

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Vliv přísadků železa a kmenů produkujících siderofory na
složení mikrobiálního společenstva rhizosféry, obsah
železa v rostlinné tkáni a napadení obecnou strupovitostí
brambor**

Diplomová práce

Autor práce: Alena Máslová

Obor studia: Hodnocení a ochrana půdy

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Markéta Marečková, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv přídatků železa a kmenů produkujících siderofory na složení mikrobiálního společenstva rhizosféry, obsah železa v rostlinné tkáni a napadení obecnou strupovitostí brambor" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. RNDr. Markétě Marečkové, Ph.D. za odborné vedení této práce, trpělivost a věcné připomínky. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům Výzkumného ústavu rostlinné výroby Mgr. Tereze Patrmanové a Ing. Janu Kopeckému, Ph.D. za pomoc a rady při práci v laboratoři. Mé poděkování patří také Mgr. Zdeňku Kameníkovi, Ph.D. za data naměřená pomocí LC-MS.

Vliv přídavek železa a kmenů produkujících siderofory na složení mikrobiálního společenstva rhizosféry, obsah železa v rostlinné tkáni a napadení obecnou strupovitostí brambor

Souhrn

Zvyšující se nároky na množství a kvalitu potravin vytvářejí stále větší tlak na udržení, případně i obnovení kvality, zdraví a úrodnosti půdy. Půdní mikroorganismy významně ovlivňují půdní prostředí, a proto je nezbytné studovat vztahy mezi půdními mikroorganismy a podmínkami půdního prostředí. K objasnění vlivu mikroorganismů na půdní prostředí je důležité studovat také vzájemné vztahy mezi jednotlivými půdními mikroorganismy a jejich interakce s rostlinami.

Některé bakterie produkují sekundární metabolity, které slouží k ochraně před patogeny, ale také mohou podporovat růst a vývoj rostlin. Příkladem sekundárních metabolitů jsou siderofory, chelátory železa, které jsou produkovány bakteriemi při deficitu dostupného železa. Siderofory zvyšují obsah dostupného železa nejen pro bakteriální producenty, ale i pro rostliny a tím pozitivně ovlivňují růst a odolnost rostlin. Siderofory lze také využít k omezení působení patogenů, a to díky konkurenčnímu boji o železo, protože nedostatek dostupného železa v půdě může inhibovat také rostlinné patogeny.

V diplomové práci byly testovány a hodnoceny bakteriální kmeny izolované z půdy, které pocházejí z různých přírodních lokalit a také z polí, kde se pěstují brambory s odlišným zasažením obecnou strupovitostí. Toto celosvětově rozšířené onemocnění brambor je vyvoláváno fytopatogenními druhy rodu *Streptomyces* a má nepříznivý vliv na vzhled a kvalitu podzemních hlíz. Tradiční strategie potlačení projevů obecné strupovitosti brambor jako je zavlažování a snížení pH půdy často selhávají, proto je potřeba hledat jiná řešení. Jednou ze slibných strategií potlačení strupovitosti je aplikace sideroforů nebo kmenů, které siderofory produkují.

U většiny bakteriálních kmenů, testovaných v diplomové práci, byla zaznamenána produkce sideroforů. Bylo zjištěno, že Gauseho kultivační medium ochuzené o železo vykazuje nejintenzivnější produkci sideroforů, ale nebyl zjištěn významný vliv lokality původu testovaných kmenů na produkci sideroforů. Pro pochopení působení sideroforů je potřeba podrobněji sledovat a studovat vztahy mezi kmeny, které je produkují.

Klíčová slova: půda, rhizosféra, mikrobiom, železo, siderofory

The influence of iron on strains producing siderophores

Summary

Increasing demands of higher quantity and good quality of food creating pressure to maintain and restore agricultural soil health and fertility worldwide. Soil microorganisms significantly affect the soil environment and therefore it is necessary to study the relationships between soil microorganisms and soil environmental conditions. To be more specific, it is important to study the interrelationships between individual soil microorganisms and their interactions with plants.

Some microorganisms produce secondary metabolites that protect them against pathogens and promote plant growth and development. One of the important example of microbial secondary metabolites are siderophores, relatively low molecular weight, ferric ion-specific chelating agents synthesized by microorganisms like bacteria, actinomycetes, fungi and certain algae growing under low ironic stress. Siderophores increase the content of available iron not only for microorganisms but also for plants and thus positively affect the growth and resistance of plants. Siderophores can also be used to reduce the effects of pathogens through the competition for iron, thus as a deficit of available iron in the soil, inhibit plant pathogens.

In this experiment, bacterial strains isolated from soil, from various natural localities and also from agricultural potato fields with different impacts of general scab, were tested and evaluated. This worldwide disease of potatoes caused by phytopathogenic species of the genus *Streptomyces* and has an adverse effect on the appearance and quality of underground tubers. The traditional strategies to suppress the manifestations of general potato scab are irrigation and lowering soil pH, often fail. At this situation, promising and efficient solution needed to be investigate. One of the promising strategy to suppress potato scab is the application of siderophores or strains that produce siderophores.

Siderophore production was recorded in most bacterial strains tested in the experiment. Iron-depleted Gause culture medium was found to show the most intense production of siderophores, but no significant effect of the locality of origin of the tested strains on siderophore production was found. To understand the action of siderophores, it is necessary to monitor and study in more detail the relationships between the strains that produce them.

Keywords: soil, rhizosphere, microbiome, iron, siderophores

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce a hypotézy	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Půdní mikroorganismy	10
3.1.1 Kmen <i>Actinobacteria</i>	11
3.1.2 Interakce rostlina–mikrob	12
3.1.3 Mikroorganismy podporující růst rostlin (PGPB)	13
3.2 Železo	14
3.3 Siderofory	16
3.3.1 Struktura a aktivita sideroforů	16
3.3.2 Druhy sideroforů.....	17
3.3.3 Produkce (biosyntéza) sideroforů	20
3.3.4 Transport komplexu siderofor–železo do buňky	20
3.3.5 Detekce a identifikace sideroforů	21
3.3.6 Využití sideroforů	22
3.3.7 Zástupce sideroforů	23
4 Metodika	26
4.1 Stanovení produkce sideroforů aktinobakteriemi	26
4.1.1 Výběr kmenů použitých k testování	26
4.1.2 Stanovení produkce sideroforů kmeny kultivovanými na pevném mediu	27
4.1.3 Stanovení produkce sideroforů kmeny kultivovanými v tekutém mediu	31
4.1.4 Extrakce sideroforů z tekutého media – extrakce na tuhou fázi	32
4.1.5 Testování přítomnosti sideroforů v extraktech	34
4.2 Analýza extraktů kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (LC-MS)	35
4.3 Statistická analýza	37
5 Výsledky	38
5.1 Hodnocení produkce sideroforů na pevných mediích	38
5.1.1 Vliv lokality na produkci sideroforů.....	39
5.1.2 Vliv kultivačního media na produkci sideroforů	40
5.1.3 Hodnocení zón u kmenů produkujících siderofory	41
5.2 Hodnocení produkce sideroforů v tekutých mediích	46
5.2.1 Vliv tekutého kultivačního media na produkci sideroforů	47
5.3 Vyhodnocení výsledků LC-MS	48
6 Diskuze	49
6.1 Vliv lokality a kultivačního media na produkci sideroforů	49
6.2 Dostupnost železa vázaného v sideroforech pro rostliny	49

6.3	Kontrola strupovitosti brambor	50
6.4	Zjištěné siderofory	50
7	Závěr	52
8	Literatura.....	53
9	Přílohy.....	I

1 Úvod

Železo je druhým nejhojnějším kovem v zemské kůře, ale v půdě se vyskytuje především zabudováno v minerálech (David et al. 2019). Tyto pevné formy jsou obvykle špatně rozpustné až nerozpustné a koncentrace železa v půdním roztoku je velmi nízká. To představuje důležitý omezující faktor v přijímání železa rostlinami (Lucena 2000). Je známo, že mnoho bakterií vylučuje siderofory, sekundární metabolity, které napomáhají získávání železa za podmínek jeho limitující dostupnosti. Aktinobakterie jsou známé pro svou schopnost produkovat mnoho různých sekundárních metabolitů, mezi které patří i siderofory s různě vysokou afinitou k nerozpustnému železu. Význam těchto látek v zemědělství spočívá v možnosti ovlivňovat růst, vývoj a zdraví mnoha plodin zpřístupněním železa, a proto je třeba podrobněji studovat jejich produkci a transportní systémy železa zprostředkované siderofory rostlinám (Paul & Dubey 2015).

Fytopatogenní zástupci rodu *Streptomyces*, přirozeně se vyskytující v půdě, způsobují chorobu tzv. obecnou strupovitost brambor, která je rozšířena po celém světě (Tarkowski & Vereecke 2014). Tato nemoc má nepříznivý vliv na vzhled a kvalitu hlíz a tím působí ekonomické ztráty při pěstování brambor. Tradiční strategie potlačení příznaků strupovitosti brambor (např. zavlažování a snížení pH půdy) nejsou dostatečné a často selhávají. Využití bakterií, které se přirozeně vyskytují v půdách, k biologické kontrole patogenů způsobujících choroby rostlin může snížit znečištění životního prostředí, které je způsobeno používáním pesticidů při fumigaci a ošetřování hlíz nebo semen před výsevem (Lin et al. 2018).

2 Cíl práce a hypotézy

Cílem diplomové práce byla literární rešerše o sideroforech a jejich producentech, v experimentální části potom zhodnocení produkce sideroforů vybranými kmeny aktinobakterií a posouzení dostupnosti takto získaného železa pro rostliny.

Hlavním modelovým systémem byly brambory a jejich onemocnění obecnou strupovitostí, protože se u tohoto onemocnění prokázal vztah mezi úrovní onemocnění a množstvím dostupného železa v půdě.

Hypotézy

H1: Testované půdní bakteriální kmeny, pocházející z různých lokalit, produkují siderofory.

H2: Produkce sideroforů je ovlivněna lokalitou původu bakteriálních kmenů.

H3: Produkce sideroforů je ovlivněna použitým kultivačním médiem.

3 Literární rešerše

Půda je důležitým zdrojem lidské obživy, ale je také nedílnou součástí ekosystémů (Food and Agriculture Organization (FAO) 2015). Je vytvářena na zemském povrchu prostřednictvím biologických, geologických a hydrologických vlivů. Půdy jsou otevřené, vícesložkové, biogeochemické systémy obsahující tři složky: pevné látky, kapaliny a plyny. Otevřeným systémem se rozumí, že mezi půdou a okolní atmosférou, biosférou a hydrosférou probíhá výměna hmoty i energie. Toky hmoty a energie z půdy nebo do půdy jsou velmi proměnlivé v čase a prostoru, ale jsou to zásadní procesy, které způsobují rozvoj půdních typů a ovlivňují kvalitu půdy (Sposito 2008). Je důležité získávat nové informace k pochopení procesů udržitelnosti půdní kvality, půdního zdraví a úrodnosti, protože počet lidí neustále roste a tím vzrůstá potřeba produkovat větší množství potravin (Food and Agriculture Organization (FAO) 2015).

Kvalita půdy může být definována jako schopnost dané půdy plnit své funkce (rozklad organické hmoty, recyklace živin, detoxikace znečišťujících látek, čištění vzduchu a vody (Gómez-Sagasti et al. 2012). Jako indikátory kvality půdy byly nejčastěji sledovány fyzikální vlastnosti půdy (např. textura, pórovitost a schopnost zadržovat vodu) a chemické vlastnosti půdy (např. pH, hlavní prvky, obsah organických látek a toxické kovy). Mikrobiální vlastnosti půdy se stále více používají jako biologické ukazatele kvality půdy, a to vzhledem ke své rychlé odezvě a vysoké citlivosti (Gómez-Sagasti et al. 2012). Současné mikrobiologické ukazatele zahrnují mikrobiální diverzitu, aktivitu, funkci a abundanci atd. (Tang et al. 2019).

3.1 Půdní mikroorganismy

Půda je důležitým rezervoárem organického uhlíku na Zemi a je stanovištěm pro téměř všechny organismy (Whitman et al. 1998). Většina půdní biomasy a biodiverzity je tvořena mikroorganismy, zejména bakteriemi a houbami (Gómez-Sagasti et al. 2012). Bakterie jsou nepochybně nejpočetnější organismy osidlující povrch Země a bylo odhadnuto, že počet bakteriálních buněk se pohybuje v rozmezí $4-6 \times 10^{30}$ (Whitman et al. 1998).

Klíčovým procesem v koloběhu živin je rozklad látek v půdě, při kterém se odumřelé rostliny, živočichové a mikroorganismy rozkládají na organickou hmotu a uvolňují se živiny. Hlavní roli v procesu rozkladu látek v půdě mají mikroby, tj. bakterie, archaea, houby a viry (Coleman et al. 2018). Kromě rozkladu organické hmoty jsou zvláště bakterie a archaea schopny za určitých podmínek svou činností ovlivňovat i rozklad minerálů. Některé bakterie jsou schopny za přítomnosti kyslíku v kyselém i neutrálním prostředí urychlit oxidaci minerálů obsahujících Fe^{II} . Mikroorganismy, které jsou schopné oxidovat Fe^{II} , jsou obecně děleny podle preferovaného pH do dvou skupin na acidofilní a neutrofilní bakterie (Colombo et al. 2014).

3.1.1 Kmen *Actinobacteria*

Bakteriální kmen *Actinobacteria* zahrnuje širokou škálu grampozitivních, nejčastěji aerobních bakterií hojně se vyskytujících v půdě. Aktinobakterie jsou známé produkcí sekundárních metabolitů, ale jejich schopnost redukovat železo je doposud málo prozkoumána (Zhang et al. 2019). Bylo zjištěno, že pouze část aktinobakterií obývajících kyselá prostředí je schopna redukovat Fe^{III} (např. *Actinocorallia sp.*, *Ferrimicrobium sp.* a *Streptomyces sp.* (Lu et al. 2010), *Aciditerrimonas ferrireducens* (Itoh et al. 2011) a *Acidithrix ferrooxidans* (Jones & Johnson 2015)). Výsledky publikované Zhang et al. (2019) naznačují, že aktinobakterie jsou schopné redukovat Fe^{III} v půdě za přístupu kyslíku a při neutrálním pH.

Streptomycety (aktinobakterie rodu *Streptomyces*), se řadí mezi aktinobakterie známé z půdního prostředí, kde často obývají povrch půdy a kořenů rostlin (Amareesan et al. 2018). Jsou neobvyklé tím, že se jedná o vláknitá prokaryota, která tvoří hyfy a značně rozvětvené mycelium (Loria et al. 2003). V půdě jsou zapojeny do koloběhu uhlíku, který je zabudován v nerozpustných organických zbytcích, jako je lignocelulóza a chitin (Bentley et al. 2002). K rozkladu těchto sloučenin využívají mnoho hydrolytických exoenzymů (Ventura et al. 2007). Streptomycety nejsou ve všech případech pouhými volně žijícími půdními bakteriemi, ale vyvinuly se také druhy žijící v symbióze s rostlinami, houbami a živočichy (Seipke et al. 2012). Streptomycety jsou také známé svými aktivitami, které působí zvýšení zdraví a produktivity různých druhů rostlin za normálních i stresových podmínek (Amareesan et al. 2018). To je částečně způsobeno tím, že streptomycety produkují různé biologicky aktivní sekundární metabolity (např. rostlinné hormony, antivirotika, antimykotika, antihypertenziva, imunosupresiva a především antibiotika) (Procópio et al. 2012), které slouží k ochraně před patogeny, ale také podporují růst a vývoj rostlin (Loria et al. 2003).

Zástupci rodu *Streptomyces* mohou na rostliny působit také negativně, příkladem jsou fytopatogenní druhy *Streptomyces scabies* (*S. scabiei*), *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces europaeiscabiei*, *Streptomyces turgidiscabies* a *Streptomyces ipomoeae* způsobující tzv. obecnou strupovitost (viz Obr. 1). Díky svému nepříznivému vlivu na vzhled a kvalitu podzemních hlíz je obecná strupovitost brambor považována za nemoc, která má velký ekonomický význam v oblastech produkujících brambory (King et al. 1991; Lerat et al. 2009; Barrera et al. 2013; Tarkowski & Vereecke 2014; Lin et al. 2018). *S. scabiei* nenapadá pouze brambory, ale způsobuje také např. strupovitost řepy (*Beta vulgaris*), mrkve (*Daucus carota*), pastináku (*Pastinaca sativa*), ředkve (*Raphanus sativus*) a tuřínu (*Brassica napobrassica*) (Lerat et al. 2009). Léze (poškozené tkáně), způsobené strupovitostí, často slouží jako vstupní bod pro sekundární a oportunní patogeny a saprofyty, což může vést k hnilobě plodin (Sharma et al. 2014). Virulence *S. scabiei* je závislá na produkci fytotoxinů nazývaných thaxtominy (nitrované dipeptidy, který inhibují syntézu celulózy v rostlinné tkáni) (King et al. 1991; Sharma et al. 2014). Produkce thaxtominu A byla zaznamenána také u *S. acidiscabies* a *S. turgidiscabies* (Alejo et al. 2019). Nejvhodnější podmínky pro vznik strupovitosti jsou v půdách lehkých (písčitých) a suchých (Sharma et al. 2014) s hodnotami pH od 5,2 do 7, proto lze v některých případech omezit chorobu snížením pH půdy. Výjimkou je ale druh *S. acidiscabies*, který způsobuje strupovitost i v půdách s pH nižším než 5 (Barrera et al. 2013; Alejo et al. 2019). *S. coelicolor* se často používá jako modelový organismus pro studium genetiky streptomycet (Procópio et al. 2012). Zástupci druhu *S. coelicolor* jsou schopny

vytvářejí siderofory v podmínkách s nízkou dostupností železa (Bentley et al. 2002). Byl zjištěn výskyt genového kladu u zástupců *S. coelicolor*, který pravděpodobně řídí biosyntézu sideroforu desferrioxaminu G1 a E (Imbert et al. 1995).



Obr. 1: Obecná strupovitost, na hlízách s různou barvou slupky, způsobená aktinobakteriemi (Hausvater et al. 2016).

3.1.2 Interakce rostlina–mikrob

Některé bakterie (např. *Thiobacillum* a *Metallogenium sp.*) jsou schopny rozpouštět primární minerály obsahující železo pomocí mechanismů jako je sorpce, solubilizace (chelatace), transformace, srážení a akumulace železa. Rostliny mohou svými kořeny a kořenovými exudáty ovlivnit pozitivně i negativně četnost, rozmanitost, ale i aktivitu mikroorganismů (Colombo et al. 2014). Interakce rostlin a mikrobů je iniciována přilnutím půdních mikrobů ke kořenům rostlin a oboustranným transportem živin. Mikroby spojené s rostlinami mohou mít prospěšné, neutrální i škodlivé účinky na rostliny a jejich růst (Amaresan et al. 2018). Mikroorganismy mohou například ovlivňovat metabolismus rostlin a jejich hormonální dráhy (Friesen et al. 2011). Škodlivé účinky na rostliny mohou být následkem vzájemné konkurence o potřebné živiny například o železo (Colombo et al. 2014). Některé streptomycety jsou pro rostliny patogenní, především jsou to kmeny produkující fyto toxin thaxtomin A (Loria et al. 2003).

Symbióza mezi mikroorganismy a rostlinami je důležitá z hlediska přístupnosti a přijatelnosti některých živin pro rostliny. Například mykorrhiza, symbióza mezi houbami a kořeny rostlin, vznikla již před mnoha miliony let, kdy došlo ke strukturně–funkční interakci mezi arbuskulárními mykorrhizami a kořeny (Malloch et al. 1980). Symbióza mezi aktinobakteriemi a kořeny rostlin se nazývá aktinorhiza, která umožňuje fixaci vzdušného dusíku. Dominantním aktinorhizálním rodem fixujícím dusík je *Frankia* (Coleman et al. 2004). Symbióza mezi luštěninami a bakteriemi rodu *Rhizobium* je studována již od 80. let 20. století, ale příznivý účinek luštěnin na půdní dusík byl znám již mnohem dříve (Sapp 2004). V poslední době se ale ukázalo, že některým rhizobiím dodávají streptomycety železo a tím zároveň ovlivňují poutání dusíku i růst rostliny (Tokala et al. 2002). Potenciálně prospěšné účinky většiny mikrobů na rostliny začaly být studovány v širším rozsahu teprve nedávno, protože se ukazuje, že tato interakce může být prakticky využívána (Friesen et al. 2011).

3.1.3 Mikroorganismy podporující růst rostlin (PGPB)

Obecně se jedná o organismy podporující růst rostlin usnadněním příjmu výživy (N, P, K a esenciální minerály), produkcí fytohormonů (indolová kyselina octová, cytokininy, gibberelliny atd.), nebo potlačením chorob rostlin (Amaresan et al. 2018). Například: Jalilian et al. (2012) zjistili, že přidavek bakteriálních rodů *Azotobacter* a *Azospirillum* do půdy hnojené hnojivem, které je bohaté na dusík, zvýšil produktivitu slunečnic a snížil produkci nasycených mastných kyselin. Amaresan et al. (2014) zjistili, že *Bacillus sp.*, *B. licheniformis* a *Achromobacter sp.* mohou být použity jako činidlo biologické kontroly s vlastnostmi podporujícími růst rostlin. Passari et al. (2016) ve svém výzkumu zjistili, že *Bacillus sp.* významně zvýšil růst výhonku a kořenů rostlin. Zjistili také, že *Bacillus sp.* produkuje celkem tři fytohormony (kyselinu indol-3-octovou (IAA), kinetin a 6-benzyladenin). Výzkum, který prováděli Gopalakrishnan et al. (2014) prokázal, že přidavek bakterií rodu *Streptomyces* způsobil zvýšení produkce rýže a významně zvýšil aktivitu celkového dusíku, dostupného fosforu, % organického uhlíku, uhlíku a dusíku z mikrobiální biomasy a dehydrogenázy oproti neočkované kontrole.

3.2 Železo

Železo (Fe) je druhým nejhojnějším kovem v zemské kůře, konkuruje mu pouze hliník (Raines et al. 2015) a zároveň je čtvrtým nejčastěji se vyskytujícím prvkem v zemské kůře (Wu et al. 2019). Železo se v půdním prostředí vyskytuje v podobě Fe^{II} v primárních minerálech, Fe^{III} v sekundárních minerálech, rozpustné a vyměnitelné železo a železo vázané na organické látky v rozpustných nebo nerozpustných formách (Colombo et al. 2014). Řadí se mezi mikroživiny (Ferreira et al. 2019) a je nezbytné pro většinu mikroorganismů (David et al. 2019), ale také pro rostliny a živočichy (Hider & Kong 2010). V půdě se železo přirozeně vyskytuje hojně, ale nachází se zabudováno v minerálech jako je například goethit nebo ferrihydrit (David et al. 2019). Koncentrace Fe v půdním roztoku je často velmi nízká a solubilizace z pevných fází je pomalá (Lucena 2000). Existují ale organické a syntetické chelátory, které mají schopnost udržovat Fe v rozpustné formě v půdním roztoku (např. kyselina citronová, kyselina šťavelová, kyselina ethylenediamindihydroxyphenyloctová (EDDHA), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) a kyselina diethylentriaminpentaoctová (DTPA)) (Lindsay 1995). Přírodní organické kyseliny (citronová a šťavelová) nejsou účinné chelátory při pH nad 7, zatímco EDDHA a DTPA mají schopnost chelatovat významné množství Fe i při pH nad 7 (Colombo et al. 2014).

V mnoha buněčných procesech je železo důležitým kofaktorem, a proto je regulace metabolismu Fe klíčovým procesem pro úspěšné přežití a dochází k němu téměř ve všech živých buňkách (Raines et al. 2015). Kromě toho je železo jako prvek nezbytnou součástí velkého množství proteinů (např. oxidázy, hydroxylázy, dioxygenázy, karboxylázy) (Ferreira et al. 2019). Působí také jako katalyzátor při syntéze chlorofylu (Hu et al. 2016), při enzymatických procesech zahrnujících kyslík (peroxidáza a kataláza), vodík (hydrogenázy) a dusík (Ferreira et al. 2019) a je nezbytný pro procesy syntézy a opravy DNA a RNA (Puig et al. 2017). Aerobní mikroorganismy využívají železo k redukci kyslíku pro syntézu ATP (Řezanka et al. 2018). Nedostatek železa může ohrozit životně důležité buněčné procesy, jako je dýchání a syntéza aminokyselin. Nedostatek Fe v půdě se může projevit u rostlin žloutnutím mladých listů (tzv. chloróza), které je způsobené inhibicí syntézy chlorofylu v chloroplastu (Lucena 2000), naopak přebytek volného železa může způsobit toxicitu prostřednictvím produkce reaktivních druhů kyslíku (Raines et al. 2015).

Železo je prvek, který je v půdě přirozeně přítomen ve dvou formách, a to Fe^{II} a Fe^{III} . Rovnováha mezi oběma formami a dostupnost Fe pro rostliny je v půdě ovlivněna půdní reakcí (pH), redoxním potenciálem (tzn. oxidační nebo redukční podmínky) (Colombo et al. 2014), obsahem organických látek a salinitou (zasoleností) půdy (Ferreira et al. 2019). Vzhledem k různým valencím hraje železo klíčovou roli v oxidačně–redukčních reakcích (Řezanka et al. 2018). Redoxní vlastnosti železa umožňují tomuto prvku působit jako donor nebo akceptor elektronů a umožňují jednotkám obsahujícím železo plnit různé klíčové biologické funkce při přenosu elektronů i při katalýze (Raines et al. 2015). Avšak v aerobním prostředí a při neutrálním pH se železo primárně vyskytuje především jako nerozpustné oxidy a hydroxidy Fe^{III} a není tak dostupné mikroorganismům (Colombo et al. 2014; Paul & Dubey 2015). Při fyziologickém (neutrálním) pH je Fe^{II} rozpustné, zatímco Fe^{III} je téměř nerozpustné (Řezanka et al. 2018). K mobilizaci Fe dochází v anaerobních a kyselých podmínkách (Colombo et al. 2014). V přirozeném prostředí má trojmocné železo rozpustnost při neutrálním pH 10^{-17} M, ale

některé mikroby, jako jsou například bakterie, vyžadují pro svůj růst 10^{-5} – 10^{-7} M železa (Khan et al. 2018; Řezanka et al. 2018). Z tohoto důvodu vyvinuly organismy jako jsou houby, rostliny nebo bakterie mnoho strategií, které jim zajišťují přístup k tomuto prvku nezbytnému pro jejich růst a vývoj (David et al. 2019) a současně je chrání před potenciálními toxickými účinky železa (Guerinot 1994). Jednou ze strategií získání potřebného železa mikroorganismy je produkce sideroforů, což jsou malé organické molekuly s vysokou afinitou k Fe^{III} (Nosrati et al. 2018).

