

**Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Extrakce DNA a základní analýza genomu u bakterií
izolovaných z kyselých lesních půd**

Bakalářská práce

Markéta Mičudová

Obor studia: Ekologické zemědělství

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

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Extrakce DNA a základní analýza genomu u bakterií izolovaných z kyselých lesních půd" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Markétě Marečkové, Ph.D. za poskytnuté odborné rady při psaní a pracích v laboratořích a věnovaný čas. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janu Kopeckému, Ph.D., Mgr. Tereze Patmanové a Mgr. Darie Rapoport z Výzkumného ústavu rostlinné výroby za pomoc a poskytnuté cenné rady při práci v laboratoři a zpracovávání výsledků.

Extrakce DNA a základní analýza genomu u bakterií izolovaných z kyselých lesních půd

Souhrn

S rozvojem ekologického zemědělství a snahou lidí praktikovat zemědělství s větším respektem k půdě, se začaly hledat způsoby, které by mohly alespoň částečně nahradit chemické látky používané při pěstování rostlin. Jednou z těchto metod by mohlo být využívání bakterií PGPR (rhizobakterie podporující růst rostlin), které napomáhají růstu rostlin, jejich rozličnými vlastnostmi a produkcí sekundárních metabolitů.

Cílem práce bylo extrahovat DNA z deseti kmenů půdních aktinobakterií (třída *Actinobacteria*). V literární rešerši se aktinobakterie třídí do taxonomických skupin a rozebírají se jejich fyziologické, chemické a molekulární vlastnosti. Dále se rešerše zaměřuje na soužití aktinobakterií s rostlinami a jejich vlastnosti, které tomuto vztahu napomáhají.

Nápomocné bakterie žijící v rizosféře rostlin se souhrnně označují PGPR (z anglického plant growth-promoting rhizobacteriaz). Početným zástupcem těchto bakterií jsou právě aktinobakterie. Proto je důležité podrobně prozkoumat jejich sekundární metabolity, které by mohly být prospěšné pro rostlinnou produkci. Některé sekundární metabolity jsou bakteriemi vylučovány jen za velmi specifických podmínek a nemusí k jejich produkci vůbec dojít. K tomu je pro objevení nových užitečných metabolitů důležité řádně prozkoumat bakteriální genom, aby se zjistilo, zda bakterie nenesou „skryté“ metabolity, které by mohly být užitečné. Pokud bychom tyto geny nebo celé genové klastry objevili, bylo by možné navodit vhodné kultivační podmínky a získat tak úplně nové látky.

Závěrem této práce byla extrakce DNA z deseti kmenů půdních aktinobakterií a připravit je na odeslání k sekvenaci jejich genomů.

Klíčová slova: Aktinobakterie, sekundární metabolity, extrakce DNA

DNA extraction and basic genome analysis in bacteria isolated from forest soils.

Summary

With the development of organic farming and the effort of people to practice farming with more respect for the soil, efforts have begun to look for ways that can at least partially replace the chemicals used in plant cultivation. One of these methods could be the use of plant growth-promoting bacteria (PGPR) for their various properties and the production of secondary metabolites.

The aim of my work was to extract DNA from ten strains of soil actinobacteria (class Actinobacteria). In the literature search, actinobacteria are classified into taxonomic groups, and their physiological, chemical and molecular properties are analyzed. Furthermore, the review focuses on the coexistence of actinobacteria with the plants and also on the properties by which actinobacteria help plant growth.

The helper bacteria living in the plant rhizosphere are collectively referred to as PGPR. Actinobacteria are common representatives of these bacteria. Therefore, it is important to investigate in detail their secondary metabolites, which could be beneficial for crop production. The production of secondary metabolites is already encoded in the DNA. Some secondary metabolites are excreted by bacteria only under very specific conditions and may not be produced at all. To this end, in order to discover new useful metabolites, it is important to properly examine the genetic code to see if the bacteria carry genes for "hidden" metabolites that could be useful. If we discovered these genes or entire gene clusters, it would be possible to induce suitable conditions and thus obtain completely new substances.

The finalization of this work was represented by extraction of DNA from ten strains of soil actinobacteria and thus preparing them for consequent genome sequencing.

Keywords: Actinobacteria, secondary metabolites, DNA extraction

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Aktinobakterie	3
3.1.1	Taxonomie aktinobakterií	4
3.1.1.1	Morfologická klasifikace	4
3.1.1.2	Chemotaxonomická klasifikace	5
3.1.1.3	Molekulární klasifikace.....	6
3.2	Aktinobakterie v půdě	7
3.3	Aktinobakterie v interakci s rostlinou	7
3.3.1	PGPR.....	8
3.3.2	Geny a genové shluky zapojené do prospěšných funkcí pro rostlinu.....	9
3.4	Streptomycety	10
3.5	Sekundární metabolity	11
3.5.1	Antibiotika	12
4	Metodika	15
4.1	Pozorované kmeny bakterií	15
4.2	Použité roztoky a chemikálie.....	15
4.3	Kultivace.....	16
4.4	Příprava bakteriálních konzerv z kmenů narostlých na tuhém médiu.....	17
4.5	Izolace chromozomové DNA	17
4.6	Izolace chromozomové DNA pomocí kitu	18
4.7	Elektrofréza	19
5	Výsledky	20
6	Diskuse.....	27
7	Závěr	29
8	Literatura.....	30

1 Úvod

V posledních letech se v zemědělské prvovýrobě začíná kromě výnosu zohledňovat i dopad produkce na životní prostředí. Jako alternativa ke konvenčnímu hospodaření se stále častěji prosazuje ekologické zemědělství, kde se pracuje se zachováním krajinných prvků, šetrnějším využitím půdy a možnostmi dodat rostlinám živiny i jinou cestou než průmyslovými hnojivy. Jednou z cest k šetrnému hospodaření by mohly představovat bakterie žijící v půdě. Půdní bakterie jsou nejznámější pro schopnost vázat vzdušný dusík a obohacovat jím půdu. Tuto schopnost mají ale jen některé druhy a není to zdaleka jejich jediná prospěšná vlastnost (Bhatti et al. 2017).

Důležitou skupinou z hlediska dodávání živin do půdy jsou aktinobakterie. Mají důležitou roli v koloběhu živin v půdě a v rozkladných procesech, produkují extracelulární enzymy a sekundární metabolity. Dále dokážou svými exudáty do určité míry inhibovat rostlinné patogeny v rhizosféře a zamezovat tak šíření chorob, které by nám mohly snižovat výnos. Na rozdíl od ostatních bakterií zvládají rozkládat i složité organické komplexy jako je například hemicelulóza, lignin a pektin a zpřístupnit tak prvky rostlinám. Dokonce degradují některé sloučeniny s vysokou molekulární hmotností, což mohou být některé uhlovodíky znečišťující půdu. Kromě zdostupnění živin a minerálních látek poskytují rostlině růstové regulátory (Bhatti et al. 2017).

Snahou ekologického zemědělství je i odstranit z výroby co nejvíce agrochemikálií. Z hlediska patogenů v půdě je alternativou k chemické ochraně využití rhizobakterií podporující růst rostlin (PGPR). PGPR obsahují geny, které dávají bakteriím schopnosti značně napomáhající rostlinám, ať už to je fixace vzdušného dusíku nebo produkce látek napomáhajících růstu. PGPR se příznivě projevují i produkcí metabolitů zahrnující antibiotika a proteiny využívané k obraně hostitelské rostliny. Většina těchto užitečných metabolitů byla objevena díky podrobnému zkoumání genomu a sekvenčním metodám. Tyto metody umožnily rychleji identifikovat ekologicky přínosné metabolity (Paterson et al. 2016).

Pro ekologické zemědělství je podstatná i tvorba tmavých pigmentů, které způsobují černé zbarvení úrodných půd. Takto vytvářejí zdravou půdu a stabilizují tvorbu kompostu, kde jsou součástí důležitých procesů vedoucích k tvorbě kvalitního humusu (Bhatti et al. 2017).

