

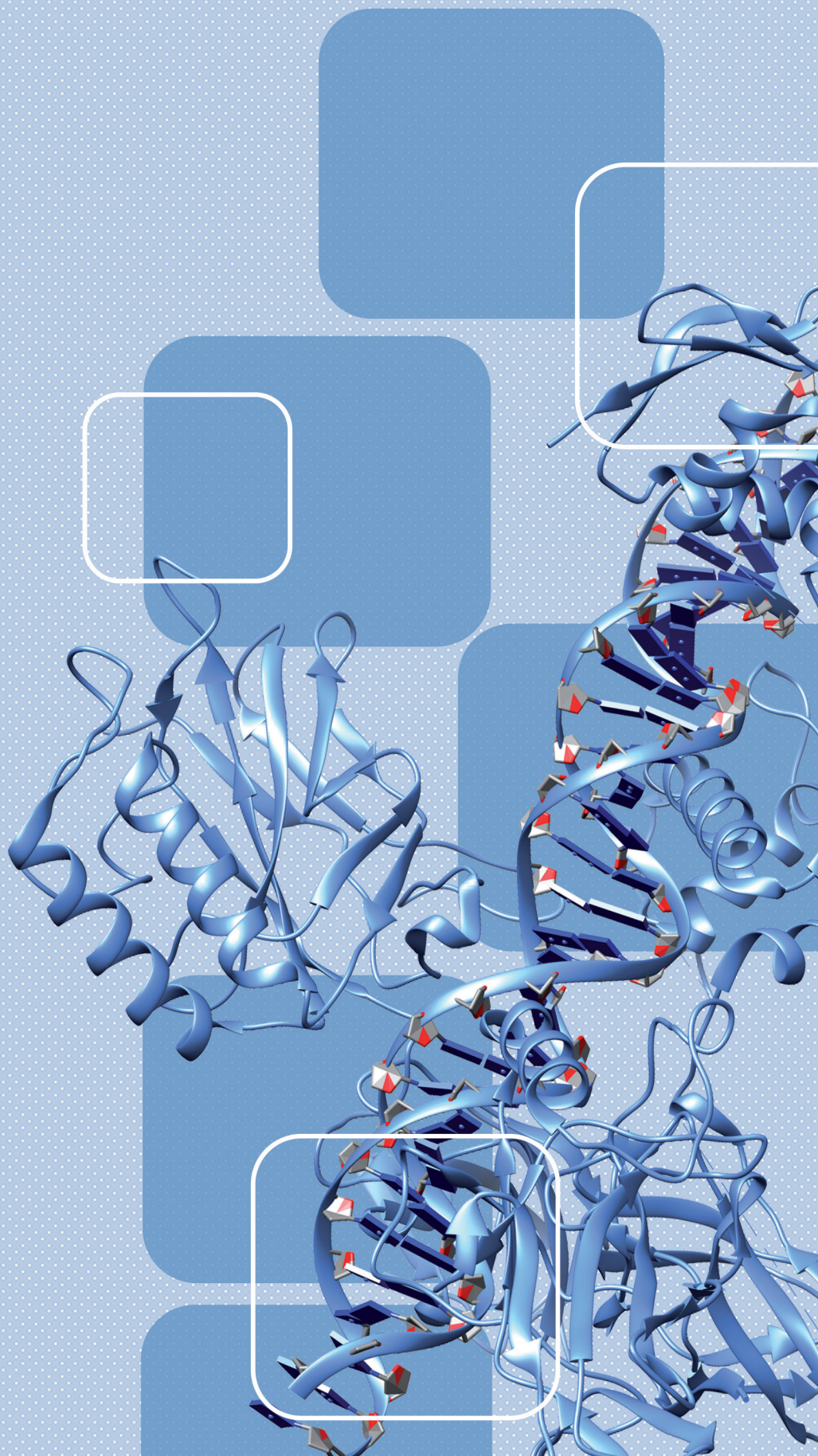
Bio

Ročník 35 • Číslo 3-4/2025

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)
a
člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: University of Chemistry and Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efbiotechnology.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Assoc. Prof. Dana Pokorna, PhD
UCT Prague
+420 220 443 151

Nekrolog – Zemřel profesor Jan Káš



Dne 9. září 2025 nás ve věku 91 let navždy opustil zakladatel Biotechnologické společnosti a její dlouholetý předseda prof. Ing. Jan Káš, DrSc. Biotechnologické společnosti se intenzivně věnoval několik desítek let a jeho srdeční záležitostí byl její bulletin Biopropect. Většinu svého profesního života spojil s VŠCHT Praha, kde stál u zrodu dnešního Ústavu biochemie a mikrobiologie, v jehož čele jako jeho vedoucí mnoho let působil.

Prof. Jan Káš, přední český biochemik, se narodil 26. května 1934 v Žatci. Po absolvování VŠCHT v roce 1957 začal svou profesní dráhu v Mrazírnách n.p. v Táboře a později v Praze, kde působil v řídicích funkcích. V roce 1964 se rozhodl vydat cestou vysokoškolského učitele a stal se srdcem vznikající katedry biochemie na VŠCHT Praha, dnešního Ústavu biochemie a mikrobiologie. V letech 1994 až 2000 tento ústav vedl a jeho neúnavná iniciativa se odrážela ve všem; od pedagogické práce přes vědecký výzkum, až po organizační činnosti, které daly ústavu jeho současnou podobu.

Prof. Káš přednášel biochemii, biotechnologie a specializované předměty z oblastí enzymologie a imunochemie. Byl školitelem doktorských studentů, předsedou oborové rady biochemie na FPBT a členem oborových rad na PřF UK v Praze a PU v Olomouci. Koordinoval pět mezinárodních projektů TEMPUS, díky nimž ústav navázal řadu plodných zahraničních spoluprací a zlepšil své instrumentální vybavení. S ministerstvem životního prostředí a dalšími institucemi se podílel na projektu UNEP/GEF „Implementation of the Draft NBF for the Czech Republic“, kde aktivně přispíval k regulaci genetických modifikací a objektivnímu informování veřejnosti. Ani po skončení projektu nezůstal stranou – pořádal semináře „Novinky v oblasti genetických modifikací“, stále předával své zkušenosti a znalosti.

Jeho významná činnost se neomezovala jen na Prahu. Spolu s kolegy se zasloužil o vznik Katedry biochemie PřF UP v Olomouci, za což mu byla udělena rektorská pamětní medaile. Byl oceněn i dalšími vyznamenáními: Čestným uznáním České rady ČSVTS, Plaketou Výzkumného ústavu potravinářského průmyslu, Medailí Josefa Hlávky, Ballingovou a Votočkovou medailí, pamětní medailí FPBT VŠCHT Praha, či medailí Italské zemědělské společnosti. Jeho vědecká kariéra byla podporována prestižními stipendii, včetně Fulbrightova, která mu umožnila působení v Dánsku, Holandsku a USA. Byl také hostujícím profesorem University of Luton.

Ve výzkumu se zaměřoval na enzymologii, imunochemii a biosenzory. Publikoval více než 200 původních prací, přes 70 přehledných článků, je spoluautorem 12 patentů a početné množství učebnic a kapitol v monografiích. Koordinoval řadu projektů, včetně programů USA, EU i mezinárodního projektu UNEP/GEF.

Prof. Káš byl členem a funkcionářem prestižních domácích i zahraničních vědeckých společností: Komise pro biotechnologie IUPAC, Biotechnologické společnosti ČR, European Federation of Biotechnology, redakčních rad Food and Agricultural Immunology, Biotechnology Advances, Chemických listů a bulletinu Biopropect. Dlouhodobě se angažoval v České chemické společnosti, Komitétu pro biochemii a molekulární biologii, České společnosti pro biochemii a molekulární biologii, Americké chemické společnosti i ve vědeckých radách několika vysokých škol a ústavů. Podílel se na organizaci mezinárodních kongresů a sympozií, včetně evropského kongresu FEBS, a spolu s Dr. Hans-Peter Meyerem založil tradici Česko-švýcarských biotechnologických symposií.

Přestože seznam aktivit prof. Káše působí impozantně, jeho skutečná hodnota spočívala v lidském rozměru jeho práce. Byl klíčovou a nezaměnitelnou osobností ústavu. Již v šedesátých letech organizoval kurzy se zahraničními experty, budoval laboratoře, rozvíjel výzkum, vychoval generace vědců, kteří se prosadili doma i v zahraničí. Když počátkem devadesátých let převzal vedení ústavu, dovedl jej s kolegy na mezinárodní úroveň.

Prof. Káš byl především týmovým hráčem, který dokázal stmelit kolektiv nejen při řešení vědeckých úkolů. Vzpomínáme na společné výlety, sportovní akce a lyžařské pobyty v Krušných horách, kde byl rovnocenným partnerem pro všechny, od studentů po kolegy. Jeho vitalita a energie byly inspirací pro každého, kdo s ním pracoval.

Na jeho přátelský a vstřícný přístup jak v profesním, tak i v osobním životě nikdy nezapomeneme.

Tomáš Ruml
Ústav biochemie a mikrobiologie
VŠCHT Praha

VÝZNAMNÉ KONTAMINANTY EXPLANTÁTOVÝCH KULTUR

Matěj Semerák, Zuzana Haňáčková, Petra Lišková, Alexandra Slámová, Adéla Reinbergerová

Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy, s. r. o.

matej.semerak@vsuo.cz; zuzana.hanackova@vsuo.cz; petra.liskova@vsuo.cz; alexandra.slamova@vsuo.cz;

adela.reinbergerova@vsuo.cz

Úvod

Kultivace rostlinného materiálu *in vitro* je souborem biotechnologických metod aseptického nakládání s částmi rostlin, tzv. explantáty. Zahrnuje mikropropagační techniky, umožňující rychlé vegetativní množení výhonů, ozdravovací postupy (např. chemoterapii systémových infekcí) či práci s nediferencovanými pletivy v kalusových kulturách. Bývá též využívána jako způsob prostorově úsporného uchování zájmových genotypů v genových bankách.

Zdrojem živin pro růst explantátů je tekuté nebo zpevněné médium, zpravidla obsahující makroprvky, mikroprvky, sacharózu, vitaminy, aminokyseliny a fytohormony. Materiál je třeba v pravidelných intervalech přesazovat na čerstvá média, jinak kultury vyčerpají živiny a odumírají. Kultivace probíhá v průhledných (skleněných či plastových) nádobách ve speciálních místnostech s řízenou teplotou a nastavitelným světelným režimem.

Nezbytnou podmínkou úspěšné práce s kulturami je pečlivé dodržování sterility. Značná bohatost kultivačního média, příznivá teplota a vysoká vzdušná vlhkost uvnitř pěstebních nádob totiž skýtají vhodné podmínky k rychlému růstu bakterií, kvasinek nebo vláknitých hub.

Největší nebezpečí zavlečení nežádoucích organismů hrozí při zakládání kultur v případě nedostatečné dekontaminace povrchu výchozího materiálu před nasazením *in vitro*. Situaci navíc může komplikovat přirozené osídlení materiálu endofytickými mikroorganismy, které nemusejí být sterilizačními činidly zasaženy, protože tato činidla obvykle působí jen povrchově (Kałużna et al. 2013; Pirttilä et al. 2003). Dalším momentem zvýšeného rizika je manipulace při přesazování (tzv. pasážování). To sice probíhá ve flow-boxu, komoře s laminárním prouděním sterilního vzduchu, ale např. vinou nedůsledné průběžné sterilizace nástrojů se bakterie a kvasinky přenášejí mezi jednotlivými již zavedenými kulturami. Ke kontaminaci spory vláknitých hub pak může dojít v důsledku obecného nedodržení zásad aseptické práce, zanedbání údržby flow-boxu apod. Naproti tomu samotná živná média zdrojem kontaminací nebývají, protože během přípravy procházejí sterilizačním cyklem v autoklávu.

Proti růstu nežádoucích mikroorganismů lze účinněji zasáhnout, jsou-li identifikovány. Naším hlavním cílem proto bylo určit rody (případně i druhy) vláknitých hub, kvasinek a bakterií, s nimiž se setkáváme při práci s explantátovými kulturami ovocných plodin ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy, s. r. o. (dále jen VŠÚO), a porovnat svá pozorování se spektrem běžných kontaminací popisovaných v literatuře.

Metodika

Studovaný materiál pocházel z *in vitro* genofondových sbírek ovocných plodin VŠÚO. Během několikátýdenního období byly shromážděny baňky s viditelnými kontaminacemi, ty byly izolovány a následně určeny. Pro analýzu jsme vesměs vybírali kultury uchovávané v bance explantátů dlouhodobě.

Jednotlivé morfotypy mikroskopických hub rostoucích v explantátových kulturách byly přeneseny na bramborovo-dextrózový agar (PDA) a kultivovány při laboratorní teplotě. Z čistých kultur byla izolována DNA pomocí ZR Fungal/Bacterial DNA kit (Zymo Research, Orange, CA, USA) v souladu s instrukcemi výrobce. PCR reakce probíhala za standardizovaných podmínek s využitím kombinací primerů specifických pro houby: ITS1-F (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3' a ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Kolonie bakterií byly přeneseny na LB médium a izolovány jako čistá kultura. Stanovení rodové a druhové příslušnosti bakteriálních izolátů bylo provedeno pomocí koloniové PCR 16S rDNA genomové oblasti pomocí specifických primerů: F1 (5'-ATCATGGCTCAGATTGAACGCT-3'), F2 (5'-CCTGGCTCAGGACGAACGCT-3') a R (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'). Amplifikované DNA fragmenty byly rozděleny pomocí elektroforézy v agarózovém gelu, příslušné PCR produkty byly vyříznuty z gelu a přečištěny pomocí Expin™ Combo GP (GeneAll, Soul, Korea) soupravy, dle návodu výrobce.

Sekvence byly analyzovány pomocí analyzátoru sekvencí GA3500 a následně editovány v programu Chromas. Identifikace sekvencí proběhla pomocí databáze GenBank a nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Za účelem rozšíření spektra identifikovaných bakterií byly některé vzorky zpracovány také hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF (Bruker), a to v laboratoři SPADIA LAB, a. s., Praha.

Výsledky, diskuse nálezů s literaturou

Identifikované kontaminanty vesměs patřily k rodům a druhům běžným jak v oblasti *in vitro* kultivací rostlinného materiálu, tak v přírodě obecně. V některých případech se jednalo o mikroorganismy přirozeně se vyskytující v ovzduší nebo o rostlinné symbionty.

S ohledem na fakt, že jsme zkoumali především zavedené kultury, nikoli čerstvě nasazené pupeny či výhony, usuzujeme, že se většinou nejednalo o kontaminace, které by se do podmínek *in vitro* dostaly na povrchu výchozího materiálu. Za nejpravděpodobnější považujeme endofytický původ (mikroorganismy nezasažené roztokem chloridu rtuťnatého, který ve VŠÚO používá-

me při zakládání kultur, a následně dlouhodobě přežívající uvnitř pletiv i na povrchu živných médií) nebo kontaminaci z ovzduší či z povrchu nesterilních předmětů při pasážování.

Největší diverzitu jsme zaznamenali u bakterií a také jim tu je věnována největší pozornost, neboť u některých druhů a rodů byly popsány zajímavé interakce s rostlinami.

Vláknité houby

Literární zdroje uvádějí v explantátových kulturách častý výskyt černí (*Alternaria*, *Cladosporium*), kornatek (*Peniophora*), kropidláků (*Aspergillus*), kropidlovců (*Rhizopus*), řasovek (*Pythium*), srpovničků (*Fusarium*), štětičkovců (*Penicillium*), zelenatek (*Trichoderma*) a dále rodů *Acremonium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Geotrichum*, *Helminthosporium*, *Paecilomyces*, *Pestalotia* nebo *Plectosphaerella* (Ezeofor et al. 2025; Li et al. 2022; Odutayo et al. 2007; Omamor et al. 2007).

Při monitoringu explantátových *in vitro* kultur ovocných plodin ve VŠÚO jsme potvrdili výskyt některých z výše zmíněných rodů (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, Obr. 1). Kromě nich jsme identifikovali také druhy rodu *Ascochyta* a *Aureobasidium*.



Obr. 1: Kultura napadená vláknitou houbou z rodu *Cladosporium*

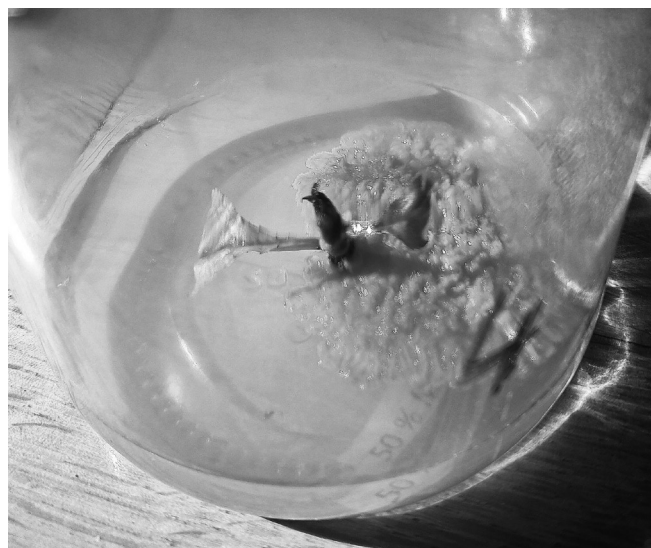
Zástupci rodů *Alternaria*, *Aspergillus* a *Cladosporium* patří k všudypřítomným vláknitým houbám, a to jak ve vnějším prostředí, tak uvnitř budov (de Ana et al. 2006). Rod *Ascochyta* zahrnuje řadu parazitů kulturních i planě rostoucích rostlin (Mel'nik et al. 2000). *Aureobasidium* vykazuje znaky vláknitých hub i kvasinek; opět se jedná o rod běžně rozšířený v nejrůznějších prostředích (Di Francesco et al. 2023).

Kvasinky a jiné houby

Kvasinky také patří mezi hojné kontaminanty kultur *in vitro*. Často se jedná o zástupce rodů *Candida*, *Rhodotorula* nebo *Cryptococcus* (Leifert et al. 1990).

Kvasinky vyskytující se v explantátových *in vitro* kulturách ve VŠÚO nejčastěji patří do zmíněného rodu *Rho-*

dotorula (*R. mucilaginosa*, Obr. 2). Rovněž jsme identifikovali zástupce rodu *Sporobolomyces*.



Obr. 2: Masivní růst kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* způsobil odumření explantátu.

Rhodotorula se vyskytuje po celém světě, a to včetně nehostinných stanovišť (Wirth and Goldani 2012). I kvasinkám z rodu *Sporobolomyces* stačí živinami chudé substráty; byly již nalezeny v širokém spektru prostředí (Kot et al. 2021).

V jednom případě jsme identifikovali zástupce rodu, jež nelze zařadit ani mezi vláknité houby, ani mezi kvasinky. Jednalo se o dřevokazný choroš šedopórku (*Bjerkandera* sp.). Tato houba sice nezpůsobila okamžitý úhyn kultury, ale v krátké době porostla celý povrch živného média i samotné explantáty (Obr. 3).



Obr. 3: Kultivační médium porostlé dřevokaznou houbou z rodu *Bjerkandera*.

Bakterie

Bakteriální kolonie se na povrchu živných médií též objevují často. Literatura v této souvislosti zmiňuje např. zástupce rodů *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chryseobacte-*

rium, *Curtobacterium*, *Flavobacterium*, *Janibacter*, *Lactobacillus*, *Magnetospirillum*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Plantibacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Roseomonas*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* či *Xanthomonas* (Izarra et al. 2020; Kałużna et al. 2013; Tekielska et al. 2019).

