



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A
BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH KMENŮ KLOSTRIDIÍ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SELECTED CLOSTRIDIAL STRAINS ISOLATED
FROM CHEESES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. MARIA CHROBOKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0478/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Maria Chroboková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Molekulární charakterizace vybraných kmenů klostridií izolovaných ze sýrů

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Zpracujte získané experimentální výsledky
4. Vyhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Maria Chroboková
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na molekulární charakterizaci 42 bakteriálních kmenů rodu *Clostridium*. DNA byla izolována fenol-chloroformovou extrakcí a vysrážena ethanolem. Poté byla provedena rodová a druhová identifikace studovaných kmenů. Ze 42 testovaných kmenů bylo 19 z nich zařazeno do druhu *Clostridium tyrobutyricum* a 3 byly zařazeny do druhu *Clostridium butyricum*. DNA všech kmenů byla testována metodou PCR se specifickými primery HGf a HGr na přítomnost genu pro hydrogenázu *hydA*. U 21 vzorků byla prokázána přítomnost genů kódujících uvedenou hydrogenázu. Pro vytvoření fingerprintových profilů studovaných kmenů byly použity primery (GTG)₅ (rep-PCR) a Pr1 a Pr6 (RAPD). Dále byla za různých podmínek studována kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5. Kultivace byla prováděna za anaerobních podmínek v tekutém živném médiu RCM, ve kterém byla glukóza nahrazena laktózou nebo syrovátkou. Růst bakteriálních buněk byl sledován při laboratorní teplotě (20-23 °C) a při 37 °C; pH média se pohybovalo v rozmezí 4,0 až 8,0 s rozdílem 0,5 jednotky.

ABSTRACT

The study was focused on molecular characterization of 42 clostridial strains. DNA was isolated by phenol-chloroform extraction procedure and precipitated with ethanol. After DNA isolation, PCR amplifications with specific primer sets were used for genus and species identification. Finally 19 strains were classified as *Clostridium tyrobutyricum* and 3 strains were classified as *Clostridium butyricum*. Presence of hydrogenase gene *hydA* was tested by PCR amplification using specific primer set HGf and HGr. Presence of hydrogenase gene was detected within 21 strains. (GTG)₅ primer (rep-PCR) and Pr1 and Pr6 primers (RAPD) were used for differentiation of clostridial strains. Next, the cultivation of *Clostridium tyrobutyricum* S5 was studied under different conditions. The cultivation was carried out in liquid Reinforced Clostridial Medium (RCM) with lactose and cheese whey instead of glucose under anaerobe conditions. Growth was observed at laboratory temperature (20 to 23 °C) and at 37 °C, pH values ranging from 4.0 to 8.0 with 0.5 unit.

KLÍČOVÁ SLOVA

Clostridium, PCR, rep-PCR, RAPD, fermentace, utilizace laktózy

KEYWORDS

Clostridium, PCR, rep-PCR, RAPD, fermentation, lactose utilisation

CHROBOKOVÁ, M. *Molekulární charakterizace vybraných kmenů klostridií izolovaných ze sýrů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 90 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce, panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. a paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc., za poskytnutí cenných informací, odborné vedení a pomoc, které mi věnovali během zpracovávání této práce. Dále děkuji Ing. Barboře Üргеové, Mgr. Kristýně Turkové a Ing. Miloši Dvořákovi za pomoc a užitečné rady při práci v laboratoři. Poděkování patří mé rodině za podporu při studiu.

Tato práce byla podporována grantem 2B08070 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

OBSAH

1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1 Obecná charakterizace rodu <i>Clostridium</i>	8
2.1.1 Taxonomické zařazení	8
2.1.2 Výskyt	8
2.1.3 Fyziologické vlastnosti.....	9
2.1.4 Druhy významné v potravinářství	12
2.2 Metody identifikace	13
2.2.1.1 Polymerázová řetězová reakce	13
2.2.1.2 Molekulární typizace	14
2.2.2 Geny kódující hydrogenázy	17
2.3 Potřeba nových energetických zdrojů	17
3. Cíl práce	19
4. Experimentální část	20
4.1 Materiál.....	20
4.1.1 Bakteriální kmeny.....	20
4.1.2 Chemikálie	20
4.1.3 Komponenty pro PCR	21
4.1.4 Roztoky	22
4.1.5 Kultivační média.....	23
4.1.5.1 Médium CM0149.....	23
4.1.5.2 Médium CM0149 bez glukózy s přídavkem laktózy	23
4.1.5.3 Médium CM0149 bez glukózy s přídavkem syrovátky	23
4.1.6 Přístroje a pomůcky	24
4.2 Metody.....	25
4.2.1 Lyze buněk a izolace DNA	25
4.2.2 Stanovení koncentrace a ředění DNA	25
4.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	25
4.2.3.1 Primery	26
4.2.3.2 Amplifikační programy.....	27
4.2.4 Agarózová gelová elektroforéza	27
4.2.5 PCR s hrubým lyzátem buněk.....	28
4.2.6 Podmínky kultivace	28
4.2.6.1 Kultivace bakteriálních kmenů na tekutých médiích a pevných médiích	29
4.2.6.2 Vytvoření anaerobních podmínek.....	29
4.2.7 Stanovení růstových křivek kmene <i>Clostridium tyrobutyricum</i> S5.....	30
4.2.7.1 Kultivace	30
4.2.7.2 Pozorované parametry při jednotlivých odběrech.....	31
5. Výsledky	33
5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	33
5.2 Příprava DNA v množství vhodném do PCR směsi.....	36
5.3 PCR s univerzálními primery pro doménu <i>Bacteria</i>	37
5.4 PCR s primery specifickými pro rod <i>Clostridium</i>	37
5.5 Stanovení citlivosti PCR s primery specifickými pro rod <i>Clostridium</i>	41
5.6 PCR s primery specifickými pro druh <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	42
5.7 PCR s druhově specifickými primery pro druh <i>Clostridium butyricum</i>	43
5.8 Amplifikace genů kódujících hydrogenázu <i>hydA</i>	46

5.9	Optimalizace teploty hybridizace (GTG) ₅ primeru při genové typizaci pomocí interrepetitivní PCR (rep-PCR)	49
5.10	Optimalizace teploty hybridizace primerů Pr1 a Pr6 při genové typizaci pomocí náhodně amplifikované polymorfní DNA (RAPD).....	50
5.11	Genová typizace pomocí interrepetitivní PCR (rep-PCR).....	52
5.12	Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD)	54
5.13	Komplexní srovnání fingerprintových profilů testovaných kmenů	60
5.14	Stanovení vlastností kmene <i>Clostridium tyrobutyricum</i> S5 (18).....	64
5.14.1	Ověření čistoty bakteriální kultury	64
5.14.2	Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při různých teplotách.....	65
5.14.3	Kultivace v tekutém médiu CM0149 se syrovátkou při různých teplotách.....	67
5.14.4	Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při 37 °C v závislosti na počáteční hodnotě pH.....	70
5.14.5	Kultivace v tekutém médiu CM0149 se syrovátkou při 37 °C v závislosti na počáteční hodnotě pH.....	71
5.14.6	Kultivace v tekutém médiu CM0149 při 37 °C v závislosti na počáteční koncentraci laktózy	73
5.14.7	Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při optimální hodnotě pH a různých teplotách.....	74
6.	Diskuze.....	77
6.1	PCR s univerzálními primery pro doménu <i>Bacteria</i>	77
6.2	PCR s rodově specifickými primery <i>Clostridium</i>	77
6.3	Zařazení testovaných kmenů do druhu <i>C. tyrobutyricum</i> a <i>C. butyricum</i>	78
6.4	Amplifikace genů kódujících hydrogenázy	78
6.5	Genová typizace pomocí interrepetitivní PCR (rep-PCR).....	78
6.6	Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD)	79
6.7	Komplexní srovnání fingerprintových profilů testovaných kmenů	80
6.8	Celkové srovnání výsledků PCR s druhově specifickými primery a všech fingerprintových profilů testovaných kmenů	80
6.9	Stanovení vlastností kmene <i>Clostridium tyrobutyricum</i> S5 (18).....	80
6.10	Ověření čistoty bakteriální kultury	80
6.10.1	Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při různých teplotách.....	80
6.10.2	Kultivace v tekutém médiu CM0149 se syrovátkou při různých teplotách.....	81
6.10.3	Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při 37 °C při různých hodnotách pH	82
6.10.4	Kultivace v tekutém médiu CM0149 se syrovátkou při 37 °C při různých hodnotách pH	82
6.10.5	Kultivace v tekutém médiu CM0149 při 37 °C s různou koncentrací laktózy.....	82
6.10.6	Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při optimální hodnotě pH a různých teplotách	83
7.	Závěr.....	84
8.	Seznam použitých zdrojů.....	85
9.	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	89
10.	Přílohy	90

1. ÚVOD

Celý svět začíná pociťovat energetickou nouzi. Zdroje ropy a uhlí se vyčerpávají a pokrytí energetických potřeb je z 80 % zabezpečeno pouze z fosilních paliv. Je proto nutné hledat jiné technologie produkce energie. Je potřebné proto vyvinout takové postupy, kdy nebude zatěžováno životní prostředí při výrobě ani spotřebě energie. Jednou z možností výroby energie je fermentativní tvorba vodíku.

Vodík lze vyrábět pomocí foto-, elektro- nebo termochemických procesů [1]. Při spalování vodíku v kyslíkaté atmosféře nebo přeměně na elektrickou energii se uvolňuje pouze voda [2].

Velká pozornost je ve světě věnována rovněž biotechnologické produkci [3]. Ta probíhá za normálního tlaku a teploty a je méně energeticky náročná než předcházející procesy. Další výhodou fermentační technologie výroby vodíku je prakticky nevyčerpatelnost výchozích energetických zdrojů, kterými může být velké množství odpadních produktů pocházejících z různých výrob.

Biotechnologickou produkci vodíku lze rozdělit do následujících kategorií:

- fotosyntetická produkce zelenými řasami, sinicemi a fotosyntetickými bakteriemi (purpurové nesírné bakterie)
- produkce anaerobními fermentujícími bakteriemi, které využívají organických látek,
- hybridní systémy využívající fotosyntetické a fermentující bakterie.

Nevýhodou fotosyntetické produkce vodíku zelenými řasami je skutečnost, že vodík nemůže být produkován v nepřítomnosti světla. Kontinuální produkce vyžaduje použití solárního reaktoru nebo reaktoru s umělým osvětlením (tedy se spotřebou energie). Účinnost produkce vodíku je ve srovnání s fermentujícími bakteriemi nízká. Uvedené bakterie totiž produkují kyslík, který inaktivuje produkci vodíku. Fermentující bakterie mohou produkovat vodík nepřetržitě. Anaerobní produkce vodíku je převážně studována u různých druhů bakterií jako jsou *Clostridium* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* a u termofilních bakterií [2], [3], [4], [5].

Fermentační techniky výroby vodíku mají ale určitá omezení oproti jiným fermentačním technologiím. Vodík lze konvertovat na elektrickou energii pomocí palivových článků nebo přímo využívat jako palivo.

V posledních letech se výzkum v oblasti fermentativní produkce vodíku zaměřuje i na genetické modifikace mikroorganismů. Pro vytváření geneticky modifikovaných mikroorganismů za účelem produkce vodíku je ale nejprve nutné studium donorových a recipientních organismů – zejména jejich předchozí identifikace a genetická charakterizace [6].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecná charakterizace rodu *Clostridium*

Většina taxonomických studií rodu *Clostridium* se zaměřuje na charakterizaci klostridií, které způsobují onemocnění a problémy v gastrointestinálním traktu lidí a zvířat [7].

Neopomenutelný je ale fakt, že se zvyšujícím zájmem o přeměnu energie alternativních zdrojů jsou více studovány klostridie, u kterých byla zjištěna tvorba plynů s vysokým podílem vodíku.

Metody taxonomického zařazení se dříve opíraly o popis vnějších znaků, mikroskopování, utilizaci sacharidů a popis na základě rezistence vůči antibiotikům. V současné době se k identifikaci a charakterizaci mikroorganismů využívají molekulárně biologické metody, mj. i amplifikace úseku 16S rRNA. Analýza úseku 16S-23S rRNA pomocí polymerázové reakce (PCR) je přesnou, rychlou a reprodukovatelnou metodou identifikace jednotlivých druhů klostridií [8].

2.1.1 Taxonomické zařazení

Bakterie jsou stejně tak jako veškeré jiné organismy řazeny do taxonomických jednotek. Dříve se využívalo zejména morfologických údajů pro řazení do taxonů, v současné době se taxonomické studie zaměřují hlavně na sekvenční analýzu 16S rDNA a studium jiných konzervativních genů. Mezi vysoce konzervativní oblasti genomu prokaryot patří geny kódující 16S nebo 23S rDNA, RNA polymeráza, elongační faktor Tu, RecA protein a HSP60 protein [9].

Podle dostupných nejnovějších informací je rod *Clostridium* v taxonomické hierarchii bakterií klasifikován takto [10]:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Clostridia*

Řád: *Clostridiales*

Čeleď: *Clostridiaceae*

Rod: *Clostridium*

2.1.2 Výskyt

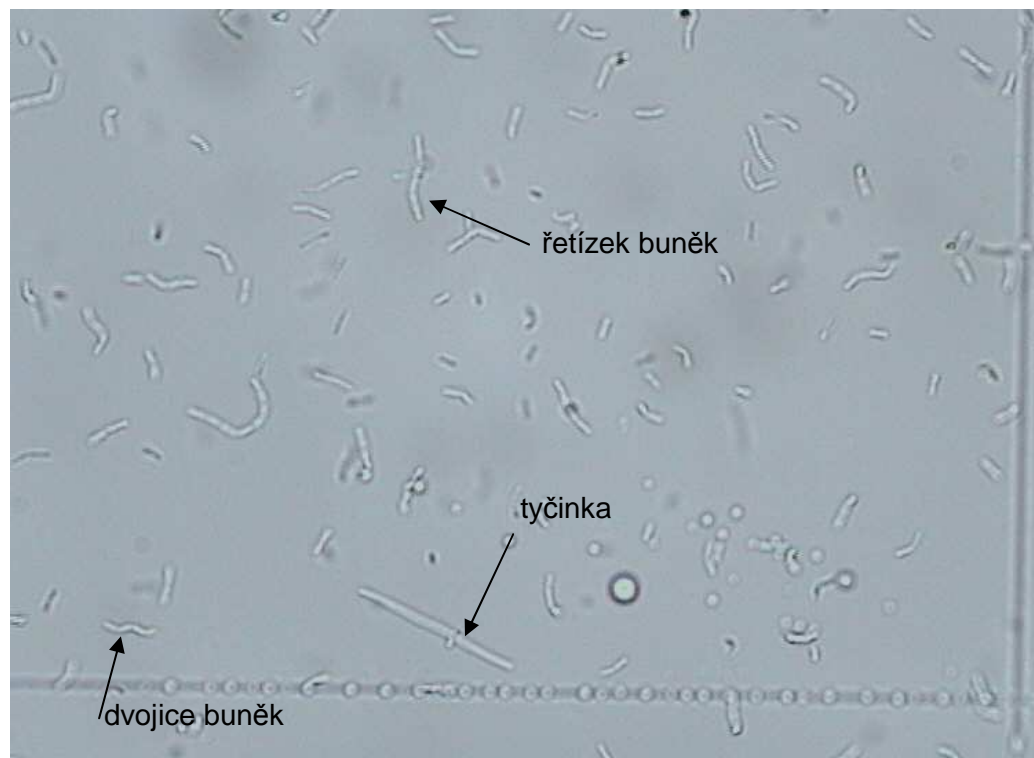
Rod *Clostridium* je tvořen více než 100 různými druhy [11], mezi něž patří jak patogenní, tak i nepatogenní druhy. Patogeny způsobují vážná onemocnění, např. druh *Clostridium botulinum* způsobuje botulismus a *C. perfringens* plynovou gangrénu. Některé nepatogenní druhy zapříčiňují pozdní duření sýrů. Nejčastěji izolovanými a identifikovanými kmeny ze zduřelých sýrů jsou *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* a *C. sporogenes* [12].

Klostridia se běžně vyskytují v půdě, stočném kalu, mořských sedimentech, rozkládajícím se rostlinném materiálu a ve střevním traktu lidí i zvířat [9]. Mohou kontaminovat siláž a později se mohou vyskytovat i syrovém mléce. Existují i klostridia osidlující termální prameny a vulkanické systémy, mezi něž patří např. kmen *Clostridium* AK₁₄ [5]. Některé kmeny *Clostridium butyricum* jsou dokonce používány i jako probiotika – inhibují růst širokého spektra enteropatogenů [13].

2.1.3 Fyziologické vlastnosti

Rod *Clostridium* zahrnuje zejména pleomorfní tyčinky s oblými konci, které jsou rovné nebo mírně zakřivené. Velikost buněk se pohybuje od 0,5 μm až do 30 μm . Nejčastěji jsou uspořádány po dvou a v krátkých řetízcích, ojediněle tvoří spirály anebo dlouhá vlákna (Obrázek 1).

Obrázek 1 Tvary buněk kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5



Grampozitivita buněk se projevuje hlavně ve velmi raném stádiu růstu. Některé druhy jsou gramlabilní. Klostridiální buňky mohou být pohyblivé a nejčastěji se u nich vyskytují peritrichální bičičky.

U klostridií byl prokázán fermentační způsob zpracovávání substrátu. Jednotlivé druhy klostridií se mezi sebou liší vztahem ke kyslíku [14]. Většina se řadí k obligátním anaerobům, avšak existují i aerotolerantní druhy. *Clostridium haemolyticum* vyžaduje pro svůj růst méně než 0,5 % kyslíku, avšak *Clostridium novyi* typu A je schopno v kulturační atmosféře tolerovat až 3 % kyslíku. Doba přežití při expozici kyslíku se mezi jednotlivými druhy různí. Existují druhy, které po pár minutách vystavení kyslíku hynou, ale jsou i druhy, které odolávají kyslíku ze vzduchu po mnoho hodin.

Důvodem senzitivity ke kyslíku je nedostatečná obrana vůči toxickým produktům aerobního metabolismu (zpracování superoxidiontu, hydroxylových radikálů, peroxidu vodíku) a reakce kyslíku s intermediátory anabolických drah. Sice klostridia jsou obvykle kataláza negativní, u některých druhů byla však prokázána přítomnost superoxididismutázy (zpracování superoxidiontu O_2^- na peroxid vodíku), tak i katalázy (rozpad peroxidu vodíku na vodu a kyslík).

Reakci kyslíku s meziproducty metabolismu zprostředkovává NADH za současné katalýzy NADH oxidázou. Postupně se NADH vyčerpá a zhroutí se tak celý metabolický systém, což má za následek smrt buněk. Anaerobní podmínky v bioreaktorech jsou většinou zajištěny dusíkatou atmosférou nebo směsí dusíku (85 %) a oxidu uhličitého (15 %). Klostridia nejsou

schopna růst v prostředí, kde je hodnota redoxního potenciálu větší než -150 mV. Je proto nutné do kultivačních médií přidávat malá množství thioglykolátu sodného, L-cysteinu, sulfidu nebo dithionátu sodného, které reagují s kyslíkem přítomným v médiu [9], [15], [16], [17].

Bakterie rodu *Clostridium* rostou v širokém teplotním rozmezí (10-69 °C). Optimální teplota pro kmeny klostridií izolovaných z islandských termálních pramenů je 50 °C. Teplotní optimum pro růst klostridií vyskytujících se v mírném pásmu je 30-37 °C.

Hodnota pH substrátu, ve kterém klostridia rostou, silně ovlivňuje charakter jejich metabolismu a rychlost růstu. Růst byl zaznamenán v matricích o hodnotách pH 4,0-10,0, avšak optimální pH pro růst je 6,5 [5]. Pro aktivaci hydrogenáz a pozdější tvorbu plynů s významným podílem vodíku je velmi důležitá počáteční hodnota pH média [18].

Většina druhů je chemoorganotrofních, některé jsou chemoautotrofní nebo chemolitotrofní. Pro autotrofy byla zaznamenána optimální hodnota pH média pro růst v rozmezí 8,1 až 8,5. Tento druhově velmi rozmanitý rod zahrnuje kmeny, které jsou schopny metabolizovat škrob, glykogen, celulózu, hemicelulózu, pektiny, nukleové kyseliny, bílkoviny, aminokyseliny, puriny a pyrimidiny [19].

Pro klostridia využívající sacharidy jako hlavní zdroj uhlíku a energie se optimální hodnota pH pro růst pohybuje kolem 7,0. Sacharidy jsou obvykle štěpeny fermentativně. Z cukru nebo peptonů je zpravidla produkována směs organických kyselin a alkoholů, např. kyselina octová, vyšší mastné kyseliny, ethanol, butanol a další [9]. Hodnoty pH média při acidogenním metabolismu klesají až k hodnotám kolem pH 4,0, kdy se jejich růst zastaví, popř. buňky sporulují. Ve spojení s purinolytickými klostridii, jejichž charakteristickým rysem je tvorba velkého množství amoniaku a nárůst hodnot pH média, kyseliny mohou být neutralizovány a je tak zajištěn růst a popř. tvorba vodíku po mnohem delší dobu. Kmeny *Clostridium bifermentans* a *Clostridium sporogenes* jsou tolerantní k silně alkalickému pH (11,7-12,2) při nízkých teplotách, kdežto nižší pH je lépe snášeno při vyšších teplotách. Tento jev souvisí s různou fluiditou bakteriální membrány – při nižší teplotě je fluidita membrány nízká, to způsobí změnu v permeabilitě pro ionty a proto pH je silně ovlivňováno teplotou [15].

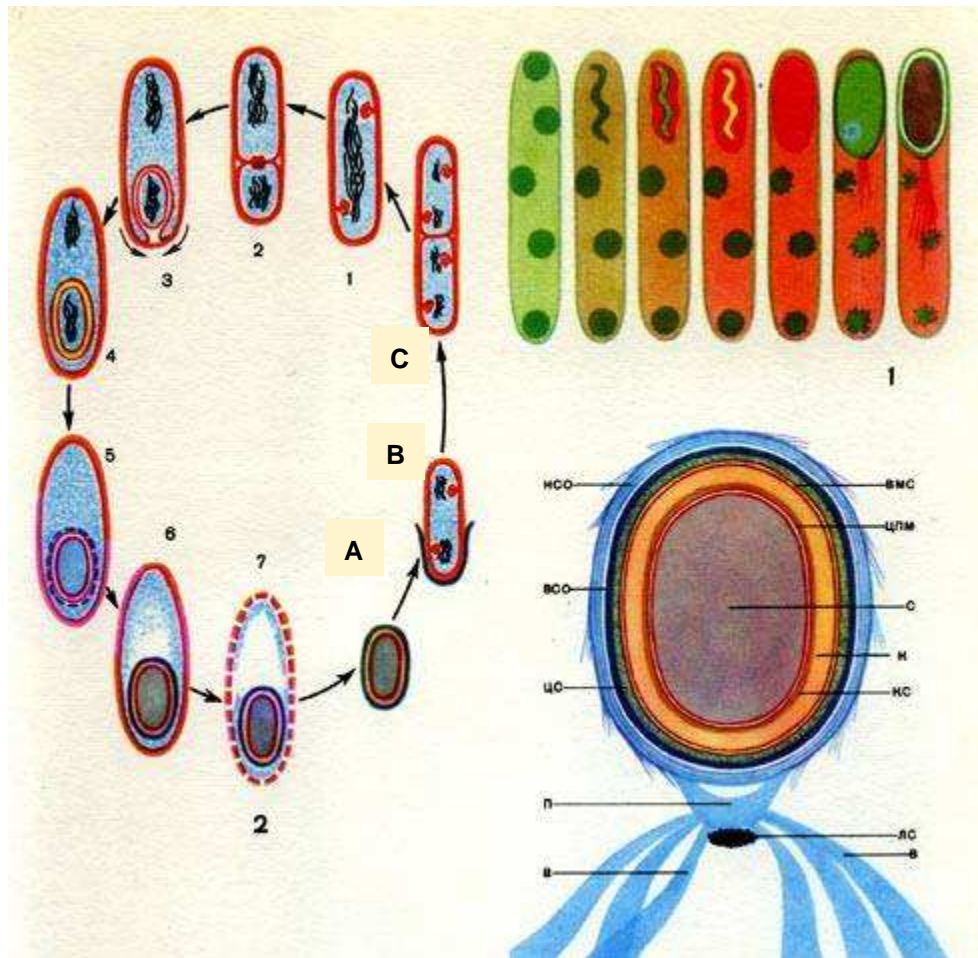
Mnoho druhů klostridií produkuje potencionální exotoxiny [14]. Klostridiální toxiny jsou biologicky aktivními proteiny s antigenní strukturou, proto mohou být vyvazovány specifickými protilátkami.

Klostridia vytvářejí aero-, alkohol- a termorezistentní endospóry. Ve vegetativní buňce vznikne vždy jen jedna spóra. V místě vytvoření spóry je většinou buňka zduřelá; později se rozpustí a zůstane volná spóra. Proces sporulace je řízen geny, jejichž exprese probíhá na základě impulsů z prostředí. Spustí se tak řetěz reakcí a změn, kdy doposud aktivní geny jsou postupně reprimovány a jiné geny jsou indukovány. Výsledkem je buňka (spóra) s tímž genomem, ale úplně jinou morfologií a fyziologií (má celkově jinou výbavu enzymů a biomolekul). Sporulace byla nejčastěji zaznamenána ke konci exponenciální fáze růstu. Obecně vzato spóry jsou aerotolerantní. Pro vyklíčení jsou nutné anaerobní podmínky a dostatek živin. Proces sporulace trvá asi 10 hodin. Sice se jedná o plynulý proces, je možné jej rozdělit na 7 částí. Proces sporulace je na Obrázku 2. Jednotlivými částmi jsou:

1. změna morfologie bakteriálního jádra – kulovitý útvar přechází na vláknitý
2. asymetrické dělení jádra a rozdělení buňky přepážkou z cytoplazmatické membrány na dvě nestejně velké části – budoucí spóru a původní vegetativní buňku, sporangium; v každé z částí je úplný genom
3. růst septa směrem k pólu buňky; menší část buňky putuje dovnitř mateřské buňky – výsledkem je předspóra; po vzniku předspóry je proces sporulace nevratný
4. tvorba kortexu mezi vnější a vnitřní membránou předspóry

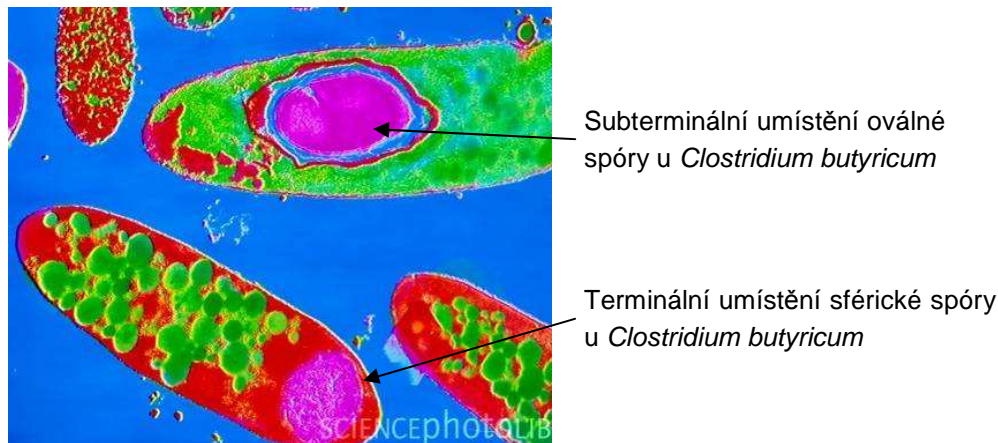
5. tvorba bílkovinné vrstvy nad vnější membránou, která později dohromady tvoří plášť spóry
 6. získávání konečných vlastností spóry – dochází k dehydrataci, buňka získává, odolnost vůči fyzikálním a chemickým zásahům
 7. lyze mateřské buňky a uvolnění spóry ze sporangia
- A samotná spóra
 B geminace spóry
 C přeměna spóry na vegetativní formu [20].

Obrázek 2 Schéma sporulace [21]



Sférické spóry jsou umístěny terminálně, u oválných endospór se jedná o subterminální umístění v buňce (Obrázek 3).

Obrázek 3 Terminální a subterminální umístění spór v buňkách *Clostridium butyricum* [22]



Subterminální umístění oválné spóry u *Clostridium butyricum*

Terminální umístění sférické spóry u *Clostridium butyricum*

Z genetického hlediska je rod *Clostridium* velmi rozmanitý. Důkazem toho může být vysoká heterogenita v rámci celého rodu v množství G+C vyskytujících se v genomu. Procentuální zastoupení G+C se pohybuje mezi 28 a 55 %. Do největší skupiny (Cluster 1) jsou zahrnuty klostridia s obsahem G+C kolem 28 %. Menší skupiny klostridií obsahují nejčastěji 35, 45 a 52 % G+C [15].

Na základě analýzy 16S rRNA genů byl tento rod rozdělen do několika podskupin. Skupina I je největší skupinou, která mj. zahrnuje všechna klostridia vyskytujících se ve zduřelých sýrech. Vyznačuje se vysokým stupněm podobnosti (více než 90 %) a právě na základě variací v sekvenci 16S rRNA je možné rozlišení jednotlivých klostridií v rámci skupiny I (Cluster I) mezi sebou [12].

U mnoha klostridií byla popsána přítomnost plazmidové DNA. Jejich přesná funkce nebyla ale dosud objasněna. Dříve byla přítomnost plazmidů spojována jen s patogenními druhy klostridií. Nyní byla prokázána jejich přítomnost i v nepatogenních druzích. Zodpovídají za rezistenci vůči antibiotikům, produkci bakteriocinů (cirkularin A, closticin) [24], toxinů (*C. tetani*) a mnoho dalších významných látek.

2.1.4 Druhy významné v potravinářství

Během dlouhé doby zrání sýrů se může projevit pozdní duření, které je způsobeno vývojem a růstem klostridiálních spór a později především aktivitou vegetativních buněk bakterií rodu *Clostridium*. Tyto bakterie přemění kyselinu mléčnou na kyselinu máselnou (způsobuje zápach žluklého másla), octovou, oxid uhličitý a vodík. Plyny způsobují nadouvání, v extrémních případech může dojít až k puknutí sýru.

Pozdní duření v sýrařství způsobuje velké ztráty a projevuje se zejména u sýrů s dlouhou dobou zrání (např. Beaufort, Emmental a Comte) [23].

Ke kontaminaci mléka spórami dochází hlavně během dojení. Dalšími zdroji znečištění je nedostatečná hygiena při ustájení a závadná siláž používaná jako krmivo. Kritické množství spór, kdy se může projevit pozdní duření, je 5-10 spór/l. Pro odstranění spór se provádí dvojitá baktofugace. Jedná se o proces odstředování při 15-20 000 ot/min. V první fázi se odstraní 90 % spór, druhou baktofugací se zajistí odstranění až 99,9 % spór. Odstředivkový kal (baktofugát) obsahuje kromě bakterií a jejich spór i bílkoviny, proto se sterilizuje a vrací zpět do mléka [25], [26]. Kombinace molekulárně biologických metod založených na DGGE a PCR se specifickými primery se osvědčila jako jedna z nejvýhodnějších pro detekci a identifikaci bakterií *Clostridium* sp. v sýrech poškozených pozdním duřením [27]. Existuje přímá souvislost mezi pozdním duřením a přítomností konkrétního druhu spór. Ve zrajících

sýrech se nejčastěji vyskytují spóry druhu *C. tyrobutyricum*. Na základě molekulárních metod byly tak v sýrech identifikovány i spóry druhů *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. pasteurianum*, *C. tetanomorphum*, *C. tertium* a *C. perfringens* [12].

2.2 Metody identifikace

Pro praktické využití bakterií je důležitá identifikace kmenů, tj. jejich zařazení do stávajících taxonů nebo vytvoření taxonů nových. Bakteriální druhy jsou charakterizovány pomocí polyfázního přístupu, který využívá různé genotypové a fenotypové vlastnosti.

Identifikace jednotlivých klostridiálních druhů je možná jak zkoumáním biochemických procesů, tak kultivačními technikami (zkvašování různých sacharidů, růst na různých typech média). Analýza fermentačních produktů plynovou nebo kapalinovou chromatografií dotváří celkový kultivační profil zkoumaného mikroorganismu. Jednou z nejčastěji používaných technik biologické identifikace je kultivace bakteriální kultury na miskách s pevným živným médiem. Zároveň se tak ověří, zda nejsou maskovány jiné bakterie v kultuře.

Konvenční postup při stanovení klostridií v potravinových matricích obsahovalo tyto kroky:

- termická inaktivace vegetativních buněk
- kultivace a stanovení KTJ
- sledování tvorby plynů při kultivaci za anaerobních podmínek v médiu s kyselinou mléčnou
- stanovení složení produktů fermentace

Jelikož je tento postup pro potravinářství příliš zdouhavý, upřednostňovány jsou molekulární metody stanovení.

2.2.1.1 Polymerázová řetězová reakce

Moderní bakteriální taxonomie využívá analýzy makromolekul, zejména DNA. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a postupy na ní založené jsou v biologických laboratořích nejvíce používanou molekulárně diagnostickou metodou založenou na replikaci nukleových kyselin *in vitro*. Při použití specifických primerů může být použita pro identifikaci různých organismů nebo je možné prokázat přítomnost specifických genů.

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymatická syntéza vybraného úseku *dsDNA* ve směru 5'→3'. Syntéza je katalyzována DNA dependentní DNA-polymerázou. PCR je reakcí sestávající ze tří částí. V závislosti na teplotě reakční směsi se pravidelně střídají kroky, během nichž probíhají odlišné děje.

Denaturace dvouřetězcových molekul DNA – reakční směs je zahřátá na 94-96 °C. Při této teplotě zanikají vodíkové můstky, které vlákna spojují a DNA denaturuje. Před prvním cyklem PCR je obvykle doba denaturace prodloužena o 5 minut. Zajistí se tak úplné oddělení jednotlivých řetězců, které pak slouží jako templát v dalším reakčním kroku. Během denaturace DNA se navíc aktivuje *Taq*-polymeráza.

