

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Izolace specifických druhů bakterií
z permafrostu**

Bakalářská práce

Ivana Rodová

Školitel: Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

České Budějovice 2018

Bakalářská diplomová práce

Rodová, I., 2018: Izolace specifických druhů Aktinobakterií z permafrostu. [Isolation of specific species of bacteria from permafrost. Bc. Thesis, in Czech] – 30 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato práce se zaměřuje na izolaci a charakterizaci bakterií z permafrostu Arktidy, které jsou schopné rozkládat alifatické a aromatické uhlovodíky. Jelikož dřívější analýzy ukázaly, že v permafrostu dominují Proteobakterie a Aktinobakterie, byla i tato práce zaměřena na tyto dvě skupiny. Alifatické a aromatické uhlovodíky rozkládá velice specializovaná skupina bakterií, které mají unikátní enzymatický aparát. Díky této schopnosti se podílejí na cyklu uhlíku ve specifických kryoturbovaných půdních horizontech Arktidy, kde byl prokázán vysoký výskyt alifatických a aromatických uhlovodíků. V neposlední řadě lze tyto bakterie využít i k biotechnologickým účelům při odbourávání ropných uhlovodíků a dalších polutantů.

Annotation

This work is mainly focused on the isolation and characterization of bacteria from Arctic permafrost, which can utilize aliphatic and aromatic carbohydrates. Previous work showed that mainly Proteobacteria and Actinobacteria dominate in permafrost soils. Therefore, this work was mainly focused on these two groups. Aliphatic and aromatic carbohydrates are utilized by very specialized group of bacteria which use unique enzymatic apparatus. Thanks to this ability these bacteria play crucial role in carbon cycle in specific cryoturbated soil horizons typical for Arctic permafrost soils, where high amount of aliphatic and aromatic compounds was confirmed. These pure isolates may also be used in treating contaminated areas by oil or other pollutants.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejnění své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 16. 4. 2018

.....

Ivana Rodová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za rady a připomínky, a současně také Mgr. Haně Petráskové za ochotu pomoci, trpělivost a čas, který mi věnovala. Práce byla finančně podpořena z projektu GAČR (16-18453S).

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Arktida	2
2.1.1.	Arktida a mikrobiální společenstva.....	2
2.2	Aktinobakterie.....	3
2.2.1	Výskyt Aktinobakterií	4
2.2.2	Čeleď Streptomycetaceae.....	4
2.2.3	Rod Streptomyces.....	5
2.2.3	Čeleď Nocardiaceae	6
2.3	Proteobakterie.....	7
2.4	Betaproteobakterie	7
2.5	Čeleď Burkholderiaceae	7
2.6	Biodegradace.....	8
3	Metody	12
3.2	Popis odběrové lokality	12
3.3	Příprava vzorků a kultivace	12
3.4	Izolace DNA	13
3.5	PCR a elektroforéza	13
3.6	Vyhodnocení sekvenací	14
3.7	Fluorescenční barvení	14
3.8	EcoPlate	14
3.9	Uchování izolátů	15
4	Výsledky a diskuze.....	16
4.1	Výsledky sekvenace.....	17
4.2	Fluorescenční mikroskopie	19
4.3	Růst vybraných bakterií na různých zdrojích C (metoda EcoPlate).....	20
5	Závěr.....	26
6	Seznam literatury.....	27

1 Úvod

Proteobakterie a Aktinobakterie patří mezi největší bakteriální kmeny a také patří k dominantním kmenům identifikovaným v permafrostu Arktidy. Oba kmeny obsahují velké množství čeledí s různorodým metabolismem, osidlující širokou škálu habitatů od půdy, přes oceány, po arktické oblasti. Obsahují ale také velké množství patogenů, a to nejen lidských, ale i zvířecích a rostlinných.

Důležitou roli představují tyto kmeny z hlediska schopnosti rozkládat celou řadu sloučenin. Aktinobakterie vyskytující se v půdě se významně podílí na koloběhu uhlíku a také rozkladu celé řady sloučenin. Například rod *Streptomyces* degraduje celulózu a je schopen rozkládat i některé aromatické uhlovodíky. Rod *Rhodococcus* dokáže degradovat látky znečišťující prostředí, a proto se hojně využívá v procesech biodegradace. Dokáže např. účinně odstraňovat ropné uhlovodíky, či uhlovodíky halogenované, které se do prostředí dostávají ve formě pesticidů.

Další důležitou schopností obou kmenů je schopnost produkovat sekundární metabolity, které nacházejí využití v různých odvětvích. Oba kmeny se tak řadí mezi producenty látek s antibakteriálními, antiparazitickými a imunosupresivními účinky. Jedná se především o rod *Streptomyces*, který produkuje antibiotika streptomycin, erytromycin, vancomycin, atd.

V následujících kapitolách budou diskutovány vybraní zástupci z kmenů Proteobakterií a Aktinobakterií, jejich výskyt a biodegradační vlastnosti.

2 Literární přehled

2.1 Arktida

Arktida je oblast za severním polárním kruhem ($66^{\circ}32'$), kde průměrná teplota ani v létě nevystoupá nad 10°C . Arktické klima je typické pro své dlouhé a velmi studené zimy, při kterých se teplota pohybuje kolem -40°C , a krátká chladná léta, kdy se teplota pohybuje kolem 0°C . Arktické oblasti jsou charakteristické malou oblačností i množstvím srážek, převážně ve formě srážek sněhových (Fitzpatrick, 1997).

Arktická tundra je oblast rozkládající se na Severní polokouli od pásu tajgy, kde jsou půdy trvale zmrzlé (od hloubky 25-90 cm). Osídlení faunou a flórou je zde velmi chudé, kvůli nepříznivým podmínkám pro život. Místní vegetace je zastoupena odolnými rostlinami, jako jsou mechy, vřes nebo lišejníky. Během letních teplot taje horní vrstva permafrostu, avšak spodní vrstvy zůstávají zmrzlé, a tudíž pro vodu nepropustné. Voda se drží na povrchu, který zůstává rozbředlý a zamokřený. Tundra proto bývá v období letních měsíců pokryta jezery, močály a bažinami. Střídavým působením mrazu a tání vznikají v půdě odlišné vrstvy. Povrch tvoří hrubší úlomky hornin a prostor mezi nimi je vyplněn jemnozrnnou zeminou.

Půdní horizonty můžeme rozdělit do čtyř skupin. Svrchní vrstva je nejbohatší na organickou hmotu, ve spodních minerálních vrstvách obsah organické hmoty klesá. Specifická vrstva typická pouze pro arktické oblasti ovlivněné permafrostem se nazývá kryoturbovaná organická hmota. Vlivem opakovaného tání a mrznutí aktivní vrstvy půdy během léta a zimy dochází k ponořování svrchních vrstev do půdního profilu (Bockheim and Tarnocai, 1998). Tímto způsobem dochází ke zvyšování heterogenity arktických půd a k nerovnoměrnému rozložení organické hmoty v půdním profilu. Poslední vrstvu půdy tvoří trvale zmrzlá půda – permafrost.

2.1.1. Arktida a mikrobiální společenstva

Výskyt mikroorganismů nejen v permafrostu, ale i v půdě je ovlivněn především dostupností živin, vody, a teplotou. Teplota určuje rychlost růstu, enzymatickou aktivitu i metabolismus. Permafrost jakožto trvale zmrzlá půda představuje bariéru, která ovlivňuje vstup vody a mineralizaci živin (Gilichinsky et al., 2005). I přes nehostinné podmínky se zde setkáváme s bohatým zastoupením mikrobiálních společenstev, která si vytvořila adaptační

mechanismy k zachování životních procesů za nízkých teplot, například díky změnám ve složení membránových lipidů nebo změnou struktury enzymů (Tehei and Zaccai, 2005).

Uvádí se, že celkový počet mikroorganismů v 1 g permafrostu se pohybuje kolem 10^8 buněk a počet života schopných mikroorganismů v rozmezí 10^2 - 10^6 buněk (Rivkina et al., 1998). Z arktického permafrostu již bylo izolováno přes 30 bakteriálních rodů (Gilichinsky et al., 1995).

2.2 Aktinobakterie

Kmen Aktinobakterie představují gram-pozitivní bakterie, obsahující ve své DNA vysoký obsah guaninu a cytosinu (Ventura et al., 2007). Jedná se o jeden z největších kmenů. Zástupci Aktinobakterií vykazují široké spektrum morfologií, od koků přes typické filamentózní formy. Většina Aktinobakterií je primárně aerobní. Rozmanitost a význam jednotlivých druhů je velmi široký (Brock et al., 1991).

Aktinobakterie tvoří nedílnou součást půdních ekosystémů, kde se díky svým schopnostem rozkládat organické látky, mezi něž patří například celulóza, fenolické látky a chitin, účastní celkového koloběhu uhlíku na Zemi. Schopností biodegradace aromatických či alifatických sloučenin významně přispívají k odbourávání polutantů znečišťujících životní prostředí. Někteří zástupci umí odbourávat také xenobiotika či pesticidy.

Aktinobakteriím však není přikládána důležitost pouze díky svým saprofytickým schopnostem, ale také díky průmyslovému a medicínskému významu. Vyskytují se mezi nimi jak producenti důležitých sekundárních metabolitů (antibiotik), tak i zástupci patogenních rodů, jako jsou *Corynebacterium*, *Mycobacterium* nebo *Nocardia*.

