

Izolace bakterií degradujících celulózu a stanovení jejich celulolytického potenciálu

František Mikl

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: František Mikl
Osobní číslo: T21940
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Ochrana životního prostředí
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Izolace bakterií degradujících celulózu a stanovení jejich celulolytického potenciálu

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část
Celulolytická aktivita.
Bakterie s celulolytickou aktivitou.
II. Praktická část
Mikrobiologický rozbor a izolace bakterií z životního prostředí.
Skríning celulolytické aktivity.
Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

- JAIN, Devendra, RAVINA, Ali Asger BHOJIYA, Surya CHAUHAN, Deepak RAJPUROHIT a Santosh R. MOHANTY. Polyphasic Characterization of Plant Growth Promoting Cellulose Degrading Bacteria Isolated from Organic Manures. *Current Microbiology*. 2021, 78(2), 739-748. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-020-02342-3
- GUDER, Daba Gudeta a M.S.R. KRISHNA. Isolation and Characterization of Potential Cellulose Degrading Bacteria from Sheep Rumen. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2019, 13(3), 1831-1839. ISSN 09737510. Dostupné z: doi:10.22207/JPAM.13.3.60
- GUPTA, Pratima, Kalpana SAMANT a Avinash SAHU. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. *International Journal of Microbiology*. 2012, 1-5. ISSN 1687-918X. Dostupné z: doi:10.1155/2012/578925

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

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

- že jsem bakalářskou práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Celulolytické bakterie patří mezi nedílné součásti globálního cyklu uhlíku. Spolu s ostatními celulolytickými organismy degradují velmi odolnou celulózu na jednoduché sacharidy. Toho dosahují prostřednictvím specifických, jimi produkovaných enzymů. Celulolytické bakterie samozřejmě nenachází využití pouze v klíčových přírodních procesech, ale také v průmyslu.

V této práci byl proveden screening a stanovení celulolytické aktivity psychrofilních a mezofilních celulolytických bakterií izolovaných ze stojatých povrchových vod. Screening a stanovení celulolytické aktivity probíhalo na selektivním karboxymethyl celulózového (CMC) agaru v kombinaci se zobrazením projasněných zón Lugolovým roztokem. Z celkového počtu 90 izolátů (50 mezofilních a 40 psychrofilních) bylo 40 % mezofilních a 38 % psychrofilních izolátů celulolyticky aktivních. U celulolytických izolátů byla následně stanovena kvantitativní hodnota celulolytické aktivity vyjádřená jako enzymatický index. Enzymatický index se u mezofilních izolátů pohyboval v rozmezí 0,31 až 3,72 a u psychrofilních izolátů v rozmezí 0,46 až 6,23. Celulolytické izoláty byly nakonec charakterizovány pomocí Gramova barvení a KOH testu, přičemž jak u mezofilních, tak u psychrofilních celulolytických izolátů převažovaly gramnegativní tyčinky.

Klíčová slova: celulolytická aktivita, celulóza, udržitelnost, rozklad

ABSTRACT

Cellulolytic bacteria belong to integral components of the global carbon cycle. They degrade very resistant cellulose into simple carbohydrates together with other cellulolytic organisms. This process is facilitated by specialized enzymes that they produce. Except their ecological importance, these bacteria have also industrial utilization potential.

This study focused on screening and assessment of cellulolytic activity in psychrophilic and mesophilic cellulolytic bacteria isolated from stagnant waters. The evaluation was conducted using selective carboxymethylcellulose (CMC) agar, complemented by Lugol's solution to visualize the zones of clearance. Out of 90 isolates (50 mesophilic and 40 psychrophilic), 40% of the mesophilic and 38% of the psychrophilic bacteria exhibited cellulolytically active. The enzymatic index, reflecting the extent of cellulolytic activity, was measured for these active isolates. It varied from 0.31 to 3.72 among mesophilic isolates and from 0.46 to 6.23 for psychrophilic isolates. The cellulolytic bacteria were further characterized using Gram staining and the KOH test, demonstrating a predominance of Gram-negative rods in both temperature groups.

Key words: cellulolytic activity, cellulose, sustainability, decomposition

Mé poděkování patří vedoucímu této bakalářské práce, Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D., za jeho pomoc a věcné rady. Dále bych chtěl poděkovat zaměstnancům Ústavu ochrany životního prostředí za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za pomoc nejen při psaní této bakalářské práce.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CELULÓZA	12
1.1 STRUKTURA CELULÓZY	12
1.1.1 Krystalické modifikace celulózy	12
2 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD CELULÓZY	14
2.1 PŘEDÚPRAVA LIGNOCELULÓZY	14
2.2 CELULÁZY.....	14
2.2.1 Klasifikace celuláz	15
2.2.2 Rozdělení celuláz podle místa působení	15
2.2.3 Celulozómy	16
2.3 LYTICKÉ POLYSACHARID MONOOXYGENÁZY	17
3 CELULOLYTICKÉ BAKTERIE	21
3.4 VÝZNAM CELULOLYTICKÝCH BAKTERIÍ	22
3.4.1 Využití celulolytických bakterií v průmyslu.....	22
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
4 CÍL PRÁCE	25
5 MATERIÁL	26
5.1 VZORKY	26
5.2 LABORATORNÍ PŘÍSTROJE.....	26
5.3 CHEMIKÁLIE.....	26
5.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	27
6 METODIKA	29
6.1 VZORKOVÁNÍ	29
6.2 METODY IZOLACE MIKROORGANISMŮ.....	29
6.2.1 Mikrobiologické ředění vzorku	29
6.2.2 Metoda křížového roztěru	29
6.3 SCREENING A STANOVENÍ CELULOLYTICKÉ AKTIVITY	30
6.3.1 Volba nejvhodnějšího selektivního agaru pro screening a stanovení celulolytické aktivity	30
6.3.2 Screening a stanovení celulolytické aktivity na CMC agaru 1	31
6.4 METODY CHARAKTERIZACE	31
6.4.1 Gramovo barvení.....	31
6.4.2 KOH test.....	32
6.5 ZAKONZERVOVÁNÍ ZÍSKANÝCH CELULOLYTICKÝCH IZOLÁTŮ.....	32

7	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
7.1	POČET JEDNOTEK TVOŘÍCÍCH KOLONIE V JEDNOTLIVÝCH VZORCÍCH.....	33
7.2	VOLBA NEJVHODNĚJŠÍHO SELEKTIVNÍHO AGARU PRO SCREENING A STANOVENÍ CELULOLYTICKÉ AKTIVITY	34
7.3	SCREENING A STANOVENÍ CELULOLYTICKÉ AKTIVITY JEDNOTLIVÝCH IZOLÁTŮ	35
7.3.1	Stanovení celulolytické aktivity mezofilních izolátů	35
7.3.2	Stanovení celulolytické aktivity psychrofilních izolátů	36
7.4	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ CELULOLYTICKÝCH IZOLÁTŮ	38
7.4.1	Procentuální zastoupení mezofilních celulolytických izolátů	38
7.4.2	Procentuální zastoupení psychrofilních celulolytických izolátů	39
7.5	CHARAKTERIZACE CELULOLYTICKÝCH IZOLÁTŮ	40
7.5.1	Charakterizace mezofilních celulolytických izolátů	40
7.5.2	Charakterizace psychrofilních celulolytických izolátů	42
	ZÁVĚR	44
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	50
	SEZNAM OBRÁZKŮ	51
	SEZNAM TABULEK	52

ÚVOD

Celulóza je nejhojnějším přírodním obnovitelným polymerem na Zemi, tvoří v průměru 40-60 % rostlinné sušiny a podle některých odhadů je jí na Zemi každoročně vyprodukováno asi $1,5 \cdot 10^{12}$ tun. V celulóze je tedy uloženo obrovské množství uhlíku a energie, která je ale často obtížně dostupná. (Heinze, 2016; Klemm et al., 2005)

Nicméně existují mikroorganismy, které umí nerozpustný polysacharid celulózu, přeměnit na jednoduché rozpustné sacharidy a využít tak její skutečný potenciál. Tento proces je uskutečňován prostřednictvím skupiny specifických extracelulárních enzymů, které jsou těmito mikroorganismy syntetizovány. (Jain et al. 2021)

Skupina těchto enzymů nenachází uplatnění pouze v klíčových přírodních procesech, kdy se společně s dalšími enzymy podílí na globálním koloběhu uhlíku, ale také v různých odvětvích průmyslu, například v bioethanolovém, papírenském, nebo potravinářském. (Arusha et al., 2016) V současné době jsou k průmyslové produkci enzymů rozkládajících celulózu využívány především celulolytické houby díky své poměrně vysoké celulolytické aktivitě. Tyto bakterie však navzdory své nižší celulolytické aktivitě přitahují stále větší pozornost. A to především díky své přirozené rozmanitosti, vysoké rychlosti růstu a schopnosti obývat různé niky, což umožňuje výběr celulolytických kmenů odolných vůči nejrůznějším stresovým faktorům. Tyto kmeny produkují rozmanitou škálu enzymů rozkládajících celulózu často i v drsných podmínkách. (Balla et al., 2022)

Cílem této práce bylo nalezení mezofilních a psychrofilních bakterií schopných aerobního rozkladu celulózy, které mohou být použity například ke zlepšení účinnosti kompostovacího procesu (Abdel-Rahman et al., 2016), dále také společně s fermentačními mikroorganismy k výrobě bioethanolu, nebo k již zmíněné průmyslové výrobě enzymů rozkládajících celulózu. Ty jsou podle zpráv o globálním trhu s enzymy nejžádanějšími enzymy a pokrývají přibližně 20 % tohoto světového trhu. (Singh et al., 2021)

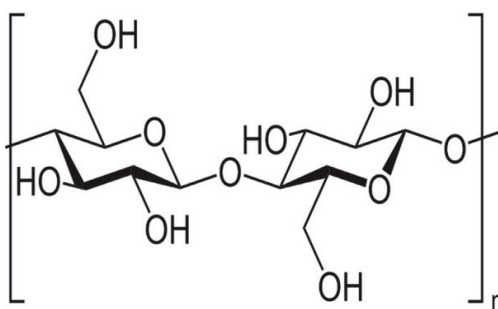
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CELULÓZA

Celulóza je základním komponentem buněčné stěny rostlin, která je pro rostlinou buňku nepostradatelná a plní mnoho rozmanitých funkcí. Má například významnou úlohu při dělení, růstu, diferenciaci buněk a morfogenezi pletiv. Taktéž určuje tvar buňky a poskytuje pletivům mechanickou pevnost. (Heinze, 2016; Klemm et al., 2005)

1.1 Struktura celulózy

Z chemického pohledu se jedná o polydisperzní nevětvený lineární homopolymer, sestávající se z β -D-glukopyranosových jednotek, spojených β -1,4-glykosidickými vazbami. Počet β -D-glukopyranosových jednotek je v každém řetězci celulózy proměnlivý a závisí na zdroji, ze kterého pochází, nicméně nejčastěji se pohybuje v rozmezí od dvou do patnácti tisíc. (Heinze, 2016; Klemm et al., 2005)



Obrázek 1 Struktura celulózy (Kumar Dey a Dey, 2021)

Jelikož jsou jednotlivé řetězce nevětvené, mohou se k sobě, například v buněčné stěně rostlin, přikládat a tvořit mezi sebou vodíkové můstky, které se neuplatňují pouze mezi těmito řetězci, ale i uvnitř řetězců samotných. Nikdy tak nenajdeme samostatné vlákno celulózy, nýbrž shluky celulózových vláken označované jako mikrofibrily, které dále vytvářejí vyšší strukturální jednotky, makrofibrily. Díky pravidelnému uspořádání celulózových vláken má celulóza poměrně vysoký stupeň krystalinity, nejčastěji v rozsahu od 40 do 60 %, závislý na původu celulózy. (Heinze, 2016)

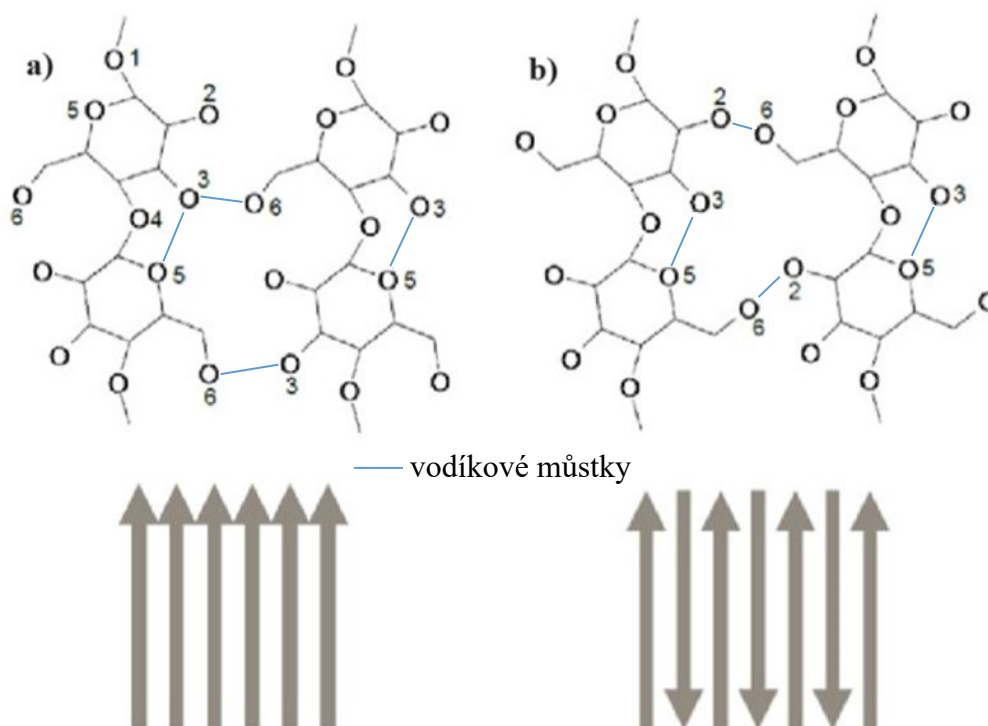
1.1.1 Krystalické modifikace celulózy

Podobně jako některé atomy prvků mají schopnost vyskytovat se v různých krystalografických soustavách a tvořit takzvané alotropické modifikace, i krystalické oblasti celulózy disponují analogickou vlastností a tvoří takzvané krystalické modifikace. Přítomná krystalická modifikace do značné míry ovlivňuje spektrum syntetizovaných enzymů

podílejících se na rozkladu celulózy. Jednotlivé modifikace se mezi sebou liší vzájemnou orientací řetězců a blízkostí jejich přílnutí. Odlišnosti v těchto parametrech způsobují rozdílné fyzikálně chemické vlastnosti u jednotlivých modifikací. Pro názornost budou zřejmě popsány dvě v přírodě se přirozeně vyskytující krystalické modifikace, z celkových šesti doposud objevených, a to celulóza I a II. Zbylé čtyři, vznikající pro průmyslové účely fyzikálně chemickými přeměnami celulózy I a II, se v přírodě přirozeně nevyskytují. (Maleki et al., 2016)

