

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**ŠLECHTĚNÍ SPECIFICKÝCH BAKTERIÍ NA PRODUKCI
ANTIBIOTIK**
DIPLOMOVÁ PRÁCE

BC. KAROLÍNA HLINKOVÁ

Učitelství pro základní školy - obory Biologie a Fyzika

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

Plzeň 2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně
s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 22. dubna 2024

.....
vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ: Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce, Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, Ph.D. za jeho pochopení, vstřícnost, dobré a odborné rady při vedení této diplomové práce na téma šlechtění specifických bakterií na produkci antibiotik.

OBSAH

ÚVOD.....	1
1 BAKTERIE.....	3
1.1 EKOLOGIE A VÝZNAM BAKTERIÍ	3
1.2 VELIKOST, TVAR A ORGANELY BAKTERIÍ.....	3
1.3 BAKTERIE PANTOEA Z1	4
1.3.1 Pantocin	5
1.4 STAPHYLOCOCCUS AUREUS	5
1.5 ACINETOBACTER BAUMANNII	7
1.6 STREPTOCOCCUS AGALACTIAE	7
1.7 EVOLUCE BAKTERIÍ A JEJICH TOXINŮ.....	8
1.8 INTERAKCE BAKTERIÍ MEZI SEBOU.....	9
1.9 VÝROBA ANTIBIOTIK BAKTERIEMI.....	10
2 SACCHAROMYCES CEREVISIAE	12
3 ANTIBIOTIKA.....	13
3.1 STRUČNÁ HISTORIE ANTIBIOTIK.....	13
3.2 TRÍDĚNÍ ANTIBIOTIK.....	14
3.2.1 Beta-laktamy a glykopeptidy (antibiotika narušující buněčnou stěnu)	14
3.2.2 Chinolony, fluorochinolony, sulfonamidy, nitroimidazoly (antibiotika narušující tvorbu nukleových kyselin).....	15
3.2.3 Polypeptidy a lipopeptidy (antibiotika působící na cytoplazmatickou membránu). 15	
3.2.4 Aminoglykosidy, makrolidy, tetracykliny, linkosamidy (antibiotika narušující proteosyntézu).....	16
3.3 VYUŽITÍ A ÚČINKOVÁNÍ ANTIBIOTIK	16
3.4 REZISTENCE BAKTERIÍ NA ANTIBIOTIKA A BUDOUCNOST ANTIBIOTICKÉ LÉČBY	17
4 MATERIÁL A METODY	22
4.1 KULTIVACE A ŠLECHTĚNÍ BAKTERIÍ.....	22
4.2 IZOLACE ANTIBIOTIKA	25
4.3 DIFÚZNÍ DISKOVÁ METODA.....	26
5 VÝSLEDKY	28
6 DISKUZE.....	49
ZÁVĚR	53
RESUMÉ.....	55
SUMMARY	56
SEZNAM LITERATURY.....	57
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ	62

ÚVOD

Bakterie patří mezi významné mikroorganismy žijící všude kolem nás. Jsou to kosmopolitní mikroorganismy. Vyskytují se například v půdách, vodách, vzduchu, zvířatech či lidech (Abia et al. 2019). Mohou se podílet na koloběhu živin a různých látek, nebo mohou způsobovat různé infekce a nemoci (Rosypal et al. 1981). Bakterie jsou velmi užitečné mikroorganismy schopné produkovat nejrůznější látky (sekundární metabolity), kterými mohou být i samotné antibiotika. V budoucnu mohou posloužit jako vhodný zdroj léčiv, jelikož mohou působit na nejrůznější organismy (Stinccone a Brandelli 2020). Antibiotika zachraňují životy lidí po celém světě, nicméně bakterie se vůči jejich působení začínají stávat rezistentní (Moser et al. 2019). Světová zdravotnická organizace WHO roku 2017 zveřejnila seznam rezistentních bakterií na antibiotika, a proto je nutné zaměřit výzkumy na objevení nových antibiotik a možností léčby [1].

Dle Westhoff et al. (2021) mohou dvě bakteriální kolonie produkovat proti sobě antibiotika a jedna druhou vzájemně potlačovat pro získávání živin. Antibiotika produkují zejména po vystavení stresovým podmínkám (Westhoff et al. 2021). Tyto stresové podmínky vyvolávají na bakterie selekční tlak a jsou schopné se evolučně přizpůsobovat svému prostředí a daným podmínkám (de Maagd et al. 2003).

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na 3 kapitoly zahrnující bakterie, antibiotika a kvasinky. První část se zaměřuje na popis bakterií z hlediska jejich výskytu, významu a stavby buňky v souvislosti s rezistencí na antibiotika. Dále v kapitole o bakteriích jsou popsány významné rody a druhy bakterií důležité pro pokus na výrobu antibiotik. V kapitole bakterie jsou i zahrnuty principy interakcí bakterií na výrobu antibiotik a evoluce bakterií. V druhé části teoretické práce jsou popisovány kvasinky, které byly použity na pokus šlechtění antibiotik proti eukaryotním buňkám v praktické části. V poslední teoretické části jsou charakterizovány antibiotika z hlediska jejich třídění, účinkování, využití, rezistence, historie a budoucnosti.

V praktické části diplomové práce jsou popisovány aplikované metody a materiály potřebné k výrobě nových antibiotik pomocí bakterií. Ty zahrnují především kultivaci bakterií, proces šlechtění, izolace antibiotika a difúzní diskovou metodu, kterou se vyrobené antibiotikum testovalo na bakteriálních kulturách. Dále jsou v praktické části vlastní výsledky popisovány a diskutovány. Celý pokus výroby antibiotik byl zaměřen na

bakterie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Acinetobacter baumannii* v různých teplotách. Cílem bylo vyšlehtit antibiotika fungující proti těmto druhům.

1 BAKTERIE

1.1 EKOLOGIE A VÝZNAM BAKTERIÍ

Bakterie jsou kosmopolitní organismy, které se vyskytují všude. Žijí přirozeně v půdách, vodách, atmosféře, zvířatech i lidech. Mimo jiné mohou žít v extrémních podmínkách jako je například permafrost nebo termální prameny (Abia et al. 2019). Bakterie žijící ve vodách a sedimentech mají v přírodě nejrozumnější funkce, například rozklad a zneškodnění odpadních látek, nebo mohou být zdrojem infekcí (Abia et al. 2018). Mimo vodní prostředí se bakterie vyskytují i v půdách, kde se podílejí na koloběhu živin a látek, jsou v symbióze s mnoha rostlinami a pomáhají rostlinám v příjmu živin. Mnoho bakterií však může způsobovat nejrozumnější infekce a ohrožovat lidské zdraví (Rosypal et al. 1981).

1.2 VELIKOST, TVAR A ORGANELY BAKTERIÍ

Bakterie mají mnoho tvarů, rozměrů a různých způsobů života. Jejich rozměry jsou od 0,2-0,75 μm a tvarově jsou kulatého (koky – např. *Staphylococcus*, *Streptococcus*) či válcovitého tvaru (tyčinky – např. *Bacillus*, *Escherichia*) různých rozměrů a velikostí. Různé druhy bakterií mohou růst při 0°C-113°C, vše záleží na konkrétním bakteriálním druhu. Stavba prokaryontní buňky zahrnuje buněčnou stěnu s glykokalyx, cytoplazmatickou membránu, cytoplazmu, ribozomy, bakteriální chromozom - dvoušroubovici DNA, bičíky a fimbrie. Na povrchu prokaryot se může vyskytovat pouzdro nebo glykokalyx za určitých podmínek. Pouzdro se u bakterií vyskytuje v případě nepříznivých podmínek, například pomáhá odolávat fagocytóze. Glykokalyx napomáhá lepšímu přilnutí prokaryontních buněk na povrch. Zároveň je součástí tzv. biofilmu (Schindler 2014). Fosfolipidová dvojvrstva tvoří cytoplazmatickou membránu bakterií. V cytoplazmatické membráně jsou zároveň umístěny zajímavé proteiny, které na sebe vážou peniciliny a jiná obdobná antibiotika. Zároveň obsahují různé enzymy (transpeptidázy, karboxypeptidázy, transglykosylázy), které vyrábějí peptidoglykan. Počet těchto proteinů a enzymů udává, jak moc bude dané antibiotikum účinné. Další významnou strukturou bakterií jsou plasmidy, které nejsou pro bakterie životně důležité, nicméně hrají významnou roli v řadě bakteriálních životních dějů, např. v rezistenci na antibiotika. Jsou to malé genetické informace DNA, které mohou obsahovat geny pro rezistenci na antibiotika. Bakterie jsou schopné si tyto geny mezi sebou předávat (Švihovec et al. 2018).

U bakterií jsou dva typy bakteriálních buněčných stěn. Podle nich rozlišujeme gramnegativní a grampozitivní bakterie. Grampozitivní bakterie mají tlustou buněčnou stěnu, která je tvořena peptidoglykanem. Peptidoglykany se u bakterií podílejí na pevnosti a tvaru jejich buněčné stěny. Vrstva peptidoglykenů je tvořena polypeptidy a polysacharidy. Grampozitivní bakterie se vyznačují tím, že jsou schopny produkovat různé látky. Tyto látky jsou například speciální enzymy (β -laktamázy) schopné rozkládat β -laktamová antibiotika. Gramnegativní bakterie mají na rozdíl od grampozitivní bakterie daleko složitější stavbu buněčné stěny. Jejich vnější membrána je strukturně složena z lipopolysacharidů, fosfolipidické dvouvrstvy a porinů. Protože je vrstva fosfolipidů nepropustná pro vodu a jiné látky, mezi ně můžeme řadit i β -laktamová antibiotika, jsou v buněčné stěně gramnegativních bakterií poriny, které složí jako transportní kanálky. Skrze poriny tedy mohou prostupovat i antibiotika. Pokud bakteriální buňka bude obsahovat stále menší množství porinů v buněčné stěně, bude růst rezistence bakterií, protože antibiotika nebudou schopny prostupovat jejich buněčnou stěnou. Tento jeden typ rezistence vzniká mutací v bakteriální chromozomové DNA. Dále se v buněčné stěně vyskytuje síťovitá vrstva peptidoglykanů, která na rozdíl od grampozitivních bakterií má tenčí strukturu. Nicméně jsou také tvořeny polypeptidy (mukopeptid) a polysacharidy (murein). Těsně nad cytoplazmatickou membránou a pod peptidoglykanem nalezneme i periplazmatický prostor, který obsahuje významné enzymy, které mohou štěpit antimikrobiální látky. Je to další významný prvek bakterií, který způsobuje jejich rezistenci vůči antibiotikům (Švihovec et al. 2018).

1.3 BAKTERIE PANTOEA Z1

Tato studie se zabývá především druhem bakterie označeným dle Horová (2022) provizorně jako Z1, tato bakterie se z 82,31% shoduje s rodem *Pantoea*. Nicméně doposud Z1 nebyl určen do druhu a nelze říct, zda je bakterie Z1 neznámý nepopsaný druh bakterie či nikoliv. Rod *Pantoea* je tvořen 25 popsanými druhy (Horová 2022). *Pantoea agglomerans* je schopná produkovat antibiotické látky, například pantocin A, B. Antimikrobiální látky *Pantoea agglomerans* cílí na syntézu aminokyselin bakterie, kterou se snaží antibiotikem potlačit. Zároveň některé druhy *Pantoea* produkují i jiné antimikrobiální látky, jako je mikrocín. Bylo zjištěno, že bakterie *Pantoea* jsou zdrojem mnoha různých antimikrobiálních látek (Robinson et al. 2020). Systematické zařazení bakterie *Pantoea*, kmen *Pseudomonadota*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Enterobacterales*, čeleď *Erwiniaceae*, rod *Pantoea* [2].

1.3.1 PANTOCIN

Bakterie druhu *Pantoea agglomerans* (*Erwenia herbicola*) je nepatogenní mikroorganismus, který dokáže produkovat antibiotikum pantocin. *Pantoea agglomerans* inhibuje blízkce příbuznou bakterii *Erwinia amylovora*, kdy proti ní produkuje antibiotika. Tyto antibiotika by potenciálně mohly bojovat proti lidským patogenům. Problém s výrobou antibiotik však nastává v kapalné kultuře, kdy je produkce antibiotika velmi malá a antibiotikum je tepelně nestabilní. Produkované antibiotikum je strukturně tvořeno malou molekulou odvozeného od peptidu. Byly nalezeny dvě struktury tohoto antibiotika, pantocin A a pantocin B. Obě produkovaná antibiotika jsou schopná transaminázou inhibovat biosyntézu histidinu či argininu (Jin et al. 2003). Wright et al. (2001) uvádí, že *Pantoea agglomerans* a její příbuzná *Pantoea disperza* mohou pomocí kosmidů pCPP702 a pCPP704 propůjčit vlastnosti výroby antibiotik i jiným bakteriím, například bakterii *Escherichia coli*. Vzhledem k tomu, že si bakterie dokážou předávat geny, biosyntetické geny pro výrobu pantocinů jsou následovné, pantocin A pCPP702 a pCPP1051, pantocin B pCPP704 a pCPP719 (Wright et al. 2001). Účinek pantocinu je skrze použití tripeptidu Ala-Gly-Gly, které využívají tripeptidové transportéry pro transport dovnitř buňky (Smits et al. 2019).

1.4 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Účinky antibiotik byly testovány na několika druzích bakterií, jednalo se o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Acinetobacter baumannii*. Patogenní *Staphylococcus aureus* je bakterie způsobující mnoho různých onemocnění. Stafylokokové infekce mohou mít různý průběh. Infekce mohou být mírného rázu například kožní infekce, nebo mohou vést až k septickým stavům (Ahmad-Mansour et al. 2021). Dle Cheung et al. (2021) může stafylokoková infekce v některých případech vést i k smrti. Studie z roku 2017 poukázala na problém, že onemocnění AIDS, tuberkulóza a hepatitida dohromady nezpůsobí tolik úmrtí než infekce zlatým stafylokokem (Cheung et al. 2021). *Staphylococcus aureus* způsobuje četné nozokomiální infekce zejména u oslabených pacientů v nemocnicích, ale i běžné populaci. Mezi běžné infekce patří endokarditida, plicní infekce, abscesy či například osteomyelitida. Nicméně *Staphylococcus aureus* se i běžně vyskytuje na kůži lidí, to zejména u 20-30 % populace. V současné době se stává více rezistentní na antibiotika a je nutné hledat nové přístupu v léčbě jím způsobených infekcí. Rozvíjení rezistence podpořil nárůst methicilin rezistentního *Staphylococcus*

aureus (MRSA). Při léčbě se využívala antibiotika cílená na stafylokokové infekce, což podpořilo vznik rezistence (Ahmad-Mansour et al. 2021).

Staphylococcus aureus žije na kožním povrchu. Můžeme ho najít i u zvířat. Nejdůležitější místo jeho výskytu je v okolí nosu. Odtud se infekce snadno šíří a kolonizuje i jiná místa na těle. Snížení kolonizace *Staphylococcus aureus* na jiná místa těla zahrnuje především nedotýkání se těchto míst. Zejména drobné kožní rány podporují infekci bakterií *Staphylococcus aureus*, protože je snazší proniknout přes epitelovou bariéru do lidského těla. Dalším významným místem kolonizace je i povrch potravin či plastové materiály. *Staphylococcus aureus* v některých případech dokáže vyvolat otravu jídlem, která způsobuje zvracení. Během stafylokokové infekce jsou produkovány různé toxiny, které podporují rozvoj infekce (Cheung et al. 2021). Mnoho toxinů a molekul produkující *Staphylococcus aureus* významně podporují rozvoj infekcí, kdy poškozují či ničí hostitelské buňky. Tímto způsobem se brání imunitnímu systému a získávají potřebné látky pro svůj život (Löffler a Tuchscher 2021). Můžeme hovořit například o hemolyzinech, enterotoxinech (SE), exfoliativních toxinech (ETs), leukocidinech (PVL), modulinech rozpustných ve fenolech (PSM), superantigenech (SAGs) a mnohých dalších (Ahmad-Mansour et al. 2021).

Hemolyziny zahrnují například α -hemolyzin (α -toxin), který způsobuje β -hemolýzu, což je rozpad červených krvinek. Tento typ toxinu způsobuje endoftalmitidu či keratitidu (Astley et al. 2019). Dalšími významnými typy hemolyzinů jsou δ -hemolyzin, β -hemolyzin, γ -hemolyzin. Tyto toxiny způsobují rozpad buněk vytvářením pórů do buněčných membrán (Ahmad-Mansour et al. 2021). Leukocidiny jsou podobné hemolyzinům s rozdílem, že se zaměřují na bílé krvinky, například na monocyty, T-lymfocyty, makrofágy či neutrofilní granulocyty (Astley et al. 2019). Toxiny tohoto typu mohou způsobovat pneumonie, infekce kůže či jiné onemocnění. PSM způsobují bakteriémii a kožní infekce. Působí toxicky na dendritické buňky, erytrocyty, neutrofilní granulocyty a makrofágy, kdy způsobují jejich osmotickou nestabilitu a následný rozpad buněk tvorbou pórů do cytoplazmatické membrány. Řadí se mezi nejagresivnější toxiny, které může *Staphylococcus aureus* produkovat. Exfoliativní toxiny způsobují Ritterův syndrom, přičemž dochází k dehydrataci buněk a ztrátě povrchové vrstvy kůže v místě infekce. Enterotoxiny vyvolávají zvracení, průjem a bolesti břicha, které jsou způsobeny stafylokokovou otravou. Je vhodné nalézt protilátky proti těmto toxinům a snažit se eliminovat jejich působení na hostitelské buňky, cytolytickou aktivitu (Ahmad-Mansour et

al. 2021). Systematické zařazení *Staphylococcus aureus*, kmen *Bacillota*, třída *Bacilli*, řád *Bacillales*, čeleď *Staphylococcaceae*, rod *Staphylococcus* [3].

1.5 ACINETOBACTER BAUMANNII

Multirezistentní bakterie *Acinetobacter baumannii* je gramnegativní bakterie rozšiřující se v nemocničním prostředí. *Acinetobacter baumannii* byla označena za oportunní patogen a v současnosti představuje zdravotní rizika spojené s rezistencí na antibiotika (Howard et al. 2012). Tvarově a vzhledově je kokovitého či tyčinkovitého tvaru. Vzhledem k rozsáhlé rezistenci na antibiotika je považován *Acinetobacter baumannii* za kritickou bakterii pro veřejné zdraví celého světa (Yusuf et al. 2023). Léčba infekcí způsobených *Acinetobacter baumannii* představuje vážný problém, jelikož je rezistentní vůči většině antibiotik (Lee et al. 2017). Způsobuje nejružnější infekce zejména u oslabených jedinců, déle hospitalizovaných lidí například na JIP. Mezi ně patří například meningitida, pneumonie, endokarditida, infekce kůže, močových cest či bakteriémie (Ibrahim et al. 2021). Mimo jiné je bakterie *Acinetobacter baumannii* běžně přítomná ve vodních, půdních prostředích, odpadních vodách i v potravinách (ovoce, zelenina). Nejenže je patogenem pro lidi, je schopná napadat i ptáky a jiné savce (Yusuf et al. 2023). Dle Lee et al. (2017) je *Acinetobacter baumannii* považován za patogen nízkého stupně, avšak je velmi rozšířen v zemích, kde dochází k válečným konfliktům (Lee et al. 2017). Systematické zařazení bakteriálního druhu *Acinetobacter baumannii*, kmen *Pseudomonadota*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Moraxellales*, čeleď *Moraxellaceae* [4].

1.6 STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

Streptococcus agalactiae je patogenní bakterie, která způsobuje onemocnění především u těhotných žen, novorozenců, seniorů, ale i u ostatních lidí. Může způsobovat dokonce úmrtí na infekci způsobenou touto bakterií (Raabe a Shane 2019). Postihuje například centrální nervový systém či způsobuje meningitidu u novorozenců. V rozvoji této infekce pomáhá šíření bakterie skrze kraniální nervy, například čichovým či trojklaným nervem do mozku. *Streptococcus agalactiae* dokáže tak napadat gliové buňky, šířit se nervovým systémem a během 24 hodin může rozvinout infekci v hostiteli. Jeho speciální obranou je produkce polysacharidové vrstvy kolem bakteriální buňky, kterou se chrání před zničením imunitním systémem (Chacko et al. 2022). Další onemocnění způsobené bakterií *Streptococcus agalactiae* jsou bakteriémie, infekce kůže, endokarditida, osteomyelitida, artritida či infekce močových cest. Infekce se léčí nejčastěji penicilem, i

když už je v Japonsku zaznamenaný případ snížené citlivosti na penicilin. Dále se mohou využívat k léčbě infekcí beta-laktamová antibiotika, ampicilin, karbapenem, cefalosporin, vankomycin, erytromycin, klindamycin nebo fluorochinolon. Nicméně se v poslední době hovoří o rezistenci na fluorochinolony, klindamyciny, vankomyciny a erytromyciny. Proto je vhodné ideálně používat beta-laktamová antibiotika a pouze v případě, kdy není jiná možnost lze využít fluorochinolony, klindamyciny, vankomyciny a erytromyciny (Raabe a Shane 2019). Systematické zařazení bakterie *Streptococcus agalactiae*, kmen *Bacillota*, třída *Bacilli*, řád *Lactobacillales*, čeleď *Streptococcaceae*, rod *Streptococcus* [5].

