Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Antimikrobiální aktivita biomasy a bakterií *Pectinatella magnifica*

Diplomová práce

Autor práce: Karolína Holečková
Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, PhD.
Konzultant: Ing. Hana Salmonová

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antimikrobiální aktivita biomasy a bakterií *Pectinatella magnifica*" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní prof. Ing. Evě Vlkové, PhD., vedoucí mé diplomové práce, za odborné rady, cenné připomínky, poskytnuté materiály a vedení při psaní práce. Děkuji Ing. Haně Salmonové za příjemnou spolupráci, konzultace a organizaci experimentů v laboratoři. V neposlední řadě děkuji svým rodičům za podporu po celou dobu mého studia.

Antimikrobiální aktivita biomasy a bakterií *Pectinatella magnifica*

Souhrn

Pectinatella magnifica je sladkovodní invazivní koloniální živočich. Podnětem k testování antimikrobiální aktivity bakterií izolovaných z *Pectinatelly* a extraktů získaných z biomasy jejích kolonií bylo nejen masivní rozšíření v oblasti jižních Čech, ale především skutečnost, že u mořských mechovců byla antimikrobiální aktivita bakterií i extraktů již potvrzena. Testovány byly bakteriální izoláty z roku 2015 a lyofilizované extrakty z biomasy kolonií připravené v Ústavu molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie na VFU v Brně. K testování antimikrobiální aktivity bakterií i extraktů byla zvolena difúzní metoda, u účinných extraktů byla následně mikrodiluční metodou stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). Celkem bylo testováno 90 supernatantů získaných z bakterií *Pectinatella magnifica* proti 14 indikátorovým bakteriím a 5 různých extraktů (methanolový, hexanový, chloroformový, ethyl-acetátový a vodný) bylo testováno proti 22 kmenům indikátorových bakterií.

Antimikrobiální aktivita byla prokázána u 8 bakteriálních izolátů. Nejúčinnějším bakteriálním izolátem z *Pectinatella magnifica* byl izolát *Bacillus mycoides*. Při anaerobní kultivaci inhiboval růst celkem pěti indikátorových bakterií, v aerobním prostředí byl inhibiční účinek prokázán třikrát. Testováním extraktů bylo nejlepšího výsledku dosaženo chloroformovým extraktem, který účinně inhiboval růst 9 indikátorových kmenů bakterií při použití nejnižší MIC i MBC. Hexanový extrakt byl druhou nejúčinnější substancí, antimikrobiální aktivita byla prokázána u 8 testovaných kmenů. Methanolový extrakt působil proti růstu 5 indikátorových kmenů.

Vzhledem k příznivým výsledkům testování, se izolované bakterie i extrakty z *Pectinatelly* jeví jako velmi slibný zdroj antimikrobiálně působících látek. Toho lze hojně využít zejména v potravinářství, za účelem prodloužení údržnosti potravin a zajištění jejich zdravotní nezávadnosti.

Klíčová slova: *Pectinatella magnifica*, symbiotické bakterie, antimikrobiální aktivita, biomasa, extrakty

Antimicrobial activity of *Pectinatella magnifica* biomass and its associated bacteria

Summary

Pectinatella magnifica is a freshwater invasive colonial animal. The reason to test the antimicrobial activity of bacteria isolated from *Pectinatella* and the extracts obtained from the biomass of its colonies was not only a massive expansion in South Bohemia, but also the fact that the antimicrobial activity of bacteria and extracts had already been confirmed in marine bryozoans. Bacterial isolates from 2015 and lyophilized extracts from colony biomass prepared at the Institute of Molecular Biology and Pharmaceutical Biotechnology at UVPS in Brno were tested in this study. To test the antimicrobial activity of bacteria and extracts, a diffusion method was chosen. Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined for the active extracts. In total, 90 supernatants obtained from *Pectinatella magnifica* were tested against 14 indicator bacteria and 5 different extracts (methanolic, hexane, chloroform, ethyl acetate and aqueous) were tested against 22 strains of indicator bacteria.

Antimicrobial activity has been proven in 8 bacterial isolates. The most effective bacterial isolate from *Pectinatella magnifica* was the *Bacillus mycoides* isolate. Anaerobic cultivation inhibited the growth of 5 indicator bacteria, in an aerobic environment, the inhibitory activity has been confirmed three times. During testing of the extracts, the best result was achieved through chloroform extracts that effectively inhibited the growth of 9 indicator strains of bacteria using the lowest MIC and MBC. The hexane extract was the second most effective substance, antimicrobial activity was observed in 8 tested strains. The methanol extract counteracted the growth of 5 indicator strains.

Due to the favorable test results, isolated bacteria and *Pectinatella* extracts are a very promising source of antimicrobial agents. This can be used extensively in food industry, in order to extend the shelf life of food and ensure its health safety.

Keywords: *Pectinatella magnifica*, associated bacteria, antimicrobial aktivity, biomass, extracts

Obsah

1 Úvod 1

2 Literární rešerše 2

2.1 Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*) 2

2.1.1 Systematické zařazení *Pectinatella magnifica* 2

2.1.2 Lokality výskytu *Pectinatella magnifica* 2

2.1.2.1 Výskyt *Pectinatella magnifica* ve světě 2

2.1.2.2 Výskyt *Pectinatella magnifica* v Evropě a České republice 3

2.1.3 *Pectinatella magnifica* – stavba těla, rozmnožování, způsob života 5

2.2 Antimikrobiální látky 7

2.2.1 Antimikrobiální látky produkované mikroorganismy 7

2.2.1.1 Antibiotika 7

2.2.1.2 Bakteriociny 9

2.2.2 Antimikrobiální látky produkované rostlinami 10

2.2.3 Antimikrobiální látky produkované živočichy 11

2.2.4 Antimikrobiální látky produkované řasami a vyššími houbami 12

2.3 Biologicky aktivní látky produkované mechovci 13

2.3.1 Bryostatiny 16

2.4 Symbiotické bakterie mechovců 17

2.4.1 Symbiotické bakterie mořských mechovců 18

2.4.2 Symbiotické bakterie sladkovodních mechovců 19

2.5 Metody stanovení antimikrobiální aktivity 20

2.5.1 Difúzní metody 20

2.5.2 Diluční metody 21

3 Hypotéza 23

4 Cíl práce 23

5 Metody a materiály 23

5.1 Testované kmeny bakterií 23

5.2 Příprava kultivačních médií a podmínky kultivace 26

5.3 Testování antimikrobiální aktivity bakteriálních izolátů 27

5.4 Testování antimikrobiální aktivity extraktů 27

6 Výsledky 29

7 Diskuze 32

8 Závěr 36

9 Seznam použité literatury 37

10 Seznam zkratek 54

1 Úvod

Významnými obyvateli vod jsou i mechovci. Málo prozkoumaní a veřejně nepříliš známí tvorové, tvořící kolonie různých velikostí, jsou zajímavým zdrojem biologicky aktivních látek. Vyšší pozornost je věnována mořským druhům mechovců, zvláště po objevu bryostatinu v roce 1960, látky, jež je úspěšně testována při léčbě rakoviny.

Na počátku 21. století byla na území České republiky zpozorována sladkovodní mechovka *Pectinatella magnifica*. Rychlé rozšiřování nabralo invazivního charakteru. První studie nejdříve monitorovaly její šíření na našem území a zkoumaly dopad na ekosystém vod. Nynější zájem studií je směřován zejména k poznání mikrobioty kolonií a testování biologicky aktivních látek z nich získaných.

2 Literární rešerše

Literární rešerše této diplomové práce vytváří ucelený přehled informací týkající se sladkovodní mechovky bochnatky americké, invazivního vodního živočicha. Dále zahrnuje popis antimikrobiálních látek, biologicky aktivních látek produkovaných mechovci a souhrn symbiotických bakterií mechovců. Na závěr přehledu jsou popsány metody testování antimikrobiální aktivity.

2.1 Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*)

První podkapitola literárního přehledu zahrnuje základní informace o bochnatce americké, její naleziště, nejčastější místa výskytu. Dále je popsána morfologie a rozmnožování kolonií mechovců, následuje popis způsob života a rozmnožování *Pectinatella magnifica*.

2.1.1 Systematické zařazení *Pectinatella magnifica*

Říše: Živočichové – Animalia

Kmen: Mechovci – Bryozoa

Třída: Mechovky – Phxylactolaemata

Řád: Plumatellida

Čeleď: *Pectinatellidae*

Druh: *Pectinatella Magnifica* (Leidy, 1851)

2.1.2 Lokality výskytu *Pectinatella magnifica*

První zmínky o bochnatce americké jsou již z poloviny 19. století. Prvně byla popsána v severní Americe.

2.1.2.1 Výskyt *Pectinatella magnifica* ve světě

Zcela původním habitatem bochnatky americké je Severní Amerika. Jeseph Leidy v roce 1851 nejprve popsal tuto mechovku jako *Cristatella magnifica*. Brzy však bylo zjištěno, že se tento nový druh liší od rodu *Cristatella* a proto byl vytvořen rod nový, *Pectinatella* (Opravilová, 2005).

Jako první naleziště bochnatky je uváděno okolí Philadelphie, ve státě Pennsylvánie na severovýchodě Spojených států amerických. Dále bylo pozorováno její rozšíření do dalších států východně od řeky Mississippi, např. Massachusetts, Maine a Mississippi (Kraepelin, 1887). V následujících letech probíhalo v severovýchodní části amerického kontinentu masivní rozšiřování (viz. Obrázek 1). Bochnatka byla nalezena v Erijském jezeře, v jezeře Ontario na hranicích s Kanadou, ale i na jihu Spojených státu amerických ve státě Texas (Wood, 2001). Nové biotopy bochnatky americké byly objeveny počátkem 90. let 20. století v Indii (Opravilová, 2005), ale také v Japonsku a Korei (Oda, 1974; Seo, 1998; Hyunbin et al., 2014).

Obrázek 1: rozšíření *Pectinatella magnifica* v USA (www. nas.er.usgs.gov)

2.1.2.2 Výskyt *Pectinatella magnifica* v Evropě a České republice

Ve střední Evropě je bochnatka považována za invazivního živočicha. Poprvé byla zpozorována v západní Evropě, v řece Bille blízko Hamburku roku 1883 (Kraepelin, 1884). Do této lokality byla pravděpodobně zavlečena lodní dopravou ze Severní Ameriky. V průběhu 20. století se bochnatka rozšířila přes Labe dále do Německa, Polska a České republiky (Rodriguez et al., 2002; Balounová et al., 2011). Výskyt bochnatky byl potvrzen i ve Francii, v oblasti zvané Franche-Comte v roce 1994 (Rodriguez, 2002; Devin, 2005), dále na ostrově Korsika v roce 2006 a v oblasti Bretaně o rok později (Notteghem, 2009). Další zemí, kde byla bochnatka nalezena je Nizozemsko, výskyt byl poprvé zaznamenán v roce 2003 v povodí Rýna mezi Lucemburskem a Německem, kolonie byly také nalezeny v Rakousku, Rumunsku a

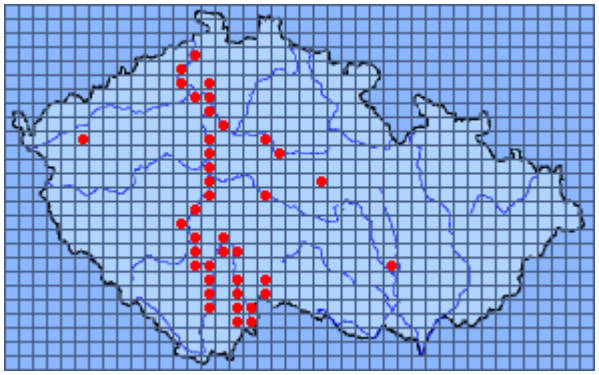
Turecku (Balounová et al., 2013). V Maďarsku je první záznam o nalezení bochnatky z roku 2011, kolonie byly nalezeny a identifikovány po proudu řeky Dunaje za Budapeští (Szekeres et al., 2013).

V České republice je první nález bochnatky uváděn v roce 1922. Do roku 1952 bylo následným sledováním postupně zjištěno 12 lokalit na Labi a Vltavě, kde se bochnatka vyskytovala nejčastěji. Intenzivní výzkum a studování bochnatky odstartovalo rozsáhlé šíření, které započalo v roce 2003 v oblasti Třeboňska (Balounová et al., 2007a; Balounová et al., 2007b; Balounová et al., 2011; Šinko, 2010).

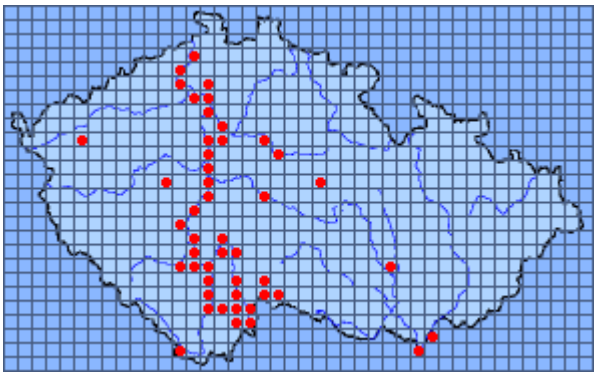
Sledování výskytu započalo v oblasti pískovny Cep, postupně byla bochnatka nalezena i v dalších nádržích (Balounová et al., 2006). V roce 2005 byla bochnatka pozorována na rybníku Podřezaný. O rok později pak na rekreačním rybníku Hejtman, ve vodní nádrži Hněvkovice u Týna nad Vltavou a na konci letní sezóny byly kolonie bochnatky nalezeny i v přehradní nádrži Orlík. V roce 2007 se bochnatka rozšířila do rybníku Nový Kanclíř a do Vlkovské pískovny (Balounová, 2007). O dva roky později byly kolonie bochnatky hlášeny na rybníku Svět a z přilehlých sádek Rybářství Třeboň a.s. V roce 2010 proběhlo masivní rozšíření na rybník Veselí I. v soustavě Vlkovských pískoven. Přítomnost bochnatky byla zpozorována i na Staňkovském rybníku blízko Chlumu u Třeboně a v rybníku Vydýmač (Balounová, 2010).

Na webových stránkách BioLib.cz probíhá průběžné mapování výskytu kolonií bochnatky. Kromě mapek znázorňujících naleziště jednotlivých kolonií jsou zde uvedené i základní informace o bochnatce, způsobu života, rozmnožování a fotografie. Níže, na obrázku 2 a 3, je pro porovnání uvedena mapka výskytu kolonií bochnatky v roce 2015 (vlevo) a v roce 2017 (vpravo). Je vidět, že se bochnatka během dvou let rozšířila nejen v okolí Třeboňska, ale přibyla nová naleziště v povodí Dunaje a ve vodní nádrži Lipno.

Obrázek 2: Výskyt *P. magnifica* 2015 (www.BioLib.cz)



Obrázek 3: Výskyt *P. magnifica* 2017 (www.BioLib.cz)



2.1.3 *Pectinatella magnifica* – stavba těla, rozmnožování, způsob života

Pectinatella magnifica je sladkovodní, koloniální živočich patřící do kmene mechovců (Carroget et al., 2005). Kolonie této mechovky rostou na různých substrátech pod vodní hladinou (Pejin et al., 2012), nejčastěji se nachází na částech vodních rostlin. Povrch kolonie má žlutohnědou barvu a vnitřní struktura je tvořena pevným průsvitným gelem. Gel je produkován jednotlivými živočichy, tzv. zooidy, a zvětšuje tak životní prostor, na kterém se mohou vyskytovat. Vnitřní gelová se skládá z 99 % z vody. Dále byla dokázána přítomnost chitinu, vápníku, chloridu sodného a proteinů (Morse, 1930). Kollar et al. (2016) provedli testování základního elementárního složení gelu. Analýza prokázala, že zkoumaný materiál je smíšenou kompozicí bílkovin a polysacharidů, nebo silně glykosylovaného proteinu. Lze se domnívat, že sloučenina, nebo sloučeniny, tvořící gelovou masu kolonie, by měly být relativně jednoduché, vzhledem k velikosti zooidů oproti velikosti celé kolonie, zdroje živin pocházející ze sladké vody a schopnosti velmi rychle nabývat na objemu. Množství vyprodukované gelové hmoty může dosáhnout tloušťky od několika milimetrů do několika desítek centimetrů (Opravilová, 2005). Kolonie *Pectinatella magnifica* mohou výjimečně dosáhnout hmotnosti i nad 10 kg, ale obvyklá hmotnost se pohybuje okolo 500 g, záleží na místě a roční době odběru vzorku (Balounová et al., 2011). Jednotliví zooidi se seskupují do mnoha růžencových útvarů zvaných rozet a tvoří tak celou kolonii. Velikost zooidů se pohybuju okolo 1mm a tělo se skládá ze dvou částí – polypidu a cystidu (Šetlíková et al., 2005).

