml zásobního roztoku do 10ml odměrné baňky a po rysku doplněno destilovanou vodou.

Do Eppendorfových zkumavek bylo připraveno 8 kalibračních standardů (2x vedle sebe) dle tabulky 8.

Tab. 8: Příprava kalibračních standardů pro stanovení proteinů dle Bradfordové

Standard	V _{PRAC.ROZTOKU} [μl]	V _{H₂O} [μl]	c _{standu.} [μg/ml]	c _{finalní} [μg/ml]
1	0	100	0	0
2	2,09	97,9	31,25	3,125
3	4,17	95,83	62,5	6,25
4	8,33	91,67	125	12,5
5	16,67	83,33	250	25
6	33,33	66,67	500	50
7	66,67	33,33	1000	100
8	100	0	1500	150

Do mikrotitrační destičky bylo z Eppendorfových zkumavek pipetováno 20 μl příslušných standardů (standard 1-8) nebo vzorků (vzorek A-J, negativní kontrola, pozitivní kontrola), vše bylo připraveno v tripletu.

Do každé jamky ke každému standardu a vzorku bylo přidáno 180 μl Bradfordova činidla. Inkubace při pokojové teplotě trvala 5 minut. Absorbance byla měřena při vlnové délce 595 nm.

8.5 Mikrobiologické zpracování vzorků odpadní vody

8.5.1 Příprava živných půd

Celkem bylo do Petriho misek připraveno 7 typů pevných živných půd. Jako univerzální růstové médium byl použit masopeptonový agar (MPA). Pro zjištění přítomnosti bakterií rodu *Lactobacillus* byla použita diagnostická půda M.R.S. (MRS). Použití diagnostické půdy M17 bylo zvoleno pro detekci mléčných streptokoků a použití diagnostické půdy BHI pro stanovení patogenních koků. Pro detekci enterobakterií byl zvolen Endův agar (ENDO), pro detekci kvasinek a plísní Sabouraudův agar (SAB) a pro detekci enterokoků živná půda Slanetz-Bartley (SB).

8.5.2 Kultivace

U vzorků A, B, F a G bylo naočkováno vždy po 1000 μl vzorku na všech 7 typů půd a u vzorku C, D, E, H, I a J bylo naočkováno vždy po 100 μl vzorku na všech 7 typů půd.

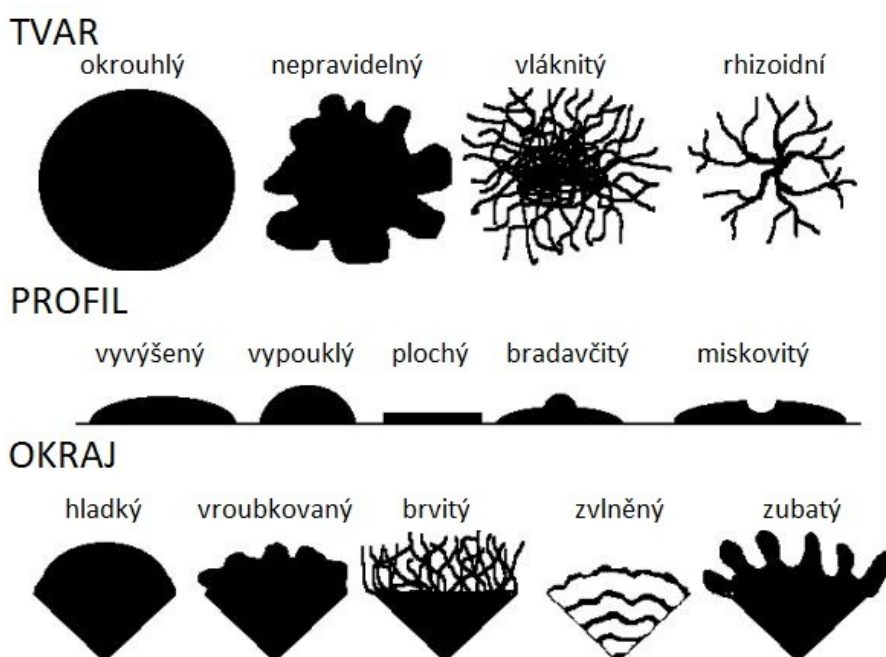
Vzorky byly očkované neředěné, dále pak v ředěních 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} a 10^{-6} .

Kultivace probíhala 48 hodin při 30 °C u živných půd MPA, MRS, M17, BHI, ENDO a SB. U živné půdy SAB probíhala kultivace taktéž 48 hodin, ale při teplotě 25 °C.

8.6 Charakteristika izolovaných bakteriálních kolonií

8.6.1 Makroskopická charakteristika bakteriálních kolonií

Na živných půdách byly charakterizovány makroskopické morfologické znaky kolonií (Obr. 8), které jsou patrné okem. Mezi tyto znaky řadíme barvu, velikost, tvar, okraj a profil kolonií.



Obr. 8: Makroskopická charakteristika bakteriálních kolonií [12]

8.6.2 Mikroskopická charakteristika bakteriálních kolonií

8.6.2.1 Gramovo barvení

Gramovo barvení je diagnostická metoda, která se používá k rozdělení bakterií na dvě skupiny – grampozitivní barví se modře a gramnegativní barví se červeně. Fixovaný preparát na podložním sklíčku se barví nejprve krystalovou violetí a následně Lugolovým roztokem. Pak se diferencuje acetonem. Grampozitivy mají v buněčné stěně tlustou vrstvu peptidoglykanu, která brání vymytí modrého barevného komplexu (komplex krystalová violet' + jód) z buňky acetonem. Gramnegativy mají tenkou vrstvu peptidoglykanu a acetonem se odbarví. Následně se barví zředěným safraninem, který bakterie dobarví červeně [77].

Gramovo barvení bylo provedeno dle následujícího postupu. Nejprve byl preparát na podložním sklíčku zafixován a obarven krystalovou violetí po dobu 60 sekund. Poté byla violet slita a preparát převrstven Lugolovým roztokem. Po uplynutí 60 sekund byl roztok z podložního sklíčka s preparátem slit a následně odbarven ethanolem. Po vymytí veškerého barviva byl preparát omyt destilovanou vodou a dobarven safraninem po dobu 60 sekund. Nakonec byl preparát dokonale opláchnut destilovanou vodou a vysušen. Po vysušení byly preparáty mikroskopovány s použitím imerzního objektivu při zvětšení 1 000x.

8.6.2.2 *Biochemické testy*

Biochemické testování zastupuje katalázový a oxidázový test. Katalázový test je založen na vzniku bublinek kyslíku při rozkladu peroxidu vodíku za působení enzymu katalázy. Uvolňování bublinek kyslíku značí pozitivní reakci a v tomto případě, testovaná bakterie produkuje enzym katalázu. Přítomnost cytochromoxidázy byla testována pomocí proužků s impregnovanou zónou. V případě, že se jedná o pozitivní reakci dochází k barevné reakci *N,N*-dimethyl-1,4-fenylendiaminu s α -naftolem na impregnované zóně proužku [78].

8.7 Identifikace bakterií pomocí metody MALDI/TOF MS

K identifikaci organismů byla použita metoda hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI/TOF MS).

Bakteriální kmeny byly suspendovány ve 150 μ l destilované vody a 450 μ l ethanolu. Takto připravené vzorky byly zamrazeny při -25 °C a poté odeslány na analýzu na přístroji MALDI/TOF MS Bruker Daltonik Biotyper Microflex do Nitry (Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre). Výsledky ve formě hmotnostních spekter byly srovnány se spektry uloženými v databázi Taxonomy.

8.8 Sledování dekarboxylázové aktivity bakterií

Pro sledování dekarboxylázové aktivity izolovaných bakterií byly využity dvě metody. První použitou metodou byla kultivační screeningová metoda na mikrotitračních destičkách, která byla zvolena k rychlému přehledu dekarboxylázové aktivity jednotlivých bakterií. Druhou použitou metodou bylo stanovení produkce biogenních aminů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV/Vis detekcí, která umožňuje detekovat i kvantifikovat jednotlivé biogenní aminy.

8.8.1 Kultivační screeningová metoda

U izolovaných bakteriálních kolonií byla provedena kultivační screeningová metoda dekarboxylázové aktivity na mikrotitračních destičkách. Masopeptonový bujón (MPB) pro kultivaci bakteriálních kmenů byl připraven z 0,93 g masového výtažku; 1,55 g peptonu; 0,93 g NaCl a 310 ml H₂O. pH roztoku bylo upraveno na 6,8 – 7,0. Roztok byl napipetován po 5 ml do zkumavek a sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Do zkumavek s MPB byly následně zaočkovány jednotlivé bakteriální kmeny a kultivovány při 30 °C po dobu 48 hodin.

Do příslušné jamky v mikrotitrační destičce bylo ze zkumavky s MPB a bakteriálním kmenem odebráno 10 µl této suspenze a přidáno 200 µl dekarboxylačního média s jednotlivými aminokyselinami. Dekarboxylační médium bylo připraveno z 0,3 g peptonu; 0,2 g Yeast Extract; 0,7 ml bromkresopurpuru (0,2 % v 50% alkoholu); 0,5 g příslušné L - aminokyseliny (arginin, fenylalanin, histidin, lysin, ornitin, tryptofan a tyrosin) a 100 ml H₂O. pH roztoku bylo upraveno na 5 – 5,3. Takto připravené mikrotitrační destičky byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Při zbarvení roztoku v jamce mikrotitrační destičky z hnědé na fialovou se jedná o pozitivní reakci.

8.8.2 Stanovení biogenních aminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC s UV/Vis detekcí

Stanovení produkce BA metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie bylo nakonec provedeno u všech bakteriálních kmenů, bez ohledu na výsledky screeningu dekarboxylázové aktivity. Masopeptonový bujón s přidavkem aminokyselin (MPB + AMK) pro kultivaci bakteriálních kmenů byl připraven z 6,6 g MPB (3,0 g peptonu; 1,8 g NaCl; 1,8 g BE); 1,2 g příslušné L – aminokyseliny (arginin, fenylalanin, histidin, lysin, ornitin, tryptofan a tyrosin) a 600 ml H₂O. Do 5 ml takto připraveného MPB + AMK byly zaočkovány bakteriální kmeny a kultivovány při 30 °C po dobu 72 hodin. Z této bakteriální suspenze byl odebrán 1 ml, naočkován do 5 ml čerstvého MPB + AMK a opět kultivován při 30 °C po dobu 72 hodin. Poté byla suspenze centrifugována při 20 °C a 5000 RCF po dobu 5 minut. 650 µl této suspenze bylo odebráno do Eppendorfových zkumavek a následně bylo přidáno 650 µl kyseliny chloristé. Takto připravené vzorky byly do doby analýzy zamrazeny na teplotu -70 °C.

Před samotnou analýzou byly vzorky rozmrazeny a dále připraveny na derivatizaci a separaci.

Do derivatizačních nádobek o objemu 16 ml bylo napipetováno 100 μ l vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu o koncentraci 500 mg/l a bylo přidáno vždy po 1 ml vzorku. Do derivatizačních nádobek bylo postupně přidáno 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1 – 11,2 a 2 ml dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu. Po 20 hodinovém třepání v temnu bylo do derivatizačních nádobek přidáno 200 μ l prolinu a opět následovalo třepání, které trvalo 60 minut. Poté byly přidány 3 ml heptanu, který způsobil zřetelné rozdělení na tři vrstvy kapalin. Z horní heptanové vrstvy byl odebrán 1 ml do vialky, který byl odpařen proudem dusíku do sucha při teplotě 60 °C. Po odpaření byly odparky zředěny 1,5 ml acetonitrilu a zamrazeny až do doby analýzy při teplotě -18 °C. Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μ m.

Separace byly provedeny gradientovou elucí (voda/acetonitril) na koloně Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 s parametry 50 x 3,0 mm, pórovitost 1,8 μ m (Agilent, Paolo Alto, USA) při teplotě 30 °C, průtok kolonou byl nastaven na 0,453 ml/min. Chromatografický systém Dionex HPLC UltiMate 3000 byl tvořen odplyňovací jednotkou (degaserem), binární pumpou, autosamplerem, termostatem kolon a UV/VIS detektorem (ThermoFisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA). Detekce probíhala pomocí UV/VIS detektoru při vlnové délce 254 nm. Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru Clarity™ Lite a Chromeleon™ 6.8.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem bylo odebráno 10 vzorků odpadních vod mlékárenského průmyslu. Vzorky A (oplachová voda z tavníny), B (oplachová voda formiček pro výrobu čerstvých sýrů), C (oplachová voda z výroby krémových sýrů typu žervé), D (venkovní kanál) a E (voda ze sýrárny (tzv. syrovátka)) byly odebrány 13. července 2017 (letní odběr) a vzorky F (oplachová voda z výroby specialit (tavené a terminované sýry)), G (oplachová voda formiček pro výrobu čerstvých sýrů), H (oplachová voda z výroby krémových sýrů typu žervé), I (venkovní kanál) a J (oplachová voda z výroby tvarohu) byly odebrány 15. listopadu 2017 (podzimní odběr). Typy vzorků se ve třech případech shodovaly (oplachová voda formiček pro výrobu čerstvých sýrů, oplachová voda z výroby krémových sýrů typu žervé a voda z venkovního kanálu) a ve dvou případech se typy vzorků lišily z důvodu výroby jiných produktů (oplachovou vodu z výroby tavených sýrů na podzim nahradila oplachová voda z výroby specialit a oplachovou vodu ze sýrárny (syrovátka) na podzim nahradila oplachová voda z výroby tvarohu).

U všech 10 vzorků odpadní vody byl stanoven obsah dusitanů, dusičnanů, fosforečnanů a proteinů. Dále byly z těchto vzorků izolovány bakterie a byla popsána jejich morfologie, bakterie byly identifikovány metodou MALDI/TOF, byl proveden screening dekarboxylázové aktivity na kultivačním médiu a následně byla analyzována produkce jednotlivých biogenních aminů pomocí metody HPLC – UV/Vis.

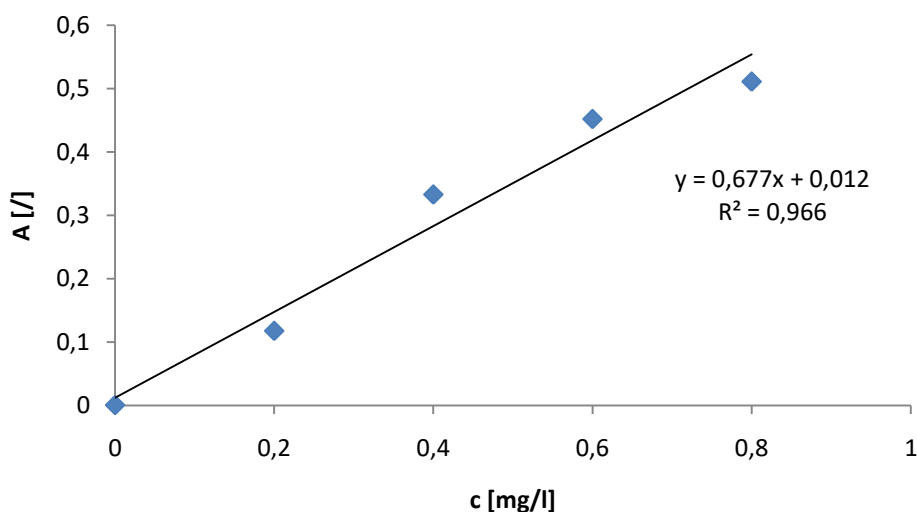
9.1 Spektrofotometrické stanovení dusitanů

Ve vodách byly spektrofotometrickou metodou stanoveny dusitany. Z rovnice kalibrační přímky závislosti koncentrace kalibračních roztoků na jejich naměřené absorbanci byly následně dopočítány koncentrace dusitanů ve vzorcích odpadní vody (vzorky A – J).

9.1.1 Letní odběr

Tab. 9: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků dusitanů při vlnové délce 550 nm (letní odběr)

Standard	$c_{\text{KALIBRAČNÍHO ROZTOKU}} [\text{mg/l}]$	A [·]
1	0	0,001
2	0,2	0,118
3	0,4	0,333
4	0,6	0,452
5	0,8	0,511



Obr. 9: Závislost absorbance na koncentraci dusitanů (letní odběr)

Tab. 10: Stanovení dusitanů v testovaných vzorcích odpadních vod (letní odběr)

Vzorek	1. měření A [l]	2. měření A [l]	Ø A [l]	c _{DUSITANŮ} [mg/l]
A	0,027	0,029	0,028	0,0233
B	0,018	0,018	0,018	0,0086
C	0,362	0,361	0,362	0,5167
D	0,183	0,183	0,183	0,2523
E	0,655	0,661	0,658	0,9539

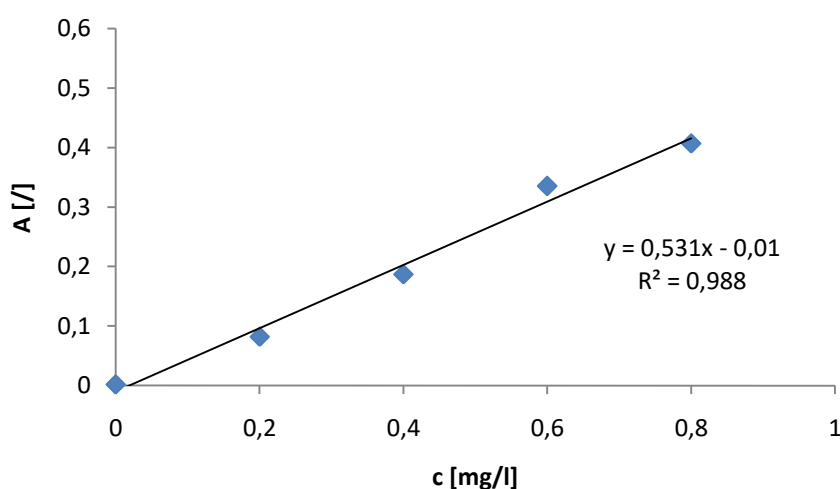
Poznámka: vzorek A = oplach tavírna; vzorek B = oplach formiček; vzorek C = oplach krémové sýry; vzorek D = venkovní kanál; vzorek E = oplach sýrárna (syrovátka)

Dusitany bývají obsaženy ve všech typech vod. Koncentrace dusitanů v podzemních a povrchových vodách je však zpravidla velmi nízká (řádově setiny až desítky mg/l), v odpadních a splaškových vodách poměrně vyšší (řádově jednotky až desítky mg/l). Dusitany se ve vodách vyskytují jako meziprodukt biologických procesů nitrifikace a denitrifikace - znečištění dusitany je většinou spojeno se zvýšeným obsahem dusičnanů (vznikají z nich redukcí), nebo mohou být doprovodným znečištěním amonných iontů [79]. Ve vyhlášce 252/2005 Sb. je pro pitnou vodu povolena maximální koncentrace dusitanů 0,5 mg/l. Nejvyšší koncentraci dusitanů 0,9539 mg/l obsahuje vzorek číslo E (oplach sýrárna). Vyšší hodnota koncentrace dusitanů byla naměřena i u vzorku vody z oplachu u krémových sýrů, a to v koncentraci 0,5167 mg/l. Nicméně i tak se jedná o koncentrace velmi nízké.

9.1.2 Podzimní odběr

Tab. 11: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků dusitanů při vlnové délce 550 nm (podzimní odběr)

Standard	$c_{\text{KALIBRAČNÍHO ROZTOKU}} [\text{mg/l}]$	$A [/]$
1	0	0,002
2	0,2	0,082
3	0,4	0,187
4	0,6	0,335
5	0,8	0,407



Obr. 10: Závislost absorbance na koncentraci dusitanů (podzimní odběr)

Tab. 12: Stanovení dusitanů v testovaných vzorcích odpadních vod (podzimní odběr)

Vzorek	1. měření $A [/]$	2. měření $A [/]$	$\bar{\Delta} A [/]$	$c_{\text{DUSITANŮ}} [\text{mg/l}]$
F	0,036	0,034	0,035	0,0847
G	0,044	0,044	0,044	0,1017
H	0,036	0,040	0,038	0,0904
I	0,799	0,797	0,798	1,5216
J	0,424	0,426	0,425	0,9887

Poznámka: vzorek F = oplach speciality; vzorek G = oplach formiček; vzorek H = oplach krémové sýry; vzorek I = venkovní kanál; vzorek J = oplach tvaroh

Poměrně vysokou hodnotu koncentrace dusitanů obsahuje vzorek I (venkovní kanál), a to 1,5216 mg/l. Vyšší hodnota koncentrace dusitanů byla naměřena i u vzorků vody z oplachu u tvarohu (0,9887 mg/l). Koncentrace dusitanů u vzorků F – J (podzimní odběr) jsou řádově srovnatelné s koncentracemi dusitanů vzorků A – E odebraných při letním odběru.

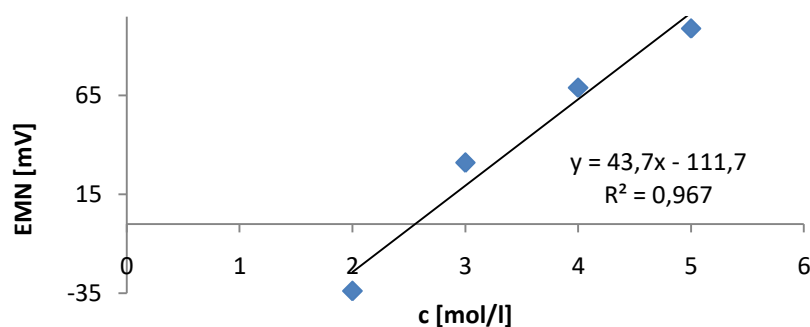
9.2 Potenciometrické stanovení dusičnanů

Stanovení dusičnanů ve vzorcích odpadních vod probíhalo potenciometricky, za použití kombinované dusičnanové iontově selektivní elektrody (ISE). Ze sestavené kalibrační přímky závislosti koncentrace standardů na naměřeném elektromotorickém napětí (EMN) byly dopočítány koncentrace dusičnanů ve vzorcích odpadních vod.