3.3 Siderofory

Termín siderofor lze přeložit z řečtiny jako nosič železa (Guerinot 1994). Siderofory jsou definovány jako nízkomolekulární látky (500–1500 daltonů) a mají vysokou afinitu k Fe^{III} ($K_f > 10^{30}$) (Hider & Kong 2010). Například enterobactin (katecholátový typ sideroforu) má z doposud objevených sideroforů nejvyšší afinitu k iontu Fe^{III} $K_f 10^{52}$ (Ghosh et al. 2020), zatímco ferrichrom (hydroxamátový typ sideroforu) vykazuje $K_f 10^{29}$ (Paul & Dubey 2015). Siderofory, chelátory železa produkované mikroorganismy (např. bakteriemi rodu *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* a *Azotobacter* a některými houbami) (Paul & Dubey 2015) a rostlinami (např. některými travními druhy) (Neubauer et al. 2000) za podmínek snížené dostupnosti Fe, usnadňují solubilizaci a transport Fe^{III} do buněk (Guerinot 1994). Siderofory produkované rostlinami se nazývají fyto siderofory (Neubauer et al. 2000). Všechny siderofory mají vyšší afinitu k Fe^{III} než k Fe^{II} (Hider & Kong 2010). Mnoho bakterií, rostlin a hub produkuje více než jeden siderofor. Zdá se, že produkce určitého sideroforu je ovlivněna odlišnými podmínkami prostředí. Některé sekundární siderofory mohou usnadnit vstřebávání jiných kovů v přítomnosti nebo nepřítomnosti železa (Hider & Kong 2010).

Již v roce 1952 byl identifikován siderofor ferrichrom (Neilands 1952) mezi dalšími byl například popsán, jako růstový faktor, siderofor mykobactin (Francis et al. 1953). Nyní je popsáno více než 500 různých sideroforů, z nichž 270 bylo strukturálně charakterizováno (Hider & Kong 2010) a výzkum sideroforů nadále pokračuje. Siderofory mohou hrát zásadní roli v zemědělství, ekologii, medicíně, ale také při bioremediaci či mohou být požitý jako biosenzory (Nosrati et al. 2018).

3.3.1 Struktura a aktivita sideroforů

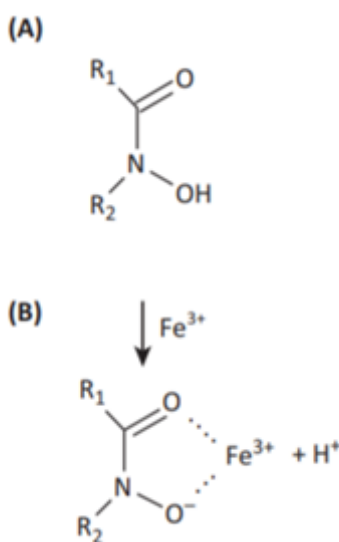
Siderofory jsou značně strukturálně variabilní (Guerinot 1994), díky své struktuře mají siderofory mnohem vyšší afinitu k Fe^{III} než k Fe^{II} , což je důležité vzhledem k selektivitě pro železo v konkurenci s jinými kovy přítomnými v biosféře. Čím vyšší je selektivita pro Fe^{III} oproti Fe^{II} , tím negativnější je redoxní potenciál. Vysoce negativní redoxní potenciál (< -400 mV) zajišťuje, že komplex Fe^{III} nebude podléhat redoxním změnám a nebude v aerobním prostředí generovat škodlivé hydroxylové radikály. Nejvíce negativní redoxní potenciál mají siderofory na bázi katecholu (Hider & Kong 2010). Komplexy sideroforů s Fe^{III} mají oproti komplexům, které jsou tvořené organickými sloučeninami často přítomnými v rhizosféře (anionty organických kyselin například oxalát nebo citrát) a Fe, vysokou konstantu stability (10^{23} – 10^{52}) (Colombo et al. 2014). Komplexy sideroforů s Fe^{III} vykazují stejné a dokonce i vyšší konstanty stability než syntetické cheláty železa, které se běžně používají v zemědělství k řešení nedostatku Fe (např. kyselina ethylenediamindihydroxyphenyloctová (EDDHA) 10^{33} a kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) 10^{25}) (Lucena 2000). Vysoká stabilita komplexů sideroforů s Fe^{III} je dobrým předpokladem pro využití sideroforů k transportu železa do buňky.

3.3.2 Druhy sideroforů

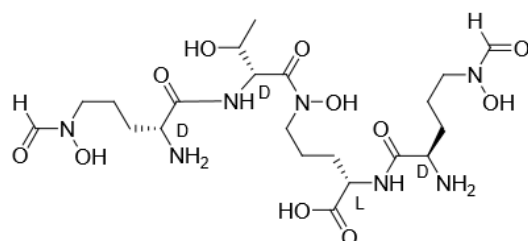
Z chemického hlediska lze siderofory rozdělit podle funkčních skupin do tří hlavních kategorií, na hydroxamáty, katecholáty a karboxyláty (Řezanka et al. 2018). Kromě výše uvedených jsou některé siderofory kombinací těchto typů sideroforů a jsou klasifikovány jako smíšené typy (Khan et al. 2018).

Hydroxamátové siderofory

Hydroxamátový typ sideroforů zahrnuje nejběžnější skupinu sideroforů vyskytujících se v přírodě (Saha et al. 2016). Tyto siderofory jsou produkovány mnoha mikroorganismy včetně bakterií a plísní. Všechny siderofory produkovány houbami jsou hydroxamátového typu s výjimkou polykarboxylátového rhizoferrinu (Khan et al. 2018). Většina hydroxamátových sideroforů obsahuje karboxylovou skupinu připojenou k dusíku (Paul et al. 2015), $C(=O)N(OH)R$, kde R je buď aminokyselina nebo její derivát (Řezanka et al. 2018). Dvě molekuly kyslíku ve skupině hydroxamátu tvoří dvojmocný železný ligand a siderofor je tedy schopen tvořit oktaedrální komplex s Fe^{III} (viz Obr. 2). Hydroxamáty vážou Fe^{III} a mají vazebné konstanty v rozmezí 10^{22} – $10^{32} M^{-1}$ (Saha et al. 2016). Tato silná vazba mezi Fe^{III} a sideroforem chrání komplex siderofor–železo před hydrolyzou a enzymatickou degradací (Řezanka et al. 2018). Hydroxamáty jsou obecně strukturálně složitější než siderofory jiných typů (katecholáty a karboxyláty) a jsou také považovány za hydrofilnější (Paul & Dubey 2015). Příkladem hydroxamátového sideroforu je coelichelin (Obr. 3), který je produkován bakteriálním druhem *Streptomyces coelicolor* (Bertrand 2010). Dalším hydroxamátovým sideroforem je pyoverdin, který je produkován gramnegativní bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (Marathe et al. 2015).



Obr. 2: (A) Hlavní strukturní složka hydroxamátového sideroforu, která je zodpovědná za koordinaci železa. (B) Komplex funkční skupiny sideroforu se železem (Fe^{III}) (Górska et al. 2014).

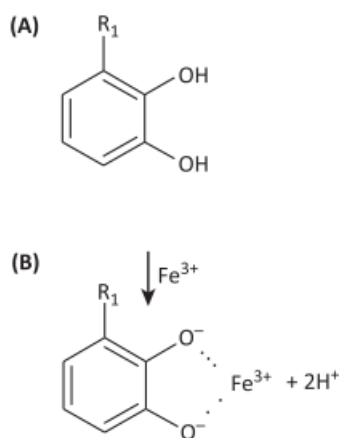


Obr. 3: Chemická struktura coelichelinu (Hider & Kong 2010).

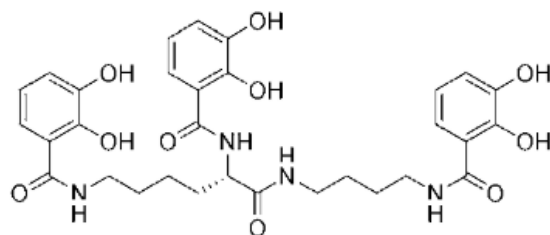
Hydroxamátové siderofory lze detekovat mnoha způsoby. Například použitím modrého testovacího media CAS (Chrome azurol S) (Louden et al. 2011), nebo použitím modifikovaného modrého testovacího media O-CAS (Pérez-Miranda et al. 2007), které je ochuzeno o živiny. Stanovení přítomnosti sideroforů lze provést také spektrofotometricky (Schwyn & Neilands 1987) nebo elektrosprejovou ionizační hmotnostní spektrometrií (ESI-MS) (Pluháček et al. 2016). Ahmed & Holmström (2014b) měřili koncentraci rozpuštěných a adsorbovaných ferrioxaminů (hydroxamátových sideroforů) v půdních vzorcích pomocí HPLC/ESI-MS (vysokoučinné kapalinové chromatografie s elektrosprejovou ionizací a hmotnostní spektrometrií).

Katecholátové siderofory

Katecholátové siderofory jsou produkovány pouze bakteriemi (Khan et al. 2018), jejich produkce převládá u gramnegativních bakterií (např. rod *Enterobacter*, *Vibrio*, *Azotobacter* a *Agrobacterium*) (Das et al. 2007). Jak je patrné z Obr. 4 tyto siderofory se skládají z katecholátových a hydroxylových skupin, na které se váže Fe^{III} (Paul & Dubey 2015). Každá katecholátová skupina dodává dva atomy kyslíku pro chelataci železa (Saha et al. 2016). Katecholátové siderofory jsou téměř vždy odvozeny od kyseliny 2, 3-dihydroxybenzoové (DHBA) (Paul & Dubey 2015). Příkladem katecholátového sideroforu je protochelin (Obr. 5) produkováný gramnegativním bakteriálním druhem *Azotobacter vinelandii* (Bertrand 2010). Dalším katecholátovým sideroforem je pyochelin, který je produkován například některými druhy gramnegativních bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (Marathe et al. 2015), *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* a půdní bakterií *Streptomyces scabies* (Bertrand 2010).



Obr. 4: (A) Hlavní strukturální složka katecholátového sideroforu, která je zodpovědná za koordinaci železa. (B) Komplex funkční skupiny sideroforu se železem (Fe^{III}) (Górska et al. 2014).

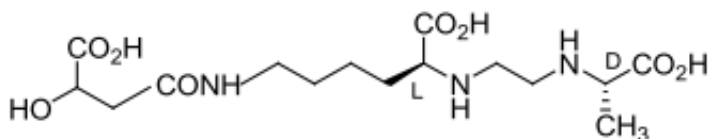


Obr. 5: Chemická struktura protochelínu (Hider & Kong 2010).

K detekci katecholátového sideroforu lze použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) s detekcí diodového pole (DAD) a elektrosprejovou ionizační hmotnostní spektrometrií (ESI-MS) (Fiedler et al. 2001). K detekci katecholového sideroforu lze použít také modré testovací medium CAS (Chrome azurol S) (Louden et al. 2011) nebo modré testovací medium O-CAS (Pérez-Miranda et al. 2007).

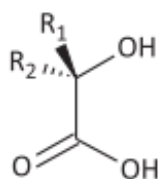
Karboxylátové siderofory

Tyto siderofory obsahující karboxylátovou skupinu jsou nejčastěji produkovány bakteriemi (např. rodem *Staphylococcus*, půdní bakterie *Rhizobium meliloti* produkuje siderofor rhizobactin (Obr. 6)) a houbami (řád *Mucorales*). K získávání železa využívají (viz Obr. 7) karboxylovou a hydroxylovou skupinu (Khan et al. 2018; Řezanka et al. 2018).

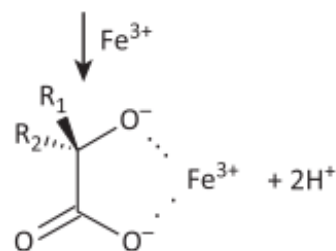


Obr. 6: Chemická struktura rhizobactinu (Hider & Kong 2015).

(A)



(B)

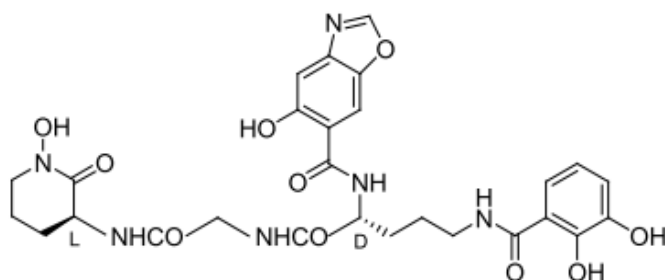


Obr. 7: (A) Hlavní strukturální složka karboxylátového sideroforu, která je zodpovědná za koordinaci železa. (B) Komplex funkční skupiny sideroforu se železem (Fe^{III}) (Górska et al. 2014).

Karboxylátové siderofory mohou být detekovány spektrofotometrickými testy, například za použití O-CAS (modifikovaného testu CAS – Chrome azurol S) nebo komplexu mědi (detekce při UV 190–280 nm) (Řezanka et al. 2018). V poslední době byla pro stanovení struktury znovu použita metoda LC-MS (Pluháček et al. 2016).

Smíšené siderofory

Siderofory řazené do této třídy mohou obsahovat jak katecholové, tak i hydroxamátové skupiny (Paul & Dubey 2015). Příkladem je anguibactin, siderofor smíšeného typu (katecholát-thiazolin-hydroxamát) produkovaný bakteriemi *Vibrio anguillarum* (Das et al. 2007) nebo heterobactin (Obr. 8), který je produkován bakteriemi *Rhodococcus erythropolis* (Paul & Dubey 2015).



Obr. 8: Chemická struktura heterobactinu A (Hider & Kong 2015).

3.3.3 Produkce (biosyntéza) sideroforů

Biosyntéza sideroforů je přímo regulována hladinou železa v prostředí, ve kterém se organismus nachází (Hider & Kong 2010; David et al. 2019). Většina tříd sideroforů je syntetizována bakteriemi, houbami a rostlinami pomocí nonribosomálních peptidových syntetáz (NRPS) (Hider & Kong 2010; Paul & Dubey 2015). Produkce sideroforů je také ovlivněna okolní teplotou, Paul & Dubey (2015) uvádějí, že testované kmeny mikroorganismů začaly produkovat siderofory při teplotě 20 °C a produkce dosáhla maxima při 30–35 °C. Essén et al. (2007) zkoumali produkci sideroforů bakteriemi *Pseudomonas stutzeri* v aerobních a anaerobních podmínkách. Zjistili, že v aerobních podmínkách byly produkovány ferrioxaminové siderofory, zatímco v anaerobních podmínkách nebyly zjištěny žádné siderofory. Anaerobní podmínky jsou totiž příznivé k chemické redukci Fe^{III} na Fe^{II}, a proto byl obsah přijatelného železa pravděpodobně dostačující a mikroorganismy neprodukovaly siderofory.

3.3.4 Transport komplexu siderofor–železo do buňky

O vylučování sideroforů je v současné době známo pouze málo (Paul & Dubey 2015). Bylo zjištěno, že siderofory vytvořeny uvnitř buňky jsou při nedostatku železa (obvykle < 1 μM) (Hider & Kong 2010) uvolněny vně buňky, kde dochází k navázání sideroforu na Fe^{III}. Přenos do buňky přes buněčnou membránu probíhá pomocí specifických receptorů (Řezanka et al. 2018). Obecný mechanismus je zahájen, když se komplex sideroforu se železem váže na receptorový protein na povrchu mikrobiálních buněk (Raymond et al. 2003).

Velká část studií absorpce bakteriálních sideroforů byla zaměřena na gramnegativní střevní bakterie (*Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*). Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu skládající se z vnitřní a vnější membránové vrstvy a peptidoglykanové vrstvy, která je mezi nimi. První vrstva funguje jako molekulární síto a druhá poskytuje mechanickou stabilitu (Hider & Kong 2010). Transport komplexu siderofor–železo do buňky gramnegativních bakterií probíhá proto pomocí receptoru vnější membrány, periplazmy vázající protein a ATP vázající protein (ABC-transportér) cytoplazmatické membrány (Ahmed & Holmström 2014a). Jakmile se nachází komplex siderofor–železo v cytosolu dochází k redukci Fe^{III} na Fe^{II} a železo je uvolněno ze sideroforu a stává se dostupným pro využití v buňce (Saha et al. 2016). Siderofory jsou následně degradovány nebo recyklovány a jsou vyloučeny z buňky (Hider & Kong 2010; Řezanka et al. 2018).

Grampozitivní bakterie nemají vnější membránu, a proto ani periplazmu. Transport železa do cytoplazmy je tedy odlišný od transportu popsaného pro gramnegativní bakterie. Navzdory tomuto rozdílu je z mikrobiologických a genetických studií známo, že tyto organismy produkují jak lipoproteinové receptory, tak ABC transportéry pro siderofory, které jsou podobné jako u gramnegativních bakterií, což dokazuje význam sideroforů pro život buňky (Hider & Kong 2010). Siderofory produkované grampozitivními bakteriemi jsou vázané na proteiny, permeasy a ATPázy, které se podílejí na jejich transportu buněčnou membránou (Řezanka et al. 2018).

3.3.5 Detekce a identifikace sideroforů

Standardní testy detekce a identifikace sideroforů byly vyvinuty v 80. letech 20. století pro lepší pochopení systémů absorpce bakteriálního železa (Schwyn & Neilands 1987). K detekci sideroforů se nejčastěji používají dvě metody, a to chemická detekce a biotest. Biotesty byly používány dříve, než byly známy chemické struktury různých sideroforů a zůstaly nejcitlivější analytickou metodou pro jejich detekci (Guerinot 1994).

Bakterie běžně používané pro tyto testy zahrnují kmeny *Aureobacterium* (*Arthrobacter*) *flavescens*, *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli*. Tyto kmeny vyžadují různé exogenní siderofory pro růst v mediu s omezeným obsahem železa (Guerinot 1994). Jedny z prvních chemických testů pro detekci sideroforů byly specifické pro hydroxamáty a katecholy, funkční skupiny tehdy známých sideroforů (Guerinot 1994). Vývoj testu chrome azurolu S (CAS) (Schwyn & Neilands 1987), který je nezávislý na struktuře sideroforu, usnadnil jejich detekci.

Chrom azurol S (CAS)

Principem detekce produkce sideroforů pomocí indikátoru Chrom azurolu S (CAS) je změna barvy media z modré na oranžovou. Když jsou siderofory přítomny v modrém testovacím CAS mediu, vytvoří se komplex siderofor–železo. Vznik tohoto komplexu vede k uvolnění CAS a dojde ke změně barvy z modré na oranžovou (Schwyn & Neilands 1987). Jak uvádí Jellison et al. (1991) pro některé grampozitivní bakterie a houby je činidlo použité v tomto testu toxické a jeho toxicita musí být zmírněna. Pérez-Miranda et al. (2007) ve svém článku popsali snadnou, rychlou a netoxickou metodu (O-CAS test) ke stanovení produkce sideroforů různými mikroorganismy na pevném mediu. Všechny tyto metody slouží pouze

k detekci produkce sideroforů, tzn. jsou nespecifické a neposkytují žádné informace o struktuře sideroforů.

K identifikaci sideroforů se v dnešní době používá kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (LC-MS). Kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií lze využít jako citlivou, vysoce výkonnou detekční metodu pro kvalitativní a kvantitativní stanovení sideroforů (Řezanka et al. 2018). Ahmed & Holmström (2015) použili ve svém pokusu k detekci a kvantifikaci sideroforů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) spojenou s elektrosprejovou ionizační hmotnostní spektrometrií. Při tomto pokusu detekovali různé druhy ferrioxaminů (E, B, G a D). Essén et al. (2007) zjišťovali produkci sideroforů, fakultativním anaerobem *Pseudomonas stutzeri*, kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. Spektrální skenování (300–700 nm) ukazuje, zda je přítomen dihydroxamátový nebo trihydroxamátový siderofor (Paul & Dubey 2015).

3.3.6 Využití sideroforů

Kromě primární funkce sideroforů (tj. zásobování mikroorganismů rozpustným železem potřebným pro jejich růst) mají siderofory uplatnění v mnoha oblastech lidské činnosti, jako je ekologie, zemědělství, bioremediace, výroba biosenzorů a farmaceutik (Řezanka et al. 2018). V posledních letech koncept biosensorických zařízení založených na sideroforech otevřel nové obzory ve vysoce přesné detekci různých kovových iontů, zejména železa, ale také různých mikroorganismů, fosfopeptidů, antibiotik a pesticidů (Nosrati et al. 2018).

Siderofory mají uplatnění v mikrobiální ekologii pro zvýšení růstu některých nekultivovatelných mikroorganismů a mohou změnit mikrobiální společenstva. V oblasti zemědělství některé druhy sideroforů podporují růst rostlin a zvyšují jejich výnos zvýšením příjmu Fe. Siderofory působí jako potenciální biokontrolní prostředek proti škodlivým fytopatogenům a mohou nahradit nebezpečné pesticidy (Saha et al. 2016).

Siderofory lze také využít při sanaci toxických a rizikových prvků, protože s těmito prvky tvoří komplexy (Saha et al. 2016). Například David et al. (2019) zkoumali potenciální biologickou schopnost zástupců rodu *Pseudomonas* produkujících siderofory a jejich produkovaných sideroforů na surových azbestových vláknech. Jejich výzkum jasně prokázal, že biologická chelatační činidla jsou při extrakci železa účinnější než nejznámější chemická chelatační sloučenina EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). Výsledky prokázaly, že bakterie rodu *Pseudomonas* a produkované siderofory, pyoverdin a pyochelin, byly schopny rozpustit železo z azbestových vláken.

Siderofory mohou interagovat s dalšími prvky například se zinkem, molybdenem, vanadem, mědí a podobně. Pyoverdin, siderofor vylučovaný bakteriemi rodu *Pseudomonas*, vytváří komplex s manganem, někdy s mnohem větší afinitou než k Fe^{III} (Khan et al. 2018). Yoneyama et al. (2011) zjistili, že molybden reguluje produkci azotobaktinu a katecholátového sideroforu u bakterie *Azotobacter vinelandii*.

Kromě chelatace železa lze siderofory využívat také při bioremediaci. Například Cao et al. (2012) ve svém výzkumu sledovali vliv sideroforů na akumulaci a toxicitu rizikových prvků kadmia (Cd) a olova (Pb). Zjistili, že očkování bakteriálním sideroforem zvýšilo ve srovnání s kontrolou akumulaci Pb a Cd v myceliu houby *Oudemansiella radicata*. Z jejich výsledků lze také usuzovat, že mikrobiální siderofory hrály důležitou roli při zmírňování toxicity Cd a Pb v

O. radicata. Braud et al. (2009) uvedli, že očkování kmenem *Pseudomonas aeruginosa* významně zvýšilo akumulaci Cr a Pb v kukuřičných výhoncích, což korelovalo se zvýšenou produkcí sideroforů, zejména pyoverdinu a pyochelinu. Cao et al. (2012) uvádí, že absorpce prvků je výrazně ovlivněna strukturou sideroforu.

Fytoremediace míst kontaminovaných rizikovými prvky může být omezena nízkou biologickou dostupností kontaminujících látek. Komplexotvorná činidla mohou pomoci zlepšit tuto techniku zvýšením rozpustnosti rizikových prvků (Neubauer et al. 2000). Jak uvádí Cao et al. (2012) siderofory, produkované mikroorganismy, hrají důležitou roli při vytváření komplexů s rizikovými prvky a při zvyšování mobility těchto prvků v půdě.

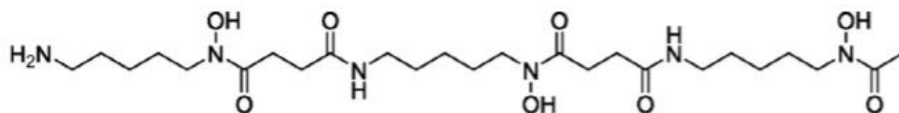
Dimkpa et al. (2009) uvádí, že siderofor desferrioxamin E (DFOE) se lépe váže s trojmocnými prvky (např. Fe a Al), než s dvojmocnými prvky (např. Cu). V této studii Dimkpa et al. (2009) sledovali vliv sideroforů na růst rostlin v půdách se zvýšeným obsahem různých prvků (zejména hliníku (Al), mědi (Cu), manganu (Mn), niklu (Ni) a uranu (U)). Výsledky jejich studie prokázaly, že zvýšená hladina těchto sledovaných prvků inhibovala růst rostlin, ale přídavek sideroforů růst rostlin podpořil. Rostliny pěstované na půdách ošetřených siderofory akumulovaly vyšší množství sledovaných prvků. Siderofory byly schopny dodávat rostlinám Fe v přítomnosti zvýšeného množství dalších prvků, zejména Al, Cu, Mn, Ni a U, které jinak inhibují získávání Fe. Siderofory snížily tvorbu volných radikálů, čímž chránily auxiny (rostlinné hormony) před degradací a umožnily zvýšit růst rostlin, což následně vedlo ke zvýšení absorpce prvků rostlinami.

Neubauer et al. (2000), kteří studovali vliv desferrioxaminu B (DFOB) na vazbu rizikových prvků Cu, Zn a Cd na minerály (montmorillonit, kaolinit a goethit), odhalili, že mobilizace komplexů DFOB–prvek (kov) silně závisí na náboji DFOB a povrchovém náboji jílových minerálů. Zjistili také, že siderofory silně ovlivňovaly sorpci rizikových prvků, ale účinky se výrazně lišily podle kombinace mezi kovy a minerály.