Nejčastěji průmyslově využívanými producenty antibiotik jsou zástupci z rodu *Streptomyces* (Ventura et al., 2007). Jedná se např. o streptomycin, erytromycin, gentamycin, vancomycin, vermencin. V současné době je k léčebné terapii a v zemědělství používáno zhruba 100 antibiotik produkovaných Aktinobakteriemi (Jiang et al., 2016). Farmakologicky významný je i rod *Bifidobacterium*, zástupce gastrointestinální flóry (Ventura et al., 2007). Aktinobakterie rodu *Frankia* jsou významnými symbionty rostlin, protože dokážou vázat dusík.

Vývoj nových léků z Aktinobakterií je závislý na překonávání mnoha překážek, jež jsou založené především na genomice. Neobvyklí mikrobi totiž mohou vlivem nového nahromadění genů syntetizovat nestandardní sekundární metabolity. Je tedy třeba studovat nové uspořádání genů a soustředit se na nové zdroje Aktinobakterií z nových, málo prozkoumaných lokalit jakou je i Arktida, jejichž produkty mohou mít velký vliv na farmakologický průmysl a mohou tak posloužit pro vývoj nových léků (Jiang et al., 2016).

2.2.1 Výskyt Aktinobakterií

Aktinobakterie osidlují takřka celou naši planetu, ať už jako saprofyté, produkující řadu významných produktů, nebo jako symbionti rostlin či patogenní mikroorganismy. Osidlují nejrůznější habitaty, včetně půdy, jezer, oceánu a živočichů. Dobře snášejí i extrémní podmínky, ať už se jedná o vysoké teploty, například v poušti, či nízké teploty v arktických oblastech.

Množství a počty druhů Aktinobakterií nalezených v půdě či jejich substrátech jsou ovlivněny hned několika faktory, mezi něž patří obsah živin, pH, teplota, salinita, vlhkost a obsah organických látek. Pro úspěšnou izolaci co nejvíce specifických druhů Aktinobakterií je nejvhodnější sbírat vzorky půdy z nedotčených oblastí, jako jsou pralesy, alkalické půdy, pouště nebo arktické oblasti.

2.2.2 Čeleď Streptomycetaceae

Zástupce čeledi Streptomycetaceae lze obecně charakterizovat jako aerobní, gram-pozitivní bakterie, které mají schopnost tvořit mycelium s rozvětveným substrátem. Vlákna mycelia vytváří dlouhé řetízky složené ze tří nebo více spor a jsou významné produkcí velkého množství pigmentů zodpovědných za barvu substrátu i vláken mycelia. Organismy jsou chemoorganotrofní a rostou v různém rozmezí pH. Všechny výše zmíněné rody se hojně vyskytují v půdě. Některé druhy mohou být také patogenní a to nejen pro živočichy a člověka, ale také pro rostliny (Dworkin et al., 2006).

Členové čeledi Streptomycetaceae mají velkou lineární genomovou DNA, která může být doprovázena lineárními nebo kruhovými plazmidy (Schrempf, 2008). Druh *Streptomyces coelicolor* se stal díky svému genomu objektem rozsáhlých genetických studií. Obsahuje 8,5 milionů párů bází a 7,825 předpokládaných genů, a proto patří k jednomu z největších sekvenovaných bakteriálních genomů (Schaechter et al., 2006).

2.2.3 Rod *Streptomyces*

Výskyt a obecná charakteristika

Druhy, patřící do rodu *Streptomyces*, zastupují většinu taxonů v čeledi Streptomycetaceae a tvoří převládající složku mikrobiální populace v půdách na celém světě. Jedná se tedy o gram-pozitivní bakterie, které se významně podílí na rozkladu organické hmoty (Schaechter et al., 2006). Podílejí se na charakteristickém „půdním zápachu“, který je způsoben produkcí metabolitů typických pro Streptomycety, nazývaných geosminy (Brock et al., 1991). Jedná se o nenasycené kruhové sloučeniny uhlíku, kyslíku a vodíku, jež jsou produkovány také některými sinicemi. Některé Streptomycety se mohou nacházet i ve vodních stanovištích, ale převážně se jedná o půdní organismy. Příznivější podmínky pro vývoj bakterií rodu *Streptomyces* představují alkalické a neutrální půdy oproti půdám kyselejšími. Vyšší druhové zastoupení lze najít obvykle v dobře odvodněných půdách (Brock et al., 1991).

Streptomycety tvoří vláknitá filamenta nazývaná hyfy, která svou velmi rozvětvenou strukturou tvoří síť, nazývanou mycelium. Díky této skutečnosti lze říci, že se svou strukturou podobají houbám (Glazer and Nikaido, 2007). Stárnutím mycelia vznikají vzdušné hyfy neboli sporofory, které vytváří vzdušné mycelium nad povrchem kolonie a tvoří spory. Spory *Streptomyces* se nazývají konidie. Konidie a sporofory obsahují velmi často pigmenty, které jsou zodpovědné za charakteristická zbarvení jednotlivých kolonií (Brock et al., 1991).

Význam

Streptomycety jsou ekologicky, průmyslově, medicínsky a vědecky významné (Schaechter et al., 2006). Z tohoto důvodu jsou předmětem rozsáhlých izolačních a screeningových studií, jelikož jsou důležitým zdrojem lékařsky i komerčně významných sekundárních metabolitů. Sekundární metabolity produkované rodem *Streptomyces* získaly pozornost pro své antibakteriální, antifugální, antiparazitické a imunosupresivní účinky (Dworlin et al., 2006). Velká většina dnes používaných antibiotik se získává převážně z druhů Streptomycet (Schaechter et al., 2006).

Streptomycety jsou ale také schopné degradovat celou řadu biopolymerů jako je celulóza, lignin a některé aromatické uhlovodíky, mezi něž patří fenantren nebo naftalen (Balachandran et al., 2012). Pro rozklad těchto sloučenin využívají širokou škálu

extracelulárních enzymů, jako jsou lipázy, esterázy, endoglukanázy, peroxidázy a oxygenázy (Tuncer et al., 2004).

2.2.3 Čeleď Nocardiaceae

Rod *Rhodococcus*

Výskyt a obecná charakteristika

Zástupci rodu *Rhodococcus* jsou popsány jako aerobní, gram-pozitivní, nepohyblivé Aktinobakterie, které byly izolovány z mnoha různých zdrojů, včetně půd, skal, vrtů, podzemních vod, mořských sedimentů, živočišného hnoje, střev hmyzu a ze zdravých i nemocných zvířat a rostlin (Bell et al., 1998). Jedná se o vláknité bakterie, které mohou tvořit hyfy a dále se větvit (Dworkin et al., 2006).

Některé druhy jsou původci onemocnění u člověka i zvířat. *R. equi* je více než 70 let znám jako patogen hřibů (Prescot, 1991). Ovšem s rostoucím počtem lidí nakažených HIV se tento patogen rozšiřuje i u lidí, u kterých způsobuje nejrůznější infekce plic. Mezi další lidské patogeny patří *R. rhodnii*, *R. rhodochrous* a *R. erythropolis*. *R. erythropolis* není pouze původce infekcí, ale patří i mezi producenty antibiotik (Winn et al., 2006).

Tvoří významnou složku půdy díky schopnosti odbourávat řadu látek znečišťujících životní prostředí. Uplatnění nacházejí v chemickém, energetickém či farmaceutickém průmyslu (van der Geize et al., 2004). Jsou schopni degradovat alifatické, aromatické a halogenové uhlovodíky a mají širokou škálu cest pro degradaci a modifikaci aromatických sloučenin (Bell et al., 1998).

Význam

Bylo prokázáno, že zástupci rodu *Rhodococcus* produkují řadu zajímavých a užitečných produktů. Například *Rhodococcus rhodochrous* se používá k výrobě akrylamidu, jehož roční výroba přesahuje 30 000 tun. Jedná se současně o první úspěšný případ průmyslové výroby v oblasti chemie pomocí mikrobu. Některé kmeny mohou produkovat poly-3-hydroxyalkanoát, jiné mohou hromadit cesium a další jsou zdrojem užitečných enzymů, jako je fenylalanin dehydrogenasa a endoglykosidázy.

Rhodococcus nachází uplatnění také v potravinářském průmyslu, například při úpravě hořkosti u ovocných šťáv. Některé druhy, jako například *Rhodococcus erythropolis*, dokážou produkovat antibiotika (Bell, 1998).

2.3 Proteobakterie

Kmen Proteobakterie byl původně nazýván „fialové bakterie a jejich příbuzní (purple bacteria and their relatives“. Na podnět amerického mikrobiologa Carla Woese byla tato skupina gram-negativních bakterií přejmenována na Proteobakterie (Brock et al., 1991). Jedná se o velmi obsáhlou (více než 1300 druhů, zařazených do nejméně 400 rodů) a rozmanitou skupinu bakterií. Jednotlivé druhy se od sebe liší nejen morfolodicky, ale také různorodostí metabolismu – zahrnují fototrofy, chemoorganotrofy a chemolithotrofy (Prescott et al., 2005). Proteobakterie se člení do šesti tříd: Alfaproteobakterie, Betaproteobakterie, Gammaproteobakterie, Deltaproteobakterie, Epsilonproteobakterie a Zetaproteobakterie plus za poslední dva roky přibylo několik nových tzv. kandidátních tříd, které ještě nemají pevnou taxonomickou hierarchii.