1.7 EVOLUCE BAKTERIÍ A JEJICH TOXINŮ

Rozvoj výpočetní mikrobiální genomiky zajistilo studium ortologních genů. Evoluční vztahy díky ortologním genům lze studovat pouze při analýze kompletních sad genomů bakterií. Studium klastrů ortologních genů pomáhá vysvětlit funkci některých genomů a i studovat evoluci genomů. Klastry genů se následně srovnávají, zda se geny překrývají, gen chybí, je nahrazen či je zde gen navíc. Existuje mnoho různých teorií o evoluci prokaryot. Jedna teorie uvádí, že k evoluci bakterií dochází díky náhradám genů. Druhá teorie tvrdí, že evoluce bakterií je naopak zajišťována selekčním tlakem. Další teorií přispívající k evoluci bakterií je genetický drift či horizontální přenos genů (Koonin et al. 2021).

Bakterie prošly dlouhou evolucí, na počátku stojí dvě hlavní větve *Archaea* a *Bacteria*. Právě příchod metagenomiky pomohl vymezit tyto dvě hlavní evoluční větve bakterií. Ještě před příchodem metagenomiky byla studována a pozorována bakterie *Nanoarchaeon equitans* a díky metagenomice se tato bakterie zařadila do větve *Archaea*. Její genom zahrnuje do této větve i další příbuzné této bakterie. Dala vzniknout většině větví fylogenetického stromu *Archaea*, tzv. nadkmenu DPANN. Nadkmen DPANN zahrnuje *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanohaloarchaeota* a *Nanoarchaeota*. Podobně byla objevena i větev *Bacteria* zahrnující kmeny *Patescibacteria* (*Candidate phyla radiation* – *CPR*). Díky těmto daným fylogenetickým základům se začaly studovat metabolické enzymy těchto bakterií. Zjistilo se, že jejich genomy kódují minimum těchto enzymů, proto ostatní enzymy musí být závislé na jiných bakteriálních druzích a enzymy musely podstoupit evoluci. To zejména skrze horizontální přenos genů (HGT), který je pro evoluci bakterií nesmírně důležitý. Selekcí dochází k evoluci genomu, která je závislá na velikosti populace, a tak bakterie snadno podléhají genetickému driftu (Koonin et al. 2021). I toxiny a proteiny produkované bakteriemi podstoupily v minulosti evoluci. De Maagd et al. (2003) uvádí, že se strukturně podobné toxiny Cry9a a Cry9

vyvinuly nezávisle na sobě, avšak jsou si podobné. Pravděpodobně nové odrůdy toxinů vznikaly různými interakcemi, například s receptory hmyzu. Právě různé druhy Cry proteinů mohou obsahovat některé toxiny jiných bakterií, které potvrzují evoluci toxinů. Různé podmínky pro život bakterií mohly způsobit selekční tlak na vývoj nových toxinů (de Maagd et al. 2003).

1.8 INTERAKCE BAKTERIÍ MEZI SEBOU

Bakterie žijí v různých bakteriálních komunitách a pro svůj život musí s ostatními komunitami bakterií soutěžit o zdroje. Díky tomu si bakterie vyvinuly různé způsoby k zabití, poškození či potlačení růstu jejich konkurentů. Velmi často cílí svůj útok na peptidoglykan v buněčné stěně bakterií pomocí různých produkovaných molekul. Tyto molekuly mohou být velikosti od malých molekul, peptidy až po proteiny. Svým účinkem fungují jako hydrolázy, lipázy, nukleázy, proteiny vytvářející póry, inhibitory proteosyntézy a různé enzymy modifikující proteiny (Sibinelli-Sousa et al. 2021).

Různé bakteriální druhy v biofilmu mezi sebou různě interagují, to zejména kooperativně či kompetitivně. Při interakci bakterií byly prokázány metabolické změny a různé fyziologické funkce. Bakterie produkují bakteriociny, baktericidní látky bílkovinného původu, díky kterým soutěží s jinými bakteriemi o živiny. Například *Streptococcus mutans* je schopen produkovat lantibiotika či mutaciny, které souvisejí s kompetitivní interakcí bakterií. Veškerá produkce látek je řízena skrze quorum-sensing. Quorum-sensing je komunikace mezi bakteriemi v biofilmu, kdy dochází ke genové regulaci v závislosti na hustotě buněk. Ovlivňuje například virulenci, tvorbu biofilmu nebo schopnost vzdorovat působení kyselin. Mnoho ústních bakterií v biofilmu může vykazovat podobné aktivity, jako jsou bakteriociny. Zároveň je riziko, že bakterie v biofilmu blízko sebe si mohou horizontálním přenosem vyměňovat geny a může vznikat rezistence na antibiotika, například skrze plazmidy (Hojo et al. 2009).

Westhoff et al. (2021) uvádí, že hlavním způsobem soutěžení bakterií mezi sebou o místo a živiny je produkování antibiotik proti sobě. Výroba antibiotik je pro bakterie metabolicky náročná, proto je zřejmě produkují, když jsou ve velkém ohrožení. Zvýšení produkce antibiotik by mohlo být zřejmě způsobeno poškozením buňky bakterie, která dané antibiotikum produkuje, nebo snížením živin. Poškození a vyčerpání živin by mělo být ze strany konkurující bakterie, proti které bude druhá bakterie produkovat antibiotika. Dle Westhoff et al. (2021) bylo vyzpozorováno, že bakterie produkují více antibiotik, když rostou dohromady v jedné společné půdě. Antibiotika mohou produkovat proti sobě

fylogeneticky příbuzné bakterie, ale i nepříbuzné. Vše záleží na prostředí, kde bakterie žijí a soutěží. Westhoff et al. (2021) uvádí, že pravděpodobně lepší účinkování produkovaného antibiotika funguje na fylogeneticky příbuzné bakterie, ačkoliv by se očekával opak (Westhoff et al. 2021).

1.9 VÝROBA ANTIBIOTIK BAKTERIEMI

Dle Stincone a Brandelli (2020) mořské bakterie produkují různé látky, které mohou být cytotoxické, antimikrobiální, antioxidační či antidiabetické. Mohou posloužit ve farmaceutickém průmyslu jako dobrý zdroj nových léčiv. Antimikrobiální látky produkované bakteriemi mohou cílit na mnoho organismů. Z mořských ekosystémů jsou dle Stincone a Brandelli (2020) hlavními producenty antimikrobiálních látek *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteriodetes*, *Planctomycetes*. Jejich významné sekundární metabolity byly izolovány z několika bakterií, které vykazovaly antimikrobiální aktivitu. *Streptomyces sp.* produkoval etamycin A a fijimycin A-C antibakteriálně působící proti MRSA. Další produkované látky různými *Streptomyces* jsou heronamycin A působící proti *Bacillus subtilis*. Různé druhy *Pseudoalteromonas* produkovaly silné antibiotikum thiomarinol či aqabamyciny. Dále *Photobacterium halotolerans* produkovala holomycin. Zřejmě má potenciál bránit procesu virulence patogenů. Různé druhy *Bacillus* produkují sekundární metabolity s velkým potenciálem pro farmaceutický průmysl, tzv. makrolaktiny. Velmi rychle rostou a snesou různé teploty. Mimo antimikrobiální aktivity vykazují i protirakovinnou či antivirovou aktivitu. *Pontibacter korlensis* produkuje nově objevenou antimikrobiální látku nazvanou pontifacin. Molekuly produkované bakteriemi můžou v budoucnosti poskytnout nové antimikrobiální látky pro antibiotickou léčbu infekcí (Stincone a Brandelli 2020).

Podle Sibirinelli-Sousa et al. (2021) bakterie mohou produkovat různé antibiotika cílené na porušení buněčné stěny (peptidoglykanové vrstvy), mezi ně zahrneme beta-laktamová antibiotika, cyklické peptidy, glykopeptidy, fosfoglykolipidy, peptidové nukleosidy, fosfonická antibiotika či depsipeptidy. Antibiotika produkovaná bakteriemi mohou mít skutečně různou strukturu, některá jsou peptidová s neobvyklou aminokyselinou, jiná jsou spojená s lipidy či sacharidy. Většinou tyto zvláštní typy antibiotik bývají syntetizovány mimo ribozomy. Bakterie produkující beta-laktamová antibiotika mohou vyrábět například cefabaciny, cefamyciny. Cefamyciny jsou produkovány bakteriemi *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces clavurigerus*, *Nocardia lactamdurans* a cefabaciny jsou produkovány bakteriemi *Xanthomonas lactamgena*, *Flavobacterium sp.*, *Lysobacter lactamgenus*. Další

skupinou produkovanou bakteriemi jsou karbapenemy. Produkovány jsou thienamyciny či epithienamyciny. Dalšími beta-laktamovými antibiotiky jsou nocardiciny, produkované bakteriemi například *Nocardia uniformis*, *Acetobacter*, *Flexibacter*, *Pseudomonas* či *Chromobacterium violaceum*. Známymi antibiotiky, která jsou produkované bakteriemi, jsou i vankomycin, teikoplanin, bacitracin a mnoho dalších antibiotik. Mnoho různých bakterií skutečně mohou produkovat mnoho látek antibiotického charakteru (Sibinelli-Sousa et al. 2021).

Bakteriální ribozomy mohou také syntetizovat antibiotika. Antibiotika syntetizované ribozomy nazýváme jako bakteriociny. Významnými bakteriociny jsou lantabiotika produkované například *Staphylococcus epidermis* či *Lactococcus lactis*. Lantabiotika zahrnují antimikrobiální látky například actagardin, mersacidin, plantaracidin, nisin, epidermin, mutacin, lakticin a mnoho dalších. Dalšími bakteriociny mimo lantabiotika jsou například lysostaphin z *Staphylococcus simulans*, Zoocin z *Streptococcus zooepidemicus*, millericin z *Streptococcus milleri* nebo koliciny z *Escherichia coli* (Sibinelli-Sousa et al. 2021).

2 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

V našich experimentech byly také jako zástupce eukaryot použity kvasinky. Dle Vanderwaeren et al. (2022) je kvasinka druhu *Saccharomyces cerevisiae* považována za modelový eukaryotický organismus a celkově základní organismus pro studium genetiky eukaryotické buňky. Velikost buňky se pohybuje okolo 5 μm a na rozdíl od bakterií má jádro. Výhodou zkoumání kvasinek je poměrně snadná kultivace v laboratořích a rychlé množení (Vanderwaeren et al. 2022). Dělí se každých 90 minut pučením, kdy se z původní mateřské buňky rozdělí na dvě dceřiné. Často se kultivují na agarových plotnách, které umožňují jejich snazší růst. Od bakterií se dají snadno rozeznat i podle jejich velikosti, jsou velikostí mezi bakteriální buňkou a lidskou buňkou. Lidé se zabývají kvasinkami více než 7000 let do minulosti, protože tyto organismy jsou schopné tzv. procesu kvašení. Mimo genetiku je *Saccharomyces cerevisiae* užitečná pro výrobu piva a chleba (Duina et al. 2014).

3 ANTIBIOTIKA

Dle Zinner (2007) jsou antibiotika považována už několik let za „zázračné“ léky, které pomáhají bojovat s infekcí v různých lékařských oborech. Od jejich prvního nálezů byly objevovány nová antibiotika a vytvořilo se několik tříd antibiotik. Postupem času se začala ve světě objevovat rezistence na tyto antimikrobiální látky, ale různé infekce lze stále léčit například kombinacemi antibiotik nebo novými samostatnými antibiotiky. V budoucnu se však očekává rostoucí míra rezistence bakterií na antibiotika a máme-li žít a léčit infekce způsobované bakteriemi, musíme dále hledat nové metody a přístupy v léčbě bakteriálních infekcí (Zinner 2007). Rezistentní bakterie jsou schopné zabít až 70 000 lidí ročně. S výhledem do budoucna (2050) by bakterie měly zabít až 10 miliónů lidí ročně. Proto je nutné se zaměřit na vývoj nových antibiotik a jejich alternativ (Yacoub et al. 2020).

3.1 STRUČNÁ HISTORIE ANTIBIOTIK

Termín antibiotikum vznikl roku 1890, které definoval Paul Vuillemin. Ve své publikaci uváděl, že jde o antagonistickou interakci mezi bakterií a prvokem nebo bakterií a houbou. Za pár let se tento termín upřesnil jako popis produkce sekundárních metabolitů hub či bakterií. Sekundární metabolity hub nebo bakterií vykazují dvě různé aktivity, podle toho jaký mají vliv na samotné bakterie, kolonie nebo houby. Jedná se o baktericidní aktivitu, kdy jsou bakterie nebo houby zabíjeny, nebo bakteriostatickou aktivitu, kdy je potlačován (inhibován) růst. V dnešní době je termín antibiotikum zahrnuje i molekuly, které omezují život bakterií či hub (Nicolaou a Rigol 2018).

Nicolaou a Rigol (2018) popisují, že už od 16. století se využívalo různých chemických látek k léčbě infekcí, například kyseliny karbolové. Velký objev přišel s pochopením příčin infekcí, kterými se zabýval Louis Pasteur. Na to navázal Robert Koch společně s Gaffkym a Fisherem, kdy izolovali bakterie *Vibrio cholerae* a *Mycobacterium tuberculosis*. Koch tak popsal vztahy mezi mikroby a nemocemi. Tím získal Nobelovu cenu. Dalším velkým mezníkem bylo první objevené antibiotikum roku 1893 Bartolomeo Gosiem. Byla izolována kyselina mykofenolová jako pevná látka z houby *Penicillium glaucum*, která vedla k dalším velkým objevům. Později roku 1910 byl schválen nový lék, který byl prvním uměle vytvořeným antibiotikem v laboratoři, tzv. Salvarsan (arsfenamin). Několik let po tom přišel Alexander Fleming s objevem antimikrobiální látky, kterou nazval penicilin. Tento objev byl zcela náhodný. Petriho miska s bakterií druhu *Stafylococcus aureus* byla kontaminována houbou druhu *Penicillium chrysogenum*, kterou

nezničil a po určitém čase si povšiml lyze bakteriálních buněk v okolí houby. Houba produkovala antimikrobiální látky proti bakteriím a tuto látku jako extrakt využil Fleming i na jiné druhy bakterií. Tímto způsobem byl objeven penicilin, za který dostal Alexander Fleming Nobelovu cenu (Nicolaou a Rigol 2018).

Nicolaou a Rigol (2018) dále uvádí další historické objevy antimikrobiálních látek. První objevený cefalosporin byl tzv. cefalosporin C, který byl prvně objeven roku 1945. Disponuje baktericidními účinky stejně jako penicilin. Cefalosporin C pochází z houby druhu *Acremonium chrysogenum* a tento objev vedl k další inspiraci, jak najít další antimikrobiální látky, jako například cefalotin. Dalšími významnými látkami byly sulfonamidy, což jsou bakteriostatické látky, které potlačují růst bakterií. Dále od roku 1939-1942 byly z bakterie *Bacillus brevis* izolovány zajímavé látky, které byly dále zkoumány. Byly tak objeveny další antibiotika gramicidiny D a S. Roku 1943 byl objeven streptomycin izolovaný z bakterie *Streptomyces griseus*. Jednalo se o významné antibiotikum schopné léčit u pacientů tuberkulózu. Dále od roku 1945 byly postupně objevovány další antimikrobiální látky různých tetracyklinů vykazující bakteriostatické účinky (chlortetracyklin, oxytetracyklin apod.). V polovině 20. století bylo objeveno širokospektrální antibiotikum zvané chloramfenikol. Mělo významný úspěch při léčbě epidemie tyfu v Bolívii. V polovině 20. století byla objevena další antibiotika, jako jsou azomycin, pleuromutilin, retapamulin, erytromyciny (A-D), vankomycin, streptogramin (A,B). Od druhé poloviny 20. století byly objeveny další významné antimikrobiální látky, například trimethoprim, činidlo kyseliny nalidixové, různé ansamyciny, různé chinoliny a mnoho dalších (Nicolaou a Rigol 2018).

3.2 TRŽIDĚNÍ ANTIBIOTIK

3.2.1 BETA-LAKTAMY A GLYKOPEPTIDY (ANTIBIOTIKA NARUŠUJÍCÍ BUNĚČNOU STĚNU)

Podle publikace Pleskot et al. (2019) jsou antibiotika rozděleny do několika skupin. První velkou skupinou jsou β -laktamy, které v sobě zahrnují různé druhy penicilinů, různé druhy cefalosporinů, monobaktamy a karbapenemy. Jejich hlavní účinek spočívá v principu narušování tvorby buněčné stěny. Buněčná stěna bakterií je rozrušovaná ve spojích síťovité struktury peptidoglykanů. Působí především na grampozitivní bakterie, jako jsou například streptokoky, stafylokoky, pneumokoky. Mezi různé druhy penicilinů řadíme antibiotika benzylpenicilin (penicilin G), fenoxymethylpenicilin (penicilin V), ampicilin (AMP), amoxicilin (AMO), piperacilin, azlocilin (AZL). Další významnou skupinou beta-laktamů jsou cefalosporiny, které zahrnují antibiotika jako cefotaxim

(CTX), cefuroxim, ceftazidim (CTZ), cefazolin, cefaperazon s sulbaktanem. Mezi poslední dvě skupiny beta-laktamů zahrnujeme monobaktamy a karbapenemy, které slouží pouze pro život ohrožující infekce. Karbapenemovými antibiotiky jsou imopenem a meropenem. Monobaktamovým antibiotikem je například aztreonam. Protože bakterie mohou produkovat speciální enzymy proti beta-laktamovým antibiotikům, mohou se jednotlivá uvedená antibiotika kombinovat s inhibitory beta-laktamázy. Tyto inhibitory zvyšují účinnost jednotlivých antibiotik, protože beta-laktamázy rozkládají beta-laktamová antibiotika a snižují jejich účinek. Základními inhibitory, které se používají v kombinaci klasických beta-laktamových antibiotik, jsou sulbaktamy, tazobaktamy a kyselina klavulanová (Pleskot et al. 2019).

Glykopeptidová antibiotika se podobně jako beta-laktamy účastní na rozrušování buněčné stěny bakterií, především jejich tvorby buněčné stěny. Nahrazují beta-laktamová antibiotika v případě jejich nefunkčnosti. Zařadíme sem například velmi známý vankomycin či teikoplanin (Pleskot et al. 2019).

3.2.2 CHINOLONY, FLUROCHINOLONY, SULFONAMIDY, NITROIMIDAZOLY (ANTIBIOTIKA NARUŠUJÍCÍ TVORBU NUKLEOVÝCH KYSELIN)

Chinolonová antibiotika se vyznačují svými schopnostmi narušovat syntézu genetické informace bakterií (DNA). Jsou schopné zablokovat transkripční enzymy, které rozdělují DNA vlákno nebo ho spojují. Patří sem antibiotika, jako jsou ciprofloxacin, norfloxacin či ofloxacin. Sulfonamidová antibiotika naopak narušují tvorbu nukleových bází při syntéze genetické informace. Mezi sulfonamidy zahrnujeme trimetoprim a sulfametoxazol. Další významnou skupinou narušující DNA jsou antibiotika nitroimidazoly, ve kterých zahrnujeme například metronidazol (Pleskot et al. 2019).

3.2.3 POLYPEPTIDY A LIPOPEPTIDY (ANTIBIOTIKA PŮSOBÍCÍ NA CYTOPLAZMATICKOU MEMBRÁNU)

Polypeptidy jsou skupina antibiotik, které v sobě zahrnují druhy kolistin, polymyxin B a bacitracin. Společně s lipopeptidy se podílejí na porušování cytoplazmatické membrány bakterií, která může vést i k samotné lyzi buněk. Lipopeptidy v sobě zahrnují antibiotikum zvané daptomycin (Švihovec et al. 2018).

3.2.4 AMINOGLYKOSIDY, MAKROLIDY, TETRACYKLINY, LINKOSAMIDY (ANTIBIOTIKA NARUŠUJÍCÍ PROTEOSYNTÉZU)

Principem fungování aminoglykosidových antibiotik je vazba na podjednotku ribozomů, kde dojde k poruše průběhu proteosyntézy. Do bílkovinného řetězce se v průběhu proteosyntézy za přítomnosti aminoglykosidových antibiotik váže nesprávná aminokyselina. Působí zejména proti gramnegativním bakteriím. Patří sem například gentamycin a amikacin. Makrolidová antibiotika, tetracyklinová antibiotika, linkosamidová antibiotika fungují na stejném principu a také narušují (inhibují) proteosyntézu. Mezi makrolidová antibiotika řadíme klarithromycin, erythromycin, spiramycin. Mezi tetracyklinová antibiotika můžeme zařadit například tigecyklin a doxycyklin. V poslední řadě mezi linkosamidová antibiotika můžeme zahrnout klindamycin (Pleskot et al. 2019).

3.3 VYUŽITÍ A ÚČINKOVÁNÍ ANTIBIOTIK

Podle Moser et al. (2019) antibiotika slouží k cílené léčbě infekcí. Tyto infekce výrazně omezují, až ohrožují běžný život lidí. Antibiotika zachraňují život miliónům lidí po celém světě. Nicméně ne vždy jsou účinná. Velmi často se rozšiřuje rezistence bakterií vůči antibiotikům. Antibiotika cíleně zabíjí bakterie způsobující infekci. Někdy jsou však podávána jen preventivně, aby v těle nepropukla infekce, např. při chirurgickém nebo stomatologickém výkonu (Moser et al. 2019). Antimikrobiální látky mohou na bakterie působit několika možnými způsoby. Mohou narušovat proces výroby bakteriální buněčné stěny a působit na buněčnou membránu, narušovat proces proteosyntézy a tvorby nukleových kyselin (Švihovec et al. 2018).

Podle Schindlera (2014) aby byla nově objevená antibiotika v medicíně využita, musí splnit několik farmakologických požadavků. Mezi ně patří především jejich neškodnost vůči eukaryotickým buňkám. Antibiotikum nesmí nijak působit na eukaryotické buňky, případně lze tolerovat slabé zanedbatelné účinky. Dále je dalším kritériem, aby se antibiotikum podávalo v nízkých koncentracích, především v míře mg/l (Schindler 2014).