9.2.1 Letní odběr

Tab. 13: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí kalibračních roztoků při potenciometrickém stanovení dusičnanů (letní odběr)

Standard	$c_{\text{KALIBRAČNÍHO ROZTOKU}} [\text{mol/l}]$	EMN [mV]
1	10^{-2}	-034
2	10^{-3}	031
3	10^{-4}	069
4	10^{-5}	099



Obr. 11: Závislost elektromotorického napětí na koncentraci dusičnanů (letní odběr)

Tab. 14: Stanovení dusičnanů v testovaných vzorcích odpadních vod (letní odběr)

Vzorek	EMN [mV]	$\log c_{\text{NO}_3}$ [mol/l]	Molární c_{NO_3} [mol/l]	Hmotnostní c_{NO_3} [mg/l]
A	040	-3,471	$3,38 \cdot 10^{-4}$	20,96
B	027	-3,174	$6,70 \cdot 10^{-4}$	41,54
C	035	-3,357	$4,40 \cdot 10^{-4}$	27,26
D	049	-3,677	$2,10 \cdot 10^{-4}$	13,04
E	022	-3,059	$8,73 \cdot 10^{-4}$	54,13

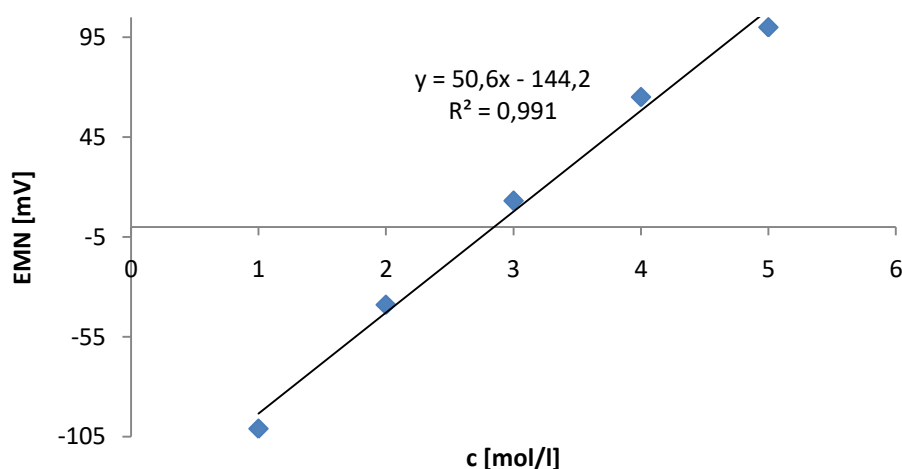
Poznámka: vzorek A = oplach tavírna; vzorek B = oplach formiček; vzorek C = oplach krémové sýry; vzorek D = venkovní kanál; vzorek E = oplach sýrarna (syrovátka)

Dusičnany se stejně jako dusitany vyskytují ve všech typech vod. V čistých přírodních vodách (podzemních i povrchových) jsou obvykle v nízkých koncentracích (řádově jednotky mg/l), v přírodních vodách ze zemědělských oblastí jsou v dnešní době ve vyšších koncentracích (řádově desítky mg/l). Dusičnany jsou konečným produktem rozkladu organicky vázaného dusíku. Větší množství dusičnanů se do vody dostává, jak již bylo zmíněno, při jejich používání v zemědělství ve formě hnojiv a ze znečištění prostředí lidskými a zvířecími výkaly [80]. Ve vyhlášce 252/2005 Sb. je pro pitnou vodu povolena maximální koncentrace dusičnanů 50 mg/l, avšak ve vodě pro kojence je povoleno maximálně 10 mg/l. Nejvyšší koncentrace dusičnanů 54,13 mg/l byla naměřena u vzorku E (voda z oplachu ze sýrárny). Nicméně u všech vzorků (A – E) jsou koncentrace dusičnanů velmi nízké a co se týká jejich obsahu, splňují dokonce i limity pro pitnou vodu.

9.2.2 Podzimní odběr

Tab. 15: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí kalibračních roztoků při potenciometrickém stanovení dusičnanů (podzimní odběr)

Standard	$c_{\text{KALIBRAČNÍHO ROZTOKU}} [\text{mol/l}]$	EMN [mV]
1	10^{-1}	-101
2	10^{-2}	-039
3	10^{-3}	013
4	10^{-4}	065
5	10^{-5}	100



Obr. 12: Závislost elektromotorického napětí na koncentraci dusičnanů (podzimní odběr)

Tab. 16: Stanovení dusičnanů v testovaných vzorcích odpadních vod (podzimní odběr)

Vzorek	EMN [mV]	$\log c_{\text{NO}_3}$ [mol/l]	Molární c_{NO_3} [mol/l]	Hmotnostní c_{NO_3} [mg/l]
F	028	-3,403	$3,95 \cdot 10^{-4}$	24,49
G	041	-3,660	$2,19 \cdot 10^{-4}$	13,58
H	019	-3,225	$5,96 \cdot 10^{-4}$	39,95
I	018	-3,206	$6,22 \cdot 10^{-4}$	38,57
J	017	-3,186	$6,52 \cdot 10^{-4}$	40,43

Poznámka: vzorek F = oplach speciality; vzorek G = oplach formiček; vzorek H = oplach krémové sýry; vzorek I = venkovní kanál; vzorek J = oplach tvaroh

Ve vzorcích z podzimního odběru (vzorky F – J) byly koncentrace dusičnanů, stejně jako u vzorků A – E, velmi nízké. Nejvyšší naměřená hodnota dusičnanů byla 40,43 mg/l. Naměřené hodnoty dusičnanů ve všech vzorcích splňují limity dokonce i pro pitnou vodu (252/2005 Sb.), které jsou 50 mg/l.

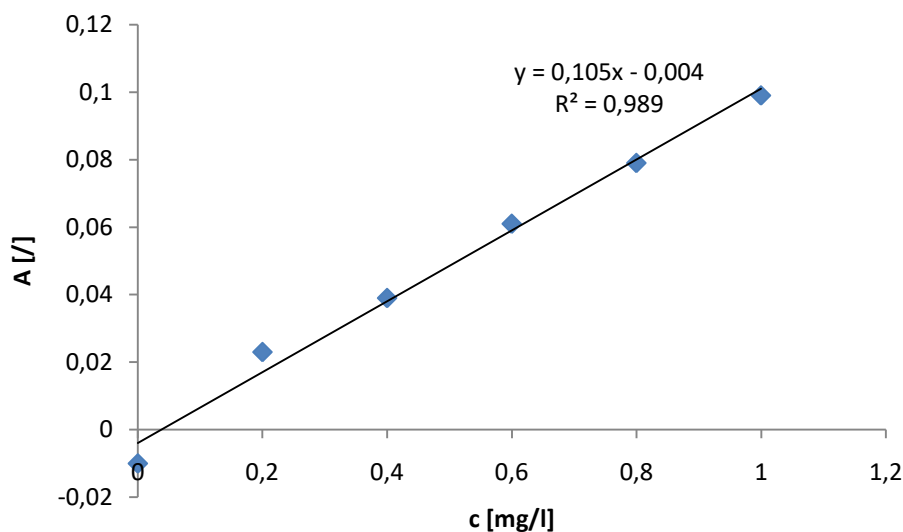
9.3 Spektrofotometrické stanovení fosforečnanů

Stanovení fosforečnanů bylo provedeno, stejně jako stanovení dusitanů, s využitím spektrofotometrické metody, kdy byla sestrojena kalibrační přímka – závislost koncentrace kalibračních roztoků na jejich naměřené absorbanci. Z této kalibrační přímky byly následně dopočítány koncentrace fosforečnanů (po korekci ředění, viz kapitola 8.3.3) ve vzorcích odpadní vody.

9.3.1 Letní odběr

Tab. 17: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků fosforečnanů při vlnové délce 698 nm (letní odběr)

Standard	$c_{\text{KALIBRAČNÍHO ROZTOKU}}$ [mg/l]	A [/]
1	0	-0,010
2	0,2	0,023
3	0,4	0,039
4	0,6	0,061
5	0,8	0,079
6	1	0,099



Obr. 13: Závislost absorbance na koncentraci fosforečnanů (letní odběr)

Tab. 18: Stanovení fosforečnanů v testovaných vzorcích odpadních vod (letní odběr)

Vzorek	A [l]	c [mg/l]	$c(\text{PO}_4^{3-})$ po korekci ředění [mg/l]
A	0,019	0,219	0,22
B	0,017	0,200	160
C	0,093	0,924	36,96
D	0,062	0,629	25,16
E	0,025	0,276	662,40

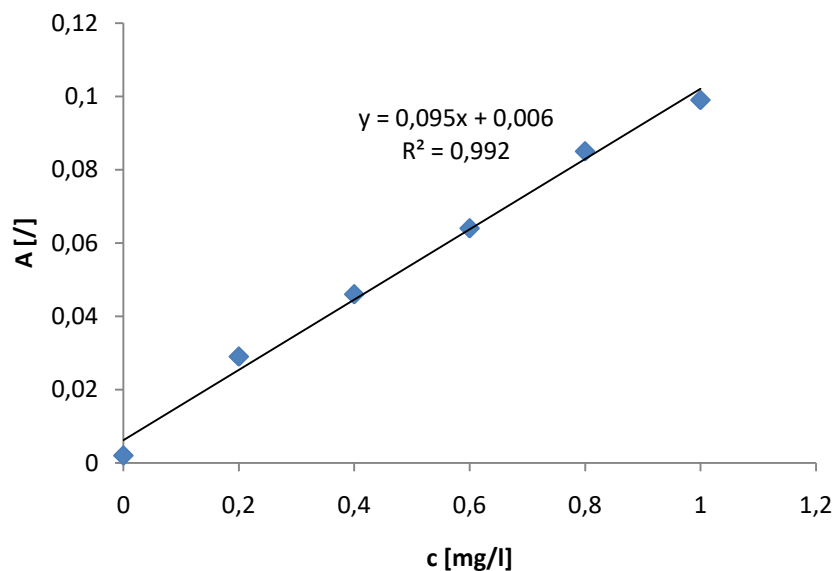
Poznámka: vzorek A = oplach tavírna; vzorek B = oplach formiček; vzorek C = oplach krémové sýry; vzorek D = venkovní kanál; vzorek E = oplach sýrárna (syrovátka)

Pro pitnou vodu je stanoven limit koncentrace fosforečnanů na 3,5 mg/l. Předpokládalo se, že nejvyšší koncentrace fosforečnanů bude nalezena u vzorku vody A z oplachu tavírny z důvodu používání tavicích solí (nejčastěji se používají fosforečnany sodné, difosforečnany a polyfosforečnany) [81], ale právě u vzorku A (oplachová voda z tavírny) byla naměřena nejnižší koncentrace fosforečnanů, a to 0,22 mg/l. Odběr by bylo vhodné zopakovat a provést měření znovu. To se ale bohužel na podzim nepodařilo, neboť mlékárna v tomto období nevyrobila tavené sýry, ale zaměřila se na výrobu tvarohu. U vzorků B – E se koncentrace fosforečnanů pohybovala od 25,16 po 662,40 mg/l. U vzorku E se vysoká koncentrace fosforečnanů dá předpokládat, neboť syrovátka obsahuje až 730 mg/100g fosforu [82].

9.3.2 Podzemní odběr

Tab. 19: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků fosforečnanů při vlnové délce 698 nm (podzemní odběr)

Standard	$c_{\text{KALIBRAČNÍHO ROZTOKU}} [\text{mg/l}]$	A [/]
1	0	0,002
2	0,2	0,029
3	0,4	0,046
4	0,6	0,064
5	0,8	0,085
6	1	0,099



Obr. 14: Závislost absorbance na koncentraci fosforečnanů (podzemní odběr)

Tab. 20: Stanovení fosforečnanů v testovaných vzorcích odpadních vod (podzemní odběr)

Vzorek	A [/]	c [mg/l]	$c(\text{PO}_4^{3-})$ po korekci ředění [mg/l]
F	0,056	0,526	21,04
G	0,081	0,789	0,789
H	0,083	0,811	0,811
I	0,083	0,811	32,44
J	0,058	0,547	43,76

Poznámka: vzorek F = oplach speciality; vzorek G = oplach formiček; vzorek H = oplach krémové sýry; vzorek I = venkovní kanál; vzorek J = oplach tvaroh

Koncentrace fosforečnanů v testovaných vzorcích vody se pohybovala od 0,789 mg/l po 43,76 mg/l. U čerstvých krémových sýrů typu žervé se fosfor běžně vyskytuje do 250 mg/100 g [82].

Stanovení dusitanů, dusičnanů a fosforečnanů bylo provedeno i z toho důvodu, aby bylo zjištěno, kolik těchto sloučenin odpadní vody mlékárenského průmyslu obsahují. Obsah dusíku (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) a fosforu (PO_4^{3-}) ve stojatých a tekoucích vodách je v posledních letech spojován se zvyšováním trofie (úživnosti) povrchových vod.

Eutrofizace je soubor přírodních a uměle vyvolaných procesů vedoucích ke zvyšování obsahu anorganických živin. Všeobecně známým projevem eutrofizace je nárůst vodního květu sinic či vegetačního zbarvení, tvořeného zelenými řasami nebo i rozsivkami, případně některými druhy vyšších rostlin. Umělá eutrofizace je způsobena nejen intenzivní zemědělskou výrobou, ale i některými druhy průmyslových odpadních vod. Fosfor je vedle dusíku základním prvkem výživy sinic a řas. Poměr těchto dvou prvků potřebný pro optimální růst organismů je přibližně 100:1 (N:P). Fosfor jako limitující prvek hraje klíčovou roli v nárůstu řasové biomasy (čím je více fosforu v povrchových vodách, tím nastává větší produkce sinic a řas). Zvýšený obsah fosforečnanů působí komplikace vodárnám, zhoršuje upravitelnost vody [83].

Jak výsledky ukázaly, naměřené koncentrace NO_2^- , NO_3^- a PO_4^{3-} nijak výrazně nepřevyšují ani limity určené pro pitné vody.

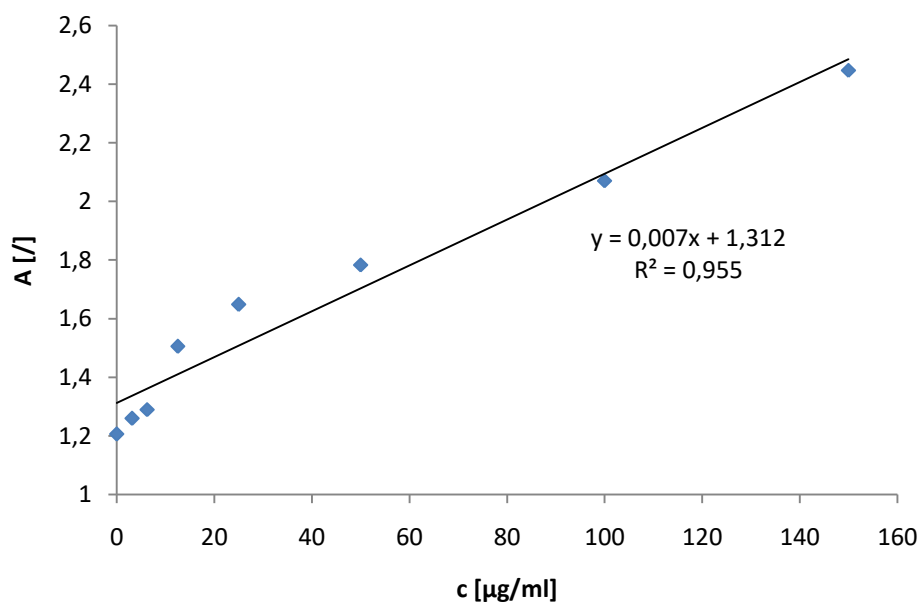
9.4 Stanovení proteinů

Stanovení proteinů probíhalo metodou kolorimetrického stanovení (detekce a kvantifikace celkového obsahu proteinů). Podstatou je interakce proteinů s Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB) v kyselém prostředí. Při navázání CBB na protein vzniká modře zbarvený produkt vhodný k fotometrickému stanovení při vlnové délce 595 nm.

9.4.1 Letní odběr

Tab. 21: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků proteinů při vlnové délce 595 nm (letní odběr)

Standard	$c_{\text{KALIBRAČNÍHO ROZTOKU}} [\mu\text{g/ml}]$	A []
1	0	1,207
2	3,125	1,260
3	6,25	1,290
4	12,5	1,506
5	25	1,649
6	50	1,783
7	100	2,071
8	150	2,448



Obr. 15: Závislost absorbance na koncentraci proteinů (letní odběr)

Tab. 22: Stanovení proteinů v testovaných vzorcích odpadních vod (letní odběr)

Vzorek	A [/]	$c_{\text{PROTEINŮ}}$ [$\mu\text{g/ml}$]
A	1,1625	ND
B	1,2066	ND
C	1,2003	ND
D	1,2038	ND
E	2,3053	127,269

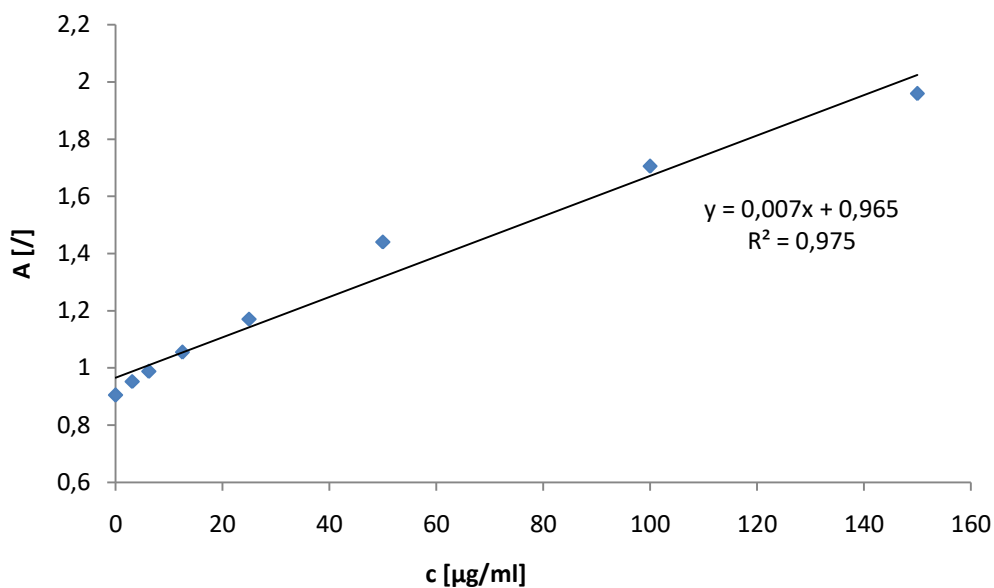
Poznámka: vzorek A = oplach tavárna; vzorek B = oplach formiček; vzorek C = oplach krémové sýry; vzorek D = venkovní kanál; vzorek E = oplach sýrárna (syrovátka); ND = nedetekováno

U vzorku E (syrovátka) bylo stanoveno množství proteinů na 127,269 $\mu\text{g/ml}$. Nejvyšší množství proteinů se předpokládalo právě u vzorku E (syrovátky). Syrovátka obsahuje velké množství proteinů, úpravou vznikají biologicky kvalitní syrovátkové proteinové prášky s vysokým obsahem BCAA (izoleucin, leucin a valin), stejně tak i biologicky aktivní mikrofrakce – α -laktalbumin, glykomakropeptidy, imunoglobuliny, laktoferin nebo laktoperoxidáza [84]. U ostatních vzorků vody (A – D) nebyla přítomnost proteinů detekována.

9.4.2 Podzimní odběr

Tab. 23: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků proteinů při vlnové délce 595 nm (podzimní odběr)

Standard	$c_{\text{KALIBRAČNÍHO ROZTOKU}}$ [$\mu\text{g/ml}$]	A [/]
1	0	0,905
2	3,125	0,952
3	6,25	0,988
4	12,5	1,055
5	25	1,171
6	50	1,440
7	100	1,705
8	150	1,959



Obr. 16: Závislost absorbance na koncentraci proteinů (podzemní odběr)

Tab. 24: Stanovení proteinů v testovaných vzorcích odpadních vod (podzemní odběr)

Vzorek	A [I]	$c_{\text{PROTEINŮ}}$ [$\mu\text{g/ml}$]
F	1,6502	97,886
G	0,7106	ND
H	0,6542	ND
I	0,8240	ND
J	1,2237	36,957

Poznámka: vzorek F = oplach speciality; vzorek G = oplach formiček; vzorek H = oplach krémové sýry; vzorek I = venkovní kanál; vzorek J = oplach tvaroh; ND = nedetekováno

U vzorku F (oplach speciality) byla naměřena nejvyšší koncentrace proteinů, a to 97,886 $\mu\text{g/ml}$. Vzorek vody z oplachu tvarohu (vzorek J) obsahoval 36,957 $\mu\text{g/ml}$ proteinu.

U vzorků G, H a I nebyly proteiny detekovány.

9.5 Charakteristika izolovaných kolonií

9.5.1 Makroskopické morfologické znaky

9.5.1.1 Letní odběr

Pro vzorek A (oplach tavírna) bylo naočkováno celkem 16 misek: 2x MPA (kultivace při 25 °C a 30 °C), M17 (30 °C), MRS (30 °C), BHI (30 °C), ENDO (30 °C), SB (30 °C), SAB (25 °C) = sada 8 misek pro jedno ředění. Vzorek A byl očkovan ve dvou ředěních, a to 1 ml neředěného vzorku (10^0) a 1 ml vzorku z prvního ředění (10^{-1}).

