

Skríning a izolace celulolyticky pozitivních mikroorganismů z ekosystémů

Jana Slováčková

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Jana Slováčková
Osobní číslo:	T22130
Studijní program:	B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace:	Ochrana životního prostředí
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Skríning a izolace celulólytický pozitivních mikroorganismů z ekosystémů

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část
Celulólytická aktivita.
Bakterie v životním prostředí rozkládající celulózu.
II. Praktická část
Izolace a identifikace bakterií z ekosystémů.
Skríning celulólytické aktivity.
Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- UFRESNE, Alain. Preparation and Applications of Cellulose Nanomaterials. *Chemistry Africa* [online]. 2023, 6(5), 2219-2236 [cit. 2023-11-22]. ISSN 2522-5758. Dostupné z: doi:10.1007/s42250-022-00542-x
- MIKHAILIDI, Aleksandra, Irina VOLF, Dan BELOSINSCHI, Bogdan-Marian TOFANICA a Elena UNGUREANU. Cellulose-Based Metallogels—Part 1: Raw Materials and Preparation. *Gels* [online]. 2023, 9(5) [cit. 2023-11-22]. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels9050390
- Pratima Gupta, Kalpana Samant, Avinash Sahu, "Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential", *International Journal of Microbiology*, vol. 2012, Article ID 578925, 5 pages, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/578925>
- Shivanand, P., Mugeraya, G. & Kumar, A. Utilization of renewable agricultural residues for the production of extracellular halostable cellulase from newly isolated Halomonas sp. strain PS47. *Ann Microbiol* 63, 1257–1263 (2013). <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0583-8>

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

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2025

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se věnuje izolaci a charakterizaci celulolytických mikroorganismů z různých přírodních vodních ekosystémů. Pomocí selektivních kultivačních technik a specifických biochemických testů byly identifikovány kmeny schopné rozkládat celulózu. Byla stanovena jejich enzymatická aktivita vyjádřená celulolytickým indexem a provedeno srovnání zastoupení těchto mikroorganismů mezi sladkovodními a slanými vodami. Výsledky ukazují výraznou diverzitu izolovaných bakterií i rozdíly v jejich degradačním potenciálu. Práce přináší poznatky o ekologické roli celulolytických mikroorganismů a zdůrazňuje jejich význam pro biotechnologické aplikace, jako je kompostování nebo výroba bioenergie.

Klíčová slova: celulóza, ekosystém, mikroorganismy, degradace, biotechnologie

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on the isolation and characterization of cellulolytic microorganisms from various natural aquatic ecosystems. Using selective culture techniques and specific biochemical assays, strains capable of degrading cellulose were identified. Their enzymatic activity, expressed as a cellulolytic index, was determined and the abundance of these microorganisms was compared between freshwater and saltwater. The results show a significant diversity of the isolated bacteria and differences in their degradation potential. The work provides insights into the ecological role of cellulolytic microorganisms and highlights their importance for biotechnological applications such as composting or bioenergy production.

Keywords: cellulose, ecosystem, microorganisms, degradation, biotechnology

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Pavel Pleva, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a podporu během celé doby zpracování práce. Dále děkuji laborantkám Ing. Veronice Kučabové a Mgr. Markétě Havlištové, které mi umožnily laboratorní práci a ochotně poskytovaly technickou pomoc. Velké díky patří rovněž mé rodině a přátelům za jejich trvalou podporu, pochopení a motivaci v průběhu celého studia.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CELULOLYTICKÁ AKTIVITA	13
1.1 CELULÓZA.....	13
1.1.1 Amorfnní celulóza.....	14
1.1.2 Krystalická celulóza	14
1.2 HYDROLÝZA CELULÓZY	15
1.2.1 Enzymový systém celulózy	16
1.3 ENVIROMENTÁLNÍ VÝZNAM CELULÓZY	16
1.3.1 V ekosystému	17
1.3.2 Pro technologie a biotechnologie	18
2 MIKROORGANISMY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ ROZKLÁDAJÍCÍ CELULÓZU.....	19
2.1 BAKTERIE ROZKLÁDAJÍCÍ CELULÓZU	19
2.1.1 Grampozitivní bakterie.....	20
2.1.2 Gramnegativní bakterie	20
2.2 ARCHEA	21
2.2.1 Thermofilní archea	21
2.2.2 Halofilní archea	21
2.2.3 Methanogenní archea	22
2.3 PLÍSŇE A HOUBY.....	22
2.4 SYMBIOTICKÝ VZTAH MEZI HOUBAMI A BAKTERIEMI	22
3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ CELULOLYTICKOU AKTIVITU	23
3.1 STRUKTURNÍ VLASTNOSTI SUBSTRÁTU	23
3.2 INHIBICE ENZYMŮ A VEDLEJŠÍ PRODUKTY HYDROLÝZY.....	23
3.3 SYNERGISMUS MEZI ENZYMÝ	24
3.4 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ FAKTORY	24
3.5 VLIV SLOŽENÍ ENZYMOVÉHO KOKTEJLU.....	24
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	25
4 CÍL PRÁCE	26
5 MATERIÁL	27
5.1 VZORKY	27
5.2 NÁSTROJE A VYBAVENÍ	27
5.3 CHEMIKÁLIE.....	28
5.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	28

6	METODIKA.....	31
6.1	ODBĚR VZORKŮ.....	31
6.2	IZOLACE MIKROORGANISMŮ.....	31
6.2.1	Desítkové ředění.....	31
6.2.2	Křížový roztěr.....	32
6.3	OPTIMALIZACE METODY STANOVENÍ CELULOLYTICKÉHO POTENCIÁLU	33
6.3.1	Výběr vhodného selektivního agaru a způsobu barvení.....	33
6.3.2	Celulolytický index	35
6.4.1	KOH test.....	35
6.4.2	Gramovo barvení.....	35
6.4.3	Biochemické testy	36
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
7.1	IZOLACE MIKROORGANISMŮ.....	37
7.2	STANOVENÍ CELULOLYTICKÉHO POTENCIÁLU IZOLÁTŮ	39
7.3	IDENTIFIKACE VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ	41
7.3.1	KOH test a Gramovo barvení.....	41
7.3.2	Biochemické testy	43
7.4	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ CELULOLYTICKÝCH A NECELULOLYTICKÝCH MIKROORGANISMŮ	45
	ZÁVĚR.....	48
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49
	SEZNAM OBRÁZKŮ	54
	SEZNAM TABULEK.....	55
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	56

ÚVOD

Celulóza je jedním z nejrozšířenějších biopolymerů na Zemi a tvoří hlavní složku rostlinné biomasy. Přestože je její rozklad klíčovým procesem v globálním koloběhu uhlíku, je tento proces díky strukturní odolnosti celulózy poměrně složitý. Celulolytické mikroorganismy, mezi něž patří různé druhy bakterií a hub, hrají v tomto rozkladu zásadní roli. Tyto mikroorganismy produkují enzymy, které umožňují degradaci celulózy na jednodušší sacharidy, čímž podporují rozklad organické hmoty v přírodních ekosystémech.

Z ekologického hlediska tedy mikroorganismy výrazně přispívají k recyklaci organické hmoty, uvolňují živiny zpět do půdy a podporují růst rostlin. Tento přirozený proces degradace rostlinného materiálu ovlivňuje složení půdních společenstev a stabilitu ekosystémů. Díky schopnosti adaptace na extrémní podmínky lze tyto mikroorganismy nalézt v různorodých prostředích, od lesních půd až po průmyslové odpady.

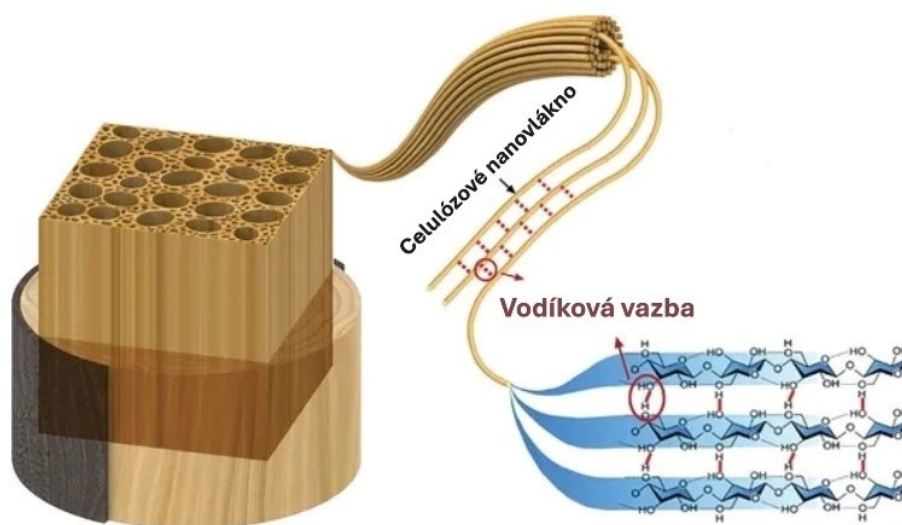
V biotechnologiích nacházejí celulolytické mikroorganismy široké uplatnění. Jejich enzymy, celulózy, jsou klíčové pro výrobu bioethanolu jakožto udržitelné alternativy fosilních paliv. Dále se využívají v papírenském průmyslu, při výrobě textilií nebo v potravinářství. Díky rostoucímu zájmu o udržitelná řešení se výzkum těchto mikroorganismů stále rozvíjí s cílem optimalizovat jejich využití v průmyslových procesech.

Tato bakalářská práce se věnuje skríningu a izolaci celulolytických pozitivních mikroorganismů z vybraných ekosystémů, charakterizaci jejich enzymatické aktivity a posuzuje jejich potenciální aplikace. Výsledky mohou přispět k hlubšímu pochopení ekologických funkcí těchto mikroorganismů i k jejich efektivnímu využití v biotechnologiích.

I TEORETICKÁ ČÁST

1 CELULOLYTICKÁ AKTIVITA

Celulóza, která je nejrozšířenějším přírodním biopolymerem tvořící přibližně 50 % biomasy, má zásadní význam. Její využívání sahá až k počátkům lidské civilizace, avšak v posledních dekádách přitahuje zvýšenou pozornost díky možnostem úpravy jejích vlastností na nanometrické úrovni. Zmenšením materiálu na nanoúroveň (Obrázek 1) dochází k odhalení zcela nových vlastností, což platí právě i pro celulózu (Dufresne, 2023).



Obrázek 1 Struktura nanocelulózy

(upraveno dle: DISPOSABLE-TABLEWARE.COM, 2024)

Některé bakterie dokáží nejen celulózu rozkládat, ale i syntetizovat. Bakteriální celulóza hraje roli při ochraně mikroorganismů před nepříznivými vlivy prostředí a pomáhá jim přizpůsobit se proměnlivým podmínkám. Zároveň může poskytovat ochranu proti působení antibiotik, což souvisí s procesy patogeneze – bakterie by mohly využívat celulózy ke zrušení vazby na biofilm (Mon *et al.*, 2024).

1.1 Celulóza

Celulóza je polymer tvořený glukózovými jednotkami propojenými β -1,4-glykosidickými vazbami a představuje nejrozšířenější formu fotosynteticky fixovaného uhlíku na Zemi. Bakterie hrají klíčovou roli v koloběhu uhlíku díky své schopnosti přeměňovat celulózu na jednodušší substráty. Nicméně její enzymatická hydrolýza je náročná kvůli pružnosti glykosidických vazeb. Struktura celulózy zahrnuje jak krystalické, tak amorfni oblasti a je pevně propojena s dalšími polymery, jako jsou hemicelulózy, pektiny a lignin.

Nejvyšší úroveň rozkladu celulózy byla zaznamenána u specializovaných celulolytických mikroorganismů, které produkují komplexní směs enzymů působících synergicky při rozkladu celulózy i přidružených složek buněčné stěny (Mon *et al.*, 2024).