2.4 Betaproteobakterie

Betaproteobakterie na rozdíl od Alfaproteobakterií vyžadují velké množství živin. Některé druhy představují nebezpečné patogeny – *Neisseria gonorrhoea* (původce kapavky) či *Neisseria meningitidis* (původce meningitidy). Bordetella, z řádu Burkholderiales, je původcem pertuse neboli černého kašle.

2.5 Čeleď Burkholderiaceae

Rod Burkholderia

Rod Burkholderia vznikl rozdělením rodu Pseudomonas do dalších sedmi rodů na základě nových studií založených na sekvenaci specifických genů, zejména kódujících ribosomální RNA (rRNA). Členové rodu Burkholderia patří mezi gram-negativní, aerobní, chemoorganotrofní, nefermentující bakterie. Pohyb je umožněn přítomností jedné nebo více polárních bičíků, s výjimkou jednoho druhu (*B. mallei*), který je postrádá (Garrity et al., 2005). Některé druhy používají poly- β -hydroxybutyrát (PHB) jako uhlíkovou rezervu (Prescott et al.,

2005). Jiné druhy jsou zase schopny fixovat dusík, jako například *B. cepacia*, *B. vietnamiensis*. Více než polovina druhů je patogenních pro člověka, zvířata nebo rostliny (Garrity et al., 2005).

Význam

Někteří zástupci tohoto rodu jsou schopni degradovat různé látky znečišťující prostředí. *Burkholderia cepacia* má užitečné vlastnosti jako antagonista rostlinných škůdců a také se uplatňuje v procesu biodegradace. *Burkholderia* byla také používána jako bakterie podporující růst rostlin, díky několika mechanismům souvisejícím s růstem rostlin. Řada druhů *Burkholderia* nachází uplatnění ve farmakologickém průmyslu, díky schopnosti produkovat antibiotika.

2.6 Biodegradace

Řada zástupců Aktinobakterií či Proteobakterií představuje důležitou roli v procesu biodegradace, při kterém dochází k využití mikroorganismu k transformaci nebo úplnému rozkladu alifatických a aromatických sloučenin ale i xenobiotik, tj. látek, většinou organických, které se do prostředí dostaly vlivem činnosti člověka. V procesu biodegradace jsou z půdy odstraňovány toxické či nebezpečné sloučeniny a přeměněny na netoxické nebo alespoň méně nebezpečné látky. V ideálním případě je koncovým produktem biodegradace oxid uhličitý, voda, anorganické soli a mikrobiální biomasa (EPA, 1998).

Důležitou vlastností některých bakterií je schopnost degradovat alifatické a aromatické uhlovodíky. Například při znečištění půdy ropnými uhlovodíky se využívá biodegradačního potenciálu některých zástupců půdních bakterií z kmene Aktinobakterií či Proteobakterií.

Degradace alifatických uhlovodíků závisí na délce a rozvětvení řetězce a probíhá jako série oxidačních reakcí, kdy z degradovaného uhlovodíku vznikne mastná kyselina, která je dále oxidována při β -oxidaci. U aromatických sloučenin závisí degradace na struktuře a počtu benzenových jader (Biocatalysis/Biodegradation Database, 2011). Bakterie rodu *Rhodococcus* jsou schopny rozkládat polycyklické aromatické uhlovodíky, stejně jako rody *Pseudomonas* nebo *Mycobacterium*, patřící též mezi Aktinobakterie (Atlas, 1981). Například *Rhodococcus sp.* dokáže degradovat naftu (Jain et al., 2005), hexan, BTEX (benzen, toluen,

etylbenzen, xylen). Burkholderia jako zástupce Proteobakterií degraduje též BTEX (Morlett-Chavéz et al., 2010).

Kromě ropných látek znečišťujících prostředí se v přírodě rozšiřují také halogenové organické látky, mezi něž patří například chlorované uhlovodíky, jež se do přírody dostávají ve formě pesticidů, chlorovaných rozpouštědel, apod. Tyto látky jsou vysoce toxické a těžko odbouratelné. Jednou z možností je využití aerobní biodegradace kmene *Rhodococcus erythropolis*, který obsahuje enzymy umožňující dehalogenaci aromatických a alifatických halogenovaných uhlovodíků, konkrétně trichlorethenu a dichlorethenu (Minařík et al., 2018).

Rhodococcus erythropolis je také schopen metabolizovat a využívat jako jediný zdroj energie C5 – C16 uhlovodíky a C1 – C12 alkoholy. Byla u něj prokázána degradace izo – a cykloalkanů a aromatických sloučenin, jež jsou přítomny v topném oleji (de Carvalho, 2005).

Vyšší zastoupení alifatických a aromatických uhlovodíků bylo také nalezeno v tzv. kryoturbovaných organických horizontech Arktidy (Gentsch et al., 2015; Dao et al., 2017). Kryoturbované půdní horizonty jsou specifické pro arktické oblasti ovlivněné permafrostem. Vznikají opakujícími se cykly zamrzání/rozmrzání, které vytvářejí v půdě trhliny, do kterých klesají svrchní organické horizonty a dostávají se tak hlouběji do půdního profilu. Kryoturbace byly prokázány na více než 80% území permafrostu. Předpokládá se, že až 30% půdního uhlíku v Arctidě je uloženo právě v těchto tzv. kryoturbovaných organických kapsách. Oproti svrchním nekryoturbovaným horizontům je zde rozklad organického uhlíku výrazně pomalejší. Vlivem nízké teploty, anaerobiozy dochází pouze k částečnému rozkladu komplexní půdní organické hmoty a dochází k hromadění meziproduktů degradace a také alifatických a aromatických uhlovodíků (Dao et al., 2017; Gentsch et al., 2015). Předchozí mikrobiologické analýzy ukázaly, že se v kryoturbovaném horizontu oproti svrchnímu organickému horizontu vyskytuje větší zastoupení skupin bakterií (např. rody *Pseudomonas*, *Artrobacter*, *Cellulomonas*) schopných tyto alifatické a aromatické uhlovodíky rozkládat (Tab. I, nepublikováno).

Tab. I: Rozdíly vybraných skupin bakterií a jejich rodů schopných rozkládat alifatické a aromatické uhlovodíky mezi svrchním organickým horizontem a kryoturbovaným horizontem (data poskytnuta školitelem).

	svrchní org. horizont (n = 30)		kryoturbovaný horizont (n = 106)		stat
	% průměr	% maximum	% Průměr	% maximum	
Thermoleophilia (Actinobacteria)	5	18	7	36	ns
Pseudomonadales (Proteobacteria)	<1	3	2	80	*
Bacillales (Firmicutes)	<1	2	1	32	*
Bakteriální rody					
<i>Arthrobacter</i>	<1	<1	1	38	*
<i>Bacillus</i>	<1	<1	1	6	*
<i>Pseudomonas</i>	<1	<1	3	28	*
<i>Micrococcus</i>	0	<1	<1	<1	*
<i>Thauera</i>	<1	<1	1	3	*
<i>Cellulomonas</i>	<1	<1	2	19	***
<i>Variovorax</i>	<1	<1	1	16	***
<i>Alkanindiges</i>	<0.01	<1	<1	<1	ns
<i>Dietzia</i>	<0.1	<1	<1	<1	ns
<i>Gordonia</i>	<0.1	<1	<1	<1	ns
<i>Halomonas</i>	<0.01	<1	<1	<1	ns
<i>Rhodococcus</i>	<0.01	<1	<1	<1	ns
<i>Streptomyces</i>	<0.01	<1	<1	<1	ns
Burkholderia	<0.1	2	<1	3	ns
<i>Thalassospira</i>	<0.01	<1	<1	<1	ns

ns - nesignifikantní, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Welchův t-test

Data dále ukazují, že v kryoturbovaném horizontu je obrovská variabilita v zastoupení jednotlivých řádů/rodů. Např. řád Pseudomonadales tvořil v kryoturbovaném horizontu cca 2% z celkového bakteriálního společenstva, v maximum však dosahoval až k 80%. Podobně tomu bylo i u rodu *Arthrobacter*, který tvořil cca 1% z celkových bakterií, v maximum však dosahoval až k 38%. Tato dominance určitých druhů by mohla souviset s různým stadiem rozkladu organické hmoty v kryoturbovaných horizontech (tj. různé zastoupení aromatických a dlouhých alifatických uhlovodíků), a tudíž by mohla odrážet stáří kryoturbovaných horizontů, které se pohybuje od stovek až po několik desítek tisíc let (Gentsch et al., nepublikovaná data, 2015).

Cíle práce:

- Izolovat a identifikovat bakterie schopné rozkládat alifatické uhlovodíky v kryoturbovaných organických horizontech.
- Charakterizovat jejich metabolický potenciál pomocí testu Ecoplate s vybranými substráty.

3 Metody

3.2 Popis odběrové lokality

Vzorky půdy byly odebrány v srpnu 2017 na ostrově Disko (západní Grónsko) cca 4 km SV od CENPERM arktické stanice v údolí „Windyvalley“. Vzorky byly odebírány na třech lokalitách vždy z organického, svrchního humusového, kryoturbovaného a minerálního horizontu. Pro izolaci bakterií schopných rozkládat alifatické uhlovodíky byly vybrány kryoturbované horizonty, kde předchozí studie prokázaly vyšší zastoupení alifatických uhlovodíků.