Pectinatella magnifica se rozmnožuje pohlavním i nepohlavním způsobem. Pohlavní aktivita trvá velmi krátké období a dochází k vnitřnímu oplození. Oplodněné vajíčko se vyvine v embryo a vytvoří obrvenou planktonní larvu. Tato larva se skládá ze dvou plně vyvinutých zooidů a řasnatého pláště. Po určité době přisedá na vhodný substrát, kde začne vyrůstat první jedinec nové kolonie. Tento jedinec je plně samostatný a schopný reprodukce pučením, ze kterého postupně vzniká celá kolonie (Wood, 2001). Nepohlavní rozmnožování probíhá pomocí nepohlavních částic, statoblastů. *Pectinatella* začíná vytvářet statoblasty v nepříznivých podmínkách, zejména při extrémních výkyvech teplot. Statoblasty jsou velmi malé černé spory o velikosti cca 1 mm, diskovitého tvaru, plovoucí na hladině (Šinko, 2010). Plování statoblastů na hladině umožňuje chtitinová stěna, která je po okrajích naplněna vzduchem. Na povrchu plovacího prstence vyrůstají kotvicovité útvary sloužící k přichycení se například na ptačí peří (Šetlíková et al., 2005). Díky vodnímu ptactvu se statoblasty mohou šířit do významných vzdáleností (Oda, 1974). Chitinový obal je velmi odolný a dokáže odolat působení vlivů trávicího traktu ptáků ale i ryb (Brown, 1933). Dalším způsobem je unášení vodním proudem

nebo větrem (Massard a Gaimer, 2002). V pomalu tekoucích vodách je rozptýlení významně podmíněno směrem vodního toku (Rodrguez et al., 2002). Vliv na šíření statoblastů má i lidská činnost (Seo, 1998). Borg (1930) nevylučuje možnost, že *Pectinatella magnifica* je kosmopolitním organismem.

K vývoji nové kolonie ze statoblastu začne docházet za příznivých vnějších podmínek. Statoblast se přichytí na vhodném substrátu, poté začne vyrůstat nový zooid. Následným pučením vznikají další zooidi. Nejprve na původním substrátu vytvoří slizovitou vrstvičku, později začínají produkovat gelovitou hmotu ke středu vyrůstající kolonie.

Pectinatella magnifica se živí filtrováním planktonu z vody (Wood, 2001), který zahrnuje řasy, prvoky a vířníky. Náročnost na živiny u této mechovky není vysoká, upřednostňuje vody nejen s nižší koncentrací živin, ale také s vysokou průhledností. Kolonie prosperují v nádržích se šterkopískovým podložím, než v lokalitách využívaných k chovu ryb s organickým sedimentem. Vysvětlením této skutečnosti je pravděpodobně nebezpečí zanášení zooidů neživou organickou hmotou (detritem) a s tím spojený nedostatek kyslíku (Šetlíková et al., 2005). Růst a vývoj *Pectinatella magnifica* velmi významně také ovlivňuje teplota vody. Více literárních zdrojů se shoduje na termofilním charakteru tohoto druhu s optimem teploty vody vyšší než 20 °C (Brown 1933; Wood 1989; Rodriguez a Vergon, 2002; Opravilová 2006; Balounová et al. 2007b; Balounová et al. 2011). Kolonie bochnatky se začínají objevovat, pokud teplota vody dosáhne 20 °C, stoupající teplota urychluje nárůst kolonií (Balounová et al., 2007b). V roce 2015 byly v Čechách zaznamenány extrémně vysoké letní teploty a bylo zjištěno, že růst kolonií byl zpomalen až zastaven. Dříve, než je obvyklé, došlo k rozpadu kolonií a uvolnění statoblastů (Rajchard, 2015).

Obrázek 6: Kolonie P*ectinatella magnifica* (foto KMVD)

2.2 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky jsou substance sloužící k eliminaci nebo inhibici mikroorganismů. Použití přírodních antimikrobiálních látek je perspektivní zejména v potravinářském průmyslu, kde zvyšují bezpečnost a kvalitu potravin. Antimikrobiálně působící látky lze získat z různých zdrojů, jako jsou rostliny, zvířata, bakterie, řasy nebo houby.

Antimikrobiální látky lze rozdělit do několika skupin dle jejich původu, principu účinku na mikroorganismy, způsobu aplikace a využití, nebo také dle jejich funkce v potravinářském průmyslu nebo při hygienickém použití. V této diplomové práci je popsáno rozdělení antimikrobiálních látek dle organismu, který je vytváří a produkuje.

2.2.1 Antimikrobiální látky produkované mikroorganismy

Antimikrobiální látky, které produkují mikroorganismy, mohou být produkty primárního nebo sekundárního metabolismu. Metabolismus, nebo také látková přeměna, je soubor všech enzymových reakcí, tzv. metabolických drah, při kterých dochází k přeměně látek na energii nejen v mikroorganismech, ale ve všech živých organismech. Zprostředkovává tak buňkám náležité množství energie a dostačené množství stavebního materiálu pro zachování všech životních funkcí, jako je růst, rozmnožování, výměna látek s okolím, udržování a obnova vnitrobuněčných struktur a buněčné integrity. Biochemické reakce tvořící metabolismus jsou na sobě funkčně závislé. Dle druhu reakčních mechanismů rozlišujeme procesy katabolické a anabolické. Katabolické reakce vytváří energii rozkládáním živin, anabolické naopak za spotřeby energie syntetizují složitější látky. Antimikrobiální látky, které vznikají katabolickými procesy za anaerobních podmínek, jsou metabolity primárními a mikroorganismy je produkují neustále v celém svém životním cyklu. Metabolity sekundární tvoří mikroorganismy pouze za určitých okolností, nebo ve specifickém období vývoje (Šilhánková, 2002).

Do skupiny sekundárních metabolitů řadíme barviva, toxiny, antibiotika a bakteriociny. Veškeré sekundární metabolity jsou tvořené v anabolických procesech a je třeba dodání energie na jejich vyprodukování.

2.2.1.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky, které inhibují růst a množení bakterií, nebo je usmrcují. Jedná se o sekundární metabolity především aktinomycet, ale také mikromycet a ostatních bakterií. Jde o silně heterogenní skupinu látek s různými účinky na bakterie a je rozlišováno několik tříd dle

chemické struktury. Mezi aminoglykosidová antibiotika řadíme amikacin, apramycin, kanamycin, neomycin, streptomycin a další. Používají se na léčbu infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi, jako je *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, působí proti leptospirám a stafylokokům, streptomycin je významné antituberkulotikum. Do skupiny amfenikolů spadá známý chloramfenikol a thiamfenikol, širokospektrá antibiotika účinná proti salmonelovým, meningokokovým a pneumokokovým infekcím s bakteriostatickými účinky. Infekce způsobené grampozitivními bakteriemi, včetně mykobakterií, jsou léčeny antibiotiky ze skupiny ansamycinů, například, rifamycin, rifampicin a rifabutin. Rozsáhlou skupinou antibiotik jsou také cefalosporiny, jejich název je odvozen od plísně *Cefalosporium*, ze které byly poprvé izolovány. Stejně jako peniciliny, monobaktamy a karbapenemy je řadíme do skupiny β-laktamových antibiotik. Způsob účinku tohoto druhu antibiotik je specifický v tom, že rozrušuje buněčnou stěnu pouze ve fázi růstu bakterií; léčba těmito antibiotiky by proto měla být zahájena co nejdříve po nástupu klinických příznaků. Dalšími rozsáhlými skupinami antibiotik jsou antibiotika peptidová, kam spadá například polymyxin, colistin a bacitracin; glykopeptidová antibiotika, například vankomycin a teikoplanin (Lefnerová, Šimůnek, 2016).

Účinky antibiotik rozlišujeme dle jejich způsobu omezení šíření cílových mikroorganismů. Typy antibiotik jako jsou například peniciliny nebo aminoglykosidy jsou schopny usmrtit mikroorganismy bez zásahu do humorální nebo imunitní obrany buňky. Tato vlastnost je označována jako baktericidní. Jiná antibiotika, například sulfonamidy a tetracykliny, reversibilně inhibují základní metabolické procesy cílových mikroorganismů. Po poklesu jejich koncentrace v prostředí, se životní projevy postižených mikroorganismů postupně vrací k normálním funkcím. Tato aktivita je označována jako bakteriostatická (Scherris, 1990). Toto základní rozdělení účinku nemusí být vždy plně platné. Bakteriostatická antibiotika v určitých množstvích mohou působit letálně pro jiné mikroorganismy, ale zároveň jsou druhy mikroorganismů, na které bakteriocidní antibiotika nepůsobí ani ve vyšších koncentracích a pouze slabě inhibují jejich životní projevy.

Významnými producenty antibiotik jsou aktinomycety, konkrétně rod *Streptomyces*. Z pohledu chemické struktury tento rod bakterií vytváří velmi rozmanitá antibiotika. Nejčastějšími typy jsou antibiotika oligosacharidová, polyenová a tetracyklinová. Antibiotika produkují také mikromycety. Neopomenutelnou hodnotu mají peniciliny produkované rodem *Penicillium*. Menší význam mají cephalosporiny, strukturou jsou podobné penicilínům. Převážná část ostatních plísňových antibiotik, vytvářených například rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Verticillium*, jsou vysoce toxická pro člověka i zvířata. Antibiotika ve velmi malé míře produkují i bakterie. Například bakterie rodu *Bacillus* produkují antibiotika polypeptidové povahy. Tato antibiotika nemají takový význam, jako antibiotika produkovaná streptomycetami (Šilhánková, 2002).

2.2.1.2 Bakteriociny

Bakteriociny jsou vysoce specializované proteiny, které vznikají syntézou na ribozomech bakterií. Exprese těchto proteinů přináší producentům selekční výhodu oproti konkurenčním bakteriím. Baktericidní účinek je zpravidla zaměřen na blízce příbuzné kmeny stejného druhu nebo čeledi (Cornut et al., 2008). Bakteriociny jsou účinnější proti grampozitivním bakteriím, než gramnegativním. Významnou a nejvíce studovanou skupinou bakteriocinů, které produkují gramnegativní bakterie, jsou koliciny. Tyto exoproteiny jsou cytotoxické povahy a jsou produkovány během růstu bakterií. Producenty jsou kolicinogenní kmeny *Escherichia coli* a některé příbuzné druhy čeledi *Enterobacteriaceae* (Scherris, 1990). Další bakteriociny, produkované střevními gramnegativními bakteriemi, jsou mikrociny. Mají menší molekuly než koliciny, jsou termostabilní, hydrofobní a rezistentní k vyššímu pH. Typickým producentem mikrocinů je druh *Klebsiella pneumoniae* (Gillor et al., 2005). Producentem bakteriocinů jsou také kmeny gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, které vytvářejí bakteriociny označované jako pyociny (Michel-Briand 2002). Dalším příkladem jsou vibriociny, produkované různými druhy rodu *Vibrio*, které mají široké antibakteriální účinky proti rodům čeledi *Enterobacteriaceae* ((*Escherichia, Shigella, Klebsiella*) (Datta a Prescott 1969).

Významnou skupinou grampozitivních bakterií, které jsou schopny vytvářet bakteriociny, jsou bakterie mléčného kvašení. Bakteriociny vytvořené touto skupinou bakterií jsou označovány jako lantibiotika. V praxi nejvýznamnějším zástupcem této skupiny látek je nisin. Nisin je jako jediný bakteriocin schválený pro použití v potravinách ve více než 50 zemích světa (Lucera et al., 2012; O´Sullivan, 2012). Získává se z bakterie *Lactococcus lactis* a jeho aktivita je prokázaná proti grampozitivním bakteriím jako je *Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus* (Rajendran et al., 2013). Narušuje cytoplasmatickou membránu, což způsobuje únik intracelulárních organel, metabolitů a rozptýlení membránového potenciálu (Lucera et al., 2012). Účinnost nisinu proti gramnegativním bakteriím se podporuje přidáním látek, které rozrušují vnější ochrannou vrstvu buněčné membrány a gramnegativní bakterie jsou tak citlivější (Belfiore et al., 2007).

2.2.2 Antimikrobiální látky produkované rostlinami

Rostliny jsou již od dávných dob hojně využívány jako koření, konzervační látky, ale i jako tradiční léčiva. Potravinám dodávají chuť, barvu, ale důležitá je i jejich antioxidační a antimikrobiální aktivita, díky které prodlužují údržnost potravin (Lai&Roy, 2004). Rostlinné látky vykazující antimikrobiální aktivitu jsou sekundární metabolity. Tyto látky chrání rostliny zejména proti bakteriím a virům, ale i proti hmyzu a býložravcům. Hlavní skupiny látek, které zprostředkovávají antimikrobiální aktivitu sekundárních metabolitů rostlin, jsou sloučeniny fenolické povahy, fenolové kyseliny. Dále chinony, saponiny, flavonoidy, taniny, kumariny, terpenoidy a v neposlední řadě také velmi rozsáhlá skupina alkaloidů (Cowan, 1999; Ciocan&Bara, 2007). Změny struktury a chemického složení těchto látek vedou k rozdílům v jejich antimikrobiálním účinku (Savoia, 2012), strukturní rozmanitost je obrovská a právě strukturní konfigurace jednotlivých sloučenin nejvíce ovlivňuje efektivitu antimikrobiální účinku. Největší strukturální rozmanitost byla zjištěna u fenolických sloučenin, hydroxylová skupina charakteristická pro tyto sloučeniny narušuje membránové struktury bakterií a způsobuje únik buněčných komponent (Xue et al., 2013). Tímto mechanismem působí například thymol a karvakrol, monoterpenové fenolové deriváty cymenu obsažené v silici tymiánu obecného (Ultee et al., 2002). Fenolová skupina má také antioxidační vlastnosti, potlačuje tak vznik reaktivních molekul kyslíku, ukládání volných radikálů, čímž snižuje redoxní potenciál a díky tomu omezuje růst mikroorganismů (Stojkovič et al., 2013). Účinnost thymolu a karvakrolu byla testována a potvrzena na bakterii *Staphylococcus aureus* (Alcaraz et al., 2000) a *Bacillus cereus* (Ultee et al., 2002).

Gochev et al., (2010) popisuje význam násobných vazeb při testování antimikrobiálních účinků. Testovali citronellol, geraniol a nerol, látky nacházející se v silicích několika různých druhů rostlin, proti bakteriím *Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* a kvasince *Candida albicans*. Prokázali, že citronellol je méně účinný díky přítomnosti pouze jedné násobné vazby ve své struktuře, oproti geraniolu a nerolu, které mají násobné vazby dvě a vykazovaly vyšší antimikrobiální aktivitu proti těmto testovaným bakteriím.

Antimikrobiální aktivita byla testována a dokázána u výtažků ze semen hroznů. Ozkan et al., (2004) testovali bakterie *Aeromonas hydrophila, Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Mycobacterium smegmatis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus, Yersinia enterocolitica* a prokázali inhibici růstu těchto bakterií. Friedman et al. (2013) testovali a prokázali antimikrobiální vlastnosti olivového oleje na

kmenech bakterií *E. coli, L. monocytogenes, Salmonella. enterica,* a *S. aureus* pomocí kvantitativního testu baktericidní aktivity. Oleje získávané z rostlin jsou tvořeny zejména těkavými aromatickými sloučeninami a označují se jako oleje esenciální, nebo éterické. Významné jsou jejich antivirové, antioxidační a protizánětlivé účinky, efektivně odpuzují hmyz a mají antinociceptivní vlastnosti. Byla potvrzena schopnost těchto olejů zvyšovat prostupnost jiných léků a testuje se, zda mohou mít i protirakovinné působení. Užívání éterických olejů při léčbě bolestí, zánětů, nebo onemocnění způsobených viry je dnes velmi rozšířené, přestože princip účinků není plně objasněn (Adorjan&Buchbauer, 2010).