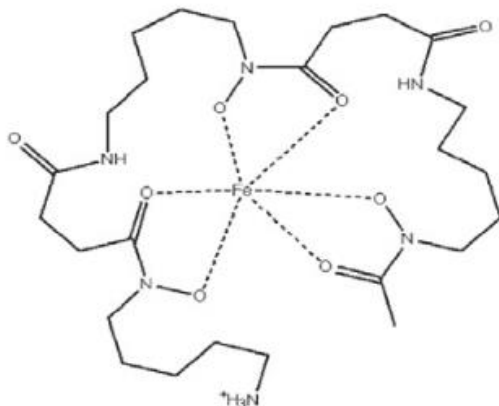
3.3.7 Zástupce sideroforů

Desferrioxaminy a ferrioxaminy (komplexy Fe)

Bakterie rodu *Nocardia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* a *Enterobacter* jsou známými producenty desferrioxaminových sideroforů jako jsou desferrioxamin B, D, E a G (Feistner et al. 1993; Winkelmann 2002). Desferrioxaminy a ferrioxaminy (komplexy železa) jsou velká skupina hydroxamátových sideroforů produkovaných také půdními bakteriemi rodu *Streptomyces* (Fernández & Winkelmann 2005; Das et al. 2007). Tyto sloučeniny jsou lineární nebo cyklické trihydroxamáty s opakujícími se jednotkami 1-amino-5-hydroxylaminoalkanu (pentan nebo butan) a kyseliny jantarové nebo octové (Fernández & Winkelmann 2005). Hydroxamátový siderofor desferrioxamin B (Obr. 9), někdy nazýván jako proferrioxamin B (Feistner et al. 1993), je produkován například bakteriemi *Streptomyces acidiscabies* (Dimkpa et al. 2008), *Streptomyces coelicolor* a *Streptomyces pilosus* (Saharan & Nehra 2011). Obr. 10 zobrazuje chemickou strukturu ferrioxaminu B (komplexu desferrioxaminu B s železem).

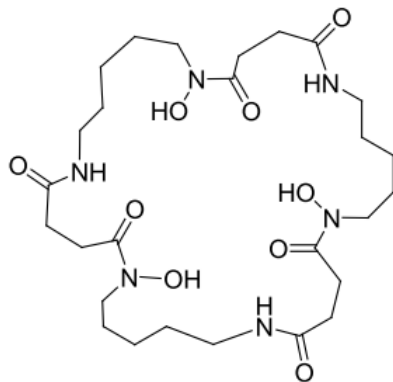


Obr. 9: Chemická struktura desferrioxaminu B (Raines et al. 2015).

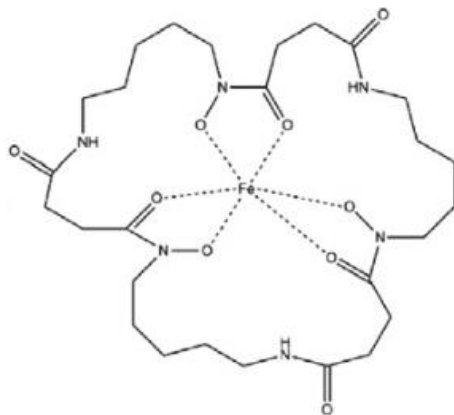


Obr. 10: Chemická struktura ferrioxaminu B (Ahmed & Holmström 2014b).

Hydroxamátový siderofor desferrioxamin E (Obr. 11) je produkovaný bakteriemi *Streptomyces acidiscabies* (Dimkpa et al. 2008) a *Streptomyces coelicolor* (Saharan & Nehra 2011). Desferrioxamin E je odolný vůči kyselinám a má vysokou formační konstantu ($K \sim 10^{32}$) (Fernández & Winkelmann 2005). Obr. 12 zobrazuje chemickou strukturu ferrioxaminu E (komplexu desferrioxaminu E s železem).



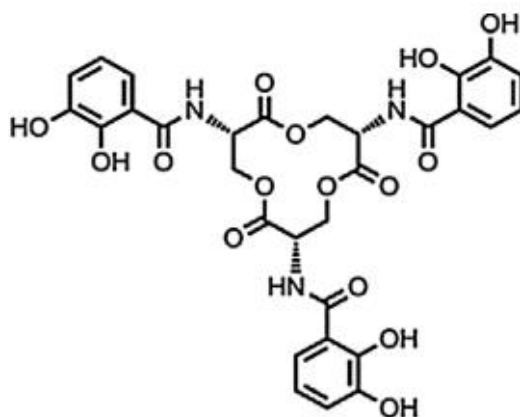
Obr. 11: Chemická struktura desferrioxaminu E (Hider & Kong 2015).



Obr.12: Chemická struktura ferrioxaminu E (Ahmed & Holmström 2014b).

Enterobactin

Siderofor enterobactin (Obr. 13) je triskatecholový derivát cyklického triserin laktonu. Koordinuje železo pomocí tří katecholátových funkčních skupin, které jsou spojeny s triserinovým makrocyklem. Je známa pozoruhodná stabilita komplexu železa s enterobactinem (Raymond et al. 2003). Enterobactin používá jako stavební bloky kyselinu dihydroxybenzoovou a serin (Hider et Kong 2010). Detailní studie chemie, rozpoznávání, syntézy, regulace a transportu enterobactinu z něj dělají snad nejlepší prostředek k porozumění sideroforem zprostředkovaným systémům absorpce železa, které vykazují mnoho funkcí této malé molekuly (Raymond et al. 2003).



Obr. 13: Chemická struktura enterobactinu (Khan et al. 2018).

4 Metodika

4.1 Stanovení produkce sideroforů aktinobakteriemi

Cílem experimentu bylo stanovení produkce sideroforů u různých kmenů aktinobakterií. K testování produkce sideroforů bylo použito modré testovací medium Chrome azurol S (CAS) (Louden et al. 2011) a kmeny byly kultivovány na pevných i v tekutých mediích. Testování produkce sideroforů kmeny kultivovanými na pevném mediu probíhalo aplikací agarových terčů s narostlou kulturou na pevné modré testovací CAS medium a následným odečtem velikosti vytvořených zón. Produkce sideroforů v tekutém mediu byla testována aplikací tekutého media, ve kterém byly kultivovány vybrané kmeny, do jamek vytvořených v CAS mediu a následně byla odečítána velikost vytvořených zón. Z tekutých medií, ve kterých byl potvrzen obsah sideroforů, byly pomocí kolonek Waters OASIS sample extraction products (HLB a MCX) vytvořeny extrakty, které potenciálně obsahovaly siderofory. Testování přítomnosti sideroforů v extraktech bylo prováděno spektrofotometrem NanoPhotometer P300 (Implen).

4.1.1 Výběr kmenů použitých k testování

Byly testovány bakteriální kmeny, které byly izolovány z půdy a pocházely ze šesti lokalit (bramborové pole, Příbram, Děvín, Merkenstein, Stampftal a Oblík) a sbírkové kmeny (*Streptomyces coelicolor* DSM 40783, *Streptomyces scabiei* DSM 41658, *Streptomyces acidiscabies* DSM 41668, *Streptomyces europaeiscabiei* DSM 41802, *Streptomyces stelliscabiei* DSM 41803 a *Streptomyces turgidiscabies* DSM 41838) jako kontrola. Lokalita bramborové pole zahrnuje kmeny pocházející z dlouhodobě sledovaných polí nacházejících se v Českomoravské vysočině (Vyklantice a Ždírec). Hodnoty vybraných půdních vlastností (půdní reakce (pH), obsahy organického C, vápníku (Ca), hořčíku (Mg) a železa (Fe) v půdě), půdní typ a vegetace jednotlivých lokalit jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Půdní podmínky jednotlivých lokalit.

Lokalita	pH	Org. C	Ca	Mg	Fe	Půdní typ	Vegetace
		(%)	(g.kg ⁻¹)	(g.kg ⁻¹)	(g.kg ⁻¹)		
Vyklantice	6,0	2,0	2,545	12,1	44,9	Kambizem	pole
Ždírec	6,9	2,3	3,245	4,17	24,8	Kambizem	pole
Příbram	5,4	4,7	ND	ND	ND	Kambizem	louka
Děvín	7,9	12,0	6,210	0,163	<0,001	Rendzina	step
Merkenstein	8,1	16,5	ND	ND	ND	Rendzina	les
Stampftal	7,9	14,8	ND	ND	ND	Rendzina	les
Oblík	7,9	21,5	6,090	0,307	<0,001	Kambizem	step

4.1.2 Stanovení produkce sideroforů kmeny kultivovanými na pevném mediu

Principem této metody je stanovení produkce sideroforů pozorováním změny modré barvy testovacího media v okolí kolonie na žlutou až světle oranžovou nebo fialovou (tzn. vytvoření zóny kolem terčíku narostlé kolonie). Vybrané kmeny byly kultivovány na třech pevných mediích, na kultivačním mediu R2A, GYM a GAUZE bez železa (GAUZE-Fe).

Příprava pevných kultivačních medií

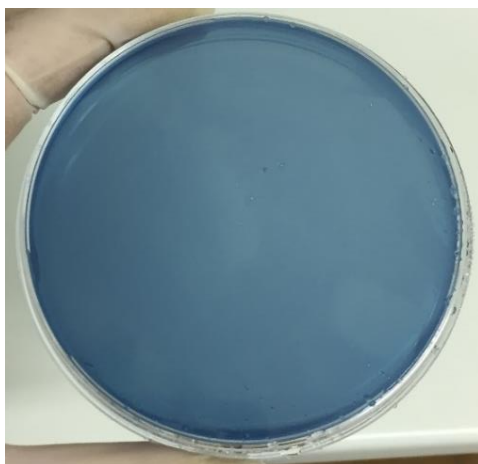
Kultivační medium R2A bylo připraveno ze směsi chemikálií R2A agar (Ph.Eur.) od výrobce VWR Chemicals. Složení této směsi v gramech na 1 litr destilované vody bylo následující: Proteose Peptone 0,5 g, Casein hydrolysate (kaseinový hydrolyzát) 0,5 g, Yeast extract (výtažek z kvasnic) 0,5 g, D-Glucose (glukosa) 0,5 g, Starch (škrob) 0,5 g, Na-pyruvate (pyruvát sodný) 0,3 g, K_2HPO_4 (hydrogenfosforečnan draselný) 0,30 g, $MgSO_4$ (síran hořečnatý) 0,024 g a Agar 15 g. Pro přípravu tohoto media bylo naváženo 18,1 gramů a rozpuštěno v 1 litru destilované vody. Sterilizace byla provedena autoklávem PS20A (Chirana) při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Takto připravené medium bylo asepticky ve flow boxu rozlito do Petriho misek. Kultivační medium GYM bylo připraveno podle Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GYM STREPTOMYCETES MEDIUM (Leibniz Institute DSMZ 2007) z následujících složek: D-Glukosa bezvodá (Penta) 4 g, Yeast Extract Powder – kvasnicový extrakt v prášku (Himedia) 4 g, Malt extract – sladový extrakt (Oxoid) 10 g, $CaCO_3$ – uhličitán vápenatý (Lachner) 2 g, Agar (Dr.Kulich) 12 g. Všechny složky kromě agaru byly rozpuštěny v 1 litru destilované vody. Následně bylo upraveno pH roztoku na 7,2 a byl přidán agar. Sterilizace byla provedena autoklávem PS20A (Chirana) při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Takto připravené medium bylo asepticky ve flow boxu rozlito do Petriho misek. Kultivační medium GAUZE-Fe bylo připraveno podle Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GAUZE'S SYNTHETIC MEDIUM NO.1 (Leibniz Institute DSMZ 2007) bez přídavku Fe ($FeSO_4 \times 7 H_2O$) pro docílení deficitu železa v mediu. Na 1 litr destilované vody bylo použito: Soluble starch – rozpustný škrob (BD) 20 g, KNO_3 – dusičnan draselný 1 g, NaCl – chlorid sodný (Penta) 0,5 g, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – síran hořečnatý heptahydrát (Sigma) 0,5 g, K_2HPO_4 – hydrogenfosforečnan didraselný bezvodý (Penta) 0,5 g, Agar (Dr.Kulich) 15 g. Sterilizace byla provedena autoklávem PS20A (Chirana) při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Takto připravené medium bylo asepticky ve flow boxu rozlito do Petriho misek.

Příprava testovacího media CAS Assay

Testovací medium CAS Assay (Schwyn & Neilands, 1987; Louden et al. 2011) bylo použito v diplomové práci pro testování přítomnosti sideroforů. Nejdříve bylo připraveno modré barvivo (Blue Dye) smícháním 500 ml roztoku připraveného rozpuštěním 0,6 g Chromeazurolu S (Sigma) v 500 ml destilované vody, 90 ml roztoku připraveného rozpuštěním 0,027 g $FeCl_3 \times 6 H_2O$ – chloridu železitého hexahydrátu (Sigma) ve 100 ml 10 mM HCl – kyselině chlorovodíkové a 400 ml roztoku připraveného rozpuštěním 0,73 g HDTMA – Hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma) ve 400 ml destilované vody. Připravené barvivo bylo sterilizováno autoklávem PS20A (Chirana) při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a skladováno v plastové kádince o objemu 1000 ml. Následně byly připraveny další potřebné

roztoky: Minimal Media 9 (MM9), 20% roztok glukózy, roztok hydroxidu sodného (NaOH), roztok Casamino Acid. Solný zásobní roztok MM9 byl připraven smícháním 15 g KH_2PO_4 – dihydrogenfosforečnanu draselného (Penta), 25 g NaCl – chloridu sodného (Penta) a 50 g NH_4Cl – chloridu amonného (Penta) a rozpuštěním této směsi v 500 ml destilované vody. 20% roztok glukózy byl připraven rozpuštěním 20 g D-Glukosa bezvodá (Penta) ve 100 ml destilované vody. Roztok hydroxidu sodného byl připraven rozpuštěním 25 g NaOH – hydroxidu sodného (Lachner) ve 150 ml destilované vody. Roztok Casamino Acid byl připraven rozpuštěním 3 g Casamino acids (Difco) ve 27 ml destilované vody.

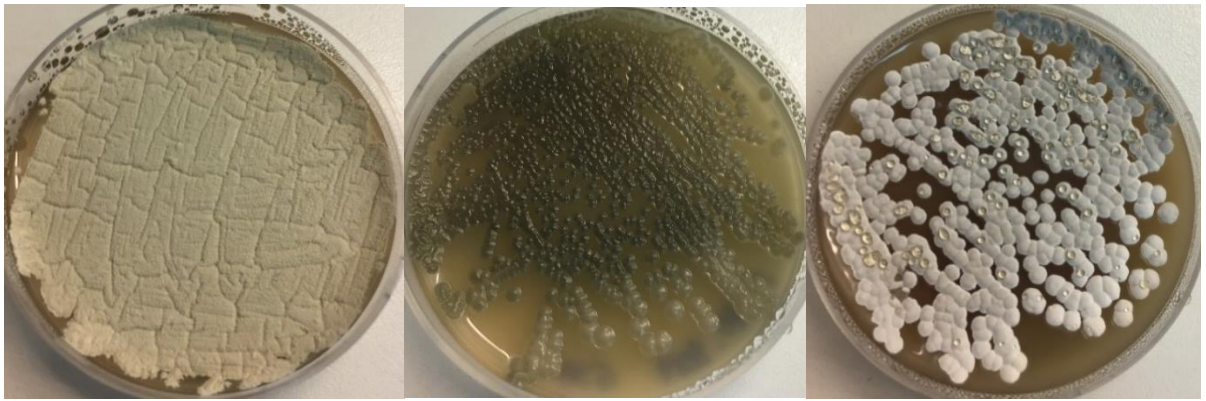
CAS Assay medium bylo připraveno smícháním 100 ml roztoku MM9 se 750 ml destilované vody. V připraveném roztoku bylo upraveno pH nad 6 a postupně v něm bylo rozpuštěno 32,24 g PIPES – piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (Sigma). Během rozpouštění PIPES bylo kontrolováno pH a v případě potřeby bylo zvýšeno na pH 6, protože tato látka není rozpustná při pH nižším než 5. Následně byl do roztoku přidáno 15 g Agar (Dr.Kulich) a byla provedena sterilizace autoklávem PS20A (Chirana) při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí roztoku MM9/ PIPES na 50 °C bylo přidáno 30 ml přefiltrovaného roztoku Casamino acid a 10 ml 20% roztoku glukózy pomocí injekční stříkačky a speciálního filtru. Nakonec bylo po stěně kádinky pomalu a za stálého míchání přidáno 100 ml modrého barviva (Blue Dye). Takto připravené medium bylo asepticky ve flow boxu rozlito do Petriho misek (viz Obr. 14).



Obr. 14: Petriho miska s testovacím mediem CAS.

Kultivace kmenů

Kmeny byly zaočkovány pomocí jednorázových plastových kliček (10 μl Disposable Inoculating Loops, Biologix Group Limited) na malé Petriho misky (průměr 6 cm) s předem připravenými medii R2A, GYM a GAUZE-Fe. Očkování probíhalo ve flow boxu ve sterilním prostředí tak, aby se snížilo riziko kontaminace kmenů plísněmi a jinými mikroorganismy. Flow box byl před každým použitím ošetřen UV zářením a pracovní plocha byla omyta 70% EtOH. K očkování byly použity bakteriální kmeny, které byly konzervovány při teplotě -72 °C. Kultivace kmenů probíhala v uzavřené nádobě, v temnu, 7 dní při teplotě 28 °C v inkubátoru Q-Cell. Příklady narostlých kmenů na kultivačním mediu jsou uvedeny na Obr. 15 a Obr. 16.



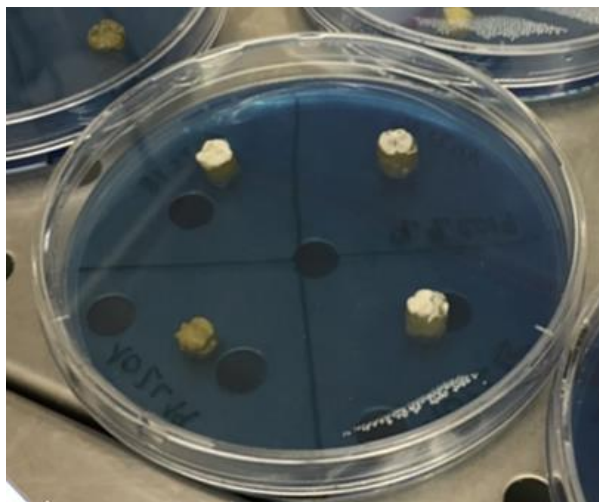
Obr. 15: Nárůst kmenů na kultivačním mediu (kmeny 09VK6, 09VK71 a 10ZC4).



Obr. 16: Nárůst kmenů na kultivačním mediu (kmeny 10OB2, 10OB11 a 10OB21).

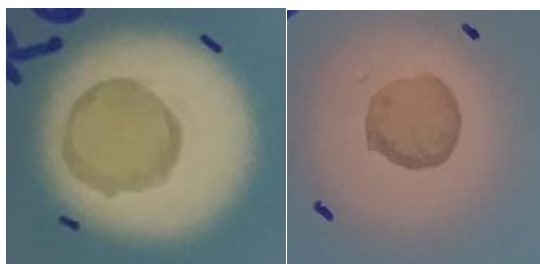
Testování produkce sideroforů

Zjišťování produkce sideroforů probíhalo za použití modrého testovacího media CAS Assay (Louden et al. 2011). Změna modré barvy media v okolí kolonie na žlutou až světle oranžovou nebo fialovou značí produkci sideroforů. Po sedmi dnech kultivace byly pomocí seříznutých špiček na pipetování vyřezávány z narostlých kolonií agarové terčíky o velikosti 6–7 mm a byly aplikovány na velké Petriho misky s CAS Assay mediem (viz Obr. 17).

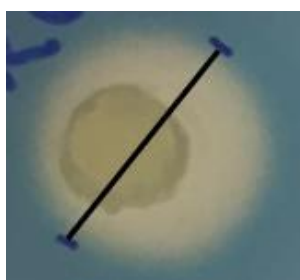


Obr. 17: Terčíky s narostlými kmeny na CAS Assay.

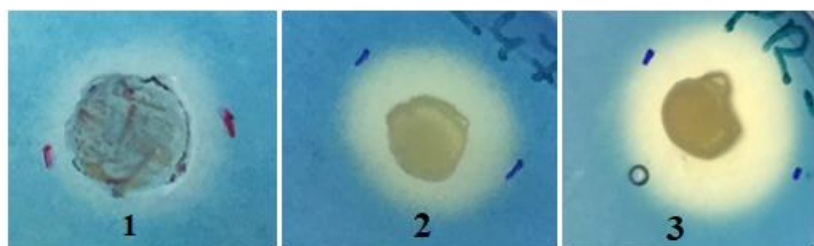
Takto upravené misky byly neprodyšně uzavřeny parafilmem a byly ponechány v uzavřené plastové nádobě při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách probíhal první odečet vytvořených zón (Obr. 18). Hodnocen byl průměr zóny vytvořené kolem terčíku v mm (Obr. 19) a intenzita vyblednutí zóny, od 1 (nejméně) do 3 (nejvíce) (Obr. 20). Po zhodnocení vytvořených zón za jeden den byly misky opět uloženy do uzavřené plastové nádoby při pokojové teplotě do dalšího hodnocení, které probíhalo ještě několikrát. Dle zbarvení vytvořené zóny kolem terčíku lze předběžně rozlišit siderofory podle funkční skupiny kterou obsahují na katecholáty, hydroxamáty a α -karboxyláty. Změna modré barvy CAS media na fialovou (siderofory katecholátového typu) nebo na oranžovou (siderofory hydroxamátového typu) (Pérez-Miranda et al. 2007).



Obr. 18: Zóny vytvořené kolem terčíků vypovídající o přítomnosti sideroforů.



Obr. 19: Průměr zóny vytvořené kolem terčíku.



Obr. 20: Intenzita vyblednutí zóny od 1 = nejméně vybledlá do 3 = nejvíce vybledlá.

4.1.3 Stanovení produkce sideroforů kmeny kultivovanými v tekutém mediu

Principem této metody je stanovení produkce sideroforů, stejně jako u testování na pevných mediích, pozorováním změny modré barvy testovacího media v okolí kolonie na žlutou až světle oranžovou nebo fialovou (tzn. vytvoření zóny kolem terčíku narostlé kolonie). Vybrané kmeny byly kultivovány ve třech tekutých mediích, v kultivačním mediu R2A, GYM a GAUZE bez železa (GAUZE-Fe). K testování produkce sideroforů v tekutých mediích byly vybrány kmeny, u kterých byla prokázána produkce sideroforů na pevných mediích.

Příprava tekutých kultivačních medií

Kultivační tekuté medium R2A bylo připraveno podle Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) R2A MEDIUM (Leibniz Institute DSMZ 2007), pro zachování kapalné formy media nebyl do směsi přidán agar. Tekuté medium R2A bylo připraveno rozpuštěním jednotlivých uvedených složek v 1 litru destilované vody: Yeast Extract Powder – kvasnicový extrakt v prášku (Himedia) 0,5 g, Proteose Peptone (Difco no. 3) 0,5 g, Casamino acids (Difco) 0,5 g, D-Glukosa bezvodá (Penta) 0,5 g, Soluble starch – rozpustný škrob (BD) 0,5 g, Na-pyruvate – pyruvát sodný (Sigma) 0,3 g, K_2HPO_4 – hydrogenfosforečnan didraselný bezvodý (Penta) 0,3 g, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – síran hořečnatý heptahydrát (Sigma) 0,05 g. Sterilizace byla provedena autoklávem PS20A (Chirana) při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Kultivační tekuté medium GYM bylo připraveno podle Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GYM STREPTOMYCES MEDIUM (Leibniz Institute DSMZ 2007), pro zachování kapalné formy media nebyl do směsi přidán agar. Tekuté medium GYM bylo připraveno rozpuštěním jednotlivých uvedených složek v 1 litru destilované vody: D-Glukosa bezvodá (Penta) 4 g, Yeast Extract Powder – kvasnicový extrakt v prášku (Himedia) 4 g, Malt extract – sladový extrakt (Oxoid) 10 g, $CaCO_3$ – uhličitán vápenatý (Lachner) 2 g. Sterilizace byla provedena autoklávem PS20A (Chirana) při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Kultivační tekuté medium GAUZE-Fe bylo připraveno podle Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GAUZE'S SYNTHETIC MEDIUM NO.1 (Leibniz Institute DSMZ 2007) bez přídatku Fe ($FeSO_4 \times 7 H_2O$) a bez agaru. Na 1 litr destilované vody bylo použito: Soluble starch – rozpustný škrob (BD) 20 g, KNO_3 – dusičnan draselný 1 g, NaCl – chlorid sodný (Penta) 0,5 g, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – síran hořečnatý heptahydrát (Sigma) 0,5 g, K_2HPO_4 – hydrogenfosforečnan didraselný bezvodý (Penta) 0,5 g. Sterilizace byla provedena autoklávem PS20A (Chirana) při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Zaočkování tekutých medií R2A, GYM, GAUZE-Fe a kultivace kmenů

Do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml, s prolamováním, bylo napipetováno 15 ml předem připraveného tekutého media. Baňky s mediem (R2A, GYM, GAUZE-Fe) byly zakryty modrou fólií a sterilizovány (20 min při 120 °C v autoklávu). Takto připravená media byla zaočkována kmeny, které byly kultivovány v malých Petriho miskách 7 dní při 28 °C na pevném mediu GYM. Zaočkováná tekutá media byla umístěna v zakrytých baňkách na třepačku, kde probíhala kultivace 7 dní při 28 °C a 180 RPM.