V našich explantátových kulturách jsme potvrdili výskyt konkrétních druhů náležících ke zmíněným rodům *Bacillus* (konkrétně *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. siamensis*, *B. subtilis* a *B. velezensis*), *Curtobacterium* (konkrétně *C. luteum*, Obr. 4) a *Methylobacterium*, resp. *Methylorubrum* (konkrétně *M. extorquens*). Dalšími identifikovanými bakteriálními druhy byly *Aeromicrobium fastidiosum*, *Agromyces fuscus*, *A. salentinus*, *Arthrobacter psychrolactophilus* a *Nocardioides gilvus*.



Obr. 4: Kolonie bakterií *Curtobacterium luteum* a *Bacillus subtilis* nemají na kulturu *in vitro* destruktivní vliv.

Druhy *B. amyloliquefaciens* a *B. velezensis* se přirozeně vyskytují v rhizosféře a jsou studovány jako organismy podporující růst rostlin a jejich odolnost vůči stresu a patogenům (Cheng et al. 2024; Zalila-Kolsi et al. 2023). *B. siamensis* může zvýšit toleranci k zasolení (Oubaha et al. 2024). Druhy *B. atrophaeus* a *B. subtilis* jsou – až na odlišnou pigmentaci na některých růstových médiích – vzhledově nerozlišitelné, protože byl druh *B. atrophaeus* vyčleněn až v nedávné době (Nakamura 1989). Jedná se, podobně jako u celého rodu *Bacillus*, o všudypřítomné bakterie, zejména půdní, schopné přežívat nepříznivé podmínky v podobě odolných endospor (Kovács 2019; Sella et al. 2014). *Curtobacterium* je rodem bakterií hojně zastoupených v listovém opadu a v rostlinném prostředí obecně (Chase et al. 2016). Zástupci rodu *Methylorubrum* opět osídlují široké spektrum substrátů a biotopů. Žijí též ve spojení s rostlinami, a to jak na jejich povrchu, epifyticky, tak endofyticky (Ardley and Green 2023). Také *Aeromicrobium fastidiosum*, původně popsán jako *Nocardioides fastidiosa*, bylo izolováno z rostlinného materiálu (Collins and Stackebrandt 1989; Tamura and Yokota 1994). Rod *Agromyces* zahrnuje bakterie půdní

(Jurado et al. 2005; Zgurskaya et al. 1992), podobně jako *Arthrobacter* (Smith and Zahnley 2005) a *Nocardioides*, přičemž do posledně uvedeného rodu patří rovněž řada druhů žijících např. ve slaných jezerech i ve znečištěných průmyslových vodách (Ma et al. 2023).

Možná opatření při zjištění kontaminace

Výskyt vláknité houby *in vitro* často znamená ztrátu rostlinného materiálu v dané baňce. Ve vlhkém prostředí totiž velice rychle rostou, a některé jsou schopny kultivační nádobu do několika týdnů zcela zaplnit. Při manipulaci s částečně kontaminovanou kulturou ve snaze o záchranu dosud nezasažených explantátů riskujeme, že nerozpoznáme okraj zóny prorostlé myceliem, a přeneseme tak úlomky hyf do dalších baňek. Pokud se navíc již tvoří spory, hrozí jejich uvolnění do prostředí mimo baňku a nekontrolované rozptýlení proudem vzduchu tvořeným flow-boxem. Ve VŠÚO zneškodňujeme vláknité houby autoklávováním neotevřených baňek.

Kolonie kvasinek a bakterií bývají zřetelněji ohraničené a zpravidla se šíří jen po povrchu média, tudíž při včasné rozpoznání infikovaného explantátu lze ostatní vyjmout a přepasážovat na čisté médium. Proti růstu bakterií se někdy aplikují antibiotika, sterilně přidávaná do živného média. Pokud je nutné je použít, identifikace organismů spojená s citlivostním testem (Szewczyk-Taranek et al. 2020) umožní vyhnout se širokospektrým typům antimikrobiálních látek a cíleně nasadit vhodnou léčbu. Tento krok je velmi žádoucí kvůli minimalizaci spotřeby antibiotik a snížení rizika vytváření a šíření rezistencí. Pozornost se musí věnovat fytotoxicitě, aby chemoterapie rostlinný materiál nezahubila, a také náležitému způsobu likvidace použitých médií (nebezpečný odpad).

Kromě antibiotik se do živných médií přidávají i další látky bránící růstu bakterií i hub. Anikina et al. (2024) ve svém přehledu zmiňují nanočástice kovů, chloran sodný nebo oxid zinečnatý. Dále byly testovány např. esenciální oleje (Barreto et al. 2023), proti kvasinkám fungicidy (Koložsvári Nagy et al. 2005). Existují též komerčně dostupné výrobky, přímo určené k potlačení rozvoje kontaminací v explantátových kulturách – např. PPM™, plant preservative mixture (Plant Cell Technology; Romadanova et al. 2022). Podobně jako u antibiotik je i u jiných antimikrobiálních aditiv třeba vzít v potaz možný negativní dopad na explantáty, na pracovníky *in vitro* provozu a na životní prostředí.

Vliv mikroorganismů na explantátové kultury

Jak již bylo zmíněno výše, růst vláknité houby si obvykle vyžádá rychlou likvidaci zasažené kultury. Kvasinky či bakterie však mohou v kultuře *in vitro* přežívat dlouhodobě a ovlivňovat růst explantátů, aniž by tyto odumřely.

Kvasinky (např. rod *Candida*) mohou z kultivačního média významně odčerpávat sacharidy, tvořit fermentační produkty a snižovat pH (Leifert et al. 1990), čímž omezují dostupnost živin pro rostlinný materiál a mění chemické vlastnosti média.

Ne všechny mikroorganismy ovšem působí škodlivě. Kontaminace některými druhy bakterií (např. z rodů *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, které byly izolovány i na našem pracovišti, či z rodu *Paenibacillus*), jež patří mezi přirozené endofyty či epifyty rostlin, zdravotní stav kultur nezhoršují. Jejich přítomnost dokonce může explantátům prospět a podpořit multiplikaci či zakořeňování, jelikož fixují vzdušný dusík, produkují fytohormony a celkově vykazují s rostlinnými kulturami mutualistický vztah (Scherling et al. 2009; Zawadzka et al. 2013). O některých zástupcích rodu *Bacillus* bylo již zmíněno výše, že v přírodě působí na růst rostlin pozitivně, a lze předpokládat, že ani v explantátových kulturách nebudou primárně vystupovat v roli patogenů. Na druhou stranu není zaručeno, že v nepřírodných podmínkách *in vitro* zůstane prospěšný symbiont vždy zcela neškodným a že rovnováha mezi mikro- a makroorganismem nebude narušena.

Samotná rodová příslušnost bakterie také o povaze jejího vztahu k rostlině s jistotou nevypovídá – například do rodu *Curtobacterium* patří i rostlinný patogen

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*, způsobující vadnutí fazolu (Osdaghi et al. 2020). Z toho vyplývá, že potenciál škodlivosti nejlépe odhadneme, bude-li identifikace kontaminantů co nejpresnější.

Závěr

Mikrobiální kontaminace rostlinných kultur *in vitro* může znamenat zásadní problém a neřídka vyžaduje likvidaci kontaminované kultury či alespoň účinný léčebný zásah. Jindy však samotný výskyt kontaminantů nebezpečí pro kultivovaný materiál nepředstavuje, což se potvrdilo i některými nálezy v našich podmínkách. Případnému zákroku proti jejich růstu by tudíž měla předcházet identifikace příslušného mikroorganismu, aby se zabránilo zbytečné aplikaci antibiotik a dalších terapeutik.

Poděkování

Výsledek byl vytvořen za podpory projektu institucionální podpory RO1525 (Ministerstvo zemědělství).

Literatura

- Ardley JK, Green PN (2023): *Methylobacterium*. IN *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Edited by ME Trujillo, S Dedysh, P DeVos, B Hedlund, P Kämpfer, FA Rainey and WB Whitman.
- Anikina I, Kaynidenov N, Turista D, Kukusheva A, Tokbergenova Z, Tuganova B, Seytkhanova K, Kaliyeva A (2025): Control of Contamination of Tissue Plant Cultures During *in vitro* Clonal Micropropagation. *OnLine J. Biol. Sci.* 25: 333–342.
- Barreto HCdS, Chagas EA, Melo AdMF, Etienne B, da Silva DCV, Araújo MdCdR (2023): Essential oils from condiment and medicinal plants in the control of contaminants from the micropropagation of *Myrciaria dubia*. *Rev. Bras. Frutic.* 45: e-879.
- Chase AB, Arevalo P, Polz MF, Berlemont R, Martiny JB (2016): Evidence for Ecological Flexibility in the Cosmopolitan Genus *Curtobacterium*. *Front. Microbiol.* 22(7): 1874.
- Cheng C, Su S, Bo S, Zheng C, Liu C, Zhang L, Xu S, Wang X, Gao P, Fan K, He Y, Zhou D, Gong Y, Zhong G, Liu Z (2024): A *Bacillus velezensis* strain isolated from oats with disease-preventing and growth-promoting properties. *Sci. Rep.* 14: 12950.
- Collins MD, Stackebrandt E (1989): Molecular taxonomic studies on some LL-diaminopimelic acid-containing coryneforms from herbage: Description of *Nocardioides fastidiosa* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 57: 289–294.
- de Ana SG, Torres-Rodríguez JM, Ramírez EA, García SM, Belmonte-Soler J. (2006): Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 16(6): 357–363.
- Di Francesco A, Zajc J, Stenberg JA (2023): *Aureobasidium* spp.: Diversity, Versatility, and Agricultural Utility. *Horticulturae* 9(1): 59.
- Ezeofor AO, Hassan SA, Abdul-Hadi JS, Iweajunwa SO, Onwuzulike AN, Odii Akpa CV, Salith HS (2025): Occurrence of molds (fungi) in indoor tissue culture laboratories. *GSC Biol. Pharm. Sci.* 31(3): 49–54.
- Izarra ML, Panta AL, Maza CR, Zea BC, Cruzado J, Gutarra LR, Rivera CR, Ellis D, Kreuze JF (2020): Identification and Control of Latent Bacteria in *in vitro* Cultures of Sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. *Front. Plant Sci.* 11: 903.
- Jurado V, Groth I, Gonzalez JM, Laiz L, Saiz-Jimenez C (2005): *Agromyces salentinus* sp. nov. and *Agromyces neolithicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(1): 153–157.
- Kałużna M, Mikiciński A, Sobiczewski P, Zawadzka M, Zenkter E, Orlikowska T (2013): Detection, isolation, and preliminary characterization of bacteria contaminating plant tissue cultures. *Acta Agrobot.* 66(4): 81–92.
- Kolozsvári Nagy J, Sule S, Sampaio JP (2005): Apple tissue culture contamination by *Rhodotorula* spp.: Identification and prevention. *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant* 41: 520–524.
- Kot AM, Kieliszek M, Piwowarek K, Błażej S, Mussagy CU (2021): *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus* – non-conventional yeasts for use in industries. *Fungal Biol. Rev.* 37: 41–58.
- Kovács ÁT (2019): *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 27(8): 724–725.
- Leifert C, Waites WM, Nicholas JR, Keetley JWW (1990): Yeast contaminants of micropropagated plant cultures. *J. Appl. Bacteriol.* 69(4): 471–476.
- Li W, Cao G, Zhu M, Zhang Y, Zhou R, Zhao Z, Guo Y, Yang W, Zheng B, Tan J, Sun Y (2022): Isolation, Identifi-

Literatura (pokračování)

fication and Pollution Prevention of Bacteria and Fungi during the Tissue Culture of Dwarf Hygro (*Hygrophila polysperma*) Explants. *Microorganisms* 10(12): 2476.

Ma Y, Wang J, Liu Y, Wang X, Zhang B, Zhang W, Chen T, Liu G, Xue L, Cui X. (2023): *Nocardioidea*: "Specialists" for Hard-to-Degrade Pollutants in the Environment. *Molecules* 28: 7433.

Mel'nik VA, Braun U, Hagedorn G (2000): Mel'nik VA: Key to the fungi of the genus *Ascochyta* Lib. (Coelomycetes). Edited and translated by VA Mel'nik, U Braun and G Hagedorn. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 379: 1–192.

Nakamura LK (1989): Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 295–300.

Odutayo OI, Amusa NA, Okutade OO, Ogunsanwo YR (2007): Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. *Afr. J. Agric. Res.* 2: 67–72.

Omamor I, Asemota A, Eke C, Eziashe E (2007): Fungal contaminants of the oil palm tissue culture in Nigerian institute for oil palm research (NIFOR). *Afr. J. Agric. Res.* 2: 534–537.

Osdaghi E, Young AJ, Harveson RM (2020): Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. *Mol. Plant Pathol.* 21: 605–621.

Oubaha B, Rathore RS, Bagri J, Singhal NK, Mazumdar K, Rishi V, Pareek A, Singla-Pareek SL (2024): *Bacillus siamensis* strain BW enhances rice growth and salinity tolerance through redox equilibrium and hormone modulation. *Curr. Plant Biol.* 37: 100321.

Pirttilä AM, Pospiech H, Laukkanen H, Myllylä R, Hohola A (2003): Two endophytic fungi in different tissues of Scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microb. Ecol.* 45(1): 53–62.

Plant preservative mixture. Available online: <https://plantcelltechnology.com/products/plant-preservative-mixture-ppm>.

Romadanova NV, Tolegen AB, Kushnarenko SV, Zholdybayeva EV, Bettoni JC (2022): Effect of Plant Preservative Mixture™ on endophytic bacteria eradication from in vitro-grown apple shoots. *Plants* 11(19): 2624.

Scherling C, Ulrich K, Ewald D, Weckwerth W (2009): A Metabolic Signature of the Beneficial Interaction of the Endophyte *Paenibacillus* sp. Isolate and In Vitro-Grown Poplar Plants Revealed by Metabolomics. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22(8): 1032–1037.

Sella SRBR, Vandenberghe LPS, Soccol CR (2014): Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiol. Res.* 169(12): 931–939.

Smith MR, Zahnley JC (2005): Production of amylase by *Arthrobacter psychrolactophilus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32(7): 277–283.

Szewczyk-Taranek B, Jaglarz A, Pałka P, Supel P, Kaszycki P, Mazur J, Pawłowska B (2020): Identification and control of endophytic bacteria during *in vitro* cultures of *Staphylea pinnata* L. *Folia Hortic.* 32(1): 47–55.

Tamura T, Yokota A (1994): Transfer of *Nocardioidea fastidiosa* Collins and Stackebrandt 1989 to the Genus *Aeromicrobium* as *Aeromicrobium fastidiosum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4): 608–611.

Tekielska D, Peňázová E, Kovács T, Křížan B, Čechová J, Eichmeier A (2019): Bacterial contamination of plant *in vitro* cultures in commercial production detected by high-throughput amplicon sequencing. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendelianae Brun.* 67(4): 1005–1014.

Wirth F, Goldani LZ. (2012): Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip. Perspect. Infect., Dis.*: 465717.

Zalila-Kolsi I, Ben-Mahmoud A, Al-Barazie R (2023): *Bacillus amyloliquefaciens*: Harnessing Its Potential for Industrial, Medical, and Agricultural Applications—A Comprehensive Review. *Microorganisms* 11: 2215.

Zawadzka M, Trzcinski P, Nowak K, Orlikowska T (2013): The impact of three bacteria isolated from contaminated plant cultures on *in vitro* multiplication and rooting of microshoots of four ornamental plants. *J. Hortic. Res.* 21(2): 41–51.

Zgurskaya H, Evtushenko L, Akimov V, Ariskina E, Dobrovolskaya T, Lysak L, Kalakoutskii L (1992): Emended Description of the Genus *Agromyces* and Description of *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces cerinus* subsp. *nitratus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces fucosus* subsp. *fucosus* sp. nov., subsp. nov., and *Agromyces fucosus* subsp. *hippuratus* sp. nov., subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 635–641.

Souhrn

Kultury *in vitro* jsou dnes široce využívány pro práci s rostlinným materiálem, a to jak pro vědecké, tak pro komerční účely. Mikrobiální kontaminace kultur vláknitými houbami, kvasinkami a bakteriemi způsobují ztráty a vyžadují aplikaci terapeutických látek. Ukazuje se však, že zdaleka ne vždy je nezbytné růst mikroorganismů za každou cenu potlačit, protože přinejmenším v případě bakterií se často jedná o symbionty, kteří s explantáty žijí v mutualistickém vztahu. Takové bakterie jsme našli i ve VŠÚO v Holovousích. Aby se předešlo nadužívání antimikrobiálních látek, je vhodné nejdříve provést identifikaci kontaminantů a teprve poté rozhodnout o případných opatřeních.

Klíčová slova: kontaminace, vláknité houby, kvasinky, bakterie, *in vitro*, explantát, kultura, identifikace

Summary

In vitro cultures are widely used for working with plant material today, both for scientific and commercial purposes. Microbial contamination of the cultures with filamentous fungi, yeasts, and bacteria causes losses and require application of therapeutic chemicals. However, it turns out that it is not always necessary to suppress the growth of microorganisms at all costs, because at least in the case of symbiotic bacteria, the contaminant may live in a mutualistic relationship with the explants. Such bacteria were also identified at the VŠÚO Holovousy. In order to avoid the overuse of antimicrobial substances, it is appropriate to first identify the contaminants and only then decide if any measures need to be implemented.

Keywords: contamination, filamentous fungi, yeasts, bacteria, *in vitro*, explant, culture, identification

POČÍTAČOVÝ DESIGN PROTEINŮ

Vojtěch Spiwok

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6, 166 28

V souvislosti s udělením Nobelovy ceny za chemii za rok 2024 Davidovi Bakerovi vzrostl zájem o počítačový design nových proteinů. Tato bouřlivě se vyvíjející disciplína má, zdá se, značný biotechnologický potenciál. Zvláště díky zavedení metod umělé inteligence se úkoly, které byly ještě před pár lety z oblasti science fiction, dnes daří realizovat. S tím roste míra úspěšnosti designu nových proteinů a klesá nutnost jejich intenzivního experimentálního testování.

Jednoduše je možné vysvětlit design nových proteinů tak, že protein vzniklý náhodným řazením aminokyselin má minimální šanci se sbalit do kompaktní jasně definované prostorové struktury. Aby se protein sbalil, je nutné aby prošel dlouhou evolucí, nebo aby ho někdo vytvořil metodami počítačového designu proteinů. Design nových proteinů je možné brát jako alternativu k hledání nových proteinů z přírodních zdrojů a k vývoji nových proteinů pomocí proteinového inženýrství, například cílené evoluce.

Za první uměle designované proteiny je možné považovat stabilní helixy a multi-helikální struktury, které v devadesátých letech designovali William F. DeGrado a David Eisenberg (Hill et al., 1990; Bryson et al., 1995). Slovo „protein“ v této chvíli musíme brát jako označení pro peptidy, které tvoří definovanou prostorovou strukturu. Design takovýchto proteinů byl hierarchický, často založený na přírodních proteinech a spočíval v kombinování různých helixů s hledáním vhodných interakcí.