Hybridizace primerů – po ochlazení reakční směsi na 45-60 °C je možná hybridizace primerů k odděleným řetězcům DNA (*ssDNA*). Primery se na základě Brownových pohybů neustále pohybují kolem DNA, iontové vazby pak mezi primery a DNA se neustále tvoří a zanikají. Na pevně připojený primer k DNA se pak připojuje polymeráza a začíná elongace.

Elongace – syntéza nových řetězců DNA je katalyzována DNA-polymerázou. Ta připojuje nukleotidy od 3' konce primeru po celé délce ssDNA tak, že jsou komplementární k templátu DNA. Syntéza je obvykle prováděna při 65-75 °C [28], [30], [31], [32].

Postupným opakováním výše zmíněných tří kroků se exponenciálně (2^n ; n = počet cyklů) syntetizuje až 10^9 kopií vybraného úseku DNA během jedné PCR. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a zpravidla se pohybuje v rozmezí od 20 do 40 cyklů. Reakce se provádí v termocykleru, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech.

Na základě amplifikace 16S rRNA genu (rDNA) s následnou restrikční analýzou (ARDRA amplified restriction rDNA analysis) je možná velmi přesná identifikace na úrovni rodu i druhu. Byla tak provedena přesná identifikace hub a bakterií, např. *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Mollicutes*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* a *Xanthomonas* [33].

Metoda nested-PCR s druhově specifickými primery je vysoce účinná pro začlenění bakteriálních kmenů do určitých druhů (v rámci rodu *Clostridium* např. *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. sporogenes* a *C. butyricum*), avšak je použitelná pouze pro identifikaci několika málo skupin mikroorganismů.

Pro analýzu mikrobiálních směsí se osvědčila denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), teplotní gradientová gelová elektroforéza a časová teplotní gradientová gelová elektroforéza (TTGE) [23].

Nyní se ale pozornost zaměřuje na amplifikační metody identifikace klostridií a vývoj rychlých testů. Ty trvají jen pár hodin a používají se zejména v klinické praxi pro rozlišení patogenních druhů klostridií. Jsou to např. Rapid ANAII, ATB 32 A, MicroScan a ANIdent. Správnost identifikace těmito testy se pohybuje na úrovni druhu mezi 60 a 90 % [33].

2.2.1.2 Molekulární typizace

K rozlišení jednotlivých bakteriálních druhů lze použít genotypové fingerprintové metody, které jsou založeny na PCR. Cílem je nalézt fingerprint charakteristický pro daný druh.

Jak prokaryotické tak eukaryotické genomy obsahují repetitivní sekvence, které oddělují jednotlivé kódující DNA sekvence. Takovéto sekvence se nacházejí jak v gramnegativních, tak i grampozitivních bakteriích různých rodů. Vedle dlouhých repetitivních elementů se v genomu prokaryot nacházejí i relativně krátké sekvence DNA [34], [35], [36]. Tyto elementy jsou nekódující a jsou přítomné v relativně velkém počtu v poměru k velkým repetitivním elementům, které obsahují kódující sekvence. Jedná se o úseky dlouhé 15 až 100 bp, které leží uvnitř kódující části (uvnitř genu), nebo mimo tuto oblast. Repetice používané pro stanovení DNA profilu daného organismu jsou známy taktéž pod pojmem VNTR (variable number tandem repeat), neboli tandemové repetice. Pomocí známých sekvencí VNTR lze testovat celou DNA a tak vytvořit její DNA profil. Pravděpodobnost, že dva vzorky DNA různých organismů budou totožné, se blíží poměru $1:1,5 \cdot 10^9$ [37].

Rep-PCR (polymerázová řetězová interrepetitivní reakce)

Rep-PCR je jednoduchou typizační metodou, při které se amplifikují sekvence oddělující v genomu různé typy repeticí. Jedná se o opakující se DNA sekvence v haploidním genomu. Jsou to např.

- opakující se extragenové palindromové Rep-elementy (35-40 bp)

- enterobakteriální opakující se intergenové shodné sekvence (ERIC-sekvence; 124-128 bp)
- mozaikové repetitivní BOX-elementy (154 bp)
- tandemově opakované polynuklotidové sekvence (GTG)_n popsané u enterobakterií (15 bp) [28]

PCR amplifikace repetitivních bakteriálních DNA elementů (rep-PCR) pomocí primeru (GTG)₅ umožnila rozlišení některých laktobacilů [38] a byla použita i při typizaci bifidobakterií [29].

Princip metody rep-PCR je podobný principu metody RAPD, avšak k zahájení amplifikace se využívá známé repetitivní sekvence, která se vyskytuje v genomu ve více kopiích. Touto opakující se sekvencí mohou být např. poly-trinukleotidy (GTG)_n, (TGG)_n, nebo poly-pentanukleotidy GCTGG [28], [38], [39]. Zmiňované repetitivní sekvence se označují zkráceně jako repeticie anebo jako IS elementy, transpozony, VNTR (variable number tandem repeat) nebo nepřepisované mezerníky [42].

Výsledkem amplifikace je více produktů různé velikosti a rozdílným molárním množstvím. Tvorba amplikonů vychází z nestejně lokalizace opakujících se elementů a z různé vzdálenosti, která je odděluje v genech. Tak je získán jedinečný fingerprint charakteristický pro každý kmen. Primery mají být navrženy tak, aby se připojily ke koncovým konzervativním oblastem repeticí a 3'-konce primeru směřovaly ven z repetitivního úseku (aby se tak neamplifikovala samotná repeticie). K amplifikaci může dojít pouze v případě, že 3'-konce se nacházejí v genomu v obrácené orientaci a v amplifikovatelné vzdálenosti [28].

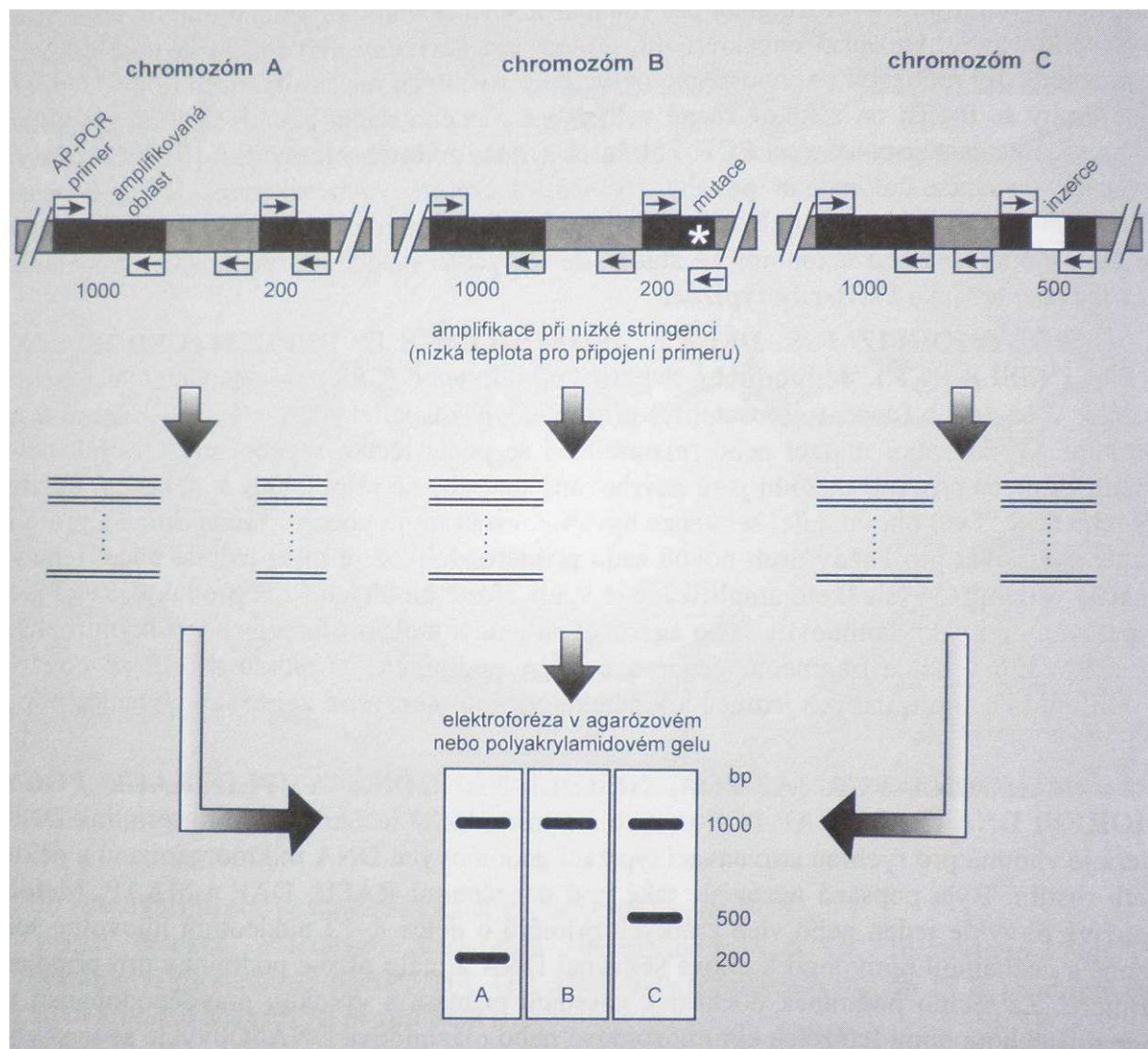
Mezi hlavní přednosti rep-PCR patří vysoká rozlišovací schopnost (na úrovni druhu, popř. kmene), dobrá reprodukovatelnost a jednoduchost provedení. Dalšími benefity metody jsou časová nenáročnost a rychlost a nízké náklady na realizaci metody.

Velkou nevýhodou rep-PCR je nízký stupeň reprodukovatelnosti mezi různými laboratořemi. Výsledky jsou ovlivňovány i technikou izolace DNA, typem použitého termocykleru aj. [39]

Náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD)

Další typizační metodou je RAPD-PCR (náhodná polymerázová řetězová reakce), která se používá k detekci polymorfizmů DNA. Je to typ PCR, při které segmenty DNA jsou amplifikovány v náhodných, předem nedefinovaných místech, ve kterých hybridizuje primer o náhodné sekvenci. Obvykle se používá jeden nebo více krátkých primerů o délce 8-12 nukleotidů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA. K připojení primeru jsou vytvářeny málo přísné podmínky. Za těchto podmínek primery s vysokou pravděpodobností nasednou na více místech obou řetězců chromozomové nebo plazmidové DNA. Na tyto místa dochází k nasedání primeru na protilehlých řetězcích 3'-konci směřujícími k sobě. Po amplifikaci je detegováno mnoho PCR produktů s různou délkou a rozdílným molárním množstvím [28].

Obrázek 4 Schématické znázornění metody RAPD [28]



Mezi přednosti této metody patří její jednoduchost, rychlost a malé množství DNA potřebné k analýze (asi 25 ng). Pro provedení RAPD není potřeba žádná předchozí molekulární znalost o zkoumaném taxonu. Amplifikované fragmenty jsou náhodně rozmístěny po celém genomu – zobrazují variabilitu jednotlivých kmenů v rámci celého genomu [40]. Rozlišování vzorků dobře koreluje s jinými genotypizačními technikami.

Nevýhodou u RAPD je citlivost PCR reakce k mnoha parametrům. Problémem je reprodukovatelnost a porovnatelnost výsledků – prakticky není možné srovnání mezi nezávislými studiemi. Další nevýhodou je nespecifičnost primerů ke konkrétnímu lokusu a pozdější nereprodukovatelnost [38]. Jedním z úskalí této metody je i skutečnost, že použitelnost oligonukleotidových primerů může být zhodnocena pouze empiricky a informace o sekvenci templátové DNA není známá [28].

V praxi je RAPD jednou z identifikačních metod využívaných při taxonomických studiích a může být kombinována s analýzou DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza) a SSCP. Novější technikou je RAPD s využitím M13 sekvence jako primeru. Tato metoda byla použita k identifikaci 7 druhů rodu *Lactobacillus*, dále druhů *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* a některých druhů rodu *Enterococcus* [41].

2.2.2 Geny kódující hydrogenázy

Hlavní roli při produkci vodíku u fermentujících bakterií hrají enzymy – hydrogenázy. Dosud byly identifikovány tři třídy hydrogenáz: [Fe]-hydrogenázy, [NiFe]-hydrogenázy a [NiFeSe]-hydrogenázy, přičemž pouze [Fe]-hydrogenázy účinně katalyzují tvorbu vodíku [43]. U druhu *Clostridium butyricum* byl zjištěn gen kódující hydrogenázu *hydA* [44], [43].

Důležitým krokem pro zajištění vysoké efektivity fermentativní produkce vodíku je podrobná charakterizace a identifikace (vybraných) mikroorganismů. Kultivační techniky identifikace hlavních bakteriálních producentů vodíku jsou v tomto případě příliš časově náročné a odlišení koexistujících bakterií v kultuře je obtížné. Ověřily se zde kombinované metody založené na analýze 16S rRNA spojené s DGGE [45], průtokovou cytometrií [46], imunofluorescencí [47], [48], [49], [50], a stanovením chininových profilů [51].

Mnoho mikroorganismů zodpovědných za uvolňování vodíku při fermentačních procesech syntetizuje [Fe]-hydrogenázy se skupinou Fe-S a dvěma atomy železa v aktivním centru enzymu.

Při vsádkových kultivacích za účelem produkce vodíku je v acidogenní fázi na úrovni mRNA hladina celulárních [Fe]-hydrogenáz vysoká. Přejdem do solventogenní fáze dochází k poklesu této hladiny. Toto kolísání vždy souvisí s množstvím hydrogenáz ve formě proteinů v buňce a indikuje tak expresi aktivity hydrogenáz na úrovni transkripce [52], [53]. Klostridiální mRNA pro hydrogenázy je proto považována za klíčový kontrolní bod při sledování a identifikaci hlavních klostridiálních druhů, které se účastní tvorby vodíku ve fermentačním systému. Používanou metodou stanovení je tandemová technika fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) spojená s průtokovou cytometrií.

2.3 Potřeba nových energetických zdrojů

Obecně je známo, že roste potřeba nahrazovat energii získávanou z fosilních paliv energií z obnovitelných zdrojů. Fosilní paliva nepatří totiž mezi obnovitelné zdroje energie a za pár desítek let dojde k jejich úplnému vyčerpání. Mimoto během jejich spalování dochází k vývinu velkého množství různých polutantů a CO₂, které ve velké míře přispívají ke globálnímu oteplování [18].

Mezi biotechnologické metody patří fermentativní výroba vodíku. Pro tyto účely mohou být zpracovány i odpadní produkty – z potravinářského průmyslu obsahující velké množství sacharidů. Mezi ně patří i syrovátka, která obsahuje v průměru 4,5 % laktózy, 0,3 % bílkovin a 0,9 % minerálních látek.

V současné době je v České republice produkováno přibližně 2,9·10⁹ litrů mléka/rok. Jedna třetina produkce je spotřebována na výrobu sýrů, takže lze předpokládat, že vzniká asi 1·10⁹ litrů syrovátky/rok a 2·10⁹ litrů odpadních vod/rok. I když v současné době je sušená nebo zahuštěná tekutá syrovátka (především sladká, neprokysaná mléčnými bakteriemi) žádanou komoditou, je tímto způsobem využívána přibližně třetina v České republice produkové syrovátky. Lze odhadovat, že dvě třetiny produkové syrovátky jsou s nulovou cenou prodávány ke krmným účelům nebo jsou nežádoucím únikem do životního prostředí. Při změně ekonomických podmínek (zdražení energetických vstupů a dopravy) se může stát odpadem s vysokými energetickými nároky na zpracování. Z tohoto hlediska je proto vhodné se zabývat alternativními způsoby zpracování syrovátky a mlékárenských odpadních vod [54], [55].

Mezi termoanaerobní producenty vodíku a ethanolu patří termofilní klostridia a dále některých druhů rodů *Thermotoga*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* a

Caldicellulosiruptor. Zájem o tyto mikroorganismy roste hlavně z důvodu jejich schopnosti využít široké spektrum sacharidických zdrojů. Analýzou 16S rDNA vzorků pocházejících z termálních pramenů (50-60 °C) na Islandu se ukázalo, že polovina testovaných obsahovala méně než 55 mol% G+C a bylo zařazeno do rodů *Clostridium*, *Caloramator* a *Paenibacillus* [56]. Fermentační technologie jsou perspektivní metodou produkce vodíku. Největšími přednostmi je to, že mohou být prováděny za běžné teploty a tlaku.

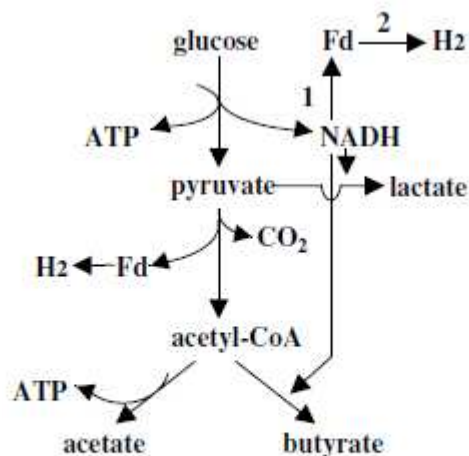
Geneticky modifikovaná *Escherichia coli* $\Delta hycA \Delta lacI$

Pro genetické manipulace se využívá zejména *E. coli*, protože jsou známy veškeré její metabolické pochody a navíc je znám její kompletní genom. Pro fermentativní produkci vodíku s využitím syrovátky byl vytvořen konstrukt *E. coli* $\Delta hycA \Delta lacI$. Vodík je běžně produkován *E. coli* z formiátu. Potřebné enzymy jsou kódovány ve formátovém regulonu [2].

Anaerobní bakterie obvykle produkují vodík během katabolismu sacharidů. [Fe]-hydrogenázy bakterií rodu *Clostridium* a *Desulfovibrio* (EC 1.12.7.2) jsou zodpovědné za uvolňování vodíku z redukované formy ferredoxinu [57], [58], [59], [60].

Níže je zobrazen biologický proces tvorby vodíku fermentační cestou (Obrázek 5).

Obrázek 5 Biologický proces tvorby vodíku fermentační cestou [61]



3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla identifikace a charakterizace vybraných kmenů bakterií rodu *Clostridium* izolovaných z mléka a sýrů pomocí amplifikačních metod. Příbuznost mezi jednotlivými kmeny byla stanovena molekulárně typizačními metodami.

Dalším cílem bylo studium podmínek kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny

Analyzované kmeny klostridií byly získány ze společností MILCOM Praha (pracoviště Tábor). Jedná se o bakteriální kmeny izolované z mléka a sýrů. Jako kontrola byly použity kmeny *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T, *Clostridium butyricum* DSM 10702^T (DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), a *Clostridium sporogenes* CCM 4423 z České sbírky mikroorganismů (CCM – Czech Collection of Microorganisms, Brno). Označení jednotlivých bakteriálních kmenů používaných v této práci je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1 Seznam všech používaných bakteriálních kmenů

Číslo	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Číslo	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)
1	9833 P	23	112
2	9867 P	24	580
3	9823 P	25	581
4	9874 II	26	MM - D
5	9865	27	89K25B
6	9843	28	1030
7	9837	29	12-15-1A
8	9860 (03B3)	30	31-44-Rk-2A
9	9875 (03B2)	31	31-75-4A
10	9829	32	V51-RCM-3B
11	31 P	33	V51-RCM-3C
12	S18/1	34	V62-45-3A
13	S18/2	35	V62-45-3B
14	S23	36	V67-R3A
15	S21	37	V69-120-R2A
16	S29	38	<i>C. butyricum</i> DSM 10702 ^T
17	S27	39	<i>C. beijerinckii</i> KVL M3
18	S5	40	<i>C. tyrobutyricum</i> SMR 184
19	E16A	41	<i>C. tyrobutyricum</i> SMR 220
20	R26A	42	<i>C. tyrobutyricum</i> UTMT 2-1
21	L2	43	<i>C. tyrobutyricum</i> UTMT 3-1
22	L3	44	<i>C. sporogenes</i> CCM 4423

4.1.2 Chemikálie

Agaróza pro elektroforézu (Top-Bio, Praha, Česká republika)

Anaerogen (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie)

Bakteriologický pepton (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie)

DNA standard 100 bp (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200, 1 500 bp)
(Malamité, Moravské Prusy, Česká republika)

DNA standard – plazmid λ linearizovaný restriktázou *HindIII* (125, 564, 2 027, 2 322, 4 361, 6 557, 9 416, 23 130 bp) (New England Biolabs, Ipswich, Velká Británie)
Dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Ethanol 96 % p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)
Ethidiumbromid (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Fenol (Lachema, Brno, Česká republika)
Glukóza p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)
Hydroxid sodný (Lachema, Brno, Česká republika)
Chloroform p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)
Isoamylalkohol p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)
Kvasničný extrakt (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie)
Kyselina ethyldiaminotetraoctová – EDTA (Serva, Heidelberg, Německo)
Kyselina chlorovodíková (Merck, Darmstadt, Německo)
Lab-Lemco prášek (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie)
Laktóza p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)
L-cystein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Octan sodný (Lachema, Brno, Česká republika)
Parafínový olej (Fagron, Olomouc, Česká republika)
Proteináza K 100 μ g/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Reinforced Clostridial Medium CM0149 (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie)
Sušená syrovátka ACTIVE (Bohemilk, Opočno, Česká republika)
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-base) (Amresco, Solon, USA)
Běžně dostupné chemikálie v kvalitě p.a.

4.1.3 Komponenty pro PCR

Voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská L'upča, Slovenská republika) - dále označovaná jako voda pro PCR
Pufr pro PCR kompletní – reakční pufr 10x PCR Blue Buffer pro *Taq*-DNA polymerázu 1.1 (Top-Bio, Praha, Česká republika)
Pufr pro PCR bez $MgCl_2$ (Top-Bio, Praha, Česká republika)
 $MgCl_2$ (25 mM) (Top-Bio, Praha, Česká republika)
Dimethylsulfoxid (DMSO) pro PCR (Top-Bio, Praha, Česká republika)
Směs dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, Česká republika)
Oligonukleotidové primery byly syntetizovány firmou (Generi-Biotech, Hradec Králové, Česká republika)
 primer (GTG)₅ pro fingerprinty [38]
 pro doménu *Bacteria* – F_eub, R_eub [62]
 pro druh *C. butyricum* – CBISF, CBISR [65]
 pro druh *C. tyrobutyricum* – Ct1F, Ct1R [66]
 pro rod *Clostridium* – F1, F2 [63]
 pro *hydA* gen – *hydA* [70]
 RAPD – Pr1, Pr6 [65]
Taq-DNA polymeráza 1.1 (1U/ μ l) (Top-Bio, Praha, Česká republika)
PCR vkladací pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, Česká republika)

4.1.4 Roztoky

Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA

- 1 M Tris-HCl (pH 7,8)

121,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 8,0 pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1 litr a poté byl sterilizován 20 minut při 121 °C.

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Bylo upraveno pH na 8,0 přidáním asi 20 g hydroxidu sodného. Roztok byl rozpouštěn na magnetické míchačce. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1 litr a poté byl sterilizován 20 minut při 121 °C.

- Roztok pro lyzi bakteriálních buněk (lyzační roztok A); (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0)

Bylo smícháno 10 ml 0,1 M Tris-HCl, 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Roztok byl doplněn sterilní vodou do 100 ml.

- Lyzační roztok s lysozymem (lyzační roztok B)

K lyzačnímu roztoku A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3,0 mg/ml.

- Proteináza K (10 mg/ml)

Navážka 10 mg proteinázy K byla rozpuštěna v 1 ml sterilní destilované vody. Roztok byl uchováván při -20 °C. Před použitím byl roztok zředěn na konečnou koncentraci 100 µg/ml.

- Roztok dodecylsulfátu sodného (20%)

20 g dodecylsulfátu sodného (SDS) byl rozpuštěn v 80 ml destilované vody při současném zahřívání na 68 °C. Hodnota pH byla upravena na 7,0 koncentrovanou HCl. Roztok byl doplněn destilovanou na objem 100 ml.

- Směs chloroform-isoamylalkohol

Chloroform a isoamylalkohol byl smíchán v poměru 24:1.

- Fenol (pH 7,8)

Destilovaný fenol byl nasycen v TE pufru a hodnota pH byla upravena pomocí hydrogenuhličitanu sodného na 7,8.

- Roztok octanu sodného (3M)

Navážka 40,81 g $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ byla rozpuštěna v 80 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena pomocí ledové kyseliny octové na 5,2. Roztok byl doplněn na výsledný objem 100 ml a poté byl sterilován 20 minut při 121 °C.

- TE pufr

1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) byl smíchán s 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněn sterilní destilovanou vodou na objem 100 ml.

Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- TBE pufr (5× koncentrovaný)

54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Dále bylo ke směsi přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Hodnota pH byla upravena pomocí 1 M NaOH na 8,0. Před použitím byl TBE pufr 10× zředěn destilovanou vodou.

- Nanášecí pufr (6× koncentrovaný)

4 mg bromfenolové modři a 250 mg Ficollu 400 bylo rozpuštěno v 10 ml sterilní destilované vody.

4.1.5 Kultivační média

4.1.5.1 Médium CM0149

Tekuté médium pro bakteriální kmeny rodu *Clostridium* bylo připraveno tak, že k 38 g média v prášku CM0149 byl přidán 1 l destilované vody. Hodnota pH média byla 6,6. Poté byl roztok sterilizován při 121 °C po dobu 15 minut. Pro přípravu pevného média pro bakteriální kmeny rodu *Clostridium* bylo postupováno stejně jako v případě přípravy tekutého média s tím rozdílem, že k roztoku bylo navíc přidáno 15 g agaru. V obou médiích byla koncentrace glukózy 0,5 % hm.

4.1.5.2 Médium CM0149 bez glukózy s přidavkem laktózy

Podle složení uváděného na komerčně dostupném médiu CM0149 bylo připraveno toto médium bez glukózy. Ta byla nahrazena adekvátním množstvím sterilního roztoku 5% laktózy, popř. odpovídajícím množstvím syrovátky. Požadované množství laktózy ve výsledném živném médiu bylo 0,5 % (hm). Všechny složky byly postupně naváženy v množství uvedeném v Tabulce 2.

Tabulka 2 Komponenty média CM0149 deklarované na obalu

Složka	Množství (g)
kvasničný extrakt	3,0
Lab-Lemco prášek	10,0
bakteriologický pepton	10,0
chlorid sodný	5,0
octan sodný	3,0

K naváženým komponentům bylo přidáno 890 ml destilované vody a po rozpuštění byl roztok sterilizován při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci bylo k médiu přidáno 10 ml cysteinhydrochloridu (50 g/l) sterilizovaného filtrací a 100 ml 5% roztoku laktózy sterilizovaného při 110 °C po dobu 30 minut. Po čáteční pH média byla upravena na pH 5,6. Toto pH je blízké reálnému vzorku sladké syrovátky, které se pohybuje mezi pH 5,5 a 6,0.

4.1.5.3 Médium CM0149 bez glukózy s přidavkem syrovátky

Pro přípravu tekutého média CM0149 se syrovátkou bylo postupováno stejně jako v případě přípravy média CM0149 s laktózou (kapitola 4.1.5.2). Jediný rozdíl byl v tom, že roztok

laktózy byl nahrazen sterilním roztokem syrovátky s výsledným obsahem laktózy 5 % (hm). Množství sacharidů uváděných na obalu sušené syrovátky bylo považováno za množství laktózy obsažené v syrovátce. Průměrné složení syrovátky uváděné na obalu je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3 Průměrné složení použité syrovátky ve 100 g

Složka	Obsah (g)
bílkoviny	11
sacharidy	68
tuky	1

Roztok syrovátky s obsahem laktózy 5 % (hm) byl připraven tak, že k 7,4 g syrovátky bylo přidáno 92,6 ml destilované vody. Sterilizace byla prováděna 20 minut při 110 °C.

4.1.6 Přístroje a pomůcky

Anaerostat OXOID (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie)
 BioNumerics (verze 2.0) (Applied Maths, Kortrijk, Belgie)
 Cell Density Meter CO8000 (WPA Biowave, Cambridge, Velká Británie)
 Centrifuga EBA 20 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Německo)
 Centrifuga mini Spin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
 Horkovzdušná sušárna MORA 524 euoline (Mora, Praha, Česká republika)
 Hybridizační pec Micro Hybridization Incubator 2000 (Sci Gene, Sunnyvale, USA)
 Laboratorní váhy OHAUS CS 200, 200g×0,1g (Ohaus, New Jersey, USA)
 Laboratorní váhy OHAUS Pioneer™, 110g×0,0001g (Ohaus, New Jersey, USA)
 Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
 Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Sencor, Praha, Česká republika)
 NanoPhotometer™ (Implen, München, Německo)
 pH metr MPH 372 (Monokrystaly, Turnov, Česká republika)
 pH papírky (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
 Termocykler DNA Engine, Peltier Thermal Cyclers-200 (Bio-Rad Lab., Philadelphia, USA)
 Termostat – Mini Incubator (Labnet International, Woodbridge, USA)
 Termostat FTC 901 (Vel Scientifica, Miláno, Itálie)
 Transiluminator TVR-312A (Spectroline, Albany, USA)
 Vortex lab dancer vario (Laneko, Dublin, Irsko)
 Vývěva KNF Neuberger Mini Laboport Diaphragm Pump (KNF Neuberger, New Jersey, USA)
 Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, B1 (Owl Scientific, Rochester, USA)
 Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit (Hoefer, Holliston, USA)
 Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
 Běžné laboratorní sklo, pomůcky a vybavení

4.2 Metody

4.2.1 Lyze buněk a izolace DNA

Pokud není uvedeno jinak byly postupy převzaty z návodů k Praktiku z molekulární biotechnologie [68].

Z dobře narostlé kultury byl odpipetován 1,5 ml suspenze buněk a stočen na centrifuze při 15 000 ot/min po dobu 3 minut. Po slití supernatantu byl sediment bakteriálních buněk resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku A (10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl). Nejdříve bylo přidáno 100 μ l roztoku, směs byla pečlivě promíchána. Poté bylo přidáno zbývajících 900 μ l roztoku a suspenze byla opět pečlivě promíchána. Suspenze byla centrifugována 3 minuty při 15 000 ot/min K sedimentu bylo přidáno 500 μ l roztoku B tak, že nejdříve bylo přidáno 100 μ l roztoku a směs byla pečlivě promíchána. Poté bylo přidáno zbývajících 400 μ l roztoku a suspenze byla opět pečlivě promíchána. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě 1 hodinu. Následně k suspenzi bylo přidáno 12,5 μ l 20% SDS roztoku a 5 μ l proteinázy K (10 μ g/ml). Vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne (asi 18 hodin).

K hrubému lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaného, pH upraveno na 7,8). Vzorky byly 4 minuty opatrně promíchávány kývavým pohybem. Po centrifugaci při 15 000 ot/min po dobu 3 minut byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté zkumavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml. Poté bylo opět přidáno 500 μ l fenolu a vzorky byly kývavým pohybem promíchávány 4 minuty. Po centrifugaci při 15 000 ot/min, která trvala 3 minuty, byla vodní fáze odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky o objemu 1,5 ml. Poté bylo přidáno 700 μ l směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1). Po 4 minutách promíchávání kývavým pohybem byly vzorky centrifugovány (15 000 ot/min, 3 minuty) a vodní fáze s DNA opět odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky o objemu 1,5 ml.

K vodní fázi obsahující DNA byla přidána 1/10 celkového objemu 3 M octanu sodného (asi 30 μ l). Po důkladném promíchání byl přidán 1 ml 96% ethanolu. DNA byla srážena při -20 °C po dobu 15 min a následně centrifugována při 15 000 ot/min taktéž 15 minut. Supernatant byl slit a DNA byla usušena v exsikátoru za průběžného odsávání vzduchu. Poté byla DNA rozpuštěna v 200 μ l TE pufru.

4.2.2 Stanovení koncentrace a ředění DNA

Koncentrace DNA byla měřena spektrofotometricky na přístroji NanoPhotometer. Jako referenční vzorek byl použit TE pufr. Absorbance byla měřena v rozmezí vlnových délek 230-320 nm. Koncentrace DNA byla stanovena z hodnoty absorbance při 260 nm ($A_{260\text{nm}}$). Z poměru hodnot absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla stanovena čistota DNA. Po stanovení koncentrace byly vzorky DNA ředěny TE pufrům na výslednou koncentraci 10 ng/ μ l. DNA této koncentrace je běžně používána do PCR směsí.

4.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Komponenty pro PCR byly po rozmrazení krátce stočeny na centrifuze. Směs pro PCR byla míchána v boxu vyzářeném UV lampou ve stanovených poměrech podle specifity primerů a programu amplifikace PCR.

Vždy bylo postupováno tak, že připravený mastermix byl po důkladném promíchání rozpipetován do zkumavek typu Eppendorf o objemu 200 μ l. Poté k němu bylo přidáno potřebné množství DNA matrice. Složení směsí pro PCR udává Tabulka 4.

