

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Biologie, sekundární metabolity a symbiotické  
mikroorganismy mechovky *Pectinatella magnifica***

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Olga Svobodová**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Vlková, Ph.D.**

© 2013 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Biologie, sekundární metabolity a symbiotické mikroorganismy mechovky *Pectinatella magnifica*“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v bakalářské práci a uvedeny v seznamu literatury na konci. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. dubna 2013

---

## **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala vedoucí své bakalářské práce doc. Ing. Evě Vlkové, Ph.D., za cenné připomínky, rady a trpělivost při psaní bakalářské práce. V neposlední řadě děkuji celé své rodině a přátelům za podporu a trpělivost při zpracování tohoto textu.

## Souhrn

Mechovky (*Bryozoa*) jsou vodní přisedlí živočichové, kteří vytvářejí kolonie, často velkých rozměrů. Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*) je koloniální sladkovodní živočich, který pochází z oblasti Severní Ameriky. Na území České republiky byla poprvé objevena v Labi u Litoměřic v roce 1922. *Bryozoa* vytvářejí kulovité nebo keříčkovité kolonie. Potravou je drobný plankton a organický detrit. Jako podklad pro kolonie slouží různé druhy vodních rostlin jako například ponořené větve vrb a olší. Samotná *Pectinatella magnifica* je teplomilný druh, vyžadující teplotu okolo 20 °C. V případě, že teplota déle než týden nestoupne přes 16–17 °C, zpomalí růst a kolonie se začnou rozpadat. *Pectinatella magnifica* je součástí sladkovodních společenstev. Její přítomnost nezvyšuje znečištění ani nepůsobí problémy s kvalitou vody. Dosud nejsou dostupné žádné informace o produkci bioaktivních látek u sladkovodních mechovek. Mnoho skupin bezobratlých živočichů produkuje specifické látky, které slouží jako obranné látky proti parazitům, predátorům a infekcím. Mechovky jsou zdrojem biologicky aktivních látek. Nejzajímavější sekundární metabolity mořských mechovek jsou makrolidové laktony (bryostatiny), indolové alkaloidy, isochinolinové chinoliny, steroly (steroidy), nitrofenoly a disulfidy. Řada těchto látek není produkována samostatnými mechovkami, ale jsou syntetizovány symbiotickými mikroorganismy. Do současné doby nebyly popsány symbiotické mikroorganismy v *Pectinatella magnifica*, ale existuje řada studií, které se zabývají symbiotickými mikroorganismy u mořských mechovek. Mimo jiné jsou zde uvedena kultivační média pro izolaci symbiotických mikroorganismů. Cílem práce je navržení podmínek a kultivačního média pro stanovení symbiotických mikroorganismů *Pectinatella magnifica*, která budou v budoucnu použita pro analýzu symbiotických bakterií z bochnatky americké. Dále je v bakalářské práci popsána mikrobiální diverzita kultivovatelných bakterií mořských mechovek.

**Klíčová slova:** *Pectinatella magnifica*, mechovky, symbiotické mikroorganismy, antimikrobiální látky

## Summary

Bryozoans (*Bryozoa*) are sessile fresh-water animals that form colonies, dimensions of these usually being very large. One of bryozoan, *Pectinatella magnifica*, is a freshwater and colony-forming animal, native to North America. In this country, the species was first discovered in the Elbe River near Litoměřice in 1922. Members of the *Bryozoa* phylum form globular or fruticose colonies. *Pectinatella magnifica* itself is a thermophilous species that requires a temperature of about 20 °C and forms part of freshwater communities. No information is so far available on the production of bioactive substances in freshwater bryozoans. Many groups of invertebrates produce specific substances that serve as compounds to protect from parasites, predators and infection. Bryozoans are a source of biologically active substances, the most notable secondary metabolites of marine bryozoans comprising macrolide lactones (bryostatins), indole alkaloids, isoquinoline quinolines, sterols (steroids), nitrofenols and disulfids. A number of these substances are not produced by bryozoans alone, but synthesised by symbiotic microorganisms. Although there was no description of symbiotic microorganisms in *Pectinatella magnifica* to this day, a number of reports exist that are involved in studying symbiotic microorganisms in marine bryozoans, and refer to, among other things, culture media for the isolation of symbiotic microorganisms. This paper aims at designing conditions and proposing a culture medium, as well as determining symbiotic microorganisms of *Pectinatella magnifica*. Prepared for the cultivation were samples from the marine bryozoan. In this study is focusing on determining symbiotic bacteria of marine bryozoans as well as their antimicrobial activity.

**Key words:** *Pectinatella magnifica*, bryozoans, symbiotic microorganisms, antimicrobial substances

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	8
<b>2 Cíl práce</b> .....	9
<b>3 Literární přehled</b> .....	10
3.1 Systematické zařazení <i>Pectinatella magnifica</i> .....	10
3.2 Vývojová charakteristika skupiny <i>Bryozoa</i> .....	10
3.3 Morfologie a anatomie skupiny <i>Bryozoa</i> .....	11
3.4 Ekologie skupiny <i>Bryozoa</i> .....	15
3.5 Biologie a ekologie bochnatky americké ( <i>Pectinatella magnifica</i> ) .....	15
3.6 Složení bochnatky americké ( <i>Pectinatella magnifica</i> ) .....	17
3.7 Sekundární metabolity mechovců (Bryozoans) .....	18
3.7.1 Makrolidové laktony ( <i>bryostatiny</i> ) .....	20
3.7.2 Indolové alkaloidy, často bromderiváty .....	21
3.7.3 Isochinolinové chinolony .....	22
3.7.4 Steroly ( <i>Steroidy</i> ) .....	22
3.7.5 Sloučeniny s heteroatomem: nitrofenoly, disulfidy .....	22
3.8 Symbiotické mikroorganismy mechovců (Bryozoans) .....	23
3.8.1 <i>Pseudoalteromonas</i> .....	27
3.8.2 <i>Alteromonas</i> .....	28
3.8.3 <i>Shewanella</i> .....	28
3.8.4 <i>Vibrio</i> .....	28
3.8.5 <i>Bacillus</i> .....	29
3.8.6 <i>Psychrobacter</i> .....	29

<b>4 Materiál a metody .....</b>	<b>30</b>
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>31</b>
<b>6 Závěr .....</b>	<b>32</b>
<b>7 Seznam použité literatury .....</b>	<b>33</b>

## 1 Úvod

Mechovky (*Bryozoa*) jsou vodní přisedlí živočichové vytvářející kolonie, někdy i velkých rozměrů. Dnes je známo kolem 4 500 recentních druhů a 1 500 fosilních forem. Jen menší část, asi 50 druhů, se nachází ve sladké a brakické vodě. Mechovky na první pohled připomínají spíše rostliny nebo divné želatinové útvary. Nejsou bohužel příliš známé, a to i přesto, že tvoří nedílnou součást sladkých vod a moří.

Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*) je sladkovodní koloniální živočich. Pochází z oblasti Severní Ameriky. V České republice byla poprvé nalezena v roce 1922 v Labi u Litoměřic. V průběhu 20. století pak byla opakovaně nalézána v Labi a na Vltavě. V roce 2003 byly kolonie mechovek nově nalezeny v inundačním území Lužnice konkrétně na stále těžené písčinně Cep. Odtud se tento organismus rozšířil masivnějším způsobem na celé území CHKO Třeboňsko.

Tento druh, i přesto, že biomasa kolonií v době maximálního rozvoje *Pectinatella magnifica* je velmi nápadná, není nijak zvlášť sledován a bohužel o jeho ekologii a vlivu na ekosystém je známo jen velmi málo. S tím souvisí i to, že údaje o skupině sladkovodních mechovek na našem území jsou často staršího data a je jich jen málo. Vzhledem k tomu, že se tento organismus šíří do vodních nádrží poměrně rychle a jeho postup má charakter invaze, jeho poznání a zachycení vlivu na ekosystém je aktuální.



