VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

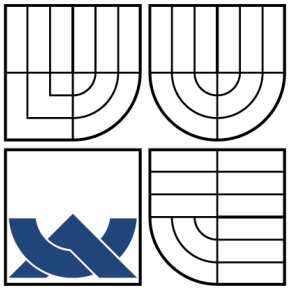
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TERMOFILNÍ MIKROORGANISMY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

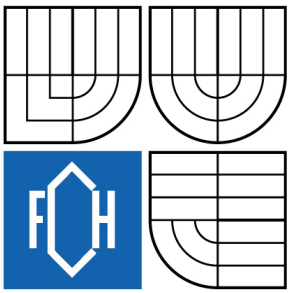
AUTOR PRÁCE KATEŘINA SKLENÁŘOVÁ
AUTHOR

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TERMOFILNÍ MIKROORGANISMY

THERMOPHILIC MICROORGANISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — KATEŘINA SKLENÁŘOVÁ

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

SUPERVISOR

BRNO 2008

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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce	**FCH-BAK0196/2007**	Akademický rok: **2007/2008**
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	**Sklenářová Kateřina**	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí bakalářské práce	**Ing. Libor Babák, Ph.D.**	
Konzultanti bakalářské práce		

Název bakalářské práce:

Termofilní mikroorganismy

Zadání bakalářské práce:

1. Zmapování termofilních druhů
2. Výskyt a rozšíření termofilních mikroorganismů v přírodě
3. Možnosti využití termofilních mikroorganismů

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.5.2008

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

Kateřina Sklenářová	Ing. Libor Babák, Ph.D.	
student(ka)	Vedoucí práce	Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá zmapováním termofilních druhů mezi mikroorganismy, charakteristikou významných rodů, ve kterých tyto organismy nacházíme a podrobným popisem vybraných druhů.
Je popsán vznik termálního prostředí a lokality výskytu termofilních mikroorganismů se zaměřením na geotermální oblasti, kde se nachází největší počet těchto druhů.
V důsledku tepelné stability enzymů nalézají tyto mikroorganismy uplatnění v potravinářském průmyslu, při čištění odpadních vod, v lékařství a při produkci termostabilních enzymů.

ABSTRACT

This bachelor's thesis is focused on distribution thermophilic species from among microorganisms, characteristic important genera, in which these microorganisms we can find and detailed description choice species.
There is described origin of thermal environment and locations of habitation thermophilic microorganisms with intention on geothermal areas, where is found the biggest number of these species.
In consequence of thermal stability of enzymes these microorganisms are used in food industry, in waste treatment, in medicine and for their production of thermostabile enzymes.

KLÍČOVÁ SLOVA
Termofilní, mikroorganismus, výskyt, využití

KEYWORDS
Thermophilic, microorganism, distribution, utilization

SKLENÁŘOVÁ, K. *Termofilní mikroorganismy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 35 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování: Děkuji Ing. Liboru Babákovi Ph.D. za odborné vedení a všestrannou pomoc při realizaci této bakalářské práce.

OBSAH

Úvod ... 6
1 Zmapování termofilních druhů ... 7
1.1 Obecná charakteristika ... 7
1.2 Rozdělení termofilních organismů ... 7
1.3 Termofily mezi mikroorganismy ... 7
1.3.1 Archea ... 7
1.3.1.1 Hypertermofilní archea ... 7
1.3.1.2 Archea bez buněčné stěny ... 9
1.3.2 Bakterie ... 9
1.3.2.1 Spory bakterií ... 10
1.3.2.2 Rod *Bacillus* ... 12
1.3.2.3 Rod *Clostridium* ... 14
1.3.2.4 Rod *Lactobacillus* ... 17
1.3.2.5 Aktinomycety ... 18
1.3.3 Cyanobakterie ... 19
1.3.4 Termofilní *Fungi* ... 19
2 Výskyt a rozšíření termofilních druhů v přírodě ... 20
2.1 Termální prostředí ... 20
2.1.1 Sluneční záření ... 20
2.1.2 Spalovací procesy ... 20
2.1.3 Geotermální aktivita ... 21
2.2 Geotermální oblasti ... 21
2.2.1 Yellowstonský Národní Park ... 21
2.2.2 Nový Zéland ... 22
2.2.3 Island ... 23
2.2.4 Kamčatka ... 24
2.3 Ostatní lokality termofilů ... 24
3 Možnosti využití termofilních mikroorganismů ... 24
3.1 Využití termofilních mikroorganismů v potravinářském průmyslu ... 24
3.1.1 Termofilní jogurtové kultury ... 24
3.1.2 Termofilní sýrařské zákysové kultury ... 25
3.1.3 Kyselina mléčná ... 25
3.2 Využití termofilních mikroorganismů v procesech čištění ... 25
3.2.1 Biologické čištění odpadních vod ... 25
3.2.1.1 BETT proces ... 26
3.2.1.2 TAS proces ... 26
3.2.1.3 ALPHA-BIOTHERM proces ... 26
3.2.1.4 FUCHS-ATAD proces ... 26
3.2.1.5 ATAD a AEROTHERM proces ... 26
3.3 Využití termofilních mikroorganismů v kompostování ... 27
3.4 Ostatní využití termofilů ... 28
3.4.1 Enzymy termofilních mikroorganismů ... 28
3.4.2 DNA termofilních mikroorganismů ... 28
Závěr ... 30
Seznam použitých zdrojů ... 31
Seznam použitých zkratek a symbolů ... 35

ÚVOD

Termofilní mikroorganismy tvoří nejznámější skupinu extrémofilních mikroorganismů, které jsou schopné obývat a rozmnožovat se při teplotách převyšující teploty považované za normální pro běžný biologický systém.
Vzhledem k růstu využití termofilních organismů v praxi (od výroby jogurtů po čištění odpadních vod) je pochopitelný zvýšený zájem nejen odborné veřejnosti o tuto problematiku. Důvod využívání těchto mikroorganismů stabilních a aktivních za vysokých teplot je zřejmý. Za zvýšené teploty se rozpustnost mnoha složek reakcí zvyšuje a riziko kontaminace se snižuje .
Cílem práce je zmapovat a stručně popsat nejvýznamnější druhy jejich výskyt a využití v praxi.

1 ZMAPOVÁNÍ TERMOFILNÍCH DRUHŮ

1.1 Obecná charakteristika

Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů i možnost jejich života.
Termofilní mikroorganismy mají optimální teplotu, při níž se rozmnožují největší rychlostí nad 45 °C a pro většinu je optimální teplota v rozmezí 50 až 60 °C. Některé mohou růst výjimečně i při teplotě až 80 °C (některé druhy *Bacillus stearothermophilus*) a extrémní termofily (některé druhy archeabakterií) i při teplotách nad 100 °C.
Některé termofilní organismy se nerozmnožují při teplotách 28 ž 30 °C dokonce některé ani při teplotách nižších než 40 °C. Jiné termofilní mikroorganismy se při teplotách 30 °C rozmnožují se zjistitelnou rychlostí. [1]

1.2 Rozdělení termofilních organismů

Termofilní mikroorganismy se dají rozdělit do 4 podskupin.

- Termotolerantní mikroorganismy mají teplotní maximum 60 až 70 °C, optimum 35 až 45 °C a minimum 5 až 10 °C. Tato skupina se rozmnožuje se téměř se stejnou rychlostí jak při 30 °C , tak i při 60 °C. V přírodě je tato podskupina termofilních mikroorganismů velmi hojně rozšířena.
- Eurytermické termofilní mikroorganismy mají teplotní maximum 70 až 75 °C, optimum 50 až 65 °C a při teplotě okolo 30 °C se rozmnožují velmi pomalu. V přírodě se vyskytují hojně.
- Stenotermické termofilní mikroorganismy mají teplotní maximum v rozmezí 75 až 80 °C, optimum 50 až 60 °C při teplotách okolo 30 °C se nerozmnožují. V přírodě jsou velmi vzácné.
- Hypertermofilní mikroorganismy mají teplotní maxima v rozmezí 105-113 °C , optimum 80-95 °C a minimum 70-80 °C. [1,2]

1.3 Termofily mezi mikroorganismy

Mezi mikroorganismy řadíme prokaryotické organismy- bakterie a archea a eukaryotické mikroorganismy- řasy, houby (kvasinky a plísně) a protozoa.
Termofilní mikroorganismy nalézáme jak u bakterií a archeí, tak i u mikrobních hub avšak v menší míře.

1.3.1 Archea

Archebakterie jsou typické svou adaptací na extrémní typy životního prostředí. Z fyziologického a systematického hlediska lze archea rozdělit do 4 skupin:

Extrémně halofilní archea
Archea produkující methan
Hypertermofilní archea
Archea bez buněčné stěny [3, 4]

1.3.1.1 Hypertermofilní archea

Rozmezí růstu těchto archeí je 45-110 °C. Optimálního růstu dosahují v rozmezí 70 až 105 °C. Vyskytují se v místech postvulkanického unikání sirných a vodních par a v mořských hydrotermálních systémech. Za anaerobních podmínek redukují elementární síru na H_2S. Za

aerobních podmínek oxidují H_2S nebo síru na H_2SO_4. Donorem elektronů při redukčních reakcích slouží H_2 nebo organické sloučeniny. [3]

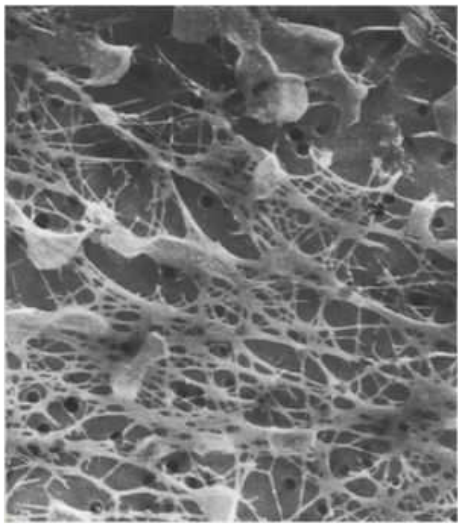
Tab. 1: Reakce uskutečňované hypertermofilními archei:

Typ výživy	Reakce, kterou je získávána energie	Rody
Chemoheterotrofní	organická sloučenina + S → H_2S + CO_2	*Thermococcus*
	organická sloučenina + SO_4^{2-} → H_2S + CO_2	*Archaeglobus*
	organická sloučenina + O_2 → H_2O + CO_2	*Sulfolobus*
	organická sloučenina → CO_2 + karboxy kyselina	*Staphylothermus*
	organická sloučenina → CO_2 + H_2	*Pyrococcus*
Chemoautotrofní	$H_2 + S^0 \rightarrow H_2S$	*Thermoproteus*
	$2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$	*Acidianus*
	$3S + 3O_2 + 2H_2O \rightarrow 2H_2SO_4$	*Sulfolobus*
	$4FeS_2 + 15O_2 + 2H_2O \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2SO_4$	*Sulfolobus*
	$4H_2 + SO_4^{2-} + 2H^+ \rightarrow 4H_2O + H_2S$	*Archaeglobus*
	$4H_2 + CO_2 \rightarrow 2H_2O + CH_4$	*Methanopyrus*