2 Cíl práce

Extrahovat DNA o vysoké kvalitě z vybraných kmenů bakterií izolovaných z kyselé lesní půdy. Provést literární rešerši, která objasní využití vybraných biosyntetických drah aktinobakterií v ekologickém zemědělství.

3 Literární rešerše

3.1 Aktinobakterie

Aktinobakterie jsou aerobní grampozitivní bakterie s vysokým obsahem guaninu a cytosinu v DNA. Své jméno získaly podle charakteristického růstu a souběžného prodlužování špičky a větvení hyf (řecky paprsek *aktis* nebo *aktin* a houby *mukes*). Vyskytují se ve většině ekosystémů jak vodních, tak suchozemských s podstatným zastoupením v půdní mikroflóře a jedná se o jeden z nejrozšířenějších bakteriálních kmenů (Barka et al. 2016). Odolávají i v extrémních podmínkách a řídí tak koloběh živin v některých systémech s nepříznivým prostředím (Bull & Goodfellow 2019; Colquhoun et al. 1998). Díky adaptacím na různorodé podmínky a interakcí s okolím a ostatními organismy si aktinobakterie vyvinuly mnoho mechanismů potřebných k přežití a jsou tak schopny produkovat široké spektrum sekundárních metabolitů (Sivakala et al. 2021; Adnani et al. 2017; Lewin et al. 2016; Sayed et al. 2019; van der Meij et al. 2017).

Původně se aktinobakterie považovaly za jakýsi přechod mezi houbami a bakteriemi hlavně kvůli jejich schopnosti tvořit mycelium. Přirovnání k houbám je ale nepřesné (Bhatti et al. 2017).

Pro náš výzkum je tento kmen důležitý z hlediska produkce sekundárních metabolitů používaných v medicíně, biotechnologii a zemědělství. Tyto látky jsou v medicíně využívány především jako antibiotika, ale také pro jejich protirakovinné, antimykotické a antihelmintické účinky (Barka et al. 2016). Je popsáno okolo 23 000 bioaktivních sekundárních metabolitů produkovaných mikroorganismy a více jak 10 000 z nich je produkováno právě aktinobakteriemi (Bhatti et al. 2017). Mezi nejpoužívanější látky tohoto rodu patří: streptomycin, tetracykliny, chloramfenikol, neomycin, erythromycin, vankomycin, kanamycin, rifamycin, gentamicin, daptomycin, platensi mycin, PM1812104, PM1812104, PM1812104 (Mahajan & Balachandran 2012), antracykliny, bleomycin, mitosany, enediny a mnoho dalších (Demain & Sanchez 2009).

Se zvýšeným používáním antibiotických léčiv se v posledních letech tvoří čím dál více rezistencí, a tak stoupá i potřeba izolovat nové aktinobakterie schopné poskytnout rozmanité sekundární metabolity. V posledních pěti letech bylo tímto způsobem získáno okolo 14 000 izolátů aktinobakterií. Nejvíce vzorků se získává převážně ze suchozemských půd, mořských ekosystémů a rostlin včetně rhizosféry (Jose et al. 2021).

Tvorba látek se netýká pouze antibiotik, ale i látek rozkládajících organické komplexy jako je proteáza, celulóza, amyláza, želatináza, laktináza, kataláza, chitináza a ureáza (Gulve & Deshmukh 2012).

Svoji využitelnost aktinobakterie prokázaly i biodegradační schopností, kdy byla pozorována degradace pesticidů s různými chemickými strukturami (Schrijver et al. 1999; Davenport et al. 2000; Korenblum et al. 2005; Sánchez 2006). Takto je lze využít při bioremedikaci kontaminovaných půd organickými polutanty, hlavně díky degradaci složitých polymerů (Goodfellow et al. 1983). Většina těchto aktinobakterií má zároveň schopnost přežít v olejnatém prostředí, a proto se mohou aplikovat i do území znečištěných ropnými deriváty (Bhatti et al. 2017).

Existuje ale i velké množství aktinobakterií, které jsou patogenní a mohou být nebezpečné jak pro rostlinné, tak živočišné organismy (Barka et al. 2016).

Hlavní faktory ovlivňující rozmanitost aktinobakterií jsou teplota, pH, vlhkost, využití půdy a vegetace (Kopecký et al. 2011). Ideální teplota pro růst aktinobakterií se pohybuje mezi 25 a 30 stupni celsia, ale existují termofilní kmeny s růstem i při 60 stupních celsia. (Edwards 1993). Aktinobakterie celkově preferují vyšší vlhkost půdy. Pokud se půda příliš vysuší, může dojít k zastavení růstu. Ideální pH pro růst se pohybuje v neutrálních hodnotách, ovšem existují výjimky. Například některé rody streptomycet se vyskytují a prosperují v půdách s velmi kyselým pH (až 3,5) (Kim et al. 2003).

3.1.1 Taxonomie aktinobakterií

Aktinobakterie jsou jedním z nejrozsáhlejších bakteriálních kmenů (Barka et al. 2016).

Taxonomie kmene *Actinobacteria* se během let značně vyvíjela. Došlo ke značnému přeskupení na základě objevování nových informací a využíváním do té doby neznámých metod výzkumu. Jednotlivé rody vykazují širokou variabilitu jak v rámci fyziologie, metabolické schopnosti, tak morfologie (Buchanan 1917).

Fylogenetickou příbuznost prokaryotních organismů stanovujeme nejčastěji dle genu 16S rRNA. Pomocí sekvence rRNA se ale nedají jednoznačně rozlišit jednotlivé druhy nebo rody (Omura et al. 1982). V dnešní době máme možnost používat další genetické markery, které pomáhají lépe rozlišit příbuzné rody (Girard et al. 2013). Kmen *Actinobacteria* tak v posledních letech prošel mnoha aktualizacemi, kdy se na základě nových metod přeskupily jednotlivé třídy a podtřídy (Gao & Gupta 2012).

Sekvence genomu nám umožnila lépe porozumět evoluci než pouze gen pro 16S rRNA, a tak lépe identifikovat jednotlivé funkce genů (Kirby 2011).

Kmen *Actinobacteria* je na základě těchto nových poznatků rozdělen do šesti tříd: *Actinobacteria*, *Acidimikrobidae*, *Coriobacteria*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* a *Thermoleophilia* (Zhi et al. 2009).

3.1.1.1 Morfologická klasifikace

Morfologická klasifikace aktinobakterií se zaměřuje hlavně na mikroskopickou morfologii a chemotaxonomii. Chemotaxonomie zkoumá převážně produkci cukrů a složení buněčné stěny. Pro jasnější rozřazení se přihlíží i k složení z hlediska fosfolipidů a vitamínu K₂ (Labeda 1987).

Charakteristikou druhů bývá přítomnost nebo naopak nepřítomnost mycelia jak substrátového, tak vzdušného. Mycelium jako takové lze u aktinobakterií považovat za formu vegetativního rozmnožování. Mycelium se druhově liší barvou, tvarem, přítomností pigmentů, strukturou a vzhledem spor. Substrátové mycelium se může tvořit jak v pevných, tak tekutých kulturách. Na pevném povrchu je často doprovázené vzdušnými hyfy, které produkují spory (Flärdh & Buttner 2009; van Dissel et al. 2014). Větvení substrátového mycelia je převážně monopoidní, kdy z hlavního kmene vyrůstají postranní větve, existují ale i případy aktinobakterií jako je například *Thermoactinomyces* větvcí se dichotomicky (Kalakoutskii & Agre 1976).

Aktinobakterie se vzájemně liší tvarem a mají širokou paletu morfologií např. koky, tyčinkové koky, fragmentující hyfové formy a formy se značně rozvětveným myceliem (Atlas 1997). Mezi druhy obvykle netvořící vzdušné hyfy patří mikrobakterie a rodokoky (Ochi 1995).