2.2.3 Antimikrobiální látky produkované živočichy

Živočichové vytvářejí antimikrobiálně působící látky sliznicemi a žlázami a chrání tak svůj organismus, nebo organismus čerstvě narozeného mláděte před napadením bakteriemi či viry. Antimikrobiální látky jsou bílkovinného charakteru, enzymové nebo neenzymové povahy. Antimikrobiálně působící enzymy jsou bakteriolytické, tedy způsobují lýzu (rozklad) buňky nejčastěji rozrušením buněčné membrány. Mezi nejvýznamnější látky tohoto charakteru patří lysozym a laktoperoxidasa, příkladem neenzymově působících antimikrobiálních látek mohou být transferriny, kam se řadí laktoferin, laktofericin, ovotransferin a další. U vyšších živočichů mohou být za antimikrobiální látky považovány i sloučeniny ze skupiny imunoglobulinů. Imunoglobuliny tvoří podstatu imunitního systému, komplikovaného mechanismu rozlišování cizorodých látek v organismu a obrany proti nim. Imunoglobuliny zprostředkovávají imunitní reakci, na základě které proběhne účinné zneškodnění cizorodých mikroorganismů. Přesné kroky jednotlivých imunitních reakcí nejsou plně prozkoumány a mechanismus fungování je podstatně složitější, než je tomu například u bakteriolytických enzymů mikroorganismů (Ferenčík et al., 2004).

Lysozym je enzym, který se přirozeně vyskytuje v ptačích vejcích, mateřském mléce savců, ale i v slzách a slinách. Antimikrobiální aktivita je daná schopností hydrolyzovat vazbu β-1,4 mezi kyselinou N-acetylmuramovou a N-acetylglukosaminem v peptidoglykanu, který tvoří buněčnou stěnu mikroorganismů, zejména grampozitivních bakterií. Tím způsobí rozpad buněčné stěny a následnou lýzu buňky vedoucí k jejímu zániku (Juneja et al., 2012). Bývá hojně využíván v potravinářství k prodloužení trvanlivosti rychle se kazících potravin, jako je například maso a masné výrobky, ryby, mléko, ovoce a zelenina (Cegielska-Radziejewska et al., 2009), a při výrobě sýrů zabraňuje tzv. pozdnímu duření sýrů způsobeného bakterií *Clostridium tyrobutyricum* (FDA, 1998).

Laktoferin je glykoprotein obsažený v mateřském mléce, slzách, slinách a v nejvyšší koncentraci v kravském kolostru. Má hlavně antibakteriální a antivirové účinky, reguluje imunitní funkce u mláďat, stimuluje proliferaci a diferenciaci střev, chrání střevní mikroflóru mláďat, adsorbuje ionty železa ve střevním traktu, které jsou nezbytné pro metabolismus některých bakteriálních patogenů. Bylo zjištěno, že vykazuje antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru bakterií a virů (Lönnerdal, 2011). Spolehlivě potlačuje růst kmenů bakterií *L. monocytogenes, Escherichia coli,* kvasinky *Klebsiella* (Murdock et al., 2007), *Cronobacter* (Al-Nabusi et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že působí antimykoticky, antikarcinogenně a imunostimulačně (Dolan et al., 2010).

Dalším významným obranným mechanismem je laktoperoxidázový systém. Tento systém se skládá ze tří synergicky působících složek – enzymu laktoperoxidázy, thiokyanatanu a peroxidu vodíku. Laktoperoxidasa je produkovaná epiteliárními buňkami mléčné žlázy skotu. V přítomnosti peroxidu vodíku, který je produktem bakterií, oxiduje thiokyanát, látky získanou ze zeleného krmení, nejvíce z luštěnin, na hypotiokyanát. Tento produkt destruuje vnitřní membránu bakterií. Díky tomuto systému je možné prodloužit dobu trvanlivosti mléka zvýšením koncentrace thiokyanatanu a peroxidu vodíku bez přidání umělých konzervantů nebo použití jiných konzervačních postupů (Vlková et al., 2009).

Korýši a členovci produkují látku zvanou chitosan, což je polykationický biopolymer, vyskytuje se zejména v exoskeletech těchto živočichů. U chitosanu byla také zjištěna antimikrobiální aktivita. Prokázána byla proti bakteriím *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Escheriachia coli, Shigella dysenteriae* a *Salmenolla Typhimurium* (Chung et al., 2011). Využití antimikrobiálního charakteru chitosanu je zejména v potravinářském průmyslu, kde může sloužit jako účinný konzervant a prodlužovat údržnost rychle se kazících potravin, jako jsou například ústřice a jiné mořské plody, nebo mléko (Cao et al., 2009).

2.2.4 Antimikrobiální látky produkované řasami a vyššími houbami

Biologicky aktivní sloučeniny produkované řasami a houbami proti patogenům nedávno získaly značnou pozornost jako nový zdroj přírodních antimikrobiálních látek (Bhagavathy et al., 2011). Bylo zjištěno, že mají taktéž antivirotické vlastnosti, antibiotické, antioxidační, protizánětlivé, cytotoxické, antimitotické a další (Plaza et al, 2010; Bhagavathy et al., 2001).

Antimikrobiálně působící látky byly nalezeny například v řase *Himanthalia elongate* a mikrořasách *Synechocystis* spp. Testováním byla ověřena jejich účinnost proti bakteriím

Escherichia coli a *Staphylococcus aureus* (Plaza et al., 2010). Antimikrobiální aktivita byla zjištěna u fluorotaninů izolovaných z mořských hnědých řas (Eom et al., 2012), fotosyntetických pigmentů (Smith et al., 2010), bromfenolů (Yamada et al., 1985), terpenoidů, kyseliny akrylové, řady fenolických sloučenin, steroidů, cyklických polysulfidů a mastných kyselin (Watson&Cruz-Rivera, 2003).

Houby mají velmi rozšířené využití jako potravinové doplňky a zároveň jako zdroj antibiotik a antioxidantů (Kalyoncu et al., 2010). Velmi oblíbená je houba hlíva ústřičná (*Pleurotus ostreatus*), která je již běžně k zakoupení jako potravinový doplněk, ale má i široké zastoupení v mnoha pokrmech. U hlívy byly prokázány imunostimulační účinky, cytotoxické (Sarangi et al., 2006) a antioxidační vlastnosti (Jayakumar et al., 2006) dále také bylo prokázáno, že snižuje sérový cholesterol (Bobek et al., 1991). Hojně rozšířená, zejména v Asii, je houba Shiitake, jejíž testování potvrdilo inhibici růstu grampozitivních i gramnegativních bakterií, včetně *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Hlavní účinnou látkou je pravděpodobně sloučenina lentinan (Rao et al., 2009).

2.3 Biologicky aktivní látky produkované mechovci

Zájem vědců se při hledání nových účinných látek přesouvá do doposud neprobádaných stanovišť se širokou škálou nových živočišných a rostlinných druhů. Velmi slibně se jeví organismy žijící v moři (Blunt et al., 2004; Blunt et al., 2006).

Mořské mechovky jsou potenciálním zdrojem farmakologicky užitečných látek. Obsahují antibakteriální, antifungální, antivirové a antiparazitické látky. Bylo zjištěno více než 5300 různých biologicky aktivních látek mořských mechovek a jejich symbiotických organismů, každý rok je objeveno dalších 200 nových. Patří sem například látka ara-A (vidarabin) antivirová látka užívaná proti herpes simplex viru encefalitidy; menzamin, látka aktivní proti malárii, tuberkulóze a HIV, lasonolidy, látky s antifungálními vlastnostmi; psammaplin A s antibakteriálními účinky (Laport et al., 2005). Dále látka s protinádorovým účinkem – spongistatin; mykaslamidy A a B, které inhibují syntézu bílkovin způsobující apoptózu; pateamin, které mají imunosupresivní a apoptotické vlastnosti; pelorusid s antibiotickou aktivitou (Dunlap et al., 2007). Protizánětlivé účinky vykazují látky manolid a luffarielloid (Ebada et al., 2010), skupina látek chondropsinu, která inhibuje růst nádorů (Dunlap et al.,

2007). Antiproliferační účinky byly prokázány u halichondrinu (Molinsky et al., 2009) a geodiamolidu A, B, H (Mayer&Gustafson 2008).

Mechovky tvoří poměrně málo prozkoumanou část mořských živočichů, ačkoliv je známých již přes 8000 druhů, a každým rokem nové taxony stále přibývají, usuzuje se, že je charakterizováno pouhé 1 % biologicky aktivních látek, které mechovci produkují (Hayward&Ryland, 1998). Mořští i sladkovodní mechovci jsou hostiteli nejen celých komunit mikroorganismů, ale i malých bezobratlých organismů (Peters et al., 2003). Syntetizují a uvolňují do okolí chemické látky, které je chrání proti predátorům, patogenním mikroorganismům a onemocněním (Al-Ogily&Knight-Jones, 1977; Lopanik et al., 2004). Mnohé studie, které se týkají původu přírodních látek produkovaných mechovci, nabízí otázku, které látky jsou opravdu syntetizovány koloniemi mechovců a které jsou produkovány mikrobiálními endosymbionty (Anthony et al., 1990). Na podporu této hypotézy existují příklady látek, které byly izolovány z mechovců, ale ve skutečnosti je mechovky neprodukují. Metabolity mechovek mají podobnost s mnoha metabolity izolovanými z jiných mořských nebo i suchozemských tvorů (Sharp et al. 2007).

Mechovky produkují nejen látky využitelné v terapii, ale také metabolity, které mohou být pro člověka toxické. Například mořská mechovka *Alcyonidium diaphanum* produkuje látku obsahující sulfoxonioový ion, která způsobuje alergické záněty kůže (Carle&Christophersen, 1980; Carle&Christophersen, 1982). Nejvíce postiženi bývají rybáři, kteří přijdou do častého kontaktu s *A. diaphanum* při výlovu ryb (Bonnevie, 1948; Pathmanaban et al., 2005). Akutní případy mohou končit vážnými otoky nohou a ramen (Seville 1957; Newhouse 1966). Tato mechovka je velmi vzácná a nachází se pouze subliterárně v britských rybolovných oblastech (Porter et al., 2002). *Zoobotryon verticullatum* je známá produkcí látky označené 2,5,6-tribromo-N-methylgramin, která je schopna inhibovat buněčné dělení (Sato&Fenical, 1983) a látky 2,5,6-tribromo-N-methylindol-3-carbaldehyd (Ortega et al., 1993), u které je prokázáno, že pozastavuje metamorfózu u vajíček mořských ježků. Rovněž inhibují kondenzaci chromatinu, rozpad jaderného obalu a vytvoření mitotického dělícího vřeténka. Tento mechanismus brání dělení buněk, což se jeví jako slibný způsob zabránění rakovinného bujení u člověka. Je možné, že se tímto způsobem mechovka brání přemnožení bezobratlých na jejím povrchu a ve vnitřním gelu (Moubax et al., 2001). Příbuzná *Zoobotryon pellucidum* produkuje velmi podobou sloučeninu, 2,5,6-tribrom-1methylgramin, která zabraňuje osídlení svého povrchu larvami svijonožců *Balanus amphitrite* a mušlí *Mytilus edulis* (Konya et al., 1994). Podobnost sloučenin produkovaných těmito příbuznými mechovkami naznačuje obdobnou funkci vypořádání se s jinými přisedavými bezobratlými živočichy na jejich povrchu nebo

v bezprostřední blízkosti. Tímto způsobem s nimi soupeří o prostor, kde mohou přisednout se svými koloniemi a zároveň udržují povrch kolonie neosídlený (Nandakumar et al., 1994; Scholz&Krumbein, 1996).

Bylo zjištěno, že mechovka *Amanthia convoluta* produkuje látku amathamid (Blackman et al., 1993), konvolutamin (Narkowiczet al., 2002), konvolutamid (Zhang et al., 1994), konvoluindol (Narkowiczet al., 2002) a další. Biologická aktivita těchto sloučenin nebyla podrobně popsána, ale je jasné, že mají cytotoxickou aktivitu a působí proti lidským nádorovým buňkám. Z klinického hlediska je toto velmi zajímavé, protože takovéto sloučeniny mají potenciál a mohou z nich být vytvořeny nové léky. Další metabolity produkované *Amanthia convoluta* dokáží inhibovat buněčné dělení jiných druhů a zabraňují tak jejich růstu v blízkém okolí kolonie mechovky (Sharp et al., 2007). Konvolutamin a konvolutindol vykazují nematocidní aktivitu proti volnému larválnímu stádiu hlístice *Haemonchus contortus*, častého parazita ovcí a přežvýkavců (Narkowiczet al., 2002). Tyto látky mají vyšší účinnost než komerčně dostupné léky a díky tomu mají vysoký potenciál v budoucím využití jako nová léčiva (Sharp et al., 2007). U metabolitů příbuzné *Amanthia alternata* byla zjištěna antimikrobiální aktivita proti grampozitivním bakteriím *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus,* a *Enterococcus faecium* (Lee et al., 1997).

Další látky vykazující cytotoxickou aktivitu byly prokázány u mechovky *Biflustra perfragilis*. Tato mechovka produkuje sloučeniny isochinolinové povahy, označované jako perfragiliny. Cytotoxická aktivita byla úspěšně testována na lidských rakovinných buněčných liniích (Schmitz et al., 1990). Struktura perfragilinů je velmi podobná chemické struktuře mimosamycinu izolovaného z bakterie *Streptomyces lavendulae*. Mimosamycin byl nalezen a dokumentován u řady organismů jak suchozemského tak mořského původu. Podobnost mezi pergragilinem a mimosamycinem vede k hypotéze, že perfragiliny nejsou metabolity mechovky, ale právě symbiotické bakterie (Choi et al., 1993). Blackman et al. (1993) úspěšně provedli izolaci dalších dvou isochinolinových chinonů z *Biflustra perfragilis* a potvrdili inhibiční účinek těchto látek proti několika mořským bakteriálním kmenům. Sloučeniny také prokázaly svou aktivitu při testování mortality na krevetách. Blackman et al. (1993) uvádějí, že právě tato aktivita metabolitů *B. perfragilis* je odpovědná za nízké osídlení kolonie jinými druhy bezobratlých a bakteriemi a zároveň ochraňuje před možnými predátory.

Metabolity s antimikrobiální aktivitou byly objeveny také u mechovky *Flustra foliacea*. Jde o mechovku s hojným výskytem. Nejdříve bylo prokázáno, že inhibuje růst bakterie *Staphylococcus aureus* a že extrakty z *F. foliacea* snižují počty larev bezobratlých osídlující její gelové kolonie (Al-Ogily&Knight-Jones, 1977). Dále byl objeven citronellol, nerola

geraniol, látky, které jsou známé jako chemické signální molekuly pro suchozemské organismy, například včely. Jejich funkce u této mechovky není přesně známa (Schmidt, 2001). Bližší identifikace biologicky aktivních látek *F. foliacea* objevila antibiotické účinky sloučeniny flustramin, která byla účinná proti bakterii *Bacillus subtilis*, houbám *Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum, Saccharomyces cerevisiae, Botrytis cinera* (Holst et al., 1994) a také *Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Serratia marcescens* a *Pseudomonas aeruginosa* (Laycock et al., 1986). U extraktů *F. foliacea* byly zdokumentovány toxické účinky na larvy bezobratlých a ryby (Dyrynda et al., 1985).

Nejznámějším producentem biologicky aktivních látek je mechovka *Bugula neritina* díky objevu bryostatinu 1 v roce 1982 (Pettit et al., 1982). Následné studie se zaměřují zejména na biologické a klinické účinky této látky. Při první izolaci bylo zjištěno, že bryostatin 1 vykazuje vysoké hladiny cytotoxické aktivity proti lymfocytární leukemii a melanomu (Pettit et al., 1991). Dále bylo zjištěno, že bryostatin 1 může inhibovat, ale i stimulovat produkci proteinové kinázy C (Szallasi et al., 1995), podporuje normální růst buněk kostní dřeně (Berkov et al., 1993) a stimuluje tvorbu interleukinu (Schield et al., 1994).