## 2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je vytvořit ucelený přehled o sladkovodní invazivní mechovce *Pectinatella magnifica*. Bakalářská práce je sepsána formou literární rešerše. V této bakalářské práci jsem nahromadila vědeckou literaturu týkající se biologie, sekundárních metabolitů a symbiotických mikroorganismů sladkovodních mechovek, zejména pak *Pectinatella magnifica*. Z údajů je vytvořen literární přehled a navržen metodický postup pro izolaci symbiotických mikroorganismů mechovek. Dále je v této bakalářské práci sestaven přehled známých sekundárních metabolitů produkovaných jak sladkovodními, tak i mořskými mechovkami.

### 3 Literární přehled

#### 3.1 Systematické zařazení *Pectinatella magnifica*

(podle Mañase, 2004)

kmen *Bryozoa* – mechovci

třída *Phylactolaemata* – mechovky

řád *Plumatellida*

čeleď *Pectinatellidae*

druh bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*)

#### 3.2 Vývojová charakteristika skupiny *Bryozoa*

Mechovci (*Bryozoa*) jsou koloniální přisedlí živočichové. Mají nejasný fylogenetický vývoj. Bývali (a v některých publikacích dosud jsou) řazeni pod podkmen *Ectoprocta*. Spolu s podobně vypadajícími koloniálními živočichy *Entoprocta* jsou pak řazeni do kmene *Bryozoa* (Šetlíková et al., 2005). Na základě obrveného lophophoru jsou postupně řazeni společně s ramenonožci (*Brachiopoda*), chapadlovými (*Phoronida*) a také s mechovnatci (*Ectoprocta* syn. *Bryozoa*) do skupiny *Lophophorata*. Chapadlovci (*Lophophorata*) jsou přisedlí bilaterální živočichové a kolem ústního otvoru mají nápadný obrvený věnec chapadel, tzv. lophophor. Nejnovější molekulární studie nedávno ukázaly, že *Lophophorata* vytváří samostatnou skupinu bez vazby na druhoústé živočichy. U kmene *Bryozoa* všichni jedinci vznikají pučením. Zatím molekulární analýzy nenašly blízké příbuzné mechovců, ale zařadily je do skupiny *Lophotrochozoa* spolu se skupinou *Platyzoa*, chapadlovek a ramenonožců (Zrzavý a Hošek, 2006).

U kmene *Bryozoa* se rozlišuje několik fylogenetických linií – skupiny *Gymnolaemata* a *Phylactolaemata*. Skupina *Gymnolaemata* je mořská větev. Jen několik druhů je druhotně sladkovodních. Mají lophophor kruhovitého tvaru. Jejich druhová diverzita je veliká a obsahuje až několik tisíc druhů. Skupina *Phylactolaemata* má ektoderm krytý kutikulou,

tvár lophophoru je podkovovitý a zahrnuje sladkovodní zástupce. Jedinci jsou navzájem propojeni tělní dutinou a nejsou nijak rozlišeni (Korábek, 2009).

### 3.3 Morfologie a anatomie skupiny *Bryozoa*

Mechovci (*Bryozoa*) jsou přisedlé mořské a sladkovodní organismy. Vytvářejí kolonie různých tvarů. Kolonie je tvořena ze zooidů, kteří vznikají pučením z mateřského jedince. Zooidi uvnitř kolonie jsou propojeni mezenchymatickým provazcem (funiculus) a ten je přichycen v těle zooida ke stěně žaludku. Většina druhů zooidů je uzavřena ve vápenatém nebo chitinovém ektodermálním obalu (zoecium). Zoecia mohou vytvářet souvislou vnější kostru zvanou zoarium, tak, že do sebe dokáží navzájem přecházet. Pomocí zřasené bazální plošky (epithekou) tyto masivní kolonie dokáží přisedat k podkladu. Tělo zooida je válcovitého nebo vakovitého tvaru a obsahuje všechny orgánové soustavy. Velikost těla zooida je mikroskopická. Normálně vyvinutí tvoří polymorfni kolonii a označujeme je jako autozooidy. Funkčně specializované jedince s redukovanou tělní schránkou nazýváme heterozooidy. Autozooidi se stávají potravou pro heterozooidy. Ochranu a inhibici larvy zajišťují ovicely. Kenozooidi slouží k připevnění kolonie k podkladu a gonoecia umožňuje rozmnožování (Špinar, 1965).

Tělo zooidů je rozděleno na dvě části: cystid a polypid. Cystid tvoří vnější obal a k povrchu přisedá. V dutině cystidu se nachází polypid, který vlastní zatažitelný lophophor podkovovitého nebo kruhovitého tvaru. U některých druhů se peristom uzavírá víčkem (epistom) (Kafka, 1886).

Pevná nepohyblivá část zooidu je cystid zvaný metasoma, který se skládá ze dvou vrstev: vnitřní vrstvy – endocystu a vnější vrstvy – exocystu. Oporu těla vytváří exocyst. Může být bílkovinný, chitinový nebo vápenatý, což záleží na druhu. Prostor cystidu je vyplněn hydrostatickou dutinou označovanou jako coelom, která vybíhá do chapadel lophophoru. Endocyst tím, že se na přední straně zoecia odděluje od exocystu, vytváří kožní napodobeninu, která je udržována pochvovými svaly. Je složena z bazální membrány, vnějšího epitelu, svalových vláken a peritoneálního epitelu (Rogick, 1937). Ještě dále následují dvě vrstvy pod epidermis, a to vrstva příčných svalů, které přiléhají k bazální

membráně, a vrstva podélných svalů, která přiléhá k mesodermu. Velmi důležitou funkci má endocyst při pučení nových jedinců a při tvorbě vajíček (Kafka, 1886).

Vnitřní pohyblivá část se nazývá polypid a obsahuje orgány. Má dvě části: horní, která se nazývá prosoma, a spodní nebo také krční – mesosoma. Lophophor je nosič chapadel a vybíhá z mesosomatu. Zooidu složí k přihánění potravy a k dýchání. Lophophor je zatažitelný do cystidu a tuto svou funkci používá při podráždění. Měkkým chitinovým límcem je lophophor přichycen k ústí zoecia a obklopuje tak ústa. Má dvě vybíhající ramena, která jsou kruhovitě nebo podkovovitě tvaru. Na průřezu chapadel lophophoru je několik řad multiciliálních buněk. Vnitřní řada je krátká a vnější řada je zastoupena dlouhými tykadly. Jako mechanický filtr slouží vyztužené a prodloužené bičinky. Mechovci se od ostatních živočichů (např. larev měkkýšů a kroužkovců) odlišují systémem sběru potravy. Mechovci mají dvě řady bičíkatých buněk, pomocí kterých si protisměrným pohybem přihánějí proud vody k ústnímu otvoru (Riisgård et al., 2004). Počet chapadel se liší podle druhu. Chapadla jsou dutá. Přetvořením tykadla různého tvaru vzniká víčko, uzavírající lophophor do cystidu. Svazek jednotlivých vláken umožňuje pohyb a změnu tvaru víčka. Uvnitř lophophoru je ústní dutina, kde začíná trávicí soustava, která má tvar „U“. Části trávicí soustavy jsou rozděleny na hltan, žaludek a konečník, který vyústí uje řitním otvorem vně lophophoru. Samotný hltan se nezúčastňuje trávení. Žaludek se skládá ze tří částí: česlo (cardium), slepé střevo a vrátník (pylorus). Pomocí stopky (funiculus) svalových buněk je žaludek přichycen k cystidu. Závěrečná část trávicí soustavy je konečník, který končí análním svěračem. Nahromaděné exkrementy uvnitř konečníku obsahují zbytky rozsivek, kořenonožců nebo nestravitelné zbytky fytoplanktonu. Trávicí soustava je celá ektodermálního původu (Kafka, 1886).