Rod *Sulfolobus*
Archea toho rodu žijí v horkých pramenech s teplotou okolo 90 °C bohatých na síru. Vyhovuje jim pH mezi 2-3. Mají nepravidelný tvar s bičíky. Jsou obligátně aerobní a fakultativní chemoautotrofní archea. Druhy rodu *Sulfolobus* jsou obecně pojmenovávány podle oblasti, kde byly nalezeny (např. *Sulfolobus solfataricus*). za dostatku kyslíku zpracovávají organické látky aerobně heterotrofně podobně jako živočichové, výsledkem je tedy H_2O a CO_2. V anaerobním prostředí přechází na chemoautotrofní výživu, zpracovává S, resp. FeS_2 až na H_2SO_4. Produktem je také síran železitý. [3,4]

Rod *Acidianus*
Patří sem fakultativně anaerobní druhy. Jejich tvar připomíná koky. *Acidianus* je archebakterie oxidující řadu minerálů. Teplotní optimum je kolem 70°C a pH optimum 1,5 - 2,0. *Acidianus brierleyi* při autotrofním růstu oxiduje železo nebo síru. *Acidianus infernus* (s teplotním optimem 90°C) a *Acidianus ambivalens* jsou obligátní chemolithotrofy rostoucí buď aerobně nebo anaerobně a oxidující nebo redukující anorganické formy síry. *Acidianus sulfidivorans* je termoacidofilní, obligátně chemolitotrofní archebakterie, která byla izolována z vulkánu na Lihirském ostrově. Buňky tohoto organismu jsou nepohyblivé, gramnegativní koky nepravidelného tvaru o velikosti 0.5 - 1.5 µm. Energii pro růst získává aerobní oxidací síry, Fe^{2+} nebo sulfidů. Optimální teplota růstu je 74 °C a pH 0,8 - 1,4. [3,5]

Rod *Pyrodictium*
Archea tohoto rodu byla izolována z vulkanických podmořských oblastí. Jejich optimální teplota růstu je 105 °C. Mohou však růst ještě při teplotě 113 °C, což je pravděpodobně mezní teplota pro život na Zemi.
Mají unikátní buněčnou strukturu zahrnující síť kanálků (tubulů) a plošek. Buňky archeí *Pyridictium* mají nepravidelný diskovitý tvar velikosti několik mikrometrů. [3, 6]



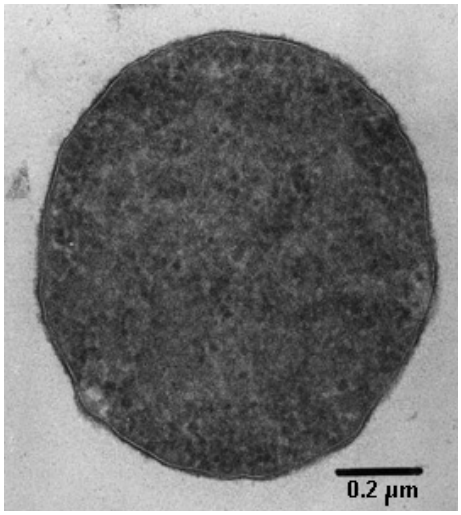
Obr. 1: Pyrodictium occultum [6]

1.3.1.2 Archea bez buněčné stěny

Nejvýznamnějším rodem této skupiny archeí je rod *Thermoplasma*.

Rod *Thermoplasma*

Příslušníci tohoto rodu jsou acidofilní aerobní chemoheterotrofové. Jejich optimální teplota růstu je 55 °C a pH 2. Plazmatická membrána buněk tohoto rodu se skládá z glyceroltetraéterových lipidů, což umožňuje ve spojení s jinými faktory růst za vyšších teplot v kyselém prostředí. Genom je obklopen zásaditým proteinem, který utváří DNA genomu do struktur podobných nukleozomům eukaryont. Sekvence aminokyselin tohoto proteinu se podobají eukaryontním histonům. [3, 7]



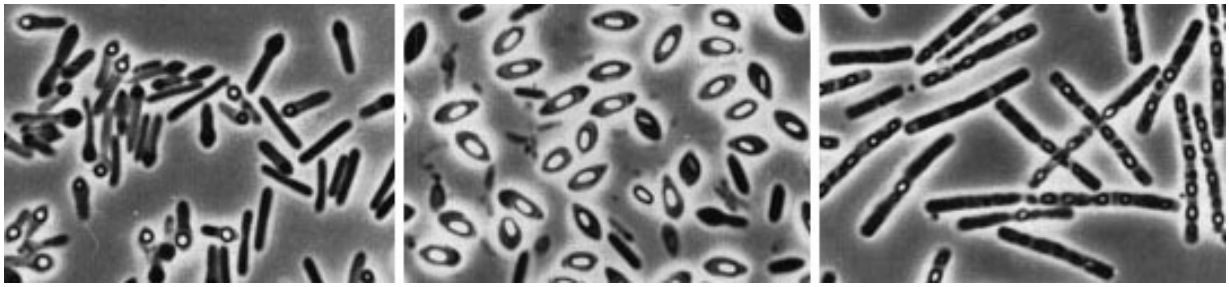
Obr. 2: Thermoplasma acidophilum [7]

1.3.2 Bakterie

Termofilní druhy nacházíme mezi bakteriemi tvořící sporotvorné tyčinky a sporotvorné koky. Těmi jsou rod *Bacillus* a rod *Clostridium*. Do této skupiny patří rody, které tvoří v buňce vždy jen jednu sporu. Významnou skupinu termofilních druhů nacházíme také u rodu *Lactobacillus* a termofilních aktinomycet. [1]

1.3.2.1 Spory bakterií

Poněvadž projevují spory odolnost proti vysokým teplotám, můžeme zde zmínit jejich vznik, biochemii, fyziologické vlastnosti a klíčení bakteriální spory.
Spory tohoto typu tvoří rody bakterií *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* a *Oscillospira*.
Vznik spory, kdy se mění vegetativní forma buňky v buňku klidovou se nazývá sporulace. Ta nastává na konci exponenciální fáze růstu. Místo symetrického buněčného dělení dojde k asymetrickému dělení buňky. Vzniknou dvě nestejně velké poloviny s úplným geonomem, ale s různou budoucností-spora a sporangium. Celý proces sporulace trvá 5 až 6 hodin a je ukončen před rozpadem vegetativní buňky. V důsledku malého styku s vnějším prostředím může si spora uchovat životnost po desítky, stovky i tisíce let. [1, 8]



Obr. 3: Ukázky bakteriálních spor [40]

Při sporulaci nastávají tyto stádia:

1. Změna jaderného materiálu - oba chromozomy vytvoří jediné vlákno umístěné podélně v buňce, tzv. linearizace chromozomů.
2. Vytvoření sporového septa - z cytoplazmatické membrány se začnou, podobně jako při dělení buněk, tvořit vychlípeniny směřující do nitra buňky a vytvářet dvojvrstevnou strukturu. Uzavřením septa se cytoplazma mateřské buňky oddělí od prostředí budoucí spory, které obsahuje chromozom, ribosomy, buněčnou šťávu s enzymy a ostatními cytoplazmatickými složkami.
3. Vznik prespory - vychlípením septa vznikají z cytoplazmatické membrány dvě další membrány, vnější a vnitřní, které mají podobné vlastnosti jako cytoplazmatická membrána vegetativních buněk, tj. selektivní permeabilitu a vysokou enzymovou aktivitu. Jejich vytvořením vzniká prespora, která je podobně jako vegetativní buňka, barvitelná různými barvivy a citlivá k nepříznivým podmínkám. Sporulace může již dále probíhat bez přísunu živin.
4. Tvorba obalových vrstev spory - po ukončení syntézy vnitřní a vnější membrány se mezi těmito membránami začne tvořit silná vrstva zvaná kortex. Po chemické stránce je podobná peptidoglykanové vrstvě buněčné stěny, a proto je její syntéza inhibována penicilinem. Mezi vnitřní sporovou membránou a kortexem vznikne tenká vrstva zvaná sporová stěna, která je opět složena z peptidoglykanu a je pravděpodobně základem pro tvorbu buněčné stěny vegetativní buňky při klíčení spory. Ještě před ukončením syntézy kortexu se začíná tvořit vnější plášť, složený ze dvou vrstev bílkovinné povahy a obsahující velké množství aminokyseliny cysteinu. U některých druhů se vyskytuje na povrchu spory ještě další volná blána zvaná exosporium, jež mívá charakteristický tvar.

5. Zrání spory - dochází ke ztrátě vody až na 15%. Charakteristický je pro sporu obsah dipikolinátu vápenatého, který spolu s nízkým obsahem vody je příčinou vysoké termorezistence spor.
6. Uvolnění spory z buňky - nastává jen u některých buněk. [1, 8]

Biochemie sporulace

Pro sporulaci je nutné, aby se v prostředí vyskytovaly určité kationty a anionty- NH_4^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, PO_4^{3-}, SO_4^{2-} a NO_3^-. Ostatní ionty jsou přítomny již ve vegetativní buňce. Vápenaté kationy jsou důležité pro syntézu dipikolinové kyseliny a příjem z prostředí nastává i ve stádiu prespory. Manganaté kationy jsou důležité při aktivaci některých peptidáz a proteináz, které rozkládají vnitrobuněčné bílkoviny. Ty buňka využije pro syntézu sporových bílkovin důležitých při tvorbě obalových vrstev.

Energii, kterou buňka potřebuje pro syntézu obalových struktur, získává buňka oxidací vnitrobuněčné poly-β-hydroxymáselné kyseliny.

Také hraje důležitou roli kyslík. U některých rodů, např. *Bacillus* je zapotřebí více kyslíku než u vegetativní buňky. U anaerobních bakterií působí kyslík jako inhibitor sporulace. [1]

Fyziologické vlastnosti

1. Termorezistence

   Termorezistence patří mezi nejdůležitější vlastnosti spory. Spory snesou několikahodinový var a ve vlhkém prostředí jsou po 15 až 30 minutách usmrcovány teprve při teplotách 115°C až 120°C. Okolní prostředí ovlivňuje odolnost bakteriálních spor. Kyselé prostředí odolnost při zahřívání snižuje, naopak přítomnost lipidů, bílkovin a vysoké koncentrace cukrů odolnost zvyšují. Tato odolnost má význam při zpracování potravin. Musíme rozlišovat kyselé a nekyselé potraviny a podle toho sterilovat.