2.3.1 Bryostatiny

Bryostatiny, neboli makrolidové laktony, jsou považovány za velmi důležitou a slibnou skupinu látek s využitím v lékařství (Dunlap et al., 2007). Dlouho bylo předpokládáno, že producentem těchto látek jsou symbiotické organismy mechovky (Paul et al., 2007). Bryostatiny jsou produkovány symbiotickou bakterií *Candidatus Endobugula sertula*, která je přítomná ve všech životních stádiích *B. neritina* (Lopanik et al., 2004b). Chrání larvy během embryonálního vývoje a přetrvávají na jejich povrchu během metamorfózy (Sharp et al., 2007). V průběhu metamorfózy zůstává *E. sertula* v larválním palliálním epitelu a následně je začleněna do tkáňové vrstvy cystidu, ze kterého se vyvíjí nový zooid v kolonii. U dospělé mechovky byl bryostatin identifikován na povrchu kolonie (Šinko et al., 2012).

Biologicky aktivní látky, které produkují symbiotické bakterie *B. neritina*, se velmi liší podle místa původu kolonie. Různé populace *B. neritina* obsahují různé bryostatiny (Davidson&Haygood, 1999). U kolonií *B. neritina* žijících v mořích USA byly identifikovány různé druhy bryostatinů, tzv. chemotypy (Paul et al., 2007). Výsledky genetických analýz těchto různých bryostatinů naznačují, že se ve skutečnosti jedná o různé typy (Šinko et al., 2012). *B. neritina* obsahuje odlišné kmen *E. sertula,* které se liší na ve čtyřech nukleotidech v genu pro malou podjednotku ribozomální RNA (SSU rRNA). Kmeny *E. sertula* mají odlišný genotyp – každý z nich produkuje různý bryostatin. Rozdíly jsou tedy pravděpodobně dány

rozdílným genotypem produkčního organismu a nikoli prostředím. Což může znamenat, že se v různých prostředích vyskytují různé genotypy *E. sertula*. Chemotypy bryostatinů se liší podle toho, v jaké hloubce kolonie mechovky žila a jaká byla teplota vody. Bylo zjištěno, že bryostatin 1 byl přítomen pouze u kolonie z hlubiny a studené vody (Mendla, 2003). Některé severní formy *B. neritina* vůbec nemají symbiotické bakterie *E. sertula* a larvy mechovky bryostatiny neobsahují (McGovern&Hellberg, 2003). Bryostatiny byly také nalezeny u slimáků *Polycera atra* čeledi Nudibranchia, kteří se živí na povrchu kolonií *B. neritina* a kladou na ní svá vajíčka (Paul et al., 2007). Bryostatiny byly nalezeny i u dalších mořských živočichů, mechovka *Bugula neritina* není tedy jediným zdrojem těchto substancí (Manning et al., 2005).

Existuje nejméně 20 různých chemických struktur bryostatinu (Manning et al., 2006; Sun and Alkon, 2006; Hale&Manaviazar, 2010). Bylo zjištěno, že bryostatin v malé koncentraci (0,1 – 0,5 ng/ml) významně zvyšuje paměť, v koncentraci vyšší (<1,0 ng/ml) měl na paměť negativní účinky (Kuzirian et al., 2006). Bryostatin lze také využít k léčbě (Mehla et al., 2010) a k prevenci propuknutí infekce HIV-1 (Ariza et al., 2011). Jiné léčebné účinky bryostatinů byly objeveny a dále testovány na centrální nervové soustavě (CNS) savců (Paul et al., 2007). Nejvíce studovaný je bryostatin 1 (Zhu et al., 2010). Testuje se jako potenciální medikament pro léčení leukémie, lymfomů, melanomů (Davidson&Haygood, 1999; Davidson et al., 2001). Dále má pozitivní účinky při traumatickém poškození mozku (Zohar et al., 2011), depresích, Alzheimerově chorobě a dalších poruchách centrální nervové soustavy (Sun&Alkon, 2006; Paul et al., 2007). Bylo zjištěno, že bryostatin 1 může podporovat imunitu (Ariza et al., 2001) a způsobuje intenzivní svalovou hyperalgézii (Alvarez et al., 2011). Ostatní skupiny bryostatinů mají také vysoký potenciál stát se léčivými přípravky (Davidson et al., 2001).

2.4 Symbiotické bakterie mechovců

Díky objevu bryostatinu u mořské mechovky se většina studií zabývá analýzou symbiotických bakterií zejména u mořských mechovců; sladkovodní mechovky a jejich osídlení mikroorganismy jsou prozkoumané mnohem méně. Pro ucelení literárního přehledu této práce je v následujících podkapitolách uvedeno pouze několik studií zabývajících se mikrobiotou mořských mechovců a jedna studie zabývající se mikrobiotou mechovce sladkovodního.

2.4.1 Symbiotické bakterie mořských mechovců

U mechovky *Flustra foliacea* žijící v Severním moři byla zkoumána mikrobiální diverzita symbiotických bakterií za použití metody částečné sekvenční analýzy 16S rDNA. Kolonie mechovce byly odebrány se dvou různých míst Severním moři a byl zjištěn značný rozdíl v zastoupení jednotlivých bakterií v celkové mikrobiální populaci. Odlišnosti byly zaznamenány i mezi koloniemi odebrané v různých časových intervalech v téže odběrové lokalitě. Rozborem kolonií z odběrového místa u ostrova Helgoland byly identifikovány převážně γ-proteobakteriemi *Schewanella frigidimarina, Pseudoalteromonas* ssp. a *Psychrobacter* ssp. Identifikace kultivovatelných symbiotických bakterií kolonií mechovce z druhého odběrového místa v okolí Steingrundu vedly k detekci směsné bakteriální populace. Složení bylo z většiny tvořeno γ- a α-proteobakteriemi. Tyto bakterie jsou nejběžněji izolovanými mikroorganismy z mořského prostředí, proto je možné vyvodit závěr, že mechovec *Flustra foliacea* přijímá kolonizaci svého povrchu bakteriemi, které jsou společně s ním obyvateli mořského prostředí (Pukall et al. 2001).

V rozsáhlém výzkumu Heindel at al. (2010) bylo shromážděno 21 vzorků 14 různých druhů mechovců z několika míst v Baltském a Středozemním moři. Z kolonií mechovců bylo izolováno 340 symbiotických bakterií, 101 vykazovalo antibiotickou aktivitu zejména proti grampozitivním kmenům bakterií. Dále bylo zjištěno, že ze středomořských druhů mechovců byly izolací získány výlučně kmeny rodů *Sphingomonas* a *Alteromonas.* Bakteriální izoláty identifikované z kolonií odebraných z Baltského moře byly kmeny *Shewanella, Marinomonas* a *Vibrio*. Bakterie jednoho kmene vyskytujících se u mechovců odebraných z obou stanovišť byly zástupci rodu *Pseudoalteromonas.*

V roce 1983 byli u mořské mechovky druhu *Watersipora* objeveni bakteriální symbionti připomínající třídu bakterií mollicutes z kmene Firmicutes. Tyto bakterie nemají peptidoglykanovou buněčnou stěnu. Anderson a Haygood (2007) použili polymerázovou řetězovou reakci (PCR), sekvencování 16S rRNA genu, specifické fluorescenční *in situ* hybridizace a fylogenetické analýzy, aby tyto symbionty identifikovali. Bylo zjištěno, že symbiotické bakterie izolované z mechovců žijících podél pobřeží Kalifornie ve skutečnosti náleží do kmene Proteobakteria. Role symbiotických proteobakterií byla prokázána u mořského mechovce *Bugula neritina*, kde zastávají chemickou obranu hostitelské larvy. Proto bylo předpokládáno, že v případě symbiózy s mechovcem Watersipora se tyto bakterie také podílejí na chemické obraně hostitelských larev. Tuto úvahu podpořil i fakt, že ze symbiotických bakterií mechovce Watersipora byla získána sloučenina velmi podobná již známé látce

chrysophanol (1,8-dihydroxy-3-methylanthraquinone), která chrání vajíčka brouků před mravenci (Hilker & Schulz, 1991).

2.4.2 Symbiotické bakterie sladkovodních mechovců

Doposud byla provedena pouze jediná studie, která popisuje izolaci a identifikaci bakterií osídlující kolonie sladkovodního mechovce.

Mikrobiotou žijící na povrchu a ve vnitřní gelové hmotě kolonií *Pectinatella magnifica* se zabývali Vlková et al. (2015). Kolonie mechovky byly odebrány celkem ze čtyř oblastí na Třeboňsku, z rybníku Cep, Hejtman, Kancíř a Veselí. Bylo izolováno celkem 135 čistých kmenů bakterií, u kterých se následně zkoumala morfologie pomocí fázově kontrastní mikroskopie a barvení podle Grama. Pro konečnou identifikaci bylo vybráno 44 kmenů, jejichž morfologické vlastnosti se lišily. Použita byla metoda sekvenování genu pro 16S rRNA a analýza hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí as ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátorem (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry - MALDI-TOF MS). Srovnáním výsledků identifikace těchto dvou nezávislých metod bylo zjištěno 27 případů, kdy se klasifikace bakteriálního druhu shodovaly. Další čtyři kmeny byly identifikovány pouze na rodovou úroveň.

Ve 27 případech byl identifikovaným bakteriálním druhem v koloniích *Pectinatella magnifica* druh *Aeromonas veronii.* Druhým nejrozšířenějším druhem byla *Aquitalea magnusonii* (9 kmenů), dále pak druhy: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (4 kmeny), *Aquitalea denitrificans* (3 kmeny), *Enterobacter aerogenes* (2 kmeny), *Herbaspirillum lusitanum* (2 kmeny), *Herbaspirillum huttiense* (2 kmeny). Po jenom kmenu byly zastoupeny druhy *Sphingomonas pituiosa, Pseudomonas moraviensis, Leuconostoc pseudomesenteroides, Chryseobacterium gambrini* a *Chryseobacterium culicis*.

U všech kolonií odebraných ze čtyř různých lokalit, byla pozorována vyšší bakteriální diverzita v gelové hmotně kolonie, než na jejích povrchu. U lokalit Hejtman a Veselí byl nejvíce identifikovaný druh bakterie *Aquitalea magnusonii*. Z oblasti rybníku Kanclíř byl nejpočetnějším druhem osídlující kolonie mechovky *Aeromonas veronii*. Nejvyšší bakteriální diverzitu vykazovaly vzorky odebrané z vnitřní gelové hmoty *Pectinatella magnifica* z rybníku Cep (Vlková et al., 2015).

2.5 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální účinek je vyjadřován kvalitativně nebo kvantitativně. Kvalitativní antimikrobiální účinek je výsledkem testování antimikrobiálně působících látek, na které mohou být mikroorganismy citlivé či rezistentní. V některých případech se vyjadřuje i mírná citlivost. Kvantitativně jsou vyjadřovány koncentrací látky, která buď inhibuje růst bakterií, nebo je hubí. Podle toho rozlišujeme testování minimální inhibiční koncentrace (MIC) a testování minimální baktericidní koncentrace (MBC) (Phillips et al., 1991).

Metody testování jsou rozlišovány na metody difúzní a metody diluční. Kvantitativní měření citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám o určité koncentraci, nebo stanovení neznámé koncentrace antimikrobiální látky je možné metodou difúzní. Výsledkem testování antimikrobiální látky je charakterizování bakterií na citlivé, přechodné (málo citlivé/rezistentní), nebo rezistentní). Citlivost nebo rezistence je určena podle toho, zda se kolem jamky nebo papírového disku s konkrétní antimikrobiální látkou vytvoří inhibiční zóna. Následná kvantifikace citlivosti mikroroganismů k příslušné antimikrobiální látce je provedena metodami dilučními. Stanovena je buď MIC, což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která viditelně inhibuje růst mikroorganismů, nebo MBC, tedy nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která bakterie usmrtí v 99,9%. MBC je určena subkultivací ze zkumavek nevykazujících žádné známky zakalení na médium bez antimikrobiální látky, a pozorováním růstu po následné inkubaci. Při těchto metodách je citlivost mikroorganismů určována sériovým dvojkovým ředěním testované látky v agaru nebo v bujónu. Mezi diluční metody je řazena i tzv. „breakpoint“ metoda neboli metoda testování hraničních hodnot. Princip je v podstatě stejný, jako při stanovení MIC, testována je však jen jedna nebo dvě koncentrace. Koncentrace zvolené pro testování jsou takové, které odpovídají hraniční koncentraci oddělující jednotlivé kategorie citlivosti. Tuto metodu je možné použít jako alternativu difúzních testů (Collins et al., 1995).

2.5.1 Difúzní metody

Difúzní metody testů slouží ke stanovení koncentrace určité antimikrobiální látky nebo k měření citlivosti mikroorganismů na danou antimikrobiální látku. Podstata těchto testů se nezměnila již 40 let. Pro testování je vhodné použít médium přímo navržené pro testy citlivosti. Sterilní médium se ve vodní lázni vytemperuje na 50 °C, poté se asepticky nalije se do Petriho misek do výšky 3 – 4 mm. Pokud nejsou připravené misky s médiem použity, lze je při teplotě 4 °C skladovat 1 týden. Inokulát může být připraven z plně narostlých kultur na živné půdě nebo ze suspenze kolonií emulgovaných v bujónu tak, aby hustota odpovídala koloniím ze živné půdy. Bakteriální kulturu je možné zaočkovat přímo do Petriho misky, zalít vytemperovaným

agarem a následně promíchat, nebo aplikovat inokolum na suchý a tuhý povrch agarové plotny. Suchým a sterilním tamponem se docílí rovnoměrného rozetření inokulátu. Poté se na povrch média aplikují disky napuštěné testovacími antimikrobiálními látkami. Na Petriho misku o průměru 9 cm je možné aplikovat 4 až 6 disků pomocí sterilní pinzety, ostré jehly nebo dispensoru. Je také možné vytvořit v zatuhlém agaru pomocí korkovače jamky a do nich dávkovat roztok antimikrobiální látky o dané koncentraci. Látky, které jsou napuštěné v discích nebo nadávkované v jamkách, difundují do agaru. Kultivace misek probíhá při 35 – 37 °C 24 nebo 48 hodin podle testovaného bakteriálního kmenu. Měření inhibičních zón probíhá od konce disku k okraji zóny. Kmeny rezistentní vytvářejí inhibiční zónu menší než 2 mm nebo ji nevytvářejí vůbec. Málo citlivé kmeny vytváří inhibiční zónu větší než 2 mm, ale zároveň o 3 mm menší než kontrolní kmen. Citlivé kmeny bakterií v okolí disku nenarostou vůbec (Collins et al., 1995).

Pomocí citlivých mikroorganismů, lze stanovit koncetraci antimikrobiální látky. Sterilní, vytemperované médium se nadávkuje do Petriho misky s inokulem citlivých bakterií. Po zatuhnutí agaru jsou do plotny vytvořeny jamky, do kterých se následně sterilní špičkou pipetují standardy antimikrobiální látky o známé koncentraci a vzorek o koncentraci neznámé. Velikost inhibičních zón vytvořených okolo jamek je přímo závislá na koncentraci látky. Po sestrojení kalibrační křivky je výpočtem určena koncentrace antimikrobiální látky v neznámém vzorku (Osserman at Lawlor, 1966).

2.5.2 Diluční metody

Diluční metody testování citlivosti mikroorganismů na antimikrobiální látky slouží k určení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Média použitá k testování citlivosti by měla být speciálně k tomuto účelu uzpůsobená. K testování se používají agarová média a bujonová živná média. Tuhá agarová média mají tu výhodu, že je na nich dobře rozpoznatelná kontaminace a snadněji se izoluje od testovaného kmene, oproti tekutým živným médiím. Rozsah MIC závisí na testovaném kmeni a druhu antimikrobiální látky. V rozsahu MIC jsou zahrnuty tzv. „breakpoint“ hodnoty koncentrací, které definují testovaný bakteriální kmen jako citlivý, málo citlivý nebo rezistentní.