Charakteristika narostlých kolonií je uvedena v tabulce v příloze 1. U neředěných vzorků na živné půdě MPA, M17, MRS a BHI došlo k přerostení celé Petriho misky povlakem a jednotlivé kolonie byly nepočítatelné. Na univerzální půdě MPA při ředění 10^{-1} narostlo 153 béžových kolonií o průměru 0,2 mm. Na živné půdě M17 narostly tři druhy kolonií, které pravděpodobně patří mezi mléčné streptokoky. Na diagnostické půdě MRS pro stanovení bakterií rodu *Lactobacillus* po kultivaci narostly mléčné kolonie o velikosti průměru 0,4 mm. Při ředění 10^{-1} se na diagnostické půdě BHI objevily tři druhy kolonií o průměru od 0,8 mm do 2 mm. Naopak u Endova agaru pro detekci enterobakterií se žádné kolonie neobjevily. 55 kolonií mléčné barvy narostlo na SB diagnostické živné půdě pro enterokoky. Petriho miska se SAB živnou půdou byla bohatě porostena plísněmi a čtyřmi druhy kolonií různých barev (bílé, béžové, žluté a oranžové). Nejčastěji se objevovaly kolonie okrouhlého tvaru s hladkým okrajem a vypouklým profilem.

Pro vzorek B (oplach formiček - teplá) bylo naočkováno celkem 16 misek: 2x MPA (pro 25 °C a 30 °C), M17 (30 °C), MRS (30 °C), BHI (30 °C), ENDO (30 °C), SB (30 °C), SAB (25 °C) = sada 8 misek pro jedno ředění. Vzorek B byl očkovan ve dvou ředěních, a to 1 ml neředěného vzorku (10^0) a 1 ml vzorku z prvního ředění (10^{-1}).

Popis kolonií, které narostly na živných půdách, je uveden v tabulce v příloze 2. Na univerzální půdě MPA narostlo 6 druhů kolonií o velikosti od 0,9 mm po 35 mm. Na diagnostické půdě M17 se neobjevily žádné kolonie, což znamená, že se žádné mléčné streptokoky v tomto vzorku vody pravděpodobně nevyskytují. Stejně tak se nepotvrdila přítomnost enterobakterií a enterokoků. Na MRS živné půdě pro detekci bakterií rodu *Lactobacillus* po kultivaci vyrostly 3 kolonie bílé barvy. Jedna bílá kolonie narostla i na Petriho misce s živnou půdou BHI pro detekci patogenních koků.

Pro vzorek C (oplach krémové sýry žervé) bylo naočkováno celkem 24 misek: 2x MPA (pro 25 °C a 30 °C), M17 (30 °C), MRS (30 °C), BHI (30 °C), ENDO (30 °C), SB (30 °C), SAB (25 °C) = sada 8 misek pro jedno ředění. Vzorek C byl očkovan ve třech ředěních, a to 100 µl neředěného vzorku (10^0), 100 µl vzorku z prvního ředění (10^{-1}) a 100 µl vzorku z druhého ředění (10^{-2}).

Charakteristika narostených kolonií je uvedena v tabulce v příloze 3. Na univerzální půdě MPA narostlo po kultivaci 5 druhů kolonií různé barvy (bílá, oranžová, béžová, žlutá a mléčná) o průměru 1 – 1,2 mm. Na živné půdě M17 pro detekci mléčných streptokoků narostlo 5 typů kolonií o průměru 1 – 3 mm. Živná půda MRS, na které narostly 4 druhy kolonií, detekovala přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus*. Na živné půdě BHI narostlo 5 kolonií, je zde pravděpodobné, že se jedná o kolonie patogenních koků. Přítomnost enterokoků (1 kolonie) a enterobakterií (5 kolonií) je taktéž pravděpodobná. Na Petriho misce se SAB živnou půdou narostlo několik typů plísní (zelená a bílá) i kvasinek o velikosti průměru od 1,6 mm po 4 mm. Nejčastěji se objevovaly kolonie okrouhlého tvaru s hladkým okrajem a vypouklým profilem.

Pro vzorek D (venkovní kanál) bylo naočkováno celkem 29 misek. Po 100 µl vzorku D v ředěních: 8x MPA (pro 25 °C a 30 °C): 10^0 , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ; M17 (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ; MRS (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ; BHI (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ; ENDO (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ; SB (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ; SAB (25 °C): 10^0 , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Vzorek D byl očkovan až v pěti ředěních, a to 100 µl neředěného vzorku (10^0), 100 µl vzorku z prvního ředění (10^{-1}), 100 µl vzorku z druhého ředění (10^{-2}), 100 µl vzorku z třetího ředění (10^{-3}) a 100 µl vzorku ze čtvrtého ředění (10^{-4}).

Popis kolonií, které narostly na živných půdách, je uveden v tabulce v příloze 4. Na univerzální půdě MPA narostly při ředění 10^{-3} dva druhy kolonií okrouhlého tvaru s hladkým okrajem. Na diagnostické půdě M17 při ředění 10^{-2} narostlo 5 druhů kolonií. Objevily se i bakterie rodu *Lactobacillus*, které přerostly celé misky ve všech zvolených ředěních (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Ve vzorku D byly pravděpodobně přítomny také patogenní koky (4 kolonie), enterobakterie (1 mléčná kolonie o průměru 4 mm) a enterokoky (1 mléčná kolonie o průměru 0,8 mm). Přítomny byly také kvasinky a plísně, které narostly na diagnostické půdě SAB. Nejčastěji se objevovaly kolonie okrouhlého a nepravidelného tvaru s hladkým okrajem a vyvýšeným profilem.

Pro vzorek E (oplachová voda ze sýrárny – syrovátka) bylo naočkováno celkem 24 misek: Po 100 μl vzorku E v ředěních: 6x MPA (pro 25 °C a 30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; M17 (30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; MRS (30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; BHI (30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; ENDO (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ; SB (30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; SAB (25 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Vzorek E byl očkován až v šesti ředěních, a to 100 μl neředěného vzorku (10^0), 100 μl vzorku z prvního ředění (10^{-1}), 100 μl vzorku z druhého ředění (10^{-2}), 100 μl vzorku z třetího ředění (10^{-3}) a 100 μl vzorku ze čtvrtého ředění (10^{-4}), 100 μl vzorku z pátého ředění (10^{-5}).

Charakteristika narostlých kolonií je uvedena v tabulce v příloze 5. Na univerzální půdě MPA se objevilo 8 druhů kolonií o velikosti průměru od 1,5 mm po 25 mm. 4 typy mléčných streptokoků pravděpodobně narostly na diagnostické půdě M17. Ve velkém množství se objevily i bakterie rodu *Lactobacillus* o průměru 0,8 mm. Na diagnostické půdě BHI narostly pravděpodobně i 4 druhy patogenních koků. Enterobakterie (5 kolonií) a enterokoky (1 kolonie) se ve vzorku E pravděpodobně také vyskytly. Petriho miska se SAB živnou půdou obsahovala velké množství plísní a kvasinek. Nejčastěji se objevovaly kolonie okrouhlého tvaru s hladkým okrajem a vypouklým profilem.

9.5.1.2 Podzimní odběr

Pro vzorek F (oplachová voda specialit (tavené a terminované sýry)) bylo naočkováno celkem 16 misek: 2x MPA (kultivace při 25 °C a 30 °C), M17 (30 °C), MRS (30 °C), BHI (30 °C), ENDO (30 °C), SB (30 °C), SAB (25 °C) = sada 8 misek pro jedno ředění. Vzorek F byl očkován ve dvou ředěních, a to 1 ml neředěného vzorku (10^0) a 1 ml vzorku z prvního ředění (10^{-1}).

Popis jednotlivých kolonií je uveden v příloze 6. Na univerzální půdě MPA narostly desítky kolonií žluté, béžové a mléčné barvy. Diagnostická půda M17 pravděpodobně potvrdila přítomnost mléčných streptokoků, neboť na Petriho miskách narostly tři typy kolonií o velikosti od 1 do 4 mm. Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou ve vzorku odpadní vody z oplachu specialit pravděpodobně také přítomny. Přítomnost potvrdila živná půda MRS, na které narostlo 279 bílých kolonií a 20 mléčných kolonií. Patogenní koky jsou ve vzorku F pravděpodobně také přítomny, na živné půdě BHI se objevily dva druhy kolonií. Na Endově agaru vyrostly po kultivaci světle růžové kolonie enterobakterií o velikosti 3 mm. Přítomnost enterokoků na SB živné půdě pravděpodobně potvrdila přítomnost 125 kolonií bílé barvy a 138 kolonií růžové barvy. Přítomné byly i kvasinky a plísně, které vyrostly na SAB živné půdě.

Pro vzorek G (oplachová voda formiček pro výrobu čerstvých sýrů) bylo naočkováno celkem 16 misek: 2x MPA (pro 25 °C a 30 °C), M17 (30 °C), MRS (30 °C), BHI (30 °C), ENDO (30 °C), SB (30 °C), SAB (25 °C) = sada 8 misek pro jedno ředění. Vzorek G byl očkovan ve dvou ředěních, a to 1 ml neředěného vzorku (10^0) a 1 ml vzorku z prvního ředění (10^{-1}).

Charakteristika jednotlivých kolonií je uvedena v příloze 7. Na univerzální půdě MPA narostly dva typy kolonií – 21 mléčných, 5 mm velkých kolonií a 63 růžových, 2 mm velkých kolonií. V počtu 15 bílých kolonií narostly na živné půdě M17 pravděpodobně mléčné streptokoky, a to při ředění 10^{-1} . Patogenní koky přerostly Petriho misky při obou ředěních a byly tak nepočítatelné. Kvasinky a plísně potvrdily svou přítomnost nárůstem na SAB živné půdě. Bakterie rodu *Lactobacillus*, enterobakterie a enterokoky nebyly ve vzorku G přítomny.

Pro vzorek H (oplach krémové sýry žervé) bylo naočkováno celkem 24 misek: 2x MPA (pro 25 °C a 30 °C), M17 (30 °C), MRS (30 °C), BHI (30 °C), ENDO (30 °C), SB (30 °C), SAB (25 °C) = sada 8 misek pro jedno ředění. Vzorek H byl očkovan ve třech ředěních, a to 100 µl neředěného vzorku (10^0), 100 µl vzorku z prvního ředění (10^{-1}) a 100 µl vzorku z druhého ředění (10^{-2}).

Celková charakteristika narostených misek je uvedena v příloze 8. Na Petriho miskách s univerzální MPA živnou půdou narostly stovky mléčných kolonií, které byly nepočítatelné. Stejný případ se opakoval i na miskách s BHI a SAB půdou. Naopak na miskách s SB živnou půdou nenarostly žádné kolonie, což pravděpodobně vylučuje přítomnost enterokoků. Na miskách s M17 živnou půdou narostlo při ředění 10^{-2} 38 béžových kolonií o velikosti 4 mm. Endův agar pravděpodobně potvrdil přítomnost enterobakterií, objevily se dva typy kolonií o velikosti od 2 mm do 6 mm.

Pro vzorek I (venkovní kanál) bylo naočkováno celkem 29 misek. Po 100 μ l vzorku I v ředěních: 8x MPA (pro 25 °C a 30 °C): 10^0 , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ; M17 (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ; MRS (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ; BHI (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ; ENDO (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ; SB (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ; SAB (25 °C): 10^0 , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Vzorek I byl očkovan až ve 4 ředěních, a to 100 μ l neředěného vzorku (10^0), 100 μ l vzorku z prvního ředění (10^{-1}), 100 μ l vzorku z druhého ředění (10^{-2}), 100 μ l vzorku z třetího ředění (10^{-3}) a 100 μ l vzorku ze čtvrtého ředění (10^{-4}).

Charakteristika Petriho misek se vzorkem I po 48 hodinové kultivaci při 30 a 25 °C je uvedena v příloze 9. Na univerzální půdě MPA vyrostly dva typy kolonií – 132 mléčných kolonií o velikosti 3 mm a 108 béžových kolonií o velikosti 3 mm. Ve vzorku I (odpadní voda z venkovního kanálu) byly pravděpodobně přítomny mléčné streptokoky, při ředění 10^{-4} narostlo 5 druhů (bílé, béžové, mléčné, oranžové a růžové barvy). 139 kolonií bílé barvy narostených na MRS živné půdě pravděpodobně potvrdilo přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus*. Na živné půdě BHI se v počtu 111 kolonií pravděpodobně objevily i patogenní koky (při ředění 10^{-4}). Enterobakterie a enterokoky potvrdily svou přítomnost na živných půdách ENDO a SB. Kvasinky narostly na SAB živné půdě v počtu 131 kolonií.

Pro vzorek J (oplachová voda z výroby tvarohu) bylo naočkováno celkem 24 misek. 100 μ l vzorku J v ředěních: 6x MPA (pro 25 °C a 30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; M17 (30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; MRS (30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; BHI (30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; ENDO (30 °C): 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ; SB (30 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ; SAB (25 °C): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Vzorek J byl očkovan až v pěti ředěních, a to 100 μ l neředěného vzorku (10^0), 100 μ l vzorku z prvního ředění (10^{-1}), 100 μ l vzorku z druhého ředění (10^{-2}), 100 μ l vzorku z třetího ředění (10^{-3}) a 100 μ l vzorku ze čtvrtého ředění (10^{-4}), 100 μ l vzorku z pátého ředění (10^{-5}).

Popis narostených kolonií je uveden v příloze 10. Kolonie dvojího druhu narostly na univerzální MPA půdě. Tyto kolonie měly bílé a béžové zbarvení, okrouhlý tvar, hladký okraj a plochý povrch. Na diagnostické MRS živné půdě narostly bílé kolonie bakterií rodu *Lactobacillus* o velikosti 1,2 mm. Na diagnostické půdě BHI narostly pravděpodobně patogenní koky při ředění 10^{-5} (kolonie oranžové, béžové, mléčné a bílé barvy o velikosti od 1 do 4,7 mm). Při ředění 10^{-5} narostlo na Endově agaru 17 kolonií oranžové barvy, 5 bílých kolonií, 5 růžových kolonií a 1 fialová kolonie. Enterokoky ve vzorku J pravděpodobně nebyly přítomny.

9.5.2 Výběr konkrétních kolonií pro další testování

9.5.2.1 Letní odběr

Z 5 vzorků odpadních vod z letního odběru kultivovaných při 25 a 30 °C bylo celkem izolováno 95 kolonií, a to 10 kolonií ze vzorku A pocházejícího z oplachové vody z tavniny, ze vzorku B z oplachové vody formiček pro výrobu čerstvých sýrů 7 kolonií, ze vzorku C (oplachová voda krémových sýrů typu žervé) 25 kolonií, ze vzorku D (venkovní kanál) 29 kolonií a ze vzorku E (voda ze sýrárny, syrovátka) 24 kolonií. V příloze 11 je uvedena charakteristika jednotlivých kolonií. Většina z izolovaných kolonií byla bílé, mléčné, béžové a žluté barvy. Ojediněle se vyskytovalo i tmavě růžové zbarvení (vzorky A10, C18, C24, D24, E20). 43 % z izolovaných kolonií prokázalo výraznou pozitivní reakci na katalázový test, 16 % kolonií projevilo slabou pozitivní reakci a 41 % kolonií reakci negativní. 86 % izolovaných kolonií netvoří enzym cytochromoxidázu a jsou na oxidázový test negativní, výrazně pozitivní reakci na oxidázový test prokázalo 7 % izolovaných kolonií a slabě pozitivní reakci dalších 7 % kolonií. 86 % z izolovaných kolonií bylo grampozitivních a 14 % gramnegativních. 35 bakterií mělo tvar koků, z toho 4 bakterie vytvářely dlouhé řetízky, 28 bakterií tvar kokotyčinek, 25 bakterií tvar tyčinek a objevily se i 4 kvasinky. Kmeny E17, E19 a E24 byly vyřazeny z důvodu slabého růstu při následujících kultivacích.

9.5.2.2 Podzimní odběr

Z 5 vzorků odpadních vod z podzimního odběru kultivovaných při 25 a 30 °C bylo celkem izolováno 60 kolonií, a to 16 kolonií ze vzorku F pocházejícího z oplachové vody specialit (tavené a terminované sýry), ze vzorku G z oplachové vody formiček pro výrobu čerstvých sýrů 4 kolonie, ze vzorku H (oplachová voda krémových sýrů typu žervé) 9 kolonií, ze vzorku I (venkovní kanál) 20 kolonií a ze vzorku J (oplachová voda z výroby tvarohu) 11 kolonií. V příloze 12 je uvedena charakteristika jednotlivých kolonií. Z 60 izolovaných kolonií bylo 39 kolonií grampozitivních (74 %), 14 kolonií gramnegativních (26 %) a v 7 případech se jednalo o kvasinky. 22 kolonií mělo tvar kokotyčinek, 19 kolonií tvar tyčinek, 9 kolonií tvar koků a 3 kolonie utvářely dlouhé řetízky bakterií. Na katalázový test mělo 28 % kolonií výrazně pozitivní reakci, 30 % kolonií slabě pozitivní reakci a 42 % kolonií negativní reakci. 43 % kolonií mělo na oxidázový test výrazně pozitivní reakci, 18 % kolonií slabě pozitivní reakci a 39 % kolonií reakci negativní.

9.5.3 Identifikace bakterií pomocí metody MALDI/TOF

9.5.3.1 Letní odběr

Pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem se podařilo identifikovat 60 bakterií a 2 kvasinky (Tab. 25). 8 bakterií ze vzorku A (oplachová voda z tavníky), 4 bakterie ze vzorku B (oplachová voda formiček z výroby čerstvých sýrů), 11 bakterií a 2 kvasinky ze vzorku C (oplachová voda z výroby krémových sýrů typu žervé), 16 bakterií ze vzorku D (venkovní kanál) a 19 bakterií ze vzorku E (voda ze sýrárny (tzv. syrovátka)).

Tab. 25: Výsledky identifikace bakterií pomocí MALDI/TOF (letní odběr)

Vzorek	Název bakterie	Vzorek	Název bakterie
A1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	D5	<i>Microbacterium mitrae</i>
A2	<i>Acinetobacter junii</i>	D8	<i>Staphylococcus carnosus</i>
A4	<i>Arthrobacter ilicis</i>	D11	<i>Exiguobacterium sp.</i>
A5	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	D12	<i>Acinetobacter schindleri</i>
A7	<i>Enterobacter cloacae</i>	D13	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
A8	<i>Lactococcus lactis</i>	D16	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i>
A9	<i>Aeromonas caviae</i>	D17	<i>Kocuria varians</i>
A10	<i>Enterobacter asburiae</i>	D20	<i>Staphylococcus carnosus</i>
B1	<i>Staphylococcus hominis</i>	D24	<i>Comamonas aquatica</i>
B2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	D25	<i>Aeromonas veronii</i>
B5	<i>Staphylococcus carnosus</i>	D26	<i>Aeromonas caviae</i>
B6	<i>Staphylococcus carnosus</i>	D27	<i>Staphylococcus carnosus</i>
C2	<i>Acinetobacter schindleri</i>	E1	<i>Chryseobacterium joostei</i>
C3	<i>Acinetobacter schindleri</i>	E2	<i>Klebsiella oxytoca</i>
C5	<i>Enterococcus faecalis</i>	E4	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
C6	<i>Kocuria rhizophila</i>	E5	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
C9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E6	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
C12	<i>Lactococcus lactis</i>	E7	<i>Lactococcus lactis</i>
C15	<i>Enterococcus faecalis</i>	E8	<i>Lactococcus lactis</i>
C16	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	E9	<i>Lactococcus lactis</i>
C17	<i>Acinetobacter baumannii</i>	E10	<i>Lactococcus lactis</i>
C18	<i>Klebsiella oxytoca</i>	E11	<i>Lactococcus lactis</i>
C19	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	E12	<i>Lactococcus lactis</i>
C20	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	E13	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
C25	<i>Lactococcus lactis</i>	E14	<i>Microbacterium lacticum</i>
C26	<i>Candida parapsilosis</i>	E15	<i>Lactobacillus sp.</i>
C27	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	E16	<i>Lactococcus lactis</i>
D1	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	E17	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
D2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	E19	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
D3	<i>Staphylococcus carnosus</i>	E20	<i>Chryseobacterium joostei</i>
D4	<i>Kocuria rhizophila</i>	E21	<i>Enterobacter asburiae</i>

Poznámka: červené – identifikace na úrovni rodu, zelené – identifikace na úrovni druhu

Bakterie rodu *Acinetobacter* byly přítomny ve všech 5 vzorcích odpadní vody a zároveň to byl nejhojněji zastoupený rod, který se objevil ve 13 případech. Celkem 7 kmenů bylo identifikováno jako *Acinetobacter johnsonii* (kolonie B2, D2, E4, E5, E6, E13 a E17), 3 vzorky jako *Acinetobacter schindleri* (kolonie C2, C3 a D12) a po jednom kmenu *Acinetobacter baumannii* (kolonie C17), *Acinetobacter junii* (kolonie A2) a *Acinetobacter lwoffii* (kolonie D13). *Acinetobacter johnsonii* se podařilo z oplachové vody z výroby tvarohu identifikovat v pěti případech a *Acinetobacter schindleri* ve vzorku odpadní vody z výroby krémových sýrů typu žervé ve dvou případech. Přesto byl rod *Acinetobacter* nejhojněji zastoupeným rodem v odpadních vodách mlékárenského průmyslu odebraných v létě.

Dalším hojně zastoupeným rodem byl rod *Lactococcus*. Celkem byly bakterie rodu *Lactococcus* identifikovány v odpadní vodě (vzorky A – E) 11 krát. 10 kolonií bylo identifikováno jako *Lactococcus lactis* (kolonie A8, C13, C25 E7, E8, E9, E10, E11, E12 a E16), z toho 7 krát ze vzorku E z oplachové vody z výroby tvarohu a 2 krát ze vzorku C z oplachové vody z výroby krémových sýrů typu žervé, a jedna kolonie jako *Lactococcus raffinolactis* (kmen C16).