1.1.1 Amorfni celulóza

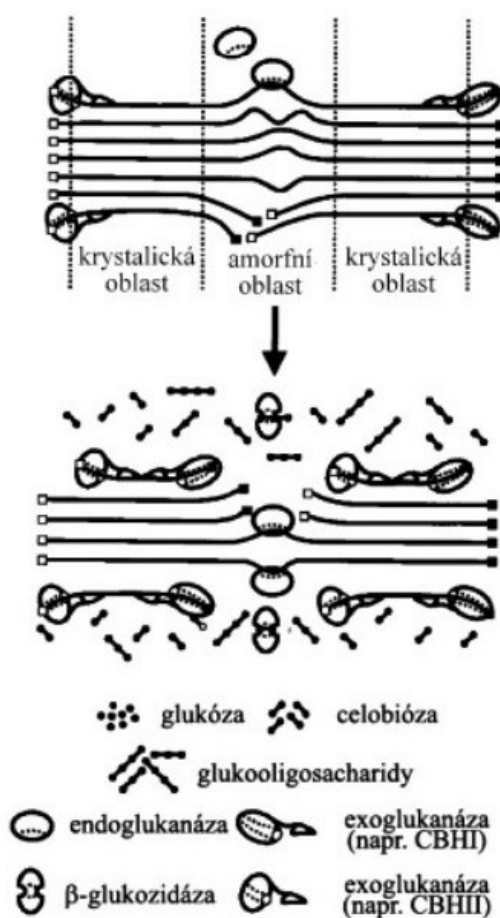
Amorfni celulóza představuje neuspořádanou formu celulózy s nižší krystalinitou a nepravidelným uspořádáním molekulárních řetězců. Na rozdíl od krystalické celulózy, která je tvořena vysoce organizovanými doménami s pevnými vodíkovými vazbami, amorfni celulóza obsahuje nepravidelně orientované segmenty s nižším stupněm polymerace a vyšší dostupností hydroxylových skupin. Tento neuspořádaný charakter jí propůjčuje odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, včetně vyšší rozpustnosti a reaktivity, což ji činí vhodnou pro chemické modifikace a biotechnologické aplikace. Amorfni celulóza se získává různými metodami, například mechanickým zpracováním (např. kryogenním mletím), chemickými úpravami (např. regeneračními procesy) nebo enzymatickou degradací. V rámci experimentálních studií byla izolována amorfni celulóza z pláštěnců pomocí kryogenního mletí a regeneračních strategií, přičemž byla analyzována její luminiscenční aktivita. Tento materiál vykazuje odlišné optické vlastnosti, které souvisejí s nepravidelným uspořádáním celulózových řetězců a přítomností kyslíkových atomů v molekulární struktuře (Jin *et al.*, 2023).

1.1.2 Krystalická celulóza

Krystalická celulóza je vysoce organizovaná forma celulózy složená z krystalických a amorfních oblastí. Krystalické zóny, tvořené pravidelně uspořádanými řetězci glukózy spojenými β -1,4-glykosidickými vazbami, jí propůjčují vysokou pevnost, stabilitu a nízkou rozpustnost ve vodě. Díky těmto vlastnostem nachází široké využití v biotechnologiích, výrobě biodegradovatelných materiálů a medicíně. Získává především z rostlinné biomasy, jako je dřevo, zemědělské odpady (sláma, slupky, stonky) a specializované energetické plodiny. Alternativním zdrojem jsou bakterie, které syntetizují celulózu prostřednictvím enzymového komplexu celulózové syntázy. Oproti rostlinným zdrojům umožňuje bakteriální produkce vyšší čistotu materiálu, lepší kontrolu nad strukturou a ekologičtější způsob výroby. V závislosti na použitém zdroji se mohou vlastnosti krystalické celulózy lišit – například dřevní celulóza má vyšší mechanickou pevnost, zatímco celulóza ze zemědělských odpadů je ekonomicky výhodnější. Výběr vhodného zdroje a metody extrakce tak hraje klíčovou roli v její průmyslové aplikaci (Emenike *et al.*, 2023).

1.2 Hydrolýza celulózy

Hydrolýza sacharidů je klíčovým procesem, při kterém dochází k rozkladu polysacharidů na jednodušší cukry, jako jsou oligosacharidy, disacharidy a nakonec monosacharidy. Tento proces je katalyzován hydrolytickými enzymy, především amylázami, celulázami a glukosidázami, které štěpí glykosidické vazby mezi jednotlivými cukernými jednotkami. Sacharidy, zejména celulóza a hemicelulóza, mohou být obtížně hydrolyzovatelné kvůli své složité struktuře a přítomnosti ligninu. K efektivní hydrolýze těchto polymerů je proto zapotřebí specifických enzymů (viz Obrázek 2) nebo dalších chemických a fyzikálních úprav. Rychlost a účinnost hydrolýzy závisí na několika faktorech, včetně typu sacharidu, přítomnosti inhibitorů a podmínek prostředí, jako je pH a teplota. Tento proces je klíčový pro biologické a průmyslové aplikace, například při výrobě bioethanolu nebo potravinářských produktů (Bioenergy Engineering, 2023).



Obrázek 2 Schéma enzymatické hydrolýzy celulózy celulázovým komplexem

(zdroj: Hůrková, 2012)

1.2.1 Enzymový systém celulázy

Enzymy celulázy jsou produkovány různými organismy, včetně bakterií, hub a některých bezobratlých. Patří do různých rodin glykosidových hydroláz a hrají zásadní roli v degradaci celulózy. Celulózový enzymový systém se skládá ze tří hlavních tříd rozpustných extracelulárních enzymů, které společně zajišťují efektivní rozklad celulózy na jednodušší sacharidy (Mon *et al.*, 2024).

Endoglukanáza je zodpovědná za náhodné štěpení β -1,4-glykosidických vazeb podél celulózového řetězce, čímž vytváří nové koncové skupiny. Exoglukanáza následně působí na neredukující konce celulózového řetězce a odštěpuje celobiózové jednotky nebo elementární fibrily z krystalické celulózy. Posledním krokem rozkladu je působení β -glukosidázy, která hydrolyzuje celobiózu a rozpustné celulodextriny na glukózu. Tato glukóza může být dále využita v metabolických procesech nebo mineralizována na vodu a oxid uhličitý. Vzájemná synergie všech tří enzymů je nezbytná pro efektivní degradaci celulózy, ať už v přírodních ekosystémech nebo v průmyslových aplikacích zaměřených na využití obnovitelných zdrojů (Gupta *et al.*, 2012).

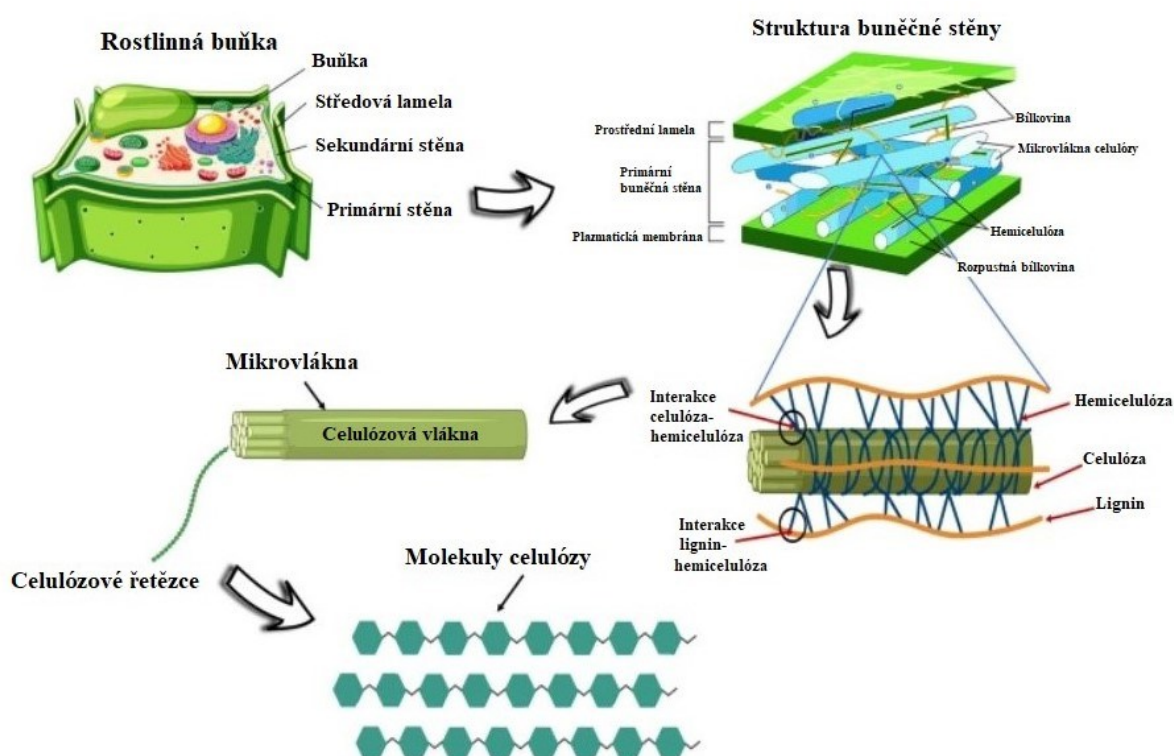
1.3 Enviromentální význam celulózy

Enzymatická přeměna obnovitelné celulózové biomasy na biopaliva tvoří klíčový základ pro moderní výrobu bioethanolu. Při této výrobě z celulózové biomasy představuje enzymatická hydrolýza celulózy na zkvasitelné cukry přibližně 30 % celkových nákladů. Proto je nezbytné důkladně porozumět procesu enzymatické hydrolýzy, aby bylo možné vyvinout efektivní model, který umožní optimalizaci podmínek a vytvoření ekonomicky výhodného systému. Tento proces je však značně složitý, protože celulóza je velmi komplexní substrát a její hydrolýza probíhá heterogenním způsobem. Přeměna celulózy na glukózu tak zahrnuje více kroků, než by odpovídalo klasickým kinetickým modelům enzymových reakcí (Olkiewicz *et al.*, 2022).

V posledních letech také výrazně vzrostl zájem o materiály z biologických zdrojů, a to díky jejich vysokému potenciálu pro výrobu hodnotných produktů s minimálním dopadem na životní prostředí. Úpravou celulózy na nanometrické měřítko se otevírají dveře k unikátním vlastnostem, které slibují široké uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích (Dufresne, 2023).

1.3.1 V ekosystému

V přírodě se celulóza běžně se získává především z rostlin a rostlinného odpadu. Rostliny jsou hlavním zdrojem celulózy (Obrázek 3), avšak jejich pěstování vyžaduje dlouhé produkční cykly a rozsáhlé plochy, což může být z hlediska efektivity i udržitelnosti omezením. Proto se stále více pozornosti zaměřuje na alternativní zdroje celulózy, mezi něž patří některé mikroorganismy a řasy (Katyal *et al.*, 2023).



Obrázek 3 Struktura rostlinné buňky

(upraveno dle: Salimi *et al.*, 2024)

Fotosyntéza rostlin fixuje CO_2 a každý rok produkuje přibližně 1011 tun sušiny, přičemž celulóza tvoří více než polovinu této hmoty. Tato biomasa je důležitým obnovitelným bio zdrojem, který lze využít k výrobě paliv, chemikálií a dalších materiálů. Nicméně nevhodné nakládání s těmito biomasami může poškodit ekosystémy a zdraví lidí. V přírodě jde hlavně o biodegradaci lignocelulózové biomasy. Mikroorganismy produkují celulázové enzymy, které efektivně rozkládají celulózu, čímž přispívají k recyklaci živin a cyklu uhlíku. I když bakterie rychleji rostou, houby jsou silnějšími producenty celulózy a hrají tak větší roli v tomto procesu. Enzymy vylučované těmito organismy (např. celobio–hydroláza, endoglukanáza a β –glukosidázy) umožňují účinný rozklad celulózy a podporují udržitelnost přírodních ekosystémů (Roy *et al.*, 2024).

1.3.2 Pro technologie a biotechnologie

Kromě bakterií jsou producenty celulózy také některé druhy řas, například *Gelidium elegans*, *Posidonia oceanica* a *Nannochloropsis oceanica*. Produkce celulózy u řas je zajímavým výzkumným tématem, které nabývá na významu z hlediska udržitelnosti, neboť tyto organismy mohou představovat udržitelnější alternativu k rostlinným zdrojům. Řasy navíc rostou rychleji než vyšší rostliny, nevyžadují zemědělskou půdu a mohou být kultivovány ve sladkovodních i mořských prostředích, což z nich činí atraktivní surovinu pro biotechnologické aplikace (Katyal *et al.*, 2023).

