

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

Antimikrobiální aktivita bakterií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Eliška Horová

Přírodovědná studia, obor biologie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.

Plzeň 2022

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma

„Antimikrobiální aktivita bakterií“

vypracoval/a samostatně pod odborným dohledem vedoucí/vedoucího bakalářské práce za použití pramenů uvedených v příložené bibliografii.

Plzeň, dne 29. dubna 2022

.....

podpis autora/autorky

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce, Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, Ph.D. za jeho ochotu, vstřícnost, trpělivost, pochopení a odborné rady po celou dobu vedení této bakalářské práce.

Obsah

Klíčová slova	7
Seznam zkratk	8
Úvod.....	9
1 Mikroorganismy	10
1.1 Obecná charakteristika bakterií	10
1.1.1 Bakteriální kolonie	11
1.2 Obecná charakteristika bakteriální buňky	11
1.2.1 Struktura bakteriální buňky	11
1.2.2 Tvar bakteriální buňky	13
2 Přírodní produkty	14
2.1 Přírodní produkty jako léčiva	14
2.2 Strategie a metodiky pro objevování přírodních produktů	16
2.2.1 Prvních 30 let (1940-1970): fenotypový screening.....	17
2.2.2 Druhých 30 let (1970-2000): přístupy založené na znalostech	17
2.2.3 Od roku 2000: přístupy založené na genomice	18
3 Antibiotika	19
3.1 Dělení ATB dle intenzity jejich účinku	20
3.2 Základní klasifikace antibiotik	20
3.3 Dělení ATB dle mechanismu jejich účinku.....	21
3.3.1 Antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny	21
3.3.2 Antibiotika inhibující syntézu bílkovin.....	21
3.3.3 Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin	22
3.3.4 Antibiotika narušující cytoplazmatickou membránu	22
3.4 Objev antibiotik	22

3.5	Proč mikroorganismy vyrábí antibiotika?	24
3.6	Bakteriální rezistence	24
4	Antimikrobiální aktivita bakterií	26
4.1	Bakteriální kompetice	26
4.1.1	Nekontaktní bakteriální kompetice	27
4.1.2	Kontaktní bakteriální kompetice	29
4.2	Predace	30
4.3	Antimikrobiální aktivita v různých prostředích	31
4.3.1	Mořské prostředí	31
4.3.2	Půdní prostředí	32
4.3.3	Prostředí organismů	33
4.3.4	Netopýr jakožto hostitel	33
4.3.5	Patogeny netopýrů	34
5	Laboratorní metody	36
5.1	Kultivace bakterií	36
5.1.1	Tekutá média	36
5.1.2	Pevná média	36
5.2	Izolace DNA	37
5.2.1	Izolace DNA za pomoci magnetických částic	37
5.3	Sekvenování	38
5.4	PCR	39
5.4.1	Postup PCR	41
6	Praktická část	42
6.1	Netopýří kolonie na hradu Točnick	42
6.1.1	Netopýr velký	42
6.2	Materiál a metody	42

6.2.1	Kultivace získaných bakterií	43
6.2.2	Kompetice získaných bakterií	43
6.3	Izolace DNA	44
6.3.1	Postup fenol-chloroformové extrakce:	44
6.3.2	Postup izolace DNA za pomoci magnetických částic:	45
6.4	Identifikace	46
6.5	Sekvenování.....	46
6.6	Izolace produkované antimikrobiální látky	47
6.7	Výsledky	47
6.8	Diskuse	55
6.8.1	Konkurenční interakce	56
6.8.2	Produkované látky – antibiotika.....	57
6.8.3	Prostředí získaných bakterií	58
6.8.4	Určení Z1 do rodu <i>Pantoea</i>	59
6.8.5	Baktericidní a jiné vlastnosti rodu <i>Pantoea</i>	59
6.8.6	Ostatní bakterie použité pro kompetici	61
6.8.7	Budoucí výzkum	62
	Závěr.....	63
	Resumé	65
	Summary	66
	Seznam použitých zdrojů.....	67
	Seznam internetových zdrojů.....	76
	Seznam tabulek.....	77
	Seznam obrázků	78

Klíčová slova

Bakterie, bakteriální kompetice, nové antibiotikum, *Pantoea*, netopýr velký

Seznam zkratek

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

RNA – Ribonukleová kyselina

m-RNA – messengerová RNA

t-RNA – transferová RNA

r-RNA – ribosomální RNA

NP – přírodní produkty

SMGC – Genový klastr – 2.2.3

ATB – antibiotika

SM – specializované metabolity

EV – extracelulární vezikuly

CDI – Contact-dependent Inhibition

HMAS – High Microbial Abundance Sponge

NGS – Next Generation Sequencing

PCR – polymerázová řetězová reakce

dNTP – deoxynukleotidtrifosfáty

ATP – adenintrifosfát

TTP – thymintrifosfát

GTP – guanintrifosfát

CTP – cytosintrifosfát

LB – Luria/Miller

Úvod

Bakterie jsou na naší planetě přítomny ve všech jejích prostředích včetně těch extrémních, které jsou pro ostatní organismy neobyvatelné. Bakterie lze tedy běžně nalézt ve vodě, v půdě, ve vzduchu či na povrchu nebo uvnitř organismů. Svou činností přispívají do koloběhu přírody, a to především přeměnou organických látek na látky anorganické.

Antimikrobiální aktivitu bakterií lze definovat jako souhrnný pojem pro všechny účinné látky či způsoby, které inhibují růst bakterií, zabraňují tvorbě mikrobiálních kolonií, a které mohou obecně mikroorganismy ničit [13]. Látky produkované bakteriemi jsou chemicky a biologicky rozmanité a mimo jiné našly své využití také v humánní medicíně. Tyto produkty nazýváme speciální metabolity souhrnně označované za přírodní produkty, mezi které řadíme například antibiotika. Kompetice bakterií, ať už kontaktní či vedená na dálku, je přirozeným chováním, během kterého bakterie využívají konkurenční mechanismy pro rozšíření pole živin a obývaného prostoru

Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část.

Teoretická část mé práce je rozdělena do 5 hlavních témat. První se zabývá stručnou a obecnou charakteristikou bakterií a strukturou či tvarem bakteriálních buněk. Druhým uvedeným tématem jsou přírodní produkty, jejich objev a využití v podobě léčiva. Na přírodní produkty navazuje třetí téma, ve kterém jsou popsána antibiotika od jejich objevu, důvodu produkce až po jejich negativní dopad v podobě bakteriální rezistence. Čtvrtým a zároveň hlavním tématem mé práce je shrnutí různých podob antimikrobiální aktivity včetně výčtu těchto aktivit v různých prostředích. Pátým tématem je souhrn a popis laboratorních metod, které byly během mého výzkumu využity.

Praktická část objasňuje izolaci, identifikaci a antimikrobiální schopnosti neznámého bakteriálního druhu z netopýří trusu, který byl odebrán v blízkosti hradu Točnick. Následně je zahrnuta samotná izolace DNA za pomoci fenol-chloroformové extrakce a magnetických částic, identifikace za využití primerů amplifikujících DNA, sekvenování neznámého bakteriálního druhu sekvenátorem Illumina a v neposlední řadě izolace produkované antimikrobiální látky. Zjištěné výsledky a navazující diskuse o dané problematice uzavírají celou praktickou část.

1 Mikroorganismy

Dle Němce a Matoulkové (2015) jsou mikroorganismy jednobuněčná individua, která jsou schopná samostatné existence i rozmnožování. Dělíme je na dvě základní skupiny. První z nich jsou prokaryotické organismy, které ještě nemají diferencované jádro. Řadíme mezi ně bakterie, cyanobakterie a archea. Druhým typem jsou eukaryotické organismy s jádrem již diferencovaným. Do této skupiny řadíme prvoky, zelené řasy a houby. Mezi mikroorganismy mohou být zařazeny i viry, které ale nespĺňují charakteristiku organismu z hlediska autoreprodukce.

1.1 Obecná charakteristika bakterií

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotní organismy, které jsou všudypřítomné, a které řadíme mezi jedny z nejstarších organismů vyskytující se na Zemi. Přibližný počet bakterií se pohybuje mezi 300 000 až 1 milionem druhů. Popsán je ale zatím pouze zlomek z celkového počtu. Způsob jejich výživy je heterotrofní i autotrofní. Na povrchu jsou bakterie ohraničeny cytoplazmatickou membránou, nad kterou se nachází pevná buněčná stěna udržující stálý tvar buňky. Z celkové bakteriální struktury se považuje 96,5 % sušiny bakterie za makromolekuly, mezi které se řadí bílkoviny, nukleové kyseliny, polysacharidy i lipidy. S okolním prostředím interagují za pomoci struktur pro přilnutí k hostiteli, pohyb, přenos genetické informace a za pomoci čidel ukazujících na stav vnějšího prostředí. Bakterie se mohou shlukovat do tzv. populací buněk, které v laboratořích rostou na živných půdách. Tyto shluky se označují jako bakteriální kultury (Bednář et al. 1996; Rosypal et al. 1981; Schindler 2014).

Bakteriální buňka roste, pokud se nachází v prostředí, které je pro ni vhodné z hlediska chemických i fyzikálních podmínek. Buňka přijímá ze svého okolí energii a živiny, které následně využívá k syntéze sama sebe, tedy svých buněčných komponentů. Po dosažení potřebné velikosti dojde k příčnému neboli binárnímu dělení, což je typ nepohlavního rozmnožování, za vzniku dceřiných buněk. Některé bakterie využívají jiné typy rozmnožování, například pučení, hormogonie, baeocyty aj. Pokud probíhá růst a dělení opakovaně po delší dobu, vzniká z jedné bakteriální buňky kultura bakterií neboli kolonie [1].

1.1.1 Bakteriální kolonie

Bakteriální kolonie jsou ve své podstatě tvořeny shluky miliard jednotlivých buněk, které spolu v rámci kolonie komunikují a vzájemně na sebe působí. Vytvořené shluky, tedy kolonie, jsou pro bakteriální buňky výhodnější nežli samostatná existence, protože jsou více chráněny před vysycháním, predací či náhlými změnami prostředí. Hlavním rysem koloniálního vývoje je buněčná odlišnost neboli, že se veškeré buňky v kolonii nenachází ve stejném stavu. Buňky provádí expresi svého genu, což je vede k tomu, aby se v kolonii rozdělili do různých rolí, které se odvíjí od postavení jednotlivých buněk v kolonii. Zároveň se předpokládá určité prostorové rozpoložení růstu. Z počátku se kolonie šíří směrem ven ze svého středu, a to všemi směry stejně. V průběhu času, kdy dochází k postupné spotřebě živin, se začínají na médiu objevovat oblasti vyčerpání. Ve výsledku dojde k situaci, kdy jsou oblasti vyčerpání tak velké, že živiny již není možné přijímat a kolonie začne ve svém středu postupně odumírat. Růst pak pokračuje pouze na vnějším okraji kolonie, kde je ještě dostatečné množství živin (Pipe a Grimson 2008).

1.2 Obecná charakteristika bakteriální buňky

1.2.1 Struktura bakteriální buňky

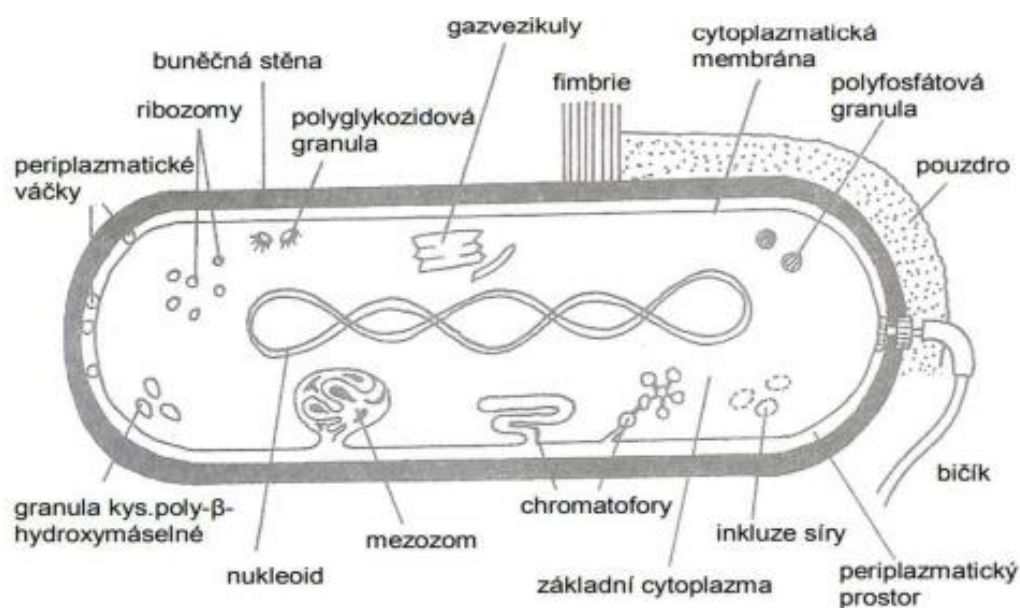
Bakteriální buňka obsahuje na základě Bednáře et al. (1996) kromě svých 4 základních struktur, kterými jsou jádro, ribosomy, cytoplazmatická membrána a buněčná stěna, také rozpustnou cytoplasmu. Veškeré struktury, které se v bakteriální buňce nachází (obr. 1.), dělí Rosypal et al. (1981) do dvou hlavních skupin:

- a) Vnitřní struktury, mezi které patří: nukleoid, ribozómy, cytoplazma, plazmidy a inkluze,
- b) Struktury tvořící povrch buňky zahrnující: cytoplazmatickou membránu, buněčnou stěnu, pouzdro neboli glykokalyx, bičíky, fimbrie, chromatofory a mesozómy.

Němec a Matoulková (2015) dále rozřazují tyto struktury na esenciální, tedy ty, které jsou přítomny u všech skupin bakterií a neesenciální, které se vyskytují pouze u některých skupin.

- a) Esenciální struktury – cytoplazmatická membrána, nukleoid, cytoplazma, ribozomy,
- b) Neesenciální struktury – pouzdro, bičíky, fimbrie, chromatofory, mesozomy, inkluze.

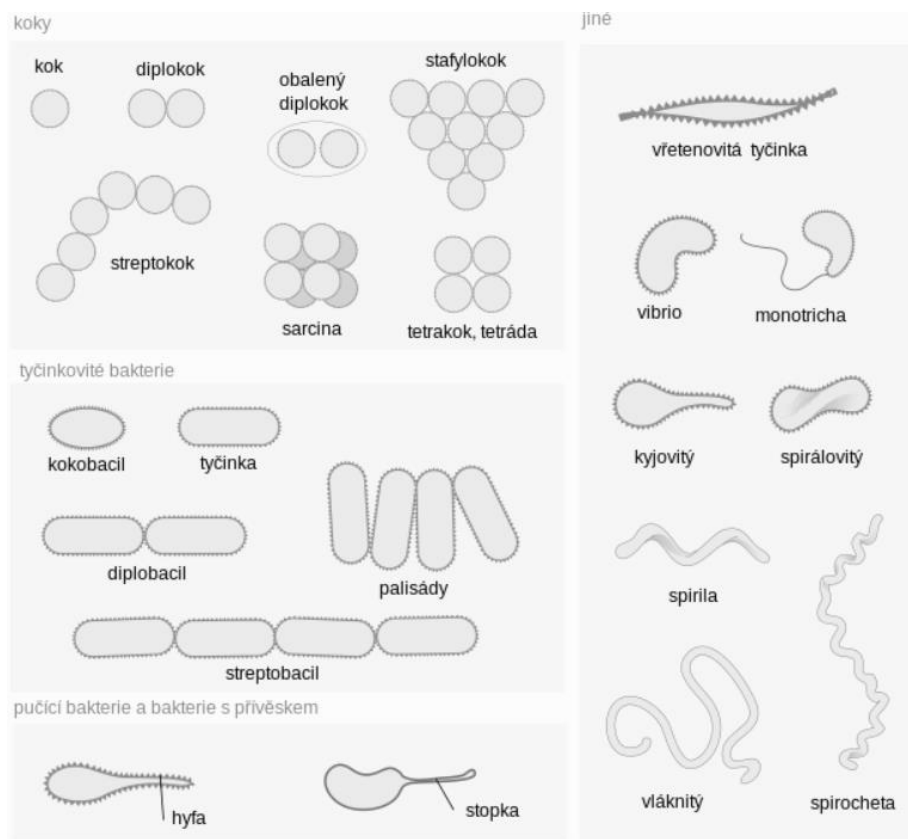
Na základě Němce a Matoulkové (2015) se bakteriální buňka liší od buňky rostlinné či živočišné svou velikostí, která se pohybuje v rozmezí μm , zatímco buňka eukaryot disponuje velikostí až desítek μm . Variabilita rozmezí velikostí bakteriálních buněk je rozmanitá v závislosti na druhové příslušnosti, fyziologickém stavu a vnějším prostředí.



Obr. 1. Struktura bakteriální buňky. Převzato z Němce a Matoulkové (2015).

1.2.2 Tvar bakteriální buňky

Tvar bakteriální buňky je základním taxonomickým znakem (Němec a Matoulková 2015). Možné formy tvaru bakteriální buňky jsou uvedeny níže na obr. 2.



Obr. 2. Tvary bakteriálních buněk. Převzato z [11].

2 Přírodní produkty

Přírodní produkty (NP) představují velkou skupinu rozmanitých chemických látek s širokou škálou biologických aktivit, které byly mnohostranně využity zejména v humánní a veterinární medicíně. Bakteriální přírodní produkty jsou označovány za produkty sekundárního metabolismu neboli jako molekuly, které nejsou nezbytné pro přežití hostitele, ale které mu spíše poskytují určitou výhodu v jeho přirozeném prostředí. Přírodní makromolekuly jako jsou například DNA, RNA nebo bílkoviny, jejich stavební kameny a prekurzory, stejně jako meziproducty primárního metabolismu, jsou z pracovní definice přírodních produktů obvykle vyloučeny (Katz a Baltz 2016; Newman a Cragg 2012).

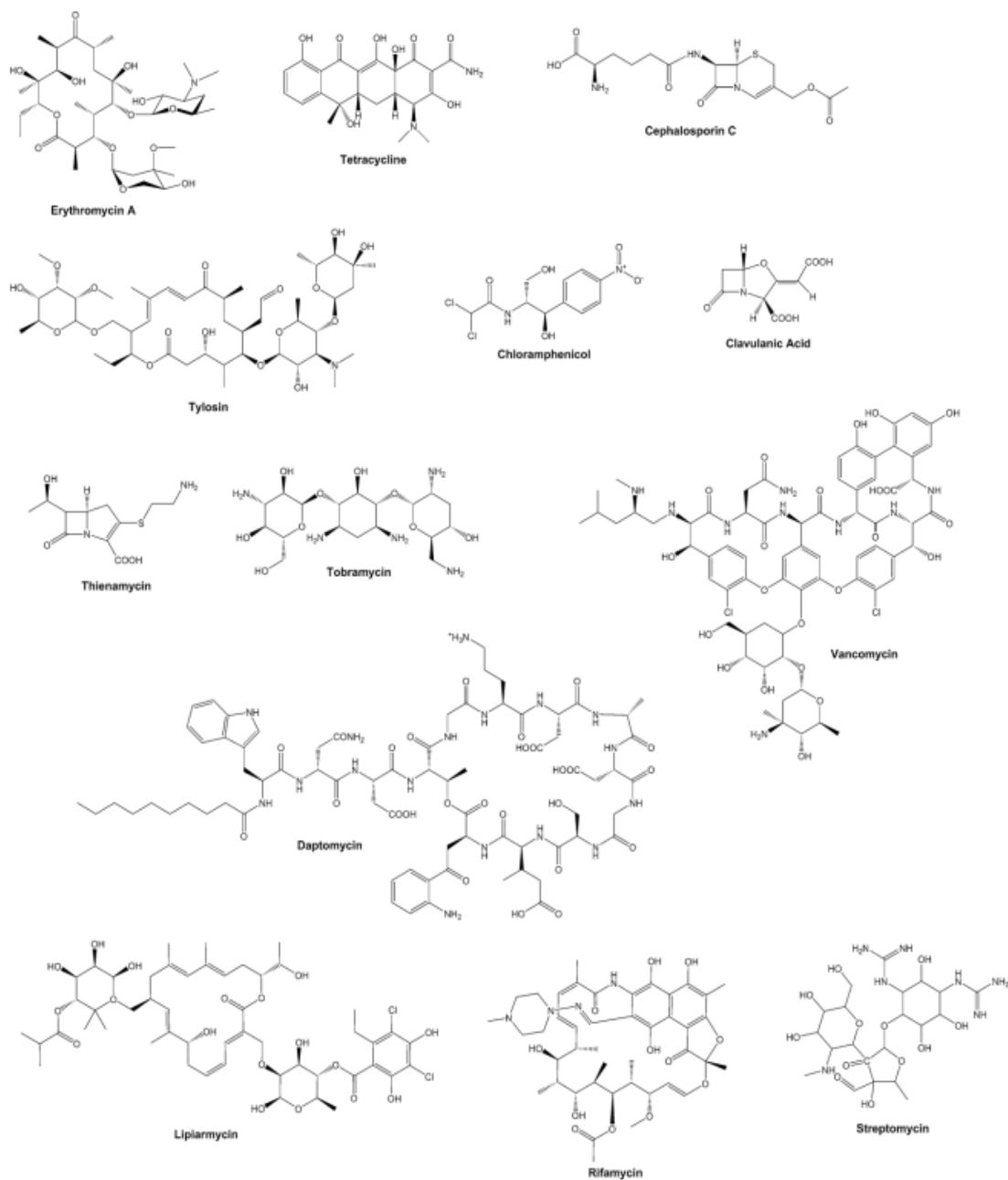
Přírodní produkty byly objeveny na základě zjištění, že se jedná o důležité a využitelné látky, mezi které patří například herbicidy, insekticidy aj. Od objevu penicilinu před více než 75 lety bylo charakterizováno >23 000 přírodních produktů, z nichž velká většina je produkována bakteriemi z čeledi Actinomycetaceae. Po objevu streptomycinu Selmanem Waksmanem a jeho spolupracovníky na Rutgersově univerzitě ve 40. letech 20. století, začaly velké snahy o objevení přírodních produktů samotnými farmaceutickými společnostmi, především ve Spojených státech, Evropě a Japonsku. Vědce zabývající se přírodními produkty fascinuje chemická rozmanitost a složitost přírodních produktů, jejíž příklady jsou uvedeny na obr. 3. (Bérdy 2012; Katz a Baltz 2016).