3.3 Příprava vzorků a kultivace

Pro kultivaci bakterií bylo připraveno tekuté medium doporučené pro kultivaci zástupců z rodu *Thermoleophilia*. Složení média je uvedeno v tabulce (Tab. II.). pH kultivačního média bylo upraveno na 7,2 (pomocí 1M HCl nebo 1M NaOH). Po sterilizaci v autoklávu (121°C, 15 min) a ochlazení na 60°C byl do média přidán heptadekan (2ml/l media). Ten byl před tím sterilizován filtrací přes 0,3 µm filtr. Heptadekan je dlouhý alifatický uhlovodík, který představoval jediný zdroj uhlíku a energie v médiu.

Tab. II: Doporučené medium pro kultivaci bakterií rozkládající alifatické uhlovodíky.

Sloučenina	g/l
NH ₄ Cl	2,00
Na ₂ HPO ₄	0,21
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20
NaH ₂ PO ₄	0,09
KCl	0,04
CaCl ₂	0,015
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,001
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,00007
H ₃ BO ₃	0,00001
MnSO ₄ . 5H ₂ O	0,00001
MoO ₃	0,00001
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,000005

Ze vzorků půdy byl odebrán 1 gram, který byl rozpuštěn v 10 ml sterilního media. Z toho byla připravena tři různá ředění (1:10, 1:100 a 1:1000). Každé ředění bylo připraveno dvakrát kvůli kultivaci při rozdílných teplotách (5°C a 20°C). Pro lepší růst bakterií byla naočkovaná media umístěna na třepačku, kde díky mechanickému míchání docházelo k vhodnému provzdušňování. Po následném nárůstu bakterií v tekutém mediu, které se projevuje zakalením (tj. zvýšení optické hustoty), bylo možno přeočkovat bakterie na pevná média - agary.

Pro přípravu pevného média bylo nutno přidat 15 g agaru, rozlít médium na Petriho misky a následně naočkovat půdy narostlými kulturami v tekutém mediu. Cílem kultivace bakterií na Petriho miskách bylo získání čistých bakteriálních kolonií přeočkováním pomocí křížového roztěru.

3.4 Izolace DNA

Z čistých kolonií byla vyizolována DNA pomocí izolačního kitu Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio). Izolace byla provedena podle protokolu od výrobce.

3.5 PCR a elektroforéza

Pro správnou přípravu vzorků na amplifikaci pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) byla změřena koncentrace DNA v jednotlivých vzorcích pomocí fluorometru QUANTUS Quanti Fluor® dsDNA System, Promega. Pro reakci bylo použito 10 – 20 ng DNA. Poté byl připraven PCR mix, jehož složení je zaznamenáno v tabulce (Tab. III).

Tab. III: Složení PCR mixu.

	V (μl)
ddH ₂ O	9,70
FastPCR pufr	12,50
1512uR (R primer)	0,25
9bfm (F primer)	0,25
BSA	0,30

Finální koncentrace primerů v PCR reakci byla 1 μM (zásobní roztok byl 100 μM). Byl přidán bovine serum albumin (BSA) 20 mg/ml (ThermoFisher), který slouží jako PCR enhancer. K 23 μl MasterMixu byly přidány 2 μl DNA templátu. Do pozitivní kontroly byla

přidána DNA *E. coli* a do negativní kontroly byla místo DNA přidána PCR voda. Poté byly vzorky amplifikovány za stanovených PCR podmínek (Tab. IV).

Tab. IV: Přehled jednotlivých PCR cyklů.

fáze	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	95	180	1
denaturace	95	60	30
připojení primerů	52	60	
extenze	72	90	
dosyntéza produktů	72	600	1

Pro ověření byly PCR produkty vizualizovány na 1% gelu pomocí elektroforézy v 1xTAE pufru při 90 V, 500 mA, po dobu 50 minut. Poté byla DNA přečištěna pomocí QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), případně QIAquick Gel Extraction Kit (QIAQEN) a rozpuštěna ve 30 μ l PCR vody. Vzorky byly naředěny podle požadavků sekvenační firmy SEQme. 16SrDNA obsahuje 1500 párů bází, proto byl templát sekvenován dvakrát – s předním (9bfm) i zpětným (1512uR) primerem. Koncentrace primerů pro sekvenační reakci byla 5 μ M.

3.6 Vyhodnocení sekvenací

Data byla vyhodnocena pomocí programu Geneious (verze 9.1.8). Sekvence jednoho izolátu s předním a zpětným primerem byly pomocí softwaru v místě překryvu spojeny. Pro analýzu sekvencí v nr databázi bylo použito celých 1500 bp.

3.7 Fluorescenční barvení

K určení životaschopnosti bakteriálních buněk byla použita metoda fluorescenčního barvení pomocí LIVE/DEAD[®]BacLight[™]Bacterial Viability Kits. Bylo smícháno 200 μ l fyziologického roztoku a 0,6 μ l SYTO 9 dye (1,67 mMm, Propidium iodide), nanášeno na podložní sklíčko (10 μ l). Takto připravená sklíčka byla pozorována pod mikroskopem.

3.8 EcoPlate

Pro získání více informací o rozkladu určitých látek identifikovanými bakteriemi byla aplikována metoda EcoPlate. Byla použita destička EcoMicroPlate (BiOLOG), v níž je zabudováno 31 různých zdrojů uhlíku. Bakterie byly nejprve kultivovány v tekutém mediu s heptadekanem na hodnotu optické denzity 0,7 – 0,8 (měřeno spektrofotometricky, OD=600,

BioPhotometer, fa.Eppendorf). Poté bylo zapotřebí centrifugací vytvořit buněčnou peletu, odsát médium s heptadekanem a naředit bakteriální kulturu na hodnotu optické denzity přibližně 0,1 (pro ředění bylo použito sterilní médium bez heptadekanu). Na destičku bylo do každé jamky napipetováno 150 μ l a destička měřena ve spektrofotometru INFINITE F200 (TECAN), při vlnové délce 595 nm. Takto bylo připraveno celkem pět destiček, tři byly inkubovány při 20°C (tj. vybrány tři bakterie izolované při 20°C), a dvě při 5°C (tj. vybrány dvě bakterie izolované při 5°C). Optická denzita byla pravidelně měřena minimálně jednou za den. Pro konečné vyhodnocení byly vypočteny průměry ze třech posledních bodů růstové křivky, kdy již nedocházelo k nárůstu OD. U destiček inkubovaných při 20°C to bylo po týdenní inkubaci, u destiček inkubovaných při 5°C to bylo po 14 denní inkubaci z důvodu pomalejšího růstu bakterií.

A1 Water	A2 β -Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β -Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β -Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ - Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ - Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ - Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α -D-Lactose	H2 D,L- α - Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α -D-Lactose	H2 D,L- α - Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α -D-Lactose	H2 D,L- α - Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Obr. 1: Přehled substrátů na mikrodestičce EcoPlate.

3.9 Uchování izolátů

Pro uchování vyočkovaných čistých kultur byly z tekutých médií připraveny glycerolové konzervy. Do sterilních kryozkumavek bylo napipetováno 700 μ l bakteriální kultury a k tomu přidáno 300 μ l 50% glycerolu. Takto připravené konzervy byly uskladněny do mrazáku při -80°C.

4 Výsledky a diskuze

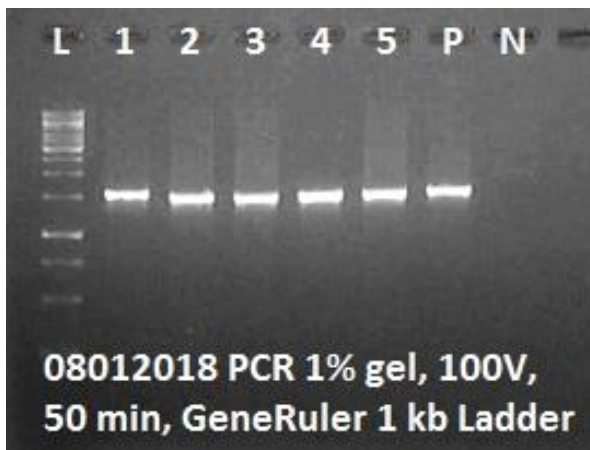
Vzorky byly inkubovány při dvou různých teplotách s cílem izolace psychrofilních (5°C) a mezofilních druhů (20°C). Zákal v tekutých médiích se při inkubaci ve 20°C objevil během dvou dnů a po přeočkování na pevná média narostly kolonie zhruba za týden. Tudíž získání čistých kolonií pomocí metody křížového roztěru trvalo od začátku inkubace zhruba tři týdny. Růst kolonií při 5°C byl značně ovlivněn inkubací při nízké teplotě. Nárůst kolonií byl pomalejší, a tudíž i proces získání čistých kolonií trval déle.



Obr. 2: Křížový roztěr.

Na obrázku (Obr. 2) je zobrazen křížový roztěr na agaru s narostlými koloniemi bakterií.

Následující obrázek zobrazuje úspěšnost amplifikace na gelu pomocí elektroforézy.



Obr. 3: Gelová elektroforéza.

Z gelu (Obr. 3) je patrné, že amplifikace genu 16SrDNA byla provedena úspěšně.