Tabulka 4 Složení směsí pro PCR

Složka	Metoda identifikace/objem (μl)							
	Uni	Clost. A	Clost. B	C. tyr.	C. but.	hydA	(GTG) ₅	RAPD
Voda pro PCR	18,0	19,0	12,5	18,0	19,0	17,5	8,0	12,0
Pufr pro PCR kompletní	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0	0
Pufr pro PCR bez MgCl ₂	0	0	0	0	0	0	2,5	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	0	0	0	1,0	0	0	5,0	5,0
DMSO pro PCR	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5
dNTP (10 mM)	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0
5' primer (10 pmol/μl)	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	2,0	2,0
3' primer (10 pmol/μl)	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0	0
DNA polymeráza 1.1 (1 U/μl)	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Matrice DNA (10 ng/μl)	1,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0	5,0	1,0

Uni doména *Bacteria*

Clost. A rod *Clostridium*

Clost. B rod *Clostridium*

C. tyr. druh *C. tyrobutyricum*

C. but. druh *C. butyricum*

(GTG)₅ genová typizace s primerem (GTG)₅

hydA gen pro hydrogenázu *hydA*

RAPD RAPD s primery Pr1 a Pr6

4.2.3.1 Primery

Používané primery pro molekulární charakterizaci kmenů *Clostridium* sp. jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5 Použité primery pro zařazení kmenů *Clostridium* sp., jejich typizaci a pro geny kódující hydrogenázu

Specifická	Označení	Sekvence 5'→3'	Teplota hybridizace (°C)	Velikost amplikonu (bp)	Reference
Doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	55	466	[62]
	R_eub	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT			
Rod <i>Clostridium</i>	F1	CTCAACTTGGGTGCTGCATTT	53	619	[63]
	F2	ATTGTAGTACGTGTGTAGCCC			
Druh <i>C. tyrobutyricum</i>	Ct1F	AACTGAAACAGCATGACT	60	233	[66]
	Ct1R	TGTAGATAAAGGTCAAGC			
Druh <i>C. butyricum</i>	CBISF	CCTCCTTTCTATGGAGAAATCTAGCA	55	262	[65]
	CBISR	TGTAGCTTGACCTTTTTAAGTTTTGA			
hydrogenáza <i>hydA</i>	HGf	AAGAAGCTTTAGAAGATCCTAA	58	259	[67]
	HGr	GGACAACATGAGGTAAACATTG			
rep-PCR f	(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	46	420 - 2 500	[38]
16S-23S rDNA ISR	Pr1	GGTGCGGGAA	36	500 - 1 460	[65]
16S-23S rDNA ISR	Pr6	CCCGTCAGCA		230 - 1 550	

4.2.3.2 Amplifikační programy

Používané programy amplifikace pro identifikaci a charakterizaci kmenů *Clostridium* sp. jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6 Amplifikační programy pro identifikaci a charakterizaci kmenů *Clostridium* sp.

Krok	Uni	Clost.	C. tyr 2	C. but 2	hydA
1.	95 °C/5 min	94 °C/5 min	95 °C/5 min	95 °C/5 min	95 °C/7 min
2.	95 °C/30 s	94 °C/30 s	95 °C/30 s	95 °C/30 s	95 °C/30 s
3.	55 °C/30 s	53 °C/30 s	60 °C/30 s	55 °C/30 s	58 °C/30 s
4.	72 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/30 s	72 °C/30 s	72 °C/30 s
5.	30	30	30	30	40
6.	72 °C/10 min	72 °C/8 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min

Pokračování Tabulky 6 Amplifikační programy pro identifikaci a charakterizaci kmenů *Clostridium* sp.

Krok	(GTG) ₅ GRAD	(GTG) ₅	RAPD GRAD	RAPD
1.	94 °C/5 min	94 °C/5 min	95 °C/5 min	95 °C/5 min
2.	94 °C/1 min	94 °C/1 min	95 °C/1 min	95 °C/1 min
3.	45-60 °C/1 min	46,3 °C/1 min	33-39 °C/1 min	36 °C/1 min
4.	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min
5.	35	35	45	45
6.	72 °C/10 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min	72 °C/10 min

Uni doména *Bacteria*

Clost..... rod *Clostridium*

C. tyr. 2 druh *C. tyrobutyricum* [64]

C. but. 2 druh *C. butyricum* [64]

hydA..... gen pro hydrogenázu *hydA*

(GTG)₅ GRAD..... rep-PCR s primerem (GTG)₅, teplotní gradient

(GTG)₅ rep-PCR s primerem (GTG)₅

RAPD GRAD amplifikace úseku 16S-23S rDNA ISR s primerem Pr1 a Pr6, teplotní gradient

RAPD..... amplifikace úseku 16S-23S rDNA ISR s primerem Pr1 a Pr6

Krok 5. počet cyklů PCR

4.2.4 Agarózová gelová elektroforéza

Pro agarózovou gelovou elektroforézu izolované DNA (kontrola intaktnosti) byl použit 0,8% gel, který byl připraven rozvařením 0,8 g agarózy ve 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Při nanášení DNA na gel byl použit 6x koncentrovaný nanášecí pufr.

Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů byla provedena na 1,8% gelu, který byl připraven rozvařením 1,8 g agarózy ve 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Při nanášení produktů PCR na gel byl použit 6x koncentrovaný vkladací pufr. Jako DNA standardu pro amplicony běžných PCR bylo použito 5 µl DNA standardu. Elektroforéza byla prováděna 2 hodiny při 70 V.

Výsledky agarózové gelové elektroforézy po odbarvení gelu v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1 µg/ml byly fotografovány digitálním fotoaparátem.

Detekce ampliconů rep-PCR a RAPD byla prováděna na 1,4% gelu. Ten byl připraven rozvařením 7,0 g agarózy v 500 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Po ochlazení na 50-60 °C bylo do gelu přidáno 100 µl ethidium bromidu (5 mg/ml). Při nanášení produktů PCR

na gel byl použit 6x koncentrovaný vkladací pufr. DNA standardem při detekci fingerprintů byl DNA standard (5 µl) a linearizovaný plazmid (3 µl). Linearizace plazmidu byla provedena tak, že 3 µl vzorku rozpuštěného plazmidu bylo zahřáno na 60 °C po dobu 3 minut. Po ochlazení byl linearizovaný plazmid aplikován na gel jako DNA standard. Elektroforéza byla prováděna přes noc při 40 V po dobu 16 hodin. Výsledky agaróзовé gelové elektroforézy byly fotografovány digitálním fotoaparátem.

Příbuznost kmenů byla analyzována s použitím programu GelComperII (verze 2.0). Na základě UPGMA analýzy a Pearsonova korelačního koeficientu byly sestaveny dendrogramy při použití jednotlivých primerů. Nakonec byly sestaveny dendrogramy z kombinace dvou a tří fingerprintových analýz.

4.2.5 PCR s hrubým lyzátem buněk

Z dobře narostlé kultury byl odpipetován 1 ml suspenze buněk a stočen na centrifuze při 15 000 ot/min po dobu 3 min. Po slítí supernatantu byl sediment bakteriálních buněk resuspendován v 1 ml sterilní vody. Suspenze byla 3 minuty centrifugována při 15 000 ot/min. Po zopakování předchozích dvou kroků byly buňky resuspendovány ve 100 µl sterilní vody. Vzorek byl přepipetován do zkumavky typu Eppendorf o objemu 0,2 ml a 30 minut povařen při 99 °C v cyklátoru.

Do PCR byl použit 10x zředěný hrubý lyzát buněk (ředěno vodou pro PCR). Složení směsi pro PCR s hrubým lyzátem je uvedeno v Tabulce 7. Pro amplifikaci byl použit program uvedený v Tabulce 6.

Tabulka 7 Složení směsi pro PCR s hrubým lyzátem buněk

Složka	Objem (µl)
Voda pro PCR	15,5
Pufr pro PCR kompletní	2,5
dNTP (10 mM)	1,0
5' primer (10 pmol/µl)	1,0
3' primer (10 pmol/µl)	1,0
DNA polymeráza (1 U/µl)	2,0
Matrice DNA (10x ředěný hrubý lyzát)	2,0

4.2.6 Podmínky kultivace

Kultivace bakteriálních kmenů v termostatu (37 °C) byla provedena v klasických skleněných zkumavkách s kovovou zátkou a na Petriho miskách.

Při kultivacích na vodní lázni (37 °C) byly používány speciálně upravené zkumavky s horním vývodem pro vedení a jímání vznikajících plynů (Obrázek 6, vpravo). U těchto zkumavek je možné sycení obsahu zkumavky dusíkem. Napojením na kalibrovanou pipetu je umožněno sledování množství vznikajícího plynu během celé doby kultivace.

Obrázek 6 Klasická skleněná zkumavka s kovovou zátkou (vlevo) a speciálně upravená zkumavka s vývodem (vpravo)



Vliv teploty na růst buněk byl sledován v tekutém živném médiu s laktózou a se syrovátkou při laboratorní teplotě (22-23 °C) a optimální teplotě pro růst (37 °C) [67]. Kultivace byly prováděny jednak na médiu s laktózou (pH upraveno na 5,6) a jednak na médiu se syrovátkou (pH případně upraveno na 5,6).

Při pozorování vlivu pH na růst buněk byla kultivace prováděna v tekutém živném médiu s laktózou a se syrovátkou při optimální teplotě 37 °C v rozmezí pH 4,0 až 8,0 se vzrůstem o 0,5 jednotky. Hodnoty pH média byly upraveny 1M roztokem HCl nebo NaOH téže koncentrace.

4.2.6.1 Kultivace bakteriálních kmenů na tekutých médiích a pevných médiích

Kultivace jednotlivých bakteriálních kmenů pro různé účely byla prováděna na těchto tekutých médiích:

- CM0149 s laktózou (připraveno v laboratoři)
- CM0149 se syrovátkou (připraveno v laboratoři)

Veškeré kultivace byly prováděny za anaerobních podmínek. Anaerobní atmosféra byla podle potřeby zajištěna různými způsoby, které jsou popsány v kapitole 4.2.6.2.

Výsevy buněk byly prováděny na Petriho miskách s pevným médiem. Pro tyto účely bylo použito vždy komerčně dostupné médium CM0149 s přídavkem agarů (15 g/l).

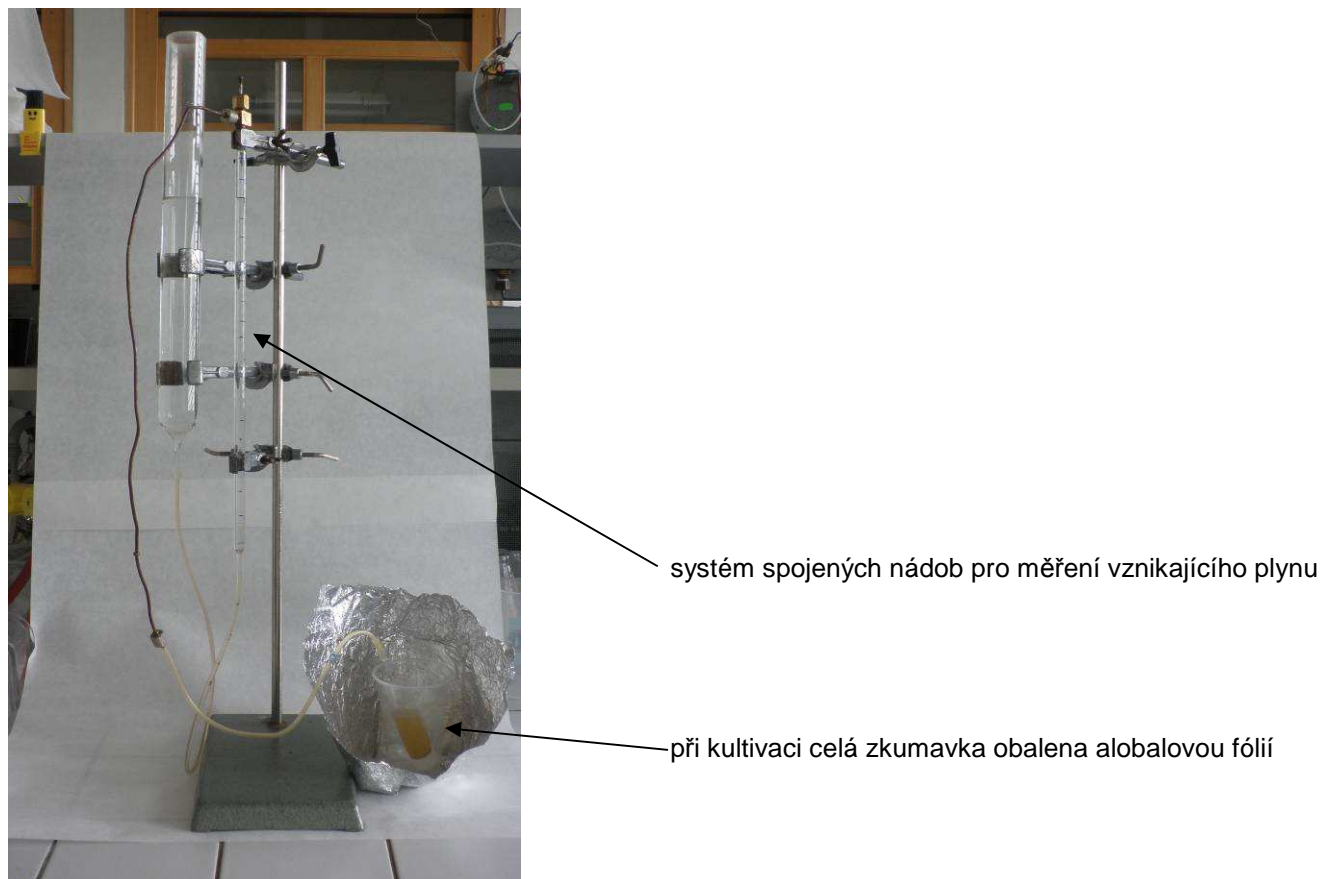
4.2.6.2 Vytvoření anaerobních podmínek

Dusíkatá atmosféra pro anaerobní kultivace byla používána pro kultivace v anaerostatu a při kultivacích na vodní lázni. Anaerobní atmosféra byla v anaerostatu vytvořena tak, že vývěvou byl odčerpán veškerý vzduch a celkový objem byl doplněn dusíkem. Proplach byl opakován dvakrát. Tento typ vytvoření anaerobní atmosféry bude dále popisován zkratkou A/N.

Pro sledování množství vznikajícího plynu během kultivace na různých typech médií bylo nutné napojit speciálně upravenou zkumavku s horním vývodem na měřící aparaturu. Anaerobní atmosféra byla zajištěna tak, že médium bylo nejprve syceno plynným dusíkem po dobu 2 minut (za účelem odstranění kyslíku) a poté ihned napojeno na měřící aparaturu taktéž propláchnutou dusíkem. Množství vznikajícího plynu při kultivaci za laboratorní teploty (22-23 °C) bylo pozorováno na měřící aparatuře (Obrázek 7) umístěné na laboratorním stole. Stejná sestava byla použita i pro kultivaci při 37 °C s tím rozdílem, že speciálně upravená zkumavka s kulturou byla umístěna ve vyhřívané vodní lázni o téže teplotě. Pro označení tohoto typu anaerobní atmosféry bude dále využívána zkratka MA/N pro měřící aparatury a ZA/N pro zjednodušené aparatury.

Alternativní možností vytvoření anaerobní atmosféry je zalití naočkovaného média parafínovým olejem. Tento způsob byl nejčastěji využíván v případě kultivací v klasických skleněných zkumavkách s kovovou zátkou o objemu 10 ml, resp. 20 ml (např. pro odběry ve stanovených časových úsecích při stanovení růstových křivek). Tento typ anaerobní atmosféry bude dále označován zkratkou PO.

Obrázek 7 Měřící aparatura pro kultivaci při laboratorní teplotě



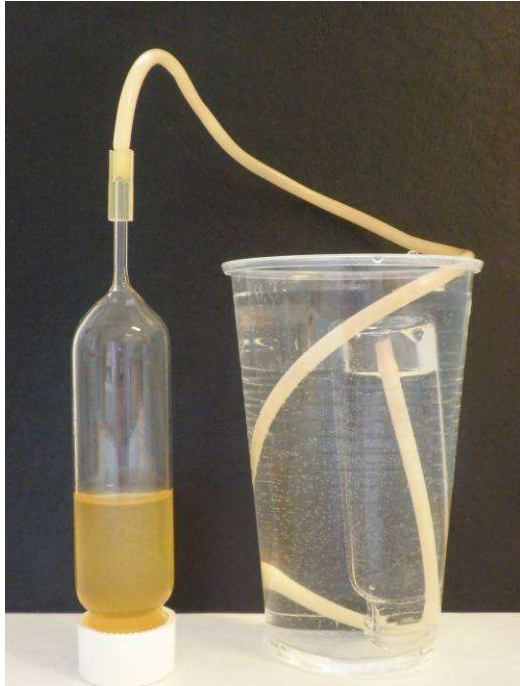
4.2.7 Stanovení růstových křivek kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5

4.2.7.1 Kultivace

Z dlouhodobě uchovávané kultury při -20 °C v 17% glycerolu byly bakteriální buňky přeočkovány do čerstvě připraveného média CM0149. Do 5 ml tekutého média bylo napipetováno 150 µl kultury a zalito 650 µl sterilního parafínového oleje.

Po dvoudenní kultivaci byla připravena čerstvá kultura, která sloužila dále jako inokulum. Po naočkování inokulem (3 %) bylo kultivační médium rozpipetováno po 5 ml do série zkumavek pro jednotlivé odběry ve stanovených časových intervalech a zalito parafínovým olejem. Do zkumavek s vývodem pro zjednodušené aparatury bylo pipetováno vždy 20 ml naočkovaného média a proplachováno plynným dusíkem (Obrázek 8).

Obrázek 8 Zjednodušená kultivační aparatura s možností vedení a jímání vznikajícího plynu



Kultivace byla ve zkumavkách prováděna za anaerobních podmínek typu PO v termostatu při 37 °C, ve zkumavkách zjednodušených aparatur byla anaerobní atmosféra typu ZA/N (kapitola 4.2.6.2).

Byl prováděn i paralelní pokus v měrné aparatuře na vodní lázni při 37 °C. Měrná aparatura byla napojena na kalibrovanou pipetu pro průběžné sledování množství vznikajících plynů během kultivace. Pro tento typ kultivace byla zvolena anaerobní atmosféra typu MA/N (kapitola 4.2.6.2). Celá aparatura byla před kultivací vysterilizována, pečlivě utěsněna, propláchnuta dusíkem a prověřena.

Pro bakteriální kmen *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla na médiu CM0149 s laktózou a se syrovátkou prováděna optimalizace počátečního pH (4,0-8,0 se vzrůstem o 0,5 jednotky) a optimalizace teploty (20-23 °C a 37 °C) pro růst buněk a tvorbu plynu. Dále byl tentýž kmen kultivován v médiu CM0149 s počáteční koncentrací laktózy 5, 10, 50, 100, 200 a 400 mM, čímž byla optimalizována koncentrace sacharidického zdroje.

4.2.7.2 Pozorované parametry při jednotlivých odběrech

Po odpipetování parafínového oleje byl celý obsah zkumavky promíchán na vortexu. Potom bylo odebráno potřebné množství suspenze na změření absorbance, která se měnila v čase podle množství buněk. Ze začátku kultivace bylo odebíráno vždy po 2 ml kultury. Později bylo nutné suspenzi buněk ředit tak, aby hodnoty absorbance $A_{600\text{nm}}$ se pohybovaly v intervalu od 0 do 1,0 (asi 2x, ve stacionární fázi růstu 4x). V tomto intervalu je závislost absorbance na koncentraci (počtu buněk) lineární.

Poté byly hodnoty absorpce násobeny použitým ředěním a do grafu byla vynesena závislost absorpance $A_{600\text{nm}}$ na době kultivace.

Na základě zjištěných hodnot absorpance během celé doby kultivace byla stanovena měrná rychlost růstu podle následujícího vzorce:

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu \cdot t \quad \Rightarrow \quad \mu = \frac{\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)}{t}$$

Měrná růstová rychlost byla ve všech dalších případech vypočtena stejným způsobem. Do grafu byla vynesena závislost měrné rychlosti růstu na době kultivace.

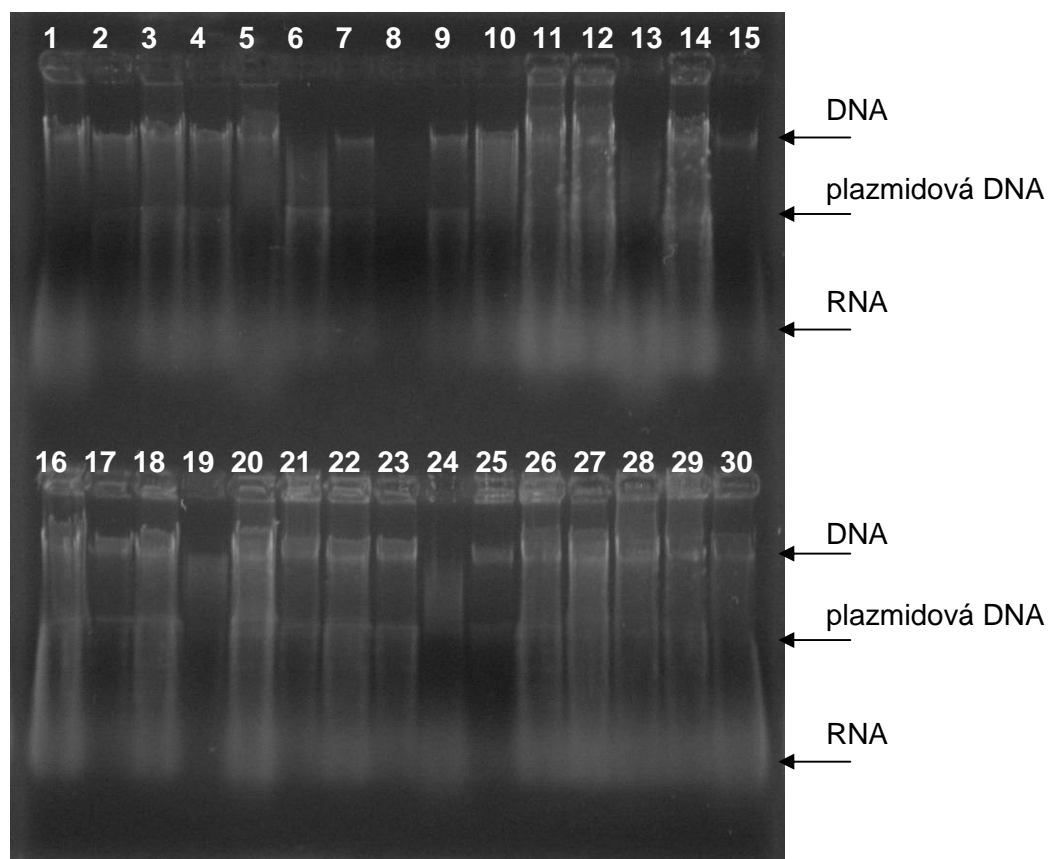
Veškerá kultura byla centrifugována při 6 000 ot/min po dobu 20 minut. Supernatant byl slit do čisté zkumavky a na pH metru byla stanovena hodnota pH.

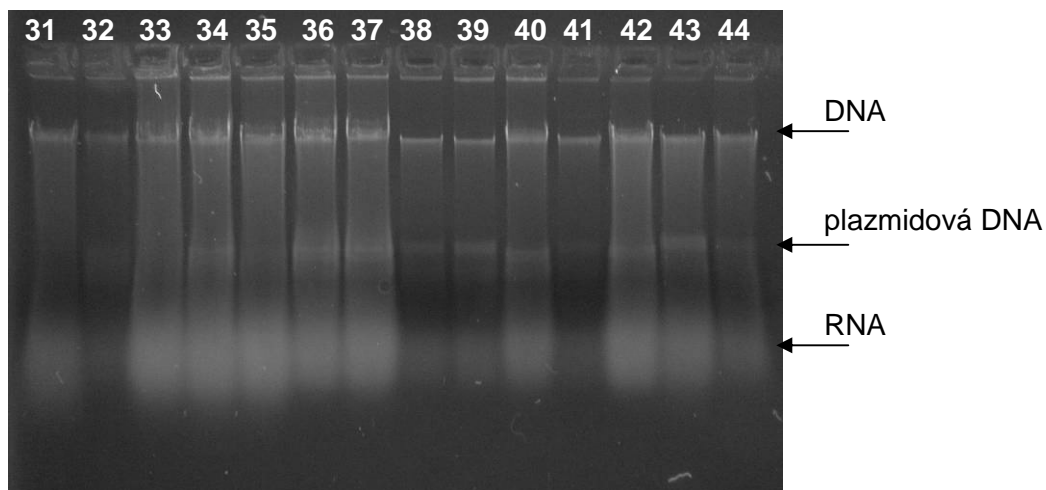
5. VÝSLEDKY

5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Pro izolaci DNA byly použity hrubé lyzáty buněk, které byly připraveny podle postupu popsaného v kapitole 4.2.1. DNA byla izolována metodou fenolové extrakce [69]. Stanovení koncentrace DNA ve vzorcích bylo provedeno spektrofotometricky. Z hodnot absorbance při 260 nm byla stanovena koncentrace DNA. Z poměru hodnot absorbancí při 260 nm a 280 nm (Tabulka 8) a pomocí gelové elektroforézy na 0,8% agarózovém gelu (Obrázek 9) byla vyhodnocena kvalita izolované DNA (Tabulka 8).

Obrázek 9 Agarózová gelová elektroforéza DNA (neředěné) 44 kmenů klostridií izolované metodou fenolové extrakce





Na 0,8% agarózový gel bylo nanášeno 30 μ l neředěné DNA. Číslo běhu odpovídá označení kmene v Tabulce 1

Tabulka 8 Koncentrace DNA a její kvalita

Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Koncentrace DNA (ng/ μ l)	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	Kvalita
1	9833 P	160	1,93	dobrá, RNA
2	9867 P	73	1,62	dobrá
3	9823 P	186	1,84	dobrá, RNA
4	9874 II	228	1,87	dobrá, RNA
5	9865	408	1,62	dobrá
6	9843	268	1,75	degradovaná
7	9837	199	1,74	dobrá
8	9860 (03B3)	116	1,60	degradovaná
9	9875 (03B2)	139	1,65	dobrá
10	9829	122	1,58	částečně degradovaná
11	31 P	147	1,79	částečně degradovaná, RNA
12	S18/1	339	2,11	částečně degradovaná, RNA
13	S18/2	236	2,05	degradovaná
14	S23	775	2,10	částečně degradovaná, RNA
15	S21	68,5	1,63	dobrá
16	S29	238	2,13	částečně degradovaná, RNA
17	S27	294	1,94	dobrá
18	S5	315	2,01	dobrá
19	E16A	63,5	1,74	degradovaná
20	R26A	360	2,00	částečně degradovaná, RNA

Pokračování Tabulky 8 Koncentrace DNA a její kvalita

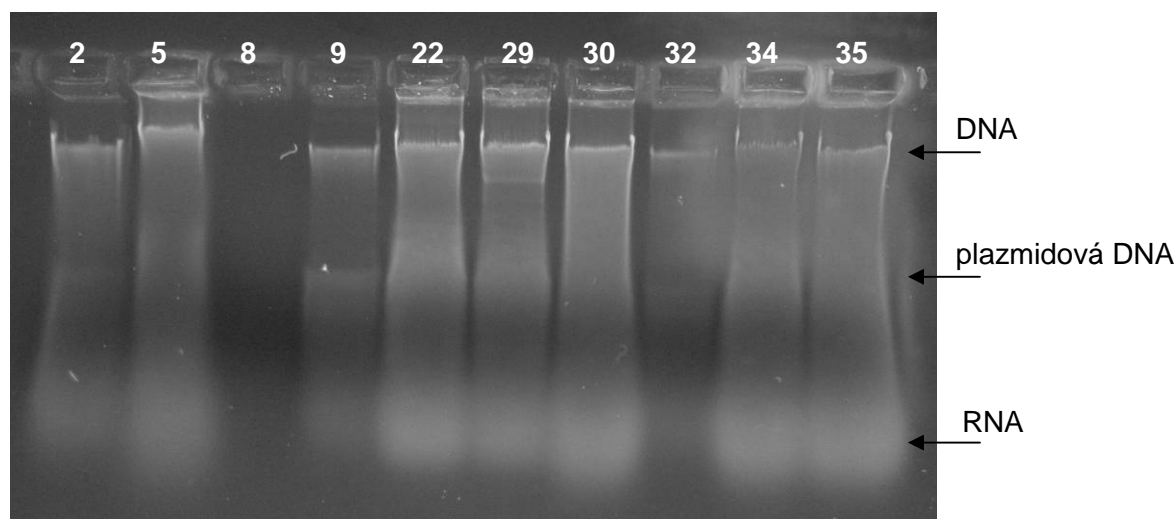
Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Koncentrace DNA (ng/μl)	A _{260nm} /A _{280nm}	Kvalita
21	L2	117	2,24	dobrá
22	L3	428	2,14	dobrá
23	112	327	2,13	dobrá
24	580	148	1,99	degradovaná
25	581	21,5	1,79	dobrá
26	MM - D	422	2,06	částečně degradovaná, RNA
27	89K25B	407	2,09	částečně degradovaná, RNA
28	1030	451	1,99	částečně degradovaná, RNA
29	12-15-1A	420	2,18	částečně degradovaná, RNA
30	31-44-Rk-2A	377	2,19	částečně degradovaná, RNA
31	31-75-4A	454	1,84	částečně degradovaná, RNA
32	V51-RCM-3B	148	2,11	dobrá
33	V51-RCM-3C	508	2,12	částečně degradovaná, RNA
34	V62-45-3A	338	2,21	částečně degradovaná, RNA
35	V62-45-3B	345	2,19	částečně degradovaná, RNA
36	V67-R3A	549	2,10	částečně degradovaná, RNA
37	V69-120-R2A	584	2,11	částečně degradovaná, RNA
38	<i>C. butyricum</i> DSM 10702 ^T	14,8	1,69	dobrá
39	<i>C. beijerinckii</i> KVL M3	14,5	1,66	dobrá
40	<i>C. tyrobutyricum</i> SMR 184	39,2	2,04	dobrá, RNA
41	<i>C. tyrobutyricum</i> SMR 220	8,5	1,79	dobrá
42	<i>C. tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	404	2,09	částečně degradovaná, RNA
43	<i>C. tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	548	1,99	částečně degradovaná, RNA
44	<i>C. sporogenes</i> CCM 4423	203	1,92	dobrá

5.2 Příprava DNA v množství vhodném do PCR směsi

Do směsi pro PCR byla použita DNA o koncentraci 10 ng/μl. DNA byla ředěna TE puforem dle postupu uvedeném v kapitole 4.2.2.

Pro dosažení větší čistoty vzorků byly vzorky č. 2, 5, 8, 9, 22, 29, 30, 32, 34 a 35 přesráženy ethanolom (Tabulka 9). Koncentrace DNA ve vzorcích byla stanovována spektrofotometricky. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 9 a na Obrázku 10.

Obrázek 10 Agarózová gelová elektroforéza přesrážené DNA vybraných kmenů klostridií



Na 0,8% gel bylo nanášeno 30 μl DNA.

Tabulka 9 Koncentrace DNA po přesrážení ethanolom

Kmen	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	DNA (ng/μl)	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	Detekce DNA (neřaděná)
2	9867 P	75,5	2,01	+++
5	9865	337	1,96	+++
8	9860 (03B3)	74	1,87	-
9	9875 (03B2)	121	2,03	++
22	L3	663	2,25	+++
29	12-15-1A	330	2,08	+++
30	31-44-Rk-2A	815	2,23	+++
32	V51-RCM-3B	17,3	2,16	++
34	V62-45-3A	963	2,21	+++
35	V62-45-3B	584	2,08	+++

DNA byla detegována na 0,8% agarózovém gelu.

+++, ++ detekce DNA různé intenzity (od nejvyšší do nejnižší)

- DNA nedetegována

Po přesrážení ethanolom se zlepšila čistota DNA. Poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl větší než 1,8. DNA byla detegována ve všech vzorcích kromě kmene *Clostridium* sp. 9860 (03B3) (8). Jedná se zřejmě o kmen, který obsahuje velké množství nukleáz a použité množství proteinázy K (0,5 μg) zřejmě nepostačovalo pro jejich inaktivaci. Do směsi pro PCR se používá DNA o koncentraci 10 ng/μl. Z uvedeného důvodu bylo nutné DNA zředit.

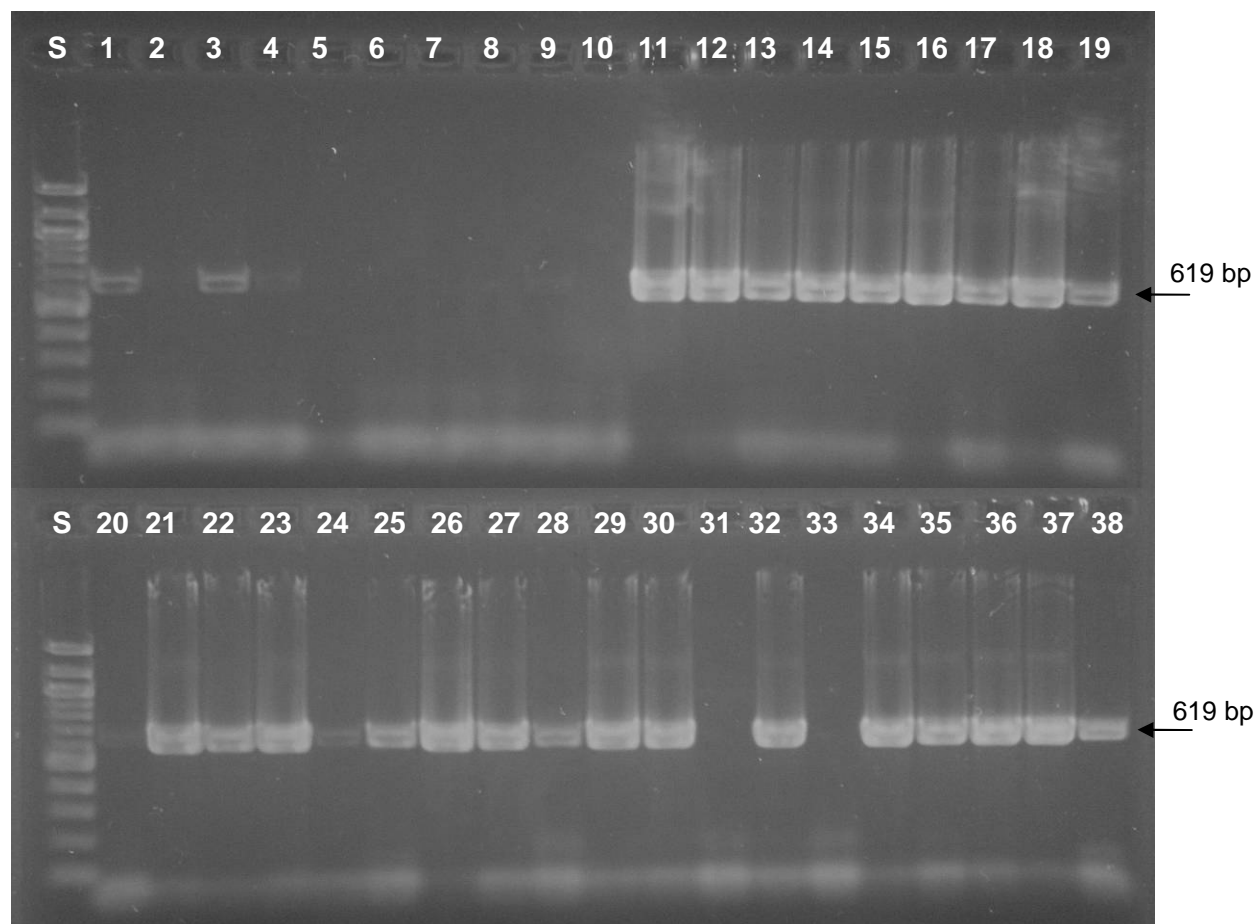
5.3 PCR s univerzálními primery pro doménu *Bacteria*

Pro ověření amplifikovatelnosti izolované DNA zředěné na výslednou koncentraci 10 ng/μl byla provedena PCR s univerzálními primery pro doménu *Bacteria* [64]. Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 4. Použitý program amplifikace je v Tabulce 6. Sekvenci sady univerzálních primerů pro doménu *Bacteria* udává Tabulka 5. Jako pozitivní kontrola byla použita purifikovaná DNA *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T o koncentraci 10 ng/μl. Během této reakce se amplifikoval úsek o velikosti přibližně 470 bp. Separace produktů PCR byla prováděna na 1,8% gelu. Ve všech případech byly získány amplikony o velikosti přibližně 470 bp, což svědčí o tom, že byla izolována DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Uvedená DNA byla použita v dalších aplikacích.