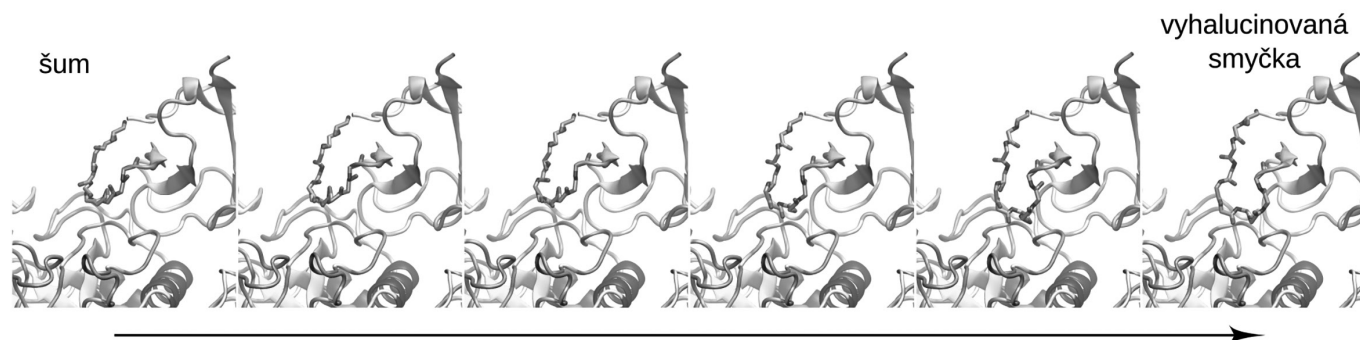
Na konci devadesátých let se objevily první počítačově navržené proteiny. Příkladem může být protein FSD-1 (Dahiyat & Mayo, 1997), k jehož designu byly využity automatizované metody molekulového modelování. Loňský laureát Nobelovy ceny David Baker obor zasáhl poprvé v roce 2003 designem proteinu Top7 (Kuhlman et al., 2003). Jedná se o jeden z prv-

ních skutečných proteinů co do délky (106 aminokyselin) a navíc je unikátní, tedy není podobný žádnému přírodnímu proteinu. Při designu tohoto proteinu byl využit program Rosetta, konkrétně jeho modul pro design proteinů, který stál při zrodu mnoha dalších proteinů.

Velkým pokrokem bylo zavedení metod umělé inteligence před několika lety. Hlavními pracovními nástroji oboru jsou programy **RFdiffusion** (z rodiny programů Rosetta) (Watson et al., 2023) a **ProteinMPNN** (Dauparas et al., 2022), případně **LigandMPNN** (Dauparas et al., 2025). Všechny jmenované programy pochází z laboratoře Davida Bakera.

RFdiffusion (Watson et al., 2023) pracuje na podobném principu jako programy pro tvorbu obrázků umělou inteligencí. Řada vědců se v minulosti zabývala možností zlepšovat nekvalitní fotografie a obrázky. Pro tento účel bylo vyvinuto mnoho metod strojového učení. Tyto metody jsou trénovány na uměle rozostřených fotografiích tak, aby z takovéto fotografie dokázali rekonstruovat původní kvalitní fotografii. Pokud takovouto metodu použijete na nekvalitní fotografii, získáme fotografii ostrou. V extrémním případě, pokud metodu použijeme na naprostý šum, metoda vyhalucinuje realistickou „fotografii“ nebo obrázek. Podobně může program RFdiffusion ze zašuměných prostorových struktur proteinu regenerovat původní struktury, nebo dokonce z náhodného šumu vyhalucinovat realistickou strukturu proteinu (Obrázek 1). Program může halucinovat úplně nebo částečně, může dohalucinovávat části proteinů, dávat nově halucinovaným proteinům symetrii a podobně.

Program RFdiffusion (alespoň v současnosti nejpožívanější verzi) neřeší aminokyselinovou sekvenci. Tu může dodat program ProteinMPNN (Dauparas et al.,



Obr. 1: Příklad halucinování smyčky proteinu programem RFdiffusion.

2022). Zkratka MPNN značí message-passing neural network. Protein je možné reprezentovat jako graf (ve smyslu teorie grafů), kde vrcholy tvoří aminokyseliny a hrany jejich interakce. Program je trénovaný na takovýchto reprezentacích známých proteinů a proto dokáže vymyslet sekvenci pro nový protein. V případě, že chceme designovat protein vážící ligand, můžeme provést podobné výpočet pomocí LigandMPNN (Dauparas et al., 2025).

Jedním z krásných příkladů aplikace designu proteinů je design proteinů rozeznávajících jiné proteiny, tedy jakýchsi umělých protilátek. Zde je potřeba zmínit pipeline **BindCraft** (Pačesa et al., 2025) od Martina Pačesy z Univerzity v Zürichu. Metoda byla testována na celé řadě proteinů, například proteinů imunitního systému nebo známých alergenů. V závislosti na cílovém proteinu vykazovala metoda úspěšnost 10 – 100 %. Disociační konstanty byly vesměs v nanomolárních řádech. I díky tomuto programu je počítačový návrh umělých protilátek blízko nahrazení tradičních metod získávání protilátek.

Podstatně složitější je situace v případě vazby ligandů. Skupina Davida Bakera pomocí programů z rodiny Rosetta navrhli několik tisíc malých barelovitých proteinů (An et al., 2024). Do každého z nich zkoušeli doctovat jednu ze čtyř nízkomolekulárních sloučenin a sekvence nadále optimalizovali pomocí LigandMPNN. Úspěch ale vyžadoval přípravu desítek tisíc syntetických genů a jejich screening, aby bylo možné získat stov-

ky funkčních vazebných proteinů. Úspěšnost postupu je tedy v řádu jednotek procent. S ohledem na rozvoj oboru je možné předpovídat, že toto číslo se v brzké době může podstatně zvýšit.

Enzymy jsou zatím ještě tvrdší oříšek. Skupina Davida Bakera použila kvantově-chemické metody pro získání aminokyselinových motivů serinových esteraz (Lauko et al., 2025). Pro tyto motivy vystavěli proteinové lešení pomocí programů rodiny Rosetta, LigandMPNN a dalších programů. Nalezení katalyticky aktivních enzymů ale vyžadovalo intenzivní screening a trojkolový redesign. Získané enzymy mají hodnoty k_{cat} v řádech 0.01–0.001 s⁻¹. Jinými slovy, jedna molekula enzymu rozštěpí jednu molekulu substrátu jednou za několik minut. To je méně než je obvyklé pro průmyslově využívané enzymy, ale je to srovnatelné s průmyslově využívanými neenzymovými katalyzátory. V oblasti designu enzymů se nyní skupina Davida Bakera soustředí na design proteasy jako terapeutika proti celiakii.

Počítačový design proteinů zahrnuje mnoho dalších zajímavých projektů, jako jsou například vývoj nanopóru pro detekci různých sloučenin, design allosterických senzorů, redesign enzymů pro degradaci plastů a další zajímavé projekty. Zajímavým výsledkem je i schválená proteinová vakcína proti COVIDu SKYCovione. *Jedná se o uměle designovaný protein tak, aby tvořil stabilní 3D strukturu a navíc obsahoval co nejvíce epitopů patogenu.*

Literatura

Bryson, J.W. et al. Protein Design: A Hierarchic Approach. *Science*, 270(5238), 935–941. doi: 10.1126/science.270.5238.935, (1995).

Dahiyat, B.I., Mayo, S.L.: De Novo Protein Design: Fully Automated Sequence Selection. *Science*, 278(5335), 82–87. doi: 10.1126/science.278.5335.82, (1997).

Dauparas, J. et al.: Robust Deep Learning–Based Protein Sequence Design Using ProteinMPNN. *Science*, 378(6615), 49–56. doi: 10.1126/science.add2187, (2022).

Dauparas, J. et al.: Atomic Context-Conditioned Protein Sequence Design Using LigandMPNN. *Nat. Methods*, 22(4), 717–723. doi: 10.1038/s41592-025-02626-1, (2025).

Hill, C.P. et al.: Crystal Structure of $\alpha 1$: Implications for Protein Design. *Science*, 249(4968): 543–546. doi: 10.1126/science.2382133, (1990).

Kuhlman, B. et al.: Design of a Novel Globular Protein Fold with Atomic-Level Accuracy. *Science*, 302(5649), 1364–1368. doi: 10.1126/science.1089427, (2003).

Lauko, A. et al.: Computational Design of Serine Hydrolases. *Science*, 388(6744), eadu2454. doi: 10.1126/science.adu2454, (2025).

Pačesa, M. et al.: One-Shot Design of Functional Protein Binders with BindCraft. *Nature*, 646(8084), 483–492. doi: 10.1038/s41586-025-09429-6, (2025).

An, L. et al.: Binding and Sensing Diverse Small Molecules Using Shape-Complementary Pseudocycles. *Science*, 385(6706), 276–282. doi: 10.1126/science.adn3780, (2024).

Watson, J.L. et al.: De Novo Design of Protein Structure and Function with RFdiffusion. *Nature*, 620(7976), 1089–1100. doi: 10.1038/s41586-023-06415-8, (2023).

MATEŘSKÉ MLÉKO JAKO RŮSTOVÝ REGULÁTOR KOJENECKÝCH KLOSTRIDIÍ

Nikol Modráčková, Blanka Krausová, Štěpánka Dvořáková, Věra Neužil Bunešová

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha – Suchbát, modrackova@af.czu.cz

Úvod

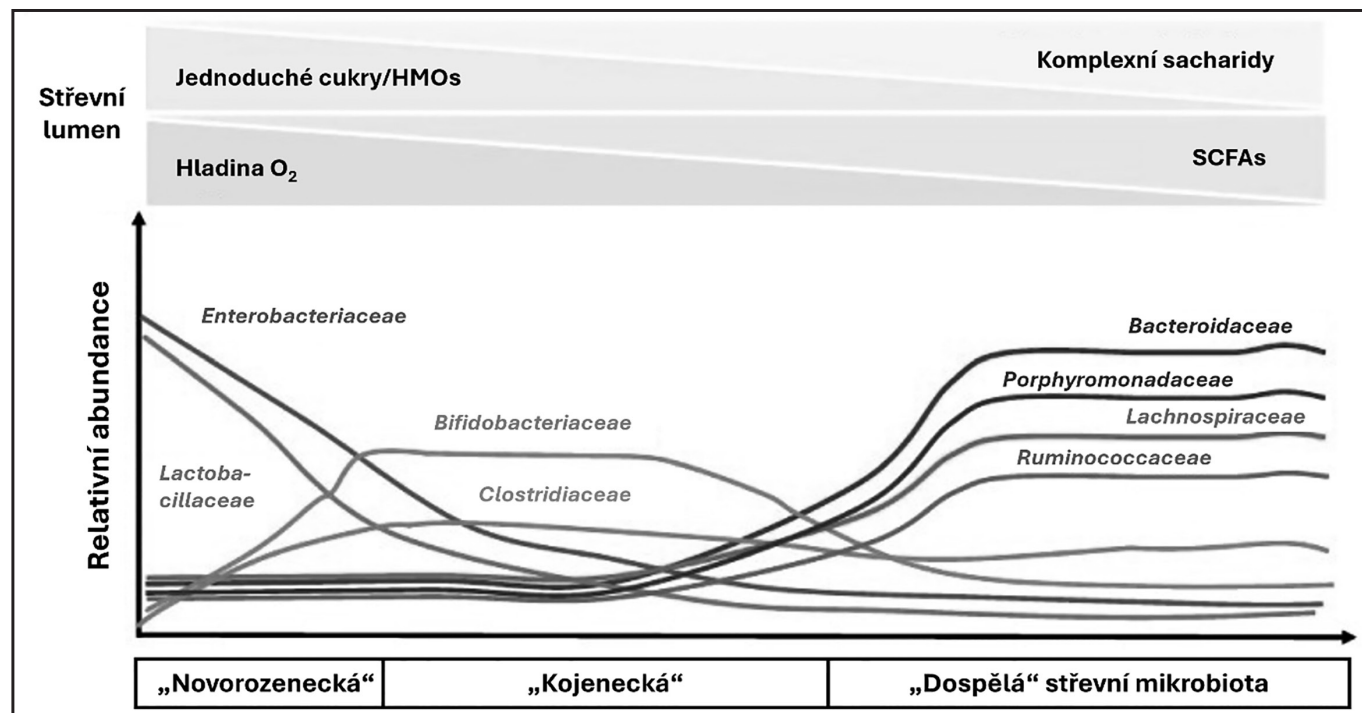
Mikroorganismy představují nedílnou součást lidského organismu a podílejí se na řadě zásadních fyziologických procesů. V rámci lidského těla tvoří řadu komplexních mikrobiálních společenství, jejichž složení a funkce se výrazně liší mezi jednotlivými částmi těla a orgánovými soustavami. Zmínit lze například gastrointestinální, kožní či urogenitální mikrobiotu (Dekabruah et al. 2020). Lidské střevo je kolonizováno obrovským množstvím mikrobů, které se vyznačuje unikátní širokou metabolickou kapacitou, intenzivní interakcí na úrovni společenství, ale i s hostitelem. Vývoj střevní mikrobioty je z pohledu zdraví hostitele zásadní proces trvající od narození až do raného dětství, kdy dochází k postupnému vytváření stabilního a funkčně robustního ekosystému. Bezprostředně po porodu je novorozenec vystaven masivní mikrobiální expozici. Samotná dynamika osídlování je určována řadou faktorů, z nichž mezi nejvýznamnější patří způsob porodu a typ výživy (Bäckhed et al. 2015; Cani 2018). Právě výživa, zejména rozdíl mezi kojením a podáváním náhradní kojenecké výživy, zásadně ovlivňuje diverzitu a funkční charakteristiku mikrobiální komunity v tomto kritickém období života jedince (Ames et al. 2023).

Mateřské mléko je unikátní biologická tekutina s nespočtem významných funkcí. Kromě makronutrientů

a mikronutrientů obsahuje i široké spektrum bioaktivních molekul jako jsou oligosacharidy mateřského mléka (*Human Milk Oligosaccharides*; HMOs) a řada antimikrobiálních složek, které formují mikrobiální prostředí charakteristické pro střevo kojenců (Masi & Stewart 2022). Vzhledem k tomu, že některé bakteriální rody, například klostridie, představují v kojeneckém období citlivý ukazatel rovnováhy střevní mikrobioty a zároveň zahrnují jak prospěšné, tak oportunně patogenní zástupce (Lopetuso et al. 2013), je pochopení jejich interakce s mateřským mlékem zásadní. Rozšíření poznatků o tom, jak mateřské mléko ovlivňuje růst typicky kojeneckých klostridiálních druhů, umožní lépe porozumět ranému vývoji střevní mikrobioty a vlivu nutričních faktorů, které významně ovlivňují stabilitu mikrobioty a zdraví kojence.

Dynamický vývoj mikrobiální komunity v prvních dnech života novorozence

Lidský gastrointestinální trakt je za fyziologických podmínek považován téměř za sterilní až do okamžiku porodu, kdy dochází k první masivní expozici mikroorganismům z okolního prostředí. Během porodu je totiž novorozenec exponován širokému spektru mikroorganismů, a to zejména mateřského původu (vaginální, fekální a kožní mikrobiota). Způsob porodu tedy v pro-



Obr. 1: Schématické znázornění zastoupení vývoje střevní mikrobioty člověka. Pro každou fázi vývoje jsou typické jiné bakteriální skupiny, které ve střevní mikrobiotě dominují. Na základě toho lze mikrobiotu rozdělit na typicky novorozeneckou, kojeneckou a dospělou. Dominantní skupiny bakteriálních čeledí odrážejí měnící se prostředí ve střevě. Obrázek byl autorkou upraven podle Sanidad & Zeng (2020).

cesu kolonizace hraje klíčovou roli. Obecně lze shrnout, že děti narozené vaginálně získávají mikroorganismy podobné vaginální a střevní mikrobiotě matky, zatímco děti narozené císařským řezem bývají kolonizovány převážně bakteriemi z kožní mikrobioty a nemocničního prostředí (Milani et al. 2017). V první fázi kolonizace střeva novorozence převažují zejména fakultativně anaerobní bakterie, zejména z čeledí *Enterobacteriaceae* a *Lactobacillaceae*, které snižují redoxní potenciál prostředí, čímž umožňují následnou kolonizaci obligátne anaerobními mikroorganismy, zejména rodů *Bifidobacterium*, *Clostridium* a *Bacteroides* (Robertson et al. 2019). Toto rané období v životě jedince představuje kritické okno pro vývoj a stimulaci imunitního systému. Případná dysbióza může zvýšit riziko vzniku alergických, metabolických či autoimunitních onemocnění (Zhang et al. 2022 b).

Zrání střevní mikrobioty je značně dynamický proces, který je ovlivňován řadou vnějších a vnitřních faktorů. Mezi vnější determinanty patří zejména způsob porodu, výživa novorozence, užívání antibiotik, hygienické podmínky, expozice prostředí a geografické faktory, zatímco mezi ty vnitřní jsou řazeny genetická výbava novorozence, fyziologické vlastnosti gastrointestinálního traktu a funkční stav imunitního systému (Hill et al. 2021). Dále hrají významnou roli i specifické interakce mezi buněčnými povrchovými strukturami mikroorganismů a receptory střevní sliznice hostitele. Tyto faktory společně určují, které mikroorganismy mohou dlouhodobě kolonizovat střevní prostředí (Lin et al. 2024).

Faktory ovlivňující vývoj střevní mikrobioty lze dále rozlišit i podle období jejich působení na prenatální, neonatální a postnatální. Prenatální faktory zahrnují stav a mikrobiotu matky, neonatální období je klíčové pro počáteční kolonizaci a postnatální období pak pro stabilizaci mikrobiální komunity. Narušení těchto procesů je prokazatelně spojováno se zvýšeným rizikem rozvoje řady nežádoucích stavů v pozdějším věku (Suárez-Martínez et al. 2023).

Kolem druhého až třetího roku života se střevní mikrobiota dítěte podobá složením a funkčními charakteristikami mikrobiotě dospělého jedince. Tento přirozený vývoj je spojen se zvýšením druhové diverzity, vyšší stabilitou mikrobiální komunity a její vyšší odolností (Sanidad & Zeng 2020). Schématické znázornění závislosti četnosti hlavních bakteriálních čeledí vyskytujících se ve střevní mikrobiotě člověka na jeho věku je znázorněno na Obrázku 1. Výsledné složení je tedy výsledkem vlivu genetických predispozic, mateřských faktorů, výživy a prostředí.

Selektivní vliv mateřského mléka na vývoj střevní mikrobioty

Mateřské mléko je komplexní biologická tekutina, která novorozencům a kojencům poskytuje nejen nezbytné živiny, ale i řadu významných přirozeně obsažených bioaktivních látek, které se podílejí na formování rané mikrobiální kolonizace trávicího traktu. Složení mateřského mléka se liší mezi ženami v závislosti na genetice, výživě, laktaci a dalších faktorech (Dror & Allen 2018). Za jednu z klíčových složek v této

souvislosti lze považovat HMOs, které představují sice až třetí nejpočetnější zastoupenou skupinu pevných složek po laktóze a lipidech, nicméně si ale zachovávají řadu významných funkcí. Svým unikátním složením představují první prebiotikum pro novorozence, jehož příjem zajistí selektivní podporu růstu žádoucích mikroorganismů, zejména některých druhů kojeneckých bifidobakterií, a podpoří tak úspěšnou kolonizaci střeva. HMOs, které nebyly trávicími enzymy hostitele využity, jsou totiž ve střevě fermentovány kompetentními mikroby za vzniku těkavých mastných kyselin a laktátu, čímž je ve střevě významně snižováno pH, a je tak značně podpořena kolonizační rezistence daného prostředí vůči nežádoucím mikroorganismům. HMOs dále také blokují vazebná místa na střevním epitelu, která jsou poté nedostupná pro nežádoucí potenciálně patogení mikroby. Kromě HMOs mateřské mléko obsahuje i řadu dalších antimikrobiálních a imunomodulačních složek, například sekretorní IgA, laktoferin, lysozym, různé peptidy a proteiny s antimikrobiálním účinkem, které se podílejí na ochraně novorozence a zároveň i na modulaci mikrobioty (Ray et al. 2019). Například glykoprotein laktoferin, který má vysokou afinitu k železu, umožňuje volně dostupné železo vázat, čímž omezuje růst řady patogenů (Kulesza-Brończyk et al. 2023). Lysozym poté narušuje peptidoglykan v buněčné stěně některých gram-pozitivních bakterií (Ferraboschi et al. 2021). Mateřské mléko navíc přirozeně obsahuje i řadu bakterií, jejichž výskyt je často detekován i ve střevě kojence (Selma-Royo et al. 2021). Není tedy pouze pasivním zdrojem živin a antimikrobiálních látek, ale lze ho považovat za aktivní biologickou tekutinu se značnou regulační funkcí. Na základě všech těchto žádoucích vlastností WHO a UNICEF doporučují včasné zahájení kojení do jedné hodiny od porodu a výlučné kojení po dobu prvních 6 měsíců života. Od šesti měsíců věku kojence je poté doporučováno zavedení nutričně adekvátních a bezpečných příkrmů spolu s pokračujícím kojením do 2 let věku nebo déle (WHO 2023).