Testování produkce sideroforů

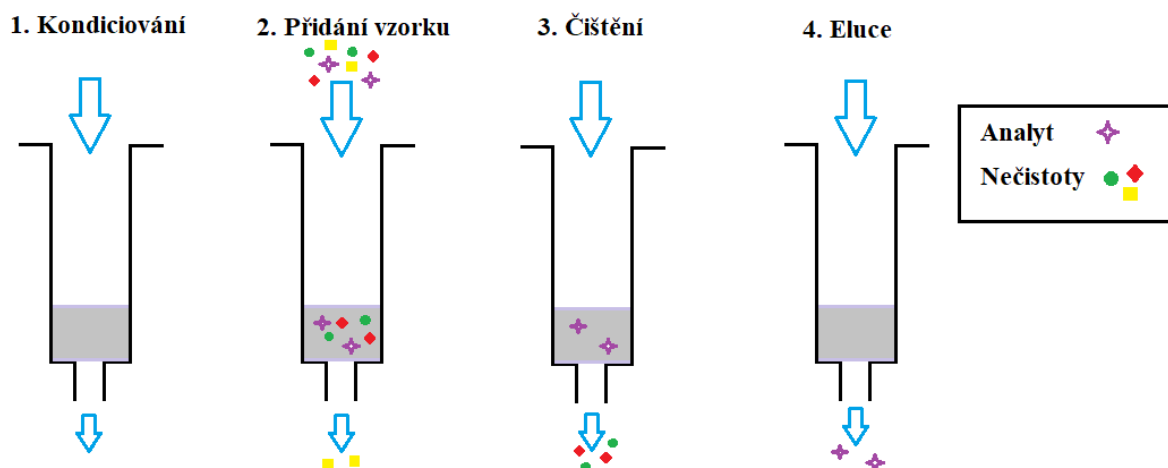
Pro testování přítomnosti sideroforů v tekutém mediu bylo použito medium CAS Assay (Louden et al. 2011). Do předem vytvořených jamek, o průměru 7–8 mm, v mediu CAS Assay bylo napipetováno 100 µl odstředěného tekutého media (R2A, GYM, GAUZE-Fe), ve kterém byly kultivovány kmeny bakterií (viz Zaočkování tekutých medií R2A, GYM, GAUZE-Fe a kultivace kmenů). První odečet vytvořených zón probíhal po 24 hodinách od aplikace tekutého media do jamek. Zóny byly kontrolovány také v následujících dnech a jejich změny byly zaznamenány. Byl hodnocen průměr zóny (mm) a intenzita vyblednutí zóny (od 1–nejméně do 3–nejvíce) vytvořené kolem jamky naplněné tekutým mediem.

Spektrofotometrické stanovení přítomnosti sideroforů v tekutých mediích

Spektrofotometrické stanovení přítomnosti sideroforů v tekutých mediích bylo provedeno spektrofotometrem NanoPhotometer P300 (Implen). Byla pozorována změna v tekutém testovacím mediu CAS Assay způsobená přidávkem 10× naředěného tekutého media, ve kterém byly kultivovány bakteriální kmeny. Do kyvety bylo napipetováno 0,5 ml 10× naředěného tekutého media (0,05 ml tekutého media + 0,45 ml destilované vody) a 0,5 ml tekutého testovacího CAS Assay media. Měření probíhalo při 630 nm 10 mm. Jako blank bylo použito čisté tekuté kultivační medium. Tekutá media byla uchovávána v chladničce při teplotě 4 °C.

4.1.4 Extrakce sideroforů z tekutého media – extrakce na tuhou fázi

Principem extrakce na tuhou fázi (SPE = soil phase extraction) je adsorpce molekul látky na tuhém sorbentu a následná eluce do rozpouštědla. Přínosem extrakce je jednak zvýšení koncentrace cílových analytů, ale také odstranění nečistot z extraktů pro usnadnění následné analýzy (Andrade-Eiroa et al. 2016). Jako sorbent byly použity kolonky (zásobníky) Waters OASIS sample extraction products (HLB a MCX), jako eluční rozpouštědlo byl použit methylalkohol – CH₃OH (Penta) a roztok methylalkoholu s 5% amoniakem. Extrakce pomocí kolonek HLB a MCX probíhá obecně ve čtyřech krocích (viz Obr. 21). Prvním krokem je kondicionování, kdy dochází k přizpůsobení tuhého sorbentu vlhkosti. Ke kondicionování se používá stejný roztok jako při posledním kroku eluci. Druhým krokem je přidání vzorku, kdy dojde k zachycení analytů na sorbent uvnitř kolonky. Následuje třetí krok, při kterém je sorbent přečištěn a zbaven nežádoucích nečistot. Posledním krokem je eluce, kdy dochází k uvolnění sorbovaných analytů do elučního rozpouštědla a vzniku výsledného extraktu.



Obr. 21: Schematické znázornění SPE extrakce pomocí kolonek.

Extrakce sideroforů methyllalkoholem pomocí kolonek Waters OASIS sample extraction products

a) Kolonky OASIS HLB 3cc (60 mg)

Tekutá media, ve kterých byly kultivovány kmeny bakterií (viz Zaočkování tekutých medií R2A, GYM, GAUZE (-Fe) a kultivace kmenů), byla centrifugována při 3000 RPM 3 minuty. Supernatant byl následně okyselen na pH 2–2,5. K extrakci sideroforů z tekutého media byly použity kolonky Waters OASIS sample extraction products HLB 3cc (60 mg) a vakuová pumpa (Welch WOB-L PRESS/VAC DRY PUMP 2). Do kolonek byly napipetovány 3 ml methyllalkoholu (Penta) a bylo spuštěno vakuum, tak aby veškerý obsah kolonky protekl přes membránu. Následně byly do kolonek napipetovány 3 ml destilované vody a opět za použití vakua protekl obsah kolonek přes membránu. Stejným postupem byly přes membránu přefiltrovány 3 ml odstředěného tekutého media. Takto připravené kolonky byly pomocí vakua propláchnuty 3 ml destilované vody a částice, které byly zachyceny sorbentem kolonky byly v centrifuze eluovány do 1 ml methyllalkoholu (Penta).

b) Kolonky OASIS MCX 3cc (60 mg)

Tekutá media, ve kterých byly kultivovány kmeny bakterií (viz Zaočkování tekutých medií GYM a GAUZE (-Fe) a kultivace kmenů), byla centrifugována při 3000 RPM 3 minuty. K extrakci sideroforů z tekutého media byly použity kolonky Waters OASIS sample extraction products MCX 3cc (60 mg) a vakuová pumpa (Welch WOB-L PRESS/VAC DRY PUMP 2). Tyto kolonky umožňují získat dva extrakty z každého vzorku, a to extrakt z první eluce za neutrálního pH a extrakt z druhé eluce za alkalického pH. Do kolonek byly napipetovány 3 ml methyllalkoholu (Penta) a bylo spuštěno vakuum, tak aby veškerý obsah kolonky protekl přes membránu. Následně byly do kolonek napipetovány 3 ml 2% kyseliny octové, připravené z 1 ml 99% kyseliny octové (Penta) a 51 ml destilované vody, a opět za použití vakua protekl obsah kolonek přes membránu. Stejným postupem byly přes membránu přefiltrovány 3 ml odstředěného tekutého media okyseleného kyselinou octovou na pH 2–3 (2,8). Takto připravené kolonky byly pomocí vakua propláchnuty 3 ml 2% kyseliny octové a částice zachycené sorbentem kolonky byly v centrifuze eluovány do 1,5 ml methyllalkoholu (Penta).

Následně bylo do kolonek napipetováno 1,5 ml roztoku methyllalkoholu s 5% amoniakem, který byl připraven z 0,5 ml 25–27% vodného roztoku amoniaku (Penta) a 9,5 ml destilované vody, a pomocí centrifugy byla provedena druhá eluce.

Přídavek Fe

Do vybraných vzorků byl přidán 1% chlorid železnatý (FeCl_2), který byl připravený rozpuštěním 0,01 g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – chlorid železnatý tetrahydrát (Sigma) v 1 ml destilované vody. 1% chlorid železnatý byl přidáván v množství 15 μl do 3 ml tekutého media a následovala extrakce methyllalkoholem stejně jako u ostatních vzorků.

4.1.5 Testování přítomnosti sideroforů v extraktech

Přítomnost sideroforů v extraktech byla testována na pevném testovacím mediu CAS Assay a pomocí spektrofotometru. Testování extraktů na pevném mediu CAS Assay probíhalo napipetováním 60 μl extraktu vytvořeného pomocí kolonek OASIS na destičky vyřezané z filtračního papíru. Byly sledovány a hodnoceny vytvořené zóny kolem destiček.

Spektrofotometrické stanovení přítomnosti sideroforů v extraktech bylo provedeno stejně jako stanovení přítomnosti sideroforů v tekutých mediích spektrofotometrem NanoPhotometer P300 (Implen). Byla pozorována změna v tekutém testovacím mediu CAS Assay způsobená přidávkem optimálně naředěného extraktu (viz Extrakce sideroforů z tekutého media – extrakce na tuhou fázi).

Varianty ředění:	5×	0,100 ml extraktu	+	0,400 ml destilované vody
	10×	0,050 ml extraktu	+	0,450 ml destilované vody
	20×	0,025 ml extraktu	+	0,475 ml destilované vody
	30×	0,017 ml extraktu	+	0,483 ml destilované vody
	50×	0,010 ml extraktu	+	0,490 ml destilované vody

Měření probíhalo při 630 nm 10 mm. Jako blank byly použity methyllalkohol (PENTA) a roztok methyllalkoholu s 5% amoniakem, které byly ředěny podle potřeby destilovanou vodou stejně jako měřené extrakty. Extrakty byly uchovávány v mrazáku při $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

4.2 Analýza extraktů kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (LC-MS)

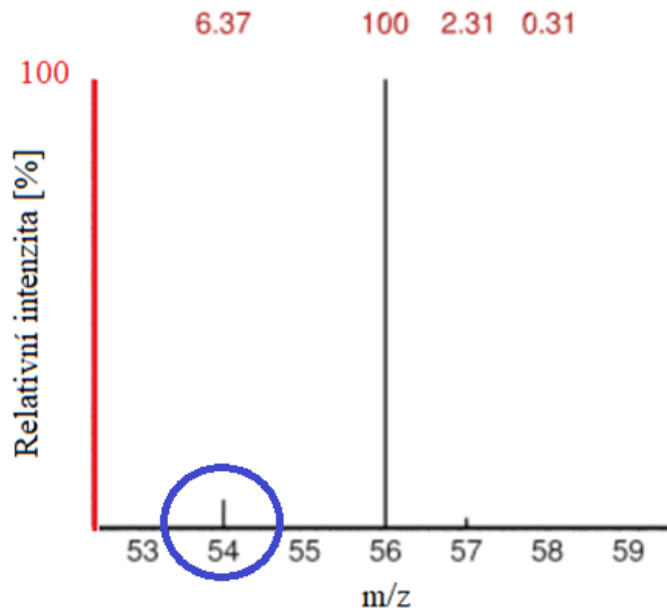
Extrakty byly centrifugovány při 14 000 RPM po dobu 3 minut. Do speciálních skleněných vialek o obsahu 1 ml byly vloženy inserty, do kterých bylo napipetováno po 200 μ l supernatantu z centrifugovaných extraktů, ve kterých byla zjištěna přítomnost sideroforů. Vialky byly uzavřeny víčky pomocí klampovacích kleští.

Extrakty byly následně analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS). K analýze byl použit systém Acquity UPLC s PDA $e\lambda$ detektorem a LCT Premier XE time of flight (TOF = doba letu iontů) hmotnostním spektrometrem (Waters, Milford, USA). Bylo nanášeno 5 μ l vzorku na kolonu Acquity UPLC CSH C₁₈ LC (50 mm \times 2,1 mm, velikost částic 1,7 μ m, Waters), byla udržována teplota 40 °C a proběhla eluce dvousložkovou mobilní fází A (0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí) a B (acetonitril). Analýzy byly provedeny v programu s lineárním gradientem (min/%B) 0/5; 1,5/5; 15/70; 18/99, následovalo jednodinutové čištění sloupce (99% B) a 1,5 minutová ekvilibrace (5% B), při průtoku 0,4 ml/min¹. Při práci s hmotnostním spektrometrem byl použit režim „W“ s kapilárním napětím nastaveným na +2800 V, kuželovým napětím +40 V, teplotou desolvačního plynu 350 °C a teplotou bloku iontového zdroje 120 °C, průtok kuželového plynu byl 50 Lh⁻¹, průtok desolvačního plynu byl 800 Lh⁻¹, doba skenování byla 0,1 s a prodleva mezi snímáním byla 0,01 s. Získaná data byla zpracována pomocí programu MassLynx V4.1 (Waters).

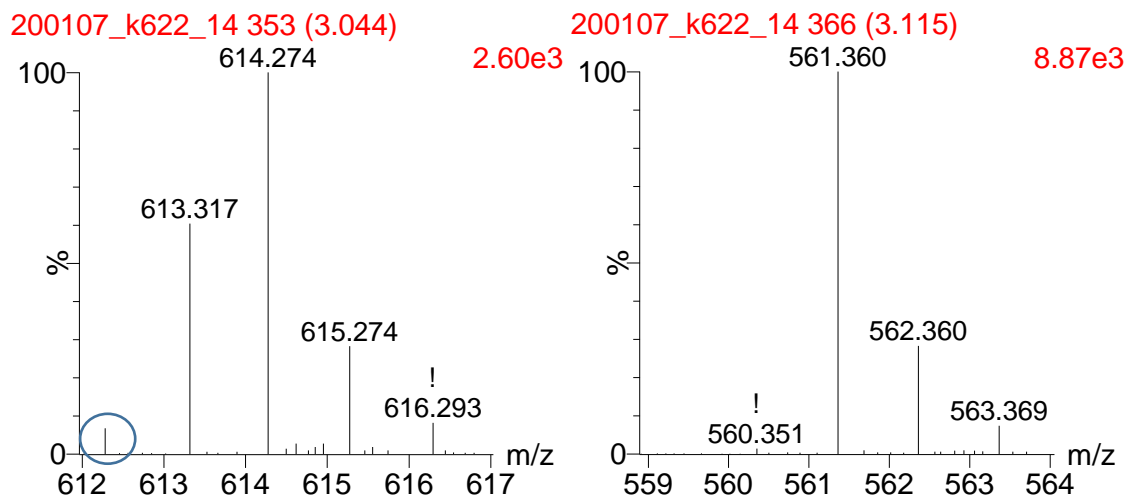
Vyhodnocení dat z LC-MS

Chromatogramy získané pomocí LC-MS byly dále analyzovány v programu MassLynx V4.1 a byly hodnoceny podle základního píku a při spektru 435 nm. Chromatogram základního píku BPI (base peak chromatogram) vyobrazuje nejintenzivnější pík v každém bodu analýzy (tj. hlavní sloučeniny). Při spektru 435 nm jsou viditelné sloučeniny železa. Celkem bylo na LC-MS hodnoceno 37 extraktů a byla zjišťována přítomnost sideroforů u 16 kmenů kultivovaných v 3 tekutých mediích (R2A, GYM a GAUZE-Fe). Siderofory byly vyhledávány podle poměru relativní molekulové hmotnosti a náboje (m/z) v databázi Siderophore Base (Bertrand 2010) tzn. menší sloučeniny, nové sloučeniny a sloučeniny nezařazené do databáze nebyly brány v úvahu.

Sloučeniny obsahující Fe vykazují na histogramu hmotnostního spektra, kde je na ose x uveden poměr relativní molekulové hmotnosti a náboje iontů (m/z) a na ose y je uvedena intenzita těchto iontů, přítomnost malého píku (viz Obr. 22). Ferrioxamin obsahuje Fe, proto je na histogramu přítomen malý pík. Naopak desferrioxamin neobsahuje Fe a na histogramu není malý pík přítomen (viz Obr. 23).



Obr. 22: Schéma izotopů železa, upraveno podle Winter (1993).



Obr. 23: Rozdíl mezi histogramy hmotnostního spektra ferrioxaminu a desferrioxaminu B.

4.3 Statistická analýza

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit počítačový program STATISTICA 12. Vliv lokality a kultivačního media na produkci sideroforů byl vyhodnocen pomocí Pearsonova chí-kvadrátu rozdělení. Hodnoty p , které byly vypočítány programem STATISTICA, byly porovnány s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ tzn. že hodnocení bylo průkazné s 95% pravděpodobností. Vliv lokality původu kmenů na produkci sideroforů byl hodnocen u kmenů kultivovaných na třech pevných mediích a to R2A, GYM a GAUZE bez železa (G-Fe). Vliv pevného kultivačního media na produkci sideroforů byl testován u kmenů pocházejících z odlišných lokalit (bramborové pole, Příbram, Stampftal a Oblík).

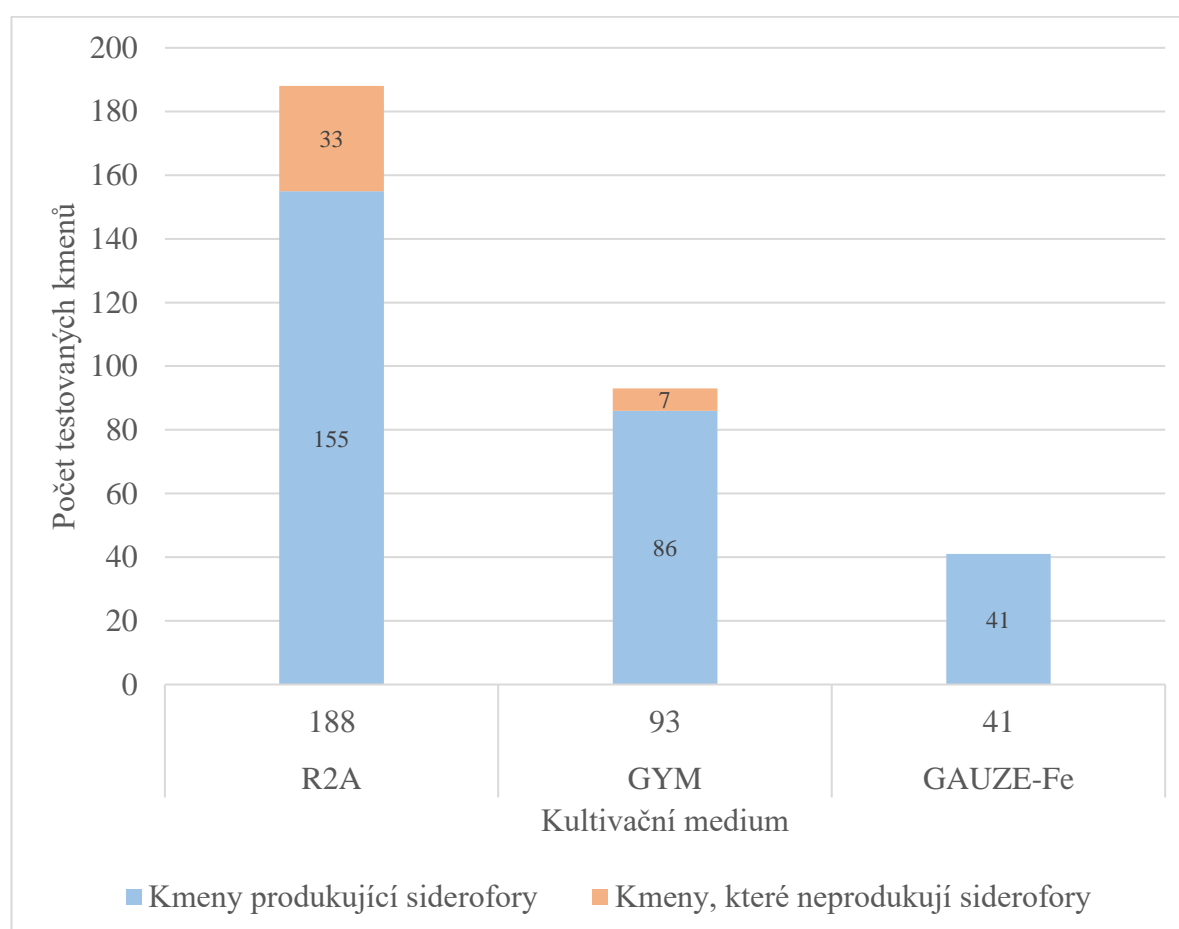
Variabilita velikosti a intenzity zón byla hodnocena pomocí variačních koeficientů (V), které byly vypočítány programem STATISTICA. Vliv lokality a kultivačního media na velikost zón vytvořených při testování produkce sideroforů byl hodnocen pomocí testu Kruskal–Wallisova ANOVA. Hodnoty p , které byly vypočítány programem STATISTICA, byly porovnány s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Byl hodnocen vliv lokality původu kmenů na velikost zón vytvořených při testování produkce sideroforů u kmenů produkujících siderofory kultivovaných na třech pevných mediích (R2A, GYM a G-Fe) a byl hodnocen i vliv kultivačních medií na velikost vytvořených zón při testování produkce sideroforů.

Vliv tekutého kultivačního media na produkci sideroforů byl vyhodnocen pomocí Pearsonova chí-kvadrátu rozdělení. Hodnoty p , které byly vypočítány programem STATISTICA, byly porovnány s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Byl testován vliv kultivačního media na produkci sideroforů u kmenů kultivovaných ve třech tekutých mediích a to R2A, GYM a GAUZE bez železa (G-Fe).

5 Výsledky

5.1 Hodnocení produkce sideroforů na pevných mediích

Na produkci sideroforů byly testovány bakteriální kmeny pocházející ze šesti lokalit a sbírkové kmeny jako kontrola. Kmeny byly kultivovány na třech různých pevných mediích (R2A, GYM a GAUZE-Fe) viz Přílohy 1, 2 a 3. Jak je patrné z Obr. 24 celkem bylo testováno 188 kmenů kultivovaných na mediu R2A, z nich 155 (82 % z celkového počtu) kmenů produkovalo siderofory a ostatních 33 nikoliv. Kmenů kultivovaných na mediu GYM bylo testováno celkem 93, z toho 86 (92 % z celkového počtu) kmenů siderofory produkovalo a 7 kmenů nikoliv. U kmenů, které byly kultivovány na mediu GAUZE bez Fe byla zjištěna produkce sideroforů ve všech případech (41).



Obr. 24: Celkový počet otestovaných kmenů na jednotlivých pevných mediích a rozdělení kmenů na produkční a neprodukční.

Na vybraných mediích byla produkce sideroforů porovnána u kmenů pocházejících z různých lokalit viz Přílohy 4, 5 a 6. Největší počet kmenů kultivovaných na pevném mediu R2A testovaných na produkci sideroforů pocházelo z lokality Příbram. Z kmenů kultivovaných na mediích GYM a GAUZE-Fe a bylo testováno nevíce kmenů z lokality bramborové pole (Vyklantice a Ždírec).

5.1.1 Vliv lokality na produkci sideroforů

Vliv lokality na produkci sideroforů byl vyhodnocen pomocí Pearsonova chí-kvadrátu rozdělení. V případě kmenů kultivovaných na mediu R2A nebylo možné na 5% hladině významnosti zamítnout hypotézu. Hodnota p (0,23354) byla vyšší než hladina významnosti (0,05). Bylo zjištěno, že produkce sideroforů kmeny pocházejícími z různých lokalit (bramborové pole, Příbram, Děvín, Merkenstein, Stampftal a Oblík), které byly kultivovány na pevném mediu R2A, není v jednotlivých lokalitách významně odlišná (viz Tab. 2).

Tab. 2: Kontingenční tabulka s počtem produkčních a neprodukčních kmenů pro kultivační medium R2A.

Lokalita	Produkce		Celkem
	ANO	NE	
bramborové pole	38	6	44
Příbram	68	21	89
Děvín	11	4	15
Merkenstein	14	1	15
Stampftal	8	0	8
Oblík	10	1	11
Celkem	149	33	182

Z kmenů kultivovaných na pevném mediu GYM byly statisticky hodnoceny čtyři lokality (bramborové pole, Příbram, Stampftal a Oblík). Podobně jako u kmenů kultivovaných na mediu R2A nebylo možné ani u kmenů kultivovaných na mediu GYM zamítnout na 5% hladině významnosti hypotézu ($p = 0,96424$). Produkce sideroforů kmeny pocházejícími z různých lokalit, které byly kultivovány na pevném mediu GYM, není v jednotlivých lokalitách významně odlišná (viz Tab. 3).

Tab. 3: Kontingenční tabulka s počtem produkčních a neprodukčních kmenů pro kultivační medium GYM.

Lokalita	Produkce		Celkem
	ANO	NE	
bramborové pole	39	3	42
Příbram	17	2	19
Stampftal	8	1	9
Oblík	10	1	11
Celkem	74	7	81

U kmenů kultivovaných na pevném mediu GAUZE bez železa (G-Fe) byla zjištěna produkce sideroforů u všech testovaných kmenů. Ani na tomto mediu se rozdíl v produkci sideroforů v závislosti na lokalitě, ze které kmeny pocházejí, neprokázal (viz Tab. 4).

Tab. 4: Kontingenční tabulka s počtem produkčních a neprodukčních kmenů pro kultivační medium G-Fe.

Lokalita	Produkce		Celkem
	ANO	NE	
bramborové pole	21	0	21
Příbram	11	0	11
Celkem	32	0	32

5.1.2 Vliv kultivačního media na produkci sideroforů

Vliv kultivačního media na produkci sideroforů byl vyhodnocen testem Pearsonova chí-kvadrátu rozdělení, podobně jako vliv lokality. Byl testován vliv kultivačního media na produkci sideroforů u kmenů pocházejících z odlišných lokalit (bramborové pole, Příbram, Stampftal a Oblík).

U kmenů pocházejících z bramborového pole nebylo možné na 5% hladině významnosti zamítnout hypotézu ($p = 0,16732$). V produkci sideroforů kmeny pocházejícími z lokality bramborové pole kultivovanými na třech různých mediích (R2A, GYM a GAUZE bez Fe) nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl (viz Tab. 5).

Tab. 5: Kontingenční tabulka s počtem produkčních a neprodukčních kmenů pro lokalitu bramborové pole.

Medium	Produkce		Celkem
	ANO	NE	
R2A	38	6	44
GYM	39	3	42
G-Fe	21	0	21
Celkem	98	9	107

U kmenů pocházejících z lokality Příbram stejně jako u kmenů pocházejících z bramborového pole nebylo možné na 5% hladině významnosti zamítnout hypotézu ($p = 0,09931$). V produkci sideroforů kmeny pocházejícími z lokality Příbram kultivovanými na třech různých mediích (R2A, GYM a GAUZE bez Fe) nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl (viz Tab. 6).

Tab. 6: Kontingenční tabulka s počtem produkčních a neprodukčních kmenů pro lokalitu Příbram.

Medium	Produkce		Celkem
	ANO	NE	
R2A	68	21	89
GYM	17	2	19
G-Fe	11	0	11
Celkem	96	23	119

U kmenů pocházejících z lokalit Stampfal a Oblík nebylo možné na 5% hladině významnosti zamítnout hypotézu ($p = 0,33114$ a 1). V produkci sideroforů kmeny pocházejícími z lokalit Stampfal a Oblík kultivovanými na dvou různých mediích (R2A a GYM) nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl (viz Tab. 7 a 8).