Agar zvolený k testování se připraví a vytemperuje na 50 °C ve vodní lázni. Testovaná antimikrobiální látka se rozředí geometrickou řadou (20, 10, 5, 2,5, 1,25). Na Petriho misku o průměru 9 cm se nadávkuje 20 ml roztaveného agaru (19 ml agaru + 1 ml testované antimikrobiální látky o známé koncentraci) a při laboratorní teplotě se nechá zatuhnout. Po zatuhnutí a vysušení povrchu se do agaru vytvoří jamky, do kterých se dávkují inokuláty

různých kmenů bakterií. Kultivace probíhá při optimální růstové teplotě pro testované bakteriální kmeny. Výsledkem testování je zjištění nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která kompletně inhibuje růst bakteriálního kmene.

Další variantou zjišťování MIC je použití bujonového dilučního testu. Antimikrobiální látky jsou ředěné stejným způsobem jako u agarových dilučních testů a jsou přimíchány do tekutého bujonu. Inokulát, dávkovaný do bujonu, by měl optimálně obsahovat $5x10^6$ buněk. Kultivace lahviček s bujonem probíhá za teploty optimální pro růst daného bakteriálního kmene. Výsledná MIC je vyhodnocena objektivně, a je jí koncentrace antimikrobiální látky v lahvičce, která nemá ani mírný zákal a je naprosto čirá (Collins et al., 1995).

Mezi diluční metody jsou řazeny také způsoby testování ve velmi malých objemech. Tyto metody jsou označovány jako mikrodiluční a celkový testovaný objem je 0,1-0,2 ml. Testování se provádí na mikrotitračních destičkách. Tento způsob testování je díky malému použitému objemu vhodný pro testování velkého množství vzorků, což se využívá zejména v klinických laboratořích. Vyhodnocení MIC je obdobné vyhodnocení MIC u bujonového dilučního testu. MIC je koncentrace antimikrobiální látky, při které nejsou mikroorganismy schopné růstu a zkumavka je čirá (Hecht et al., 1999).

3 Hypotéza

Vzhledem k ověřeným poznatkům o produkci antimikrobiálně působících látek mořskými mechovci lze předpokládat, že sladkovodní mechovka *Pectinatella magnifica* nebo její symbiotické bakterie jsou schopny produkovat antimikrobiálně působící látky.

4 Cíl práce

Cílem diplomové práce je testování antimikrobiální aktivity symbiotických bakterií a různých typů extraktů připravených z lyofilizátu mechovky *Pectinatella magnifica*.

5 Metody a materiály

Následující podkapitoly popisují experimentální část této diplomové práce. Zabývají se testováním antimikrobiální aktivity bakterií izolovaných z kolonií *Pectinatella magnifica* a různých typů extraktů připravených z lyofilizátu celých kolonií této mechovky vyskytující se převážně na území jižních Čech.

5.1 Testované kmeny bakterií

Antimikrobiální aktivita bakterií izolovaných z *Pectinatella magnifica* (celkem 92 izolátů z roku 2015) byla testována proti 14 potenciálně patogenním bakteriím a bakteriím způsobující kažení potravin (viz. tabulka 1), izoláty byly testovány proti blízce příbuzným kmenům taktéž izolovaných z bochnatky.

Dále byla testována antimikrobiální aktivita pěti různých extraktů proti 22 indikátorovým bakteriím, zahrnující navíc i probiotické bakterie *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20215 a *Lactobacillus brevis* CCM 3805 (viz. tabulka 2).

Tabulka 1: Seznam indikátorových kmenů

Taxonomické zařazení	Původ
Bacillus cereus CCM 2010	sbírkový kmen
Clostridium dificille CCM 3593	sbírkový kmen
Clostridium perfringens DSMZ 11778	sbírkový kmen
Clostridium perfringens CCM 4435	sbírkový kmen
Enterobacter aerogenes CCM 7797	sbírkový kmen
Enterococcus faecalis KMVD	trávicí trakt dospělého člověka
Escherichia coli ATCC 25922	sbírkový kmen
Escherichia coli KMVD	trávicí trakt dospělého člověka
Listeria monocytogenes ATCC 7644	sbírkový kmen
Micrococcus luteus ATCC 10240	sbírkový kmen
Moraxella canis CCM 4590	sbírkový kmen
Propionibacterium acnes DSMZ 1893	sbírkový kmen
Salmonella enterica Enteritidis ATCC 13076	sbírkový kmen
Salmonella sp. KMVD	mleté maso
Serratia marcescens DSMZ 30121	sbírkový kmen
Staphylococcus aureus ATCC 25923	sbírkový kmen

Tabulka 2: Seznam indikátorových kmenů použitých při testování extraktů

Taxonomické zařazení	Původ
Acinetobacter parvus CCM 7030	sbírkový kmen
Bacillus cereus CCM 2010	sbírkový kmen
Bifidobacterium bifidum DSMZ 20215	sbírkový kmen
Clostridium difficile CCM 3593	sbírkový kmen
Clostridium perfringens CCM 4435	sbírkový kmen
Clostridium perfringens DSMZ 11778	sbírkový kmen
Enterobacter aerogenes CCM 7797	sbírkový kmen
Enterococcus faecalis KMVD	trávicí trakt dospělého člověka
Escherichia coli KMVD	trávicí trakt dospělého člověka
Escherichia coli O45 IS	sbírkový kmen
Escherichia coli O55 IS	sbírkový kmen
Lactobacillus brevis CCM 3805	sbírkový kmen
Listeria monocytogenes ATCC 7644	sbírkový kmen
Micrococcus luteus ATCC 10240	sbírkový kmen
Moraxella canis CCM 4590	sbírkový kmen
Propionibacterium acnes DSMZ 1893	sbírkový kmen
Pseudomonas aeruginosa CCM 1960	sbírkový kmen
Salmonella enterica Enteritidis ATCC 13076	sbírkový kmen
Salmonella enterica Typhimurium IS	sbírkový kmen
Salmonella sp. KMVD	mleté maso
Serratia marcescens DSMZ 30121	sbírkový kmen
Staphylococcus aureus ATCC 25923	sbírkový kmen

5.2 Příprava kultivačních médií a podmínky kultivace

Kultivace bakterií izolovaných z *Pectinatella magnifica* probíhala v Yeast extrakt-trypton bujonu (Oxoid) obohaceném o glukózu. Živná půda byla nadávkována do vialek po 9 ml, uzavřena a vysterilována. Pro kultivaci izolátů v anaerobním prostředí bylo tekuté médium před uzavřením řádně probubláno oxidem uhličitým technikou podle Hungate (Hungate, 1973).

Složení agaru bylo přizpůsobeno dle nároků idikátorových kmenů. Ve většině případů byly testované bakterie uvedené v tabulce 1 kultivovány na Wilkins-Chalgren agaru za podmínek uvedených v tabulce 3. Vyjímky v kultivaci jsou uvedené v tabulce 4.

Tabulka 3: Seznam použitých kultivačních médií

Název média	Složení/obohacení	Teplota kultivace	Způsob kultivace
Yeast extrakt-trypton-bujón (Oxoid)	Obohacený o glukózu (1 g/l)	24°C	aerobně/anaerobně
Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	Obohacený o cystein (0,5 g/l), sojový pepton (5 g/l) a tween 80 (1 ml/l)	37°C	anaerobně
Brain-heart infusion agar (Merck)	Příprava dle návodu výrobce	37°C	anaerobně

Tabulka 4: Seznam testovaných bakterií s odlišnými podmínkami kultivace

Taxonomické zařazení	Použitý agar	Teplota kultivace	Způsob kultivace
Bacillus cereus CCM 2010	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	30°C	anaerobně
Listeria monocytogenes ATCC 7644	Brain-heart infusion agar	37°C	anaerobně
Micrococcus luteus ATCC 10240	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	37°C	aerobně
Moraxella canis CCM 4590	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	30°C	aerobně

5.3 Testování antimikrobiální aktivity bakteriálních izolátů

Z plně narostlých bakteriálních izolátů byl do mikrozkumavek odebrán 1 ml suspenze, který byl odstředěn při 14 500 ot/min po dobu 5 minut. Získaný supernatant byl ihned přelit do čisté, sterilní mikrozkumavky, aby nedošlo k rozpuštění peletu bakteriálních buněk na dně a tím ke kontaminaci supernatantu.

Pro stanovení antimikrobiální aktivity bakteriálních izolátů byla použita metoda agarového difúzního testu. Nejprve byl připraven příslušný agar, který byl vysterilován a následně vytemperován na teplotu 50 °C ve vodní lázni. Testované kmeny vybraných indikátorových bakterií byly v množství 1 ml naočkovány na Petriho misku, pomocí sklopné pipety zality 20 ml připraveného agaru a krouživým pohybem na obě strany jemně promíchány, aby bylo dosaženo rovnoměrného nárůstu. Po zatuhnutí agaru, byly sterilním korkovrtem vytvořeny okraje 6 jamek v pravidelných rozestupech. Poté byl sterilní jehlou odstraněn vyříznutý agar. Pomocí automatické pipety bylo do každé z jamek nadávkováno 60 µl supernatantu. Na každé misce byla testována antimikrobiální aktivita třech bakteriálních izolátů ve dvou opakováních. Misky byly ponechány 4 hodiny v lednici, aby došlo k plné difuzi supernatantu do agaru. Následně byly misky umístěny do termostatu o optimální teplotě pro růst konkrétních testovaných bakterií, viz tabulka 3 a 4. Anaerobní bakterie byly kultivovány v anaerostatech za přítomnosti vyvíječe anaerobní atmosféry AnaeroGen (Thermo Scientific). Fakultativně anaerobní bakterie byly kultivovány při aerobních i anaerobních podmínkách. Antimikrobiální aktivita byla hodnocena jako průměr inhibičních zón v mm po 48 hodinách kultivace.

5.4 Testování antimikrobiální aktivity extraktů

Dále byla testována antimikrobiální aktivita extraktů z lyofilizovaných kolonií mechovky, připravených v Ústavu molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie na VFU v Brně. Konkrétně se jedná o extrakt methanolový (PM1), hexanový (PM2), chloroformový (PM3), ethyl-acetátový (PM4) a vodný (PM5). Lyofilizované extrakty byly rozpuštěny v 1% roztoku dimethylsufoxidu (DMSO) a zředěny na koncentraci 20mg/ml. Pomocí agarové difúzní metody bylo zjištěno, které indikátorové bakterie jsou na extrakty citlivé. Poté bylo provedeno stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) mikrodiluční metodou.

Nejdříve byl připraven příslušný kultivační bujón. Ten byl s konkrétní testovanou koncentrací extraktu nadávkován do 96ti jamkové mikrotitrační destičky v celkovém objemu 90 µl. koncentrace extraktů byla snižována dvojkovým ředěním od počáteční koncentrace 20 mg/ml. Následně bylo přidáno 10 µl suspenze indikátorového organismu o standardizované densitě 10^6 buněk, dle McFarlanderovy stupnice. Testování bylo provedeno ve trojím opakování. Jako negativní kontrola sloužilo kultivační médium s příslušnou koncentrací extraktu a jako kontrola pozitivní médium bez antimikrobiální látky pouze s inokulem indikátorového kmenu. Intenzita zákalu byla stanovena spektrofotometricky na přístroji INFINITE M200 TECAN při vlnové délce 420 nm, po 48 hodinách kultivace.

Jako MIC byla stanovena nejnižší koncentrace, při které byl inhibován růst více než 80 % indikátorových bakterií v porovnání s kontrolou. MBC byla určena jako nejnižší koncentrace, při které nedošlo k nárůstu indikátorového kmene bakterií, po subkultivaci 10 µl suspenze do média bez extraktu.

6 Výsledky

Celkem bylo testováno 90 supernatantů získaných z bakterií *Pectinatella magnifica* proti 14 indikátorovým bakteriím. Antimikrobiální aktivita byla prokázána u 8 bakteriálních izolátů, viz tabulka 5. Nejúčinnějším izolátem byl *Bacillus mycoides* kultivovaný za anaerobních podmínek, prokazatelně inhiboval růst indikátorových bakterií celkem v pěti případech. Při kultivaci v prostředí aerobním byla inhibice růstu indikátorových kmenů prokázána třikrát.

Methanolový (PM1), hexanový (PM2) a chloroformový (PM3) extrakt prokázal antimikrobiální účinek proti testovaným bakteriím. Grampozitivní bakterie byly citlivější na jejich účinek, než bakterie gramnegativní. Z gramnegativních indikátorových bakterií byl všemi třemi extrakty inhibován růst *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, chloroformový extrakt pak dále inhiboval růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u chloroformového extraktu, který účinně inhiboval růst 9 indikátorových kmenu bakterií z celkového počtu 22 při použití nejnižší MIC i MBC, viz tabulka 7. Hexanový extrakt byl druhou nejúčinnější substancí, antimikrobiální aktivita byla prokázána u 8 testovaných kmenů. Methanolový extrakt působil proti růstu 5 indikátorových kmenů. Žádný z použitých indikátorových organismů nebyl inhibován extraktem ethyl-acetátovým nebo vodným.

Tabulka 5: Průměr inhibičních zón v mm při testování izolátů s antimikrobiální aktivitou

	Indikátorové kmeny					
Produkční kmeny	***Bacillus cereus* CCM 2010**	***Clostridium perfringens* DSMZ 11778**	***Listeria monocytogenes* ATCC 7644**	***Micrococcus luteus* ATCC 10240**	***Bacillus mycoides* 2014004**	***Bacillus thuringiensis* 2014013**
Herbaspirillum sp.	**15,00 ± 0,00**	R	R	R	R	R
Dickeya zeae	R	**13,00 ± 0,00**	R	R	R	R
Aeromonas sorbia	R	**11,50 ± 0,50**	R	R	R	R
***Chromobacterium* sp.**	**12,50 ± 0,50**	R	R	R	R	R
Bacillus mycoides AE	**16,50 ± 0,50**	R	**21,00 ± 0,00**	R	**15,50 ± 0,50**	R
Bacillus mycoides ANAE	**18,50 ± 0,50**	**8,95 ± 0,05**	**22,5 ± 2,50**	R	**19,00 ± 0,00**	**15,50 ± 0,50**
Aeromonas veronii	R	R	R	**9,75 ± 0,25**	R	R
Plesiomonas shigelloides	**13,00 ± 0,00**	R	**13,00 ± 1,00**	R	R	R

Tabulka 6: Průměr inhibičních zón v mm u testovaných extraktů

	Ø inhibičních zón v mm ± SD (testováno ve dvou opakováních)				
Kmen	**PM 1**	**PM 2**	**PM 3**	**PM 4**	**PM 5**
***Acinetobacter parvus* CCM 7030**	R	R	R	R	R
***Bacillus cereus* CCM 2010**	**13,67 ± 1,53**	**17,00 ± 1,00**	**18,10 ± 0,36**	R	R
***Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521**	**10,50 ± 0,50**	**11,33 ± 0,58**	**15,33 ± 1,53**	R	R
***Clostridium difficile* CCM 3593**	**9,17 ± 1,04**	**9,5 ± 0,50**	**11,50 ± 0,50**	R	R
***Clostridium perfringens* DSMZ 4435**	R	**8,67 ± 0,58**	**8,33 ± 0,58**	R	R
***Clostridium perfringens* DSMZ 11778**	R	**8,00 ± 0,00**	**9,00 ± 1,00**	R	R
***Enterobacter aerogenes* CCM 7797**	R	R	R	R	R
***Enterococcus faecalis* KMVD**	R	R	R	R	R
***Escherichia coli* KMVD**	R	R	R	R	R
***Escherichia coli* 045 IS**	R	R	R	R	R
***Escherichia coli* 055 IS**	R	R	R	R	R
***Lactobacillus brevis* CCM 3805**	R	R	R	R	R
***Listeria monocytogenes* ATCC 7644**	**10,83 ± 1,76**	**11,67 ± 0,76**	**14,00 ± 1,00**	R	R
***Micrococcus luteus* ATCC 10240**	**9,67 ± 0,58**	**10,00 ± 0,00**	**11,00 ± 0,00**	R	R
***Moraxella canis* CCM 4590**	R	R	R	R	R
***Propionibacterium acnes* DSMZ 1893**	R	R	R	R	R
***Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960**	R	R	**10,33 ± 0,58**	R	R
***Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076**	R	R	R	R	R
***Salmonella enterica* Typhimurium IS**	R	R	R	R	R
***Salmonella* sp. KMVD**	R	R	R	R	R
***Serratia marcescens* DSMZ 30121**	R	R	R	R	R
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	R	**11,67 ± 1,53**	**14,00 ± 1,00**	R	R

Tabulka 7: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC)

Bacterial strains	MIC			MBC		
	PM 1	**PM 2**	**PM 3**	**PM 1**	**PM 2**	**PM 3**
***Bacillus cereus* CCM 2010**	5	4	**2**	5	5	**4**
***Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20215**	10	10	**5**	>20	20	**10**
***Clostridium dificille* CCM 3593**	1	**0,5**	**0,5**	4	**0,5**	1
***Clostridium perfringens* CCM 4435**	>20	**5**	10	>20	20	20
***Clostridium perfringens* DSMZ 11778**	>20	5	**2**	>20	10	**4**
***Listeria monocytogenes* ATCC 7644**	10	10	10	>20	20	20
***Micrococcus luteus* ATCC 10240**	10	**4**	**4**	10	**5**	**5**
***Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960**	>20	>20	10	>20	>20	**20**
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	>20	10	**5**	>20	20	**10**

7 Diskuze

Invazivní rozvoj sladkovodní mechovky *Pectinatella magnifica* dal podnět k řadě výzkumů zabývajících se jejím dopadem na ekosystém nejen v České republice, avšak její bakteriální osídlení je stále velmi málo prozkoumané. V souvislosti s antimikrobiálními látkami, které byly nalezeny a úspěšně izolovány ze symbiotických bakterií mořských druhů mechovců, se nabízí domněnka, zda i sladkovodní druhy mechovek nemají podobné vlastnosti. Proto bylo cílem této diplomové práce otestovat antimikrobiální aktivitu kmenů bakterií izolovaných z *Pectinatelly* a extraktů připravených přímo z jejích kolonií.