4.1 Výsledky sekvenace

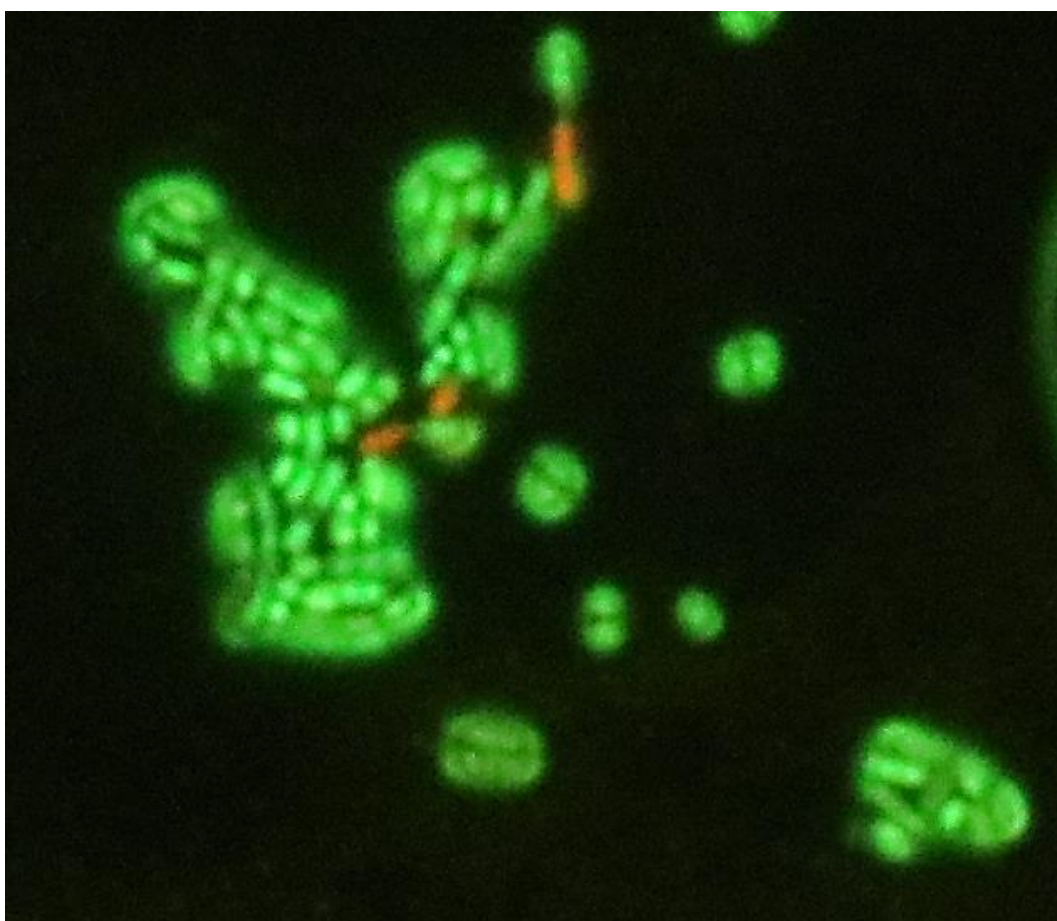
V následující tabulce (Tab. V) jsou uvedeny výsledky tří sekvenací PCR produktů z bakteriálních izolátů, podle kterých byly stanoveny hodnoty HQ neboli High Quality (%) a GC (%) neboli procentuální zastoupení guaninu a cytosinu v DNA.

Tab. V: Výsledky sekvenace PCR produktů bakteriálních izolátů.

sekvenace	číslo izolátu	bakterie	kmen	HQ (%)	GC (%)	teplota (°C)	ředění
1	1	Alkanindiges	Proteobakterie	90,6	53,0	20	1:10
	2	-		0,0	-	20	1:10
	3	-		0,0	-	20	1:1000
	4	Rhodococcus	Aktinobakterie	93,4	57,5	20	1:1000
	5	Alkanindiges	Proteobakterie	81,4	53,1	20	1:100
	11	Alkanindiges	Proteobakterie	82,0	53,2	20	1:100
	12	Alkanindiges	Proteobakterie	81,5	53,3	20	1:100
	13	Alkanindiges	Proteobakterie	63,4	53,1	20	1:1000
2	17	Alkanindiges	Proteobakterie	92,8	53,1	20	1:10
	18	-		0,0	-	20	1:1000
	19	Alkanindiges	Proteobakterie	93,8	53,2	20	1:100
	20	Rhodococcus	Aktinobakterie	89,4	57,6	20	1:10
	21	Burkholderia	Proteobakterie	75,3	55,8	20	1:10
	22	-		0,0	-	5	1:10
	23	-		0,0	-	5	1:10
	24	Rhodococcus	Aktinobakterie	93,3	57,6	20	1:1000
25	Alkanindiges	Proteobakterie	76,4	53,1	20	1:1000	
3	35	-		0,0	-	20	1:1000
	36	Duganella	Proteobakterie	75,3	53,2	5	1:10
	37	Alkanindiges	Proteobakterie	81,4	54,6	5	1:10
	38	-		0,0	-	20	1:1000

Z tabulky je patrné, že u většiny vzorků vyšlo vysoké procento nukleových bází o vysoké kvalitě (HQ), tudíž taxonomické zařazení je s velkou pravděpodobností správné. U vzorků, u nichž vyšlo HQ 0 je pravděpodobné, že izolovaná DNA z kolonie zřejmě nebyla čistá, tj. obsahovala více než jednu bakterii, a tudíž nebylo možné izolát spolehlivě identifikovat a taxonomicky zařadit. Neúspěšná sekvenace vzorků 22 a 23 inkubovaných v 5°C byla opakována v 3. sekvenaci pod čísly 36 a 37. Zde už došlo k úspěšnému identifikování bakterií. Naopak u vzorků číslo 35 a 38 nedošlo k identifikování bakterií, nejspíše z důvodu špatně naředěného druhého primeru. Podařilo se vyizolovat zástupce Aktinobakterií, mezi něž patří Rhodococcus, a zástupce Proteobakterií, mezi něž patří Alkanindiges, Burkholderia a Duganella. Rod Alkanindiges byl vyizolován jak z 20, tak z 5°C.

4.2 Fluorescenční mikroskopie

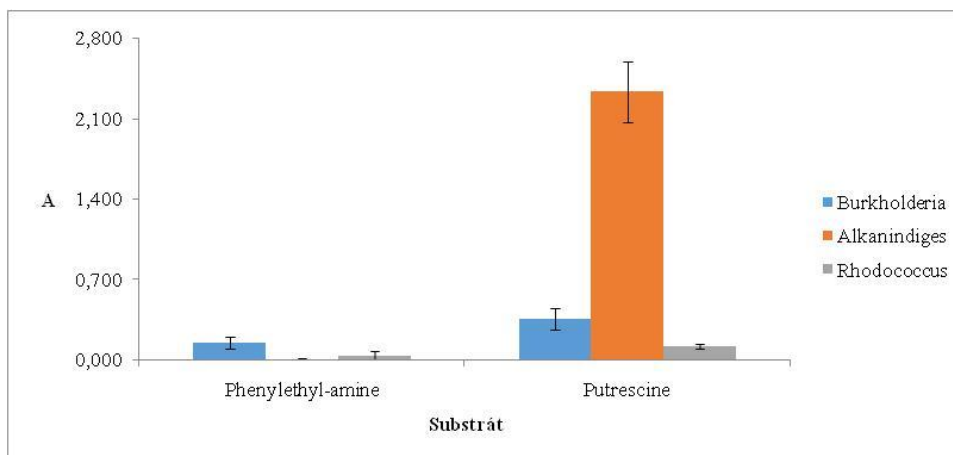


Obr. 4: Fluorescenční mikroskopie LIVE/DEAD bakterie *Alkanindiges*.

Na obrázku jsou zobrazeny bakterie rodu *Alkanindiges* pod fluorescenčním mikroskopem zobrazující mrtvé (oranžové/červené) a živé (zelené) buňky. Je patrný tvar buněk, který by se dal popsat jako krátký tyčinkovitý.

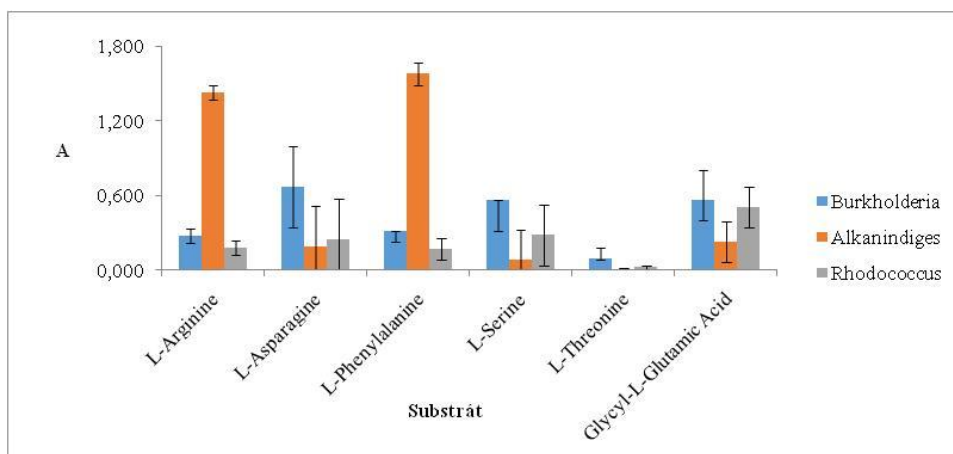
4.3 Růst vybraných bakterií na různých zdrojích C (metoda EcoPlate)

Z dat získaných měření destiček v mikrodestičkovém spektrofotometru byly sestrojeny grafy, které porovnávají nárůst bakterií na různých zdrojích C a energie. Následující grafy zobrazují nárůst bakterií z rodu *Burkholderia*, *Alkanindiges* a *Rhodococcus* na jednotlivých substrátech inkubovaných při 20°C.