Z hlediska účinnosti antibiotik se stanovuje minimální inhibiční koncentrace (MIC), což znamená minimální koncentrace antibiotik, která je schopná potlačovat růst bakterií. Obvykle se udává v procentech (50%-90% MIC). Vedle minimální inhibiční koncentrace antibiotik existuje i minimální baktericidní koncentrace (MBC), která omezuje růst 99,9% bakterií ve vzorku. Tato koncentrace antibiotik usmrcuje bakterie ve vzorku. Hodnota

koncentrací antibiotik (MBC či MIC) určuje, jak dané antibiotikum působí na bakterie. Zda je působení antibiotika spíše bakteriostatické nebo baktericidní (Švihovec et al. 2018).

Dle Schindlera (2014) existuje několik způsobů, jak testovat citlivost či rezistenci bakterií na různá antibiotika. Jedná se o E-test, difúzní diskový test nebo diluční metoda. E-test je difúzní metoda, která využívá papírového proužku s gradientem koncentrací antibiotik. E-test vyšetřuje minimální inhibiční koncentrace antimikrobiálních látek. Je velice podobný diskovému testu. Výroba takového proužku s gradientem koncentrací antibiotik je vysoce nákladná a pracná. Diluční metoda využívá mikrotitrační destičky s jednotlivými jamkami. Jamky představují klesající koncentrace antibiotik. Tyto antibiotika jsou naředěny bujónem a naočkovány bakteriemi. Pokud se jamka nezakalí, znamená to, že bakterie nebyla schopná růst. Naopak pokud se jamka zakalí, bakterie vyrostla a daná koncentrace antibiotik nefunguje. Naopak diskový test využívá Petriho misky naočkovanou bakteriemi s antibiotikem napuštěným do papírového disku. Difúzí se kolem papírového disku vytvoří inhibiční zóna, kde bakterie nejsou schopny svého růstu (Schindler 2014).

3.4 REZISTENCE BAKTERIÍ NA ANTIBIOTIKA A BUDOUCNOST ANTIBIOTICKÉ LÉČBY

Podle Munita a Arias (2016) rezistence na antibiotika vyjadřuje odolnost bakterií vůči těmto látkám. Bakterie jsou geneticky poddajné a velmi rychle se mohou přizpůsobovat veškerým hrozbám v jejich prostředí, které je ohrožují. Především přizpůsobují svoji odolnost proti antimikrobiálním látkám. Podléhají selekčnímu tlaku, stresu a boji o živiny. Mnoho let se snaží adaptovat na prostředí, ve kterém žijí. Evoluční adaptací se pomalu dostávají na vrchol své evoluce. Bakterie mají mnoho strategií, jak se přizpůsobovat svému prostředí a zejména antibiotikům (Munita a Arias 2016).

Jednou strategií může být například mutace. Bakteriální geny, které ovlivňují působení antibiotika, zmutují a bakterie je schopná žít v daném prostředí dál s menší citlivostí na dané antibiotikum. Mutací genů pak bakterie přijímá látku v menším množství, a tak odolává jejímu působení. Efluxí je bakteriální buňka schopna se zbavovat přijímané látky nebo je schopna snížit příjem antibiotika změnou porinů. Při efluxi využívá tzv. efluxní čerpadla, které vyčerpávají toxické látky mimo buňku. Mutací je schopna změnit i svůj metabolismus, na který může dané antibiotikum cílit či se může pozměnit antimikrobiální cíl antibiotika. Snížením afinity antibiotika se bakterie snaží vyhnout

„zásahu“ do jejich citlivého místa v buňce. Jsou schopné změnit cíl zásahu antibiotikem a přežít jeho působení. Další možnou strategií pro odolávání antibiotikům může být horizontální přenos genů (konjugace, transdukce, transformace), kdy bakterií externě získávají genetický materiál, díky kterému budou moci odolávat působení antimikrobiálních látek. V tomto případě hrají významnou roli v předávání rezistence plazmidy, integrony a transpozony. Další strategií bakterií pro boj s antimikrobiální látkou je produkce enzymů, které molekulu antibiotika zničí nebo inaktivují. Například enzym karbapenemáza byl izolovaný u pacienta z Indie. Gen pro produkci karbapenemázy byl kódován v několika plazmidech. Znepokojivé je, že tyto plazmidy jsou snadno přenosné mezi různými druhy a umožňují další šíření rezistence (Munita a Arias 2016).

Světová zdravotnická organizace (WHO) roku 2017 zveřejnila seznam rezistentních bakterií (Tab. 1), na které by se měl v současné době zaměřovat výzkum antibiotik. Tyto rezistentní bakterie jsou rozděleny do kategorií podle priorit výzkumu nových antibiotik. Mezi nejvyšší prioritu (kritický stav) jsou zařazeny bakterie *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Následuje priorita označená jako vysoká, kde jsou zařazeny bakterie *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *Salmonellae* a *Neisseria gonorrhoeae*. Poslední prioritou s označením střední jsou zde zařazeny bakterie *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella spp.* [1].

Tab. 1 Priorita výzkumu nového antibiotika dle WHO. Vlastní zpracování dle Nicolaou a Rigol (2018)

Priorita výzkumu nového antibiotika dle WHO	Čeleď/rod/druh	Rezistence na antibiotikum
kritická	<i>Acinetobacter baumannii</i>	carbapenem
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	carbapenem
	<i>Enterobacteriaceae</i>	carbapenem
vysoká	<i>Enterococcus faecium</i>	vankomycin
	<i>Staphylococcus aureus</i>	methicilin, vankomycin
	<i>Helicobacter pylori</i>	klarithromycin
	<i>Campylobacter spp</i>	fluorochinolony
	<i>Salmonellae</i>	fluorochinolony
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	fluorochinolony, cefalosporin
střední	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	penicilin
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ampicilin
	<i>Shigella spp.</i>	fluorochinolony

Vysoké podávání antibiotik ve zdravotnických zařízeních vede jednoznačně k antibiotické rezistenci. Vzhledem k tomu, že bakterie jsou kosmopolitní (voda, půda, vzduch apod.), riziko infekce patogenními bakteriemi je vysoké. Infekce jsou vážným problémem zejména v nemocničních prostředích, kde se často nachází rezistentní bakterie. Pro boj s rezistencí se momentálně využívá různých kombinací antibiotik, například beta-laktamové antibiotika společně s fluorochinolony a aminoglykosidy pro léčbu pseudomonádových infekcí. Nicméně i v tomto případě může do budoucna vzniknout rezistence i na kombinovaná různá antibiotika. Naději v léčbě bakteriálních infekcí a boj s rezistencí vzbuzuje i fágová terapie. Antibiotická adjuvans je novou strategií, jak bojovat s antibiotickou rezistencí. Patří sem inhibitory efluxního čerpadla, inhibitory beta-laktamázy nebo permeabilizátory membrány pro zvýšení propustnosti pro antimikrobiální látky. Permeabilizátory zahrnují například polymyxiny či antimikrobiální peptidy. Velká budoucnost se přisuzuje i vakcínám a monoklonálním látkám, avšak nevýhodou je finanční náročnost. Velký průlom naznačují nanočástice, které by mohly být podávány samostatně nebo společně s antibiotiky. Nanočástice jsou poměrně stabilní látky proteinového, lipidového či sacharidového původu a už v nižších koncentracích mohou zneškodnit bakterie. Nicméně přítomnost například těžkých kovů v nanočásticích může urychlit selekční tlak na bakterie a rozvíjet dál rezistenci (Ding et al. 2023).

Vzhledem k antibiotické rezistenci bakterií se už mnoho let uvažuje o využití bakteriofágů, které by mohly doplnit antibiotika či je nahradit. Fágová terapie v dnešní době vyvolává naději, že budeme moci dále bojovat s bakteriálními infekcemi a léčit je. WHO považuje zvyšující se rezistenci bakterií za obrovskou globální hrozbu, proto je důležité hledat alternativy antibiotik, jako je například fágová terapie. Bakteriofág je virus napadající bakterie a vyskytuje se téměř v jakémkoliv prostředí (voda, vzduch apod.). Problémem je, že bakteriofág napadá pouze bakterie, které jsou fylogeneticky příbuzné. Například může infikovat bakterie v rámci svého druhu a několik různých bakterií ze svého rodu. Ovšem pouze velmi málo fágů dokáže infikovat i různé druhy. Pozitivní zprávou je, že existují klinické případy léčby skrze fágy, které zaznamenaly úspěch (Hatfull et al. 2021).

Další z možností v boji proti rezistentním bakteriím, je využití alternativních antibiotik pocházejících z rostlinných sekundárních metabolitů. V posledních letech dochází ke zkoumání rostlinných látek farmaceutickými institucemi a postupně se rozvíjí bylinná medicína. Například v asijských a afrických zemích se bylinná medicína využívá

už několik let a až 80 % obyvatel se léčí skrze přírodní produkty. Zároveň v posledních letech byla objevena nová antibiotika a až 69 % nových antibiotik pochází z přírodních rostlinných látek. Rostliny z čeledí *Pinaceae*, *Fabaceae*, *Apiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Hypericaceae* či například *Cupressaceae*, jsou možným potenciálem pro hledání nových antibiotik a jejich produkty vykazují antimikrobiální aktivitu. Zkoumání a testování přírodních botanických produktů by mohlo zajistit zásobu antimikrobiálních látek určené k boji s bakteriálními infekcemi. Botanické produkty mohou být budoucností pro léčbu infekcí, zejména v boji s bakteriemi a plísněmi (Savoia 2012).

Významnými botanickými produkty jsou například flavonoidy, alkaloidy, terpeny, fenoly a kumariny. Tyto látky mají velký potenciál pro budoucí medicínu a výrobu nových antibiotik. Flavonoidy jsou významné přírodní látky, u kterých byla prokázána antimikrobiální aktivita. Tato aktivita byla pozorována u *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* či *Mycobacterium tuberculosis*. Flavonoidové sloučeniny jsou tak budoucností v boji s mikroorganismy. Nicméně je potřeba sloučeniny lehce strukturně změnit, aby bylo možné do budoucna vyvinout lék. I některé alkaloidy mohou vykazovat antimikrobiální aktivitu např. proti houbám, bakteriím, prvokům i virům. Například dřišťál je bohatý na alkaloidy, které vykazují antimikrobiální aktivitu, tzv. berberin. I některé rostliny z čeledi *Ranunculaceae* v sobě obsahují antimikrobiální látky, které mohou mít v medicíně široké využití (Savoia 2012).

Dle Van Vuuren a Holl (2017) se pro konkrétní léčbu kožních infekcí, které často způsobují druhy například *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* či *Propionibacterium acnes*, využívají v afrických zemích rostliny například *Aloe excelsa*, *Aristea ecklonii* či *Alchornea floribunda*. *Alchornea floribunda* byla velmi účinná proti druhu *Staphylococcus aureus*. Nejširší antimikrobiální aktivitu však vykazoval druh *Aristea ecklonii*. Respirační infekce mají na svědomí nejčastěji bakterie druhu *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis* či *Moraxella catarrhalis*. Využívané rostliny proti respiračním infekcím jsou například *Galenia africana*, *Berchemia discolor*, *Ptaeroxylon obliquum* či *Hexalobus monopetalus*. Mezi nejběžnější bakterie, které způsobují střevní obtíže (gastrointestinální infekce) patří *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Helicobacter pylori* či některé rody *Clostridium*. Na střevní infekce byly použity rostliny například *Agathosma betulina*, *Pterocarpus angolensis*, *Sclerocarya birrea*, *Acacia karroo* a *Plectranthus ecklonii*. Pro léčbu sexuálně přenosných infekcí se alternativně využívají rostliny například

Cussonia, *Schefflera*, *Ximenia caffra* (kořen). Tyto infekce například způsobují velmi často bakterie *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum* či *Neisseria gonorrhoeae* (Van Vuuren a Holl 2017).

Mezi evropské léčivé protizánětlivé rostliny můžeme zařadit například rostliny *Achillea millefolium*, *Chelidonium majus*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Matricaria chamomilla*, *Betula verrucosa*, *Taraxacum officinale*, *Plantago major* a mnoho dalších (Tolmacheva et al. 2014).

Jedovatá zvířata jsou pozoruhodnou skupinou organismů, které nám mohou poskytnout nové léčebné látky. Už dnes se využívá mnoho látek získaných právě z jedů těchto organismů. Můžeme mluvit o členovcích, ostnokožcích, žahavcích, měkkýších, plazech, rybách či obojživelnících. V současné době je zaměřen výzkum na antimikrobiální peptidy, které by mohly sloužit jako potenciální nové antibiotika. Antimikrobiální peptidy jsou látky získané z jedů, které svojí antimikrobiální aktivitou narušují cytoplazmatické membrány. Zřejmě budou účinná vůči bakteriím, virům, houbám či různým parazitům. Antimikrobiální látky byly nalezeny u mnoha pavouků. Například *Pardosa brevivulva* či *Tegenaria domestica* produkuje pavučinu, která vykazuje baktericidní vlastnosti. Jed *Agelena labyrinthica* dokázal smrštit cytoplazmatickou membránu bakterií, tím se smrštila celá jejich bakteriální buňka. *Lycosa carolinensis* svými antimikrobiálními peptidy působila proti kvasinkám (*Candida glabrata*) i bakteriím. Stejně tak bylo mnoho antimikrobiálních látek objeveno i u štírů, včel, vos či mravenců. U obratlovců jsou významnými nositelé antimikrobiálních látek například žáby. *Bufo gargarizans* ve své kůži obsahuje mnoho zajímavých látek, které se používaly k léčbě infekcí. Mimo jiné se usušená kůže tohoto druhu využívala k léčbě rakoviny. *Bufo rubescens* má v kůži také mnoho zajímavých látek, kterými jsou i antimikrobiální peptidy, které napadají cytoplazmatické membrány bakterií. Výzkum sekretů a jedů živočichů mohou vést k novému objevování antibiotik (Yacoub et al. 2020).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 KULTIVACE A ŠLECHTĚNÍ BAKTERIÍ

Pro kultivaci bakterií bylo využito bakterií Z1, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Acinetobacter baumannii*. Bakterie Z1 zařazená do řádu *Pantoea* byla izolována z netopýřího trusu na lokalitě hrad Točník (Horová 2022). Ostatní bakterie byly získány z České sbírky mikroorganismů, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Kamenice 5, budova E25, Brno, kde byly zakoupeny a jejich výběr byl konzultován s kurátorkou sbírky Mgr. Danou Novákovou, Ph.D. Jedná se kolekci – The Czech Collection of Microorganisms (CCM) a vybrané kmeny jsou vedeny pod těmito čísly: *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Streptococcus agalactiae* CCM 6187, dva kmeny *Acinetobacter baumannii* CCM č. 2355 a CCM č. 7031

Kultivace probíhala na LB (Luria-Bertani) agarové plotně Petriho misek a v tekutém médiu. Kvůli kultivaci kmenů *Acinetobacter baumannii* bylo LB médium později mícháno 1:1 s trypton-sójovým agarem. Nejprve byly bakterie kultivovány v tekutém médiu na třepače po dobu 24-48 hodin. Byl zde přidán *Staphylococcus aureus* proti bakterii Z1 produkující antibiotikum. Stejný postup byl i pro Z1, *Streptococcus agalactiae* a *Acinetobacter baumannii*. Následně byly bakterie dohromady vysety na agarové plotny Petriho misek, rozetřeny hokejkou a umístěny do termostatu na dobu 24-48 hodin. Když bakterie narostly na Petriho miskách, byly udělány preparáty, (z Petriho misek a z tekutého média), k pozorování pod mikroskopem Olympus BX53 s imerzním olejem ve zvětšení 1000x. Po celou dobu styku obou kolonií bakterií docházelo ke kompetitivním interakcím mezi bakteriemi v tekutém médiu i na agarových plotnách Petriho misek. Cílem bylo získat šlechtění antibiotikum proti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* i *Acinetobacter baumannii* a dílčím cílem bylo vyšlechtit fungování antibiotika na vyšší teploty (nad 30°C). Kultivace se nejlépe osvědčila na Petriho miskách. Do tekutého média se snadno dostávala kontaminace v podobě nežádoucích bakterií.

Šlechtění antibiotik pomocí bakterií Z1 začalo při 12°C v poměru 1:1 (Tab. 2). V této teplotě nejlépe bakterie Z1 produkovala antibiotikum proti *Staphylococcus aureus*. Pro šlechtění antibiotik bylo využito pasážování bakterií. Nejprve bylo šlechtěno antibiotikum proti bakterii *Staphylococcus aureus* ve 12°C. Každá pasáž byla tvořena jinými poměry bakterií (Tab. 2). Nejprve byl poměr 1:1 a následně se koncentrace bakterií Z1 a *Staphylococcus aureus* měnila. Každá pasáž byla kontrolována pod mikroskopem se

zvětšením 1000x při využití imerzního oleje. Od 16. pasáže byla navyšována teplota v termostatu na 14°C, následně u 17. pasáže na 15°C a poté vždy o 2°C v případě, že bakterie Z1 převládala v dané pasáži. Když některá pasáž začala vykazovat rezistentní chování *Staphylococcus aureus* proti šlechtěnému antibiotiku, byly nové pasáže vytvořeny z původního *Staphylococcus aureus* z první pasáže a vyšlechtěná bakterie Z1 byla vyčištěna křížovým roztěrem na agarové plotně Petriho misky, kde byly izolovány jednotlivé kolonie. Čistá kolonie bakterií Z1 byla vložena do nové pasáže se *Staphylococcus aureus* z první pasáže. Poté byla pasáž sledována a tvořily se nové pasáže. Když pasáže vykazovaly fungování antibiotika a převahu bakterií Z1 nad *Staphylococcus aureus*, mohla být navýšena teplota. Šlechtění antibiotika s bakteriemi Z1 vyžadovalo okolo 28°C pomalejší zvyšování teploty, a to pouze o 1°C. Při těchto teplotách je antibiotikum velmi citlivé a nestabilní. Při testování účinnosti antibiotika se musí dodržet maximální hranice teploty, při které bylo antibiotikum šlechtěno. Například pokud byly bakterie šlechtěny na teplotu 31°C, tak jejich antibiotikum nebude účinkovat ve 32°C. Proto je velmi vhodné u testování antibiotika dodržovat stanovenou teplotní hranici nebo o 1-2°C teplotu snížit. Antibiotikum bylo vyšlechtěno postupným zvyšováním teploty až na 32°C.

Tab. 2 Kultivace a šlechtění bakterií Z1 proti *Staphylococcus aureus*

Kultivace a šlechtění bakterií Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i>		
číslo pasáže	koncentrace	teplota
1.-8.	1:1	12°C
9.	1:4	12°C
10.	1:5	12°C
11.	1:10	12°C
12.-14.	4:50	12°C
15.	5:100	12°C
16.	3:100	12-14°C
17.-18.	3:100	15°C
19.	1:10	15°C
20.	3:100	15°C
21.	1:100	15°C
22.-23.	1:100	18°C
24.	3:100	20°C
25.	1:10	20°C
26.	1:10	22°C
27.	1:10	22-24°C
28.	1:40	26-31°C (navyšování o 1°C po 4-7 dnech)
29.	1:40	32°C

Stejného postupu bylo využito i u *Streptococcus agalactiae* s rozdílným počátkem kultivace při teplotě 22°C (Tab. 3). Bakterie *Streptococcus agalactiae* vykazovala špatný růst v nižších teplotách (12-15°C), proto se začalo se šlechtěním až při 22°C. K šlechtění bylo využito bakterií z pasáže č. 26 proti *Staphylococcus aureus*. Bakterie Z1 se doposud nesečkala s novou bakterií *Streptococcus agalactiae*, nicméně v kulturách většinou dominovala. První pasáž byla vytvořena v poměru koncentrací 1:1 v 22°C. Kultury byly šlechtěny na smíchané LB agarové půdě s půdou Trypton-sójovým agarem (medium 71). Následně byla teplota navyšována o 1-2°C, pouze v případě jednoznačné dominance Z1 proti *Streptococcus agalactiae*. Poslední pasáž číslo 5. byla vyšlechtěna na teplotu 31°C a zároveň otestována difúzním diskovým testem při teplotě 29°C z důvodu technických problémů s termostatem. Antibiotikum je na vyšší teploty, než je šlechtěno, velmi citlivé a nestabilní. Z tohoto důvodu byla zvolena nižší teplota. Veškeré následující pasáže od č. 2 až po č. 5 byly vytvořeny v poměrech koncentrací 3:10.

Tab. 3 Kultivace a šlechtění bakterií Z1 proti *Streptococcus agalactiae*

Kultivace a šlechtění bakterií Z1 a <i>Streptococcus agalactiae</i>		
číslo pasáže	koncentrace	teplota
1.	1:1	22°C
2.	3:10	24-26°C
3.	3:10	28-29°C
4.	3:10	30°C
5.	3:10	31°C

Stejný postup byl využit i pro bakterii *Acinetobacter baumannii* CCM 2355, kdy bylo využito šlechtěné bakterie Z1 proti *Staphylococcus aureus* ve 30°C (Tab. 4). Kultury byly vyšlechtěny na smíchané LB agarové půdě s půdou Trypton-sójovým agarem (medium 71). První pasáž byla vytvořena v poměru koncentrací bakterií 1:1 ve 30°C. Druhá pasáž až pátá pasáž byla vytvořena v poměru koncentrací 2:1. Pasáž č. 2 byla šlechtěna ještě ve 30°C, ale následující pasáže ve 31°C. Z pasáže č. 5 bylo izolováno antibiotikum produkované šlechtěnou bakterií Z1 a otestováno difúzní diskovou metodou.