Identifikacemi izolovaných bakterií se zabývali Vlková a kol. (2015). Z výsledků jejich práce vyplývá, že nejdominantněji zastoupenými bakteriemi byly druhy rodů *Aeromonas* a *Aquitalea*. V menších počtech pak byly identifikovány rody C*hryseobacterium, Herbaspirillum, Enterobacter, Lactococcus, Leuconostoc, Pseudomonas a Sphingomonas*. Nejčastěji zastoupená bakterie izolovaná z *Pectinatelly* je *Aeromonas veronii*. Tato fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčinkovitá bakterie, je všudypřítomná ve sladké i mořské vodě (Silver et al. 2011). Příkladem symbiotického vztahu *A. veronii* s hostitelem je osídlení trávicího traktu pijavic. Rozkladem krve, která je přirozenou potravou pijavic, *A. veronii* produkují antimikrobiálně působící metabolity, které účinně zabraňují množení patogenních mikroorganismů v trávicím traktu pijavic (Indergand and Graf, 2000). Bakterie rodu *Aeromonas* zahrnují mezofilní a psychrofilní druhy, proto jsou původci širokého spektra onemocnění u teplokrevných i chladnokrevných zvířat, včetně ryb, plazů a obojživelníků, savců i lidí (Gosling et al., 1996). U *Aeromonas* spp. byla prokázána produkce několika toxinů. Patří k nim dva hemolytické toxiny, hemolysin a aerolysin. Dále cytotoxický enterotoxin Act a cytolytické toxiny Alt a Ast. Pravděpodobně se jedná o skupinu blízce příbuzných hemolytických cytotoxických enterotoxinů. Aerolysin sdílí vysokou homologii jak s toxinem Act, tak i s oběma cytolytickými toxiny (Chopra & Houston 1999). Vzhledem k masivnímu rozšíření *Pectinatelly* v oblasti jižních Čech, kde je mnoho chovných rybníků, není doposud jisté, zda bakterie rodu *Aeromonas*, které osídlují její kolonie, mohou způsobovat onemocnění ryb, anebo naopak, svými metabolity potlačovat růst blízce příbuzných patogenních druhů a ryby tak chránit.

Bakterie rodu *Herbaspirillum* jsou gramnegativní, aerobní, nesporotvorné, zakřivené tyčinky. Většina je diazotrofních s potenciální endofytickou a systémovou kolonizací mnoha rostlin. Jejich přítomnost je obvyklá na kořenech obilovin a luštěnin, ale již byly izolovány i ze vzorků vody (Dobritsa et al., 2010). *Enterobacter* patří do skupiny γ-proteobakterií. Je to

fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčinkovitá bakterie. Tento druh bakterií se obecně vyskytuje v trávicím traktu teplokrevných živočichů, včetně člověka, a může být přítomen jako kontaminant ve vodě i půdě (Grimont et al., 2005). *Chryseobacterium* jsou gramnegativní, aerobní, nesporotvorné tyčinkovité bakterie, identifikovány byly nejen ve vodě, v kalech, sedimentech, půdě, ale i v potravinových vzorcích (Kämpfer et al., 2010). Identifikací bakterií kolonizující sladkovodní mechovky se zabývá velmi omezené množství studií. Vypadá to, že kolonie *Pectinatella magnifica* jsou osídlovány bakteriemi nacházející se v jejich bezprostředním okolí, avšak symbiotický vztah mezi konkrétními bakteriálními druhy a *Pectinatellou* nelze vyloučit ani potvrdit a je zapotřebí bližšího výzkumu.

Zkoumání byly také podrobeny různé extrakty získané přímo z kolonií mechovek. U mořských druhů byla antimikrobiální aktivita potvrzena u mnoha mechovek žijících například ve Středozemním moři (Uriz et al., 1991), u pobřeží Tasmánie (Walls et al., 1993), Anglie (Al-ogily et al., 1977), jižní Indie (Nair, 1984), Japonska (Matsunaga, 1986), nebo v severní části státu Washington v oblasti Puget Sound (Shellenberger & Ross, 1998) a na západním pobřeží Kanady (Tischler et al., 1986). Ale testováním extraktů ze sladkovodní mechovky se jako první zabývali až Pejin et al. (2012), a to u nepříliš běžného druhu *Hyalinella punctata* vyskytující se v Srbsku (Martinovic et al., 2010). Pět různých extraktů bylo testováno proti osmi kmenům bakterií, čtyřem zástupcům gramnegativních bakterií a čtyřem grampozitivním, a dále proti osmi plísním. Byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC), minimální baktericidní koncentrace (MBC) a minimální fungicidní koncentrace (MFC). Dosaženo bylo velmi zajímavých výsledků. Acetonový a hexanový extrakt působil proti indikátorovým bakteriím při velmi nízké koncentraci. Zbylé tři extrakty, methanolový, vodný a dimethylsulfoxidový, také účinkovaly proti růstu bakterií, avšak při použití vyšší koncentrace. MIC se u acetonového extraktu pohybovala v rozmezí 0,50 – 7,00 μg/ml, MBC pak 2,50 – 10,00 μg/ml. V porovnání s paralelně testovaným streptomycinem a ampicilinem vykazoval tento extrakt spolehlivou účinnost při 5krát – 30krát nižší koncentraci. Překvapivých výsledků bylo dosaženo i testováním antimykotické aktivity těchto extraktů proti plísním. Nejaktivnější byl acetonový a methanolový extrakt. MIC byla u acetonového extraktu v rozmezí 2,50 – 8,00 μg/ml a MFC 5,00 – 9,00 μg/ml. Ve srovnání se zároveň testovanými antimykotiky bifonazolem a ketokonazolem dosahoval acetonový extrakt opět velmi dobrých výsledků za použití 10krát – 400krát nižší koncentrace. V případě hexanového extraktu bylo při testování proti *Trichoderma viride* dosaženo inhibičního účinku při MIC extraktu 1,00 μg/ml, zatím co u ketokonazolu 2500 μg/ml, MFC extraktu byla 2,50 μg/ml, u téhož antimykotika až 3500 μg/ml, tj. 2500krát a 1400krát vyšší než u zmíněného extraktu.

Další studií, kterou Pejin et al. (2016) na sladkovodních mechovkách provedli, bylo testování antimikrobiální aktivity extraktů z *Pectinatella magnifica*. Poprvé byla hodnocena antimikrobiální aktivita extraktů *in vitro*. Nejvyšší aktivita byla pozorována u acetonového extraktu, MIC byla stanovena na 0,004 – 0,350 mg/ml a MBC 0,007 – 0,500 mg/ml. Nejlepší antifungální aktivita byla prokázána u extraktu methanolového, MIC byla 0,030 – 0,120 mg/ml a MFC 0,060 – 0,250 mg/ml.

Druhý výzkum zabývající se nejen antimikrobiální, ale i cytotoxickou aktivitou extraktů z *Pectinatella magnifica*, mechovky, rozšířené zejména v oblasti jižních Čech, provedli Kollar et al. (2016). Testy cytotoxicity ukázaly, že všechny extrakty, s výjimkou vodního, mají LD_{50} pod 100 µg/ml a jsou tedy označeny jako potenciálně toxické. Vodní extrakt s LD_{50} 250 µg/ml byl označen jako potenciálně škodlivý. Vzhledem k invazivnímu rozšiřování *Pectinatella* ve vodním ekosystému, by její potenciální přímá nebo environmentální toxicita měla být dále zkoumána. Významný antibakteriální účinek připravených extraktů byl pozorován proti bakterii *Clostridium difficile*, která je patogenní a velmi často způsobuje intestinální onemocnění (Bhunia, 2008). Extrakty z bochnatky inhibovaly růst i dalších známých patogenů (*Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*) a bakterií kazící potraviny (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*). V porovnání s prací Pejin et al. (2016) byl růst indikátorových bakterií inhibován nejen extraktem methanolovým, hexanovým a chloroformovým, ale také etherovým a vodným extraktem. Zatím co Pejin et al. (2016) prokázali antibakteriální účinek extraktu z bochnatky proti bakteriím *Salmonella*, *Escherichia* a *Enterococcus*, v práci Kollar et al. (2016) byly tyto bakterie rezistentní. Další indikátorové bakterie *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* byly citlivé na extrakty z bochnatky v obou studiích. Rozdíl je ale ve stanovených MIC. Zatím co Kollar et al. (2016) uvádí MIC 2 – 10 mg/ml, Pejin et al. (2016) prokázali ve všech případech MIC nižší než 1 mg/ml. Tento značný rozdíl v hodnotách MIC může být vysvětlen různým složením mikrobioty a celkového osídlení konkrétních kolonií, ze kterých byly extrakty získány. Díky tomu může být odlišný i obsah biologicky aktivních látek, které způsobí vyšší účinnost konkrétního extraktu, při nižší koncentraci, nebo naopak, je jejich účinnost nižší a je zapotřebí vyšší koncentrace. Konečné hodnoty MIC mohly ovlivnit i způsoby přípravy extraktů a manipulace s nimi před a během testování.

V této diplomové práci byla testována antimikrobiální aktivita bakteriálních izolátů z roku 2015. Testována byla citlivost několika potenciálně patogenních bakterií, bakterií kazících potraviny, i bakterií izolovaných z mechovky mezi sebou. Nejúčinnějším bakteriálním izolátem byl *Bacillus mycoides*, který při anaerobní kultivaci inhiboval růst pěti indikátorových

bakterií. Inhibiční zóny se pohybovaly v průměru od 8,95 ± 0,05 mm do 22,5 ± 2,50 mm. Při kultivaci v aerobním prostředí účinkoval pouze proti třem indikátorovým kmenům a inhibiční zóny byly od 15,50 ± 0,50 mm do 21,00 ± 0,00 mm. Je velmi pravděpodobné, že v případě fakultativně anaerobních bakterií zvolený způsob kultivace ovlivňuje množství a druh produkovaných metabolitů, které mohou mít antibakteriální účinky. Práce Zigha et al. (2006) prokazuje u bakterie *Bacillus subtilis*, blízce příbuzné rodu *Bacillus mycoides*, že snížení oxido-redukčního potenciálu v okolí vyvolává změny v metabolických procesech a v exponenciální fázi růstu bakterií dochází k produkci enterotoxinů. Změna procesů je v tomto případě indikována i jinými ukazateli, například produkcí laktátu, namísto acetátu, snížením rychlosti růstu, spotřeby glukózy z živného prostředí a změn v koncentraci produktů fermentačního procesu oproti kontrole kultivované v aerobním prostředí. Proto zřejmě kultivace izolátu *Bacillus mycoides* v anaerobním prostředí podpořila produkci biologicky aktivních látek a izolát se jevil jako účinnější než ostatní.

Nicméně i tak je množství, síla účinnosti, ale i samotná produkce biologicky aktivních látek ovlivněna řadou dalších vnějších faktorů, než je jen množství kyslíku v okolním prostředí. Celkově mají kultivační podmínky a složení kultivačních médií významný vliv. Vše je nastaveno tak, aby izolované bakterie měly optimální podmínky pro svůj růst. Možná z toho důvodu nemusí biologicky aktivní látky produkovat a bojovat tak o svůj životní prostor. Produkce aktivních látek zároveň nemusí probíhat ve fázi, v jaké jsou supernatanty z izolátů podrobeny testování. V práci Zigha et al. (2006) je zmíněno, že produkce enterotoxinu u *Bacillus subtilis* probíhá v exponenciální fázi. U jiné bakterie to může být i v pozdější fázi růstu, nebo naopak v dřívější. Tuto skutečnost není jednoduché při vlastním testování zohlednit. Supernatanty jsou získávány z plně vzrostlých kultur o vysoké hustotě. Délka kultivace je řízena dle rychlosti nárůstu potřebného množství bakterií, ne podle růstové fáze, ve které se právě nacházejí. V neposlední řadě je třeba zmínit fakt, že čisté izolované kmeny samy o sobě antimikrobiální aktivitu nikdy vykazovat nemusejí. K produkci biologicky aktivních látek může být zapotřebí symbiotického vztahu s jinými bakteriemi osídlující kolonie bochnatky, nebo specifické prostředí samotné kolonie, které v laboratorních podmínkách není možné věrně napodobit.

I přes náročnost získávání nových poznatků o biologicky aktivních látkách, se *Pectinatella magnifica* jeví jako velmi slibný zdroj. Díky množství biomasy, které *Pectinatella* tvoří, je na našem území k dispozici velké množství materiálu vhodného ke zkoumání. Tohoto potenciálu by se mělo využít.

8 Závěr

Testováním vybraných izolátů byla antimikrobiální aktivita potvrzena u osmi bakteriálních kmenů, z toho čtyři produkční kmeny inhibovaly růst indikátorových kmenů ve dvou a více případech. Ostatní testované čisté kmeny izolované z *Pectinatella* antimikrobiální aktivitu nevykazují. Z vybraných extraktů bylo nejlepšího výsledku dosaženo chloroformovým extraktem, který účinně inhiboval růst devíti indikátorových kmenu bakterií při použití nejnižší inhibiční i baktericidní koncentrace. Antimikrobiální aktivita byla zjištěna také u extraktu hexanového a methanolového.

Vzhledem k pozitivním výsledkům je *Pectinatella magnifica* jistě zajímavým zdrojem biologicky aktivních látek. Antimikrobiálně působící bakterie izolované z jejích kolonií mohou být využity v potravinářství, za účelem potlačení rozvoje nežádoucí mikroflóry a tím udržení zdravotní nezávadnosti a prodloužení trvanlivosti neúdržných potravin. Další využití by mohly najít například v probiotických přípravcích pro hospodářská zvířata, nebo pro ryby dospívající v sádkách a chovných rybních. Naopak efektivní využívání extraktů v praxi je poměrně vzdálené. Díky množství organismů, nacházejících se v biomase *Pectinatella*, je množství látek rozpuštěných v jenom konkrétním extraktu z ní získané, velmi vysoké a rozmanité. Identifikace konkrétní biologicky aktivní látky, navržení praktického využití a otestování před zavedením do produktů, je časově i finančně značně náročná.