Převážná většina celulózy syntetizované v přírodě se vyskytuje v krystalické modifikaci zvané celulóza I. Na začátek je zapotřebí zmínit, že celulóza I je tvořena dvěma různými koexistujícími krystalickými strukturami, konkrétně I_α a I_β , jejichž poměr ovlivňuje její fyzikální vlastnosti. Obecnou vlastností obou krystalických forem je, že jednotlivé řetězce celulózy jsou vůči sobě orientovány paralelně, což umožňuje jejich velmi těsné přílnutí. (Heinze, 2016; Atalla a Vanderhart, 1984)

Na rozdíl od celulózy I je celulóza II v přírodě jen velmi málo zastoupena a pouze pár organismů je schopno její syntézy. Mezi její producenty patří bakterie druhu *Gluconoacetobacter xylinum*, nebo zelené řasy rodu *Halycistis*. Jednotlivé řetězce celulózy jsou v této modifikaci uspořádány antiparalelně. (Heinze, 2016)



Obrázek 2 Vzájemné uspořádání řetězců a) celulóza I, b) celulóza II (upraveno dle Pelegrini et al., 2019)

2 BAKTERIÁLNÍ ROZKLAD CELULÓZY

Bakteriální rozklad celulózy, jakožto klíčový proces podílející se na globálním koloběhu uhlíku, je uskutečňován prostřednictvím celulolytických bakterií produkujících specifické enzymy. Kromě skupiny synergických hydrolytických extracelulárních enzymů známých jako celulózy, je katalyzován také oxidačními extracelulárními enzymy zvanými lytické polysacharid monooxygenázy (LPMOs). LPMOs působí během rozkladu celulózy synergicky s celulázami. Kromě celulolytických bakterií disponují schopností rozkládat celulózu také specifické druhy hub a prvoků. (Barbosa et al., 2020; Horn et al., 2012)

2.1 Předúprava lignocelulózy

Na začátek je zapotřebí zmínit, že celulóza se přirozeně vyskytuje téměř výhradně ve formě lignocelulózy. Lignocelulóza je složena převážně ze tří strukturních polymerů, celulózy, hemicelulózy a ligninu, jejichž poměrné množství se v závislosti na původu lignocelulózy liší. Tyto tři hlavní strukturní komponenty jsou navzájem spojeny chemickými vazbami, což dělá z lignocelulózy komplexní matici, která je špatně dostupná pro celulózy a LPMOs. Ta tak musí být před započítím rozkladu celulózy modifikována některým z předúpravných procesů, které zabezpečí lepší přístupnost rozkladných enzymů k povrchu celulózy. Proces předúpravy lignocelulózy významně ovlivňuje efektivitu následného rozkladu celulózy. (Andlar et al., 2018)

V přirozených přírodních podmínkách je tento proces uskutečňován za pomoci organismů produkujících specifické enzymy. V průmyslových podmínkách je k předúpravě celulózy nejvíce využíváno nejrůznějších fyzikálně-chemických metod, jejichž přednostmi jsou relativně nízké náklady a vysoká účinnost. Mezi hlavní nevýhodu patří použití silných chemikálií a tím pádem drsné reakční podmínky v reakčních směsích. Průmyslově méně využívaná je biologická předúprava, při které silné chemikálie používány nejsou. Navzdory své environmentální přívětivosti je však tato metoda předúpravy velmi pomalá a málo účinná v porovnání s fyzikálně-chemickými metodami. (Abolore et al., 2024; Andlar et al., 2018)

2.2 Celulózy

Celulolytické bakterie produkují komplexní skupinu extracelulárních enzymů, takzvaných celuláz, které katalyzují hydrolytické štěpení β -1,4-glykosidických vazeb spojujících β -D-glukopyranosové jednotky v řetězcích celulózy za současného uvolnění jednoduchých sacharidů.

2.2.1 Klasifikace celuláz

Enzymy jsou klasifikovány do rodin podle jejich substrátové specifity a aminokyselinové sekvence. Celulázy patří do velké skupiny glykosid hydroláz (GHs). Podle pravidelně aktualizované databáze CAZy, která sdružuje takzvané karbohydrát aktivní enzymy (CAZymy), tedy enzymy degradující, syntetizující či modifikující komplexní uhlovodíky, jsou GHs rozděleny do 189 rodin. Celulázy lze najít v těchto rodinách: GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH10, GH12, GH26, GH44, GH45, GH48, GH51, GH61, GH74, GH124. (Barbosa et al., 2020)

2.2.2 Rozdělení celuláz podle místa působení

Celulázy jsou směsí různých celulolytických enzymů, které jsou rozděleny do skupin podle místa působení na endoglukanázy, exoglukanázy a β -glukosidázy. Pro všechny jmenované skupiny celuláz platí, že jednotlivé druhy bakterií často syntetizují více typů funkčně stejných celuláz náležících do stejné skupiny. (Andlar et al. 2018; Barbosa et al., 2020) Je nutné zmínit, že ne všechny celulolytické bakterie disponují přítomností genů kódujících všechny níže popsané skupiny enzymů. Zvláště geny pro exoglukanázy, které mají afinitu ke krystalickým oblastem celulózy, jsou v genomu celulolytických bakterií poměrně málo časté. To znamená, že velký počet druhů celulolytických bakterií je schopen degradovat amorfní oblasti celulózy, nicméně schopnost degradace krystalických oblastí celulózy není u celulolytických bakterií příliš častá. (Melo et al., 2014)

Endoglukanázy (EGs) mají afinitu k amorfním oblastem celulózy a hydrolyzují vnitřní β -glykosidické vazby, přičemž uvolňují oligomery různých délek, například celobiózu nebo celo-oligosacharidy. Jejich působení zapříčiní rychlý pokles délky řetězce, což vyústí v nárůst počtu redukujících koncových skupin. (Barbosa et al., 2020) EG tedy narušuje celulózu v amorfní oblasti za současného uvolnění oligosacharidů do doby, než se dostane k oblasti krystalické, kde je její funkce nahrazena exoglukanázou. (Henrissat et al. 1985)

Exoglukanázy (celobiohydrolázy, CBHs) jsou procesní enzymy s afinitou ke krystalickým oblastem celulózy. Tato skupina působí na redukující konce (CBHs I) nebo na neredukující konce vláken celulózy (CBHs II), přičemž dochází k uvolnění celobiózy. CBHs mají aktivní místa podobná tunelům, která se nejprve připojují ke koncům celulózových mikrofibril a poté procesně klouzají po celulózových vláknech, která navlékají skrz aktivní místa za současného odštěpení celobiózy. Pro efektivní rozklad celulózy musí

být přítomny oba typy CBHs. O rozklad celobiózy vzniklé působením CBHs se starají β -glukosidázy. (Barbosa et al., 2020; Henrissat et al. 1985)

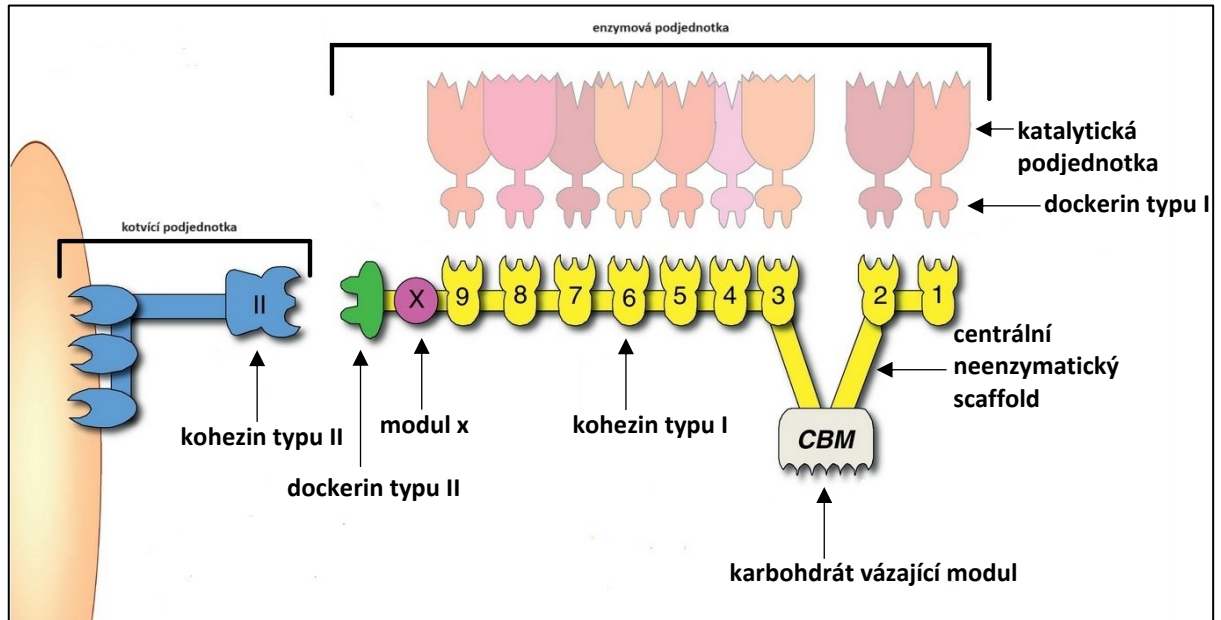
β -glukosidázy (β -Gs) hydrolyzují disacharid celobiózu nebo cello-oligomery na dvě molekuly glukózy. Tuto skupinu enzymů, umí na rozdíl od předchozích dvou skupin enzymů, syntetizovat i celá řada mikroorganismů, které nedisponují schopností rozkládat celulózu. Celobiázy jsou nezbytné pro úplnou degradaci celulózy na glukózu. Navíc hrají důležitou roli při regulaci celkové rychlosti celulólyzy, jelikož celobióza, jakožto substrát β -Gs, působí jako inhibitor na EGs a CBHs. β -Gs jsou zase inhibovány glukózou (Barbosa et al. 2020). Z toho vyplývá, že k dosažení maximální účinnosti celulólyzy musí být vzniklá glukóza spotřebována buď to samotnými celulólytickými bakteriemi, nebo také přítomnými necelulólytickými bakteriemi. V průmyslových podmínkách je možno přistoupit k simultánní sacharifikaci a fermentaci (SSF), případně je glukóza z reakční směsi odstraňována. (Chungopast et al. 2021; Zabed et al. 2017)

2.2.3 Celulozómy

Celulázy bývají u většiny anaerobních celulólytických organismů seskupovány do multienzymových komplexů zvaných celulozómy, které zlepšují efektivitu celulólyzy tím, že poskytují zvýšenou synergickou aktivitu mezi rezidentními celulázami. V 80. letech minulého století, Lamed a Bayer (1985) poprvé objevili tento komplexní systém v celulólytické termofilní anaerobní bakterii *Clostridium thermocellum*. V návaznosti na tento objev byla přítomnost celulozómů popsána u mnoha dalších celulólytických anaerobních bakterií. (Datta, 2024)

Celulozómy obsahují dvě hlavní podjednotky, kotvící a enzymovou. Kotvící podjednotka na jedné straně přiléhá k povrchu buňky. Na druhé straně kotevní podjednotky se nachází kohezin typu II tvořící nekovalentní vazbu s dockerinem typu II, čímž přichycují neenzymatický scaffold enzymové podjednotky ke kotvící podjednotce. Kostru enzymové podjednotky tvoří centrální neenzymatický scaffold. Ten obsahuje několik kohezinů typu I, karbohydrát vázající modul (CBM) zajišťující navázání celulozomu k substrátu, modul X se zatím neznámou funkcí a katalytické podjednotky, které jsou spojeny s dockeriny typu I. Nekovalentní vazba mezi kohezinem typu I a dockerinem typu I zajišťuje přichycení katalytických podjednotek k centrálnímu neenzymatickému scaffoldu. (Smith a Bayer, 2013)

Celulozomy je možno nalézt i u některých aerobních celulytických mikroorganismů. U těchto mikroorganismů však převládá způsob, kdy se jednotlivé celulázy uvolňují samostatně do okolního prostředí. (Datta, 2024)



Obrázek 3 Zjednodušené schéma celulozómu bakterie *Clostridium thermocellum* (upraveno dle Smith a Bayer, 2013)

2.3 Lytické polysacharid monoxygenázy

Dlouhou dobu byly celulázy jedinou známou skupinou enzymů schopnou katalyzovat bakteriální rozklad celulózy. Již v roce 1950 však Reese et al. navrhl, že degradace celulózy by mohla být řízena dvěma po sobě jdoucími fázemi, řízenými rozdílnými skupinami enzymů. Konkrétně počáteční nehydrolytickou fází zpřístupňující celulózu pro hydrolytické enzymy, následovanou vlastní fází hydrolýzy.