Tab. 7: Kontingenční tabulka s počtem produkčních a neprodukčních kmenů pro lokalitu Stampfal.

Medium	Produkce		Celkem
	ANO	NE	
R2A	8	0	8
GYM	8	1	9
Celkem	16	1	17

Tab. 8: Kontingenční tabulka s počtem produkčních a neprodukčních kmenů pro lokalitu Oblík.

Medium	Produkce		Celkem
	ANO	NE	
R2A	10	1	11
GYM	10	1	11
Celkem	20	2	22

5.1.3 Hodnocení zón u kmenů produkujících siderofory

Variabilita velikosti a intenzity zón

Celkově, jak je patrné z Tab. 9, byla zaznamenána největší variabilita velikosti i intenzity zón u kmenů kultivovaných na pevném mediu R2A ($V = 69\%$) a nejmenší u kmenů kultivovaných na pevném mediu GAUZE bez Fe ($V = 16\%$). Na mediích R2A a GYM byla zaznamenána vysoká variabilita velikosti zón u kmenů pocházejících z lokality Příbram. Celkově největší průměrná velikost i intenzita vybělení vytvořených zón byla zaznamenána u kmenů kultivovaných na pevném mediu GAUZE-Fe (12,8 mm; 2,6) a nejmenší u kmenů kultivovaných na pevném mediu R2A (9,4 mm; 1,7).

Tab. 9: Průměrné hodnoty a variační koeficienty (V) velikostí a intenzity zón vytvořených kmeny kultivovanými na 3 mediích (R2A, GYM, GAUZE-Fe).

Medium	R2A		GYM		GAUZE-Fe	
	Průměr	V	Průměr	V	Průměr	V
Velikost zóny (mm)	9,4	68,9	10,2	53,3	12,8	16,2
Intenzita zóny	1,7	63,7	1,9	48,8	2,6	24,7

Z vybraných kmenů kultivovaných na pevném mediu R2A, které produkují siderofory, tvořily průměrně největší zóny kmeny pocházející z lokality Stampfal (11,5 mm) a nejmenší kmeny pocházející z lokality Děvín (7,7 mm) viz Tab. 10. U kmenů kultivovaných na pevném mediu R2A byla průměrně největší intenzita vyblednutí zón zaznamenána u kmenů pocházejících z lokality Merkenstein (2,1) a nejnižší u kmenů pocházejících z lokality Děvín (1). Z vybraných kmenů, které produkují siderofory, kultivovaných na mediu GYM tvořily průměrně největší zóny kmeny pocházející z lokality Příbram (12,8 mm) a nejmenší kmeny pocházející z lokality Oblík (9 mm). U kmenů kultivovaných na pevném mediu GYM byla průměrně největší intenzita vyblednutí zón zaznamenána u kmenů pocházejících z lokality bramborové pole (2,3) a nejnižší u kmenů pocházejících z lokality Merkenstein (1). U kmenů kultivovaných na mediu GAUZE-Fe byla hodnocena velikost a intenzita vyblednutí zón pouze u kmenů z lokalit bramborové pole a Příbram, kdy kmeny pocházející z lokality Příbram (14,3 mm; 2,8) vykazovaly průměrně větší velikost i intenzitu vyblednutí zón než kmeny pocházející z lokality bramborové pole (12 mm; 2,5).

Tab. 10: Průměrné hodnoty velikostí a intenzity zón vytvořených kmeny kultivovanými na 3 mediích (R2A, GYM, GAUZE-Fe) pro jednotlivé lokality.

	Medium	R2A	GYM	GAUZE-Fe
	Lokalita	Průměr	Průměr	Průměr
Velikost zóny (mm)	bramborové pole	9,5	9,5	12,0
Intenzita zóny	bramborové pole	1,8	2,3	2,5
Velikost zóny (mm)	Příbram	9,5	12,8	14,3
Intenzita zóny	Příbram	1,7	1,8	2,8
Velikost zóny (mm)	Děvín	7,7	10,7	
Intenzita zóny	Děvín	1,1	2,1	
Velikost zóny (mm)	Merkenstein	9,4	9,5	
Intenzita zóny	Merkenstein	2,1	1,0	
Velikost zóny (mm)	Stampftal	11,5	9,3	
Intenzita zóny	Stampftal	1,6	1,4	
Velikost zóny (mm)	Oblík	8,8	9,0	
Intenzita zóny	Oblík	1,6	1,5	

U kmenů kultivovaných na pevném mediu R2A, které produkují siderofory, byla zjištěna největší variabilita velikosti zón u kmenů pocházejících z lokality Příbram (variační koeficient (V) = 86 %) a největší variabilita intenzity zón u kmenů pocházejících z lokality Děvín (V = 90 %) viz Tab. 11. Nejnižší variabilita velikosti i intenzity zón byla zjištěna u kmenů

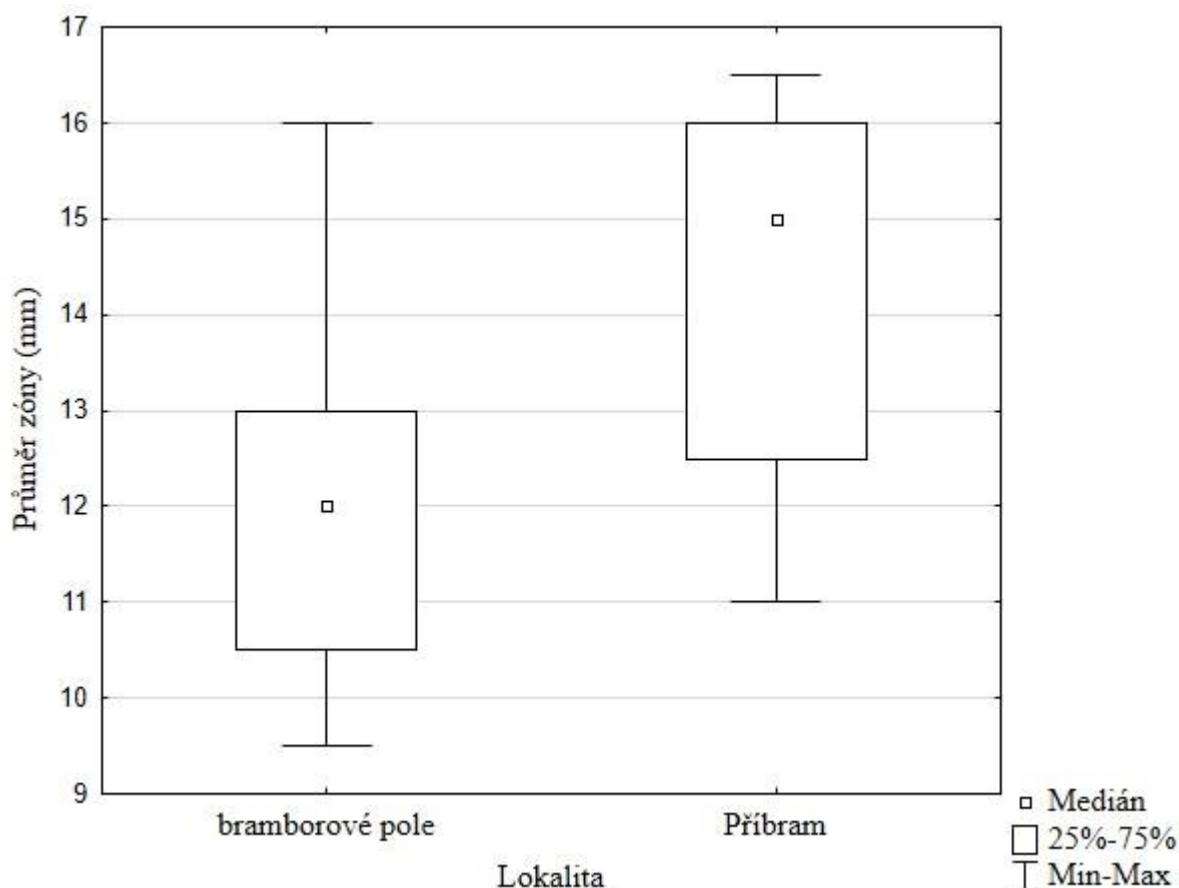
pocházejících z lokality Merkenstein ($V = 30\%$ a 42%). U kmenů, které produkují siderofory, kultivovaných na pevném mediu GYM byla zjištěna největší variabilita velikosti zón stejně jako u pevného media R2A u kmenů pocházejících z lokality Příbram ($V = 74\%$) a největší variabilita intenzity zón u kmenů pocházejících z lokality Stampfal ($V = 63\%$). Nejnižší variabilita velikosti zón byla zjištěna u kmenů pocházejících z lokality Děvín ($V = 11\%$) a nejnižší variabilita intenzity zón byla zjištěna u kmenů pocházejících z lokality bramborové pole ($V = 38\%$). U kmenů kultivovaných na mediu GAUZE-Fe byla zaznamenána větší variabilita velikosti a intenzity vyblednutí zón u kmenů pocházejících z lokality bramborové pole ($V = 14,2\%$ a $29,5\%$) než u kmenů pocházejících z lokality Příbram ($V = 13,9\%$ a $12,0\%$).

Tab. 11: Variační koeficienty (V) velikostí a intenzity zón vytvořených kmeny kultivovanými na 3 mediích (R2A, GYM, GAUZE-Fe) pro jednotlivé lokality.

	Medium	R2A	GYM	GAUZE-Fe
	Lokalita	V	V	V
Velikost zóny (mm)	bramborové pole	48,1	36,2	14,2
Intenzita zóny	bramborové pole	56,5	37,7	29,5
Velikost zóny (mm)	Příbram	85,5	74,2	13,9
Intenzita zóny	Příbram	68,2	56,0	12,0
Velikost zóny (mm)	Děvín	71,4	10,8	
Intenzita zóny	Děvín	90,1	42,1	
Velikost zóny (mm)	Merkenstein	30,5	5,3	
Intenzita zóny	Merkenstein	42,1	0,0	
Velikost zóny (mm)	Stampftal	42,1	46,3	
Intenzita zóny	Stampftal	46,6	63,5	
Velikost zóny (mm)	Oblík	33,5	34,6	
Intenzita zóny	Oblík	62,2	58,4	

Vliv lokality na velikost vytvořených zón

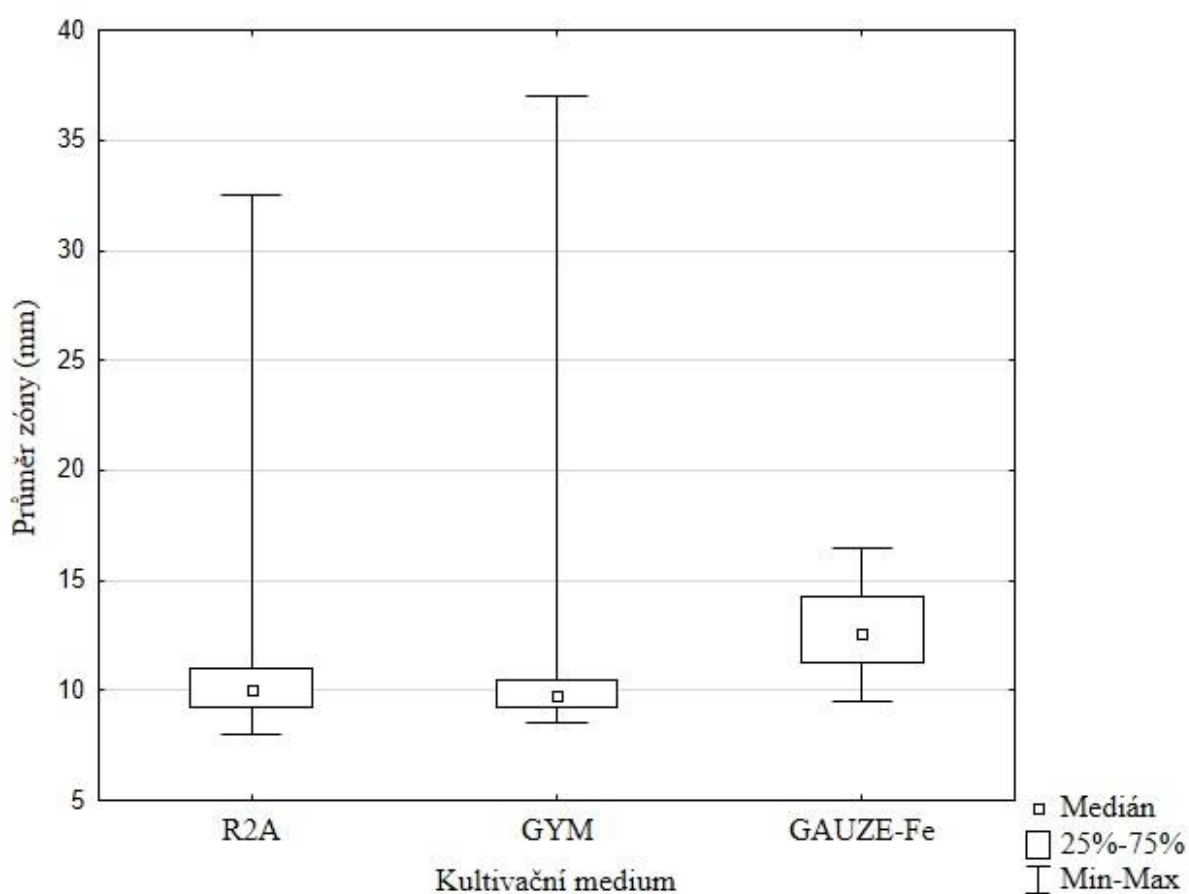
Vliv lokality původu kmenů na velikost zón vytvořených při testování produkce sideroforů byl testován pomocí Kruskal–Wallisova ANOVA. Hodnoty p byly porovnávány s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Velikost vytvořených zón byla hodnocena u 149 kmenů kultivovaných na mediu R2A. Kmeny byly rozděleny do skupin dle lokalit jejich původu (bramborové pole, Příbram, Děvín, Merkenstein, Stampftal a Oblík) a ukázalo se, že na 5% hladině významnosti nelze zamítnout hypotézu ($p = 0,3633$), tzn. velikost zón se v jednotlivých lokalitách významně neliší. Velikost vytvořených zón byla hodnocena u 74 kmenů kultivovaných na mediu GYM. Bylo zjištěno, že na 5% hladině významnosti nelze zamítnout hypotézu ($p = 0,1464$), tzn. velikosti zón se v jednotlivých lokalitách významně neliší. U kmenů kultivovaných na mediu GAUZE-Fe byla hodnocena velikost vytvořených zón u dvou lokalit (bramborové pole a Příbram), celkem u 32 kmenů, u kterých byla na 5% hladině významnosti zamítnuta hypotéza ($p = 0,0054$). U kmenu kultivovaných na mediu GAUZE-Fe byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ve velikosti zón kmenů pocházejících ze dvou lokalit (bramborové pole a Příbram) (viz Obr. 25).



Obr. 25: Porovnání velikostí vytvořených zón u dvou lokalit (bramborové pole a Příbram).

Vliv kultivačního media na velikost vytvořených zón

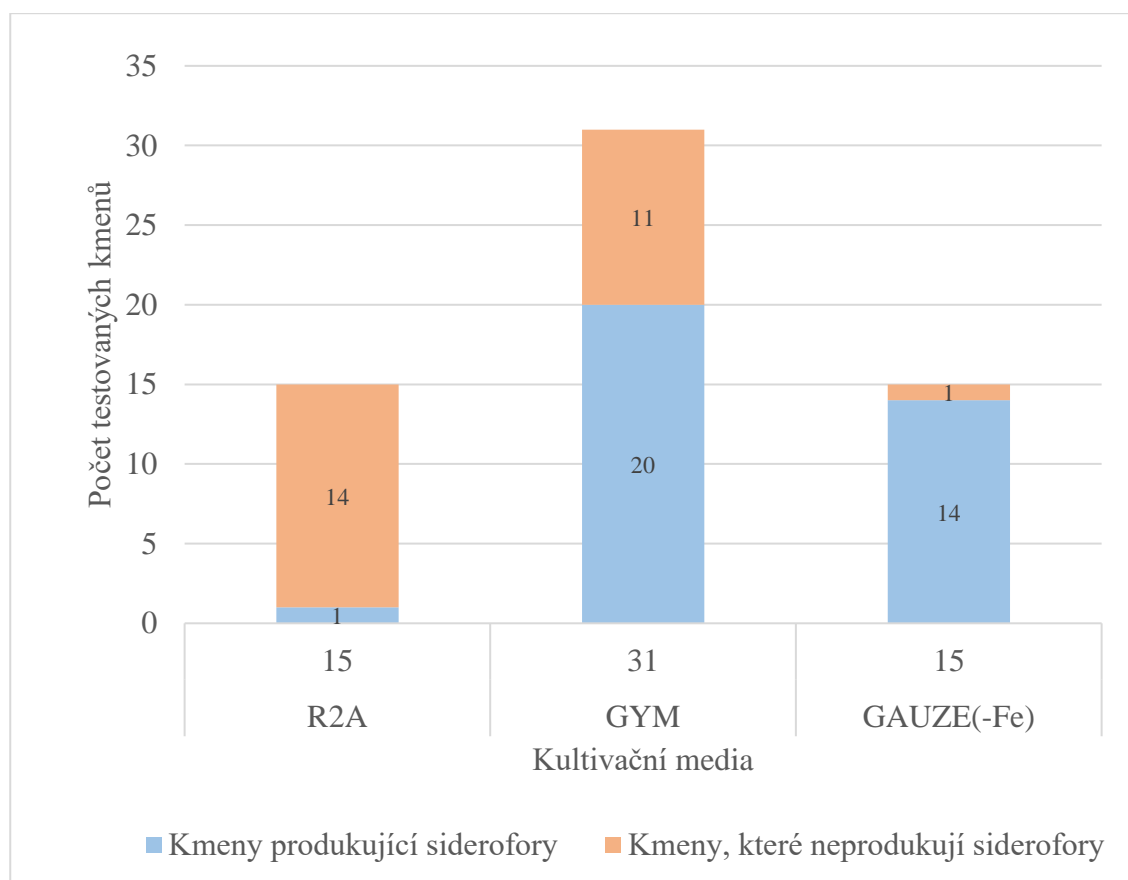
Vliv kultivačního media na velikost zón vytvořených při testování produkce sideroforů byl hodnocen pomocí testu Kruskal–Wallisova ANOVA a hodnoty p byly porovnány s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Byl hodnocen vliv tří kultivačních medií (R2A, GYM a GAUZE-Fe) na velikost vytvořených zón kmeny produkujícími siderofory. Na 5% hladině významnosti byla zamítnuta hypotéza ($p = 0,0000$). Existuje statisticky významný rozdíl mezi velikostí zón vytvořených kmeny kultivovanými na mediu R2A, GYM a GAUZE-Fe. Následně byla použita metoda mnohonásobného porovnání k rozhodnutí, která dvě media se od sebe statisticky významně liší. Bylo zjištěno, že kmeny kultivované na mediích R2A a GYM při testování produkce sideroforů vytvářely srovnatelně velké zóny, kdežto kmeny kultivované na mediu GAUZE-Fe vytvářely zóny větší což je patrné i z krabicového grafu Obr. 26.



Obr. 26: Porovnání velikostí vytvořených zón při kultivaci kmenů produkujících siderofory na různých kultivačních mediích (R2A, GYM, GAUZE-Fe).

5.2 Hodnocení produkce sideroforů v tekutých mediích

Přítomnost sideroforů v tekutých mediích byla zjišťována především pro účely výběru vhodných vzorků pro přípravu extraktů, které byly dále analyzovány. Byla použita tekutá kultivační media R2A, GYM a GAUZE bez Fe viz Přílohy 7, 8 a 9. Celkem bylo na produkci sideroforů otestováno 15 kmenů kultivovaných v tekutém mediu R2A a pouze jeden kmen produkoval siderofory. Kmenů kultivovaných v tekutém mediu GYM bylo otestováno 31 z toho 20 (67 % z celkového počtu) kmenů siderofory produkovalo a 11 neprodukovalo. Z patnácti kmenů kultivovaných v tekutém mediu GAUZE bez Fe siderofory produkovalo 14 kmenů (viz Obr. 27). Z výsledků vyplývá, že nejvíce produkovaly siderofory kmeny, které byly kultivovány v tekutém mediu GAUZE bez Fe.



Obr. 27: Celkový počet otestovaných kmenů v jednotlivých tekutých mediích a rozdělení kmenů na produkční a neprodukční.

5.2.1 Vliv tekutého kultivačního media na produkci sideroforů

Vliv tekutého kultivačního media na produkci sideroforů byl vyhodnocen testem Pearsonova chí-kvadrátu rozdělení. Byl hodnocen vliv kultivačního media na produkci sideroforů vybranými kmeny kultivovanými v tekutém mediu. V případě produkce sideroforů kmeny kultivovanými v tekutých mediích byla na 5% hladině významnosti zamítnuta hypotéza protože vypočítaná hodnota $p(0,00001) < 0,05$. Produkce sideroforů kmeny kultivovanými v tekutých mediích je ovlivněna druhem kultivačního media (viz Tab. 12).

Tab.12: Kontingenční tabulka s počtem produkčních a neprodukčních kmenů na jednotlivých mediích.

Medium	Produkce		Celkem
	ANO	NE	
R2A	1	13	14
GYM	20	10	30
GAUZE-Fe	14	1	15
Celkem	35	24	59

5.3 Vyhodnocení výsledků LC-MS

Chromatogramy získané pomocí LC-MS (viz Analýza extraktů kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (LC-MS)) byly dále analyzovány v programu MassLynx V4.1 byly hodnoceny podle základního píku a při spektru 435 nm. Celkem bylo na LC-MS hodnoceno 37 extraktů a byla zjišťována přítomnost sideroforů u 16 kmenů kultivovaných v 3 tekutých mediích (R2A, GYM a GAUZE-Fe). U 10 extraktů nebyly identifikovány žádné sloučeniny podobné sideroforům a u 27 extraktů byly zaznamenány sloučeniny odpovídající desferrioxaminovým a ferrioxaminovým sideroforům, acyl-desferrioxaminům a acyl-ferrioxaminům, kyselině aspergillové, acinetoferrinu, pyridin-2,6-bis (kyselině thiokarboxylové), rhizobactinu, siderochelinu, pyridoxatinu a salmochelinu.

Celkem byla zjištěna přítomnost sideroforů v extraktech z 6 kmenů pocházejících z lokality bramborové pole. Byly zaznamenány především sloučeniny odpovídající desferrioxaminovým a ferrioxaminovým sideroforům a kyselině aspergillové viz Příloha 10. U kmenu 09VK61 bylo zaznamenáno 10 sideroforů. Při kultivaci kmenu 09VK61 v tekutém mediu GYM byla zjištěna produkce 5 desferrioxaminových sideroforů a 1 ferrioxaminového sideroforu. Byl nalezen desferrioxamin B, D1, D2, E, H a ferrioxamin D2 viz Příloha 11. Při kultivaci kmenu 09VK61 v tekutém mediu GAUZE-Fe byla zjištěna produkce 5 desferrioxaminových sideroforů (desferrioxamin A1, B, D1, D2 a E) viz Příloha 12. Po přidavku železa do tekutého media před SPE extrakcí byla zjištěna u kmenu 09VK61 kultivaného v tekutém mediu GAUZE-Fe produkce 1 desferrioxaminového sideroforu (desferrioxaminu H) a 2 ferrioxaminových sideroforů (ferrioxaminu D2 a E), byla také zjištěna přítomnost acyl-ferrioxaminu 1 a 3 viz Příloha 13.

Celkem byla zjištěna přítomnost sideroforů v extraktech z 6 kmenů pocházejících z lokality Příbram. Byly zaznamenány sloučeniny odpovídající desferrioxaminovým a ferrioxaminovým sideroforům, kyselině aspergillové a dalším sideroforům viz Příloha 14. U kmenu 10PL107E bylo zaznamenáno velké množství sloučenin odpovídající sideroforům. Při kultivaci kmenu 10PL107E v tekutém mediu GYM byla zjištěna produkce 5 desferrioxaminových sideroforů (desferrioxamin A1, B, D2, E a H) a 2 ferrioxaminových sideroforů (ferrioxamin A1 a B), dále byla zaznamenána přítomnost acyl-desferrioxaminu 1 a 2, acyl-ferrioxaminu 1 a kyseliny aspergillové viz Příloha 15. Při kultivaci kmenu 10PL107E v tekutém mediu GAUZE-Fe byla zaznamenána produkce pouze desferrioxaminových sideroforů (desferrioxamin A1, B, D1, D2 a E) viz Příloha 16.

Byla zjištěna přítomnost sideroforů v extraktech ze 2 kmenů pocházejících z lokality Děvín a ze 2 kmenů z lokality Stampftal. Kmeny pocházející z těchto dvou lokalit produkovaly sloučeniny odpovídající desferrioxaminovým a ferrioxaminovým sideroforům a kyselině aspergillové viz Přílohy 17 a 18. U kmenu 05DE515b, pocházejícího z lokality Děvín, kultivaného v tekutém mediu GYM byla zjištěna produkce desferrioxaminu E a také byla zjištěna přítomnost jeho analogu s železem ferrioxaminu E viz Příloha 19. Při kultivaci kmenu 05DE515b v tekutém mediu GAUZE-Fe byla kromě produkce desferrioxaminu a ferrioxaminu E navíc zjištěna produkce desferrioxaminu D2 viz Příloha 20.

6 Diskuze

6.1 Vliv lokality a kultivačního media na produkci sideroforů

Při statistickém vyhodnocení bylo zjištěno, že produkce sideroforů kmeny, které byly kultivovány na třech různých pevných mediích (R2A, GYM a GAUZE-Fe), není ovlivněna lokalitou jejich původu. V diplomové práci bylo zjištěno, že produkce sideroforů kmeny pocházejícími z odlišných lokalit není ovlivněna pevným kultivačním mediem. Ačkoliv nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v produkci sideroforů kmeny kultivovanými na různých pevných mediích z výsledků je patrné, že kultivace na mediu s deficitem živin a železa (GAUZE-Fe) zajistila produkci sideroforů u největšího počtu kmenů. Je známo, že siderofory jsou produkovány při deficitu železa (Hider & Kong 2010; Tank et al. 2012). U kmenů kultivovaných na mediu GAUZE-Fe byl zjištěn vliv lokality původu na velikost vytvořených zón, jelikož byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ve velikosti zón vytvořených během testování produkce sideroforů u kmenů pocházejících z různých lokalit. Také bylo zjištěno, že kmeny kultivované na mediu GAUZE-Fe vytvářely zóny větší než kmeny kultivované na mediích R2A a GYM, což mohlo být následkem deficitu živin v Gauseho kultivačním mediu.