Rod *Staphylococcus* byl zastoupený 7 koloniemi. Jako *Staphylococcus carnosus* bylo identifikováno 6 kolonií (kolonie B5, B6, D3, D8, D20 a D27), z toho 4 krát ze vzorku D z venkovního kanálu a 2 krát ze vzorku B z oplachové vody formiček pro výrobu čerstvých sýrů, a jako *Staphylococcus hominis* kolonie B1.

Dále byly identifikovány bakterie *Aeromonas caviae* (kolonie A9 a D26) a *Aeromonas veronii* (kolonie D25), *Arthrobacter ilicis* (kolonie A4), *Brevundimonas vesicularis* (kolonie C20), *Comamonas aquatica* (kolonie D24), *Enterococcus casseliflavus* (kolonie A5, C5 a C15), *Enterobacter asburiae* (kolonie A10 a E21) a *Enterobacter cloacae* (kolonie E7), *Chryseobacterium joostei* (kolonie E20), *Klebsiella oxytoca* (kolonie C18 a E21) a *Klebsiella pneumoniae* (kolonie C8), *Kocuria rhizophila* (kolonie C6 a D4) a *Kocuria varians* (kolonie D17), *Leclercia adecarboxylata* (kolonie E19), *Microbacterium lacticum* (kolonie E14) a *Microbacterium mitrae* (kolonie D5), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (kolonie A1) a *Raoultella ornithinolytica* (kolonie C19). Identifikovány byly i dvě kvasinky. Kolonie C26 jako *Candida parapsilosis* a kolonie C27 jako *Metschnikowia pulcherrima*.

Mezi izolovanými bakteriemi ze vzorků odpadních vod z mlékárenského průmyslu se objevily i významné patogenní druhy. Např. bakterie *Acinetobacter baumannii* (kolo-

nie C17), která patří dle Světové zdravotnické organizace do seznamu rezistentních patogenů, proti kterým je naléhavě potřeba vyvinout nová antibiotika. Dalšími přítomnými patogeny byly *Klebsiella pneumoniae* (kolonie C8), která způsobuje zápal plic a *Enterococcus faecalis* (kolonie C5 a C15), který způsobuje endokarditidu nebo infekce močových cest [87].

9.5.3.2 Podzimní odběr

Z podzimního odběru se podařilo pomocí MALDI/TOF analyzovat 17 bakterií a 1 kvasinku (Tab. 26). 7 bakterií ze vzorku F (oplachová voda specialit), 3 bakterie ze vzorku G (oplachová voda formiček pro výrobu čerstvých sýrů), 2 bakterie a 1 kvasinka ze vzorku H (oplachová voda u krémových sýrů typu žervé), 4 bakterie ze vzorku I (venkovní kanál) a 1 bakterie ze vzorku J (oplachová voda z výroby tvarohu).

Tab. 26: Výsledky identifikace bakterií pomocí MALDI/TOF (podzimní odběr)

Vzorek	Název bakterie	Vzorek	Název bakterie
F1	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i>	G4	<i>Pseudomonas taetrolens</i>
F3	<i>Pseudomonas gessardii</i>	H4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
F5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	H6	<i>Pseudomonas graminis</i>
F9	<i>Pseudomonas brenneri</i>	H8	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
F10	<i>Pseudomonas fragi</i>	I1	<i>Aeromonas media</i>
F12	<i>Aeromonas eucrenophila</i>	I6	<i>Lactococcus lactis</i>
F14	<i>Lactobacillus sp.</i>	I13	<i>Pseudomonas fragi</i>
G1	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	I16	<i>Aeromonas caviae</i>
G2	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	J9	<i>Microbacterium oxydans</i>

Poznámka: červené – identifikace na úrovni rodu, zelené – identifikace na úrovni druhu

Bakterie rodu *Pseudomonas* byly přítomny ve vzorcích odpadních vod F, G, H i J a zároveň to byl nejhojněji zastoupený rod, který se objevil v 7 případech. Celkem dvě kolonie byly identifikovány jako *Pseudomonas fragi* (kolonie F10 a I13). Dále se vyskytovaly *Pseudomonas gessardii* (kolonie F3), *Pseudomonas brenneri* (kolonie F9), *Pseudomonas taetrolens* (kolonie G4), *Pseudomonas graminis* (kolonie H6) a *Pseudomonas azotoformans* (kolonie H8). Dalším rodem, zastoupeným 3 bakteriemi, byl rod *Aeromonas*. Vyskytly se bakterie *Aeromonas eucrenophila* (kolonie F12), *Aeromonas media* (kolonie I1) a *Aeromonas caviae* (kolonie I16).

Dále byly identifikovány bakterie *Acinetobacter radioresistens* (kolonie G1 a G2), *Chryseobacterium scophthalmum* (kolonie F1), *Lactococcus lactis* (kolonie I6), *Leuconostoc mesenteroides* (kolonie F5), *Microbacterium oxydans* (kolonie J9) a kvasinka *Rhodotorula mucilaginosa* (kolonie H4).

Ze vzorků odpadních vod odebraných na podzim se žádné významné patogeny nepodařilo izolovat.

V odpadních vodách z letního odběru byly přítomny především bakterie rodu *Acinetobacter*, *Lactococcus* a *Staphylococcus*. V podzimním odběru se nejčastěji vyskytovaly bakterie rodu *Pseudomonas* a *Aeromonas*. Před letním odběrem odpadních vod, který byl proveden 13. července 2017, panovaly vysoké denní teploty. 14 dní před odběrem se pohybovaly denní teploty v průměru od 25 do 34 °C. Předpokládalo se, že vyšší teploty budou vyhovovat bakteriím a podaří se vyizolovat více kmenů než z vod z podzimního odběru (15. listopadu 2017), kdy se průměrné denní teploty 14 dní před odběrem pohybovaly v rozmezí od 2 do 14 °C. Tento předpoklad byl správný. Při charakterizaci Petriho misek po kultivaci vzorků vod bylo na první pohled jasné, že Petriho misky se vzorky z letního odběru měly vyšší míru mikrobiálního oživení než Petriho misky se vzorky z odběru podzimního. Proto bylo na podzim vybráno pouze 60 kmenů, na rozdíl od 95 kmenů vyizolovaných z odpadních vod z letního odběru.

9.5.4 Screening dekarboxylázové aktivity u izolovaných bakterií kultivační metodou

Schopnost dekarboxylovat vybrané aminokyseliny (arginin, fenylalanin, histidin, lysin, ornitin, tryptofan a tyrosin) byla kultivační metodou zjišťována u všech 95 kolonií izolovaných z letního odběru a u všech 60 kolonií izolovaných z podzimního odběru. Při pozitivní reakci dochází ke změně zbarvení dekarboxylačního média z hnědé na tmavě fialovou (díky přítomnosti pH indikátoru bromkresolpurpuru).

9.5.4.1 Letní odběr

Vyhodnocení screeningu dekarboxylázové aktivity u bakterií izolovaných ze vzorků odpadních vod odebraných v létě je uvedeno v příloze 13. Byla prokázána poměrně vysoká dekarboxylační schopnost zkoumaných bakteriálních kmenů, a to zejména u ornitinu, lysinu, tyrosinu a argininu. U ornitinu prokázalo pozitivní reakci 77 bakteriálních kmenů z 95. Pouze u 18 bakteriálních kmenů nebyla pozitivní reakce pozorována. Lysin dokázalo dekarboxylovat 75 % bakteriálních kmenů (71 z 95), tyrosin 72 % bakteriálních kmenů (68 z 95) a arginin taktéž 72 % bakteriálních kmenů (68 z 95). Naopak histidin nedokázalo dekarboxylovat 60 % bakteriálních kmenů. Ani u tryptofanu nedocházelo k výrazné dekarboxylaci, u 52 % bakteriálních kmenů nedošlo ke změně zbarvení dekarboxylačního média z hnědé na fialovou.

9.5.4.2 Podzimní odběr

V příloze 14 jsou uvedeny kompletní výsledky screeningu dekarboxylázové aktivity u bakterií izolovaných ze vzorků odpadních vod odebraných na podzim. Stejně jako v létě byla prokázána poměrně vysoká dekarboxylační schopnost zkoumaných bakteriálních kmenů. Z vybraných aminokyselin (arginin, fenylalanin, histidin, lysin, ornitin, tryptofan a tyrosin) byl nejvíce dekarboxylován arginin, který dekarboxylovalo 50 z 65 izolovaných bakteriálních kmenů (77 %). Mezi nejvíce dekarboxylované aminokyseliny patří dále lysin a tyrosin, pozitivní reakci projevilo 45 bakteriálních kmenů z 65 (69 %). U fenylalaninu prokázalo pozitivní reakci 40 bakteriálních kmenů z 65 (62 %). Naopak histidin patřil k nejméně dekarboxylovaným aminokyselinám. Pozitivní reakce proběhla pouze u 46 % vyizolovaných bakteriálních kmenů.

V létě byly nejčastěji dekarboxylovány ornitin, lysin, tyrosin a arginin. Na podzim se podařilo vyizolovat bakterie s vykazující schopností dekarboxylovat arginin, lysin, tyrosin a fenylalanin.

Screening dekarboxylázové aktivity na kultivačním médiu je velmi jednoduchá a poměrně rychlá metoda, velkou nevýhodou této metody je její nepřesnost. V průběhu reakce probíhající při kultivační metodě vznikají alkalické produkty, které způsobují falešně pozitivní zabarvení dekarboxylačního média. Dalším problémem je neschopnost zachycení malého množství vznikajících biogenních aminů.

Původním záměrem bylo vybrat kmeny vykazující silně pozitivní reakci, ale z výše uvedených důvodů bylo nakonec následující stanovení produkce biogenních aminů metodou HPLC – UV/Vis provedeno u všech izolovaných kmenů (95 z letního odběru a 60 z podzimního odběru).

9.5.5 Stanovení produkce biogenních aminů pomocí HPLC – UV/Vis

Stanovení produkce a kvantifikace biogenních aminů produkovanými izolovanými bakteriemi bylo provedeno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/Vis detekcí. Jedná se, na rozdíl od kultivační metody, o velmi přesnou metodu, která umožňuje detekovat i kvantifikovat vznikající jednotlivé biogenní aminy, a to i v nízkých koncentracích.

9.5.5.1 Letní odběr

Ze vzorků odpadních vod mlékárenského průmyslu bylo v letním odběru testováno 95 kolonií. Produkce biogenních aminů u všech vzorků (A – E) je uvedena v příloze 15.

V tabulce 27 je uvedeno pět nejproduktivnějších bakterií vzorku A (oplachová voda z tavrny).

Tab. 27: Nejproduktivnější kmeny vzorku A (oplachová voda z tavrny)

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
A1	43,32	21,54	23,53	9,58	11,19	701,18	ND	41,73	852,06
A7	75,95	6,93	514,28	32,35	7,63	33,04	25,68	48,45	744,31
A8	67,54	8,07	1042,50	22,29	ND	11,87	17,99	29,89	1200,14
A9	103,73	6,06	1092,84	17,13	4,34	17,28	14,58	21,25	1277,21
A10	43,89	3,93	478,72	31,42	ND	24,68	26,19	46,12	654,95

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

Kmen A9 (*Aeromonas caviae*) produkoval celkem 1 277, 21 mg/l biogenních aminů, z nichž byl nejvíce produkován putrescin (1 092,84 mg/l). U kmene A8 (*Lactococcus lactis*) byly naměřeny obdobné hodnoty, celková produkce všech biogenních aminů dosáhla 1 200,14 mg/l a stejně jako u kmene A9 (*Aeromonas caviae*), byl nejvíce produkován biogenním aminem putrescin (1 042, 50 mg/l). U kmenu A1 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) byla zaznamenána celková produkce biogenních aminů v množství 852,06 mg/l, z toho tyramin dokázal vytvořit 701,18 mg/l. Dalším poměrně produktivními kmeny byly A7 (*Enterobacter cloacae*), který vytvořil 744,31 mg/l BA (nejvíce putrescin 514,28 mg/l) a A10 (*Enterobacter asburiae*), který vytvořil 654,95 mg/l BA (nejvíce putrescin 478,72 mg/l). U vzorku A (oplachová voda z tavrny) byl obecně nejvíce detekován putrescin, tyramin a tryptamin, naopak nejméně histamin.

Nejproduktivnější kmeny vzorku B (oplachová voda formiček) jsou uvedeny v tabulce 28.

Tab. 28: Nejproduktivnější kmeny vzorku B (oplachová voda formiček)

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
B2	40,06	ND	625,17	23,34	ND	18,11	23,25	45,36	775,29
B3	37,04	3,56	326,29	13,83	ND	17,16	22,32	45,13	465,33
B5	47,17	4,82	260,69	28,86	3,77	19,49	23,14	42,23	430,18
B6	60,45	ND	1178,04	18,29	ND	15,69	14,19	23,94	1310,59
B7	73,46	ND	882,11	25,84	4,74	20,43	21,28	40,96	1068,81

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

1 310, 59 mg/l BA se podařilo vyprodukovat kmenu B6 (*neidentifikováno*), z nichž byl nejvíce zastoupen putrescin (1 178 mg/l). Kmen B7 (*neidentifikováno*) vyprodukoval 1 068, 81 mg/l, z toho 882,11 mg/l tvořil putrescin. 775,29 mg/l BA (z toho 625,17 mg/l putrescinu) vytvořil kmen B2 (*Acinetobacter johnsonii*). Kmeny B3 (*neidentifikováno*) a B5 (*Staphylococcus carnosus*) s produkcí BA 465,33 mg/l a 430,18 mg/l patřily také k nejproduktivnějším kmenům vzorku B. Celkově byly u vzorku B nejvíce detekovány BA putrescin a tryptamin, naopak nejméně histamin a fenylethylamin.

V následující tabulce (Tab. 29) je uvedeno pět nejproduktivnějších kmenů izolovaných ze vzorku C (oplachová voda z výroby krémových sýrů typu žervé).

Tab. 29: Nejproduktivnější kmeny vzorku C (oplachová voda krémových sýrů typu žervé)

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
C1	73,36	5,94	436,49	43,65	ND	34,04	21,64	45,51	660,63
C4	45,54	12,99	61,43	14,59	15,07	503,78	1,38	54,11	708,89
C9	135,09	11,79	486,32	333,95	11,03	90,00	ND	244,54	1312,71
C12	33,47	15,08	18,03	9,16	14,27	515,46	3,22	37,44	646,13
C25	73,40	12,88	664,62	45,56	5,28	308,18	ND	30,83	1140,76

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

Kmen C9 (*Klebsiella pneumoniae*) vyprodukoval 1 312,71 mg/l BA, z toho 486,32 mg/l putrescinu, 333,95 mg/l kadaverinu a 244,54 mg/l sperminu. Kmen C25 (*Lactococcus lactis*) dokázal vytvořit 1 140,76 mg/l BA, z toho 664,62 mg/l putrescinu a 308,18 mg/l tyraminu. Dalšími kmeny s vysokou produkcí BA jsou C4 (*neidentifikováno*), C1 (*neidentifikováno*) a C12 (*Lactococcus lactis*), které dokázaly vytvořit BA v rozmezí od 646,13 do 708,89 mg/l. U vzorku C byl nejvíce detekován tyramin, putrescin a kadaverin, naopak nejméně spermidin a histamin.

Nejproduktivnější kmeny vzorku D (venkovní kanál) jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 30).

Tab. 30: Nejproduktivnější kmeny vzorku D (venkovní kanál)

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
D4	67,88	20,74	91,80	113,64	13,25	327,33	ND	47,37	682,01
D5	44,06	22,54	275,49	63,95	15,13	588,44	ND	28,59	1038,20
D6	51,52	3,65	792,69	68,24	2,56	25,07	ND	51,47	995,21
D11	63,95	29,36	23,74	14,43	16,74	779,27	ND	20,65	948,14
D27	57,13	27,77	20,78	11,71	12,44	713,25	ND	64,81	907,89

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

Kmen D5 (*Microbacterium mitrae*) byl s 1 038,20 mg/l BA nejproduktivnějším kmenem vzorku D (588,44 mg/l tvořil tyramin a 275,49 mg/l putrescin). Druhým nejproduktivnějším kmenem byl D6 (*neidentifikováno*) s 995,21 mg/l BA (z toho 792,69 mg/l putrescinu). 948,14 mg/l BA vyprodukoval kmen D11 (*Exiguobacterium* sp.), z toho 779,27 mg/l tyra-

minu. Dalšími kmeny s poměrně vysokou produkcí BA byly D27 (*Staphylococcus carnosus*) a D4 (*Kocuria rhizophila*), které tvořily BA od 682,01 – 907,89 mg/l. U vzorku D (venkovní kanál) byl nejvíce detekován tyramin, putrescin a spermin, naopak nejméně spermidin a histamin. Spermidin nebyl detekován ani u jednoho z izolovaných kmenů vzorku D.

V tabulce 31 jsou uvedeny nejproduktivnější kmeny vzorku E (oplachová voda ze sýrárny).

Tab. 31: Nejproduktivnější kmeny vzorku E (oplachová voda ze sýrárny)

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
E2	52,21	7,78	18,07	176,45	4,80	66,49	ND	47,58	373,38
E3	21,54	ND	15,64	136,93	ND	28,53	ND	44,49	247,12
E8	31,35	5,36	467,87	23,23	4,86	21,93	ND	29,72	584,32
E10	51,41	8,79	22,16	94,29	4,28	31,05	ND	35,60	247,57
E18	39,80	14,10	307,90	42,42	12,74	570,54	ND	29,94	1017,45

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

Kmen E18 (*neidentifikováno*) se s 1 017,45 mg/l BA (z toho 570,54 mg/l tyraminu a 307,90 mg/l putrescinu) ukázal jako nejproduktivnější. Kmen E8 (*Lactococcus lactis*) vytvořil 584,32 mg/l BA (z toho 467,87 mg/l tvořil putrescin) a kmen E2 (*Klebsiella oxytoca*) vytvořil 373,38 mg/l BA (z toho 66,49 mg/l tvořil tyramin). Kmeny E10 (*Lactococcus lactis*) a E3 (*neidentifikováno*) vytvořily obdobné množství BA, a to 247,57 mg/l a 247,12 mg/l. U vzorku E (oplachová voda ze sýrárny) byl nejvíce detekován tyramin, putrescin a kadaverin, naopak nejméně spermidin a histamin. Spermidin byl detekován pouze u jednoho z izolovaných kmenů. Histamin byl detekován u 14 kmenů z 22, ale ve všech případech se jednalo o minimální množství, které nepřesáhlo hodnotu 12,74 mg/l.

Ze všech 5 vzorků (A – E) z letního odběru byl nejčastěji a v nejvyšších koncentracích produkován putrescin a tyramin (stovky až tisíce mg/l), dále spermin, kadaverin a tryptamin (desítky až stovky mg/l) a naopak nejméně fenylalanin, histamin a spermidin (desítky až jednotky mg/l). Mezi bakterie s nejvyšší dekarboxylázovou aktivitou vyizolované z odpadních vod odebraných v létě, které se podařilo identifikovat, patří *Lactobacillus lactis* (kolonie s označením A8, C12, C25, E8 a E10), *Staphylococcus carnosus* (kolonie B5 a D27), dále *Acinetobacter johnsonii* (kolonie B2), *Aeromonas caviae* (kolonie A9),

Enterobacter cloacae (kolonie A7), *Enterobacter asburiae* (kolonie A10), *Klebsiella oxytoca* (kolonie E2), *Klebsiella pneumoniae* (kolonie C9), *Kocuria rhizophila* (kolonie D4), *Microbacterium mitrae* (kolonie D5) a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (kolonie A1).

9.5.5.2 Podzimní odběr

Ze vzorků odpadních vod mlékárenského průmyslu bylo v podzimním odběru testováno 60 kolonií. Produkce biogenních aminů u všech vzorků (F – J) je uvedena v příloze 16.

V tabulce 32 je uvedeno pět nejproduktivnějších bakterií vzorku F (oplachová voda z výroby specialit).

Tab. 32: Nejproduktivnější kmeny vzorku F (oplachová voda z výroby specialit)

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
F1	101,25	36,46	13,27	15,32	28,52	40,84	0,03	55,80	291,47
F2	ND	16,78	7,20	4,75	3,55	28,03	0,14	69,85	130,31
F4	299,73	101,96	32,63	34,38	30,89	76,89	0,09	52,44	629,00
F5	ND	10,64	4,72	3,58	2,01	27,42	0,11	55,46	103,94
F12	ND	6,75	53,35	2,10	1,58	20,04	0,02	61,25	145,09

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

Nejproduktivnější kmen izolovaný ze vzorku F byl F4 (*neidentifikováno*) s produkcí 629,00 mg/l BA (z toho 299,73 mg/l tryptaminu a 101,96 mg/l fenylethylaminu). Kmen F1 (*Chryseobacterium scophthalmum*) dokázal vytvořit 291,47 mg/l BA (z toho nejvíce tryptaminu, a to 101,25 mg/l). Dalším produktivním kmenem byl kmen F12 (*Aeromonas eucrenophila*) s množstvím vyprodukovaných BA 145,09 mg/l. Kmeny F5 (*Leuconostoc mesenteroides*) a F2 (*neidentifikováno*) dokázaly vytvořit od 103,94 do 130,31 mg/l BA. U vzorku F (oplachová voda z výroby specialit) byl nejvíce detekován spermin a tryptamin, naopak nejméně spermidin, který v žádném případě nepřekročil hodnotu 0,15 mg/l.

V tabulce 33 jsou uvedeny nejproduktivnější kmeny vzorku G (oplachová voda formiček).