Vaaje-Kolstad et al. v roce 2005 zjistili, že bakterie *Serratia marcescens*, která disponuje schopností rozkládat krystalický analog celulózy, chitin, produkuje protein CBP21, který zvyšuje dostupnost chitinu pro hydrolytické enzymy.

V přelomové studii bylo roku 2010 prokázáno, že CBP21 je enzym, který štěpí glykosidické vazby v chitinu oxidativním způsobem za vzniku normálního redukujícího a oxidovaného konce. (Vaaje-Kolstad et al., 2010) V návaznosti na toto a některá další zjištění se pak vědci zabývali možností, že by proteiny spadající do stejné skupiny, jako protein CBP21, mohli obdobně působit i na celulózu. (Moser et al., 2008)

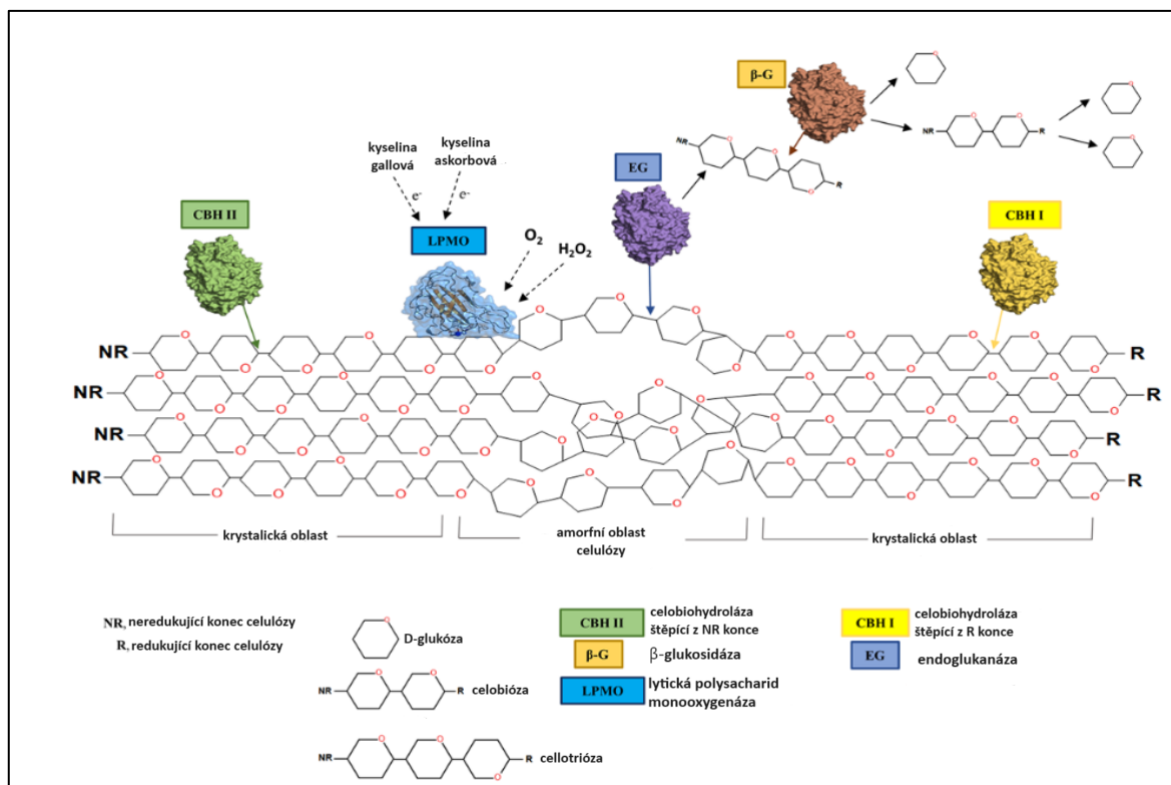
Tuto domněnku pak v roce 2011 Forsberg et al. potvrdili zjištěním, že CelS2, protein ze *Streptomyces coelicolor* spadající do stejné skupiny jako CBP21, skutečně štěpí celulózu obdobným oxidativním způsobem v synergii s hydrolytickými enzymy. Dnes už je tak dobře známo, že spolu s celulázami se na aerobním bakteriálním rozkladu celulózy podílí také enzymy s oxidačním účinkem, v současné době nazývané lytické polysacharid monooxygenázy (LPMOs). Je samozřejmě nutné zmínit, že stejně jako u celuláz, se přítomnost genů pro LPMOs liší napříč celulolytickými bakteriálními druhy. (Beeson et al., 2015)

2.3.1 Klasifikace lytických polysacharid monooxygenáz

LPMOs se podle databáze CAZy řadí do velké skupiny takzvaných enzymů s pomocnou aktivitou (AAs). Tato skupina v současné době seskupuje 9 rodin ligninolytických enzymů a 7 rodin LPMOs. Ligninolytické enzymy sice působí na zcela odlišný typ substrátu, ale stejně jako LPMOs rozkládají svůj substrát oxidativním způsobem, navíc se s LPMOs a dalšími enzymy podílí na rozkladu lignocelulózy. Z těchto důvodů jsou do této skupiny řazeny společně. Bakteriální LPMO se konkrétně řadí do rodiny AA10. (Horn et al., 2012; Levasseur et al., 2013)

2.3.2 Oxidační působení lytických polysacharid monooxygenáz

LPMOs působí konkrétně prostřednictvím oxidačního mechanismu. Iont mědi přítomný ve struktuře LPMOs redukuje molekulární kyslík v přítomnosti externího donoru elektronů. Jako donor elektronů slouží například kyselina askorbová nebo gallová. Redukovaný kyslík následně unáší jeden vodík ze substrátu a štěpí β -1,4 glykosidickou vazbu za vzniku konce řetězce obsahujícího cukr oxidovaný na pozici C1 nebo C4. Oxidací na pozici C1 vznikají rozpustné oligosacharidy s kyselinou aldonovou na jejich redukujícím konci, oxidací na pozici C4 vznikají rozpustné oligosacharidy s ketoaldózou na jejich neredukujícím konci. Některé LPMOs oxidují výhradně na pozici C1, jiné výhradně na pozici C4 a třetí skupina může oxidovat buď na pozici C1 nebo C4. Oxidací glykosidické vazby vytvářejí LPMOs vstupní bod pro celulázy, čímž zlepšují degradaci celulózy. (Horn et al., 2012)



Obrázek 4 Zjednodušené schéma bakteriálního rozkladu celulózy prostřednictvím synergického působení celuláz a LPMO (upraveno dle Andlar et al., 2018)

2.4 Faktory ovlivňující bakteriální rozklad celulózy

Bakteriální degradace celulózy je poměrně pomalý proces. Mnoho faktorů ovlivňuje nejenom rychlost degradace celulózy, ale také použité enzymy. Mezi tyto faktory se řadí například povaha celulózy, teplota, obsah kyslíku nebo pH. (Datta, 2024)

Povaha celulózy je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících bakteriální rozklad celulózy. Z těchto povahových rysů lze zdůraznit především poměr krystalické a amorfní fáze. Tento parametr ovlivňuje rychlost rozkladného procesu a to tak, že s narůstajícím podílem krystalické fáze klesá rychlost degradace. Dalším podstatným povahovým rysem je krystalická modifikace celulózy, která ovlivňuje spektrum syntetizovaných rozkladných enzymů. (Andlar et al., 2018; Barbosa et al., 2020)

Dalšími důležitými faktory jsou teplota a pH. Bakteriální rozklad celulózy probíhá v rozmezí teplot 0 až 65 °C a v rozmezí pH 5 až 11. Přesnou optimální teplotu a pH pro degradaci celulózy nicméně určit nelze, jelikož se tyto parametry liší napříč bakteriálními druhy. (Shah a Mishra, 2020)

Obsah kyslíku ovlivňuje jak rychlost, tak enzymy použité při bakteriálním rozkladu celulózy. V přítomnosti kyslíku se snoubí hydrolytický a oxidační mechanismus rozkladu celulózy. Hydrolyza celulózy je uskutečňována pomocí volně se vyskytujících celuláz, oxidační štěpení prostřednictvím LPMOs. V anaerobních podmínkách probíhá pouze hydrolytický rozklad celulózy působením celulozómů. Anaerobní způsob bakteriálního rozkladu celulózy je v porovnání s aerobním rozkladem pomalejší. (Andlar et al., 2018)

3 CELULOLYTICKÉ BAKTERIE

Bakterie schopné rozkladu celulózy, a tedy mající celulytickou aktivitu, jsou označovány jako celulytické. Vyznačují se poměrně krátkou generační dobou, obrovskou rozmanitostí a schopností obývat i extrémní prostředí. (Balla et al., 2022) Výčet bakteriálních rodů, do nichž náleží celulytické bakterie, je opravdu nepřehledný. Pro názornost jen pár z nich, například rody *Acetivibrio*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ruminococcus*, *Streptomyces*. nebo *Thermomonospora*. (Harindintwali et al. 2020)

3.1 Celulytická aktivita

Celulytická aktivita je vlastností bakterií, která je vázána druhově a vyjadřuje schopnost celulytických bakterií rozkládat celulózu. Kvantitativní hodnota celulytické aktivity, tedy míra schopnosti celulytických bakterií rozkládat celulózu, je vyjadřována jako enzymatický index. Hodnota celulytické aktivity stoupá s rostoucí hodnotou enzymatického indexu. Screening a stanovení celulytické aktivity probíhá prostřednictvím selektivních agarů obsahujících celulózu. (Balla et al., 2022; Kasana et al., 2008) Postup screeningu a stanovení celulytické aktivity je podrobně popsán v kapitole 6.3.

Toto stanovení a vyjádření schopnosti rozkladu celulózy je nicméně vhodné pouze pro kultivovatelné celulytické bakterie. Pro dosud nekultivovatelné celulytické bakterie se využívá jiné metody, která určuje, zda je daná bakterie schopná rozložit celulózu na základě genů nalezených v jejím genomu při metagenomovém sekvenování. Sekvence nalezených genů jsou porovnávány se sekvencemi již známých genů kódujících enzymy zodpovědné za rozklad celulózy. (Yang et al., 2016)

Na závěr této kapitoly je ještě nutné dodat, že místo termínu celulytická aktivita bývá často používán termín celulytický potenciál, který vyjadřuje totéž, tedy schopnost celulytických bakterií rozkládat celulózu. (Gupta et al., 2012)

3.2 Výskyt celulytických bakterií

Bakteriální druhy, u nichž byla doposud zjištěna celulytická aktivita, byly nalezeny v mnoha rozmanitých prostředích, například ve vodě, v půdě nebo trávicím traktu živočichů. Vyjímkou nejsou ani prostředí, která se vyznačují extrémními podmínkami, ve kterých by ostatní celulytické organismy přežili jen těžko. (Balla et al., 2022)

Soares et al. (2012) popsali přítomnost celulolytických bakterií v půdách nacházejících se ve dvou lokalitách, které jsou vystaveny dvěma rozdílným extrémním podnebním. První lokalitou byla Brazilská semiaridní caatinga, druhou lokalitou Antarktida. Celulolytické bakterie tak lze najít mezi psychrofilů, mezofilů i termofilů.

Z hlediska využití celulolytických bakterií v průmyslu je jejich schopnost obývat různá, často i extrémní prostředí velmi užitečná, jelikož umožňuje výběr celulolytických kmenů odolných vůči nejrůznějším podmínkám. (Balla et al., 2022)

3.3 Vztah celulolytických bakterií ke kyslíku

Z předchozí kapitoly je jasné, že celulolytické bakterie lze v přírodě najít jako volně se vyskytující mikroorganismy, ale také jako mikroorganismy žijící uvnitř trávicího traktu nejrůznějších organismů. U volně se vyskytujících celulolytických bakterií probíhá rozklad celulózy ve většině případů za přístupu kyslíku, zatímco v trávicím traktu živočichů probíhá bez jeho přítomnosti. Z toho vyplývá, že zástupce celulolytických bakterií lze nalézt jak mezi aerobními, tak mezi anaerobními bakteriemi. Ačkoli mají anaerobní bakterie nezastupitelnou roli, v přírodě nicméně dominují bakterie aerobní, který jsou zodpovědné přibližně za 90–95 % celkového rozkladu celulózy. (Peréz et al., 2002)

3.4 Význam celulolytických bakterií

Význam celulolytických bakterií tkví především v jejich zapojení do globálního cyklu uhlíku, kdy jsou společně s dalšími celulolytickými organismy schopny uvolňovat obrovské množství uhlíku a energie uložené v celulóze. Život na naší planetě je tak ať už přímo či nepřímo vázán na činnost těchto organismů. Kromě klíčových přírodních procesů však nachází své uplatnění také v nejrůznějších odvětvích průmyslu. (Arusha et al., 2016)

3.4.1 Využití celulolytických bakterií v průmyslu

Celulolytické bakterie nachází uplatnění především při průmyslové výrobě celulóz, které jsou podle zpráv o globálním trhu s enzymy nejžádanějšími enzymy a pokrývají přibližně 20 % tohoto světového trhu. (Singh et al., 2021) Takto syntetizované enzymy jsou následně využívány například v bioethanolovém, potravinářském nebo papírnickém průmyslu. (Arusha et al., 2016; Guder et al., 2019)

Kromě průmyslové výroby celulóz je možno celulolytické bakterie také nepřímo využít k výrobě bioethanolu z rostlinné biomasy procesem zvaným simultánní sacharifikace a

fermentace (SSF). Při tomto procesu se využívá směsných mikrobiálních konsorcií složených z celulolytických bakterií a fermentujících mikroorganismů. Celulóza je nejprve prostřednictvím celulolytických bakterií rozložena na redukující sacharidy, které jsou poté následně mikrobiální fermentací přeměněny na ethanol. Mikroorganismy nejčastěji používané pro fermentaci redukujících sacharidů při SSF jsou *Saccharomyces cerevisiae* a *Zymomonas mobilis*. (Limayem a Ricke, 2012) K výrobě bioethanolu je namísto samotných mikroorganismů možno využít přímo i enzymy jimi syntetizované. To s sebou nicméně přináší nutnost syntetizované enzymy izolovat a purifikovat, což znamená vyšší cenu vyrobeného bioethanolu. (Barbosa et al., 2020)

Další z mnoha možných využití celulolytických bakterií je například jejich inokulace do kompostu za účelem zvýšení počtu prospěšných bakterií, které přispívají k jeho kvalitě. Chungopast et al. (2021) zjistili, že inokulace celulolytických bakterií do kompostu zvyšuje celkové množství bakterií, zejména bakterií fixujících dusík. V ekosystému kompostu dochází k synergickým vztahům celulolytických, dusík fixujících a dalších bakterií. Metabolity celulolytických bakterií využívají ostatní bakterie přítomné v kompostu, včetně bakterií fixujících dusík, které zase dodávají amoniak jako zdroj dusíku pro ostatní bakterie. Některé celulolytické bakterie jsou dokonce sami schopné fixace molekulárního dusíku, například zástupci rodů *Bacillus*, *Paenibacillus* nebo *Pseudomonas*. (Harindintwali et al. 2020)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo provést screening a stanovení celulytické aktivity u psychrofilních a mezofilních bakterií izolovaných z povrchových stojatých vod. Toho bylo docíleno pomocí literární rešerše a mikrobiologických metod.