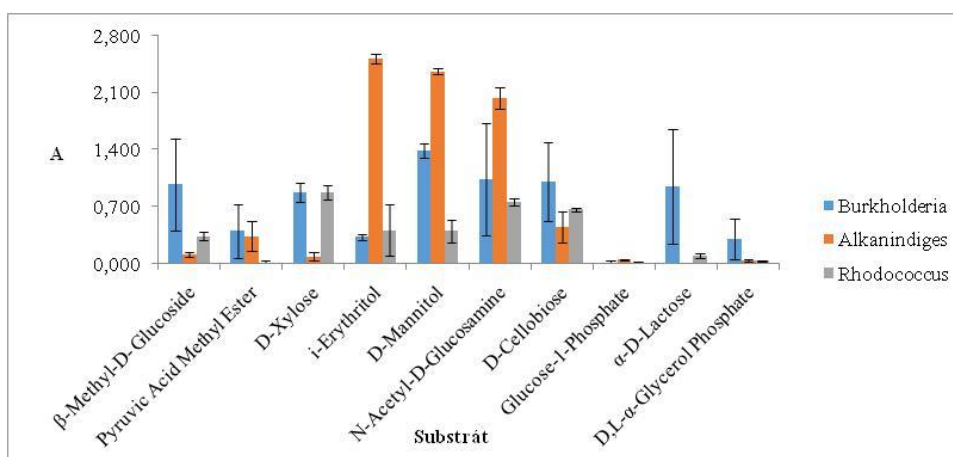
Obr. 5: Nárůst vybraných rodů bakterií na substrátech ze skupiny aminů při 20°C.

Z grafu vyplývá, že výraznější nárůst bakterií je na substrátu putrescin a to konkrétně u bakterie *Alkanindiges*. Na substrátu fenyletyl-amin byl nárůst všech rodů nepatrný. Putrescin se nachází běžně v půdě, je produktem rozkladu proteinů a oligopeptidů, ale i součástí kořenových exudátů (Kuiper, 2001) a ve vyšší koncentraci má bakteriostatické účinky. Jeho rozklad bakterií *Alkanindiges* v kryoturbovaných horizontech tak může podpořit nárůst jiných bakterií, které tuto schopnost nemají a které by byly vyšší koncentrací putrescinu inhibované.



Obr. 6: Nárůst vybraných rodů bakterií na substrátech ze skupiny aminokyselin při 20°C.

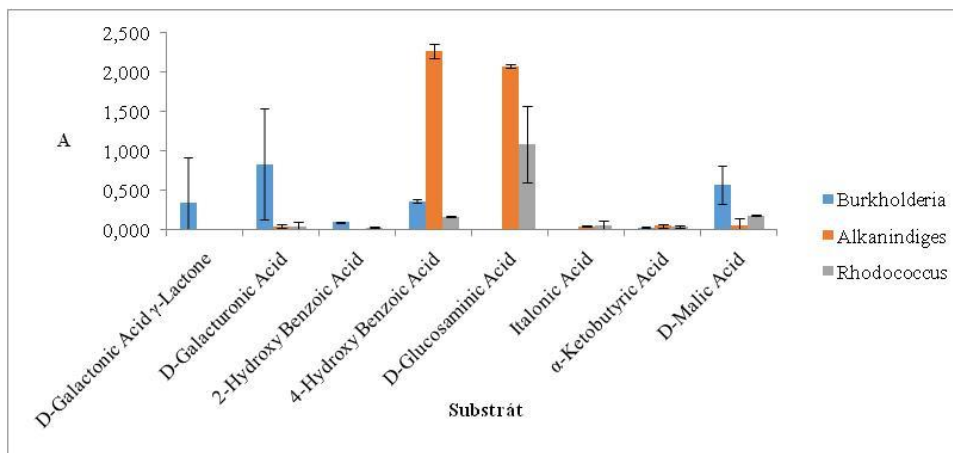
Izolát z rodu *Alkanindiges* vykazoval mnohem větší nárůst na aromatické aminokyselině L-fenylalaninu a L-asparaginu (Obr. 6). Schopnost využívat aminokyseliny jako zdroje uhlíku a ne jako zdroj dusíku je známa a byla mnohokrát popsána (viz např. Ogata et al., 1967). L-arginin je navíc prekurzorem při syntéze polyaminů, kam patří i výše zmiňovaný putrescin (Obr. 5), tudíž je vysoký nárůst na L-argininu logický. U ostatních rodů není patrná výrazná preference substrátů. Nejmenší nárůst u všech tří rodů lze vidět na substrátu L-threonin.



Obr. 7: Nárůst vybraných rodů bakterií na vybraných uhlovodících při 20°C.

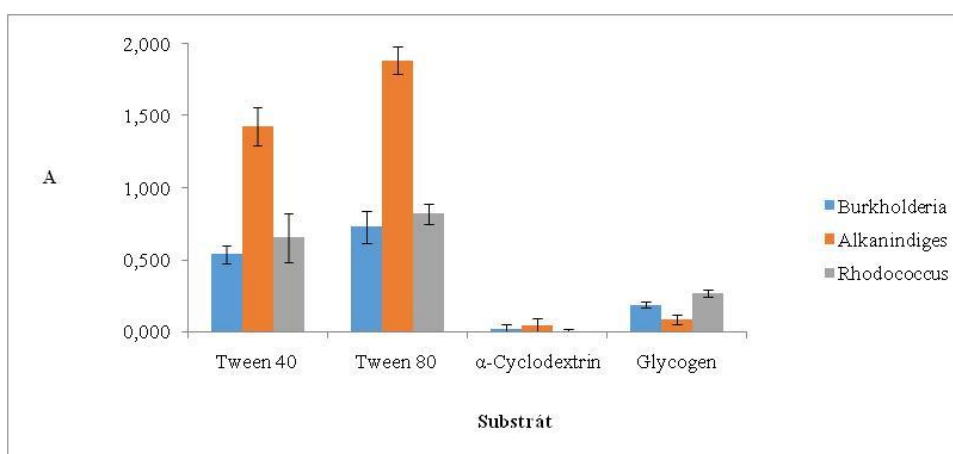
Z Obr. 7 je patrný preferenční nárůst izolátu z rodu *Alkanindiges* na substrátech I-erytritolu, D-manitolu a N-acetyl-D-glucosaminu. I-erytritrol je čtyřuhlíkatý a D-manitol pětiuhlíkatý cukerný alkohol. Obě sloučeniny vznikají při rozkladu rostlinného materiálu, manitol je navíc produkován rostlinami při osmotickém stresu (Klann, 2016). Vysoký nárůst na N-acetyl-D-glucosaminu ukazuje, že izolát z rodu *Alkanindiges* využívá i mrtvé bakteriální biomasy, jelikož je N-acetyl-D-glucosamin hlavní strukturální složkou

buněčných stěn bakterií a archaeí. Zástupci tohoto rodu se tak zřejmě v kryoturbovaných horizontech podílí na recyklaci mrtvé mikrobiální biomasy.



Obr. 8: Nárůst vybraných rodů bakterií na substrátech ze skupiny karboxylových kyselin při 20°C.

Izolát z rodu *Alkanindiges* preferenčně roste na 4-hydroxybenzoové kyselině a D-glukosaminové kyselině. Kyselina 4-hydroxybenzoová je jedním z meziproduktů rozkladu ligninu (Bokern, 1991). Polyfenolické a fenolické sloučeniny, které při rozkladu ligninu vznikají, byly v kryoturbovaných horizontech nalezeny ve větším množství v porovnání se svrchními půdními horizonty (Gentsch et al., 2015; Dao et al., 2017). To opět poukazuje na důležitou roli těchto bakterií na rozkladu komplexních polyfenolických sloučeninách a na celkovém koloběhu uhlíku v kryoturbovaných horizontech.

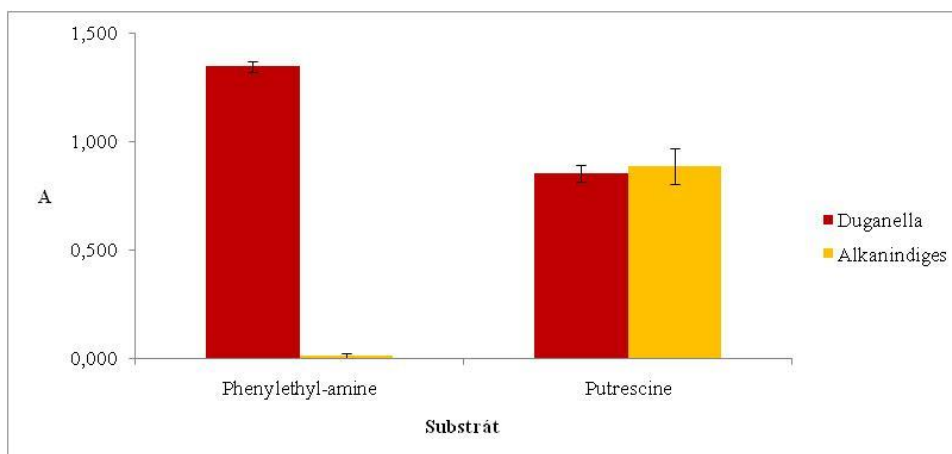


Obr. 9: Nárůst vybraných rodů bakterií na substrátech ze skupiny polymerů při 20°C.