5.4 PCR s primery specifickými pro rod *Clostridium*

Pro začlenění bakteriálních kmenů do rodu *Clostridium* byly použity primery F1 a F2 specifické pro rod *Clostridium* [63]. Během reakce byl amplifikován charakteristický úsek o velikosti 619 bp. Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 6. Složení použité směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 4 a v Tabulce 5 jsou uvedeny sekvence použitých primerů. Amplikony byly detegovány na 1,8% agarózovém gelu (Obrázek 11) a výsledky přehledně shrnuty v Tabulce 10.

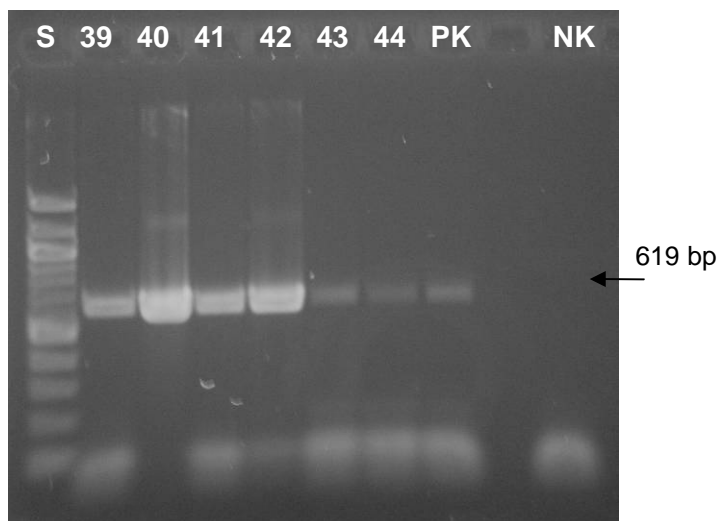
Obrázek 11 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými pro rod *Clostridium*



S DNA standard (100-1500 bp)

PK pozitivní kontrola

NK negativní kontrola



S DNA standard (100-1500 bp)
 PK pozitivní kontrola
 NK negativní kontrola

Tabulka 10 Výsledky PCR pro rod *Clostridium*

Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Detekce produktů PCR	Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Detekce produktů PCR
1	9833 P	++	23	112	+++
2	9867 P	-	24	580	+
3	9823 P	++	25	581	+++
4	9874 II	-/+	26	MM - D	+++
5	9865	-	27	89K25B	+++
6	9843	-	28	1030	++
7	9837	-	29	12-15-1A	+++
8	9860 (03B3)	-	30	31-44-Rk-2A	+++
9	9875 (03B2)	-/+	31	31-75-4A	-
10	9829	-	32	V51-RCM-3B	+++
11	31 P	+++	33	V51-RCM-3C	-
12	S18/1	+++	34	V62-45-3A	+++
13	S18/2	+++	35	V62-45-3B	+++
14	S23	+++	36	V67-R3A	+++
15	S21	+++	37	V69-120-R2A	+++
16	S29	+++	38	<i>C. butyricum</i> DSM 10702 ^T	+++
17	S27	+++	39	<i>C. beijerinckii</i> KVL M3	+++
18	S5	+++	40	<i>C. tyrobutyricum</i> SMR 184	+++
19	E16A	+++	41	<i>C. tyrobutyricum</i> SMR 220	+++
20	R26A	+	42	<i>C. tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	+++
21	L2	+++	43	<i>C. tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	++
22	L3	+++	44	<i>C. sporogenes</i> CCM 4423	++

+++ , ++ , + detegovány amplikony různé intenzity (od nejvyšší do nejnižší)
 - nebyl detegován specifický PCR produkt

Z důvodu ověření zařazení testovaných kmenů byla opakována rodově specifická PCR u následujících kmenů: 9833 P (1), 9867 P (2), 9823 P (3), 9874 II (4), 9865 (5), 9843 (6), 9837 (7), 9860 (03B3) (8), 9875 (03B2) (9), 9829 (10), R26A (20), 580 (24), 31-75-4A (31), V51-RCM-3C (33), *C. tyrobutyricum* UTMT 3-1 (43), *C. sporogenes* CCM 4423 (44).

Velmi slabá detekce ampliconů vzorků č. 2, 4-10, 31 a 33 (Obrázek 11) mohla být způsobena přítomností inhibitorů PCR nebo velkým stupněm degradace DNA.

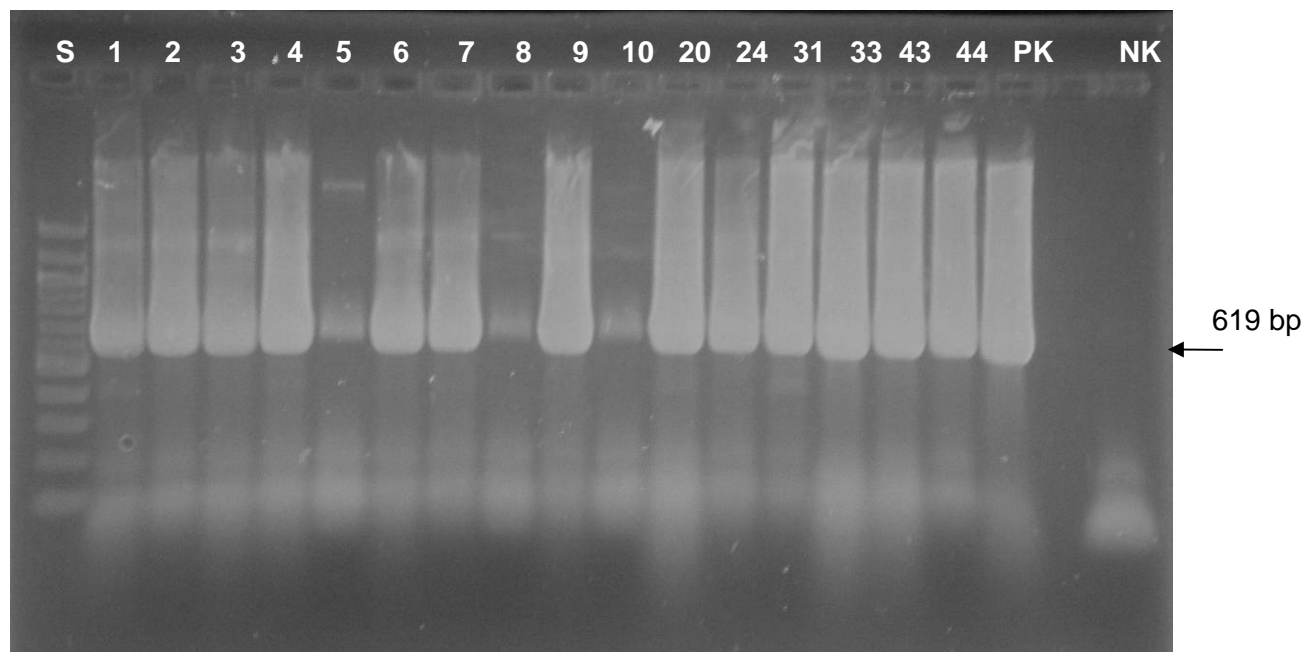
Snížení vlivu těchto inhibitorů je možné dosáhnout dvěma způsoby:

- zředit DNA matici natolik, že aktivita inhibitorů neovlivňuje PCR (1 ng/μl a 100 pg/μl)
- zdvojnásobit množství komponent pro PCR – použití bohatší směsi pro PCR (s vyšším obsahem dNTP, primerů a polymerázy) (Tabulka 4). V této reakci bylo použito 5 μl koncentrované DNA (Obrázek 12).

Pro stanovení vlivu ředění DNA na činnost inhibitorů PCR s primery specifickými pro rod *Clostridium* byla připravena řada ředěné DNA. K ředění byla použita technika desítkového ředění. Koncentrace DNA použité do směsi pro PCR se pohybovaly v intervalu (10 ng/μl, 100 fg/μl). Pomocí sady ředění DNA typového kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T bylo ověřeno, že ředěním DNA klesá intenzita produktu PCR detegovatelného na gelu.

Přítomnost inhibitorů byla ověřována ve vzorcích kmenů *Clostridium* sp. 9865 (5), *C. sp.* 9860 (03B3) (8) a *C. sp.* 9829 (10) (kapitola 6.2).

Obrázek 12 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s rodově specifickými primery vybraných kmenů *Clostridium*



Byla použita bohatší směs pro PCR (Clost.B Tabulka 4) a 5 μl koncentrované DNA. Na gel bylo nanášeno 25 μl vzorku a 5 μl nanášecího pufu.

Tabulka 11 Výsledky PCR s primery specifickými pro rod *Clostridium* při použití 50 ng DNA do bohatší směsi pro PCR

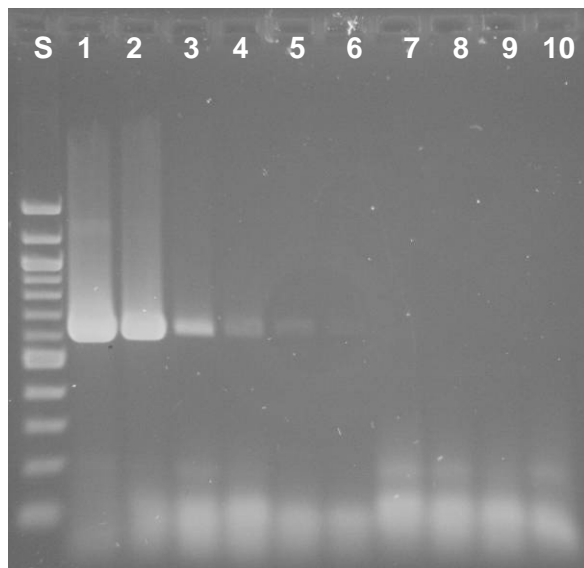
Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Detekce (koncentrovaná DNA)
1	9833 P	+++
2	9867 P	+++
3	9823 P	+++
4	9874 II	+++
5	9865	++
6	9843	+++
7	9837	+++
8	9860 (03B3)	++
9	9875 (03B2)	+++
10	9829	++
20	R26A	+++
24	580	+++
31	31-75-4A	+++
33	V51-RCM-3C	+++
43	<i>C. tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	+++
44	<i>C. sporogenes</i> CCM 4423	+++

+++ , ++ detegovány amplikony různé intenzity (od nejvyšší do nejnižší)

5.5 Stanovení citlivosti PCR s primery specifickými pro rod *Clostridium*

Použitím sady ředění DNA typového kmene *Clostridium butyricum* DSM 10702^T do směsi pro PCR byla získána citlivost PCR se specifickými primery pro rod *Clostridium*. Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 4, jednotlivé kroky amplifikačního programu jsou v Tabulce 6. Do směsi pro PCR pro negativní kontrolu byla použita voda pro PCR.

Obrázek 13 Vizualizace amplikonů po stanovení citlivosti rodově specifické PCR pro rod *Clostridium*



Na 1,8% agarózový gel bylo nanášeno 25 μ l směsi pro PCR.

S DNA standard (100-1500 bp)

Tabulka 12 Stanovení citlivosti PCR s primery specifickými pro rod *Clostridium*

Běh	DNA (koncentrace)	Detekce amplikonu
1	10 ng/ μ l	++++
2	1 ng/ μ l	+++
3	100 pg/ μ l	++
4	10 pg/ μ l	+
5	1 pg/ μ l	+
6	100 fg/ μ l	-/+
7	10 fg/ μ l	-
8	1 fg/ μ l	-
9	100 ag/ μ l	-
10	NK	-

++++, +++, ++, +... detegovány amplikony různé intenzity (od nejvyšší do nejnižší)

-..... nebyl detegován specifický PCR produkt

NK..... negativní kontrola

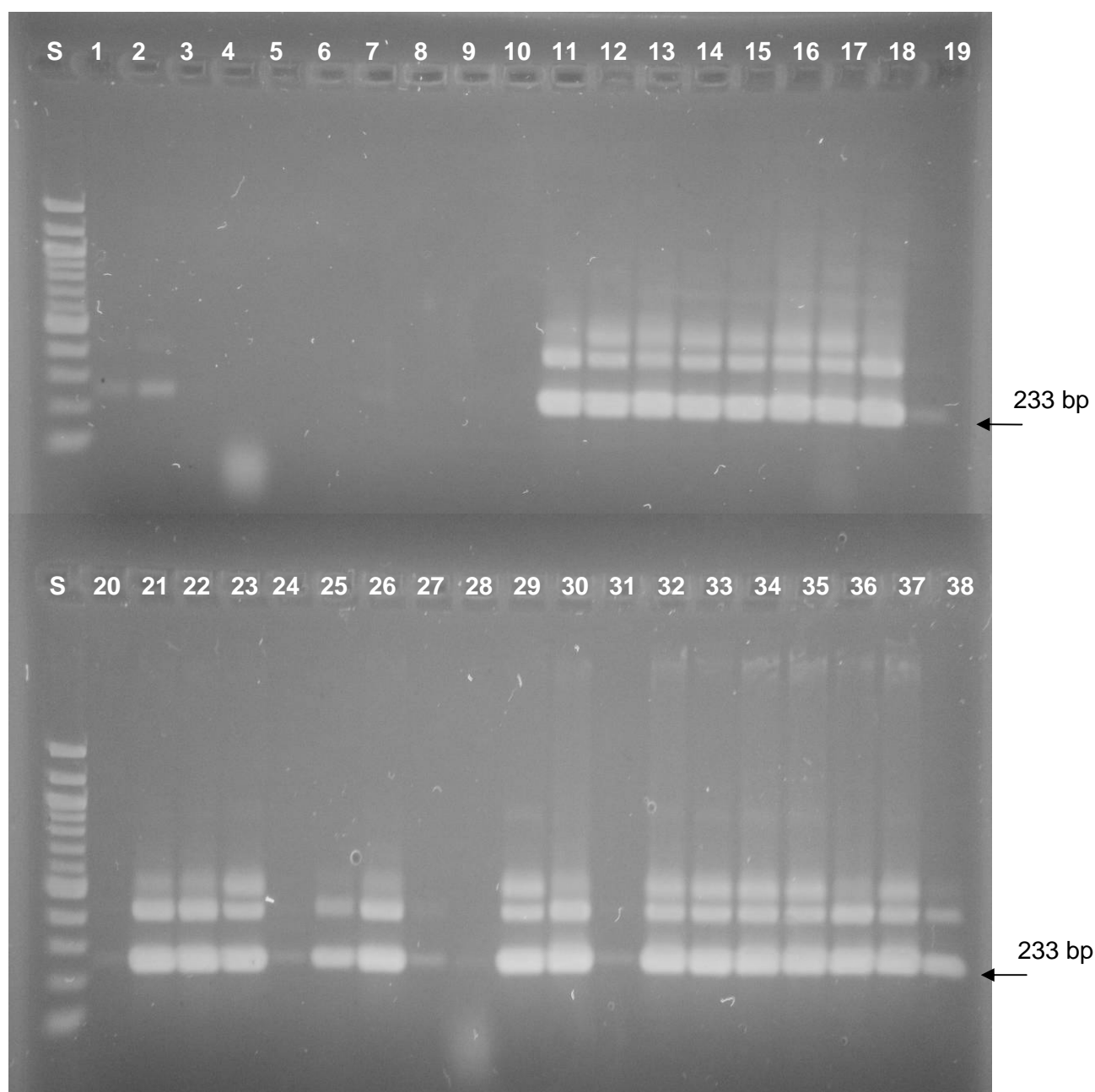
Technikou desítkového ředění byla získána řada vzorků DNA, které byly použity jako matrice DNA do PCR s primery specifickými pro rod *Clostridium*. Testovány byly vzorky s koncentrací DNA 10 ng/ μ l až 100 at/ μ l. Z Obrázku 13 je patrné, že amplikon se vzorkem DNA o koncentraci 100 fg/ μ l je ještě detegovatelný na gelu.

V tomto experimentu byla zjištěna citlivost rodově specifické PCR na 100 fg/ μ l.

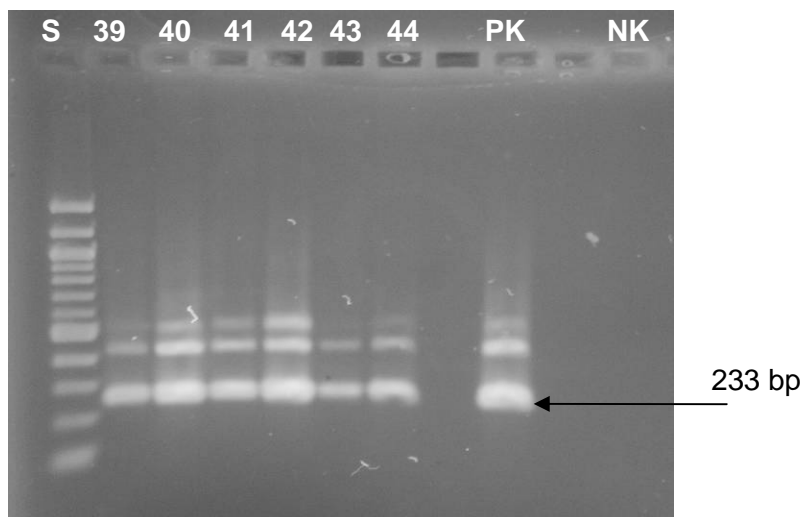
5.6 PCR s primery specifickými pro druh *Clostridium tyrobutyricum*

DNA všech 44 kmenů klostridií byla amplifikována s použitím primerů specifických pro druh *Clostridium tyrobutyricum*. Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 4, kolonce C. tyr, amplifikační program udává Tabulka 6 a sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tabulce 5. Během této reakce se amplifikuje úsek o velikosti 233 bp. Jako pozitivní kontrola byla do směsi pro PCR použita purifikovaná DNA izolovaná z typového kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T o koncentraci 10 ng/μl. Jako negativní kontrola byla použita směs pro PCR, do které místo matrice DNA byla použita voda pro PCR.

Obrázek 14 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými PCR pro druh *Clostridium tyrobutyricum*



Do směsi pro PCR bylo použito 10 ng DNA matrice. Na 1,8% agarózový gel bylo nanášeno 25 μl směsi pro PCR.



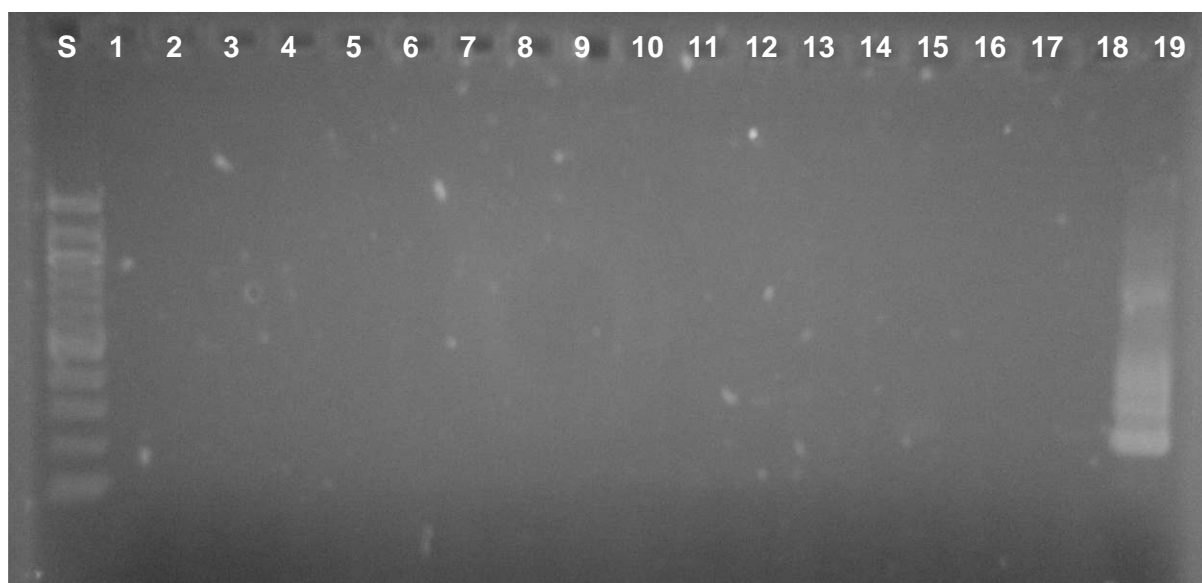
Do směsi pro PCR bylo použito 10 ng DNA matrice. Na 1,8% agarózový gel bylo nanášeno 25 µl směsi pro PCR.

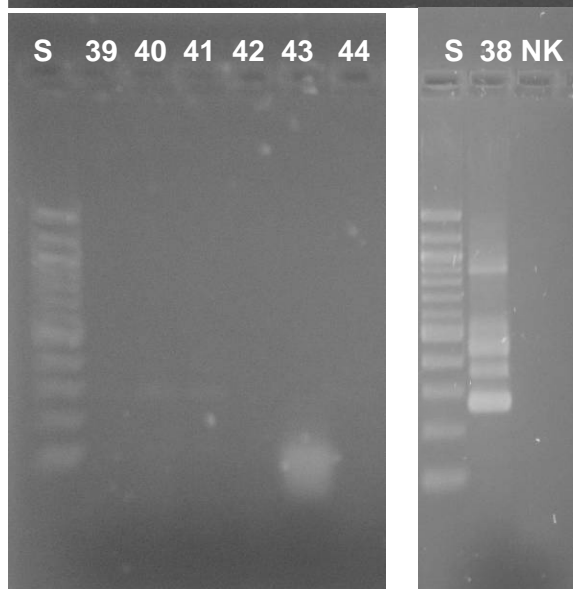
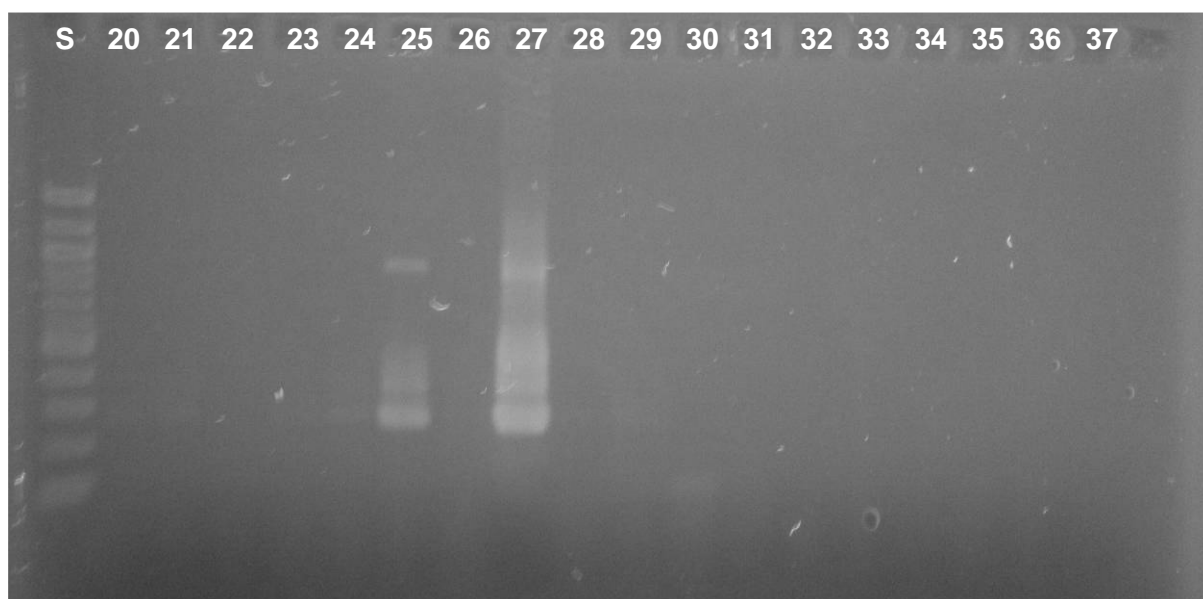
Zhodnocení výsledků agarózové gelové elektroforézy PCR produktů po amplifikaci se specifickými primery pro druh *Clostridium tyrobutyricum* je shrnuto spolu s výsledky druhově specifické PCR pro druh *Clostridium butyricum* v Tabulce 13.

5.7 PCR s druhově specifickými primery pro druh *Clostridium butyricum*

DNA 44 kmenů klostridií byla testována s primery specifickými pro druh *Clostridium butyricum*. Složení směsi pro PCR uvedeno v Tabulce 4, kolonce C. but. Amplifikační program udává Tabulka 6 a sekvence použitých primerů je uvedena v Tabulce 5. Během této reakce se amplifikuje úsek o velikosti 262 bp [65]. Jako negativní kontrola byla použita PCR směs, ke které byla přidána DNA kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T o koncentraci 10 ng/µl. DNA vzorku č. 38 odpovídá DNA typového kmene *Clostridium butyricum* DSM 10702^T a směs pro PCR s touto DNA byla použita jako pozitivní kontrola.

Obrázek 15 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s primery specifickými PCR pro druh *Clostridium butyricum*





Do směsi pro PCR bylo použito 10 ng matrice DNA. Na 1,8% agarózový gel bylo naneseno 25 μ l směsi pro PCR a 5 μ l nanášecího pufru.

S DNA standard

NK..... negativní kontrola

Vyhodnocení výsledků agarózové gelové elektroforézy produktů PCR po amplifikaci se specifickými primery pro druh *Clostridium butyricum* je shrnuto spolu s výsledky druhově specifické PCR pro druh *Clostridium tyrobutyricum* v Tabulce 13.

Tabulka 13 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR produktů po amplifikaci s primery specifickými pro druh *Clostridium tyrobutyricum* a *Clostridium butyricum*

Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Detekce		Zařazení
		<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. butyricum</i>	
1	9833 P	+	-	N
2	9867 P	++	-	N
3	9823 P	-	-	N
4	9874 II	-	-	N
5	9865	-	-	N
6	9843	-	-	N
7	9837	-	-	N
8	9860 (03B3)	-	-	N
9	9875 (03B2)	-	-	N
10	9829	-	-	N
11	31 P	+++ , Np	-	tyr
12	S18/1	+++ , Np	-	tyr
13	S18/2	+++ , Np	-	tyr
14	S23	+++ , Np	-	tyr
15	S21	+++ , Np	-	tyr
16	S29	+++ , Np	-	tyr
17	S27	+++ , Np	-	tyr
18	S5	+++ , Np	-	tyr
19	E16A	+	+++	but
20	R26A	+	-	N
21	L2	+++ , Np	-	tyr
22	L3	+++ , Np	-	tyr
23	112	+++ , Np	-	tyr
24	580	+	-	tyr
25	581	++ , Np	+++ , Np	but
26	MM - D	+++ , Np	-	tyr
27	89K25B	+	+++ , Np	but
28	1030	-	-	N

+++ , ++ , + detegovány amplikony různé intenzity (od nejvyšší do nejnižší)

- nedetegován specifický produkt PCR

Np detegován nespecifický produkt PCR

but zařazení do druhu *Clostridium butyricum*

tyr zařazení do druhu *Clostridium tyrobutyricum*

N nezařazeno

Pokračování Tabulky 13 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR produktů po amplifikaci s primery specifickými pro druh *Clostridium tyrobutyricum* a *Clostridium butyricum*

Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Detekce		Zařazení
		<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. butyricum</i>	
29	12-15-1A	+++ , Np	-	tyr
30	31-44-Rk-2A	+++ , Np	-	tyr
31	31-75-4A	+	-	N
32	V51-RCM-3B	+++ , Np	-	N
33	V51-RCM-3C	+++ , Np	-	N
34	V62-45-3A	+++ , Np	-	N
35	V62-45-3B	+++ , Np	-	N
36	V67-R3A	+++ , Np	-	N
37	V69-120-R2A	+++ , Np	-	N
38	<i>butyricum</i> DSM 10702T	++ , Np	+++ , Np	but
39	<i>beijerinckii</i> KVL M3	++ , Np	-	N
40	<i>tyrobutyricum</i> SMR 184	+++ , Np	-	tyr
41	<i>tyrobutyricum</i> SMR 220	+++ , Np	-	tyr
42	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	+++ , Np	-	tyr
43	<i>tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	+++ , Np	-	tyr
44	<i>sporogenes</i> CCM 4423	++ , Np	-	N

+++ , ++ , + detegovány amplikony různé intenzity (od nejvyšší do nejnižší)

- nedetegován specifický produkt PCR

Np detegován nespecifický produkt PCR

but zařazení do druhu *Clostridium butyricum*

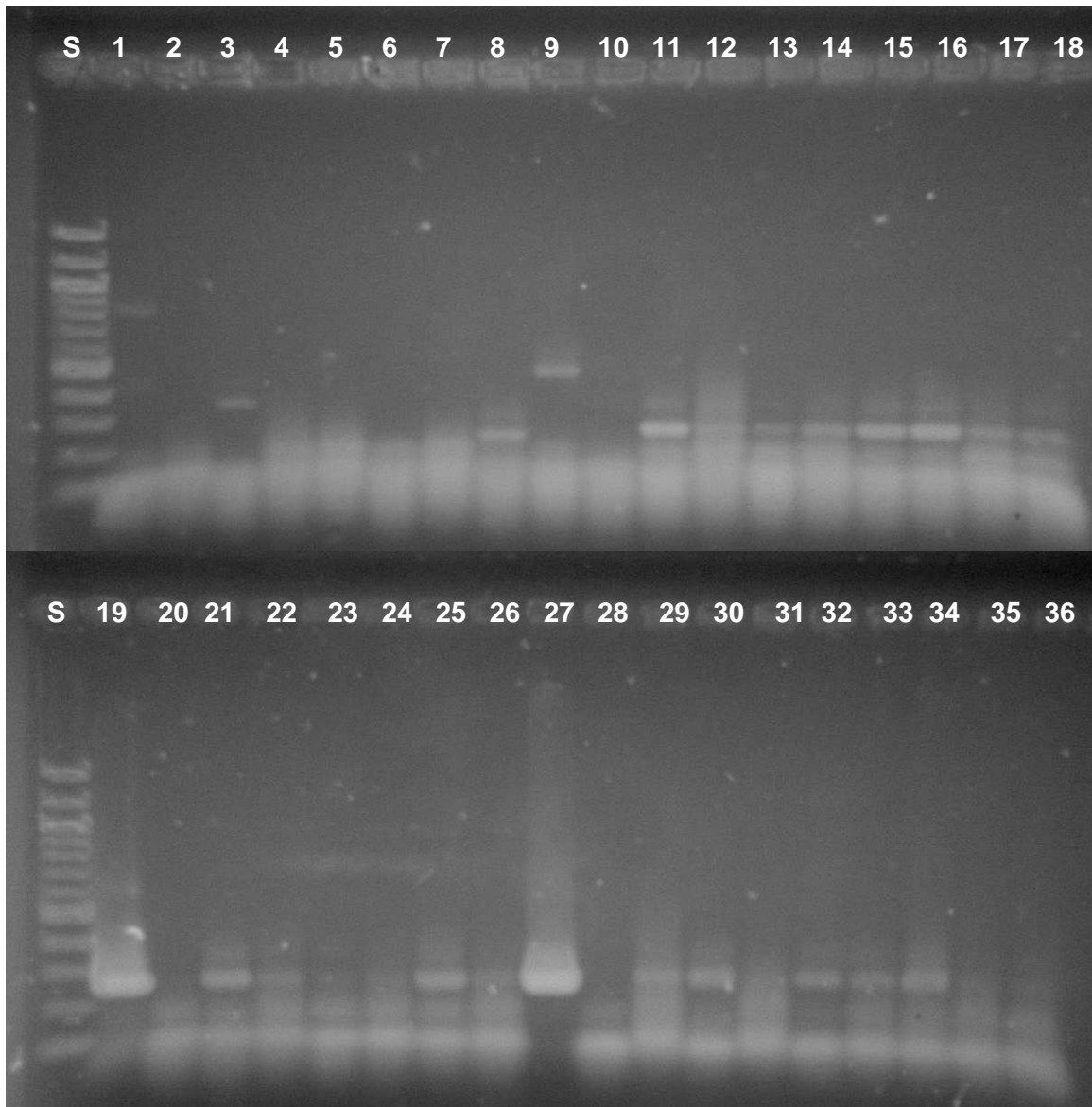
tyr zařazení do druhu *Clostridium tyrobutyricum*

N nezařazeno

5.8 Amplifikace genů kódujících hydrogenázu *hydA*

Pro identifikaci genů kódujících hydrogenázu *hydA* byla použita směs pro PCR uvedená v Tabulce 4; sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 5 a program amplifikace této PCR je uveden v Tabulce 6.