Celulóza získaná ze dřeva a jiných rostlinných zdrojů může být upravena do podoby nanocelulózy, která díky své malé velikosti vzhledem k velkému povrchu nabízí jedinečné vlastnosti. V environmentálních technologiích se nanocelulóza uplatňuje jako vysoce účinný biosorbent pro odstraňování těžkých kovů a dalších škodlivých látek z vody a odpadních vod. Její biodegradabilita a obnovitelnost z ní činí ekologicky šetrnou alternativu k vlastnosti. V environmentálních technologiích se nanocelulóza uplatňuje jako vysoce účinný biosorbent pro odstraňování těžkých kovů a dalších škodlivých látek z vody a odpadních vod. Její biodegradabilita a obnovitelnost z ní činí ekologicky šetrnou alternativu k syntetickým sorbentům. Vývoj efektivních a udržitelných metod syntézy nanosorbentů s vysokou adsorpční kapacitou proto představuje klíčový krok k širšímu využití celulóзовých materiálů v moderních technologiích a biotechnologiích (Rocky *et al.*, 2023).

2 MIKROORGANISMY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ ROZKLÁDAJÍCÍ CELULÓZU

Mikroorganismy z životního prostředí hrají klíčovou roli v rozkladu celulózy a jsou významným zdrojem enzymů celulázového systému. Nejeфекtivnější mikrobiální systémy se nacházejí ve střevech organismů, které se živí celulóзовou biomasou, jako jsou termiti nebo larvy některých motýlů. V přírodě však bylo popsáno mnoho mikroorganismů s celulolytickými aktivitami, a to jak mezi houbami, tak mezi bakteriemi. Tyto mikroorganismy produkují široké spektrum enzymů, které umožňují efektní degradaci celulóзовé biomasy. Z bakteriálních druhů se na hydrolýze celulózy podílejí jak aerobní, tak anaerobní mikroorganismy. Celulolytické mikroorganismy jsou klíčovými hráči v přirozených procesech rozkladu rostlinné biomasy a mohou být využity i v biotechnologických aplikacích zaměřených na udržitelnou produkci bioenergie a dalších produktů založených na obnovitelných zdrojích (Gupta *et al.*, 2012).

2.1 Bakterie rozkládající celulózu

Celulózu mohou rozkládat různé druhy bakterií, které hrají klíčovou roli v cyklu uhlíku a přirozené degradaci celulóзовé biomasy v přírodních ekosystémech. Mezi nejvýznamnější bakterie zodpovědné za degradaci celulózy patří rody *Clostridium*, *Trichonympha*, *Ruminococcus*, *Bacteroides* a *Butyrivibrio*, které se vyskytují v trávicím traktu herbivorních živočichů a hmyzu, kde napomáhají trávení celulózy. Tyto bakterie produkují specifické celulolytické enzymy, které jsou schopné efektně štěpit celulóзовá vlákna na jednodušší cukry, které mohou následně využít pro svou energetickou potřebu. Bakterie tedy nejen že rozkládají celulózu na jednoduché cukry, ale také přispívají k obnově ekosystémů tím, že umožňují recyklaci organické hmoty. Díky jejich schopnosti rozkládat celulózu a jiné lignocelulóзовé materiály, jsou nepostradatelnými účastníky biogeochemických cyklů a představují klíčové mikroorganismy pro udržitelnost přírodních ekosystémů. Tento proces je rovněž využíván v průmyslových aplikacích, kde bakterie a jejich enzymy pomáhají v recyklaci odpadu a výrobě biopaliv, což má pozitivní dopad na životní prostředí (Katyal *et al.*, 2023).

Bakterie se schopností rozkladu celulózy můžeme rozdělit podle několika různých vlastností jako je například potřeba kyslíku, podle ekosystému, ve kterém se vyskytují nebo podle teplotních preferencí. V této práci jsem si vybrala dělení podle buněčné stěny.

2.1.1 Grampozitivní bakterie

Přítomnost celulytických enzymů byla zjištěna u grampozitivní bakterie *Clostridium thermocellum* (Lamed *et al.*, 1987).

Mezi nejvýznamnější grampozitivní bakterie degradující celulózu patří zástupci rodu *Bacillus*, kteří se vyskytují v různých ekosystémech a jsou často studováni pro svou schopnost produkovat celulózu. Byl izolován kmen *Bacillus subtilis*, který byl již dříve identifikován jako významný zdroj genů pro celulózu, přičemž různé studie uvádějí, že velká část celulytických bakteriálních izolátů pochází právě z tohoto rodu. Některé studie potvrdily, že druhy jako *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* a *B. megaterium* produkují enzymy schopné efektivně degradovat celulózu. Produkce enzymů u těchto bakterií závisí na podmínkách kultivace, jako je pH, teplota a koncentrace inokula, přičemž optimální podmínky vedou k výraznému zvýšení enzymatické aktivity. Kromě rodu *Bacillus* se mezi gram-pozitivní celulytické bakterie řadí také aktinomycety, například zástupci rodu *Paenarthrobacter* nebo *Mycobacterium*, kteří rovněž vykazují schopnost produkovat celulózu štěpící enzymy (Li *et al.*, 2023).

2.1.2 Gramnegativní bakterie

Vedle grampozitivních bakterií se na rozkladu celulózy podílí i řada gramnegativních bakterií, mezi které patří například zástupci rodů *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* nebo *Chryseobacterium*. Některé studie identifikovaly gramnegativní bakterie s celulytickou aktivitou v různých prostředích, včetně půdních ekosystémů a sedimentů. Například druh *Stenotrophomonas sp.* izolovaný z půdy vykázal schopnost rozkládat celulózu za optimálních růstových podmínek. Další gramnegativní bakterie, *Thermoanaerobacterium sp.*, byla izolována z tropické suché půdy a prokázala schopnost degradovat celulózu i při vyšších teplotách. Studie zaměřené na optimalizaci kultivačních podmínek těchto bakterií ukázaly, že enzymatická aktivita celulózy produkované gramnegativními bakteriemi závisí na pH, teplotě a době inkubace. Například druhy *Acinetobacter* a *Branhamella* vykazovaly různé hladiny celulózy aktivy v závislosti na těchto faktorech. Přestože gramnegativní bakterie obecně nejsou tak často spojovány s produkcí celulózy štěpících enzymů jako grampozitivní bakterie, jejich adaptabilita a enzymatická aktivita naznačují jejich potenciál pro biotechnologické aplikace (Li *et al.*, 2023).

2.2 Archea

Archaea hrají nepřímou, ale klíčovou roli v celulolytické aktivitě v batoru přežvýkavců, především prostřednictvím syntrofní spolupráce s celulolytickými bakteriemi. Celulózu v batoru rozkládají hlavně bakterie, jako jsou *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens*, které ji přeměňují na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, vodík a oxid uhličitý. Přítomnost metanogenních archeí, které využívají H_2 k produkci metanu, pomáhá snižovat koncentraci vodíku, čímž zabraňují zpětné inhibici celulolytických enzymů a umožňují efektivnější fermentaci celulózy (Abubakr *et al.*, 2014).

2.2.1 Termofilní archaea

Termofilní archaea se vyskytují v extrémních prostředích s vysokými teplotami, jako jsou hydrotermální prameny, hlubokomořské sedimenty nebo průmyslové anaerobní fermentory. Některé druhy se podílejí na degradaci celulózy v anaerobních podmínkách, kde často spolupracují s celulolytickými bakteriemi. Přestože neprodukují klasické celulázy, využívají syntrofní metabolismus k rozkladu fermentačních produktů, jako jsou acetát, vodík a metanogenní substráty. Díky své odolnosti vůči vysokým teplotám jsou termofilní archaea perspektivní pro biotechnologické aplikace, zejména při produkci bioplynu a bioethanolu. Jejich přítomnost v anaerobních fermentorech umožňuje stabilnější a efektivnější degradaci lignocelulóзовé biomasy, což z nich činí klíčové pomocníky v rozkladu organických materiálů v průmyslovém měřítku (Tsavkelova *et al.*, 2018).

2.2.2 Halofilní archaea

Extrémně halofilní archaea tvoří významnou součást mikrobiálních komunit v prostředích s vysokým obsahem solí, přičemž většina kultivovaných druhů využívá jednoduché cukry nebo peptidy jako zdroj uhlíku. Nedávné studie odhalily, že některé halofilní archaea jsou schopny růstu na nerozpustných polysacharidech, včetně celulózy. Tyto mikroorganismy využívají dva rozdílné přístupy k rozkladu celulózy. Některé druhy se specializují na efektivní degradaci celulózy díky vysoké enzymatické aktivitě, zatímco jiné jsou metabolicky flexibilnější a využívají širší spektrum živin. Transport glukózy a celooligosacharidů probíhá prostřednictvím ABC transportérů a porterů, přičemž intracelulární metabolismus glukózy je regulován buď glykolýzou, nebo semifosforylační Entner–Doudoroffovou dráhou, v závislosti na konkrétním kmeni. (Elcheninov *et al.*, 2023).

2.2.3 Methanogenní archea

Methanogenní archaea hrají důležitou roli v anaerobním rozkladu celulózy, především jako součást komplexního mikrobiálního společenstva, které se podílí na degradaci lignocelulózové biomasy. Samotné methanogeny sice neprodukují celulózy, ale spoléhají na fermentativní mikroorganismy, jako jsou střevní protisté a bakterie, které celulózu rozkládají na jednodušší cukry a fermentační produkty, zejména acetát, vodík a oxid uhličitý. Jsou klíčovým článkem anaerobního potravního řetězce, ve kterém uzavírají cyklus uhlíku přeměnou celulóзовé biomasy na methan, jenž může být dále využit jako zdroj energie. Tento proces je nejen důležitý pro přírodní uhlíkový cyklus, ale také má praktické využití v biotechnologiích, například při výrobě bioplynu z rostlinné biomasy (Kaneko *et al.*, 2024).

2.3 Plísně a houby

Také plísně mají významnou roli v přirozeném rozkladu celulóзовé biomasy díky produkci celulóзовých enzymů. Mezi dominantní rody patří *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Myceliophthora* a *Penicillium*, které efektivně degradují celulózu a přispívají k recyklaci organické hmoty v ekosystémech. Nicméně optimalizace jejich enzymatické aktivity a sacharifikační účinnosti zůstává výzvou. Bylo prokázáno, že úspěšná degradace celulózy vyžaduje spolupráci několika enzymů v rámci celulóзовého konsorcia. Proto se zaměřuje výzkum na genetické modifikace těchto hub s cílem zvýšit produkci vysoce účinných celuláz s lepší stabilitou (pH, teplota), vyšší výtěžností a sníženou inhibicí substrátem. K dosažení těchto vylepšení se využívají pokročilé strategie genetické manipulace, které umožňují cílenou úpravu enzymatických mechanismů a zvyšují efektivitu přirozené biodegradace celulózy (Mondal *et al.*, 2022).

2.4 Symbiotický vztah mezi houbami a bakteriemi

Během aerobního kompostování je celulóza nepřetržitě štěpena enzymy celulázami, které uvolňují celulolytické mikroorganismy, zejména bakterie a houby. V počátečních fázích kompostování rozklad celulózy zajišťují především aerobní bakterie, které produkují extracelulární celulózy a zahajují degradaci celulóзовých vláken. V pozdějších fázích kompostování přebírají dominantní roli houby, které stabilizují proces rozkladu a zároveň podporují přeměnu ligninu. Tento synergický systém bakterie-houby umožňuje efektivní degradaci lignocelulózy a zajišťuje optimální koloběh živin potřebný pro zrání kompostu (Li *et al.*, 2023).