Tab. 4 Kultivace a šlechtění bakterií Z1 proti *Acinetobacter baumannii*

Kultivace a šlechtění bakterií Z1 a <i>Acinetobacter baumannii</i>		
číslo pasáže	koncentrace	teplota
1.	1:1	30°C
2.	1:2	30°C
3.	2:10	31°C
4.	2:10	31°C
5.	2:10	31°C

Obdobného postupu bylo využito i u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. První kontakt s bakterií Z1 v první pasáži byl při 12°C a všechny ostatní pasáže byly v poměrech koncentrací 1:1. Od pasáže číslo 4. došlo k navyšování teploty na 15°C a v pasáži číslo 6. došlo k navýšení teploty na 18°C. Pasáže s buněčnými kulturami byly průběžně kontrolovány. Testování šlechtění antibiotik proti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* probíhalo půl roku.

4.2 IZOLACE ANTIBIOTIKA

Pro izolaci antibiotika bylo využito podobné metody dle Horová (2022) s drobnými změnami pro zlepšení postupu. Izolace antibiotika byla provedena pomocí agarové plotny s bakteriemi produkující antibiotikum, ethylesteru kyseliny octové a filtračního papíru vystřiženého sterilními nůžkami (kolečka, čtverečky). Na 14 Petriho misek o velikosti průměru 90 mm obsahující LB agar bylo vyseto 65 µl bakterií Z1 a 135 µl bakterií *Staphylococcus aureus*. Bakterie byly po celé agarové plotně rozetřeny hokejkou a vloženy do termostatu po dobu 24 hodin. Při první izolaci na 12°C, při druhé izolaci na 22°C, při třetí izolaci na 32°C. Po 24 hodinách byly narostlé kultury bakterií setřeny a odstraněny. Agarové plotny byly následně umístěny do kádinky s ethylesterem kyseliny octové (50ml). V ethylesteru kyseliny octové byly agarové plotny i rozdrceny pro lepší izolaci antibiotika a celá kádinka byla ponechána po dobu 24 hodin na třepačce v pokojové teplotě. Celá kádinka byla překryta průhlednou plastovou membránou chránící směs před vyschnutím. Po 24 hodinách byly odstraněny zbytky agarové plotny z roztoku a do roztoku byly vloženy filtrační papírky určené k nasání antibiotika. Celá směs se nechala odpařovat při 55°C. Výsledné papírky kulatého a hranatého tvaru byly vloženy do středu nové agarové plotny s bakteriemi druhu *Staphylococcus aureus*, (původní nešlechtěná kultura) a uloženy do termostatu na dobu 24 hodin a do pokojové teploty na 24 hodin.

Stejného postupu bylo využito i u bakterií Z1 s kompetitivní interakcí proti *Streptococcus agalactiae*. Na 40 Petriho misek o velikosti průměru 60 mm byly vysety bakterie Z1 (30 µl) a *Streptococcus agalactiae* (100 µl). Byla použita směs médií LB a Trypton-sójového agaru (medium 71). Bakterie byly rozetřeny po celé ploše Petriho misek a uloženy do termostatu na 24 hodin v 29 °C. Poté byl z agarových ploten setřen nárůst bakterií. Agarové plotny byly umístěny do kádinky a rozdrčeny v ethylesteru kyseliny octové (50 ml). Následně se celá směs nechala třepat po dobu 24 hodin v pokojové teplotě. Z kádinky byly odstraněny zbytky agaru a byly zde vloženy vystřižené filtrační papíry pro izolaci antibiotika. Celá směs se nechala odpařovat při 55°C. Papírky s izolovaným antibiotikem byly vloženy na Petriho misky s původní nešlechtěnou kulturou *Streptococcus agalactiae* a uloženy do termostatu na 29 °C. Zároveň byla otestována i nižší koncentrace antibiotika pouze ze 14 Petriho misek o velikosti průměru 60 mm v 31°C.

Acinetobacter baumannii byl vyset na 20 Petriho misek o velikosti průměru 90 mm společně s bakterií Z1 na smíchané LB agarové půdě s Trypton-sójového agaru (medium 71) v množství 200 µl *Acinetobacter baumannii* a 100 µl Z1. Smíchané kultury byly vloženy do termostatu na 31°C po dobu 24 hodin. Následně veškerý nárůst bakterií byl setřen a agarové plotny byly vloženy do kádinky a rozdrčeny v ethylesteru kyseliny octové (50 ml). Celá směs se nechala 24 hodiny třepat v pokojové teplotě. Po 24 hodinách se odstranily agarové plotny, do směsi byly vloženy filtrační papírky, do kterých se nasálo antibiotikum, a směs se po 24 hodinách odpařila při 55°C. Filtrační papírky s izolovaným antibiotikem byly vloženy na kulturu bakterií *Acinetobacter baumannii* z první pasáže na Petriho misky do 31°C k provedení diskového difúzního testu.

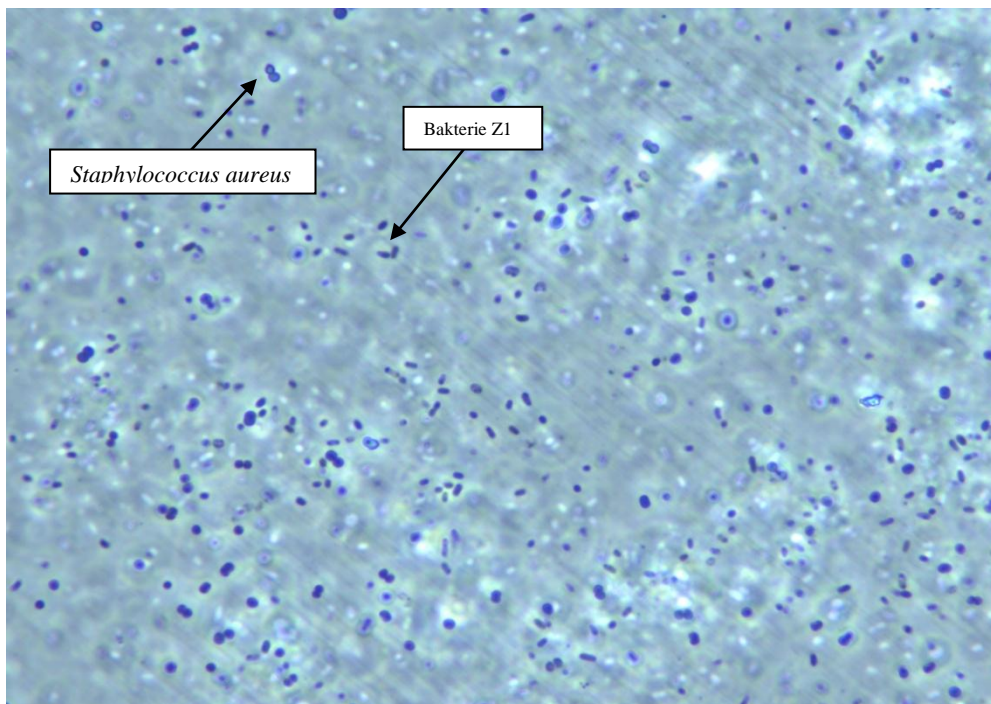
4.3 DIFÚZNÍ DISKOVÁ METODA

Dle Schindlera (2014) se pomocí difúzní metody testuje citlivost různých bakterií na různá antibiotika, tzv. diskový test. Základem difúzní metody je získané antibiotikum napuštěné v papírovém disku. Papírový disk vložíme na již připravenou Petriho misku s naočkovanou půdou. V závislosti na koncentraci se kolem disku vytvoří inhibiční zóna, která brání růstu bakterií (Schindler 2014). Pro testování citlivosti *Staphylococcus aureus* na antibiotikum byla aplikována disková difúzní metoda. Bylo využito podobného postupu dle Schindler (2014) avšak upraveného. Izolované antibiotikum ve filtračním papírku kulatého a hranatého tvaru bylo umístěno na agarové plotny s vyšetými bakteriemi *Staphylococcus aureus* v množství 100 µl (pokojová teplota) a 200 µl (12°C, 22°C, 32°C).

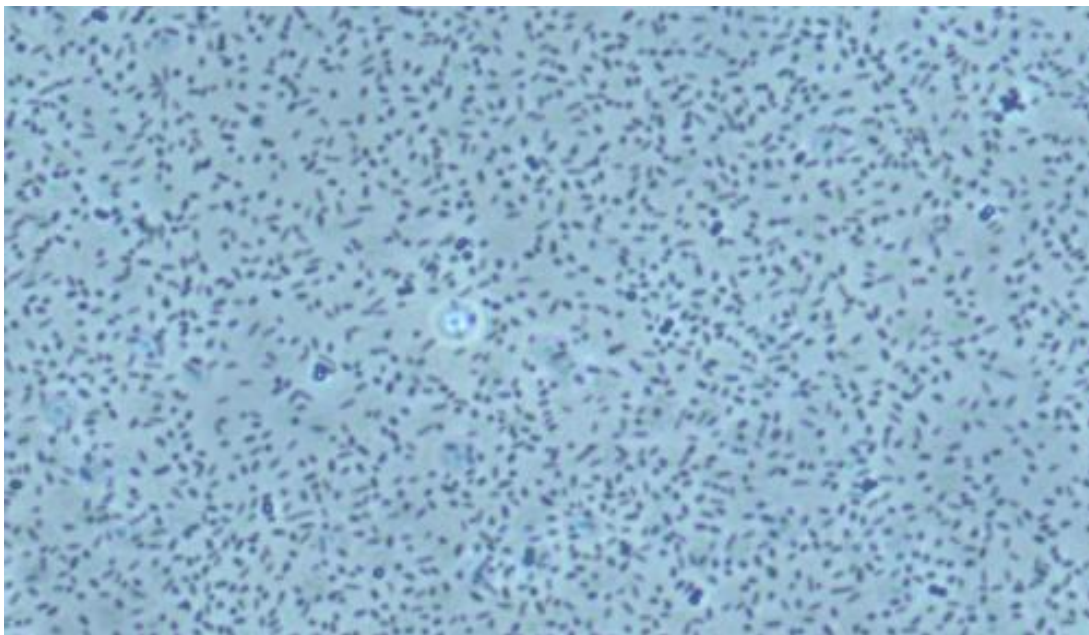
Agarové plotny Petriho misek byly následně umístěny do termostatu na 12°C, 22°C a 32°C. Po 24 hodinách byly na Petriho miskách se *Staphylococcus aureus* zaznamenány inhibiční zóny. Zároveň byla provedena i kontrola s filtračním papírkem bez izolovaného antibiotika, kde po 24 hodinách a více nebyla vytvořena inhibiční zóna. Stejného postupu bylo využito i u *Streptococcus agalactiae* a *Acinetobacter baumannii*. *Streptococcus agalactiae* byl testování difúzní diskovou metodou při teplotách 29°C a 31°C v množství 100 µl. Bakterie *Acinetobacter baumannii* byly testovány diskovou difúzní metodou v teplotě 31°C v množství 100 µl.

5 VÝSLEDKY

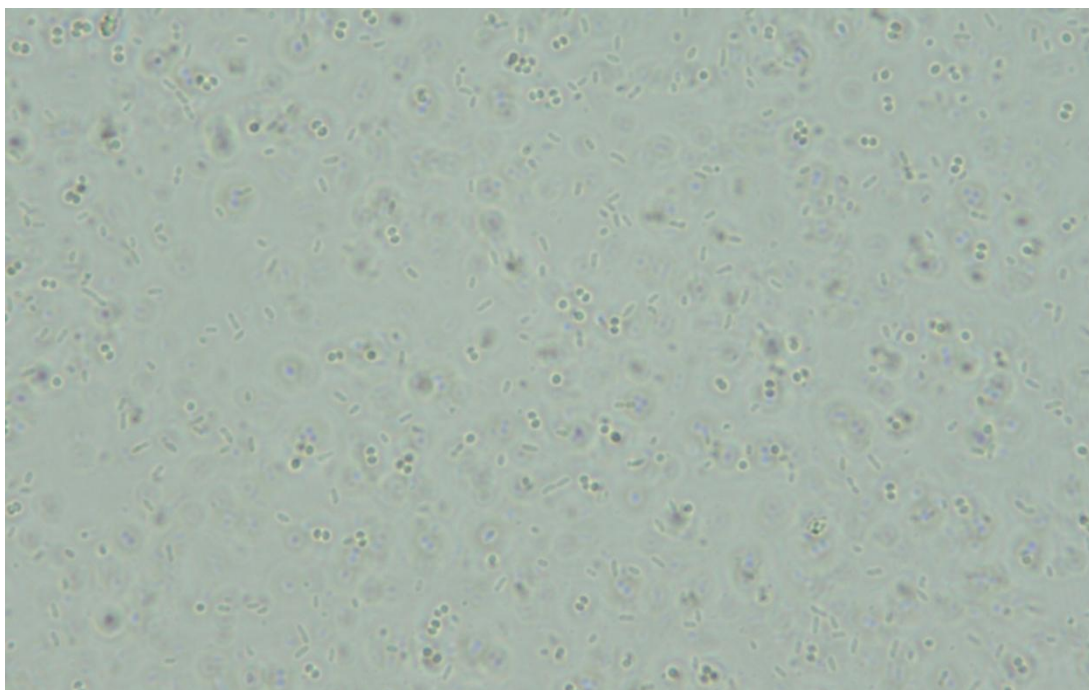
Při prvním styku bakterií Z1 s bakteriemi *Staphylococcus aureus* v první pasáži nedocházelo k žádným známkám produkce antibiotik. I po více dnech byly poměry bakterií mezi sebou vyrovnané (obr. 1). Po tvorbě nových pasáží v koncentraci 1:1 ve 12°C se začaly bakterie Z1 prosazovat nad *Staphylococcus aureus*. Toho je důkazem pasáž číslo 8, kde s odhadem zhruba z 95% převládají bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* už po 4 dnech (obr. 2). Pasáže byly průběžně kontrolovány a zároveň byl sledován jejich vývoj i po delším časovém odstupu, například i po 2 měsících. Od 9. pasáže docházelo ke změnám koncentrací ze 1:1 na 1:4, kdy bylo navýšeno množství *Staphylococcus aureus* a naopak sníženo množství bakterie Z1. Po 1 dnu kompetitivní interakce se však počet Z1 a *Staphylococcus aureus* vyrovnal na poměr 1:1 (obr. 3). To je známkou produkce antimikrobiálních látek proti *Staphylococcus aureus*. Přizpůsobené antibiotikum proti *Staphylococcus aureus* lze tak získat už od 8. pasáže. Ideální je ponechat bakterie spolu interagovat více než 3 dny, protože bakterie Z1 má více času na produkci antibiotik a potlačení konkurenčních bakterií *Staphylococcus aureus*.



Obr. 1 Pasáž 1 s bakteriemi *Staphylococcus aureus* a Z1 po 9 dnech v tekutém LB médiu, koncentrace 1:1 ve 12°C (zvětšení 1000x).



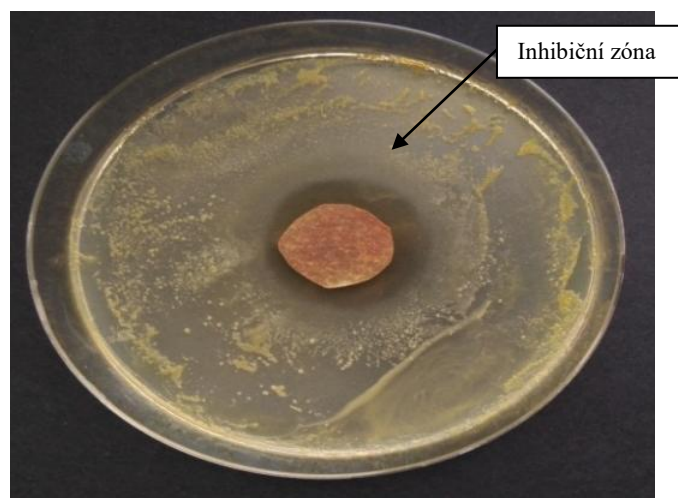
Obr. 2 Pasáž č. 8 po 4 dnech kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* v poměru 1:1 tekutého LB média ve 12°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* po 4 dnech (zvětšení 1000x).



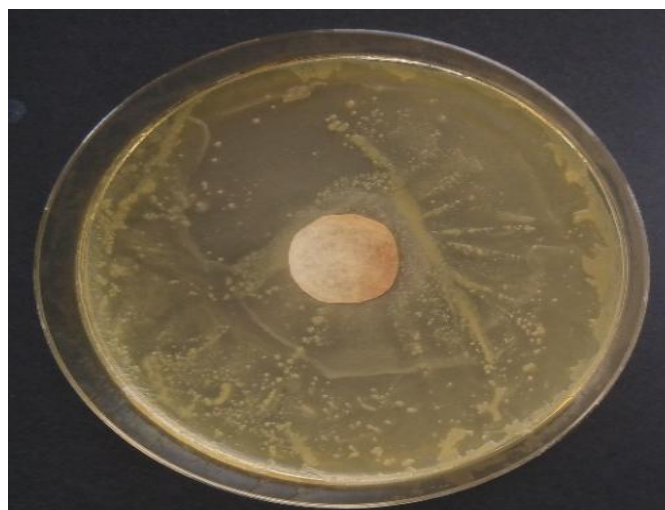
Obr. 3 Pasáž č. 9 po 1 dni ve 12°C v tekutém LB médiu s bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* (původní poměr 1:4). Po 24 hodinách došlo k vyrovnání poměru na 1:1 (zvětšení 1000x).

Pro jasný důkaz produkce antibiotik bakterií Z1 proti jiným bakteriím, například *Staphylococcus aureus* či *Streptococcus agalactiae* byl proveden difúzní diskový test na agarových plotnách Petriho misek. V první fázi šlechtění bylo izolováno produkované antibiotikum z 12. pasáže, které bylo šlechtěno ve 12°C. Pokus byl proveden na dvou

Petriho miskách, kde jedna byla ve 12°C a druhá v pokojové teplotě. Na Petriho misky byly vysety bakterie *Staphylococcus aureus* z první pasáže, kdy tato bakterie se doposud neseťkala s novým antibiotikem. Následně bylo do středů Petriho misek vloženo antibiotikum nasáklé ve filtračních papírcích. Výsledkem bylo vytvoření inhibiční zóny okolo filtračního papírku, kde se vyskytovalo izolované antibiotikum proti bakteriím *Staphylococcus aureus*. Tato inhibiční zóna se však vytvořila pouze na Petriho misce, která byla uložena v termostatu na 12°C (obr. 4). Druhá Petriho miska uložena v pokojové teplotě neobsahovala žádnou známku inhibiční zóny (obr. 5). Důvodem bude zřejmě teplotní nestabilita antibiotika podobného pantocinu, která byla popisována i v kapitole 1.3.1 Pantocin.

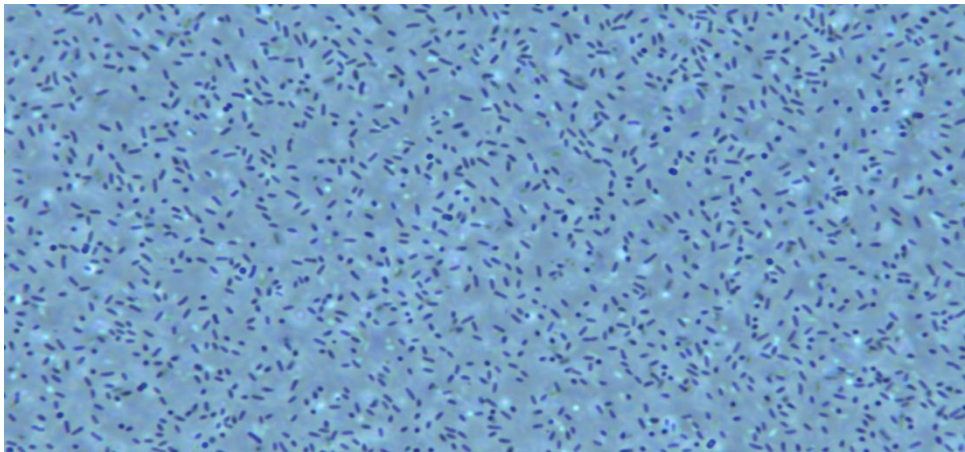


Obr. 4 Diskový difúzní test izolovaného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti *Staphylococcus aureus* ve 12°C s inhibiční zónou.

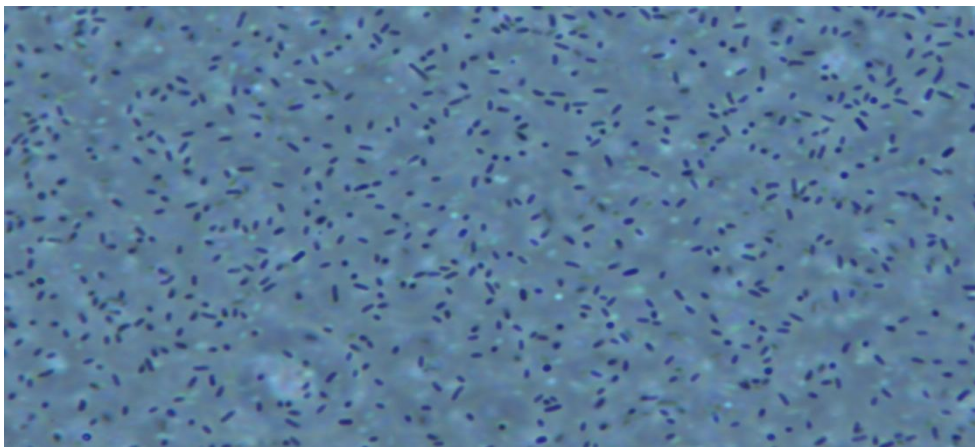


Obr. 5 Diskový difúzní test izolovaného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti *Staphylococcus aureus* v pokojové teplotě bez inhibiční zóny.