Obrázek 16 Agarózová gelová elektroforéza amplikonů PCR s primery specifickými pro gen kódující hydrogenázu *hydA*

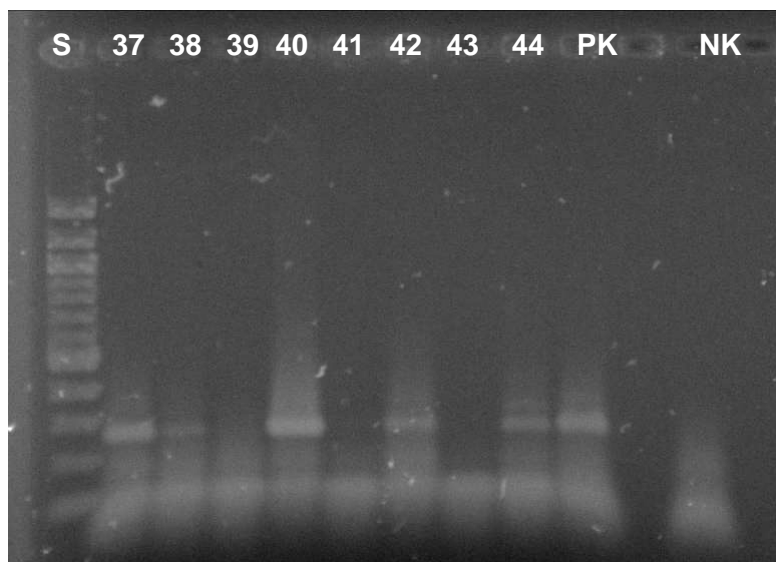


Na 1,8% agarózový gel bylo nanášeno 25 μ l směsi pro PCR a 5 μ l 6 \times koncentrovaného nanášecího pufru.

S DNA standard

PK pozitivní kontrola

NK negativní kontrola



Na 1,8% agarózový gel bylo naneseno 25 µl směsi pro PCR a 5 µl 6× koncentrovaného nanášecího pufru.

S DNA standard
 PK..... pozitivní kontrola
 NK..... negativní kontrola

Tabulka 14 Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR po amplifikaci s primery specifickými pro gen kódující hydrogenázu *hydA*

Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Detekce produktů PCR	Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Detekce produktů PCR
1	9833 P	Np	18	S5	+++
2	9867 P	-	19	E16A	+++
3	9823 P	Np	20	R26A	-
4	9874 II	-	21	L2	++
5	9865	-	22	L3	+
6	9843	-	23	112	-
7	9837	-	24	580	-
8	9860 (03B3)	+++	25	581	+++
9	9875 (03B2)	Np	26	MM - D	-
10	9829	-	27	89K25B	+++
11	31 P	+++	28	1030	-
12	S18/1	-	29	12-15-1A	-
13	S18/2	+++	30	31-44-Rk-2A	+++
14	S23	+++	31	31-75-4A	-
15	S21	+++	32	V51-RCM-3B	+++
16	S29	+++	33	V51-RCM-3C	+++
17	S27	+++	34	V62-45-3A	+++

+++ , ++ , + detegovány amplikony různé intenzity (od nejvyšší do nejnižší)
 - nebyl detegován specifický produkt PCR
 Np detegován nespecifický produkt PCR

Pokračování Tabulky 14 Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR po amplifikaci s primery specifickými pro gen kódující hydrogenázu *hydA*

Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Detekce produktů PCR	Běh	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Detekce produktů PCR
35	V62-45-3B	-	40	<i>C. tyrobutyricum</i> SMR 184	+++
36	V67-R3A	-	41	<i>C. tyrobutyricum</i> SMR 220	-
37	V69-120-R2A	+++	42	<i>C. tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	++
38	<i>C. butyricum</i> DSM 10702 ^T	-	43	<i>C. tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	-
39	<i>C. beijerinckii</i> KVL M3	-	44	<i>C. sporogenes</i> CCM 4423	++

+++ , ++ , + detegovány amplikony různé intenzity (od nejvyšší do nejnižší)

- nebyl detegován specifický produkt PCR

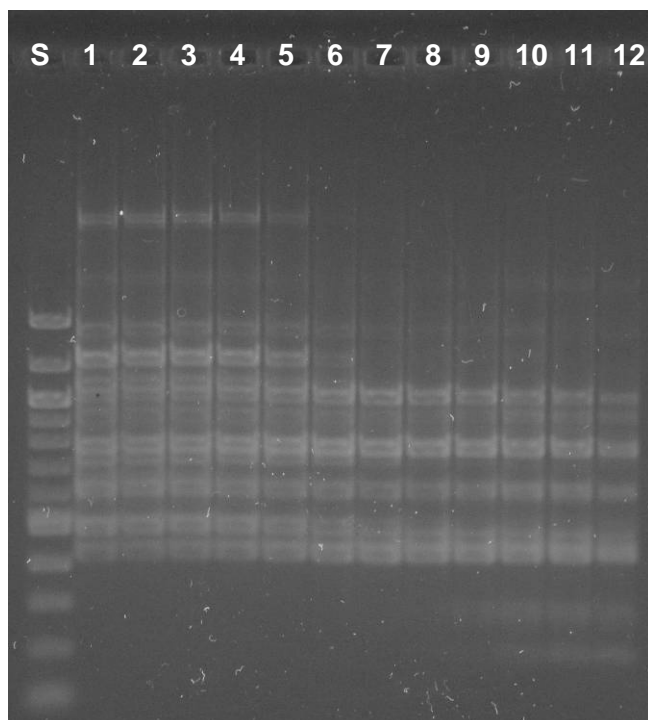
Np detegován nespecifický produkt PCR

U 21 vzorků ze 44 testovaných byla prokázána přítomnost genu pro hydrogenázu *hydA*.

5.9 Optimalizace teploty hybridizace (GTG)₅ primeru při genové typizaci pomocí interrepetitivní PCR (rep-PCR)

Optimalizace teploty hybridizace primeru (GTG)₅ pro typizaci pomocí rep-PCR byla provedena s purifikovanou DNA (10 ng/μl) typového kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T. Složení směsi pro PCR s primerem (GTG)₅ je uvedena v Tabulce 4. PCR byla provedena podle amplifikačního programu uvedeného v Tabulce 6, sekvence použitého primeru je v Tabulce 5.

Obrázek 17 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR po optimalizaci teploty hybridizace primeru (GTG)₅



Na agarózovou gelovou elektroforézu byl použit 1,4% gel. Bylo nanášeno 5 μl produktu PCR s nanášecím pufrem.

Tabulka 15 Výsledky agarózové gelové elektroforézy ampliconů po optimalizaci teploty hybridizace primeru (GTG)₅

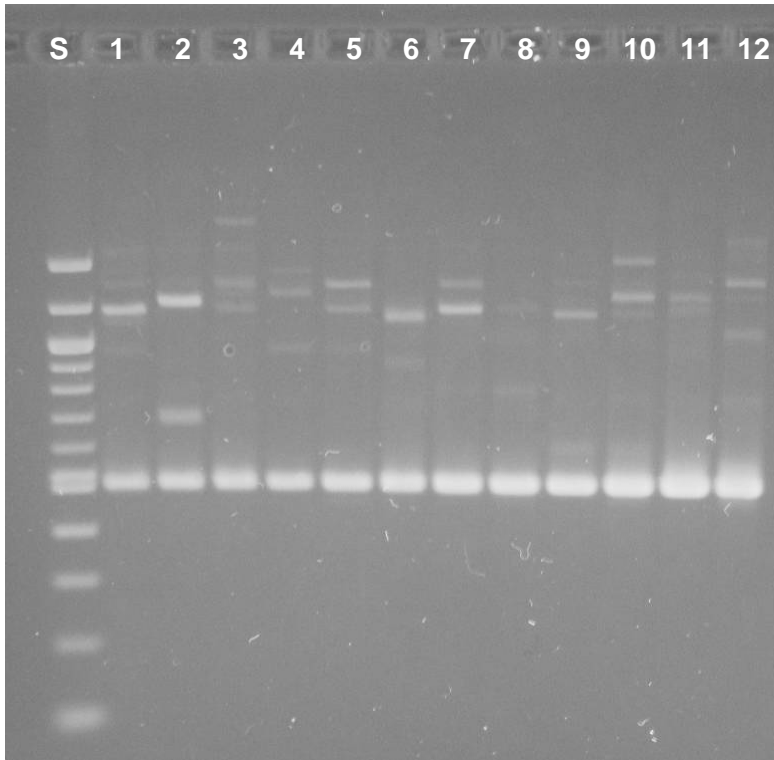
Běh	Teplota hybridizace (°C)	Rozmezí velikosti ampliconů (bp)
1	45,0	420 - 2 500
2	45,4	420 - 2 500
3	46,3	420 - 2 500
4	47,5	420 - 2 500
5	49,2	420 - 2 500
6	51,4	420 - 1 480
7	53,9	420 - 1 020
8	56,0	420 - 1 020
9	57,7	420 - 1 020
10	58,8	150 - 1 020
11	59,7	150 - 1 020
12	60,0	150 - 1 020

Teplota hybridizace primeru (GTG)₅ 46 °C byla zvolena jako optimální teplota pro fingerprintové profily testovaných 44 kmenů klostridií.

5.10 Optimalizace teploty hybridizace primerů Pr1 a Pr6 při genové typizaci pomocí náhodně amplifikované polymorfní DNA (RAPD)

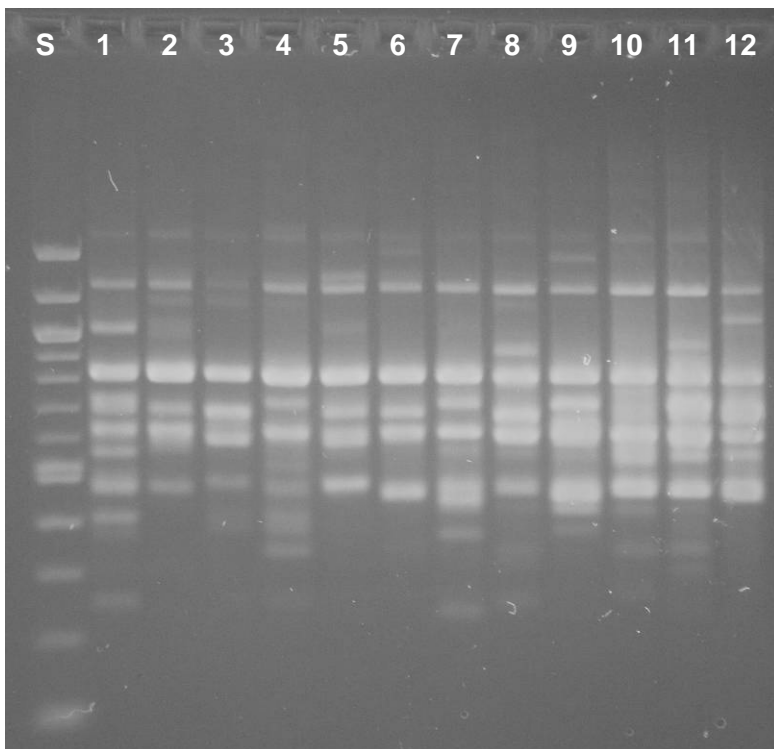
Složení směsi pro PCR s primery Pr1 a Pr6 je uvedena v Tabulce 4. PCR s primerem Pr1 a Pr6 byla provedena podle amplifikačního programu uvedeného v Tabulce 6. Výsledky detekce ampliconů na agarózovém gelu jsou uvedeny na Obrázku 18 a Obrázku 19. Souhrn výsledků udává Tabulka 16.

Obrázek 18 Gradient teploty hybridizace primeru Pr1 (zleva 33,0 - 39,0 °C) při RAPD a použití DNA typového kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T



Detekce na 2% agarózovém gelu.

Obrázek 19 Gradient teploty hybridizace primeru Pr6 (zleva 33,0 - 39,0 °C) při RAPD a použití DNA typového kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T



Detekce na 2% agarózovém gelu.

Tabulka 16 Výsledky agarózové gelové elektroforézy ampliconů po optimalizaci teploty hybridizace primerů Pr1 a Pr6

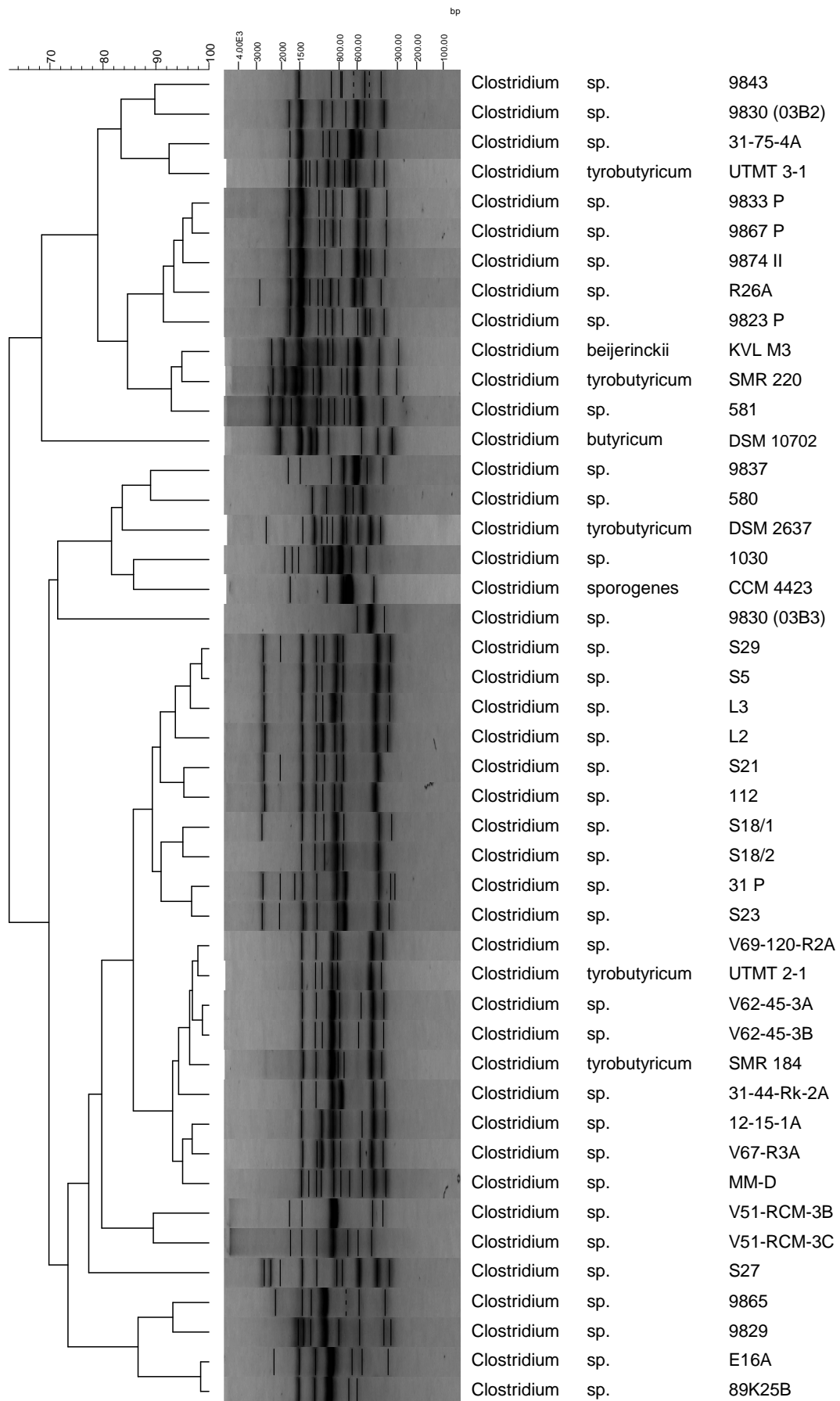
Běh	Teplota hybridizace (°C)	Rozmezí velikosti ampliconů (bp)	
		Primer 1	Primer 6
1	33,0	500 - 1 550	250 - 1 550
2	33,2	500 - 1 420	480 - 1 550
3	33,5	500 - 1 700	490 - 1 550
4	34,0	500 - 1 450	250 - 1 550
5	34,7	500 - 1 460	490 - 1 550
6	35,6	500 - 1 380	480 - 1 550
7	36,6	500 - 1 460	230 - 1 550
8	37,5	500 - 1 400	240 - 1 550
9	38,1	500 - 1 380	390 - 1 550
10	38,5	500 - 1 500	350 - 1 550
11	38,9	500 - 1 400	340 - 1 550
12	39,0	500 - 1 430	490 - 1 550

Při teplotě hybridizace 35,6 - 36,6 °C bylo na gelu detegováno největší množství dobře viditelných diskrétních zón (v rozmezí 500 - 1 460 bp pro primer Pr1 a 230 - 1 550 bp pro primer Pr6). Jako optimální teplota hybridizace primerů Pr1 a Pr6 byla zvolena teplota 36,0 °C. Tato teplota hybridizace se shoduje s teplotou uváděnou v literatuře [65].

5.11 Genová typizace pomocí interrepetitivní PCR (rep-PCR)

Fingerprintové profily byly získány na základě provedení reakce PCR s primerem (GTG)₅. Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 4. Jako matrice DNA do směsi pro PCR byla použita purifikovaná DNA 45 kmenů klostridií uvedených v Tabulce 1 o koncentraci 10 ng/μl. PCR byla provedena podle amplifikačního programu uvedeného v Tabulce 6. Amplicony byly detegovány na 1,4% agarózovém gelu. Podle dendrogramu byla jednotlivá klostridia rozdělena do pěti skupin (Tabulka 17).

Obrázek 20 Fingerprintové profily 45 kmenů klostridií po amplifikaci s primerem (GTG)₅



Tabulka 17 Rozdělení klostridií do skupin na základě dendrogramu sestrojeného z fingerprintových profilů po amplifikaci s (GTG)₅ primerem

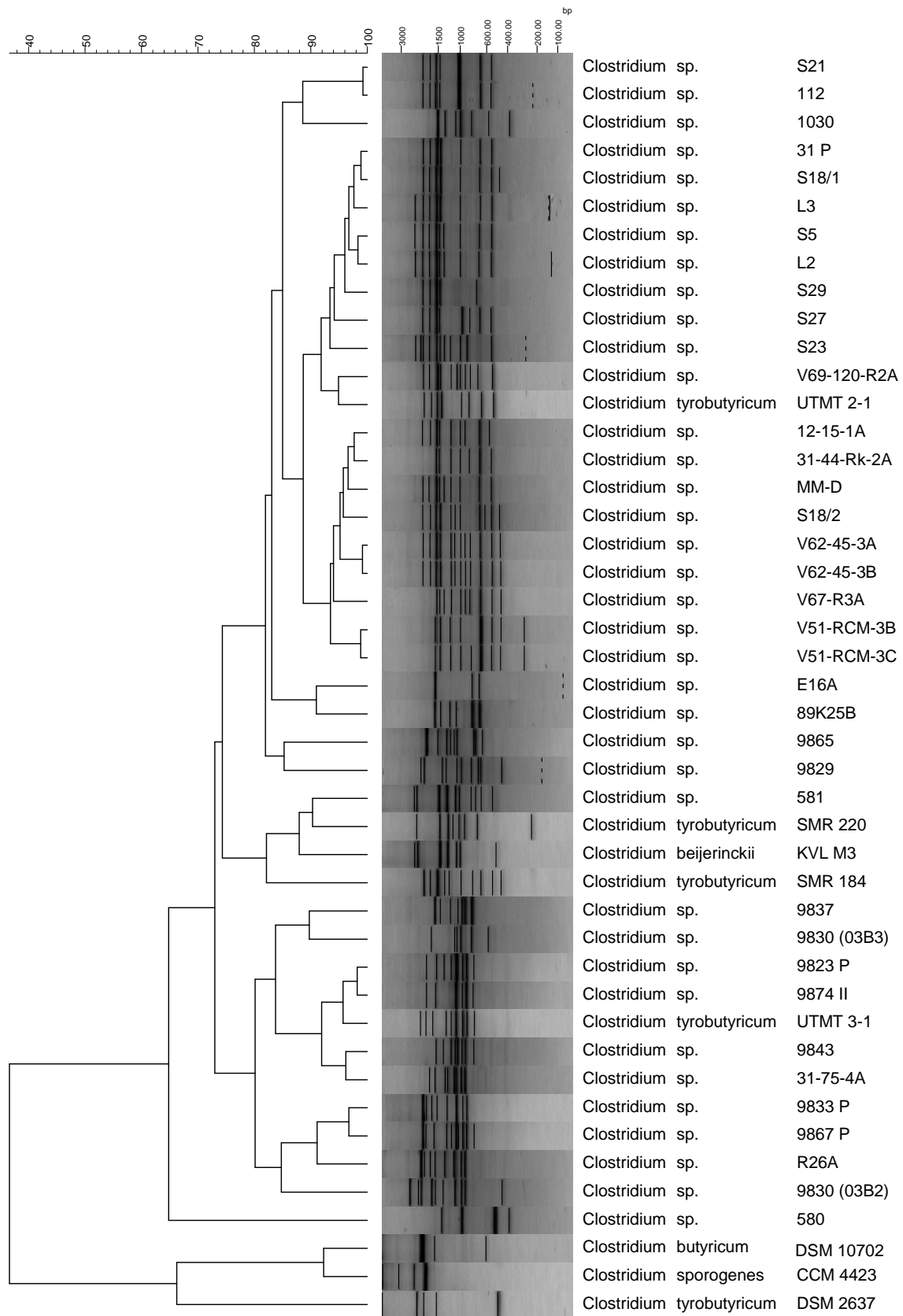
Skupina	Hladina podobnosti (%)	Kmen	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)
I	86	<i>Clostridium sporogenes</i> CCM 4423	1030
II	83	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	9843, 9830 (03B2), 31-75-4A
III	83	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	9837, 580
IV	77	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 2-1 <i>Clostridium tyrobutyricum</i> SMR 184	S29, S5, L3, L2, S21, 112, S18/1, S18/2, 31 P, S23, V69-120-R2A, V62-45-3A, V62-45-3B, 31-44-Rk-2A, 12-15-1A, V67-R3A, MM-D, V51-RCM-3B, V51-RCM-3C, S27
V	nezařazeno		9833 P, 9867 P, 9874 II, 9823 P, 581, 9830 (03B3), R26A, 9865, 9829, E16A, 89K25B

5.12 Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD)

Fingerprintové profily 45 kmenů klostridií byly získány metodou RAPD s primery Pr1 a Pr6. Porovnáním fingerprintů pomocí programu BioNumerics byly na základě Pearsonova korelačního koeficientu a UPGMA analýzy sestaveny dendrogramy (Obrázek 21, Obrázek 22). Podle dendrogramů byla jednotlivá klostridia rozdělena do skupin (Tabulka 18, Tabulka 19).

Složení směsi pro RAPD s primery Pr1 a Pr6 je uvedena v Tabulce 4. Jako matrice DNA do směsi pro PCR byla použita purifikovaná DNA 45 kmenů klostridií uvedených v Tabulce 1 o koncentraci 10 ng/μl. PCR s primerem Pr1 a Pr6 byla provedena podle amplifikačního programu uvedeného v Tabulce 6. Amplikony byly detegovány na 1,4% agarózovém gelu.

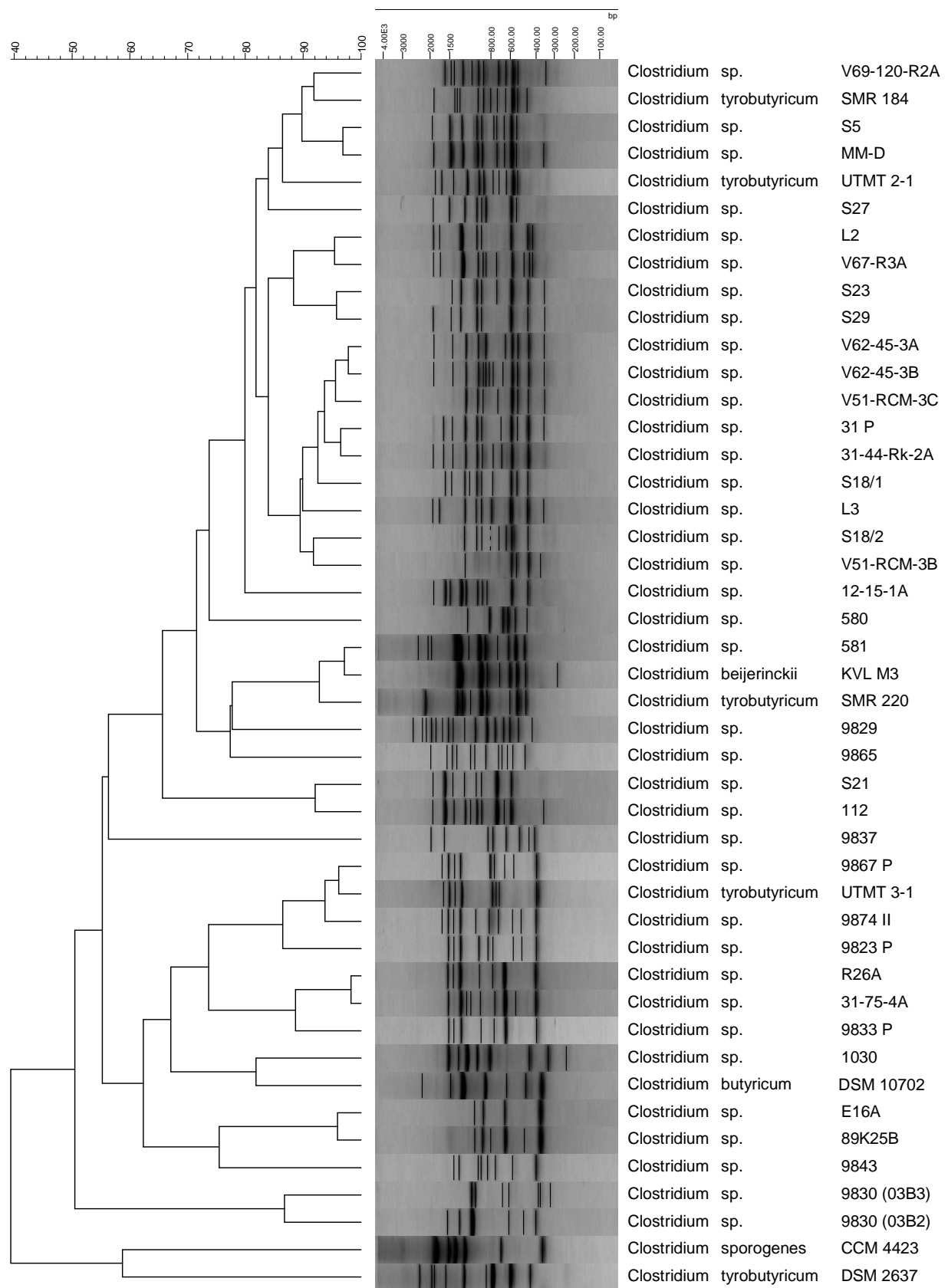
Obrázek 21 Fingerprintové profily a dendrogram 45 kmenů klostridií po amplifikaci s primerem Pr1



Tabulka 18 Rozdělení klostridií do skupin na základě dendrogramu sestrojeného z fingerprintových profilů po amplifikaci s primerem Pr1

Skupina	Hladina podobnosti (%)	Kmen	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)
I	89	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	S21, 112, 1030, 31 P, S18/1, L3, S5, L2, S29, S27, S23, V69-120-R2A, 12-15-1A, 31-44-Rk-2A, MM-D, S18/2, V62-45-3A, V62-45-3B, V67-R3A, V51-RCM-3B, V51-RCM-3C
II	81	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	9827, 9830 (03B3), 9823 P, 9874 II, 9843, 31-75-4A, 9833 P, 9867 P, R26A, 9830 (03B2)
III		nezařazeno	E16A, 89K25B, 9865, 9829, 581, 580

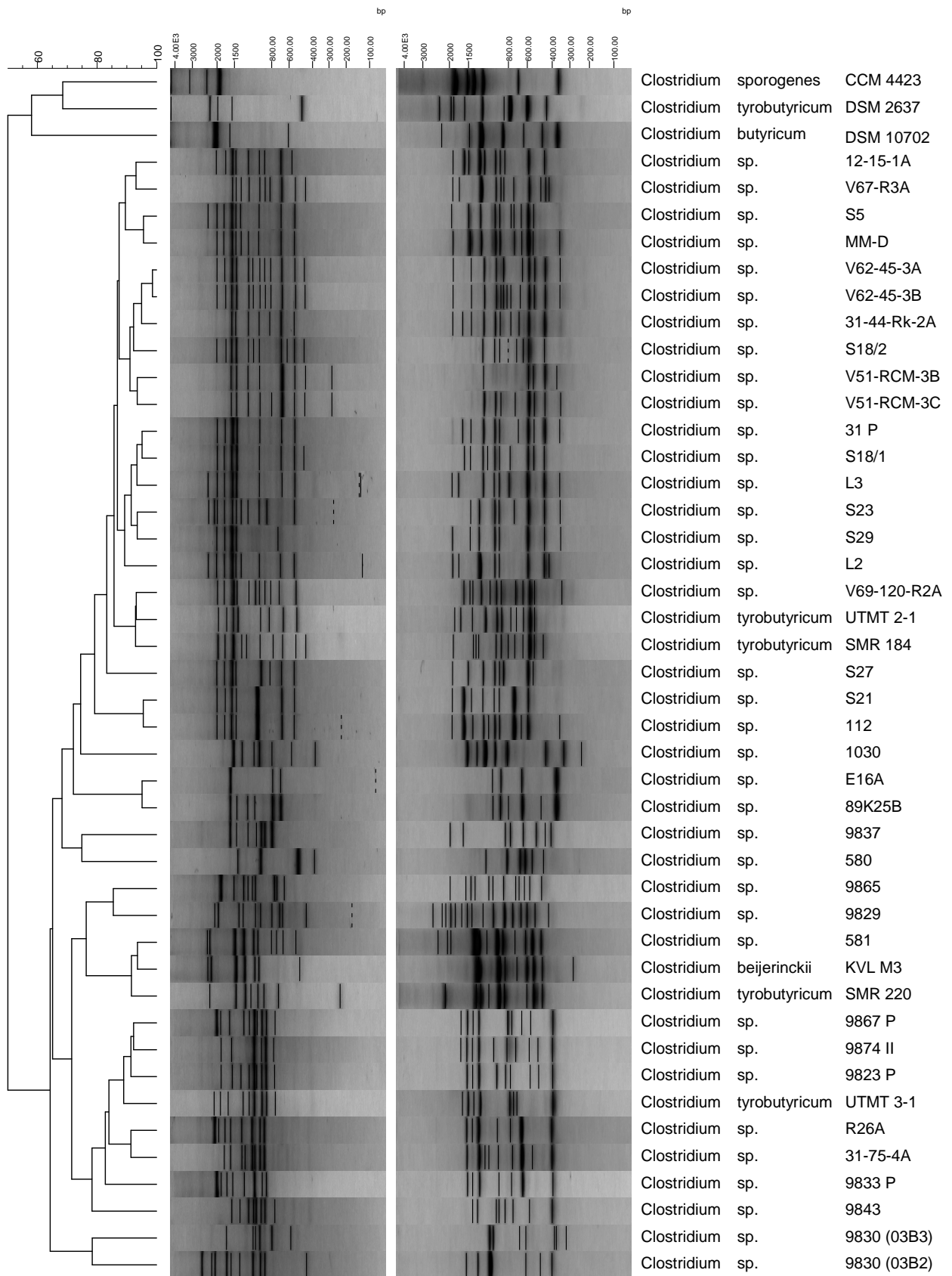
Obrázek 22 Fingerprintové profily a dendrogram 45 kmenů klostridií po amplifikaci s primerem Pr6



Tabulka 19 Rozdělení klostridií do skupin na základě dendrogramu sestrojeného z fingerprintových profilů po amplifikaci s primerem Pr6

Skupina	Hladina podobnosti (%)	Kmen	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)
I	80	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> SMR 184 <i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	V69-120-R2A, S5, MM-D, S27, L2, V67-R3A, S23, S29, V62-45-3A, V62-45-3B, V51-RCM-3C, 31 P, 31-44-Rk-2A, S18/1, L3, S18/2, V51-RCM-3B, 12-15-1A
II	97	<i>Clostridium beijerinckii</i> KVL M3	581
III	74	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	9867 P, 9874 II, 9823 P, R26A, 31-75-4A, 9833 P
IV	81	<i>Clostridium butyricum</i> DSM 10702 ^T	1030
V	nezařazeno		580, 9829, 9865, S21, 112, 9837, E16A, 89K25B, 9843, 9830 (03B3), 9830 (03B2)

Obrázek 23 Srovnání fingerprintových profilů a dendrogram 45 kmenů klostridií po amplifikaci s primerem Pr1 a Pr6



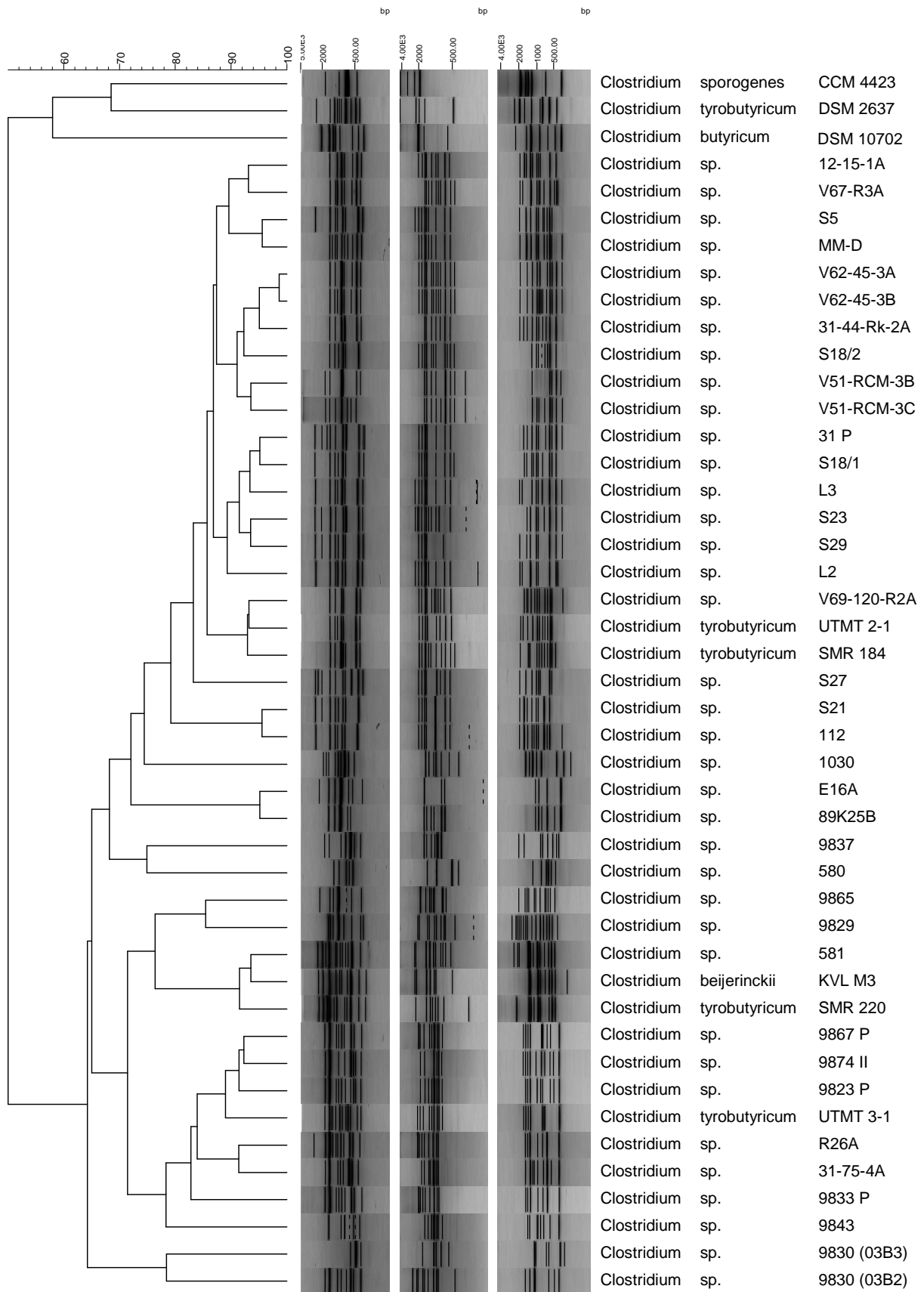
Tabulka 20 Rozdělení klostridií do skupin na základě dendrogramu sestrojeného z kombinace fingerprintových profilů po amplifikaci s primerem Pr1 a Pr6

Skupina	Hladina podobnosti (%)	Kmen	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)
I	88	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	9867 P, 9874 II, 9823 P, R26A, 31-75-4A, 9833 P
II	83	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 2-1 <i>Clostridium tyrobutyricum</i> SMR 184	12-15-1A, V67-R3A, S5, MM-D, V62-45-3A, V62-45-3B, 31-44-Rk-2A, S18/2, V51-RCM-3B, V51-RCM-3C, 31 P, S18/1, L3, S23, S29, L2, V69-120-R2A, S27
III	nezařazeno		S21, 112, 1030, E16A, 89K25B, 9837, 580, 9865, 9829, 581, 9843, 9830 (03B3), 9830 (03B2)

5.13 Komplexní srovnání fingerprintových profilů testovaných kmenů

Fingerprintové profily po amplifikaci postupně s primery (GTG)₅, Pr1 a Pr6 všech 45 testovaných kmenů byly srovnány mezi sebou. Na jejich základě byl sestrojen souhrnný dendrogram vyjadřující vzájemný stupeň příbuznosti (Obrázek 24).