V případě podávání náhradních kojeneckých výživ namísto výlučného kojení, dochází k prokazatelně jinému trendu kolonizace. Tyto výživy totiž nelze vyrobit tak, aby zcela přesně simulovaly mateřské mléko. Zejména tedy obsahem unikátních HMOs, které stále nelze identicky vyrobit, ale i z důvodu obsahu dalších bioaktivních látek. Střevní mikrobiota kojenců přijímajících umělou výživu je tedy prokazatelně rozmanitější, s nižším zastoupením bifidobakterií a často vyšším zastoupením jiných anaerobů, a to většinou klostridií, ve srovnání s kojenými dětmi. Složení mateřského mléka a náhradní mléčné výživy má tedy významný dopad na raný vývoj střevní mikrobioty. Dále je velmi důležité si uvědomit, že žádná náhradní kojenecká výživa zatím nemůže plně napodobit složení a biologickou aktivitu mateřského mléka, přestože jsou tyto produkty v dnešní době často obohacovány o různé prebiotické substráty, jejichž frakce se některým strukturám HMOs alespoň podobají (Baumann-Dudenhoefter et al. 2018; O'Neill et al. 2020; Laursen 2021).

Kojení tedy podporuje výskyt jiných bakterií, zejména bifidobakterií v neprospěch klostridií. Jejich zastoupení je ve střevní mikrobiotě dominantní a je považováno za

žádoucí z důvodu řady důležitých funkcí (Lawson et al. 2020). I proto jsou bifidobakterie často doporučovány jako vhodná probiotika pro kojence. Většinou jsou dodávány formou doplňků stravy nebo jsou jimi obohacovány náhradní kojenecké výživy (Sjælland et al. 2025).

Klostridie jako významní zástupci střevního ekosystému kojence

Rod *Clostridium* představuje nepostradatelnou, ale často nepochopenou součást střevní mikrobioty člověka. Zatímco některé druhy mají za fyziologických podmínek komenzální charakter a přispívají ke zdraví hostitele a udržování střevní rovnováhy, jiné mohou při narušení rovnováhy mikrobioty nebo oslabení imunity hostitele přejít do patogenního stavu (Lopetuso et al. 2013). Rod *Clostridium* zahrnuje širokou skupinu převážně obligátně anaerobních, sporulujících grampozitivních bakterií patřících do čeledi *Clostridiaceae* v rámci kmene Firmicutes. Díky schopnosti tvorby odolných spor jsou klostridie všudypřítomné. Vyskytují se v půdě, vodě, trávicím traktu zvířat i člověka, ale také v anaerobních sedimentech či odpadních vodách. Tyto bakterie vykazují mimořádně široké metabolické spektrum, dokážou fermentovat sacharidy, proteiny i lipidy a často produkují plyn, organické kyseliny (zejména butyrát) a další metabolity. Právě tato fermentační aktivita dává klostridiím zásadní ekologický význam v rozkladu organické hmoty a cyklu uhlíku (Dürre 2021).

Klostridie jsou taxonomicky i fyziologicky velmi heterogenní skupinou bakterií. Zahrnují jak neškodné nebo dokonce prospěšné druhy (například *Clostridium butyricum*), tak vysoce patogenní zástupce způsobující závažná onemocnění lidí i zvířat (například *C. botulinum* a *C. tetani*). Ve střevní mikrobiotě člověka jsou komenzální klostridie stabilní a početnou skupinou, která se podílí na fermentaci vlákniny, produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (*Short Chain Fatty Acids*; SCFAs) a modulaci imunitního systému. Konkrétně u kojenců jsou běžně detekovány variabilní druhy klostridií, přičemž jejich zastoupení se mění v závislosti na výživě a maturaci střevního ekosystému. Některé klostridie tak zaujímají dvojí roli ve střevní mikrobiotě (Egan et al. 2021; Bhattacharjee et al. 2023).

Typickým příkladem střevního komenzála je druh *C. perfringens*. Je známý jako původce plynové gangrény a potravinových otrav, ale současně se běžně vyskytuje ve střevní mikrobiotě zdravých lidí, včetně kojenců. Vykazuje vysokou metabolickou flexibilitu a schopnost produkovat široké spektrum enzymů a toxinů. Dokáže efektivně využívat různé zdroje živin, včetně sacharidů, peptidů a lipidů, a přizpůsobuje se měnícím se podmínkám prostředí. Některé kmeny *C. perfringens* jsou navíc aerotolerantní, což umožňuje jejich krátkodobé přežití v přítomnosti kyslíku a jejich vyšší odolnost. Typicky fermentuje cukry za tvorby kyseliny máselné, mléčné a octové, čímž významně ovlivňuje střevní prostředí (Kiu & Hall 2018). Komenzální charakter tohoto druhu je regulován přítomností dalších mikroorganismů, které s ním interagují. V kojenecké mikrobiotě se na tom podílejí zejména bifidobakterie a laktobacily, ale i samotná dieta, kdy mateřské mléko obsahuje

řadu již zmiňovaných antimikrobiálních látek, například HMOs, laktoferin, lysozym apod. (Kirmiz et al. 2018; Komatsu et al. 2022; Ge et al. 2024). Tyto faktory tedy významně ovlivňují, kdy a za jakých podmínek tato klostridie může představovat riziko pro zdraví hostitele.

V případě, že dojde k narušení střevní mikrobiální rovnováhy a oslabení hostitele (například po antibiotické léčbě), může dojít k přemnožení a expresi toxinů *C. perfringens* vedoucích ke klinickým projevům, jako jsou průjemy, nekrotizující enteritida nebo plynová gangréna. Obecně lze tedy shrnout, že tento klostridiální druh je významně adaptabilní, nikoliv jednoznačně „škodlivý“. Jedná se spíše o podmíněného oportunistu, jehož charakter určuje kontext střevního prostředí (Ba et al. 2024).

Schopnost klostridií využívat mateřské mléko

Jak již bylo zmíněno, mateřské mléko je považováno za ideální výživu novorozence. Je také známo, že významně podporuje prospěšné bakterie ve střevní mikrobiotě kojenců, zejména bifidobakterie v neprospěch klostridií. Proč si ale přesto v tomto konkurenčním prostředí kojenecké klostridie stále zachovávají své místo? Kromě taxonomie se z fyziologického hlediska kojenecké druhy bifidobakterií a klostridií liší i ve spektru produkováných metabolitů. Bifidobakterie produkují především acetát, laktát a formiát, zatímco klostridie jsou významnými producenty širšího spektra SCFAs, které je značně ovlivněno metabolizovaným substrátem (Tsukuda et al. 2021). Velmi zajímavých klostridiálním metabolitem je například butyrát, který má klíčové imunomodulační účinky, přispívá k udržení integrity střevní bariéry a je zdrojem energie pro enterocyty (Siddiqui & Cresci 2021). Všechny tyto vlastnosti jsou však velmi často druhově a kmenově specifické. Přítomnost některých klostridií je tedy za fyziologických podmínek žádoucí, nicméně některé druhy mohou způsobovat střevní záněty či anaerobní infekce, a to nejen po antibiotické terapii, ale i při působení stresových faktorů (Lopetuso et al. 2013). Velmi důležité je si ale uvědomit, že většina kojeneckých klostridií je spolu se svým hostitelem v komenzálním vztahu (Lopetuso et al. 2013; Guo et al. 2020). Je zároveň pravděpodobné, že mateřské mléko s jeho unikátním složením je velmi důležitý faktor, který se podílí na udržování klostridií v kojenecké mikrobiotě v rovnováze nejen s hostitelem, ale i s ostatními přítomnými mikroorganismy.

Výskyt klostridií ve střevní mikrobiotě kojence a vliv příjmu mateřského mléka bylo předmětem zájmu řady vědeckých studií. Při testování schopnosti růstu vybraných druhů bifidobakterií a klostridií na mateřském a kravském mléce, laktóze a různých frakcích HMOs bylo zjištěno, že obě bakteriální skupiny běžně využívají kravské mléko i laktózu. Nicméně pouze bifidobakterie byly schopny využít i mateřské mléko a HMOs. Tento jev by mohl být podpořen i přítomností přirozeně obsaženého lysozymu v mateřském mléce. Kojenecké druhy bifidobakterií jsou totiž vůči lysozymu rezistentní, zatímco většina klostridií je vysoce citlivá (Rockova et al. 2011). Využitím HMOs žádoucími mikroby totiž dojde k vytvoření kompetitivního prostředí ve střevě, což

brání nadměrnému rozvoji potenciálně patogenních bakterií, včetně některých klostridií (Zhang et al. 2022a), jako je například *Clostridioides difficile*. Je zajímavé, že přestože má infekce *Cl. difficile* u dospělých lidí obvykle závažný klinický průběh, u zdravých kojenců je kolonizace asymptomatická a poměrně běžná, a to i přes vysokou míru detekce. Mechanismy této tolerance nejsou dosud plně objasněny, nicméně lze předpokládat, že právě složení střevního mikrobiomu, respektive metabolomu, které je významně ovlivňováno výživou kojence, reguluje expresi genů souvisejících s patogenitou (Semon et al. 2021). Kromě *Cl. difficile* bylo ve střevní mikrobiotě kojence bez zdravotních obtíží detekováno velké množství dalších klostridiálních druhů, jako je *C. perfringens*, *C. paraputrificum*, *C. tertium*, *C. leptum*, *C. symbiosum*, *C. butyricum*, *C. ramosum*, *C. baratii* a *C. jeddahense*, což naznačuje jejich kmenzální charakter (Stoeva et al. 2021; Grenda et al. 2022; Ingrubelli et al. 2023).

Za účelem ověření schopnosti využívat mateřské mléko byla v rámci diplomových prací na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky (ČZU v Praze) *in vitro* otestována široká sbírka kojeneckých klostridií, které byly originálně izolovány ze střevní mikrobioty kojenců krmených mateřským mlékem bez zdravotních obtíží. Schopnost využívat mateřské mléko byla druhově a kmenově specifická. Mateřské mléko zcela inhibovalo druhy *C. tertium*, *C. butyricum*, *Cl. difficile* a *Paenibacillus sordellii*. Je zajímavé, že přestože druh *Paraclostridium bifermentans* mateřské mléko nevyužíval, byl schopen v něm přežít. Oproti tomu byl druh *C. perfringens* dokonce k utillizaci mléka kompetentní. Přestože byla tato schopnost poměrně častá, existovaly výjimky pro některé z testovaných kmenů. Do testování byly zahrnuty i náhradní kojenecké výživy, které kromě *C. perfringens* umožnily růst také druhům *P. bifermentans* a *C. tertium* (zatím nepublikovaná data). Schopnost mírného růstu *C. perfringens* v mateřském mléce, a dokonce i utillizace některých frakcí HMOs byla potvrzena i v dalších studiích (Marcobal et al. 2010; Salli et al. 2020; Shaw et al. 2020). V širším kontextu je nicméně velmi důležité si uvědomit, že střevní mikrobiota kojence je komplexní komunita, ve které dochází k nespočtu interakcí a zprostředkovávání substrátů (Culp & Goodman 2023), a lze tedy předpokládat, že přestože většina kojeneckých klostridií není schopna v monokultuře mateřské mléko využívat, jinak by tomu bylo při testování bakteriálních konsorcií. Zároveň je žádoucí provedení dalších studií pro zhodnocení schopnosti růstu variabilních druhů kojeneckých klostridií na frakcích HMOs. Je totiž možné, že některé z nich k tomu mohou být kompetentní jako výsledek jejich adaptace na kojenecké střevo s příjmem mateřského mléka.

Zmiňovaný růst, který byl umožněn v náhradních kojeneckých výživách, mohl být podpořen i obsahem

prebiotických složek, které byly do testovaných výživ přidány. Jedná se například o řadu biotechnologicky vyráběných oligosacharidů podobným oligosacharidům v mateřském mléce (*Human-identical Milk Oligosaccharides*; HiMOs) nebo galaktooligosacharidů (GOS) a fruktooligosacharidů (FOS), které mají zlepšit vlastnosti umělých výživ a zajistit správný fyziologický vývoj střevní mikrobioty kojenců (Béghin et al. 2021). Bylo již nicméně prokázáno, že některé z těchto substrátů podporují i jiné necílené skupiny mikroorganismů. Jedná se například o FOS, GOS, rafinózu, stachyózu a inulin, které kojenecké klostridie běžně dokáží utillizovat (Rada et al. 2008). Cílem vývoje by tedy mělo být navrhovat a vyrábět takové výživy, aby se co nejvíce podobaly svým složením mateřskému mléku. Velmi důležité je rozlišovat mezi HMOs v mateřském mléce a uměle přidanými prebiotiky v náhradních kojeneckých výživách, protože mohou způsobit zcela odlišný efekt na střevní mikrobiom, než na který bylo cíleno.

Závěr

Klostridie představují významnou součást rané střevní mikrobioty kojence. Jejich přítomnost i funkční charakter jsou regulovány řadou faktorů, zejména způsobem porodu a typem výživy. Přestože mateřské mléko díky unikátní kombinaci HMOs a antimikrobiálních složek selektivně podporuje růst bifidobakterií v neprospěch klostridií, klostridie si ve střevní komunitě zachovávají své místo. Některé druhy klostridií kojeneckého původu dokonce vykazují schopnost v tomto prostředí nejen perzistovat, ale i prosperovat. Mezi ně patří i *C. perfringens*, běžný kmenzál, jehož role ve střevní mikrobiotě kojenců stále není zcela jasná. Schopnost využívat mateřské mléko a jeho složky je výrazně druhově i kmenově specifická. Pro udržení střevní homeostázy, jak na úrovni mikrobiální komunity, tak ve vztahu k hostiteli, je proto zásadní vhodná volba výživy, která podporuje mikrobiální rovnováhu. Pro potvrzení schopnosti klostridií metabolizovat mateřské mléko a HMOs je však nezbytné provést další experimenty zahrnující větší počet kmenů napříč jednotlivými druhy. Dosud dostupných studií je totiž nedostatek a pro většinu kojeneckých druhů klostridií tyto informace stále chybí. Tyto poznatky jsou žádoucí pro vývoj náhradních kojeneckých výživ, a s tím související vhodnou volbu probiotik a prebiotik, které mohou účinněji podporovat fyziologický vývoj střevního ekosystému v raném dětství.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory grantů MŠMT LUAUS23014 a METROFOOD-CZ, č. LM2023064. Autoři by touto cestou chtěli poděkovat studentům Bc. Adéle Andrášové, Ing. Anně Černé a Eugeniovi Ingrubellimu, Msc., kteří na tomto tématu spolupracovali v rámci svých závěrečných prací.

Literatura

Ames SR, Lotoski LC, Azad MB. 2023. Comparing early life nutritional sources and human milk feeding practices: personalized and dynamic nutrition supports infant gut microbiome development and immune system maturation. *Gut Microbes* **15**:2190305.

Ba X, Jin Y, Ning X, Gao Y, Li W, Li Y, Wang Y, Zhou J. 2024. *Clostridium perfringens* in the intestine: Innocent bystander or serious threat? *Microorganisms* **12**:1610.

Baumann-Dudenhoeffer AM, D'Souza AW, Tarr PI, War-

Literatura (pokračování)

- ner BB, Dantas G. 2018. Infant diet and maternal gestational weight gain predict early metabolic maturation of gut microbiomes. *Nat. Med.* **24**:1822-1829.
- Bhattacharjee D, Flores C, Woelfel-Monsivais C, See-katz AM. 2023. Diversity and prevalence of *Clostridium innocuum* in the human gut microbiota. *Msphere* **8**:e00569-00522.
- Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H. 2015. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* **17**:690-703.
- Béghin L, Tims S, Roelofs M, Rougé C, Oozeer R, Rakza T, Chirico G, Roeselers G, Knol J, Rozé JC. 2021. Fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* C50 and *Streptococcus thermophilus* O65) with prebiotic oligosaccharides is safe and modulates the gut microbiota towards a microbiota closer to that of breastfed infants. *Clin. Nutr.* **40**:778-787.
- Canli PD. 2018. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **67**:1716-1725.
- Culp EJ, Goodman AL. 2023. Cross-feeding in the gut microbiome: ecology and mechanisms. *Cell Host Microbe* **31**:485-499.
- Dekaboruah E, Suryavanshi MV, Chettri D, Verma AK. 2020. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Arch. Microbiol.* **202**:2147-2167.
- Dror DK, Allen LH. 2018. Overview of nutrients in human milk. *Adv. Nutr.* **9**:278S-294S.
- Dürre P. 2021. The Genus *Clostridium*. Pages 325-338. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press.
- Egan M, Dempsey E, Ryan CA, Ross RP, Stanton C. 2021. The sporobiota of the human gut. *Gut Microbes* **13**:1863134.
- Ferraboschi P, Ciceri S, Grisenti P. 2021. Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic. *Antibiotics* **10**:1534.
- Ge H, Zhu W, Zhang J, Wang Z, Shi H, Sun J, Shi M. 2024. Human milk microbiota and oligosaccharides in colostrum and mature milk: comparison and correlation. *Front. Nutr.* **11**:1512700.
- Grenda T, Grenda A, Domaradzki P, Krawczyk P, Kwiatek K. 2022. Probiotic potential of *Clostridium* spp.—Advantages and doubts. *Curr. Issues Mol. Biol.* **44**:3118-3130.
- Guo P, Zhang K, Ma X, He P. 2020. *Clostridium* species as probiotics: potentials and challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **11**:1-10.
- Hill L, Sharma R, Hart L, Popov J, Moshkovich M, Pai N. 2021. The neonatal microbiome in utero and beyond: perinatal influences and long-term impacts. *J. Lab. Med.* **45**:275-291.
- Ingrubelli E, Modrackova N, Tejnecky V, Killer J, Schwab C, Neuzil-Bunesova V. 2023. Culture-dependent screening of endospore-forming clostridia in infant feces. *BMC Microbiol.* **23**:347.
- Kirmiz N, Robinson RC, Shah IM, Barile D, Mills DA. 2018. Milk glycans and their interaction with the infant-gut microbiota. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **9**:429-450.
- Kiu R, Hall LJ. 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg. Microbes Infect.* **7**:1-15.
- Komatsu Y, Kumakura D, Seto N, Izumi H, Takeda Y, Ohnishi Y, Nakaoka S, Aizawa T. 2022. Dynamic associations of milk components with the infant gut microbiome and fecal metabolites in a mother–infant model by microbiome, NMR metabolomic, and time-series clustering analyses. *Front. Nutr.* **8**:813690.
- Kulesza-Brończyk B, Bień A, Sobieraj P, Orczyk-Pawłłowicz M, Lis-Kuberka J, Czosnykowska-Łukacka M, Bzikowska-Jura A. 2023. Factors affecting total protein and lactoferrin in human milk. *Sci. Rep.* **13**:22434.
- Laursen MF. 2021. Gut microbiota development: influence of diet from infancy to toddlerhood. *Ann. Nutr. Metab.* **77**:21-34.
- Lawson MAE, O'Neill IJ, Kujawska M, Javadi SG, Wijeyesekera A, Flegg Z, Chalklen L, Hall LJ. 2020. Breast milk-derived human milk oligosaccharides promote *Bifidobacterium* interactions within a single ecosystem. *ISME J.* **14**:635-648.
- Lin Q, Lin S, Fan Z, Liu J, Ye D, Guo P. 2024. A review of the mechanisms of bacterial colonization of the mammal gut. *Microorganisms* **12**:1026.
- Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathog.* **5**:23.
- Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. 2010. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J. Agri. Food Chem.* **58**:5334-5340.
- Masi AC, Stewart CJ. 2022. Untangling human milk oligosaccharides and infant gut microbiome. *IScience* **25**.
- Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Palacio SD, Montes SA, Mancabelli L. 2017. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **81**.
- O'Neill IJ, Sanchez Gallardo R, Saldova R, Murphy EF, Cotter PD, McAuliffe FM, van Sinderen D. 2020. Maternal and infant factors that shape neonatal gut colonization by bacteria. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**:651-664.
- Rada V, Nevoral J, Trojanova I, Tomankova E, Smehilova M, Killer J. 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in *in vitro* conditions. *Anaerobe* **14**:205-208.
- Ray C, Kerketta JA, Rao S, Patel S, Dutt S, Arora K, Pour-