3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ CELULOLYTICKOU AKTIVITU

Pro pochopení mechanismu degradace celulózy v životním prostředí je důležité zaměřit se na faktory ovlivňující její rozklad. Celulóza je biologicky odbouratelný materiál, který se v přírodě rozkládá působením enzymů, jako jsou celulózy produkované mikroorganismy. Tento proces je klíčový pro přirozený koloběh uhlíku a přispívá k udržitelnosti ekosystémů. Rychlost a účinnost degradace celulózy však mohou ovlivňovat různé environmentální faktory, například dostupnost rozkladných mikroorganismů, vlhkost, teplota a pH prostředí, ale především i vlastnosti substrátu a enzymatické. Schopnost celulózy podléhat přirozené biodegradaci je výhodná pro snížení odpadu a zátěže životního prostředí, což z něj činí perspektivní materiál pro udržitelná řešení v různých průmyslových a ekologických aplikacích (Torgbo a Sukyai, 2020).

Klíčové aspekty jsou popsány níže.

3.1 Strukturní vlastnosti substrátu

Dostupnost celulózy pro enzymatický rozklad je primárně určena její krystalinitou, stupněm polymerace a přítomností dalších složek buněčné stěny, jako jsou lignin a hemicelulóza. Celulóza s vyšším stupněm krystalinity je obtížněji degradovatelná, protože enzymy mají omezený přístup ke glykosidickým vazbám. Naproti tomu amorfni celulóza je mnohem snadněji štěpitelná. Přítomnost ligninu a hemicelulózy může bránit přístupu celuláz k celulóзовým vláknům a zároveň způsobovat nespecifickou adsorpci enzymů, čímž snižuje jejich účinnost (Fang a Qu, 2018).

3.2 Inhibice enzymů a vedlejší produkty hydrolýzy

Během enzymatického rozkladu celulózy vznikají vedlejší produkty, které mohou působit jako inhibitory enzymatické aktivity. Glukóza a celobióza, jako hlavní produkty celulóзовé hydrolýzy, mohou zpětně inhibovat exoglukanázy a β -glukosidázy, čímž snižují celkovou rychlost rozkladu. Kromě toho může inhibici způsobovat i lignin, který váže enzymy na svůj povrch a brání jejich interakci se substrátem (Fang a Qu, 2018).

Dalším mechanismem je katabolická represe, při které přítomnost snadno využitelných cukrů (např. glukózy) inhibuje expresi genů pro celulózy. Tento jev byl pozorován například u *Trichoderma reesei* i dalších mikroorganismů, kde dochází ke snížení syntézy celobiohydrolázy (CBH I), zatímco jiné enzymy se ještě určitou dobu produkují. (Bhat a Bhat, 1997)

3.3 Synergismus mezi enzymy

Celulolytický proces vyžaduje synergickou spolupráci několika typů enzymů. Endoglukanázy náhodně štěpí β -1,4-glykosidické vazby v celulóзовém řetězci, čímž vytvářejí nové koncové skupiny, které jsou následně degradovány exoglukanázy. β -glukosidázy pak přeměňují celobiózu a kratší oligomery na glukózu. Kromě těchto klíčových enzymů mohou degradaci celulózy podporovat i pomocné enzymy, jako jsou xylanázy nebo lytické polysacharid monooxygenázy, které usnadňují přístup celuláz k substrátu (Fang a Qu, 2018).

Výzkumy také ukazují, že různé enzymy rozpoznávají různé stereochemie neredukujících konců celulózy, čímž se jejich aktivity navzájem doplňují. (Bhat a Bhat, 1997)

3.4 Fyzikálně-chemické faktory

Optimalizace pH a teploty je zásadní pro efektivní hydrolýzu celulózy. Celulázy mají obvykle optimální aktivitu při mírně kyselém pH (kolem 5,0–6,0) a teplotách v rozmezí 50–55 °C. Při nižších teplotách dochází k snížení kinetiky enzymatických reakcí, zatímco vyšší teploty mohou vést k denaturaci enzymů. Také přítomnost iontů kovů a jiných chemických látek může mít pozitivní nebo negativní vliv na aktivitu celuláz. Například Ca^{2+} a Mg^{2+} mohou stabilizovat enzymy, zatímco těžké kovy jako Cu^{2+} nebo Hg^{2+} mohou enzymatickou aktivitu inhibovat (Fang a Qu, 2018).

3.5 Vliv složení enzymového koktejlu

Efektivní rozklad celulózy závisí na vhodném poměru jednotlivých enzymů. Výzkumy ukazují, že kombinace endoglukanáz, exoglukanázy a β -glukosidáz ve správném poměru výrazně zvyšuje účinnost hydrolýzy. Kromě toho může být produkce enzymů zvýšena pomocí genetického inženýrství nebo fermentačních technologií, které umožňují selektivní zvýšení produkce celulázových enzymů a jejich adaptaci na specifické substráty (Fang a Qu, 2018).

Dosavadní poznatky ukazují, že optimální aktivitu vykazuje směs, ve které jsou CBH I a II v poměru 1:1, a je doplněna malým množstvím specifické endoglukanázy. Prokázalo se také, že přítomnost vazebné domény výrazně zvyšuje účinnost enzymů tím, že umožňuje jejich pevné uchycení k celulóze a efektivnější hydrolýzu. (Bhat a Bhat, 1997)

II PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byl skrínink ekosystému a izolace mikroorganismů degradující celulózu v povrchových tekoucích i stojatých vodách. Následně bylo provedeno sledování a stanovení jejich celulolytického potenciálu. Výsledků bylo dosaženo využitím literární rešerše a mikrobiologických a biochemických metod.

Jednotlivé části práce zahrnovaly:

- izolování mikroorganismů s celulolytickým potenciálem,
- optimalizace metody pro stanovení celulolytické aktivity,
- stanovení poměru celulolytických a necelulolytických mikroorganismů,
- stanovení celulolytické kapacity,
- identifikace vybraných celulolytických bakterií.

5 MATERIÁL

Následující kapitoly obsahují výpis použitého materiálu, vzorků a kultivačních médií pro tuto bakalářskou práci.

5.1 Vzorky

V praktické části bylo zkoumáno celkem 9 vzorků, které zahrnovaly tekoucí i stojaté vody v různých lokalitách České republiky. Nejvíce vzorků bylo odebráno v lokalitě Luhačovic a okolí Zlína. Zkoumán byl i vzorek z Baltského moře.

Tabulka 1 Lokality zkoumaných vzorků

Značení	Označení vzorků	Lokalita	Souřadnice
A + B	J2-J14	Baltské moře	54.7317078N, 17.2482139E
C	A9-A17	Vodní nádrž Nové Mlýny – horní	48.8948264N, 16.5607719E
D	A40-A42	Štěrkáč Otrokovice	49.2232728N, 17.5140036E
E	A35-A39	Hrubý rybník Kroměříž	49.2913278N, 17.4090511E
F	F1-F7	Přehrada Luhačovice	49.1219269N, 17.7773264E
G	G1-G2	Rybník Luhačovice	49.1003956N, 17.7659383E
H	H1-H4	Podhradský rybník	49.1409831N, 17.7805439E
I	I5	Pramen Aloiska	49.1021250N, 17.7646964E
J	N4-N6	Pramen Sírčena	49.1446228N, 17.7702678E

(zdroj: vlastní)

5.2 Nástroje a vybavení

Autokláv	Tuttnauer, Nizozemsko
Běžné laboratorní pomůcky a laboratorní sklo	
Biohazard box	Merci, Česká republika
Digestoř Aura PCR	BioAir, Itálie
Mikropipety	Eppendorf, Německo
Plynový kahan gasprofi 1 micro	WLD-TEC, Německo
Počítadlo kolonií	Schütt Labortechnik, Německo
Světelný mikroskop	Intarco Micro, Česká republika
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA

5.3 Chemikálie

Aceton	Penta, Česká republika
Destilovaná voda	
Ethanol	Penta, Česká republika
Fyziologický roztok	
Imerzní olej	Sigma-Aldrich, USA
Krystalová violet	Penta, Česká republika
Lugolův roztok	Lachema, Česká republika
Safranin	Himedia, Indie

5.4 Kultivační média

Byla navržena kultivační média pro vzorky tak, aby byla zajištěn optimální růst mikroorganismů z jednotlivých vzorků. Médium MBA (Tabulka 6) bylo použito pro mikroorganismy z Baltského moře, právě pro vyšší obsah chloridu sodného. Avicel a CMC agar (Tabulky 2 a 3) byly použity pro optimalizaci stanovování celulolytického potenciálu při barvení. Jako selektivní médium pro zjištění poměru celulolytických mikroorganismů ve vzorku bylo použito minerální médium s přidavkem karboxymetyl celulózy (Tabulka 5) a univerzální půda BHI (Tabulka 4).

Tabulka 2 AVICEL médium

Látka	Množství [g/l]
NaNO ₃	6,0
KH ₂ PO ₄	1,5
KCl	0,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5
FeSO ₄	stopové množství
ZnSO ₄	stopové množství
Avicel	5,0
Agar	15,0

(zdroj: vlastní)

Tabulka 3 CMC médium

Látka	Množství [g/l]
NaNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	0,1
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
Karboxymetyl celulóza	2,0
Pepton	0,2
Agar	15,0

(zdroj: vlastní)

Tabulka 4 BHI médium

Látka	Množství [g/l]
Telecí mozek, infuzní forma	200
Hověží srdce, infuzní forma	250
Proteázový peptid	10
Dextróza	2
NaCl	5
Na ₃ PO ₄	2,5
Agar	15

(zdroj: vlastní)

Tabulka 5 MM + CMC médium

Látka	Množství [ml]
Roztok Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	23,9
Roztok KH ₂ PO ₄	9,078
Destilovaná vody	850
Roztok NH ₄ Cl	30
Roztok MgSO ₄ x 7H ₂ O	10
Roztok Fe(NH ₄) ₂ x (SO ₄) ₂ x 6H ₂	3
Roztok CaCl ₂ x 2H ₂ O	1
Roztok stopových prvků	1
Karboxymetyl celulóza	2
Agar	15

(zdroj: vlastní)

Tabulka 6 MBA médium

Látka	Množství [g/l]
Pepton	5,00
Kvasničný extrakt	1,00
Citrát železitý	0,10
Chlorid sodný	19,45
Chlorid hořečnatý	8,80
Síran sodný	3,24
Chlorid vápenatý	1,80
Chlorid draselný	0,55
Hydrogenuhličitan sodný	0,16
Bromid draselný	0,08
Chlorid strontnatý	0,034
Kyselina boritá	0,022
Křemičitan sodný	0,004
Dusičnan amonný	0,0016
Hydrogenfosforečnan sodný	0,008
Fluorát sodný	0,0024
Agar	15,00

(zdroj: vlastní)

6 METODIKA

Následující kapitola se podrobně věnuje metodickému postupu, který byl zvolen pro zpracování této práce. Popisuje jednotlivé kroky, použité materiály (viz kapitola 5 Materiál) a metody, objasňuje způsob sběru, zpracování a vyhodnocení dat.

6.1 Odběr vzorků

Testované vzorky povrchových vod byly asepticky odebrány z dostupných přírodních zdrojů, jako jsou rybníky, prameny nebo jezera, do 15ml sterilních zkumavek. Odběr byl proveden za použití sterilních pomůcek, aby se minimalizovala možnost kontaminace vzorku vnějšími mikroorganismy. Ihned po odběru byly zkumavky uzavřeny, označeny a uchovávány při nízké teplotě až do dalšího zpracování v laboratoři. Z takto připravených vzorků byla poté odebrána požadovaná množství vody, která sloužila jako výchozí materiál pro následnou izolaci mikroorganismů pomocí kultivačních metod na specifických živných půdách.