Tab. 33: Nejproduktivnější kmeny vzorku G (oplachová voda formiček)

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
G3	ND	6,94	5,17	434,59	ND	18,08	0,11	38,86	503,74
G4	ND	5,19	3,85	67,29	3,93	17,62	0,09	35,82	133,79

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

Kmen G3 (*neidentifikováno*) izolovaný ze vzorku G (oplachová voda formiček) produkoval množství BA 503,74 mg/l (z toho nejvíce kadaverinu, a to 434,59 mg/l). Druhým poměrně produktivním kmenem se ukázal kmen G4 (*Pseudomonas taetrolens*), který vytvořil 133,79 mg/l BA. Zástupci vzorku G nejvíce produkovaly kadaverin a spermin, naopak nejméně spermidin, který byl detekován v minimálním množství (pod 0,22 mg/l) a tryptamin, který netvořil ani jeden z izolovaných kmenů.

V následující tabulce (Tab. 34) jsou uvedeny nejproduktivnější kmeny vzorku H (oplachová voda krémových sýrů typu žervé).

Tab. 34: Nejproduktivnější kmeny vzorku H (oplachová voda krémových sýrů typu žervé).

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
H1	84,17	39,27	11,65	12,96	21,41	39,71	0,09	46,76	256,02
H3	80,71	23,75	20,24	15,98	25,88	58,46	0,05	52,24	277,30
H4	45,14	16,76	6,43	9,94	9,20	16,69	0,04	13,96	118,17
H5	ND	8,51	8,01	3,54	1,99	30,12	0,16	52,15	104,48
H7	14,15	17,16	30,68	12,51	7,69	31,66	0,06	50,29	164,21

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

Největší množství BA dokázaly vytvořit kmeny H3 (*neidentifikováno*) a H1 (*neidentifikováno*), a to 277,30 mg/l a 256,02 mg/l (z toho nejvíce tryptaminu). Dalšími produktivními kmeny byly H7 (*neidentifikováno*) s produkcí 164,21 mg/l BA, H4 (*Rhodotorula mucilaginosa*) s produkcí 118,17 mg/l BA a H5 (*neidentifikováno*) s produkcí 104,48 mg/l BA. Izolované kmeny ze vzorku H nejčastěji produkovaly spermin, tryptamin a tyramin, naopak nejméně spermidin.

V tabulce 35 jsou uvedeny nejproduktivnější kmeny vzorku I (venkovní kanál).

Tab. 35: Nejproduktivnější kmeny vzorku I (venkovní kanál)

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
I1	ND	3,44	52,76	9,63	6,38	99,69	0,01	21,64	193,55
I3	462,37	205,16	112,61	103,95	107,75	215,81	0,17	52,75	1260,56
I16	25,52	15,51	68,71	32,25	10,41	28,13	0,09	29,93	210,56
I18	148,36	127,32	26,85	37,87	34,50	69,50	0,07	36,51	480,98
I19	127,08	37,61	13,50	28,20	31,61	43,47	0,05	26,98	308,50

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

Kmen I3 (*neidentifikováno*) dokázal vytvořit největší množství BA, a to 1 260,56 mg/l (z toho nejvíce 462,37 mg/l tryptaminu, 215,81 mg/l tyraminu a 205,16 mg/l fenylethylaminu). Dalšími produktivními kmeny vyizolovanými ze vzorku I (venkovní kanál) byly I18 (*neidentifikováno*) s produkcí BA 480,98 mg/l, I19 (*neidentifikováno*) s produkcí BA 308,50 mg/l, I16 (*Aeromonas caviae*) s produkcí BA 210,56 mg/l a I1 (*Aeromonas media*) s produkcí BA 193,55 mg/l. Mezi nejčastěji detekované BA patřily tryptamin, spermin a tyramin, naopak nejméně spermidin, který byl detekován minimálně.

Nejproduktivnější kmeny vzorku J (oplachová voda z výroby tvarohu) jsou uvedeny v tabulce 36.

Tab. 36: Nejproduktivnější kmeny vzorku J (oplachová voda z výroby tvarohu)

	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
J1	ND	2,46	51,52	15,20	ND	19,07	ND	29,38	117,63
J2	97,37	24,81	31,87	21,15	15,73	43,88	0,11	53,12	288,05
J6	16,82	8,85	8,57	4,40	6,64	28,98	0,04	41,90	116,20
J7	351,00	130,73	26,87	38,77	24,61	80,60	ND	40,75	693,34
J9	17,88	11,88	4,95	6,17	4,76	23,85	ND	50,60	120,09

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

Jako nejproduktivnější kmen se ukázal kmen J7 (*neidentifikováno*) s celkovou produkcí BA 693,34 mg/l (z toho nejvíce tryptamin 351,00 mg/l a fenylethylamin 130,73 mg/l). Dalším produktivním kmenem s množstvím vytvořených BA 288,05 mg/l byl kmen J2 (*neidentifikováno*). Kmeny J6 (*neidentifikováno*), J1 (*neidentifikováno*) a J9 (*Microbacterium oxydans*) dokázaly vytvořit BA v rozmezí od 116,20 do 120,09 mg/l. Nejčastěji detekovanými BA produkovanými bakteriemi vyizolovanými ze vzorku J (oplachová voda z výroby tvarohu) byly tryptamin, spermin a tyramin, naopak nejméně spermidin.

Ze všech 5 vzorků (F – J) z podzimního odběru byl nejčastěji a v nejvyšších koncentracích produkován spermin, tryptamin, tyramin a fenylethylamin (stovky až tisíc mg/l), dále kadaverin, putrescin a histamin (desítky až stovky mg/l) a naopak nejméně spermidin (jednotky mg/l). Mezi bakterie s nejvyšší dekarboxylázovou aktivitou vyizolované z odpadních vod odebraných na podzim, které se podařilo identifikovat, patří kolonie s označením F12 (*Aeromonas eucrenophila*), I16 (*Aeromonas caviae*), I1 (*Aeromonas media*), F1 (*Chryseobacterium scophthalmum*), F5 (*Leuconostoc mesenteroides*), G4 (*Pseudomonas taetrolens*) a kolonie s označením H4 (*Rhodotorula mucilaginosa*).

V tabulce 37 je uvedeno pořadí produkovaných BA bakteriemi izolovanými z odpadních vod mlékárenského průmyslu od nejčastěji detekovaných po nejméně detekované. V letním odběru odpadních vod z mlékárenského průmyslu produkovaly přítomné bakterie nejvíce putrescin, tyramin a spermin, naopak nejméně histamin a spermidin. V podzimním odběru odpadních vod z mlékárenského průmyslu produkovaly přítomné bakterie nejvíce spermin, tryptamin a tyramin a nejméně, stejně jako v letním odběru, histamin a spermidin.

Tab. 37: Pořadí detekovaných BA produkovaných bakteriemi izolovanými ze vzorků vod z obou odběrů (letního a podzimního)

Pořadí BA	Letní odběr	Podzimní odběr
1.	Putrescin	Spermin
2.	Tyramin	Tryptamin
3.	Spermin	Tyramin
4.	Kadaverin	Fenylethylamin
5.	Tryptamin	Kadaverin
6.	Fenylethylamin	Putrescin
7.	Histamin	Histamin
8.	Spermidin	Spermidin

Cedidlová (2016) uvádí, že v povrchových vodách se mezi nejčastěji detekované BA řadí spermidin (v množství 4,5 – 45,5 mg/l) a spermin (v množství 12,0 – 34,4 mg/l), naopak mezi nejméně detekované BA produkované bakteriemi z povrchových vod se řadí tryptamin a také fenylethylamin, který nebyl u těchto bakterií detekován vůbec [12].

Ze vzorků odpadních vod se podařilo vyizolovat i bakterie, které v laboratorních podmínkách produkovaly BA v množství až 1 000 mg/l. Mezi ty, které patří k nejproduktivnějším, a které se podařilo identifikovat, patří *Aeromonas caviae* (kolonie s označením A9), *Acinetobacter johnsonii* (kolonie B2), *Enterobacter cloacae* (kolonie A7), *Klebsiella pneumoniae* (kolonie C9), *Lactococcus lactis* (kolonie A8, C12 a C25), *Microbacterium mitrae* (kolonie D5), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (kolonie A1) a *Staphylococcus carnosus* (kolonie B6 a D27). Všechny výše zmiňované bakterie byly izolovány z odpadních vod mlékárenského průmyslu odebraných v létě. Z odpadních vod odebraných na podzim došlo k překročení množství biogenních aminů 1 000 mg/l pouze u jednoho kmene (kolonie I3), který se ale nepodařilo identifikovat.

Ze zjištění, uvedeného výše vyplývá, že venkovní teplota má vliv na přítomnost bakterií s dekarboxylázovou aktivitou a je pravděpodobné, že se v letních měsících vyskytuje ve vodě i větší množství BA než za nižších teplot.

Souhrnně lze konstatovat, že jak naměřené výsledky ukázaly (kapitoly 9.4.1 a 9.4.2), odpadní vody z mlékárenského průmyslu obsahují proteiny v koncentracích řádově desítky $\mu\text{g/ml}$ (tj. desítky mg/l). Pokud jsou v těchto vodách přítomny bakterie s dekarboxylázovou aktivitou, tak jak výsledky této práce dokumentují (kapitola 9.5.5), mohly by z proteinů uvolněné aminokyseliny dekarboxylovat za vzniku příslušných biogenních aminů. Přítomnost těchto mikrobiálních metabolitů je diskutována zejména v souvislosti s potravinami (sýry, masné výrobky, ryby, aj.). Nicméně, v odpadních vodách odebraných přímo z provozu se nalézají bakterie vlastnící dekarboxylázovou aktivitu, které by mohly finální výrobky (sýry) kontaminovat.

Jaké množství jednotlivých BA se nachází přímo v odpadních vodách mlékárenského průmyslu, mohou zjistit další analýzy vzorků pomocí různých instrumentálních metod (např. HPLC nebo UPLC/MS) v kombinaci s vhodnou extrakční technikou (např. SPE/extrakce tuhou fází) [85].

Výzkumy v oblasti biogenních aminů se v posledních letech začaly orientovat nejen na bakterie vlastnící dekarboxylázovou aktivitu (produkce BA), ale také na bakterie vlastnící aminooxidázovou aktivitu (bakterie mající schopnost BA degradovat). Je možné, že mezi izolovanými bakteriemi z vod z mlékárenského průmyslu se nachází některá, která by tuto aminooxidázovou aktivitu mohla vlastnit. Příkladem by mohla být bakterie rodu *Lactobacillus* [86], izolovaná z řady v této práci zkoumaných vzorků /A, C, D, E, F/ a identifikovaná pomocí MALDI/TOF. Tento předpoklad ale ukáží až další výzkumy.

ZÁVĚR

Celkem bylo z 10 vzorků odpadních vod odebraných v mlékárně na Moravě izolováno 155 kolonií. Z 5 vzorků (A – E) odpadních vod mlékárenského průmyslu odebraných v letním odběru (13. července 2017) bylo izolováno 95 kolonií a z 5 vzorků (F – J) odebraných v podzimním odběru (15. listopadu 2017) bylo izolováno 60 kolonií.

Ve vzorcích odpadních vod odebraných v létě byly přítomny převážně grampozitivní bakterie (86 %), nejčastěji ve tvaru koků. Z 95 vyizolovaných kolonií bylo 59 % pozitivních na katalázový test a na test oxidázový bylo pozitivních pouze 14 % kolonií. Ve vzorcích odpadních vod odebraných na podzim byly taktéž přítomny převážně grampozitivní bakterie (74 %), nejčastěji ve tvaru kokotýčinek. Z 60 vyizolovaných kolonií bylo na katalázový test 58 % pozitivních a na oxidázový test bylo pozitivních 61 % kolonií.

Identifikace bakterií byla provedena metodou MALDI/TOF a z původních 155 kolonií bylo spolehlivě identifikováno 77 bakterií a 3 kvasinky. Ve vzorcích odpadních vod z letního odběru se nejčastěji vyskytovaly bakterie rodu *Acinetobacter*, *Lactococcus* a *Staphylococcus*, naopak ve vzorcích odpadních vod odebraných na podzim se nejčastěji vyskytovaly bakterie rodu *Pseudomonas* a *Aeromonas*.

Stanovení produkce BA metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/Vis detekcí bylo provedeno u všech izolovaných kmenů (95 z letního odběru a 60 z podzimního odběru). Bylo zjištěno, že izolované bakterie jsou schopny v laboratorních podmínkách vyprodukovat BA v množství jednotek až tisíce mg/l. V letním odběru odpadních vod z mlékárenského průmyslu produkovaly izolované bakterie nejvíce putrescin, tyramin a spermin, naopak nejméně histamin a spermidin. Ze vzorků odpadních vod odebraných na podzim produkovaly izolované bakterie nejvíce spermin, tryptamin a tyramin a nejméně, stejně jako v letním odběru, histamin a spermidin.

Mezi izolované bakterie, které vyprodukovaly BA v koncentracích stovek nebo tisíce mg/l a které se podařilo identifikovat, patří: *Aeromonas caviae*, *Acinetobacter johnsonii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Microbacterium mitrae*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* a *Staphylococcus carnosus*.

V odebraných vzorcích vod byly stanoveny i obsahy dusitanů, dusičnanů, fosforečnanů a proteinů. V odpadních vodách mlékárenského průmyslu byly přítomny dusitany v maximálním množství 1,52 mg/l a dusičnany v maximálním množství 41,54 mg/l, jedná se koncentrace velmi nízké. Na rozdíl od fosforečnanů, které byly naměřeny v maximálním

množství 662,4 mg/l (používání tavících solí při výrobě mléčných výrobků). Proteiny pak byly stanoveny v maximálním množství 127,27 mg/l.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VODRÁŽKA Z., 1996: *Biochemie*, Praha Academia, ISBN 80-200-0600-1.
- [2] Wikipedie: Proteiny – obrázek [online]. [cit. 05-04-2018]. Dostupný na [www: https://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADlkovina#/media/File:ProteinStructures.png](https://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADlkovina#/media/File:ProteinStructures.png)
- [3] Wikipedie: Fenylalanin – obrázek [online]. [cit. 05-04-2018]. Dostupný na [www: https://cs.wikipedia.org/wiki/Fenylalanin#/media/File:Dekarboxylace_fenylalaninu.PNG](https://cs.wikipedia.org/wiki/Fenylalanin#/media/File:Dekarboxylace_fenylalaninu.PNG)
- [4] JURČOVÁ D., 2011: *Vliv složení binárních směsí fosforečnanových solí na růst mikroorganismů v tavených sýrech*, diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [5] ŠNIRC J., GOLIAN J., 2015: *Štruktúra, bioaktívne zložky a spracovanie mlieka*, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, ISBN 978-80-552-1311-8.
- [6] FOX P. E., McSWEENEY P. L. H., 2003: *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, New York, Kluwer Academic.
- [7] FOX P. E., McSWEENEY P. L. H., 2006: *Advanced Dairy Chemistry: Lipids*, New York, Springer.
- [8] GAJDŮŠEK S., 2003: *Laktologie*, Mendelova univerzita v Brně, ISBN 80-7157-657-3.
- [9] GREIF G., GREIFOVÁ M., 1998: *Výskyt biogénnych aminov v mliečnych produktech*, Mliekarstvo, 29/3, s. 33-36.
- [10] SHALABY A. R., 1996: *Significance of biogenic amines to food safety and human nutrition*, Food Research International, 29, s. 676-690.
- [11] KRAJNACOVÁ P., 2011: *Analýza biogenních aminů v sýrech infračervenou a ramanovou spektrometrií*, diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci.
- [12] CEDIDLOVÁ K., 2016: *Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými ze vzorků vod*, bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [13] PURVES D., AZGUSTINE G. J., FITZPATRICK D., 2001: *Neuroscience*, Sunderland (MA), Sinauer Associates, ISBN: 0-87893-742-0.
- [14] ALVAREZ M. M., MORENO-ARRIBAS M. V., 2014: *The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganism as a solution*, Trends in Food Science & Technology, vol. 39, issue 2, s. 146-155.

- [15] GREIF G., GREIFOVÁ M., 2004: *Vplyv teploty na dynamiku rastu a produkci zmíniv Escherichia coli*, Mliekarstvo, 35/2, s. 15-18.
- [16] KALAČ P., KRÍŽEK M., 1998: *Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě*, Czech Journal of Food Science, 16, s. 151-159.
- [17] ČERNÝ V., KVASNIČKOVÁ E., HAVLÍKOVÁ Š., KALHOTKA L., 2009: *Výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou v sýrech*, Mlékárenské listy č. 116, Výzkumný ústav mlékárenský Tábor při Mendelově univerzitě v Brně.
- [18] NOVELLA-RODRIGUEZ S., VECIANA-NOGUÉS M. T., TRUJILLO-MESA A. J., VIDAL-CAROU M. C., 2002: *Profile of Biogenic Amines in goat cheese made from pasteurized and pressurized milks*, Journal of Food Science, 67, s. 2940-2944.
- [19] BARDÓCZ S., 1993: *The role of dietary polyamines*, Eur.J.Clin.Nutr, 47, s. 683-690.
- [20] BURDYCHOVÁ R., KOMPRDA T., 2007: *Biogenic amine-forming microbial communities in cheese*, FEMS Microbiol. Lett, 276, s. 149-155.
- [21] KOMPRDA T., DOHNAL V., ZÁVODNÍKOVÁ R., 2008: *Contents of some biologically active amines in a Czech blue vein cheese*, Journal of Food Science, 26/6, s. 428-440.
- [22] KOMPRDA T., 2005: *Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu*, Veterinářství Brno, 10, s. 646-649.
- [23] NOVELLA-RODRIGUEZ S., VECIANA-NOGUÉS M. T., 2003: *Distribution of Biogenic Amines and Polyamines in cheese*, J. Agric Food Chem, 48(11), s. 5117-5123.
- [24] HŮLOVÁ M., 2013: *Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou z mléka a mléčných výrobků*, disertační práce, Mendelova univerzita v Brně.
- [25] VOTAVA M., 2001: *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun Brno, s. 129-133, ISBN: 80-902896-6-5.
- [26] BARTL V., 2001: *Vodní aktivita*, Maso, 1, s. 30-32.
- [27] KALAČ P., KRÍŽEK M., 2002: *Biogenní aminy a polyaminy v potravinách*, Výživa a potraviny, 1, s. 12-13.
- [28] LINARES D. M., 2012: *Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products*, Frontiers in Microbiology, 3, s. 180.

- [29] POJER P., 2011: *Výskyt biologicky účinných aminů a polyaminů ve vybraných druzích zrajících sýrů*, diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- [30] STRATTON J. E., HUTKINS R. W., TAYLOR S., 1991: *Biogenic amines in cheese and other fermented foods*, a review in *Journal of Food Protection*, 54, s. 460-470.
- [31] JOOSTEN H. M. L. G., 1988: *Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese*, *Netherlands Milk Dairy J.*, 42, s. 329-357.
- [32] JOOSTEN H. M. L. G., OLIEMAN C., 1986: *Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermosensitized reaction detection*, *J. of Chromatography*, 356, s. 311-319.
- [33] SLÁDKOVÁ P., KOMPRDA T., BURDYCHOVÁ R., 2007: *Skríning startovacích a probatických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů*, MZLU v Brně, 96, ISBN 978-80-7375-119-9-7.
- [34] ARENA M. E., MANCA DE NADRA M. C., PARDO I., SPANO G., 2007: *Biogenic amine production by Lactobacillus*, In *Journal of Applied Microbiology*, 90/2, s. 158-162.
- [35] ZAHRADNÍČEK O., 2003: *Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky*, In VOTAVA M., *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun Brno, ISBN 80-902896-6-5.
- [36] SILLA SANTOS M. H., 1996: *Biogenic amines: their importance in foods*, *Journal of Food science*, 29, s. 213-231.
- [37] BOVER-CID S., HOLZAPFEL H. W., 1999: *Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria*, *International Journal Of Food Microbiology*, 11, s. 73-84.
- [38] GALGANO F., SUZII G., FAVATI F., CARUSO M., MARTUSCELLI M., GARDINI F., SALZANO G., 2001: *Biogenic amines during in Semicotto Caprino cheese: role of enterococci*, *International Journal of Food Science and Technology*, 64, s. 105-107.
- [39] LOGAN N. A., DE VOS P., 2009: *Genus I Bacillus*, Vol. Three The Firmicutes, Springer, ISBN 978-03-387-95041-9.
- [40] RŮŽIČKA F., 2003: *Grampozitivní sportující aerobní tyčinky*, In VOTAVA M., *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun Brno, ISBN 80-902896-6-5.
- [41] JAY J. M., LOESSNER M. J., GOLDEN D. A., 2005: *Modern food microbiology*, New York, s. 790, ISBN 0-378-231800-3.