Morfologie sporového řetězce je dalším z poznávacích znaků, už jenom tím, že pro aktinobakterie je charakteristická tvorba výtrusů (Locci & Sharples 1984). Sporulace započne povětšinou pučením. Spory se tvoří jak na substrátu, tak na vzdušném myceliu jako jednotlivé buňky, řetězce různých délek nebo měchýřky (sporangia), které jsou jakousi kapsou obsahující spory. Vlastnosti spor se od sebe také liší, například v odolnosti vůči vysokým teplotám nebo pH (Cross & Goodfellow 1973). Při klasifikaci se přihlíží i k fyzickým vlastnostem spor jako je povrch, který může být hladký, chlupatý, ostnatý nebo bradavičnatý (Dietz & Mathews 1971). Pokud bakterie vytvářejí řetězce spor, tak počet spor je meziodově odlišný. Pouze z jedné spory se skládají řetězce rodů *Micromonospora*, *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* a *Promicromonospora*, rod *Microbispora* tvoří spory v podélných párech. *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya* a některé *Nocardia spp* tvoří krátké sporové řetězce. Rody *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* a někteří *Nocardia spp* tvoří velmi dlouhé řetězce obsahující až sto spor v jednom vláknu. Druh *Frankia* dokonce netvoří řetězce, ale sporangia, což jsou váčky naplněné sporami (Pridham et al. 1958).

Aktinobakterie produkují řadu pigmentů, které mohou být červené, žluté, oranžové, hnědé, zelené, modré nebo růžové. Zbarvení je odvozeno hlavně od kmene, ale je závislé i na kultivačním médiu a stáří kultury. Barevné pigmenty jsou tvořené polymery s různorodou molekulární strukturou a vznikají při oxidaci fenolových a indolových sloučenin (Lechevalier & Lechevalier 1965). Tmavé melanoidní pigmenty nejsou používány jen při klasifikaci, ale především hrají hlavní roli při tvorbě půdních humusových látek žádoucích pro lepší výnos rostlin, které způsobují charakteristické tmavé zbarvení humusu (Dastager et al. 2006; Manivasagan et al. 2013).

3.1.1.2 Chemotaxonomická klasifikace

Z hlediska chemotaxonomie se bakterie třídí do skupin pomocí jejich chemického složení (Goodfellow & Minnikin 1985; O'Donnell 1988). Nejčastěji porovnávané látky jsou aminokyseliny buněčné stěny, lipidy, proteiny, cukry, typy kyseliny muramové, menachinony a základní složení DNA (Goodfellow & O'Donnell 1989; Williams et al. 1989). Chemické složení se sleduje hlavně v rámci zkoumání buněčné stěny. Tyto rozdíly jsou podstatné při rozřazování aktinobakterií do podřádů. Chemická struktura peptidoglykanu v buněčné stěně třídí aktinobakterie do rodů. Rozmanitost peptidoglykanů v rámci rodů se týká umístění aminokyseliny v poloze 3 tetrapeptidového postranního řetězce, přítomnosti nebo naopak nepřítomnosti glycinu v interpeptidových můstcích a procenta cukru v peptinoglykanu (Willey et al. 2010).

Dalším faktorem je izomerie, která se týká 2,6-diamin opimelové kyseliny (DAP). Aktinobakterie obsahují buď LL- nebo DL- DAP. Tento jev je rodovou charakteristikou, například rod *Streptomyces* je charakteristický LL-DAP a rod *Nocardia* meso-DAP (Lechevalier & Lechevalier 1980). I když je izomerie DAP podstatná pro taxonomii, není to

jediný faktor, ke kterému bychom při určování rodu měli přihlížet a je důležité jej kombinovat s více taxonomickými jednotkami, jelikož některé skupiny mohou sdílet stejnou optiku DAP (Bouizgarne & Ait Ben Aoumar 2014). Proto se aktinobakterie rozřazují jak na základě morfologických, tak i chemických vlastností (Barka et al. 2016).

Mastné kyseliny se mezidruhově také značně odlišují a jejich složení se dá použít při identifikaci rodů aktinobakterií (Kroppenstedt 1985). Délka uhlíkatého řetězce mastných kyselin se pohybuje od dvou do devadesáti uhlíků (existují výjimky i přes devadesát uhlíků). Z hlediska taxonomie jsou podstatné pouze mastné kyseliny s počtem uhlíků v rozmezí deset až dvacet čtyři (Suzuki et al. 1993).

Pro klasifikaci rodů *Actinomadura*, *Microtetraspora*, *Nocardia* a *Streptomyces* se přihlíží k typu isoprenoidních chinonů obsažených v buněčných obalech (Barka et al. 2016).

V cytoplasmatické membráně aktinobakterií se diskontinuálně tvoří různé typy fosfolipidů představující základ membrány. Z hlediska fosfolipidů se aktinobakterie klasifikují do pěti skupin odvozených na základě extraktů a jejich fosfolipidových markerů. Podstatným zjištěním je, že aktinobakterie patřící do jednoho rodu mají stejný fosfolipidový typ (Williams et al. 1989; Goodfellow 1989; Lechevalier 1977; Lechevalier et al. 1977; Lechevalier et al. 1981; Yokota & Tamura 1994).

Při zohlednění složení cukrů v buněčných obalech se aktinobakterie dají rozdělit do pěti skupin. Do první skupiny patří druhy s arabinózou a galaktózou v buněčné stěně. Druhá skupina obsahuje madurózu (3-O-methyl-D-galaktózu). Třetí skupina nemá definované charakteristické cukry. Čtvrtá skupina obsahuje xylózu a arabinózu. Pátá skupina obsahuje rhamózu a galaktózu (Labeda 1987; Lechevalier & Lechevalier 1970).

3.1.1.3 Molekulární klasifikace

Jak už bylo výše zmíněno, v dnešní době se organismy nedají klasifikovat pouze pomocí chemických a morfologických vlastností a je třeba využít i molekulární taxonomii, která je založena na sekvenování genomu (Zhi et al. 2009).

Sekvenování genomu se v posledních letech stalo samozřejmostí při objevování nových druhů a bez genetické analýzy založené na genu 16S rRNA a DNA hybridizace už ani není možné vyčlenit nové druhy (Euzéby 1997).

Jelikož 16S rRNA díky své univerzální přítomnosti poskytuje záchytný bod pro fylogenetické studie, byla její sekvenační data použita k rekonstrukci zastaralých fylogenetických stromů. U kmene *Actinobacteria* se ale následně vyskytly neobjasněné vazby, jelikož pro některé taxonomické třídy nejsou známy žádné morfologické znaky, které by mohly být spolehlivým indikátorem. Z tohoto důvodu se rozčlenění aktinobakterií řídí sekvenací 16S rRNA (Ludwig & Klenk 2001; Gao & Gupta 2005).

Aby mohl být kmen aktinobakterií jasně definován, je třeba využít i jiné molekulární markery než 16S rRNA, které jsou charakteristické pouze pro aktinobakterie (Kunisawa 2007).

Navzdory různorodosti kmene *Actinobacteria* ve velikosti genomu, data genomových sekvencí odhalují oblasti nápadně podobné, co se týče pořadí genů (Kunisawa 2007).

Jedním z rodů klasifikovaným na základě molekulární taxonomie je rod *Streptomyces*. Jedná se o nejobsáhlejší z rodů aktinobakterií a pro nás je významný hlavně z hlediska produkce sekundárních metabolitů (Barka et al. 2016).