Obrázek 24 Srovnání fingerprintových profilů a dendrogram 45 kmenů klostridií po amplifikaci s primerem (GTG)₅, Pr1 a Pr6



Tabulka 21 Rozdělení klostridií do skupin na základě dendrogramu sestaveného z kombinace fingerprintových profilů po amplifikaci s primerem (GTG)₅, Pr1 a Pr6

Skupina	Hladina podobnosti (%)	Kmen	Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)
I	83	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 2-1 <i>Clostridium tyrobutyricum</i> SMR 184	12-15-1A, V67-R3A, S5, MM-D, V62-45-3A, V62-45-3B, 31-44-Rk-2A, S18/2, V51-RCM-3B, V51-RCM-3C, 31 P, S18/1, L3, S23, S29, L2, V69-120-R2A, S27
II	82	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	9867 P, 9874 II, 9823 P, R26A, 37-75-4A, 9833 P
III	nezařazeno		S21, 112, 1030, E16A, 89K25B, 9837, 580, 9865, 9829, 581, 9843, 9830 (03B3), 9830 (03B2)

Na základě výsledků PCR se sadami specifických primerů pro druh *Clostridium tyrobutyricum* a *Clostridium butyricum* (Tabulka 13) spolu se všemi vyhodnocenými dendrogramy (Obrázky 20-24) byly jednotlivé kmeny klostridií zařazeny do druhů. Dílčí a celkové zařazení kmenů do druhů je v Tabulce 22.

Tabulka 22 Celkové zařazení 45 kmenů klostridií do druhů

Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Identifikace						
	Druhová	(GTG) ₅	Pr1	Pr6	Pr1-Pr6	(GTG) ₅ -Pr1-Pr6	Celková
9833 P	N	N	T81	T74	T88	T82	T
9867 P	N	N	T81	T74	T88	T82	T
9823 P	N	N	T81	T74	T88	T82	T
9874 II	N	N	T81	T74	T88	T82	T
9865	N	N	N	N	N	N	N
9843	N	T83	T81	N	N	N	N
9837	N	T83	T81	N	N	N	N
9860 (03B3)	N	N	T81	N	N	N	N
9875 (03B2)	N	T83	T81	N	N	N	N
9829	N	N	N	N	N	N	N
31 P	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
S18/1	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
S18/2	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
S23	T	T77	T89	T80	T83	T83	T

Txy zařazeno do druhu *Clostridium tyrobutyricum* na hladině podobnosti xy%

Bxy zařazeno do druhu *Clostridium butyricum* na hladině podobnosti xy%

Sxy zařazeno do druhu *Clostridium sporogenes* na hladině podobnosti xy%

Bexy zařazeno do druhu *Clostridium beijerinckii* na hladině podobnosti xy%

N nezařazeno

T zařazeno do druhu *Clostridium tyrobutyricum*

B zařazeno do druhu *Clostridium butyricum*

S zařazeno do druhu *Clostridium sporogenes*

- na zkoumaných hladinách podobnosti kolem sbírkových a typových kmenů nebyla vytvořena žádná skupina

Kmen (<i>Clostridium</i> sp.)	Identifikace						
	Druhov	(GTG) ₅	Pr1	Pr6	Pr1-Pr6	(GTG) ₅ -Pr1-Pr6	Celkov
S21	T	T77	T89	N	N	N	N
S29	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
S27	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
S5	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
E16A	B	N	N	N	N	N	N
R26A	N	N	T81	T74	T88	T82	T
L2	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
L3	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
112	T	T77	T89	N	N	N	N
580	T	T83	N	N	N	N	N
581	B	N	N	Be97	N	N	N
MM - D	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
89K25B	B	N	N	N	N	N	N
1030	N	S86	T89	B81	N	N	N
12-15-1A	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
31-44-Rk-2A	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
31-75-4A	N	T83	T81	T74	T88	T82	T
V51-RCM-3B	N	T77	T89	T80	T83	T83	T
V51-RCM-3C	N	T77	T89	T80	T83	T83	T
V62-45-3A	N	T77	T89	T80	T83	T83	T
V62-45-3B	N	T77	T89	T80	T83	T83	T
V67-R3A	N	T77	T89	T80	T83	T83	T
V69-120-R2A	N	T77	T89	T80	T83	T83	T
<i>butyricum</i> DSM 10702	B	-	-	B81	-	-	B
<i>beijerinckii</i> KVL M3	N	-	-	Be97	-	-	Be
<i>tyrobutyricum</i> SMR 184	T	T77	-	T80	T83	T83	T
<i>tyrobutyricum</i> SMR 220	T	-	-	-	-	-	T
<i>tyrobutyricum</i> UTMT 2-1	T	T77	T89	T80	T83	T83	T
<i>tyrobutyricum</i> UTMT 3-1	T	T83	T81	T74	T88	T82	T
<i>sporogenes</i> CCM 4423	N	S86	-	-	-	-	S
<i>tyrobutyricum</i> DSM 2637 ^T	T	T83	-	-	-	-	T

Txy zařazeno do druhu *Clostridium tyrobutyricum* na hladině podobnosti xy%

Bxy zařazeno do druhu *Clostridium butyricum* na hladině podobnosti xy%

Sxy zařazeno do druhu *Clostridium sporogenes* na hladině podobnosti xy%

Bexy zařazeno do druhu *Clostridium beijerinckii* na hladině podobnosti xy%

N nezařazeno

T zařazeno do druhu *Clostridium tyrobutyricum*

B zařazeno do druhu *Clostridium butyricum*

S zařazeno do druhu *Clostridium sporogenes*

- na zkoumaných hladinách podobnosti kolem sbírkových a typových kmenů nebyla vytvořena řádná skupina

5.14 Stanovení vlastností kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18)

5.14.1 Ověření čistoty bakteriální kultury

Na základě předběžných experimentů [71] byl pro další zkoumání vybrán kmen *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18). U tohoto kmene byla opětovně potvrzena jeho čistota a identita. Metodou desítkového ředění byla připravena řada ředění do $1 \cdot 10^{-4}$. Bakteriální kultura byla ředěna sterilním médiem CM0149. Z ředění $1 \cdot 10^{-4}$ bylo odebráno 50 μl kultury a rozetřeno očkovací kličkou po celé ploše pevného média na Petriho misce. Po 36 hodinách byla kultivace v anaerostatu s anaerobní atmosférou typu A/N (kapitola 4.2.6.2) ukončena a výsledek zdokumentován digitálním fotoaparátem. Identita kmene byla dále potvrzena pomocí PCR s hrubým lyzátem a primery specifickým pro rod *Clostridium* (Obrázek 26).

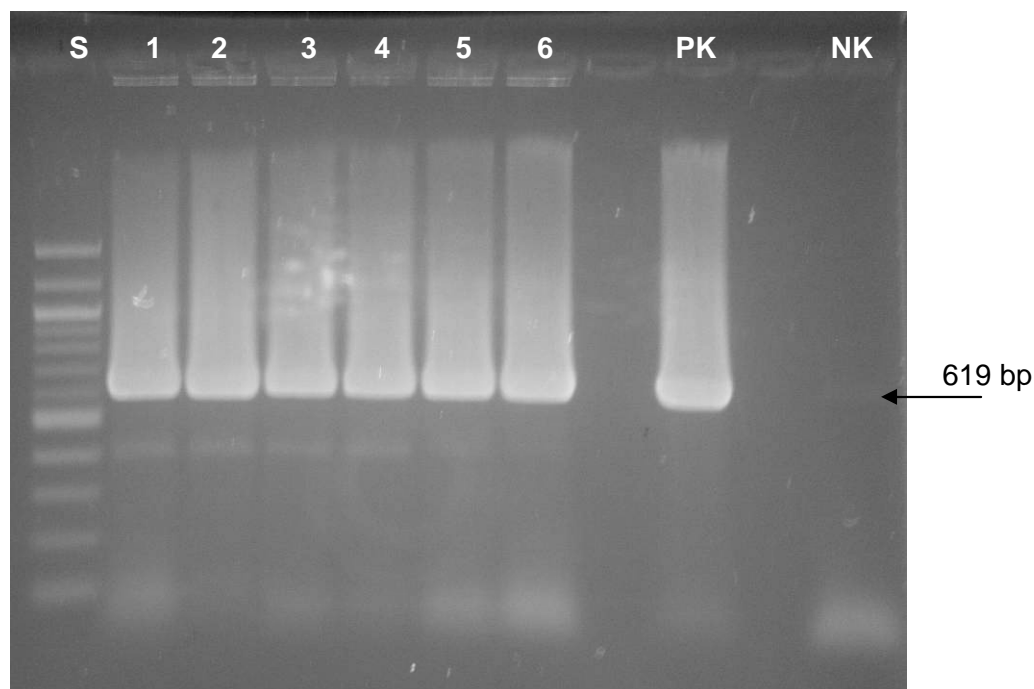
Obrázek 25 Kolonie bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18)



Na Petriho miskou nanášeno 50 μl kultury z ředění $1 \cdot 10^{-4}$.

Do směsi pro PCR se specifickými primery pro rod *Clostridium* jako DNA matrice byl použit hrubý lyzátní buněk kultivovaných v médiu CM0149 s různou počáteční koncentrací laktózy. Hrubý lyzátní byl získán zahřátím buněk 30 min při 99 $^{\circ}\text{C}$ (kapitola 4.2.4). Amplifikace probíhala podle programu *Clost.* uvedeného v Tabulce 6. Jako pozitivní kontrola byla použita purifikovaná DNA typového kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T o koncentraci 10 ng/ μl . Výsledky PCR s hrubým lyzátem jsou uvedeny v Tabulce 23 a na Obrázku 26.

Obrázek 26 Agarózová gelová elektroforéza produktů rodově specifické PCR s hrubým lyzátem buněk (619 bp)



Na 1,8% gel bylo naneseno 25 μ l směsi pro PCR.

Tabulka 23 Výsledky PCR s hrubým lyzátem buněk

Běh	Buňky z média s laktózou (mM)	Detekce amplikonu (619 bp)
1	5	+++
2	10	+++
3	50	+++
4	100	+++
5	200	+++
6	400	+++

Ve stanovených časových intervalech byly prováděny odběry jednotlivých zkumavek s bakteriální kulturou. Při každém odběru byla posuzována přítomnost zákalu, sedimentu a bublinek plynů. Dále byla změřena absorbance při 600 nm a po centrifugaci bylo stanoveno pH supernatantu. Uváděné hodnoty absorbance (A_{600nm}) jsou průměrem hodnot vynásobených použitým ředěním dvou paralelních stanovení.

5.14.2 Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při různých teplotách

Kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla provedena při teplotě 37 $^{\circ}$ C v termostatu a při laboratorní teplotě, která se pohybovala v intervalu (20-23 $^{\circ}$ C).

Jako zdroj uhlíku v tekutém živném médiu CM0149 byla použita laktóza o koncentraci 5 % (hm).

Počáteční pH média bez cukru bylo upraveno na pH 5,6 (pH blízké reálnému vzorku pH sladké syrovátky). Autoklávováním poklesla hodnota pH o 0,2 a po přidání inokula došlo k dalšímu poklesu o 0,2 jednotky.

Výsledky sledování růstu buněk a změny pH během celé doby kultivace je shrnuto v Tabulce 24. Grafické znázornění vybraných sledovaných parametrů v průběhu kultivace je znázorněno v grafech (Graf 1, Graf 2, Graf 3).

Tabulka 24 Kultivace bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) na médiu s laktózou při různých teplotách

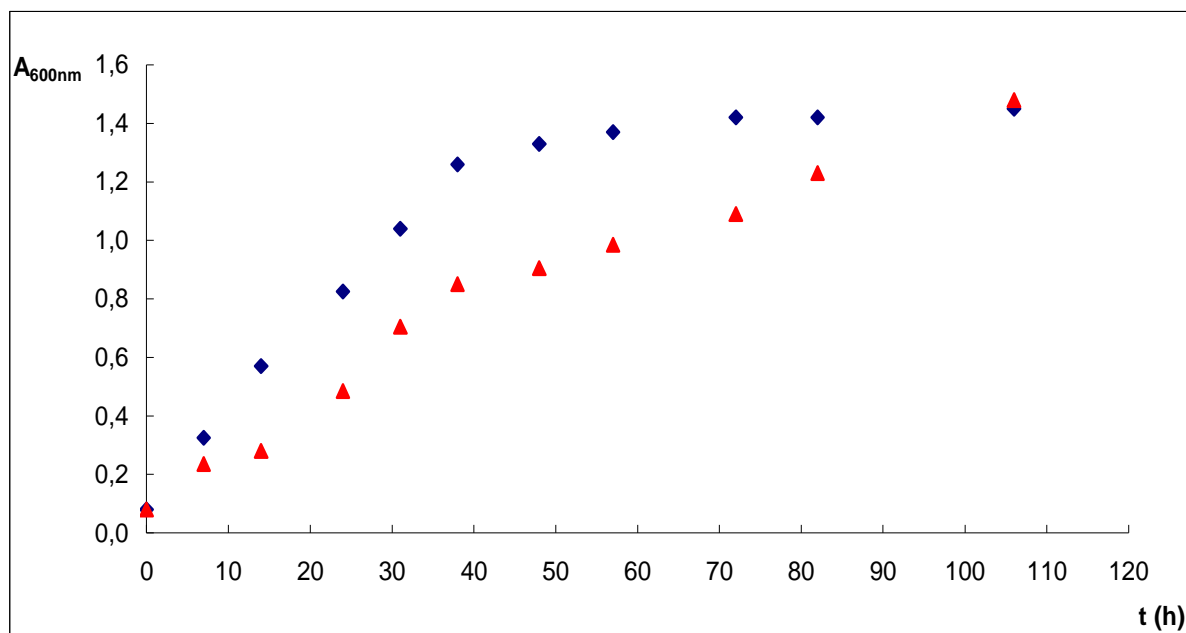
Teplota kultivace (°C)	37			LT		
	A _{600nm}	μ (h ⁻¹)	pH	A _{600nm}	μ (h ⁻¹)	pH
0	0,08	-	5,2	0,08	-	5,2
7	0,33	0,200	5,2	0,24	0,154	5,3
14	0,57	0,140	5,1	0,28	0,089	5,1
24	0,83	0,097	4,5	0,49	0,075	4,8
31	1,04	0,060	4,2	0,71	0,070	4,6
38	1,26	0,054	4,0	0,85	0,062	4,4
48	1,33	0,044	3,9	0,91	0,051	4,2
57	1,37	0,038	4,0	0,99	0,044	4,1
72	1,42	0,030	4,1	1,09	0,027	4,0
82	1,42	0,027	4,2	1,23	0,025	4,0
106	1,45	0,021	4,0	1,48	0,021	3,9

LT = 20-23 °C

A_{600nm} absorbance při 600 nm

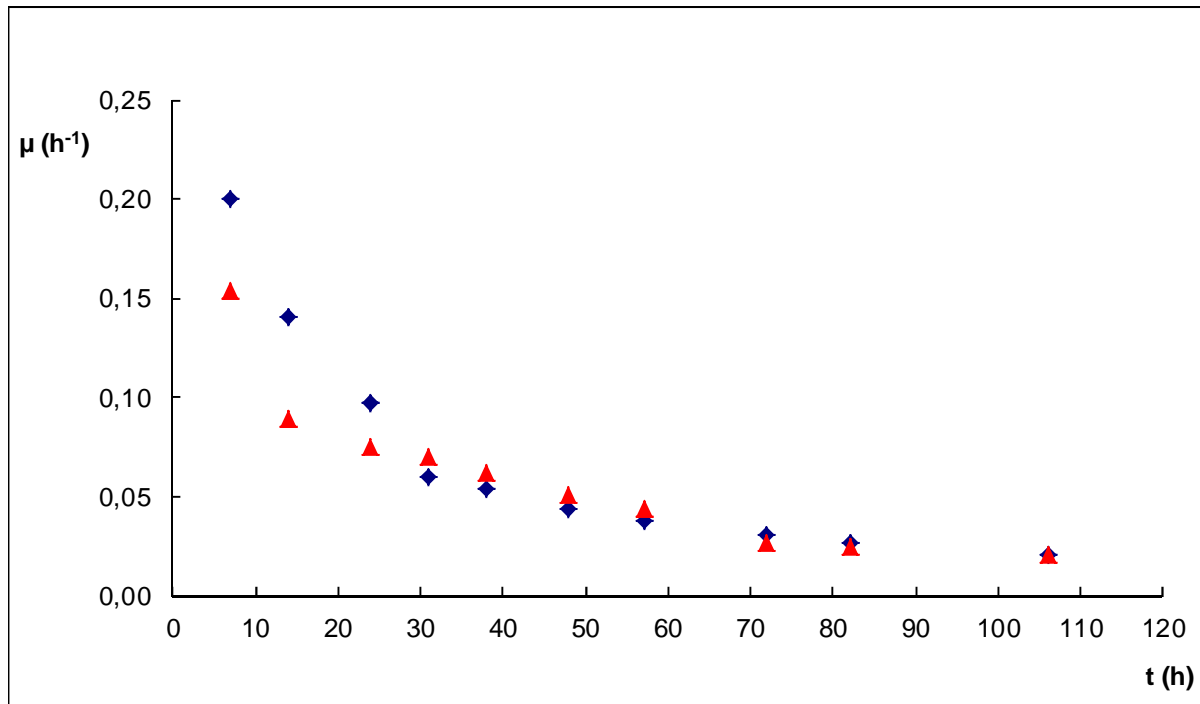
μ měrná rychlost růstu (h⁻¹)

Graf 1 Závislost změny absorbance A_{600nm} kultury *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) v závislosti na době kultivace při 37 °C (modrá značka) a při laboratorní teplotě (červený trojúhelník)

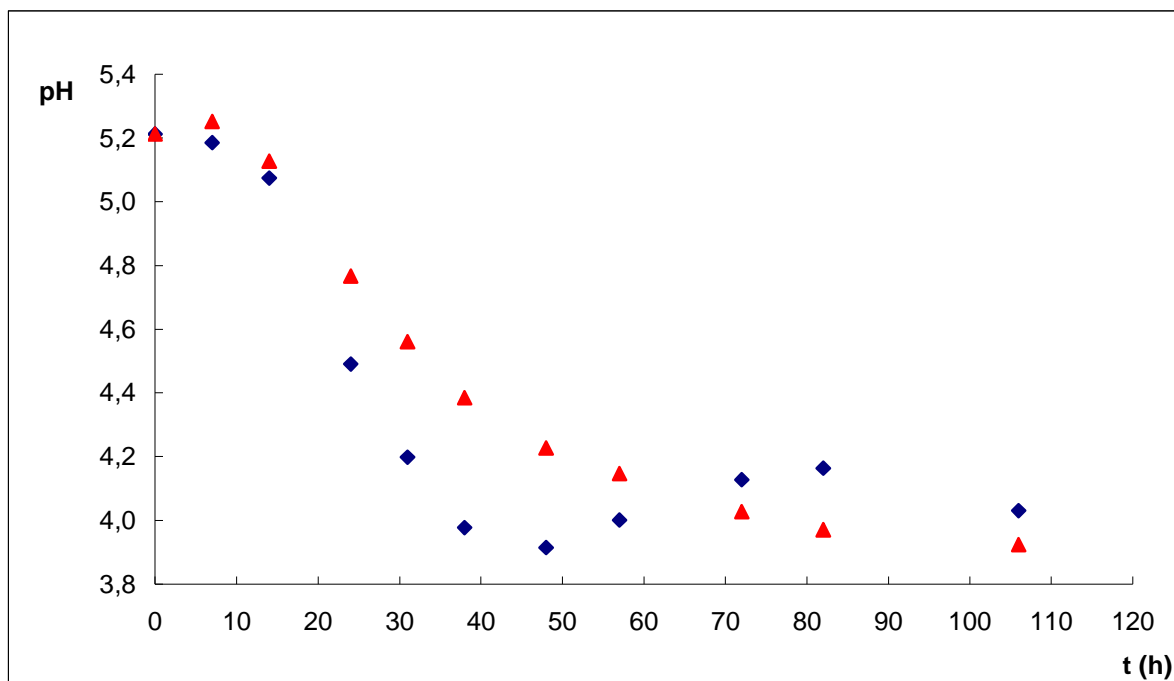


Jako substrát byla použita laktóza.

Graf 2 Měrná růstová rychlost kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) na laktóze při 37 °C (modrá značka) a při laboratorní teplotě (červený trojúhelník)



Graf 3 Závislost změny hodnot pH média při kultivaci kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) v závislosti na době kultivace při 37 °C (modrá značka) a při laboratorní teplotě (červený trojúhelník)



5.14.3 Kultivace v tekutém médiu CM0149 se syrovátkou při různých teplotách

Kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla provedena při teplotě 37 °C v termostatu a při laboratorní teplotě, která se pohybovala v intervalu (20-23 °C).

V obou experimentech (37 °C a 20-23 °C) byla zvolena anaerobní atmosféra typu PO (kapitola 4.2.6.2). V paralelním pokusu kultivace na vodní lázni s průběžným sledováním tvorby plynů byla anaerobní atmosféra typu MA/N (kapitola 4.2.6.2).

Jako zdroj uhlíku v tekutém živném médiu CM0149 byla použita syrovátka o výsledné koncentraci laktózy 5 % (hm).

Počáteční pH média bez cukru bylo totožné s hodnotou pH média pro kultivaci stejného kmene na laktóze za stejných podmínek (kapitola 5.14.2). Autoklávováním došlo k poklesu pH média z hodnoty 5,6 o 0,2 jednotky. Přidáním roztoku syrovátky s pH přibližně 6,1 došlo k nárůstu o 0,1 jednotky. Po přidání inokula pH opět pokleslo o 0,1 jednotky na výslednou hodnotu 5,3. Průběh změn pH přehledně vyjadřuje Tabulka 25.

Tabulka 25 Změny hodnot pH při manipulaci s médiem

Médium		pH
médium bez cukru	před autoklávováním	5,6
	po autoklávování	5,4
médium se syrovátkou		5,5
zaočkované médium se syrovátkou		5,3

Veškeré výsledky sledování růstu buněk a změny pH během celé doby kultivace je shrnuto v tabulce a zpracováno v grafické podobě (Tabulka 26, Graf 4, Graf 5, Graf 6).

Tabulka 26 Kultivace bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) na médiu se syrovátkou při různých teplotách

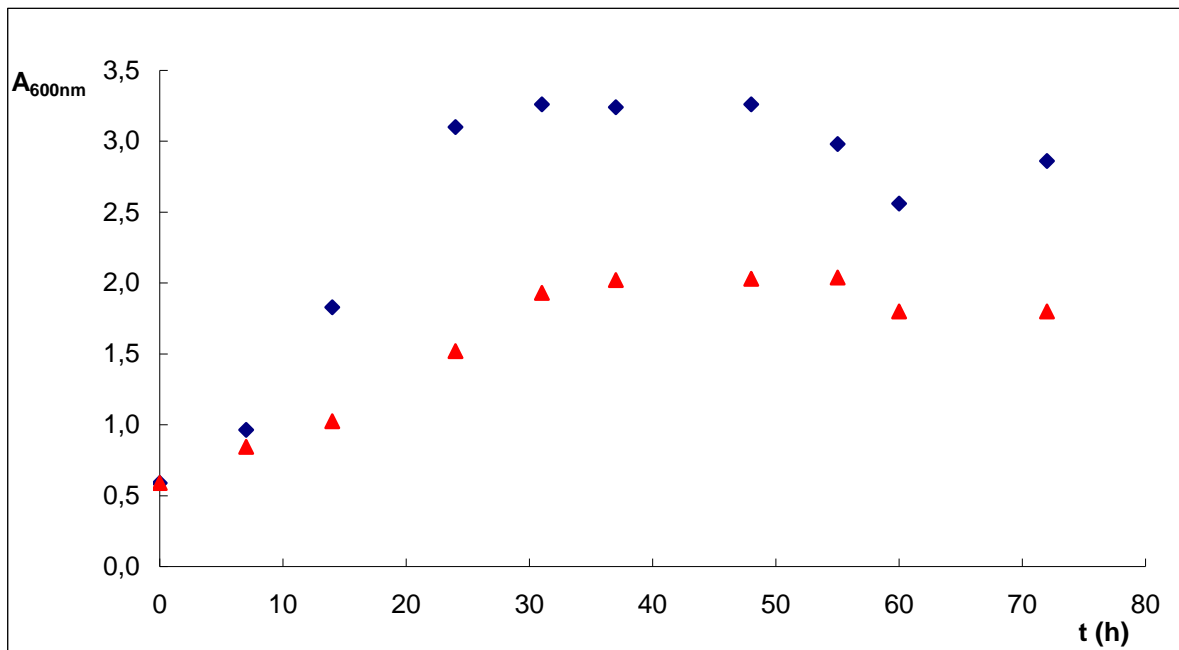
Teplota kultivace (°C)	37			LT		
	A _{600nm}	μ (h ⁻¹)	pH	A _{600nm}	μ (h ⁻¹)	pH
0	0,59	-	5,3	0,59	-	5,3
7	0,97	0,070	5,1	0,85	0,051	5,2
14	1,83	0,031	4,5	1,03	0,039	5,2
24	3,10	0,011	3,9	1,52	0,011	4,6
31	3,26	0,010	3,8	1,93	0,016	4,5
37	3,24	0,009	3,7	2,02	0,015	4,2
48	3,26	0,007	3,7	2,03	0,011	4,2
55	2,98	0,004	3,7	2,04	-0,003	4,1
60	2,56	0,001	3,7	1,80	-0,005	4,0
72	2,86	0,003	3,9	1,80	-0,004	4,1

LT = 20-23 °C

A_{600nm} absorpance při 600 nm

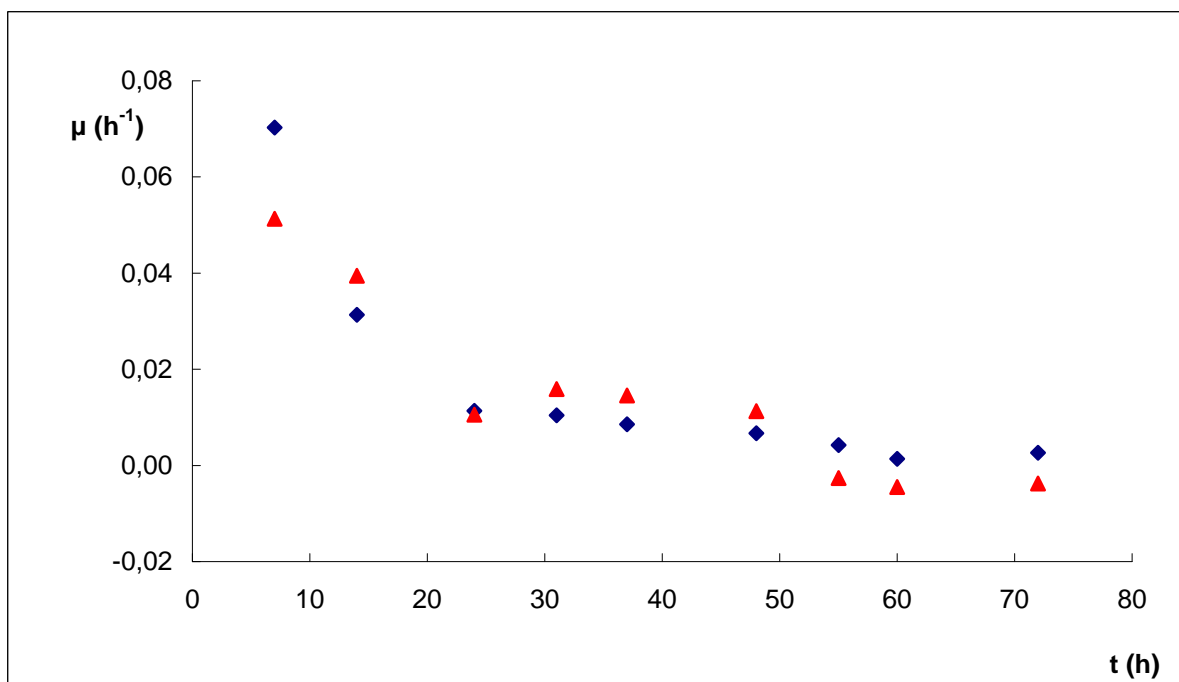
μ měrná rychlost růstu (h⁻¹)

Graf 4 Závislost změny absorbance $A_{600\text{nm}}$ kultury *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) v závislosti na době kultivace při 37 °C (modrá značka) a při laboratorní teplotě (červený trojúhelník)

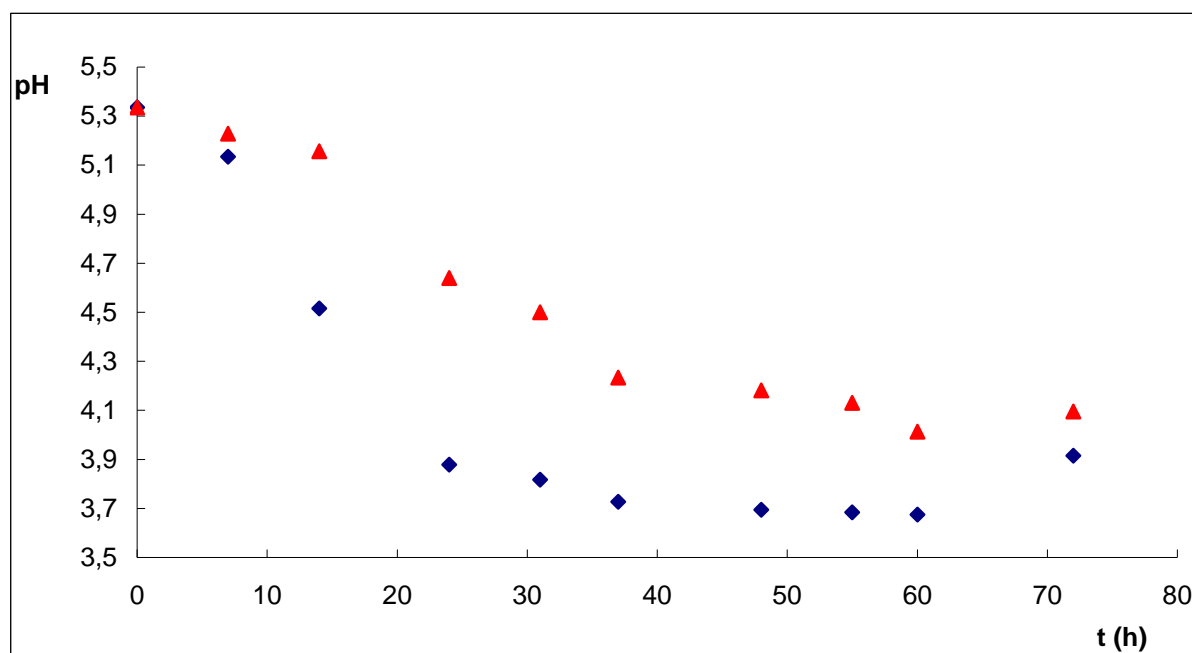


Jako substrát byla použita syrovátka.