Historie objevování přírodních produktů je rozdělena do tří na sebe navazujících období: 40.-70. léta 20. století, 70.-90. léta 20. století a období po roku 2000. V těchto letech došlo k významnému pokroku, který ovlivnil strategie používané k objevování nových přírodních produktů (Katz a Baltz 2016).

2.1 Přírodní produkty jako léčiva

Od roku 2013 bylo americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv schváleno více než 1450 nových chemických látek, z nichž asi 40 % tvoří přírodní produkty nebo látky z nich odvozené (deriváty přírodních produktů, syntetické sloučeniny založené na přírodních sloučeninách apod.). Nejvýznamnější lékařské využití přírodních produktů je

v oblasti antibakteriální terapie. Přírodní produkty a jejich syntetické deriváty druhé a třetí generace se stále využívají k léčbě bakteriálních infekcí u lidí a zvířat způsobených grampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Látky uvedené v obr. 3. jako azithromycin nebo clarithromycin, oba polosyntetické deriváty erytromycinu; doxycyklin; tetracyklin; amoxicilin, polosyntetický derivát penicilinu a cephalexin, derivát cephalosporinu C se běžně využívají k ambulantní léčbě bakteriálních kožních nebo respiračních onemocnění. Tylosin a jeho polosyntetický derivát tilmikosin se používají k léčbě bakteriálních infekcí u zvířat. Antibakteriální látky podobné erytromycinu nebo tylosinu působí jako inhibitory tak, že se naváží na ribozomální podjednotku 50S a blokují translaci vznikajícího polypeptidového řetězce. Tetracyklin rovněž blokuje translaci vazbou na 50S ribozomální podjednotku. Chloramfenikol, třetí látka vázající ribozomy, je velmi účinná proti gramnegativním bakteriím, ale kvůli vzácným vedlejším účinkům se již klinicky nepoužívá. Kyselina klavulanová je kombinována s polosyntetickým analogem penicilínu amoxicilinem ve sloučenině zvané Augmentin pro použití vůči patogenům rezistentních na penicilin. Vankomycin a teikoplanin se používají u grampozitivních infekcí. Daptomycin se využívá u obtížně léčitelných grampozitivních infekcí, včetně methicilin rezistentního *Staphylococcus aureus*. Thienamycin se naopak využívá k léčbě gramnegativních bakteriálních onemocnění. Tobramycin se rovněž využívá u hospitalizovaných pacientů přenášejících gramnegativní infekce. Lipiarmycin je účinný například vůči *Clostridium difficile*, původce těžké kolitidy a průjmů. Rifampicin, polosyntetický analog rifamycinu, se používá se v kombinaci s dalšími látkami, včetně streptomycinu, k léčbě tuberkulózy (Demain 2014; Katz a Baltz 2016).



Obr. 3. Chemická struktura antibakteriálních přírodních produktů (Katz a Baltz 2016).

2.2 Strategie a metodiky pro objevování přírodních produktů

Během posledních sedmi desetiletí procházelo objevování přírodních produktů procesem vývoje. Strategie byly relativně během prvních 30 let jednoduché, pak se staly rozmanitějšími a složitějšími, což bylo ještě v následujících dvou desetiletích umocněno díky vědeckému a technologickému pokroku. V novější době otevřelo levné

sekvenování mikrobiálního genomu zcela nové strategie pro objevování nových přírodních produktů (Katz a Baltz 2016).

2.2.1 Prvních 30 let (1940-1970): fenotypový screening

Systematický screening aktinomycet získaných z půdy Waksmanovou skupinou ve 40. letech 20. století, který vedl k objevu aktinomycinu, streptothricinu a především streptomycinu, přiměl farmaceutické společnosti zahájit screening extraktů aktinomycet proti patogenním bakteriím. Tento proces vyžadoval získání mikroorganismů, fermentaci, izolaci produktů a testování fermentačních bujónů a purifikovaných sloučenin proti testovaným organismům. Pro testování používaly společnosti biotesty pro fenotypový screening. Obecně fenotypový screening využívá buněčnou linii a metodu ke stanovení reakce na použitou testovanou sloučeninu, aniž by byl předem znám mechanismus jejího účinku. Nejjednodušším odečtem je pak inhibice nebo samotná smrt buňky, čímž se během prvních 30 let identifikovalo více než 1000 přírodních produktů, které měly antibakteriální aktivitu. Rané protinádorové léky byly také odhaleny ve fenotypovém screeningu pomocí stabilních linií nádorových buněk kultivovaných nejprve na experimentálních zvířecích modelech a později in vitro (Katz a Baltz 2016).

2.2.2 Druhých 30 let (1970-2000): přístupy založené na znalostech

V tomto období se začaly hledat nové zdroje přírodních produktů. Charakteristickým znakem druhého třicetiletého období bylo velké rozšíření metodik a strategií screeningu. Pokroky v oblasti rekombinantní DNA a dalších technologií umožnily výzkumným pracovníkům rychle stanovit mechanismus účinku přírodních produktů, jejich polosyntetických analogů a syntetických sloučenin a rychle vedly k vývoji biochemických nebo celobuněčných testů, souhrnně známých jako screening založený na cíli. Při fenotypových screenech není způsob účinku (tj. molekulární cíl) testované sloučeniny znám nebo se nanejvýš předpokládá. Naproti tomu cílový screening je založen na předpokladu nebo ověřeném poznatku, že interakce testované sloučeniny s určeným cílem (obvykle enzymem, enzymovým komplexem nebo receptorem) povede k požadovanému farmakologickému účinku. Fenotypový screening vzorků na

přítomnost přírodních produktů pokračoval i v 70. a 80. letech. Kromě toho byly pro objevování nových přírodních produktů hledány nové zdroje mimo půdy. Mezi ně patřilo zejména mořské prostředí, ve kterém se kladl důraz na objevování nových protirakovinných sloučenin. Počet celosvětově podaných patentů přesáhl 1300 (Katz a Baltz 2016; Ang et al. 2015).

2.2.3 Od roku 2000: přístupy založené na genomice

Na počátku roku 2000 odhalily první dvě sekvenace genomu *Streptomyces* kódování mnohem více genových klastrů speciálních metabolitů (SMGC), než se předpokládalo. Toto pozorování bylo následně použito na aktinomycety. Mezi aktinomycetami se počet SMGC značně liší, jedinci s rozsáhlými genomy bývají totiž více „nadaní“. V dnešní době je možné sekvenovat 10 000 až 100 000 genomů aktinomycet ve skupinách a identifikovat stále nové SMGC. Dobrým příkladem je *Streptomyces rapamycinicus*, který má 12,7 Mb genomu, přičemž 3,0 Mb (24 %) je věnováno biosyntéze 48 SMGC. Výzkumy mezi půdními izoláty také odhalily vysokou frekvenci biosyntetických klastrů přírodních produktů stejně jako přítomnost antibiotických resistomů (neboli více genů pro rezistenci k antibiotikům). Díky méně nákladnému sekvenování genomů, pokroku v pochopení biosyntézy speciálních metabolitů a pokrokům v biologických metodách je nyní možné určit částečné struktury nových speciálních metabolitů nebo z nich odvozených látek pomocí sekvenací DNA (Katz a Baltz 2016; Baltz 2008; Bentley et al. 2002).

Katz a Baltz (2016) se domnívají, že v příštích letech budou pro objev nových přírodních produktů klíčové tři hlavní prvky, a to zejména levné sekvenování genomu a s tím spojený objev genomů kódujících mnoho nových speciálních metabolitů; rozšíření odběru vzorků z doposud neprozkoumané půdy a využití nových mikrobů pro vytěžování genomů; pokrok ve strukturní biologii a funkční inženýrské analýze pro budoucí aplikace biosyntézy.

3 Antibiotika

Antibiotika jsou látky, které jsou produkovány živými organismy. Jejich cílem je narušit životní funkce a struktury mikroorganismů či působit toxicky proti živočišným a rostlinným buňkám. V největší míře jsou produkovány samotnými mikroorganismy – bakteriemi. Příkladem jsou *Escherichia coli*, která produkuje antibiotikum kolicin, *Bacillus megaterium* produkující megacin nebo *Pseudomonas aeruginosa*, který produkuje pyocin. Za hlavní producenty antibiotik se ale považují zejména příslušníci rodu *Streptomyces* nebo vláknité bakterie aktinomycety. Tyto druhy produkují velké množství chemicky rozmanitých látek od streptomycinu, neomycinu, tetracyklinu, aktinomycinu až po chloramfenikol. Z tzv. plísňových antibiotik mají značný význam zejména peniciliny, které produkuje druh *Penicillium chrysogenum* (Dobrovolná 2010; Rosypal et al. 1981; Spížek 2016).

Medicína dříve rozlišovala dva druhy odlišných antibakteriálních léčiv – samotná antibiotika a chemoterapeutika. Ve své podstatě se tyto léky nijak dramaticky nelišily, jediný rozdíl, který definoval jejich odlišnost byl způsob produkce. Za antibiotikum se původně označovala látka produkováná samotnými živými organismy. Chemoterapeutikum pak byla látka synteticky neboli uměle připravená. V dnešní době už toto rozdělení není platné, protože se většina dnešních antibiotik připravuje a vyrábí rovněž synteticky či jsou tyto látky deriváty původních přírodních produktů (Dobrovolná 2010).

Účinek antibiotik se projevuje již při malých koncentracích a je specificky zaměřený. Selektivita je velmi důležitým prvkem při působení antibiotika, protože tak může dojít k účinku pouze vůči určitému druhu nepřátelského mikroorganismu a jeho zabití, aniž by došlo k poškození napadeného organismu. Při působení antibiotika dochází k zasažení určitého citlivého a životně důležitého systému bakteriální buňky, jehož následkem je například narušení jejích metabolických reakcí. Antibiotika mají tedy specifický účinek v inhibici metabolických pochodů buňky nebo mohou narušovat syntézu její buněčné stěny (popřípadě i nukleových kyselin a bílkovin), funkce cytoplazmatické membrány, procesy fosforylace aj. (Dobrovolná 2010; Němec a Matoulková 2015; Rosypal et al. 1981).

Rezistentní kmeny jsou vůči působení antibiotik imunní. To je způsobeno zejména jejich nesprávným užíváním a nedodržováním zásad jejich využití. Mezi hlavní zásady využívání antibiotik patří jejich správná volba, optimální doba léčby, adekvátní dávkování a vhodná kombinace s ostatními léčivy. Pokud dojde ke styku antibiotika s rezistentní buňkou, antibiotikum může být neúčinné z důvodu nepřítomnosti napadnutelné citlivé struktury v cílové buňce nebo z důvodu změny strategie buňky, která zvolí alternativní metabolickou dráhu, kterou nemůže dané antibiotikum zasáhnout. Bakterie mohou zničit antibiotickou látku působením svých enzymů, které například zabrání proniknutí antibiotika do vnitřních částí bakteriální buňky (Dobrovolná 2010; Němec a Matoulková 2015; Rosypal et al. 1981).

3.1 Dělení ATB dle intenzity jejich účinku

Narušení mikroorganismu vede buďto k zastavení růstu buňky a jejího množení, v tomto případě nazýváme antibiotika jako bakteriostatická, nebo dokonce až k její smrti, kdy jsou tyto typy antibiotik označovány za baktericidní (Dobrovolná 2010; Němec a Matoulková 2015).

- a) Mezi bakteriostatická antibiotika řadíme: makrolidy, tetracykliny, sulfonamidy, chloramfenikol, linkomycin, klindamycin aj.,
- b) Mezi baktericidní antibiotika řadíme: betalaktamová ATB, monobaktamy, karbapenemy, peniciliny, cefalosporiny, aminoglykozidy aj.

3.2 Základní klasifikace antibiotik

Antibiotické látky jsou charakteristické odlišnou chemickou strukturou. Jejich pole působení je zúženo pouze na několik míst bakteriální buňky a jsou různě odolné vůči štěpení enzymy. Antibiotika dělíme do menších skupin, které jsou rozděleny dle jejich chemické struktury, spektra účinku, dle cílového druhu a dalších farmakologických vlastností. Rovněž je důležitým měřítkem i mechanismus účinku antibiotik. Základní složky jejich molekul tvoří aminokyseliny, cukry a jejich deriváty a steroidní skelet. Díky odlišné chemické struktuře můžeme antibiotika dělit na betalaktamová, amfenikolová, tetracyklinová, aminoglykosidová, makrolidová, linkosamidová,

glykopeptidová, polypeptidová a skupinu ostatních (Bednář et al. 1996; Dobrovolná 2010).

3.3 Dělení ATB dle mechanismu jejich účinku

Dle Schindlera (2014) jsou ATB děleny dle mechanismu účinku, kterým bakteriální buňku ovlivňují a působí na ni, následovně:

- a) Inhibující syntézu buněčné stěny,
- b) Inhibující syntézu bílkovin,
- c) Inhibující syntézu nukleových kyselin,
- d) Narušující cytoplazmatickou membránu.

3.3.1 Antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny

Syntézu buněčné stěny ovlivňují 2 hlavní skupiny antibiotik – β -laktamy (penicilin, cefalosporiny, manobaktamy, karbapenemy) a glykopeptidy. Enzymy syntetizující peptidoglykan pro buněčnou stěnu jsou schopny reagovat na β -laktamy či jiná antibiotika této skupiny jejich navázáním, čímž dojde k narušení jejich funkce způsobem jejich inhibice. Buňky poté nejsou schopny tvořit buněčnou stěnu a rovněž ztrácí schopnost její obnovy čímž dojde k jejich smrti (Dobrovolná 2010; Schindler 2014).

3.3.2 Antibiotika inhibující syntézu bílkovin

Syntéza bílkovin probíhá na různých místech povrchu ribozomu, tomu odpovídá i variabilita míst zásahu antibiotik. Mezi antibiotika, která ovlivňují syntézu bílkovin patří zejména tetracykliny, makrolidy, aminoglykosidy, linkosamidy, diterpeny, amfenikoly aj. Antibiotika, která způsobují inhibici proteosyntézy ovlivňují molekuly m-RNA přenášející informaci nebo t-RNA, které připojuje aminokyseliny do polypeptidového řetězce. Jelikož je tvorba proteinů jednou ze základních podmínek života, všechna tato antibiotika řadíme mezi baktericidní (Dobrovolná 2010; Schindler 2014).

3.3.3 Antibiotika inhibující syntézu nukleových kyselin

Syntézu nukleových kyselin ovlivňují antibiotika rozdělená dle mechanismu jejich účinku – na inhibitory RNA polymerázy, kterým je ansamycin a inhibitory DNA-gyrázy, mezi které patří aminoglykosid, chinolon a novobiocin. RNA-polymeráza je ovlivněna buďto přímou nebo nepřímou inhibicí. Přímá inhibice probíhá vlivem účinku antibiotika rifamycinu, který inhibuje začáteční fáze transkripce. Nepřímá inhibice probíhá vlivem aktinomycinu, který se naváže na DNA dvoušroubovici, a znemožní tak její využití pro biosyntézu RNA. DNA-gyráza je ovlivněna antibiotikem chinolonem, který ji inhibuje. V důsledku toho dojde k rozvinutí dvoušroubovice, která ztrácí svoji funkčnost a je nepoužitelnou (Dobrovolná 2010; Schindler 2014).

3.3.4 Antibiotika narušující cytoplazmatickou membránu

Za narušení cytoplazmatické membrány jsou zodpovědná antibiotika polymyxin, azol, polyen, amfotericin a ionofor. Tyto antibiotika způsobují poškození struktury cytoplazmatické membrány, kdy začne vnitřní cytoplasma unikat do okolního prostředí buňky, u které dojde později ke smrti (Dobrovolná 2010; Schindler 2014).

3.4 Objev antibiotik

Použití prvních antibiotik, a tedy i bakteriálních mikroorganismů, které je produkují, sahá 2000 let zpět do Číny, Egypta a Řecka v podobě tradiční kaše z plesnivého chleba, která se využívala k léčbě otevřených ran. Prvním oficiálním objeveným záznamem je papyrus z roku 1550 př. n. l., který představuje nejstarší dochovaný lékařský dokument, ve kterém je zaznamenáno využití plesnivého chleba se zeminou. Další záznam pochází z doby před 1000 lety v podobě anglosaského receptu, u kterého byl prokázán účinek proti *Staphylococcus aureus* (Hutchings et al. 2019).

Vývoj prvního léčiva, které se podobalo antibiotiku, se připisuje Paulu Ehrlichovi, který přibližně před 100 lety vyvinul syntetický lék Salvarsan na bázi arsenu působící proti bakterii *Treponema pallidum*, původce sifilitidy. Salvarsan byl nahrazen prvním účinným širokospektrým antibiotikem, sulfonamidovým léčivem Prontosil, který objevil bakteriolog Gerhard Domagk v návaznosti na práci Paula Ehrliche. Dle jeho koncepce

pracovali a vyvíjeli další typy léků řady vědců, až do doby Alexandra Fleminga, který objevil penicilin produkovaný plísní *Penicillium notatum*. Toto první antibiotikum na světě bylo proti mnoha infekčním onemocněním do značné míry neúčinné, protože penicilin působí pouze na grampozitivní bakterie. Za objev penicilinu později obdržel Alexander Fleming Nobelovu cenu. Látka penicilin byla následně upravován dalšími osobnostmi, mezi kterými byli například Howard Florey či Ernst Chain, společně s jejich kolegy z Oxfordu, až do podoby účinného léčiva. Antibióza mezi mikroby ale byla popsána dávno před objevem penicilinu, mimo jiné také Louisem Pasteurem, který přišel s myšlenkou, že mikrobi mohou vylučovat materiál zabíjející jiné mikroby (Dobrovolná 2010; Hutchings et al. 2019; Spagnolo et al. 2021).