9 Seznam použité literatury

Adorjan B., Buchbauer G. (2010): Biological properties of essential oils: an updated review. Flavour and Fragrance Journal, vol 25(6), p. 407 – 426.

Alcaraz, L., Blanco, S., Puig, O., Tomas, F., Ferretti, F. (2000): Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. Journal of Theoretical Biology, vol 205(2), p. 231 – 240.

Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Al-Holy, M. A., Shaker, R. R., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2009): Influence of desiccation on the sensitivity of *Cronobacter* spp. to lactoferrin or nisin in broth and powdered infant formula. International Journal of Food Microbiology, vol 136(2), p. 221 – 226.

Al-OgilyS. M., Knight-Jones E. W. (1977): Nature, vol 265, p. 728.

Anderson Ch. M., Haygood M. G. (2007): α-Proteobacterial Symbionts of Marine Bryozoans in the Genus *Watersipora.* Applied and Enviromental Microbiology, p. 303 – 311.

Anthony U., Nielsen P. H., Pereira M., Christophersen C. (1991): Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemical and Molecular Biology, vol 96, p. 431 – 437.

Ariza M. E., Ramakrishnan R., Singh N. P., Chauhan A., Nagarkatti P. S., Nagarkatti M. (2011): Bryostatin-1, a naturally occurring antineoplastic agent, Acts as a Toll-like receptor 4(TLR-4) ligand and induces unique cytokines and chemokines in dendritic cells. Journal of Biological Chemistry, vol 286, p. 24 – 34.

Balounová, Z., Rajchard, J., Šmahel, L., Švehla, J. (2006): *Pectinatella magnifica* – invazní druh mechovky v jihočeské krajině. In: Měkotová, J., Štěrba, O. (2006): Říční krajina 4: p. 8-12. Sborník příspěvků z konference. Univerzita Palackého, Olomouc.

Balounová Z., Šmahel, L., a Rajchard, J. (2007): Invaze *Pectinatella magnifica* v jihočeských vodách pokračuje. In: Měkotová, J., Štěrba, O. (Eds.), 2006: Říční krajina 4. Sborník příspěvků z konference, Olomouc.

Balounová Z., Rajchard J., Šmahel L. (2007a): Dobývací prostor nádrže Cep jako možná brána invaze mechovky *Pectinatella magnifica*, Konference ekologie krajiny v ČR: Těžba nerostných surovin a ochrana přírody, 14-15.9 2007, Horka nad Moravou.

Balounová Z., Šmahel L., Rajchard J. (2007b): Invaze *Pectinatella magnifica* v jihočeských vodách pokračuje, Říční krajina, vol 4, p. 8 – 13.

Balounová Z., Rajchard J., Švehla J., Šmahel L. (2011): The onset of invasion *Pectinatella magnifica* in South Bohemia (Czech Republic). Biologia, vol 66, p. 1091 – 1096.

BalounováZ., Pechoušková E., Rajchard J., Joza V., Šinko J. (2013) World-Wide distribution of the Bryozoan *Pectinatella magnifica* (Leidy 1851). European Journal of Environmental Sciencis, vol 3, p. 96 – 100.

Belfiore C., Castellano P., & Vignolo, G. (2007): Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. Food Microbiology, 24(3), p. 223 – 229.

BerkowR. L., Schlabach L., Dodson R., benjamin W. H., Pettit G. R., Rustagi P., Kraft A. S. (1993): Cancer Research, vol 53, p. 2810 – 2815.

Bhagavathy, S., Sumathi, P., Jancy Sherene Bell, I. (2011): Green algae *Chlorococcum humicola* a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, vol 1(1), p. 1 – 7.

Bhunia A. K. (2008): Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis, Springer, New York, NY, USA, p. 134.

Blackman A. J., Eldershaw T. P. D., Garland S. M. (1993): Australian Journal of Chemistry, vol 46, p. 401 – 405.

Blackman A. J., Ralph C. E., Skelton B. W., White A. H. (1993): Australian Journal of Chemistry, vol 46, p. 213 – 220.

Blunt J. W., Copp B. R., Munro M. H. G., Northcote P. T., Prinsep M. R. (2004): Natural Product Report, vol 21, p. 1 – 49.

Blunt J. W., Copp B. R., Munro M. H. G., Northcote P. T., Prinsep M. R. (2006): Natural Product Report, vol 23, p. 26 – 78.

Bobek P., Ginter E., Jurčovičová M., Kuniak L. (1991): Choilesterol-Lowering Effect of the Mushroom *Pleurotus ostreatus* in Hereditady Hypercholesteroloemic Rats. Nutrition&Metabolism, vol 35, p. 191 – 195.

Bonnevie P. (1948): Acta Allergol, vol 1, p. 40 – 46.

Borg F. (1930): Moostierchen oder Bryozoen (Ectoprocten). In: Bischoff H (ed.) Muschelinge oder Moluscocieda und Manteltiere oder Tunicata (Kamptozoa, Phoronidea, Bryozoa, Tunicata, Ascidiae). Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meersteile nach ihren Merkmalen und nach ihrer Lebensweise. Jena Gustav Fisher, p. 25 – 142.

Brown C. J. D. (1933): A limnological study of certain fresh-water Polyzoa with special reference to their statoblast. Transactions of the American Microscopical Society, vol 52, p. 271 – 314.

Cao R., Xue C.- H., & Liu Q. (2009): Changes in microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas)* during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. International Journal of Food Microbiology, vol 131(2), p. 272 – 276.

Carle J. S., Christophersen (1980): Journal of Americal Chemical Society, vol 102, p. 5107 - 5108.

Carle J. S., Christophersen (1982): Toxicon, vol 20, p. 307 – 310.

Carroget, P.; Carroget, L.; Gruet, Y.; Baudet, J.; Dutertre, M. (2005): Presence of colonies of the bryozoan *Pectinatella magnifica* Leidy 1851 in the Loire and the Nantes channel at Brest (Loire-Atlantique). Bulletin de la Société des sciences naturelles de l'Ouest de la France., vol 27, p. 19 – 29.

Choi Y. H., Park A., Schmitz F. J., Vanaltena I. (1993): Journal of Natural Products, vol 56, p. 1431 – 1433.

Chopra A. K., Houston C. W. (1999): Molecular characterization of *Aeromonas* enterotoxins. 6th International *Aeromonas*/Plesiomonas Symposium. Chicago, Illinois, p. 15.

Chung Y. C., Yeh J. Y., & Tsai C. F. (2011): Antibacterial characteristics and aktivity of water-soluble chitosan derivatives prepared by the Maillard reaction. Molecules, vol 16(10), p. 8504 – 8514.

Ciocan, I. D., Bara, I. (2007): Plant products as an-timicrobial agents. Universitatii Ale Stiintifice Analele Alexandru Ioan Cuza. Tom VIII.

Cegielska-Radziejewska, R., Lesnierowski, G., & Kijowski, J. (2009): Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. European Food Research and Technology, vol 228(5), p. 841 – 845.

Collins C. H., Lyne P. M., Grange J. M. (1995): Microbiological Methods. Butterworth-Heinemann Ltd. Great Britain. ISBN: 0- 7506 – 0653 - 3

Cornut G., Fortin C., Soulières D. (2008): Antineoplastic Properties of Bacteriocins. Revisiting Potential Active Agents. Ameriacan Journal of Clinical Oncology, vol 31, p. 399 – 404.

Cowan M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, vol 12(4), p. 564 – 582.

Davidson S. K., Haygood M. K. (1999): Identification of sibling species of the bryozoan *Bugula neritina* that produce different anticancer bryostatins and harbor distinct strains of the bacterial symbiont "*Candidatus endobugula sertula*". Biological Bulletin, vol 196, p. 273 – 280.

Datta A., Prescott L. M. (1969): Effect of Vibriocins on Members of *Enterobacteriaceae*. Journal of Bacteriology, vol 98, p. 849 – 850.

Davidson S. K., Allen S. W., Lim G. E., Anderson C. M., Haygood M. G. (2001): Evidence for the Biosynthesis of Bryostatins by the Bacterial Symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*" of the Bryozoan *Bugula neritina*. Applied Environental Microbiology, vol 67, p. 4531 – 4537.

Devin S., Bollache L., Noël P. Y., Biesel J. N. (2005): Patterns of biological invasion in French freswater systems by non-indigenous macroinvertebrates. Hydrobiologia, vol 551, p. 137 – 146.

Dobritsa A. P., Reddy M. C. S., Samadpour M. (2010): Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolution Microbiology. vol 60, p. 1418 – 1426.

Dolan L. C., Matulka R. A., Burdock G. A., (2010): Naturally Occurring Food toxins. Review

Dunlap W. C., Battershill C. N., Liptrot C. H., Coob R. E., Bourne D. G., Jaspars M., Long P. F., Newman D. J. (2007): Biomedicinals from the phytosymbionts of marine invertebrates: A molecular approach. Methods, vol 42, p. 358 – 376.

Dyrynda P. E. J., Nielsen C., Larwood G. P., Olsen O. (1985): Bryozoa: Ordovician to Recent, p. 95 – 100.

Ebada S. S., Lin W. H., Proksch P. (2010): Bioactive sesterterpenes and triterpenes from marine sponges: occurrence and pharmacological significance. Marine Drugs, vol 8, p. 313 – 346.

Eom S. H., Kim Y. M., Ki, S. K. (2012): Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. Food and Chemical Toxicology, vol 50(9), p. 3251 – 3255.

FDA (1998): Direct food substances affirmed as generally recognized as safe: egg white lysozyme. Federal Register, vol 63(4), p. 12421 – 12426.

Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Maťha V. (2004): Imunitní systém – informace pro každého. Grada Publishing, a. s. Havlíčkův brod. Počet stran 236. ISBN 80 247 1196 6

Figuerola B., Sla-Comorera L., Angulo-Preckler C., Vázquez J., Montes M. J., García-Aljaro C., Mercadé E., Blanch A. R., Avila C. (2014): Antimicrobial activity of Antarctic bryozoans: An ecological perspective with potential for clinical applications. Marine Environmental Research, vol 101, p. 52 – 59.

Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E. (2013): Bactericidal activities of healthpromoting, food-derived powders against the foodborne pathogens *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Science, vol 78(2), p. 270 – 275.

Gillor O., Nigro L. M., Riley M. A. (2005): Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. Current Pharmaceutical Design, vol 11, p. 1067 – 175.

Gosling P. J., Austin B., Altwegg M., Joseph S. W., John W. (1996): *Aeromonas* species in diseases of animals. The Genus: Aeromonas, First Edition,Ltd, Chicester. p. 175.

Grimont P. A. D., Grimont F., Brenner D. J., Krieg N. R. & Staley J. T. (2005): Enterobacter. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, p. 661 – 669.

Hale K. J., Manaviazar S. (2010): New approaches to the total synthesis of the bryostatin antitumor macrolides. Chemistry-An Asian Journal, vol 5, p. 704 – 754.

Hayward P. J., Ryland J. S (2005): Cheilostomatous Bryozoa. Part I. Aeteoidea-Cribrilinoidea, Field Studies Council, Shrewsbury

Hecht D. W., Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Yolken R. H. (1999): Antimicrobial agents and susceptibility testing: susceptibility testing of anaerobic bacteria. Manual of clinical mikrobiology, p. 1555 – 1563.

Heindel H., Wiese J., Thial V., Imhoff J. F. (2010): Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats, Sytematic and Applied Microbiology, vol 33, p 94 – 104.

Hilker M., Schulz S. (1991): Anthraquinones in different developmental stages of *Galeruca tanaceti* (Coleoptera, Chrysomelidae). Journal of Chemistry and Ecology, vol 17**,** p. 2323 - 2332.

Holst P. B., Anthoni U., Christophersen C., Nielsen P. H. (1994): Journal of Natural Products, vol 57, p. 997 – 1000

Hungate R. E., Macy J. (1973): The Roll-Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. Bulletins from the Ecological Research Committee/NFR, Modern Methodsin the Study of Microbial Ecology, vol 17, p. 123 – 126.

Hyunbin, J., Gea-Jae, J., Myeoungseop, B., Dong-Gyun, H., Jung-Soo, G., Ji-Yoon, K., Jong-Yun, C. (2014): Distribute pattern of Pectinatella magnifica (Leidy, 1851), an invasive species, in the Geum River and the Nakdong River, South Korea. Journal of Ecology and Environment, 37, p. 217 – 223.

Indergand S. & Graf J. 2000. Ingested blood contributes to the specificity of the symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar sobria and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech, Applied Enviromental Microbiology, p. 4735 – 4741.

Jayakumar T., Ramesh E., Geraldine P. (2006): Antioxidant aktivity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl_4-induced liver injury in rats. Food and Chemistry Toxikology, vol 44(12), p. 1989 – 1996.

Juneja, V. K., Dwivedi, H. P., & Yan, X. (2012): Novel natural food antimicrobials. Annual Review of Food Science and Technology, vol 3, 381 – 403.

Kalyoncu F., Oskay M., Saglam H., Erdogan T. F., Tamer A. Ü. (2010): Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. Journal of Medicinal Food, vol 13(2), p. 415 – 419.

Kämpfer P., Chandel K., Prasad G. B. K. S., Shouche Y. S., Veer V. (2010): *Chryseobacterium culicis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito Culex quinquefasciatus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol 60, p. 2387 – 2391.

Kollar P., Rajchard J., Balounová Z., Pazourek J. (2014): Marine natural products: Bryostatins in preclinical and clinical studies. Pharmaceutical Biology, vol 52, p. 237 – 242.

Kollar P., Šmejkal K., Salmonová H., Vlková E., Lepšová-Skácelová O., Balounová Z., Rajchard J., Cvačka J., Jaša L., Babica P., Pazourek J. (2016): Assesment of Chemical Impact of Invasive Bryozoan *Pectinatella magnifica* on the Enviroment: Cytotoxicity and Antimikrobial Activity of *P. magnifica* extracts. Molecules, vol 21, p. 1476.

Konya K., Shimidzu N., Adachi K., Miki W. (1994): Fisheries Science (Carlton Aust.), vol 60, p. 773 – 77.

Kuzirian A. M., Epstein H. T., Gagliardi C. J., Nelson T. J., Sakakibara M., Taylor C., Scioletti A. B., Alkon D. L. (2006): Bryostatin enhancement of memory in Hermissenda. Biological Bulletin, vol 210, p. 201 – 214.

Kraepelin, K. (1884): Zur Biologie und Fauna der Süßwasserbryozoen. Zoologischer Anzeiger, vol 7, p. 319 – 321.

Kraepelin, K. (1887): Die deutschen Süsswasserbryozoen. Eine Monographie. I. Anatomisch-systematischer Teil. Abhandlungen Naturwissenschaftlichen, vol 10, p. 1 – 168.

Lai, P., & Roy, J. (2004): Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. Current Medicinal Chemistry, vol 11, p. 1451 – 1460.

Laport M. S., Santos O. C. S., Muricy G. (2005): Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. Current Pharmaceutical Biotechnology, vol 10, p. 86 – 105.

LaycockM. V., Wright J. L. C., Findlay J. A., Patil A. D. (1986): Canadian Journal of Chemistry, vol 64, p. 1312 – 1316

Lee N. K., Fenical W., Lindquist N. (1997): Journal of Natural Products, vol 60, p. 697 – 699.

Leidy, 1851 [online]; [cit 12. 10. 2017]; BioLib. Dostupné z http://www.biolib.cz/cz/taxon/id44166/

Lefnerová D., Šimůnek J. [online]; [cit 13. 12. 2017]; dostupné z http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/atb.pdf

Lopanik N., Gufson K. R., Lindquist N. (2004b): Structure of bryostatin 20: A symbiont-produced chemical defense for larvae of the host bryozoan, *Bugula neritina*. Journal of Natural Products, vol 67, p. 1412 – 1414.

Lopanik N., Gufson K. R., Lindquist N. (2004): Structure of bryostatin 20: A symbiont-produced chemical. Defense for larvae of the host bryozoan, *Bugula neritina*. Journal of Natural Products, vol 67, p. 1412 – 1414.

Lopanik N., Targett N., Linguist N. (2006): Ontogeny of a symbiont-produced chemical defense in *Bugula neritina* (Bryozoa). Marine Ecology-Progress Series 327, p. 183 – 191.