- [42] GÖRNER F., VALÍK L., 2004: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*, Malé Centrum, Bratislava, s. 528, ISBN: 80-967064-9-7.
- [43] MARTUSCELLI M., GARDINI F., TORRIANI S, MASTROCOLA D., SERIO A., CHAVEZ-LÓPEZ C., SUZZI G., 2005: *Production of biogenic amines during ripening of Pecorino Abruzzese cheese*, *International Dairy Journal*, 15, s. 571-578.
- [44] KLABAN V., 2001: *Svět mikrobů*, Gaudeamus, Univerzita Hradec Králové, s. 416, ISBN 80-7041-687-4.
- [45] MARINO M., MAIFRENI I., BARTOLOMEOLI I., RONDINI G., 2008: *Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices*, *Journal of Applied Microbiology*, 105/2, s. 540-549.
- [46] DUCKOVÁ V., ČANIGOVÁ M., 2004: *Psychrotrofná mikroflóra mlieka*, *Mliekarstvo*, 35/3, s. 32-35.
- [47] SUZZI G., GARDINI F., 2003: *Biogenic amines in dry fermented sausages*, a review in *International Journal of Food Microbiology*, s. 41-54.
- [48] LADERO V., SÁNCHEZ-LLANA E., FERNÁNDEZ M., ÁLVAREZ M. A., 2011: *Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions*, *Int.J.*, 46, s. 516-521.
- [49] NOVELA-RODRÍGUEZ S., VECIANA-NOGUÉS M. T., ROIG-SAGUÉS A. X., TRUJILLO-MESA A. J., VIDAL-CAROU M. C., 2004: *Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheese from pasteurized and raw milk*, *The journal of Dairy Research*, 71/2, s. 245-252.
- [50] HOUDKOVÁ M., 2012: *Pokyny pro mlékárenský průmysl*. Článek: 119766. [online]. [cit. 25-11-2017]. Dostupný na [www:](http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=119766)
- <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=119766>
- [51] BERESFORD T. P., FITZSIMONS N. A., BRENNAN N. L., COGAN T. M., 2001: *Recent advances in cheese microbiology*, *International Dairy Journal*, 11, s. 259-274.
- [52] FERNANDÉZ-GARCÍA E., TOMILLO J., NUNEZ M., 2000: *Formation of biogenic amines in raw milk Hispánico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture*, *Journal of Food Protection*, 63, s. 1551-1555.

- [53] Zákon č. 254/2001 Sb., zákon o vodách.
- [54] MAJER, P., 2011: *Odpady z mlékárenského průmyslu a jejich zpracování*, bakalářská práce, Mendelova univerzita v Brně.
- [55] Studijní materiál Vodovody a kanalizace Vsetín a.s. [online]. [cit. 28-11-2017]. Dostupný na [www](http://www.vakvs.cz/userfiles/admin/files/pro_skoly/odpadni_vody.pdf):
- http://www.vakvs.cz/userfiles/admin/files/pro_skoly/odpadni_vody.pdf
- [56] Integrovaná prevence a regulace znečištění, Návrh referenčního dokumentu o nejlepších dostupných technikách v průmyslu potravin, nápojů a mléka, 2005. [online]. [cit. 01-12-2017]. Dostupný na [www](https://www.mpo.cz/ippc/bref/--143226/):
- <https://www.mpo.cz/ippc/bref/--143226/>
- [57] MAREK M., VOLDŘICH M., 2006: *Odpady z potravinářských výroby v životním prostředí*, Vědecký výbor Fytosanitární a životní prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- [58] JUHASZ A. L., MAGESA G., 2004: *Waste management*, Enfield: Science Publishers, s. 355, ISBN 1-57808-323-0.
- [59] HORÁKOVÁ K., 2008: *Možnosti izolace a identifikace hygienicky významných bakterií ve vodách*, disertační práce, Masarykova univerzita v Brně.
- [60] TORTORELLO M. L., 2003: *Indicator organisms for safety and quality – uses and methods for detection*, J AOAC Nov-Dec, 86(6), s. 1208-1217.
- [61] ŠTĚPÁNEK M., 1979: *Hygienický význam životních dějů ve vodách*, Avicentrum Praha, 735 21-08/25, s. 587.
- [62] HÄUSLER J., 1995: *Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod*. Díl III. Praha, Stanovení mikrobiologických ukazatelů, Ministerstvo zemědělství ČR.
- [63] BARTAM J., COTRUVUO J., EXNER M., FRICKER C., GLASMACHER A., 2003: *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: The significance of HPCs for water quality and the human health*, WHO, Geneva.
- [64] MAIER R. M., PROPER I. L., GERBA C. P., 2000: *Environmental microbiology*. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney and Tokyo.

- [65] BAUDIŠOVÁ D., 2007: *Současné metody mikrobiologického rozboru vody, příručka pro hydroanalytické laboratoře*, Praha, Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka.
- [66] PAYMENT P., FRANCO E., 1993: *Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts*. Appl Environ Microbiol., 59, s. 2418-2424.
- [67] VEGER J., BAUDIŠOVÁ D., 1996: *Bakterie z čeledi Enterobacteriaceae ve vodním prostředí*, Praha, Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka.
- [68] HLISTOVÁ J., 2007: *Dekarboxylasová aktivita bakterií izolovaných z ryb*, diplomová práce, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.
- [69] LINDOVSKÁ E., 2005: *Souhrn a užití legislativních požadavků na odpadní vody v potravinářských provozech*, bakalářská práce, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.
- [70] Kromilk, a.s. [online]. [cit. 2018-04-06]. Dostupný na [www:](http://www.kromilk.cz/cz/mlekarna-syry-vyroba-soucasnost.html)
<http://www.kromilk.cz/cz/mlekarna-syry-vyroba-soucasnost.html>
- [71] Meteoblue Weather – obrázek [online]. [cit. 2018-04-06]. Dostupný na [www:](https://goo.gl/UGG9vX)
<https://goo.gl/UGG9vX>
- [72] Meteoblue Weather – obrázek [online]. [cit. 2018-04-06]. Dostupný na [www:](https://goo.gl/Jdrgvv)
<https://goo.gl/Jdrgvv>
- [73] HORÁKOVÁ M., LISCHKE P., GRÜNWARD A., 1989: *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. 2. vydání. Praha: SNTL.
- [74] VEVERKOVÁ L.: *Speciální metody instrumentální analýzy*. Úloha: Stanovení koncentrace NO_3^- iontů. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. [online]. [cit. 2018-04-06]. Dostupný na [www:](http://zaloha.remediace.cz/default.asp?id=6&uid=4&pmid=40&lang=0)
<http://zaloha.remediace.cz/default.asp?id=6&uid=4&pmid=40&lang=0>
- [75] ŠLECHTA J.: *Instrumentální metody*. Úloha: Ultrafialová a viditelná spektrometrie. VŠB-TU v Ostravě. [online]. [cit. 2018-05-09]. Dostupný na [www:](http://www.janslechta.net/odpadari/files/Stul%20c.%203_Spektrofotometrie-PO4.pdf)
http://www.janslechta.net/odpadari/files/Stul%20c.%203_Spektrofotometrie-PO4.pdf
- [76] *Biochemie živočichů*. Úloha: Stanovení koncentrace proteinů v roztoku. MENDELU v Brně. [online]. [cit. 2018-05-09]. Dostupný na [www:](https://goo.gl/LhcNLo)
<https://goo.gl/LhcNLo>

[77] RŮŽIČKA J., 1999: *Mikrobiologie pro technology životního prostředí*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 80-214-1374-3.

[78] Erba Lachema s.r.o., Brno: Příbalový leták OXItest.

[79] HLOBILOVÁ V., 2013: *Dusitany a dusičnany ve stravě – jejich negativa a pozitiva*, bakalářská práce, Masarykova univerzita v Brně.

[80] *Aplikace analytických metod do výuky hydrobiologie: Stanovení obsahu sloučenin dusíku ve vodách*. [online]. [cit. 2018-05-09]. Dostupný na www:

http://hydrobiologie.upol.cz/uploads/files/03_metody_stanoveni_obsahu_%20dusiku.pdf

[81] *Potravinářská revue: odborný časopis pro výživu, výrobu potravin a obchod*. 1/2009 s. 14-16. [online]. [cit. 09-05-2018]. Dostupný na www:

<http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/PZ/RE1-2009%20oprava.pdf>

[82] TŮMOVÁ B., 2014: *Fosfor ve výživě člověka*, bakalářská práce, Masarykova univerzita v Brně.

[83] KOČÍ V., BURKHARD J., MARŠÁLEK B., 2000: *Eutrofizace na přelomu tisíciletí*, VŠCHT v Praze, s. 3-13. [online]. [cit. 09-05-2018]. Dostupný na www:

http://www.daphne.cz/indikacezivin/images/eutro_tisic.pdf

[84] BORGENVIK M., 2012: *Intake of branched-chain amino acids influences the levels of MAFbx mRNA and MuR-1 total protein in resting and exercising human muscle*, Am J Physiol Endocrinol Metab. Mar. 1; 302 (5).

[85] LAZARO DE LA TORRE C. A., CONTE JUNIOR C. A., 2013: *Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin*, Sao Paulo, v. 50, s. 430-446 [online]. [cit. 09-05-2018]. Dostupný na www:

<https://pdfs.semanticscholar.org/0e84/64733bd063035fb5b0dcfad10e7931f5e558.pdf>

[86] CAPOZZI V., 2012: *Biogenic amines degradation by Lactobacillus plantarum: Toward a potential application in wine*, Frontiers in Microbiology, Apr.2, s. 122 [online]. [cit. 09-05-2018]. Dostupný na www:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3316997/>

[87] KENNETH R. J., GEORGE R. C, et. al., 2014: *Pathogenesis of Bacterial Infection*, Sherris Medical Microbiology, New York, s. 391-406, ISBN 978-0-07-181826-1.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyselina
ARG	Arginin
BA	Biogenní amin
BE	Beef extrakt (masový výtažek)
BHI	Brain heart infusion agar (živná půda)
BSA	Bovine Serum Albumine
CAD	Kadaverin
CBB	Coomassie Brilliant Blue G-250
ENDO	Endův agar (živná půda)
EMN	Elektromotorické napětí
G – / G +	Gramnegativní/grampozitivní
HIA	Histamin
HIS	Histidin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ISE	Kombinovaná iontově-selektivní elektroda
LYS	Lysin
MALDI	Laserová ionizace za účasti matrice
MPA	Masopeptonový agar (živná půda)
MPB	Masopeptonový bujón
MRS	M.R.S. agar (živná půda)
M17	M17 agar (živná půda)
ND	Nedetkováno
NED	<i>N</i> -(1-naftyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid
ORN	Ornitin

PEA	Fenylethylamin
PHE	Fenylalanin
PUT	Putrescin
SAB	Sabouradův agar (živná půda)
SB	Slanetz – Bartley agar (živná půda)
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
TOF	Analyzátor doby letu
TPA	Tryptamin
TRA	Tyramin
TRP	Tryptofan
TYA	Tryptone Yeast Extract Agar
TYR	Tyrosin
UV/Vis	Spektrofotometrický detektor měřící absorbanci vzorku v oblasti ultrafialového a viditelného záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Obecný vzorec aminokyseliny	14
Obr. 2: Vznik peptidové vazby [1]	15
Obr. 3: Struktura proteinů (a – primární; b – sekundární; c – terciální; d – kvartérní struktura) [2].....	16
Obr. 4: Kaseinová micela [4].....	18
Obr. 5: Dekarboxylace aminokyseliny fenylalaninu za vzniku biogenního aminu fenylethylaminu [3]	19
Obr. 6: Vývoj teplot v Kroměříži v období od 1. do 15. července 2017 [71].....	41
Obr. 7: Vývoj teplot v Kroměříži v období od 1. do 15. listopadu 2017 [72]	42
Obr. 8: Makroskopická charakteristika bakteriálních kolonií [12].....	48
Obr. 9: Závislost absorbance na koncentraci dusitanů (letní odběr).....	53
Obr. 10: Závislost absorbance na koncentraci dusitanů (podzimní odběr).....	54
Obr. 11: Závislost elektromotorického napětí na koncentraci dusičnanů (letní odběr).....	55
Obr. 12: Závislost elektromotorického napětí na koncentraci dusičnanů (podzimní odběr).....	56
Obr. 13: Závislost absorbance na koncentraci fosforečnanů (letní odběr)	58
Obr. 14: Závislost absorbance na koncentraci fosforečnanů (podzimní odběr)	59
Obr. 15: Závislost absorbance na koncentraci proteinů (letní odběr).....	61
Obr. 16: Závislost absorbance na koncentraci proteinů (podzimní odběr).....	63

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Složení hlavních typů kaseinů z hlediska aminokyselin [5,6,7].....	17
Tab. 2: Hlavní kategorie mléčných proteinů kravského mléka [5,8].....	18
Tab. 3: Základní přehled biogenních aminů podle Kalače a Křížka (1998) [16,12]	20
Tab. 4: Složení mléka – charakter disperze složek a jejich koncentrace v 1 litru mléka [5,7,8]	28
Tab. 5: Charakteristika odpadů z potravinářských výrob [56]	33
Tab. 6: Příprava kalibračních standardů pro stanovení dusitanů	43
Tab. 7: Příprava kalibračních standardů pro stanovení fosforečnanů.....	45
Tab. 8: Příprava kalibračních standardů pro stanovení proteinů dle Bradfordové	47
Tab. 9: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků dusitanů při vlnové déлке 550 nm (letní odběr).....	52
Tab. 10: Stanovení dusitanů v testovaných vzorcích odpadních vod (letní odběr)	53
Tab. 11: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků dusitanů při vlnové déлке 550 nm (podzimní odběr).....	54
Tab. 12: Stanovení dusitanů v testovaných vzorcích odpadních vod (podzimní odběr)	54
Tab. 13: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí kalibračních roztoků při potenciometrickém stanovení dusičnanů (letní odběr).....	55
Tab. 14: Stanovení dusičnanů v testovaných vzorcích odpadních vod (letní odběr)	55
Tab. 15: Naměřené hodnoty elektromotorického napětí kalibračních roztoků při potenciometrickém stanovení dusičnanů (podzimní odběr).....	56
Tab. 16: Stanovení dusičnanů v testovaných vzorcích odpadních vod (podzimní odběr).....	57
Tab. 17: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků fosforečnanů při vlnové déлке 698 nm (letní odběr).....	57
Tab. 18: Stanovení fosforečnanů v testovaných vzorcích odpadních vod (letní odběr).....	58
Tab. 19: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků fosforečnanů při vlnové déлке 698 nm (podzimní odběr).....	59
Tab. 20: Stanovení fosforečnanů v testovaných vzorcích odpadních vod (podzimní odběr).....	59
Tab. 21: Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků proteinů při vlnové déлке 595 nm (letní odběr).....	61
Tab. 22: Stanovení proteinů v testovaných vzorcích odpadních vod (letní odběr)	62

Tab. 23: Naměřené hodnoty absorpance kalibračních roztoků proteinů při vlnové délce 595 nm (podzimní odběr).....	62
Tab. 24: Stanovení proteinů v testovaných vzorcích odpadních vod (podzimní odběr)	63
Tab. 25: Výsledky identifikace bakterií pomocí MALDI/TOF (letní odběr).....	70
Tab. 26: Výsledky identifikace bakterií pomocí MALDI/TOF (podzimní odběr)	72
Tab. 27: Nejproduktivnější kmeny vzorku A (oplachová voda z tavrny)	75
Tab. 28: Nejproduktivnější kmeny vzorku B (oplachová voda formiček)	76
Tab. 29: Nejproduktivnější kmeny vzorku C (oplachová voda krémových sýrů typu žervé).....	77
Tab. 30: Nejproduktivnější kmeny vzorku D (venkovní kanál)	77
Tab. 31: Nejproduktivnější kmeny vzorku E (oplachová voda ze sýrárny)	78
Tab. 32: Nejproduktivnější kmeny vzorku F (oplachová voda z výroby specialit).....	79
Tab. 33: Nejproduktivnější kmeny vzorku G (oplachová voda formiček)	79
Tab. 34: Nejproduktivnější kmeny vzorku H (oplachová voda krémových sýrů typu žervé).....	80
Tab. 35: Nejproduktivnější kmeny vzorku I (venkovní kanál).....	80
Tab. 36: Nejproduktivnější kmeny vzorku J (oplachová voda z výroby tvarohu)	81
Tab. 37: Pořadí detekovaných BA produkovaných bakteriemi izolovanými ze vzorků vod z obou odběrů (letního a podzimního)	82

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Charakteristika narostených kolonií vzorek A (letní odběr)	99
Příloha 2: Charakteristika narostených kolonií vzorek B (letní odběr)	100
Příloha 3: Charakteristika narostených kolonií vzorek C (letní odběr)	101
Příloha 4: Charakteristika narostených kolonií vzorek D (letní odběr)	103
Příloha 5: Charakteristika narostených kolonií vzorek E (letní odběr)	104
Příloha 6: Charakteristika narostených kolonií vzorek F (podzimní odběr).....	105
Příloha 7: Charakteristika narostených kolonií vzorek G (podzimní odběr)	106
Příloha 8: Charakteristika narostených kolonií vzorek H (podzimní odběr)	107
Příloha 9: Charakteristika narostených kolonií vzorek I (podzimní odběr).....	108
Příloha 10: Charakteristika narostených kolonií vzorek J (podzimní odběr)	109
Příloha 11: Charakteristika jednotlivých kolonií vyizolovaných z letních vzorků odpadní vody	110
Příloha 12: Charakteristika jednotlivých kolonií vyizolovaných z podzimních vzorků odpadní vody	113
Příloha 13: Screening dekarboxylázové aktivity u vzorků odpadní vody A – E (letní odběr).....	115
Příloha 14: Screening dekarboxylázové aktivity u vzorků odpadní vody F – J (podzimní odběr)	118
Příloha 15: Stanovení produkce BA metodou HPLC – UV/Vis (letní odběr).....	120
Příloha 16: Stanovení produkce BA metodou HPLC – UV/Vis (podzimní odběr).....	123

**PŘÍLOHA 1: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK A (LETNÍ ODBĚR)**

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil
MPA (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	béžová	153	0,2	okrouhlý	hladký	ploché
M17 (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	bílá	20	0,5	okrouhlý	hladký	ploché
		mléčná	17	0,7	okrouhlý	hladký	vyvýšený
nažloutlá	21	2	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený		
MRS (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	mléčná	5	0,4	okrouhlý	hladký	vypouklý
BHI (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	oranžová	4	0,9	okrouhlý	hladký	vypouklý
		bílá	2	0,8	okrouhlý	zvlněný	vyvýšený
mléčná	30	2	okrouhlý	hladký	vypouklý		
ENDO (30 °C)	10 ⁰ ,10 ⁻¹	bez nárůstu bakterií					
SB (30 °C)	10 ⁰	mléčná	55	3	okrouhlý	zubatý	vypouklý
MPA (25 °C)	10 ⁰ ,10 ⁻¹	nepočítatelné					
SAB (25 °C)	10 ⁰	bílá	3	3,2	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
		béžová	62	12,5	okrouhlý	hladký	ploché
		žlutá	12	8,5	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		oranžová	2	10	okrouhlý	hladký	vyvýšený

PŘÍLOHA 2: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK B (LETNÍ ODBĚR)

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil
MPA (30 °C)	10 ⁰	béžová	1	2	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		bílá	1	10	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený
		mléčná	1	30	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10 ⁻¹	světle žlutá	1	0,9	okrouhlý	hladký	ploché
		mléčná	45	2	okrouhlý	hladký	vypouklý
		zelená	1	35	okrouhlý	hladký	vyvýšený
M17 (30 °C)	bez nárůstu bakterií						
MRS (30 °C)	10 ⁰	bílá až mléčná	3	5	okrouhlý	hladký	ploché
	10 ⁻¹	bílá	12	4	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		bílá	1	45	nepravidelný	brvitý	vypouklý
BHI (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	bílá	1	45	nepravidelný	brvitý	vypouklý
ENDO (30	bez nárůstu bakterií						
SB (30 °C)	bez nárůstu bakterií						
MPA (25 °C)	10 ⁰ ,10 ⁻¹	nepočítatelné					
SAB (25 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	bílá plíseň	1	50	-	-	-

PŘÍLOHA 3: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK C (LETNÍ ODBĚR)

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil	
MPA (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné						
	10 ⁻¹	bílá	1	1	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
		oranžová	103	1,2	okrouhlý	zvlněný	vypouklý	
		béžová	122	1,5	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
		žlutá	207	1,3	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
		mléčná	201	1	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
	10 ⁻²	bílá	-	-	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
		oranžová	58	1,2	okrouhlý	zvlněný	vypouklý	
		béžová	98	1,5	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
		žlutá	158	1,3	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
		mléčná	122	1	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
	M17 (30 °C)	10 ⁰ , 10 ⁻¹	nepočítatelné					
		10 ⁻²	béžová	52	2,5	okrouhlý	hladký	ploché
žlutá			22	2,5	nepravidelný	hladký	vypouklý	
mléčná			72	3	okrouhlý	hladký	ploché	
oranžová			5	1,5	okrouhlý	hladký	ploché	
bílá	5		1	okrouhlý	hladký	vypouklý		
MRS (30 °C)	10 ⁰	plísně	4	60	-	-	-	
		bílá	20	5	nepravidelný	zvlněný	vypouklý	
		bílá	15	3	okrouhlý	hladký	ploché	
	10 ⁻¹	béžová	4	2,8	okrouhlý	hladký	ploché	
		mléčná	15	1,3	okrouhlý	zvlněný	vyvýšený	
	10 ⁻²	béžová	1	2,5	okrouhlý	hladký	ploché	
mléčná	10	1,3	okrouhlý	zvlněný	vyvýšený			
BHI (30 °C)	10 ⁰ , 10 ⁻¹	nepočítatelné						
	10 ⁻²	béžová	10	2,9	okrouhlý	hladký	ploché	
		mléčná	82	2	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
		žlutá	22	1,3	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
		bílá	5	2	okrouhlý	hladký	ploché	
oranžová		4	3	okrouhlý	hladký	ploché		
ENDO (30 °C)	10 ⁰ i 10 ⁻¹	nepočítatelné						
	10 ⁻²	fialová	16	1,5	okrouhlý	hladký	vyvýšený	
		růžová	7	2	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený	
		oranžová	5	3	okrouhlý	hladký	vypouklý	
		růžová	8	3,2	okrouhlý	hladký	ploché	
bílá		2	10	nepravidelný	brvitý	bradavčitý		
SB (30 °C)	10 ⁰ i 10 ⁻¹	mléčná	321	1	okrouhlý	hladký	vypouklý	
	10 ⁻²	mléčná	16	1	okrouhlý	hladký	ploché	