   Velmi termorezistentní spory mají spory termofilních organismů, především *Bacillus stearothermophilus* a *Clostridium thermosacharolyticum*.
2. Odolnost k jedovatým látkám

   Díky nepropustnosti obalových vrstev spory pro většinu látek je bakteriální spora odolná vůči některým látkám, především jedovatým.
3. Mírně zvýšená radiorezistence

   Radiorezistence je nejspíš způsobena sirnými aminokyselinami obsažených ve sporových bílkovinách a nepohyblivostí volných radikálů vzniklých zářením.
4. Zvýšená odolnost k nepříznivým podmínkám

   Díky nízké metabolické aktivitě spory, kterou způsobuje nízký obsah vody ve spoře, nízké enzymové vybavení a nízká aktivita enzymů, je bakteriální spora odolná vůči vysychání, hladovění a jiným nepříznivým podmínkám. [1]

Klíčení spory

Pokud se bakteriální spora dostane do vhodných podmínek jako je dostatek vody, živin, vhodné pH a teplota, dochází k přeměně spory na vegetativní buňku. Proces klíčení začíná rozpadem kortexu a uvolňováním organickým sloučenin do prostředí. Současně spora přijímá vodu. Poté dojde k prasknutí obalů spory a vzniknutí jednoho nebo dvou výrůstků, které se přemění ve vegetativní buňku. [1]

1.3.2.2 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* je rozsáhlý a v přírodě velmi rozšířený. Jeho druhy mají v celku bohaté enzymové vybavení, takže mohou rozkládat nejrůznější organické sloučeniny. Většina druhů má velmi aktivní amylolytické enzymy, které štěpí škrob, řada druhů má pektolytické enzymy, které štěpí rostlinné pektiny, a většina druhů má velmi aktivní proteolytické enzymy, takže se uplatňuje při aerobním a anaerobním rozkladu bílkovin. Řada druhů produkuje antibiotika polypeptidové povahy, z nichž některá se pomocí těchto bakterií vyrábějí průmyslově (např. bacitracin). Jiné druhy tvoří slizovitá pouzdra polysacharidové povahy (levany a dextrany), které způsobují nežádoucí nitkovitost pečiva a pšeničného chleba. Určité druhy slouží pro průmyslovou přípravu enzymů. Bakteriální amylasy získané z *Bacillus subtilis* se uplatňují v pivovarství a v textilním průmyslu proteinasy se používají především do pracích prostředků.
Vegetativní buňky rodu *Bacillus* jsou aerobní, peritrichní tyčinky, rovné s oblým nebo hranatým zakončením a poměrně velkých rozměrů (0,5 x 1,2μm až 2,5 x 10μm). Je to rod grampozitivní, přestože příležitostně vykazuje rekci gramnegativní nebo proměnlivou. Buňky se mohou vyskytovat samostatně nebo tvoří řetízky o počtu jednotek až stovek. Délka je závislá jak na podmínkách prostředí tak na jednotlivém kmenu. Globule reservního metabolitu, kyseliny poly-β-hydroxymáselné, jsou zřetelné v cytoplazmě, zvláště obarvíme-li lipidy Sudanovou černí B.
Pro čeleď *Bacillaceae*, do níž rod *Bacillus* patří, je velice významným taxonomickým znakem tvorba jedné endospory, která se vyznačuje velkou odolností k vysokým teplotám, jedům, zářením a jiným nepříznivým podmínkám. [1,9]

Smith et al. (1946, 1952) a později Gordon et al. (1973) navrhli a vyvinuli systém pro diferenciaci a identifikaci aerobních bacilů nesoucích spory. Rod rozdělili do 3 skupin podle morfologie spory a sporangia:

Skupina 1: Sporangium nezduřelé; spory elipsoidní nebo cylindrické, centrální až terminální. Grampozitivní.

A. Podskupina s „velkými buňkami“: tělo bacilů o průměru 1,0 μm nebo větší, s patrnými protoplazmatickými globulemi. Skupina zahrnuje *B. megaterium, B.cereus, B.cereus* var. *mycoides, B. thuringiensis* a *B. anthracis.*

B. Podskupina s „malými buňkami“: průměr < 1μm, protoplazmatické globule nepozorovatelné. *B. subtilis, B. pumilis, B. licheniformis, B. firmus* a *B. coagulans.*

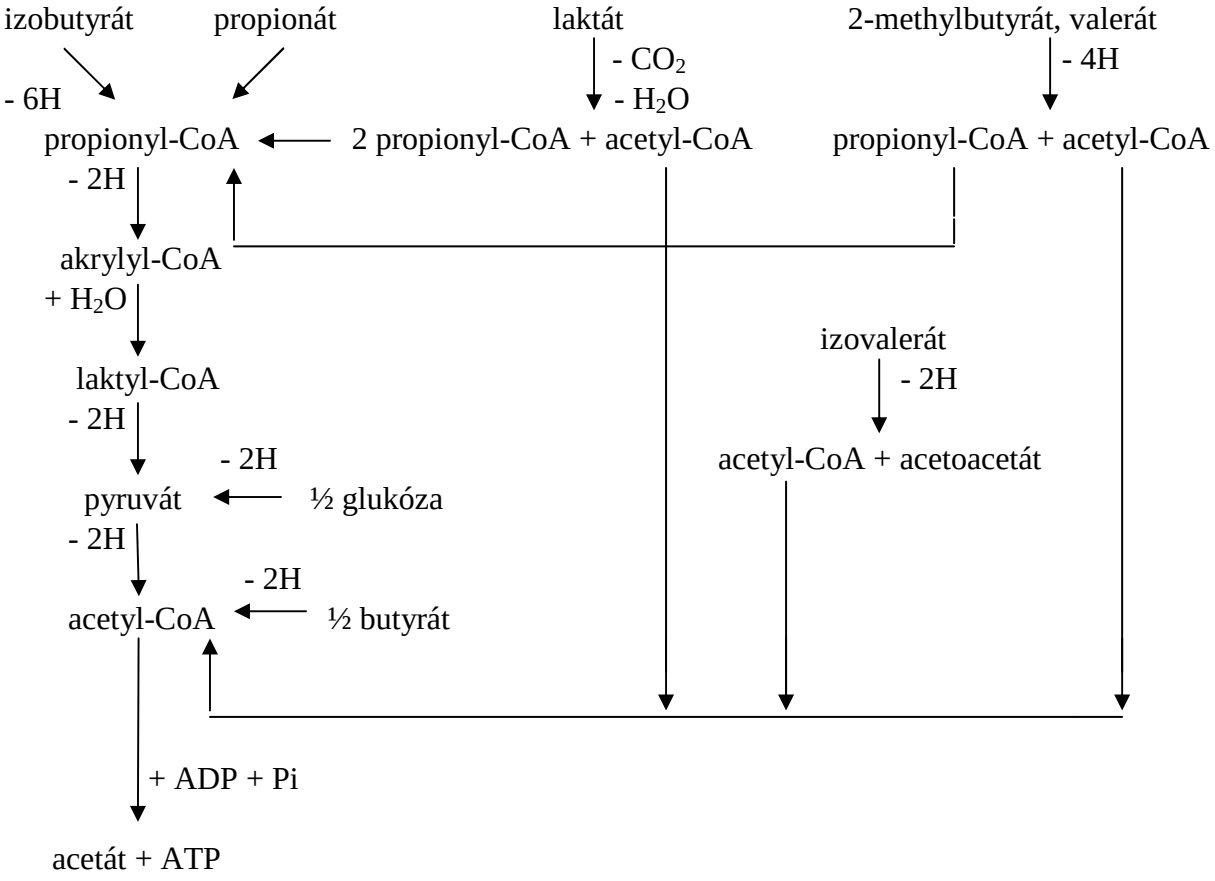
Skupina 2: Sporangium zduřelé; spory elipsoidní, centrální až terminální. Gramproměnlivé. Zařazujeme sem *B. circulans, B. macerans, B. polymyxa, B. alvei, B. laterosporus, B. brevis, B. stearothermophilus, B. popilliae, B. larvae* a *B. lentimorbus.*

Skupina 3: Sporangium zduřelé; spory sférické, subterminální až terminální. Gramproměnlivé. *B. sphaericus.*

K diagnostice a dalšímu členění do pododdělení každé skupiny na úroveň druhů se užívají selektivní mikrobiologické a biochemické testy. [10]

V médiích obsahujících sacharidy, většina členů vytváří pouze kyselinu, ale některé, jako *B. macerans* a *B. polymyxa*, produkují plyn. Běžně bývá zkvašována glukóza, maltóza a sacharóza, mannitol a salicin méně. Vzácně je zkvašována laktóza. Konečné produkty zkvašování glukózy se velmi liší. Některé druhy produkují kyselinu mléčnou. Jiné, jako *B. subtilis, B. licheniformis* a *B. cereus*, tvoří 2, 3-butandiol a glycerol, *B. polymyxa* tvoří 2, 3-butandiol, ethanol a vodík a *B. macerans* vytváří především ethanol, aceton a octovou a mravenčí kyselinu. Většina druhů vylučuje proteolytické enzymy a hydrolyzuje kasein a želatinu.
Co se týče požadavku na kyslík, všichni členové rodu rostou aerobně. Některé druhy, například *B. subtilis, B. brevis, B. firmus, B. megaterium* a *B. sphaericus*, jsou striktně aerobní. Jiné, například *B. cereus, B. anthracis, B. licheniformis, B. polymyxa* a *B. coagulans*, jsou fakultativně anaerobní. [11]

Z metabolismu je velmi zajímavý metabolismus a transformace některých organických kyselin.



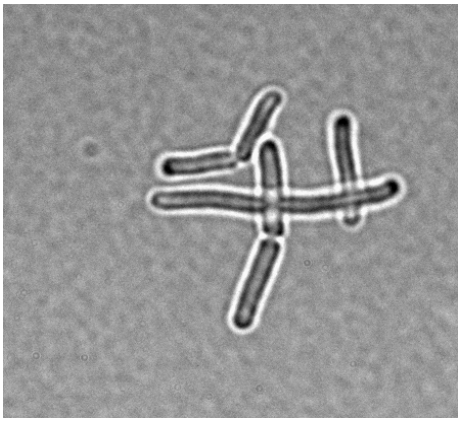
Obr. 4: Metabolismus nižších organických kyselin u aerobních termofilních baktérií [2]

Termofilní druhy:

Bacillus thermoantarcticus
Tato grampozitivní bakterie byla izolována z geotermální půdy blízko kráteru v Mount Melbourne v Antarktidě. Optimální teplota růstu *B. thermoantarcticus* je 65 °C a pH 6. Bakterie produje cytochrom c oxidasu, poněvadž oxidázový test proběhl pozitivně. Naopak katalázový test byl negativní, což znamená, že bakterie neumí rozložit peroxid vodíku na kyslík a vodu. *B. thermoantarcticus* produkuje exopolysacharidy, tj. polysacharidy nacházející se vně buněčné stěny mikrobiálních buněk, dále exocelulární xylanasu, endocelulární alkoholdehydrogenasu a exo a endocelulární glukosidasu. [12]