Protože se nevytvořila inhibiční zóna u Petriho misky v pokojové teplotě, začalo se antibiotikum s bakteriemi Z1 šlechtit pro fungování a růst ve vyšších teplotách než pouze ve 12°C. Před zvyšováním teploty bylo však potřeba přizpůsobit bakterii Z1, aby dokázala potlačit mnoho *Staphylococcus aureus* v malém množství Z1. Například v 15. pasáži byla dána koncentrace bakterií Z1 proti *Staphylococcus aureus* v poměru 5:100. Pasáž číslo 15 byla šlechtěna ve 12°C v tekutém LB médiu na třepačce, kdy bylo dáno 50 µl bakterií Z1 a 1000 µl bakterií *Staphylococcus aureus*. Po 24 hodinách byl výsledek převahy bakterií Z1 nad *Staphylococcus aureus* velmi značný (obr. 6). Podobně u 8. pasáže bakterie Z1 opět získaly početní převahu nad *Staphylococcus aureus*. Pasáž číslo 16. vykazovala stejné výsledky (obr. 7).

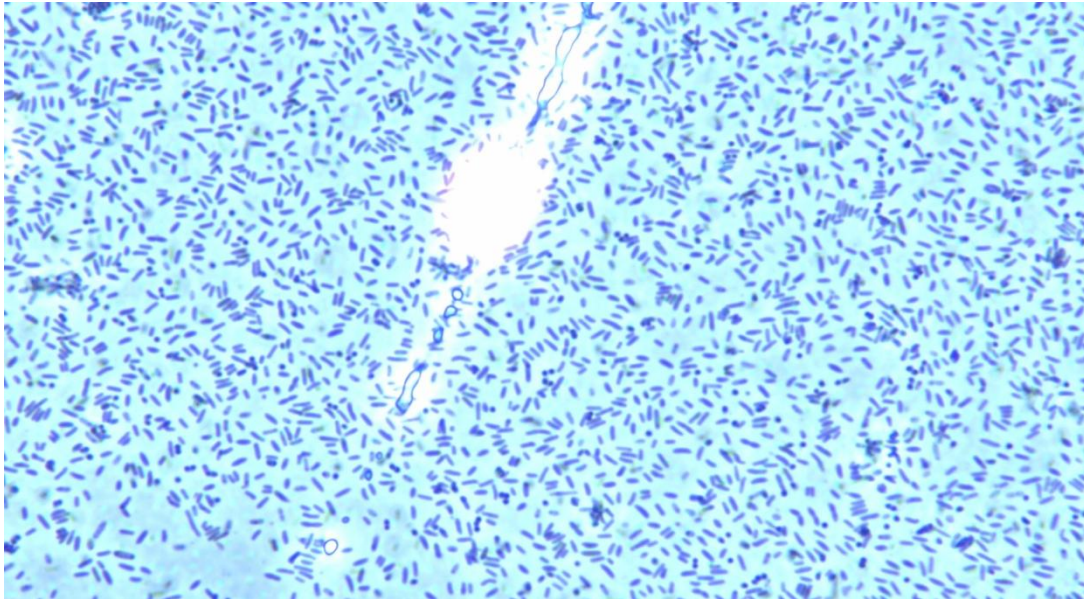


Obr. 6 Pasáž č. 15 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* v poměru 5:100 tekutého LB média ve 12°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* po 24 hodinách (zvětšení 1000x).



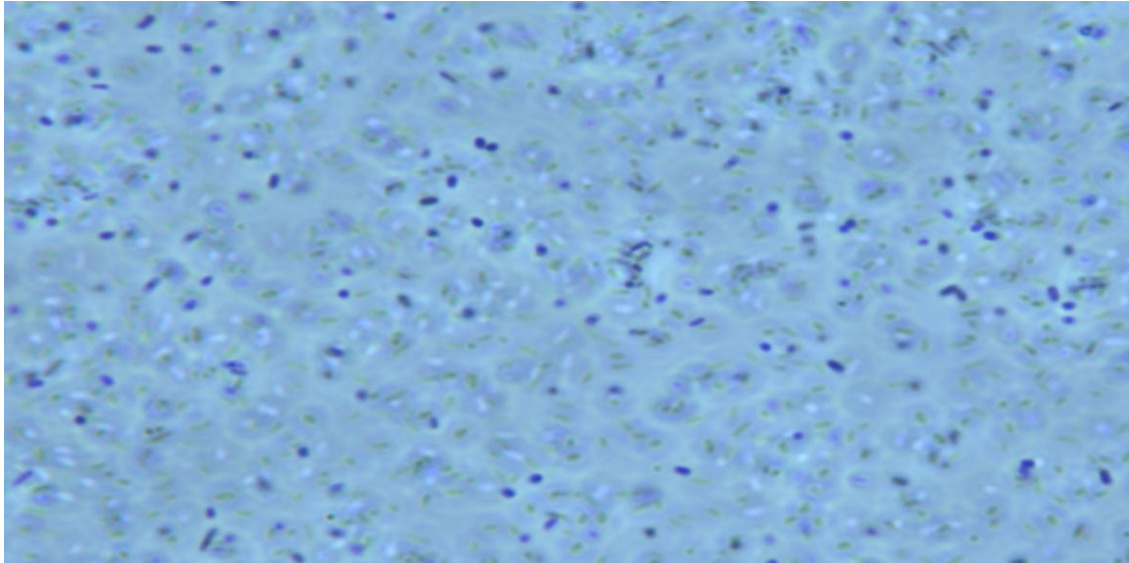
Obr. 7 Pasáž č. 16 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* v poměru 3:100 tekutého LB média ve 12°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* po 48 hodinách (zvětšení 1000x).

I po více dnech docházelo k jednoznačné převaze bakterií Z1 nad bakteriemi *Staphylococcus aureus* v 15. pasáži (obr. 8). Bakterie Z1 dominovala ve vzorku s odhadem zhruba v 98%. Podobný výsledek byl zaznamenán i u 16. pasáže.

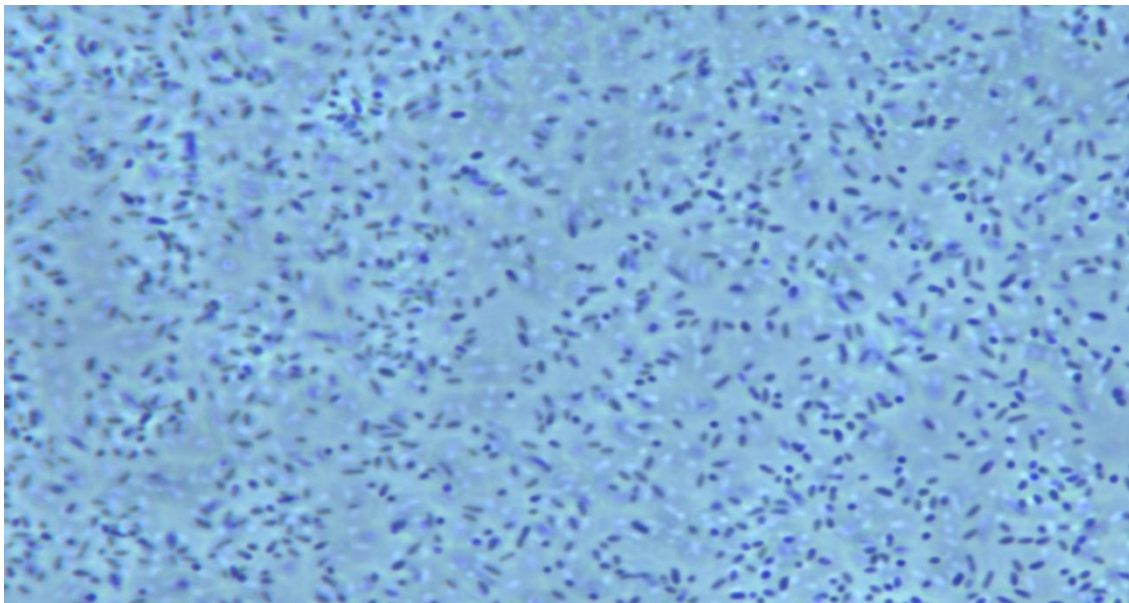


Obr. 8 Pasáž č. 15 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* v poměru 5:100 tekutého LB média ve 12°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* po 9 dnech (zvětšení 1000x).

Protože výsledky šlechtění 15. pasáže a 16. pasáže byly velmi uspokojivé, u 16. pasáže došlo k navýšení teploty z 12°C na 14°C o 2°C. Koncentrace bakterií byla však zachována a vytvořila se 17. pasáž také v poměru koncentrací 3:100 (30 μ l Z1 a 1000 μ l *Staphylococcus aureus*). Do 17. pasáže se však dostala v průběhu šlechtění kontaminace od much, pravděpodobně *Bradysia paupera*, a pasáže musely být neustále čistěny křížovým roztěrem pro izolaci kolonií. Pasáž číslo 18. po vyčištění vykazovala dobré výsledky, proto u této pasáže byla navýšena teplota na 15°C. Bakterie Z1 jednoznačně převažovala nad *Staphylococcus aureus* i v 15°C (obr. 9). Nicméně do pasáže číslo 19. se také dostala kontaminace a proces šlechtění byl opět zpomalen. Nicméně po čištění pasáže vykazovala slibné výsledky (obr. 10).



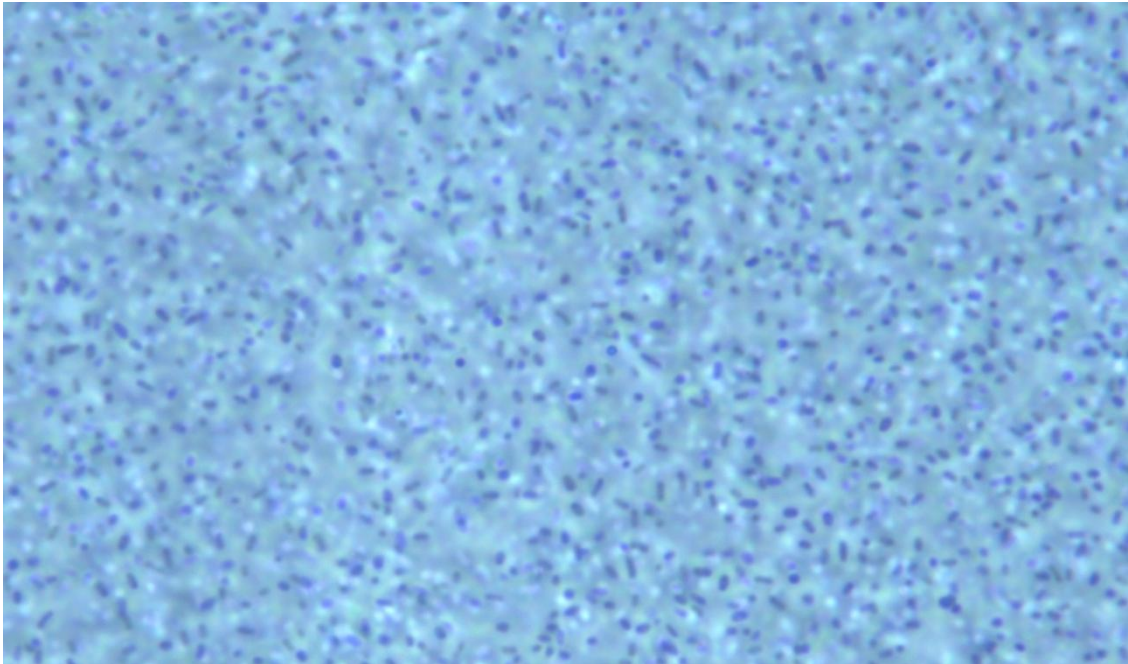
Obr. 9 Pasáž č. 18 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* v poměru 3:100 tekutého LB média v 15°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* po 3 týdnech (zvětšení 1000x).



Obr. 10 Pasáž č. 19 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* v poměru 1:10 tekutého LB média v 15°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* po 5 dnech (zvětšení 1000x).

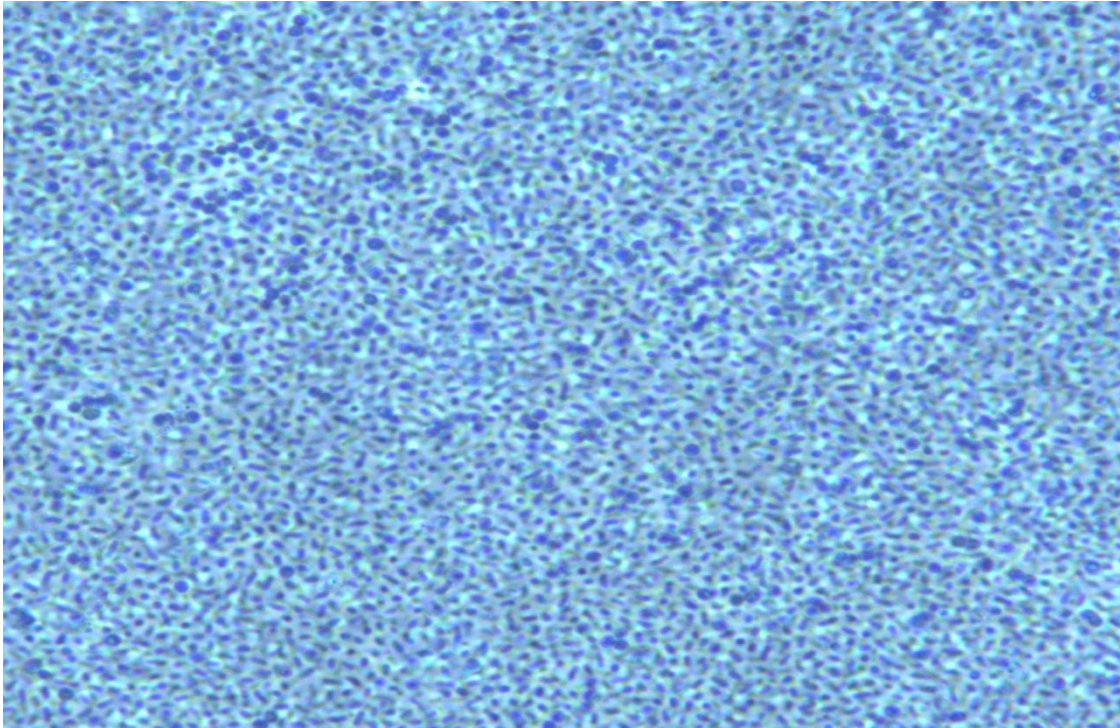
Šlechtění vykazovalo dobré výsledky v předchozích pasážích číslo 19., 20., 21., tak bylo možné navýšit u 22. pasáže teplotu z 15°C na 18°C. V předchozích krocích byla teplota navyšována postupně, ale z důvodu zdržení s kontaminacemi se následně podařila teplota zvýšit až o 3°C. Pasáž číslo 22. v 18°C vykazovala také slibné výsledky i v původním poměru koncentrací 1:100 bakterie Z1 proti *Staphylococcus aureus*. I v takto malém množství dokázala bakterie Z1 potlačit vysoké množství *Staphylococcus aureus* a

početně zvítězit (obr. 11). V takto malé koncentraci potřebovala bakterie Z1 více času na potlačení bakterie *Staphylococcus aureus*. Proto je lepší volit vyšší koncentrace bakterií pro rychlejší šlechtění, například od 3:100 a vyšší.



Obr. 11 Pasáž č. 22 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* v poměru 1:100 tekutého LB média v 18°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* po 12 dnech (zvětšení 1000x).

Od pasáže číslo 23. došlo k dalšímu navýšení teploty z 18°C na 20°C. Nyní se teplota navyšuje už pouze jen o 2°C. Důvodem je, aby bakterie Z1 lépe rostla v nových podmínkách a nebyla vystavena velkému teplotnímu rozdílu. Pasáž číslo 26. byla následně vystavena vyšší teplotě 22°C v termostatu a vykazovala dobré výsledky šlechtění (obr. 12). Následně byla využita pro difúzní diskový test proti *Staphylococcus aureus* z první pasáže.

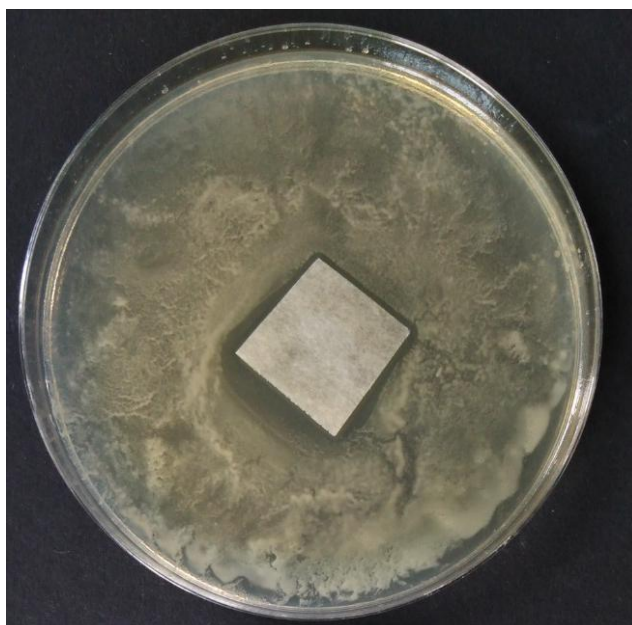


Obr. 12 Pasáž č. 26 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* v poměru 1:10 na agarové půdě ve 22°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* po 4 dnech (zvětšení 1000x).

Při druhé izolaci antibiotika, které bylo účinné ve 22°C, byly vytvořeny opět dvě Petriho misky s izolovaným šlechtěným antibiotikem z 26. pasáže na filtračním papírku proti *Staphylococcus aureus*. Jedna Petriho miska byla umístěna do pokojové teploty s předpokladem fungování antibiotika, protože bylo šlechtěno na účinnost ve vyšších teplotách do 22°C. Výsledkem byla tvorba inhibiční zóny kolem kulatého filtračního papírku v 18-19°C (obr. 13). Druhá Petriho miska byla umístěna do termostatu na 22°C a výsledkem byla opět tvorba inhibiční zóny kolem hranatého filtračního papírku (obr. 14). Oba výsledky byly viditelné už po 24 hodinách. Zároveň byla provedena i kontrola, kde byla na agarovou plotnu Petriho misky vyseta kolonie *Staphylococcus aureus*, do středu byl vložen filtrační papírek bez izolovaného antibiotika. Podle očekávání se po 24 hodinách, žádná inhibiční zóna nevytvořila (obr. 15).



Obr. 13 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti *Staphylococcus aureus* v pokojové teplotě 18-19°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.



Obr. 14 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti *Staphylococcus aureus* ve 22°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.

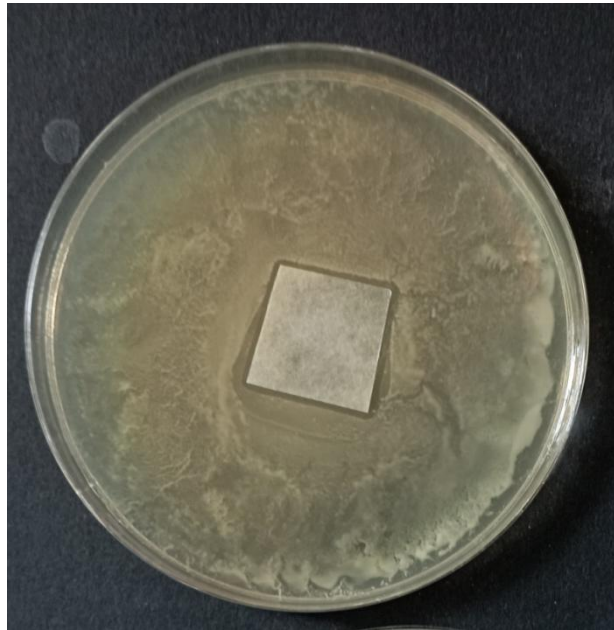


Obr. 15 Kontrolní diskový difúzní test bez izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 na filtračním papíru proti *Staphylococcus aureus* ve 22°C bez inhibiční zóny po 24 hodinách.

Výsledky tvorby inhibičních zón byly zkontrolovány i po 3 dnech. Po 3 dnech se inhibiční zóny zmenšily (obr. 16, 17). Důvodem může být selekční tlak na bakterie *Staphylococcus aureus*, tak některé mohly mutovat pro migraci i do jiných částí Petriho misek, kde je více živin. Dalším důvodem může být právě nestabilita izolovaného antibiotika a zřejmě se může po více dnech rozpadat. Nicméně po kontrole difúzního diskového testu po 2 týdnech byla na Petriho miskách stále zřetelná inhibiční zóna a antibiotikum stále působí do určité míry i po 2 týdnech.