Na přelomu 20. a 21. století se objevily první zprávy o bakteriální produkci tepelně stabilních sloučenin, které byly následně zkoumány pro užitečnost v boji proti infekčním onemocněním. Pravděpodobně první klinické použití antibiotik bylo zaznamenáno v 90. letech 19. století, kdy byl využit extrakt z *Pseudomonas aeruginosa*. Četné zprávy o produkci antimikrobiálních sloučenin mikroorganismy vedly Selmana Waksmana k tomu, že založil výzkumnou skupinu věnující se systematickému studiu mikrobů jakožto producentů. Waksman následně definoval antibiotikum jako „sloučeninu vytvářenou mikrobem k ničení jiných mikrobů“ a zasloužil se o identifikaci vláknitých aktinomycet žijících v půdě jako plodných producentů antimikrobiálních sloučenin. Waksman objevil řadu antibiotik, včetně neomycinu a streptomycinu, první látky účinné proti tuberkulóze. Waksmanova práce také identifikovala rod *Streptomyces* jakožto plodné producenty přírodních produktů v podobě sekundárních, dnes už speciálních metabolitů neboli sloučenin, které nejsou potřebné pro normální růst, vývoj nebo reprodukci organismů v laboratoři. Mnoho streptomycetových sekundárních metabolitů je účinných proti bakteriím, houbám, virům, nematodám a hmyzu, ale byly také vyvinuty jako protinádorová a imunosupresivní léčiva. Zlatý věk objevování antibiotik probíhal od 40. do 60. let 20. století. Většina tehdy objevených antibiotik se stále klinicky používá nebo jsou syntetizovány jejich deriváty. Jejich účinnost ale poklesla v důsledku nárustu bakteriální rezistence (Hutchings et al. 2019).

3.5 Proč mikroorganismy vyrábí antibiotika?

Bylo navrženo několik teorií, které vysvětlují, proč mikroby vytvářejí tolik bioaktivních speciálních metabolitů (antibiotik). Antibiotika jsou součástí mikrobiálního světa miliony let a nejpravděpodobnějším vysvětlením jejich přítomnosti je, že mají tyto látky hned několik funkcí – působí jako chemické zbraně k ničení konkurentů, a to buď způsobem ochranným (obranným) nebo predátorským (útočným) a zprostředkovávají interakce s eukaryotickými hostiteli, jako je například hmyz nebo rostliny či mezi mikroby navzájem. Jeden z překvapivých objevů, které přineslo sekvenování mikrobiálních genomů je, že mnohé bakterie a houby kódují mnohem více sekundárních metabolických drah, než kolik jich ve skutečnosti vytvářejí v laboratoři. Obecně tedy platí, že nejméně tři čtvrtiny jejich potencionálních schopností, co se sekundárních drah týče, nejsou in vitro aktivní. Produkci těchto sloučenin tedy pravděpodobně spouštějí environmentální signály nebo hostitelské organismy. Mnoho bezobratlých živočichů, včetně hmyzu a mořských hub, vytváří s bakteriemi produkujícími antibiotika obranné a vzájemně prospěšné symbiózy, tzv. obranné mutualismy, a pravděpodobně podobné vztahy vytváří i celá řada suchozemských rostlin (Hutchings et al. 2019; Spagnolo et al. 2021).

3.6 Bakteriální rezistence

Bakteriální rezistence je v humánní a veterinární medicíně považována za stále větší problém. Bakterie rezistentní vůči antimikrobiálním látkám byly zaznamenány i bez antibiotické terapie, například u volně žijících zvířat a hmyzu. Ve volném prostředí se rezistentní bakterie primárně vyskytují v důsledku nesprávného využití antibiotik člověkem, popřípadě zvířaty (Mühldorfer 2012).

Rezistence vůči antibiotikům je nyní dobře známá jako hlavní problém při léčbě infekčních onemocnění. Rezistence může být aktivní, tj. výsledek specifického evolučního tlaku na přizpůsobení mechanismu protiútoky vůči antibiotiku, nebo pasivní, kdy je rezistence důsledkem obecných adaptačních procesů, které nejsou nutně spojeny s konkrétním antibiotikem. Pasivní rezistencí je například nespecifická bariéra poskytovaná vnější membránou některých bakterií. Bakterie dle Wrighta (2005) dosahují aktivní rezistence vůči antibiotiku třemi hlavními mechanismy:

- a) Vyplavením antibiotika z buňky prostřednictvím souboru membránových pumpovacích proteinů,
- b) Modifikací cílového antibiotika, která je způsobena mutací klíčových vazebných prvků, jako je r-RNA nebo dokonce přepracováním biosyntetických drah,
- c) Syntézou modifikovaných enzymů, které selektivně cílí a ničí aktivitu antibiotik.

Všechny tyto mechanismy vyžadují nové genetické naprogramování buňky v reakci na přítomnost antibiotik, kdy může docházet až k regulaci exprese genů rezistence. Bakteriální buňky proto vynakládají značné množství energie, aby aktivně antibiotikům odolávaly. Některé výzkumy vzniku rezistence u bakterií poskytly informaci, že mají bakterie schopnost si geny rezistence předávat také vzájemně mezi sebou (Dobrovolná 2010; Wright 2005).

Hledání strategie proti rozvoji rezistence je pro veřejné zdraví celosvětovou výzvou. V posledních desetiletích došlo k dramatickému nárůstu počtu humánně patogenních bakterií, které jsou rezistentní vůči jednomu nebo více antibiotikům. Stále více infekčních onemocnění způsobených rezistentními organismy nereagují na běžnou léčbu a antibiotika ztrácejí svou sílu. V mnoha zdravotnických zařízeních chybí včasná identifikace původců onemocnění a jsou zcela chybně a často zbytečně nasazována širokospektrá antibiotika. Díky tomu dochází k dramatickému nárůstu nově vznikající rezistence (Frieri et al. 2017).

4 Antimikrobiální aktivita bakterií

Mikroorganismy přirozeně soutěží o přežití ve všech možných prostředích. Taxonomická rozmanitost vede ke složité interakci mezi danými druhy a obecně se zdá, že konkurence mezi nimi také definuje jejich vzájemné vztahy. Bakterie používají konkurenční mechanismy, které jsou téměř stejně rozmanité jako konkurenti, s nimiž se setkávají. Každá konkurenční strategie má své výhody a nevýhody. Pokud bakterie používají pro svou obranu látky či struktury, jako jsou antibiotika, enzymy nebo vezikuly, jsou schopny konkurovat a zároveň minimalizovat rizika přímého poškození při kontaktní konkurenci. Jakmile ale buňka exportuje své konkurenční molekuly přes svůj obal, podléhají tyto molekuly difúzi, která snižuje jejich inhibiční sílu vůči konkurentům na dálku (Stubbendieck a Straight 2016).

4.1 Bakteriální kompetice

Bakteriální kompetici lze rozdělit na kompetici vykořisťovatelskou a kompetici rušivou. Exploatační konkurence je svým způsobem pasivní v tom smyslu, že jeden organismus čerpá ze svého okolí živiny, čímž brání okolním konkurentům v přístupu k těmto zdrojům. Oproti tomu interferenční konkurence vyvolává antagonistické faktory, které vznikají, aby bránily konkurentům. V mikrobiálních systémech je kompetice obvykle formulována v kontextu omezení růstu nebo inhibice v důsledku exploatace či interference. Mikrobiální druhy mohou být citlivé nebo dokonce rezistentní vůči inhibičním aktivitám růstu a mohou v reakci na okolní konkurenci začít s produkcí neboli syntézou antibiotik, sporulací, tvorbou biofilmu či mohou zahájit odlišné predátorské funkce nebo motilitu. Ačkoli nejsou tyto fyziologické změny univerzální u všech bakterií, představují rozmanitost mechanismů pro zvýšení konkurenční zdatnosti bakteriálních druhů, které jsou jimi vybaveny. Schopnost jednotlivých druhů využívat spektrum kompetičních mechanismů a reakcí na okolní kompetiční výzvy může být zásadním faktorem pro jejich přežití ve společenstvu rozmanitých organismů, ve kterých může mít kompetiční stres mnoho podob. Bakteriální kompetici je možné zkoumat v laboratorních podmínkách za pomoci společné kultivace dvou nebo více mikrobiálních druhů za definovaných podmínek (Birch 1957; Hibbing et al. 2010; Stubbendieck a Straight 2016).

4.1.1 Nekontaktní bakteriální kompetice

Prvním prostředkem, který spadá pod nekontaktní bakteriální kompetici, je konkurence za pomoci produkce specializovaných metabolitů. Konkurence je mezi druhy často zprostředkována bioaktivními metabolity syntetizovanými jednotlivými kompetitory. Specializované metabolity (SM) jsou molekuly produkované bakteriemi, které se nepodílejí na primárním metabolismu, ale jsou zapojeny do jiných biologických procesů. Mnoho specializovaných metabolitů bylo dříve označováno jako „sekundární metabolity“, protože k jejich produkci často dochází až v pozdních fázích růstu a jejich přítomnost je v laboratorních podmínkách postradatelná. Specializované metabolity však mohou být pro některé bakterie nezbytné pro jejich přežití a přetrvání v prostředí. V mnoha případech není známa souvislost mezi produkcí speciálního metabolitu a reakcemi, které u konkurentů vyvolávají. V kontextu kompetitivních interakcí jsou primárně zajímavé látky, které ovlivňují růst a vývoj konkurenčních bakterií. Mezi tento typ specializovaného metabolitu řadíme například antibiotika, kterým jsem pro jejich důležitost věnovala samostatnou kapitolu. Bakterie obecně produkují mnoho specializovaných metabolitů, které představují obrovskou chemickou rozmanitost. Ačkoliv je antibiotická aktivita nejčastější aktivitou připisovanou specializovaným metabolitům, mnoho antibiotik má také efektivní účinek na bakteriální konkurenty nezávislé na inhibici růstu (Davies 2013; Price-Whelan et al. 2006; Stubbendieck a Straight 2016).

Existuje řada výzkumů podrobně popisujících účinky speciálních metabolitů na konkurenční druhy bakterií. Názorným příkladem jsou zejména půdní bakterie, které produkují rozmanité speciální metabolity. Například půdní bakterie *Pseudomonas protegens* produkuje speciální metabolickou látku 2,4-diacetylfloroglucinol, která během společné kultivace s *Bacillus subtilis* inhibovala její buněčnou diferenciaci. Dalším speciálním metabolitem je látka bacillaen produkovaná právě *B. subtilis*, která byla identifikována jako inhibitor proteosyntézy nebo látka surfaktin, produkovaná stejným druhem, která brání vývoji mnoha druhů *Streptomyces*. Druhy rodu *Streptomyces* jsou v půdě všudypřítomné a rovněž proslulé svou schopností syntetizovat speciální metabolity. Produkce speciálních metabolitů může také působit i na další faktory, které ovlivňují život bakterie. Například může produkce speciálního metabolitu způsobit přerušování signalizačních procesů mezi buňkami (Patel et al. 1995; Powers et al. 2015; Stubbendieck a Straight 2016).

Druhým prostředkem nekontaktní bakteriální kompetice je produkce a vylučování enzymů. Kromě speciálních metabolitů bakterie produkují enzymy, které se účastní konkurenčního boje. Vylučované enzymy, které umožňují a vytváří rezistenci vůči antibiotikům mají jasnou konkurenční výhodu. Produkci enzymů může ale bakterie také přímo zasahovat do vývoje svých konkurentů, například pomocí enzymů degradující signální molekuly. Mezi plodné producenty enzymů patří například bakterie *M. xanthus*, která produkuje více než 300 degradačních hydrolytických enzymů. Funkce mnoha z těchto enzymů není známa, ale u některých z nich byla prokázána jasná antibakteriální aktivita. Příkladem kompetitivní funkce enzymu je případ, kdy *Staphylococcus epidermidis* „soutěží“ se *S. aureus* o kolonizaci lidské nosní dutiny. *Staphylococcus epidermidis* vylučuje serinovou proteázu Esp, která inhibuje tvorbu biofilmu *S. aureus*. Esp rozkládá biofilmy *S. aureus* tím, že inaktivuje autolyziny a zabraňuje uvolňování DNA, která je nezbytnou součástí extracelulární matrix biofilmu (Stubbendieck a Straight 2016; Wright 2005).

Stubbendieck a Straight (2016) dále uvádí, že extracelulární vezikuly (EV) mají velký význam z hlediska bakteriálních interakčních procesů. Vezikuly jsou schopny přenášet proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a malé molekuly, které fungují v kompetitivních a signálních procesech. Bakterie také využívají extracelulární vezikuly k obranným procesům proti několika typům antimikrobiálních útoků nebo k doručení antagonistických látek konkurenčním bakteriím. Těmito látkami mohou být enzymy, jako jsou hydrolázy rozkládající peptidoglykan produkované *P. aeruginosa* a *Lysobacter sp.*, nebo antibiotické speciální metabolity, jako je aktinorhodin nebo prodigiosiny, které se nachází v extracelulárních vezikulech produkovaných *S. coelicolor* a *S. lividans*. Extracelulární vezikuly již zmíněné *M. xanthus* jsou z hlediska svého konkurenčního potenciálu výjimečné. Obsahují totiž mimo jiné také 16 speciálních metabolitů, včetně myxalamidů, které jsou známými antibiotiky. Tento fakt tedy zdůrazňuje důležitost funkce extracelulárních vezikul. Zároveň bylo prokázáno, že bakterie *B. subtilis* narušuje své vlastní extracelulární vezikuly vylučováním speciálního metabolitu, látkou surfactinem. Cílená lýza extracelulárních vezikul surfactinem může sloužit jako obranný mechanismus proti vezikulám s antibiotiky produkovaným konkurenčními organismy (Berleman 2013).

4.1.2 Kontaktní bakteriální kompetice

Určité druhy bakterií spolu fyzicky interagují při vysoké buněčné denzitě prostřednictvím mechanismů kompetitivní interakce. Je více než pravděpodobné, že se některé kompetitivní funkce vyvinuly tak, aby fungovaly specificky v těsné blízkosti. Bakterie v tomto případě primárně využívají funkce zabudované do buněčných obalů, které jsou směrem do vnějšího prostředí zaměřeny na konkurenty. Inhibice závislá na kontaktu (contact-dependent inhibition, CDI) popisuje specifický mechanismus konkurenčního boje, kdy membránový protein funguje jako transportní systém pro buněčný toxin. Prototypický systém CDI byl poprvé popsán u bakterie *E. coli*. Skládá se ze tří složek: CdiA, CdiB a CdiI. V systému CDI dochází k navázání toxinu CdiA na CdiB, což je protein vnější membrány. CdiI pak poskytuje produkující buňce určitou imunitu specifickým navázáním na CdiA, čímž inhibuje jeho aktivitu vůči produkující buňce. Vzhledem k užšímu cílovému rozsahu se usuzuje, že systémy CDI jsou prostředkem k inhibici blízkce příbuzných druhů. To by umožnilo bakteriím CDI inhibovat jiné bakterie, které spíše přímo soutěží o stejné nebo velmi podobné ekologické niky. V případě, že se CDI buňka dostane do přímého kontaktu s cílovou buňkou, dostane se toxin CdiA do kontaktu s proteinem vnější membrány cílové buňky. Toxin CdiA se pak ukládá na povrch cílové buňky a podléhá samovolnému uvolnění. CdiA následně musí pro správný účinek vstoupit přímo do cytoplazmy. Jeho translokace do cytoplazmy vyžaduje protonovou hybnou sílu a interakci s receptory specifickými pro vnitřní membránové proteiny toxinu (Aoki et al. 2005; Aoki et al. 2010; Stubbendieck a Straight 2016).

Bakterie si vyvinuly další mechanismy, mezi které mimo jiné patří také CDI, a které kompetitivně vylučují nesourodé buňky z biofilmu. Rozvíjející se biofilmy obsahují trojrozměrné struktury, které se například u *B. thailandensis* nazývají „pilíře“. Tyto struktury se rozšiřují směrem ven z místa uchycení biofilmu a poskytují buňkám uvnitř pilířů lepší přístup ke kyslíku a živinám, nežli mají buňky v substrátu biofilmu. Systém CDI u *B. thailandensis* vylučuje buňky citlivé na CDI z vývoje pilířů. Buňky, které produkují stejný systém CDI, pravděpodobně sourozenci, nejsou díky svým příbuzným genům imunity CDI usmrceny (Rendueles a Ghigo 2015; Stubbendieck a Straight 2016).

Další příklad bakteriální kontaktní kompetice představuje dravý druh bakterie rodu *Bdellovibrio*, která se fyzicky sráží s cílovými buňkami za účelem proražení buněčného obalu, pohlcení a strávení své kořisti zevnitř za pomoci vylučovaných enzymů, které zahrnují například nukleázy a hydrolázy (Lambert a Sockett 2013; Stubbendieck a Straight 2016).

4.2 Predace

Predace strukturuje potravní řetězce, ovlivňuje tok energie a mění rychlost a způsob koloběhu živin v ekosystémech. V mikrobiálním světě jsou dravé bakterie běžné, zejména v půdních a vodních systémech, ale o rychlosti jejich růstu a roli v toku energie mikrobiálními potravními sítěmi se toho ví málo, částečně proto, že je obtížné takovéto bakterie kvantifikovat, ačkoliv byly nalezeny v mnoha prostředích. U dravých druhů bakterií neboli u bakterií s antimikrobiální aktivitou, byla zjištěna při výzkumném měření vyšší rychlost růstu i příjem uhlíku. Obligátně dravé bakterie rostly o 36 % rychleji a asimilovaly uhlík o 211 % rychleji nežli nedravé bakterie. U fakultativně dravých bakterií byl nárůst menší, rychlost růstu o pouhých 6 % a o 17 % vyšší rychlost asimilace uhlíku. Bakterie, které se živí jinými bakteriemi, jsou příliš malé na to, aby své oběti pohltily, ale přesto se s konkurencí umí predačně vypořádat. Příslušníci rodu *Bdellovibrionales* se přichytí na buňku kořisti, proniknou buněčnou membránou a následně se usídlí v cytoplazmě hostitele, kde spotřebovávají buněčné složky a zároveň si vytvářejí dceřiné buňky, které nakonec kořist lyzují a usmrtí. Někteří bakteriální predátoři mají jména, která vypovídají o způsobu jejich predace – například *Vampirovibrio* či *Vampirococcus* vkládají do napadené buňky cytoskeletární výběžky, „tesáky“, které z ní extrahují cytoplazmu. Dalším příkladem je rod *Cytophaga*, který je tzv. „požíračem buněk“ nebo rod *Lysobacter*, který lyzuje ostatní bakterie (Hungate et al. 2021).

4.3 Antimikrobiální aktivita v různých prostředích

4.3.1 Mořské prostředí

Mořské bakterie jsou bohatým zdrojem bioaktivních látek působících proti patogenním bakteriím. Tato skutečnost umožňuje objev nových zdrojů pro vývoj nových léků určených k léčbě infekčních onemocnění způsobených rezistentními bakteriemi. Výzkumy mořských bakterií ukázaly, že jsou tyto organismy široce zastoupeny v mořských přílivových oblastech, hlubokých mořích ale i na extrémních stanovištích, jako jsou například hydrotermální prameny nebo polární moře. Většina mořských bakterií je přichycena na mořské makroorganismy, jako jsou řasy, korály, houby apod. (Dufourcq 2013).

Oblast Nové Kaledonie je velice rozmanitá z hlediska mořských pobřežních oblastí. Z těchto oblastí bylo izolováno 493 vzorků bakterií, především z rodů *Salinivibrio*, *Photobacterium* a *Pseudoalteromonas*. Jejich antimikrobiální aktivita byla testována proti čtyřem referenčním kmenům – *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Testy ukázaly, že 63 ze 493 izolátů mělo antibakteriální aktivitu proti alespoň jednomu z referenčních kmenů. Z 63 izolátů bylo 26 aktivních proti *S. aureus*, 4 byly účinné proti *E.coli*, *Ent. Faecalis*, *S. aureus* a 14 proti *E.coli*, *S.aureus* a *P.aeruginosa* (Dufourcq 2013).

Mnoho studií uvádí, že přírodní zdroje z moře mají velký potenciál bioaktivních látek proti patogenním bakteriím. Mořské houby se sami o sobě zařadili mezi jedny z nejbohatších zdrojů bioaktivních sloučenin, které mohou být dokonce využity v oblasti farmacie. Objev bakterií, které jsou součástí těchto hub, bylo velkým průlomem, protože se jejich bioaktivní látky dají vyrábět rychle a ve velkém měřítku, aniž by bylo nutné odebírat větší množství houby. Kmeny těchto bakterií byly pojmenovány iniciálami houby, ze které byly izolovány. Houba se tedy stala sídlem mikroorganismů a začala být nazývána jako High Microbial Abundance Sponge (HMAS). Úloha bakterií v houbě spočívá v ochraně proti predátorům, ale také se například účastní na jejím metabolismu. Nedílnou součástí těchto bakterií představuje produkce bioaktivních sloučenin, které působí antimikrobiálně, ale také antioxidačně a protinádorově. Několik zdrojů uvádí, že extrakty z těchto bakterií spojených s mořskými houbami mají antimikrobiální aktivitu proti bakteriím *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* a *B. subtilis* (Asagabaldan et al. 2017).