Svalová soustava je složena ze dvou skupin: svalstva zažívacího traktu a svaly tělní stěny (endocyst). Svaly jsou utvořeny buď jednotlivými svalovými vlákny nebo svalovými snopečky. Tyto svalové snopečky jsou dobře viditelné v oblasti zažívacího traktu, zatímco jednotlivá svalová vlákna jsou celkem vzácná. Díky svalové soustavě je umožněn pohyb polypidu, lophophoru, proudění tělní tekutiny uvnitř samotného jedince a přichycení polypida ke stěně cystidu. Zatahovače lophophoru a trávicího traktu jsou nejvýznamnější svaly celé svalové soustavy. K pohybu chapadel slouží dobře rozvinuté podélné svaly, které jsou uvnitř chapadel všech mechovek (Rogick, 1937). Pevné větvenité provazce tvoří funiculus. Ty jsou přichyceny ke stěně žaludku (Kafka, 1881).

Mezi hltanem a řitním otvorem v dutině lophophoru je uložena nervová soustava. Jícnová zauzlina (ganglium) je centrem nervové soustavy. Odtud vybíhají dvě mohutné větve do ramen lophophoru a jemné periferní nervy. Nervy inervují trávicí trakt a svalová vlákna (Kafka, 1886).

Cévní soustava zcela chybí. Vylučovací soustava se vyskytuje jen u velmi malého počtu mechovců (Špinar, 1965). Svalové buňky tělní stěny umožňují pohyb tělní tekutiny. Zejména přes lophophor a přes tělní stěnu se pak uskutečňuje výměna plynů, která probíhá osmoticky. V těle mechovců se nenacházejí žádné speciální orgány na vylučování metabolických odpadů. V cylindrickém epitelu endocystu se nacházejí buňky, které zajišťují vylučování. V polypidu se hromadí složitější odpadní produkty, které nejsou vylučovány. Polypid po několika týdnech degeneruje. Cystid následně vytváří nový polypid. Sladkovodní mechovky se rozmnožují buď pohlavně nebo nepohlavně. Nepohlavní rozmnožování se uskutečňuje dvěma způsoby: statoblasty nebo pučením. Mořské i sladkovodní mechovky jsou hermafroditi. Některé druhy mechovek jsou schopny produkovat vajíčka i spermie ve stejné době. Vajíčka jsou umístěna na endocystu a vyvíjejí se ve vaječnicku. Ve varlatech na funiculu se tvoří spermie. Jedno vajíčko postupně dozrává a odděluje se od vaječnicku a je spermii oplozeno. Oplození je vnitřní a vývoj nepřímý. Pupen (ooecium) vzniká z oplozeného vajíčka. Dochází k rýhování zygoty a vývoji zárodku. Pouze u některých druhů dochází ve váčcích mesodermální coelomové výstelky k vývoji oplozených vajíček. Následně se pak vyvíjejí z oplozených vajíček larvy trochoforového typu. Extrémní metamorfózou pohyblivé, bilaterálně souměrné larvy (cyphonautes) vzniká zooid (Zrzavý a Hošek, 2006). Larva má na spodní straně ústa a řitní otvor a na svrchní straně obrvenou apikální destičku. Následně prvoústa (blastoporus) zarůstají a na jejich místě se vytvoří váček z ektodermu, který se později spojí s prvostřevem. A tak vzniká ústní otvor. Později se na opačném konci střeva vychlípí ektoderm a tím vznikne průchozí trávicí trubice. U některých druhů zůstává střevo slepé. Přísavné orgány jsou na obou stranách larvy. Svazek brv probíhá po vnějším obvodě. Na vychlípěnině tělní stěny u sladkovodních mechovek vznikají polypidy.

Po nějakou dobu larva plave ve vodě. Později se pomocí přísavky připevní k podkladu. Larva se pak po přisednutí pokrývá celá ektodermální tkání, zploští se a všechny tkáně podlehnou rozkladu. Larva ztrácí brvy. Prvotní schránka (protoecium) je vytvořena a vyrůstá první jedinec kolonie z vnitřku změněné larvy, který kolem sebe vylučuje trubkovité

zoecium, které se nazývá ancestroecium. Primární zooid mechovky vzniká z oplozeného vajíčka. Pohlavní rozmnožování probíhá v období od června do září (Kafka, 1886).

Pučením se z prvního zooida rozvine kolonie, které jsou vytvořeny z matečného jedince z epidermis. Vzniká dvouvrstvý pupen a vytvoří se shluk zárodečných buněk. Následně se uvnitř pupenu vytváří dutina, na jejímž dně se zformuje trávicí trakt z ektodermálního materiálu. Později se vytvoří chapadla a základ nervové soustavy. Více matečných polypidů vytváří larvy skupiny *Phylactolaemata*, které posléze umírají a mění se na tzv. hnědé těleso. Na povrchu kolonie zůstávají živí zooidi (Kafka, 1881).

Sladkovodní mechovky se také rozmnožují nepohlavně fragmentací, dělením nebo několika druhy pučení. Když probíhá mechanické oddělení části kolonie, nastává fragmentace (např. u druhu *Plumatella fruticosa*). U hyalinních mechovek se převážně vyskytuje dělení, což je aktivní proces. Pomocí svalové kontrakce je zúžena stěna těla, coelom se rozdělí a oddělí se jednotlivé části kolonií (Wood, 2001).

Vnitřní pupeny (statoblasty) se vytvářejí u sladkovodních mechovek jako adaptace na nepříznivé klimatické podmínky. Mechovky jsou díky statoblastům schopny přežít i extrémní podmínky, jako jsou například extrémní teploty. Statoblasty jsou druhově specifické, a tak v některých případech je obtížné je rozlišit. Mají oválný nebo ledvinovitý tvar. Povrch mají pokrytý pevným chitinózním obalem, který má řadu komůrek vyplněných plynem. Někdy mohou být přítomny i ostny (např. *Pectinatella magnifica*) nebo háčky. Vznikají na funiculu, který je během života jedince přichycen k vaku žaludku. Po ukončení pohlavního rozmnožování nastává vývoj statoblastů. Zárodečná hmota se nachází uvnitř statoblastu, ze které se následně vytvoří nový polypid. K odumírání kolonií dochází ke konci léta a rozrušením stěn se statoblasty dostávají do prostředí. Nový zárodek vyrůstá na jaře ze statoblastu a dává tak vznik nové kolonii (Kafka, 1886). Rozeznáváme dva druhy statoblastů: sessoblasty a floatoblasty. Sessoblasty jsou přisedlé statoblasty připojené pevně k tělu zooida. Plovací prstenec nemají a někdy jsou opatřeny přichytnými tělísky. Poté, co dojde k rozpadu nebo odtržení kolonie, sessoblasty zůstávají pevně přichycené k substrátu i dlouho poté. Floatoblasty jsou kruhovitěho nebo oválného tvaru. Mají plovací prstenec, který je složený z chitinových rourek. Díky statoblastům je umožněno mechovkám osidlovat nová stanoviště. Pomocí vodního ptactva, plovoucí vegetace, větru nebo vodního toku mohou být přemísťovány i na velké vzdálenosti (Rogick, 1943).