Produkce sideroforů kmeny kultivovanými v tekutých mediích byla ovlivněna druhem kultivačního media. Nejvyšší produkce sideroforů byla zaznamenána při kultivaci v tekutém mediu GAUZE-Fe (tj. medium s deficitem živin) a nejnižší v mediu R2A, což mohlo být způsobeno nedostatečným růstem kolonií aktinobakterií v tomto mediu.

6.2 Dostupnost železa vázaného v sideroforech pro rostliny

Ačkoliv je železo v půdě hojně zastoupeno může dojít k jeho deficitu a to především z důvodu, že je vázané v těžko rozpustných sloučeninách (Colombo et al. 2014). K mobilizaci železa dochází především v anaerobních a kyselých podmínkách (Colombo et al. 2014), tzn. že při neutrálním (fyziologickém) pH, které je příznivé pro většinu půdních organismů není železo dostupné. Proto si mikroorganismy, houby a rostliny vyvinuly strategie k jeho získání, příkladem je produkce sideroforů (Paul & Dubey 2015) sloučenin s vysokou afinitou k železu. Siderofory mobilizují železo konkurenční komplexací nebo rozpouštěním minerálů obsahujících železo. Po vytvoření komplexu siderofor–železo dochází k rozpoznávání a absorpci komplexů do buňky pomocí vysoce účinných transportních systémů nebo uvolňováním železa z komplexu sideroforu a následnou absorpcí železa buňkou. Některé siderofory jsou po absorpci železa vyloučeny z buňky do půdního roztoku a stávají se přijatelnými pro rostliny (Kraemer 2004). Tank et al. (2012) uvádí, že siderofory zachycují dostupné železité ionty kolem kořenů a vyvolávají tím reakci vedoucí k podpoře růstu rostlin. Siderofory ovlivňují růst a odolnost rostlin zvyšováním obsahu dostupného železa pro rostliny (Indiragandhi et al. 2008; Radzki et al. 2013).

6.3 Kontrola strupovitosti brambor

Streptomycety způsobující strupovitost brambor (*S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. turgidiscabies* a *S. ipomoeae*) jsou široce rozšířeny po celém světě, kde jsou pěstovány brambory (Tarkowski & Vereecke 2014). Patogenní kmeny *S. turgidiscabies* a *S. acidiscabies* tolerují nižší pH než *S. scabies*, proto mají potenciál způsobovat strupovitost brambor v kyselých půdách (Aittamaa et al. 2010; Barrera et al. 2013; Alejo et al. 2019). Potlačení strupovitosti brambor je komplikované, protože vývoj choroby je ovlivňován mnoha faktory. Na vznik a průběh onemocnění má vliv odolnost pěstované odrůdy brambor, půdní a klimatické podmínky stanoviště a agrotechnické zásahy. Tradiční strategie potlačení příznaků strupovitosti brambor, jako je zavlažování a snížení pH půdy, nejsou dostatečné a často selhávají. Tyto úpravy podmínek prostředí mohou být příčinou rozvoje dalších chorob (Dees & Wanner 2012). Jednou ze strategií potlačení strupovitosti brambor je šlechtění brambor odolných vůči chorobám, ale doposud nebyl nalezen dostupný komerční kultivar brambor, který by byl zcela odolný vůči strupovitosti (Tarkowski & Vereecke 2014). Je známo, že na lehčích půdách a s pH vyšším než 5,5 je výskyt strupovitosti brambor častější (Hausvater et al. 2016). Také bylo zaznamenáno, že výraznější projevy strupovitosti brambor se vyskytují v půdách s vyšším obsahem prvků jako je uhlík, dusík, vápník a železo (Sagova-Mareckova et al. 2015). Irabi et al. (2017) uvádí, že použití čtyřdenního zavlažovacího intervalu a aplikace hnojiv obsahujících síru, významně snížilo vývoj strupovitosti brambor. Wang et al. (2019) zjistili, že přidavek mikrobiálního produktu, složeného ze kmenů *Bacillus subtilis* a *Trichoderma harzianum*, potlačil strupovitost brambor a zvýšil výnos hlíz tím, že podporoval výskyt prospěšných bakterií v rhizosféře brambor. Výsledky, které publikovali Han et al. (2005) prokazují, že *Bacillus* sp. sunhua lze použít jako možnost kontroly strupovitosti brambor. Zjistili také, že sloučeniny jako je makrolaktin A a iturin A inhibují *S. scabiei*, tyto sloučeniny nebyly v extraktech analyzovaných v diplomové práci nalezeny. Jako možná strategie se jeví aplikace, či podpora rozvoje bakteriálních kmenů produkujících sloučeniny chelatuující železo se silnější afinitou k železu, než mají sloučeniny, které produkují patogenní kmeny. Protože nedostatek dostupného železa v půdě může inhibovat rostlinné patogeny a snížit jejich konkurenceschopnost (Tank et al. 2012).

6.4 Zjištěné siderofory

Ve všech sledovaných lokalitách (bramborové pole, Příbram, Děvín a Stampftal) byly nalezeny podobné sloučeniny (desferrioxamin a ferrioxamin B a E a kyselina aspergillová), v lokalitě bramborové pole (Vyklantice a Ždírec) byly navíc nalezeny další sloučeniny např. desferrioxamin D1, D2, H a ferrioxamin D2 viz Příloha 10. Siderofory desferrioxamin B a E jsou produkovány některými patogenními druhy bakterií například *Streptomyces acidiscabies* (Dimkpa et al. 2008). Kyselina aspergillová je produkována rodem *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. sclerotiorum*) (Bertrand 2010). White & Hill (1943) uvádí, že kyselina aspergillová vykazuje antibakteriální aktivitu proti určitým gramnegativním i grampozitivním bakteriím a má relativně vysokou toxicitu. Ačkoliv Kontoghiorghes & Kolnagou (2005) označují kyselinu aspergillovou jako přirozeně se vyskytující chelátor železa s velmi silnými vazebnými

vlastnostmi Nurchi et al. (2009) naopak uvádějí, že kyselinu aspergillovou nelze klasifikovat jako chelátor železa.

Z výsledků diplomové práce lze usoudit, že kmeny pocházející z lokalit, kde jsou pěstovány brambory, produkují podobné sloučeniny jako patogenní bakterie způsobující strupovitost brambor. Tyto kmeny by mohly ovlivňovat strupovitost brambor tím, že budou konkurovat patogenním bakteriálním kmenům v boji o železo (Beneduzi et al. 2012), což potvrzují Ilyas & Bano (2012) kteří uvádí, že bakterie produkující siderofory zpomalují růst patogenů a tím, že budou zvyšovat obsah dostupného železa pro rostliny (Radzki et al. 2013).

7 Závěr

- V diplomové práci byla hodnocena produkce sideroforů vybranými kmeny aktinobakterií. Lze potvrdit H1 „Testované půdní bakteriální kmeny, pocházející z různých lokalit, produkují siderofory“, protože průměrně 91 % kmenů kultivovaných na pevných mediích produkovalo siderofory bez ohledu na to, z jaké lokality pocházely. U kmenů kultivovaných na pevném mediu nelze potvrdit H2 „Produkce sideroforů je ovlivněna lokalitou původu bakteriálních kmenů“ ani H3 „Produkce sideroforů je ovlivněna použitým kultivačním mediem“, protože nebyl zaznamenán statisticky významný vliv lokality původu kmenů ani kultivačního media na produkci sideroforů. Ačkoliv nebyl zjištěn vliv lokality původu kmenů a kultivačního media na produkci sideroforů u kmenů kultivovaných na pevném mediu, H3 byla potvrzena při kultivaci v tekutém mediu tzn. vliv kultivačního media na produkci sideroforů byl potvrzen. Nejvyšší produkce sideroforů byla zaznamenána u kmenů kultivovaných v tekutém Gauseho mediu ochuzeném o železo (GAUZE-Fe), proto se toto medium doporučuje pro další výzkum produkce sideroforů aktinobakteriemi.
- Siderofory zvyšují obsah dostupného železa v půdě a tím ovlivňují růst a odolnost rostlin, protože některé siderofory jsou po absorpci železa do bakteriální buňky vyloučeny do půdního roztoku a stávají se přijatelnými pro rostliny. Aplikace určitých sideroforů by mohla zajistit dostatek železa pro rostliny. Vzhledem k tomu, že chemikálie používané v zemědělství (např. pesticidy a fungicidy) mohou být nebezpečné, jsou siderofory považovány za ekologicky bezpečnější alternativu pro ochranu rostlin, protože dostupnost kovů a zvláště železa, ovlivňuje náchylnost k onemocnění.
- Zásadnější rolí sideroforů se jeví jejich potenciál konkurovat svou přítomností v boji o železo, které potřebují některé patogenní organismy pro svůj vývoj a vyvolání onemocnění. Bylo zjištěno, že kmeny způsobující strupovitost brambor produkují siderofory, což jim umožňuje získat železo. Tato informace byla potvrzena v diplomové práci testováním produkce sideroforů sbírkovými patogenními kmeny streptomycet. Kmeny nepatogenních aktinobakterií produkující siderofory, které tvoří stabilnější komplexy se železem, než vytvářejí kmeny patogenní, mohou být využity ke konkurenčnímu boji o tento prvek a tím i nepřímo k regulaci vývoje a růstu patogena. Spolupůsobení antibakteriální aktivity a konkurence o železo lze považovat za slibnou strategii v boji proti patogenům rostlin, které negativně působí na kvalitu a kvantitu pěstovaných plodin. Je třeba dále studovat vlastnosti jednotlivých sideroforů a dalších organických sloučenin produkovaných bakteriálními kmeny přirozeně se vyskytujícími v půdě.

8 Literatura

- Ahmed E, Holmström SJM. 2014a. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology* **7**:196-208.
- Ahmed E, Holmström SJM. 2014b. The effect of soil horizon and mineral type on the distribution of siderophores in soil. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **131**:184-195.
- Ahmed E, Holmström SJM. 2015. Siderophore Production by Microorganisms Isolated From a Podzol Soil Profile. *Geomicrobiology Journal* **32**:397-411.
- Aittamaa M, Somervuo P, Laakso I, Auvinen P, Valkonen JPT. 2010. Microarray-based comparison of genetic differences between strains of *Streptomyces turgidiscabies* with focus on the pathogenicity island. *Molecular Plant Pathology* **11**:733-746.
- Alejo A, Burgueño E, Maldonado LA, Herrera G, Felix R, Quintana ET. 2019. In vitro effect of the crude extract of a potato common scab streptomycete in Sinaloa, Mexico. *Revista Argentina de Microbiologia* **51**:363-370.
- Amaresan N, Jayakumar V, Thajuddin N. 2014. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annum*) grown in coastal agricultural ecosystem. *Indian Journal of Biotechnology (IJBT)* **13**:247-255.
- Amaresan N, Kumar K, Naik JH, Bapatla KG, Mishra RK. 2018. *Streptomyces* in Plant Growth Promotion: Mechanisms and Role. Pages 125-135 in Singh BP, Gupta VK, Passari AK editors. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications*. Elsevier, India.
- Andrade-Eiroa A, Canle M, Leroy-Cancellieri V, Cerdà V. 2016. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *Trends in Analytical Chemistry* **80**:641-654.
- Barrera VA, Kageyama K, Rojo RA, Gasoni L, Kobayashi K. 2013. A species-specific method for detecting pathogenic *Streptomyces* species from soil and potato tubers in Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia* **45**:277-281.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* **35**:1044-1051.
- Bentley SD, et al. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**:141-147.
- Bertrand S. 2010. The web data base of microbial siderophores. Available from http://bertrandsamuel.free.fr/siderophore_base/siderophores.php (accessed May 2020).

Braud A, Jézéquel K, Bazot S, Lebeau T. 2009. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* **74**:280-286.

Cao Y, Zhang X, Deng J, Zhao Q, Xu H. 2012. Lead and cadmium-induced oxidative stress impacting mycelial growth of *Oudemansiella radicata* in liquid medium alleviated by microbial siderophores. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**:1727-1737.

Coleman DC, Callaham MA, Crossley DA. 2018. *Fundamentals of Soil Ecology* 3rd Edition. Academic Press, London.

Coleman DC, Crossley DA, Hendrix PF. 2004. *Fundamentals of Soil Ecology* 2nd Edition. Academic Press, London.

Colombo C, Palumbo G, He JZ, Pinton R, Cesco S. 2014. Review on iron availability in soil: Interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments* **14**:538-548.

Das A, Prasad R, Srivastava A, Giang PH, Bhatnagar K, Varma A. 2007. Fungal Siderophores: Structure, Functions and Regulation. *Microbial Siderophores* **12**:1-42.

David SR, Ihiwakrim D, Regis R, Geoffroy VA. 2019. Iron removal from raw asbestos by siderophores-producing *Pseudomonas*. *Journal of Hazardous Materials* **385**.

Dees MW, Wanner LA. 2012. In Search of Better Management of Potato Common Scab. *Potato Research* **55**:249-268.

Dimkpa CO, Merten D, Svatoš A, Büchel G, Kothe E. 2009. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology and Biochemistry* **41**:154-162.

Dimkpa C, Svatoš A, Merten D, Büchel G, Kothe E. 2008. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Canadian Journal of Microbiology* **54**:163-172.

Essén SA, Johnsson A, Bylund D, Pedersen K, Lundström US. 2007. Siderophore production by *Pseudomonas stutzeri* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:5857-5864.

Feistner GJ, Stahl DC, Gabrik AH. 1993. Proferrioxamine siderophores of *Erwinia amylovora*. A capillary liquid chromatographic/electrospray tandem mass spectrometric study. *Organic Mass Spectrometry* **28**:163-175.

- Fernández V, Winkelmann G. 2005. The determination of ferric iron in plants by HPLC using the microbial iron chelator desferrioxamine E. *BioMetals* **18**:53-62.
- Ferreira MJ, Silva H, Cunha A. 2019. Siderophore-Producing Rhizobacteria as a Promising Tool for Empowering Plants to Cope with Iron Limitation in Saline Soils: A Review. *Pedosphere* **29**:409-420.
- Fiedler HP, Krastel P, Müller J, Gebhardt K, Zeeck A. 2001. Enterobactin: The characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by Streptomyces species. *FEMS Microbiology Letters* **196**:147-151.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2015. Revised world soil charter. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/3/a-i4965e.pdf> (accessed September 2019).
- Francis J, Macturk HM, Madinaveitia J, Snow GA. 1953. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. *The Biochemical Journal* **55**:596-607.
- Friesen ML, Porter SS, Stark SC, von Wettberg EJ, Sachs JL, Martinez-Romero E. 2011. Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **42**:23-46.
- Ghosh SK, Bera T, Chakrabarty AM. 2020. Microbial siderophore – A boon to agricultural sciences. *Biological Control* **144**.
- Gómez-Sagasti MT, Alkorta I, Becerril JM, Epelde L, Anza M, Garbisu C. 2012. Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. *Water, Air, and Soil Pollution* **223**:3249-3262.
- Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, Sathya A, Vijayabharathi R, Rupela O, Kudapa H, Katta K, Varshney RK. 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research* **169**:40-48.
- Górska A, Sloderbach A, Marszał, M. P. 2014. Siderophore-drug complexes: Potential medicinal applications of the “Trojan horse” strategy. *Trends in Pharmacological Sciences* **35**:442-449.
- Guerinot ML. 1994. Microbial Iron Transport. *Annual Review of Microbiology* **48**:743-772.
- Han JS, Cheng JH, Yoon TM, Song J, Rajkarnikar A, Kim WG, Yoo ID, Yang YY, Suh JW. 2005. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. *sunhua*. *Journal of Applied Microbiology* **99**:213-221.

Hausvater IE, Doležal IP, Baštová IP. 2016. AKTINOBAKTERIÁLNÍ OBEČNÁ STRUPOVITOST BRAMBORU. Výzkumný Ústav Bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o. a Poradenský Svaz „Bramborářský Kroužek“, Havlíčkův Brod.

Hider RC, Kong X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* **27**:637-657.

Hider RC, Kong XL. 2015. Chemistry and Biology of Siderophores - List of Siderophore Structures.

Hu X, Page MT, Sumida A, Tanaka A, Terry MJ, Tanaka R. 2016. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology* **38**:42-49.

Ilyas N, Bano A. 2012. Potential Use of Soil Microbial Community in Agriculture. Pages 45-64 in Maheshwari DK editor. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Springer-Verlag, Berlin.

Imbert M, Béchet M, Blondeau R. 1995. Comparison of the main siderophores produced by some species of *Streptomyces*. *Current Microbiology* **31**:129-133.

Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Sa TM. 2008. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of Diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology* **56**:327-333.

Irabi A, Elhassan S, Abubaker M, Ali A. 2017. Effect of Sulphur and Irrigation Regimes on Potato Common Scab Development in Khartoum Area. *Asian Research Journal of Agriculture* **3**:1-10.

Itoh T, Yamanoi K, Kudo T, Ohkuma M, Takashina T. 2011. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**:1281-1285.

Jalilian J, Modarres-Sanavy SAM, Saberli SF, Sadat-Asilan K. 2012. Effects of the combination of beneficial microbes and nitrogen on sunflower seed yields and seed quality traits under different irrigation regimes. *Field Crops Research* **127**:26-34.

Jellison J, Chandhoke V, Goodell B, Fekete FA. 1991. The isolation and immunolocalization of iron-binding compounds produced by *Gloeophyllum trabeum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **35**:805-809.

- Jones RM, Johnson DB. 2015. *Acidithrix ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.; a filamentous and obligately heterotrophic, acidophilic member of the Actinobacteria that catalyzes dissimilatory oxido-reduction of iron. *Research in Microbiology* **166**:111-120.
- Khan A, Singh P, Srivastava A. 2018. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research* **212-213**:103-111.
- King RR, Lawrence CH, Clark MC. 1991. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *American Potato Journal* **68**:675-680.
- Kontoghiorghes G, Kolnagou A. 2005. Molecular Factors and Mechanisms Affecting Iron and Other Metal Excretion or Absorption in Health and Disease. The Role of Natural and Synthetic Chelators. *Current Medicinal Chemistry* **12**:2695-2709.
- Kraemer SM. 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic Sciences* **66**:3-18.
- Leibniz Institute DSMZ. 2007. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. Available from <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/culture-technology/list-of-media-for-microorganisms> (accessed May 2019).
- Lerat S, Simao-Beaunoir AM, Beaulieu C. 2009. Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* **10**:579-585.
- Lin C, Tsai CH, Chen PY, Wu CY, Chang YL, Yang YL, Chen YL. 2018. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01. *PLoS ONE* **13**:1-17.
- Lindsay WL. 1995. Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach. *Iron Nutrition in Soils and Plants* 7-14.
- Loria R, Coombs J, Yoshida M, Kers J, Bukhalid R. 2003. A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**:65-72.
- Louden BC, Haarmann D, Lynne AM. 2011. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education* **12**:51-53.
- Lu S, Gischkat S, Reiche M, Akob DM, Hallberg KB, Küsel K. 2010. Ecophysiology of Fe-cycling bacteria in acidic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:8174-8183.
- Lucena JJ. 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review. *Journal of Plant Nutrition* **23**:1591-1606.

Malloch DW, Pirozynskit KA, Ravent PH. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). *Ecology* **77**:2113-2118.

Marathe R, Phatake Y, Sonawane A. 2015. Bioprospecting of *Pseudomonas aeruginosa* for their potential to produce siderophore: process optimization and evaluation of its bioactivity. *International Journal of Bioassays* **4**:3667-3675.

Neilands JB. 1952. A Crystalline Organo-Iron Pigment from a Rust Fungus (*Ustilago sphaerogena*). *Journal of the American Chemical Society* **74**:4846-4847.

Neubauer U, Furrer G, Kayser A, Schulin R. 2000. Siderophores, NTA, and citrate: Potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **2**:353-368.

Nosrati R, Dehghani S, Karimi B, Yousefi M, Taghdisi SM, Abnous K, Alibolandi M, Ramezani M. 2018. Siderophore-based biosensors and nanosensors; new approach on the development of diagnostic systems. *Biosensors and Bioelectronics* **117**:1-14.

Nurchi VM, Crisponi G, Pivetta T, Tramontano E, Marincola FC, Lachowicz JI. 2009. Interaction between aspergillitic acid and iron(III): A potentiometric, UV-Vis, ¹H NMR and quantum chemical study. *Polyhedron* **28**:763-768.

Passari AK, Mishra VK, Leo VV, Gupta VK, Singh BP. 2016. Phytohormone production endowed with antagonistic potential and plant growth promoting abilities of culturable endophytic bacteria isolated from *Clerodendrum colebrookianum* Walp. *Microbiological Research* **193**:57-73.

Paul A, Dubey R. 2015. Characterization of Protein Involved in Nitrogen Fixation and Estimation of Co-Factor. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology* **2**:89-97.

Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods* **70**:127-131.

Pluháček T, Lemr K, Ghosh D, Milde D, Novák J, Havlíček V. 2016. CHARACTERIZATION OF MICROBIAL SIDEROPHORES BY MASS SPECTROMETRY. *Mass Spectrometry Reviews* **35**:35-47.

Procópio RE, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **16**:466-471.

Puig S, Ramos-Alonso L, Romero AM, Martínez-Pastor MT. 2017. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics* **9**:1483-1500.

- Radzki W, Gutierrez Mañero FJ, Algar E, Lucas García JA, García-Villaraco A, Ramos Solano B. 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **104**:321-330.
- Raines DJ, Sanderson T, Wilde E, Duhme-Klair A-K. 2015. Siderophores. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier.
- Raymond KN, Dertz EA, Kim SS. 2003. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:3584-3588.
- Řezanka T, Palyzová A, Faltýsková H, Sigler K. 2018. Siderophores: Amazing Metabolites of Microorganisms. *Studies in Natural Products Chemistry* **60**:157-188.
- Sagova-Mareckova M, Daniel O, Omelka M, Kristufek V, Divis J, Kopecky J. 2015. Determination of factors associated with natural soil suppressivity to potato common scab. *PLoS ONE* **10**:1-13.
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S, Tribedi P. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research* **23**:3984-3999.
- Saharan BS, Nehra V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* **2011**:1-30.
- Sapp J. 2004. The dynamics of symbiosis: An historical overview. *Canadian Journal of Botany* **82**:1046-1056.
- Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* **160**:47-56.
- Seipke RF, Kaltenpoth M, Hutchings MI. 2012. *Streptomyces* as symbionts: An emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Reviews* **36**:862-876.
- Sharma A, Gautam S, Saxena S. 2014. *Streptomyces*. Pages 560-566 in Batt CA, Tortorello M-L editors. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Elsevier.
- Sposito G. 2008. *The Chemistry of Soils: Second Edition*. Oxford University Press, New York.
- Tang J, Zhang J, Ren L, Zhou Y, Gao J, Luo L, Yang Y, Peng Q, Huang H, Chen A. 2019. Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. *Journal of Environmental Management* **242**:121-130.

- Tank N, Rajendran N, Patel B, Saraf M. 2012. Evaluation and biochemical characterization of a distinctive pyoverdinin from a *Pseudomonas* isolated from chickpea rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**:639-648.
- Tarkowski P, Vereecke D. 2014. Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances* **32**:215-229.
- Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ. 2002. Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* **68**:2161-2171.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**:495-548.
- Wang Z, Li Y, Zhuang L, Yu Y, Liu J, Zhang L, Gao Z, Wu Y, Gao W, Ding G-C, Wang Q. 2019. A Rhizosphere-Derived Consortium of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* Suppresses Common Scab of Potato and Increases Yield. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **17**:645-653.
- White EC, Hill JH. 1943. Studies on Antibacterial Products Formed by Molds: I. Aspergillinic Acid, a Product of a Strain of *Aspergillus Flavus*. *Journal of Bacteriology* 433-443.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *The National Academy of Sciences* **95**:6578-6583.
- Winkelmann G. 2002. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society Transactions* **30**:691-696.
- Winter M. 1993. WebElements. The University of Sheffield. Available from <https://www.webelements.com/iron/> (accessed February 2020).
- Wu B, Amelung W, Xing Y, Bol R, Berns AE. 2019. Iron cycling and isotope fractionation in terrestrial ecosystems. *Earth-Science Reviews* **190**:323-352.
- Yoneyama F, Yamamoto M, Hashimoto W, Murata K. 2011. *Azotobacter vinelandii* gene clusters for two types of peptidic and catechol siderophores produced in response to molybdenum. *Journal of Applied Microbiology* **111**:932-938.
- Zhang L, Zeng Q, Liu X, Chen P, Guo X, Ma LZ, Dong H, Huang Y. 2019. Iron reduction by diverse actinobacteria under oxic and pH-neutral conditions and the formation of secondary minerals. *Chemical Geology* **525**:390-399.

9 Přílohy

Seznam příloh

- Příloha 1: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných na pevném mediu R2A a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.
- Příloha 2: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných na pevném mediu GYM a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.
- Příloha 3: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných na pevném mediu GAUZE-Fe a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.
- Příloha 4: Celkový počet otestovaných kmenů z jednotlivých lokalit kultivovaných na pevném mediu R2A a rozdělení kmenů na produkční a neprodukční.
- Příloha 5: Celkový počet otestovaných kmenů z jednotlivých lokalit kultivovaných na pevném mediu GYM a rozdělení kmenů na produkční a neprodukční.
- Příloha 6: Celkový počet otestovaných kmenů z jednotlivých lokalit kultivovaných na pevném mediu GAUZE-Fe a rozdělení kmenů na produkční a neprodukční.
- Příloha 7: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných v tekutém mediu R2A a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.
- Příloha 8: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných v tekutém mediu GYM a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.
- Příloha 9: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných v tekutém mediu GAUZE-Fe a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.
- Příloha 10: Zjištěné siderofory produkované kmene pocházejícími z lokality bramborové pole.
- Příloha 11: Chromatogram z LC-MS pro kmen 09VK61 kultivovaný v mediu GYM a vyznačení zjištěných sloučenin.
- Příloha 12: Chromatogram z LC-MS pro kmen 09VK61 kultivovaný v mediu GAUZE-Fe a vyznačení zjištěných sloučenin.
- Příloha 13: Chromatogram z LC-MS pro kmen 09VK61 kultivovaný v mediu GAUZE-Fe s přídatkem železa a vyznačení zjištěných sloučenin.
- Příloha 14: Zjištěné siderofory produkované kmene pocházejícími z lokality Příbram.
- Příloha 15: Chromatogram z LC-MS pro kmen 10PL107E kultivovaný v mediu GYM a vyznačení zjištěných sloučenin.
- Příloha 16: Chromatogram z LC-MS pro kmen 10PL107E kultivovaný v mediu GAUZE-Fe a vyznačení zjištěných sloučenin.
- Příloha 17: Zjištěné siderofory produkované kmene pocházejícími z lokality Děvín.
- Příloha 18: Zjištěné siderofory produkované kmene pocházejícími z lokality Stampfal.
- Příloha 19: Chromatogram z LC-MS pro kmen 05DE515b kultivovaný v mediu GYM a vyznačení zjištěných sloučenin.
- Příloha 20: Chromatogram z LC-MS pro kmen 05DE515b kultivovaný v mediu GAUZE-Fe a vyznačení zjištěných sloučenin.