Jednotlivé části práce zahrnovaly:

- izolace bakterií
- volbu nejvhodnějšího způsobu screeningu a stanovení celulytické aktivity
- screening a stanovení celulytické aktivity na selektivním CMC agaru
- identifikaci celulytických izolátů pomocí Gramova barvení a KOH testu

5 MATERIÁL

5.1 Vzorčky

Pro screening celulolytické aktivity mezofilních a psychrofilních bakterií bylo použito 10 vzorků stojatých povrchových vod z různých lokalit v okolí Zlína. Všechny lokality jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1 Seznam lokalit

	Lokalita	Datum odběru	Teplota při odběru [°C]
1	Slepé rameno Moravy (PR Kanada)	3.10.2023	21,1
2	Přehradní nádrž Fryšták		20,3
3	Mokřad – Rusava		18,5
4	Zatopený lom Chvalčov		19,1
5	Slepé rameno Moravy (PP Na letišti)		23,2
6	Machovský rybník		20,7
7	Mokřad – Hostišová		18,6
8	Retenční nádrž Lehotice		15,6
9	Zboženský rybník		14,3
10	Chlumský rybník		14,8

5.2 Laboratorní přístroje

Běžné laboratorní pomůcky a laboratorní sklo

Digestoř Aura PCR

Mikropipety

Mikroskop Olympus CX41

Vortex Genie 2

BioAir, Itálie

Eppendorf, Německo

Intarco Micro, Česká republika

Scientific Industries, USA

5.3 Chemikálie

Aceton

Agar

Etanol

Hydroxid sodný

Imerzní olej

K₂HPO₄

KCl

Kongo červeň

Krystalová violet

Lugolův roztok

MgSO₄

Penta, Česká republika

Himedia, Indie

Penta, Česká republika

Penta, Česká republika

Sigma-Aldrich, USA

Penta, Česká republika

Penta, Česká republika

Himedia, Indie

Sigma-Aldrich, USA

Lachema, Česká republika

Penta, Česká republika

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Penta, Česká republika
NaNO ₃	Penta, Česká republika
(NH ₄) ₂ SO ₄	Penta, Česká republika
Pepton	Himedia, Indie
Safranin	Himedia, Indie
Sodná sůl karboxymethylcelulózy	Himedia, Indie
Želatina	Himedia, Indie

5.4 Kultivační média

Tabulka 2 Složení: mozko-srdcová infuze (BHI): Himedia Indie

Látka	Množství [%]
Telecí mozek, infuzní forma	20,0
Hovězí srdce, infuzní forma	25,0
Proteázový peptid	1,0
Dextróza	0,2
NaCl	0,5
Na ₃ PO ₄	2,5
Agar	1,5

Tabulka 3 Složení: CMC agar 1

Látka	Množství [%]
NaNO ₃	0,3
K ₂ HPO ₄	0,1
MgSO ₄	0,05
KCl	0,05
Sodná sůl karboxymethylcelulózy	0,2
Pepton	0,02
Agar	1,7

Tabulka 4 Složení: CMC agar 2

Látka	Množství [%]
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,03
K ₂ HPO ₄	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25
Želatina	0,2
Sodná sůl karboxymethylcelulózy	1,0
Pepton	1,0
Agar	1,5

Tabulka 5 Složení: CMC agar s Kongo červení

Látka	Množství [%]
K_2HPO_4	0,05
$MgSO_4$	0,025
Želatina	0,2
Sodná sůl karboxymethylcelulózy	0,2
Kongo červeně	0,02
Agar	1,5

6 METODIKA

6.1 Vzorkování

Do sterilních plastových 50 ml centrifugačních zkumavek byly asepticky odebrány vzorky povrchových stojatých vod v blízkosti břehu, vždy s trochou tlející rostlinné biomasy. Převážná teplota byla stejná jako venkovní teplota při odběru vzorků, tedy 20 ± 1 °C. Vzorky byly inokulovány na BHI agar v tentýž den, ve který probíhal i jejich odběr.

6.2 Metody izolace mikroorganismů

Vzorky byly po naředění inokulovány na BHI agar a ponechány ke kultivaci. U mezofilních bakterií kultivace probíhala při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 3 dní. Psychrofilní bakterie byly kultivovány při teplotě 4 ± 1 °C po dobu 7 dní. Vyrostlé kolonie mezofilních i psychrofilních bakterií byly spočteny a vybrané z nich byly následně izolovány a purifikovány pomocí metody křížového roztěru.

6.2.1 Mikrobiologické ředění vzorku

Většinu vzorků pro mikrobiologické stanovení je potřeba před naočkováním na tekutá či ztužená živná média naředit tak, aby na Petriho miskách vyrostlo počítatelné množství kolonií. Ředění se provádí desetinnou řadou, kdy se původní vzorek ředí postupně násobky desíti.

Nejprve bylo 0,5 ml vzorku asepticky přeneseno do zkumavky se 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku. Obsah ve zkumavce byl opatrně, ale důkladně promíchán. Poté bylo odebráno 0,5 ml a přeneseno do následující zkumavky opět se 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku. Tímto postupem bylo dosaženo zředění 10^{-1} a 10^{-2} . Z obou zkumavek bylo následně vyočkováno 0,1 ml zředěného vzorku na předem připravená živná média.

6.2.2 Metoda křížového roztěru

Křížový roztěr se používá především ke kontrole čistoty kultur, ale také k získávání čistých kultur ze směsných vzorků. K jeho provedení je zapotřebí pouze správně vybraná živná půda v Petriho misce a sterilní bakteriologická klička.

Do očka sterilní bakteriologické kličky byla nabrána kultura a dobře rozetřena na povrchu BHI agaru do tvaru oválu u okraje Petriho misky. Dále byla novou sterilní bakteriologickou kličkou rozetřena série čar po obvodu misky. Další série čar byla rozetřena opět novou sterilní bakteriologickou kličkou tak, aby protínaly první čáry do kříže. Nakonec byla další novou sterilní bakteriologickou kličkou naočkována i zbývající plocha BHI agaru formou klikaté čáry.

6.3 Screening a stanovení celulolytické aktivity

Purifikované izoláty byly následně testovány na schopnost rozkládat celulózu. V případě, že daný izolát touto schopností disponoval, byla u něj zároveň stanovena celulolytická aktivita. Testy byly prováděny na selektivním CMC agaru 1 v kombinaci se zvýrazněním projasněných zón pomocí Lugolova roztoku. Tento selektivní agar byl vybrán jako nejvhodnější ze tří celkově testovaných médií.

6.3.1 Volba nejvhodnějšího selektivního agaru pro screening a stanovení celulolytické aktivity

Volba nejvhodnějšího selektivního agaru pro screeningu a stanovení celulolytické aktivity probíhala pomocí dvou vzorových bakteriálních kultur. Jako ukázka pozitivního výsledku sloužila neidentifikovaná celulózu degradující bakteriální kultura. Pro ukázku negativního výsledku byla použita celulózu nedegradující bakteriální kultura *Escherichia coli*.

Potenciálně vhodná selektivní média v Petriho miskách (CMC agar 1 a 2, CMC agar s Kongo červení) byla naočkována vzorovými bakteriálními kulturami. Očkování probíhalo tak, že do očka bakteriologické kličky byla nabrána vybraná kultura a dobře rozetřena na povrchu vybraného média do tvaru oválu o rozměrech přibližně 5 x 3 mm. Po naočkování byla média kultivována při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 3 dnů. Po proběhnutí kultivace bylo zapotřebí u médií CMC agar 1 a 2 zobrazit projasněné zóny, které vznikají okolo celulózu degradujících bakterií. (Balla et al., 2022; Kasana et al., 2008)

U CMC agarů 1 a 2 byla pro zobrazení projasněných zón média převrstvena převrstvena Lugolovým roztokem po dobu 3 minut. U CMC agaru s Kongo červení se projasněné zóny u celulózu degradujících bakterií zobrazí i bez převrstvení specifickým činidlem. Nakonec proběhlo vizuální vyhodnocení a volba nejvhodnějšího selektivního agaru pro screening a stanovení celulolytické aktivity. (Balla et al. 2022; Kasana et al., 2008)

6.3.2 Screening a stanovení celulolytické aktivity na CMC agaru 1

Purifikované izoláty byly naočkovány na CMC agar 1 v Petriho miskách. Bakteriologickou kličkou byly izoláty na povrchu CMC agaru 1 rozetřeny do tvaru kruhu o poloměru asi 10 mm. Po naočkování byla média ponechána ke kultivaci. V případě mezofilních izolátů kultivace probíhala po dobu 3 dní při teplotě 30 °C. Psychrofilní izoláty byly kultivovány po dobu 7 dní při teplotě 4 °C.

Po proběhnutí kultivace byla média převrstvena Lugolovým roztokem po dobu 3 minut, aby došlo k zobrazení projasněných zón. U izolátů, které vykazaly schopnost rozkládat celulózu, byl za pomoci pravítka změřen průměr narostlé kolonie a zobrazené projasněné zóny. Průměr narostlé kolonie i projasněné zóny byl měřen vždy v nejširším místě. Z těchto hodnot byla na základě vztahu (1) stanovena kvantitativní hodnota celulolytické aktivity vyjádřená jako enzymatický index. (Balla et al., 2022)

$$EI = \frac{d_z - d_k}{d_k} \quad (1)$$

Kde:

EI – enzymatický index [-]

d_z – průměr hydrolytické zóny [mm]

d_k – průměr kolonie [mm].

6.4 Metody charakterizace

Izoláty, u nichž byla detekována celulolytická aktivita, byly charakterizovány pomocí Gramova barvení a KOH testu.

6.4.1 Gramovo barvení

Gramovo barvení je jednou z diagnostických metod používaných při identifikaci bakterií. Rozlišuje skupinu grampozitivních (barví se modrofialově) a gramnegativních bakterií (barví se červenorůžově) na základě rozdílů ve složení jejich buněčné stěny.

Fixovaný preparát na podložním sklíčku byl nejprve na 60 sekund ponořen do roztoku krystalové violeti. Poté byl roztok krystalové violeti bez oplachování slit a ponořen na 60 sekund do Lugolova roztoku. Lugolův roztok byl opatrně opláchnut destilovanou vodou a odbarvován po dobu přibližně 2 sekund. Následně byl preparát znovu opatrně opláchnut

destilovanou vodou a dobarven roztokem safraninu. Po dalším důkladném opláchnutí destilovanou vodou se preparát ponechal uschnout. Uschlý preparát byl mikroskopován pomocí imersního objektivu.

6.4.2 KOH test

KOH test je další z diagnostických metod používaných při identifikaci bakterií a stejně jako Gramovo barvení rozlišuje skupinu grampozitivních a gramnegativních bakterií na základě rozdílů ve složení jejich buněčné stěny. U grampozitivních bakterií nedochází k proniknutí roztoku hydroxidu draselného poměrně tlustou vrstvou peptidoglykanu a tedy ani k lýze buněk. Naopak u bakterií gramnegativních dochází vlivem roztoku hydroxidu draselného k narušení tenké vrstvy peptidoglykanu a tedy i k lýze buněk. Buněčný lyzát tvoří viskózní suspenzi, které se táhne za bakteriologickou kličkou.

Na sterilní podložní skličko byla nejprve nanesa kapka 3% roztoku KOH. Následně bylo v této kapce rozmícháno malé množství narostlé bakteriální biomasy za pomoci sterilní bakteriologické kličky. KOH test byl nakonec vizuálním pozorováním vyhodnocen.

6.5 Zakonzervování získaných celulolytických izolátů

Pro dlouhodobé uchování bakteriálních kultur je vhodné jejich zakonzervování v roztoku glycerolu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Celulolytické izoláty získané v rámci této bakalářské práce byly zakonzervovány v roztoku glycerolu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a jsou součástí sbírky ústavu ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně.