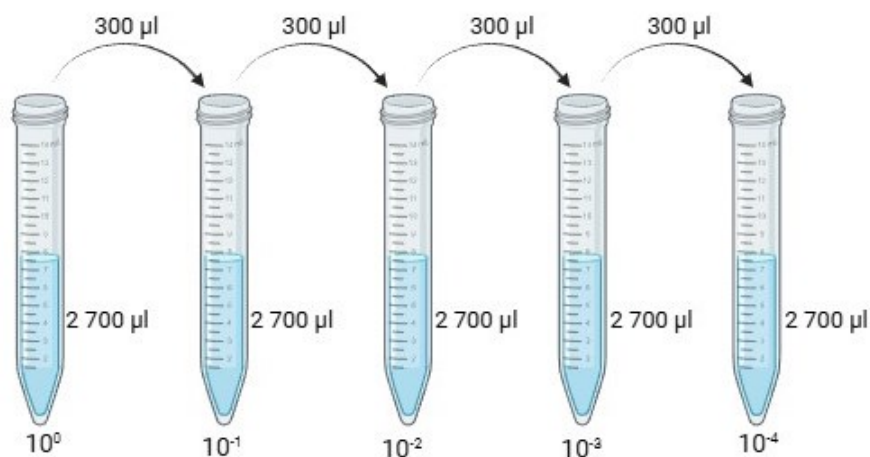
6.2 Izolace mikroorganismů

Pro získání jednotlivých kolonií dílčích vzorků bylo zapotřebí získat jednotlivá inokula, aby bylo možné je nadále zkoumat.

6.2.1 Desítkové ředění

Prvotní izolace mikroorganismů proběhla pomocí desítkového ředění dílčích vzorků. Podstatou desítkového ředění je dostat koncentraci původního vzorku na takovou, abychom byli schopni získat počítatelné množství kolonií mikroorganismů na živném médiu, které se pohybuje v rozmezí 20-200 kolonií na Petriho misce.

V našem případě se jednalo o aseptické převedení 300 μ l vzorku do 2 700 μ l fyziologického roztoku. Obsah zkumavky byl promíchán a z promíchané zkumavky se opět převedlo 300 μ l vzorku do 2 700 μ l fyziologického roztoku. Tento postup byl opakován, dokud nebylo k dispozici ředící řada od 10^0 až po 10^{-5} . Princip je dále popsán na Obrázku 4.



Obrázek 4 Princip desítkového ředění

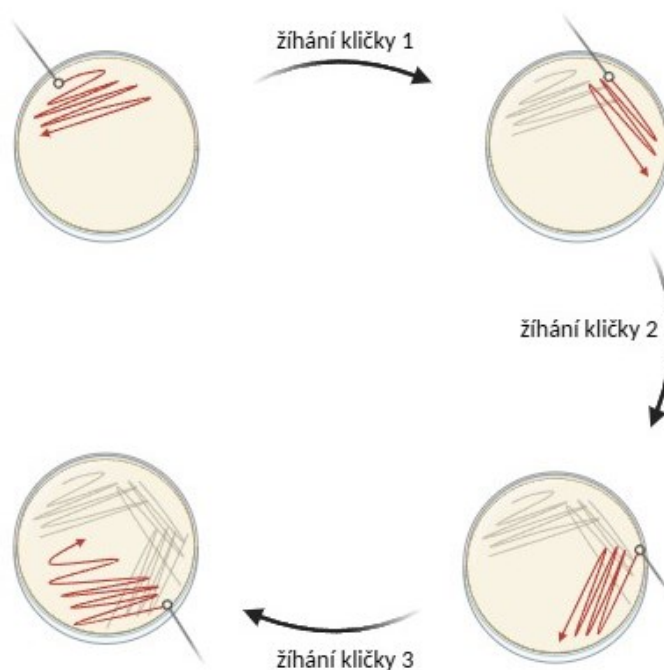
(zdroj: vlastní)

Po vytvoření ředící řady byly vzorky asepticky převedeny na selektivní půdu MM + CMC a univerzální půdu BHI (viz Tabulka 4 a 5) byl zjištěn poměr celulolytických mikroorganismů k jejich celkovému počtu. Objem dílčích vzorku přenesených na půdu byl 500 µl a následně byly rozetřeny laboratorní hokejkou.

6.2.2 Křížový roztěr

Dále bylo zapotřebí izolovat samostatné kolonie. Samostatné kolonie byly vybrány dle vizuální odlišnosti, která zahrnovala: barvu, okraje, profil a tvar kolonie. Křížovým roztěrem byly dále jednotlivé kolonie opakovaně čištěny, aby byla získána čistá kultura. V principu jde o metodu, kdy pomocí sterilní bakteriologické kličky byla nejprve odebrána kolonie z předchozí kultury a inokulována na povrch agarů ve formě 4 tahů poblíž okraje Petriho misky. Pro dosažení separace jednotlivých kolonií byla následně použita nová sterilní klička, kterou byly vždy provedeny další 4 paralelní tahy podél obvodu misky. Poté byla další sterilní kličkou vytvořena druhá série tahů, kolmo protínajících předchozí linii inokulace, čímž došlo k naředění inokula. Závěrem byla zbývající plocha agarů rovnoměrně inokulována formou klikatého tahu pomocí další nové sterilní kličky (viz Obrázek 5). Tento postup zajistil postupné rozředění inokula a umožnil růst izolovaných kolonií, vhodných pro další identifikaci nebo testování.

Kultivace mikroorganismů byla dále provedena na pevném živném médiu typu BHI.



Obrázek 5 Princip křížového roztěru

(zdroj: vlastní)

6.3 Optimalizace metody stanovení celulolytického potenciálu

Pro vybrání správné metody bylo testováno několik selektivních médií a jejich barvení. Bylo využito modelových mikroorganismů.

6.3.1 Výběr vhodného selektivního agaru a způsobu barvení

Principem optimalizace metody bylo zjistit jaká kombinace selektivního živého média a barvení je nejvhodnější pro stanovení celulolytického potenciálu. Bylo zkoumáno několik variant selektivních pěstí (viz Tabulky 2, 3, 4 a 6) a barvení Kongo červení před i po kultivaci. Jako optimální médium bylo vybráno živné médium CMC v kombinaci s barvením Lugolovým roztokem. Tato kombinace vykazovala nejlepší podmínky pro stanovení celulolytického potenciálu, protože zóny kolonií byly dostatečně projasněny – zobrazeno na Obrázku 4.

Kongo Červeně nevykazovala dostatečných vizuálních vlastností pro odečet výsledků u testovaných vzorků, jak můžeme vidět na Obrázku 3. Dále byl testován i přídavek želatiny místo agaru, který se ale nejevil jako optimální, protože testované mikroorganismy želatinu ztekucovaly.



Obrázek 6 Barvení Kongo červení

(zdroj: vlastní)



Obrázek 7 Barvení Lugolovým roztokem

(zdroj: vlastní)

Při výběru vhodné metody byly využity mikroorganismy *Escherichia coli* a *Saccharophagus degradans*.

Saccharophagus degradans je mikroorganismus schopný efektivně rozkládat hlavní složky rostlinných buněčných stěn, především celulózu. Dokáže se připojit k celulóзовým vláknům a využívat je jako zdroj uhlíku, což potvrzuje jeho výraznou celulolytickou aktivitu. Díky této vlastnosti je ideálním kontrolním mikroorganismem při testování celulolytického potenciálu, protože jeho růst na celulóze je spolehlivým důkazem přítomnosti a účinnosti celulolytických enzymů (Alva Munoz a Riley, 2008).

Escherichia coli je gramnegativní bakterie a široce používaný modelový mikroorganismus díky své dobře prozkoumané genetice, rychlému růstu a dostupnosti mnoha expresních a regulačních nástrojů. Přestože dokáže fermentovat jednoduché cukry, jako je xylóza, není schopna přirozeně degradovat polymery celulózy. Její omezená schopnost sekrece proteinů navíc snižuje její využitelnost při extracelulární produkci celuláz. (Gao et al., 2015)

6.3.2 Celulolytický index

Stanovení celulolytického indexu bylo provedeno pomocí Rovnice 1, kdy byl zvažován průměr kolonie d_k a průměr zóny, kterou kolonie tvořila d_z . Průměry byly měřeny v milimetrech. Celulolytický index je bezrozměrné číslo udávající schopnost mikroorganismu degradovat celulózu.

$$\text{celulolytický index} = \frac{d_z - d_k}{d_k} \quad [1]$$

Kde:

d_z – průměr zóny vytvořené kolonií [mm],

d_k – průměr kolonie [mm].

6.4 Mikrobiologická identifikace

Po pročištění jednotlivých kultur pěti křížovými roztěry a stanovení jejich celulolytického potenciálu, byly provedeny testy pro bližší identifikaci. Mezi identifikační testy patřil KOH test a Gramovo barvení a dalších biochemických testů popsaných v následujících kapitolách.

6.4.1 KOH test

KOH test je jednoduchá a rychlá metoda pro odlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií. Působením hydroxidu draselného (KOH) dochází k narušení tenké peptidoglykanové vrstvy buněčné stěny gramnegativních bakterií, což vede k uvolnění buněčného lyzátu. Výsledná viskózní hmota se při manipulaci táhne za očkovací kličkou. Tento test není vhodné provádět u bakterií tvořících sliz, protože přítomný polysacharidový materiál může zkreslit výsledky (Kopecká a Rotková, 2017).

6.4.2 Gramovo barvení

Gramovo barvení slouží k rozdělení bakteriálních druhů do dvou hlavních skupin na základě rozdílů ve struktuře buněčné stěny – gram-pozitivní nebo gram-negativní. Klíčovou roli při tomto procesu hrají tloušťka peptidoglykanové vrstvy a obsah lipidů (Zhou et al., 2024). Pohledem přes imerzní objektiv světelného mikroskopu byly pozorovány a stanoveny tvary buněk izolovaných mikroorganismů.

6.4.3 Biochemické testy

Pro identifikaci izolovaných gramnegativních tyčinek byly využity standardní biochemické testy založené na metabolických vlastnostech bakterií. Tyto testy byly provedeny kultivačně v mikroměřítku, inkubací při teplotě 36 ± 1 °C po dobu 24 hodin.

Ze spektra enzymových aktivit byla sledována především schopnost hydrolyzovat močovinu (ureáza), štěpit β -galaktosidové vazby (β -galaktosidáza) a produkovat sirovodík z redukce sirných sloučenin. Dále byly testovány dekarboxylázové aktivity pro ornitin a lysin a schopnost bakterií metabolizovat arginin pomocí arginindihydrolázy. U některých kmenů byla také hodnocena přítomnost β -glukuronidázy a β -xylosidázy.

V rámci hodnocení fermentačních schopností byly testovány různé sacharidy a jejich deriváty, a to jak běžně fermentované (např. glukóza, laktóza, sacharóza, mannitol, trehalóza), tak i méně časté substráty jako arabitol, adonitol, dulcitol nebo melibióza. Pozitivní fermentace byla indikována změnou barvy média v důsledku acidifikace.

Dále byla sledována schopnost využívat organické kyseliny jako citrát nebo malonát jako jediný zdroj uhlíku. Schopnost štěpit glykosid esculin byla hodnocena na základě vzniku tmavého komplexu s ionty železa.

Výsledné biochemické profily jednotlivých izolátů byly zaznamenány a porovnány s referenčními údaji dostupnými v odborné literatuře, což umožnilo jejich předběžnou druhovou identifikaci. Výsledky byly hodnoceny na základě změny barvy indikátorů v jednotlivých substrátových systémech po inkubaci za optimálních podmínek (24 h při 35–37 °C). Na základě kombinace pozitivních a negativních reakcí bylo možné přiřadit izolované kmeny k odpovídajícím rodům, případně druhům, pomocí porovnání s dostupnými diagnostickými tabulkami.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Izolace mikroorganismů

Izolovány byly mikroorganismy, které dle vybrané metodiky prokazatelně rozkládají celulózu. Jednotlivé mikroorganismy byly izolovány pomocí křížového roztěru, dokud nebyly patrné jednotlivé kolonie. Izolováno a popsáno bylo celkem 35 kolonií celulolytických mikroorganismů viz Tabulka 7.