Obr. 1: Statoblasty druhu *Pectinatella magnifica* (fotografie pracovníků KMVD)

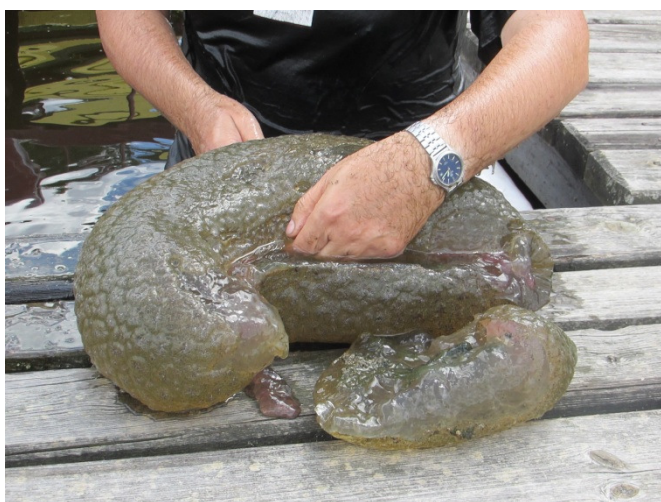
### 3.4 Ekologie skupiny *Bryozoa*

Obecně jsou *Bryozoa* nacházena v klidné stojaté nebo mírně tekoucí vodě. Vyskytují se hlavně ve vodě s dostatkem potravy a kyslíku. Většinou v malých hloubkách. Dočasný nedostatek vody mohou snést jen některé druhy. Vytvářejí kulovité nebo keříčkovité kolonie. Pomocí aktivní filtrace vody získávají potravu. Drobný plankton a organický detrit se stává jejich potravou. Různé druhy vodních rostlin (např. rod *Nuphar*, *Nymphaea*, *Potamogeton*) slouží jako substrát. Přichytávají se hlavně na stébla rákosu, kameny, dřevo, především pak ponořené větve vrb a olší. Přednost dávají stinným místům a čistým vodám. Každý druh je specifický a preferuje trochu jiné podmínky (Kafka, 1887).

### 3.5 Biologie a ekologie bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*)

*Pectinatella magnifica* je teplomilný druh, který vyžaduje teplotu kolem 20 °C. V případě, že teplota přes týden nestoupne přes 16–17 °C, zpomalí růst a kolonie se rozpadají. Průhlednost vody je také limitujícím faktorem, na jejímž vytváření se díky svému filtrování

také sama podílí. S tím souvisí i množství a vydatnost srážek, proudy vody či intenzivní déšť totiž mohou snadno zakalit litorální zónu (Šetlíková et al., 2005). V hlubších vodách se bochnatka americká vyskytuje spíše na podzim. Oproti stojaté vodě upřednostňuje tekoucí. Můžeme ji také nalézt v litorální zóně potoků a řek, kde je omezenější průtok vody, protože silný proud znemožňuje zachycení substrátu a následné přežití kolonie (Davenport, 1900). Preferuje vodu s dostatkem živin. Její výskyt byl zaznamenán v oligotrofních až mezotrofních nádržích, jen velmi výjimečně ve vodách dystrofních (Balounová et al., 2006). Nejdůležitějším zdrojem potravy pro bochnatku americkou je fytoplankton, hlavně rozsivky. Také pak filtruje různé prvoky (Protozoa), malé planktonní členovce, řasy a detrit (Wood, 2001). Kolonie mechovky díky svému intenzivnímu metabolismu ovlivňují složení fytoplanktonu v nádržích (Ricciardi a Lewis, 1991). *Pectinatella magnifica* je ve své ekologii běžnou součástí sladkovodních společenstev. Nezvyšuje znečištění vody ani nepůsobí problémy s kvalitou vody. Nicméně na konci životního cyklu působí menší problémy kvůli tomu, že se oddělují kolonie od substrátu a mohou ucpávat vodovodní potrubí nebo odpadní kanalizaci. Tyto odumírající zbytky působí odpudivě na rekreanty nebo rybáře. Zatím nebylo prokázáno, že by bochnatka americká při přímém kontaktu s člověkem nějak nebezpečně ovlivňovala lidské zdraví. Avšak existují případy, kdy způsobila podráždění kůže či svědění (Wood, 2001).



Obr. 2: Kolonie bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*) (fotografie pracovníků KMVD)



Řada jiných organismů – od symbiontů přes komenzály po parazity – obývají mechovky (Šetlíková et al., 2005). Významnými hostiteli jsou pro skupiny Microsporidia a Myxozoa. Vývoj parazitických druhů *Trichonosema* a *Tetracapsula* probíhá v coelomové dutině. Tyto druhy způsobují závažné onemocnění ledvin u lososovitých ryb (Canning et al., 2001). *Pectinatella magnifica* se stává útočištěm a obydlím i jiným organismům (např. drobným korýšům Crustacea a plžům Gastropoda). Dále např. ploštěnky kladou svá vajíčka do rosolovité hmoty kolonií. Často se také vyskytují ve společnosti sladkovodních hub, především druhu *Ephydatia fluviatilis* (Šetlíková et al., 2005). Na povrchu jsou nárůsty sinic řas a sinic rodu *Scenedesmus*, *Cymbella*, *Eunotia*, *Navicula*, *Oscillatoria*, *Stephanodiscus*, *Coenococcus*, *Microchaete* a *Pseudanabaena*, které se shodují s planktonem vodních nádrží. Současně také sama *Pectinatella magnifica* slouží jako potrava ploštěnek, plžů, larev pakomárů (např. *Cryptochironomus*) a chrostíků (*Trichoptera*) (Balounová et al., 2006).

### 3.6 Složení bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*)

Kolonie zooidů bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*) tvoří tenkou povrchovou vrstvu. Uvnitř kolonie se nachází rosolovitá hmota, která může dosáhnout až 70 cm. Obsah sušiny je kolem 0,4 % z celkové hmotnosti jedince. Výzkumy na konci sezony v roce 2004 nicméně zjistily, že průměrný obsah sušiny je vzhledem k vysoké koncentraci kolonií řas a sinic uvnitř bochnatky americké 2,25 %. Celá kolonie (vážící od 2 do 100 kg) byla vytvořena v rekordním čase (několik dní), což je srovnatelný čas pro růst některých nádorů. Proteiny (albuminy, ovalbuminy) jsou přítomny v rosolovité hmotě. Tyto bílkoviny jsou tvořeny především aminokyselinami: tyrosin, tryptofan, cystin. Charakteristickým znakem *Pectinatella magnifica* je, že nosná konstrukce je složena z chitinu (Sharp et al., 2007).

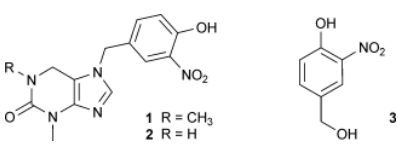
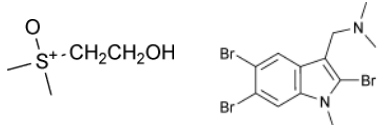
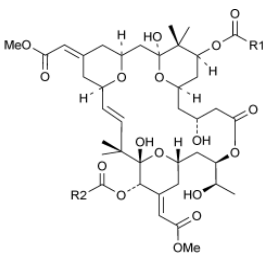
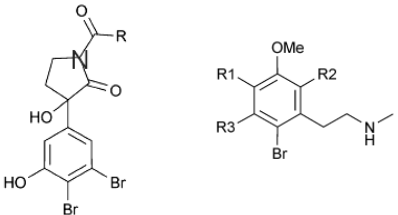
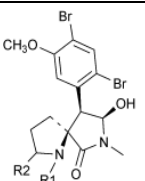


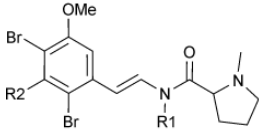
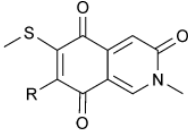
Obr. 3: Rosolovitá hmota uvnitř kolonie bochnatky americké (fotografie pracovníků KMVD)

### 3.7 Sekundární metabolity mechovců (Bryozoans)

Sharp et al. (2007) uvádějí, že nejsou dostupné žádné informace o přírodních produktech sladkovodních mechovek. Mnoho skupin bezobratlých produkuje specifické látky, které slouží jako obranné látky proti parazitům, predátorům, infekcím nebo jako chemikálie pro vnitrodruhovou a mezidruhovou komunikaci. Některé z těchto sloučenin mají zajímavé vlastnosti, které by mohly být využívány ve farmakologii (Prinsep et al., 2004).