Do malé sterilní centrifugační mikrozumavky bylo napipetováno $500\text{ }\mu\text{l}$ 30% roztoku glycerolu. Následně bylo do takto připravené mikrozumavky za pomoci bakteriologické kličky přeneseno větší množství vybrané bakteriální kultury z Petriho misky a rozmícháno. Takto připravené mikrozumavky byly nakonec umístěny do mrazáku, kde jsou uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Počet jednotek tvořících kolonie v jednotlivých vzorcích

Ve vzorcích z jednotlivých lokalit byly po kultivaci na BHI agaru jak u mezofilů, tak u psychofilů stanoveny počty jednotek tvořících kolonie a jsou uvedeny v Tabulce 6. Vzhledem k ročnímu období a klimatickým podmínkám bylo předpokládáno, že počet jednotek tvořících kolonie bude větší u mezofilů.

Tabulka 6 Počet jednotek tvořících kolonie

	Lokalita	Počet jednotek tvořících kolonie (mezofilové) [CFU/ml]	Počet jednotek tvořících kolonie (psychofilové) [CFU/ml]
1	Slepé rameno Moravy (PR Kanada)	$2,9 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^3$
2	Přehradní nádrž Fryšták	$1,5 \cdot 10^5$	$9,2 \cdot 10^2$
3	Mokřad – Rusava	$1,6 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^3$
4	Zatopený lom – Chvalčov	$5,6 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^3$
5	Slepé rameno Moravy (PP Na letišti)	$3,0 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^3$
6	Machovský rybník	$7,3 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^3$
7	Mokřad – Hostišová	$2,4 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^3$
8	Retenční nádrž Lehotice	$3,0 \cdot 10^5$	$7,4 \cdot 10^2$
9	Zboženský rybník	$5,2 \cdot 10^4$	$6,7 \cdot 10^2$
10	Chlumský rybník	$2,3 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^3$

Nejvyšší počty jednotek tvořících kolonie u mezofilů byly zjištěny ve vzorku z lokality Retenční nádrž Lehotice a to $3,0 \cdot 10^5$ CFU/ml, u psychofilů byly zjištěny ve vzorku z lokality Machovský rybník a to $4,2 \cdot 10^3$ CFU/ml. Naopak nejnižší počty jednotek tvořících kolonie u mezofilů byly nalezeny ve vzorku z lokality Zboženský rybník a to $5,2 \cdot 10^4$ CFU/ml. U psychofilů byly nejnižší počty jednotek tvořících kolonie nalezeny taktéž ve vzorku z lokality Zboženský rybník a to $6,7 \cdot 10^2$ CFU/ml.

Co se týče porovnání četnosti mezofilů a psychofilů, počet jednotek tvořících kolonie byl u mezofilů řádově vyšší. Toto zjištění je v souladu s na začátku formulovaným předpokladem.

Ze vzorku vody každé lokality bylo následně prostřednictvím BHI agaru izolováno a purifikováno 5 mezofilních a 4 psychofilní izoláty, jež se navzájem lišily svými makroskopickými morfologickými znaky. U těchto izolátů byl následně proveden screening a stanovení celulolytické aktivity.

7.2 Volba nejvhodnějšího selektivního agaru pro screening a stanovení celulytické aktivity

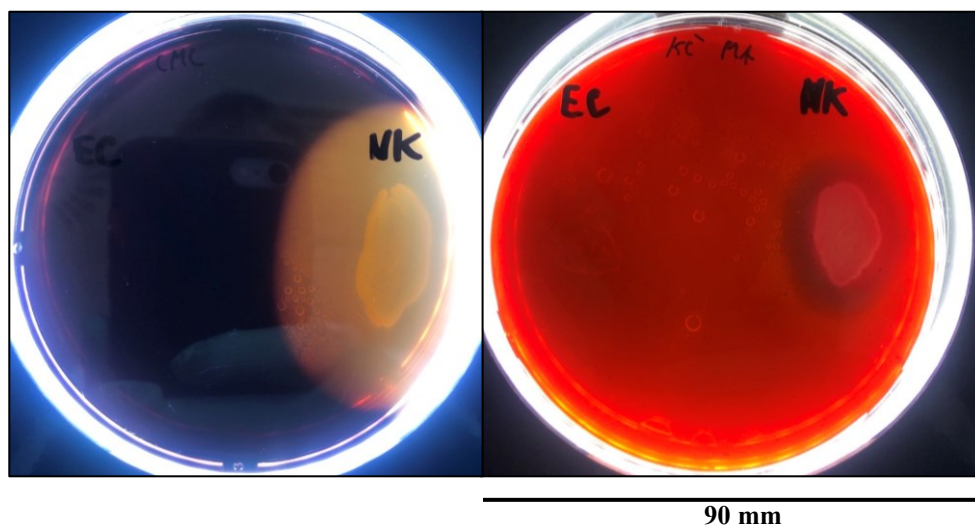
Jelikož existuje více médií používaných ke screeningu celulytické aktivity, byly vybrány a otestovány tři vhodné selektivní agary. Z těchto tří selektivních agarů byl na základě jejich otestování vybrán nejvhodnější selektivní agar. Data uvedená v Tabulce 7 jsou výsledkem ze tří paralelně probíhajících testů.

Tabulka 7 Zobrazení projasněných zón na jednotlivých selektivních agarech

		neidentifikovaný celulytický kmen	necelulytický kmen <i>Escherichia coli</i>
selektivní agar	převrstvení	projasněná zóna	
CMC agar 1	Lugolův roztok	+	–
CMC agar 2	Lugolův roztok	+	+
CMC agar s Kongo červení	bez převrstvení	+	–

+ projasněná zóna se zobrazila, – projasněná zóna se nezobrazila

Z Tabulky 7 je patrné, že se projasněná zóna zobrazila u všech selektivních agarů naočkovaných neznámým celulytickým kmenem. Projasněná zóna se nicméně z neznámého důvodu zobrazila také u CMC agaru 2 naočkovaného necelulytickým kmenem *Escherichia coli*. V úvaha tak dále připadala jen dvě zbývající selektivní média. Jako nejvhodnější selektivní médium byl nakonec vybrán CMC agar 1, jelikož CMC agar s Kongo červení není možno sterilizovat autoklávacím a je u něj tak vyšší riziko kontaminace.



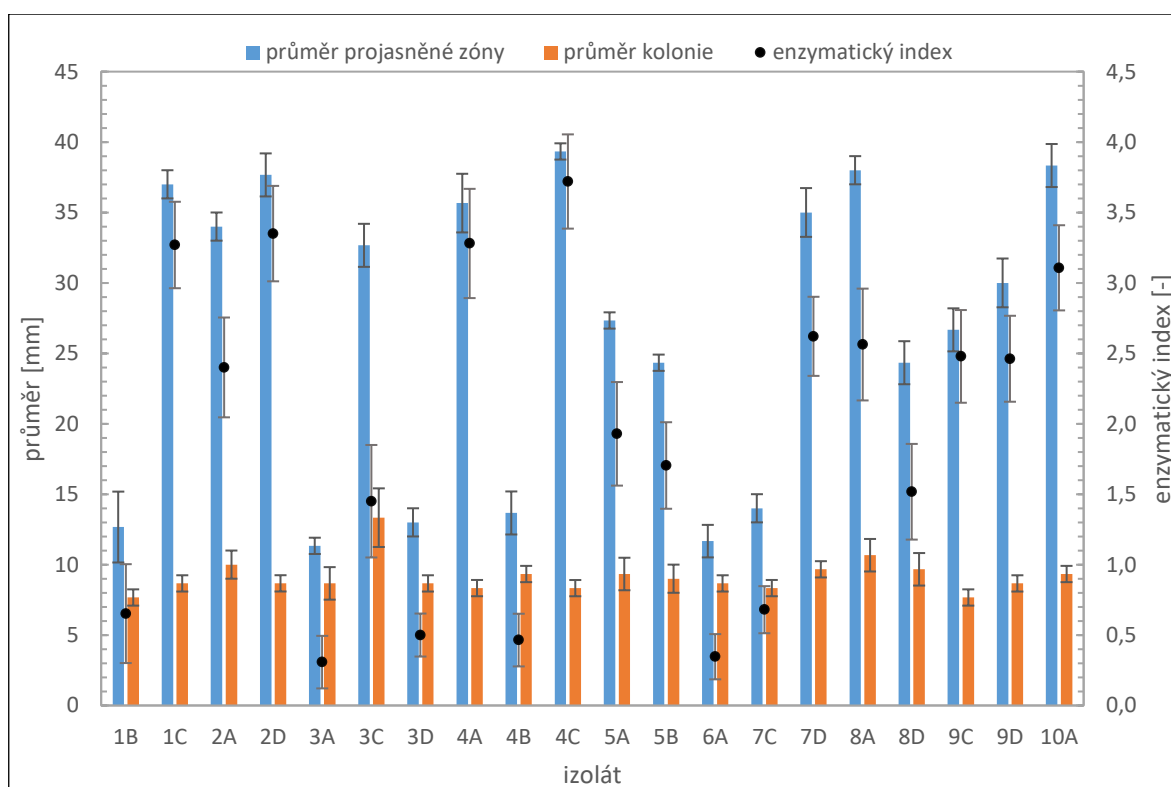
Obrázek 5 *Escherichia coli* (EC) a neidentifikovaný celulytický kmen (NK) na CMC agaru 1 (vlevo) a CMC agaru s Kongo červení (vpravo)

7.3 Screening a stanovení celulolytické aktivity jednotlivých izolátů

Pomocí CMC agaru 1 byl proveden screening celulolytické aktivity. Celkem bylo nalezeno 20 celulolyticky aktivních mezofilních izolátů a 15 celulolyticky aktivních psychrofilních izolátů. U celulolyticky aktivních izolátů byla stanovena i kvantitativní hodnota celulolytické aktivity vyjádřená jako enzymatický index.

7.3.1 Stanovení celulolytické aktivity mezofilních izolátů

Stanovení celulolytické aktivity mezofilních izolátů probíhalo ve třech paralelních testech a výsledky jsou vyjádřeny jako průměr tří naměřených hodnot \pm směrodatná odchylka tří naměřených hodnot.



Obrázek 6 Průměry projasněných zón, kolonií a hodnoty enzymatických indexů mezofilních izolátů

Hodnoty enzymatického indexu se u mezofilních izolátů pohybovaly v rozmezí 0,31 až 3,72. Největší enzymatický index byl stanoven u izolátu 4C z lokality Zatopený lom – Chvalčov, a to $3,72 \pm 0,37$. Naopak nejnižší enzymatický index byl stanoven u izolátu 3A z lokality Mokřad – Rusava, a to $0,31 \pm 0,19$. Tyto hodnoty enzymatických indexů jsou srovnatelné s hodnotami, které stanovili Balla et al. (2022) u bakteriálních mezofilních celulolytických izolátů získaných z různých prostředí v Alžírsku.

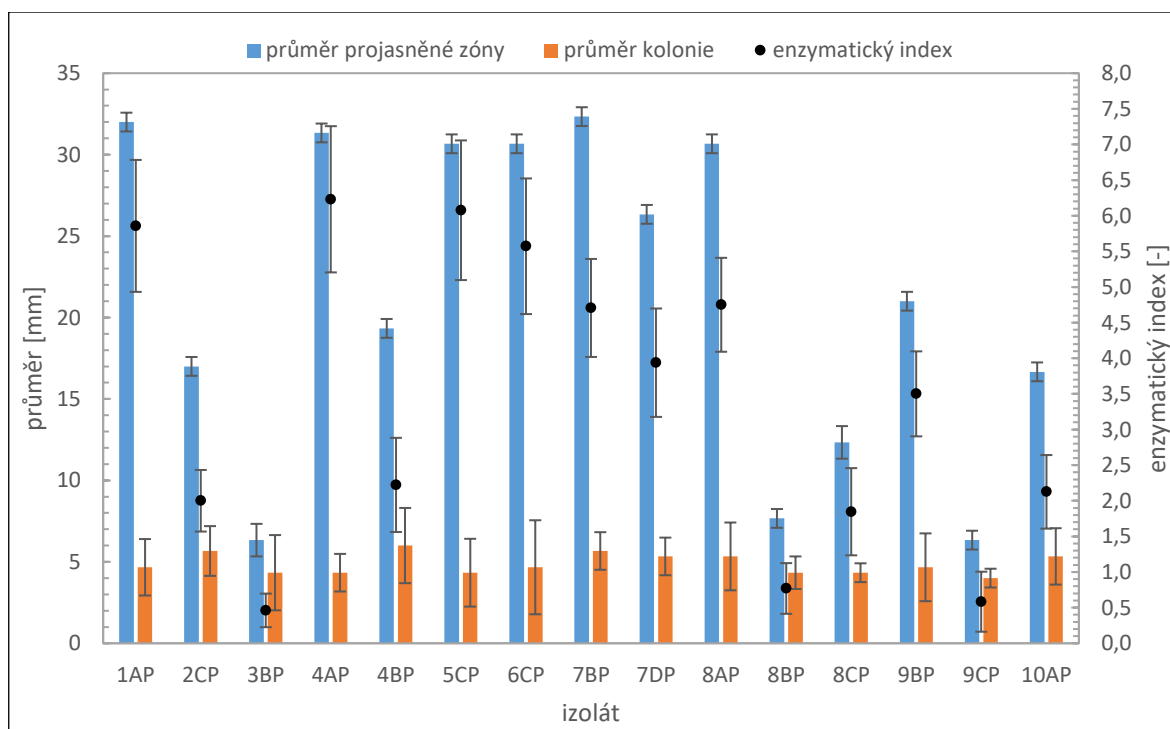


60 mm

Obrázek 7 Mezofilní izoláty 4C (vlevo) a 2D (vpravo) se zobrazenými projasněnými zónami na CMC agaru 1