Graf 5 Měrná růstová rychlost kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) na syrovátce při 37 °C (modrá značka) a při laboratorní teplotě (červený trojúhelník)



Graf 6 Závislost změny hodnot pH média při kultivaci kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) v závislosti na době kultivace při 37 °C (modrá značka) a při laboratorní teplotě (červený trojúhelník)



5.14.4 Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při 37 °C v závislosti na počáteční hodnotě pH

Kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla provedena při teplotě 37 °C v termostatu, kdy byla zvolena anaerobní atmosféra typu PO (kapitola 4.2.6.2). V paralelním pokusu kultivace na vodní lázni s průběžným sledováním tvorby plynů byla anaerobní atmosféra typu ZA/N (kapitola 4.2.6.2). Jako sacharidický zdroj v tekutém živném médiu CM0149 byla laktóza. Počáteční hodnoty pH média byly 4,0 až 8,0 se vzrůstem pH o 0,5 jednotky. Po ukončení kultivace byla stanovena výsledná hodnota pH.

Výsledky sledování růstu buněk během doby kultivace jsou shrnuty v Tabulce 27. Průběh změn pH je zobrazen v Grafu 7.

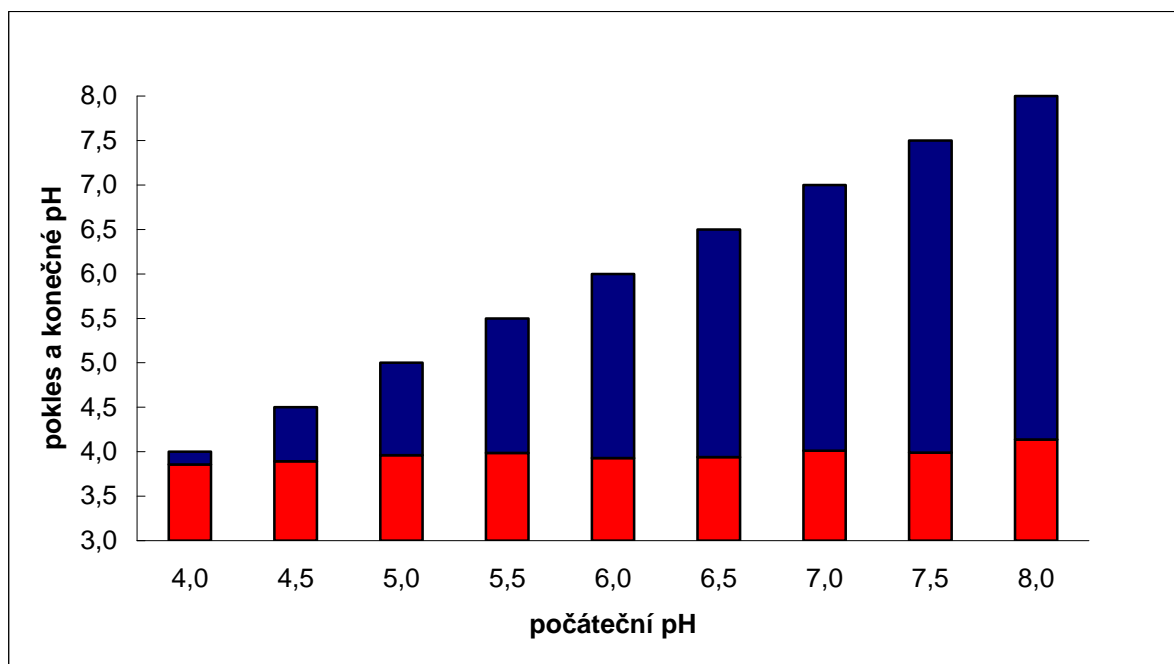
Tabulka 27 Kultivace bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) na laktóze v závislosti na hodnotě pH (absorbance A_{600nm})

Doba kultivace (h)/pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
0	0,08	0,08	0,10	0,09	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09
6	0,26	0,32	0,28	0,26	0,28	0,28	0,29	0,27	0,34
12	0,32	0,40	0,42	0,49	0,41	0,55	0,53	0,50	0,62
23	0,42	0,68	0,84	0,99	1,23	1,15	1,25	1,28	1,33
30	0,41	0,72	0,94	0,96	1,38	1,25	1,48	1,53	1,45
34	0,55	0,85	0,96	1,18	1,31	1,46	1,36	1,48	1,56
47	0,62	1,13	1,16	1,38	1,35	1,54	1,55	1,58	1,86
54	0,54	1,14	1,02	1,12	1,23	1,20	1,31	1,31	1,58
60	0,56	1,09	1,01	1,24	1,32	1,24	1,34	1,35	1,53
72	0,60	0,86	1,08	1,11	1,22	1,34	1,54	1,49	1,71

Tabulka 28 Srovnání počátečních a konečných hodnot pH

Doba kultivace (h)/pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
0	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
72	3,9	3,9	4,0	4,0	3,9	3,9	4,0	4,0	4,1
Δ pH	0,1	0,6	1,0	1,5	2,1	2,6	3,0	3,5	3,9

Graf 7 Srovnání počátečních a konečných hodnot pH



5.14.5 Kultivace v tekutém médiu CM0149 se syrovátkou při 37 °C v závislosti na počáteční hodnotě pH

Kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla provedena při teplotě 37 °C v termostatu, kdy byla zvolena anaerobní atmosféra typu PO (kapitola 4.2.6.2). V paralelním pokusu kultivace na vodní lázni s průběžným sledováním tvorby plynu byla anaerobní atmosféra typu ZA/N (kapitola 4.2.6.2).

Jako sacharidický zdroj v tekutém živném médiu CM0149 byla syrovátka s výslednou koncentrací laktózy 5 % (hm).

Počáteční hodnoty pH média byly 4,0 až 8,0 se vzrůstem o 0,5 jednotky. Po ukončení kultivace bylo stanoveno pH supernatantu. Pokles pH vystihuje Graf 8.

Výsledky sledování růstu buněk jsou shrnuty v Tabulce 29.

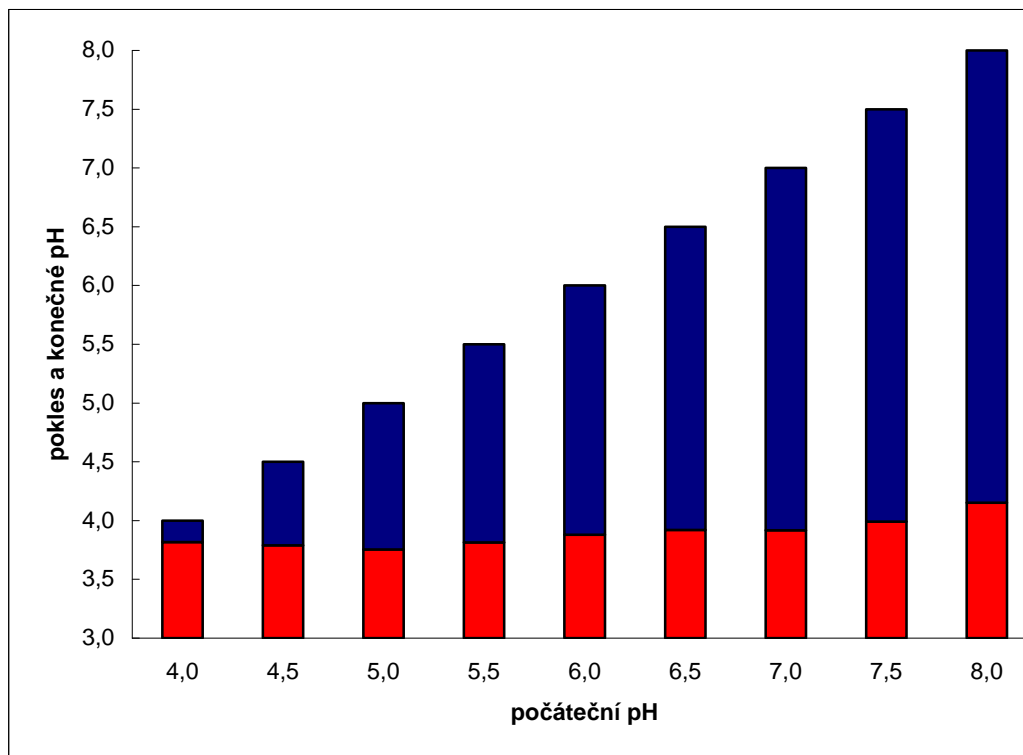
Tabulka 29 Kultivace bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) na syrovátce v závislosti na hodnotě pH (absorbance A_{600nm})

Doba kultivace (h)/pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
0	0,41	0,56	0,54	0,70	1,49	1,68	1,31	1,02	0,70
6	0,55	0,56	0,65	0,94	1,74	1,95	1,66	1,72	1,32
10	0,55	0,76	0,84	1,12	1,74	1,69	1,57	1,48	1,07
23	1,19	1,39	1,68	2,36	3,50	3,52	3,60	3,62	3,48
29	1,39	1,50	1,89	2,94	3,58	3,52	3,92	3,42	3,30
33	1,47	1,54	1,78	2,36	3,74	3,66	3,44	3,36	3,40
46	1,73	1,54	1,84	2,72	3,84	4,40	3,94	3,80	3,62
52	1,39	1,60	1,93	2,74	3,32	3,64	3,16	3,50	3,10
58	1,23	1,68	1,91	3,10	3,60	3,70	3,58	3,62	3,26
72	1,01	1,56	1,79	2,74	3,08	3,34	3,46	3,48	3,56

Tabulka 30 Srovnání počátečních a konečných hodnot pH

Doba kultivace (h)/pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
0	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
72	3,8	3,8	3,8	3,8	3,9	3,9	3,9	4,0	4,2
Δ pH	0,2	0,7	1,2	1,7	2,1	2,6	3,1	3,5	3,8

Graf 8 Srovnání počátečních a konečných hodnot pH



5.14.6 Kultivace v tekutém médiu CM0149 při 37 °C v závislosti na po čáteční koncentraci laktózy

Kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla provedena při teplotě 37 °C v termostatu, kdy byla zvolena anaerobní atmosféra typu PO (kapitola 4.2.6.2). V paralelním pokusu kultivace s průběžným sledováním tvorby plynů byla zvolena anaerobní atmosféra typu ZA/N (kapitola 4.2.6.2).

Sacharidickým zdrojem v tekutém živném médiu CM0149 byla laktóza. Pro zjištění vlivu koncentrace substrátu na růst buněk a tvorbu plynů byly podle Almarsdottir a kol. [5] zvoleny tyto výchozí koncentrace laktózy v médiu: 5, 10, 50, 100, 200 a 400 mM. Po ukončení kultivace byla stanovena konečná hodnota pH supernatantu.

Veškeré výsledky sledování růstu buněk během celé doby kultivace jsou shrnuty v Tabulce 31.

Tabulka 31 Hodnoty absorbance (A_{600nm}) v průběhu kultivace bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) při 37 °C na laktóze v závislosti na její po čáteční koncentraci

Doba kultivace (h)	A_{600nm} /koncentrace (mM)					
	5	10	50	100	200	400
0	0,13	0,12	0,12	0,10	0,10	0,08
5	0,36	0,28	0,27	0,25	0,22	0,18
11	0,87	0,81	0,73	0,61	0,30	0,20
23	1,41	1,48	1,17	0,82	0,60	0,59
29	1,45	1,36	1,35	0,97	0,87	0,70
37	1,04	1,02	1,09	1,33	1,23	0,91
47	0,90	0,90	1,12	1,33	1,38	1,31
53	0,80	0,80	1,06	1,30	1,39	1,38
59	0,79	0,82	1,11	1,33	1,39	1,44
72	0,70	0,71	0,92	1,28	1,31	1,38

Tabulka 32 Hodnoty pH v průběhu kultivace bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) při 37 °C na laktóze v závislosti na její po čáteční koncentraci

Doba kultivace (h)	pH/koncentrace laktózy (mM)					
	5	10	50	100	200	400
0	6,1	6,1	6,1	6,1	6,0	6,0
5	6,1	6,0	6,0	6,0	5,8	5,9
11	6,3	6,3	6,4	6,4	6,0	6,0
23	6,7	6,8	6,7	6,7	6,5	6,3
29	6,8	6,7	6,7	6,7	6,7	6,4
37	6,7	6,7	6,8	6,6	6,7	6,7
47	6,8	6,8	7,0	7,0	6,9	6,8
53	6,9	6,8	7,2	7,1	7,0	6,9
59	6,9	6,8	7,1	7,1	7,0	7,0
72	7,1	7,1	7,3	7,2	7,3	7,0

5.14.7 Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při optimální hodnotě pH a různých teplotách

Kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla provedena při teplotě 37 °C v termostatu a při optimální hodnotě pH pro růst buněk (6,5). Přidáním inokula pH pokleslo o 0,1 jednotky.

V sérii zkumavek pro jednotlivé odběry byla zvolena anaerobní atmosféra typu PO (kapitola 4.2.6.2). V paralelním pokusu kultivace ve zjednodušených aparaturách na vodní lázni s průběžným sledováním tvorby plynů byla anaerobní atmosféra typu MA/N (kapitola 4.2.6.2).

Jako sacharidický zdroj v tekutém živném médiu CM0149 byla laktóza o koncentraci 5 % (hm). Médium bylo zaočkováno 3 % inokula stáří 15 hodin.

Veškeré výsledky sledování růstu buněk a změny pH během celé doby kultivace je shrnuto v tabulce a zpracováno do grafů (Tabulka 33, Graf 9, Graf 10, Graf 11).

Tabulka 33 Kultivace bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) na médiu s laktózou při optimálním pH, 37 °C a za laboratorní teploty (LT = 20-23 °C)

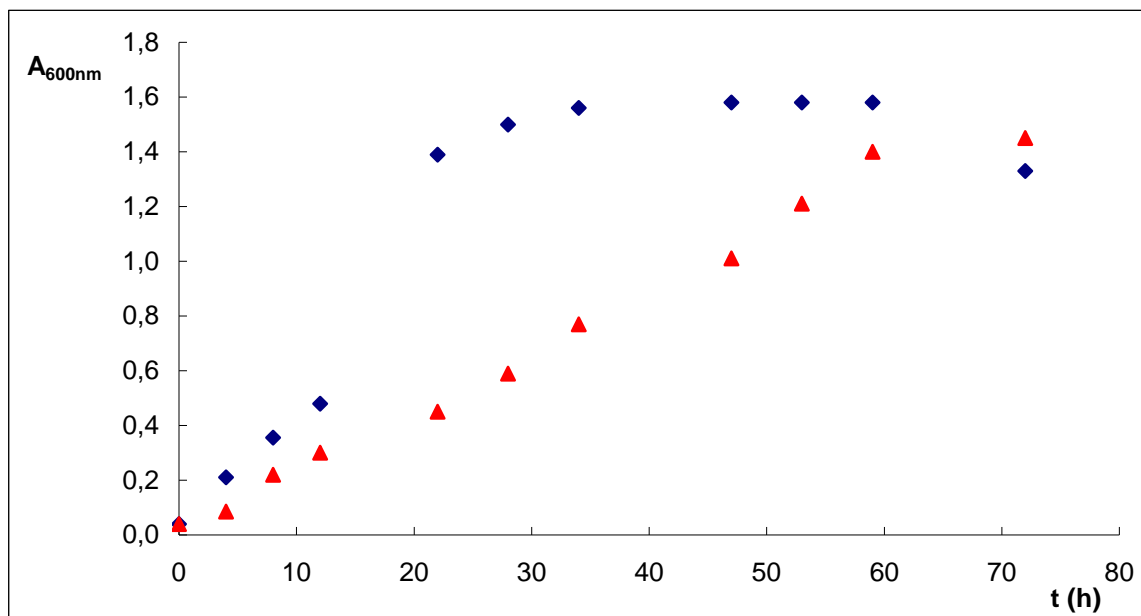
Teplota kultivace (°C)	37			LT		
	Doba kultivace (h)	A _{600nm}	μ (h ⁻¹)	pH	A _{600nm}	μ (h ⁻¹)
0	0,04	-	6,4	0,04	-	6,4
4	0,21	0,415	5,8	0,09	0,188	6,2
8	0,36	0,273	5,6	0,22	0,213	5,8
12	0,48	0,207	5,3	0,30	0,168	5,7
22	1,39	0,130	4,4	0,45	0,110	5,3
28	1,50	0,105	4,2	0,59	0,096	5,1
34	1,56	0,087	4,1	0,77	0,087	4,9
47	1,58	0,063	4,1	1,01	0,069	4,6
53	1,58	0,056	4,1	1,21	0,051	4,5
59	1,58	0,051	4,1	1,40	0,049	4,4
72	1,33	0,039	4,0	1,45	0,040	4,3

LT = 20-23 °C

A_{600nm} absorbance při 600 nm

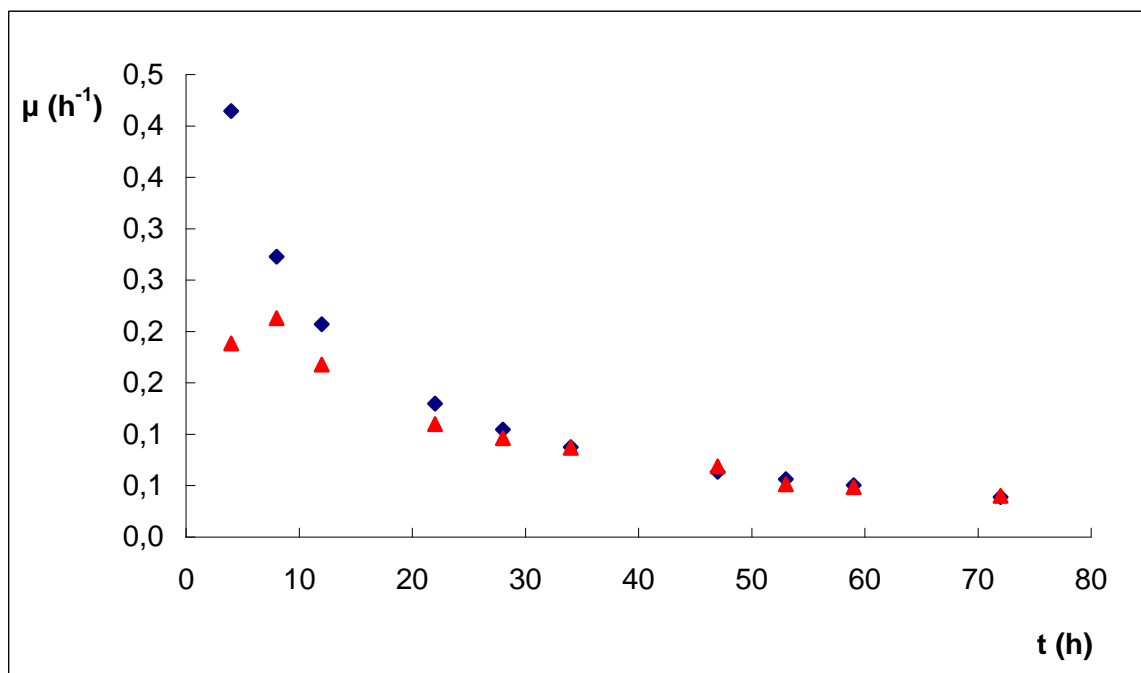
μ měrná rychlost růstu (h⁻¹)

Graf 9 Závislost absorbance $A_{600\text{nm}}$ kultury *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) v závislosti na době kultivace při optimálním pH a při 37 °C a laboratorní teplotě

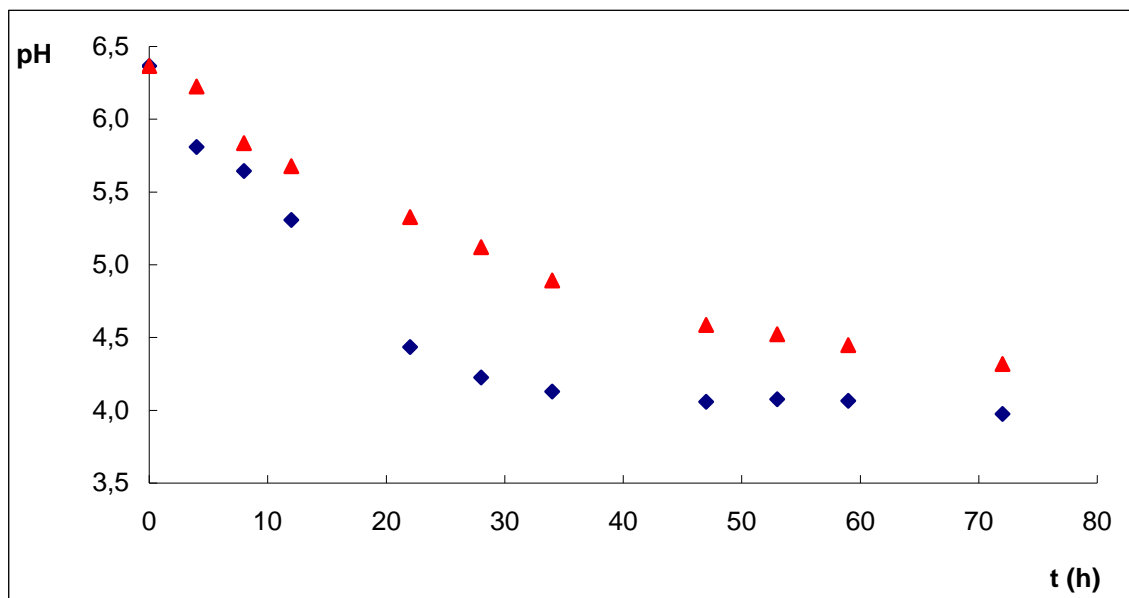


Jako substrát byla použita laktóza.

Graf 10 Měrná růstová rychlost kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) při 37 °C a při laboratorní teplotě



Graf 11 Závislost změny hodnot pH kultury *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) v závislosti na době kultivace na médiu při optimálním pH a při 37 °C a laboratorní teplotě



6. DISKUZE

6.1 PCR s univerzálními primery pro doménu *Bacteria*

Ve všech vzorcích byla kromě chromosomální DNA izolována i RNA a plazmidová DNA. U všech vzorků s výjimkou *Clostridium* sp. 9843 (6), *C. sp.* 9860 (03B3) (8), *C. sp.* S18/2 (13), *C. sp.* E16A (19), *C. sp.* 580 (24) bylo detegováno relativně velké množství DNA (Obrázek 9).

Pro amplifikaci genů charakteristických pro doménu *Bacteria* byly použity univerzální primery F_eub a R_eub [62]. Ve směsi pro PCR (Tabulka 4) bylo použito 10 ng DNA matrice a separace byla prováděna na 1,8% gelu.

U všech kmenů bylo zjištěno, že izolovaná DNA je amplifikovatelná. Důkazem toho jsou PCR produkty o velikosti přibližně 470 bp. U kmenů *C. sp.* 9865 (5), *C. sp.* 9829 (10), *C. sp.* 580 (24), *C. sp.* 581 (25), *C. butyricum* DSM 10702^T (38), *C. beijerinckii* KVL M3 (39) a *C. tyrobutyricum* SMR 220 (41) byl amplifikován úsek asi o 50 bp kratší, než u zbývajících. U kmenů *Clostridium* sp. S18/1 (12), *C. sp.* 581 (25) a *C. tyrobutyricum* SMR 220 (41) byl navíc amplifikován úsek, který není charakteristický pro doménu *Bacteria*. Velikost nespecifického produktu byla přibližně 1 600 bp. Na základě fingerprintových profilů výše zmíněných kmenů bude vyhodnocen stupeň podobnosti společných vlastností.

6.2 PCR s rodově specifickými primery *Clostridium*

DNA všech 44 kmenů byla testována na přítomnost genů společných pro rod *Clostridium* pomocí rodově specifických primerů, jejichž sekvence je uvedena v Tabulce 5. Během PCR se amplifikuje úsek DNA o velikosti 619 bp [63]. Ve všech běžích kromě běhů č. 2, 4-10, 31 a 33 byl detegován specifický produkt PCR (Obrázek 11).

Bylo předpokládáno, že kmene *Clostridium* sp. 9833 P (1), *C. sp.* 9867 P (2), *C. sp.* 9823 P (3), *C. sp.* 9874 II (4), *C. sp.* 9865 (5), *C. sp.* 9843 (6), *C. sp.* 9837 (7), *C. sp.* 9860 (03B3) (8), *C. sp.* 9875 (03B2) (9), *C. sp.* 9829 (10), *C. sp.* R26A (20), *C. sp.* 580 (24), *C. sp.* 31-75-4A (31), *C. sp.* V51-RCM-3C (33), *C. tyrobutyricum* UTMT 3-1 (43) a *C. sporogenes* CCM 4423 (44) obsahují inhibitory PCR. Snížení aktivity těchto inhibitorů je možné zředěním matrice DNA natolik, že aktivita inhibitorů neovlivňuje PCR. To se osvědčilo při desetinásobném zředění matrice DNA (1 ng/μl) u kmenů *Clostridium* sp. 9833 P (1), *C. sp.* 9867 P (2), *C. sp.* R26A (20), *C. sp.* 31-75-4A (31), *C. sp.* V51-RCM-3C (33). V případě PCR provedené s DNA o koncentraci 100 pg/μl nebyl kromě vzorku *Clostridium* sp. V51-RCM-3C (33) detegován žádný PCR produkt.

Zároveň byl ověřen vliv ředění DNA na eliminaci vlivu inhibitorů u DNA izolované kmene *Clostridium* sp. 9865 (5) (kapitola 5.4). S rostoucím ředěním matrice DNA použité do směsi pro PCR množství amplikonů detegovatelných na gelu rostlo, zatímco v případě použití DNA kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T množství amplikonů klesalo. Byl tak potvrzen předpoklad, že vzorek obsahoval inhibitory PCR a ředěním DNA byly ředěny i přítomné inhibitory.

Druhým možným řešením pro zařazení testovaných kmenů do rodu *Clostridium* bylo použití bohatší směsi pro PCR (Tabulka 4), kde bylo aplikováno 5 μl koncentrované DNA. Toto uspořádání se osvědčilo zejména u kmenů *Clostridium* sp. 9860 (03B3) (8) a *Clostridium* sp. 9829 (10), u nichž použití optimálního složení směsi pro PCR a ředění DNA pro zředění přítomných inhibitorů bylo nedostačující (Obrázek 12). Všechny testované kmene byly zařazeny do rodu *Clostridium*.

Pomocí desítkového ředění byla získána řada vzorků DNA, které byly použity jako matrice DNA do rodově specifické PCR pro rod *Clostridium*. V tomto experimentu byla zjištěna citlivost rodově specifické PCR na 100 fg/μl (Obrázek 13).

6.3 Zařazení testovaných kmenů do druhu *C. tyrobutyricum* a *C. butyricum*

Analýzou souboru 44 kmenů klostridií bylo 19 z nich zařazeno do druhu *Clostridium tyrobutyricum* (Tabulka 13). Při PCR se specifickými primery pro druh *Clostridium tyrobutyricum* byl amplifikován úsek o velikosti 233 bp [66]; při použití specifických primerů pro druh *Clostridium butyricum* (262 bp) nebyl detegován žádný produkt PCR (Obrázek 14 a Obrázek 15). Do druhu *Clostridium butyricum* byly zařazeny kmeny *Clostridium* sp. E16A (19), *C. sp.* 581 (25) a *C. sp.* 89K25B. Při PCR se specifickými primery se amplifikoval jak charakteristický úsek pro druh *Clostridium butyricum* o velikosti 262 bp [65], tak i nespecifické amplikony totožné s nespecifickými amplikony typového kmene *Clostridium butyricum* DSM 10702^T (Obrázek 15).

6.4 Amplifikace genů kódujících hydrogenázy

DNA všech 44 kmenů rodu *Clostridium* bylo pomocí PCR se specifickými primery testováno na přítomnost genů pro hydrogenázy *hydA*. Během reakce byl amplifikován produkt PCR o velikosti 259 bp [70].

Bylo zjištěno, že hydrogenázový gen obsahovalo 21 kmenů ze 44 testovaných (Tabulka 14). Pro vzorek DNA kmene *Clostridium* sp. 9833 P (1) nebyl detegován specifický produkt PCR o velikosti 259 bp (Obrázek 16). Během amplifikace se sadou primerů HGf a HGr se ale syntetizoval nespecifický produkt o velikosti přibližně 850 bp. Podobně jako v běhu č. 1 byl u vzorku *Clostridium* sp. 9823 P (3) detegován nespecifický produkt PCR velikosti asi 370 bp. Další nespecifický amplikon byl detegován v běhu č. 9, který přísluší vzorku DNA kmene *Clostridium* sp. 9875 (03B2). Velikost tohoto amplikonu byla odhadnuta na 490 bp. Se sadou primerů HGf a HGr se mohou amplifikovat i úseky, jejichž sekvence jsou velmi podobné sekvenci navržených primerů a nacházejí se od sebe v amplifikovatelné vzdálenosti (3-4 kbp).

6.5 Genová typizace pomocí interrepetitivní PCR (rep-PCR)

Při optimalizaci teploty hybridizace primeru (GTG)₅ byla do PCR směsi použita DNA typového kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T o koncentraci 10 ng/μl. Při teplotě hybridizace 46,3 °C bylo na gelu detegováno nejvíce množství dobře viditelných diskretních zón (Obrázek 17, Tabulka 15; asi 12 diskretních zón v rozmezí 420 - 2 500 bp). Tato teplota byla zvolena jako optimální teplota hybridizace (GTG)₅ primeru pro fingerprintové profily DNA všech 44 testovaných bakteriálních kmenů rodu *Clostridium*.

Rep-PCR byla provedena s primerem (GTG)₅ [38]. V rámci blízké příbuzných druhů se vytvořily čtyři skupiny, a to kolem kmenů *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 3-1 (II skupina, 83% hladina podobnosti), *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 2-1 a *Clostridium tyrobutyricum* SMR 184 (IV skupina, 77% hladina podobnosti). Kolem sbírkového (typového) kmene se vytvořily dvě skupiny, a to kolem *Clostridium sporogenes* CCM 4423 (I skupina, 86% hladina podobnosti) a *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T (III skupina, 83% hladina podobnosti). Pátá skupina byla tvořena celkem 11 kmeny, které nebyly nezařazeny do žádné z předchozích skupin. Kmen *Clostridium* sp. 1030 byl na hladině podobnosti 86 % zařazen

do druhu *Clostridium sporogenes*. K typovému kmeni *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T byly přiřazeny kmeny *Clostridium* sp. 9837 a *Clostridium* sp. 580 (Tabulka 17). Toto zařazení se však v mnoha případech neshoduje se zařazením podle PCR s druhově specifickými primery pro druh *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum* (Tabulka 13).

6.6 Náhodně amplifikovaná polymorfni DNA (RAPD)

Při teplotě hybridizace 35,6 °C a 36,6 °C a použití primeru 1 byly na gelu detegovány dvě a tři dobře viditelné diskrétní zóny (Obrázek 18). Toto rozmezí teploty hybridizace se shoduje s teplotou hybridizace primeru 1 pro RAPD uváděnou v literatuře [65]. Pro další charakterizaci bakteriálních kmenů rodu *Clostridium* bude v amplifikačním programu použita teplota hybridizace primeru Pr1 36 °C. Rovněž i při použití primeru Pr6 bylo při teplotě 35,6 - 36,6 °C amplifikováno nejvíce množství dobře viditelných ampliconů.

RAPD byla provedena s purifikovanou DNA všech 45 kmenů klostridií a to postupně s primerem Pr1 a Pr6 [65].

Po amplifikaci s primerem Pr1 a sestrojení fingerprintových profilů byly vytvořeny tři skupiny. Do skupiny I na hladině podobnosti 89 % s druhem *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 2-1 zařazeno celkem 21 kmenů (Tabulka 17). Druhou skupinu tvořilo celkem deset kmenů, které vykazovaly 81% podobnost s kmenem *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 3-1. Zařazení kmenů testovaných s primerem Pr1 se shoduje se zařazením podle PCR provedené se specifickými primery pro druh *Clostridium tyrobutyricum* (Tabulka 22). Kmeny, které byly podle PCR s druhově specifickými primery zařazeny do druhu *Clostridium butyricum*, nebyly po amplifikaci s primerem Pr1 zařazeny do žádné z vytvořených skupin (Tabulka 17, Tabulka 22).

Po amplifikaci s primerem Pr6 a sestrojení dendrogramu bylo 45 kmenů klostridií rozděleno do pěti skupin. První skupinu tvořilo 18 kmenů na 80% hladině podobnosti s kmeny *Clostridium tyrobutyricum* SMR 184 a *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 2-1. Šest kmenů se v 74 % shodovalo s kmenem *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 3-1 a vytvořilo tak jednu ze skupin. Pouze kmen *Clostridium* sp. 581 vykazoval 97% podobnost s kmenem *Clostridium beijerinckii* KVL M3. Toto zařazení se však neshoduje se zařazením podle PCR s druhově specifickými primery, kdy byl tento kmen zařazen do druhu *Clostridium butyricum*. U kmene *Clostridium* sp. 1030 byla po amplifikaci s primerem Pr6 prokázána 81% podobnost s typovým kmenem *Clostridium butyricum* DSM 10702^T, podle PCR s druhově specifickými primery však tento kmen nebyl zařazen do žádného druhu. Navíc po amplifikaci s primerem (GTG)₅ tento kmen vykazoval 86% podobnost s druhem *Clostridium sporogenes* a v RAPD s primerem Pr1 byl v 89% podobný k druhu *Clostridium tyrobutyricum*. Pro jeho přesné zařazení je nutné další studium a provedení molekulárně biologických analýz, např. PCR se specifickými primery pro druhy, se kterými vykazoval vysoký stupeň podobnosti. Je nutné vzít v úvahu i to, že původní zařazení kmenů nemusí být správné.