Tabulka 1: Příklady sekundárních metabolitů mořských mechovek (Sharp et al., 2007)

Taxonomické zařazení produkčního organismu	Struktura sekundárního metabolitu	Poznámky
<p>Třída <i>Stenolaemata</i> nebo <i>Cyclostomata</i></p>	<p>phidoplopin</p>  <p>1 R = CH<sub>3</sub> 2 R = H 3</p>	<p>neobvyklá přítomnost nitroskupiny</p>
<p>Třída <i>Gymnolaemata</i> nebo <i>Ctenostomatida</i> podřád <i>Alcyondiina</i></p>		<p>zabraňují buněčnému dělení</p>
<p>podřád <i>Vesicularina</i> rod <i>Amathia</i></p>	<p>bryostatiny</p> 	<p>mohou zabraňovat růstu nádorů</p>
	<p>convolutamides      convolutamines</p> 	<p>pozastavují a působí proti buněčnému dělení</p>
	<p>amathaspiramides</p> 	<p>mírně cytotoxický pro nádorové buňky</p>

	amathamides	bakteriální symbionti
		
nebo <i>Cheilostomata</i>	perfragiliny	antibakteriální aktivita
	 <p>Methanol, dimethyl sulfid, dichlormethan, dimethyl disulfid, chloromethan, methanethiol</p>	

Je nutno poznamenat, že zaznamenaná aktivita výše uvedených sloučenin byla zdokumentována experimentálně (Sharp et al., 2007).

Hlavní sekundární metabolity mechovek lze rozdělit do 5 skupin:

1. makrolidové laktony (bryostatiny)
2. indolové alkaloidy
3. isochinolinové chinolony
4. steroly (steroidy)
5. sloučeniny s heteroatomem: nitrofenoly, disulfidy

### 3.7.1 Makrolidové laktony (bryostatiny)

Nejzajímavějšími sloučeninami spojenými právě s mechovkami jsou bryostatiny. Bryostatiny patří do skupiny makrolidových laktonů (vzorec viz tab. 1). Na začátku osmdesátých let 20. století byly tyto látky izolovány z výtažků mechovky *Bugula neritina*

a byla určena jejich struktura. Bryostatiny jsou látky produkované na ochranu mechovky proti predátorům nebo proti infekcím. Mají cytotoxické vlastnosti a jsou předmětem výzkumu jako protinádorové látky (Pettit et al., 1993).

Zatím bylo nicméně zjištěno, že bryostatiny nejsou produktem samotných bryozoans, ale spíše jsou produktem symbiotických mikroorganismů, například: *Candidatus Endobugula sertula*, které jsou zdrojem bryostatinů u mořské mechovky *Bugula neritina* (Davidson et al., 2001; Lopanik et al., 2006). Bylo zjištěno, že i nitrofenoly a další sekundární metabolity mechovek jsou mikrobiálního původu (Sharp et al., 2007).

Byly izolovány tři bryostatiny z larvy *Bugula neritina*, a to bryostatin 10, bryostatin 20 a třetí bryostatin ještě není přesně charakterizován, ale již teď se ví, že byl odpudivý pro ryby. Bryostatin 10 má pravděpodobně nejsilnější antipredátorské účinky, ale bude velmi obtížné určit přesné biochemické mechanismy, kterými na predátory působí (Lopanik et al., 2006). Sharp et al. (2007) uvádějí, že nejsou dostupné žádné informace o přírodních produktech sladkovodních mechovek (Sharp et al., 2007). Bryostatiny jsou zkoumány hlavně kvůli léčivým účinkům na centrální nervovou soustavu savců (Paul et al., 2007). Bylo zjištěno, že bryostatiny mají vliv na paměť, a sice bryostatiny v koncentraci 0,1–0,5 ng/ml výrazně zlepšovaly paměť. Bryostatiny mohou být také použity na léčbu a prevenci proti HIV-1 infekci (Ariza et al., 2011). Bryostatin je testován jako možný lék pro léčbu leukemie, lymfomů, melanomů a dalších nádorů (Davidson a Haygood, 1999; Davidson et al., 2001).

Současně bylo vyzkoumáno, že bryostatiny mohou být lékem pro traumatické poranění mozku (Zohar et al., 2011) a také k léčbě depresí, Alzheimerovy choroby a dalších jiných poruch centrálního nervového systému (Sun a Alkon, 2006; Paul et al., 2007). Bryostatin může aktivovat vrozenou imunitu (Ariza et al., 2011). Současně také bylo zjištěno, že bryostatin způsobuje zvýšenou citlivost svalů na bolest (Alvarez et al., 2011). Existují i další bryostatiny, u kterých je potenciál, že by se v budoucí době mohly stát léčivými (Davidson et al., 2001).

### **3.7.2 Indolové alkaloidy, často bromderiváty**

Indolové alkaloidy jsou alkaloidy, které mají jako základ chemickou strukturu indol. Ten je zabudován buď v jednoduchých molekulách (gramin, psilocin, psilocybin) nebo ve

složitějších strukturách. Indolové alkaloidy představují velmi rozsáhlou a terapeuticky dobře využitelnou skupinu sekundárních metabolitů. Indolové alkaloidy byly izolovány z mořské mechovky *Pterocella vesiculosa*. Tyto alkaloidy byly dále zkoumány pro své bioaktivní, cytotoxické a antibakteriální účinky. Bylo zjištěno, že extrakt z *Pterocella vesiculosa* je účinný proti leukemii u myši. Následně z mechovky *Pterocella vesiculosa* byly izolovány dva alkaloidy: pterocellin A a pterocellin B. Dodnes probíhá izolace a charakteristika nových pterocellinů, které mají být pojmenovány procellin C a procellin D. Alkaloidy, které byly izolovány z *Cribricellina cribraria*, měly v různých stupních antimikrobiální a antimykotické vlastnosti (Prinsep et al., 2004).

### **3.7.3 Isochinolinové chinolony**

Chinolony se řadí do skupiny chemoterapeutik. Jsou to primárně baktericidní látky, které mají různě širokou antibakteriální aktivitu. Chemicky je lze rozdělit na nefluorované a fluorované. Isochinolinové chinolony jsou účinné zejm. na gramnegativní bakterie a užívaly se zejména v minulosti k léčbě močových infekcí. Chinolony se také používají k léčbě systémových infekcí. Chinolony inhibují enzym gyrázu. Problémem je rychlý vznik rezistence, často zkřížené mezi jednotlivými látkami (Sharp et al., 2007). Také mořské mechovky mohou produkovat chinolony – jedná se o isochinolony (Prinsep et al., 2004).

### **3.7.4 Steroly (Steroidy)**

Steroly jsou organické chemické látky ze skupiny steroidů, které mají ve své struktuře v poloze 3 hydroxylovou skupinu a v poloze 17 alifatický postranní řetězec. Steroly se běžně vyskytují v buňkách hub (mykosteroly), rostlin (fytoosteroly), živočichů (zoosteroly) i člověka. Steroidy byly izolovány a zkoumány z mořské mechovky *Biflustra grandicella* (Lopanik et al., 2006).