4.3.2 Půdní prostředí

V půdě se mikroorganismy většinou nachází v jejích svrchních několika centimetrech, které jsou značným heterogenním prostředím, ve kterém musí bakterie často soutěžit o omezené zdroje pro jejich přežití. Půdní bakterie se proto staly bioaktivními a vyvinuly různé strategie, za pomoci kterých mohou konkurovat svým sousedům a zajistit jejich eliminaci. Toho docilují například produkcí toxických látek, jako jsou bakteriociny nebo antibiotika. Produkce antibiotik zajišťuje v půdě inhibici či zabití ostatních konkurujících bakterií, a tím tedy umožňují privilegovaný přístup k živinám. Antimikrobiální aktivita půdních bakterií závisí na obsahu živin, zejména zdroji uhlíku a dusíku. V posledních desetiletích bylo izolováno velké množství bakterií, které produkují různé druhy metabolitů nebo enzymů. Každý rok je izolováno přibližně 500 typů antibiotik, přičemž je většina získávána z půdních bakterií. Mezi ty půdní bakterie, které produkují širokou škálu antibiotik, včetně antimykotických, antiparazitárních nebo protinádorových látek, patří zejména rod *Streptomyces* (Prashanthi et al. 2021; Westhoff et al. 2019). Prashanthi et al. (2021) dále uvádí, že z 263 bakteriálních kolonií izolovaných z půdních vzorků měly pouze 3 antibakteriální potenciál. Jednalo se o kmeny *B. aryabhatai*, *A. humicola* a *N. lactis*, které působily antibakteriálně proti řadě lidských patogenů (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* a *K. pneumoniae*). Řada vědců si vybrala půdu pro izolaci bakterií produkujících antibiotika. Arifuzzaman et al. (2010) odhalili 20 půdních bakteriálních kmenů, které byly aktivní proti patogenním mikrobům. Denizci (1996) izoloval 356 izolátů *Streptomyces* z půd v několika oblastech Turecka a provedl jejich screening na antibakteriální aktivitu. Dehnad et al. (2010) izolovali 150 aktinomycet z půdních vzorků ze západního Íránu pro screening antibakteriální aktivity vůči testovaným patogenům. Falkinham et al. (2009) uvádějí, že půdní bakterie tvoří základ pro výrobu téměř 500 antibiotik ročně.

Zemědělská půda je sídlem komplexu bakterií druhu *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia* a *Robbsia*. Druh *Burkholderia* je skupinou zejména oportunistických patogenů, které společně produkují širokou škálu antimikrobiálních sloučenin inhibující ostatní bakteriální patogeny, kvasinky i houby (Rojas-Rojas et al. 2018).

4.3.3 Prostředí organismů

Mikrobiom organismů je z hlediska bakterií velice rozmanitou oblastí. Největší množství bakterií najdeme v gastrointestinálním traktu, kde zastupují řadu funkcí. Studie u savců prokázaly, že se mikrobiom výrazně podílí na řadě fyziologických procesů, které jsou pro jejich hostitele životně důležité. Ovlivňují například hostitelův metabolismus, energetickou homeostázu, zdraví střevního epitelu či procesy související s imunologickou aktivitou. Mikrobiom propůjčuje tělu metabolické schopnosti, které přesahují schopnost samotného organismu, což z něj činí součást hostitelské fyziologie. Z hlediska složení je nutno pohlížet na hostitele jako na více druhový hybridní organismus, který se skládá z hostitelských a mikrobiálních buněk. Tyto buňky následně fungují v dynamické a symbiotické rovnováze (Barko et al. 2017).

Z hlediska střevního mikrobiomu jsou před narozením považováni všichni savci včetně člověka za sterilní, tedy bez svého vlastního mikrobiálního prostředí. K jeho vytvoření dochází až během porodu, kdy dochází ke styku mikrobiomu samice s potomkem. Mikrobiom potomka je rovněž ovlivněn jeho okolním prostředím, ve kterém se nachází další mikroorganismy, se kterými přichází potomek v prvních hodinách života do kontaktu. Střevo ale není volně přístupné pro všechny organismy, je selektivní a umožňuje kolonizaci pouze některým z nich, ostatní inhibuje. Tvorba takovéto mikrobiálně-slizniční symbiotické jednotky je řízena komplexním vzájemným působením mezi bakteriálními a hostitelskými imunologickými faktory. Jejím cílem je vytvoření vzájemné imunologické tolerance. Výsledný mikrobiom se během života potomka dále vyvíjí dle přijímané stravy a prostředí, ve kterém se potomek nachází (Barko et al. 2017; Palmer et al. 2007).

4.3.4 Netopýr jakožto hostitel

Výskyt nových infekčních onemocnění zvýšil zájem o netopýry jakožto potenciální hostitele a přenašeče zoonotických patogenů, včetně bakterií. Zatímco se dřívější výzkumy zabývaly převážně virovým hlediskem, výskyt patogenních bakterií u netopýrů a vliv na jejich mortalitu byly do značné míry opomíjeny. Řád Chiroptera je nejrozmanitější a geograficky nejrozšířenější taxon savců, který se vyskytuje na celé Zemi, vyjma Antarktidy. Netopýři mají schopnost létat, díky čemuž mohou překonávat

velké vzdálenosti během sezónních migrací, ale také velmi početnými koloniálními populacemi. Tyto charakteristiky spolu s jejich dlouhou dobou života a schopností obývat množství rozmanitých ekologických nik řadí netopýry mezi nejúspěšnější druhy na Zemi. Jejich role v epidemiologii nemocí je o to důležitější, protože netopýři jsou také vnímaví k množství různých mikroorganismů, mezi které patří viry, bakterie, houby a paraziti. Existuje široká škála vnitřních a vnějších faktorů, mezi které patří například pohlaví, věk, tělesná kondice či environmentální a antropogenní stresory, které mohou ovlivnit imunitní kompetenci a náchylnost hostitele vůči patogenním organismům. Zvláště důležité je shlukování netopýrů v jejich nocovištích, protože dochází ke zvýšení možnosti mezikoloniálního přenosu. Dalším charakteristickým chováním jsou časté pohyby v rámci jednotlivých hnízdišť, což může způsobit přenos patogenů mezi druhy netopýrů a tím i zprostředkovat výměnu v rámci jednotlivých populací. Klíčový faktor pro přenos bakterií rovněž představuje potravní ekologie netopýrů, která poskytuje dostatek příležitostí úzkého kontaktu s jinými zvířaty, a tedy i možnost přenosu na jiné hostitele. Hmyz představuje nositele patogenních organismů, proto se zdá pravděpodobné, že také působí jako pasivní přenašeč. Podobně by mohlo být možným zdrojem bakterií pro netopýry také kontaminované ovoce nebo voda. Mnoho studií zkoumalo přítomnost infekčních zoonotických mikroorganismů u netopýrů, ale poznatky o vlivu na netopýří hostitele jsou u většiny zjištěných mikrobiálních druhů omezené. Kvůli omezení při sběru dat a uchování vzorků se bakteriologické výzkumy omezují převážně na gastrointestinální bakteriální flóru, sérologii, detekci bakterií genetickými metodami z krve a ektoparazity netopýrů (Mühldorfer 2012; Wang et al. 2011).

4.3.5 Patogeny netopýrů

Většina informací o gastrointestinální bakteriální flóře netopýrů a přítomnosti či nepřítomnosti bakteriálních enteropatogenů pochází z mikrobiologických studií, které se většinou dosud zabývaly těmi bakteriálními druhy, které mohou představovat potenciální zdravotní hrozbu pro člověka nebo domácí zvířata. Z tohoto hlediska byly u netopýrů příležitostně zjištěny patogeny druhu *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* a *Campylobacter*. Mezi další patogeny, které již nepředstavují přímou hrozbu pro člověka, patří řada bakterií, které jsou často považovány za střevní komenzály. Některé z nich ale stále

zůstávají enteropatogeny způsobující onemocnění netopýrů. Do této skupiny řadíme *Escherichia coli*, *Vibrio sp.* a *Clostridium sp.* Například *Escherichia coli* byla identifikována jako původce vzestupné infekce močových cest u dvou netopýrů z čeledi Vespertilionidae. Kmeny *Escherichie coli* byly izolovány z netopýra na Trinidadu a v Brazílii. *Clostridium perfringens* a *Clostridium sodellii* byly identifikovány jako primární příčina hemoragických průjmů u evropských druhů Vespertilionidů. *Clostridium perfringens* byla zjištěna u skupiny netopýrů *Nyctalus noctula* chované v zajetí za účelem léčby a *Clostridium sordelli* bylo izolováno z traumatizovaného netopýra vousatého, který byl nalezen umírající v těsné blízkosti člověka (Adesiyun et al. 2009; Mühldorfer 2012).

Mezi další patogenní bakterie, které byly z netopýrů izolovány, patří několik druhů borélií a bartonel. Fylogenetické analýzy kmenů identifikovaly několik odlišných bakteriálních druhů. Netopýři stejného druhu, geografického původu (příslušníci čeledi Vespertilionidae) či ekologické niky sdíleli blízkce příbuzné kmeny Bartonella (Lin et al. 2012; Mühldorfer 2012).

Netopýři mohou také bakterie přenášet v krevním řečišti, což způsobilo přenos těchto bakterií na klíšťata, jakožto jejich ektoparazity. U stejných klíšťat byla ještě navíc objevena bakterie *Rickettsia*. Konkrétní druhy *Borelia hermsii* a několik druhů *Rickettsia* (*R. conorii*, *R. rickettsi*, *R. parkeri*, *R. amnlyommii* a *R. rhipicephali*) byly zjištěny u netopýrů z Koreje, Brazílie a Ameriky. Většina z nich patří do čeledi Vespertilionidae a Molossidae (Mühldorfer 2012).

5 Laboratorní metody

5.1 Kultivace bakterií

Kultivace neboli množení bakterií se provádí v laboratorních podmínkách. Bakterie se při ní nachází v umělém prostředí, které nahrazuje jejich původní přirozené podmínky z hostitele. Pro zachování optima růstu a metabolismu bakterií, musí být laboratorní podmínky, jak chemické, tak fyzikální, zcela vyhovující jejich životním podmínkám. Mezi tyto podmínky patří například teplota, živiny, atmosféra kultivace, vlhkost, tlak apod. Kultivace bakterií probíhá na živných kultivačních půdách neboli médiu. Tyto půdy rozlišujeme na tekutá média a pevná média [1] [2].

5.1.1 Tekutá média

Tekuté půdy jsou složeny ze směsí, které jsou rozpuštěny ve vodě. Směsi jsou jednoduché či složitější roztoky obsahující živiny a růstové faktory. Řadíme mezi ně například bujón a masopeptonovou vodu, která se skládá z natrávených aminokyselin. Tekutá média se nejhojněji využívají pro pomnožení bakterií za účelem další diagnostiky [3]. V tomto typu média nelze po kultivaci s jistotou určit, zdali se jedná o čistou kulturu nebo o seskupení více druhů [4].

5.1.2 Pevná média

Pro vytvoření pevného média se přidává k základnímu bujónu agar, želatina či křemičité gely. Agar je polysacharid, který se získává vyvařením z mořských řas. Následná směs je umístěna na Petriho misku, na které lze pozorovat jednotlivé izolované kolonie [5]. Kolonie bakterií mohou pocházet z jedné buňky nebo může vzniknout velmi pevným seskupením několika bakterií. Výsledné kolonie, které vznikají na agaru, mají typickou morfologii, která se odvíjí od druhového původu bakterie a od konkrétního složení živné půdy. Následně se může na kolonii hodnotit její tvar, velikost, okraje, povrch, barva, konzistence aj. [5].

5.2 Izolace DNA

Existuje mnoho metod, za pomoci kterých lze izolovat DNA z bakteriální buňky. Jednou z nich je metoda fenol-chloroformové extrakce, která se v kombinaci s isopropanolem a ethanolem využívá již desítky let na všechny typy organismů, včetně bakterií. Za pomoci těchto látek je možno získat velmi čisté preparáty nukleových kyselin. Metoda kombinuje směs fenolu a chloroformu s vodným roztokem, kterým může být například buněčný extrakt, a umožňuje separaci molekul mezi výslednou organickou a vodnou fází. Po smíchání se fáze oddělí odstředěním, čímž vzniknou dvě odlišné fáze, přičemž organická fáze se nachází pod fází vodnou. Mezi nimi je bělavá interfáze, která obsahuje bílkoviny a další sloučeniny (Krausz a Bose 2014).

Všechny roztoky musí být připravovány za pokojové teploty. V prvním kroku do sterilní zkumavky napipetujeme pufr s vhodným množstvím bakterií tak, aby byl roztok mírně zakalený. Následně do roztoku přidáme 2 μl lysostafinu a celou zkumavku inkubujeme ve vodní lázni o teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Po uplynutí dané doby přidáme k roztoku 3 μl dodecylsulfátu sodného a znovu celou zkumavku inkubujeme, tentokrát při teplotě 95 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Po tomto kroku by měl být vzorek převážně čirý. Následně zkumavku s daným roztokem chladíme při pokojové teplotě po dobu cca 5 minut. Poté přidáme do roztoku 103 μl fenol-chloroform-izoamylalkoholu a vortexujeme několik sekund při vysokém výkonu. Zkumavku vložíme do odstředivky a při 12 000 x g po dobu 5 minut. Z výsledného roztoku odpipetujeme 5 μl horní vodné vrstvy do nové sterilní zkumavky a přidáme 45 μl TE pufru. Konečný vzorek je připraven pro další laboratorní analýzu v podobě PCR (Krausz a Bose 2014).

5.2.1 Izolace DNA za pomoci magnetických částic

Izolaci DNA lze uskutečnit za pomoci magnetických částic, které můžeme také nazvat magnetickými kuličkami. Tyto kuličky jsou struktury o velikosti 5 nm – 100 μm tvořené z kovového jádra, kterým může být maghemit či magnetit nebo ve výjimečných případech zlato. Toto jádro je obaleno vrstvou se specifickým povrchem, který lze upravit dle charakteru cílové molekuly. Velikost celé kuličky se může měnit v závislosti na charakteru izolovaného. Pokud chceme izolovat proteiny, magnetická kulička by

měla mít velikost od 5-50 nm, pro izolaci nukleových kyselin by měla mít 20-450 nm. Celý princip izolace vychází z fyzikálně – chemických vlastností dané magnetické kuličky, která reaguje na vnější magnetické pole a je schopna navázat různé částice, díky jejich vlastní afinitě k jejímu povrchu [6].

Během izolace se magnetické kuličky přidávají přímo ke vzorku do zkumavky, ve kterém na sebe naváží cílené částice. Kuličky se následně přitáhnou magnetem ke stěně zkumavky a zbylý roztok se spolu s ostatními zbylými látkami odstraní. Posledním krokem je fyzikálně-chemické dokončení různého charakteru, kterým může být například denaturace, pomocí které se oddělí navázané molekuly z magnetických kuliček. Tímto způsobem získáme vybrané molekuly, které můžeme dále využít [6].

5.3 Sekvenování

Sekvenování nové generace (Next generation sequencing, NGS) je technologie masivně paralelního sekvenování. Nabízí vysokou rychlost, propustnost a škálovatelnost, což umožňuje přizpůsobení se potřebám daného experimentu. Sekvenování nové generace tedy dává možnost výběru, zdali se má provést pouze povrchové sekvenování více vzorků nebo naopak sekvenování malého počtu vzorků, ale za to více do hloubky s možností najít vzácnosti daných oblastí. Její hlavní princip spočívá v určení přesného pořadí nukleotidů v celých genomech či konkrétních cílových oblastech DNA a RNA. Sekvenování nové generace umožnilo revoluci ve vědecké oblasti a dovolilo laboratořím provádět širokou škálu aplikací společně se studiem biologických systému na takové úrovni, která nebyla doposud možná. Komplikovaná problematika genomiky vyžaduje jistou hloubku informací, které přesahovali možnosti tradičních technologií sekvenování DNA. Sekvenování nové generace tento přesah umožnilo a stalo se každodenním nástrojem v oblasti biologie [7].

Inovativní možnosti přípravy vzorků a analýzy dat umožňují širokou škálu aplikací. Sekvenování nové generace například umožňuje laboratořím rychle sekvenovat celé genomy, hloubkově sekvenovat cílové oblasti, analyzovat epigenetické faktory, jako je metylace DNA v celém genomu a interakce DNA s proteiny. Dále umožňuje sekvenovat vzorky rakoviny a studovat její vzácné somatické varianty, nádorové subklony apod., studovat lidský mikrobiom nebo identifikovat nové patogeny [7].

Sekvenování nukleových kyselin je základem biologického výzkumu. McGinn a Gut (2013) uvádí, že existuje několik generací technologií sekvenování DNA, které lze dobře charakterizovat na základě jejich povahy a druhu výstupu, který poskytují. Dideoxyterminátorové sekvenování vyvinuté Sangerem v roce 1977 dominovalo 30 let až do roku 2005, kdy byl představen první sekvenátor 2. generace se značně nižšími náklady a s výstupem řádově vyšším než Sangerovo sekvenování (McGinn a Gut 2013; Sanger et al. 1977).

Projekt lidského genomu, který využíval sekvenování pomocí Sangerovy kapilární elektroforézy trval více než 10 let a stál téměř 3 miliardy dolarů. Sekvenování nové generace naproti tomu umožňuje rozsáhlé sekvenování celého genomu, které je dostupné a praktické pro běžného výzkumníka. Umožňuje vědcům analyzovat celý lidský genom v rámci jediného sekvenčního experimentu nebo sekvenovat tisíce až desetitisíce genomů během jednoho roku [7].

V současné době se využívá již 3. generace postupů, které například využívají nanoporové systémy, které jsou vyvíjeny pro sekvenování DNA (McGinn a Gut 2013).

5.4 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednou z klíčových technik molekulární biologie. PCR technika byla první, která umožnila specifickou detekci společně s vysokou produkcí DNA. Je zejména hojně využívána lékaři a výzkumnými pracovníky k diagnostice nemocí, sekvenování genů a jejich klonování, ale také k provádění složitých kvantitativních a genomických studií rychlým a efektivním způsobem. Jedno z nejdůležitějších využití představuje aplikace klasické metody PCR pro detekci patogenů. Dále se tato metoda využívá například ve forenzní medicíně k identifikaci podezřelých [8].

PCR převádí velmi malé množství DNA na velké, které je využitelné přímo nebo pro navazující procedury, a je základem mnoha specializovaných technik molekulární biologie. Využívá složky buněčného mechanismu podobného mitotickému dělení buněk in vitro. Po zveřejnění metody v roce 1985 byl základní postup PCR značně modifikován, rozšířen a aplikován na velké množství dalších technik (Saiki et al. 1985; Waters a Shapter 2013).

Během mitotického dělení se pro každou novou somatickou buňku vytvoří kopie genomu. Tímto procesem se zdvojnásobí množství DNA, které se rovnoměrně rozdělí mezi obě nové buňky. Ke zdvojení jaderné DNA dochází při každém buněčném dělení, protože mnohobuněčný organismus vzniká kontinuálním buněčným dělením počínaje původní progenitorovou buňkou. Jediná kopie genomu se v původní jediné progenitorové buňce v plně zralém organismu přemění na mnoho miliard kopií. PCR se opírá o obdobné principy a izolované složky tohoto procesu, které převádějí velmi nízké koncentrace DNA na koncentrace velmi vysoké. Běžně se PCR provádí pro fragmenty DNA o délce až 5 kbp. Delší fragmenty lze také podrobit procesu PCR, ale je náročnější. PCR na dlouhé vzdálenosti často vyžaduje tzv. koktejly enzymů společně s dalšími přísadami. Tyto koktejly enzymů zahrnují korekturní enzymy, jako je Pfu. Taq polymeráza nemá schopnost korektury, zatímco Pfu DNA polymeráza pocházející z *Pyrococcus furiosus* ano. Snižuje chybovost až pětinasobně oproti Taq polymeráze (Cline et al. 1996; Waters a Shapter 2013).