3.2 Aktinobakterie v půdě

V půdě žijí rozmanité mikroorganismy ať už se jedná o bakterie, archaea, prvoky nebo houby. Často získávají energii a živiny oxidací organických zbytků z rostlin a organismů. Takto si rozkladnými procesy zpřístupňují živiny pro sebe ale i pro rostliny. Bakterie jako zdroj uhlíku používají složitější sloučeniny jako je celulóza, hemicelulóza, lignin a proteiny. Zbytky organických látek, které se dostanou do půdy jsou nejprve rozkládány ostatními bakteriemi a houbami a teprve později aktinobakteriemi, jelikož jejich rozkladné aktivity jsou zvláště uzpůsobené pro obtížně rozložitelné látky (Buresova et al. 2019). Zvládají rozložit odolnější organickou hmotu jako dřevo a chitin a tvořit tmavé zemní pigmenty přispívající k zdravé barvě půdního humusu. Tyto procesy a mnohé další jsou z našeho hlediska důležité v rámci zemědělské produkce a pěstování rostlin. Kdyby se půda dala zásobit správnými populacemi bakterií, mohlo by dojít k nezanedbatelnému navýšení výnosu (Bhatti et al. 2017).

Aktinobakterie zastupují hlavní roli rozkladačů v půdě a recyklují tak organické látky pomocí hydrolytických a oxidativních enzymů (Mohan & Vijayakumar 2007). Tato jejich vlastnost je využívána při kompostování. Cíleně se zvyšuje teplota, kdy dojde k zapojení termofilních a termotolerantních aktinobakterií. Nejen že dojde k zahřívání materiálu, ale vysoké teploty také odstraní některé viry a patogenní bakterie jako jsou například koliformní bakterie. Při tvorbě kompostu se musí dbát i na provzdušňování materiálu, jelikož většina aktinobakterií jsou aerobní bakterie a potřebují k metabolické aktivitě kyslík (Bhatti et al. 2017).

Jiné rody aktinobakterií tvoří symbiotické vztahy s rostlinami a poutají vzdušný dusík. Jedním z rodů spadajících pod aktinobakterie fixující takto dusík je *Frankia*. Tento rod je schopný zajistit hostitelské rostlině většinou potřebu dusíku (Bhatti et al. 2017).

3.3 Aktinobakterie v interakci s rostlinou

Při izolování aktinobakterií z rostlin se ukázalo, že jejich rozmanitost je stejně pestrá jako například z mořského prostředí. Aktinobakterie bychom našly jak v kořenech, listech, stoncích tak v rhizosféře (Jose et al. 2021).

Aktinobakterie žijící v rhizosféře jsou v blízké interakci s rostlinou a vzájemně se výrazně ovlivňují (Bhatti et al. 2017). Prospěšné rhizobakterie se charakterizují tím, že svými mechanismy buď přímo nebo nepřímo přispívají k růstu rostliny. Především zpřístupňují rozkladem živiny a minerály. Některými specifickými metabolity inhibují fytopatogeny nebezpečné pro rostlinu (Jose PA & Jha B 2016). Nejen že takto přispívají rostlinám během života, ale těla mrtvých mikroorganismů slouží jako hnojivo (Bhatti et al. 2017).

Dalším parametrem, kterým můžeme měřit prospěšnost rhizobakterií rostlině, je schopnost podporovat tvorbu růstových regulátorů v rostlinách neboli růstových hormonů, které již v malých koncentracích ovlivňují růst a vývoj rostlin (Bhatti et al. 2017). Tato

interakce mezi rhizobními bakteriemi a rostlinami se charakterizuje jako rhizobakterie podporující růst rostlin (z anglického plant growth-promoting rhizobacteriaz PGPR). Nejedná se jen o tvorbu růstových regulátorů, ale o všechny nepřímé mechanismy ovlivňující růst rostlin (Bhatti et al. 2017). Vliv aktinobakterií na růst je velmi druhově specifický. Zatím co u jedné plodiny může růst podporovat, u jiné jej může inhibovat (Gardner et al. 1984; O'Neill et al. 1992). Známe dva hlavní způsoby, jak PGPR ovlivňují růst rostlin. Nepřímo může PGPR snižovat nebo zabraňovat působení škodlivých organismům, což je aktivita založená na antagonismu mezi mikroorganismy pomocí produkce sekundárních metabolitů. Převážně se jedná o biosyntetizovaná antibiotika cíleně potlačující nepřátelské mikroorganismy (Fenton et al. 1992). Přímo působí PGPR, když rostlině dodávají potřebnou látku nebo usnadní příjem živin z půdy. Mezi tyto aktivity patří fixace dusíku, solubilizace, syntéza fytohormonů a sideroforů (Bernard 2012). Všechny druhy streptomycet produkují vždy alespoň jednu z látek výrazně ovlivňujících růst rostlin (Mohammadi & Lahdenpera 1992). Některé streptomycety zároveň slouží jako biologická ochrana v půdě. Jedním z těchto příkladů je *Streptomyces griseoviridis* (Tahvonen 1982). Nanáší se na kořeny rostlin rostoucí v květináčích, okurky a mnohé další druhy zeleniny (Mohammadi & Lahdenpera 1992). Nepoužívá se jen jako biologická ochrana, ale je i součástí jako účinná látka biofungicidu mycostop.

Další látkou užitečnou pro rostliny produkovanou rodem *Streptomyces* je kyselina indol-3-octová (IAA) (Bennett et al. 1998; Dobbelaere et al. 1999; Paciorek & Friml 2006). Tento jev byl studován u čtyřech rodů: *Streptomyces*, *Frankia*, *Nocardia*, *Kitasatospora* (da-Silva et al. 2008; El-Tarabily & Sivasithamparam 2006; Mohammadi & Lahdenpera 1992; Sivasithamparam et al. 2003; Shrivastava et al. 2008). IAA představuje formu auxinu, který je potřebný pro základní buněčné procesy jako je buněčné dělení, prodlužování a diference buněk. Čím víc auxinu má rostlina k dispozici, tím více se větví její kořen a rostou kořenové vlásky, a tím se zvětšuje plocha pro absorbování živin z půdy. Kromě růstu je auxin podstatný pro vývoj rostliny, a to se především týká vývoje embryí a plodů, ontogeneze, diferenciace cévních tkání, prodlužovacího růstu a tvorby kořenů (Bennett et al. 1998; Dobbelaere et al. 1999; Paciorek & Friml 2006).

3.3.1 PGPR

Termín PGPR se poprvé objevil na konci 70. let 20. století (Kloepper a Schroth 1978; Suslow et al. 1979), kdy se celosvětově začínaly zkoumat mechanismy, způsoby působení, fyziologie, biochemie a chemie rhizobiálních bakterií. V roce 1995 se na pole zkoumání PGPR zavedla i dnes nepostradatelná sekvenace genomu a byl poprvé sekvenován bakteriální genom pomocí konvenčního Sangerova sekvenování v kombinaci s novou počítačovou metodou (Fleischmann et al. 1995; Fraser et al. 1995). V té době se ale ještě sekvenování nedalo využít plnohodnotně v běžných laboratorních metodách, jelikož bylo velmi drahé a náročné (Goodwin et al. 2016). Teprve mezi lety 2005 a 2015 se objevují rozmanitější platformy, označované také jako třetí (např. PacBio SMRT a Heliscope sequencing) a čtvrtá generace sekvenování (Oxford Nanopore sequencing), díky které můžeme provádět sekvenování i v terénním prostředí (Jain et al. 2016). S klesáním nákladů se zvýšilo množství sekvenačních dat a rozrůstají se genové banky. Takto může dojít k objevům opakujících se rysů a vzorců, a tedy k objevům nových vlastností organismů (Fayyad et al. 1996). V případě

mikroorganismů, a tedy i PGPR takto bioinformatici prozkoumávají genom za účelem nálezu nových, nám užitečných metabolitů (Paterson et al. 2017).

Aktivní působení PGPR zprostředkovává rostlině přímo enzymy nebo jiné sekundární metabolity ovlivňující její růst. Díky studiu genomu máme možnost objevit geny kódující prospěšné enzymy. Enzymy, které hledáme, ovlivňují především hladiny rostlinných hormonů. Dále pátráme po genových klastrech kódujících antibioticky aktivní látky (Paterson et al. 2017).