### **3.7.5 Sloučeniny s heteroatomem: nitrofenoly, disulfidy**

Mořské mechovky mohou být zdrojem dalších organických látek, a to hlavně nitrofenolů, které jsou pravděpodobně produkovány symbiotickými mikroorganismy. Stanovení činnosti těchto sloučenin zatím není zcela prozkoumáno. Jsou prováděny empirické

testy, na základě kterých je možné zjistit jejich cytotoxicitu a některé další významné účinky. V několika případech sekundární metabolity způsobily kožní alergii a ukázaly tak, že jsou cytotoxické (Sharp et al., 2007).

### 3.8 Symbiotické mikroorganismy mechovců (Bryozoans)

Mechovky, jak bylo zmíněno výše, jsou zdrojem biologicky aktivních látek. Řada těchto látek není produkována samostatnými mechovkami, ale jsou syntetizovány symbiotickými mikroorganismy. Do současné doby nebyly popsány symbiotické mikroorganismy v *Pectinatella magnifica*, ale existuje řada studií, které se zabývají výzkumem symbiotických mikroorganismů u mořských mechovek.

Ve své bakalářské práci se zaměřuji na popis symbiotických bakterií. Bakterie v koloniích mechovek lze studovat různými metodami, jako jsou například přímá mikroskopie nebo stanovení pomocí kultivačních a molekulárně biologických metod. Cílem mé bakalářské práce je navrhnout kultivační médium pro izolaci bakterií u *Pectinatella magnifica*. V rešerši se tedy zaměřuji hlavně na kultivační stanovení.

Pukall et al. (2001) zkoumali mikrobiální diverzitu kultivovatelných bakterií mořské mechovky *Flustra foliacea* ze Severního moře. Na kultivaci byly připraveny tři vzorky z mořské mechovky, a to Flustra I, Flustra II a Flustra III. Ze vzorku Flustra I byly nejčastěji izolovány bakterie ze skupiny  $\gamma$ -Proteobacteria. Bakterie byly identifikovány jako *Shewanella frigidimarina*, *Pseudoalteromonas* sp. a *Psychrobacter* sp. Většina bakterií izolovaných ze vzorku Flustra II pocházející z oblasti Steingrund v Severním moři byla určena jako grampozitivní bakterie. Ze vzorku Flustra III byly izolovány a následně také identifikovány fylogeneticky smíšené bakteriální populace skládající se z  $\gamma$ - a  $\alpha$ -Proteobacterií a grampozitivních bakterií. Autoři použili pro kultivaci bakterií minimální média pro zjištění oligotrofních a pomalu rostoucích kmenů bakterií. Zatímco rychle rostoucí kmeny bakterií byly izolovány z komplexních médií o různém složení.

Výše zmíněná minimální média obsahovala 10 mg peptonu (Difco), 5 mg kvasničného autolyzátu (Oxoid) a agar ve valu vody. Média byla doplněna o 1 g/l jednou z těchto látek: kyselinou alginovou, acetátem, glukózou, glyoxylátem, mannitem, metylaminem,

propionátem, práškovým extraktem „lamminaria saccharina“ (Sigma), laminarin (0,1 g/l; Sigma) a rybí moučkou (1 %; Sigma).

Komplexní média byla použita následující:

- R2A agar (Difco) obohacený o NaCl (15 g/l)
- Agar pro aktinomycety (Difco) obohacený o 15 g/l NaCl a 5 ml glycerolu
- Mořský agar (Difco)
- Mořský bujon 1:100 obohacený o NaCl (20 g/l) a 15 g/l agaru (Oxoid)
- BGYM médium (obsahuje glukózu, kvasnicový autolyzát, sladový extrakt rozpuštěný v uměle vytvořené mořské vodě) (Balk-Bindseil et al., 1995)
- Kvasnico-tryptonový extrakt (Oxoid) – mořské médium (YTSS) (Gonzáles et al., 1996)
- TCBS-agar (Difco) obsahující tiosulfát, žluč a sacharózu
- Chitinový agar doplněný o chitosan (1 g/l)
- Celulózový a škrobový agar (10 g/l) (Huang et al., 1996)

Všechna výše zmíněná média obsahovala 100 µg/ml cykloheximidu (Sigma) k omezení růstu plísní. Misky s médii byly kultivovány při 8 °C až 6 týdnů. Přestože pro všechny tři vzorky (Flustra I, Flustra II, Flustra III) byla použita stejná kultivační média, byl největší počet izolovaných kolonií zaznamenán u vzorku Flustra I (138 izolátů).



Tabulka 2: Souhrn izolovaných bakterií a jejich počet v příslušném vzorku (Pukall et al., 2001)

Izolovaný rod bakterie	Vzorek Flustra I Počet izolovaných bakterií (%)	Vzorek Flustra II Počet izolovaných bakterií (%)	Vzorek Flustra III Počet izolovaných bakterií (%)
<i>Shewanella</i>	45 (32,6)	0	1 (4,0)
<i>Pseudoalteromonas</i>	57 (41,3)	0	2 (8,0)
<i>Psychrobacter</i>	16 (11,6)	0	0
<i>Pseudomonas</i>	7 (5,1)	0	1 (4,0)
<i>Cytophaga/Flavobacterium</i>	13 (9,4)	1 (1,75)	0
<i>Yersinia</i>	0	12 (21,05)	3 (12)
<i>Roseobacter/Ruegeria</i>	0	5 (8,8)	3 (12)
<i>Bacillus</i>	0	28 (49,1)	5 (20)
<i>Staphylococcus</i>	0	2 (3,5)	0
<i>Micrococcus</i>	0	4 (7,0)	0
<i>Nocardioides</i>	0	5 (8,8)	0
<i>Arthrobacter</i>	0	0	1 (4,0)
<i>Cellulomonas</i>	0	0	1 (4,0)
<i>ostatní</i>	0	0	8 (32,0)

Jak již bylo zmíněno výše, existuje k dnešnímu dni jen velmi malý počet studií, které se zabývají zkoumáním mikroorganismů v mechovkách. Jednu studii vypracovali Heindl et al. (2009). Autoři se zaměřili na stanovení symbiotických bakterií mořských mechovek a stanovení jejich antimikrobiální aktivity.

Bylo odebráno celkem 21 vzorků blíže nespecifikovaných mořských mechovek ze 14 různých lokalit. Tyto vzorky z mořských mechovek byly odebrány z Baltského a Středozemního moře. Následně bylo izolováno 340 bakterií a z toho 101 bakterií vykazovalo antimikrobiální aktivitu. Ze Středozemního moře byly izolovány například kmeny rodu *Sphingomonas* a *Alteromonas*, na rozdíl od kmenů *Shewanella*, *Marinomonas* a *Vibrio*, které pocházejí z izolátů a vzorků odebraných z Baltského moře. Nicméně například rod *Pseudoalteromonas* byl nalezen v izolátech ze vzorků odebraných z obou lokalit.

Na odběr vzorků mořských mechovek byly zvoleny tři místa na pobřeží Středozevního moře a tři místa v Baltském moři. Vzorky byly odebrány potápěči do sterilních, uzavíratelných plastových lahví a byly uloženy v mořské vodě na odebraném stanovišti do té doby, dokud vzorky nebyly dále transportovány. Následně byly vzorky z mořských mechovek nařezány pomocí sterilní holicí žiletky a potom byly promyty sterilní mořskou vodou. Každý odebraný vzorek byl vyfotografován pro pozdější taxonomické zařazení. Celkem bylo odebráno 10 vzorků z Baltského moře z 5 různých druhů mechovek a 11 vzorků ze Středozevního moře z 9 různých druhů mechovek. Vzorky mechovek byly zafixovány a podrobeny vyšetření. Pomocí elektronového mikroskopu byly sledovány symbiotické mikroorganismy.