Mezi základní fyzikální složky PCR patří (1.) templátová DNA, tedy DNA, která se kopíruje, (2.) deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP), které představují základní kameny DNA, a které dělíme na adenintrifosfát (ATP), thymintrifosfát (TTP), guanintrifosfát (GTP) a cytosintrifosfát (CTP). Dále mezi základní složky patří (3.) Taq DNA polymeráza, jakožto enzym, který spojuje nukleotidy dohromady a vytváří zrcadlový obraz předlohy, (4.) oligonukleotidové primery, které představují sekvenci DNA komplementární k cílové DNA, a na kterou se váže DNA polymeráza. Další složkou je (5.) pufový roztok o vhodné iontové síle a pH (Waters a Shapter 2013).

PCR využívá tepelně stabilní DNA polymerázu, Taq DNA polymerázu, pocházející z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Tepelná stabilita umožňuje enzymu odolávat teplotě, které je potřebné k denaturaci DNA a také umožňuje udržovat aktivitu při relativně vysokých teplotách, což zlepšuje specifčnost primerů (Waters a Shapter 2013).

5.4.1 Postup PCR

Proces PCR dle Waterse a Shapterera (2013) standardně zahrnuje tři základní kroky:

1. Denaturace – Zkumavka obsahující PCR komponenty se zahřeje na 94-96 °C. Tím dojde k denaturaci DNA a rozdělení dvou komplementárních vláken,
2. Nasednutí primerů (annealing) – Zkumavka se ochladí, což umožní primerům, aby se navázaly prostřednictvím párových bází na cílovou sekvenci. Sekvence DNA primerů je komplementární k cílové sekvenci,
3. Extense – DNA polymeráza se naváže na primery DNA a poté primery prodlužuje po jednom nukleotidu, přičemž současně přečte templát a poté umístí nukleotid, který templát doplňuje.

Opakováním výše zmíněného procesu v několika cyklech dojde k exponenciálnímu zvýšení koncentrace cílové DNA. PCR zprvu vytvoří jedinou kopii, která zdvojnásobí množství cílové DNA. V případě opakování jsou ve druhém cyklu PCR k dispozici dva cíle, které lze zkopírovat, čímž se množství cíle zdvojnásobí na čtyři. Ke zdvojnásobení následně dochází při každém následujícím opakování stejným způsobem. PCR se běžně provádí ve 25-35 cyklech, takže ve výsledku dochází ke znásobení množství cílové DNA řádově až 225-235krát. Pro dlouhé fragmenty je třeba prodloužit dobu PCR. Taq polymeráza přidává nukleotidy rychlostí přibližně 2000/ minutu (Waters a Shapter 2013).

6 Praktická část

6.1 Netopýří kolonie na hradu Točník

Na konci 14. století byl na příkaz krále Václava IV. postaven hrad Točník, který se stal letním sídlem majoritně netopýřů velkých, ale můžeme zde výjimečně pozorovat také netopýra černého, pestrého, hvízdavého, dlouhouchého aj. Hrad byl zařazen na seznam evropsky významných lokalit v rámci programu Natura 2000. Samice těchto netopýřů pravidelně využívají útočiště hradu již více než 20 let. Každoročně se zde nachází od dubna do srpna v prostorech vrchlíku vnitřního kamenného schodiště, kde lze nalézt cca 400 samic, které využívají bezpečí stavby pro výchovu svých mláďat. Každý večer tyto netopýři provádí let přes černou kuchyni, okny až do okolních lesů, které využívají pro lov hmyzí potravy [9].

6.1.1 Netopýr velký

Netopýr velký (*Myotis myotis*) je jedním z celkově 24 druhů netopýru, kteří se vyskytují na území České republiky. Netopýři jsou nokturní živočichové, kteří pro svou orientaci a komunikaci využívají tzv. echolokaci neboli vysokofrekvenční zvuky v rozmezí 20-80 kHz. Převážnou většinu jejich jídelníčku tvoří hmyz a ostatní členovci, které sbírají ze země. Průměrná délka života se pohybuje mezi 2-3 roky. Život netopýřů má roční cyklus – od dubna do srpna se samice shromažďují v letních koloniích, čehož je názorným příkladem právě hrad Točník. V letních koloniích následně odnáší a vychovávají své mláďe, které přichází na svět přibližně po 55 až 70 dnech březosti. Dobu dospívání však přežije pouze asi 20 % z nich. Na podzim se následně netopýři setkávají ve svých tradičních úkrytech, kde dochází k páření. V zimě Netopýr velký přechází do stavu hibernace. Všichni netopýři jsou na našem území chráněni zákonem [10].

6.2 Materiál a metody

Jako zdrojový materiál byl použit trus z kolonie netopýra velkého (*Myotis myotis*) z hradu Točník. Z trusu byly získány bakterie, které byly následně kultivovány nejdříve v tekutém později na pevném médiu. Pro všechny kultivace v této práci bylo použito

tekuté médium LB (Luria/Miller, výrobce The Carl Roth GmbH.), případně pevné LB médium (Luria/Miller, The Carl Roth GmbH) s agarem o složení:

- Trypton 10 g/l
- Kvasnicový extrakt 5 g/l
- Chlorid sodný (NaCl) 10 g/l
- Agar 15 g/l
- Hodnota pH 7,0 ±0,2

6.2.1 Kultivace získaných bakterií

V tekutém médium proběhla kompetice bakterií o zdroje a přežití. Vítězné bakterie byly kultivované na agarových plotnách LB média v plastických Petriho miskách, kde byla získána čistá kultura bakterie označená Z1, která byla opět kultivovaná v tekutém LB médiu. Po kultivaci byla šlechtěna v tekutém LB médiu pomocí kompetice proti bakterii *Escherichia coli*. Cílem bylo posílit inhibiční schopnosti tohoto druhu.

Do 100 ml tekutého média bylo přidáno 2 ml z narostlé 24 hodinové kultury *E.coli* a 0,5 ml bakterie Z1. Po 3 dnech bylo použito 0,4 ml vítězné bakterie Z1 proti 3ml z nové 24 hodinové kultury *E.coli*. Následně 0,2 ml vítězné Z1 proti 3 ml z nové 24 hodinové kultury *E.coli*. Z tohoto nárůstu byla získána čistá linie, namnožena v tekutém LB médiu a použita pro PCR reakci pro identifikaci druhu bakterie Z1. Pozorování a hodnocení růstu a kompetice bakterií bylo prováděno na mikroskopu OLYMPUS BX53.

6.2.2 Kompetice získaných bakterií

Zároveň byla také provedena kompetice na agarových plotnách. Na LB agaru bylo skleněnou hokejkou rozetřeno 100 µl kultury *E. coli*, a několika dalších bakteriálních kmenů označených 179, 179M, 1231M, 1231O. Testování mělo být podle plánu provedeno s některými kmeny z banky mikroorganismů, ale z finančních důvodů byly použity linie získané z momentálně dostupných archeologických nálezů. Bakterie byly získány ze zubů z odkrytých hrobů z lokality Církvice. Následně bylo na agarovou

plotnu kápnuto 30 μ l z kultury Z1, buď na střed nebo byly aplikovány 4 kapky na plotnu s rozetřenými bakteriemi jiného druhu. Kultivace byla provedena v termostatu při 35 °C a na laboratorní stole při asi 24°C. Po 24 hodinách bylo provedeno vyhodnocení.

6.3 Izolace DNA

Izolace DNA bakterií z netopýřího trusu byla provedena fúzí dvou způsobů jejího provedení. Prvním byla metoda fenol-chloroformové extrakce, která byla zhotovena s cílem efektivního „rozbití“ bakterií pro navazující metodu. Tou byla izolace DNA za využití magnetických kuliček, jejichž účelem bylo získání co nejlepší DNA pro následující sekvenaci. Metoda fenol-chloroformové extrakce vychází z faktu, že DNA je dobře rozpustná ve vodě, zatímco ve směsi fenolu a chloroformu je její rozpustnost horší. Metoda byla proto využita za účelem využití schopnosti proteinů rozdělovat své části na polární a nepolární. V takovém případě se tedy i jejich aminokyseliny směřují dle své polaritě buďto do vody nebo do fenolu. Z tohoto důvodu se v oblasti hranice obou prostředí tvoří vrstva proteinu (Green a Sambrook 2012). Navazující provedení izolace DNA za pomoci magnetických kuliček umožnilo oddělení nežádoucích složek zbylých po extrakci od dané DNA, způsobem jejího navázání na povrch kuliček. Jejich feromagnetická složka umožňuje interakci s vnějším magnetickým polem, zatímco s biologickými systémy interaguje druhá část kuliček, kterou je ferimagnetická složka (Pečová et al. 2010).

6.3.1 Postup fenol-chloroformové extrakce:

Postup fenol-chloroformové extrakce a izolace DNA magnetickými kuličkami byl proveden dle zavedeného laboratorního protokolu ZČU, jehož zhotovení jsem vypracovala dle bakalářské práce Zichové (2021):

1. Vzorek netopýřího trusu byl ve zkumavce (ependorf; 1,5 ml) smíchán s 400 μ l destilované vody,

2. Ke vzniklému roztoku bylo přidáno 700 μ l ROTI®-FENOL/CHLOROFORM/ISOAMYLALKOHOL, jakožto součást roztoku TE pufru,
3. Hotová směs byla po dobu 3 minut vortexována,
4. Poté proběhla centrifugace po dobu 7 minut a 11 000 g, po které následoval odběr horní vodné fáze do nové zkumavky s ohledem na důležitost čistoty roztoku (vůči potencionální kontaminaci oddělenými bílkovinami),
5. Následně proběhlo opakování postupu č. 1, 2 a 3,
6. Následně proběhlo opakování postupu č. 4,
7. Následně proběhlo znovu opakování postupu č. 1,2 a 3, ale v tomto případě už byl ke směsi přidán pouze chloroform, nikoliv fenol-chloroform-isoamyl alkohol,
8. Následně proběhlo znovu opakování kroku č. 4, jehož výsledkem je voda s DNA připravena pro navazující izolaci za pomoci magnetických částic.

6.3.2 Postup izolace DNA za pomoci magnetických částic:

1. Voda s DNA byla umístěna v množství 200-300 μ l do zkumavky (1,5 ml), kam bylo přidáno: 100 μ l 5 M NaCl; 200 μ l 40% PEG (polyethylenglykol) a 50 μ l roztoku magnetických nosičů Clean NGS,
2. Následovala inkubace zkumavky po dobu 15 minut,
3. Poté byla zkumavka po dobu 5 minut umístěna do magnetického separátoru,
4. Byl odpipetován supernatant s ohledem na nutnou separaci magnetických kuliček,
5. Vyjmutí zkumavky z magnetického separátoru a promytí magnetických nosičů, s navázanou DNA, 500 μ l 70% ethanolu,
6. Následně proběhlo opakování kroku č. 3 a 4,
7. Poté proběhlo opětovné promytí magnetických nosičů s 200 μ l 70% ethanolu,
8. Zkumavka byla znovu umístěna do magnetického separátoru, po jehož zhotovení byl také znovu odpipetován supernatant (zbylý ethanol se nechal odpařit),
9. Zkumavka byla vyjmuta z magnetického separátoru. Navázaná DNA byla eluována do 50 μ l TE pufru za ustálené laboratorní teploty po dobu 1 hodiny,

10. Posledním krokem bylo opětovné vložení zkumavky do magnetického separátoru a odpipetování TE pufru s obsaženou DNA, po kterém následovalo odseparování nosiče za pomoci magnetického separátoru. Eluát s obsaženou DNA byl vložen do čisté mikrozkušavky.

6.4 Identifikace

Pro identifikaci byly použity primery amplifikující DNA z obvykle používané oblasti 16S rRNA. V první detekci bylo využito primerů 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3' (výrobce Generi Biotech Machkova 587/42 500 11, Hradec Králové). Primery byly designovány dle Frank et al. (2008). Reakční PCR směsi byly inkubovány po dobu 4 minut při teplotě 94 °C, následovaly cykly denaturace po dobu 1 minuty při teplotě 94 °C, annealing po dobu 30 s v různých teplotách a extenze po dobu 2 minut při teplotě 72 °C (Frank et al. 2008). Nasednutí primerů (annealing) bylo testováno při různých teplotách (50 °C 54 °C 56 °C a 60 °C). PCR kit byl od firmy Top-Bio, s.r.o. (Průmyslová 596, 252 50, Vestec). Očekávaná velikost produktu byla 1500 bp.

Pro další pokus o identifikaci byly vyzkoušeny jiné primery s očekávanou délkou produktu 292 bp. Jednalo se o 515f 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' a reverzní 806r 5'-TAATCTWTGGGVHCATCAGG-3' (výrobce Generi Biotech Machkova 587/42 500 11, Hradec Králové) primery byly designovány dle Caporaso et al. (2011). Reakční PCR směsi byly inkubovány po dobu 3 minut při teplotě 94 °C, následovaly cykly denaturace 94 °C po dobu 45 s, annealing 50 °C po dobu 60 s v různých teplotách a extenze po dobu 90s při teplotě 72 °C, celkově proběhlo 35 cyklů (Caporaso et al. 2011).

6.5 Sekvenování

Sekvenování genomové DNA neznámých bakterií bylo provedeno v Biopstické laboratoři s.r.o., jakožto renomované a největší cytologické a biopstické laboratoři v České republice (adresa: Mikulášské náměstí 628/4, 326 00 Plzeň Slovany). Laboratoř je akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO 15189. Sekvenování bylo provedeno na přístroji

Illumina dle manuálu dostupného z webových stránek firmy [12]. Srovnání sekvencí s dalšími sekvencemi jiných druhů bakterií bylo provedeno v databázi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

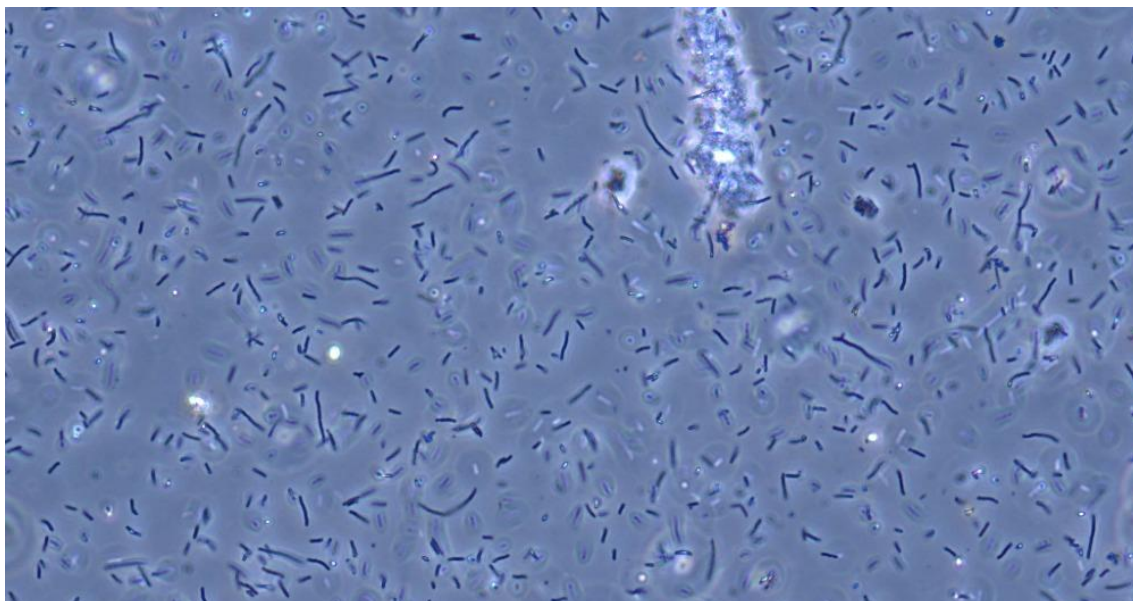
6.6 Izolace produkované antimikrobiální látky

Izolace surového antibiotika, (nebo zatím nespecifikované směsi antimikrobiálních látek), byla uskutečněna podobně jako v práci Selvameenal et al. (2009) s rozdílem úpravy postupu. Na 5 Petriho misek s LB agarem byla vyseta směs *E. coli* 200 µl, kmen 1231M 100 µl a kmen Z1 50 µl. Směs byla rozetřena sterilní skleněnou hokejkou a inkubována v pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Druhý den byl skleněnou hokejkou odstraněn nárůst bakterií Z1 z agarů, agar byl v 0,5 l kádince rozdrcen a zalit cca 50 ml ethylesteru kyseliny octové. Následně byla kádinka zakryta plastovou membránou a 24 hodin třepána na třepačce. Další den byl ethylester kyseliny octové se směsí z agarů slit do nové kádinky a odpařován v digestoři na plotně při 55°C. Do koncentrované směsi byly ponořeny dva čtverečky filtračního papíru a na podložním sklíčku byly při 55 °C usušeny do sucha. Po dvou hodinách v pokojové teplotě, z důvodu jistého vysušení, byly čtverečky položeny na LB agarové plotny s rozetřenými kulturami *E. coli* a kmene 1231M, obdobně jako u běžné diskové difúzní metody. Po 24 hodinách inkubace v pokojové teplotě byly plotny vyhodnoceny.

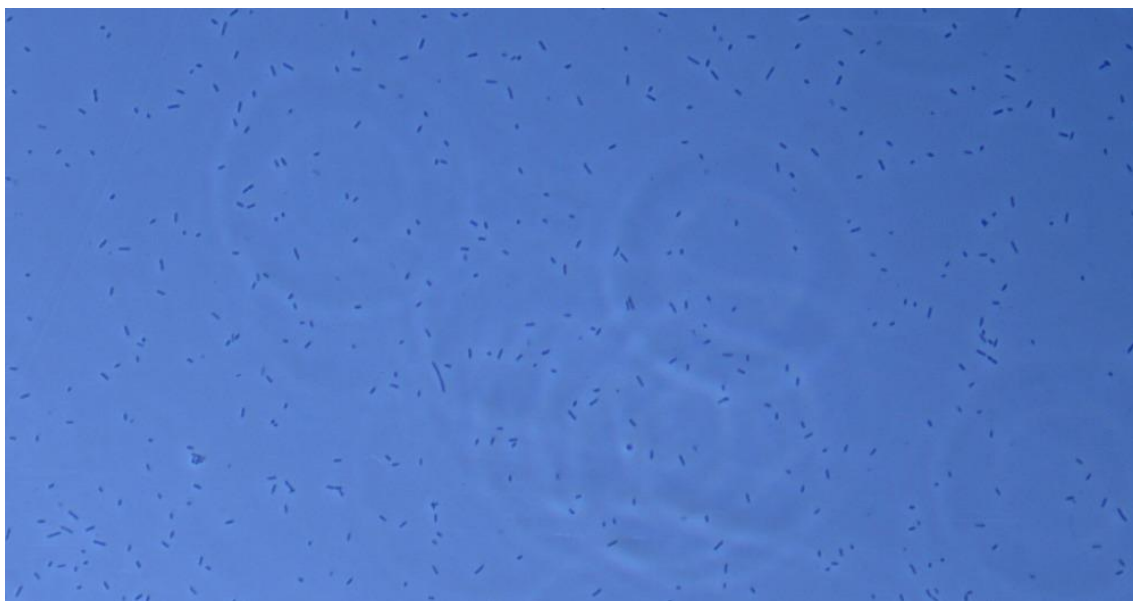
6.7 Výsledky

Bakterie ze směsi trusu netopýra velkého (*Myotis myotis*) po namnožení za 24 hodin (obr. 4.), vykazovaly směs různých druhů bakterií, zatímco se po 72 hodinách za pokojové teploty na třepačce začal prosazovat jeden druh na úkor ostatních, frekvence všech živých bakterií klesla (obr. 5.). Podobně tomu bylo (obr. 6).