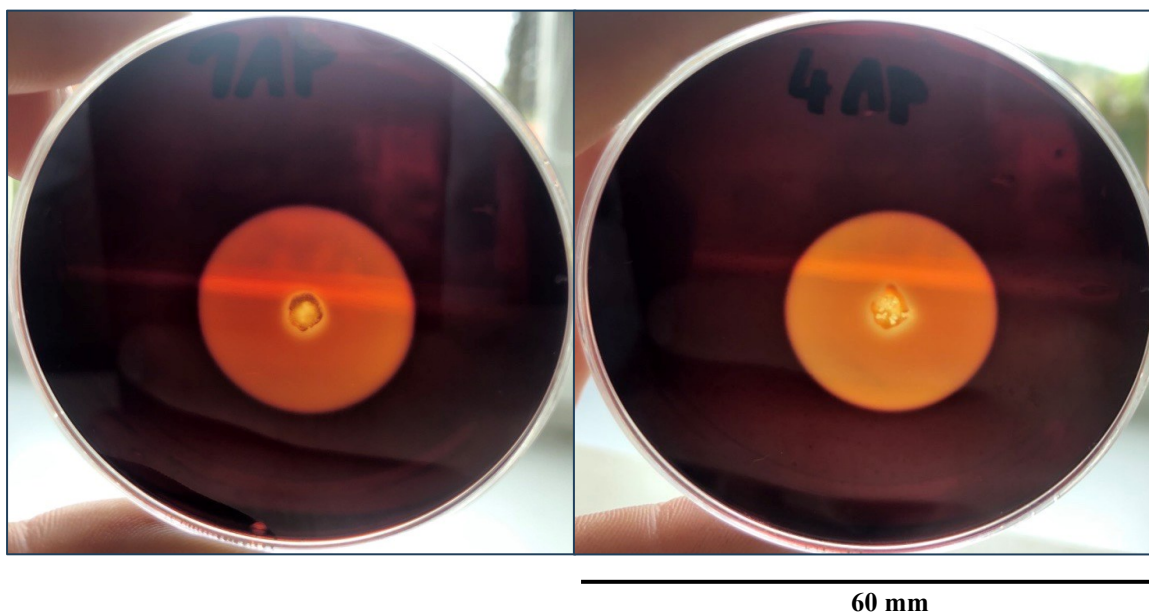
7.3.2 Stanovení celulolytické aktivity psychrofilních izolátů

Stanovení celulolytické aktivity psychrofilních izolátů probíhalo ve třech paralelních testech a výsledky jsou vyjádřeny jako průměr tří naměřených hodnot \pm směrodatná odchylka tří naměřených hodnot.



Obrázek 8 Průměry projasněných zón, kolonií a hodnoty enzymatických indexů psychrofilních izolátů

Hodnoty enzymatického indexu se u psychrofilních izolátů pohybovaly v rozmezí 0,46 až 6,23. Největší enzymatický index byl stanoven u izolátu 4AP z lokality Zatopený lom – Chvalčov, a to $6,23 \pm 1,03$. Naopak nejnižší enzymatický index byl stanoven u izolátu 3BP z lokality Mokřad – Rusava, a to $0,46 \pm 0,24$. Zjištěné enzymatické indexy jsou větší v porovnání s enzymatickými indexy psychrofilních celulólytických bakterií izolovaných Soaresem et al. (2012) z Antarktického permafrostu. Naopak jsou srovnatelné s hodnotami enzymatických indexů stanovených Ballou et al. (2022), tato práce byla nicméně zaměřena na mezofilní celulólytické bakterie. Simbolon et al. (2023) zjistili, že celulólytické izoláty získané prostřednictvím CMC agaru při kultivační teplotě 28 °C z ekosystému mořské trávy, nevykazují na CMC agaru při kultivační teplotě 4 °C žádnou celulólytickou aktivitu.



Obrázek 9 Mezofilní izoláty 1AP (vlevo) a 4AP (vpravo) se zobrazenými projasněnými zónami na CMC agaru 1

7.4 Procentuální zastoupení celulolytických izolátů

Bylo stanoveno procentuální zastoupení celulolytických izolátů. Procentuální zastoupení celulolytických izolátů bylo stanoveno na základě celkového počtu izolátů a počtu celulolytických izolátů ve vzorku dané lokality.

7.4.1 Procentuální zastoupení mezofilních celulolytických izolátů

Procentuální zastoupení mezofilních celulolytických izolátů bylo stanoveno na základě celkového počtu mezofilních izolátů a počtu mezofilních celulolytických izolátů ve vzorku dané lokality a je uvedeno v Tabulce 8.

Tabulka 8 Procentuální zastoupení mezofilních celulolytických izolátů

	Lokalita	Počet izolátů [-]	Počet celulolytických izolátů [-]	Procentuální zastoupení celulolytických izolátů [%]
1	Slepé rameno Moravy (PR Kanada)	5	2	40,0
2	Přehradní nádrž Fryšták	5	2	40,0
3	Mokřad – Rusava	5	3	60,0
4	Zatopený lom – Chvalčov	5	3	60,0
5	Slepé rameno Moravy (PP Na letišti)	5	2	40,0
6	Machovský rybník	5	1	20,0
7	Mokřad – Hostišová	5	2	40,0
8	Retenční nádrž Lehotice	5	2	40,0
9	Zboženský rybník	5	2	40,0
10	Chlumský rybník	5	1	20,0
Celkem		50	20	40,0

Z dat uvedených v Tabulce 8 je dobře patrné, že nejvyšší procentuální zastoupení mezofilních celulolytických izolátů bylo ve vzorcích z lokalit Mokřad – Rusava a Zatopený lom – Chvalčov. Nejnižší procentuální zastoupení mezofilních celulolytických izolátů bylo naopak ve vzorku z lokality Machovský rybník. Z celkového počtu 50 mezofilních izolátů byla celulolytická aktivita zjištěna u 20 z nich. Pro srovnání, Simbolon et al. (2023) zaznamenal celulolytickou aktivitu u 8 z celkových 33 izolátů získaných z ekosystému mořské trávy při kultivační teplotě 28 °C. Procentuální zastoupení mezofilních

celulolytických izolátů zjištěné ve studii, která zkoumala izoláty získané z různých prostředí v Alžírsku, bylo 6,5 %, což odpovídá 26 celulolytickým izolátům z celkového počtu 398 izolátů. (Balla et al., 2022)

7.4.2 Procentuální zastoupení psychrofilních celulolytických izolátů

Procentuální zastoupení psychrofilních celulolytických izolátů bylo stanoveno na základě celkového počtu psychrofilních izolátů a počtu psychrofilních celulolytických izolátů ve vzorku dané lokality a je uvedeno v Tabulce 9.

Tabulka 9 Procentuální zastoupení psychrofilních celulolytických izolátů

	Lokalita	Počet izolátů [-]	Počet celulolytických izolátů [-]	Procentuální zastoupení celulolytických izolátů [%]
1	Slepé rameno Moravy (PR Kanada)	4	1	25,0
2	Přehradní nádrž Fryšták	4	1	25,0
3	Mokřad – Rusava	4	1	25,0
4	Zatopený lom – Chvalčov	4	2	50,0
5	Slepé rameno Moravy (PP Na letišti)	4	1	25,0
6	Machovský rybník	4	1	25,0
7	Mokřad – Hostišová	4	2	50,0
8	Retenční nádrž Lehotice	4	3	75,0
9	Zboženský rybník	4	2	50,0
10	Chlumský rybník	4	1	25,0
Celkem		40	15	37,5

Z dat uvedených v Tabulce 9 je dobře patrné, že nejvyšší procentuální zastoupení psychrofilních celulolytických izolátů bylo ve vzorku z lokality Retenční nádrž Lehotice. V pěti lokalitách byl shodně nalezeno po jednom celulolytickém izolátu. Z celkového počtu 40 psychrofilních izolátů byla celulolytická aktivita zjištěna u 15 z nich.

7.5 Charakterizace celulolytických izolátů

Jak u mezofilních, tak u psychrofilních celulolytických izolátů byla provedena charakterizace prostřednictvím Gramova barvení a KOH testu.

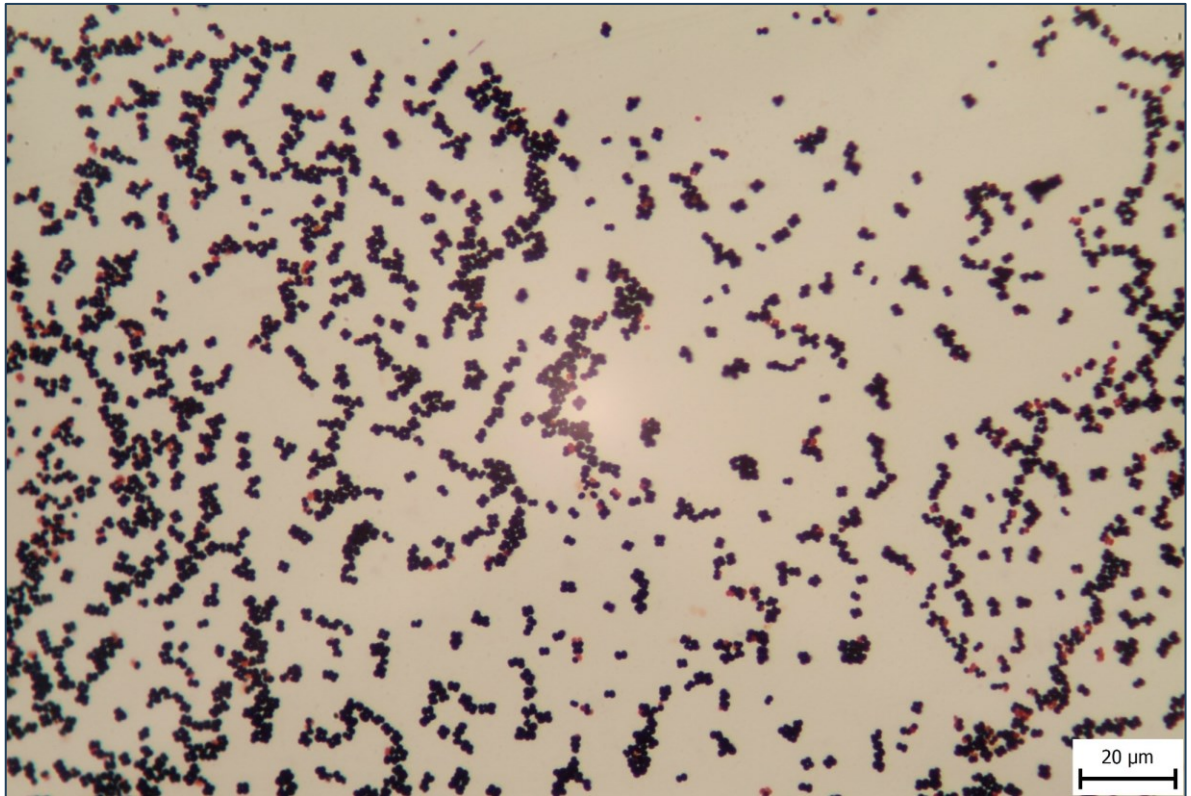
7.5.1 Charakterizace mezofilních celulolytických izolátů

Bylo charakterizováno všech 20 mezofilních celulolytických izolátů. Výsledky identifikace jsou uvedeny v Tabulce 10.

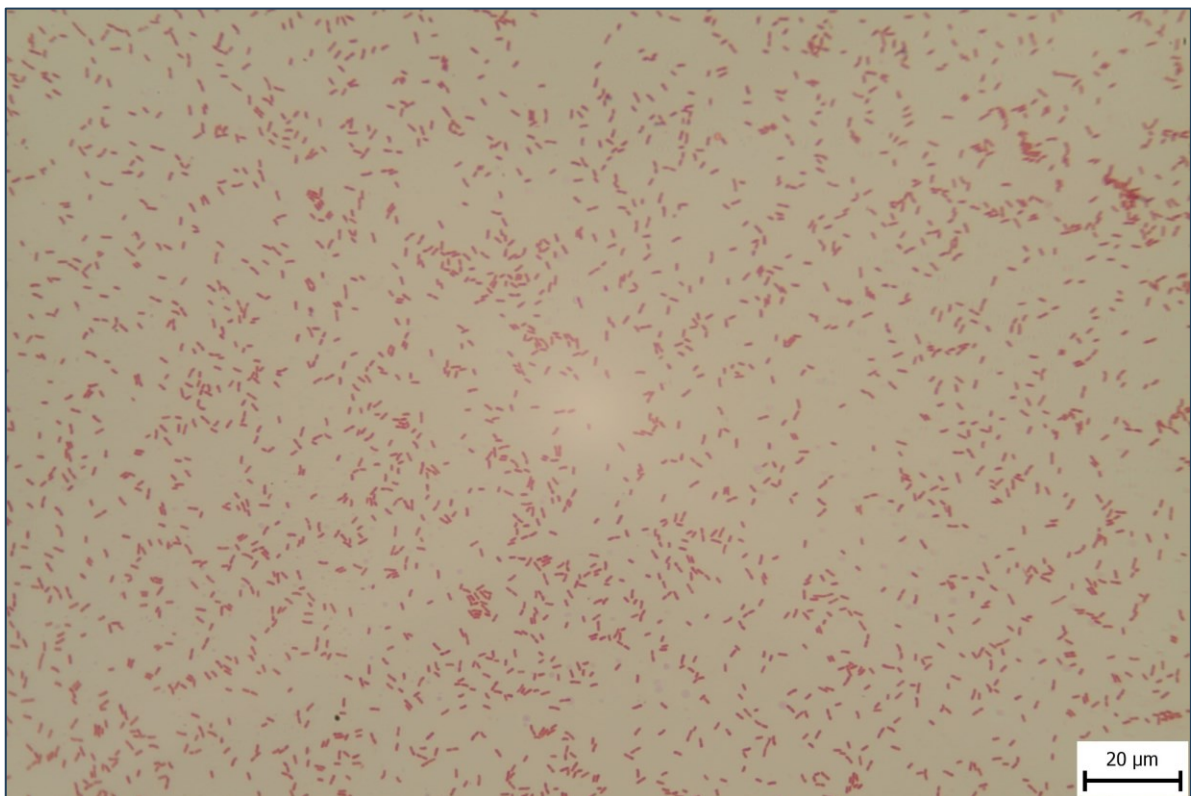
Tabulka 10 Charakterizace – mezofilní celulolytické izoláty

izolát	tvar	Gramovo barvení	KOH test
1B	koky	+	–
1C	tyčinky	+	–
2A	tyčinky	+	–
2D	tyčinky	–	+
3A	tyčinky	–	+
3C	tyčinky	+	–
3D	tyčinky	–	+
4A	tyčinky	–	+
4B	tyčinky	–	+
4C	tyčinky	–	+
5A	tyčinky	–	+
5B	tyčinky	–	+
6A	tyčinky	+	–
7C	tyčinky	–	+
7D	tyčinky	+	–
8A	tyčinky	+	–
8D	tyčinky	–	+
9C	tyčinky	–	+
9D	tyčinky	–	+
10A	koky	+	–