Literatura (pokračování)

- nami F, Bhushan P. 2019. Human milk oligosaccharides: The journey ahead. *Int. J. Pediatr.* **2019**:2390240.
- Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. 2019. The human microbiome and child growth—first 1000 days and beyond. *Trends Microbiol.* **27**:131-147.
- Rockova S, Rada V, Marsik P, Vlkova E, Bunesova V, Sklenar J, Splichal I. 2011. Growth of bifidobacteria and clostridia on human and cow milk saccharides. *Anaerobe* **17**:223-225.
- Salli K, Hirvonen J, Siitonen J, Ahonen I, Anglenius H, Maukonen J. 2020. Selective utilization of the human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose, 3-fucosyllactose, and difucosyllactose by various probiotic and pathogenic bacteria. *J. Agri. Food Chem.* **69**:170-182.
- Sanidad KZ, Zeng MY. 2020. Neonatal gut microbiome and immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* **56**:30-37.
- Selma-Royo M, Lerma JC, Cortes-Macias E, Collado MC. 2021. Human milk microbiome: from actual knowledge to future perspective. *Semin. Perinatol.* **45**:151450.
- Semon AK, Keenan O, Zackular JP. 2021. *Clostridioides difficile* and the microbiota early in life. *J. Pediatr. Infect., DiS. Soc.* **10**:S3-S7.
- Shaw AG, Cornwell E, Sim K, Thrower H, Scott H, Brown JCS, Dixon RA, Kroll JS. 2020. Dynamics of toxigenic *Clostridium perfringens* colonisation in a cohort of prematurely born neonatal infants. *BMC Pediatr.* **20**:1-11.
- Siddiqui MT, Cresci GAM. 2021. The immunomodulatory functions of butyrate. *J. Inflamm. Res.*: 6025-6041.
- Sjælland MA, Philipsen MT, Henriksen TB, Skipper J, Rubak SLM. 2025. Probiotics in Term Infants: Clinical Impact of Infant-Type Bifidobacteria-A Systematic Review and Meta-Analyses. *J. Nutr.*
- Stoeva MK, Garcia-So J, Justice N, Myers J, Tyagi S, Nemchek M, McMurdie PJ, Kolterman O, Eid J. 2021. Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease. *Gut Microbes* **13**:1907272.
- Suárez-Martínez C, Santaella-Pascual M, Yagüe-Guirao G, Martínez-Graciá C. 2023. Infant gut microbiota colonization: influence of prenatal and postnatal factors, focusing on diet. *Front. Microbiol.* **14**:1236254.
- Tsukuda N, Yahagi K, Hara T, Watanabe Y, Matsumoto H, Mori H, Higashi K, Tsuji H, Matsumoto S, Kurokawa K. 2021. Key bacterial taxa and metabolic pathways affecting gut short-chain fatty acid profiles in early life. *ISME J.* **15**:2574-2590.
- WHO. 2023. Infant and young child feeding, Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding>.
- Zhang B, Li L-Q, Liu F, Wu J-Y. 2022a. Human milk oligosaccharides and infant gut microbiota: Molecular structures, utilization strategies and immune function. *Carbohydr. Polym.* **276**:118738.
- Zhang H, Zhang Z, Liao Y, Zhang W, Tang D. 2022 b. The complex link and disease between the gut microbiome and the immune system in infants. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**:924119.

Souhrn

Střevní mikrobiota kojence představuje dynamický ekosystém, který zajišťuje odolnost a zachování zdraví svého hostitele. K masivní počáteční mikrobiální kolonizaci novorozeneckého střeva dochází bezprostředně po narození jedince. Formování je zajištěno zejména mateřskou mikrobiotou, mléčnou dietou a okolním prostředím. Mateřské mléko svým jedinečným složením a antimikrobiálními vlastnostmi ve střevní mikrobiotě kojenců selektivně podporuje bifidobakterie, jejichž zastoupení je dominantní. Naopak mikrobiota dětí krmených náhradní kojeneckou výživou bývá mnohem rozmanitější s typicky vyšším podílem klostridií v neprospěch bifidobakterií. I přes tyto rozdíly však klostridie představují důležitou součást střevního ekosystému všech kojenců. Zvláštní pozornost si zaslouží druh *Clostridium perfringens*, který je známý svým patogenním potenciálem, schopností tvořit spory a produkovat široké spektrum metabolitů a toxinů. Ve střevní mikrobiotě si nicméně zachovává komenzální charakter. Je zcela běžně detekován u kojenců bez jakýchkoli klinických projevů. Jeho aktivita je výrazně ovlivněna složením střevního prostředí a přítomností dalších mikroorganismů, které mohou jeho růst a metabolismus modulovat, a stejně tak dietou. Dostupné poznatky naznačují, že mateřské mléko významně reguluje růst některých typických klostridiálních druhů a působí jako přirozený selekční faktor mikrobioty kojenců. Výjimkou je ale *C. perfringens*, který je běžnou součástí střevní mikrobioty kojenců, protože díky svým specifickým adaptačním mechanismům dokáže překonávat antimikrobiální účinky mateřského mléka a prosperovat v prostředí, které je pro většinu ostatních klostridií nepříznivé.

Klíčová slova: kojenecká výživa; mateřské mléko; střevní mikrobiota; klostridie; komenzální charakter

Summary

The infant gut microbiota represents a dynamic ecosystem that ensures the resistance and maintenance of its host's health. Massive initial microbial colonisation of the neonatal gut occurs immediately after the birth of the individual. Formation is ensured mainly by the maternal microbiota, milk diet, and the surrounding environment. With its unique composition and antimicrobial properties, human milk selectively supports the growth of bifidobacteria, which are usually dominant in the gut microbiota of infants. On the contrary, the microbiota of children fed with infant formula tends to be more diverse, with a typically higher proportion of clostridia to the detriment of bifidobacteria. Despite these differences, clostridia represent an important part of the gut ecosystem of all infants. The species *Clostridium perfringens* warrants special attention due to its pathogenic potential, ability to form spores, and production of a wide range of metabolites and toxins. However, it retains a commensal character in the intestinal microbiota. It is commonly detected in infants without any clinical manifestations. Its activity is significantly influenced by the composition of the gut environment and the presence of other microorganisms that can modulate its growth and metabolism, as well as by diet. Based on several available studies, human milk significantly regulates the growth of some typical clostridial species and acts as a natural selection factor for the infant microbiota. An exception is *C. perfringens*, which is a common part of the infant gut microbiota because, thanks to its specific adaptation mechanisms, it can overcome the antimicrobial effects of human milk and thrive in an environment that is unfavourable for most other clostridia.

Keywords: infant nutrition; human milk; gut microbiota; clostridia; commensal character

ORGANIC MATTER CONTENT SELECTIVELY BINDS SPECIFIC TRACE METALS IN ANAEROBIC DIGESTATE SAMPLES

Aleksandra Ilic^{a,b}, Vojtěch Kouba^a, Jo De Vrieze^{c,d}, Jan Bartáček^a

^aUniversity of Chemistry and Technology Prague, Department of Water Technology and Environmental Engineering, Technická 5, 166 28 Prague, Czechia

^bDepartment of Green Chemistry and Technology, Ghent University, Frieda Saeyssstraat 1, B-9052 Gent, Belgium

^cCenter for Microbial Ecology and Technology (CMET), Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium

^dCentre for Advanced Process Technology for Urban Resource recovery (CAPTURE), P. O. Frieda Saeyssstraat 1, B-9000 Gent, Belgium

Corresponding author: Aleksandra Ilic, Frieda Saeyssstraat 1, B-9052 Gent

ilicl@vscht.cz

Introduction

Efficiency and stability of microbial processes involved in anaerobic digestion require bioavailable trace metals such as Co, Ni, Fe, Zn, Mn, Mo and W (Kuo and Parkin 1996, Gonzalez-Gil, Jansen et al. 2003). Conversely, the bioavailability of trace metals also plays a crucial role in the final disposal of digestates, as it affects their toxicity to receiving ecosystems (Aquino and Stuckey 2004, Laera, Shakeri Yekta et al. 2019, Zheng, Zou et al. 2022). In digestates, trace metals can be present as free ions, bound by inorganics, organics, or sorbed on the digestate biomass. But not all the trace metals are available for an uptake and metabolic incorporation, i.e. bioavailable. Bioavailability of trace metals depends on their binding to chelating functional groups such as carboxyl, hydroxyl, phenolic or amino groups (Callander and Barford 1983, Roussel 2013). These functional groups can affect metal bioavailability in both directions, making them less or more bioavailable; they are commonly part of humic and fulvic acids, vitamins and siderophores. These organics have been expressed and measured by various methods.

One of the most common ways to fractionate metals relies on the selectivity of extractants applied in sequential extractions. The most frequent sequential extractions used for anaerobic samples are European Community Bureau of Reference in Brussels (BCR) (Cao, Wang et al. 2018), Tessier (Zhu, Qiang et al. 2014) and their modified versions (Hullebusch, Uotomo et al. 2005, Gustavsson, Yekta et al. 2013, Yekta, Skyllberg et al. 2017). Each of these extraction methods contains a fraction which represents metals bound to organics (and sulphides). In the case of BCR extraction, extractants in the organic phase are hydrogen peroxide and ammonium acetate, while Tessier extraction uses nitric acid instead of ammonium acetate. Even though widely applied, these methods have drawbacks:

- 1) organic fraction is operationally defined based on a certain extractant selectivity,
- 2) many modified versions of the standardised protocols are not verified, resulting in low procedure uniformity
- 3) operational parameters affect the procedure to high extent (Bacon and Davidson 2008, Thanh, Ketheesan et al. 2016).

Another approach has been to look at the organic products excreted by the biomass i.e., soluble micro-

bial products (SMPs) and extracellular polymeric substances (EPS), and their metal binding abilities (Kuo and Parkin 1996, Patidar and Tare 2008, d'Abzac, Bordas et al. 2010, Liu, Chang et al. 2015, Hasani Zadeh, Serrano et al. 2022). SMPs and EPS consist mainly from proteins, polysaccharides and humic-like substances (d'Abzac, Bordas et al. 2013), but can also include DNA, lipids and small molecules (Kunacheva and Stuckey 2014). SMPs are often quantified as chemical oxygen demand (COD) of soluble effluent subtracted by COD of volatile fatty acids and residual substrate (Kunacheva and Stuckey 2014) or as total organic carbon (TOC) which follows the same calculation (Wu, Duan et al. 2015). Although this approach provides information on soluble organic matter, it does not differentiate organic matter based on size or form.

An approach used to target all organics that can affect metal bioavailability is to determine dissolved organic matter (DOM), which is a standardised method widely applied (Guo, Xie et al. 2020, Du, Gu et al. 2021), but qualitatively not specific.

The promising alternative method is to separate organic matter by size using ultrafiltration (UF) with various molecular weight cut-offs (MWCO). Ultrafiltration has been used to investigate trace metals speciation in relation to dissolved organic matter (DOM) in wastewater (Aquino, Gloria et al. 2009), estuarine (Wen, Santschi et al. 1999), sea water (Singhal, Preetha et al. 2006) and fresh water (Liu, Lead et al. 2013), describing the effect of operational parameters such as pH, membrane material and pore size distribution on the transfer of organic compounds. Despite this, in anaerobic digestates, the potential of UF to fractionate DOM and trace metals has not yet been assessed.

To the best of our knowledge, this work is the first to use ultrafiltration to study the significance of fractionated dissolved organic matter on metal binding. We defined three fractions (< 3 kDa = truly dissolved, 3 – 10 kDa = low molecular weight colloidal phase, 10 kDa – 0.2 µm = high molecular weight colloidal phase) by applying 3 kDa, 10 kDa MWCO and 0.22 µm filters in parallel. First, analytical reproducibility among ultrafiltration fractions was assessed. Second, we investigated if the sample origin influenced metal distribution among the fractions. Finally, to analyse metal binding by DOM, we performed correlation analysis between them.

Material and methods

Sample characterization

Anaerobic digestates were obtained from seven distinct full-scale installations. Three samples (defined as SD1, SD2 and SD3) were taken from wastewater treatment plant digesters, while the other four (defined as AGR1, AGR2, AGR3 and AGR4) were from anaerobic digesters treating agricultural waste. All samples were filled until the top of the containers to reduce air exposure and were kept at 4 °C until analysis. The more detailed composition of the feedstock is given in the Table 1. The pH of the samples was measured with a Thermo Scientific Orion Star A211 pH meter. The measurements of TS, TSS and VSS were performed according to the Standard Methods (APHA 2005). The volatile fatty acids (VFA), including C2-C8 fatty acids and C4-C6 isoforms, were quantified through gas chromatography (GC-2014, Shimadzu®, The Netherlands) with a DB-FFAP 123-3232 column (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm; Agilent, Belgium) and a flame ionization detector (FID). Liquid samples (2 mL) were first conditioned with sulfuric acid, sodium chloride and 2-methyl hexanoic acid as internal standard, followed by an extraction with diethyl ether. The extracts (1 µL) were injected at 280 °C with a split ratio of 60 and a purge flow of 3 mL min⁻¹. The oven temperature increased by 6 °C min⁻¹ from 110 °C to 158 °C and by 8 °C/min from 158 °C to 175 °C, where it was kept for 1 min. The FID had the temperature of 220 °C. The carrier gas was N₂ at a flow rate of 2.49 mL/min (Andersen, Hennebel et al. 2014).

Reagents

All the solutions used were of analytical grade, except for the nitric acid (67 – 69 %, Chem-Lab NV) which was of Pico-Pure grade. To minimize glassware contamination, glassware was rinsed before usage with 1 % nitric acid solution, followed by deionised and Mili-Q® water.

Metal fractionation by ultrafiltration

All seven samples (50 ml each) were centrifuged in Eppendorf 5804R centrifuge at 10000 rpm. Then, the supernatant was filtered through 0.45 µm, followed by 0.2 µm syringe filtration (Macherey-Nagel, Germany). The produced filtrate was used as a starting point for ultrafiltration. Filtration was performed in parallel, i.e., 0.2 µm filtrate was passed through 3 and 10 kDa Amicon®Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck, USA) at 9000 rpm for 15 min. To make filtration possible due to high colloidal content, the filtrate of the samples AGR4 and AGR1 was diluted 1:5 and 1:3 respectively, before ultrafiltration. After the ultrafiltration, 0.2 µm filtrate and filtrates from the 3 and 10 kDa filter units were digested by mixing 2.5 ml of sample with 2 ml of 67 % HNO₃ (Chem-Lab NV) and 1 ml of 30 % H₂O₂ (Chem-Lab NV) on a hot plate at 100 °C for 1 h at 50 W. Each digestion was done in triplicate. Cooled-down and diluted to 50 ml, samples were refrigerated at 4 °C and afterwards the metals were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Perkin-Elmer model NexION 350D). The isotopes used were: ⁹⁸Mo, ⁵⁵Mn, ⁵⁹Co, ⁵⁸Ni, ⁶³Cu, ⁵⁶Fe and ⁶⁴Zn. Rh was used as an internal standard. Accuracy and precision of the calibration curves were assured with a Quality Control (QC) sample, which was run parallel to the samples in each measurement batch. The recovery of QC varied from 88 % to 107 %. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for ICP-MS were calculated as:

$$LOD = \frac{3 \times \text{standard deviation of the blank}}{\text{average slope curve}}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \text{standard deviation of the blank}}{\text{average slope curve}}$$

Tab. 1: General characteristics of seven different digestates

Sample	pH	Digester feedstock	TS (g/L)	TSS (g/L)	VSS (g/L)	VFA (mg/L)
SD1	7.8	Waste activated sludge	39.0	20.0	15.0	276
SD2	7.59	Waste activated sludge	29.4	27.0	15.8	206
SD3	8.36	A-sludge ¹	37.7	34.7	21.7	3234
AGR1	8.49	Mix of manure, energy crops and food waste	42.1	19.6	14.5	1994
AGR2	8.53	Mix of manure, energy crops and food waste	52.6	49.7	26.3	1453
AGR3	8.09	Mix of manure, energy crops and food waste	41.2	29.1	22.4	1030
AGR4	8.09	Food waste	38.3	19.3	13.9	5315

¹ A-sludge is produced in the A-stage of a modified two-stage wastewater treatment process (Boehnke, Diering et al. 1997)

where standard deviation of the blank is calculated from 10 blank intensity measurements and the average slope curve is determined as an average of 3 slope values calculated by plotting intensities of the standard solution (y axis) versus standard concentrations (x axis). LODs and LOQs are reported in Supporting information.

Organic matter fractionation

The filtrates from 0.2 μm , 3 kDa and 10 kDa were analysed for dissolved organic matter (DOM) by measuring total organic carbon (TOC) by Shimadzu TOC-VCPN analyser coupled with a Shimadzu ASI-V auto-sampler. The TOC value was obtained as a difference between total and inorganic carbon, which were both measured. For the TOC analyser, the LOD and LOQ for total carbon were 0.192 and 0.641 mg/L, respectively. For inorganic carbon the LOD and LOQ were 0.074 and 0.248 mg/L, respectively.

Nomenclature and calculations

For the metal and organic matter fractionation, we operationally defined three fractions:

1. Fraction < 3 kDa,
2. Fraction 3-10 kDa, calculated as difference of 10 kDa and 3 kDa (metal concentration and TOC concentration)
3. Fraction 10 kDa- 0.2 μm , calculated as difference of 0.2 μm and 10 kDa (metal concentration and TOC)

Metal concentration of all metals was expressed as a median value of an analytical triplicate in micromoles per litre. To compare analytical reproducibility among fractions, relative standard variations (RSDs) were calculated from the analytical triplicates. To determine correlation between VFAs and the investigated metals, Pearson two-sided correlation with 95 % significance was tested in R.