Mnoho aktinobakterií má tiché geny, které se neprojeví, dokud nenastanou vhodné vnější podmínky. Takto mohou být v laboratoři vyvolány pro nás nové funkce PGPR použitím spouštěčů a stresových signálů, které nejsou zahrnuty v klasických experimentálních metodách (Paterson et al. 2017).

Analýza celého genomu nám dává výhodu plně zhodnotit kmen PGPR a odhalit jak jeho přínosné, tak nebezpečné stránky. PGPR totiž nemusí být pouze užitečné, ale může se jednat i o patogenní kmeny, a proto je důležité nejprve zhodnotit jejich virulenci (Paterson et al. 2017).

3.3.2 Geny a genové shluky zapojené do prospěšných funkcí pro rostlinu

Již máme mnoho informací o působení a genomech PGPR, ale i tak se obtížně definují vlastnosti bakterií, které jsou prospěšné, jelikož rhizosféra hostí velkou škálu různorodých bakterií. Může se jednat o saprofytické půdní bakterie, které napomáhají rozkladu, až po endofytní bakterie žijící uvnitř kořenové tkáně. Existují také bakterie, které jsou zároveň PGPR, ale žijí i v jiných ekologických nikách. Běžně se také vyskytuje u těchto bakterií situace, kdy bakterie působí různě na jednotlivé druhy rostlin a mohou vyvolávat jak prospěšné, tak negativní působení na rostlinu (Walker et al. 2013).

Geny zapojené do prospěšných funkcí pro rostlinu jsou rozmanité. Základní prospěšné mechanismy zařizují genové klastry *nif*, které jsou součástí nitrogenázového komplexu při fixaci dusíku (Bashan & de-Bashan 2010), geny *phl* působící při syntéze floroglucinu (Haas & Keel 2003), gen *hcn* zajišťující syntézu kyanovodíku, geny *ipd* a *ppd* provádějící syntézu auxinu a další (Bruto et al. 2014).

Genový klaster *nif* pro fixaci dusíku obsahuje geny odpovídající za fixaci dusíku některými prokaryotickými mikroorganismy (Arnold et al. 1988; Joerger & Bishop 1988). Řadí se sem geny kódující enzymy redukující dvouatomový dusík, geny pro regulaci a ukládání amoniaku a syntézu nezbytných kofaktorů (Ouzounis et al. 1994). Původně byl objeven pouze jeden gen pro fixaci dusíku a to *nifU*, kódující protein poskytující molekulární základ pro sestavení klastrů Fe-S potřebných pro upevnění dusíkaté látky, ale postupně byly nalezeny i další geny *nif* (Fu et al. 1994; Johnson et al. 2005).

Při porovnání sekvencí mezi podobnými *nifU* bylo zjištěno, že *nifU* kóduje protein obsahující tři odlišné domény a to N – terminální doménu, centrální doménu a C-terminální doménu (Agar et al. 2000).

Nedávno byly objeveny homology *nifU* i v organismech nefixujícím dusík jako je *Escherichia coli*, kvasinky, rostliny a některá zvířata (př. myši, potkani, zebřičky, komáři a háďátka). Tento objev vedl k teorii, že gen *nifU* neslouží pouze k fixaci dusíku z ovzduší, ale

mohl by se zapojovat do procesu sestavování sítí Fe-S v celé živočišné říši (Zheng a kol. 1998; Yabe a kol. 2004).

Fe-S klastry se skládají z různých poměrů železa a elementární síry (Beinert & Kiley 1999). Pro klastry Fe-S je charakteristické, že hrají primární roli v přenosu elektronů a zapojují se do vazby a aktivace substrátu v dehydratazách a radical-S-adenosylmethionine enzymech (Ruzicka & Beinert 1978). Klastry Fe-S se zároveň používají jako „molekulární přepínače“ při genové regulaci v transkripci a translaci díky jejich citlivosti na buněčné redoxní podmínky (Kiley & Beinert 2003).

Fytohormon indol-3-octová kyselina (IAA) je jednou z formou auxinu a produkují ji nejen rostliny, ale i bakterie a některé řasy. Bakterie mají tři hlavní cesty syntézy IAA, které odstraňují amino a karboxylové skupiny z α – uhlíku tryptofanu přes meziproduct indolepyruvát, indolecetamid nebo indolacetonitril. Konečný produkt IAA je vylučován vně buňky (Patten et al. 2013).

Geny pro syntézu IAA se nachází v mnoha prokaryotických, tak eukaryotických organismech. Jedním z genů zapojující se do syntézy IAA je *ipdC* kódující tvorbu indolepyruvátdekarboxylázy. Tento gen je přítomen v mnoha různých skupinách bakterií, které se běžně vyskytují v půdě a v rostlinných hostitelích (Koga et al. 1991; Costacurta et al. 1994; Brandl & Lindow 1996; Malhotra & Srivastava 2008; Ryu & Patten 2008). Dvě hlavní větve genů se kvůli nedostatečné technologii špatně oddělují. Jedná se o sekvenci aktinobakteriální indolepyruvátdekarboxylázy a sekvenci firmicute α -ketokyselinové dekarboxylázy. Oba tyto enzymy fungují jako indolepyruvátdekarboxylázy (Spaepen et al., 2007). Rozdělení na tyto dvě skupiny dle aminokyselinových sekvencí podporují kódové sekvence *ipdC* a *ppdC* (Schütz et al., 2003; Schütz et al., 2005).

Deriváty floroglucinu jsou sekundární metabolity produkované bakteriemi. Floroglucinol produkují i rostliny a zabraňuje degradaci auxinu (Yang & Cao 2012). Genový shluk *phl* zodpovědný za biosyntézu derivátu floroglucinu 2,4-diacetylphloroglucinu (DAPG) byl poprvé izolován v roce 1996 z *Pseudomonas fluorescens*. V roce 1999 se následně zjistilo, že tento klastr se skládá ze šesti genů *phl* (*phlFACBDE*) (Moynihan et al. 2009).

Produkce sekundárního metabolitu kyanovodíku byla poprvé pozorována u *Pseudomonas fluorescens* přeměnou glycinu za mikroaerofilních podmínek. Bylo zjištěno, že tuto přeměnu zajišťuje genový klastr *hcn* (Laville et al. 1998).

3.4 Streptomycety

Čeď *Streptomycetaceae* se řadí do kmene *Actinobacteria*, řádu *Actinomycetales* v rámci třídy *Actinobacteria*. Rod *Streptomyces* je jediným členem čeledi *Streptomycetaceae* (Anderson & Wellington 2001). V půdě představuje rod *Streptomyces* 95 % aktinobakterií a je zároveň nejvýznamnějším producentem rozmanitých sekundárních metabolitů (Williams & Vickers 1988). Takto produkují až dvě třetiny známých antibiotik. Bylo již objeveno a popsáno přes 500 druhů streptomycet a nové se stále objevují (Mohanraj & Sekar 2013). V půdě tyto bakterie výrazně zasahují do koloběhu uhlíku, který je součástí nerozpustných organických komplexů původem z rostlin a hub (Hasani et al. 2014). Jsou převážně mezofilní

a rostou při teplotách 10 – 37 °C s optimálním pH 6,5 – 8 (James & Edwards 1989; Cabello et al. 2003).

Přesto že se streptomycety vyskytují převážně v půdě, můžeme je najít i ve vodě, na rostlinách a na dalších stanovištích (Singh et al. 2006). Mezi tato další stanoviště patří například: seno a další organický materiál, sladkovodní a mořská stanoviště, rostliny a živočichové (Hasani et al. 2014). Velikost a skladba populace je určena fyzikálními, chemickými i biologickými faktory ekosystému. Pro objevování nových streptomycet je proto důležité znát tyto faktory a jejich vzájemné propojení (Kharat et al. 2009; Wang et al. 1999).