Bylo charakterizováno 8 grampozitivních a 12 gramnegativních mezofilních celulolytických izolátů. Co se týče tvaru, kromě izolátu 1B a 10A, byly všechny mezofilní celulolytické izoláty byly tyčinkovité. Celulolytický nejaktivnější izoláty 4C a 2D byly charakterizovány jako gramnegativní tyčinky. V kontrastu s těmito výsledky, Balla et al. (2022) analýzou genu pro 16S rRNA zjistili, že všech 26 jimi identifikovaných mezofilních celulolytických izolátů izolovaných z různých prostředí v Alžírsku náleželo do rodu grampozitivních tyčinkovitých bakterií *Bacillus*.



Obrázek 10 Izolát 1B obarvený Gramovým barvením



Obrázek 11 Izolát 4C obarvený Gramovým barvením

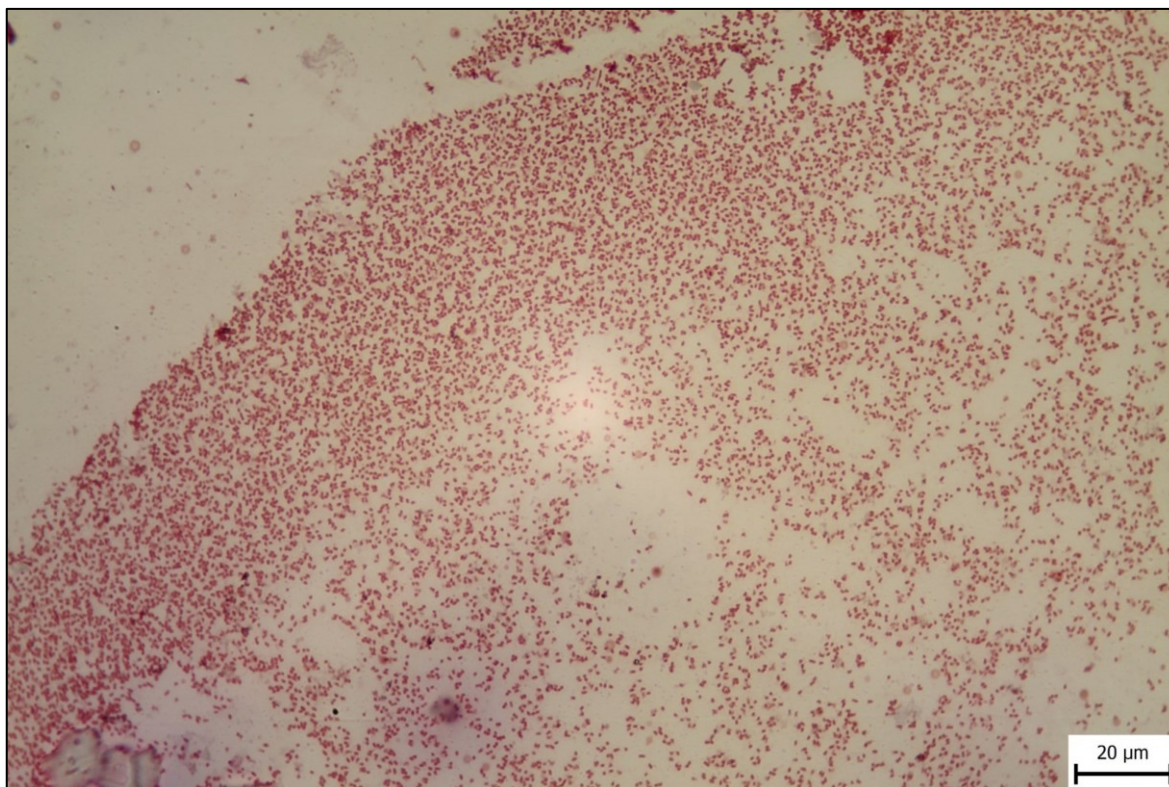
7.5.2 Charakterizace psychrofilních celulolytických izolátů

Bylo charakterizováno všech 15 psychrofilních celulolytických izolátů. Výsledky identifikace jsou uvedeny v Tabulce 11.

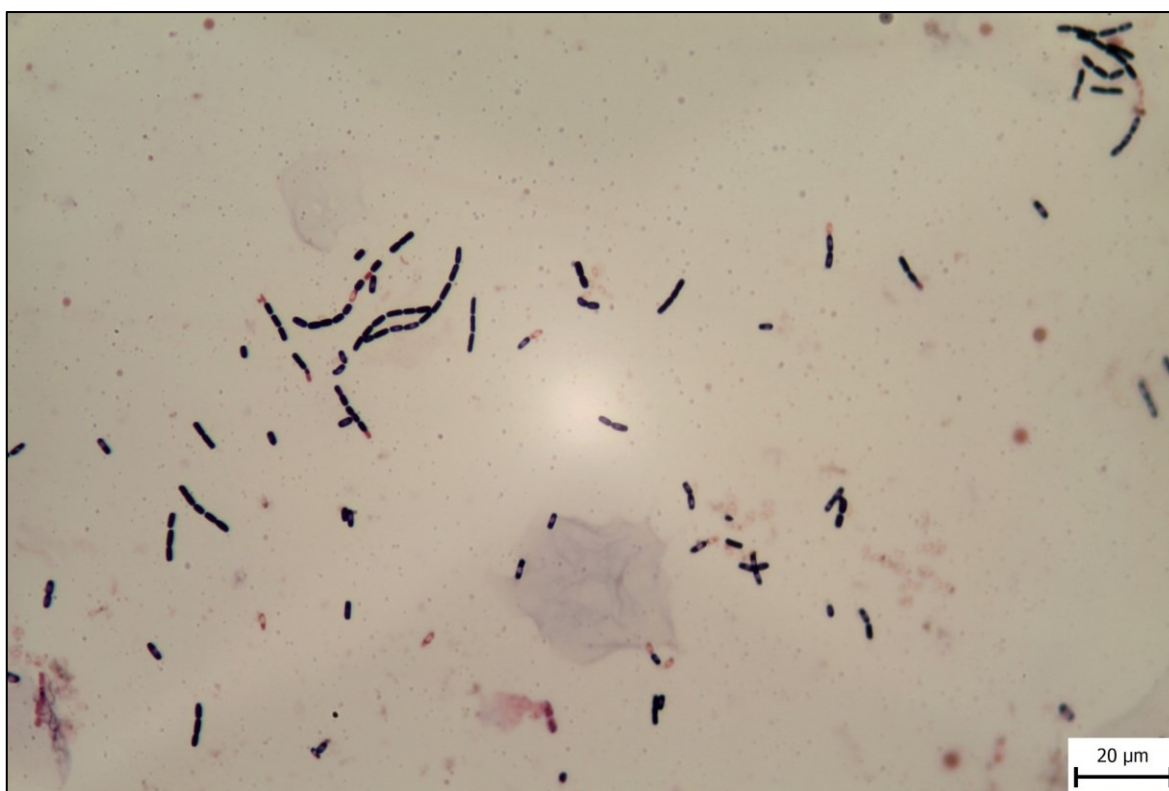
Tabulka 11 Charakterizace – psychrofilní celulolytické izoláty

izolát	tvar	Gramovo barvení	KOH test
1AP	tyčinky	–	+
4AP	tyčinky	–	+
4BP	tyčinky	+	–
5CP	tyčinky	–	+
6CP	tyčinky	+	–
7BP	tyčinky	+	–
7DP	tyčinky	–	+
8AP	tyčinky	–	+
8BP	tyčinky	+	–
8CP	tyčinky	–	+
9BP	tyčinky	–	+
9CP	tyčinky	+	–
10AP	tyčinky	–	+
10BP	tyčinky	–	+
10CP	tyčinky	–	+

Bylo charakterizováno 5 grampozitivní a 10 gramnegativních psychrofilních celulolytických izolátů. Všechny izoláty byly tyčinkovitého tvaru. Celulolyticky nejaktivnější izoláty 4AP a 5CP byly charakterizovány jako gramnegativní tyčinky. Výsledky charakterizace jsou srovnatelné se zjištěním Soarese et al. (2012), kteří zkoumali psychrofilní celulolytické bakterie izolované z Antarktického permafrostu. U jimi izolovaných psychrofilních celulolytických izolátů taktéž převládaly izoláty charakterizované jako gramnegativní tyčinky. V této studii bylo dále přistoupeno k identifikaci celulolytických izolátů a konkrétně se jednalo o zástupce rodů *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, *Pedobacter*, *Acinetobacter* a *Pseudomonas*. Nicméně byla také zaznamenána přítomnost grampozitivních tyčinek, konkrétně spadajících mezi rody *Microbacterium* a *Arthrobacter*.



Obrázek 12 Izolát 4AP obarvený Gramovým barvením



Obrázek 13 Izolát 9CP obarvený Gramovým barvením

ZÁVĚR

V praktické části této bakalářské práce byla zkoumána celulolytická aktivita mezofilních a psychofilních bakterií vyskytujících se v povrchových stojatých vodách, prostřednictvím selektivního CMC agarů 1. Celulolytická aktivita byla zaznamenána u 20 z celkových 50 mezofilních izolátů a u 15 z celkových 40 psychofilních izolátů. Enzymatický index, jakožto kvantitativní vyjádření celulolytické aktivity, se u mezofilních izolátů pohyboval v rozmezí 0,31 až 3,72 a u psychofilních izolátů v rozmezí 0,46 až 6,23.

Identifikace získaných celulolytických izolátů ukázala, že mezi nimi převládaly izoláty tyčinkovitého tvaru. Dva mezofilní celulolyticky neaktivnější izoláty byly identifikovány jako gramnegativní tyčinky, dva psychofilní celulolyticky neaktivnější izoláty byly identifikovány také jako gramnegativní tyčinky. Nicméně mezi celulolytickými mezofilními izoláty byly nalezeny ve dvou případech také grampozitivní koky. Co do celkového počtu gramnegativních a grampozitivních napříč mezofilními a psychofilními izoláty, bylo identifikováno 22 gramnegativních 13 grampozitivních izolátů.

Získané celulolytické izoláty byly zakonzervovány v roztoku glycerolu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a jsou součástí sbírky ústavu ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně. Celulolytické izoláty by mohly být využity například k průmyslové výrobě enzymů rozkládajících celulózu, k výrobě bioethanolu simultánní sacharifikací a fermentací (SSF), případně ke zlepšení účinnosti kompostovacího procesu.

Další studium by mělo být zaměřeno na bližší identifikaci získaných celulolytických izolátů pomocí molekulárně-biologických metod. Dále by také mohlo být přistoupeno ke stanovení aktivity celulózu degradujících enzymů, případně k detekci genů, které tyto enzymy kódují. Za účelem zvýšení celulolytické aktivity by mohly být identifikované izoláty geneticky modifikovány nebo využity k tvorbě konsorcií celulolytických bakterií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali; NOUR EL-DIN, Mohamed; REFAAT, Bahgat M.; ABDEL-SHAKOUR, Essam H.; EWAIS, Emad El-Din et al. Biotechnological Application of Thermotolerant Cellulose-Decomposing Bacteria in Composting of Rice Straw. Online. *Annals of Agricultural Sciences*. 2016, roč. 61, č. 1, s. 135-143. ISSN 05701783. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aos.2015.11.006>. [cit. 2024-04-15].

ABOLORE, Rasaq S.; JAISWAL, Swarna a JAISWAL, Amit K. Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review. Online. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2024, roč. 7. ISSN 26668939. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100396>. [cit. 2024-03-31].

AFMB - CNRS - UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE. Dostupné z: <http://www.cazy.org/>. [cit. 2024-04-01].

ANDLAR, Martina, Tonči REZIĆ, Nenad MARĐETKO, Daniel KRACHER, Roland LUDWIG, Božidar ŠANTEK, Faizah N. ALENEZI a Lassaad BELBAHRI. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2018, **18**(11), 768-778 [cit. 2024-03-23]. ISSN 1618-0240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201800039

ARUSHA, P Nandimath; KIRAN, R Kharat; SHANTI, G Gupta a ARUN, S Kharat. Optimization of cellulase production for Bacillus sp. and Pseudomonas sp. soil isolates. Online. *African Journal of Microbiology Research*. 2016, roč. 10, č. 13, s. 410-419. ISSN 1996-0808. Dostupné z: <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.7954>. [cit. 2023-09-20].