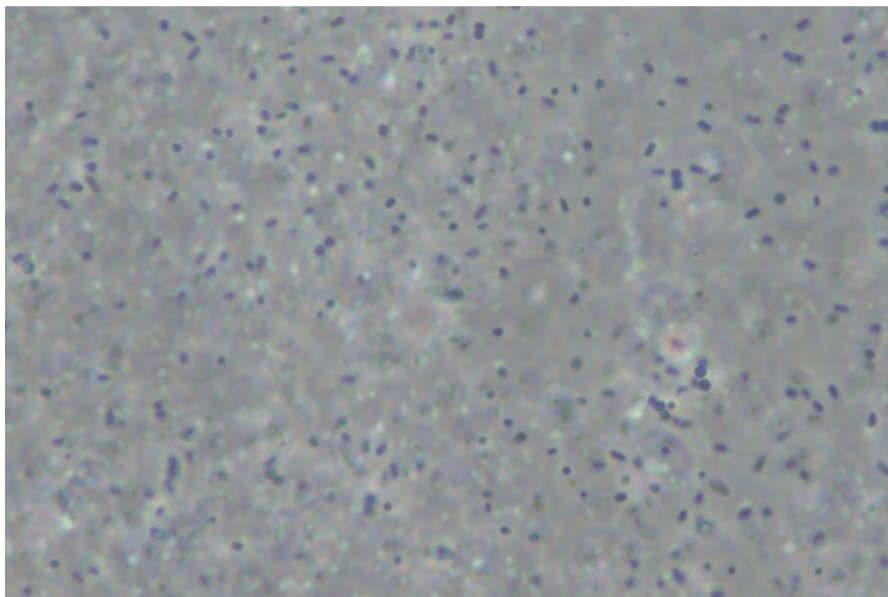


Obr. 16 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti *Staphylococcus aureus* v pokojové teplotě 18-19°C s inhibiční zónou po 3 dnech.

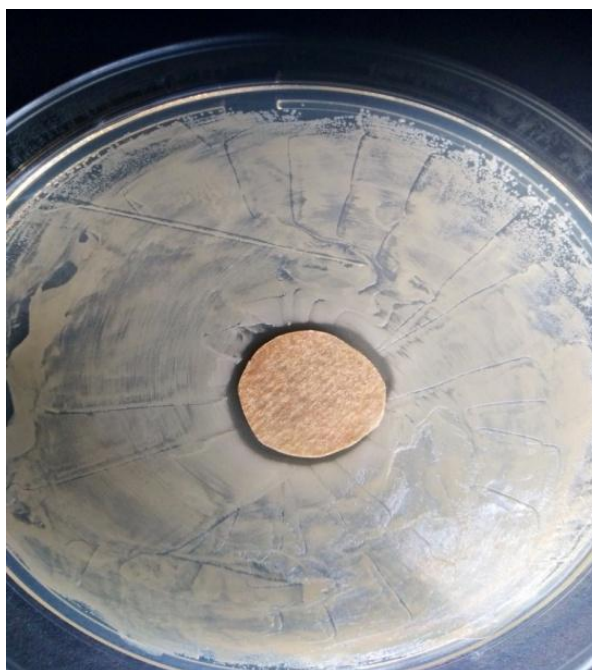


Obr. 17 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti *Staphylococcus aureus* ve 22°C s inhibiční zónou po 3 dnech.

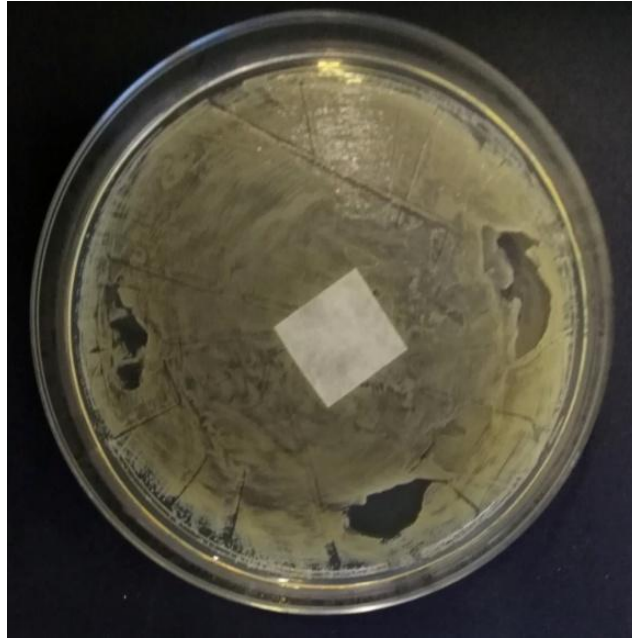
Protože pasáž číslo 28 (obr. 18) a 29 vykazovala převahu Z1 bakterie nad *Staphylococcus aureus* bylo z 29. pasáže izolováno antibiotikum k difúznímu diskovému testu. Je velmi důležité brát v úvahu koncentrace antibiotik s bakteriemi na Petriho miskách. Více Petriho misek k izolaci antibiotika (20 a více, při velikosti misky 90 mm) mají větší účinnost a zajišťují širší inhibiční zónu. Pasáž č. 29 ve 32°C vykazuje dobré výsledky difúzního diskového testu izolovaného antibiotika (obr. 19) a byla zároveň provedena kontrola s filtračním papírkem bez izolovaného antibiotika (obr. 20). Antibiotikum proti *Staphylococcus aureus* účinkuje i ve 32°C.



Obr. 18 Pasáž č. 29 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Staphylococcus aureus* v poměru 1:100 v 31°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Staphylococcus aureus* po 2 dnech (zvětšení 1000x).

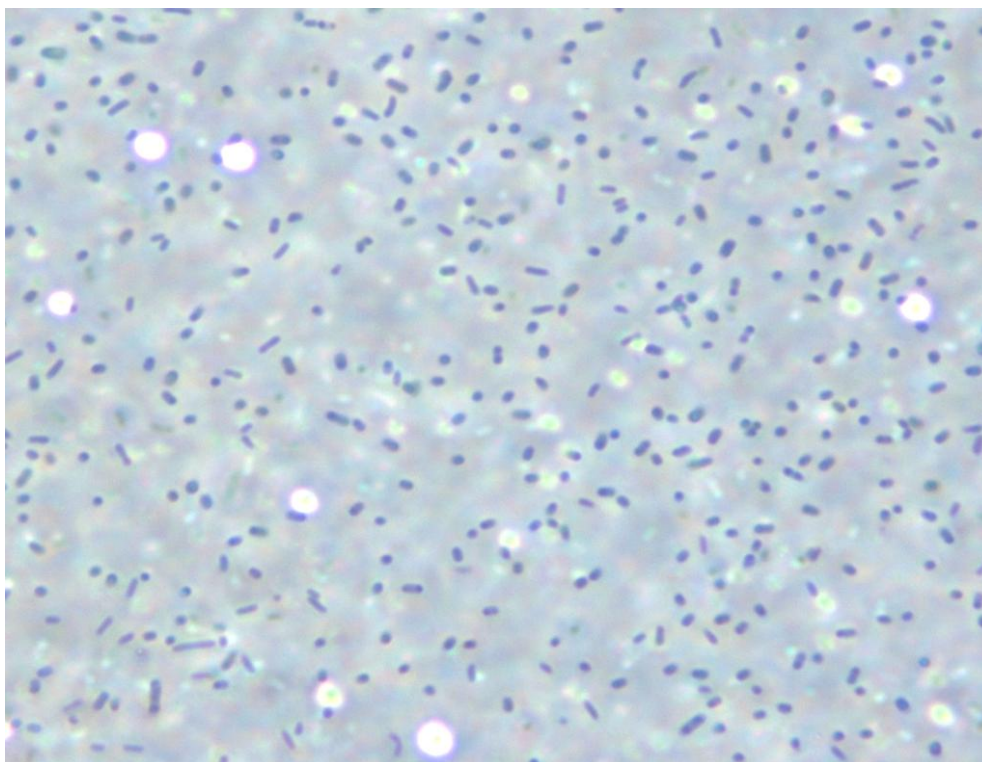


Obr. 19 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti *Staphylococcus aureus* ve 32°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.

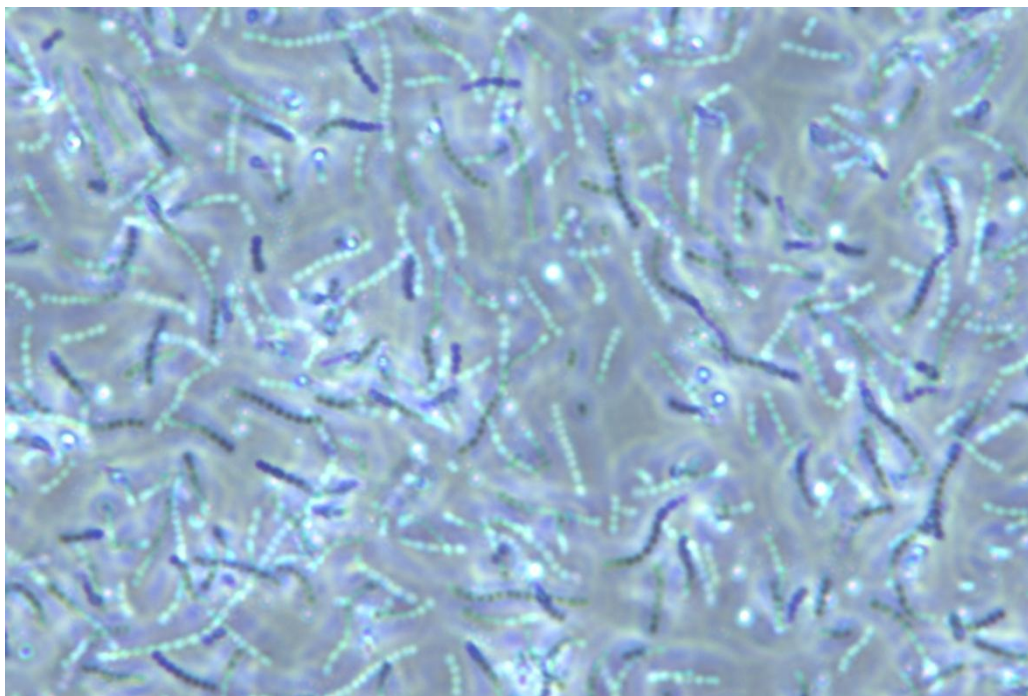


Obr. 20 Kontrolní diskový difúzní test bez izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 na filtračním papíru proti *Staphylococcus aureus* ve 32°C bez inhibiční zóny po 24 hodinách.

Šlechtění antibiotika proti *Streptococcus agalactiae* probíhalo obdobně jako u *Staphylococcus aureus*. Pro nové pokusy bylo využito šlechtěných Z1 proti *Staphylococcus aureus* z vyšších teplot. Velmi dobré výsledky vykazovala pasáž č. 26 šlechtěná proti *Staphylococcus aureus* ve 22°C. Tyto bakterie se velmi rychle adaptovaly na první nový kontakt s bakterií *Streptococcus agalactiae* a již ve 4 pasáži se podařilo získat velmi slibné výsledky (obr. 21). Výhodou byla především jejich schopnost růstu ve vyšších teplotách, než jsou teploty okolo 12-20°C. Proces šlechtění se tímto způsobem velmi urychlil. Pasáž číslo 4 byla šlechtěna na teplotu 30°C v poměru 3:10. Vykazovala nejlepší výsledky šlechtění a potlačila většinu bakterií *Streptococcus agalactiae*. Bakterie *Streptococcus agalactiae* bez kontaktu s bakteriemi Z1 rostou ve 30°C velmi dobře a nejeví žádné známky potlačení (obr. 22).

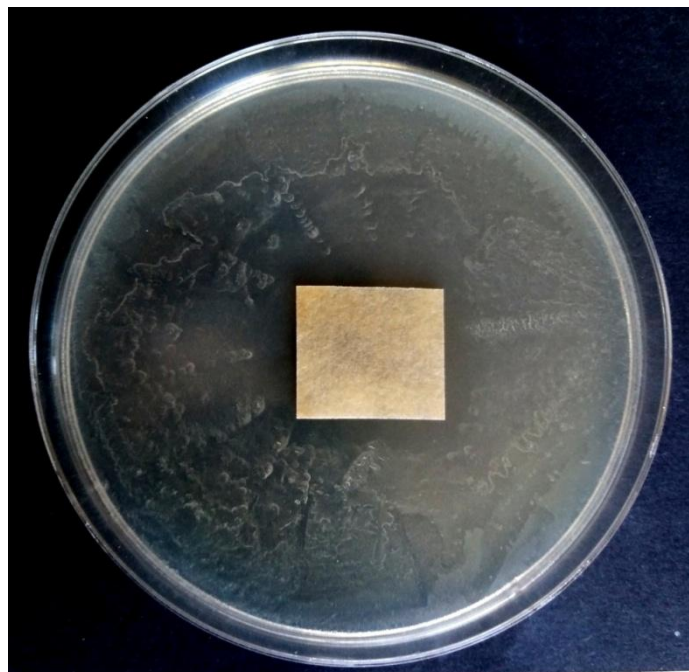


Obr. 21 Pasáž č. 4 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Streptococcus agalactiae* v poměru 3:10 na agarové půdě ve 30°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Streptococcus agalactiae* po 4 dnech (zvětšení 1000x).

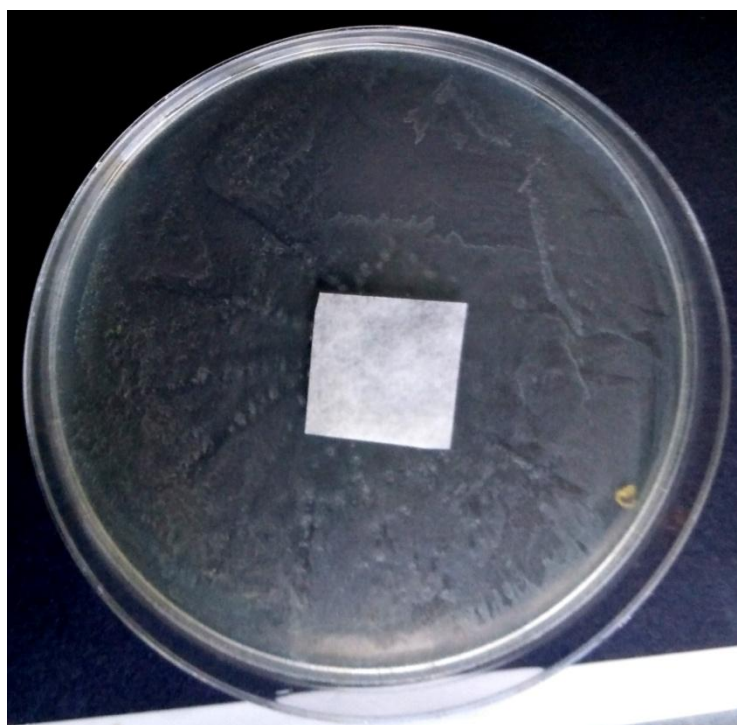


Obr. 22 Čistá kultura *Streptococcus agalactiae* v agarové půdě při teplotě 30°C bez kontaktu bakterií Z1 po 3 dnech (zvětšení 1000x).

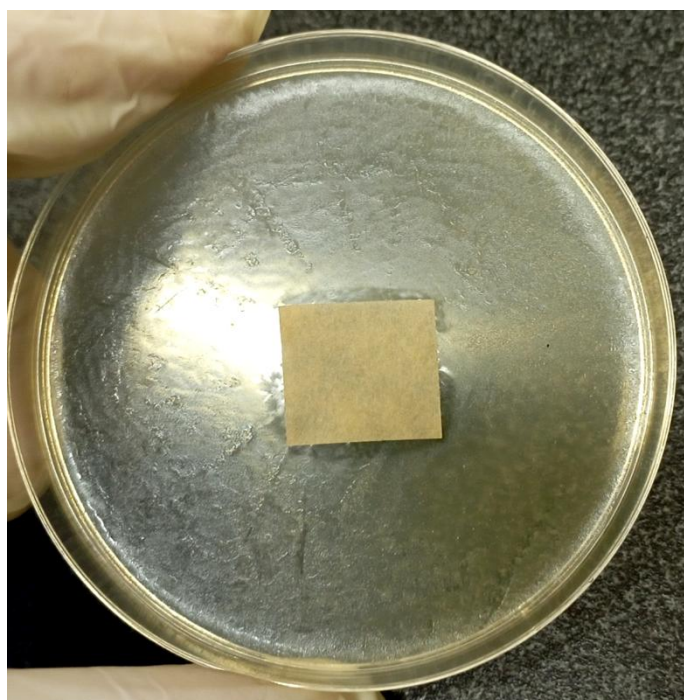
Zároveň byla vytvořena 5. pasáž šlechtěná na 31°C. Vzhledem k velmi dobrým výsledkům šlechtění bakterií Z1 na produkci antibiotik proti bakteriím *Streptococcus agalactiae* byl proveden diskový difúzní test. Test ověřoval účinnost antibiotik produkovaných bakteriemi Z1 proti čisté kultuře *Streptococcus agalactiae*, která se neseťkala s bakteriemi Z1 (původní kultura *Streptococcus agalactiae*). Výsledkem byla tvorba inhibiční zóny okolo disku v teplotě 29°C (obr. 23). Vzhledem k citlivosti šlechtěných antibiotik na teplotu, byla zvolena teplota 29°C a silné koncentrace (40 misek o průměru 60 mm). Antibiotikum v těchto vysokých teplotách je velmi citlivé a jeho účinnost se snižuje, pokud dojde k teplotním výkyvům nad hranici 31°C. Mimo jiné byla provedena i kontrola. Disk byl napuštěn ethylesterem kyseliny octové bez antibiotika a inhibiční zóna se dle očekávání nevytvořila (obr. 24). I po 10 dnech antibiotikum na Petriho misce proti *Streptococcus agalactiae* stále účinkuje, ale inhibiční zóna se postupně zmenšuje (obr. 25). Účinnost antibiotika byla ověřována i s izolovaným antibiotikem v kulatém papírku se zřetelnou inhibiční zónou při 29°C (obr. 26) i účinnost při nižší koncentraci izolovaného antibiotika - 14 Petriho misek o průměru 60 mm ve 31°C. Výsledkem nižší koncentrace antibiotika byla velmi slabá inhibiční zóna o velikosti 1 mm (obr. 27), viditelná pouze při detailním pohledu. To poukazuje na potřebu vyšších koncentrací antibiotika, jinak je účinnost antibiotika nepatrná.



Obr. 23 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti *Streptococcus agalactiae* v 29°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.



Obr. 24 Kontrolní diskový difúzní test bez izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 na filtračním papíru proti *Streptococcus agalactiae* v 29°C bez inhibiční zóny po 24 hodinách.



Obr. 25 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na hranatém filtračním papíru proti *Streptococcus agalactiae* v 29°C s inhibiční zónou po 10 dnech.

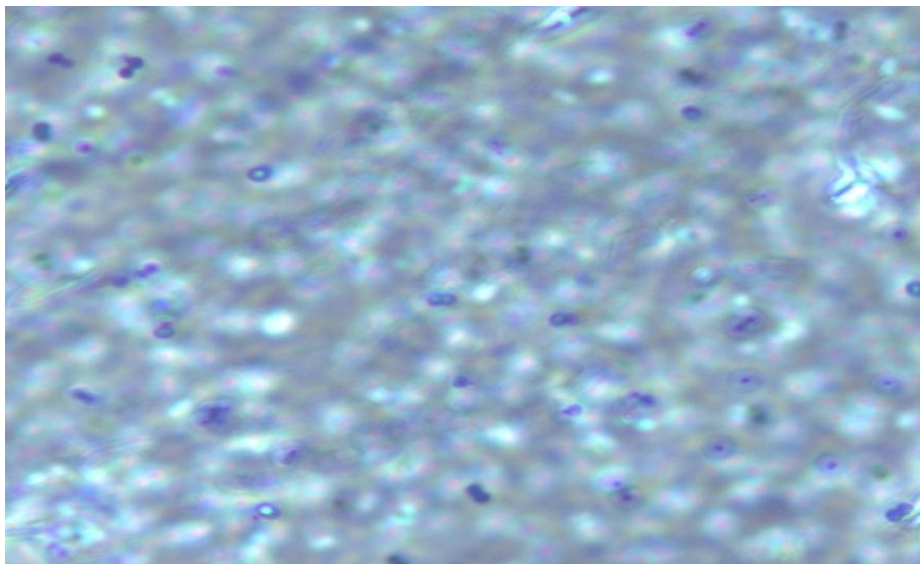


Obr. 26 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na kulatém filtračním papíru proti *Streptococcus agalactiae* v 29°C s inhibiční zónou po 10 dnech.



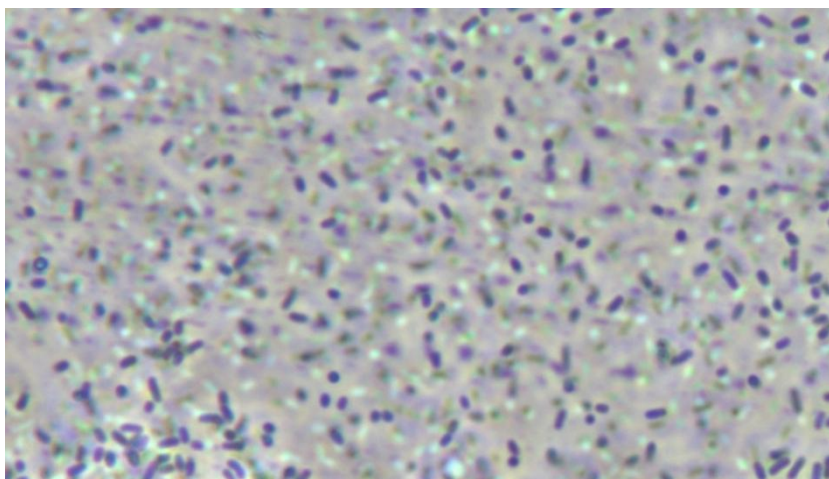
Obr. 27 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti *Streptococcus agalactiae* v 31°C s inhibiční zónou 1 mm po 24 hodinách.

Šlechtění antibiotika proti *Acinetobacter baumannii* (obr. 28) probíhalo obdobně jako u *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae*. Šlechtění započalo na teplotě 30°C v poměru koncentrací 1:1.