Příloha 1: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných na pevném mediu R2A a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.

Lokalita	Sbírkové kmeny	bramborové pole		Příbram				Děvín	Merkenstein	Stampftal	Oblík
Označení kmene	<i>Streptomyces coelicolor</i>	09VK6	10ZC15	10PL8	10PL107E	PR4	PR31	05DE192	05ME6	05ST98	09OB8
	<i>Streptomyces scabiei</i>	09VK11	10ZL16	10PL18E	10PL108	PR5	PR32	05DE393	05ME33	05ST859	09OB13
	<i>Streptomyces acidiscabies</i>	09VK30	10ZL18	10PL21	10PL109	PR6	PR33	05DE503	05ME81	05ST873	09OB18
	<i>Streptomyces europaeiscabiei</i>	09VK38	10ZL19	10PL28	10PL112E	PR7	PR34	05DE504	05ME109	05ST876	10OB2
	<i>Streptomyces stelliscabiei</i>	09VK56	10ZL20	10PL36	10PL116	PR8	PR37	05DE507b	05ME114	05ST925	10OB7
	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	09VK61	10ZL22	10PL41E	10PL118	PR9	PR38	05DE511	05ME118	05ST933	10OB11
		09VK62	10ZL23	10PL67E	10PL123	PR10	PR39	05DE512	05ME805	05ST940	10OB14
		09VK67	10ZL24	10PL70	10PL124	PR11	PR40	05DE515b	05ME815	05ST946	10OB21
		09VK69	10ZL25	10PL73U	10PL128E	PR12	PR41	05DE518	05ME825		10OB102
		09VK71	10ZL26	10PL76	10PL129	PR13	PR42	05DE522	05ME830		10OB201
		09VK75	10ZL27	10PL77	10PL130	PR14	PR43	05DE523	05ME834		10OB204
		09VK94	10ZL28	10PL78	10PL131E	PR15	PR45	05DE525	05ME838		
		09VK96	10ZL29	10PL80	10PL135E	PR17	PR46	05DE528	05ME852		
		09VK98	10ZL30	10PL81E	10PL138	PR19	PR48	05DE535	05ME854		
		10ZC1	10ZL31	10PL84	10PL147	PR20	PR49	05DE539	05ME911		
		10ZC2	10ZL32	10PL88	10PL148	PR21	PR50				
		10ZC3	10ZL33	10PL90	10PL149E	PR24	PR51				
		10ZC4	10ZL34	10PL94	10PL153	PR26	PR52				
		10ZC5	14VE2	10PL95	10PL154	PR27b	PR54				
		10ZC9	14SL3	10PL96	PR1	PR28	PR56				
		10ZC11	14SL12	10PL105E	PR2	PR29	PR57				
		10ZC13	14HB8C	10PL1006	PR3	PR30	PR60				
							PR62				
	Celkem otestováno	6	44		89				15	15	8
Produkce sideroforů	ANO	NE									

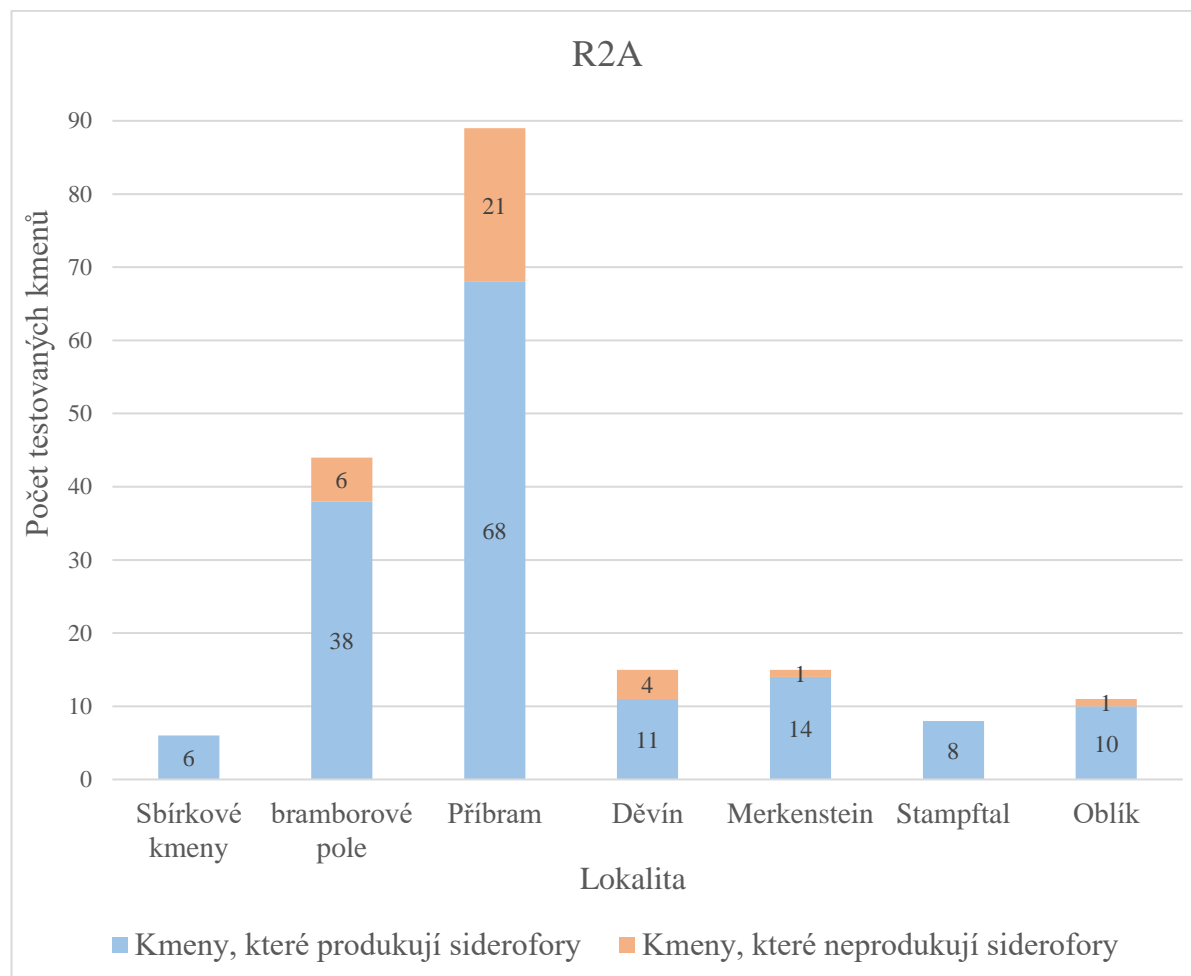
Příloha 2: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných na pevném mediu GYM a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.

Lokalita	Sbírkové kmeny	bramborové pole		Příbram	Děvín	Merkenstein	Stampftal	Oblík
Označení kmene	<i>Streptomyces coelicolor</i>	09VK6	10ZC13	10PL18E	05DE511	05ME33	05ST859	09OB8
	<i>Streptomyces scabiei</i>	09VK11	10ZC15	10PL21	05DE515b	05ME815	05ST865	09OB13
	<i>Streptomyces acidiscabies</i>	09VK30	10ZL16	10PL41E	05DE539	05ME830	05ST870	09OB20
	<i>Streptomyces europaeiscabiei</i>	09VK38	10ZL17	10PL67E			05ST876	10OB2
	<i>Streptomyces stelliscabiei</i>	09VK56	10ZL18	10PL80			05ST881	10OB7
	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	09VK61	10ZL19	10PL81E			05ST891	10OB11
		09VK62	10ZL20	10PL105E			05ST928	10OB14
		09VK67	10ZL22	10PL107E			05ST933	10OB21
		09VK69	10ZL23	10PL108			05ST940	10OB102
		09VK71	10ZL24	10PL109				10OB201
		09VK75	10ZL25	PR5				10OB204
		09VK94	10ZL26	PR11				
		09VK96	10ZL27	PR16				
		09VK98	10ZL28	PR19				
		10ZC1	10ZL29	PR31				
		10ZC2	10ZL30	PR37				
		10ZC3	10ZL32	PR42				
		10ZC4	10ZL33	PR47				
		10ZC5	14VE2	PR57				
		10ZC9	14SL3					
	10ZC11	14SL12						
Celkem otestováno	6	42		19	3	3	9	11
Produkce sideroforů	ANO	NE						

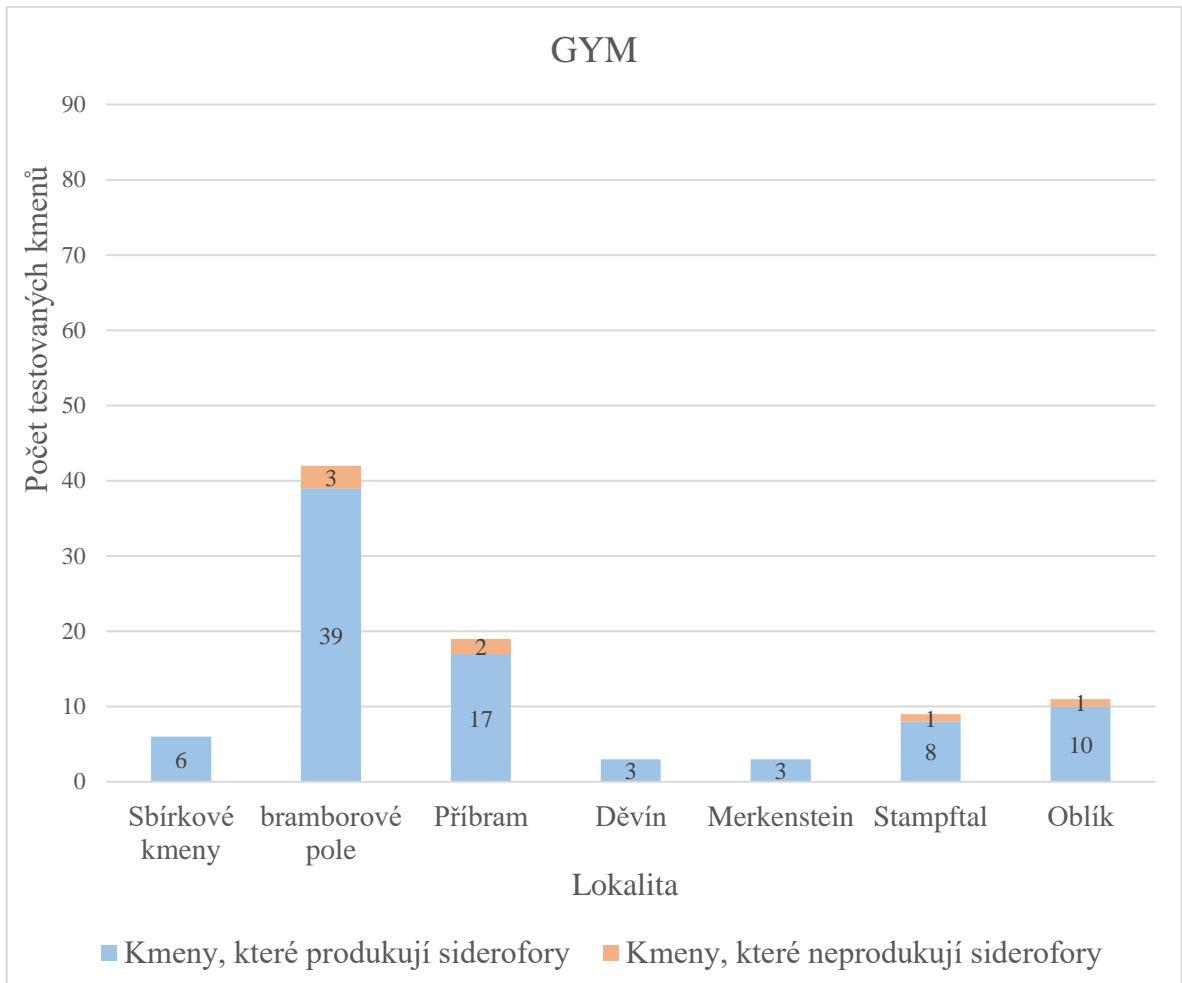
Příloha 3: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných na pevném mediu GAUZE-Fe a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.

Lokalita	Sbírkové kmeny	bramborové pole	Příbram	Děvín	Merkenstein	Stampftal	Oblík
Označení kmene	<i>Streptomyces coelicolor</i>	09VK30	10PL41E	05DE515b		05ST891	
	<i>Streptomyces scabiei</i>	09VK38	10PL107E	05DE539			
	<i>Streptomyces acidiscabies</i>	09VK61	PR5				
	<i>Streptomyces europaeiscabiei</i>	09VK62	PR37				
	<i>Streptomyces stelliscabiei</i>	09VK67	PR42				
	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	09VK69	PR47				
		10ZC5	PR50				
		10ZC9	PR51				
		10ZC11	PR52				
		10ZL16	PR57				
		10ZL17	PR62				
		10ZL18					
		10ZL19					
		10ZL23					
		10ZL25					
		10ZL27					
		10ZL28					
		10ZL29					
		10ZL30					
		10ZL32					
	10ZL34						
Celkem otestováno	6	21	11	2	0	1	0
Produkce sideroforů	ANO	NE					

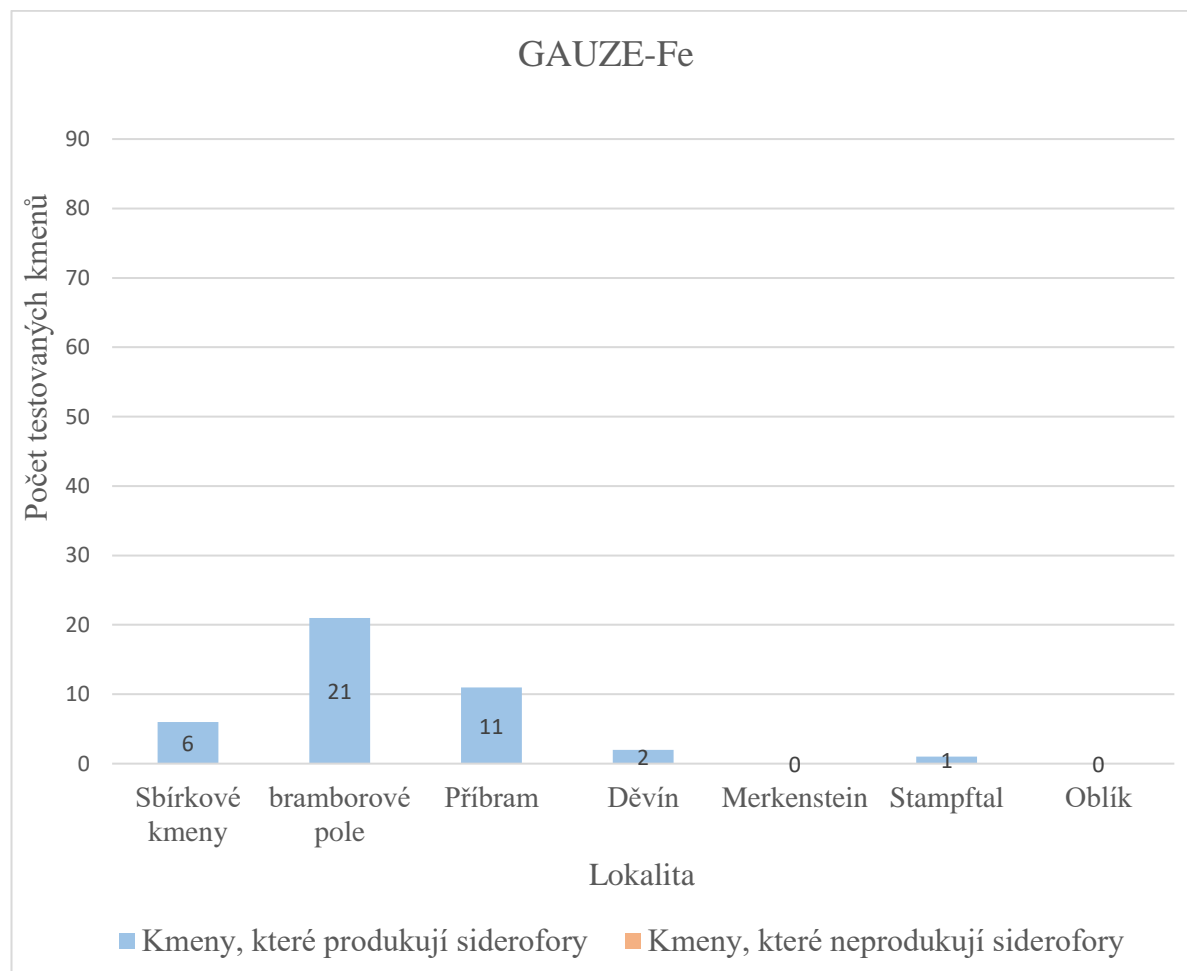
Příloha 4: Celkový počet otestovaných kmenů z jednotlivých lokalit kultivovaných na pevném mediu R2A a rozdělení kmenů na produkční a neprodukční.



Příloha 5: Celkový počet otestovaných kmenů z jednotlivých lokalit kultivovaných na pevném mediu GYM a rozdělení kmenů na produkční a neprodukční.



Příloha 6: Celkový počet otestovaných kmenů z jednotlivých lokalit kultivovaných na pevném mediu GAUZE-Fe a rozdělení kmenů na produkční a neprodukční.



Příloha 7: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných v tekutém mediu R2A a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.

Lokalita	Sbírkové kmeny	bramborové pole	Příbram	Děvín	Merkenstein	Stampftal	Oblík
Označení kmene	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	09VK6	PR37			05ST933	10OB11
		09VK38	PR57				10OB21
		09VK62					
		09VK71					
		10ZL23					
		10ZL24					
		10ZL30					
		14SL3					
	14SL12						
Celkem otestováno	1	9	2	0	0	1	2
Produkce sideroforů	ANO	NE					

Příloha 8: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných v tekutém mediu GYM a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.

Lokalita	Sbírkové kmeny	bramborové pole	Příbram	Děvín	Merkenstein	Stampftal	Oblik
Označení kmene	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	09VK6	10PL41E	05DE515b		05ST891	10OB11
		09VK30	10PL107E	05DE539		05ST933	10OB21
		09VK38	PR5				
		09VK61	PR37				
		09VK62	PR47				
		09VK67	PR50				
		09VK71	PR57				
		10ZL18	PR62				
		10ZL23					
		10ZL24					
		10ZL27					
		10ZL28					
		10ZL29					
		10ZL30					
		14SL3					
	14SL12						
Celkem otestováno	1	16	8	2	0	2	2
Produkce sideroforů	ANO	NE					

Příloha 9: Tabulka kmenů, otestovaných na produkci sideroforů, kultivovaných v tekutém mediu GAUZE-Fe a vyznačení kmenů produkčních a neprodukčních.

Lokalita	Sbírkové kmeny	bramborové pole	Příbram	Děvín	Merkenstein	Stampftal	Oblik
Označení kmene		09VK30	10PL41E	05DE515b		05ST891	
		09VK61	10PL107E	05DE539			
		09VK67	PR5				
		10ZL18	PR50				
		10ZL27	PR62				
		10ZL28					
		10ZL29					
Celkem otestováno	0	7	5	2	0	1	0
Produkce sideroforů	ANO	NE					

Příloha 10: Zjištěné siderofory produkované kmeny pocházejícími z lokality bramborové pole.

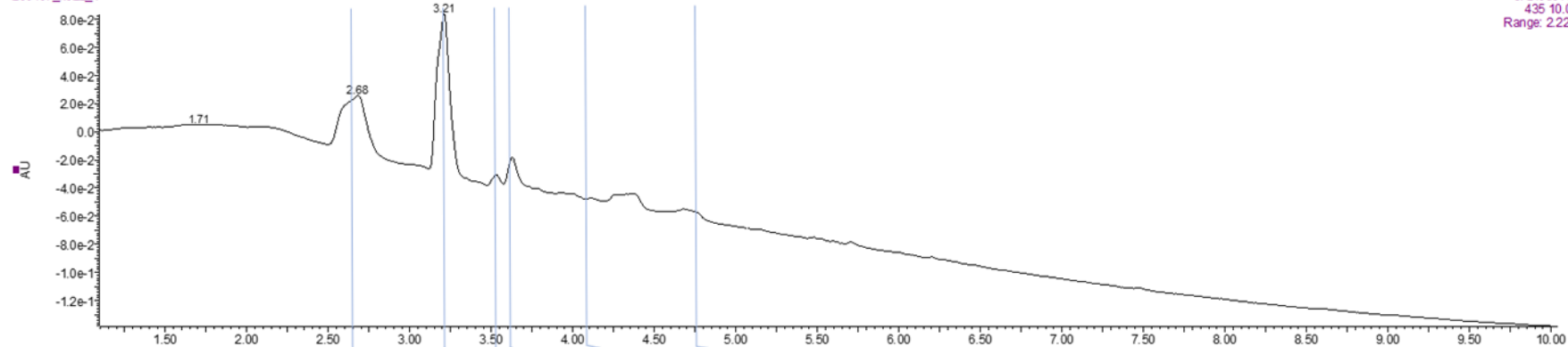
Označení kmenů	Kultivační medium	Název sideroforu
09VK38	GYM	desferrioxamin D2
		desferrioxamin E
		desferrioxamin G1
		kyselina aspergillová
	R2A	desferrioxamin E
		kyselina aspergillová
09VK61	GYM	ferrioxamin D2
		desferrioxamin B
		desferrioxamin D2
		desferrioxamin E
		desferrioxamin H
		desferrioxamin D1
	G-Fe	desferrioxamin A1
		desferrioxamin B
		desferrioxamin D2
		desferrioxamin D1
		desferrioxamin E
	G-Fe+FeCl ₃	ferrioxamin D2
		ferrioxamin E
		acyl-ferrioxamin 1
		desferrioxamin H
acyl-ferrioxamin 3		
09VK67	GYM	kyselina aspergillová
10ZL18	GYM	ferrioxamin E
		kyselina aspergillová
		acinetoferrin
		desferrioxamin E
	G-Fe el.2	pyridin-2,6-bis(kyseliny thiokarboxylové)
		desferrioxamin E
		acyl-desferrioxamin 1
10ZL27	GYM	desferrioxamin B
		kyselina aspergillová
		desferrioxamin H
		ferrioxamin D2
		ferrioxamin E
		rhizobactin
10ZL28	G-Fe	desferrioxamin B
		ferrioxamin E

Příloha 11: Chromatogram z LC-MS pro kmen 09VK61 kultivovaný v mediu GYM a vyznačení zjištěných sloučenin.

09VK61 (GYM)

CSH C18 63 0i1FA ACN
200107_k622_1

3 Diode Array
435 10.00Da
Range: 2.221e-1



Ferrioxamin D2

Desferrioxamin B

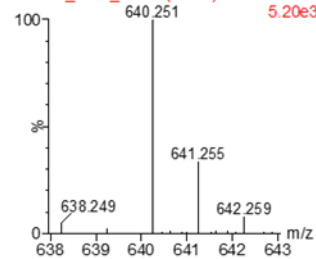
Desferrioxamin D2

Desferrioxamin E

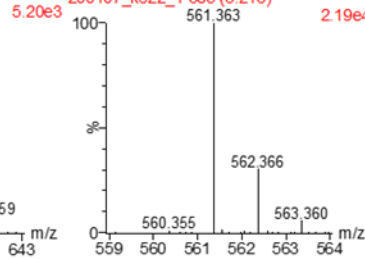
Desferrioxamin H

Desferrioxamin D1

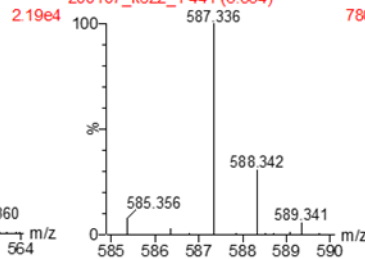
200107_k622_1 287 (2.654)



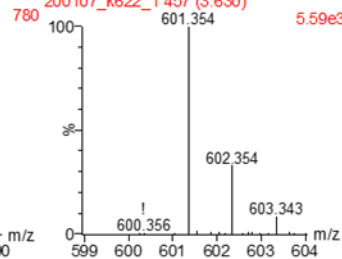
200107_k622_1 385 (3.213)



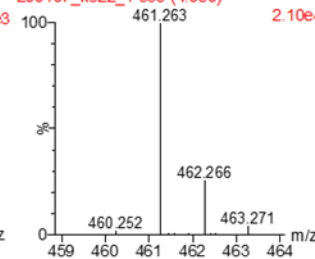
200107_k622_1 441 (3.534)



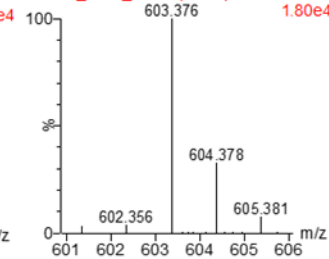
200107_k622_1 457 (3.630)



200107_k622_1 539 (4.090)

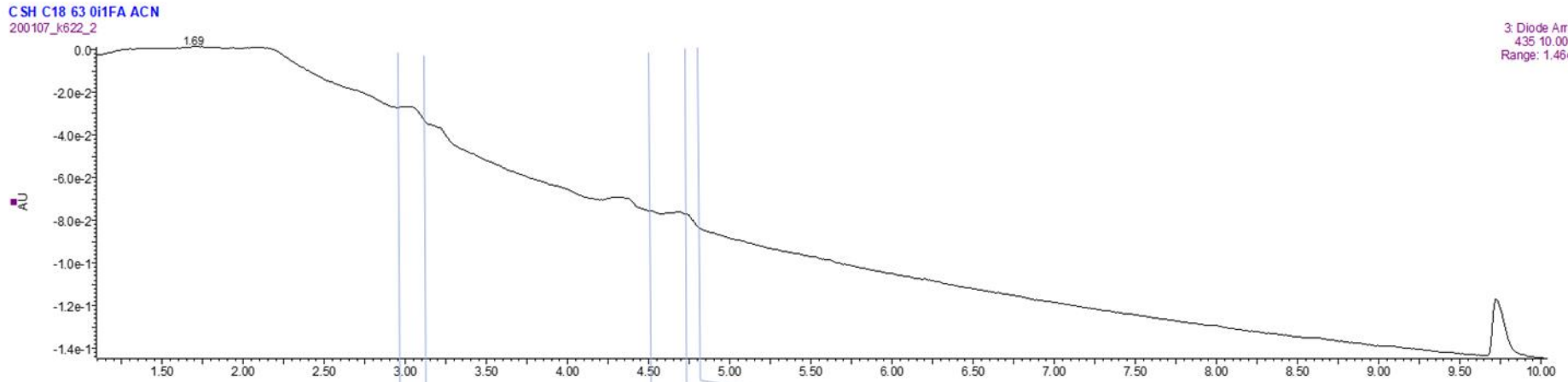


200107_k622_1 654 (4.749)

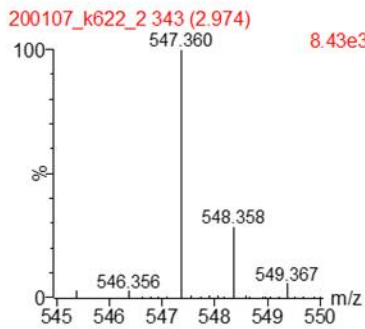


Příloha 12: Chromatogram z LC-MS pro kmen 09VK61 kultivovaný v mediu GAUZE-Fe a vyznačení zjištěných sloučenin.