Results and Discussion

Method performance

Ultrafiltration with centrifugal filter units was performed in parallel series, where the filtrate of 0.2 μm filtration was the starting solution for 3 and 10 kDa MWCO filtration. The starting solution, as well as the two MWCO filtrates were filtered once, digested in analytical triplicate and processed for metal determination. Method precision was assessed by comparing the values of relative standard deviation (RSD) in terms of fractions (MWCO) and each metal individually.

Compared to the 0.2 μm filtrate, the samples filtered through smaller MWCO had higher RSD. For 0.2 μm filtrate, the RSD of 10 % was surpassed in only 5/49 measurements, with the median RSD of 2 % (Table 2). Smaller MWCO filtrates exceeded 10 % RSD in greater number of samples (23/49 measurements from 10 kDa and 21/49 measurements from 3 kDa). The median RSD of 10 and 3 kDa filtrate were 9 % and 6 %, respectively (Table 3 and Table 4).

As for the metals individually, high precision was observed for Co and Mo (only one Mo RSD higher than 10 % RSD and Co RSD were all under 10 %). Measured Ni, Mn, Cu and Fe had RSD ranging up to 15 %

in most of the cases. In the work of Lange, Österlund et al. (2020) RSD of Cu was to some extent higher, within the range of 16 to 24 % for both < 3 kDa and 3 kDa – 0.45 μm fractions (percentages were calculated as a median of RSDs that were obtained from different samples). In our work, the lowest precision was seen for Zn triplicates, especially in 3 kDa samples which had RSD in the range 9-110 %. Lange, Österlund et al. (2020) measured lower Zn RSDs, from 17 % to 34 % (values calculated in the same way as Cu) but overall, Zn had higher RSD than Cu, which coincides with our research.

Even though ultrafiltration was performed in parallel (rather than sequentially), as suggested by Logan and Jiang (1990), it is important to mention unexpected concentrations of certain metals: Mo (in SD2 and AGR3), Mn (in SD1, SD2 and AGR3), Cu (AGR3), Fe (SD1), Co (SD2, SD3, AGR3 and AGR4) and Zn (in SD3, AGR1, AGR2 and AGR4) had lower values in filtrate originating from a bigger MWCO. As a result, distribution of metals among the three MWCO fractions resulted in negative values. For that reason, the samples with the highest errors, namely SD2 and AGR3 for Mo measurement and AGR1 and AGR2 for Zn, were not taken into consideration in any part of the results analysis. These errors might have arisen from sorption of metals onto the filters, even though Amicon®Ultra-15 Centrifugal Filter Units have been used previously for metal determination with high recoveries (90 – 105 %) and negligible metal loss (Schijf and Zoll 2011, Lange, Österlund et al. 2020).

Metal distribution among fractions

Metal distribution among three defined fractions (<3 kDa; 3-10 kDa; 10 kDa – 0.2 μm) was to a high extent metal specific, and to a lesser degree sample dependent. As shown in Fig.1, the metals were mostly detected in fractions <3 kDa and 10 kDa – 0.2 μm . Therefore, they were either “truly dissolved” as free ions or bound to smaller organic and inorganic compounds (<3 kDa), or bound to larger organic compounds and also some colloidal matter (10 kDa – 0.2 μm), respectively. Mo, Co and Ni were predominantly measured in <3 kDa fraction. In this fraction, Mo had a share of 86 % in digestates from WWTP (SD samples); this share of Mo varied more (from 23 to 77 %) among samples from the agricultural digestates (AGR). The situation with Co was very similar: around 60 % share in the SD samples, and from 11 to 56 % in the AGR. For Ni and Co, the second dominant fraction was the 10 kDa – 0.2 μm in all the samples, while for Mo this was the second dominant fraction only in samples SD3, AGR2 and AGR4.

On the other hand, Zn, Mn, Cu and Fe were found predominantly in the fraction of 10 kDa – 0.2 μm . Mn was detected in this fraction in the highest percentage in SD samples (82 – 84 %), and it had higher variation from 54 to 72 % in AGR. Similarly, Cu and Fe were also found in a higher portion in SD samples, while Zn did not exhibit this tendency. These four metals were found in the <3 kDa fraction in the second highest concentration in most of the samples.

Tab. 2: Relative standard deviation [%] of metals calculated from analytical triplicate in 0.2 µm filtrate
0.2 µm filter

Sample	Metal						
	Mo	Ni	Mn	Zn	Cu	Co	Fe
SD1	1	3	1	5	0	1	0
SD2	6	1	5	2	1	1	4
SD3	2	7	2	8	3	3	6
AGR1	1	11	1	14	18	2	2
AGR2	0	0	1	16	3	1	2
AGR3	0	0	0	0	0	0	0
AGR4	8	18	3	5	1	2	3

Tab. 3: Relative standard deviation [%] of metals calculated from analytical triplicate in 10 kDa filtrate
10 kDa filter

Sample	Metal						
	Mo	Ni	Mn	Zn	Cu	Co	Fe
SD1	18	13	40	50	25	1	13
SD2	4	5	15	38	6	2	23
SD3	0	0	0	1	0	0	0
AGR1	4	13	10	16	11	6	7
AGR2	2	6	6	3	33	4	1
AGR3	3	9	2	6	37	1	9
AGR4	7	87	7	15	13	7	40

Tab. 4: Relative standard deviation [%] of metals calculated from analytical triplicate in 3 kDa filtrate
3 kDa filter

Sample	Metal						
	Mo	Ni	Mn	Zn	Cu	Co	Fe
SD1	1	3	51	28	18	2	91
SD2	4	14	12	25	12	6	48
SD3	2	4	5	9	4	2	0
AGR1	3	39	30	50	11	6	18
AGR2	3	10	31	110	119	4	6
AGR3	5	4	3	76	24	3	4
AGR4	4	25	2	13	4	2	10

From these insights we can presume that metal affinity for complexation with DOM varies depending on a metal to a high extent, and not as much on feedstock. Interestingly, we also see that an increase in the concentration of DOM (Table 5) did not always lead to an increase in the metal concentration. This can be illustrated by the example of Ni, for which the TOC measured in <3 kDa fraction was in every digestate sample lower than in the 10 kDa – 0.2 µm, but metal content of all Ni samples was actually found in the smallest fraction.

Apart from the dominance of one fraction among all the metals, it can be seen also that fraction 3-10 kDa is hardly present, except for the sample AGR1 in which this fraction is significantly higher in Mo (49%), Cu

(45%), Co (28%), Mn (22%) and Fe (17%). Overall, results show that metals are for the most part distributed only in two fractions.

Effect of organic matter on metal fractionation

To assess the organic matter content that binds metals, TOC was measured in each MWCO filtrate of every digestate sample. The TOC fractions were calculated in the same way as metal fractions. The concentrations measured in 10 kDa – 0.2 µm fraction were the highest for all the samples. In addition, sample origin had an effect on organic matter concentrations in that fraction: SD samples had TOC in the lower range from 271 to 348 mg/L, while in AGR samples TOC was measured in even seventeen times higher concentrations (1520

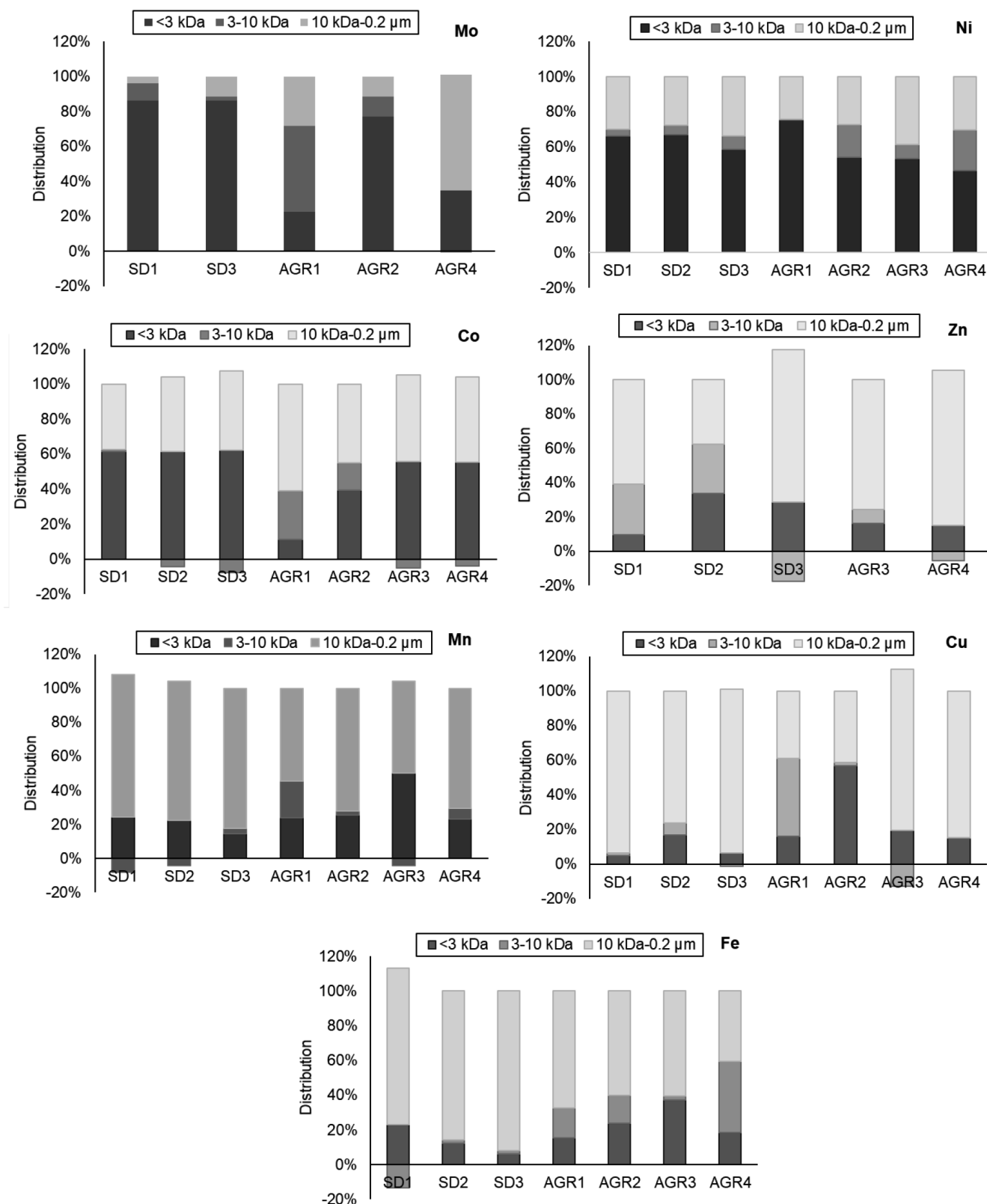


Fig. 1: Distribution of metals among three different fractions in seven different digestates

to 4483 mg/L). This trend was seen for other two fractions (3-10 kDa and 3-10 kDa) as well (Tab. 5)).

Although the concentration of TOC differed to a large extent between these two sample groups, organic matter in all the samples was found foremost in the biggest MWCO fraction (10 kDa – 0.2 μm), from 51 to 81 %, followed by <3 kDa fraction with TOC ranging from 12 to 34 %. The fraction 3-10 kDa had by far the least TOC

measured, in which organic matter was found from 2 to 16 % only. The variation of TOC in SD samples in <3 kDa and 10 kDa – 0.2 μm fractions was lower than in AGR samples: the highest TOC variation in SD samples was 6 %, while in AGR samples it was 30 %.

To assess the relationship between trace metals and their binding to organic matter, we explored dependency between TOC and metal content in the various

Tab. 5: Total organic carbon (TOC) (mg/L) distribution among the fractions for the seven digestates

Sample	<3 kDa (mg/L)	3-10 kDa (mg/L)	10 kDa – 0.2 µm (mg/L)
SD1	152	42	272
SD2	117	45	271
SD3	187	28	348
AGR1	637	400	4483
AGR2	1014	474	1520
AGR3	603	39	1892
AGR4	2051	254	3685

digestate fractions by performing linear correlation analysis. Samples were divided in two groups, SD (samples with WWTP origin) and AGR (samples from agricultural waste), to see if origin of the sample affects the relationship (Fig. 2). Overall, the metals investigated correlated to TOC to a higher extent in SD than in AGR group. Strong correlation ($R^2 > 0.7$) was found for Mn and Fe in SD group and Zn in AGR. Similarly, Heydon, Perez Serrano et al. (2023) found that Fe was strongly related with colloidal organic carbon in the fraction 3 kDa -100 kDa in polluted river sample. This was explained by the complexation of Fe with carboxylic and phenolic functional groups present in organic matter as fulvic and humic acids (Lead and Wilkinson 2006). Good correlation (R^2 is 0.5 to 0.7) was observed for Zn and Cu only in SD group. Cu and Fe in AGR, so as Co in SD had fair correlation (R^2 is 0.3 to 0.5). Mo and Ni in both groups, so as Mn and Co in AGR, showed poor correlation ($R^2 < 0.3$) with TOC. These results implicate that DOM plays an important role in binding of Zn, Fe (SD samples), Mn (SD samples) and Cu (SD samples). On the other hand, Co, Mo and Ni showed to be not affected by the DOM. Such distinctions are most likely due to various metal affinities towards the individual functional groups as part of the organic matter (Du, Gu et al. 2021).

Volatile fatty acids (VFA) are one of the most abundant intermediate products of anaerobic digestion, thus components of dissolved organic matter, and at a low pH, they can act as a ligand with proton affinity (Molaey, Yesil et al. 2021). Correlation analysis of VFA and metal concentrations revealed that Zn and Cu were significantly correlated to VFA ($p < 0.05$). Thus, we can assume that VFAs are one of the factors responsible for Zn and Cu binding to DOM. For other investigated metals there was no significant correlation found with VFAs.

Conclusion

To the best of our knowledge, this study is the first to show the binding of trace metals to organic matter fractions of various sizes as a crucial aspect of metal bioavailability in anaerobic digestates. The metals were mostly detected either in “truly dissolved fraction” (<3 kDa), or a fraction containing larger organic compounds (10 kDa – 0.2 µm). Mo, Co and Ni were pre-

dominantly measured in <3 kDa fraction. On the other hand, Zn, Mn, Cu and Fe were found primarily in the largest 10 kDa – 0.2 µm fraction. Our results further imply that the concentration of organic matter in a digestate sample is not always reflecting the degree of metal binding, but good linear correlation of metal and TOC concentration was seen for Zn (all samples), Fe (WWTP samples), Mn (WWTP samples) and Cu (WWTP samples). In contrast, Ni, Co and Mo seem to have different speciation and the effect of organic matter was not statistically significant. The feedstock type (origin of samples) is an important parameter when considering DOM binding to metals since metals showed different strength of correlation. Overall, the samples originating from WWTPs had stronger correlation between TOC and metal concentrations than the samples of agricultural waste.

Author contribution

Aleksandra Ilic: Conceptualization, Investigation, Writing- Original draft, Visualisation, Data curation

Vojtěch Kouba: Writing- Review & Editing, Supervision

Jo De Vrieze: Resources, Writing- Review & Editing, Formal analysis

Jan Bartacek: Conceptualization, Resources, Writing- Review & Editing, Supervision

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Data availability

The data supporting this article are available at Open Science Framework at <https://osf.io/8p93b/> with DOI 10.17605/OSF.IO/8P93B.

Acknowledgements

We thank Roseline Blanckart for her assistance with the ICP-MS and ICP-OES analyses and Jakob Benisch for the help with graphical design.

The research was funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 676070. This communication reflects only the authors' views and the Research Executive Agency of the EU is not responsible for any use that may be made regarding the information it contains.

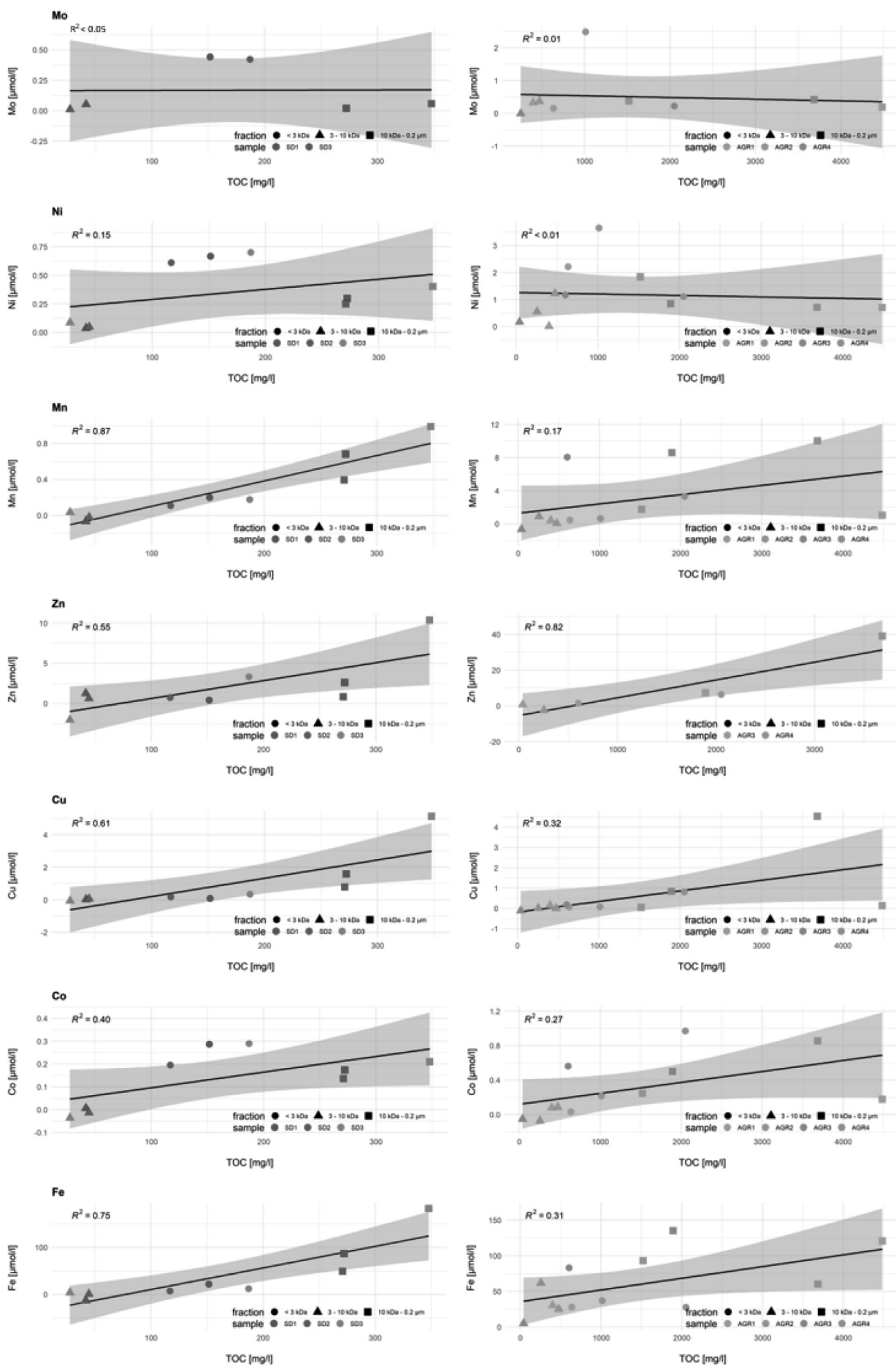


Fig. 2: Linear correlation of total organic carbon (mg/L) and metal concentration (μmol/L) of each MWCO fraction (circle is < 3 kDa, triangle is 3-10 kDa, square is 10 kDa- 0.2 μm). Results are separated in two sample groups, SD (samples with WWTP origin) and AGR (samples from agricultural waste). Each sample is presented with a different colour.