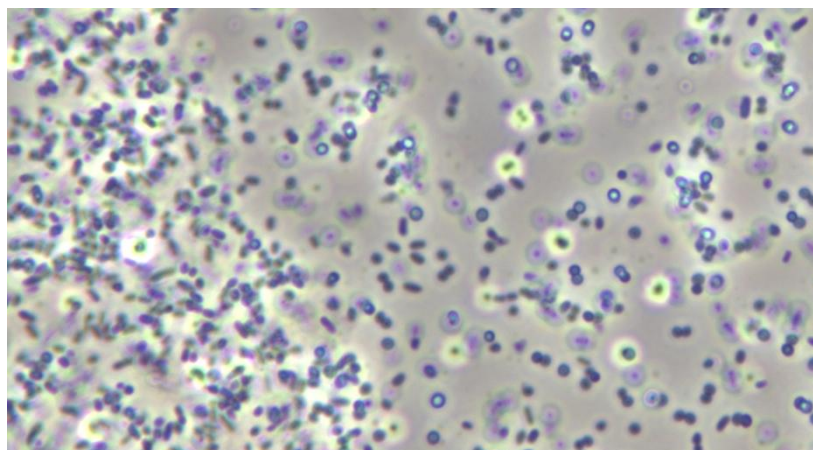


Obr. 28 Kultivace *Acinetobacter baumannii* (zvětšení 1000x)

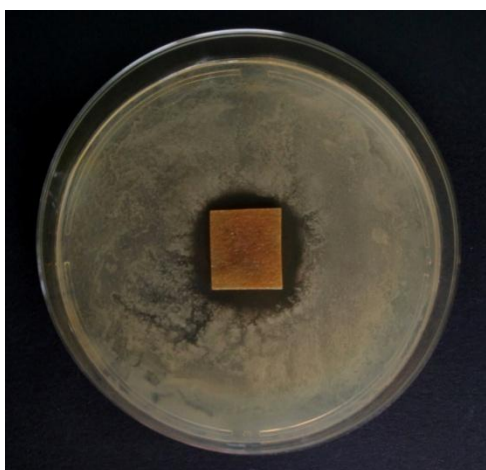
Pasáž č. 2 vykazovala velmi dobré výsledky šlechtění ve 31°C a početní převahu bakterií Z1 nad *Acinetobacter baumannii* (obr. 29). Pasáž č. 5 (obr. 30) byla použita k difúznímu diskovému testu antibiotika ve 31°C, které účinkovalo na bakterie *Acinetobacter baumannii* a vytvořila se kolem filtračního papírku inhibiční zóna (obr. 31,32). Zároveň byla provedena kontrola (obr. 33).



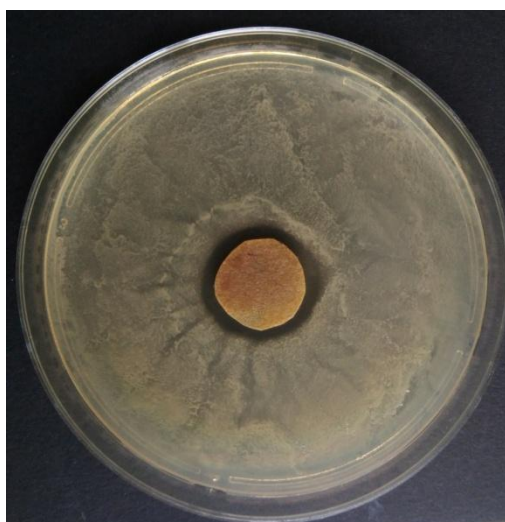
Obr. 29 Pasáž č. 2 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Streptococcus agalactiae* v poměru 1:2 ve 31°C. Početní převaha bakterie Z1 nad *Acinetobacter baumannii* po 5 dnech (zvětšení 1000x).



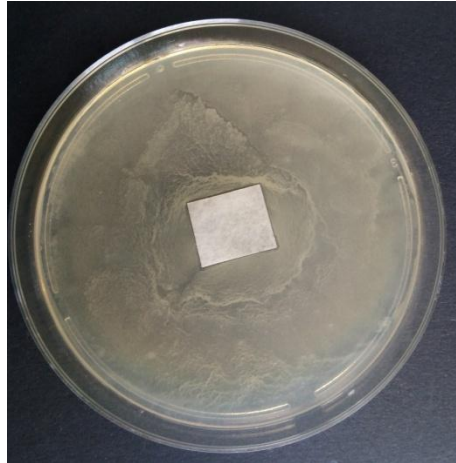
Obr. 30 Pasáž č. 4 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a *Acinetobacter baumannii* v poměru 2:10 ve 31°C (zvětšení 1000x) pro izolaci antibiotika.



Obr. 31 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na hranatém filtračním papíru proti *Acinetobacter baumannii* ve 31°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.

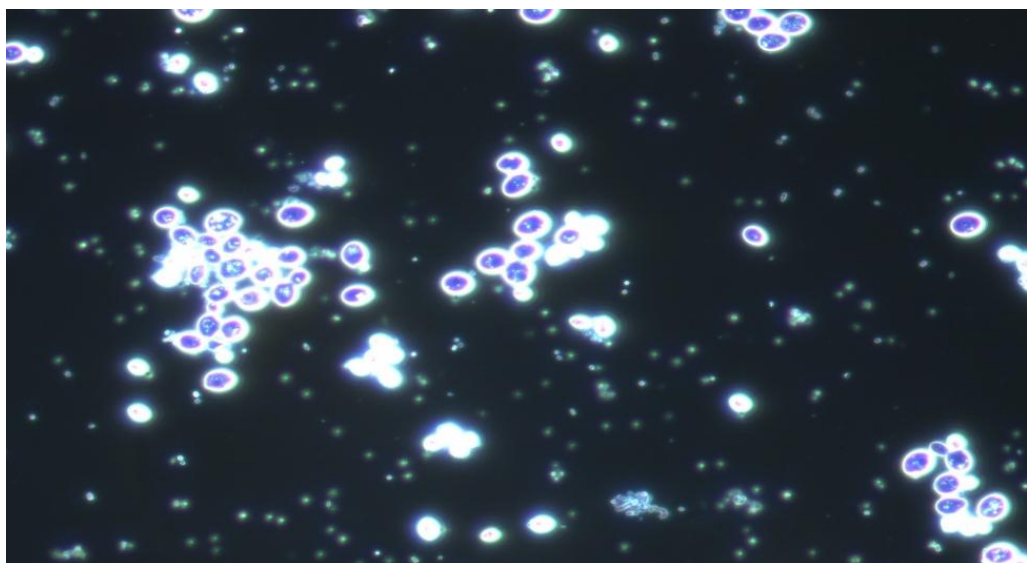


Obr. 32 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na kulatém filtračním papíru proti *Acinetobacter baumannii* ve 31°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.

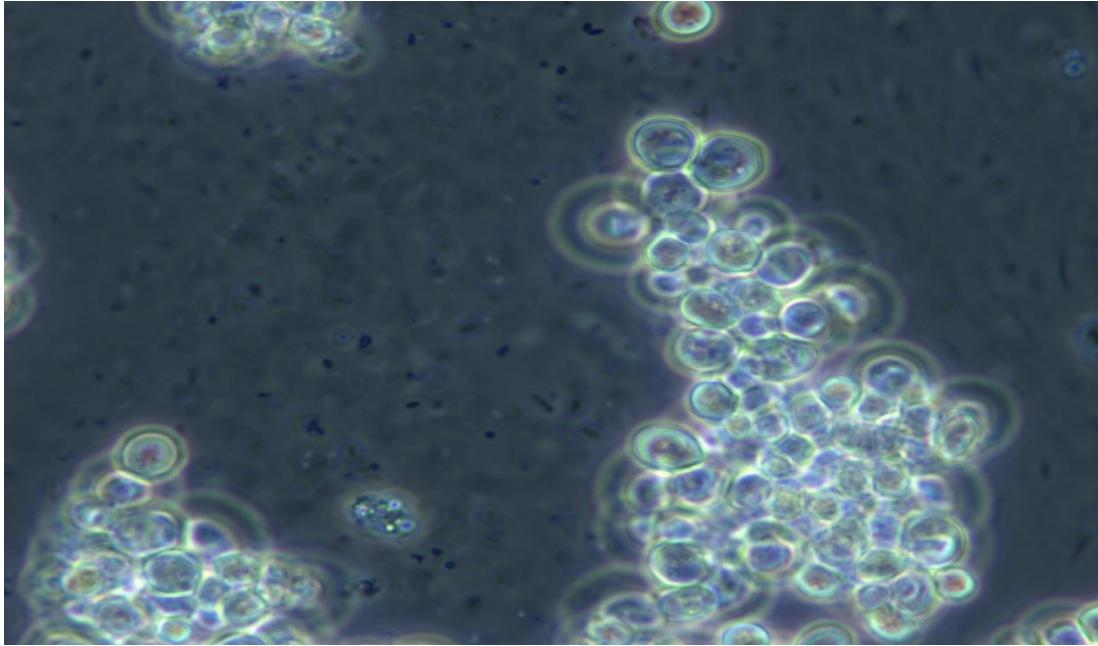


Obr. 33 Kontrolní diskový difúzní test bez izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 na filtračním papíru proti *Acinetobacter baumannii* ve 31°C bez inhibiční zóny po 24 hodinách.

Pokus na výrobu antibiotik byl proveden i na *Saccharomyces cerevisiae*. Šlechtění antibiotik započalo na 12°C v poměru koncentrací 1:1 a teplota byla postupně zvyšována jako u *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus*. Po druhém styku bakterií Z1 s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* nedocházelo k žádné produkci antibiotik a potlačení kvasinek (obr. 34). I v pasáži číslo 4., která byla umístěna v termostatu na 15°C nedocházelo k žádným známkám produkce antibiotik proti kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (obr. 35). Šlechtění antibiotika a celková produkce antibiotik bakteriemi Z1 nefunguje proti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*, jelikož bakterie Z1 početně nezměly nad kvasinkami.



Obr. 34 Pasáž číslo 2. s bakteriemi Z1 a kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* po 7 dnech v tekutém LB médiu, koncentrace 1:1 ve 12°C (zvětšení 1000x). Žádné známky produkce antibiotik proti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*.



Obr. 35 Pasáž číslo 4. s bakteriemi Z1 a kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* po 21 dnech v tekutém LB médiu, koncentrace 1:1 v 15°C (zvětšení 1000x). Žádné známky produkce antibiotik proti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*.

6 DISKUZE

Tato diplomová práce je unikátní v tom, že pojednává o možnosti vyšlechtění speciálních antibiotik proti různým bakteriím. Ke šlechtění se využívají bakterie, které jsou schopné produkovat antimikrobiální látky, které jim pomáhají v prosazování svého druhu k získávání živin a celkového prostředí, ve kterém se vyskytují, na úkor jiných druhů bakterií. Bakterie Z1 je schopná produkovat antibiotika proti jiným druhům bakterií. Toho se dá využít k výrobě antibiotik. Antibiotika byla vyráběná proti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Acinetobacter baumannii*.

Genetické inženýrství a genové manipulace se staly v 70. letech 20. století velmi diskutované a žádané, především k výrobě antibiotik (Vyskočil a Zelený 1982). Za počátkem vzniku genetického inženýrství stály manipulace s geny žab a bakterií, geneticky modifikovaný inzulin nebo šlechtění geneticky modifikovaných rostlin. Především se přenášejí geny jednoho organismu do druhého organismu s cílem odstranit nežádoucí vlastnosti (Slezáčková 2016). Velmi často se k tomu právě využívají plazmidy (Vyskočil a Zelený 1982). V dnešní době jsou velmi oblíbené genové manipulace, které jsou velmi užitečné avšak finančně nákladné. Dle Slezáčková (2016) hlavním rozdílem mezi klasickým šlechtěním a genetickým inženýrstvím je to, že při genové manipulaci se může přenést jedna i více vlastností, zároveň je i rychlejší. Klasickým šlechtěním se mohou dostávat do genů i vlastnosti nežádoucí a proces šlechtění trvá i delší dobu (Slezáčková 2016). Evoluce a šlechtění bakterií na produkci antibiotik je však méně nákladné a pro přírodu přirozené. Bakterie do společného kontaktu přicházejí velmi často a musí spolu neustále bojovat o živiny, prostředí a život prostřednictvím produkce sekundárních metabolitů, kterými jsou například i naše antibiotika. Bakterie v přírodě mohou produkovat nejrůznější antibiotika mnohokrát v nejrůznějších podmínkách. Proto je velmi dobré se zaměřit na tyto bakterie a potenciál šlechtění antibiotik touto cestou. Můžeme získat touto cestou nejnovější různá léčiva na širokou škálu onemocnění, například naše antibiotika proti infekcím *Staphylococcus aureus*. Bakterie se evolučně přizpůsobují svému prostředí a tím se musí evolučně přizpůsobovat i jejich sekundární metabolity, aby působily na konkurenční druhy. Výhodou evolučního šlechtění bakterií je především rychlost. Šlechtění například pavouků a jejich antimikrobiálních peptidů by bylo velmi dlouhou cestou, jelikož reprodukce nových generací oproti bakteriím trvá delší dobu. Nicméně i šlechtění jiných organismů s produkcí antimikrobiálních peptidů by mohlo být cestou

k výrobě nových léčiv, zejména antibiotik. U bakterií je velká výhoda jejich rychlého množení a evoluce jejich generací, které přizpůsobují i svá produkovaná antibiotika.

Vzhledem k výsledkům lze tvrdit, že se procesem šlechtění bakterií dá jednoznačně docílit výroby nových antibiotik proti konkrétním druhům bakterií. Tento výsledek má obrovský potenciál pro zdravotnický a farmaceutický průmysl. Zejména možnost vyrobit pomocí šlechtění bakterií různá antibiotika proti konkrétnímu typu bakteriálního onemocnění. Například by se touto metodou mohlo vyšlechtit antibiotikum proti bakterii *Vibrio cholerae* a získané antibiotikum poslouží k léčbě cholery. Přitom by nemělo zatěžovat organismus z hlediska působení antibiotik na jiné druhy bakterií, které v lidském těle přirozeně žijí. Antibiotikum by bylo úzce specializované pouze na konkrétní druh bakterie. Nicméně na blízce příbuzné bakterie by mohlo taktéž účinkovat, ale to by mohlo být nové téma pro další studii.

Šlechtění antibiotik bylo zaměřeno zejména na vybrané druhy ze seznamu WHO, na které omezeně účinkují antibiotika a vyžadují novou výrobu antibiotik v boji proti chorobám a rezistencím bakterií. Tyto bakterie ze seznamu WHO vyjadřují pro lidstvo hrozbu, jelikož léčba antibiotiky může postupně selhávat narůstající rezistencí těchto bakterií. Z tohoto důvodu byly zvoleny bakterie *Staphylococcus aureus*, které se nachází zhruba ve středu tabulky priorit WHO pro výrobu nových antibiotik, dále bakterie *Acinetobacter baumannii*, které se nachází na prvním místě potřeby výroby nových antibiotik. Zároveň byla dále zvolena bakterie *Streptococcus agalactiae*, která se nenachází na seznamu WHO, ale pro pokus na výrobu antibiotik byla dostačující.

Mimo jiné bylo zjištěno, že díky zvyšování stresu u bakterií Z1 na agarových plotnách a v tekutém médiu docházelo k adaptaci na podmínky prostředí a různé teploty. Tím se podařilo vyšlechtit i antibiotikum na vyšší teploty. V další práci by se mimo jiné mohlo začít zabývat šlechtěním antibiotika na teploty vyšší než 37°C, aby antibiotikum mohlo účinkovat v lidském těle i při horečnatých stavech, optimálně do 42°C. Při kultivaci bakterií Z1 a jejich testování kompetitivních interakcí bylo zjištěno, že jsou bakterie Z1 velmi citlivé na teplotu a teplotní výkyvy. To samé zřejmě platí i pro jejich produkované antibiotikum na potlačení jiných bakteriálních druhů. Při další výrobě antibiotik pomocí bakterií Z1 je nutno dbát na opatrnost s nastavováním teplotních podmínek pokusů. Antibiotikum je tepelně nestabilní, a proto je nutno ho šlechtit dál na vyšší teploty. Optimálně zvyšováním teploty postupně od 1-3°C. Zejména u teplot vyšších nad 31°C je

optimální zvyšovat teplotu pouze o 1°C. Bakterie Z1 jsou už kriticky citlivé na teploty vyšší nad 30°C, proto se musí šlechtit delší čas (2-3 týdny).

V průběhu šlechtění se do kompetitivních bojů bakterií dostávala kontaminace od much pravděpodobně *Bradysia paupera*. Občas tedy probíhal boj pravděpodobně mezi 3 různými druhy/rody bakterií. Celkové šlechtění se protáhlo a každá pasáž se musela neustále čistit. Několikrát se stalo, že minimálně v jedné Petriho misce kontaminace bakterií vyhrála kompetitivní boje a v jiných nikoliv. Tam, kde zůstala bakterie Z1, podařila se křížovým roztěrem získat a uchovat pro další šlechtění v případě dalších kontaminací. Každopádně kontaminace bakterií od much byla velmi zajímavá, protože pravděpodobně tyto bakterie také dokážou produkovat antibiotikum a také dokázaly potlačit *Staphylococcus aureus* nebo *Streptococcus agalactie*. Bakteriální kontaminace od much mohou mít také obrovský potenciál pro výrobu nových antibiotik a v dalších pracích by bylo vhodné toto otestovat. Je i velmi pravděpodobné, že bakterie od much a bakterie Z1 mohly spolupracovat a kompetitivně potlačit bakterie *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactie*. Ve společné kombinaci by mohly vytvářet silnější antibiotika. Výzkum byl však zaměřen na produkci antibiotika samostatné bakterie Z1.

Westhoff et al. (2021) uvádí ve své publikaci, že lepší fungování antibiotika je účinnější mezi fylogeneticky příbuznými bakteriemi (Westhoff et al. 2021). Ačkoliv veškeré testované bakterie jsou fylogeneticky nepřibuzné s bakterií Z1, která je velmi podobná bakterii *Pantoea agglomerans*, a zároveň antibiotika proti použitým konkurenčním bakteriím fungují dobře. Vše je však závislé na koncentracích antibiotik. Čím více Petriho misek se vytvoří pro kompetitivní interakce bakterií, tím větší množství antibiotik získáme, zároveň je lepší vytvořit stresové podmínky pro bakterie Z1, aby tvořily více antibiotik.

Šlechtění antibiotik proti kvasinkám nevykazovalo žádnou účinnost. Lze tedy tvrdit, že antibiotikum proti *Saccharomyces cerevisiae* nefunguje a tedy pravděpodobně nebude účinkovat proti eukaryotním buňkám. Je proto naděje, že pro eukaryotní buňky mělo být neškodné, což podporuje možnost zaměřit výrobu antibiotik pro lidské užívání v léčebném procesu. Proto by se měly další výzkumy zaměřit na testování vyšlechtěných antibiotik na eukaryotních buňkách, savců a v poslední řadě je nutno prozkoumat účinek na lidský organismus. Případné škodlivé účinky by použití v lidské medicíně pravděpodobně vyloučily. Ale případný úspěch by mohl celkově podpořit úspěšnou léčbu bakteriálních onemocnění a snížit zatížení organismů antibiotiky, které působí i proti jiným druhům bakterií, než na původce patogenů.

Aby se zlepšil proces šlechtění bakterií na produkci antibiotik a zamezilo se případnému šíření rezistencí vzniklých procesem šlechtění, bylo by vhodné každou pasáž následně čistit křížovým roztěrem, aby se získala čistá kolonie bakterií Z1. Tímto způsobem by se mohlo podařit eliminovat například případné rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus*, které si mohou své rezistence předávat mezi sebou v generacích například skrze plasmidy. Získané čistě vyšlechtěné kolonie Z1 z křížového roztěru se umístí do interakce s dalšími bakteriemi a nechají se šlechtit na další pasáž, například proti *Staphylococcus aureus* a i na vyšší teploty. Tímto způsobem by bylo možné zefektivnit proces šlechtění antibiotik pomocí bakterií, avšak celý proces by vyžadoval více času.

V dalších studiích by bylo i nadále vhodné pokračovat v šlechtění bakterií na produkci antibiotik. Bylo by zajímavé vyzkoušet i jiné bakterie na produkci antibiotik, které by mohly působit obdobně jako bakterie Z1. Tyto bakterie by mohly produkovat odlišné typy antimikrobiálních látek, které by mohly taktéž působit jako potencionální léčiva v boji s bakteriálními chorobami. Zároveň by bylo velmi vhodné zkusit vyšlechtit antibiotika například pomocí osvědčené bakterie Z1 proti jiným druhům bakterií a potencionálním původcům chorob. Šlechtit nové antibiotika by bylo vhodné například proti bakteriím *Enterococcus faecium*, *Helicobacter pylori*, *Salmonellae* či *Pseudomonas aeruginosa*. Mimo jiné by bylo velmi užitečné se v dalším výzkumu zaměřit na přesnou charakterizaci molekul produkovaného antibiotika bakterií Z1 a jednotlivé molekuly mezi sebou strukturně porovnat v rámci působení na různé druhy bakterií a stejně tak porovnat jejich chemické struktury při různých teplotách. Na základě provedených pokusů je pravděpodobné, že Z1 vytvářejí odlišné typy molekul antibiotik v závislosti nejen na konkurenčním druhu, ale také na teplotě.

ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na šlechtění specifických bakterií s provizorním názvem Z1, které jsou schopny produkovat antibiotika na potlačení konkurenčních druhů kompetitivní interakcí. Antibiotika byla šlechtěna proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Acinetobacter baumannii*. Zároveň všechna připravovaná antibiotika byla šlechtěna na vyšší teploty, protože původní šlechtění teplotně nestabilních antibiotik započalo na 12°C a podařilo se je vyšlechtit až na 32°C, což je rozdíl 20°C.

Veškerá antibiotika byla připravovaná skrze bakteriální kompetitivní interakce, kdy byly vytvářeny stresové podmínky pro život bakterií na Petriho miskách a v tekutém médiu. Dva různé bakteriální druhy musely soupeřit o živiny, prostor a svůj život a tímto způsobem byl na bakterie vyvíjen selekční tlak. Tyto bakterie se prosazovaly na úkor druhého druhu prostřednictvím produkce sekundárních metabolitů, které po otestování difúzní diskovou metodou byly označeny jako antibiotika. Evolucí a šlechtěním bakterií Z1 se podařilo vyrobit antibiotika.

Pro šlechtění v tekutém médiu a Petriho miskách byly použity média Luria-Bertani a Tryptone-soya-agar. Dále byly použity Petriho misky o průměru 90 a 60 mm. Množství Petriho misek mělo na výrobu účinného antibiotika zásadní vliv. Čím více Petriho misek, tím vyšší účinnost antibiotika a větší inhibiční zóna. Zpravidla je vhodné použít minimálně 14 Petriho misek o průměru 90 mm, aby byla inhibiční zóna dobře zřetelná. Je lepší zvolit více Petriho misek a do kompetitivní interakce dát více konkurenčních bakterií (např. *Acinetobacter baumannii*) a méně bakterií Z1. To vyvolá větší selekční tlak a větší produkci antibiotik. Pro šlechtění bakterií bylo vytvořeno několik různých pasáží, kam se přenášely a šlechtily nové generace bakterie Z1 proti původní kultuře konkurenčních bakterií. V případě podezření na vznikající rezistenci byla kultura čištěna křížovým roztěrem a čisté kolonie bakterií Z1 byly izolovány a uchovány pro další pasáž. V případě jednoznačného vítězství byla vybraná pasáž použita k izolaci antibiotika a otestování účinnosti difúzní diskovou metodou. Dále bylo pro izolaci antibiotik použito ethylesteru kyseliny octové a filtračního papíru připraveného na sterilní kolečka a kroužky. Po izolaci antibiotika do filtračního papíru byl proveden difúzní diskový test účinnosti antibiotika, kdy se vytvářela inhibiční zóna potvrdující přítomnost antibiotika bakterie Z1.

Ze získaných dat byly zpracovány výsledky práce speciálně pro výrobu a šlechtění antibiotika proti *Staphylococcus aureus*, zvláště pro *Streptococcus agalactiae* a zvláště pro *Acinetobacter baumannii*. Zároveň byly uvedeny i teploty šlechtění jednotlivých pasáží bakterií a poměry koncentrací. Testování antibiotik proti *Staphylococcus aureus* bylo provedeno difúzním diskovým testem v teplotách 12°C, 22°C, 32°C. Testování antibiotik proti *Streptococcus agalactiae* bylo provedeno difúzním diskovým testem v teplotách 29°C a 31°C. Testování antibiotik proti *Acinetobacter baumannii* bylo provedeno difúzním diskovým testem v teplotě 31°C. Výsledkem byla vždy tvorba inhibiční zóny o různé velikosti v závislosti na koncentraci antibiotika. Zároveň byla vždy u každého pokusu provedena kontrola bez izolovaného antibiotika, filtrační papír byl pouze namočen v ethylesteru kyseliny octové. Je však velmi důležité nechat filtrační papír dobře vyschnout. Mimo jiné byl proveden i pokus na účinnost antibiotik proti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*, kde se nevytvořila žádná inhibiční zóna a pravděpodobně je antibiotikum proti eukaryotním buňkám neškodné.

Neškodnost proti eukaryotním buňkám by měl podpořit další výzkum tohoto antibiotika, což by mohlo vést k přizpůsobení antibiotik pro lékařské účely a možnou léčbu bakteriálních infekcí. Šlechtění antibiotik je revoluční metoda, která podporuje výrobu nejrůznějších antibiotik, skrze produkci bakterií proti nejrůznějším bakteriálním infekcím. Tato metoda by mohla pomoci v léčbě infekcí i v boji se vznikající rezistencí bakterií na antibiotika ve světě.

RESUMÉ

Tato práce je zaměřena na proces šlechtění bakterií na produkci speciálních antibiotik. Práce se zaměřuje na získání antibiotik působících proti druhům bakterií *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Acinetobacter baumannii*. Proces šlechtění antibiotik byl proveden skrze kompetitivní interakce konkurenčních bakterií na Petriho miskách a v tekutém médiu. Na bakterie byl vyvíjen selekční tlak, který podpořil produkci antibiotik bakterií Z1 proti jinému konkurenčnímu druhu, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* nebo *Acinetobacter baumannii*.

Bakterie mezi sebou musely soupeřit o živiny, prostor s jiným druhem bakterie, tím produkovaly své sekundární metabolity a mezi nimi byly i samotné antibiotika. Tvorbou nových pasáží a generací bakterií kompetitivní interakcí se produkce antibiotik šlechtila a zdokonalovala. Šlechtění začalo na 12°C a postupně skončilo na 32°C, což je rozdíl 20°C pro teplotně nestabilní antibiotikum. To je jednoznačným důkazem, že se bakterie na produkci antibiotik dají šlechtit.

Účinkování antibiotik proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* a *Acinetobacter baumannii* bylo testováno difúzní diskovou metodou a vždy byla provedena kontrola. Difúzní diskový test antibiotika proti *Staphylococcus aureus* byl testován ve 12°C, 22°C a 32°C. Difúzní diskový test antibiotika proti *Streptococcus agalactiae* byl testován v 29°C a 31°C. Difúzní diskový test antibiotika proti *Acinetobacter baumannii* byl testován v 31°C. Výsledkem byla vždy tvorba inhibiční zóny kolem izolovaného antibiotika, což byl jednoznačný důkaz nejen o účinkování antibiotik, ale i o možnosti šlechtění antibiotik proti různým bakteriím a teplotám.

Tato práce je unikátní v tom, že přináší možnost šlechtění bakterií a jejich sekundárních metabolitů (například antibiotik) proti nejrůznějším bakteriím a teplotám. Díky této metodě je zde veliký potenciál v získání nových léčiv proti bakteriálním onemocněním a v boji s bakteriální rezistencí.

SUMMARY

This work is focused on the process of breeding bacteria for the production of special antibiotics. The work focuses on obtaining antibiotics that act against the types of bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Acinetobacter baumannii*. The antibiotic breeding process was carried out through competitive interactions of competing bacteria in Petri dishes and in liquid media. A selection pressure was exerted on the bacteria, which supported the production of antibiotics by Z1 bacteria against another competing species, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* or *Acinetobacter baumannii*.

The bacteria had to compete with each other for nutrition, space with another type of bacteria, thereby producing their secondary metabolites and among them were the antibiotics themselves. Through the creation of new passages and new generation of bacteria through competitive interaction, antibiotics were bred and perfected. Breeding started at 12°C and gradually ended at 32°C, and it is a difference of 20°C for a temperature-labile antibiotic. This is unequivocal proof that antibiotics can be bred.

The effectiveness of antibiotics against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Acinetobacter baumannii* was tested by the diffusion disk method and a control was always performed. The diffusion disk test of the antibiotic against *Staphylococcus aureus* was tested at 12°C, 22°C and 32°C. The diffusion disk test of the antibiotic against *Streptococcus agalactiae* was tested at 29°C and 31°C. The diffusion disk test of the antibiotic against *Acinetobacter baumannii* was tested at 31°C. The result was always the formation of an inhibition zone around the isolated antibiotic, which was clear evidence not only of the effectiveness of antibiotics, but also of the possibility of breeding antibiotics against different bacteria and temperatures.

This work is unique in that it brings the possibility of breeding bacteria and their secondary metabolites (for example antibiotics) against various bacteria and temperatures. Thanks to this method, there is great potential in obtaining new drugs against bacterial diseases and in the fight against bacterial resistance.

SEZNAM LITERATURY

- Abia, A. L. K., Alisoltani, A., Keshri, J. a Ubomba-Jaswa, E. 2018. Metagenomic analysis of the bacterial communities and their functional profiles in water and sediments of the Apies River, South Africa, as a function of land use. *Science of the Total Environment*, 617, 326-334.
- Abia, A. L. K., Alisoltani, A., Ubomba-Jaswa, E. a Dippenaar, M. A. 2019. Microbial life beyond the grave: 16S rRNA gene-based metagenomic analysis of bacteria diversity and their functional profiles in cemetery environments. *Science of the Total Environment*, 655, 831–841.
- Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J. P. a Molle, V. 2021. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins*, 13 (10), 677 s.
- Astley, R., Miller, F. C., Mursalin, M. H., Coburn, P. S. a Callegan, M. C. 2019. An Eye on *Staphylococcus aureus* Toxins: Roles in Ocular Damage and Inflammation. *Toxins*, 11 (6), 356 s.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. a Schnepf, H. E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37, 409-433.
- Ding, D., Wang, B., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, H., Liu, X., Gao, Z. a Yu, Z. 2023. The spread of antibiotic resistance to humans and potential protection strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 254, 114734 s.
- Duina, A. A., Miller, M. E. a Keeney, J. B. 2014. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197 (1), 33-48.

- Hatfull, G. F., Dedrick, R. M. a Schooley, R. T. 2022. Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annual Review of Medicine*, 73, 197-211.
- Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T. a Maeda, N. 2009. Bacterial interactions in dental biofilm development. *Journal of Dental Research*, 88 (11), 982-990.
- Horová, E. 2022. Antimikrobiální aktivita bakterií. MS. Bakalářská práce. depon. in Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta Pedagogická, 42-59. Plzeň.
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A. a Sleator, R. D. 2012. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3 (3), 243-250.
- Chacko, A., Delbaz, A., Choudhury, I. N., Eindorf, T., Shah, M., Godfrey, C., Sullivan, M. J., St John, J. A., Ulett, G. C. a Ekberg, J. A. K. 2022. *Streptococcus agalactiae* Infects Glial Cells and Invades the Central Nervous System via the Olfactory and Trigeminal Nerves. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12, 793416 s.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S. a Otto, M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12 (1), 547-569.
- Ibrahim, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I. M. S. a Aziz, S. N. 2021. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular Biology Reports*, 48 (10), 6987-6998.
- Jin, M., Liu, L., Wright, S. A., Beer, S. V. a Clardy, J. 2003. Structural and functional analysis of pantocin A: an antibiotic from *Pantoea agglomerans* discovered by heterologous expression of cloned genes. *Angewandte Chemie International Edition*, 42 (25), 2898-2901.
- Koonin, E. V., Makarova K. S. a Wolf, Y. I. 2021. Evolution of Microbial Genomics: Conceptual Shifts over a Quarter Century. *Trends in Microbiology*, 29 (7), 582-592.

- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C. a Lee, S. H. 2017. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 55 s.
- Löffler, B. a Tuchscher, L. 2021. *Staphylococcus aureus* Toxins: Promoter or Handicap during Infection? *Toxins*, 13 (4), 287 s.
- Moser, C., Lerche, C. J., Thomsen, K., Hartvig, T., Schierbeck, J., Jensen, P. Ø., Ciofu, O. a Høiby, N. 2019. Antibiotic therapy as personalized medicine - general considerations and complicating factors. *APMIS*, 127 (5), 361-371.
- Munita, J. M. a Arias, C. A. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4 (2), 24 s.
- Nicolaou, K. C. a Rigol, S. 2018. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*, 71 (2), 153-184.
- Pleskot, O., Herink, J. a Fusek, J. 2019. *Základy speciální farmakologie*. Univerzita Pardubice, 166-174. Pardubice.
- Raabe, V. N. a Shane, A. L. 2019. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiology Spectrum*, 7 (2), 1-13.
- Robinson, L. J., Verrett, J. N., Sorout, N. a Stavrinides, J. 2020. A broad-spectrum antibacterial natural product from the cystic fibrosis isolate, *Pantoea agglomerans* Tx10. *Microbiological Research*, 237, 126479 s.
- Rosypal, S., Hoďák, K., Martinec, T. a Kocur, M. 1981. *Obecná bakteriologie*. Státní pedagogické nakladatelství, 564-570. Praha.
- Savoia, D. 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7 (8), 979-990.

- Schindler, J. 2014. Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů. Grada, 47-52. Praha.
- Sabinelli-Sousa, S., Hespanhol, J. T. a Bayer-Santos, E. 2021. Targeting the Achilles' Heel of Bacteria: Different Mechanisms To Break Down the Peptidoglycan Cell Wall during Bacterial Warfare. *Journal of Bacteriology*, 203 (7), 13 s.
- Slezáčková, T. 2016. Geneticky modifikované organismy a jejich etické souvislosti. MS. Diplomová práce. depon. in Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, 10-24. Brno.
- Smits, T. H. M., Duffy, B., Blom, J., Ishimaru, C. A. a Stockwell, V. O. 2019. Pantocin A, a peptide-derived antibiotic involved in biological control by plant-associated *Pantoea* species. *Archives of Microbiology*, 201 (6), 713-722.
- Stincone, P. a Brandelli, A. 2020. Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40 (3), 306-319.
- Švihovec, J., Bultas J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J. a Votava, M. 2018. *Farmakologie*. Grada, 702-752. Praha.
- Tolmacheva, A. A., Rogozhin, E. A. a Deryabin, D. G. 2014. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants. *Acta Pharmaceutica*, 64 (2), 173-186.
- Van Vuuren, S. a Holl, D. 2017. Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009-2016. *Journal of Ethnopharmacology*, 208, 236-252.
- Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S. a Verstrepen, K. J. 2022. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology,

from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11665 s.

- Vyskočil, P. a Zelený, K. 1982. Genetické inženýrství a výroba antibiotik. *Kvasný Průmysl.*, 28 (8), 186-189.
- Westhoff, S., Kloosterman, A. M., van Hoesel, S. F. A., van Wezel, G. P. a Rozen, D. E. 2021. Competition Sensing Changes Antibiotic Production in *Streptomyces*. *mBio*, 12 (1), 13 s.
- Wright, S. A., Zumoff, C. H., Schneider, L. a Beer, S. V. 2001. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1), 284-292.
- Yacoub, T., Rima, M., Karam, M. a Fajloun, J. S. A. Z. 2020. Antimicrobials from Venomous Animals: An Overview. *Molecules*, 25 (10), 2402 s.
- Yusuf, I., Skiebe, E. a Wilharm, G. 2023. Evaluation of CHROMagar Acinetobacter and MacConkey media for the recovery of *Acinetobacter baumannii* from soil samples. *Letters in Applied Microbiology*, 76(2), 1-7.
- Zinner, S. H. 2007. Antibiotic use: present and future. *New Microbiologica*, 30 (3), 321-325.

Internetové zdroje

- [1] <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- [2] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=549>
- [3] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1280&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- [4] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=470&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- [5] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1311&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ

Obr. 1 Pasáž 1 s bakteriemi <i>Staphylococcus aureus</i> a Z1 po 9 dnech v tekutém LB médiu, koncentrace 1:1 ve 12°C (zvětšení 1000x).	28
Obr. 2 Pasáž č. 8 po 4 dnech kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> v poměru 1:1 tekutého LB média ve 12°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Staphylococcus aureus</i> po 4 dnech (zvětšení 1000x).	29
Obr. 3 Pasáž č. 9 po 1 dni ve 12°C v tekutém LB médiu s bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> (původní poměr 1:4). Po 24 hodinách došlo k vyrovnání poměru na 1:1 (zvětšení 1000x).	29
Obr. 4 Diskový difúzní test izolovaného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti <i>Staphylococcus aureus</i> ve 12°C s inhibiční zónou.	30
Obr. 5 Diskový difúzní test izolovaného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti <i>Staphylococcus aureus</i> v pokojové teplotě bez inhibiční zóny.	30
Obr. 6 Pasáž č. 15 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> v poměru 5:100 tekutého LB média ve 12°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Staphylococcus aureus</i> po 24 hodinách (zvětšení 1000x).	31
Obr. 7 Pasáž č. 16 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> v poměru 3:100 tekutého LB média ve 12°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Staphylococcus aureus</i> po 48 hodinách (zvětšení 1000x).	31
Obr. 8 Pasáž č. 15 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> v poměru 5:100 tekutého LB média ve 12°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Staphylococcus aureus</i> po 9 dnech (zvětšení 1000x).	32
Obr. 9 Pasáž č. 18 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> v poměru 3:100 tekutého LB média v 15°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Staphylococcus aureus</i> po 3 týdnech (zvětšení 1000x).	33
Obr. 10 Pasáž č. 19 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> v poměru 1:10 tekutého LB média v 15°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Staphylococcus aureus</i> po 5 dnech (zvětšení 1000x).	33
Obr. 11 Pasáž č. 22 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> v poměru 1:100 tekutého LB média v 18°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Staphylococcus aureus</i> po 12 dnech (zvětšení 1000x).	34
Obr. 12 Pasáž č. 26 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> v poměru 1:10 na agarové půdě ve 22°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Staphylococcus aureus</i> po 4 dnech (zvětšení 1000x).	35
Obr. 13 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti <i>Staphylococcus aureus</i> v pokojové teplotě 18-19°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.	36
Obr. 14 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti <i>Staphylococcus aureus</i> ve 22°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.	36
Obr. 15 Kontrolní diskový difúzní test bez izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 na filtračním papíru proti <i>Staphylococcus aureus</i> ve 22°C bez inhibiční zóny po 24 hodinách.	37
Obr. 16 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti <i>Staphylococcus aureus</i> v pokojové teplotě 18-19°C s inhibiční zónou po 3 dnech.	37

Obr. 17 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti <i>Staphylococcus aureus</i> ve 22°C s inhibiční zónou po 3 dnech.	38
Obr. 18 Pasáž č. 29 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Staphylococcus aureus</i> v poměru 1:100 v 31°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Staphylococcus aureus</i> po 2 dnech (zvětšení 1000x).	39
Obr. 19 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti <i>Staphylococcus aureus</i> ve 32°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.	39
Obr. 20 Kontrolní diskový difúzní test bez izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 na filtračním papíru proti <i>Staphylococcus aureus</i> ve 32°C bez inhibiční zóny po 24 hodinách.	40
Obr. 21 Pasáž č. 4 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Streptococcus agalactiae</i> v poměru 3:10 na agarové půdě ve 30°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Streptococcus agalactiae</i> po 4 dnech (zvětšení 1000x).	41
Obr. 22 Čistá kultura <i>Streptococcus agalactiae</i> v agarové půdě při teplotě 30°C bez kontaktu bakterií Z1 po 3 dnech (zvětšení 1000x).	41
Obr. 23 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti <i>Streptococcus aagalactiae</i> v 29°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.	42
Obr. 24 Kontrolní diskový difúzní test bez izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 na filtračním papíru proti <i>Streptococcus agalactiae</i> v 29°C bez inhibiční zóny po 24 hodinách.	43
Obr. 25 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na hranatém filtračním papíru proti <i>Streptococcus aagalactiae</i> v 29°C s inhibiční zónou po 10 dnech.	43
Obr. 26 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na kulatém filtračním papíru proti <i>Streptococcus aagalactiae</i> v 29°C s inhibiční zónou po 10 dnech.	44
Obr. 27 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na filtračním papíru proti <i>Streptococcus aagalactiae</i> v 31°C s inhibiční zónou 1 mm po 24 hodinách.	44
Obr. 28 Kultivace <i>Acinetobacter baumannii</i> (zvětšení 1000x)	45
Obr. 29 Pasáž č. 2 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Streptococcus agalactiae</i> v poměru 1:2 ve 31°C. Početní převaha bakterie Z1 nad <i>Acinetobacter baumannii</i> po 5 dnech (zvětšení 1000x).	45
Obr. 30 Pasáž č. 4 kompetitivní interakce mezi bakteriemi Z1 a <i>Acinetobacter baumannii</i> v poměru 2:10 ve 31°C (zvětšení 1000x) pro izolaci antibiotika.	46
Obr. 31 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na hranatém filtračním papíru proti <i>Acinetobacter baumannii</i> ve 31°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.	46
Obr. 32 Diskový difúzní test izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 z agaru na kulatém filtračním papíru proti <i>Acinetobacter baumannii</i> ve 31°C s inhibiční zónou po 24 hodinách.	46
Obr. 33 Kontrolní diskový difúzní test bez izolovaného šlechtěného antibiotika bakterie Z1 na filtračním papíru proti <i>Acinetobacter baumannii</i> ve 31°C bez inhibiční zóny po 24 hodinách.	47

- Obr. 34 Pasáž číslo 2. s bakteriemi Z1 a kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* po 7 dnech v tekutém LB médiu, koncentrace 1:1 ve 12°C (zvětšení 1000x). Žádné známky produkce antibiotik proti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*. 47
- Obr. 35 Pasáž číslo 4. s bakteriemi Z1 a kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* po 21 dnech v tekutém LB médiu, koncentrace 1:1 v 15°C (zvětšení 1000x). Žádné známky produkce antibiotik proti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*. 48

- Tab. 1 Priorita výzkumu nového antibiotika dle WHO. Vlastní zpracování dle Nicolaou a Rigol (2018)..... 18
- Tab. 2 Kultivace a šlechtění bakterií Z1 proti *Staphylococcus aureus* 23
- Tab. 3 Kultivace a šlechtění bakterií Z1 proti *Streptococcus agalactiae* 24
- Tab. 4 Kultivace a šlechtění bakterií Z1 proti *Acinetobacter baumannii*..... 25