Bacillus thermoamylovorans
B. thermoamylovorans je mírně termofilní, fakultativně anaerobní, amylotická bakterie. Byla izolována z palmového vína, tropického alkoholického nápoje ze Senegalu. Optimální pH růstu je okolo 7 a optimální teplota je 50 °C. Nad 58 °C bakterie přestává růst. Buňky *B. thermoamylovorans* jsou grampozitivní, produkují cytochrom c oxidasu, nesporulují, mají tyčinkovitý tvar a trochu se pohybují pomocí peritrichálního bičíku. Bakterie produkuje laktát, acetát, formiát a ethanol. [51]

Bacillus stearothermophilus
Bacillus stearothermophilus jiným jménem *Geobacillus stearothermophilus* je tyčinkovitá, grampozitivní bakterie rozšířená v půdě, horkých pramenech, oceánských sedimentech a arktických vodách. Optimální teplota růstu je mezi 50 až 65 °C. Způsobuje kažení potravinářských výrobků, zejména nekyselých zeleninových a masových konzerv. Může být příčinou tzv. plynuloprostého kysnutí nekyselých konzerv, neboť při vhodné teplotě tvoří značné množství kyselin. Je schopna rozmnožovat se nad pH 4,8. Používá se jako modelový organismus při sterilizaci párou k ověřování studií a periodické kontrole sterilizačních cyklů. [1,13]

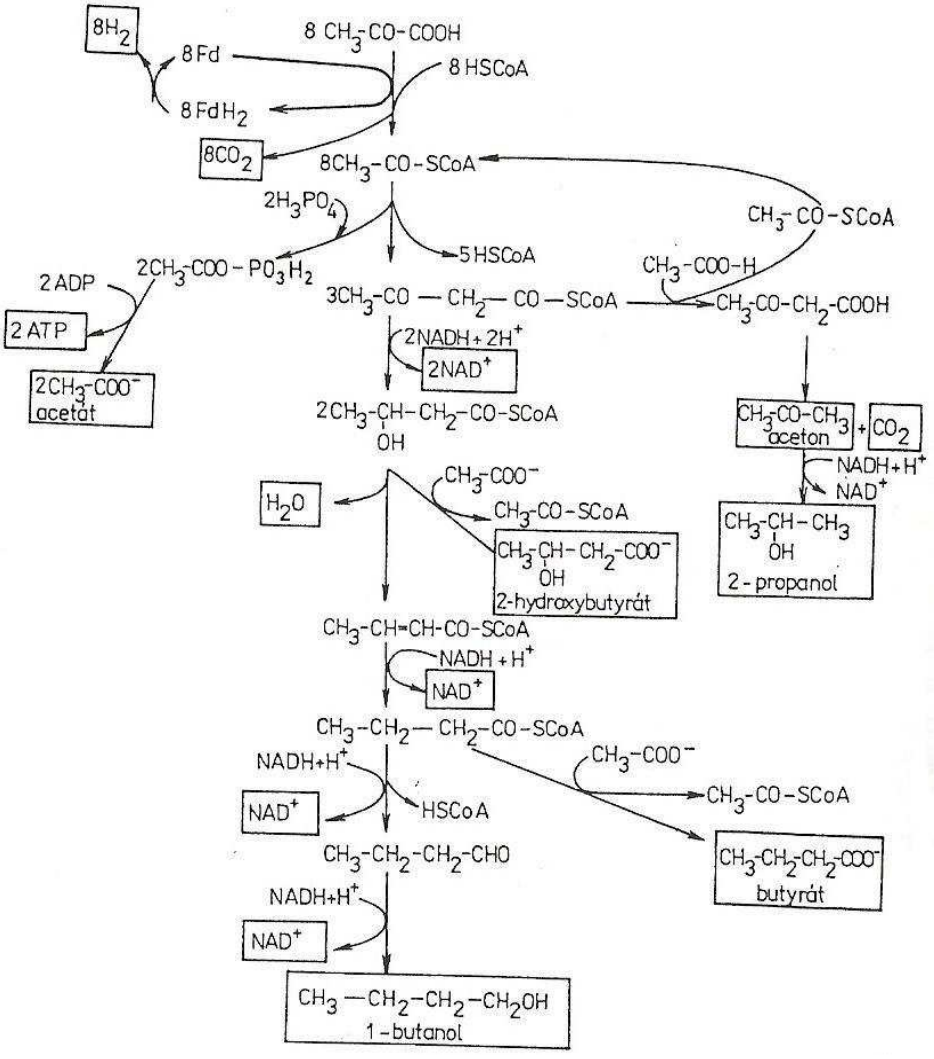


Obr. 5: B. stearothermophilus [41]

1.3.2.3 Rod *Clostridium*

Klostridia patří mezi rozsáhlý a z potravinářského hlediska velmi důležitý rod, volně se vyskytují hlavně v mírně kyselých půdách. Buňky klostridií mají tvar peritrichní tyčinky o rozměrech 1 x 5-8 μm, jsou grampozitivní. Tvoří spory, které jsou širší než vegetativní buňka.

Rod *Clostridium* je obligátně anaerobní, kyslík inhibuje růst a po několika minutách usmrcuje vegetativní buňky u většiny druhů.
Některé druhy mají silné proteolytické schopnosti, které se uplatňují při rozkladu bílkovin. Jiné mají sacharolytické schopnosti a zkvašují jednoduché cukry, ale také oligosacharidy a škrob, některé dokonce štěpí i celulosu. Při anaerobní oxidaci sacharidů tvoří klostridia velké množství oxidu uhličitého a vodíku. Tvorba plynu se nepříznivě projevuje např. v sýrařství. Průmyslově se využívají druhy *Clostridium acetobutylicum* a *Clostridium butyricum* pro výrobu butanolu, acetonu a kyseliny máselné.
Z potravinářského hlediska je velmi významný druh *Clostridium botulinum*, který produkuje smrtelně jedovatý botulotoxin. Spory *Clostridium botulinum* jsou usmrcovány 4-10 minutovým zahříváním vlhkým teplem na 120 °C. Další druhy důležité z hlediska produkce toxinů jsou *Clostridium perfrigens* a *Clostridium tetani*. *Clostridium* se též minoritně vyskytuje jako epifytní mikroflóra na rostlinách, kde produkuje kyselinu máselnou. Jelikož mají vysokou rezistenci vůči chloru a jiným chemickým či fyzikálním faktorům, je vhodné využít je pro doplňkovou kontrolu vodárenského systému, rozvodů a pro kontrolu účinnosti dezinfekce vody. *Clostridium* se též vyskytuje jako amylolytická bakterie v bachoru. [1, 14]



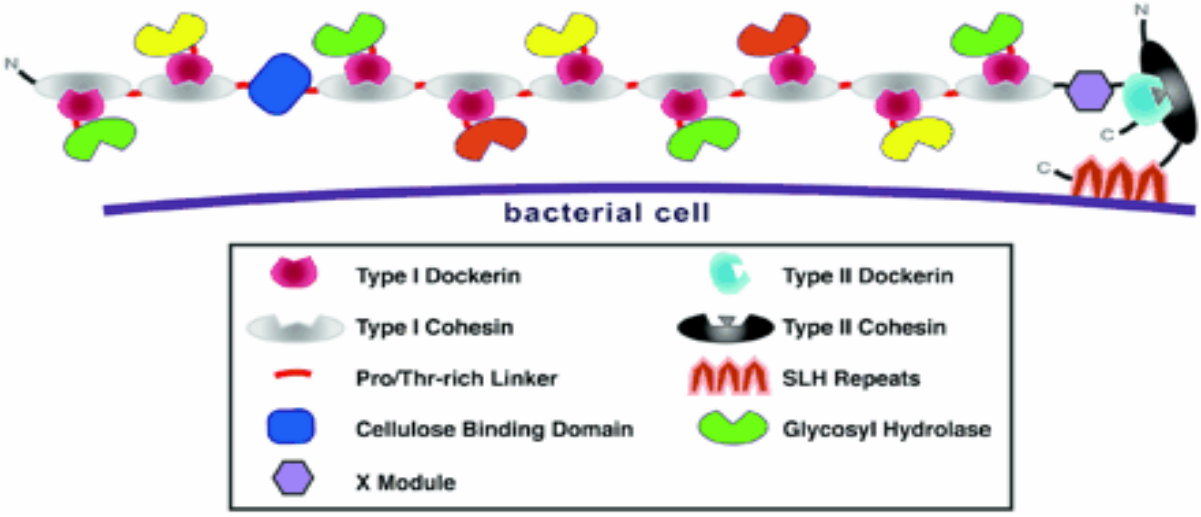
Obr. 6: Metabolismus glukózy u rodu Clostridium [1]

Termofilní druhy:

Clostridium thermocellum

Clostridium thermocellum je anaerobní termofilní bakterie s optimální teplotou růstu 60 °C, minimální teplotou 28 °C a maximální teplotou 69 °C. Vyhovuje jí pH v rozmezí 7,5 až 6,1. *C. thermocellum* přímo přeměňuje celulosový substrát na ethanol. Tato přeměna je užitečná při přeměně biomasy na použitelný zdroj energie. Degradace celulosy je uskutečňována pomocí obrovského extracelulárního celulásového systému, zvaného celulosome, který obsahuje téměř 20 katalytických podjednotek. Celulázový systém bakterie se významně liší od houbových (plísňových) celuláz způsobený vysokou aktivitou krystalické celulosy, která je schopná kompletně rozpustit krystalické zdroje celulosy jako je například bavlna. Nicméně jsou zde určitá omezení v použití bakterie pro praktické aplikace, způsobené nízkým výtěžkem ethanolu, přinejmenším částečně způsobené rozvětvené fermentační cestě, produkující také acetát, formiát, laktát spolu s ethanolem. [15,16]

Obr. 7: Clostridium thermocellum [42]



Obr. 8: Schématický diagram cellulosomu Clostridium thermocellum [43]

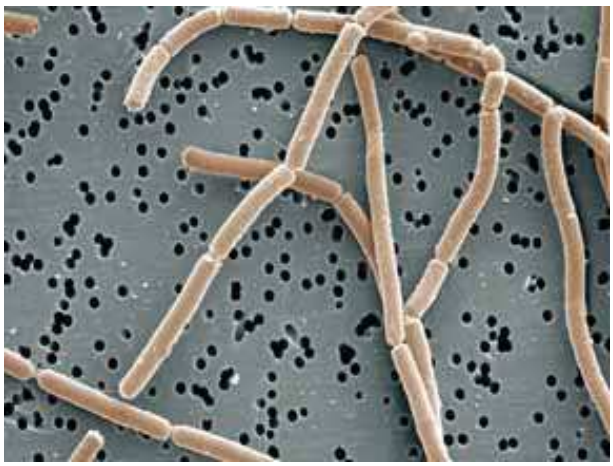
1.3.2.4 Rod *Lactobacillus*

Rod obsahující grampozitivní fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní nesporulující bakterie. Jsou hlavní složkou mléčných bakterií, pojmenovaných podle toho, že dokáží přeměnit laktózu a jiné cukry na kyselinu mléčnou.
Jiné druhy mohou žít v lidském trávicím traktu nebo ve vagíně, kde tvoří příznivou mikroflóru. Mnoho druhů se významně uplatňuje při rozkladu rostlinného materiálu. Většina druhů je schopna růstu nad 45 °C.
Některé druhy *Lactobacillus* jsou průmyslově využívány pro produkci jogurtů, sýrů, kyselého zelí, naloženou zeleninu, piva, vína, moštů a jiného fermentovaného jídla, stejně dobře živočišné krmivo, například píce.
Podle druhu katabolického metabolismu rozdělujeme rod *Lactobacillus* na 3 skupiny:

1. Obligátně homofermentativní
   (*L. acidophilus, L delbrueckii, L. helveticus, L. salivarius*)
2. Fakultativně homofermentativní
   (*L. casei, L. curvatus, L. plantarum, L. sakei*)
3. Obligátně heterofermentativní
   (*L. brevis, L. buchneri, L. fermentum, L. reuteri*) [1]

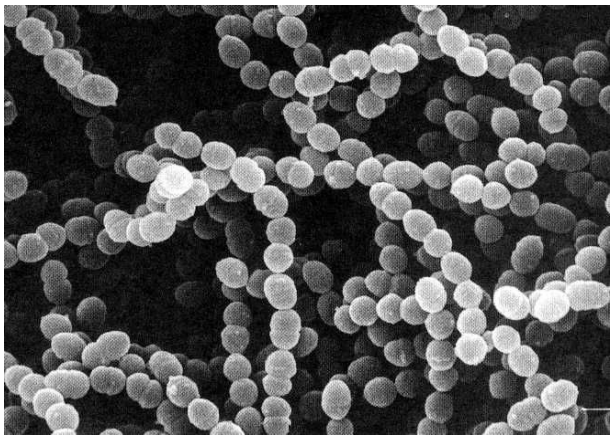
Lactobacillus thermophilus
L. thermophilus je nesporulující, nepohyblivá, grampozitivní bakterie o velikosti 1 až 3,5 µm. Tvoří rovné nebo mírně zakřivené tyčinky. V mléčné kultuře převládají samostatné buňky nebo krátké řetízky na rozdíl od masového bujónu, kde se vyskytují s větší četností, a také řetízky jsou delší. Optimální teplota růstu je 50 až 63 °C a maximální teplota je 65 °C. [17]

Lactobacillus bulgaricus
L. bulgaricus patří mezi několik bakterií používaných pro produkci jogurtů. Po morfologické stránce je to grampozitivní, nesporulující, nepohyblivá bakterie tyčinkovitého tvaru s optimální teplotou růstu okolo 40 °C. Má určité složité požadavky na výživu, zahrnující neschopnost fermentovat cukry s výjimkou laktózy. Tato bakterie je schopná života ve velmi kyselém pH, mezi 5,4- 4,6, které příznivě působí na její růst. *L. bulgaricus* se živí mlékem a produkuje kyselinu mléčnou, která pomáhá k ochraně mléka. Během zkvašování mléka produkuje bakterie acetaldehyd, který dodává jogurtu jeho charakteristickou vůni. [18]



Obr. 9: Lactobacillus bulgaricus [44]

Streptococcus thermophilus
S. thermophilus sice patří do rodu *Streptococcus*, ale spolu s rodem *Lactobacillus* patří do řádu *Lactobacillales*, proto jej pro svou podobnost s *L. bulgaricus* zde uvádím.
S. thermophilus je grampozitivní fakultativně anaerobní, nesporulující, nepohyblivá, homofermentaivní bakterie s optimální teplotou růstu 40 až 45 °C. Můžeme ji nalézt v mléce a mléčných produktech. Většinou je používána pro výrobu jogurtů. [19]



Obr. 10: Streptococcus thermophilus [45]

1.3.2.5 Aktinomycety

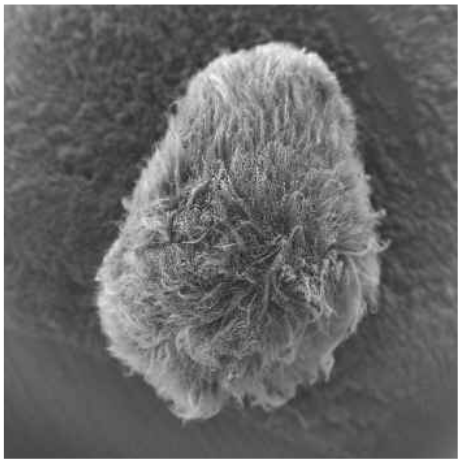
Aktinomycety jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní i aerobní bakterie tvořící dlouhá větvená vlákna (hyfy) tvořící buď mycelium nebo se rozpadající v tyčinkovité či kokovité buňky. Rozmnožují se sporami (jednotlivé, v párech, v řetízcích na konci hyf) nebo tvoří sporangia s endosporami.

Typické půdní bakterie, dávají půdě charakteristický plísňový pach. Řada druhů produkuje antibiotika. Produkují barviva - barevné kolonie (červená, modrá, fialová, růžová, zelená, žlutá, šedá) nebo bílé mycelium. Rozkládají organické látky v přírodě. Některé druhy jsou patogenní pro rostliny, jiné pro zvířata nebo člověka.

Termofilní a termotolerantní aktinomycety se významně uplatňují při rozkladu organických sloučenin v přírodě. [1]

Rod *Thermomonospora* rozkládá mnoho organických sloučenin včetně lignocelulosového komplexu. Mezi termofilní termomonospory patří *Thermomonospora curvata, Thermomonospora viridis, Thermomonospora citrina* s optimální teplotou růstu okolo 50 °C.

Dalším významným termofilním rodem je *Thermoactinomyces*, jehož zástupci se hojně vyskytují v přírodě. Tvoří hlavní mikroflóru kompostů, plesnivého zvlhlého sena, zvlhlého obilí a dalšího rozkládajícího se organického materiálu. Také se vykytují ve filtrech klimatizačního zařízení. Také vyvolávají alergie u hypersenzitivních jedinců. Tvoří kulovité endospory, které vznikají jednotlivě na vzdušných i substrátových hyfách buď přisedle nebo na krátkých jednoduchých nebo větvených sporoforech. Optimální teplota růstu je 50-55 °C a při této teplotě mají vysokou enzymovou aktivitu. [1]



Obr. 11: Thermomonospora curvata [46]

1.3.3 Cyanobakterie

Některé druhy rodu *Mastigocladus* žijí v horkých pramenech.
Mastigocladus laminosus je termofilní cyanobakterie, která roste v alkalických horkých pramenech s teplotou do 60 °C. Je schopná žít v širokém rozmezí teplot 35-60 °C a pH 4,5- 9,5. Má fotosyntetický systém jako vyšší rostliny, avšak zde nalézáme některé odchylky díky přizpůsobení se podmínkám prostředí. [20]

Obr. 12: Mastigocladus laminosus [47]

1.3.4 Termofilní *Fungi*

Termotolerantní fungi mají teplotní optimum okolo 20 °C, ale dokáží růst i při teplotě 50 °C. Mezi tyto druhy patří *Mucor pusillus, Chaetomium thermophile, Thermomyces lanuginosus, Thermoascus aurantiacus*. Termofilní druhy nedokáží růst pod teplotou 20 °C a jejich teplotní optimum je okolo 55 °C.
Druh *Dactylaria gallopava* dokáže přežívat i při tepltě 61,5 °C. Některé druhy nalézáme na pouštích např. *Lichenothelia* nebo jsou součástí kompostů nebo horkých pramenů. Nerostou, ale přežívají i teploty vyšší jak 70 °C (pouze v suchém prostředí). Askospory *Talaromyces flavus* snášejí i 80 °C a konidie *Trichocomaceae* přežijí i požár. [21]

2 VÝSKYT A ROZŠÍŘENÍ TERMOFILNÍCH DRUHŮ V PŘÍRODĚ

2.1 Termální prostředí

Termofilní organismy mají nároky na vysokou teplotu svého okolí. Vznik termálního prostředí může nastat čtyřmi způsoby:

- Slunečním zářením
- Spalovacími procesy
- Radioaktivním rozpadem
- Geotermální aktivitou [22]

2.1.1 Sluneční záření

Sluneční záření může řídit teplotu půdy až do teplot okolo 60 °C hlavně v pouštních oblastech. Ačkoli tak vysoké teploty nastávají pouze během denních hodin. Ve vodném prostředí dochází díky solárnímu ohřevu k značnému teplotnímu vzrůstu pouze v mělkých vodách nebo ve vodách s neobvyklou hustotou. V pobřežních mořských zátokách dosahuje teplota 40 °C. [22]

2.1.2 Spalovací procesy

Spalovacími procesy se v přírodě tvoří nejvíce tepla. Spalovací procesy mohou být vyvolány biologickými nebo nebiologickými cestami. Studie samovznícení sena a jiného organického materiálu má dlouho historii. Tepelná energie vzniká činností mikroorganismů a teplota může dosáhnout až 70 °C. Jiná místa, kde existuje přírodní samovznícení jsou hnízda ptáků rodu *Megapodiidae*, kterým se přezdívá ptačí inkubátory nebo stavěči hromad. Tito ptáci nezahřívají vejce vlastním teplem, ale zahrabávají je a vytváří obrovské hromady.

Umělé biotopy, jako doutnající uhelné hromady obsahují rody *Thermoplasmy* a *Sulfolobus*. Jiné nepřirozené prostředí pro hypertermofily jsou vroucí odpadní vody z vodních elektráren, *Pyrobaculum islandicum* byl izolován z přetlakového ventilu vodní elektrárny. [22, 23]

Obr. 13: Hnízdo druhu Megapodius tenimberensis v Indonésii [48]

2.1.3 Geotermální aktivita

Geotermální aktivita je pravděpodobně zodpovědná za nejvíce početné prostředí s vysokou teplotou. Teploty v aktivních vulkánech jsou příliš vysoké pro živé organismy (roztavená láva může mít teplotu 1000 °C i vyšší). Horké prameny a doprovodné fumaroly související s vulkanickou aktivitou mají teploty snesitelnější a pohybují se od 30°C až po bod varu (90-100 °C podle nadmořské výšky). Termální vody jsou rozšířeny po celém světě. Nejvýznamnější oblasti výskytu termálních pramenů jsou Yellowstonský Národní Park, Island, Nový Zéland a Rusko. [22]

2.2 Geotermální oblasti

2.2.1 Yellowstonský Národní Park

V parku se nachází 60 % všech světových gejzírů. Celkový počet zdejších termálních jevů se pohybuje okolo 10 000. Zahrnují otvory, z nichž s dýmem vyvěrají horké sopečné plyny, dále horké prameny, bahenní sopky a samozřejmě gejzíry.

Největší množství geotermálních jevů se objevuje na okraji kaldery - sopečné prolákliny vzniklé po poslední erupci, která proběhla před 60 000 - 70 000 lety. Z této doby se zde stále nachází ložisko horkého magmatu, které je uloženo pod povrchem v hloubce, která možná nedosahuje ani 2 km. Zatímco normálně stoupá teplota uvnitř svrchní zemské kůry směrem do hloubky v průměru o 1 °C každých 33 m, naproti tomu pod zdejší náhorní plošinou stoupá až o 22 °C. Zdejší gejzíry vznikají přehřátím vody v hloubce asi 1500 m na 500°C .