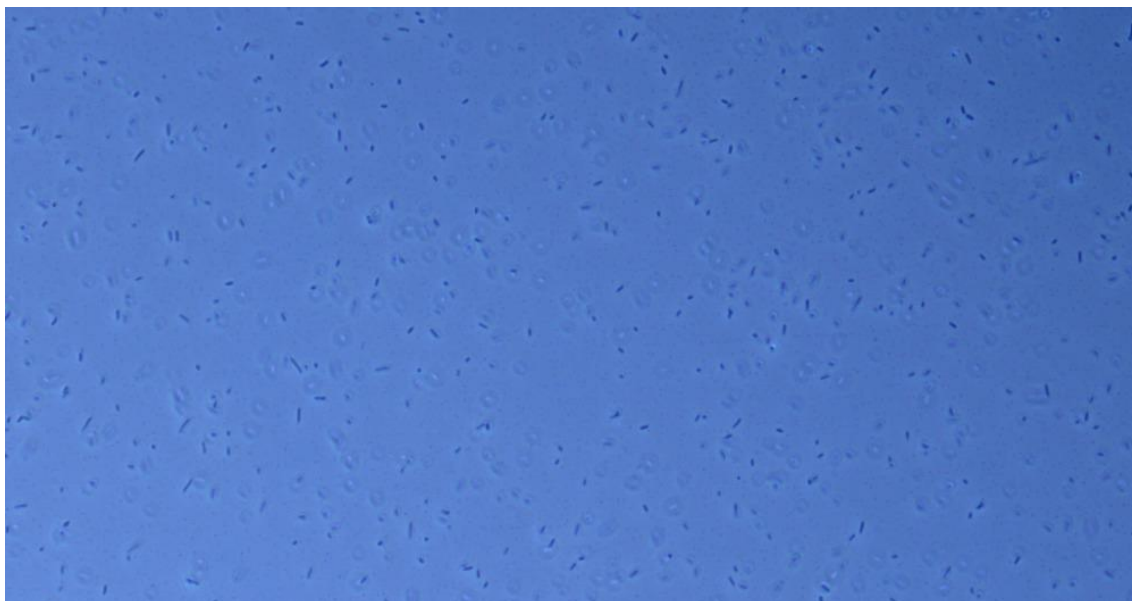
Následně byly dva mililitry kultury přeneseny do 50 ml nového LB tekutého média, kde se po dalších dvou dnech výrazně prosadily a namnožili bakterie jednoho druhu, označeného provizorně jako Z1. V dalším kroku byla kultura kultivována na pevném médiu, na Petriho plastické misce na LB agaru a poté byl proveden křížový roztěr na další misce, kde byla odebrána jedna kolonie, ze které byla získána v tekutém LB médiu čistá kultura kmene Z1.



Obr. 4. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu z trusu netopýra po 24 hodinách kultivace (zvětšení 40x).

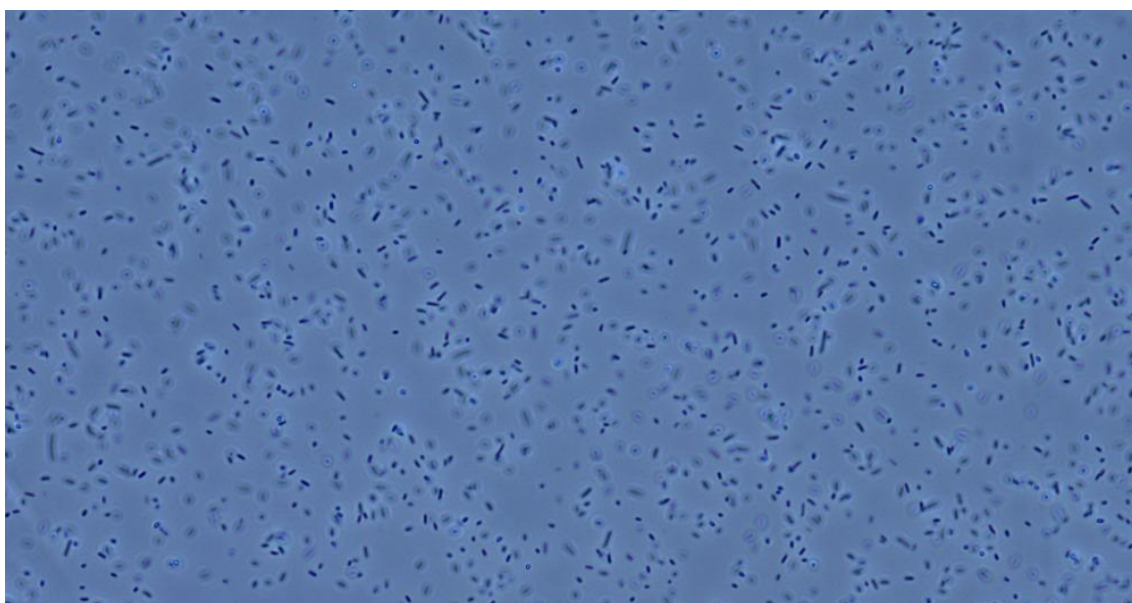


Obr. 5. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu z trusu netopýra po 72 hodinách kultivace (zvětšení 40x).

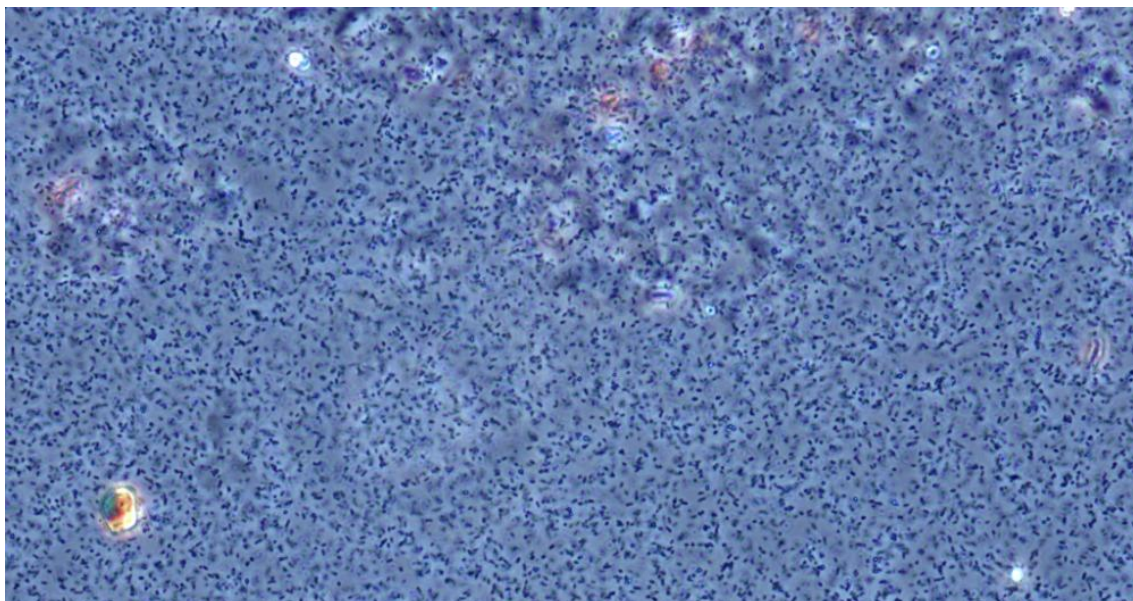


Obr. 6. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu z trusu netopýra po 96 hodinách kultivace (zvětšení 40x).

V další fázi následovalo šlechtění této Z1 na vyšší schopnost likvidování jiných bakterií. Pro šlechtění byla zvolena tradiční *E. coli*. Proces šlechtění je stručně popsán v kapitole „Materiál a metody“. Výsledek šlechtění je na obr. 7., a zvláště 8., kde se dosti obtížně identifikuje některá z původně převažujících *E.coli*.

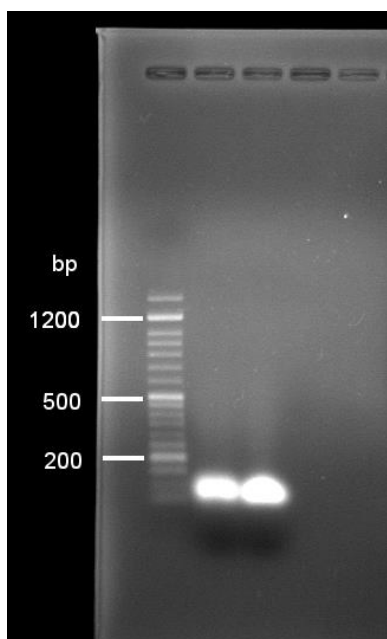


Obr. 7. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu po kultivaci směsi *E.coli* a kmene Z1 na počátku kultivace po 6 hodinách (zvětšení 40x).

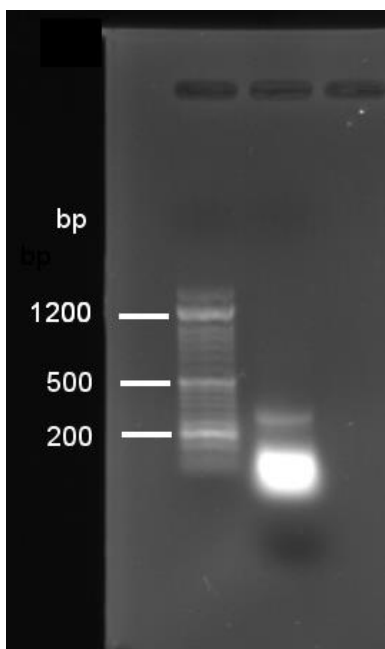


Obr. 8. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu po kultivaci směsi *E.coli* a kmene Z1 po 48 hodinách (zvětšení 40x).

Po vytvoření a namnožení čisté linie byla z bakterií Z1 izolována genomová DNA a následně byla provedena PCR reakce s primery 27F a 1492R. Avšak ani po opakované PCR reakci, při různých teplotách nasedání primerů (annealing), se nepodařilo získat očekávaný produkt (obr. 9.). Teprve při použití jiných primerů pro 16S RNA (515f a 806r) se podařilo získat produkt očekávané délky 292 bp (obr. 10.).



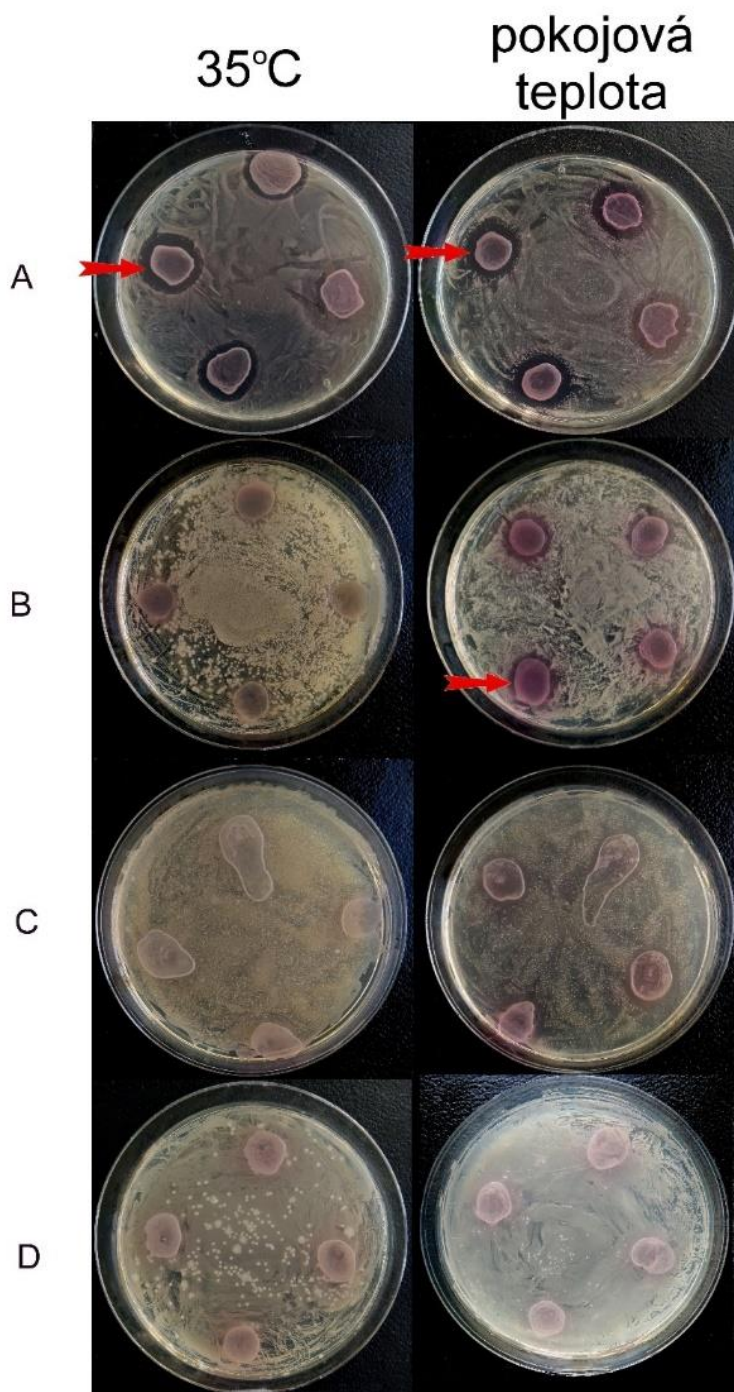
Obr. 9. Agarózový gel po PCR reakci s primery 27F a 1492R.



Obr. 10. Agarózový gel po PCR reakci s primery 515f a 806r.

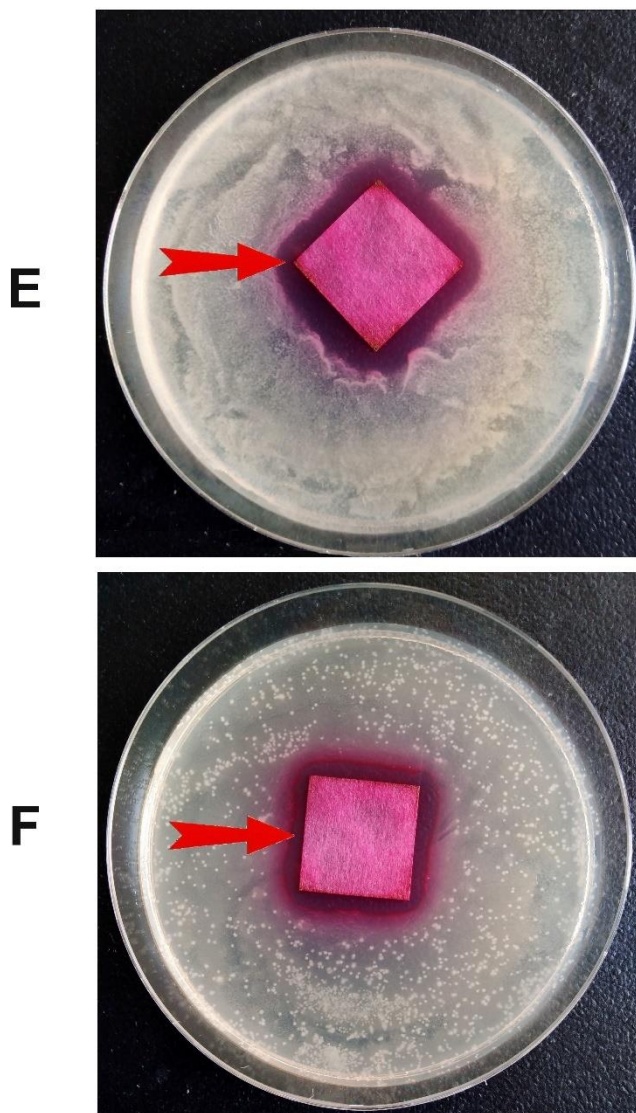
Bakterie Z1 byly také testovány na agarových plotnách, v termostatu při 35 °C, proti *E. coli*, 179, 179M, 1231M a 1231O. Poté byl stejný krok opakován při pokojové teplotě přibližně 24 °C. Ve všech případech se Z1 prosadila. Nejzřetelněji proti 1231M.

Na obr. 11. je vidět, že Z1 je efektivnější při nižší pokojové teplotě, zejména proti 1231M a *E. coli*, proti které byl druh Z1 šlechtěn. Kolem kolonií Z1 je vidět antimikrobiální aktivita a dále je rozeznatelná inhibiční zóna bez bakterie kmene 1231M a *E. coli*. U ostatních testovaných druhů není inhibiční zóna silně rozeznatelná, ale je zřejmé, že na místech, kde byla na plotnách Z1 jsou původně vyšetě bakterie zcela potlačeny. Z porovnání pokusů v teplotách 35 °C a při pokojové teplotě se zdá, že v pokojové teplotě je Z1 účinnější.



Obr. 11. Kompetice kmene Z1 proti dalším bakteriím na agarových LB plotnách při 35 °C a při pokojové teplotě. A - 1231M, B - *E.coli*, C - 179O, D - 179M. Šipka označuje inhibiční zóny.

Surový extrakt z kompetičních kultur izolovaný z LB agaru difundoval z filtračního papíru do nového agaru s nárůstem kultury kmene 1231M a *E. coli* a projevil se vytvořením inhibičních zón (obr. 12.), což se dá považovat za důkaz úspěšné izolace baktericidní látky, nebo aspoň její části, produkované kmenem Z1. Na plotně s *E. coli* se objevila kontaminace ve formě dalších kolonií, nicméně surový extrakt inhiboval i tyto bakterie.



Obr. 12. Aplikace diskové difúzní metody pomocí čtverečků filtračního papíru s nasáklým extraktem z agaru po kompetici Z1 s dalšími kmeny. E – čtvereček na kultuře kmene 1231M, F – čtvereček na kultuře *E. coli*, (červená barva pochází z neutrální červeně přítomné v některých agarových plotnách). Šipky označují inhibiční zóny.

Sekvenováním bylo určeno, že bakterie Z1 patří do rodu *Pantoea* (Tab.1), shoda činí 82.31 %, ovšem nepodařilo se určení do druhu. Systematika rodu je už sice přehlednější než dříve, nicméně zařazení není snadné, rod se skládá z 25 popsáných druhů a dvou poddruhů (Tambong 2019). V současné době nelze vyloučit, že se jedná o nový, doposud nepopsaný druh. Sekvenováním byly také určeny další kmeny 179, 179M, 1231M, 1231O, viz Tab. 1.

Tab. 1: Výsledky sekvenování na sekvenátoru Illumina použitých na neznámých bakteriích pro kompetici s Z1

Z1

	Počet přečtení sekvence
Název	(% klasifikovaných přečtení)
<i>Pantoea</i> sp. 57917	610170 (82.31%)

179

	Počet přečtení sekvence
Název	(% klasifikovaných přečtení)
<i>Acinetobacter pittii</i>	81566 (22.55%)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	49660 (13.73%)
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	29366 (8.12%)
<i>Massilia timonae</i>	5798 (1.6%)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	5702 (1.58%)
<i>Pantoea</i> sp. 57917	4794 (1.33%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2120 (0.59%)

179M

Název	Počet přečtení sekvence (% klasifikovaných přečtení)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	172488 (34.16%)
<i>Acinetobacter pittii</i>	115642 (22.9%)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8568 (1.7%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4682 (0.93%)
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	1362 (0.27%)
<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	572 (0.11%)

1231M

Název	Počet přečtení sekvence (% klasifikovaných přečtení)
<i>Bacillus simplex</i>	613112 (59.69%)
<i>Bacillus megaterium</i>	54958 (5.35%)
<i>Bacillus cereus</i>	14704 (1.43%)
<i>Pantoea sp. 57917</i>	4186 (0.41%)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	2336 (0.23%)

6.8 Diskuse

Hledání nových druhů antibiotik se nesporně pokládá za důležitý výzkum. Ovšem řada takto objevených látek nemusí být použitelná v lékařské praxi, protože mohou být pro člověka, či jiné savce škodlivé, případně až toxické. Přesto je identifikace nových baktericidních složek potřebnou záležitostí. Tato práce zřejmě další takovouto látku prokazuje, i když zatím bez bližší identifikace.

Byl získán nový druh bakterie z přírodního prostředí na základě bakteriální kompetice. Většina takových prostředí ukrývá rozmanité sbírky mikrobiálních druhů. V těchto komunitách bakterie soutěží se svými sousedy o prostor a zdroje. Laboratorní experimenty s čistými a smíšenými kulturami odhalily mnoho aktivních mechanismů, kterými mohou bakterie poškodit nebo zabít jiné mikroorganismy. Rostoucí množství teoretických a experimentálních populačních studií navíc naznačuje, že interakce v rámci bakteriálních druhů, případně mezi druhy, mohou mít hluboký dopad na přírodní konkurenční vztahy (Hibbing et al. 2010).

6.8.1 Konkurenční interakce

Bakterie jsou evolučně vybaveny pro vzájemnou kompetici. Mikrobiální organismy soutěží o přežití v přirozeně smíšených komunitách a různých prostředích. I když mezi druhy může docházet ke spolupráci, zřejmě jsou častější konkurenční mezidruhové interakce (Stubbendieck et al. 2016). V našem případě byly tyto vlastnosti využity pro nalezení bakterie, která je nejlépe schopná v daném prostředí ostatní konkurenční druhy potlačit. Dalším krokem, bylo tyto vlastnosti posílit. Podle očekávání se potvrdilo, že lze baktericidní vlastnosti rozvíjet šlechtěním, samotný proces šlechtění je u bakterií snadný a rychlý, v tomto případě, šlo o boj o potravní zdroje v LB médiu a stálé snižování počtu bakterií Z1 v konkurenci *E.coli*, což vyvolalo selekční tlak poměrně významným způsobem. I když není jasné, zda se jen zvýšila produkce vylučované látky nebo se i nějakým způsobem díky selekci změnila její kvalita.