References

- Andersen, S. J., T. Hennebel, S. Gildemyn, M. Coma, J. Desloover, J. Berton, J. Tsukamoto, C. Stevens and K. Rabaey (2014). "Electrolytic membrane extraction enables production of fine chemicals from biorefinery sidestreams." *Environmental science & technology* **48**(12): 7135-7142.
- APHA (2005). *Standard methods for the examination of water & wastewater*. Washington, D.C, American Public Health Association.
- Aquino, S. F., R. M. Gloria, S. Q. Silva and C. A. L. Chernicharo (2009). "Quantification of the Inert Chemical Oxygen Demand of Raw Wastewater and Evaluation of Soluble Microbial Product Production in Demo-Scale Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors under Different Operational Conditions." *Water Environment Research* **81**(6): 608-616.
- Aquino, S. F. and D. C. Stuckey (2004). "Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds." *Water Research* **38**(2): 255-266.
- Bacon, J. R. and C. M. Davidson (2008). "Is there a future for sequential chemical extraction?" *Analyst* **133**(1): 25-46.
- Boehnke, B., B. Diering and S. W. Zuckut (1997). "Cost-effective wastewater treatment process for removal of organics and nutrients." *Water engineering & management* **144**(7): 18-21.
- Callander, I. J. and J. P. Barford (1983). "Precipitation, chelation, and the availability of metals as nutrients in anaerobic digestion. I. Methodology." *Biotechnology and Bioengineering* **25**(8): 1947-1957.
- Cao, W., M. Wang, M. Liu, Z. Zhang, Z. Sun, Y. Miao, C. Sun and C. Hu (2018). "The chemical and dynamic distribution characteristics of iron, cobalt and nickel in three different anaerobic digestates: Effect of pH and trace elements dosage." *Bioresource Technology* **269**: 363-374.
- d'Abzac, P., F. Bordas, E. Joussein, E. D. v. Hullebusch, P. N. L. Lens and G. Guibaud (2013). "Metal binding properties of extracellular polymeric substances extracted from anaerobic granular sludges." *Environmental Science and Pollution Research* **20**(7): 4509-4519.
- d'Abzac, P., F. Bordas, E. van Hullebusch, P. N. L. Lens and G. Guibaud (2010). "Effects of extraction procedures on metal binding properties of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **80**(2): 161-168.
- Du, X., L.-p. Gu, T.-t. Wang, H.-j. Kou and Y. Sun (2021). "The relationship between the molecular composition of dissolved organic matter and bioavailability of digestate during anaerobic digestion process: Characteristics, transformation and the key molecular interval." *Bioresource Technology* **342**: 125958.
- Gonzalez-Gil, G., S. Jansen, M. H. Zandvoort and H. P. van Leeuwen (2003). "Effect of yeast extract on speciation and bioavailability of nickel and cobalt in anaerobic bioreactors." *Biotechnology and Bioengineering* **82**(2): 134-142.
- Guo, X., X. Xie, Y. Liu, C. Wang, M. Yang and Y. Huang (2020). "Effects of digestate DOM on chemical behavior of soil heavy metals in an abandoned copper mining areas." *Journal of Hazardous Materials* **393**: 122436.
- Gustavsson, J., S. S. Yekta, A. Karlsson, U. Skjellberg and B. H. Svensson (2013). "Potential bioavailability and chemical forms of Co and Ni in the biogas process—An evaluation based on sequential and acid volatile sulfide extractions." *Engineering in Life Sciences* **13**(6): 572-579.
- Hasani Zadeh, P., A. Serrano, G. Collins and F. G. Feroso (2022). "Interrelating EPS, soluble microbial products and metal solubility in a methanogenic consortium stressed by nickel and cobalt." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **238**: 113579.
- Heydon, M., L. Perez Serrano, E. Schreck, C. Causserand, O. S. Pokrovsky, P. Behra and J. Viers (2023). "Role of colloids in the transfer and dispersion of trace elements into river waters through a former mining district." *Applied Geochemistry* **155**: 105736.
- Hullebusch, E., S. Utomo, M. Zandvoort and P. Lens (2005). "Comparison of three sequential extraction procedures to describe metal fractionation in anaerobic granular sludges." *Talanta* **65**(2): 549-558.
- Kunacheva, C. and D. C. Stuckey (2014). "Analytical methods for soluble microbial products (SMP) and extracellular polymers (ECP) in wastewater treatment systems: A review." *Water Research* **61**: 1-18.
- Kuo, W.-C. and G. F. Parkin (1996). "Characterization of soluble microbial products from anaerobic treatment by molecular weight distribution and nickel-chelating properties." *Water Research* **30**(4): 915-922.
- Laera, A., S. Shakeri Yekta, M. Hedenström, R. Buzier, G. Guibaud, M. Dario, G. Esposito and E. D. van Hullebusch (2019). "A simultaneous assessment of organic matter and trace elements bio-accessibility in substrate and digestate from an anaerobic digestion plant." *Bioresource Technology* **288**: 121587.
- Lange, K., H. Österlund, M. Viklander and G.-T. Blecken (2020). "Metal speciation in stormwater bioretention: Removal of particulate, colloidal and truly dissolved metals." *Science of The Total Environment* **724**: 138121.
- Lead, J. R. and K. J. Wilkinson (2006). "Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends." *Environmental Chemistry* **3**(3): 159-171.
- Liu, R., J. R. Lead and H. Zhang (2013). "Combining cross flow ultrafiltration and diffusion gradients in thin-films approaches to determine trace metal speciation in freshwaters." *Geochimica et Cosmochimica Acta* **109**: 14-26.
- Liu, Y., S. Chang and F. M. Defersha (2015). "Characterization of the proton binding sites of extracellular

polymeric substances in an anaerobic membrane bioreactor." *Water Research* **78**: 133-143.

Logan, B. E. and Q. Jiang (1990). "Molecular Size Distributions of Dissolved Organic Matter." *Journal of environmental engineering* (New York, N.Y.) **116**(6): 1046-1062.

Molaey, R., H. Yesil, B. Calli and A. E. Tugtas (2021). "Influence of volatile fatty acids in anaerobic bioleaching of potentially toxic metals." *Journal of Environmental Management* **285**: 112118.

Patidar, S. K. and V. Tare (2008). "Soluble microbial products formation and their effect on trace metal availability during anaerobic degradation of sulfate laden organics." *Water Science and Technology* **58**(4): 749-755.

Roussel, J. (2013). *Metal behaviour in anaerobic sludge digesters supplemented with trace nutrients*, University of Birmingham.

Schijf, J. and A. M. Zoll (2011). "When dissolved is not truly dissolved—The importance of colloids in studies of metal sorption on organic matter." *Journal of Colloid and Interface Science* **361**(1): 137-147.

Singhal, R. K., J. Preetha, R. Karpe, K. Tirumalesh, S. C. Kumar and A. G. Hegde (2006). "The use of ultra filtration in trace metal speciation studies in sea water." *Environment International* **32**(2): 224-228.

Thanh, P. M., B. Ketheesan, Z. Yan and D. Stuckey (2016). "Trace metal speciation and bioavailability in anaerobic digestion: A review." *Biotechnology Advances* **34**(2): 122-136.

Summary

Stable and effective anaerobic digestion necessitates bioavailable trace metals as crucial enzyme components. The degree to which these metals are bioavailable depends on their binding to various organic fractions within digestates. However, the role of these individual organic fractions in metal binding is poorly understood, especially the distinction based on size distribution. To show which fraction i.e., organic matter size, is significant for metal binding, we treated seven digestates from various full-scale anaerobic digestion plants by different ultrafiltration filters, namely 3 kDa molecular weight cutoff (MWCO), 10 kDa MWCO and 0.22 µm filters. In the resulting fractions (< 3 kDa, 3-10 kDa, 10 kDa- 0.2 µm), we analyzed total organic carbon (TOC) and trace metals, including Mo, Mn, Co, Ni, Cu, Fe and Zn. The distribution of metals and organic matter was bimodal, i.e., the majority of metals and total organic carbon were found in two fractions, < 3 kDa and 10 kDa- 0.2 µm. Overall, the influence of the feedstock on relative metal distribution was not substantial, resulting in the same metal being found in the similar percentage among different digestate samples. On the other hand, the feedstock appeared to have an effect on metal binding to organic matter: the samples with WWTP origin showed higher linear correlation than the samples originating from agricultural waste. Mn, Cu, Fe and Zn in WWTP samples showed to be impacted the most by organic matter size. These results gave an insight into the role of organic matter on trace metal binding in digestates.

Keywords: digestate origin; organic matter; trace metal fractionation; ultrafiltration; centrifugal filters

Souhrn

Stabilní a efektivní anaerobní digesce vyžaduje biologicky dostupné stopové kovy, jelikož jde o klíčové složky enzymů. Míra biologické dostupnosti těchto kovů závisí na jejich vazbě na různé organické frakce v digestátech. Úloha těchto jednotlivých organických frakcí ve vázání těchto kovů však není dostatečně objasněna, zejména co do obsahu stopových kovů ve frakcích o různé velikosti částic. Abychom ukázali, která frakce, tj. organická hmota o různé velikosti částic, je pro vazbu kovů významná, upravili jsme sedm digestátů z různých provozních instalací anaerobní digesce pomocí filtrů s mezní molekulovou hmotností (MWCO) 3 kDa, MWCO 10 kDa a filtrů s 0,22 µm. Ve výsledných frakcích (< 3 kDa, 3-10 kDa, 10 kDa – 0,2 µm) jsme analyzovali celkový organický uhlík (TOC) a stopové kovy, včetně Mo, Mn, Co, Ni, Cu, Fe a Zn. Distribuce kovů a organické hmoty byla bimodální, tj. většina kovů a celkového organického uhlíku byla nalezena ve dvou frakcích, < 3 kDa a 10 kDa – 0,2 µm. Celkově nebyl vliv vstupní suroviny na relativní distribuci kovů podstatný, což vedlo k tomu, že stejný kov byl nalezen v podobném procentuálním zastoupení v různých vzorcích digestátu. Na druhou stranu se zdálo, že vstupní surovina má vliv na vazbu kovů na organickou hmotu: vzorky pocházející z čistíren odpadních vod (ČOV) vykazovaly vyšší lineární korelaci než vzorky pocházející ze zemědělského digestátu. Mn, Cu, Fe a Zn ve vzorcích z ČOV byly nejvíce ovlivněny velikostí částic organické hmoty. Tyto výsledky poskytly vhled do role organické hmoty na vazbu stopových kovů v digestátech.

Klíčová slova: původ digestátu; organická hmota; frakcionace stopových kovů; ultrafiltrace; odstředivé filtry

Wen, L.-S., P. Santschi, G. Gill and C. Paternostro (1999). "Estuarine trace metal distributions in Galveston Bay: importance of colloidal forms in the speciation of the dissolved phase." *Marine Chemistry* **63**(3): 185-212.

Wu, W., T. Duan, H. Song, Y. Li, A. Yu, L. Zhang and A. Li (2015). "The effect of continuous Ni(II) exposure on the organic degradation and soluble microbial product (SMP) formation in two-phase anaerobic reactor." *Journal of Environmental Sciences* **33**: 78-87.

Yekta, S. S., U. Skjellberg, Å. Danielsson, A. Björn and B. H. Svensson (2017). "Chemical speciation of sulfur and metals in biogas reactors – Implications for cobalt and nickel bio-uptake processes." *Journal of Hazardous Materials* **324**: 110-116.

Zheng, X., D. Zou, Q. Wu, H. Wang, S. Li, F. Liu and Z. Xiao (2022). "Review on fate and bioavailability of heavy metals during anaerobic digestion and composting of animal manure." *Waste Management* **150**: 75-89.

Zhu, N.-m., L. Qiang, X.-j. Guo, Z. Hui and D. Yu (2014). "Sequential extraction of anaerobic digestate sludge for the determination of partitioning of heavy metals." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **102**: 18-24.

PROVOZNÍ APLIKACE NITRITACE A ANAMMOX V ČR

Oldřich Vodička¹, Pavel Švehla², Iveta Růžicková³

¹ Vodovody a kanalizace Pardubice, a. s., Zelené předměstí, Teplého 2014, Pardubice

² Česká zemědělská univerzita v Praze, KAVR, Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbátka

³ VŠCHT Praha, Ústav technologie vody a prostředí, Technická 5, Praha 6 – Dejvice

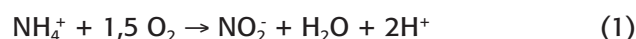
Až do sedmdesátých let minulého století se mělo za to, že biologická oxidace dusíku (N-amon) je možná pouze v oxickém prostředí. Až v sedmdesátých letech minulého století bylo publikováno (Broda 1977), že je na základě termodynamických předpokladů anaerobní oxidace N-amon nejen možná, ale ve skutečnosti energeticky výhodnější než běžná nitrifikace v oxických podmínkách. Touto studií předpověděl existenci chemolitotrofních bakterií schopných oxidovat N-amon v anaerobních podmínkách dlouho předtím než byly pro svět mikrobiologů a biotechnologů objeveny. Skutečný objev tohoto procesu byl popsán až na počátku devadesátých let dvacátého století (Van de Graaf a kol. 1990) a stalo se tak do jisté míry náhodou. Během provozu denitrifikační pilotní jednotky na čištění odpadních vod ve společnosti Gist-Brocades (Delft, Nizozemsko) bylo pozorováno, že na odtoku z reaktoru mizí N-amon, přičemž současně docházelo ke zvýšené produkci elementárního dusíku. V navazujících experimentech (Mulder a kol. 1995) stejný tým ukázal, že N-amon skutečně mizí za anaerobních podmínek prostřednictvím biologického procesu. Tento nově objevený proces byl podle anglického označení děje (Anaerobic ammonium oxidation) nazván Anammox. Od samotného objevu anammox bakterií šel výzkum tohoto procesu doslova překotnou rychlostí. Mohl za to potenciální přínos, který mohl Anammox proces přinést v oboru čištění odpadních vod i dostupné moderní mikrobiologické postupy zaměřené na identifikaci mikroorganismů. V roce 2001 jsme již znali nejen základní popis Anammox procesu chemickou rovnicí, byly identifikovány první dva rody bakterií (Brocadia, Kuenenia), byla popsána jejich unikátní buněčná struktura (anammoxosome), enzym HAO, extrémně pomalý růst a nutnost speciálních reaktorů. Byly vyvinuty molekulární sondy (FISH) a potvrzena diverzita (v reálných čistírnách odpadních vod). A dnes jsem s poznáním ještě dále.

Využití Anammox procesu v technologii čištění odpadních vod

Dnes je Anammox proces považován za jednu z nejvýznamnějších inovací v biologickém odstraňování dusíku. Na území české republiky jsou zatím pouze omezené zkušenosti z poloprovozního měřítka, a doposud neexistovala žádná plně provozní aplikace. Přitom v zahraničí je Anammox považován za jednu z nejpokrokovějších a dobře zavedených technologií pro odstraňování sloučenin dusíku. Provozní aplikace využívající uvedeného procesu jsou v současné době ve světě využívány zejména k odstraňování dusíku z odpadních vod s vysokými koncentracemi dusíku (N-amon > 200 mg/l), jako je například kalová voda vznikající při zahušťování a odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu (Kouba a kol. 2018). Existují i zkuš-

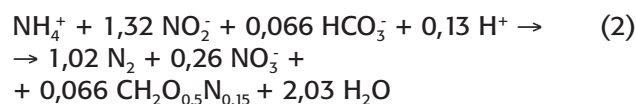
nosti se zpracováním samotného skládkového výluhu (N-amon > 1200 mg/l) s využitím procesu Anammox (Ganigué a kol. 2009).

Proces Anammox je ve své podstatě založen na spojení aktivity vlastních mikroorganismů vykazujících Anammox aktivitu s procesem zkrácené nitrifikace zajišťované mikroorganismy, které se podílejí i na konvenční nitrifikaci. Takovýto proces bývá označován jako PN/A (z anglického partial nitrification/anammox). Nitrifikace však musí být řízena tak, aby jejím konečným produktem byl dusitanový, nikoliv dusičnanový dusík (probíhá nitritace). Nitrifikační mikroorganismy (AOB – Ammonium Oxidizing Bacteria) oxidují 57 % vstupního N-amon na NO₂ podle rovnice 1, což oproti nitrifikaci může uspořit cca 50–60 % energie na aeraci. Tato úspora je dána právě skutečností, že postačí biochemicky oxidovat pouze část amoniakálního dusíku a navíc je oxidace ukončena již v dusitanovém stupni.



Postup nitritace/denitritace byl nejen v zahraničí, ale také v rámci ČR v laboratorních podmínkách již před mnoha lety úspěšně aplikován jako metoda pro oddělené čištění kalové vody (Jenicek et al., 2004; Švehla, 2004) a posléze otestován i v poloprovozním měřítku (Radechovský et al., 2015), nicméně až dosud se v ČR nedočkal provozní aplikace.

Anammox bakterie využívají v procesu zbylý N-amon a dusitany vyprodukované v rámci nitritace následně přemění na plynný N₂ dle rovnice 2 (CH₂O_{0,5}N_{0,15} představuje biomasu) (Straus a kol. 1998).



Protože Anammox bakterie patří na rozdíl od denitrifikačních bakterií mezi chemolitotrofní organismy, dusík je odstraněn prakticky bez nároku na organický substrát. Zároveň se při odstraňování dusíku vyprodukuje až o 90 % méně přebytečného kalu. Navíc, výkonnost technologií založených na procesu Anammox může být velice vysoká (navrhované zatížení se v závislosti na konkrétních podmínkách pohybuje okolo 0,35–2,3 kg-N/m³/d, v některých případech i 10 kg-N/m³/d (Kouba a kol. 2018), a pro odstranění dusíku tedy stačí nádrže menšího objemu.

Pro technologické uspořádání PN/A byly od samého počátku (Straus a kol. 1998) doporučovány semikontinuální vsádkové reaktory (SBR – Sequencing Batch Reactor). Ty umožňují přesné řízení jednotlivých fází – aeraci pro částečnou nitritaci, anoxické podmínky pro anammox, sedimentaci a odtok. Většina PN/A aplikací je dnes jednostupňová, což znamená, že nitrifikace na dusitany a Anammox probíhají v jednom reaktoru. Pro skládkové výluhy s vysokým obsa-

hem N-amon a nízkým poměrem C:N je SBR ideální, protože umožňuje jemné řízení koncentrace rozpuštěného kyslíku a udržení pro Anammox výhodného poměru $\text{NO}_2^-:\text{NH}_4^+$ přibližně 1:1. Přesto je nutné počítat s provozními obtížemi, jako je dlouhá doba zapracování procesu kvůli pomalému růstu anammox biomasy, citlivost na teplotu a přítomnost toxických látek ve skládkovém výluhu. SBR poskytuje flexibilitu, ale vyžaduje pokročilý monitoring a důsledný technologický dohled, aby PN/A proces dosáhl akceptovatelné účinnosti a spolehlivosti.

Problematika skládkových odpadních vod

Skládkové odpadní vody (SOV) jsou často čistěny v rámci běžné aktivační linky ČOV. Tato praxe však má svoje limity a může představovat riziko nárůstu koncentrace celkového dusíku na odtoku z ČOV.

SOV představují složitý typ odpadní vody s vysokými koncentracemi amoniakálního dusíku (často N-amon > 1200 mg/l) a celkového dusíku (TN > 1800 mg/l), nízkým poměrem C/N. Organická složka je tvořena převážně látkami velmi špatně rozložitelnými. Další potíží je vysoký obsah rozpuštěných anorganických solí (RAS > 10 g/l) a obsah těžkých kovů (Cu, Zn atd.). Tyto vlastnosti se mění podle stáří skládky. Nemalou roli hraje i aktuální hydrometeorologické podmínky. Proto se kvalita SOV významně mění a může ovlivňovat účinnost procesu jejich čištění.