Pramen Grand Prismatic je ojedinělým přírodním jevem. Poté co ztratil schopnost tryskat, vytvořil tento gejzír jezírko s teplou, smaragdově modrou vodou. S průměrem přes 110 m je považován za největší termální pramen v USA (a možná i na světě). Největší z yellowstonských horkých pramenů vděčí za své barvy bakteriím a řasám, které jsou schopny života ve vodě o teplotě blízké bodu varu. Svěží barvy v horkých pramenech jsou výsledkem pigmentem zbarvených bakterií v mikrobiálním porostu, které rostou na okrajích na minerály bohatých vod. Bakterie produkují barvy v rozmezí od zelené po červenou. Množství barvy v mikrobiálním povlaku záleží na poměru chlorofylu a karotenoidů. V létě mají jezírka oranžovou a červenou barvu, kdežto v zimě jsou povlaky obvykle tmavě zelené. Střed jezera je sterilní díky extrémnímu teplu a má tmavě modrou barvu. Při pohledu z výšky jezero nápadně připomíná otevřené lidské oko. [24, 25]

Obr. 14: Pramen Grand Prismatic [49]

Díky fotosyntetickým pigmentům mají cyanobakterie modrozelenou, červené řasy červenou, bakterie purpurovou a díky karotenoidním pigmentům mají archebakterie žlutou nebo hnědou barvu. [26]

Obr. 15: Oblast pokrytá biofilmem žlutě a hnědě zbarvených prokaryot, včetně rodu Sulfolobus [26]

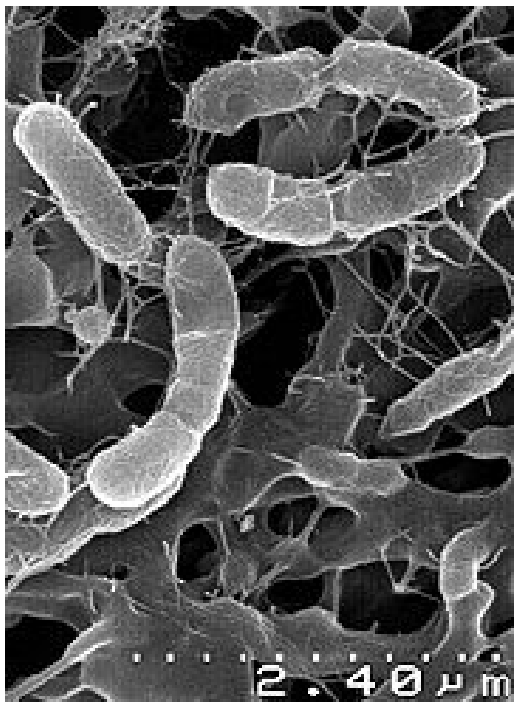
Obr. 16: Fumarola, v okolí jsou patrné zóny mikroorganismů [26]

2.2.2 Nový Zéland

Také na Novém Zélandě se nachází oblast s geotermální aktivitou. Jedná se především o oblast Wai-o-tapu v blízkosti města Rotorui. Jde o oblast s jedním z nejaktivnějších zemských zlomů na světě. Zde na rozhraní indoaustralské a pacifické kry se kdysi vynořil z oceánu i Nový Zéland. V Rotorui nás izoluje od magmatu šest kilometrů země.
Na mnohých místech jsou ve skále hluboké prohlubně, v nichž vřou hektolitry termální vody. Největší z nich dostala název "Číše šampaňského". Je to 5 hektarů veliká nádrž s temně oranžovými okraji. Teplota vody v jezeře se pohybuje v rozmezí 73 až 75 °C a pH má 5,5. Křemičité geotermální vody jsou přesyceny sloučeninami jako je auripigment (As_2S_3) a

antimonit (Sb_2S_3), které se usazují a dávají tak oranžovou barvu sedimentům pod hladinou. Z jezera byla izolována bakterie *Venenivibrio stagnispumantis*, která toleruje vysoké koncentrace arsenitých a antimonitých sloučenin. Je to chemolitotrofní, pohyblivá bakterie tvaru mírně zakřivené tyčinky. Energii získává reakcí $H_2 + ½ O_2 \rightarrow H_2O$. Žije v rozmezí teplot 45 - 75 °C a její optimální pH růstu je 4,5 - 5,8. [24, 27]

Obr. 17: *"Číše šampaňského"* [27]



Obr. 18: *Venenivibrio stagnispumantis* [50]

2.2.3 Island

Na Islandu je téměř 200 sopek, některé dosud aktivní. Se sopečnou činností souvisí přítomnost horkých pramenů, gejzírů, bahenních sopek, výronů plynů jako jsou fumaroly a sulfatary.

Termální prameny, které se vyskytují po celém Islandu, nejen ve vulkanicky aktivním pásmu, zde mají různé podoby od sirnatých bahnitých tůní, až ke krystalicky čistým, tyrkysově modrým křemičitým pramenům a gejzírům. [24, 28]

2.2.4 Kamčatka

Na Kamčatce také nalézáme spoustu horkých pramenů, gejzírů a horkých jezer s teplotou až 95 °C. Jsou v nich termofilní organismy. Časté jsou thiobakterie, které místo kyslíku potřebují k získávání energie síru. Některé tu byly nalezeny i ve velmi kyselém prostředí o pH blízkém 1. Vědci předpokládají, že obdobné bakterie mohly představovat jedny z prvních organismů na Zemi, kdy se zemská atmosféra skládala především z vodíku, sirovodíku a oxidu uhličitého, tedy látek, které tyto bakterie potřebují k životu. Žijí tu také bakterie, které v sobě hromadí mangan. Pro ně se možná najde využití při průmyslové těžbě tohoto prvku. Zajímavými obyvateli horkých pramenů jsou zelenomodré řasy, které slouží jako filtr některých vystupujících plynů, např. metanu a oxidu uhličitého (částečně je zpracovávají). Některé termofilní druhy těchto řas jsou vázány na prameny dosahující teplot až 65 °C.
Další biologickou zvláštností horkých pramenů jsou stromatolitové sopečky. Vypadají jako malé sopky, ale místo lávy z nich tryská voda. Je pro ně charakteristická vrstevnatá stavba s 0,1 až 0,2 mm silnými vrstvami prokřemenělých tmavě modrých řas se zbytky různých bakterií a sinic. [29]

2.3 Ostatní lokality termofilů

Termofilní mikroorganismy se vyskytují v půdě, v kompostech, v uskladněném vlhkém materiálu (rašelině, obilí, seně), bahně tj. všude tam, kde činnost mezofilních mikroorganismů přispěla ke zvýšení teploty na 40 až 45 °C. Při této teplotě začíná intenzivní činnost termofilů, jež vede k dalšímu zvyšování teploty a někdy i k samovznícení (např. u sena, rašeliny nebo obilí). [1]

3 MOŽNOSTI VYUŽITÍ TERMOFILNÍCH MIKROORGANISMŮ

3.1 Využití termofilních mikroorganismů v potravinářském průmyslu

3.1.1 Termofilní jogurtové kultury

Názvem jogurt nebo jogurtová mléka se označují mléčné výrobky vzniklé prokysáním mléka čistou jogurtovou kulturou. Tato kultura obsahuje mikroorganismy *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*. K výrobě se používá nezahuštěné mléko nebo různě zahuštěné mléko o různé tučnosti. Připravená směs mléka se homogenizuje, pasteruje a temperuje na teplotu zrání. Pak jsou přidány mikroorganismy ve formě jogurtového zákysu, který se nechá 4 - 8 hodin vyvíjet při teplotě 40 °C. Při tomto procesu, který se nazývá kysání se přemění laktóza na kyselinu mléčnou. Do jogurtu mohou být přidávány probiotické bakterie, které blahodárně působí na střevní mikroflóru člověka.
Streptococcus thermophilus a *Lactobacillus bulgaricus* mají symbiotický vztah a spolu se vyznačují rychlou tvorbou kyseliny mléčné. Díky větší proteolytické aktivitě, *Lactobacillus bulgaricus* uvolňuje aminokyseliny z bílkovin mléka, a tím stimuluje růst *Streptococcus thermophilus*. Ten poté stimuluje růst a metabolismus *Lactobacillus bulgaricus* tvorbou kyseliny mravenčí, která může také vznikat při výrobě jogurtů zahříváním na 85 °C na 20-30 minut nebo 95 °C na 5 minut termickým rozkladem laktózy, ale jen v omezené míře. [2, 30, 31]

3.1.2 Termofilní sýrařské zákysové kultury

V mlékárenském průmyslu se termofilní zákysové kultury používají při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, termofilního kyselého mléka a od něj odvozených produktů a při výrobě měkkých sýrů a tvarohů.

Zákysové kultury obsahují bakterie *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus , Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis, Lactobacillus helveticus.*

Při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, jako je například parmezán nebo ementál fermentují bakterie laktózu na kyselinu mléčnou, přičemž snižují hodnotu pH sýřeniny a tím napomáhají její dehydrataci. Voda navázaná na kasein se s klesajícím pH uvolňuje a je potom odstraňována lisováním. Fermentace probíhá i při zvýšené teplotě při dohřívání a dosušování sýřeniny při teplotách 51 - 55 °C, a taky při jejím lisování. Nízká hodnota pH zabraňuje růstu nežádoucích bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Paličkovitá bakterie termofilních zákysů musí při výrobě sýrů snášet vyšší koncentrace solí.

Významná role termofilních zákysových kultur je jejich proteolytická aktivita, která se podílí spolu s dalšími složkami určující chuť, vůni a reologické vlastnosti sýrů. [2, 31]

3.1.3 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná je kysele chutnající, lehce rozpustná, bezbarvé krystaly tvořící hydroxykyselina. Vzniká fermentací laktózy pomocí probiotických bakterií např. *Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus delbrücki.* V důsledku vzniku kyseliny mléčné ve střevech je inhibován růst patogenních mikroorganismů a podporována činnost mléčných bakterií, kteří mají příznivý vliv na střevní mikroflóru. Tyto bakterie dokáží laktózu štěpit a využít ji pro svůj růst, přičemž vytvářejí např. vitamíny B_2 a B_{12}. V důsledku působení kyseliny mléčné se zlepšuje rozpustnost vápníku a průchodnost střevní sliznice.