Jako důkaz toho, že se jedná o látku, která je bakteriemi Z1 vylučována lze považovat inhibiční zónu, která vzniká vypouštěním určité antimikrobiální látky do okolí kolonií. Zřetelně je rozeznatelná v případě kompetice s *E. coli*, proti které byla Z1 šlechtěna, i když silná je i v případě s kmenem 1231M (snad nějaký rod *Bacillus*, viz Tab.1). Pokud by se jednalo o nějaký druh přímé predace, pravděpodobně by tato zóna nevznikala. Samozřejmě nelze vyloučit, ani oba způsoby potlačování konkurenčních bakterií. Nicméně inhibiční zóna není příliš velká, možná by bylo vhodné při dalším výzkumu v budoucnu pokračovat v procesu šlechtění. Případně je možné také zkusit jiné druhy pro kompetiční šlechtění.

Nevyřešenou otázkou zůstává, jakou to vlastně bakterie Z1 vylučuje látku, což je také hlavní cíl případného dalšího výzkumu. Inhibiční zóna nebyla příliš velká, přesto jsou bakterie Z1 úspěšní potlačovatelé jiných druhů, jak plyne z pokusů v tekutých médiích.

6.8.2 Produkované látky – antibiotika

Koncentrace antibiotik ale nemusí být příliš výrazná, a přece může být účinná, případně hrát různé role. Koncentrace antibiotik postačující k dostatečné inhibici růstu mohou být v přirozeném prostředí malé. Při vysokých koncentracích vykazují antibiotika antimikrobiální aktivitu na vnímavých buňkách, zatímco subinhibiční koncentrace indukují u bakterií různé biologické reakce (Bernier et al. 2013). Některá antibiotika mohou fungovat i v omezeném množství, např. erythromycin a rifampicin, která v nízkých koncentracích mění způsob bakteriální transkripce, což bylo dokázáno u *Salmonella typhimurium*. Analýza knihovny *S. typhimurium*, kde bylo 6500 klonů ukázala, že může být ovlivněno až 5 % promotorů, které se týkaly některých známých genů, které mají různé funkce, ale ovlivnění zahrnovalo také promotory genů, u kterých funkce zatím není známa (Goh et al. 2002). Ovšem antibiotika se mohou uplatnit i jako mezibuněčné signály. V neletálních koncentracích mohou bakterie vnímat antibiotika jako extracelulární chemikálie a spouštět různé buněčné reakce, které mohou zahrnovat změněný profil antibiotické rezistence/tolerance. V přirozeném prostředí jsou mikroorganismy typicky v polymikrobiálních komunitách a antibiotiky zprostředkované interakce mezi druhy mohou hrát významnou roli ve struktuře a funkci bakteriálního společenství (Bernier et al. 2013). Signalizace malých molekul a další formy interakce buňka-buňka, agonistické i antagonistické, jsou charakteristické pro všechny formy mikrobiálního života a jsou zodpovědné za většinu interakcí v rámci mikrobiomů a mezi nimi (Davies et al. 2013). Některé mikroorganismy věnují až 15 % obsahu svého genomu produkci specializovaných mikrobiálních metabolitů (SM) (Davies et al. 2013), které slouží k mezibakteriálním interakcím. Z hlediska předkládané práce jsou důležité antibakteriální SM. Je třeba uvažovat, že jedna bakterie může produkovat řadu sloučenin sekundárních metabolitů, například výzkum antifungálních a antibakteriálních vlastností surového extraktu ze *Streptomyces* sp. (kmen Gö 40/10) odhalil přítomnost nejméně 30 různých sloučenin. Deset z izolovaných 18 identifikovaných metabolitů bylo do té doby neznámých (Schiewe et al. 1999).

Produkce přírodních antibiotik je spojena zejména s aktinomycetami. I když není jasné proč. Kmeny *Streptomyces hygroscopicus* tvoří téměř 200 antibiotik. Jeden kmen *Micromonospora* může produkovat 48 aminoglykosidových antibiotik. Kmeny *Streptomyces griseus* produkují přes 40 různých antibiotik. *Myxobacterium xanthus* věnuje 9 % svého genomu produkci sekundárních metabolitů, což je dvakrát více než *S. coelicolor*. Myxobakterie jako skupina produkují více než 300 antibiotik (Dworkin 2007, Demain 2014).

Produkovaná látka kmene Z1 může patřit mezi již popsané či dokonce běžně používaná antibiotika, kterých je známo poměrně velké množství. Na trhu je víc než 350 látek antimikrobiální látek. Je však také možné, že je produkovanou látkou směs baktericidních látek, jako např. u výše zmíněného druhu *Streptomyces hygroscopicus* (Schiewe et al. 1999). Podobně komplex *Burkholderia cepacia* zahrnuje skupinu 24 druhů, které vykazují pozoruhodný antagonismus proti bakteriím, kvasinkám a houbám včetně dalších kmenů *B. cepacia*, multirezistentních lidských patogenů a rostlinných patogenů. Analýza genomu kmene TAtl-371 odhalila několik genů zapojených do produkce antagonistických sloučenin: siderofory, bakteriociny a hydrolytické enzymy, přičemž vylučované látky vykazují jednotlivě odlišné inhibiční schopnosti (Rojas-Rojas et al. 2018). U Z1 může existovat podobný komplex vylučovaných látek. Nicméně aspoň část je rozpustná v ethylesteru kyseliny octové a může být v budoucnu chemicky určena a separována např. pomocí chromatografie na tenké vrstvě či dalších metod do čisté formy.

6.8.3 Prostředí získaných bakterií

Co se týká přirozeného prostředí kmene Z1 není jasné, zda je skutečně běžnou součástí mikroorganismů netopýrů, hlavně pro vyšší účinnost Z1 při nižších teplotách. Netopýři jsou schopni rychle měnit svou tělesnou teplotu, přičemž teploty během aktivního letu dosahují více než 40 °C a během hibernace klesají na 0–12 °C (Bandouchova et al. 2020). Měli bychom čekat stejné fungování Z1 při poměrně širokém rozsahu teplot, ale to nenastává. Nelze však v této chvíli rozhodnout, zda to je specifikum této bakterie, nebo důsledek šlechtění v pokojové teplotě. Je třeba také vzít do úvahy možnost, že se bakterie náhodně vyskytovala na netopýřím trusu a s netopýry nijak úzce nesouvisí.

6.8.4 Určení Z1 do rodu *Pantoea*

Sekvenováním byla neznámá bakterie Z1 zařazena do rodu *Pantoea* (viz. Tab 1). Členové rodu *Pantoea* jsou nezapouzdřené gramnegativní bakterie, které nevytváří spory a patří do čeledi Enterobacteriaceae. Rod se skládá z 25 popsanych druhů a dvou poddruhů, izolovaných z různých prostředí, jako je voda, půda, člověk, zvířata a rostliny (Deletoile et al., 2009, Tambong et al., 2014, Tambong 2019). Sedm z 25 druhů však bylo nedávno klasifikováno do dvou nových rodů (Tambong 2019). Druhy rodu *Pantoea* zahrnují druhy spojené s rostlinami, buď jako epifyty nebo jako patogeny, některé druhy mohou způsobit také onemocnění u lidí. Nejčastější druh izolovaný z lidí je *Pantoea agglomerans*, který je normálně v přírodě široce rozšířen (Delétoile et al. 2008). *P. agglomerans* je oportunní lidský patogen, který se může vyskytovat sporadicky nebo v ohniscích. Na počátku 70. let 20. století *P. agglomerans*, (tehdy nazývaný *Enterobacter agglomerans*), způsobil rozsáhlou septikémií v USA a Kanadě, která byla způsobena kontaminovanými uzávěry na lahvích s infuzními tekutinami (Delétoile et al. 2008). Je také možné, že některá sekvence naší bakterie Z1 už je známa, existuje 47 genomů *Pantoea* zaznamenaných jako *Pantoea* sp. Ty byly ale analyzovány pomocí jiných sekvencí (*leu* S, MLSA, gDDH, ANI, ANIm a TETRA) (Tambong 2019), aby bylo možné tyto sekvence porovnat s kmenem Z1, bylo by nutné u Z1 sekvenovat další úseky DNA.

6.8.5 Baktericidní a jiné vlastnosti rodu *Pantoea*

Bakterie však byla izolována z důvodu získání kompetičně nejsilnější bakterie v daném prostředí. Proto je důležité se zaměřit na baktericidní vlastnosti rodu *Pantoea*. Zdá se, že izolovaná bakterie Z1 se ostatním členům rodu nevyvíká. Některé izolované bakterie z tohoto rodu jsou producenty antibiotik a jsou využívány jako biokontrolní činidla pro zvládání chorob rostlin (Walterson a Stavrínides 2015). Tyto izoláty bakterií produkují antimikrobiální látky, které už existují jako komerční produkty biologické kontroly, např. BlightBan C9-1. Tento prostředek slouží ke kontrole plísně u jabloní a hrušní (Johnson et al. 2000, Walterson a Stavrínides 2015). Bakterie *Pantoea agglomerans* byla s několika dalšími s úspěchem využita k posílení obranyschopnosti rostlin. Například funguje jako ochrana rajčete před hád'átkem jižním *Meloidogyne incognita* (Munif et al. 2001). *Pantoea agglomerans* také potlačovala několik

onemocnění způsobených půdními rostlinnými patogeny, u okurky proti antraknóze způsobené *Colletotrichum orbiculare* a u *Arabidopsis* proti bakteriálním skvrnám způsobeným *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* KD4326 (Zhang et al. 1998). Další izolované druhy mají bioremediační potenciál se schopností degradovat herbicidy bez vytváření toxických vedlejších produktů. Bylo zjištěno, že druh *Pantoea ananatis* rychle a úplně degraduje herbicid mesotrion (Pileggi et al. 2012). Některé izoláty z *Pantoea agglomerans* 1 (IP-PA1) byly také využity jako imunopotenciátory pro vývoj podpůrných léků na terapii melanomu (Hebishima et al. 2011). Z *Pantoea agglomerans* pochází lipopolysacharid, IP-PA1. Orální podání IP-PA1 prokázalo aktivaci makrofágů (priming) a ochranné účinky proti infekci, alergii a rakovině, bez jakýchkoli vedlejších účinků (Nakata et al. 2011). Bakterie *Pantoea* mají další využití. Bylo prokázáno, že půdní izoláty rodu *Pantoea* disponují schopnostmi, které zahrnují redukci kovů (Francis et al. 2000). Podařilo se získat kmen půdní bakterie *Pantoea* NII-153 využívající fenol jako jediný zdroj uhlíku. Kmen vykazoval vysokou toleranci ke koncentraci fenolu (900 mg l) a lze ho využít pro biologické čištění průmyslových odpadních vod obsahujících vysoce pevný fenol a pro bioremediaci půd kontaminovaných fenolem (Dastager et al. 2009). Dále jsou bakterie *Pantoea* využitelné k solubilizaci, (nepravému rozpouštění látek v kapalině, ve které je látka jinak téměř nerozpustná), což se ukázalo u nerozpustných fosforečnanů (Son et al. 2006). Bakterie *Pantoea* byly rovněž izolovány z petrochemické čistírny odpadních vod, kde *Pantoea* sp. TEM18 vykazovala největší toleranci k mědi. Kmen byl schopen přežít v médiu obsahujícím měď v koncentracích až 180 mg/l. Kromě mědi se také se prokázala schopnost absorbovat, akumulovat a tolerovat významné hladiny chromu a kadmia (Ozdemir et al. 2004). Uniklá ropa představuje problém jak v mořském, tak v suchozemském prostředí. Pokud možno je třeba ji šetrně zlikvidovat. Fakultativně anaerobní *Pantoea* sp. kmen A-13, izolovaný z ornitogenní půdy Dewartovy ostrovy (Frazierovy ostrovy) v Antarktidě, je schopen používat jako jediný zdroj uhlíku n-parafiny nebo petrolej, z čehož vytváří glykolipidové biosurfaktanty a tyto biosurfaktanty zase vedou k emulgaci a následné biologické degradaci škodlivých ropných uhlovodíků (Vasileva-Tonkova a Gesheva 2007). Schopností degradovat toxické ropné uhlovodíky na méně škodlivé sloučeniny je slibnou alternativou k současně používaným chemickým surfaktantům (Vasileva-Tonkova a Gesheva 2007, Walterson a Stavrínides 2015).

Všudypřítomnost, všestrannost a genetická ovladatelnost izolátů *Pantoea* z nich činí ideální skupinu nejen pro zkoumání specializovaných adaptací a oportunistu, ale také pro vývoj komerčně relevantních lékařských, zemědělských a ekologických produktů (Walterson a Stavrínides 2015). Námí získaný kmen Z1 nabízí zejména potlačení jiných druhů bakterií a další studium by mělo být zaměřeno hlavně tímto směrem.

6.8.6 Ostatní bakterie použité pro kompetici

Vedlejším problémem, který se netýká tématu práce je otázka určení bakterií, které byly použity pro kompetici. Podobnost se známými druhy na úrovni 22,55 %, 34,16 % a 59,69 % není velká, ale je otázka proč. Že by se ve všech případech jednalo o nové druhy, nebo byla přesnost sekvenování na současně velmi dokonalém přístroji tak omezená? Je však možné, že se jedná o pozorování evoluce v praxi. Oblast genu 16S rRNA, která se používá k identifikaci organismů se zabývá hypervariabilní oblastí uvnitř konzervovaného genu. Bakteriální kmeny byly získány ze zubů únětické kultury (zhruba 2300 až 1700 let př.n.l.). Pokud se podařilo zachytit a oživit opravdu původní bakterie, musíme počítat s tím, že došlo za zhruba 4000 let k nahromadění nových mutací v hypervariabilních oblastech. Samozřejmě musíme vzít i v úvahu nepřesnosti metodiky. Johnson et al. (2019) upozorňuje, že zacílení na variabilní oblasti 16S pomocí sekvenačních platforem pro krátké čtení nemůže dosáhnout taxonomického rozlišení poskytnutého sekvenováním celého (~1500 bp) genu. V zásadě, pokud není sekvenována celá oblast 1500 bp, taxonomické rozlišení nemusí být dostatečně přesné a je nutno počítat s intragenomickou variací mezi kopiemi genu 16S (Johnson et al. 2019). Použité sekvenování v této studii, celou oblast nezahrnulo.

Další fakt, který do určité míry zpochybňuje „evoluci v praxi“ je, že se nejedná o lidské bakterie, které byly očekávány při růstu na LB médiu ze zubního materiálu, ale o bakterie celkem obecně se vyskytují v přírodě. Tento problém má řešení snad jen v další a rozsáhlejší kultivaci bakterií z tohoto materiálu. Existence tisíce let starých lidských bakterií, byla prokázána pomocí sekvenování Illumina ze vzorků zubního kamene. Studie byla provedena na materiálu z Japonska, z období lovců a sběračů kultury Jomon, starých přibližně 3000 let a ze zemědělské kultury z období Edo 400-150 BP (Eisenhofer et al. 2020). Ale bylo provedeno jen sekvenování DNA, o kultivaci se autoři nepokusili.

6.8.7 Budoucí výzkum

Hlavním cílem práce je však antibakteriální působení kmene Z1. Zjistit o jakou jde látku by mělo být cílem další studie. Získání surového extraktu, baktericidní látky, nebo její některé frakce, je velmi nadějný začátek pro další analýzy. Mikroby jsou velmi důležití při výrobě léčiv z přírodních produktů. Z 23 000 účinných látek z mikroorganismů, tj. antimikrobiálních, antivirotik, cytotoxických a imunosupresivních látek, tvoří 42 % houby a 32 % vláknité bakterie, aktinomycety (Demain 2014). Bude třeba otestovat, jaké jsou látky vypouštěné Z1, zda se podobají klasickým antibiotikům, nebo jde například o nějaké proteiny. Účinnost peptidů obecně přitahuje pozornost. Antimikrobiální peptidy si v posledních letech získaly zvýšený zájem mezi vědci, zdravotníky a farmaceutickými společnostmi díky jejich terapeutickému potenciálu. Jedná se o nízkomolekulární proteiny se širokým rozsahem antimikrobiálních a imunomodulačních aktivit proti infekčním bakteriím (gram pozitivních i gram negativních), virům a houbám. Neschopnost mikroorganismů vyvinout si rezistenci proti většině antimikrobiálních peptidů z nich udělala účinný produkt, který může výrazně ovlivnit novou éru antimikrobiálních látek. Kromě toho tyto peptidy také demonstrují zvýšenou účinnost, vysokou specifitu, sníženou lékovou interakci, nízkou toxicitu, biologickou diverzitu a vlastnosti přímého útoku (Boparai a Sharma 2020).

Je otázkou, zda může být vylučovaná látka v budoucnu použita jako léčivo, pokud uvážíme, že většina objevených baktericidních látek je jako léčivo nevhodná. Nicméně v této fázi si objevené baktericidní produkty *Pantoea* Z1 zaslouží další podrobný výzkum.

Závěr

Bakalářská práce byla zaměřena na antimikrobiální aktivitu bakterií z hlediska kontaktní kompetice či produkce bioaktivních látek v podobě specializovaných či přírodních produktů. Práce byla napsána s cílem izolace a identifikace neznámého bakteriálního druhu, vymezení jeho antimikrobiálních schopností a separace látky, kterou produkuje. Vzorek bakterií použitý při výzkumu byl získán z trusu netopýra velkého (*Myotis myotis*) z hradu Točnick. Pro výzkum byla využita celá řada laboratorních metod, které umožnily určit izolované bakterie a zobrazit látku, kterou samy produkují.

Získané bakterie byly nejprve kultivovány v tekutých i pevných médiích. Poté byla uskutečněna kompetice bakterií o zdroje a přežití, kdy byl vítězný kmen izolovaných bakterií kultivován a označen jako Z1. Pro posílení inhibičních schopností Z1 bylo také provedeno šlechtění za pomoci kompetice proti bakterii *E.coli* jehož výsledkem byla silná inhibice výskytu bakterií tohoto druhu. Současně byla prováděna kompetice *E.coli* a několika dalších bakteriálních kmenů označených 179, 179M, 1231M a 1231O na agarových plotnách vůči Z1. Ve všech uvedených případech se Z1 prosadila, nejvíce proti 1231M.

Následná izolace DNA získaných bakterií z netopýřího trusu byla provedena metodou fenol-chloroformové extrakce a využitím magnetických kuliček, jejichž cílem bylo získání co nejlepší DNA. PCR byla provedena opakovaně, ale teprve až při použití primerů pro 16S RNA (515f a 806r) se podařilo získat požadovaný produkt. Pro sekvenování byl využit sekvenátor Illumina a srovnání výsledků s jinými druhy bylo provedeno v databázi BLAST. Za pomoci této metody byla určena bakterie Z1 do rodu *Pantonea*, určení do druhu se bohužel nepovedlo provést. Je pravděpodobné, že se jedná o nový druh tohoto rodu. Momentálně tedy nelze určit, zdali se jedná o nový, doposud nepopsaný druh.

V neposlední řadě byla provedena izolace produkované antimikrobiální látky smícháním agaru, na kterém byla bakterie Z1, s ethylesterem kyseliny octové. Následně byly do upravené koncentrované směsi ponořeny čtverečky filtračního papíru, které byli po jejich vysušení položeny na LB agarové plotny s rozetřenými kulturami *E.coli* a kmene 1231M za účelem zjištění antimikrobiální aktivity. Výsledkem bylo projevení

inhibičních zón, což je považováno za důkaz úspěšné izolace baktericidní látky produkované kmenem Z1.

Výsledkem této práce je identifikace kmene bakterií Z1 do rodu a prokázání produkce baktericidní látky, kterou je potencionálně možné v budoucnu využít pro další výzkum či možné zařazení do medicínské praxe. Z důvodu dosavadního neurčení druhu a charakteru produkované látky totiž momentálně nelze s jistotou říci, zdali se jedná o látku patřící mezi již popsaná nebo běžně používaná antibiotika. Hlavním cílem další studie by bylo zjištění, o jakou látku se konkrétně jedná a eventuálně lze také během další studie určit Z1 do konkrétního druhu, případně stanovit druh nový.