Streptomycety jsou vzhledem a stanovišti výskytu podobné houbám, avšak se mezi ně neřadí (Ikeda et al. 2003). Vlákná i spory jsou velmi malé a většinou nedorůstají většího průměru než 1 µm (Willemsse et al. 2011). Rozmnožují se výtrusy z fragmentujících vláken uvolňujících se z dlouhých řetězců (Chater 1993). Kolonie rostou pomalu, ze začátku jsou hladké, ale časem po vytvoření vzdušného mycelia u nich můžeme najít zrnitý, práškovitý nebo vločkovitý povrch (Ambarwati et al. 2012). Toto mycelium, díky pigmentům tvořenými streptomycetami, může mít širokou škálu barev (Flärdh & Buttner 2009). Peptidoglykan nacházející se v buněčných stěnách je charakteristický svým vysokým obsahem kyseliny L-diaminopimelové (L-DAP). Další typickou charakteristikou pro streptomycety je absence mykolové kyseliny, ale naopak přítomnost velkého množství nasycených iso- a anteiso-mastných kyselin (Cummins & Harris 1958).

Aby spory streptomycet mohly vyklíčit z klidového stádia, je potřeba, aby se nacházely v prostředí bohatém na živiny a mohly vytvořit zárodečné trubičky. Trubičky se postupně prodlužují a větví. Proplétáním vláken vzniká síť nazývaná se substrátové mycelium (Flärdh & Buttner 2009). Při pokročilém růstu dochází k diferenciaci mycelia ve středu kolonie a tvoření nového typu hyf a to tzv. vzdušných hyf. Po zastavení růstu vzdušných hyf se buňky dělí, a to vede k vývinu každé z nich v odolnou sporu (Kieser et al. 2000).

Schopnost produkce sekundárních metabolitů je z našeho hlediska jednou z nejdůležitějších vlastností. Streptomycety nám takto poskytují antibakteriální, fungicidní, antivirové a protinádorové látky a růstové faktory především vitamín B1. Například streptomycin, jedno z nejpoužívanějších antibiotik, produkují dva rody streptomycet, a to *Streptomyces coelicolor* a *Streptomyces griseus*.

Aby streptomycety produkovaly sekundární metabolity, musí se vyskytovat v prostředí s dostatkem živin. Hlavními prvky podmiňující tvorbu jsou uhlík a dusík. Nezáleží ale jen na množství prvků, ale i na jejich formě (Hasani et al. 2014). Pro produkci antibiotik je nejlepší uhlík ve formě škrobu a glycerolu (Jonsbu et al. 2002). Co se týče dusíku, tak anorganické formy a jednoduché komplexy snižují produkci antibiotik (Young & Kempe 1985).

3.5 Sekundární metabolity

Aktinobakterie produkují dva druhy metabolitů, a to primární a sekundární. Primární metabolity jsou důležité pro správné fungování buňky a umožňují přirozený růst, vývoj a reprodukci a plní tak fyziologické funkce (Demain 1980). Sekundární metabolity naopak zajišťují funkce, které přímo nesouvisí s životními projevy buňky. Od primárních metabolitů se především liší tím, že nejsou podmínkou správného růstu, tvoří se jen při správných životních podmínkách, molekuly si jsou často velmi funkčně a strukturně podobné, a hlavně

v moment, kdy je buňka schopná produkovat sekundární metabolity, tak je produkuje ve vyšším množství, než je schopná spotřebovat (Drew & Demain 1977). Zdroj dusíku ve formě sójového šrotu, kukuřičného výluhu a kvasnicového extraktu podporují tvorbu antibiotických látek. Pro tvorbu antibiotik je vhodné přijímat nižší množství dusíku neustále než přijmout velkou dávku najednou, proto více vyhovují složitě dusíkové sloučeniny, které se rozkládají pomaleji, a tak uvolňují dusík déle (Ilič et al. 2010). Z pohledu ostatních minerálních složek podporuje tvorbu antibiotik hlavně fosfor, draslík, zinek, mangan a železo (Martin 2004; Gesheva et al. 2005).

Z hlediska produkce bioaktivních sloučenin jsou pro nás nejzajímavější rody *Streptomyetaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Nocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* a *Thermomonosporaceae* (Jose et al. 2019; Lazzarini et al. 2000; Tiwari & Gupta 2011).

Díky genovému inženýrství se objevují i nové sloučeniny produkované aktinobakteriemi, o kterých jsme dosud neměli tušení. Zkoumá se čím dál víc mikrobiálních produktů, a to hlavně díky cenově dostupnějším sekvenčním technologiím inspirovaných genomem *S. coelicolor* A3(2). Pátrání je zaměřené na tzv. biosynthetic gene clusters (BGCs) v češtině biosyntetické genové klastry, které umožňují mikrobům produkci sekundárních metabolitů a pro nás příležitost objevit tyto nové látky (Lee et al. 2020; Bentley et al. 2002; Gomez-Escribano et al. 2016; Yang et al. 2019).

BGCs jsou geny kódující samotné biosyntetické enzymy a jádrové biosyntetické enzymy. Zároveň obsahují geny, které regulují projev biosyntetických genů a jsou tak přímo spojené s vznikem rezistencí (Bilyk & Luzhetskyy 2016; Dhakal et al. 2019; Li et al. 2019; Pickens et al. 2011).

3.5.1 Antibiotika

Prvními antibiotiky získanými od streptomycet byl aktinomycin v roce 1940, streptotricin v roce 1942 a následně o dva roky později streptomycin. Tento objev odstartoval pátrání po dalších sekundárních metabolitech tohoto rodu, které by se daly nadále využít (Waksman & Woodruff 1940). Aktinomycin, streptotricin a streptomycin jsou zároveň antibiotika s vysokou frekvencí výskytu. Streptotricin se objevuje cca u 10 % streptomycet izolovaných náhodně z půdy, streptomycin v 1 % a aktinomycin v 0,1 % (Baltz 2007). Nejpodstatnějšími třídami klinických antibiotik původem od aktimycet jsou: aminoglykosidy (neomycin, kanamycin, streptomycin) (Busscher et al. 2005; Park et al. 2013; Vakulenko & Mobashery 2003), angucykliny (auricin; také protinádorové látky jako landomycin a moromycin) (Kharel et al. 2012), ansamyciny (rifamycin, geldana mycin) (Kang et al. 2012), antracykliny (především protinádorové látky, např. daunorubicin) (Minotti et al. 2004; Nitiss 2009), beta-laktamy (cefamyciny) (Liras 1999) a také důležitý inhibitor beta-laktamázy kyselina klavulanová (Jensen & Paradkar 1999; Saudagar et al. 2008), chloramfenikol (Vining & Stuttard 1994), glutarimidy (cykloheximid) (Kominek 1975), glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin) (Butler et al. 2014; Van Bambeke 2006), lipopeptidy (daptomycin) (Baltz 2010), lantibiotika (mersacidin, actagardin) (Willey & van der Donk 2007), makrolidy (klaritromycin, erythromycin, tylosin) (Gaynor & Mankin 2003; Poehlsgaard & Douthwaite 2003), oxazolidinony (cykloserin) (Mulinos 1955), streptograminy (streptogramin) (Johnston

et al. 2002) a tetracykliny (Okami & Hotta K 1988). Produkce antibiotik se může výrazně lišit i mezidruhově. Například některé druhy streptomyces produkují pouze jedno antibiotikum a jiné tvoří řadu antibiotik různého chemického složení. Antibiotika ale nejsou jediné sekundární metabolity tvořené streptomycety. Produkují i látky herbicidní, antimykotické, protinádorové, antihelmintické a imunosupresivní (Behal 2000).