Lönnerdal, B. (2011). Biological effects of novel bovine milk fractions. Nestle Nutrition Workshop Series. Paediatric Programme, vol 67, p. 41 – 54.

Lucera A., Costa C., Conte A., Del Nobile M. A. (2012): Food applications of natural antimicrobial compounds. Frontiers in Microbiology, vol 3, p. 287.

Massard J. A., Geimer G. (2002): Occurence of *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) (Bryozoa, Phylactolaemata) in the German-Luxemburg border region near Bech-Kleinmacher (Luxemburg) and Nennig (Germany), vol. 44, p. 107 – 120.

Manning T. J., Land M., Rhodes E., Chamberlin L., Rudloe J., Phillips D., Lam T. T., Purcell J., Cooper H. J., Emmett M. R., Marshall A. G. (2005): Identifying bryostatins and potential precursors from the *Bugula neritina*. Natural Product Research, vol 19, p. 467 – 491.

Manning T. J., Rhodes E., Land M., Parkman R., Sumner B., Lam T. T., Marshall A. G., Phillips D. (2006): Impact of environmental conditions on the marine natural product bryostatin 1. Natural Product Research, vol 20, p. 611 – 628.

Martinovic-Vitanovic V. M., Milankov V. M., Kalafatic V. I. (2010): Limnologica, vol 40, p. 73.

Matsungana S., Fusetani N., Hashimoto K. (1986): Experientia, vol 42, p. 84

Mayer A. M. S., Gustafson K. R. (2008): Marine pharmacology in 2005–2006: Antitumour and cytotoxic compounds. European Journal of Cancer, vol 44, p. 2357 – 2387.

McGovern M. T., Hellberg H. E. (2003): Cryptic species, cryptic endosymbionts, and geographical variation in chemical defences in the bryozoan *Bugula neritina*. Molecular Ecology, vol 12, p. 1207 – 1215.

Michel-Briand Y., Baysse Ch. (2002): The pyocins of Pseudomonas aeruginosa. Biochemie 84, p. 499 – 510.

Mehla R., Bivalkar-Mehla S., Zhang R., Handy I., Albrecht H., Giri S., Nagarkatti P., Nagarkatti M., Chauhanet A. (2010): Bryostatin modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. PLoS ONE, vol 5, p. 11160.

Mendla D. (2003): Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: proces developments and economics. Biomolecular Engineering, vol 20, p. 441 – 458.

Morse W. (1930): The chemical constitution of Pectinatella. Science, vol 7, p. 265.

Moubax I., Bontemps-Subielos N., Banaigs B., Combaut G., Huitorel P., Girard J. P., Pesando D. (2001): Environmental Toxicology and Chemistry, vol 20, p. 589 – 596.

Murdock, C., Cleveland, J., Matthews, K., & Chikindas, M. (2007): The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. Letters in Applied Microbiology, 44(3), p. 255 – 261.

Nair P. S. R. (1993): Indian Journal of Medical Ressearch, vol 97, p. 85.

Nandakumar K., Tanaka M. (1994): Marine Ecology Progress Serries, vol 44, p. 157 – 163.

Narkowicz C. K., Blackman A. J., Lacey E., Gill J. H., Heiland K. (2002): Journal of Natural Products, vol 65, p. 938 – 941.

Newhouse M. L. (1966): British Medical Journal, vol 1, p. 1142 – 1145.

Notteghem, P. (2009): Évolution de la distribution de la Pectinatelle, Pectinatella magnifica (Leidy, 1851), Bryozoaire d'eau douce, en France et en Europe. Rev. Sci. Bourgogne-Nat., 9/10, p. 188 – 197.

Oda S. (1974): Pectinatella magnifica occurring in Lake Shoji, Japan. Japan. Soc. Syst. Zool, vol 10, p. 31 – 39.

Opravilová, V. (2005): O výskytu dvou druhů bezobratlých zavlečených do ČR: *Dusegia trigrina* (Tricladida) a *Pectinatella magnifica* (Bryozoa). Sborník Přírodovědeckého klubu v Brně, p. 39 – 50.

Opravilová V. (2006): Bryozoa – mechovky, p. 366. In: Mlikovsky J. & Styblo P. (eds), Nepůvodní druhy fauny a flory Českе republiky, ČSOP, Praha, CZ, 496 pp. ISBN: 80 – 86770 – 17 – 6.

Osserman E. F., Lawlor D. P. (1966): Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. Journal of Experimental Medicine, vol 5, p. 921 – 52.

Ortega M. J., Zubia E., Salva J. (1993): Journal of Natural Products, vol 56, p. 633 – 636.

Özkan, G., Sagdiç, O., Göktürk B., N., Kurumahmutoglu, Z. (2004). Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol 84(14), p. 1807 – 1811.

O'Sullivan, D. J. (2012): Developing antimicrobial dairy ingredients. Food Technology, vol 66(6), p. 44 – 50.

Paul V. J., Arthur K. E., Ritson-Williams R., Ross C., Sharp K. (2007): Chemical defenses: From Compounds to Communities. Biological Bulletin, vol 213, p. 226 – 251.

Pathmanaban O. N., Porter J. S., White I. R. (2005): Clinical and Experimental Dermatology, vol 30, p. 622 – 626.

Pejin B., Glamoclija J., Ciric A., Radotic K., Vajs V., Tesevic V., Hegedis A., Karaman I., Horvatovic M., Sokovic M. (2012): Antimikrobil aktivity of freahwater bryozoan *Hyalinella punctata*; Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, vol. 7, p. 1021 – 1026.

Pejin B., Ciric A., Horvatovic M., Jurca T., Glamoclija J., Nikolic M., Sokovic M. (2016): An insight into antimicrobial activity of the freshwater bryozoan *Pectinatella magnifica*. Natural Products Research, vol 30, p. 1839 – 1843.

Pejin B., Ciric A., Karaman I., Horvatovic M., Glamoclija J., Nikolic M., Sokovic M. (2016): In vitro antibiofilm activity of the freshwater bryozoan *Hyalinella punctata*: A case study of Pseudomonas aeruginosa PAO1. Natural Product Reports, vol 30, p. 1847 – 1850.

Peters L., König M., Wright A. D., Pukall R., Stackebrandt E., Eberl L., Riede K. (2003): Secondary metabolites of Flustra foliacea and their influence on bacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol 69, p. 3469 – 3475.

Petters L., Wright A. D., Krtick A., Konig G. M. (2004): Journal of Chemistry and Ecology, vol 30, p. 1165 – 1181.

Pettit G. R., Herald C. L., Doubek D. L., Herald D. L., Arnold E., Clardy J. (1982): Journal of the American Chemical Society, vol 104, p. 6846 – 6848.

Pettit G. R., Kamano Y., Aoyagi R., Herald C. L, Doubek D. L., Schmidt J. M., Rudloe J. J. (1985): Tetrahedron, vol 41, p. 985 – 994.

Pettit G. R. Herz W., Kirby G., Steglich W., Tamm C (1991): Progress in the Chemictry of Organic Natural products, vol 57, p. 153 – 195.

Phillips I., Andrews J., Blint A. J., Bridson E., Brown D. F. J., Cooke E. M., Greenwood D., Holt H., King A., Spencer R. C., Williams R. J., Wise R., (1991): A guide to sensitivity testing. Report of the Working Party on Anthibiotic Sensitivity Testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Journal of Antimikrobial Chemotherapy, vol 27, p. 1 – 50.

Plaza M., Santoyo S., Jaime L., García-Blairsy Reina G., Herrero M., Se~norans F. (2010): Screening for bioactive compounds from algae. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol 51(2), p. 450 – 455.

Porter J. S., Ellis J. R., Hayward P. J., Rogers S. I., Callaway (2002): Jornal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, vol 82, p. 529 – 535.

Prinsep M. R., Yao B., Nicholson B. K., Gordon D. P. (2004): The pterocellins, bioactive alkaloids from the marine bryozoan *Pterocella vesiculosa*. Phytochemistry Reviews, vol 3, p. 325 – 331.

Pukall R., Kramer I., Rohde M., Stackebrandt E. (2001): Microbial diversity of cultivable bacteria associated with the Nort Sea bryozaon *Flustra foliacea*, Systematic and Applied Microbiology, vol 24, p. 623 – 633.

Rajchard (2015) Josef, doc. RNDr. Ing. PhD., Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Branišovská 1645/31A, 370 05 České Budějovice, ústní sdělení

Rajendran K., Nagappan R., Ramamurthy K. (2013): Short Communication A study on the bactericidal effect of nisin purified from *Lactococcus lactis*. Ethiopian Journal of Biological Sciences, vol 10(1).

Rao J. R., Millar B. C., Moore J. E. (2009): Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). International Journal of Antimicrobial Agents, vol 33(6), p. 591 – 592.

Rodriguez, S., Vergon, J. P. (2002): *Pectinatella magnifica* Leidy 1851 (Phylactolaemates), a species of Bryozoa introduced in the north of Franche-Comte. Bulletin Francais de la peche et de la pisciculture, vol 365-366, p. 281 – 296.

Sarangi I., Ghosh D., Bhutia S. K., Mallick S. K., Maiti T. K. (2006): Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglykans. International Immunopharmacology, vol 6(8), p. 1287 – 1297.

Sato A., Fenical W. (1983): Tetrahedron Lett, vol 24, p. 481 – 484.

Savoia, D. (2012): Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. Future Microbiology, vol 7(8), p. 979 – 990.

Seo J. E. (1998): Taxonomy of the freshwater bryozoans from Korea. Korean Journal of Systematic Zoology, vol 14, p. 371 – 378.

Seville R. H. (1957): British Journal Dermatology, vol 69, p. 92 – 93.

Shellenberger J. S., Ross J. R. P. (1998): Northwest Science, vol 72, p. 23.

Schield C., Prendivile J., Jayson G., Crowther D, Fox B., Pettit G. R., Stern P. L. (1994): Cancer Immunol. Immunother, vol 39, p. 223 – 230.

Scherris J. C. (1990): Medicial Microbiology. Prentice-Hall International Inc. ISBN 0–8385–6194-2

Schmidt E. W. (2005): From chemical structure to environmental biosynthetic pathways: navigating marine invertebrate–bacteria associations. Trends in Biotechnology, vol 23, p. 437–440.

Schmidt J. O. (2001): Journal of Apicular Research, vol 40, p. 7 - 10.

Schmitz F. J., Deguzman F. S., Choi Y. H., Hossanin M. B., Rizvi S. K., Vanderhelm D. (1990): Pure and Applied Chemistry, vol 62, p. 1393 – 1396.

Scholz J., Krumbein W. E. (1996): 10th International Bryzoology Conference, Wellington, New Zealand

Sharp J. H., Winson M. K., Porter J. S. (2007): Bryozoan metabolites: an ecological perspective. Highlight. Natural Product Reports, vol 24, p. 659 – 673.

Sharp K. H., Davidson S. K., Haygood M. G. (2007): Localization of '*Candidatus Endobugula* Sertula' and the bryostatins throughout the life cycle of the bryozoan *Bugula neritina*. ISME J., vol 1, p. 693 – 702.

Silver A. C., Williams D., Faucher J., Horneman A. J., Gogarten J. P., Graf J. (2011): Complex evolutionary history of *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. Plos One

Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamoćlija, J., Kukić-Markovic, J., Petrović, S. (2013): In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. Journal of the Science of Food and Agriculture.

Szallasi Z., Kosa K., Smith C. B., Dlugosz A. A., Williams E. K., Yuspa S. H., Blumberg P. M. (1995): Mol. Pharmacol, vol 47, p. 258 – 265.

Szekeres J., Akác A., Csányi B. (2013): First record of *Pectinatella magnifica* (Leidy 1851) in Hungary. Water Resources Management, vol 3, p. 47 – 49.

Šinko J., Rajchard J., Balounová Z., Fikotová L. (2012): Biologically active substance from water invertebrates: a review. Veterinarni medicína, vol 57, p. 177 – 184.

Šetlíková, I., Balounová, Z., Lukavský, J., Rajchard, J. (2005): Nepůvodní druh mechovky na Třeboňsku. Živa, LIII, vol 4, p. 172 – 174.

Šilhánková L. (2002): Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Academia. 364. ISBN: 80-200-1024-6

Šinko, Jan 2010 [online]; [cit 12. 10. 2017]; Příroda.cz. Dostupné z http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=1210

Špinar, Z. (1960): Systematická paleontologie bezobratlých. NČSAV, Praha, p. 247 - 268.

Sun M. K., Alkon D. L. (2006): Bryostatin-1: Pharmacology and therapeutic potential as a CNS drug. CNS Drug Reviews 12, p. 1 – 8.

Tajkarimi, M., Ibrahim, S., Cliver, D. (2010): Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, vol 21(9), p. 1199 – 1218.

Tischler M., Ayer S. W., Anderson R. J. (1986): Comparative Biochemistry and Physiology, vol 84, p. 43.

Ultee, A., Bennik, M. H. J., Moezelaar, R. (2002): The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, vol 68(4), p. 1561 – 1568.

Uriz M. J., Martin D., Turon X., Ballesteros E., Hughes R., Acebal C. (1991): Marine Ecology Progress Series, vol. 70, p. 175.

Vlková E., Rada V., Killer J.: Potravinářská mikrobiologie. 1. vydání Praha: ČZU, 2009. 168 s. ISBN 978-80-213-1988-2.

Vlková E., Killer J., Kmeť V., Rada V., Musilová Š., Bunešová V., Hovorková P., Božik M., Salmonová H., Rajchard J. (2015): Identification of microbiota associated with *Pectinatella magnifica* in South Bohemia, Biologia, vol. 70, p. 3.

Walls J. T., Ritz D. A., Blackman A. J. (1993): Fouling, surface bacteria and antibacterial agents of four bryozoan species found in Tasmania, Australia. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, vol 169, p. 1 – 13

Watson S. B., Cruz-Rivera E. (2003): Algal chemical ecology: an introduction to the special issue. Phycologia, vol 42(4), p. 319 – 323.

Wood, T. S. (1989): Ectoproct Bryozoans of Ohio. Bulletin of the Ohio Biological Survey, vol 8, p. 1 - 70.

Wood, T. S. (2001): Bryozoans. James and Alan Covich (eds.) Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates, Second Edition. Academic Press, p. 505 – 525.

Xue, J., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2013): Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, p. 12720 – 12726.

Zhang H. P., Shigemori H., Ishibashi M., Kosaka T., Pettit G. R., Kamano Y., Kobayashi J. (1994): Tetrahedron, 50, p. 10201 – 10206.

Zhu J. B., Wan X. Y., Zhu Y. P., Ma X. L., Zheng Y. W., Zhang T. B. (2010): Toxicity of bryostatin-1 on the embryo-fetal development of Sprague-Dawley Rats. Birth Defects Research part B – Developmental and Reproductive Toxicology 89, p. 171 – 174.

Zigha A., Rosenfeld E., Schmitt P., Duport C. (2006): Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. Arch Microbiol, vol 185, p. 222 – 223.

Zohar O., Lavy R., Zi X. M., Nelson T. J., Hongpaisan J., Pick C. G., Alkon D. L. (2011): PKC activator therapeutic for mild traumatic brain injury in mice. Neurobilogy of Disease 41, p. 329 – 337.

10 Seznam zkratek

ATCC Americká sbírka typových kultur

ARDRA Ribozomální DNA analýza

CCM Česká sbírka mikroorganismů

DMSO Dimethylsulfoxid

DSMZ Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury

KMVD Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

MALDI-TOF Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátorem

MBC Minimální baktericidní koncentrace

MIC Minimální inhibiční koncentrace

MFC Minimální fungicidní koncentrace

PCR Polymerázová řetězová reakce

PM1 Methanolový extrakt připravený z lyofilizátu *Pectinatella magnifica*

PM2 Hexanový extrakt připravený z lyofilizátu *Pectinatella magnifica*

PM3 Chloroformový extrakt připravený z lyofilizátu *Pectinatella magnifica*

PM4 Ethyl-acetátový extrakt připravený z lyofilizátu *Pectinatella magnifica*

PM5 Vodný extrakt připravený z lyofilizátu *Pectinatella magnifica*

UVPS University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences

VFU Veterinární a farmaceutická univerzita