ATALLA, Rajai H. a VANDERHART, David L. Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Forms. Online. *Science*. 1984, roč. 223, č. 4633, s. 283-285. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.223.4633.283>. [cit. 2023-10-11].

BALLA, Amel; SILINI, Allaoua; CHERIF-SILINI, Hafsa; BOUKET, Ali Chenari; BOUDECHICHA, Amel et al. Screening of Cellulolytic Bacteria from Various Ecosystems and Their Cellulases Production under Multi-Stress Conditions. Online. *Catalysts*. 2022, roč. 12, č. 7. ISSN 2073-4344. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/catal12070769>. [cit. 2024-03-23].

BARBOSA, Fernando Cesar, Maria Augusta SILVELLO, Rosana GOLDBECK, Daniel KRACHER, Roland LUDWIG, Božidar ŠANTEK, Faizah N. ALENEZI a Lassaad BELBAHRI. Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production. *Biotechnology Letters* [online]. 2020, **42**(6), 875-884 [cit. 2024-03-23]. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-020-02875-4

BEESON, William T.; VU, Van V.; SPAN, Elise A.; PHILLIPS, Christopher M. a MARLETTA, Michael A. Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. Online. *Annual Review of Biochemistry*. 2015, roč. 84, č. 1, s. 923-946. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034439>. [cit. 2024-05-03].

- DATTA, Rahul. Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review. Online. *Heliyon*. 2024, roč. 10, č. 1. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24022>. [cit. 2024-04-02].
- DUCHESNE, Luc C. Duchesne a LARSON, D. W. Cellulose and the Evolution of Plant Life. *BioScience*. 1989, roč. 39, č. 4, s. 238-41.
- FORSBERG, Zarah; VAAJE-KOLSTAD, Gustav; WESTERENG, Bjørge; BUNÆS, Anne C.; STENSTRØM, Yngve et al. Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. Online. *Protein Science*. 2011, roč. 20, č. 9, s. 1479-1483. ISSN 0961-8368. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pro.689>. [cit. 2024-04-09].
- GUDER, Daba Gudeta a KRISHNA, M.S.R. Isolation and Characterization of Potential Cellulose Degrading Bacteria from Sheep Rumen. Online. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2019, roč. 13, č. 3, s. 1831-1839. ISSN 09737510. Dostupné z: <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.60>. [cit. 2024-05-14].
- GUPTA, Pratima; SAMANT, Kalpana a SAHU, Avinash. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. Online. *International Journal of Microbiology*. 2012, roč. 2012, s. 1-5. ISSN 1687-918X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2012/578925>. [cit. 2023-09-19].
- HARINDINTWALI, Jean Damascene; ZHOU, Jianli a YU, Xiaobin. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: A novel tool for environmental sustainability. Online. *Science of The Total Environment*. 2020, roč. 715. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136912>. [cit. 2024-04-25].
- HEINZE, Thomas. Cellulose: Structure and Properties. Online. *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials*. Advances in Polymer Science. 2016, s. 1-52. ISBN 978-3-319-26013-6. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/12_2015_319. [cit. 2023-10-02].
- HENRISSAT, B.; DRIGUEZ, H.; VIET, C. a SCHÜLEIN, M. Synergism of Cellulases from *Trichoderma reesei* in the Degradation of Cellulose. Online. *Bio/Technology*. 1985, roč. 3, č. 8, s. 722-726. ISSN 0733-222X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nbt0885-722>. [cit. 2024-05-16].
- HORN, Svein Jarle; VAAJE-KOLSTAD, Gustav; WESTERENG, Bjørge a EIJSINK, VincentGH. Novel enzymes for the degradation of cellulose. Online. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, roč. 5, č. 1. ISSN 1754-6834. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-45>. [cit. 2024-05-02].
- CHUNGOPAST, Sirinapa; YODYING, Preecha a NOMURA, Mika. Effects of Cellulolytic Bacteria on Nitrogen-Fixing Bacteria, 16S rRNA, nifH Gene Abundance, and Chemical Properties of Water Hyacinth Compost. Online. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2021, roč. 21, č. 1, s. 768-779. ISSN 0718-9508. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00399-4>. [cit. 2024-04-25].

JAIN, Devendra; RAVINA; BHOJIYA, Ali Asger; CHAUHAN, Surya; RAJPUROHIT, Deepak et al. Polyphasic Characterization of Plant Growth Promoting Cellulose Degrading Bacteria Isolated from Organic Manures. Online. *Current Microbiology*. 2021, roč. 78, č. 2, s. 739-748. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02342-3>. [cit. 2024-05-01].

KASANA, Ramesh Chand; SALWAN, Richa; DHAR, Hena; DUTT, Som a GULATI, Arvind. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. Online. *Current Microbiology*. 2008, roč. 57, č. 5, s. 503-507. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>. [cit. 2024-04-26].

KLEMM, Dieter; HEUBLEIN, Brigitte; FINK, Hans-Peter a BOHN, Andreas. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. Online. *Angewandte Chemie International Edition*. 2005, roč. 44, č. 22, s. 3358-3393. ISSN 1433-7851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>. [cit. 2024-05-16].

KUMAR DEY, Amit a DEY, Abhijit. Selection of Optimal Processing Condition during Removal of Methylene Blue Dye Using Treated Betel Nut Fibre Implementing Desirability Based RSM Approach. Online. *Response Surface Methodology in Engineering Science*. 2021. ISBN 978-1-83968-917-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.98428>. [cit. 2024-01-30]

LAMED, Raphael a BAYER, Edward A. The Cellulosome of *Clostridium thermocellum*. Online. *Advances in Applied Microbiology Volume 33. Advances in Applied Microbiology*. 1988, s. 1-46. ISBN 9780120026333. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70203-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70203-X). [cit. 2024-05-16].

LEVASSEUR, Anthony; DRULA, Elodie; LOMBARD, Vincent; COUTINHO, Pedro M a HENRISSAT, Bernard. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. Online. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, roč. 6, č. 1. ISSN 1754-6834. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>. [cit. 2024-04-10].

LIMAYEM, Alya a RICKE, Steven C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. Online. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, roč. 38, č. 4, s. 449-467. ISSN 03601285. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>. [cit. 2024-04-28].

MOSER, Felix; IRWIN, Diana; CHEN, Shaolin a WILSON, David. B. Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. Online. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, roč. 100, č. 6, s. 1066-1077. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bit.21856>. [cit. 2024-04-09].

MALEKI, Samaneh Sadat; MOHAMMADI, Kourosh a JI, Kong-shu. Characterization of Cellulose Synthesis in Plant Cells. Online. *The Scientific World Journal*. 2016, roč. 2016, s. 1-8. ISSN 2356-6140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2016/8641373>. [cit. 2023-12-10].

MELO, Itamar S.; ZUCCHI, Tiago D.; SILVA, Rafael E.; VILELA, Elke S. D.; SÁBER, Mirian Lobo et al. Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from the Stain house Lake, Antarctica. Online. *Folia Microbiologica*. 2014, roč. 59, č. 4, s. 303-306. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0295-x>. [cit. 2024-05-03].

PELEGRINI, Bruna Luíza; RÉ, Fabrícia; DE OLIVEIRA, Mariana Maciel; FERNANDES, Thiago; DE OLIVEIRA, Jean Halison et al. Cellulose Nanocrystals as a Sustainable Raw Material: Cytotoxicity and Applications on Healthcare Technology. Online. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2019, roč. 304, č. 8. ISSN 1438-7492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mame.201900092>. [cit. 2024-01-31].

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T. a MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. Online. *International Microbiology*. 2002, roč. 5, č. 2, s. 53-63. ISSN 1139-6709. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>. [cit. 2024-05-16].

REESE, Elwyn T.; SIU, Ralph G. H. a LEVINSON, Hillel S. THE BIOLOGICAL DEGRADATION OF SOLUBLE CELLULOSE DERIVATIVES AND ITS RELATIONSHIP TO THE MECHANISM OF CELLULOSE HYDROLYSIS. Online. *Journal of Bacteriology*. 1950, roč. 59, č. 4, s. 485-497. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jb.59.4.485-497.1950>. [cit. 2024-04-09].

SHAH, Freny a MISHRA, Sandhya. In vitro optimization for enhanced cellulose degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KY962963 associated with a microalgae *Chlorococcum* sp. using OVAT and statistical modeling. Online. *SN Applied Sciences*. 2020, roč. 2, č. 11. ISSN 2523-3963. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03697-9>. [cit. 2024-04-12].

SIMBOLON, L M; ISMET, M S; ISMIATI, P; ILHAM, A F a SRIMARIANA, E S. Cellulolytic activity at the low temperature of associative bacteria from a seagrass ecosystem. Online. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2023, roč. 1137, č. 1. ISSN 1755-1307. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1137/1/012039>. [cit. 2024-05-14].

SINGH, Anita; BAJAR, Somvir; DEVI, Arti; PANT, Deepak; BOUDECHICHA, Amel et al. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. Online. *Bioresource Technology Reports*. 2021, roč. 14, č. 7. ISSN 2589014X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>. [cit. 2024-03-23].

SMITH, Steven P a BAYER, Edward A. Insights into cellulosome assembly and dynamics: from dissection to reconstruction of the supramolecular enzyme complex. Online. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013, roč. 23, č. 5, s. 686-694. ISSN 0959440X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.09.002>. [cit. 2024-04-02].

SOARES, Fábio Lino; MELO, Itamar Soares; DIAS, Armando Cavalcante Franco a ANDREOTE, Fernando Dini. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. Online. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, roč. 28, č. 5, s. 2195-2203. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1025-2>. [cit. 2024-04-26].

VAAJE-KOLSTAD, Gustav; HORN, Svein J.; VAN AALTEN, Daan M.F.; SYNSTAD, Bjørnar a EIJSINK, Vincent G.H. The Non-catalytic Chitin-binding Protein CBP21 from *Serratia marcescens* Is Essential for Chitin Degradation. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, roč. 280, č. 31, s. 28492-28497. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M504468200>. [cit. 2024-04-09].

VAAJE-KOLSTAD, Gustav; WESTERENG, Bjørge; HORN, Svein J.; LIU, Zhanliang; ZHAI, Hong et al. An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. Online. *Science*. 2010, roč. 330, č. 6001, s. 219-222. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1192231>. [cit. 2024-04-09].

YANG, Chao; XIA, Yu; QU, Hong; LI, An-Dong; LIU, Ruihua et al. Discovery of new cellulases from the metagenome by a metagenomics-guided strategy. Online. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, roč. 9, č. 1. ISSN 1754-6834. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0557-3>. [cit. 2024-04-26].

ZABED, H.; SAHU, J.N.; SUELY, A.; BOYCE, A.N. a FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. Online. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, roč. 71, s. 475-501. ISSN 13640321. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>. [cit. 2024-05-16].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	Enzym s pomocnou aktivitou
BHI	Srdce-mozková infúze
β -G	β -glukosidáza
CAZy	Karbohydrát aktivní enzymy
CBH	Celobiohydroláza
CBM	Karbohydrát vázající modul
CFU	Kolonie tvořící jednotky
CMC	Karboxymethyl celulóza
EG	Endoglukanáza
EI	Enzymatický index
GH	Glykosid hydroláza
LPMO	Lytická polysacharid monooxygenáza

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura celulózy (Kumar Dey a Dey, 2021).....	12
Obrázek 2 Vzájemné uspořádání řetězců a) celulóza I, b) celulóza II (upraveno dle Pelegrini et al., 2019)	13
Obrázek 3 Zjednodušené schéma celulozomu bakterie <i>Clostridium thermocellum</i> (upraveno dle Smith a Bayer, 2013)	17
Obrázek 4 Zjednodušené schéma bakteriálního rozkladu celulózy prostřednictvím synergického působení celuláz a LPMO (upraveno dle Andlar et al., 2018)	19
Obrázek 5 <i>Escherichia coli</i> (EC) a neidentifikovaný celulolytický kmen (NK) na CMC agaru 1 (vlevo) a CMC agaru s Kongo červení (vpravo)	34
Obrázek 6 Průměry projasněných zón, kolonií a hodnoty enzymatických indexů mezofilních izolátů.....	35
Obrázek 7 Mezofilní izoláty 4C (vlevo) a 2D (vpravo) se zobrazenými projasněnými zónami na CMC agaru 1	36
Obrázek 8 Průměry projasněných zón, kolonií a hodnoty enzymatických indexů psychrofilních izolátů	36
Obrázek 9 Mezofilní izoláty 1AP (vlevo) a 4AP (vpravo) se zobrazenými projasněnými zónami na CMC agaru 1	37
Obrázek 10 Izolát 1B obarvený Gramovým barvením.....	41
Obrázek 11 Izolát 4C obarvený Gramovým barvením.....	41
Obrázek 12 Izolát 4AP obarvený Gramovým barvením	43
Obrázek 13 Izolát 9CP obarvený Gramovým barvením.....	43

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Seznam lokalit	26
Tabulka 2 Složení: mozko-srdcová infuze (BHI): Himedia Indie	27
Tabulka 3 Složení: CMC agar 1	27
Tabulka 4 Složení: CMC agar 2	27
Tabulka 5 Složení: CMC agar s Kongo červení	28
Tabulka 6 Počet jednotek tvořících kolonie	33
Tabulka 7 Zobrazení projasněných zón na jednotlivých selektivních agarech	34
Tabulka 8 Procentuální zastoupení mezofilních celulolytických izolátů	38
Tabulka 9 Procentuální zastoupení psychrofilních celulolytických izolátů	39
Tabulka 10 Charakterizace – mezofilní celulolytické izoláty	40
Tabulka 11 Charakterizace – psychrofilní celulolytické izoláty	42