Výroba kyseliny mléčné se provádí pomocí bakterií mléčného kvašení (např. *Lactobacillus bulgaricus)*, kdy se laktóza při teplotách vhodných pro konkrétní bakterie přemění na kyselinu mléčnou. Ta se během fermentace neutralizuje např. uhličitanem vápenatým. Po prokvašení se médium zahřeje a zfiltruje, filtrát se zahustí, mléčnan vápenatý se převede pomocí kyseliny sírové na kyselinu mléčnou a nerozpustný síran vápenatý, který se oddělí. Z takto získané kyseliny mléčné lze rafinací získat látku v potravinářské jakosti. [2, 32]

3.2 Využití termofilních mikroorganismů v procesech čištění

3.2.1 Biologické čištění odpadních vod

Při biologickém čištění odpadních vod se využívají termofilní mikroorganismy, které rozkládají organické znečištění. Tento proces je složitý a skládá se z řady reakcí. Rychlost tohoto procesu závisí na obsahu kyslíku, pH, teplotě, typu znečištění a přítomnosti toxických látek. Důležitá je také použitá metoda čištění a velikost částic.

Při anaerobním rozkladu se organické látky oxidují na oxid uhličitý a vodu a jiné látky se redukují a vznikají organické plyny, např. methan. Anaerobní biologické čištění se používá u silně znečištěných vod a při procesu vyhnívání.

Při aerobním biologickém čištění dochází k oxidaci organických látek a vzniká oxid uhličitý a voda. [2, 33]

3.2.1.1 BETT proces

Zkušební provoz BETT procesu je tvořen mobilní jednotkou obsahující izolovaný reaktor pro termofilní čištění odpadních vod nebo zpracování kalu. BETT zařízení je konstruováno jako vsádkový nebo kontinuální způsob kultivace. Vsádkový proces, kdy je bioreaktor naplněn a zaočkován mikrobní kulturou, je využíván pro studium vyhnívání kalů. Kontinuální způsob, při kterém jsou mikroorganismy plynule doplňovány s novým médiem a staré médium se suspendovanými mikroorganismy se odstraňuje odtokem, je používáno pro studium zpracování kapalného aktivovaného kalu. [34, 35]

3.2.1.2 TAS proces

Termofilní stabilizaci kalu (TAS) využívají především malé čistírny odpadních vod. Odpadní kal je při tomto procesu stabilizován vzduchem nebo průmyslovým kyslíkem a zároveň hygienizován vysokou teplotou.
Větší čistírny odpadních vod používají způsob dvojitého zpracování kalu (DS). Kombinace aerobní a anaerobní stabilizace umožňuje použití menších reaktorů ke stabilizaci a hygienizaci odpadního kalu než při čistě anaerobním způsobu zpracování. [2]

3.2.1.3 ALPHA-BIOTHERM proces

Při tomto procesu primární a sekundární aktivované kaly vstupují do ALPHA-BIOTHERM pasterizace, což je provozní termofilní aerobní autokláv, kde jsou zdrženy při 70 °C jednu hodinu. Pasterizovaný kal je postupně čerpán do čtyř vejčitých anaerobních autoklávů. Teplo požadované pro pasterizaci a procesy vyhnívání je poskytováno autoklávem nebo palivovými kotli. Jednotka ALPHA-BIOTHERMu je schopna s využitím termofilních bakterií zpracovávat mechanicky zahuštěné tuhé biologické látky s obsahem sušiny více jak 8%. [2]

3.2.1.4 FUCHS-ATAD proces

Při této technologii se kal neodstraňuje, ale je zušlechťován. Při aerobní termofilní stabilizaci je kal stabilizován a hygienizován, a tím získáno cenné hnojivo. [36]

3.2.1.5 ATAD a AEROTHERM proces

Technologie ATAD (autotermní termofilní aerobní stabilizace kalu) se zabývá biologickým aerobním zpracováním kalu při teplotách nad 45 °C. K dosažení zvýšené reakční teploty se nepřivádí teplo z vnějšku, nýbrž proces se exotermickými reakcemi samočinně udržuje v termofilním rozsahu teplot.
Technologie AEROTHERM využívá autotermní termofilní aerobní proces jako předstupeň před anaerobní mezofilní stabilizací. Obě technologie se úspěšně používají při desinfekci čistírenských kalů, odlehčení stávajících vyhnívacích zařízení na stabilizaci čistírenského kalu a při snížení investičních nákladů.
Princip aerobní autotermní stabilizace kalu vychází z poznatku, že v celkové energetické bilanci biochemických reakcí při aerobním rozkladu organického substrátu v kalu dochází k uvolnění značně velkého reakčního tepla. Uvolněné reakční teplo zvyšuje teplotu kalu na hodnotu odpovídající rovnováze mezi produkcí reakčního tepla, tepelným obsahem kalu a

ztrátami tepla do okolí systému. Pokud je substrát dostatečně koncentrovaný a reakční systém tepelně izolovaný od okolního prostředí, pak se teplota kalu tímto procesem samočinně zvýší na značně vysoké hodnoty, dosahující v praxi 70 °C. Při zvýšené teplotě se rozkladné biochemické procesy podstatně urychlují, kal se stabilizuje během několika dnů a rovněž dochází ke zničení přítomných patogenních mikroorganismů. [37]

3.3 Využití termofilních mikroorganismů v kompostování

Kompostování je jednou z možností, jak využít odpadní biomasu. Tento způsob patří mezi nejjednodušší a nejlevnější způsoby při zpracování bioodpadu. K hlavním nevýhodám patří absence přímého energetického zhodnocení. Mezi nejdůležitější přínosy kompostování patří efektivní využití odpadní biomasy, zabezpečení koloběhu uhlíku, upevnění vazby dusíku, proces obnovy a zlepšení půdní úrodnosti, komerční využití odpadů a hygienizace prostředí.

Jednou z nejdůležitějších předností kompostování je produkce kvalitního humusu mimo půdní prostředí. Základem aerobního kompostování je biodegradace organické hmoty účinkem aerobních mikroorganismů kombinovanou s některými dalšími reakcemi, mezi které patří především hydrolýza a oxidace. Jedna z podmínek k efektivnímu a rychlému procesu kompostování je přívod kyslíku. Především se na procesu huminizace podílejí heterotrofní mikroorganismy, které degradují organické látky a část z nich oxidují až na CO_2 a H_2O. Současně dochází k vazbě dusíku a tím se zvyšuje užitečná hodnota kompostu.

Zrání kompostu můžeme rozdělit do tří fází. První fáze je charakterizována rychlým nárůstem teploty až na 60 °C. Mikroorganismy rozkládají složité organické sloučeniny na jednodušší, anorganického charakteru. Probíhají rovněž chemické degradační reakce. Na začátku se odbourávají cukry, škroby a bílkoviny, později celulosa a další části dřevní hmoty. Konečným produktem těchto rozkladů jsou CO_2, voda a další látky. Při nadbytku dusíku může vznikat rozkladem i amoniak. Protože mikroorganismy nejsou schopny odbourat organické kyseliny, vzrůstá jejich zastoupení v kompostu a snižuje se pH. Na počátku se uplatňují mezofilní mikroorganismy, které odbourávají snadně rozložitelnou organickou hmotu. Při zvýšení teploty začínají účinkovat termofilní mikroorganismy, které mohou zvýšit teplotu až na 80 °C. Při těchto pochodech se uplatňují tyčinkovité bakterie mikromycety rozkládající celulosu. Termofilní houby mají významnou roli při tvorbě humusu. Teploty nad 70 °C nejsou pro kompost žádané, protože při těchto teplotách některé mikroorganismy hynou a tím se prodlužuje doba zrání kompostu. Ve druhé fázi dochází k pozvolnému poklesu teploty na 25 °C. Organické látky jsou postupně přeměňovány na humusové složky. Ty se vážou na jílovité částice a přechází na stabilní formy odolné vůči mikrobiálnímu rozkladu. V poslední fázi klesá teplota na teplotu okolí a tvoří se kvalitní a stabilní humus.

Teplota je důležitým ukazatelem stavu kompostu. Správný průběh teploty svědčí o správné receptuře základky a je ukazatelem vhodného výběru technologie. Kompostování je samozáhřevný proces. Většina mikroorganismů v kompostu je mezofilních. Termofilní mikroorganismy se začínají uplatňovat při překročení teplot 45 °C. Při vyšších teplotách dochází k biochemické a technické desinfekci. Zničí se semena plevelů, antibiotika a choroboplodné zárodky. [38]

3.4 Ostatní využití termofilů

3.4.1 Enzymy termofilních mikroorganismů

Proteiny z hypertermofilů udrží ve vysoké teplotě, v porovnání s mesofyly, déle strukturní konformaci díky souboru slabých (a kumulativních) interakcí, navýšení počtu solných můstků, vylepšení sbalování nepolárních reziduí a zkracování délky povrchových smyček. Často se užitek solných můstků a hydrofobních interakcí objeví na rozhraní podjednotek, protože mají vliv na oligomerizaci proteinů hypertermofilů. Termofilita je také spojena se zmenšením poměru povrchu ku objemu, což je dáno přítomností několika aminokyselinových reziduí, které jsou pevněji zabaleny v holoproteinu. Dále jsou produkovány malé heat-shock proteiny (sHSP) o molekulové hmotnosti 12 - 43 kDa. Mnoho těchto proteinů má funkci molekulárních chaperonů, katalyzují skládání nebo denaturaci proteinů, pomáhají při skládání nově syntetizovaných proteinů a brání agregaci proteinů**.** Ačkoliv jsou u různých organismů různé aminokyselinové sekvence a kvartérní struktura sHSP, monomerní struktura těchto proteinů je téměř identická. To vede k hypotéze, že mnoho 18 sHSP sdílí společný strukturní blok a mechanismus jejich funkce spočívá v kvartérní struktuře závislé na druhu a cílovém proteinu.
Díky stabilitě a aktivitě za vysokých teplot jsou enzymy termofilních mikroorganismů využívány v několika průmyslových odvětvích. (Tab.2) [39]

Tab č.2: Využití termostabilních mikroorganismů:

Enzymy termofilních mikroorganismů	Využití
proteasy	detergenty, hydrolýzy v potravinářském průmyslu- pivovarnictví, pekárenství
glykosylhydrolasy (např.amylasy, glukoamylasy, glukosidasy, xylanasy)	zpracování škrobu, celulosy, chitinu, pektinu, textilní průmysl
chitinasy	potravinářské a zdravotnické prostředky
xylanasy	bělení papíru
lipasy, esterasy	detergenty, stererospecifické reakce (transesterifikace, organické biosyntezy)
DNApolymerasy	molekulární biologie (PCR)
dehydrogenasy	oxidační reakce

3.4.2 DNA termofilních mikroorganismů

Termorezistence dvoušroubovice DNA může být zlepšena vyšším podílem GC. Nicméně GC analýzy ukázaly, že toto není případ hypertermofilů. Dokonce někteří hypertermofilové jako *Acidianus infernus, Methanothermus sociabilis, Methanococcus igneus*a a *Pyrococcus furiosus* vykazují obsah GC 30 až 40%, což je blízko nejnižšímu obsahu schopnému udržet informaci. Všichni známí hypertermofilové mají reverzní gyrasu, ojedinělý typ DNA topoisomerasy I, která způsobuje pozitivní nadšroubovicové vinutí, a tím další stabilizaci DNA. Na rozdíl od bakterií mají archeální hypertermofilové úplné základní histony. Přídavek

histonů od zástupce archeálního rodu *Sulfolobus* k DNA in vitro způsobil drastický nárůst teploty tání. Bylo purifikováno několik enzymů hypertermofilů, které vykazovaly neobyčejnou teplotní stabilitu, např. *Pyrococcus woesii* vlastní amylasu, která je aktivní při 130 °C.