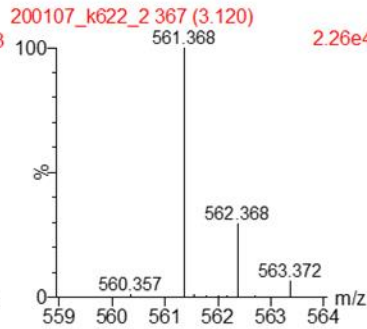
09VK61 (G-Fe)



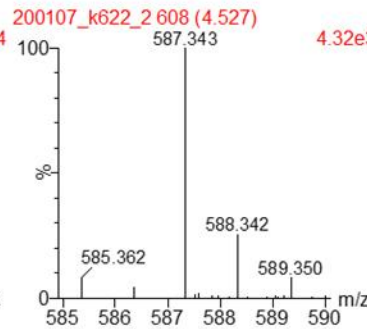
Desferrioxamin A1



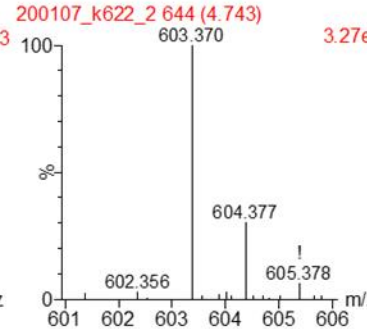
Desferrioxamin B



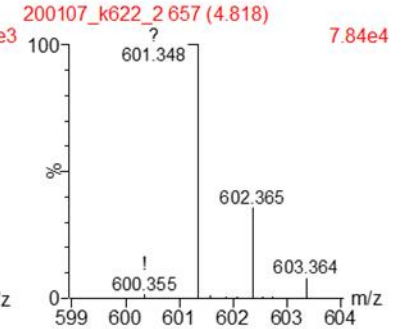
Desferrioxamin D2



Desferrioxamin D1



Desferrioxamin E

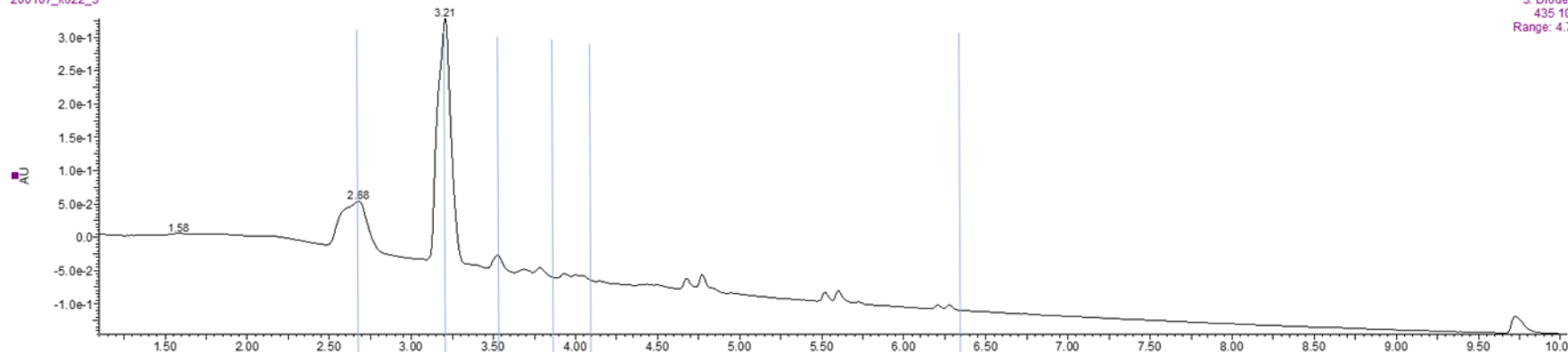


Příloha 13: Chromatogram z LC-MS pro kmen 09VK61 kultivovaný v mediu GAUZE-Fe s přidavkem železa a vyznačení zjištěných sloučenin.

09VK61 (G-Fe +FeCl₃)

CSH C18 63 01FA ACN
200107_k622_3

3 Diode Array
435 10.00Da
Range: 4.733e-1



Ferrioxamin D2

Ferrioxamin E

Ferrioxamin E

Acyl-ferrinoxamin 1

Desferrioxamin H

Acyl-ferrinoxamin 3

200107_k622_3 290 (2.668)

200107_k622_3 383 (3.209)

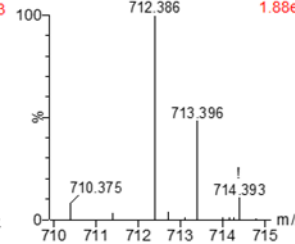
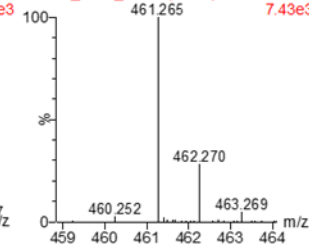
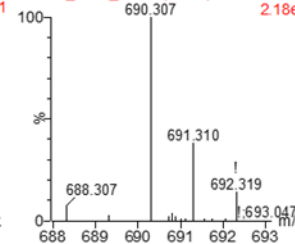
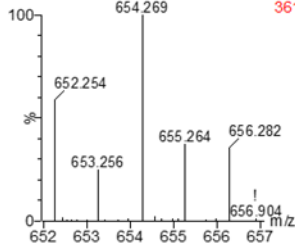
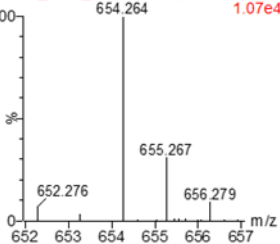
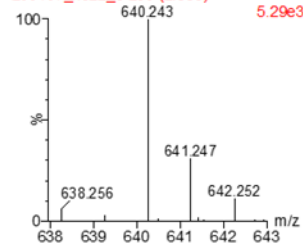
200107_k622_3 437 (3.518)

200107_k622_3 495 (3.863)

200107_k622_3 538 (4.100)

200107_k622_3 924 (6.342)

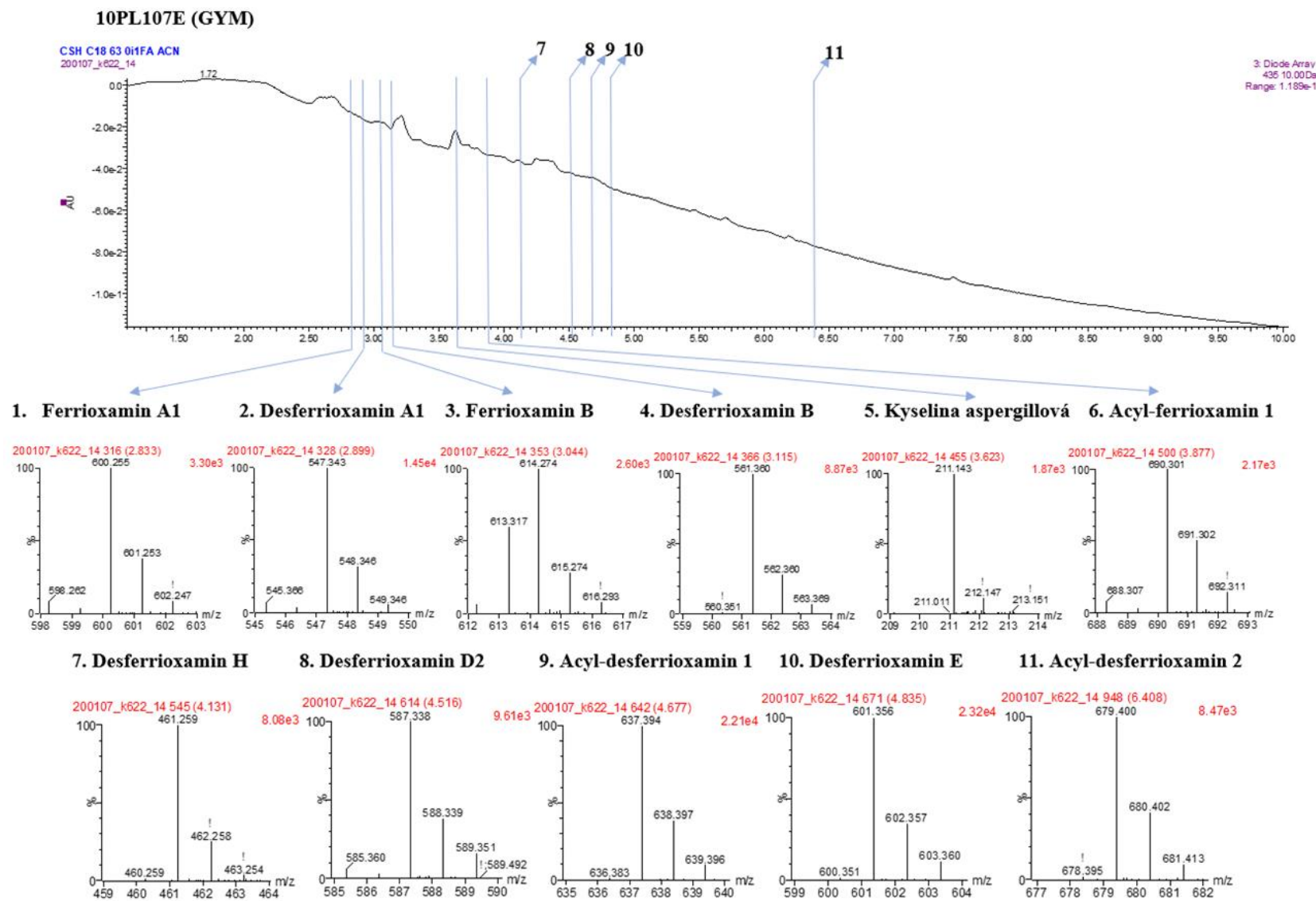
1.88e3



Příloha 14: Zjištěné siderofory produkované kmeny pocházejícími z lokality Příbram.

Označení kmenů	Kultivační medium	Název sideroforu
PR5	GYM	siderochelin A
		pyridoxatin
		salmochelin S1
		kyselina aspergillová
		acinetoferrin
PR50	GYM	kyselina aspergillová
		desferrioxamin E
PR57	GYM	desferrioxamin E
		ferrioxamin E
		kyselina aspergillová
PR62	GYM	kyselina aspergillová
		pyridoxatin
10PL107E	GYM	ferrioxamin A1
		desferrioxamin A1
		ferrioxamin B
		desferrioxamin B
		kyselina aspergillová
		acyl-ferrioxamin 1
		desferrioxamin H
		desferrioxamin D2
		acyl-desferrioxamin 1
		desferrioxamin E
	acyl-desferrioxamin 2	
	G-Fe	desferrioxamin A1
		desferrioxamin B
		desferrioxamin D2
		desferrioxamin D1
desferrioxamin E		
10PL41E	GYM el.2	desferrioxamin B
		ferrioxamin B
		kyselina aspergillová
		acyl-desferrioxamin 1

Příloha 15: Chromatogram z LC-MS pro kmen 10PL107E kultivovaný v mediu GYM a vyznačení zjištěných sloučenin.

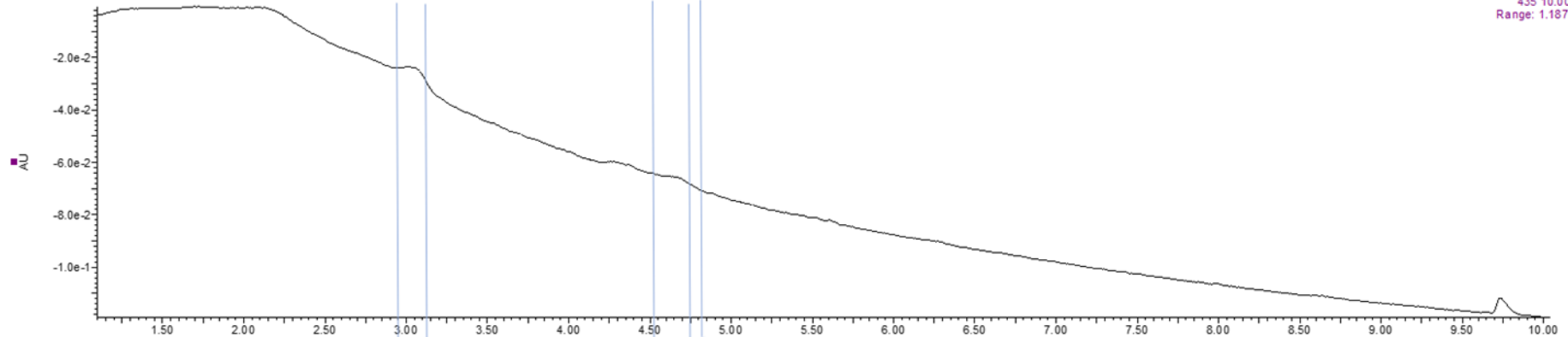


Příloha 16: Chromatogram z LC-MS pro kmen 10PL107E kultivovaný v mediu GAUZE-Fe a vyznačení zjištěných sloučenin.

10PL107E (G-Fe)

CSH C18 63 0HFA ACN
200107_k622_15

3: Diode Array
435 10.00Da
Range: 1.187e-1



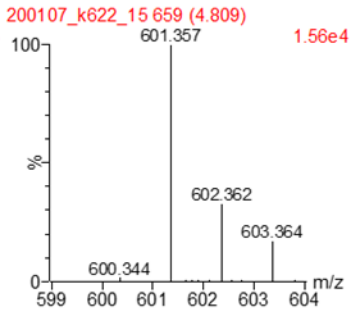
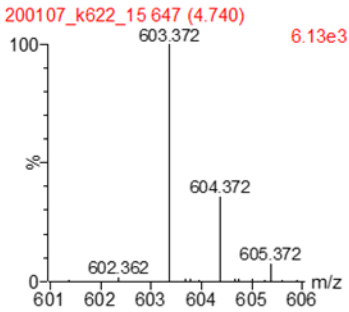
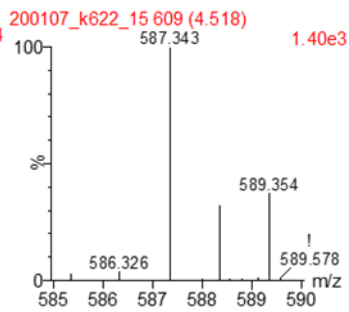
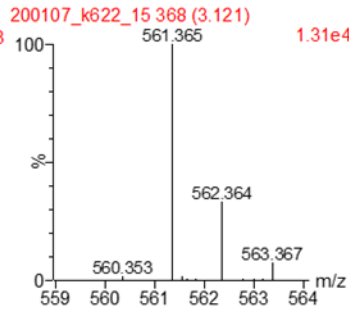
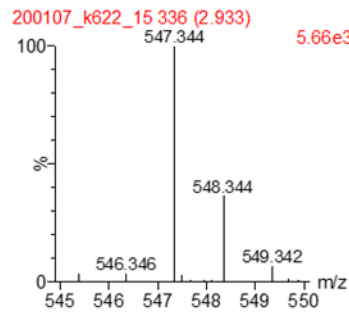
Desferrioxamin A1

Desferrioxamin B

Desferrioxamin D2

Desferrioxamin D1

Desferrioxamin E



Příloha 17: Zjištěné siderofory produkované kmeny pocházejícími z lokality Děvín.

Označení kmenů	Kultivační medium	Název sideroforu
05DE515b	GYM	ferrioxamin E
		desferrioxamin E
	G-Fe	desferrioxamin D2
		ferrioxamin E
		desferrioxamin E
05DE539	GYM	desferrioxamin B
		kyselina aspergillová
	GYM el.2	desferrioxamin B
	G-Fe	desferrioxamin B
		ferrioxamin E
		desferrioxamin E
	G-Fe+FeCl ₃	ferrioxamin D2
		ferrioxamin E
		ferrioxamin D1

Příloha 18: Zjištěné siderofory produkované kmeny pocházejícími z lokality Stampfal.

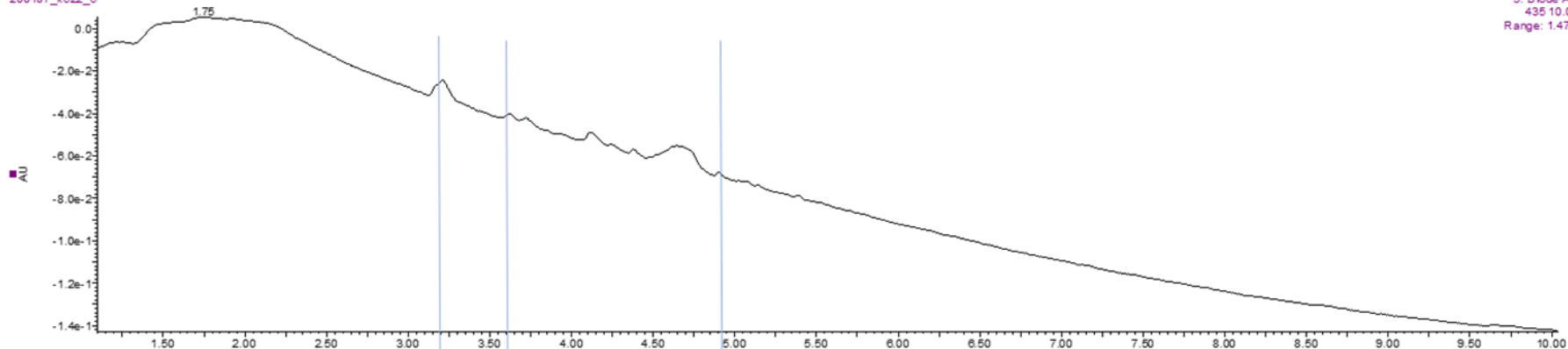
Označení kmenů	Kultivační medium	Název sideroforu
05ST891	GYM	ferrioxamin E
	G-Fe el.2	ferrioxamin E
		kyselina aspergillová
05ST933	GYM	desferrioxamin E
		kyselina aspergillová

Příloha 19: Chromatogram z LC-MS pro kmen 05DE515b kultivovaný v mediu GYM a vyznačení zjištěných sloučenin.

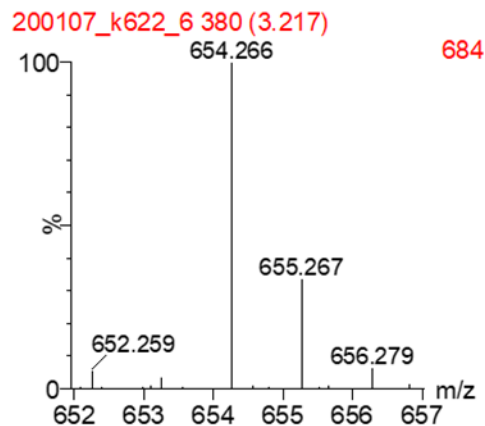
05DE515b (GYM)

CSH C18 63 0i1FA ACN
200107_k622_6

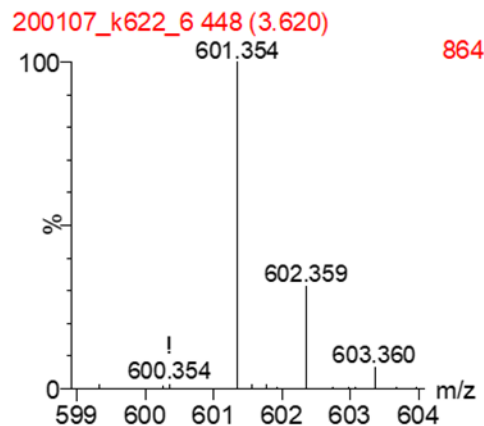
3: Diode Array
435 10.00Da
Range: 1.479e-1



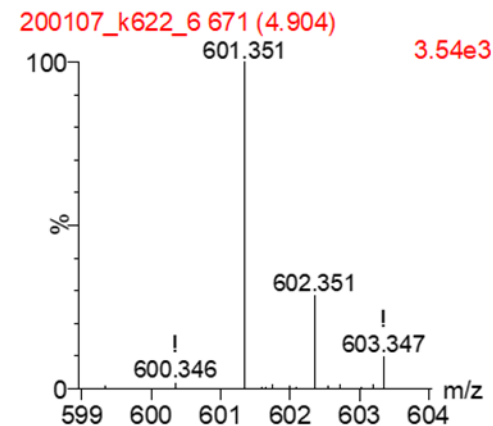
Ferrioxamin E



Desferrioxamin E

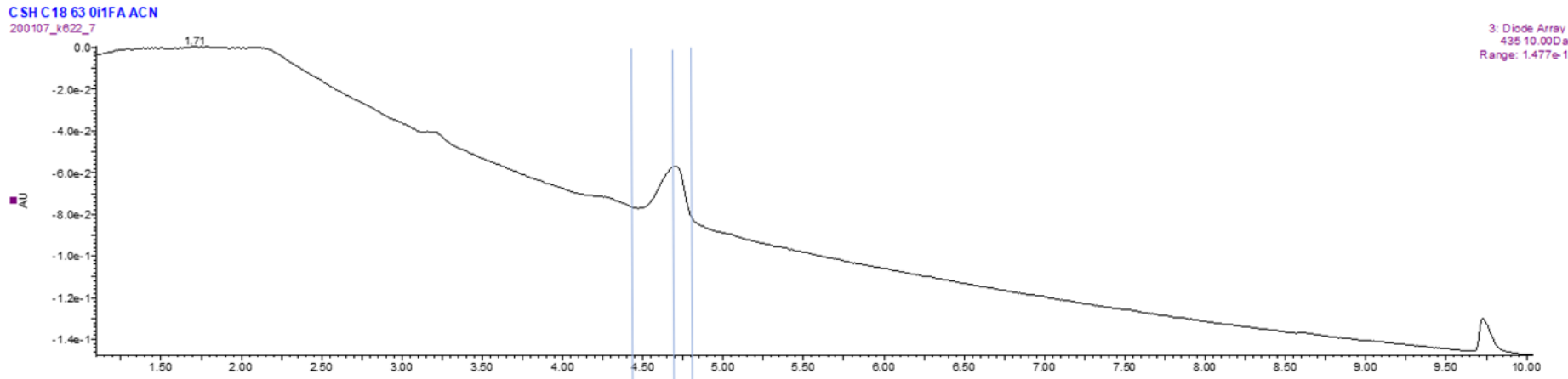


Desferrioxamin E

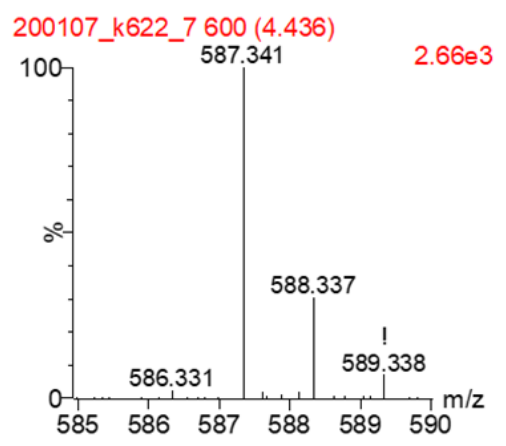


Příloha 20: Chromatogram z LC-MS pro kmen 05DE515b kultivovaný v mediu GAUZE-Fe a vyznačení zjištěných sloučenin.

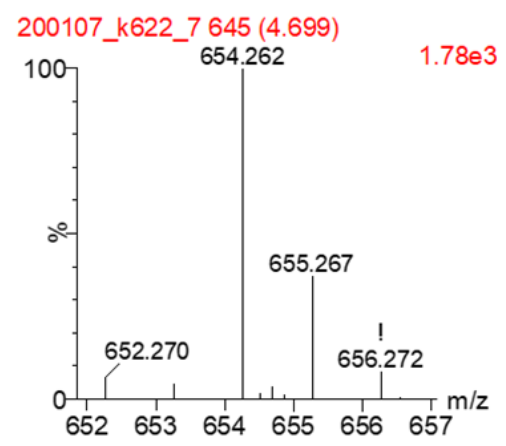
05DE515b (G-Fe)



Desferrioxamin D2



Ferrioxamin E



Desferrioxamin E