Ve světě, zejména v Asii již existují poměrně bohaté zkušenosti s čištěním SOV procesem Anammox. Evropa má funkční Anammox technologie pro skládkové výluhy v provozním měřítku ve Španělsku (katalánsko) (Mágrí a kol. 2021) a Německu (Emscherbruch) (Azari a kol. 2017) a Itálii (Trento) (Lanzetta 2021). Ve Španělsku jde o dvoustupňový PN/A proces v SBR režimu, pracující při teplotách 25 °C (PN), respektive 35 °C (Anammox). V případě Německa mají zkušenosti s čištěním SOV technologií Anammox v dvoustupňovém uspořádání od roku 2006. Jde o kontinuálně protékanou čistírnu, pracující při teplotách 16–35 °C, kombinující využití biomasy v suspenzi (aktivovaného kalu) s biomasou na aktivním uhlí. V případě italského provozu jde o jednostupňový proces PN/A v SBR režimu pracující při průměrné teplotě 23,3 °C. Tyto systémy jsou obvykle dvoustupňové a často doplněné fyzikálně-chemickými procesy pro odstranění organického znečištění.

Nitritace SOV na BČOV Pardubice

Vysoká poptávka po čištění skládkových vod, existence bioplynové stanice v areálu BČOV a volná kapacita BČOV Pardubice nás vedla k přebudování jedné z nevyužitých aktivačních nádrží na zařízení pro oddělené zpracování. Původní aktivační nádrž byla přebudována na čtyři samostatné nádrže (AN13.1-13.4), každá o objemu 1 000 m³. Každá z nich může sloužit jako samostatný SBR reaktor. Při návrhu procesu byly dvě nádrže určeny pro nitritaci a dvě pro Anammox v režimu SBR. Dvě z těchto nádrží jsou zakryté a vybavené systémem odtahu vzdušiny, která je dále čistěna pomocí fotokatalytické jednotky. Další aktivační nádrž byla rekonstruována pro příjem a retenci SOV. Její celkový objem

přesahuje 4 000 m³. Není sice míchaná, přesto částečně pomáhá vyrovnávat rozdíly ve složení jednotlivých SOV. Voda z retenční nádrže AN14 může být čerpána do libovolné nádrže AN13.x, přičemž je možné i vzájemné přečerpávání mezi nimi. Dále je možná inokulace nádrží z přílehlé aktivační linky. Předčištěná voda je řízeně čerpána buď do jedné z aktivačních linek, nebo na nátok městských odpadních vod, kde je následně rozdělena na všechny tři biologické linky.

Možným řešením, jak zvýšit bezproblémový příjem těchto odpadních vod s extrémně vysokým obsahem sloučenin dusíku je jejich separátní předčištění s následným dočištěním na hlavní aktivační lince. Za tímto účelem je možno aplikovat proces nitritace/denitritace PN/A

Ačkoli laboratorní výzkumy provedené v letech 2017–2019 na pracovišti KAVR ČZU (Švehla et al. 2018) jednoznačně prokázaly nutnost a benefity ředění SOV fugátem z bioplynové stanice vznikajícím po zahuštění čistírenských kalů, nebylo z provozních důvodů toto doporučení využito. Fugát v našem případě obsahuje značné množství mikroplastů, jimiž by byly reaktory zanášeny. Hlavním důvodem pro ředění skládkových výluhů je vysoký obsah RAS (respektive vysoká salinita či vodivost). Z literatury (Soliman 2018) je známo, že tento parametr může významně ovlivňovat aktivitu nitritačních organismů AOB. Přičemž inhibičně působí hodnoty RAS nad 5000 mg/l (Zhang et al., 2015).

Provoz nitritace SOV byl zahájen v říjnu 2023. Cílem bylo uvést nově vybudované SBR do stabilního nitritačního procesu a získat data pro následné využití biologických technologií PN/A. Na rozdíl od zahraničních provozních aplikací je proces udržován při teplotách úměrných aktuálním klimatickým podmínkám. Dále je třeba zmínit, že proces je řízen bez externí úpravy pH. Tím je limitována účinnost odstranění amoniakálního dusíku. Roční kolísání teplot je od zimních minim kolem 10 °C po maxima počátkem podzimu okolo 25 °C. Byly zkoušeny dva způsoby zapracování nitritace, jeden s inokulací kalem z aktivační linky BČOV a druhý bez inokulace. Adaptace a nárůst funkční kultury byl ovlivněn chladným obdobím roku, proto o adaptaci kultury v pravém slova smyslu můžeme mluvit spíše až od dubna 2024. Nicméně i zima 24/25 ukázala, že při déletrvajícím provozu při nízkých teplotách v nádržích (pod 12 °C) sice dochází k výraznému snížení rychlosti procesu, ale kumulace dusitanů je při těchto podmínkách stále významná (až 80 % N-amon je oxidováno na dusitany).

Od září 2024 dosahuje proces poměrně stabilních výsledků. V tomto období (podzim 2024) trval pracovní cyklus reaktoru přibližně sedm dní a v jeho průběhu se pohybovala teplota v rozmezí 17,5–19,0 °C. Zatížení dusíkem činilo 0,11 kg(N-amon)/(m³.den) a byla dosažena rychlost odstranění 62 g (N-amon)/(m³.den), což znamenalo téměř 60 % účinnost odstranění celkového dusíku. Z odstraněného množství amoniakálního dusíku přešlo 75 % na dusitanový dusík. Množství kalu v nádrži během cyklu bylo asi 1 700 kg (NLzž).

Hodnota celkového zatížení reaktoru dusíkem není vysoká. Jak bylo uvedeno výše, během laboratorní

ho výzkumu, kdy byla SOV ředěna čtyřikrát fugátem, bylo dosahováno zatížení přibližně 0,4 kg(N-amon)//(m³.den). Vzhledem k prostředí neředených SOV je však akceptovatelná.

Pokud to kvalita SOV dovolí, tzn., pokud je příznivý poměr dusíku a neutralizační tlumivé kapacity, je možné snížením zatížení dospět k vyššímu stupni odstranění N-amon.

Dosavadní provoz prokázal celoroční možnost udržení nitrifikačního procesu v SBR režimu pro úpravu SOV za účelem získání vhodného přítoku pro případný ANAMMOX reaktor.

Potvrzení Anammox aktivity v provozovaném systému

SBR reaktory byly řízeny v nitrifikačním režimu, to znamená, že byly provzdušňovány. S přibývajícím dobou provozu docházelo stále častěji k časově významným úsekům, kdy byla v reaktorech pozorována minimální koncentrace kyslíku. Současně se prohlubovaly nesrovnalosti v dusíkaté bilanci. V letních měsících 2025 byla pozorováno již odstranění celkového dusíku na úrovni 55 % z původního množství. Vzhledem k předpokladu nízké dostupnosti substrátu pro denitrifikační aktivitu byly odeslány vzorky kalu na FISH analýzu.

FISH analýza z 30. 7. 2025 prokázala ve vzorku aktivovaného kalu jednoznačnou přítomnost anammox bakterií pomocí obecné sondy Amx368. Jejich signál byl hodnocen jako velmi častý, přičemž se vyskytovaly převážně ve formě malých kompaktních klastrů o velikosti do 5 – 10 µm. Volné buňky nebo řídké klastry byly pozorovány jen výjimečně. I přes omezený soubor snímků poskytla obrazová analýza přibližnou kvantifikaci: medián ~4,2 %, průměr ~5,6 %, tedy cca 5,5 % plochy celkové biomasy. Tento podíl a charakter signálu svědčí o vysokém biologickém potenciálu pro anammox proces v daném vzorku.

Literatura

Azari M., Walter U., Rekers V., Gu J-D., Denecke M. (2017): „More than a decade of experience of landfill leachate treatment with a full-scale anammox plant combining activated sludge and activated carbon biofilm.“ *Chemosphere* 174: 117-126.

Broda, E. (1977): „Two kinds of lithotrophs missing in nature.“ *Z. Allg. Mikrobiol.* 17, 491–493.

Ganigué R. a kol (2009): „Long-term operation of a partial nitrification pilot plant treating leachate with extremely high ammonium concentration prior to an anammox process.“ *Bioresour Technol* 100, 5624–5632.

Van de Graaf A.A., Mulder A., Slijkhuys H., Robertson L.A. and Kuenen J.G. (1990): „Anoxic ammonium oxidation.“ *Proceedings of the 5th European Congress on Biotechnology* (Christiansen, C., Munck, L. and Villadsen, J., Eds.), Vol. I, pp. 338–391. Munksgaard, Copenhagen.

Jeníček P. a kol. (2004): „Factors affecting nitrogen removal by nitrification/denitrification.“ *Water Sci Technol* 49(5–6), pp. 73–79.

Současně byly detekovány bakterie oxidující amoniak (AOB) ze skupiny *β-Proteobacteria*. Jejich výskyt byl hodnocen jako velmi častý, převážně ve formě malých kompaktních klastrů do 15 µm. Dominantními zástupci jsou *Nitrosomonas oligotropha* a halofilní/halotolerantní *Nitrosomonas*, obě skupiny vykazují vysoký výskyt. Naproti tomu podskupiny *Nitrosococcus mobilis* a *Nitrospira spp.* nebyly prokázány. Přibližná kvantifikace ukazuje celkové zastoupení AOB kolem 10 % biomasy (medián 10 %, průměr 9,5 %), z toho asi 4,5 % tvoří halofilní *Nitrosomonas*. Tento podíl naznačuje vysoký biologický potenciál pro první stupeň nitrifikace.

Následná FISH analýza vzorku z 21. 10. 2025 opět potvrdila hojný celkový výskyt anammox pomocí sondy Amx368. Rozšířený set specifických sond navíc odhalil taxonomickou diverzitu anammox společenstva: byly pozorovány výskyt *Brocadia anammoxidans*, *Kuenenia stuttgartiensis*, *Scalindua wagneri*, *Anammoxoglobus propionicus*, *Brocadia fulgida* a *Scalindua brodae*. Tyto druhově specifické nálezy byly sice výjimečné a většinou ve formě jednotlivých buněk (ojediněle menší klastry). Silný signál obecné sondy při nízké detekci druhově specifických sond naznačuje, že ve vzorku je významná část anammox populace, kterou dostupné sondy nepokrývají. To může znamenat buď environmentální klony známých rodů, nebo dokonce nové, dosud nepopsané druhy. Pro identifikaci je nutné provést metagenomiku nebo alespoň 16S rRNA sekvenování.

Lze konstatovat, že výsledky potvrzují trvale vysokou přítomnost anammox bakterií s konzistentní morfologií a bohatou druhovou diverzitou. Tato skutečnost je příznivá pro stabilitu a dlouhodobou spolehlivost PN/A procesu.

Poděkování

Příspěvek byl vypracován v rámci řešení projektu SQ01020303. Autoři děkují za finanční podporu.

Kouba V., Dolejš P., Švehla P., Čejka J., Vodička O., Benáková A., Máca J., Jeníček P. a Bartáček J. (2018): „Jak ušetřit na odstraňování dusíku na ČOV (10 let zahraničních zkušeností s procesem anammox).“ *SOVAK* 4/2018, pp. 14/146-21/153.

Lanzetta A., Mattioli D., Di Capua F., Sabia G., Petta L., Esposito G., Andreottola G., Gatti G., Merz W. a Langone M. (2021): „Anammox-Based Processes for Mature Leachate Treatment in SBR: A Modelling Study.“ *Processes* 2021: 9(8), 1443.

Magrí A., Rusalleda M., Vilà A., Akaboci T.R.V., Balaguer M.D., Llenas J.M. a Colprim J. (2021): „Scaling-Up and Long-Term Operation of a Full-Scale Two-Stage Partial Nitrification-Anammox System Treating Landfill Leachate.“ *Processes* 2021: 9(5), 800.

Mulder A., Van de Graaf A.A., Robertson L.A. and Kuenen J.G. (1995): „Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor.“ *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 177–183.

Strous M., J.J. Heijnen, J.G. Kuenen, M.S.M. Jetten (1998): „The sequencing batch reactor as a powerful tool for

the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms." *Appl Microbiol Biot* 50(5), pp. 589–596

Švehla P. (2004): „Oddělené biologické čištění kalové vody.“ Disertační práce. VŠCHT Praha.

Švehla P., Vodička O., Kouba V., Jeníček P., Míchal P., Došková E., Shtukaturova A. a Bartáček J. (2018): „Zpra-

cování externích odpadních vod s vysokým obsahem dusíku za využití procesu ANAMMOX či jiných inovativních biologických postupů.“ *Sborník z konference Odpadové vody 2018*: 313–318

Radechovský J. a kol. (2015): „Zkrácená nitrifikace kalové vody v pokusné poloprovozní jednotce.“ *Vodní hospodářství* 65/3, pp. 10-12 (2015)

Souhrn

Projekt na BČOV Pardubice byl zaměřen na stabilní nitrifikační proces skládkových odpadních vod (SOV) v SBR režimu, bez externí úpravy pH a bez temperace. Provoz probíhá od října 2023 a od září 2024 podařilo dosáhnout stabilní nitriface, kdy až 75 % odstraněného N-amon je transformováno na dusitany bez jejich další oxidace na dusičnany.

Dlouhodobým udržením podmínek příznivých pro anammox bakterie se podařilo tyto organismy kultivovat přímo v reaktoru. FISH analýzy z července a října 2025 potvrdily jejich hojný výskyt (cca 5,5 % biomasy) a vysoký biologický potenciál pro Anammox proces.

Výsledkem je první provozní aplikace nitrifikačního procesu v ČR a současně první aplikace Anammox procesu v uspořádání PN/A pro čištění surových skládkových vod. Tento úspěch potvrzuje možnost efektivního odstraňování dusíku i za extrémních podmínek. Dosažené výsledky otevírají cestu k dalším technologickým krokům k optimalizaci procesu a taktéž k detailní genetické analýze, která může přinést nové poznatky o adaptaci těchto organismů na extrémní podmínky.

Klíčová slova: ANAMMOX, nitriface, čištění odpadních vod, skládkové vody, FISH

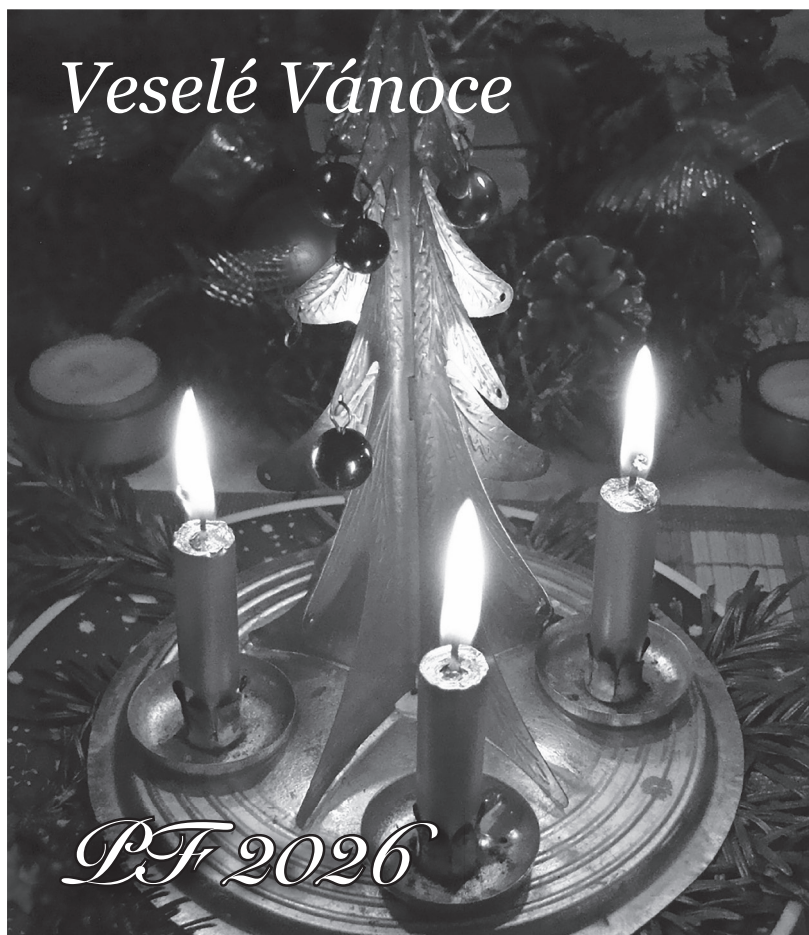
Summary

The project at BČOV Pardubice focused on achieving a stable nitrification process for landfill leachate (SOV) in an SBR mode, without external pH adjustment and without temperature control. Operation has been ongoing since October 2023, and by September 2024, stable nitrification was achieved, with up to 75 % of removed ammonium nitrogen being transformed into nitrites without further oxidation to nitrates.

By maintaining conditions favorable for anammox bacteria over the long term, these organisms were successfully cultivated directly in the reactor. FISH analyses from July and October 2025 confirmed their abundant presence (approximately 5.5 % of biomass) and high biological potential for the Anammox process.

The result is the first full-scale application of the nitrification process in the Czech Republic and, at the same time, the first application of the Anammox process in a PN/A configuration for the treatment of raw landfill leachate. This achievement demonstrates the feasibility of efficient nitrogen removal even under extreme conditions. The results pave the way for further technological steps to optimize the process and for detailed genetic analysis, which may provide new insights into the adaptation of these organisms to extreme conditions.

Keywords: ANAMMOX, nitrification, waste water treatment, landfill water, FISH



O B S A H

Nekrolog – zemřel profesor Jan Káš	37
Semerák M., Haňáčková Z., Lišková P., Slámová A., Reinbergerová A.: Významné kontaminanty explantátových kultur	38
Spiwok V.: Počítačový design proteinů	43
Modráčková N., Krausová B., Dvořáková Š., Neužil Bunešová V.: Mateřské mléko jako růstový regulátor kojenenckých klostridií	45
Ilic A., Kouba V., De Vrieze J., Bartáček J.: Obsah organických látek selektivně váže specifické stopové kovy ve vzorcích anaerobního digestátu	51
Vodička O., Švehla P., Růžicková I.: Provozní aplikace nitritace a ANAMMOX v ČR	60

C O N T E N T

Obituary – prof. Jan Káš has died	37
Semerák M., Haňáčková Z., Lišková P., Slámová A., Reinbergerová A.: Significant contaminants of explant cultures	38
Spiwok V.: Computer design of protens	43
Modráčková N., Krausová B., Dvořáková Š., Neužil Bunešová V.: Breast milk as growth regulator of infant clostridia	45
Ilic A., Kouba V., De Vrieze J., Bartáček J.: Organic matter content selectively binds specific trace metals in anaerobic digestate samples	51
Vodička O., Švehla P., Růžicková I.: Operational application of nitrification and ANAMMOX in the Czech Republic	60

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Dana Pokorná, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PŘF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PŘF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu jsou uváděny ve formě Author-Date v příslušném místě textu, včetně tabulek a obrázků (McKnight et al. 2022). V seznamu literatury jsou potom uváděny v abecedním pořadí. Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují arabskými číslicemi (příklad formátu **Tab. 1:**). Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nekládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu Danka.Pokorna@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References to the literature are referenced in Author-Date form at the appropriate point in the text, including tables and figures (McKnight et al. 2022). They are then listed in alphabetical order in the reference list. Journal abbreviations are used according to Chemical Abstract Service Source Index convention.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z.: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are identified by Arabic numerals (example format **Tab. 1:**). Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address Danka.Pokorna@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737 (Print)
ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).