DNA stálá za tepla je žádána pro amplifikace DNA polymerasovou řetězovou reakcí. Pro tyto účely je komerčně dostupná DNA polymerasa z *Thermus aquaticus, Thermotoga maritima, Thermococcus litoralis* a *Pyrococcus furiosus.* [39]

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské bylo zmapování termofilních druhů, jejich výskyt a rozšíření v přírodě a možnosti využití.
Termofilní mikroorganismy mají nejnižší optimální teplotu růstu 45 °C. Termofilní zástupce nacházíme mezi Archebakteriemi a to konkrétně ve skupině hypertermofilních archeí, které mají optimální teplotu růstu v rozmezí 70 až 105 °C a ve skupině archeí bez buněčné stěny. Mezi bakteriemi tvoří nejpočetnější skupinu termofilních mikroorganismů rody tvořící spory, rod *Bacillus* a *Clostridium*. Další zástupce nacházíme mezi rody *Lactobacillus*, aktinomycetami a v menší míře i mezi mikrobními houbami.
Termální prostředí vzniká slunečním zářením, spalovacími procesy, radioaktivním rozpadem a nejčastěji geotermální aktivitou. Nejvýznamnější oblasti výskytu geotermální činnosti jsou Yellowstonský Národní park, kde se nachází největší množství termofilních druhů, dále Island, Nový Zéland a Kamčatka. Mezi ostatní lokality výskytu termofilních druhů patří komposty, půda, uskladněný vlhký materiál a vroucí odpadní vody z vodních elektráren.
V potravinářském průmyslu nacházejí termofilní organismy uplatnění jako součást termofilních zákysových kultur používaných při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, termofilního kyselého mléka a od něj odvozených produktů a při výrobě měkkých sýrů a tvarohů. Při výrobě jogurtů nebo kyseliny mléčné se využívá metabolismu termofilních mikroorganismů např. *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*, které dokáží fermentovat laktózu na kyselinu mléčnou. Významnou měrou přispívají termofilní mikroorganismy k tvorbě kvalitního humusu a tím zkvalitňují půdu a podílí se na zpracování bioodpadů. Další možností uplatnění termofilních mikroorganismů je při stabilizaci a hygienizaci odpadních kalů. Využívá se termofilních aerobních čistících systémů jako např. BETT proces, TAS proces, ATAD proces a další. Díky své teplotní stabilitě nachází uplatnění enzymy termofilních organismů v mnoha odvětvích, např. v textilním průmyslu, ve zdravotnictví, v molekulární biologii.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře*. 3. opravené vydání. Praha: Academia, 2002. 364 s. ISBN 80-200-1024-6.

[2] Franková, T.: *Aplikace termofilních mikroorganismů.* Brno, 2006. 40s. Bakalářská práce na Ústavu chemie potravin a biotechnologií na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Vedoucí bakalářské práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

[3] Rosypal, S. a kol.: *Nový přehled biologie.* 1. vydání. Praha: Pedagogické nakladatelství 2003. 797s. ISBN 80-7183-268-5.

[4] Sulfolobus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-15]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Sulfolobus>.

[5] Plumb, J. J., Haddad, Ch. M., Gibbon, J. A. M., Franzmann, P. D.: *Acidianus sulfidivorans* sp. nov., an extremely acidophilic, thermophilic archaeon isolated from a solfatara on Lihir Island, Papua New Guinea, and emendation of the genus description. A Journal of the Society for General Microbiology [online]. 2007, [citováno 2008-03-15]. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/57/7/1418>.

[6] Pyrodictium [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-15]. Dostupné z: <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pyrodictium>.

[7] Thermoplasma [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-15]. Dostupné z: < http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Thermoplasma>.

[8] Bakteriální spory [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-19]. Dostupné z: <http://fvl.vfu.cz/export/sites/fvl/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/pr-2.pdf>.

[9] Rod Bacillus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-21]. Dostupné z: <http://sweb.cz/kolar-jiri/jirka/detaily/charakt.htm>.

[10] Rod Bacillus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-21]. Dostupné z: <http://sweb.cz/kolar-jiri/jirka/detaily/ident.htm>.

[11] Rod Bacillus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-21]. Dostupné z: <http://sweb.cz/kolar-jiri/jirka/detaily/metabol.htm>.

[12] Nicolaus, B., Lama, L., Esposito, E., Manca, M.C., di Prisco, G,. Gambacorta, A.: ‘‘Bacillus thermoantarcticus’’ sp. nov., from Mount Melbourne Antarctica: a novel thermophilic species. *Polar Biology* [online]. 1996, [citováno 2008-03-23]. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/content/gm9pxk69fxedtn4p/>.

[13] Stearothermophilus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-25]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_stearothermophilus>.

[14] Clostridium [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-29]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium>.

[15] Clostridium thermocellum [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-29]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_thermocellum>.

[16] Freier, D., Mothershed, Ch. P., Weigel, J.: Characterization of Clostridium thermocellum JW 20. Applied and Environmental Microbiology [online]. 1988, leden [citováno 2008-04-03]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/54/1/204.pdf>.

[17] Charlton, D. B.: Studies on Lactobacillus Thermophilus. Journal of Dairy Science. [online]. [citováno 2008-04-05]. Dostupné z: <http://jds.fass.org/cgi/reprint/15/5/393.pdf>.

[18] Lactobacillus bulgaricus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-05]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_bulgaricus>.

[19] Streptococcus thermophilus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-05]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_thermophilus>.

[20] Nechushtai, R., Muster, P., Binder, A., Liveanu, V., Nelson, N.: Photosystem I reaction center from the thermophilic cyanobacterium Mastigocladus laminosus. Biochemistry [online]. 1983, březen [citováno 2008-04-05]. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/reprint/80/5/1179.pdf>.

[21] Termofilní Fungi [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-10]. Dostupné z: <http://botany.natur.cuni.cz/koukol/ekologiehub/EkoHub_2.ppt>.

[22] Brock, T. D.: *Thermofilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Dostupné z: <www: http://digicoll.library.wisc.edu/Science/ [citováno 2007-04-28].

[23] Megapodiidae [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-28]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Megapode>.

[24] Pramen Grand Prismatic [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-28]. Dostupné z: <http://www.volny.cz/dedjohn/referaty/gejz.htm>.

[25] Grand Prismatic [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-28]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Grand_Prismatic_Spring>.

[26] Thermophilic microorganisms [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-28]. Dostupné z: < http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/thermas2.jpg&imgrefurl=http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/thermo.htm&h=284&w=588&sz=23&hl=cs&start=1&um=1&tb>.

[27] Champagne Pool [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-28]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Champagne_Pool>.

[28] Island [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-05-05]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Island>.

[29] Kamčatka [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-05-05]. Dostupné z: <http://www.kamchatka2005.wz.cz/kamca.htm>.

[30] Jogurt [online], poslední revize 2004 [citováno 2008-05-05]. Dostupné z: <http://druidova.mysteria.cz/ZDRAVA_VYZIVA/JOGURT.htm>.

[31] Görner, F., Valík, L'.: *Aplikovaná mikrobiológia požívatín*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

[32] Kyselina mléčná [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-05-05]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_ml%C3%A9%C4%8Dn%C3%A1>.

[33] Dolejš, P.: *Příručka pro čištění a úpravu vod*. Přerov: KEMIFLOC,a.s., 1996. 133 s.

[34] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2. opravené vydání, Praha: Academia, 1999. 192s. ISBN 80-200-0600-1.

[35] Stovergroup, *BETT process a pilot plant* [online]. 1999, poslední revize 2005 [citováno 2008-05-15]. Dostupné z: <http://www.stovergroup.com/bett/index.htm>.

[36] Zpracování kalů [online]. 1993, poslední revize 6/2007 [citováno 2008-05-15]. Dostupné z: <http://www.asio.cz/czech/novinky.htm>.

[37] Voda [online]. 1998, poslední revize 5/2004 [citováno 2008-05-15]. Dostupné z: <http://www.e-voda.cz/voda/Voda-kveten04.pdf>.

[38] Kompost [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-05-15]. Dostupné z: <www.waste.cz/pdf/09-04/BioodpadWaste04.doc>.

[39] Extremofilní mikroorganismy [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-05-16]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/150560/prif_b/Bakalarska_prace.pdf>.

[40] Spora Clostridium [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-19]. Dostupné z: < http://www.denniskunkel.com/PublicHtml/n_StockSearchResults.asp?Category=Bacteria&ImageNumber=97184dfA&Keyword1=&Keyword2=&Keyword3=&EduSearch=Search>.

[41] Stearothermophilus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-25]. Dostupné z: <http://www.agavebio.com/Catalog/images/S-layer%20Catalog%204_img _19.jpg>.

[42] Clostridium thermocellum [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-25]. Dostupné z: <http://www.jgi.doe.gov/education/bioenergy/Clostridium_thermocellum.jpg>.

[43] Clostridium thermocellum [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-03-29]. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/content/full/69/1/124/F2>.

[44] Lactobacillus bulgaricus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-05]. Dostupné z: <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus>.

[45] Streptococcus thermophilus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-05]. Dostupné z: <http://www.unibas.it/utenti/parente/Starter/gruppi.html>.

[46] Thermomonospora curvata [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-05]. Dostupné z: <http://www.biomed.cas.cz/gim_em/data/sem2.html>.

[47] Mastigocladus laminosus [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-07]. Dostupné z: <http://galerie.sinicearasy.cz/v/Cyanobacteria/Stigonematales/Mastigocladus/Mastigocladus+laminosus.jpg.html>.

[48] Megapodius tenimberensis [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-07]. Dostupné z: <http://orientalbirdimages.org/photographers.php?p=3&action=birderimages&Bird_Image_ID=26455&Birder_ID=693&PHPSESSID=1ae>.

[49] Grand Prismatic [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-20]. Dostupné z: <http://faculty.uml.edu/nelson_eby/89.315/material.htm>.

[50] Venenivibrio stagnispumantis [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-20]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Venenivibrio_stagnispumantis>.

[51] Bacillus thermoamylovorans [online]. 2008, poslední revize 2008 [citováno 2008-04-15]. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/45/1/9.pdf>.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	Adenosintrifosfát
ADP + P_i	Adenosindifosfát + fosfátová jednotka
FUCHS ATAD proces	Aerobní termofilní stabilizace
ATAD proces	Autotermní termofilní aerobní stabilizace kalu
TAS proces	Termofilní stabilizace kalu
BETT proces	Biologicky vylepšené termofilní čištění
NAD^+, NADH + H^+	Nikotinamidadenindinukleotid a jeho redukovaná forma
Fd	Flavinadenindinukleotid