Resumé

Bakalářská práce je zaměřena na mikroorganismy, konkrétně bakterie, jejich charakteristiky, struktury a tvary buněk. Dále jsou v práci popsány specializované metabolity či přírodní produkty, z hlediska jejich funkce jakožto léčiv, a strategií pro jejich další objevování. Nejvýznamnějším z nich jsou antibiotika, kterým je v práci věnována pro jejich důležitost samostatná kapitola, která zahrnuje jejich objev, klasifikaci, dělení a samotné důvody, proč jsou mikroorganismy produkovány. Navazujícím a zároveň hlavním tématem práce je antimikrobiální aktivita bakterií. Ta je hodnocena jak z pohledu kontaktní či nekontaktní formy, tak i z hlediska produkce antimikrobiálních sloučenin. Uvedeny jsou i možné příklady antimikrobiální aktivity v různých prostředích. Nedílnou součástí práce je uvedení použitých laboratorních metod. Zde je zahrnuta kultivace bakterií na tekutých i pevných médiích; izolace DNA v souvislosti s využitím magnetických částic; sekvenování a metoda PCR. Cílem práce bylo identifikovat další bakterii schopnou vyrábět dosud neznámé baktericidní látky, její izolace a určení rozsahu jejího působení. Jako zdrojový materiál byl použit netopýří trus, jako zajímavý materiál dosud v podobných pracích opomíjený. Všechna tato témata jsou zahrnuta v praktické části bakalářské práce.

Summary

The bachelor thesis focuses on microorganisms, specifically bacteria, their characteristics, structures and cell shapes. Furthermore, the thesis describes specialized metabolites or natural products, in terms of their function as drugs, and strategies for their further discovery. The most important of these are antibiotics, which are given a chapter in the thesis due to their importance, covering their discovery, classification, division and the very reasons why they are produced by microorganisms. The antimicrobial activity of bacteria is a follow-up and the main topic of the thesis. This is evaluated both in terms of contact or non-contact form and in terms of predation and production of antimicrobial compounds. Possible examples of antimicrobial activity in different environments are also given. An integral part of the work is the presentation of the laboratory methods used. This includes the cultivation of the bacteria on liquid and solid media; DNA isolation in the context of magnetic particle use; sequencing and the PCR method. The aim of the work was to identify another bacterium capable of producing previously unknown bactericidal substances, its isolation and determination of the extent of its activity. Bat droppings were used as source material, an interesting material previously neglected in similar work. All these topics are covered in the practical part of the bachelor thesis.

Seznam použitých zdrojů

- Adesiyun, A. A., Stewart-Johnson, A. a Thompson, N. N. 2009. Isolation of enteric pathogens from bats in Trinidad. *Journal of wildlife diseases* 45(4), 952–961.
- Ang, M. L., Murima, P., a Pethe, K. 2015. Next-generation antimicrobials: from chemical biology to first-in-class drugs. *Archives of pharmacal research* 38(9), 1702–1717.
- Aoki, S. K., Diner, E. J., de Roodenbeke, C. T., Burgess, B. R., Poole, S. J., Braaten, B. A., Jones, A. M., Webb, J. S., Hayes, C. S., Cotter, P. A. a Low, D. A. 2010. A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature* 468(7322), 439–442.
- Aoki, S. K., Pamma, R., Hernday, A. D., Bickham, J. E., Braaten, B. A. a Low, D. A. 2005. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)* 309(5738), 1245–1248.
- Arifuzzaman, M., Khatun, M. R. a Rahman, H. 2010. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *Afr J Biotechnol* 9, 4615-4619.
- Asagabaldan, M. A., Ayuningrum, D., Kristiana, R., Sabdono, A., Radjasa, O. K. a Trianto, A. 2017. Identification and Antibacterial Activity of Bacteria Isolated from Marine Sponge *Haliclona (Reniera)* sp. against Multi-Drug Resistant Human Pathogen. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 55, 012019.
- Baltz R. H. 2008. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current opinion in pharmacology* 8(5), 557–563.
- Bandouchova, H., Zukal, J., Linhart, P., Berkova, H., Brichta, J., Kovacova, V., Kubickova, A., Abdelsalam, E., Bartonička, T., Zajíčková, R., & Pikula, J. 2020. Low seasonal variation in greater mouse-eared bat (*Myotis myotis*) blood parameters. *PloS one* 15(7), e0234784.
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S. a Williams, D. A. 2017. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32(1), 9-25.

- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A. a Vávra, J. 1996. *Mikrobiologie*. Marvil. Praha.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth S., Huang C. H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M. A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J. a Hopwood, D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417(6885), 141–147.
- Bérdy J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of antibiotics* 65(8), 385–395.
- Berleman, J. a Auer, M. 2013. The role of bacterial outer membrane vesicles for intra – and interspecies delivery. *Environmental microbiology* 15(2), 347–354.
- Bernier, S. P., & Surette, M. G. 2013. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Frontiers in microbiology* 4, 20.
- Birch, L. C. 1957. The Meanings of Competition. *The American Naturalist* 91(856), 5–18.
- Boparai, J. K., & Sharma, P. K. 2020. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein and peptide letters* 27(1), 4–16.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1(Suppl 1), 4516–4522.
- Cline, J., Braman, J. C. a Hogrefe, H. H. 1996. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic acids research* 24(18), 3546–3551.
- Dafourcq, R., Chalkiadakis, E., Fauchon, M., Deslandes, E., Kerjean, V., Chanteau, S., Petit, E., Guezennec, J. a Dupont-Rouzeyrol, M. 2013. Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential

antibacterial activity from a marine coastal environment from New Caledonia. *Letters in Applied Microbiology* 58(2), 102–108.

- Dastager, S., Deepa, C., Pandey, A. 2009. Isolation and Characterization of High-Strength Phenol-Degrading Novel Bacterium of the *Pantoea* Genus. *Bioremed* 13(4), 171-179
- Davies J. 2013. Specialized microbial metabolites: functions and origins. *The Journal of antibiotics* 66(7), 361–364.
- Davies, J. 2013. Specialized microbial metabolites: functions and origins. *The Journal of antibiotics* 66(7), 361–364.
- Dehnad, A., Parsa, L., Bakhshi, R., Soofiani, S. A. a Mokhtarzadeh, A. 2010. Investigation antibacterial activity of Streptomyces isolates from soil samples, West of Iran. *Afr J Microbiol* 4, 1542-1549,
- Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., Arlet, G., & Brisse, S. 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of clinical microbiology* 47(2), 300–310.
- Demain A. L. 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41(2), 185–201.
- Demain, A. L. 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 41(2), 185–201.
- Denizci, A. A. 1996. A study on the detection and production of antibacterial antibiotics from Actinomycetes which isolated from the soils of Aegean and Eastern Black Sea regions of Turkey. MS, Doktorská práce, depon. in Institute of Science and Technology Ege University. Turecko.
- Dobrovolná, L. 2010. Biochemické aspekty užívání antibiotik. MS. Bakalářská práce. depon. in Masarykovs Univerzita v Brně, Fakulta Pedagogická, 9-18. Brno.
- Dworkin, M., 2007. Lingering puzzles about mycobacteria. *Microbe-American Society for Microbiology* 2(1), p.18.
- Eisenhofer, R., Kanzawa-Kiriyama, H., Shinoda, K. I., & Weyrich, L. S. 2020. Investigating the demographic history of Japan using ancient oral

microbiota. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 375(1812), 20190578.

- Falkinham, J. O., Wall, T. E., Tanner, J. R., Tawaha, K., Alali, F. Q., Li, C. a Oberlies, N. H. 2009. Proliferation of antibiotic-producing bacteria and concomitant antibiotic production as the basis for the antibiotic activity of Jordan's red soils. *Appl Environ Microbiol* 75, 2735-2741.
- Francis, C. A., Obratsova, A. Y., & Tebo, B. M. (2000). Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Applied and environmental microbiology* 66(2), 543–548.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology* 74(8), 2461–2470.
- Frieri, M., Kumar, K. a Boutin, A. 2017. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health* 10(4), 369-378.
- Goh, E. B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M. G., & Davies, J. 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(26), 17025–17030.
- Green, M. R. a Sambrook, J. 2012. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Hebishima, T., Matsumoto, Y., Watanabe, G., Soma, G., Kohchi, C., Taya, K., Hayashi, Y., & Hirota, Y. 2011. Oral administration of immunopotentiator from *Pantoea agglomerans* 1 (IP-PA1) improves the survival of B16 melanoma-inoculated model mice. *Experimental animals* 60(2), 101–109.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. a Peterson, S. B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews. Microbiology* 8(1), 15–25.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews. Microbiology* 8(1), 15–25.
- Hungate, B. A., Marks, J. C., Power, M. E., Schwartz, E., van Groenigen, K. J., Blazewicz, S. J., Chuckran, P., Dijkstra, P., Finley, B. K., Firestone, M. K.,

- Foley, M., Greenlon, A., Hayer, M., Hofmockel, K. S., Koch, B. J., Mack, M. C., Mau, R. L., Miller, S. N., Morrissey, E. M., Propster, J. R., Purcell, A. M., Sieradzki, E., Starr, E. P., Stone, B. W. G., Terrer, C., Pett-Ridge, J. 2021. The Functional Significance of Bacterial Predators. *mBio* 12(2), e00466-21.
- Hutchings, M., Truman, A. a Wilkinson, B. 2019. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* 51, 72-80.
 - Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications* 10(1), 5029.
 - Johnson, K. B., Stockwell, V. O., Sawyer, T. L., & Sugar, D. 2000. Assessment of Environmental Factors Influencing Growth and Spread of *Pantoea* agglomerans on and Among Blossoms of Pear and Apple. *Phytopathology* 90(11), 1285–1294.
 - Katz, L., Baltz, R., H. 2016. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 43(2-3), 155-176.
 - Krausz, K. L. a Bose, J. L. 2016. Rapid Isolation of DNA from *Staphylococcus*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1373, 59–62.
 - Lambert, C. a Sockett, R. E. 2013. Nucleases in *Bdellovibrio bacteriovorus* contribute towards efficient self-biofilm formation and eradication of preformed prey biofilms. *FEMS microbiology letters* 340(2), 109–116.
 - Lin, J. W., Hsu, Y. M., Chomel, B. B., Lin, L. K., Pei, J. C., Wu, S. H. a Chang, C. C. 2012. Identification of novel *Bartonella* spp. in bats and evidence of Asian gray shrew as a new potential reservoir of *Bartonella*. *Veterinary microbiology* 156(1-2), 119–126.
 - McGinn, S., Gut, I. G. 2013. DNA sequencing – spanning the generations. *New BiotechnoLogy* 30(4), 366-372.
 - Mühlendorfer, K. 2012. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. *Zoonoses and Public Health* 60(1), 93-103.
 - Munif, A., Hallmann, J., & Sikora, R. A. 2001. Induced systemic resistance of selected endophytic bacteria against *Meloidogyne incognita* on

- tomato. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)* 66(2b), 663–669.
- Nakata, K., Inagawa, H., & Soma, G. 2011. Lipopolysaccharide IP-PA1 from *Pantoea agglomerans* prevents suppression of macrophage function in stress-induced diseases. *Anticancer research* 31(7), 2437–2440.
 - Němec, M. a Matoulková, D. 2015. *Základy obecné mikrobiologie*. Masarykova univerzita. Brno.
 - Newman, D. J., a Cragg, G. M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 19821 to 2010. *Journal of natural products* 75(3), 311–335.
 - Ozdemir, G., Ceyhan, N., Ozturk, T., Akirmak, F., Cosar, T. 2004, Biosorption of Chromium(VI), Cadmium(II) and Copper(II) by *Pantoea* sp. TEM 18,” *Chemical Engineering Journal* 102(3), 249–253.
 - Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. a Brown, P. O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* 5(7), e177.
 - Patel, P. S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P. a Mayerl, F. 1995. Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *The Journal of antibiotics* 48(9), 997–1003.
 - Pečová, M., Zajoncová, L., Poláková, K., Čuda, J., Šafaříková, M., Šebela, M. a Šafařík, I. 2010. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy* 105, 524–530.
 - Pileggi, M., Pileggi, S. A., Olchanheski, L. R., da Silva, P. A., Munoz Gonzalez, A. M., Koskinen, W. C., Barber, B., & Sadowsky, M. J. 2012. Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere* 86(11), 1127–1132.
 - Pipe, L. Z., Grimson M. J. 2008. Spatial-temporal modelling of bacterial colony growth on solid media. *Molecular Biosystems* 3(4), 192–198.
 - Powers, M. J., Sanabria-Valentín, E., Bowers, A. A. a Shank, E. A. 2015. Inhibition of Cell Differentiation in *Bacillus subtilis* by *Pseudomonas protegens*. *Journal of bacteriology* 197(13), 2129–2138.

- Prashanthi, R., Shreevatsa, G. K., Krupalini, S., Manoj, L. 2021. Isolation, characterization, and molecular identification of soil bacteria showing antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *Journal, genetic engineering & biotechnology* 19(1), 120.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. a Newman, D. K. 2006. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature chemical biology* 2(2), 71–78.
- Rendueles, O., & Ghigo, J. M. 2015. Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. *Microbiology spectrum* 3(3), 10.1128/microbiolspec.MB-0009-2014.
- Rojas-Rojas, F. U., Salazar-Gómez, A., Vargas-Díaz, M. E., Vásquez-Murrieta, M. S., Hirsch, A. M., De Mot, R., Ghequire, M., Ibarra, J. A. a Estrada-de Los Santos, P. 2018. Broad-spectrum antimicrobial activity by *Burkholderia cenocepacia* TAtl-371, a strain isolated from the tomato rhizosphere. *Microbiology (Reading)* 164(9), 1072–1086.
- Rojas-Rojas, F. U., Salazar-Gómez, A., Vargas-Díaz, M. E., Vásquez-Murrieta, M. S., Hirsch, A. M., De Mot, R., Ghequire, M., Ibarra, J. A., & Estrada-de Los Santos, P. 2018. Broad-spectrum antimicrobial activity by *Burkholderia cenocepacia* TAtl-371, a strain isolated from the tomato rhizosphere. *Microbiology (Reading, England)* 164(9), 1072–1086.
- Rosypal, S., Hod'ák, K., Martinec, T. a Kocur, M. 1981. *Obečná bakteriologie*. Státní pedagogické nakladatelství. Praha.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. a Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)* 230(4732), 1350–1354.
- Sanger, F., Nicklen, S. a Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12), 5463–5467.
- Selvameenal, L., Radhakrishnan, M., Balagurunathan, R., Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. *Indian J Pharm Sci* 71(5), 499-504.

- Schiewe, H. J., & Zeeck, A. 1999. Cineromycins, gamma-butyrolactones and ansamycins by analysis of the secondary metabolite pattern created by a single strain of *Streptomyces*. *The Journal of antibiotics* 52(7), 635–642.
- Schindler, J. 2014. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. Grada. Praha
- Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S., & Heo, M. S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea* agglomerans R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource technology* 97(2), 204–210.
- Spagnolo, F., Trujillo, M., & Dennehy, J. J. 2021. Why Do Antibiotics Exist? *mBio* 12(6), e0196621
- Spížek, J. 2016. *Boj s rezistencí na antibiotika*. Středisko společných činností AV ČR. Praha.
- Stubbendieck, R. M. & Straight, P. D. 2016. Multifaceted Interfaces of Bacterial Competition. *Journal of bacteriology* 198(16), 2145–2155.
- Stubbendieck, R. M., & Straight, P. D. 2016. Multifaceted Interfaces of Bacterial Competition. *Journal of bacteriology* 198(16), 2145–2155.
- Stubbendieck, R. M., & Straight, P. D. 2016. Multifaceted Interfaces of Bacterial Competition. *Journal of bacteriology* 198(16), 2145–2155.
- Tambong J. T. 2019. Taxogenomics and Systematics of the Genus *Pantoea*. *Frontiers in microbiology* 10, 2463.
- Tambong, J. T., Xu, R., Kaneza, C. A., & Nshogozabahizi, J. C. 2014. An In-depth Analysis of a Multilocus Phylogeny Identifies *leuS* As a Reliable Phylogenetic Marker for the Genus *Pantoea*. *Evolutionary bioinformatics online* 10, 115–125.
- Vasileva-Tonkova, E., & Gesheva, V. 2007. Biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp. during growth on hydrocarbons. *Current microbiology* 54(2), 136–141.
vydání. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Walterson, A. M., & Stavriniades, J. 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS microbiology reviews*, 39(6), 968–984.

- Wang, L. F., Walker, P. J., Poon, L. L. M. 2011. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats ‘special’ as reservoirs for emerging viruses? *Current Opinion in Virology* 1, 649–657.
- Waters, D. L. E., Shapter, F.M. 2013. The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. *Cereal Genomics* 1099, 65-75.
- Westhoff, S., Otto, S. B., Swinkels, A., Bode, B., Wezel, G. P. a Rozen, D. E. 2019. Spatial structure increases the benefits of antibiotic production in *Streptomyces*. *Evolution; international journal of organic evolution* 74(1), 179–187.
- Wolfgang, S. 2006. *Dynamics of the Bacterial Chromosome: Structure and Function*. Wiley. Hoboken.
- Wright, G. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57(10), 1451-1470.
- Zhang, W., Han, D. Y., Dick, W. A., Davis, K. R., & Hoitink, H. A. 1998. Compost and compost water extract-induced systemic acquired resistance in cucumber and *Arabidopsis*. *Phytopathology* 88(5), 450–455.
- Zichová, E. 2021. *Screening mikroorganismů a patogenů na vybraném historickém pohřebišti*. MS, Bakalářská práce, depon. in Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta Pedagogická, 27-29. Plzeň.

Seznam internetových zdrojů

- [1] <https://mikrobiologie.estranky.cz/clanky/bakterie/rust-a-mnozeni.html>
- [2] <https://labmet.zshk.cz/vyuka/kultivace-bakterii.aspx>
- [3] http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/vseob/P1v/kultivace_vs.pdf
- [4] https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/kultivace_mikroorganizmu.html
- [5] http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/vseob/P1v/kultivace_vs.pdf
- [6] https://is.muni.cz/el/sci/podzim2009/C7176/um/Izolace_DNA.pdf
- [7] <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>
- [8] [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)36139-X/fulltext](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)36139-X/fulltext)
- [9] <https://napude.sousednetopyr.cz/hrady-tocnik-a-zebrak/>
- [10] <http://www.tocnik.com/?Zvirena%3ANetopyri>
- [11] <https://eluc.ikap.cz/verejne/lekce/21>
- [12] https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16smetagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
- [13] <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/antimicrobial-activity>

Seznam tabulek

Tab. 1: Výsledky sekvenování na sekvenátoru Illumina použitých na neznámých bakteriích pro kompetici s Z1	54
---	----

Seznam obrázků

Obr. 1. Struktura bakteriální buňky. Převzato z Němce a Matoulkové (2015).....	12
Obr. 2. Tvary bakteriálních buněk. Převzato z [11].	13
Obr. 3. Chemická struktura antibakteriálních přírodních produktů (Katz a Baltz 2016).	16
Obr. 4. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu z trusu netopýra po 24 hodinách kultivace (zvětšení 40x).	48
Obr. 5. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu z trusu netopýra po 72 hodinách kultivace (zvětšení 40x).	48
Obr. 6. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu z trusu netopýra po 96 hodinách kultivace (zvětšení 40x).	49
Obr. 7. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu po kultivaci směsi <i>E.coli</i> a kmene Z1 na počátku kultivace po 6 hodinách (zvětšení 40x).....	49
Obr. 8. Snímek vzorku z tekuté kultury v LB médiu po kultivaci směsi <i>E.coli</i> a kmene Z1 po 48 hodinách (zvětšení 40x).	50
Obr. 9. Agarózový gel po PCR reakci s primery 27F a 1492R.....	50
Obr. 10. Agarózový gel po PCR reakci s primery 515f a 806r.	51
Obr. 11. Kompetice kmene Z1 proti dalším bakteriím na agarových LB plotnách při 35 °C a při pokojové teplotě. A -1231M, B - <i>E.coli</i> , C - 179O, D - 179M. Šipka označuje inhibiční zóny.....	52
Obr. 12. Aplikace diskové difúzní metody pomocí čtverečků filtračního papíru s nasáklým extraktem z agaru po kompetici Z1 s dalšími kmeny. E – čtvereček na kultuře kmene 1231M, F – čtvereček na kultuře <i>E. coli</i> , (červená barva pochází z neutrální červeně přítomné v některých agarových plotnách). Šipky označují inhibiční zóny.....	53