MPA (25 °C)	$10^0, 10^{-1}$	nepočítatelné					
SAB (25 °C)	10^0	nepočítatelné					
	10^{-1}	bílá	2	4	okrouhlý	hladký	vypouklý
		zelená plíseň	5	3	okrouhlý	-	-
		běžová	20	2	okrouhlý	hladký	ploché
		mléčná	20	2	okrouhlý	hladký	vypouklý
		oranžová	8	3	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		růžová	2	1,6	okrouhlý	hladký	vyvýšený
	10^{-2}	nepočítatelné					

PŘÍLOHA 4: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK D (LETNÍ ODBĚR)

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil
MPA (30 °C)	$10^0, 10^{-2}$ i	nepočítatelné					
	10^{-3}	běžová	30	2	okrouhlý	hladký	vypouklý
		žlutá	14	8	okrouhlý	hladký	ploché
M17 (30 °C)	$10^0, 10^{-1}$	nepočítatelné					
	10^{-2}	oranžová	2	3	okrouhlý	hladký	vypouklý
		bílá	1	5	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený
		běžová	1	4	hvězdčovitý	zvlněný	ploché
		mléčná	5	2	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10^{-3}	bílá	22	1,8	okrouhlý	hladký	vypouklý
10^{-3}	běžová	1	8	okrouhlý	zvlněný	vyvýšený	
MRS (30 °C)	10^0-10^{-3}	nepočítatelné					
BHI (30 °C)	$10^0, 10^{-1}$	nepočítatelné					
	10^{-2}	oranžová	2	3	okrouhlý	hladký	ploché
		žlutá	2	1,8	nepravidelný	hladký	vypouklý
		běžová	11	4	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený
10^{-2}	mléčná	27	3,6	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený	
ENDO (30 °C)	$10^0, 10^{-1}$	nepočítatelné					
	10^{-2}	mléčná	3	4	okrouhlý	hladký	ploché
SB (30 °C)	$10^0, 10^{-1}$	mléčná	32	0,8	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10^{-2}	mléčná	7	0,8	okrouhlý	hladký	vypouklý
MPA (25 °C)	$10^0, 10^{-1}$	nepočítatelné					
	10^{-2}	mléčná	2	8	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		běžová	4	14	nepravidelný	hladký	vyvýšený
		žlutá	9	10	nepravidelný	hladký	vypouklý
$10^{-3}, 10^{-4}$	nepočítatelné						
SAB (25 °C)	$10^0, 10^{-2}$	nepočítatelné					
	10^{-3}	mléčná	1	15	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		bílá	3	10	okrouhlý	hladký	ploché
10^{-4}	běžová	2	2,5	okrouhlý	hladký	vypouklý	

**PŘÍLOHA 5: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK E (LETNÍ ODBĚR)**

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil
MPA (30 °C)	10 ⁻³	oranžová	14	3	okrouhlý	hladký	plochý
		světle oranžová	3	5	okrouhlý	hladký	vypouklý
		béžová	79	2	nepravidelný	hladký	vypouklý
		mléčná	82	2,6	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10 ⁻⁴	žlutá	2	2	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		béžová	3	2,6	okrouhlý	hladký	plochý
		mléčná	62	1,5	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
10 ⁻⁵	mléčná	5	25	okrouhlý	hladký	plochý	
M17 (30 °C)	10 ⁻³	oranžová	8	10	nepravidelný	zvlněný	plochý
		béžová	69	35	okrouhlý	hladký	plochý
		bílá	52	40	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10 ⁻⁴	nepočítatelné					
	10 ⁻⁵	nepočítatelné					
MRS (30 °C)	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴	bílá	202,	0,8	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10 ⁻⁵	bílá	70	0,8	okrouhlý	hladký	vypouklý
BHI (30 °C)	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴	nepočítatelné					
	10 ⁻⁵	bílá	2	55	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
		béžová	4	20	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
		mléčná	1	1,5	okrouhlý	hladký	vypouklý
		bílá	1	1	okrouhlý	hladký	vyvýšený
ENDO (30 °C)	10 ⁰ , 10 ⁻¹	nepočítatelné					
	10 ⁻²	fialová	9	1	okrouhlý	hladký	vypouklý
		růžová	13	2,3	okrouhlý	hladký	plochý
		oranžová	1	3	okrouhlý	zvlněný	vyvýšený
		růžová	5	3	okrouhlý	hladký	plochý
		bílá	1	10	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
SB (30 °C)	10 ⁻³	bílá	52	1,2	okrouhlý	hladký	plochý
	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵	nepočítatelné					
MPA (25 °C)	10 ⁻³	žlutá	2	3	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10 ⁻⁴	béžová	12	10	okrouhlý	hladký	plochý
		mléčná	6	8	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10 ⁻⁵	mléčná	6	2,3	okrouhlý	hladký	vypouklý
		béžová	4	4	okrouhlý	hladký	vypouklý
		oranžová	3	1,2	okrouhlý	hladký	vypouklý
SAB (25 °C)	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵	nepočítatelné					

**PŘÍLOHA 6: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK F (PODZIMNÍ ODBĚR)**

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil
MPA (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	žlutá	9	3	okrouhlý	hladký	ploché
		béžová	69	6	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		mléčná	28	0,6	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
M17 (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	bílá	14	4	okrouhlý	zvlněný	vypouklý
		béžová	85	3	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		oranžová	2	1	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený
MRS (30 °C)	10 ⁰	bílá	279	1	okrouhlý	hladký	ploché
	10 ⁻¹	mléčná	20	0,9	okrouhlý	hladký	vypouklý
BHI (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	béžová	120	4	okrouhlý	hladký	vypouklý
		bílá	3	3	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený
ENDO (30 °C)	10 ⁰	růžová	52	3	okrouhlý	hladký	ploché
	10 ⁻¹	růžová	25	3	okrouhlý	hladký	ploché
SB (30 °C)	10 ⁰	bílá	125	1	okrouhlý	hladký	ploché
		růžová	138	1,5	okrouhlý	hladký	ploché
MPA (25 °C)	10 ⁰ , 10 ⁻¹	nepočítatelné					
SAB (25 °C)	10 ⁰	béžová	53	2	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
		růžová	29	1,2	okrouhlý	hladký	ploché

**PŘÍLOHA 7: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK G (PODZIMNÍ ODBĚR)**

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil
MPA (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	mléčná	21	5	okrouhlý	hladký	plochý
		růžová	63	2	okrouhlý	hladký	vyvýšený
M17 (30 °C)	10 ⁰	nepočítatelné					
	10 ⁻¹	bílá	15	4	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
MRS (30 °C)	bez nárůstu bakterií						
BHI (30 °C)	10 ⁰ ,10 ⁻¹	nepočítatelné					
ENDO (30 °C)	bez nárůstu bakterií						
SB (30 °C)	bez nárůstu bakterií						
MPA (25 °C)	10 ⁰ ,10 ⁻¹	nepočítatelné					
SAB (25 °C)	10 ⁰	běžová	9	1,3	nepravidelný	zvlněný	plochý

**PŘÍLOHA 8: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK H (PODZIMNÍ ODBĚR)**

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil
MPA (30 °C)	10^0 - 10^{-2}	nepočítatelné					
M17 (30 °C)	$10^0, 10^{-1}$	nepočítatelné					
	10^{-2}	běžová	5	2	okrouhlý	hladký	ploché
MRS (30 °C)	$10^0, 10^{-1}$	nepočítatelné					
	10^{-2}	běžová	38	4	nepravidelný	hladký	ploché
BHI (30 °C)	10^0 - 10^{-2}	nepočítatelné					
ENDO (30 °C)	10^0 i 10^{-1}	nepočítatelné					
	10^{-2}	běžové	4	6	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		růžové	18	2	nepravidelný	hladký	vyvýšený
SB (30 °C)	bez nárůstu bakterií						
MPA (25 °C)	10^0 - 10^{-2}	nepočítatelné					
SAB (25 °C)	10^0 - 10^{-2}	nepočítatelné					

**PŘÍLOHA 9: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK I (PODZIMNÍ ODBĚR)**

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil
MPA (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻³	nepočítatelné					
	10 ⁻⁴	mléčné	132	3	okrouhlý	hladký	ploché
		běžové	108	3	okrouhlý	hladký	ploché
M17 (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻³	nepočítatelné					
	10 ⁻⁴	bílá	8	2	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený
		běžová	93	3	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený
		mléčná	120	4	okrouhlý	hladký	ploché
		oranžová	1	1,5	okrouhlý	hladký	vypouklý
růžová	3	2,3	okrouhlý	hladký	vypouklý		
MRS (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻³	nepočítatelné					
	10 ⁻⁴	bílá	139	1,5	okrouhlý	hladký	ploché
BHI (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻³	nepočítatelné					
	10 ⁻⁴	bílá	5	3	okrouhlý	hladký	ploché
		běžová	79	2,5	nepravidelný	hladký	vypouklý
oranžová	27	1	nepravidelný	zvlněný	vyvýšený		
ENDO (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻³	nepočítatelné					
	10 ⁻⁴	růžová	5	3	okrouhlý	hladký	ploché
		fialová	32	8	nepravidelný	hladký	vypouklý
SB (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻³	bílá	254	2	okrouhlý	hladký	ploché
	10 ⁻⁴	bílá	180	2	okrouhlý	hladký	ploché
SAB (25 °C)	10 ⁰ -10 ⁻³	nepočítatelné					
	10 ⁻⁴	růžová	29	1,7	okrouhlý	hladký	vyvýšený
		bílá	102	1,5	okrouhlý	hladký	ploché

**PŘÍLOHA 10: CHARAKTERISTIKA NAROSTENÝCH KOLONIÍ
VZOREK J (PODZIMNÍ ODBĚR)**

Typ živné půdy	Ředění vzorků	Barva	Počet	Velikost [mm]	Tvar	Okraj	Profil
MPA (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻³	nepočítatelné					
	10 ⁻⁴	bílá	193	4	okrouhlý	hladký	ploché
		běžová	17	3	okrouhlý	hladký	ploché
	10 ⁻⁵	bílá	150	4	okrouhlý	hladký	ploché
běžová		12	3	okrouhlý	hladký	ploché	
M17 (30 °C)	bez nárůstu bakterií						
MRS (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻⁴	nepočítatelné					
	10 ⁻⁵	bílá	72	1,2	okrouhlý	hladký	vypouklý
BHI (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻⁴	nepočítatelné					
	10 ⁻⁵	oranžová	42	2,5	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
		běžová	62	3	nepravidelný	zvlněný	vypouklý
		mléčná	109	4,7	okrouhlý	hladký	vypouklý
		bílá	11	1	okrouhlý	hladký	vyvýšený
ENDO (30 °C)	10 ⁰ -10 ⁻⁴	nepočítatelné					
	10 ⁻⁵	bílá	5	2,5	okrouhlý	hladký	ploché
		oranžová	17	3	okrouhlý	hladký	ploché
		růžová	5	5	okrouhlý	hladký	ploché
		fialová	1	1	okrouhlý	hladký	ploché
SB (30 °C)	bez nárůstu bakterií						
MPA (25 °C)	10 ⁻³	žlutá	2	3	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10 ⁻⁴	běžová	12	10	okrouhlý	hladký	ploché
		mléčná	6	8	okrouhlý	hladký	vypouklý
	10 ⁻⁵	mléčná	6	2,3	okrouhlý	hladký	vypouklý
		běžová	4	4	okrouhlý	hladký	vypouklý
		oranžová	3	1,2	okrouhlý	hladký	vypouklý
SAB (25 °C)	bez nárůstu bakterií						

**PŘÍLOHA 11: CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH KOLONIÍ
VYIZOLOVANÝCH Z LETNÍCH VZORKŮ ODPADNÍ VODY**

Vzorek	Teplota kultivace [°C]	Název kolonie	Barva	Kataláza	Oxidáza	Gramovo barvení	
A	30	A1	Bílá	-	+	G -	tyčky
	30	A2	Běžová	+	-	G +	koky
	30	A3	Oranžová	-	-	G +	tyčky
	30	A4	Mléčná	+	-	G +	tyčky
	30	A5	Bílá	-	-	G +	kokotyčky
	30	A6	Běžová	-	+/-	G +	tyčky
	30	A7	Bílá	-	+/-	G -	tyčky
	30	A8	Mléčná	-	-	G +	tyčky
	30	A9	Žlutá	-	-	G -	tyčky
	30	A10	Růžová	-	-	G +	tyčky
B	30	B1	Bílá	+/-	-	G +	koky
	30	B2	Běžová	-	-	G +	koky
	30	B3	Žlutá	+	-	G +	koky
	30	B4	Mléčná	-	-	G +	koky
	30	B5	Mléčná	+	-	G +	koky
	30	B6	Bílá	+	-	G +	koky
	30	B7	Bílá	-	-	G +	koky
C	30	C1	Žlutá	+	+	G +	tyčky
	30	C2	Bílá	+	-	G +	kokotyčky
	30	C3	Mléčná	+/-	-	G +	kokotyčky
	30	C4	Žlutá	+/-	-	G +	kokotyčky
	30	C5	Běžová	-	-	G +	kokotyčky
	30	C6	Žlutá	+	-	G +	koky
	30	C7	Mléčná	-	-	G +	kokotyčky
	30	C8	Žlutá	+	-	G +	kokotyčky
	30	C9	Běžová	+	-	G +	kokotyčky
	30	C10	Bílá	+	-	G +	koky
	30	C11	Žlutá	+	-	G +	koky
	30	C12	Bílá	-	-	kvasinka	
	30	C13	Mléčná	-	-	G +	řetízky
	30	C14	Běžová	-	-	G +	řetízky
	30	C15	Mléčná	-	-	G -	kokotyčky
	30	C16	Mléčná	-	-	G +	kokotyčky
	30	C17	Fialová	+	-	G +	koky
	30	C18	Růžová	+/-	-	G +	kokotyčky
	30	C19	Oranžová	+/-	-	G +	kokotyčky
	25	C20	Oranžová	+/-	-	G +	tyčky
	25	C21	Mléčná	+/-	+/-	G +	tyčky
	25	C22	Oranžová	+/-	-	G +	koky
	25	C23	Mléčná	+/-	-	kvasinka	

	25	C24	Růžová	-	-	kvasinka	
	25	C25	Bílá	-	-	kvasinka	
D	30	D1	Bílá	+	-	G +	koky
	30	D2	Žlutá	+	-	G +	koky
	30	D3	Mléčná	+	-	G +	koky
	30	D4	Žlutá	+	-	G +	koky
	30	D5	Oranžová	+	-	G +	kokotyčky
	30	D6	Žlutá	+	-	G -	tyčky
	30	D7	Běžová	-	-	G +	kokotyčky
	30	D8	Bílá	+	-	G +	koky
	30	D9	Mléčná	-	-	G +	kokotyčky
	30	D10	Běžová	+	-	G +	tyčky
	30	D11	Bílá	+	-	G +	tyčky
	30	D12	Oranžová	+	-	G -	kokotyčky
	30	D13	Nažloutlá	+	-	G +	Koky
	30	D14	Běžová	+	-	G +	koky
	30	D15	Mléčná	+ -	+	G -	tyčky
	30	D16	Bílá	-	+	G +	tyčky
	30	D17	Běžová	+	-	G -	kokotyčky
	30	D18	Běžová	+	-	G +	koky
	30	D19	Mléčná	+	-	G +	koky
	30	D20	Mléčná	+	-	G +	koky
	30	D21	Bílá	+	-	G +	koky
	30	D22	Žlutá	-	-	G -	tyčky
	30	D23	Bílá	-	-	G +	řetízky
	30	D24	Růžová	-	-	G +	tyčky
	30	D25	Fialová	-	+ -	G -	tyčky
	30	D26	Běžová	+	-	G -	kokotyčky
	25	D27	Oranžová	-	+ -	G +	tyčky
	25	D28	Žlutá	+	-	G +	tyčky
	25	D29	Běžová	+	-	G +	koky
E	30	E1	Oranžová	+ -	+ -	G +	tyčky
	30	E2	Běžová	+ -	-	G +	kokotyčky
	30	E3	Běžová	+	+	G -	tyčky
	30	E4	Mléčná	+	-	G +	koky
	30	E5	Mléčná	+	-	G +	koky
	30	E6	Běžová	+	-	G +	koky
	30	E7	Mléčná	-	-	G +	kokotyčky
	30	E8	Mléčná	-	-	G +	kokotyčky
	30	E9	Bílá	-	-	G +	kokotyčky
	30	E10	Žlutá	-	-	G +	koky
	30	E11	Mléčná	-	-	G +	kokotyčky
	30	E12	Mléčná	-	-	G +	kokotyčky
	30	E13	Bílá	+	-	G +	koky
	30	E14	Běžová	-	-	G +	kokotyčky
	30	E15	Bílá	-	-	G +	kokotyčky
	30	E16	Mléčná	-	-	G +	řetízky
	30	E17	Žlutá	-	-	-	-

	30	E18	Běžová	+	-	G +	koky
	30	E19	Oranžová	+ -	-	-	-
	30	E20	Růžová	+	+	G +	kokotyčky
	30	E21	Běžová	-	-	G +	tyčky
	25	E22	Oranžová	+	+ -	G +	tyčky
	25	E23	Běžová	+ -	-	G +	kokotyčky
	25	E24	Oranžová	+ -	+	-	-

**PŘÍLOHA 12: CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH KOLONIÍ
VYIZOLOVANÝCH Z PODZIMNÍCH VZORKŮ ODPADNÍ VODY**

Vzorek	Teplota kultivace [°C]	Název kolonie	Barva	Kataláza	Oxidáza	Gramovo barvení	
F	30	F1	Oranžová	+-	+-	G -	kokotyčky
	30	F2	Nažloutlá	+-	-	G +	koky
	30	F3	Béžová	+	+	G +	tyčky
	30	F4	Mléčná	+-	-	G +	koky
	30	F5	Bílá	-	+	G +	kokotyčky
	30	F6	Růžová	+-	-	G +	kokotyčky
	30	F7	Béžová	+	+	G -	tyčky
	30	F8	Mléčná	+-	-	G -	tyčky
	30	F9	Béžová	+	+	G -	tyčky
	30	F10	Růžová	+	+	G +	kokotyčky
	30	F11	Oranžová	-	-	G +	kokotyčky
	30	F12	Bílá	-	+-	G +	tyčky
	30	F13	Tmavě růžová	+	+	G +	tyčky
	30	F14	Světle růžová	-	+-	G +	kokotyčky
	30	F15	Bílá	-	+	G -	kokotyčky
	30	F16	Mléčná	+-	+	G +	kokotyčky
G	30	G1	Růžová	-	-	kvasinka	
	30	G2	Mléčná	+-	-	G +	kokotyčky
	30	G3	Béžová	+-	+-	G -	kokotyčky
	30	G4	Žlutá	+-	+	G +	tyčky
H	30	H1	Mléčná	+	+	G -	kokotyčky
	30	H2	Bílá	-	-	G +	řetízky
	30	H3	Bílá	-	-	G +	kokotyčky
	30	H4	Růžová	-	+-	kvasinka	
	30	H5	Béžová	+	+	G +	kokotyčky
	30	H6	Nažloutlá	+	-	G -	kokotyčky
	30	H7	Bílá	+	-	G +	koky
	30	H8	Žlutá	+-	+	G -	kokotyčky
	30	H9	Růžová	+-	+	G +	kokotyčky
I	30	I1	Nažloutlá	-	+	G +	tyčky
	30	I2	Béžová	-	+	G -	tyčky
	30	I3	Mléčná	+	+	G +	kokotyčky
	30	I4	Bílá	-	+	G +	kokotyčky
	30	I5	Béžová	-	+-	kvasinka	
	30	I6	Bílá	-	-	G +	koky
	30	I7	Žlutá	-	-	G +	koky
	30	I8	Světle růžová	-	-	kvasinka	
	30	I9	Nažloutlá	+-	+	G -	tyčky
	30	I10	Růžová	-	-	kvasinka	
	30	I11	Bílá	+	+-	G -	tyčky

	30	I12	Běžová	-	+ -	G -	tyčky
	30	I13	Bílá	+ -	-	G +	tyčky
	30	I14	Běžová	+ -	+	G +	tyčky
	30	I15	Mléčná	-	+	G +	tyčky
	30	I16	Světle žlutá	+ -	+	G +	tyčky
	30	I17	Růžová	+	+	G +	tyčky
	30	I18	Tmavě růžová	+	+	G +	kokotyčky
	30	I19	Bílá	+	+ -	G +	kokotyčky
	30	I20	Bílá	-	+	G +	kokotyčky
	J	30	J1	Růžová	+ -	+ -	G -
30		J2	Žlutá	+ -	-	kvasinka	
30		J3	Běžová	+ -	-	G +	řetízky
30		J4	Bílá	+	+	G +	kokotyčky
30		J5	Žlutá	-	-	G +	koky
30		J6	Růžová	-	-	G +	řetízky
30		J7	Bílá	-	-	G +	koky
30		J8	Běžová	+	+	G +	koky
30		J9	Žlutá	+	+ -	G +	tyčky
30		J10	Světle žlutá	-	-	kvasinka	
30		J11	Bílá	-	-	G +	koky

**PŘÍLOHA 13: SCREENING DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY U
VZORKŮ ODPADNÍ VODY A – E (LETNÍ ODBĚR)**