Tabulka 7 Makroskopický vzhled izolovaných mikroorganismů

Izolát	Profil	Barva	Tvar	Okraje
J2	ploché	narůžovělá	okrouhlý	hladké
J3	ploché	nahnědlá	zvlněný	prstovité
J5	vypouklý	bílá/mléčná	okrouhlý	zubaté
J6	zvýšený	bílá, mléčný okraj	okrouhlý	koncentrické
J7	vypouklý	bílá	zvlněný	zubaté
J9	zvýšený	mléčná, bílý okraj	okrouhlý	koncentrické
J10	ploché	bílá, mléčná zóna	zvlněný	vroubkované
J13	vypouklý	bílá	zvlněný	zubaté
J14	vypouklý	bílá	okrouhlý	hladké
A0	ploché	bílá	okrouhlý	hladké
A1	ploché	mléčná	okrouhlý	hladké
A4	ploché	oranžová	okrouhlý	hladké
A9	ploché	mléčná	zvlněný	zvrásnělé
A10	zvýšený	mléčná	okrouhlý	hladké
A12	ploché	průhledná	zvlněný	zubaté
A14	vypouklý	oranžová	zvlněný	vláknité
A15	vypouklý	bílá	zvlněný	prstovité
A17	vypouklý	bílá	zvlněný	prstovité
A35	zvýšený	růžová	okrouhlý	hladké
A37	ploché	bílá	zvrásnělý	rizoidní
A38	ploché	žlutá	okrouhlý	hladké
A39	vypouklý	bílá	okrouhlý	hladké
A40	vypouklý	oranžová	okrouhlý	hladké
A41	ploché	mléčná	okrouhlý	vroubkované
A42	vypouklý	bílá	okrouhlý	hladké
F6	ploché	oranžovobílá	laločnatý	zubaté
G1	vypouklý	bílá	zvlněný	vroubkované
G2	vypouklý	narůžovělá	okrouhlý	hladké
I5	ploché	mléčná	okrouhlý	zubaté
H1	vypouklý	oranžová	okrouhlý	hladké
H2	ploché	bílá	zvlněný	zvrásnělé
H4	ploché	bílá	zvlněný	vláknité
N4	zvýšený	bílá	okrouhlý	vroubkované
N5	ploché	mléčná	zvlněný	prstovité
N6	zvýšený	mléčná	zvlněný	prstovité

(zdroj: vlastní)

Morfologie kolonií byla hodnocena podle základních charakteristik: profil kolonie, barva, tvar a okraje. Výsledky ukazují na vysokou morfologickou diverzitu, která může odrážet jak druhovou rozmanitost izolovaných mikroorganismů, tak i jejich růstové vlastnosti na použitém kultivačním médiu.

Z hlediska profilu byla většina kolonií plochých nebo vypouklých, což je běžné u mnoha druhů bakterií. Kolonie se zvýšeným profilem byly pozorovány méně často, například u izolátů A35 nebo N4, a především tedy u izolátů z moře J6, J9, A10.

Barva kolonií se nejčastěji pohybovala v odstínech bílé, mléčné a narůžovělé, což je typické pro běžné saprofytické bakterie. Zajímavostí je výskyt barevně výraznějších kolonií – oranžové (A4, A40, H1), růžové (A35, G2) a žluté (A38) – které mohou naznačovat přítomnost pigmentovaných druhů, případně bakterií s fotoprotektivními nebo antioxidačními metabolity.

Z hlediska tvaru kolonií dominovaly okrouhlé a zvlněné formy, přičemž laločnaté (F6), zvrásnělé (A9, A37, H2) či laločnatě vláknité okraje (A14, H4) byly pozorovány pouze u několika málo izolátů převážně ze sladkovodního stojatého prostředí. Okraje kolonií byly nejčastěji hladké nebo zubaté, přičemž u některých kmenů (např. A14, H4) se vyskytly výraznější struktury jako vláknité či prstovité výběžky.

Celkově lze říci, že morfologie kolonií poskytla důležitý předběžný náhled na diverzitu izolátů a jejich případné zařazení do širších fylogenetických skupin. Přítomnost různorodých barevných a strukturálních znaků poukazuje na mikrobiální bohatství všech dílčích vzorků a podporuje další fyziologickou či molekulární identifikaci izolovaných kmenů.

7.2 Stanovení celulólytického potenciálu izolátů

Průměry kolonií a jejich zón byly proměřeny geometrickým pravítkem, zapsány a dle Rovnice 1 zmíněné v kapitole 6.3.2 vypočítány dílčí celulólytické indexy.

Tabulka 8 Celulólytické indexy mikroorganismů

Vzorek	Izolát	Celulólytický index [-]
A	J2	3,00
	J3	2,00
	J5	1,83
	J6	2,00
	J7	2,00
	J9	0,56
	J10	2,77
	A0	3,80
	A1	6,33
	A4	2,40
B	J13	3,58
	J14	1,40
C	A9	8,33
	A10	3,92
	A12	4,20
	A14	4,78
	A17	4,36
E	A35	4,14
	A37	-0,38
	A39	1,33
F	A40	1,18
	A41	2,47
	A42	2,36
G	G1	1,64
	G2	4,82
H	H1	1,57
	H2	1,23
	H4	3,29
J	N4	4,70
	N5	4,00
	N6	4,00

(zdroj: vlastní)

Celulólytická aktivita jednotlivých izolátů byla hodnocena pomocí celulólytického indexu, který umožňuje porovnat schopnost bakterií rozkládat celulózu. Výsledky v Tabulce 8 ukazují značné rozdíly mezi jednotlivými vzorky, jak v rámci jednoho vzorku, tak mezi vzorky navzájem.

Nejvyšší průměrný celulólytický index byl zaznamenán ve vzorku C (vodní nádrž), kde většina izolátů vykazovala nadprůměrnou aktivitu (např. A9 s indexem 8,33). Vysoké hodnoty byly rovněž naměřeny u vzorků J (pramen) a A (moře), které vykazovaly jak početné zastoupení izolátů, tak i jejich schopnost efektivně rozkládat celulózu.

Naopak nejnižší průměrný index byl zjištěn u vzorku E (rybník), a to zejména kvůli výskytu izolátu A37, který vykázal zápornou hodnotu celulólytického indexu. To může indikovat buď technickou chybu při měření, nebo přítomnost bakterie s inhibičním efektem na rozklad celulózy.

Vzorky z rybníků a přehrady F, G a H vykazovaly celkově nižší až střední aktivitu, přičemž žádný z izolátů z těchto vzorků nevyčníval výrazně nad průměr. Přesto lze i zde předpokládat přítomnost mikroorganismů se základními celulólytickými schopnostmi.

Rozdíly v celulólytické aktivitě mohou být ovlivněny různým složením mikrobiálních komunit, původem vzorku nebo stavem organické hmoty, ze které byly bakterie izolovány. Výsledky naznačují, že některé vzorky obsahují vysoce aktivní celulólytické bakterie, které by mohly mít potenciál pro aplikaci při biodegradaci lignocelulóзовých materiálů.

7.3 Identifikace vybraných mikroorganismů

7.3.1 KOH test a Gramovo barvení

Tabulka 9 Identifikace mikroorganismů pomocí KOH testu a Gramova barvení

Izolát	KOH test	Gramovo barvení	Tvar
J2	+	-	tyčinky
J3	+	-	tyčinky
J5	+	-	kokotýčinky
J6	+	-	tyčinky
J7	+	-	tyčinky
J9	+	-	tyčinka
J10	+	-	tyčinka
J13	+	-	tyčinka – spory
J14	+	-	tyčinka
A0	+	-	tyčinky
A1	+	-	tyčinka
A4	+	-	tyčinka
A9	+	-	tyčinka
A10	+	-	kokotýčinky
A12	-	+	tyčinky
A14	-	+	koky
A15	-	+	tyčinky – spory
A17	+	-	tyčinky
A35	+	-	tyčinky
A37	-	+	tyčinky
A38	-	+	koky
A39	-	+	tyčinky
A40	-	+	kokotýčinky
A41	-	+	koky
A42	+	-	kokotýčinky
F6	+	-	tyčinky
G1	+	-	tyčinky
G2	+	-	tyčinky
I5	-	+	koky
H1	+	-	tyčinky
H2	+	-	kokotýčinky
H4	+	-	kokotýčinka
N4	+	-	tyčinka
N5	+	-	tyčinka
N6	+	-	tyčinka

(zdroj: vlastní)

Na základě výsledků KOH testu a Gramova barvení lze pozorovat převahu gramnegativních bakterií, které tvořily přibližně tři čtvrtiny všech izolátů. Tento výsledek odpovídá

předpokladům, protože gramnegativní bakterie často dominují v prostředích s vyšším obsahem rozložitelných organických látek.

Z morfologického hlediska převažovaly tyčinkovité formy, a to napříč většinou vzorků. Koky a kokotýčinky se vyskytly v menší míře, nejčastěji ve vzorcích s grampozitivními bakteriemi. U několika izolátů (např. J13, A15) byla pozorována sporulace, což naznačuje přítomnost sporulujících grampozitivních druhů, jako jsou *Bacillus spp.*

Rozdělení izolátů podle vzorků ukazuje na různou mikrobiální rozmanitost:

- Vzorek A poskytl nejvyšší počet izolátů (10), z nichž většina byla gramnegativních tyčinek.
- Vzorek B (J13, J14) zahrnoval izoláty s možnou sporulací a rovněž gramnegativní morfotypy.
- Vzorek C obsahoval kombinaci gramnegativních (A9, A10, A17) i grampozitivních (A12, A14) bakterií, včetně koků.
- Vzorek E (A35, A37, A39) byl rovněž pestrý, s převahou tyčinek, včetně grampozitivních.
- Vzorek F obsahoval koky i kokotýčinky (A40–A42), přičemž převažovaly grampozitivní formy.
- Vzorky G, H a J vykazaly výhradně gramnegativní tyčinky a kokotýčinky.

Z těchto výsledků je patrné, že největší rozmanitost mikroorganismů (jak z hlediska gram reakce, tak morfologie) byla pozorována ve vzorcích A, C, E a F, zatímco vzorky G, H a J byly mikrobiálně méně různorodé. Tato různorodost může souviset s odlišným složením substrátu, původem materiálu nebo fází rozkladu, v níž byl vzorek odebrán.

Článek (Balmonte *et al.*, 2020) naznačuje, že ve sladkovodních prostředích převažují mezi celulolytickými bakteriemi gram-pozitivní druhy, zatímco v mořských prostředích je zastoupení gram-pozitivních a gram-negativních celulolytických bakterií vyrovnanější. Tento rozdíl může být ovlivněn specifickými podmínkami prostředí, jako je dostupnost substrátů, pH, salinita a interakce s jinými organismy, což by vysvětlovalo různorodost jednotlivých vzorků.

Současně byla potvrzena spolehlivost KOH testu jako orientační metody, neboť jeho výsledky dobře korespondovaly s klasickým Gramovým barvením.

7.3.2 Biochemické testy

K přesnějšímu druhovému určení by bylo vhodné využít doplňující molekulárně-biologické metody, například polymerázovou řetězovou reakci (PCR) nebo sekvenaci genu 16S rRNA.

Tabulka 10 Výsledky biochemických testů

Test	J10	J14	H1	G2	N5	N6	J6
URE	-	-	-	-	-	-	-
SAL	-	-	+	+	+	+	-
DUL	-	-	-	-	-	-	-
ARG	-	+	+	+	+	+	+
SOR	+	-	-	-	-	-	+
ADO	-	-	-	-	-	-	-
ORN	-	-	-	-	-	-	-
MLB	-	-	-	-	-	-	-
ART	-	-	-	-	-	-	-
LYS	-	-	+	+	+	-	-
CEL	+	+	-	-	+	+	+
SUC	+	-	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
LAC	+	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-
SCI	-	-	-	-	-	-	-
TRE	+	+	+	+	+	+	+
RAF	-	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	-	-	-	-	-
MAN	+	-	+	+	+	+	-
ESL	+	-	+	+	+	+	-
ONP	+	+	+	+	+	+	+
GLR	-	-	-	-	-	-	-
bXY	-	-	-	-	-	-	-
Druhové zařazení	<i>Yersinia</i>	<i>Aeromonas</i>					

(zdroj: vlastní)

Pro charakterizaci izolovaných bakteriálních kmenů byly provedeny biochemické testy zaměřené na schopnost metabolizovat různé sacharidy, využívat alternativní substráty a produkovat specifické enzymy. Testováno bylo celkem sedm kmenů označených jako J14, J10, H1, G2, N5, N6 a J6. Výsledky testů byly zaznamenány v Tabulce 10 ve formě pozitivních (+) nebo negativních (-) reakcí. Biochemická charakterizace izolovaných bakteriálních kmenů přinesla důležité poznatky týkající se jejich metabolických vlastností a možného zařazení do taxonomických skupin. Ze zmíněných sedmi testovaných izolátů byla zaznamenána různorodost ve výsledcích, přičemž některé metabolické znaky byly společné, jiné naopak vysoce variabilní.