Pro mikrobiologické analýzy byly vzorky mechovek rozdrobeny pomocí sterilní paličky a naředěny ve sterilizované mořské vodě ( $10^{-1}$ – $10^{-5}$ ). Naředěné vzorky byly asepticky natírány na kultivační médium. Pro kultivaci bakterií bylo použito TSB3S25 médium (obsahující 0,3 % sójového tryptonu – Difco, 2,5 % NaCl a 1,5 % agaru). Komponenty byly rozpuštěny v přírodní mořské vodě odebrané z Baltského a Středozevního moře. Misky byly kultivovány při 25 °C 1 týden. Po kultivaci byly kolonie izolovány, identifikovány a byla sledována jejich antimikrobiální aktivita proti *Staphylococcus lentus*, *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli* (Heindl et al., 2009).

Tabulka 3: Souhrn izolovaných bakterií a jejich antimikrobiální aktivita (Heindl et al., 2009).

Příslušný rod bakterie	Antimikrobiální aktivita proti		
	<i>Staphylococcus lentus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Cellulomonas</i>	+	–	–
<i>Tenacibaculum</i>	–	+	–
<i>Pseudovibrio</i>	+	+	+
<i>Sphingomonas</i>	+	–	–
<i>Alteromonas</i>	–	+	–
<i>Marinomonas</i>	+	+	–
<i>Pseudoalteromonas</i>	+	+	–
<i>Arctic sea water bacterium</i>	–	+	–
<i>Alteromonadaceae</i>	+	+	–
<i>Shewanella</i>	+	+	–
<i>Vibrio</i>	–	+	–

Nejčastěji se vyskytující rody bakterií stanovené v mořských mechovkách jsou popsány v následujících kapitolách.

### 3.8.1 *Pseudoalteromonas*

*Pseudoalteromonas* je rod mořských bakterií. V roce 1995 Gauthier et al. navrhli *Pseudoalteromonas* jako nový rod, který byl vyčleněn z rodu *Alteromonas*. Oddělen byl na základě výsledků rRNA-DNA hybridizačních studií. Jedná se o gramnegativní, heterotrofní aerobní bakterie. Buňky mají tvar mírně zakřivených tyčinek a vyskytují se jednotlivě nebo v párech. Dosahují šířky 0,3–0,9 µm. Netvoří mikrocyty ani endospory. Buňky jsou schopny růstu při teplotě 4–30 °C. Pozorované kolonie rodu *Pseudoalteromonas* mají běžovou barvu, jsou hladké s rovnými okraji a rostou do průměru 1–2 mm. *Pseudoalteromonas* se nacházejí ve všech oceánech světa převážně při teplotě 20 °C. Poprvé byl rod *Pseudoalteromonas* izolován z mořských řas a je prokázáno, že je producentem celé řady biologicky aktivních látek (Bozal et al., 1997).

### 3.8.2 *Alteromonas*

*Alteromonas* je rod proteobakterií, které se nacházejí v mořské vodě jak na otevřeném oceánu, tak i na pobřeží. Jedná se o gramnegativní, aerobní a heterotrofní bakterie s jedním polárně umístěným bičíkem. Buňky mají tvar zakřivených tyčinek. Nejmasivnější výskyt byl zaznamenán u polynéských ostrovů. Dříve rod *Alteromonas* zahrnoval 4 druhy. Ale nyní na základě rRNA-DNA hybridizačních experimentálních studií bylo přiřazeno do rodu *Alteromonas* celkem 14 druhů (Gauthier et al., 1995).

### 3.8.3 *Shewanella*

*Shewanella* je rod mořských bakterií, které patří k jedněm z nejběžnějších bakterií na Zemi. *Shewanella* je fakultativní, gramnegativní, anaerobní bakterie s polárně umístěným bičíkem. Buňky mají tyčinkovitý tvar a jsou 2–3 µm dlouhé a 0,5–0,6 µm široké. Vytvářejí kolonie, které mají kruhový tvar, jsou hladké a konvexní. Mají béžovou až narůžovělou barvu, což závisí na stáří samotné kolonie. Jejich růst není závislý na iontech sodíku. Růst buněk byl zaznamenán při různých teplotách, ale neoptimálnější teplota pro růst je kolem 30 °C. Buňky jsou schopny přeměnit dusičnan na dusitan a dusitan na oxid dusný. Přírůst buněk je nejmasivnější při optimální koncentraci NaCl a přírůst může činit až 3 % za týden. *Shewanella oneidensis* patří k jednomu z nejznámějších druhů z rodu *Shewanella*. Své jméno získala podle jezera Oneida v USA, kde byla prvně izolována. *Shewanella oneidensis* se převážně nachází ve velkých hloubkách. Tento druh je zvláště zajímavý v oblasti výzkumu kvůli své schopnosti a potenciálu biosanace těžkých kovů (Gorby et al., 2006).

### 3.8.4 *Vibrio*

*Vibrio* je rod gramnegativních, fakultativně anaerobních bakterií. Buňky mají tvar přímých nebo mírně zakřivených tyčinek. Pohybují se pomocí bičíků. Žijí saprofytičky ve sladké i v mořské vodě, v půdě i v organismu člověka a zvířat (např. druhy *Vibrio fischeri*, *Vibrio costicola*). Rostou na běžných půdách, někdy i při vyšším pH (až 10). Některé druhy jsou patogenní, např. *Vibrio cholerae* vyvolává cholera. Přenáší se téměř výhradně vodou

v prostředí se špatnými hygienickými podmínkami. *Vibrio parahaemolyticus* se vyskytuje v organismu některých mořských ryb. Je nejčastější příčinou gastroenteritid v Japonsku, kde se konzumují syrové ryby (Blake et al., 1979).

### 3.8.5 *Bacillus*

*Bacillus* je rovná grampozitivní sporulující tyčinkovitá aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie o velikosti  $1 \times 4 \mu\text{m}$ . Buňky tvoří spory, které jsou teplotně rezistentní po dobu 30 minut. Rod *Bacillus* je poměrně rozsáhlý a značně rozšířený v přírodním prostředí, zejména v půdě a ve vodě, odkud se zejména spory mohou dostávat i do ovzduší. Jeho druhy vytvářejí amylolytické, pektinolytické a proteolytické enzymy, které pomáhají rozkládat různé organické zbytky rostlin a živočichů. Rod *Bacillus* se využívá hlavně v medicíně, kde produkuje antibiotika. Tvoří bělavé až hnědavé nepravidelné kolonie buněk. Optimální pH je 5,5–8,5. Rod *Bacillus* tvoří asi 10 % epifytních bakterií na rostlinách. Tento rod je také znám díky své produkci fytoalexinů – látek působících stimulačně nebo inhibičně na růst rostlin. Nejznámějším druhem z rodu *Bacillus* je *Bacillus anthracis*. Jedná se o grampozitivní fakultativně anaerobní bakterii tyčinkovitého tvaru, která je známa především jako původce onemocnění anthrax (Anagnostopoulos a Spizizen, 1961).

### 3.8.6 *Psychrobacter*

*Psychrobacter* je rod heterotrofních gramnegativních tyčinkovitých, aerobních a mořských bakterií. Předpona Psycho- je odvozena z řeckého přídavného jména Psychros, což v překladu znamená zima. *Psychrobacter* je tedy velmi rezistentní vůči zimě a nepříznivým teplotním podmínkám. Tento rod je psychrofilní a optimální teplota pro jeho růst je 5 °C. Jakmile teplota překročí 35–37 °C, kolonie již nedokáží růst. Kolonie rodu jsou neprůhledné a hladké. Vyskytuje se v oceánech, nejčastěji v Antarktickém, kde byl izolován z široké škály stanovišť, hlavně tedy z mořské vody, ale také z kůže nebo žaber ryb. Například *Psychrobacter glacincola* byl izolován z ledu Antarktického oceánu a *Psychrobacter proteolyticus* byl nalezen v žaludku ryb z Antarktického oceánu (Bowman et al., 1996).