Vzorek	Dekarboxylace aminokyseliny						
	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
A1	-	-	-	+/-	+	+	-
A2	-	-	+/-	+	+	+	+
A3	-	-	-	+	+	-	-
A4	-	-	+	+	+	-	+
A5	-	-	-	-	+	-	-
A6	+/-	-	-	+	+	-	-
A7	+	+	+	+	+	+	+
A8	+	+	+	+	+	+	+
A9	+	+	+/-	+	+	+	+
A10	+	+	+/-	+	+	+	+
Vzorek	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
B1	+	+	-	+	+	+	+
B2	+	+	-	+	+	+	+
B3	+	+	-	+	+	-	+
B4	+	+/-	-	+	+	-	+/-
B5	+	+/-	-	+	+	-	-
B6	+	+/-	-	+	+	+	+
B7	-	+	-	+	+	+	+
Vzorek	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
C1	-	-	-	+	+	-	+
C2	+	-	-	-	+	-	-
C3	+	-	-	-	+	-	-
C4	+	-	-	-	+	-	-
C5	+	+	-	-	-	-	+
C6	+	+	-	+	+	-	+
C7	+	+	-	+	+	-	+
C8	+	-	+	+	+	+	+/-
C9	-	-	-	+	+	+	+
C10	-	-	-	+	+	-	+
C11	+/-	-	-	+	+	-	+
C12	-	-	-	+	-	-	-
C13	-	-	-	-	-	-	-
C14	-	-	-	-	-	-	-
C15	-	-	-	-	-	-	+
C16	+/-	-	-	-	+	-	+
C17	+	+	-	+	+	+	+
C18	+	+	-	+	+	+	+
C19	+	+	-	+	+	+	+
C20	+	+	-	+	+	+	+

C21	+	+	-	+	+	+	+
C22	+	+	-	+	+	+	+
C23	+	+-	-	+	+	+	+
C24	+	+	+-	+	+	+	+
C25	+	+	-	+	+	+	+
Vzorek	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
D1	+-	-	-	+-	+	-	+-
D2	+	-	-	+-	+	-	+-
D3	+	-	-	+	+	-	+
D4	+	-	-	+	+	-	+
D5	-	-	-	+	+	-	+
D6	-	-	-	+	+	-	+
D7	+	-	-	-	-	-	-
D8	+	-	-	+	+	+-	+-
D9	+	-	-	-	+	-	-
D10	+-	-	-	+	+	-	+
D11	+-	-	-	+	+	-	+
D12	-	-	-	-	-	-	+-
D13	+	-	-	+-	+-	-	+-
D14	-	-	-	-	+-	-	+
D15	-	-	-	-	-	-	-
D16	-	-	-	-	-	-	+-
D17	-	-	-	+	+	-	+
D18	-	-	-	-	-	-	+-
D19	+	+-	-	-	-	-	+-
D20	+	+-	-	-	+	-	+
D21	+	+	-	+-	+	-	+-
D22	+	+-	-	-	-	-	-
D23	+	-	+	+	+	-	+
D24	+	+	+	+	+	+	+
D25	+	+	+	+	+	+	+
D26	+	+	+	+	+	+	+
D27	+	+	+	+	+	+	+
D28	+	+	+	+	+	+	+
D29	+	-	+	+	+	-	+
Vzorek	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
E1	+	-	+	+	+	-	+
E2	+	+	+	+	+	-	+
E3	+	+	+	+	+	-	+
E4	+	+	+	+	+	+	+
E5	+	+-	+-	+	-	+	+-
E6	+	+-	+-	+	+	+	+
E7	+	+	+-	+	+	+	+
E8	+	-	+	+	+	+-	+

Vzorek	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
E9	+	+ -	+	+	+	+ -	+
E10	+	+	+	+	-	+	+
E11	+	+	+	+	-	-	+
E12	+	+ -	+	+	-	-	+
E13	+	+	+	+	-	+ -	+
E14	+	+	+	+	+	+	+
E15	+	+	+	+	+	+	+
E16	+	+	+	+	+	+	+
E17	+	+	+	+	+	+	+
E18	+	+ -	+	+	+	+ -	+
E19	+	+ -	+	+	+	+ -	+
E20	+	+ -	+ -	+ -	+	+ -	+ -
E21	+ -	+ -	+ -	+ -	+	+	+ -
E22	+ -	+ -	+	+	+	+	+
E23	+ -	+	-	-	+	+	+
E24	+ -	-	+	+	+	+	+

Poznámka: + výrazně pozitivní; + - pozitivní; - negativní; ARG arginin; PHE fenylalanin; HIS histidin; LYS lysin; ORN ornitin; TRP tryptofan; TYR tyrosin

**PŘÍLOHA 14: SCREENING DEKARBOXYLÁZOVÉ AKTIVITY U
VZORKŮ ODPADNÍ VODY F – J (PODZIMNÍ ODBĚR)**

Vzorek	Dekarboxylace aminokyseliny						
	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
F1	+	+ -	-	+ -	+ -	-	-
F2	+	+	-	+	+	+ -	+
F3	+	+	+	+	+	+	+
F4	+	+	-	+	+	+ -	+
F5	+ -	-	-	+ -	+ -	-	+ -
F6	+	+	+ -	+	+	+ -	+
F7	+	+	+	+	+	+	+
F8	+	+	+ -	+	+	+	+
F9	+	+	+	+	+	+	+
F10	+	+	+	+	+	+	+
F11	+	+	-	+	+ -	+ -	+
F12	+	+	+	+	+	+	+
F13	+	+	+	+	+	+	+
F14	+	+	-	+	+ -	-	+ -
F15	+	+ -	-	+	+	+ -	+
F16	+	-	-	+	-	-	+ -
Vzorek	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
G1	+	+ -	-	+	+	+ -	+
G2	+	+	-	+	+	+ -	+
G3	+	+	-	+	+	+	+
G4	+	+	-	+	+	+	+
Vzorek	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
H1	+	+	+	+	+	+	+
H2	+	+	-	+	+	-	+
H3	+	+ -	-	+ -	+ -	-	-
H4	+	+	+ -	+	+ -	+ -	+
H5	+	+	+	+	+	+	+
H6	+	+	+	+	+	+	+
H7	+	+	+ -	+	+	+	+
H8	+	+	+	+	+	+ -	+
H9	+	+	+	+	+	+	+
Vzorek	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
I1	+	+	+ -	+	+	+	+
I2	+	+	+ -	+	+	+	+
I3	+	+	+	+	+	+	+
I4	+	+	+	+	+	+	+
I5	+	+ -	-	+ -	+ -	+ -	+
I6	+	+ -	-	+ -	+ -	-	+
I7	+	+ -	-	+ -	-	-	-

I8	+	+	-	+	+	+	+
I9	+	+ -	-	+	+ -	+	+
I10	+	+	-	+	+	-	+
I11	+	+	+	+	+	+ -	+
I12	+	-	-	+	+	-	+
I13	+	+	+	+	+	+	+
I14	+	+	+	+	+	+	+
I15	+	+	+	+	+	+	+
I16	+	+	-	+	+	+	+
I17	+	+	-	+	+	+	+
I18	+	+	+ -	+	+	+	+
I19	+	+	+ -	+	+	+	+
I20	+	+	-	+	+	+ -	+
Vzorek	ARG	PHE	HIS	LYS	ORN	TRP	TYR
J1	+	+	-	+	+	+ -	+
J2	+	+	-	+	+	+ -	+
J3	-	-	-	-	+ -	-	+ -
J4	-	-	-	+ -	+ -	-	-
J5	-	-	-	+ -	-	-	-
J6	-	-	-	+ -	-	-	-
J7	-	-	-	+ -	+ -	-	-
J8	-	-	-	+ -	-	-	-
J9	-	-	-	+ -	-	-	-
J10	+ -	+ -	-	+ -	+	-	+ -
J11	-	-	-	+ -	-	-	-

Poznámka: + výrazně pozitivní; + - pozitivní; - negativní; ARG arginin; PHE fenylalanin; HIS histidin; LYS lysin; ORN ornitin; TRP tryptofan; TYR tyrosin

**PŘÍLOHA 15: STANOVENÍ PRODUKCE BA METODOU HPLC –
UV/VIS (LETNÍ ODBĚR)**

Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
A1	43,32	21,54	23,53	9,58	11,19	701,18	ND	41,73	852,06
A2	37,16	10,15	18,18	ND	5,39	42,93	ND	33,06	146,86
A3	31,53	12,80	15,20	29,23	11,66	249,79	3,48	26,31	380,00
A4	32,47	ND	ND	ND	3,40	15,57	ND	33,51	84,94
A5	29,29	7,22	19,42	7,29	5,08	27,08	ND	41,55	136,91
A6	34,39	4,46	14,65	3,60	5,39	31,23	27,07	39,52	160,30
A7	75,95	6,93	514,28	32,35	7,63	33,04	25,68	48,45	744,31
A8	67,54	8,07	1042,5	22,29	ND	11,87	17,99	29,89	1200,1
A9	103,73	6,06	1092,8	17,13	4,34	17,28	14,58	21,25	1277,2
A10	43,89	3,93	478,72	31,42	ND	24,68	26,19	46,12	654,95
Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
B1	34,02	3,56	27,41	4,32	ND	16,21	21,38	44,89	151,80
B2	40,06	ND	625,17	23,34	ND	18,11	23,25	45,36	775,29
B3	37,04	3,56	326,29	13,83	ND	17,16	22,32	45,13	465,33
B4	59,51	6,75	126,97	11,96	3,27	33,44	17,97	47,16	307,04
B5	47,17	4,82	260,69	28,86	3,77	19,49	23,14	42,23	430,18
B6	60,45	ND	1178,0	18,29	ND	15,69	14,19	23,94	1310,5
B7	73,46	ND	882,11	25,84	4,74	20,43	21,28	40,96	1068,8
Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
C1	73,36	5,94	436,49	43,65	ND	34,04	21,64	45,51	660,63
C2	44,49	14,55	42,33	ND	20,46	30,66	33,78	55,99	242,26
C3	42,87	7,49	9,63	ND	ND	35,45	29,33	40,91	165,69
C4	45,54	12,99	61,43	14,59	15,07	503,78	1,38	54,11	708,89
C5	29,30	8,54	33,63	ND	9,52	21,37	ND	34,63	136,98
C6	75,50	8,32	26,71	422,26	ND	64,08	ND	31,64	628,50
C7	42,19	7,90	10,99	4,85	3,14	22,96	ND	66,30	158,32
C8	39,31	7,86	16,41	ND	9,24	31,25	ND	66,91	170,97
C9	135,09	11,79	486,32	333,95	11,03	90,00	ND	244,54	1312,7
C10	38,81	8,45	19,99	ND	13,36	23,40	ND	40,61	144,62
C11	28,94	4,37	9,72	ND	3,97	26,33	ND	52,64	125,96
C12	33,47	15,08	18,03	9,16	14,27	515,46	3,22	37,44	646,13
C13	23,29	6,11	15,30	6,59	6,17	24,80	0,22	51,08	133,55
C14	36,27	6,33	10,42	ND	3,80	42,52	0,40	67,08	166,82
C15	40,35	19,91	20,02	26,98	7,31	405,89	2,48	49,33	572,26
C16	25,15	4,93	7,95	171,69	4,69	219,82	ND	49,82	484,05
C17	54,21	15,53	22,67	254,67	8,54	249,04	ND	27,79	632,45

C18	20,67	1,97	6,40	61,25	1,41	29,74	ND	49,77	171,21
C19	48,63	6,87	13,60	160,76	6,05	20,14	ND	35,50	291,54
C20	28,54	8,13	12,11	6,51	6,53	42,10	ND	55,77	159,67
C21	71,17	9,99	22,11	263,92	8,20	27,98	0,25	47,09	450,70
C22	58,48	9,03	21,98	52,20	9,53	37,73	ND	65,76	254,72
C23	53,07	13,61	24,13	2,81	4,80	27,92	0,18	53,02	179,54
C24	60,51	8,65	234,88	55,92	10,61	24,23	ND	42,55	437,36
C25	73,40	12,88	664,62	45,56	5,28	308,18	ND	30,83	1140,7
Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
D1	69,40	17,25	21,89	ND	23,36	49,38	ND	51,48	232,76
D2	52,10	10,55	15,38	10,04	8,42	33,08	ND	79,92	209,49
D3	72,73	10,11	20,63	94,76	19,76	32,60	ND	51,52	302,11
D4	67,88	20,74	91,80	113,64	13,25	327,33	ND	47,37	682,01
D5	44,06	22,54	275,49	63,95	15,13	588,44	ND	28,59	1038,2
D6	51,52	3,65	792,69	68,24	2,56	25,07	ND	51,47	995,21
D7	40,18	5,63	10,86	ND	11,45	21,21	ND	37,80	127,13
D8	40,75	4,72	13,89	ND	5,50	39,83	ND	60,92	165,60
D9	45,54	7,09	ND	ND	4,59	36,52	ND	64,45	158,18
D10	31,50	14,56	17,55	10,84	13,12	50,53	ND	87,46	225,57
D11	63,95	29,36	23,74	14,43	16,74	779,27	ND	20,65	948,14
D12	73,05	16,91	20,60	160,11	16,87	147,11	ND	58,69	493,33
D13	53,71	4,79	13,35	277,59	ND	35,67	ND	63,89	448,99
D14	32,41	6,94	8,44	7,39	8,66	116,13	ND	53,85	233,83
D15	56,79	6,94	29,44	22,02	ND	38,22	ND	61,68	215,08
D16	26,40	5,08	11,63	170,32	3,88	18,95	ND	29,23	265,50
D17	35,21	14,37	23,84	11,06	11,29	44,17	ND	67,84	207,77
D18	20,09	ND	5,09	ND	ND	27,35	ND	40,28	92,81
D19	47,01	7,02	9,90	4,28	3,62	27,27	ND	44,58	143,68
D20	41,56	3,73	123,68	11,46	2,19	32,40	ND	58,62	273,64
D21	70,01	5,02	35,62	28,72	8,40	35,61	ND	71,66	255,04
D22	53,63	7,27	190,48	5,71	6,52	36,74	ND	70,71	371,06
D23	40,04	9,52	109,48	5,66	4,13	44,30	ND	91,26	304,39
D24	32,82	4,04	ND	7,15	ND	36,96	ND	55,97	136,93
D25	44,83	8,11	15,38	82,04	10,43	60,33	ND	59,82	280,92
D26	52,59	41,12	ND	31,19	7,38	32,22	ND	60,71	225,23
D27	57,13	27,77	20,78	11,71	12,44	713,25	ND	64,81	907,89
D28	27,65	5,15	5,07	ND	ND	41,14	ND	59,08	138,08
D29	52,60	4,94	9,63	45,51	ND	30,32	ND	48,42	191,42
Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
E1	12,93	9,72	8,19	4,40	ND	21,01	3,13	33,12	92,49

Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
E2	52,21	7,78	18,07	176,45	4,80	66,49	ND	47,58	373,38
E3	21,54	ND	15,64	136,93	ND	28,53	ND	44,49	247,12
E4	44,78	6,38	15,94	57,08	4,90	26,91	ND	54,17	210,15
E5	55,81	5,61	20,51	101,82	6,46	24,25	ND	49,02	263,48
E6	28,50	10,98	12,66	5,90	4,85	27,06	ND	33,72	123,68
E7	28,69	5,45	12,70	7,77	ND	24,10	ND	43,74	122,45
E8	31,35	5,36	467,87	23,23	4,86	21,93	ND	29,72	584,32
E9	29,35	3,07	5,82	ND	ND	21,92	ND	35,00	95,15
E10	51,41	8,79	22,16	94,29	4,28	31,05	ND	35,60	247,57
E11	25,58	ND	9,95	39,35	ND	19,53	ND	36,61	131,02
E12	38,29	6,36	8,41	3,83	4,25	20,34	ND	33,90	115,39
E13	38,64	8,21	10,32	3,54	ND	33,62	ND	42,88	137,22
E14	41,75	5,85	12,03	6,15	3,08	27,35	ND	47,60	143,81
E15	50,36	7,02	14,35	85,28	4,54	27,85	ND	37,03	226,42
E16	26,80	7,14	13,05	7,70	4,62	30,34	ND	39,17	128,83
E17	26,60	8,25	38,05	43,18	8,57	22,22	ND	33,60	180,47
E18	39,80	14,10	307,90	42,42	12,74	570,54	ND	29,94	1017,4
E19	14,93	7,04	14,77	7,12	3,89	20,94	ND	47,07	115,75
E20	38,03	6,25	4,65	ND	ND	27,55	ND	39,72	116,19
E21	27,44	5,13	20,10	24,13	4,07	30,26	ND	61,83	172,97
E22	45,80	4,52	17,71	39,25	ND	18,57	ND	38,73	164,58

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno

**PŘÍLOHA 16: STANOVENÍ PRODUKCE BA METODOU HPLC –
UV/VIS (PODZIMNÍ ODBĚR)**

Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
F1	101,25	36,46	13,27	15,32	28,52	40,84	0,03	55,80	291,47
F2	ND	16,78	7,20	4,75	3,55	28,03	0,14	69,85	130,31
F3	ND	3,61	6,66	1,85	ND	21,43	0,15	55,89	89,59
F4	299,73	101,96	32,63	34,38	30,89	76,89	0,09	52,44	629,00
F5	ND	10,64	4,72	3,58	2,01	27,42	0,11	55,46	103,94
F6	ND	11,79	2,80	2,66	1,97	24,94	0,05	56,63	100,84
F7	16,75	8,05	4,81	4,78	2,59	14,66	0,10	30,63	82,37
F8	8,02	14,48	3,24	3,67	2,19	17,76	0,08	30,73	80,18
F9	ND	5,08	4,25	2,40	ND	15,43	0,11	38,20	65,47
F10	ND	4,63	2,83	1,62	ND	19,91	0,07	44,98	74,03
F11	ND	3,90	2,89	1,68	ND	20,76	0,07	57,68	86,97
F12	ND	6,75	53,35	2,10	1,58	20,04	0,02	61,25	145,09
F13	ND	2,10	3,41	ND	ND	15,59	0,04	32,85	53,98
F14	ND	4,46	7,58	2,64	1,96	19,17	0,10	42,90	78,81
F15	ND	2,63	3,16	2,41	ND	16,90	0,02	45,78	70,90
F16	ND	1,93	3,99	1,61	ND	11,20	0,09	26,60	45,41
Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
G1	ND	5,41	4,14	2,63	1,56	22,59	0,03	28,05	64,41
G2	ND	7,73	5,50	4,57	2,86	33,01	0,22	36,39	90,27
G3	ND	6,94	5,17	434,59	ND	18,08	0,11	38,86	503,74
G4	ND	5,19	3,85	67,29	3,93	17,62	0,09	35,82	133,79
Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
H1	84,17	39,27	11,65	12,96	21,41	39,71	0,09	46,76	256,02
H2	ND	4,26	3,10	2,45	ND	25,11	0,05	47,59	82,56
H3	80,71	23,75	20,24	15,98	25,88	58,46	0,05	52,24	277,30
H4	45,14	16,76	6,43	9,94	9,20	16,69	0,04	13,96	118,17
H5	ND	8,51	8,01	3,54	1,99	30,12	0,16	52,15	104,48
H6	ND	2,03	4,38	16,95	ND	10,19	0,08	26,84	60,47
H7	14,15	17,16	30,68	12,51	7,69	31,66	0,06	50,29	164,21
H8	9,50	3,91	8,69	5,65	4,20	24,69	0,26	42,05	98,94
H9	ND	2,50	5,38	3,40	2,30	20,84	0,14	46,99	81,54
Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
I1	ND	3,44	52,76	9,63	6,38	99,69	0,01	21,64	193,55
I2	ND	3,48	47,28	2,53	ND	17,71	0,01	51,50	122,51
I3	462,37	205,16	112,61	103,95	107,75	215,81	0,17	52,75	1260,5
I4	34,84	8,50	16,20	5,94	4,75	78,54	0,02	27,73	176,54

I5	ND	13,01	3,16	3,45	1,95	28,55	0,06	51,64	101,82
I6	ND	1,99	2,47	7,06	ND	18,79	0,06	45,37	75,74
I7	ND	14,85	3,10	3,21	1,80	24,21	0,05	45,44	92,64
I8	ND	ND	ND	1,27	ND	16,28	0,08	35,34	52,96
I9	20,85	14,62	5,14	5,08	7,09	18,37	0,12	26,14	97,42
I10	ND	1,67	ND	1,36	ND	11,04	0,06	24,91	39,04
I11	ND	10,98	8,06	5,70	1,93	23,92	0,09	42,36	93,03
I12	ND	12,59	6,48	3,78	1,97	23,80	0,04	33,00	81,66
I13	8,94	5,27	6,53	7,24	5,41	21,99	0,03	39,59	95,01
I14	5,77	8,73	9,02	4,30	3,27	25,66	0,08	41,94	98,78
I15	9,57	7,80	42,35	5,77	6,51	19,24	ND	27,40	118,63
I16	25,52	15,51	68,71	32,25	10,41	28,13	0,09	29,93	210,56
I17	ND	9,95	38,24	3,10	2,60	23,31	ND	34,74	111,94
I18	148,36	127,32	26,85	37,87	34,50	69,50	0,07	36,51	480,98
I19	127,08	37,61	13,50	28,20	31,61	43,47	0,05	26,98	308,50
I20	ND	ND	2,38	ND	ND	12,23	0,06	30,22	44,89
Vzorek	TPA	PEA	PUT	CAD	HIA	TRA	SPD	SPM	Σ_{BA}
J1	ND	2,46	51,52	15,20	ND	19,07	ND	29,38	117,63
J2	97,37	24,81	31,87	21,15	15,73	43,88	0,11	53,12	288,05
J3	ND	2,85	4,45	3,29	2,16	17,58	0,06	33,43	63,82
J4	ND	4,30	20,42	3,09	ND	48,49	ND	31,61	107,91
J5	ND	6,06	10,92	6,34	3,16	13,09	0,10	24,90	64,56
J6	16,82	8,85	8,57	4,40	6,64	28,98	0,04	41,90	116,20
J7	351,00	130,73	26,87	38,77	24,61	80,60	ND	40,75	693,34
J8	ND	4,44	4,75	19,67	2,33	18,60	0,07	48,95	98,80
J9	17,88	11,88	4,95	6,17	4,76	23,85	ND	50,60	120,09

Poznámka: TPA tryptamin; PEA fenylethylamin; PUT putrescin; CAD kadaverin; HIA histamin; TRA tyramin; SPD spermidin; SPM spermin; ND nedetekováno