Test ureázy (URE), který slouží k detekci schopnosti produkovat enzym ureázu rozkládající močovinu, byl u všech kmenů negativní. To vylučuje přítomnost některých typických ureázu-pozitivních rodů, jako je *Proteus* nebo *Helicobacter* (Mobley *et al.*, 1995). Naopak pozitivní reakce na arginin-dihydrolázu (ARG) byla pozorována u většiny kmenů, s výjimkou J10 (moře), což poukazuje na schopnost využívat arginin jako alternativní dusíkatý substrát.

Z hlediska vztahu k celulolytické aktivitě je důležité zmínit, že většina testovaných kmenů vykazala pozitivní reakci na celobiózu (CEL), což je disacharid vznikající jako meziprodukt při enzymatickém štěpení celulózy. Tato schopnost fermentovat celobiózu naznačuje, že bakterie mohou efektivně využívat produkty rozkladu celulózy, i když ji samy přímo neštěpí. Námi získané izoláty tak pravděpodobně fungují jako sekundární degradátoři v mikrobiálních společenstvech – nepřímo přispívají k rozkladu celulózové biomasy tím, že zpracovávají produkty uvolněné jinými mikroorganismy, například houbami rodu *Trichoderma* (Mondal *et al.*, 2022).

Z ekologického hlediska je tato schopnost velmi významná, protože tito mikrobi se podílejí na efektivní recyklaci rostlinné biomasy, čímž podporují koloběh živin v přírodě. V přirozených ekosystémech mohou tyto sekundární degradátoři výrazně urychlit proces mineralizace organického materiálu. Z biotechnologického pohledu pak tyto mikroorganismy představují důležitý nástroj například při bioaugmentaci kompostu nebo zpracování zemědělského odpadu (Li *et al.*, 2023).

Naše výsledky potvrzují i studie (Kudo *et al.*, 1987), že bakterie, které samy nerozkládají celulózu, mohou mít významný podíl na celkovém procesu její degradace a to prostřednictvím využívání vzniklých jednodušších cukrů. Tyto mikroorganismy proto nelze při studiu celulolytických procesů opomíjet a jejich role v ekologii a biotechnologiích je zásadní.

U všech kmenů kromě J14 (moře), byla pozorována pozitivní fermentace trehalózy (TRE), sacharózy (SUC) nebo mannitolu (MAN), což jsou znaky běžné u enterobakterií. Naopak většina kmenů nevykazovala aktivitu v testech na sorbitol (SOR), rafinózu (RAF), inositol (INO) a další méně běžné substráty, což může sloužit k přesnějšímu zařazení jednotlivých izolátů pomocí diagnostických tabulek. Celkově lze konstatovat, že testované izoláty představují různorodou skupinu fakultativně anaerobních bakterií s částečně konzervovanými biochemickými vlastnostmi. Zkoumané znaky, zejména schopnost využívat celobiózu a trehalózu, naznačují ekologický význam těchto mikroorganismů

v procesech rozkladu celulózového materiálu a jejich potenciál pro využití v biotechnologických aplikacích, například při kompostování biomasy bohaté na celulózu (Li *et al.*, 2023), což se shoduje s našimi výsledky.

Pomocí těchto testů byla většina testovaných mikroorganismů zařazena do bakteriálního rodu *Aeromonas*. Tento výsledek se shoduje se studií (Chantarasiri, 2021), kde sledovali biochemické a exoenzymatické vlastnosti tohoto rodu. Žádná dostupná odborná studie nepotvrdila celulolytický potenciál bakterií rodu *Yersinia*.

7.4 Procentuální zastoupení celulolytických a necelulolytických mikroorganismů

Tabulka 11 Zastoupení celulolytickým mikroorganismů v dílčích vzorcích

Vzorek	Celulolytické [CFU/ml]	Celkový počet [CFU/ml]	Zastoupení celulolytických [%]
A	1140	5700	20,0
B	1560	7540	21,6
C	2000	4760	42,0
D	2240	8200	27,3
E	1600	2120	75,5
F	5600	188000	3,0
G	2400	9200	26,1
H	356	3820	9,3
I	20	500	16,0
J	58	2240	2,6

(zdroj: vlastní)

Pomocí kvantitativní kultivace (viz Tabulka 11 a Obrázek 8) bylo stanoveno relativní zastoupení celulolytických mikroorganismů ve vzorcích z různých vodních prostředí. Výsledky ukazují výraznou variabilitu v závislosti na charakteru jednotlivých lokalit, zejména pokud jde o salinitu a typ prostředí (slaná voda, sladkovodní stojatá voda, pramen).

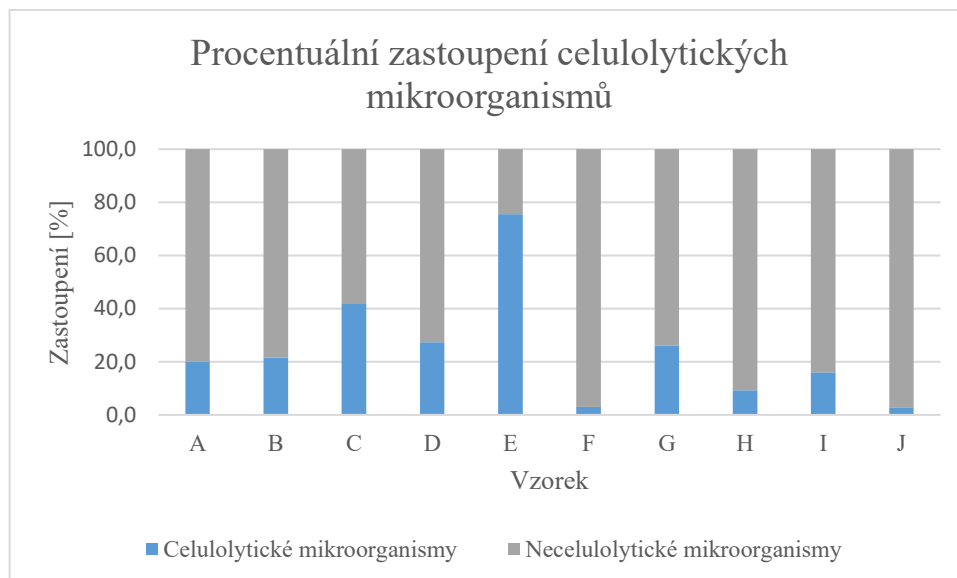
Vzorky A, B a I pocházející ze zdrojů vod s vyšší salinitou vykazovaly relativně nízký podíl celulolytických mikroorganismů – konkrétně 20,0 %, 21,6 % a 16,0 %. Tyto hodnoty naznačují, že halofilní mikroorganismy jsou buď méně efektivní při degradaci celulózy, nebo že samotné prostředí neposkytuje dostatek vhodného substrátu pro rozvoj celulolytické aktivity. Tento trend je v souladu s níže uvedenou literaturou, která uvádí, že mořské nebo slanější vody obecně obsahují nižší zastoupení mikroorganismů schopných efektivně rozkládat celulózu, ačkoliv mohou mít specifické enzymy s halostabilní aktivitou.

Dostupné studie ukazují, že ačkoli se celulolytické mikroorganismy vyskytují jak ve sladkovodních, tak mořských prostředích, jejich poměr je ve slaných vodách obecně nižší. Například výzkum provedený v pobřežní zóně sladkovodního jezera Tonle Sap v Kambodži prokázal ve studii (Chantarasiri, 2021), že ze 83 izolovaných bakterií bylo 17 % schopných produkovat celulolytické enzymy. Což se shoduje s námi izolovanými bakteriemi, které vykazovaly vysokou aktivitu celuláz. Naproti tomu, podle článku (Intriago, 2012) se v mořském prostředí sice také vyskytují celulolytické druhy, avšak jejich zastoupení je oproti sladkovodním bakteriím výrazně nižší a často se specializují na rozklad specifických mořských polysacharidů. Tyto rozdíly pravděpodobně souvisí s odlišnými fyzikálně-chemickými podmínkami a dostupností substrátů v jednotlivých ekosystémech.

Naopak vzorky C, D, E, F, G a H ze sladkovodních stojatých vod vykazovaly vyšší zastoupení celulolytických mikroorganismů, a to až do hodnoty 75,5 % u vzorku E (rybník). Průměrné zastoupení v této skupině přesahuje 35 %, což poukazuje na to, že sladkovodní prostředí obecně podporuje vyšší aktivitu mikroorganismů rozkládajících rostlinnou biomasu.

Zvláštní pozornost si zaslouží vzorek J, který pochází z pramene Sirčena v Podhradí. Tento vzorek vykazoval velmi nízké zastoupení celulolytických mikroorganismů (2,6 %), přestože byl odebrán ze zdánlivě přírodního zdroje. Možným vysvětlením je specifické chemické složení pramene nebo nízký přísun organického materiálu, který by podporoval růst celulolytických bakterií. Toto zjištění se shoduje s odbornou literaturou od (Fang a Qu, 2018) použitou v teoretické části (Faktory ovlivňující celulolytickou aktivitu).

Z ekologického hlediska výsledky ukazují, že prostředí bohatá na rostlinnou organickou hmotu a s nižší salinitou významně podporují výskyt a aktivitu mikroorganismů schopných degradovat celulózu. Tato data potvrzují význam sladkovodních mikrobiálních společenstev v koloběhu uhlíku a podtrhují rozdíly mezi halofilními a sladkovodními celulolytickými mikroorganismy. Toto naše tvrzení se shoduje již s výše uvedenou literaturou (Intriago, 2012).



Obrázek 8 Graf procentuálního zastoupení celulolytických mikroorganismů

(zdroj: vlastní)

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo provést skrínig a izolaci celulolyticky pozitivních mikroorganismů z různých typů vodních ekosystémů, především s důrazem na jejich ekologický a biotechnologický význam. Pomocí optimalizované kultivační metodiky a následné identifikace vybraných izolátů bylo potvrzeno, že přírodní vodní zdroje, včetně sladkovodních a slaných lokalit, jsou bohatým rezervoárem celulolytických bakterií.

Bylo izolováno celkem 35 celulolytických kmenů, přičemž jejich četnost a aktivita se lišily v závislosti na typu prostředí. Nejvyšší procentuální zastoupení celulolytických mikroorganismů bylo zaznamenáno ve vzorku E – rybník (75,5 %), zatímco nejnižší ve vzorku J (2,6 %), pocházejícím z pramene Širčena. Zdroje se zvýšenou salinitou, jako například vzorky A, B a I (moře a pramen s vyšší salinitou), vykazovaly nižší celkové zastoupení celulolytických bakterií, což poukazuje na možné rozdíly v adaptabilitě mikrobiálních společenstev na osmotické podmínky.

Pomocí biochemické charakterizace byly identifikovány izoláty vykazující silnou enzymatickou aktivitu v rozkladu celulózy. Přítomnost klíčových enzymů, jako je trehaláza, β -galaktosidáza a schopnost metabolizovat celulózu, byla potvrzena u námi izolovaných kmenů. Identifikace izolátů ukázala, že některé z nich mohou patřit k rodu *Aeromonas*, jež jsou známy svou schopností rozkládat lignocelulózové materiály, jak bylo popsáno v teoretické části a diskuzi.

Získané výsledky přispívají k hlubšímu pochopení ekologické role celulolytických mikroorganismů ve vodních ekosystémech. Zároveň také potvrzují jejich potenciál pro využití v biotechnologických procesech, například při kompostování biomasy, úpravě odpadních vod nebo výrobě bioenergie. Izolované mikroorganismy mohou v budoucnu sloužit jako základ pro vývoj efektivních a ekologicky šetrných producentů v biotechnologii.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABUBAKR, Abdelrahim; ALIMON, Abdul Razak; YAAKUB, Halimatun; ABDULLAH, Norhani; IVAN, Michael et al., 2014. Effect of Feeding Palm Oil By-Products Based Diets on Total Bacteria, Cellulolytic Bacteria and Methanogenic Archaea in the Rumen of Goats. Online. PLoS ONE. 2014-4-22, roč. 9, č. 4. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095713>. [cit. 2025-02-03].