## **4 Materiál a metody**

Na základě literárních materiálů zpracovaných v literární rešerši byla sestavena kultivační média a podmínky pro stanovení symbiotických mikroorganismů *Pectinatella magnifica*.

## 5 Výsledky

Pro kultivaci symbiotických mikroorganismů byla navržena tato média:

Minimální médium s glukózou

Složení: 10 mg peptonu

5 mg kvasničného extraktu

1 g glukózy

10 g Na Cl

15 agaru

1 l vody

„Yeast extract“ agar (Oxoid)

Složení: 23 g Yeast extract agar

5 g tryptonu

1 g glukózy

1 l vody

„Bochnatkové médium“

Byly použity stejné komponenty jako v předchozím médiu, nebyly však rozpuštěny ve vodě, ale ve výluhu z bochnatky. Výluh z bochnatky byl připraven následujícím způsobem: 0,5 kg kolonie bochnatky bylo rozvařeno v 0,5 l vody a následně přefiltrováno. Byly navrženy následující podmínky pro kultivaci: 5 dní při 24 °C aerobně i anaerobně. Teplota 24 °C byla určena jako optimální, protože právě při této teplotě je nárůst kolonií mechovek nejmasivnější. Vzhledem k tomu, že je požadavek na stanovení aerobních i anaerobních bakterií, tak bude kultivace probíhat jak za přítomnosti kyslíku, tak i za jeho nepřítomnosti.

## **6 Závěr**

Na základě literárních údajů byla sestavena kultivační média, která budou v budoucnu použita pro analýzu symbiotických bakterií z *Pectinatella magnifica*.



## 7 Seznam použité literatury

- Alvarez, P., Ferrari, L. F., Levine, J. D. 2011. Muscle pain in models of chemotherapy-induced and alcohol-induced peripheral neuropathy. *Annals of Neurology*. 70 (1). 101–109.
- Anagnostopoulos, C., Spizizen, J. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81 (5). 741–746.
- 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 Unixie cytokines and chemokines in dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*. 286 (1). 24–34.
- Balk-Bindseil, W., Helmke, E., Weyland, H., Laatsch, H. 1995. Maremycin A and B, new diketopiperazines from a marine *Streptomyces* sp. *Liebigs. Ann. Chem.*, pp. 1291–1294.
- Balounová, Z., Rajchard, J., Šmahel, L., Švehla, J. 2006. Invaze *Pectinatella magnifica* v jihočeských vodách pokračuje. In: Měkotová, J., Štěrba, O. (eds.). Říční krajina 4. Sborník příspěvků z konference, 18. 10. 2006. Olomouc. ISBN 80-244-1495-3.
- Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G., Heublein, P. C. 1979. Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *N. Engl. J. Med.* 300 (1). 1–5.
- Bowman, J. P., Cavanagh, J., Austin, J. J., Sanderson, K. 1996. Novel *Psychrobacter* Species from Antarctic Ornithogenic Soils. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (4). 841–848.
- Bozal, N., Tudela, E., Rosselló-Mora, R., Lalucat, J., Guinea, J. 1997. *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., Isolated from an Antarctic Coastal Environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (2). 345–351.
- Canning, E. U., Curry, A., Feist, S. W., Longshaw, M., Okamura, B. 2001. A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *J. Eukaryot. Microbiol.* 47 (5). 456–468.

- Davenport, C. B. 1900. On the Variation of the Statoblasts of *Pectinatella magnifica* from Lake Michigan, at Chicago. *The American Naturalist*. 34 (408). 959–968.
- Davidson, S. K., Haygood, M. G. 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*. 196 (3). 273–280.
- 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 Environmental Microbiology*. 67 (10). 4531–4537.
- Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R. 1995. Phylogenetic Analyses of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (4). 755–761.
- González, J. M., Whitman, W. B., Hosson, R. E., Moran, M. A. 1996. Identifying numerically abundant culturable bacteria from complex communities: an example from a lignin enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (12). 4433–4440.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B. et al. 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 (30). 11358–11363.
- Heindl, H., Wiese, J., Thiel, V., Imhoff, J. F. 2009. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats. *Systematic and Applied Microbiology*. 33. 94–104.
- Huang, J-H., Chen, C-J., Su, Y-C. 1996. Production of chitinolytic enzymes from a novel species of *Aeromonas*. *J. Ind. Microbiol.* 17. 89–95.
- Kafka, J. 1881. O sladkovodních mechovkách českých. *Vesmír*. 10. 222–223, 247–249, 271–273, 282–283.

Kafka, J. 1886. Sladkovodní mechovky země české II. Archiv pro přírodovědecké prozkoumání Čech, Praha.

Korábek, O. Pásnice, mechovky a mechovnatci České republiky. OKA 7. [online]. 2009. [cit. 2011-02-22]. Dostupné z: [http://casopisoka.wz.cz/clanek/oka\\_07\\_01\\_001\\_006.pdf](http://casopisoka.wz.cz/clanek/oka_07_01_001_006.pdf).

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

Mañas, M. 2004. [online]. 2009. [cit. 2011-04-17]. BioLib. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id44166/>

Paul, V. J., Arthur, K. E., Ritson-Williams, R., Ross, C., Sharp, K. 2007. Chemical defenses: From Compounds to Communities. Biological Bulletin. 213 (3). 226–251.

Pettit, G. R., Cichacz, Z. A., Gao, F., Herold, C., Boyd, H., Boyd M. R. 1993. Isolation and structure of the remarkable human cancer cell-growth inhibitors spongistatin-2 and spongistatin-3 from an eastern Indian ocean *Spongia*. *Review Article Veterinarni Medicina*, sp. Journal of the Chemical Society – Chemical Communications. 14. 1166–1168.

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

Ricciardi, A., Lewis D. J. 1991. Occurrence and ecology of *Lophopodella carteri* (Hyatt) and other fresh-water Bryozoa in the Lower Ottawa River near Montreal, Quebec. Canadian Journal of Zoology. 69 (5). 1401–1404.

Riisgård, H. U., Nielsen, K. K., Fuchs, J., Rasmussen, B. F., Obst, M., Funch, P. 2004. Ciliary feeding structures and particle capture mechanism in the freshwater bryozoan *Plumatella repens*. Invertebrate Biology. 123 (2). 156–167.

Rogick, M. D. 1937. Studies on Freshwater Bryozoa: V. Some Additions to Canadian Fauna. Ohio Journal of Science. 37 (2). 99–104.

Rogick, M. D. 1943. Studies on Freshwater Bryozoa: XIV. The Occurrence of *Stolella indica* in North America. Annals of the New York Academy of Sciences. 45 (4). 163–178.

- 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 Journal*. 1 (8). 693–702.
- Sun, M. K., Alkon, D. L. 2006. Bryostatin-1: Pharmacology and therapeutic potential as a CNS drug. *CNS Drug Reviews*. 12 (1). 1–8.
- Šetlíková, I., Balounová, Z., Lukavský, J., Rajchard, J. 2005. Nepůvodní druh mechovky na Třeboňsku. *Živa*. 53 (4). 172–174.
- Špínar, Z. V. 1965. Systematická paleontologie bezobratlých. Praha: Academia, 1049 s.
- Wood, T. S. 2001. Bryozoans. In: Thorp, J. H., Covich, A. P. (eds.) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, pp. 505–525.
- Zohar, O., Lavy, R., Zi, X., Nelson, T. J., Hongpaisan, J., Pick, C. G., Alkon, D. L. 2011. PKC activator therapeutic for mild traumatic brain injury in mice. *Neurobiology of Disease*. 41 (2). 329–337.
- Zrzavý, J., Hošek, P. 2006. *Fylogeneze živočišné říše*. Scientia: Praha, 255 s. ISBN 80-86960-08-0.