Největším producentem antibiotik na světě jsou již zmíněné aktinomycety, které tvoří přibližně dvě třetiny všech známých antibiotik. Většinu z nich produkují streptomycety (více jak 80 % antibiotik aktinobakteriálního původu) (Bennett 1998; Hopwood et al. 1995; Ilic et al. 2007). Jako modelový organismus pro studium antibiotik slouží *Streptomyces coelicolor*. O rozmanitosti látek produkovaných *S. coelicolor* se vědělo již dlouho, ale teprve s odhalením sekvencí genomu se ukázalo, že skutečný potenciál tohoto druhu, jako producenta sekundárních metabolitů, je mnohem vyšší. Objevilo se přes 20 biosyntetických genových klastrů pro sekundární metabolity (Bentley et al. 2002; Challis & Hopwood 2003). Postupně se odhalilo, že *S. coelicolor* není jediným druhem, který má skrytou schopnost produkovat antibiotika. Tento fakt se stal spíše normou než výjimkou a některé streptomycety bez našeho vědomí obsahují více jak 50 shluků genů zajišťující produkci sekundárních metabolitů (Ikeda et al. 2003; Ohnishi et al. 2008; Oliynyk et al. 2007; Udwyary et al. 2007). Tento objev spustil výzkum tzv. tichých neboli spících antibiotik a hledání metod pro aktivaci jejich biosyntézy v rámci aplikované genomiky (Baltz 2008; Ochi et al. 2014; Rutledge & Challis 2015; Yoon & Nodwell 2014; Zhu et al. 2014).

Mechanismy působení antibiotik jsou dobře známé a jsou rozdělené dle několika klasifikací. Antibiotika se zacílí na základní buněčné funkce a omezí nebo zastaví bakteriální růst (Kohanski et al. 2010). Proces je sám o sobě složitý a zahrnuje fyzikální, biochemické, molekulární a strukturní změny buď celého organismu nebo konkrétních buněčných organel. Mohou tímto způsobem narušovat replikaci DNA, syntézu RNA, syntézu buněčné stěny a syntézu proteinů (Procópio et al. 2012).

Topologii DNA řídí DNA gyráza (topoizomeráza) tak, že katalyzuje vzor štěpení a vazbu DNA. Tato reakce je podstatná pro syntézu DNA a transkripci mRNA. Pokud je narušena antibiotiky dojde k smrti buňky (Chopra et al. 2002; Brötz-Oesterhelt & Brunner 2008; Nikaido 2009).

Transkripce je důležitá pro přepis informace z DNA do mRNA. Tato činnost vede k růstu buněk a je tak ideálním cílem pro antibiotika. Například rifamycin inhibuje zahájení transkripce a blokuje růst ribonukleotidového řetězce (Chopra et al. 2002; Brötz-Oesterhelt & Brunner 2008; Nikaido 2009).

Buněčná stěna složená z peptidoglykanu napomáhá udržovat osmotický tlak a dodává schopnost buňce přežít v rozličných prostředích. Peptidoglykan se biosyntetizuje ve třech stupních. Antibiotika působí až ve třetí fázi tak, že brání jeho polymeraci působením na transpeptidády (Chopra et al. 2002; Brötz-Oesterhelt & Brunner 2008; Nikaido 2009).

Při blokaci proteosyntézy antibiotiky dochází k blokování velké ribosomální jednotky, čímž zabraňují tvorbě peptidového řetězce. Tak působí například makrolidy. Naopak tetracyklin blokuje v malé ribosomální podjednotce přístup aminoacyl tRNA k ribozomu, spektinomycin narušuje stabilitu vazby peptidyl-tRNA na ribozom a streptomycin, kanamycin a gentamicin působí v 16S rRNA, která je součástí malé ribozomové podjednotky (Chopra et al. 2002; Brötz-Oesterhelt & Brunner 2008; Nikaido 2009).

Cytoplazmatická membrána je vstupní bránou a zároveň bariérou pro vodu, ionty a živiny. Některá antibiotika mohou narušovat buněčnou membránu inhibicí beta-ketoacyl syntázy I / II (FabF / B), což je důležitý enzym při tvorbě mastných kyselin potřebných pro bakteriální buněčnou membránu (Wang et al. 2006).

Kvůli nadměrnému užívání antibiotik v zemědělství, zdravotnictví a potravinářství si populace bakterií vytváří rezistence vůči antibiotikům. Rezistence může být způsobena geneticky jako například mutací vlastního genomu nebo převzetím rezistentních genů od jiné bakterie (Aminov 2009; Martinez et al. 2009). Nositelům genů rezistencí jsou i plazmidy, které konjugací výrazně napomáhají šíření rezistentního genu v populaci (Wright 2010).

K mutacím převážně dochází v místech působení antibiotik, a tak brání jejich účinkům (Andersson & Hughes 2010). V přírodních podmínkách slouží antibiotika a ostatní sekundární metabolity převážně k inhibici konkurence. Ukázalo se, že většina kmenů *Streptomyces* je rezistentní vůči více než jednomu antibiotiku (Nikaido 2009).

V posledních letech k rezistenci přispívá převážně neuvážené užívání antibiotik spotřebiteli a špatné dávkování při samoléčbě bez pokynů lékaře. Takto je větší šance ke vzniku rezistentních kmenů a potřebě používat dražší a mnohdy i toxičtější antibiotika. Odolnost bakterií se všeobecně zvýšila proti všem antibiotikům, a nejen určitým látkám (Takesue et al. 2010; Kiffer et al. 2005).

4 Metodika

4.1 Pozorované kmeny bakterií

Tabulka 1: Použité kmeny bakterií a jejich zařazení do rodu

Kmeny 15Tr	Použito	Rod
742	Ano	<i>Streptomyces</i>
67	Ano	<i>Streptomyces</i>
831	Ano	<i>Streptacidiphilus</i>
1487	Ano	<i>Nocardia</i>
1491	Ano	<i>Nocardia</i>
688	Ano	<i>Streptomyces</i>
1444	Ano	<i>Streptacidiphilus</i>
1241	Ano	<i>Actinospica</i>
261	Ano	<i>Micromonospora</i>
32	Ano	<i>Streptacidiphilus</i>
53	Nevyrostlo	<i>Actinospica</i>
602	Nevyrostlo	<i>Catenulispora</i>

4.2 Použité roztoky a chemikálie

Tabulka 2: Použité chemikálie, jejich výrobce a země původu

Chemikálie	Výrobce a země původu
Agar	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Agarosa	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Bacteo Proteose peptone	HiMedia, Indie
Casmino acidis	Bacton, Dickinson and Company USA
D-glukózy	Penta, Česká republika
EDTA (Kyselina etylendiamintetraoctová)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Fenol	MP Biomedicals, Kalifornie, USA
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Chloroform	Lach-Ner, Česká republika
Isopropanol	Penta, Česká republika
Izoamylalkohol	Penta, Česká republika
K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Lysozym	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
MgSO ₄ *7H ₂ O	Penta, Česká republika
Na – pyruvate	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NaAc (Octan sodný)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NaCl (chlorid sodný)	Penta, Česká republika

Proteináza K	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA
Rozpustný škrob	Penta, Česká republika
SDS (Dodecylsírán sodný)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Kalifornie, USA
Tris-acetát	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Yeast extract	HiMedia, Indie
Yellow load pufr	Top-Bio, Česká republika

4.3 Kultivace

Nejprve bylo potřeba si připravit kultivační média pro pěstování vybraných bakteriálních kmenů. Byla použita pevná média R2A a R2A55. Obě média byla připravena z 1 g Bacteo Proteose peptone, 1 g Yeast extract, 1 g Casmino acidis, 1 g D-glukózy, 1 g rozpustného škrobu, 0,6 g Na – pyruvate, 0,6 g K₂HPO₄, 0,1 g MgSO₄*7H₂O doplněné do 1 litru destilované vody. Následně se upravilo pH R2A na 7 a u R2A55 na 5,5. Agar se připravil zvlášť přidáním 15 g agaru na 1 litr destilované vody.

Médium i agar byly následně sterilovány v autoklávu auto PS20A (Chirana) po dobu 20 min při teplotě 121°C.