Na základě dendrogramu sestrojeného z kombinace fingerprintových profilů po amplifikaci s primery Pr1 a Pr6 došlo k rozdělení 45 kmenů klostridií do tří skupin (Obrázek 23, Tabulka 20). Skupinu I tvořilo šest kmenů, které byly na 88 % podobné kmeni *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 3-1. Další velká skupina byla tvořena 18 kmeny na 83% hladině podobnosti s kmeny *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 2-1 a *Clostridium tyrobutyricum* SMR 184. Zařazení kmenů této skupiny do druhu *Clostridium tyrobutyricum* se shodovalo s druhovým zařazením pomocí sady specifických primerů pro druh *Clostridium*

tyrobutyricum. Skupinu III tvoří všechny kmeny, které při řazení s primerem Pr1 nebo Pr6 nebyly zařazeny do žádné z vytvořených skupin.

6.7 Komplexní srovnání fingerprintových profilů testovaných kmenů

Po srovnání všech tří fingerprintových profilů byly jednotlivé klostridiální kmeny zařazeny do dvou skupin (Obrázek 24, Tabulka 21). Na hladině podobnosti 83 % se ke kmenům *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 2-1 a *Clostridium tyrobutyricum* SMR 184 zařadilo celkem 18 kmenů. Druhou skupinu vytvořilo šest kmenů, které vykazovaly výslednou hladinu podobnosti 82 % s kmenem *Clostridium tyrobutyricum* UTMT 3-1. U zbývajících 13 kmenů nedošlo k seskupení kolem žádného ze sbírkových nebo typových kmenů.

6.8 Celkové srovnání výsledků PCR s druhově specifickými primery a všech fingerprintových profilů testovaných kmenů

U kmenů *Clostridium* sp. 31 P, *C. sp. S/1*, *C. sp. S18/2*, *C. sp. S23*, *C. sp. S29*, *C. sp. S27*, *C. sp. S5*, *C. sp. L2*, *C. sp. L3*, *C. sp. MM-D*, *C. sp. 12-15-1A* a *C. sp. 31-44-Rk-2A* se shodovaly jak výsledky PCR s druhově specifickými primery, tak zařazení do druhů na základě fingerprintových profilů a sestrojených dendrogramů (Tabulka 22). Kmeny *Clostridium* sp. 31-75-4A, *C. sp. V51-RCM-3B*, *C. sp. V51-RCM-3C*, *C. sp. V62-45-3A*, *C. sp. V62-45-3B*, *C. sp. V67-R3A* a *C. sp. V69-120-R2A* nebyly podle PCR s druhově specifickými primery zařazeny ani do druhu *Clostridium butyricum*, ani do druhu *Clostridium tyrobutyricum*. Na základě sestrojených dendrogramů však byly tyto kmeny zařazeny do druhu *Clostridium tyrobutyricum*. Je nutné ale vzít v potaz to, že v dendrogramech se většina kmenů shlukovala kolem kmenů z místních sbírek, nikoli však kolem typového (sbírkového) kmene. Identifikace kmenů z místních sbírek nemusí být totožná s reálným zařazením kmene do konkrétního druhu. U kmenů *Clostridium* sp. 9833 P, *C. sp. 9867 P*, *C. sp. 9823 P*, *C. sp. 9874 II* a *C. sp. R26A* byla potvrzena příslušnost k druhu *Clostridium tyrobutyricum* pouze na základě fingerprintových profilů sestrojených po amplifikaci s primery Pr1, Pr6. Po amplifikaci v rep-PCR tyto kmeny ale nebyly zařazeny do žádné ze skupin, avšak z dendrogramů po amplifikaci s primery Pr1 a Pr6 a jejich kombinace se výše zmíněné kmeny řadily do druhu *Clostridium tyrobutyricum*. Pro přesnější zařazení by bylo vhodné zvolit jinak komponovaný polyfázní přístup identifikace a charakterizace kmenů.

6.9 Stanovení vlastností kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18)

6.10 Ověření čistoty bakteriální kultury

Výsevem na Petriho misku a metodou PCR byla ověřována čistota bakteriální kultury použité pro kultivaci v tekutém živném médiu CM0149 s různými počátečními laktózy (5-400 mM). Na Petriho misce byly pozorovány kolonie, které byly stejné velikosti, zbarvení (Obrázek 25). Z tohoto faktu lze usuzovat, že bakteriální kultura byla čistá.

6.10.1 Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při různých teplotách

Byl sledován růst buněk kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) za anaerobních podmínek v médiu CM0149 s laktózou při 37 °C a za laboratorní teploty. Z grafu závislosti změny absorbance při 600 nm na čase (Graf 1) vyplývá, že nárůst buněk při 37 °C byl rychlejší než

při kultivaci za laboratorní teploty. Tento fakt dokládají i hodnoty měrné rychlosti růstu – při laboratorní teplotě měrná rychlost růstu je o $0,05 \text{ h}^{-1}$ menší než při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Graf 2, Tabulka 24). Během prvních 24 hodin kultivace byl zaznamenán pokles měrné rychlosti růstu buněk o 50 % jednak v případě kultivace při $37 \text{ }^\circ\text{C}$, tak při laboratorní teplotě. Po 30 hodinách od zaočkování byla při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ zahájena fáze zpomaleného růstu. Souvisí to i výrazným poklesem pH oproti pH na začátku kultivace (5,2) k hodnotě 4,2. Při této hodnotě pH je růst velmi pomalý. Mezi 31. a 57. hodinou kultivace měrná rychlost růstu buněk při laboratorní teplotě byla větší než měrná rychlost růstu při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. V tomto období byl totiž zaznamenán výraznější pokles pH během kultivace při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ než za laboratorní teploty. Veškeré fyziologické pochody buněk při laboratorní teplotě jsou pomalejší. Po 106 hodinách kultivace optická hustota bakteriální kultury narostlé při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a za laboratorní teploty byla téměř totožná, hodnoty měrných rychlosti růstu za obou hodnot kultivačních teplot se blížily nule a hodnoty pH se od sebe lišily jen nepatrně.

Po celou dobu kultivace byly sledovány hodnoty pH jak za laboratorní teploty, tak i při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Při sledování změn pH bylo zjištěno, že při laboratorní teplotě docházelo k pomalejšímu poklesu hodnot pH. Z grafu závislosti pH na čase (Graf 3) je patrný prudký pokles pH během kultivace při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v prvních 48 hodinách k hodnotě 3,9. Jedná se o minimální hodnotu pH, které bylo dosaženo během kultivace při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Pokles hodnot pH souvisí s tvorbou kyselin y octové a máselné [5]. Později byl zaznamenán nárůst hodnot pH až k hodnotě 4,2 a nakonec se pH opět snížilo. Za laboratorní teploty pokles hodnot pH byl pomalejší. Pomalá tvorba organických kyselin nezpůsobila prudký pokles pH, tudíž buňky si uchovaly delší schopnost růstu. Minimální pH při kultivaci za laboratorní teploty bylo dosaženo až ve 106 hodině. Hodnoty pH média silně ovlivňují délku lag fáze, charakter růstu, tvorbu metabolitů a produkci plynů [72]. Kritickou hodnotou pH pro růst buněk je pH 4,0, co bylo ověřeno i v provedeném experimentu (Graf 3) [18].

6.10.2 Kultivace v tekutém médiu CM0149 se syrovátkou při různých teplotách

Byl sledován růst buněk kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) za anaerobních podmínek v médiu CM0149 se syrovátkou při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a za laboratorní teploty. V tomto experimentu byla prokázána schopnost klostridií využívat laktózu ze syrovátky.

Při kultivaci za laboratorní teploty byl do 31 hodin od zaočkování zaznamenán nárůst biomasy téměř o 40 % menší než při kultivaci při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Graf 4, Tabulka 26). Po 48. hodině kultivace při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ končila stacionární fáze růstu. Při laboratorní teplotě byla po 55. hodině kultivace zaznamenána fáze odumírání buněk. Důkazem toho jsou záporné hodnoty měrné rychlosti růstu (Tabulka 26).

Ve srovnání s kultivací stejného kmene za stejných podmínek v médiu CM0149 s laktózou byl v médiu CM0149 se syrovátkou zaznamenán celkový nárůst biomasy o přibližně 50 % větší. Díky své proteolytické aktivitě [20] bakterie byly schopny využít i proteiny obsažené v roztoku syrovátky. Dalším vysvětlením vyšších hodnot absorbance $A_{600\text{nm}}$ může být to, že po centrifugaci se v sedimentu buněk navíc nacházely zbytky sražených bílkovin ze syrovátky.

Z grafu závislosti pH na době kultivace (Graf 6) je při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ patrný velmi rychlý pokles pH během prvních 24 hodin až k hodnotě 3,9. Později hodnoty pH se měnily jen nepatrně. Minima pH bylo dosaženo v 37. hodině od začátku kultivace (pH 3,7). Za laboratorní teploty nebyl zaznamenán tak prudký pokles jako v případě kultivace při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Mírný nárůst pH po 60. hodině v případě obou kultivací souvisí nejspíše se spotřebou vlastních metabolitů (kyseliny octové a máselné) jako uhlíkatého zdroje energie.

Profily hodnot pH během kultivací v tekutém živném médiu s laktózou a se syrovátkou jsou téměř totožné (Tabulka 24 a Tabulka 26). Minimální hodnoty pH se pohybovaly vždy v intervalu 3,9-4,1. Porovnáním měrných rychlostí růstu v médiu CM0149 s laktózou a se syrovátkou bylo zjištěno, že měrná růstová rychlost při kultivaci na syrovátce dosahovala pouze 30 % hodnoty měrné rychlosti růstu při kultivaci v médiu s laktózou.

6.10.3 Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při 37 °C při různých hodnotách pH

Kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla prováděna v tekutém živném médiu CM0149 s laktózou při 37 °C za anaerobních podmínek typu PO (kapitola 4.2.6.2) s různými výchozími hodnotami pH (4,0-8,0).

Během kultivace v médiu CM0149 s laktózou o počáteční koncentraci 5 % (hm) s původním pH 4,0 byl pozorován velmi pomalý a nízký nárůst biomasy. Bakteriální kultura narostla během 72 hodin do hodnoty absorbance (A_{600nm}) 0,6 (Graf 7 a Tabulka 27). Oproti tomu byl při výchozím pH média 6,5 pozorován velmi rychlý nárůst buněk. Hodnota absorbance (A_{600nm}) při tomto pH po 23 hodinách kultivace byla 1,23. Buňky si uchovaly poměrně dlouhou schopnost růstu i při výchozí hodnotě pH 8,0. Tato hodnota pH nepůsobí na buňky natolik inhibičně, aby nemohly růst. Pokles pH tvorbou organických kyselin ke kritické hodnotě pH pro růst (pH 4,0) trvá mnohem déle, proto buňky jsou schopny v tomto médiu růst mnohem déle než v médiích s nižší výchozí hodnotou pH. Jak zaznamenali Colunga et al. [2], počáteční pH 7,5 média poskytuje takové podmínky, kdy se tvoří zejména organické kyseliny.

6.10.4 Kultivace v tekutém médiu CM0149 se syrovátkou při 37 °C při různých hodnotách pH

Kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla prováděna v tekutém živném médiu CM0149 se syrovátkou s počáteční koncentrací laktózy 5 % (hm) při 37 °C za anaerobních podmínek typu PO (kapitola 4.2.6.2) s různými výchozími hodnotami pH (4,0-8,0).

Při kultivaci s počáteční hodnotou pH 4,0-5,0 byl pozorován velmi pomalý a nízký nárůst biomasy. Bakteriální kultura narostla během 72 hodin do hodnoty absorbance (A_{600nm}) v rozmezí 1,0-1,8 (Tabulka 29). Na rozdíl od původních hodnot pH z rozmezí 4,0-5,0 kultura narostlá v médiu s původním pH neutrálním až mírně zásaditým dosahovala hodnot optické hustoty 3,3-3,6.

Optimální pH pro růst buněk bylo v tomto experimentu stanoveno na pH 6,0-8,0.

Pokles pH byl způsoben tvorbou organických kyselin, zejména kyseliny octové a máselné.

6.10.5 Kultivace v tekutém médiu CM0149 při 37 °C s různou koncentrací laktózy

Kultivace kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) byla provedena za anaerobních podmínek typu PO (kapitola 4.2.6.2) při 37 °C. Podle Almarsdottir a kol. byly výchozí koncentrace laktózy v médiu zvoleny takto: 5, 10, 50, 100, 200 a 400 mM.

Při kultivaci s počáteční koncentrací laktózy 5 mM a 10 mM byla zaznamenán velmi rychlý nárůst buněk (během 23 hodin k hodnotám optické hustoty 1,4-1,5). Po 29. hodině kultivace byl ale zaznamenán pokles hodnot absorbance při 600 nm. Tento jev lze vysvětlit tak, že během 24 hodin byly spotřebovány téměř veškeré sacharidy. Později bakterie byly limitovány sacharidickým zdrojem energie a docházelo k jejich úhynu. Oproti tomu ale při vysokých

počátečních koncentracích laktózy v médiu (200-400 mM) byl pozorován pomalý nárůst biomasy. Buňky ale díky dostatku sacharidického zdroje energie byly schopny růst i po 48 hodinách od začátku kultivace, a to až do ukončení kultivace. Při nízkých počátečních koncentracích laktózy buňky po 29 hodinách kultivace nerostly a začala fáze jich odumírání. I když se přepokládá inhibice růstu vlivem vysokých počátečních koncentrací substrátů, důležitějším aspektem inhibice růstu a enzymových procesů jsou ale počáteční hodnoty pH v médiu [5].

Při sledování pH během celé doby kultivace byl během prvních 5 hodin růstu zaznamenán pokles pH o 0,1 až 0,2 jednotky. Po 5 hodinách růstu byl pozorován celkový nárůst pH u všech vzorků až k hodnotám, které se pohybovaly mezi 7,0 a 7,3 (Tabulka 32).

6.10.6 Kultivace v tekutém médiu CM0149 s laktózou při optimální hodnotě pH a různých teplotách

Během kultivace byl sledován růst bakteriálního kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 (18) při optimálním pH pro růst buněk při 37 °C a za laboratorní teploty. Po čáteční koncentraci laktózy byla totožná s koncentrací sacharidů v komerčně dostupném médiu CM0149 (5 % hm). Jelikož stáří inokula bylo pouze 15 hodin, při kultivaci za laboratorní teploty je možné ještě pozorovat konec fáze zrychleného růstu, která souvisí s nárůstem měrné rychlosti růstu mezi 4. a 8. hodinou kultivace. Po 8 hodinách kultivace při byl zaznamenán pokles hodnot měrné růstové rychlosti, protože buňky byly přešly do exponenciální fáze růstu. Oproti tomu u kultury rostoucí při 37 °C byla ihned pozorována exponenciální fáze růstu. Během 22 hodin kultivace byl zaznamenán velmi rychlý pokles měrné růstové rychlosti a nárůst biomasy k hodnotě absorbance ($A_{600\text{nm}}$) 1,39 (Tabulka 33, Graf 9, Graf 10). Maximální hodnoty optické hustoty bylo dosaženo až po 47 hodinách kultivace při 37 °C. Buňky kultivované při laboratorní teplotě si uchovaly schopnost růstu po celou dobu kultivace. Pokles hodnot absorbance při 600 nm pro kultivaci při 37 °C může souviset jak se sporulací v důsledku limitace živinami, tak se začátkem odumírání bakteriální kultury. Hodnoty pH klesaly během celé doby kultivace od 6,4 až hodnotám 4,3 a 4,0 (Graf 11).

Jak bylo zjištěno později, optimálními podmínkami pro tvorbu vodíku v médiích se syrovátkou jsou teplota 37 °C, počáteční pH 7,5 a koncentrace syrovátky na začátku kultivace 20 g/l [2]. Při prováděné kultivaci bylo zvoleno ale optimální pH pro růst buněk, nikoli však pro tvorbu vodíku. Důvodem nesprávné volby pH byl fakt, že během žádného experimentu se neprojevila tvorba plynů, proto nebylo možné ani zjistit optimální hodnotu pH pro tvorbu vodíku

7. ZÁVĚR

Světovým trendem je maximální využití různých odpadních produktů. Nejedná se pouze o klasické komodity (kovy, sklo, plasty, papír), ale také o odpadní produkty potravinářského průmyslu. Důležitým faktorem pro udržení trvalého stavu v ekosystému je zpracování odpadních vod. V posledních letech jsou zkoumány možnosti využití odpadních vod z potravinářského průmyslu, resp. z mlékárenství, pro fermentativní produkci vodíku. Pro tyto účely je nutné správně zvolit produkční mikroorganismus nebo jejich směs. Předchozí identifikace a charakterizace je nezbytným krokem pro stanovení vlastností daných kmenů.

U souboru anaerobních bakterií rodu *Clostridium* byla pomocí molekulárně biologických metod provedena jejich identifikace (zařazení do druhů *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum*). S použitím molekulárně-typizačních metod a shlukové analýzy byla testována příbuznost se sbírkovými a typovými kmeny.

V souboru anaerobních bakterií rodu *Clostridium* byla rovněž testována přítomnost genů pro hydrogenázu *hydA*. U kmenů s pozitivním výsledkem pro hydrogenázy se předpokládá produkce vodíku při fermentačních procesech. Při další identifikaci a charakterizaci jednotlivých kmenů bude nutné použít více metod, které poskytnou podrobnější informace o zkoumaném souboru bakterií.

Dalším neopomenutelným faktem je vysoká citlivost některých bakterií na vlastnosti fermentačního prostředí (pH, teplota, Eh). U kmene *Clostridium tyrobutyricum* S5 byla proto testována schopnost růstu a fermentovat čistou laktózu a laktózu přítomnou v syrovátce při různých teplotách a hodnotách pH.

Výsledky této práce budou publikovány formou posteru na konferenci Chemistry & Life (14.-16. září 2011) a dále budou využity pro studie fermentativní produkce vodíku a důležitých rozpouštědel pro chemický průmysl.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LIN, P.-Y., et al. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007, 32, s. 1728-1735.
- [2] ROSALES-COLUNGA, L.M., et al. Hydrogen production by *Escherichia coli* Δ hycA Δ laci using cheese whey as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010, 35, s. 491-499.
- [3] DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2001, 26, s. 13-28.
- [4] GROENESTIJN, J.W. van, et al. Energy aspect of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002, 27, s. 1141-1147.
- [5] ALMARSODOTTIR, A.R., et al. Hydrogen production from sugars and complex biomass by *Clostridium* species, AK14, isolated from Icelandic hot spring. *Icelandic Agricultural Sciences*. 2010, 23, s. 67-71.
- [6] MAEDA, T., et al. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microbial Biotechnology*. 2007, 1, s. 30-39.
- [7] FINEGOLD, S.M., et al. Taxonomy of General Comments and Update on Taxonomy of Clostridia and Anaerobic cocci. *Anaerobe*. 2002, 8, s. 283-285.
- [8] SONG, Y., et al. *Clostridium bolteae* sp. nov., Isolated from Human Sources. *Systematic and Applied Microbiology*. 2003, 26, s. 84-89.
- [9] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [10] *Taxonomy Browser* [online]. - [cit. 2011-05-02]. NCBI. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1485>>.
- [11] PAREDES-SABJA, D.; et al. Germination response of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* to cultured human epithelial cells. *Anaerobe*. 2011, 2, s. 1-7.
- [12] LE BOURHIS, A.-G., et al. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, 113, s. 154-163.
- [13] SEKI, H., et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatrics International*. 2003, 45, s. 86-90.
- [14] *IDENTIFICATION OF CLOSTRIDIUM SPECIES*. London : Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory, 2008. 14 s. Dostupné z WWW: <<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/bsopid/pdf/bsopid8.pdf>>.
- [15] MINTON, et al. *Clostridia*. New York : A division of Plenum Publishing Corporation, 1989. 307 s.
- [16] GRAMPOZITIVNÍ TYČINKY A KOKY TVOŘÍCÍ ENDOSPORY. In *Grampozitivní tyčinky* [online]. Brno, 2007 [cit. 2011-05-03]. Dostupné z WWW: <http://fvf.vfu.cz/export/sites/fvf/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie/Gx_tycinky.pdf>.
- [17] STUBBS, S., et al. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of *Bacteroides* spp. and Characterization of Nitroimidazole Resistance Genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, 9, s. 3209-3213.
- [18] WANG, J.; et al. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen energy*. 2009, 34, s. 799-811.

- [19] Grupa22: index [Mikrobiologia] [online]. 16. 1. 2009 [cit. 2011-05-03]. Dostupný z WWW: <<http://micro.org.pl/doku.php/grupa22:index>>.
- [20] KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 602 s.
- [21] CLOSTRIDIUM. Obrázek [cit. 2011-05-04]. Dostupné z WWW: <http://plant.geoman.ru/books/item/f00/s00/z00000000/pic/st111_32.jpg>.
- [22] *Science Photo Library* [online]. 2005 [cit. 2011-05-03]. The leading provider of science and specialist images and footage. Dostupné z WWW: <http://www.sciencephoto.com/images/showFullWatermarked.html/B220523-Clostridium_butyricum_bacteria-SPL.jpg%3Fid%3D662200523>.
- [23] LE BOURHIS, A.-G., et al. Development and Validation of PCR Primers To Assess the Diversity of Clostridium spp. in Cheese by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 1, s. 29-38.
- [24] KEMPERMAN, R., et al. Identification and Characterization of Two Novel Clostridial Bacteriocins, Circularin A and Closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology*,. 2003, 3, s. 1589-1597.
- [25] GÖRNER, F.; VALÍK, L'. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľn*. Bratislava : Malé Centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [26] Vlastní materiály k přednáškám *Technologie potravin*. 2010.
- [27] COCOLIN, L., et al. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, 90, s. 83-91.
- [28] ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. Brno : MU Brno, 2008. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [29] KŘÍŽOVÁ, J.; et al. RAPD and rep-PCR Fingerprinting for Characterization of Bifidobacterium Species. *Folia Microbiologica*. 2008, 53 (2), s. 99-104.
- [30] BIOWEB – PCR [online]. 3. srpna 2007 , [cit. 2008-05-03]. Dostupný z WWW: <http://www.bioweb.genezis.eu/index.php?cat=11&file=pcr>
- [31] Základy molekulární biologie [online]. 2006 , 7. listopadu 2006 [cit. 2008-05-03] Dostupný z WWW: <<http://appendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio.htm>>.
- [32] Principle of the PCR [online]. 1999 , 5. ledna 2004 [cit. 2008-05-03]. Dostupný z WWW: <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>.
- [33] DE BAERE, T., et al. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of cultured mycobacteria in a diagnostic laboratory. *BMC Microbiology*. 2002, 4, s. 1471-1483.
- [34] VERSALOVIC, J., et al. Fingerprinting Bacterial strains using repetitive DNA sequence amplification. *U.S patent*. 1997, 11, s. 1-47.
- [35] VERSALOVIC, J., et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res*. 1991. 19, 6823–6831.
- [36] LUPSKI, J. R.; et al. Short, Interspersed Repetitive DNA Sequences in Prokaryotic Genomes : MINIREVIEW. *Journal of Bacteriology*. 1992, 14, s. 4525-4529
- [37] McMURRY, J.; et al. *Fundamentals of general, organic, and biological chemistry*. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2006. 62 s.
- [38] GEVERS, D., et al. Applicability of rep-PCR fngerprinting for identification of Lactobacillus species. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, 205, s. 31-36.
- [39] ŠVEC, P. Využití rep-PCR v bakteriální taxonomii : -. Konferenční abstrakta. Brno : MU Brno, 2007. s. 1-14. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/ccm/downl/public/rep-PCR%20Lachema%202007.pdf>>.

- [40] DNA laboratoř katedry botaniky PŘF UK v Praze [online]. 23.1.2009 [cit. 2011-05-03]. Metody - RAPD. Dostupné z WWW: <http://botany.natur.cuni.cz/dna/index.php?option=com_content&view=article&id=48:rapd-princip&catid=34:rapd&Itemid=56>.
- [41] ROSSETTI, L., et al. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*. 2005, 63, s. 134-144.
- [42] KOLENATÝ, O. *Forezní DNA přístup* [online]. 2007 [cit. 2011-05-03]. DNA slovníček - výklad některých odborných termínů. Dostupné z WWW: <<http://dna.com.cz/index.php?language=cz&kategorie=ostatni&page=article&text=65>>.
- [43] CAMMARCK, R. Hydrogenase sophistication. *Nature*. 1999, 379, s. 214-215.
- [44] CHEN, W.-M., et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobicsewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2005, 30, s. 1063-1070.
- [45] AULING, G., et al. Analysis of the polyphosphate-accumulating microflora in phosphorus-eliminating, anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, 57, s. 3585-3592.
- [46] AMANN, R., et al. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Applied Environment Microbiology*. 1997, 63(7), s. 2884-2896.
- [47] CLOETE, T.E., et al. A combined membrane filterimmunofluorescent technique for the in situ identification and enumeration of *Acinetobacter* in activated sludge. *Water Research*. 1988, 22, s. 961-969.
- [48] HOWGRAVE-GRAHAM, A.R., et al. Application of the fluorescent- antibody technique for the detection of *Sphaerotilus natans* in activated sludge. *Applied Environmental Microbiology*. 1988, 54, s. 799-802.
- [49] PALMER, C.J., et al. Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Applied Environmental Microbiology*. 1993, 59, s. 3618-3624.
- [50] VÖLSCH, A., et al. Detection and analysis of two serotypes of ammonia-oxidizing bacteria in sewage plants by flow-cytometry. *Applied Environmental Microbiology*. 1990, 56, s. 2430-2435.
- [51] HIRAISHI, A., et al. Respiratory quinone profiles as tools for identifying different bacterial populations in activated sludge. *Journal of General and Applied Microbiology*. 1988, 34, s. 39-56.
- [52] GORWA, M.F., et al. Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *The Journal of Bacteriology*. 1996, 178(9), s. 2668-2675
- [53] CHANG, J.J., et al. Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2006, 70(5), s. 598-604.
- [54] DRBOHLAV, J. MILCOM, 2011, soukromé sdělení.
- [55] RITTICH, B., et al. *České Ekologické Manažerské Centrum* [online]. 2009 [cit. 2011-05-03]. Charakterizace vybraných kmenů klostridií a jejich využití pro produkci vodíku. Dostupné z WWW: <<http://www.cemc.cz/OZE2011/106.pdf>>.
- [56] ORLYGSSON, Johann, et al. Bioprospecting thermophilic ethanol and hydrogen producing bacteria from hot springs in Iceland. *Icelandic Agricultural Sciences*. 2010, 23, s. 73-85.
- [57] MEYER, J., et al. Primary structure of hydrogenaseI from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry*. 1991, 30, s. 9697-9704.

- [58] PETERS, J.W., et al. X-ray crystal structure of the Fe only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*. 1998, 282, s. 1853-1858.
- [59] KAJI, M., et al. The *hydA* gene encoding the H₂-evolving hydrogenase of *Clostridium perfringens*: molecular characterization and expression of the gene. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, 181, s. 329-336.
- [60] SANTANGELO, J.D., et al. Characterization and expression of the hydrogenase-encoding gene from *Clostridium acetobutylicum* P262. *Microbiology*. 1995, 141, s. 171-180.
- [61] MORIMOTO, K., et al. Overexpression of a hydrogenase gene in *Clostridium paraputrificum* to enhance hydrogen gas production. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, 246, s. 229-234.
- [62] HAARMAN, M., et al. Quantitative Real-time PCR Assays To Identify and Quantify Fecal *Bifidobacterium* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 5, s. 2318-2324.
- [63] REKHA, R., et al. Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Journal of Biotechnology*. 2006, 5, s. 505-512.
- [64] ÜRGEOVÁ, B. *Identifikace vybraných bakterií v sýrech pomocí PCR*. Brno, 2009. 70 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Dostupné z WWW: <https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=13435>.
- [65] NAKANISHI, S., et al. Rapid Species Identification and Partial Strain Differentiation of *Clostridium butyricum* by PCR Using 16S-23S rDNA Intergenic Space Regions. *Microbiology and Immunology*. 2005, 49(7), s. 613-621.
- [66] HERMAN, L.M. et al. A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, 12, s. 4141-4146.
- [67] WANG, M., et al. Improving PCR and qPCR detection of hydrogenase A (*hydA*) associated with *Clostridia* in pure cultures and environmental sludges using bovine serum albumin. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 2007, 77, 645-656.
- [68] RITTICH, B., ŠPANOVÁ A. *Návody k praktiku z molekulární biotechnologie*. 2011. Nепublikováno
- [69] SAMBROOK, J., RUSSEL, D., W. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd edition. *Cold Spring Harbor Press*. New York. 2001. ISBN 978-087967.
- [70] WANG, M.-Y., et al. Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous *Clostridium butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008, 33, s. 4730-4738.
- [71] RITTICH, B. 2011. Soukromé sdělení.
- [72] FERCHICHI, M. et al. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology*. 2005, 120, s. 402-409.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

RNA	ribonucleic acid; ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
PCR	polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce
NADH.....	nikotinamid adenin dinukleotid
G+C	guanin+cytosin
DGGE	denaturent gradient gel electrophoresis; elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu
ARDRA	amplified restriction rDNA analysis; restriční analýza amplifikované rDNA
nested-PCR.....	hnízdová PCR
TTGE	temperature gradient gel electrophoresis; gelová elektroforéza s teplotním gradientem
ssDNA.....	single-stranded DNA; jednořetězcová DNA
VNTR	variable number tandem repeat; variabilní počet tandemových opakování
ERIC-sekvence ..	enterobakteriální opakující se intergenové shodné sekvence
BOX-elements....	mozaikové repetitivní elementy
rep-PCR	repeat sequence primed PCR; interrepetitivní PCR
RAPD	náhodná amplifikace polymorfni DNA
SSCP	analýza konformačního polymorfismu jednořetězců
FISH.....	fluorescence <i>in situ</i> hybridization; fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
A/N.....	anaerobní atmosféra tvořena dusíkem
MA/N	anaerobní atmosféra v měrné aparatuře tvořena dusíkem
ZA/N.....	anaerobní atmosféra ve zjednodušené aparatuře tvořena dusíkem
PO.....	parafínový olej
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean; metoda párování pomocí nevyvážených aritmetických průměrů

10. PŘÍLOHY

Příloha 1 Abstrakt posteru, který bude prezentován na vědecké konferenci Chemistry & Life (14.-16.9.2011), Brno

FERMENTATIVE HYDROGEN PRODUCTION BY BACTERIAL STRAIN *Clostridium tyrobutyricum* S5.

**MARIA CHROBOKOVÁ¹, ALENA ŠPANOVÁ^{1,2},
BOHUSLAV RITTICH^{1,2}, KRISTÝNA TURKOVÁ¹,
MILOŠ DVOŘÁK¹, BARBORA ŮRGEOVÁ¹**

¹*Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of
Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118,
612 00 Brno, Czech Republic*

²*Department of Experimental Biology, Faculty of Science,
Masaryk University, Tvrdeho 14, 612 00 Brno, Czech Republic
xcchrobokova@fch.vutbr.cz*

Presence of clostridium in milk is a technological problem for cheese making as they cause late-blowing defect. This damage is characterised by gas formation. The ability to produce gas by some species of genus *Clostridium* could possibly find an industrial use. Research has been focused on *Clostridium* strains deposited at MILCOM – Dairy Research Institute (Tábor, Czech Republic). It was found out that good candidate for hydrogen production is *Clostridium tyrobutyricum* S5 strain from this collection. From this reason its properties were evaluated and the cultivation of *Clostridium tyrobutyricum* S5 under different conditions was studied. The cultivation was carried out in liquid Reinforced Clostridial Medium (RCM) with lactose (5 %) and cheese whey with lactose content 5 % instead of glucose as substrate under anaerobe conditions. Growth of bacterial cells was observed at laboratory temperature (from 20 to 23 °C) and at 37 °C, pH values range from 4.0 to 8.0 with 0.5 unit. Optimal pH was evaluated at 6.5. Optimal pH and different temperatures (20-23 °C/37 °C) were thereafter used in last experiment (see Fig. 1 and Fig. 2). The content of lactose and volatile fatty acids was also determined in supernatants.

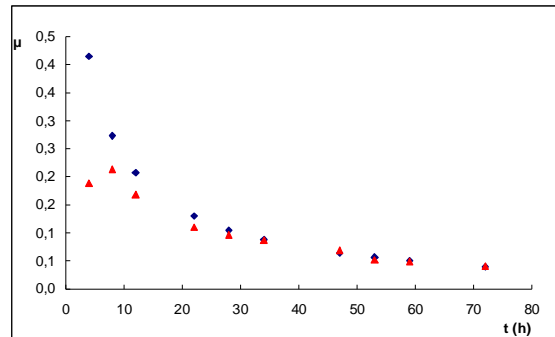


Fig. 1. Effect of temperature 37 °C (♦) and laboratory temperature (20-23 °C) (▲) on the maximal specific growth rate (μ) of *Clostridium tyrobutyricum* S5 in RCM with optimal pH 6.5 value and lactose as substrate

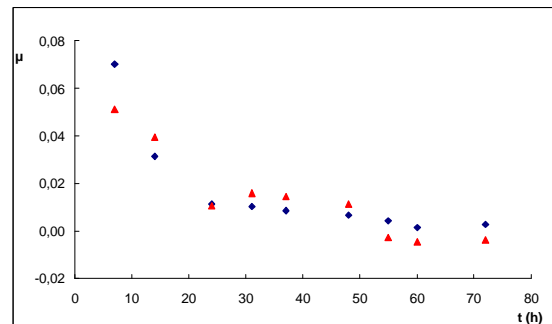


Fig. 2. Effect of temperature 37 °C (♦) and laboratory temperature (20-23 °C) (▲) on the maximal specific growth rate (μ) of *Clostridium tyrobutyricum* S5 in RCM with cheese whey as substrate

This work was supported by MŠMT ČR, grant No. 2B08070.