Z obr. 9 je opět patrný vysoký nárůst rodu *Alkanindiges* na emulgátorech Tween 40 a Tween 80. Tyto sloučeniny obsahují dlouhý alifatický řetězec odvozený od kyseliny olejové

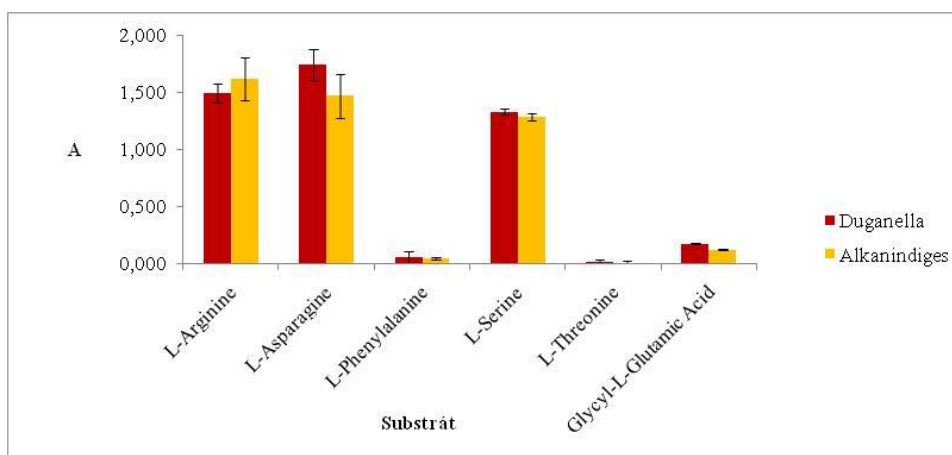
(C18). I tento test tedy potvrdil schopnost izolátu z rodu *Alkanindiges* ve větší míře degradovat alifatické uhlovodíky a jejich deriváty.

Následující grafy zobrazují nárůst vybraných rodů bakterií (*Duganella*, *Alkanindiges*) na jednotlivých substrátech při 5°C.



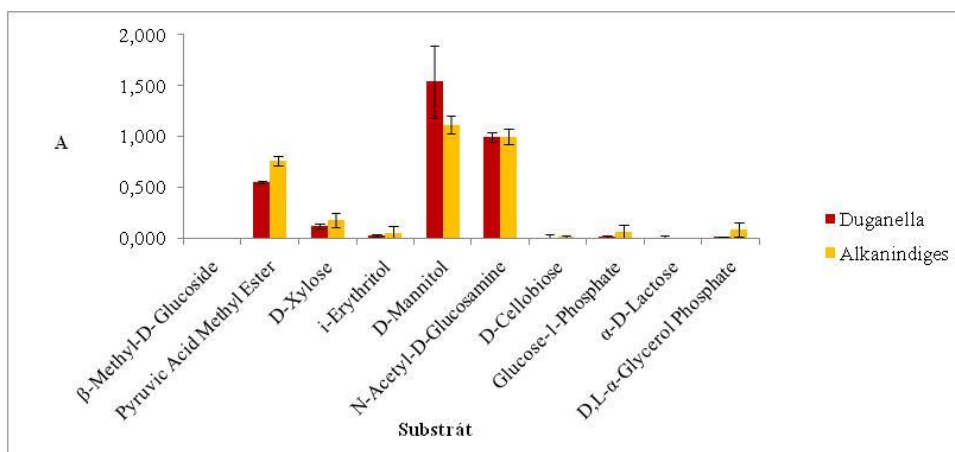
Obr. 10: Nárůst vybraných rodů bakterií na substrátech ze skupiny aminů při 5°C.

Z grafu (Obr. 10) je patrný nárůst obou rodů na substrátu Putrescine a výraznější nárůst rodu *Duganella* na substrátu fenyletyl-amin, na kterém byl ovšem nárůst rodu *Alkanindiges* téměř nulový.



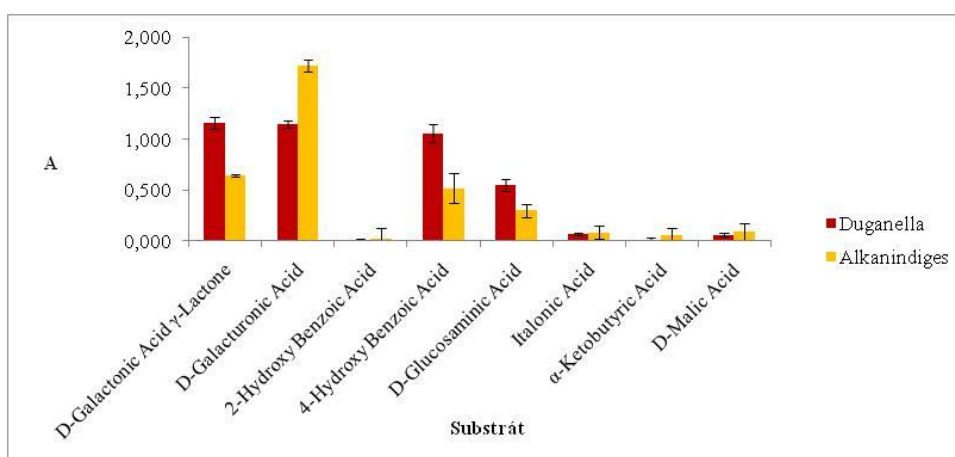
Obr. 11: Nárůst vybraných rodů bakterií na substrátech ze skupiny aminokyselin při 5°C.

Z grafu (Obr. 11) vyplývají u obou rodů preference aminokyselin L-arginin, L-asparagin a L-serin. Naopak velmi nízký nárůst je vyobrazen u aminokyselin L-fenylalanin, L-threonin a Glycyl-L-Glutamic Acid.



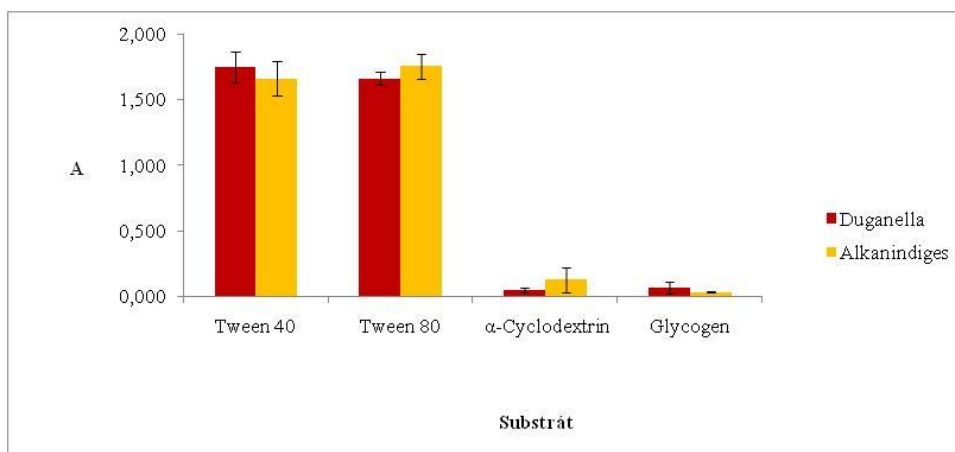
Obr. 12: Nárůst vybraných rodů bakterií na substrátech ze skupiny karbohydrátů při 5°C.

Z grafu (Obr. 12) vyplývá vyšší nárůst obou rodů na substrátech D-Mannitol, N-Acetyl-D-Glucosamine a střední nárůst na substrátu Pyruvic Acid Methyl Ester. Na ostatních substrátech byl nárůst obou rodů bakterií velmi nízký. Na substrátu β -Methyl-D-Glucosid byl dokonce nárůst pro oba rody nulový.



Obr. 13: Nárůst vybraných rodů bakterií na substrátech ze skupiny karboxylových kyselin při 5°C.

Z grafu (Obr. 13) je patrné, že bakterie rodu Duganella i Alkanindiges preferují pro svůj růst substráty D-Galactonic Acid γ -Lactone, D-Galacturonic Acid a 4-hydroxy benzoovou kyselinu. Na D-glukosaminové kyselině byl nárůst střední a na zbylých substrátech zcela nepatrný u obou rodů.



Obr. 14: Nárůst vybraných rodů bakterií na substrátech ze skupiny polymerů při 5°C.

Z grafu (Obr. 14) je patrná preference substrátů Tween 40 a Tween 80, která se projevila výrazným nárůstem obou rodů. Naopak je vidět nízký nárůst na substrátech α -cyklodextrin a glykogen.

Předchozí grafy také ukazují rozdíly nárůstu bakterie *Alkanindiges sp.* při dvou teplotách. Při 20°C rostl *Alkanindiges* preferenčně na jednoduchých uhlovodících, kdežto při 5°C na polymerech. Při obou teplotách byl využíván putrescin. Z aminokyselin oba izoláty preferují L-arginin, což se projevilo velmi dobrým růstem, ale u L-asparaginu se vysoký růst projevil pouze u izolátu z 5°C. Téměř shodné hodnoty vykazovaly oba izoláty na substrátech ze skupiny polymerů, z nichž je patná výrazná preference Tween 40 a Tween 80 a naopak velmi nepatrný nárůst na α -cyklodextrinu a glykogenu.