ALVA MUNOZ, Luis Esteban a RILEY, Mark R., 2008. Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics by *Saccharophagus degradans*. Online. Biotechnology and Bioengineering. Roč. 100, č. 5, s. 882-888. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bit.21854>. [cit. 2025-04-19].

BHAT, M.K. a BHAT, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Online. Biotechnology Advances. Roč. 15, č. 3-4, s. 583-620. ISSN 07349750. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(97\)00006-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(97)00006-2). [cit. 2025-02-02].

Bioenergy Engineering, 2023. Online. Elsevier. ISBN 9780323983631. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2021-0-00787-2>. [cit. 2025-02-01].

CHANTARASIRI, Aiya, 2021. Diversity and Activity of Aquatic Cellulolytic Bacteria Isolated from Sedimentary Water in the Littoral Zone of Tonle Sap Lake, Cambodia. Online. Water. Roč. 13, č. 13. ISSN 2073-4441. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/w13131797>. [cit. 2025-05-12].

DISPOSABLE-TABLEWARE.COM. 2024. Nanocellulose is an innovative solution to improve the performance of disposable tableware. [online]. [cit. 2025-04-30]. Dostupné z: <https://cz.disposable-tableware.com/info/nanocellulose-is-an-innovative-solution-to-improve-the-performance-of-disposable-tableware>

DUFRESNE, Alain. Preparation and Applications of Cellulose Nanomaterials. Chemistry Africa [online]. 2023, 6(5), 2219-2236 [cit. 2023-11-22]. ISSN 2522-5758. Dostupné z: [doi:10.1007/s42250-022-00542-x](https://doi.org/10.1007/s42250-022-00542-x).

ELCHENINOV, Alexander G.; UGOLKOV, Yaroslav A.; ELIZAROV, Ivan M.; KLYUKINA, Alexandra A.; KUBLANOV, Ilya V. et al., 2023. Cellulose metabolism in halo(natrono)archaea: a comparative genomics study. Online. Frontiers in Microbiology. 2023-6-1, roč. 14. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1112247>. [cit. 2025-02-03].

EMENIKE, Ebuka Chizitere; IWUOZOR, Kingsley O.; SALIU, Oluwaseyi D.; RAMONTJA, James a ADENIYI, Adewale George, 2023. Advances in the extraction, classification, modification, emerging and advanced applications of crystalline cellulose: A review. Online. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. Roč. 6. ISSN 26668939. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100337>. [cit. 2025-02-03].

FANG, Xu a QU, Yinbo (ed.), 2018. Fungal Cellulolytic Enzymes. Online. Singapore: Springer Singapore. ISBN 978-981-13-0748-5. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0749-2>. [cit. 2025-01-31].

GAO, Dongfang; LUAN, Yaqi; WANG, Qian; LIANG, Quanfeng a QI, Qingsheng, 2015. Construction of cellulose-utilizing Escherichia coli based on a secretable cellulase. Online. Microbial Cell Factories. Roč. 14, č. 1. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0349-7>. [cit. 2025-04-28].

GUPTA, Pratima; SAMANT, Kalpana a SAHU, Avinash, 2012. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. Online. International Journal of Microbiology. Roč. 2012, s. 1-5. ISSN 1687-918X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2012/578925>. [cit. 2025-02-02].

HŮRKOVÁ, Drahomíra. 2012. Využití procesu vysokotlaké hydrolýzy kyselinou sírovou při produkci bioplynu z pšeničné slámy. [online]. Diplomová práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. Vedoucí práce Ing. Josef Maroušek, Ph.D. [cit. 2025-04-30]. Dostupné z: https://theses.cz/id/gl0cga/Vyuit_procesu_vysokotlak_hydrolzy_kyselinou_srovou_pi_pro.pdf

INTRIAGO, Pablo, 2012. Marine Microorganisms: perspectives for getting involved in cellulosic ethanol. Online. AMB Express. Roč. 2, č. 1. ISSN 2191-0855. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-46>. [cit. 2025-05-12].

JIN, Kunfeng; SONG, Guangjie; DIAO, Huailing; ZHANG, Xiaocheng; JI, Xin et al., 2023. Hydrogen-bond assisted nonconventional photoluminescence of crystalline and amorphous cellulose. Online. Cellulose. Roč. 30, č. 13, s. 8139-8150. ISSN 0969-0239. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05392-5>. [cit. 2025-02-03].

KANEKO, Masayuki; OMORI, Tatsuki; IGAI, Katsura; MABUCHI, Takako; SAKAI-TAZAWA, Miho et al., 2024. Facultative endosymbiosis between cellulolytic protists and methanogenic archaea in the gut of the Formosan termite *Coptotermes formosanus*. Online.

ISME Communications. 2024-01-08, roč. 4, č. 1. ISSN 2730-6151. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ismeco/ycae097>. [cit. 2025-02-03].

KATYAL, Moniya; SINGH, Rakshanda; MAHAJAN, Ritu; SHARMA, Anurekha; GUPTA, Ranjan et al., 2023. Bacterial cellulose: Nature's greener tool for industries. Online. Biotechnology and Applied Biochemistry. Roč. 70, č. 5, s. 1629-1640. ISSN 0885-4513. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bab.2460>. [cit. 2025-01-29].

KOPECKÁ, Jana a ROTKOVÁ, Gabriela, 2017. Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií. Online. 23. června 2017. ISBN 978-80-210-8787-3, 978-80-210-8788-0. Dostupné z: <http://elportal.cz/publikace/cviceni-mikrobiologie>. [cit. 2025-04-28].

KUDO, H.; CHENG, K.-J. a COSTERTON, J. W., 1987. Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the in vitro degradation of straw cellulose. Online. Canadian Journal of Microbiology. 1987-03-01, roč. 33, č. 3, s. 244-248. ISSN 0008-4166. Dostupné z: <https://doi.org/10.1139/m87-041>. [cit. 2025-05-14].

LAMED, R; NAIMARK, J; MORGENSTERN, E a BAYER, E A, 1987. Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. Online. Journal of Bacteriology. Roč. 169, č. 8, s. 3792-3800. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jb.169.8.3792-3800.1987>. [cit. 2025-02-03].

LI, Hao; ZHANG, Minqi; ZHANG, Yuanhao; XU, Xueming; ZHAO, Ying et al., 2023. Characterization of Cellulose-Degrading Bacteria Isolated from Silkworm Excrement and Optimization of Its Cellulase Production. Online. Polymers. Roč. 15, č. 20. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15204142>. [cit. 2025-02-04].

LI, Yingxin; KURAMAE, Eiko E.; NASIR, Fahad; WANG, Enze; ZHANG, Zhengang et al., 2023. Addition of cellulose degrading bacterial agents promoting keystone fungal-mediated cellulose degradation during aerobic composting: Construction the complex co-degradation system. Online. Bioresource Technology. Roč. 381. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129132>. [cit. 2025-02-03].

MOBLEY, H L; ISLAND, M D a HAUSINGER, R P, 1995. Molecular biology of microbial ureases. Online. Microbiological Reviews. Roč. 59, č. 3, s. 451-480. ISSN 0146-0749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/mr.59.3.451-480.1995>. [cit. 2025-05-14].

MON, María Laura; ROMANO, Nelson; FARACE, Pablo Daniel; TORTONE, Claudia A.; ORIANI, Delia S. et al., 2024. Exploring the cellulolytic activity of environmental mycobacteria. Online. Tuberculosis. Roč. 147. ISSN 14729792. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2024.102516>. [cit. 2025-01-24].

MONDAL, Subhadeep; HALDER, Suman Kumar a MONDAL, Keshab Chandra, 2022. Tailoring in fungi for next generation cellulase production with special reference to CRISPR/CAS system. Online. Systems Microbiology and Biomanufacturing. Roč. 2, č. 1, s. 113-129. ISSN 2662-7655. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00045-9>. [cit. 2025-01-30].

OLKIEWICZ, Magdalena; TYLKOWSKI, Bartosz; MONTORNÉS, Josep M.; GARCIA-VALLS, Ricard a GULACZYK, Iwona, 2022. Modelling of enzyme kinetics: cellulose enzymatic hydrolysis case. Online. Physical Sciences Reviews. 2022-08-31, roč. 7, č. 8, s. 901-921. ISSN 2365-659X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/psr-2020-0039>. [cit. 2025-01-24].

ROCKY, M. Mehedi Hasan; RAHMAN, Ismail M.M.; BISWAS, Foni B.; RAHMAN, Shafiqur; ENDO, Masaru et al., 2023. Cellulose-based materials for scavenging toxic and precious metals from water and wastewater: A review. Online. Chemical Engineering Journal. Roč. 472. ISSN 13858947. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.144677>. [cit. 2025-01-29].

ROY, Deblina; GUNRI, Sunil Kumar a PAL, Kamal Krishna, 2024. Isolation, screening and characterization of efficient cellulose-degrading fungal and bacterial strains and preparation of their consortium under in vitro studies. Online. 3 Biotech. Roč. 14, č. 5. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13205-024-03974-z>. [cit. 2025-01-29].

SALIMI, Mehri; EL IDRISSE, Ayoub; CHANNAB, Badr-eddine; ESSAMLALI, Younes; FIROUZABADI, Ali Ghadami et al., 2024. Cellulose-based controlled release fertilizers for sustainable agriculture: recent trends and future perspectives. Online. Cellulose. Roč. 31, č. 18, s. 10679-10726. ISSN 0969-0239. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10570-024-06273-1>. [cit. 2025-05-11].

TORGBO, Selorm a SUKYAI, Prakit, 2020. Biodegradation and thermal stability of bacterial cellulose as biomaterial: The relevance in biomedical applications. Online. Polymer Degradation and Stability. Roč. 179. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109232>. [cit. 2025-02-02].

TSAVKELOVA, Elena; PROKUDINA, Ljuba; EGOROVA, Maria; LEONTIEVA, Maria; MALAKHOVA, Dina et al., 2018. The structure of the anaerobic thermophilic microbial community for the bioconversion of the cellulose-containing substrates into biogas. Online. Process Biochemistry. Roč. 66, s. 183-196. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.12.006>. [cit. 2025-02-03].

ZHOU, Yanzhong; LI, Jieming; LI, Zhen; YIN, Hao; ZHU, Siqi et al., 2024. Rapid and robust bacterial species identification using hyperspectral microscopy and gram staining techniques. Online. Journal of Biophotonics. Roč. 17, č. 4. ISSN 1864-063X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbio.202300449>. [cit. 2025-04-18].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura nanocelulózy	13
Obrázek 2 Schéma enzymatické hydrolýzy celulózy celulázovým komplexem	15
Obrázek 3 Struktura rostlinné buňky	17
Obrázek 4 Princip desítkového ředění	32
Obrázek 5 Princip křížového roztěru	33
Obrázek 6 Barvení Kongo červení	34
Obrázek 7 Barvení Lugolovým roztokem	34
Obrázek 8 Graf procentuálního zastoupení celulolytických mikroorganismů	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Lokality zkoumaných vzorků	27
Tabulka 2 AVICEL médium.....	28
Tabulka 3 CMC médium	29
Tabulka 4 BHI médium	29
Tabulka 5 MM + CMC médium	29
Tabulka 6 MBA médium	30
Tabulka 7 Makroskopický vzhled izolovaných mikroorganismů.....	37
Tabulka 8 Celulolytické indexy mikroorganismů	39
Tabulka 9 Identifikace mikroorganismů pomocí KOH testu a Gramova barvení.....	41
Tabulka 10 Výsledky biochemických testů	43
Tabulka 11 Zastoupení celulolytickým mikroorganismů v dílčích vzorcích	45

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ARG	arginin–dihydroláza
BHI	mozko–srdcová infuze
CBH	celobiohydroláza
CEL	celobióza
CMC	karboxymethylcelulóza
INO	inositol
KOH	hydroxid draselný
MAN	mannitol
MBA	marine broth agar
MM	minerální médium
PCR	polymerázová řetězová reakce
RAF	rafinóza
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SOR	sorbitol
SUC	sacharóza
TRE	trehalóza
URE	ureáza