5 Závěr

Z permafrostu bylo celkem izolováno 19 izolátů, které byly identifikovány jako zástupci Aktinobakterií či Proteobakterií. Jako zástupce Aktinobakterií byl ze tří izolátů identifikován *Rhodococcus*. *Rhodococcus* nejvíce rostl na D-glukosaminové kyselině. Jako zástupce Proteobakterií byl z devíti izolátů identifikován *Alkanindiges*, který byl vyizolován při 20 i 5°C inkubaci. Rozdílná teplota inkubace ovlivnila i nárůst na jednotlivých uhlíkatých zdrojích a to konkrétně u fenyletyl-aminu, L-asparginu a I-erytritolu.

Jako další zástupce Proteobakterií se podařilo vyizolovat rod *Burkholderia*, a pak také psychrofilní bakterii z rodu *Duganella*, která byla vyizolována při 5°C. *Burkholderia* prokázala největší nárůst na D-manitolu, kdežto *Duganella* nejlépe rostla na polymeru Tween 40.

6 Seznam literatury

- ATLAS R. M. (1981). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective, *Microbiological Reviews* 45(1), 180-209.
- BALACHANDRAN C., DURAI PANDIYAN V., BALAKRISHNA K., IGNACIMUTHU S. (2012). Petroleum and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Degradation and Naphthalene Metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) Isolated from Oil Contaminated Soil, *Bioresource technology* 112: 83-90.
- BELL K. S., PHILP J. C., AW D. W. J., CHRISTOFI N. (1998). The Genus *Rhodococcus*, *Journal of Applied Microbiology*, 85(2):195-210.
- BIOCATALYSIS/BIODEGRADATION DATABASE: BTEX Metabolism Metapathway Map [online], [29.1.2011], available at: http://umbbd.msi.umn.edu/BTEX/BTEX_map.html.
- BOCKHEIM J. G., TARNOCAI C. (1998). Recognition of Cryoturbation for Classifying Permafrost Affected Soils, *Geoderma* 81(3-4): 281-293.
- BOKERN L. (1991). Accumulation of Phenolic Acid Conjugates and Betacyanins, and Changes in the Activities of Enzymes Involved in Feruloylglucose Metabolism in Cell-suspension Cultures of *Chenopodium Rubrum* L., *Planta*, 184(2): 261–270.
- BROCK T. D., MADIGAN M. T. (1991). *Biology of Microorganisms*, (6th ed.), Prentice Hall International, Englewood Cliffs, s. 368-787.
- DAO T. T., GENTSCH N., MIKUTTA R., SAUHEITL L., SHIBISTOVA O., WILD B., SCHNECKER J., BÁRTA J., ČAPEK P., GITTEL A., LASHCHINSKIY. N., URICH T., ŠANTRŮČKOVÁ H., RICHTER A., GUGGENBERGER G. (2017). Fate of Carbohydrates and Lignin in North-East Siberian Permafrost Soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 116: 311-322.
- DE CARVALHO C. C. C. R. DS FONSECA M. M. R. (2005). Degradation of Hydrocarbons and Alcohols at Different Temperatures and Salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14, *FEMS Microbiology Ecology* 51(3): 389-399.
- DWORKIN M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K. H., STACKEBRANDT E. (2006). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Vol. 1, (3rd ed.), Springer, (NY).

FITZPATRICK E. A. (1997). Arctic Soils and Permafrost, Ecology of Arctic Environments, *Blackwell Science* 13: 1-40.

GARRITY G. M., BRENNER D. J., KRIEG N. R., STALEY J. T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2nd ed.), Springer, (NY).

GENTSCH N., MIKUTTA R., ALVES R. J. E., BÁRTA J., ČAPEK P., GITTEL A., HUGELIUS G., KUHRÝ P., LASHCHINSKIY. N., PALMTAG J., RICHTER A., ŠANTRŮČKOVÁ H., SCHNECKER J., SHIBISTOVA O., URICH T., WILD B., GUGGENBERGER G. (2015). Storage and Transformation of Organic Matter Fractions in Cryoturbated Permafrost Soils Across the Siberian Arctic, *Biogeosciences*, 12(14): 4525-4542.

GILICHINSKY D. A., WAGENER S., VISHNIVETSKAYA T. A. (1995). Permafrost Mikrobiology, *Permafrost Periglac Process* 6(4): 281-291.

GILICHINSKY D., RIVKINA E., BAKERMANS C., SHCHERBAKOVA V., PETROVSKAYA L., OZERSKAYAS., IVANUSHKINA N., KOCHKINA G., LAURINAVICHUIS K., PECHERITSINA S., FATTAKHOVA R., TIEDJE J. M. (2005). Biodiversity of Cryopegs in permafrost, *FEMS Microbiology Ecology* 53(1): 117-128.

GLAZER A. N., NIKAIDO H (2007). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied mikrobiology*, (2nd ed.), Cambridge University Press, (NY).

JAIN R. K., KAPUR M., LABANA S., LAL B., SARMA P. M. BHATTACHARYA D., THAKUR I. S. (2005). Microbial Diversity: Application of Microorganisms for the Biodegradation of xenobiotics, *Current Science*, 89: 101-112.

JIANG Y., LI Q., CHEN X., JIANG CH. (2016). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria, *Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications* 2016: 40-57.

KLANN J., MCHENRY A., MONTELONGO C., GOFFREDI S. K. (2016). Decomposition of Plant-sourced Carbon Compounds by Heterotrophic Betaproteobacteria Isolated from a Tropical Costa Rican Bromeliad, *Microbiologyopen* 5(3): 479-489.

KUIPER I., BLOEMBERG G. V., NOREEN S., THOMAS-OATES J. E., LUGTENBERG B. J. J. (2001). Increased Uptake of Putrescine in the Rhizosphere Inhibits Competitive Root

Colonization by *Pseudomonas fluorescens* Strain WCS365, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(9): 1096-1104.

MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS(2007). Microbial Community Analysis [online], Biolog, EcoPlate [2018-03-25], available at: http://www.biolog.com/pdf/milit/00A_012_EcoPlate_Sell_Sheet.pdf.

MINAŘÍK, M., SOLAŘOVÁ, M., SIGLOVÁ, M., MASÁK, J. (2018). Aerobní biodegradace odstraňující TCE, DCE [online], working paper [2018-03-25], available at: http://www.epsbiotechnology.cz/documents/konference_seminare/2005_09_19_001_clanek.pdf.

MORLETT-CHÁVEZ J. A., ASCACIO-MARTÍNEZ J. A., RIVAS-ESTILLA A. M., VELÁZQUEZ-VADILLO J. F., HASKINS W. E., BARRERA-SALDANA H. A., ACUNA-ASKAR K. (2010). Kinetics of BTEX Biodegradation by a Microbial Consortium acclimatized to Unleaded Gasoline and Bacterial Strains Isolated from it, *International Biodeterioration and Biodegradation* 64(7): 581-587.

OGATA K., UCHIYAMA K., YAMADA H. (1967). Metabolism of Aromatic Amino Acid in Microorganisms, *Agricultural and Biological Chemistry* 31(2), 200-206.

POWELL, R. M., BLOWES, D. W., GILLHAM, R. W., SCHULTZ, D., SIVAVEC, T., PULS, R. W., VOGAN, J. L., POWELL, P. D., LANDIS, R. (1998). Permeable Reactive Barrier Technologies for Contaminant Remediation [online], United States Environmental Protection Agency, EPA/600/R-98/125 [2018-03-25], available at: <https://clu-in.org/download/rtdf/prb/reactbar.pdf>.

PRESCOTT L. M., HARLEY J. P., KLEIN D. A. (2005). *Microbiology*, (6th ed.), McGraw-Hill, NY.

RIVKINA E., GILICHINSKY D., WAGENER S., TIEDJE J., McGRATH J. (1998). Biogeochemical Activity of Anaerobic Microorganisms from Buried Permafrost Sediments, *Geomicrobiology Journal* 15(3): 187-193.

SCHAECHTER M., INGRAHAM J. L., NEIDHARDT F. C. (2006). *Microbe*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- SCHREMPF H. (2008). Streptomycetaceae: Life Style, Genome, Metabolism and Habitats, *Encyclopedia of Life Sciences*, (eds, John Wiley&Sons, Ltd), John Wiley&Sons, Ltd.
- TEHEI M., ZACCAI G. (2005). Adaptation to Extreme Environments: Macromolecular Dynamics in Complex Systeme, *Biochimica et Biophysica Acta* 1724(3): 404-410.
- TUNCER M., KURU A., ISIKLI M., SAHIN N., CELENK F. G. (2004). Optimization of Extracellular Endoxylanase, Endoglucanase and Peroxidase Production by Streptomyces sp. F2621 Isolated in Turkey, *Journal of Applied Microbiology* 97(4): 783-91.
- VAN DER GEIZE R., DIJKHUIZEN L. (2004). Harnessing the Catabolic Diversity of Rhodococci for Environmental and Biotechnological Applications, *Current Opinion in Microbiology* 7(3): 255–261.
- VENTURA M., CANCHAYA C., TAUCH A., CHANDRA G., FITZGERALD G. F., CHATER K. F., VAN SINDEREN D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(3): 495–548.
- WINN W., ALLEN S., JANDA W., KONEMAN E., PROCIP G., SCHREKENBERGER P. et al. (2006). *Koneman's color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, (6th ed.), Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkin; Aerobic actinomycetes Chapter.