Po sterilizaci se nechal agar společně s médiem mírně zchladnout. Přidání agaru do média probíhalo ve flowboxu (aura vertical SD4, Tecomak, Itálie), který se před každým použitím vysvítil UV světlem po dobu čtvrt hodiny a plocha se otřela roztokem 70% etanolu, aby se zamezilo zbytečné kontaminaci. Ve flowboxu se připravené médium nalilo na Petriho misky, které byly předem označeny, zda se jedná o R2A nebo R2A55.

Na ztuhnuté médium se očkovaly kmeny z konzerv tvořených z 50 % glycerolem a z 50 % roztokem TRIS o koncentraci 200 mM zamrazené v mrazících boxech při teplotě -70 °C. Bakterie se na Petriho misky roztíraly sterilními plastovými kličkami. Takto připravené a popsané misky se nechaly dnem vzhůru po dobu sedmi dnů růst v inkubátoru (INCUBATOR avantor vwr Rakousko) při teplotě 28 °C.

Jelikož původní konzervy byly kontaminované, muselo se několikrát provést rozočkování na nové misky s čistým médiem. Ukázalo se, že všechny kmeny rostou na neutrálním médiu R2A, ale na kyselém R2A55 se některým kmenům nedařilo. Proto byly kmeny následně očkované a pěstovány pouze na médiu R2A.

Když se podařilo vzorky dostatečně pročistit a na každé misce se nacházel pouze jeden kmen bez kontaminací, proběhla kultivace v tekutém médiu. Použilo se tekuté médium R2A s podobným složením jako u tuhého R2A, ale bez přidání agaru a jiného množství složek s pH 7. Pro přípravu tekutého R2A se smíchalo 0,5 g Bacteo Proteose peptone, 0,5 g Yeast extract, 0,5 g Casmino acidis, 0,5 g D-glukózy, 0,5 g rozpustného škrobu, 0,3 g Na – pyruvate, 0,3 g K₂HPO₄, 0,05 g MgSO₄*7H₂O na jeden litr destilované vody.

Tekuté médium se po 20 ml rozlilo do Erlenmayerových baněk, které se zakryly folií. Erlenmayerovy baňky se sterilovaly v autoklávu po dobu 20 min při 121°C. Ve flowboxu se na tekuté médium v Erlenmayerových baňkách naočkávaly jednotlivé kmeny vypěstované na

Petriho miskách. K očkování se v ideálním případě použily narostlé spory, ale některé kmeny zarostly do agaru, a tak se bakterie přidávaly i s částí tuhého média. Takto připravené a uzavřené Erlenmayerovy baňky se nechaly kultivovat 48 hodin v třepačce při 200 rpm.

Po uběhnutí doby kultivace narostly v baňkách shluky bakterií. Některé kmeny netvořily shluky ale drobnější částičky, které připomínaly zákal. Poté se kultury přelily do centrifugačních zkumavek a stočily se v centrifuze Hettich Universal 32 R (Hettich Zetrifugen, Německo) po dobu 10 min při 3000 rpm při teplotě 4 °C. Bakteriální buňky se usadily na dně a supernatant se odlil do odpadu. Buňky se přenesly pomocí pipety s uříznutou špičkou a nad plamenem vyhlazenou špičkou do 2 ml mikrozkušavek. Mikrozkušavky byly ještě jednou stočeny v centrifuze Eppendorf Centrifuge 5418 (Eppendorf, Německo) po dobu 5 minut při 6000 rpm při pokojové teplotě. Buňky se usadily na dně a zbytek media se odpipetoval. Část vzorků byla uschována v mrazícím boxu při teplotě -18 °C. S ostatními se rovnou pracovalo.

4.4 Příprava bakteriálních konzerv z kmenů narostlých na tuhém médiu

Po řádném přečištění kmenů na tuhém médiu jsme získali kultury, které byly skladovány v lednici při teplotě 6 °C. Z narostlých bakterií, ideálně z jejich spor, se následně tvořily bakteriální konzervy.

Nejprve se připravilo médium (100% glycerol a 200 mM TRIS v poměru 1:1), které se napipetovalo do mikrozkušavek se šroubovacím uzávěrem o objemu 1,8 ml. Do každé mikrozkušavky se přidal 1 ml média. Takto připravené mikrozkušavky se sterilovaly v autoklávu po dobu 20 min při 121 °C.

Když médium dostatečně zchladlo, naočkoval se ve flowboxu do každé mikrozkušavky jeden bakteriální kmen předpěstovaný na Petriho miskách pomocí plastové sterilní kličky. Z každého kmene se vytvořily tři konzervy.

Takto připravené a uzavřené konzervy se uskladnily v mrazícím boxu při teplotě -70 °C.

4.5 Izolace chromozomové DNA

Pro izolaci DNA se využily centrifugované buňky uchované v 2 ml mikrozkušavkách. Sediment se po rozmrazení zvážil a resuspendoval v SET pufru (2 ml 1M Tris-HCl, 5 ml 0,5 M EDTA, 1,5 ml 0,5 M NaCl, 91,5 ml vody). Na 0,3 g bakteriální hmoty se přidalo 0,5 ml SET pufru, pipetováním přes špičku s ustřiženým a nad plamenem zarovnaným koncem. Do každé mikrozkušavky se odpipetovalo 25 µl zásobního roztoku lyozymu. Zásobní roztok lyozymu byl připraven rozpuštěním 0,2 g lyozymu v 10 ml SET pufru a následně skladován v lednici při šesti stupních celsia. Roztok v mikrozkušavce se promíchal převrácením a přesunul do suchého záhřevného bloku Bio TDB-100 Dry block thermostat. Vzorky se inkubovaly při 37 °C dokud nezačala lyze. Pro každý kmen je čas rozdílný, ale většinou se pohybuje okolo 10–40 minut. Pro naše účely byla doba štěpení stanovena na 30 minut. Zda je vzorek dostatečně lyzován, jsme posuzovali dle toho, že suspenze zhoustne a při míchání se táhne. Pokud se lyze nepovede, musí se doba štěpení prodlužovat. U mých pokusných kmenů se tak čas natáhl až na šestnáct hodin, a i tak se štěpení nepovedlo u všech kmenů.

Po lyzi se do každé ependorfky přidalo 14 μ l zásobního roztoku proteinázy K a 60 μ l 10% SDS; promíchalo se převrácením zkumavky. Inkubace při 55 °C probíhala dvě hodiny za občasného promíchání. Suspenze se takto pročistila.

Suspenze se vyjmula ze záhřevného bloku a nechala zchladnout na okolní teplotu. Extrahovala se stejným objemem neutrálního roztoku fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 25:24:1. Vzorky byly následně přesunuty do centrifugy Eppendorf Centrifuge 5418 (Eppendorf) a centrifugovány po dobu 5 minut při 6000 rpm. Mikrozukavky se opatrně vyjmuly z centrifugy tak, aby nedošlo k promíchání fází. Vodná fáze byla odpipetována pipetou s ustriženou a nad plamenem vyhlazenou špičkou do nové ependorfky. Celý krok extrakce se zopakoval ještě jednou. Dále se k vodné fázi v nové mikrozukavce přidal stejný objem směsi chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 24:1. Vzorky se po dobu pěti minut promíchávaly převrácením.

Vzorek se centrifugoval 5 minut při 6000 rpm, a poté byla znovu odebrána vodná fáze do čisté ependorfky. Do mikrozukavky bylo ke vzorku přidáno 0,1 objemu vzorku 3M NaAc o pH 4,7 a 0,6 objemu vzorku isopropanolu. Z rozhraní vodné fáze se sbírala odvodněná DNA a to natáčením na hladkou sterilní skleněnou tyčinku. Natočením DNA na skleněnou tyčinku dochází k pročištění a odstranění malých fragmentů DNA. Skleněná tyčinka s natočenou DNA se dvakrát opláchla v roztoku 100% etanolu a opatrně se nechala uschnout na vzduchu. Když tyčinka s DNA uschnula, ponořila se do ependorfky naplněné 200 μ l TE pufu (10 mM Tris, 1 mM EDTA) a uzavřela se parafilmem tak, aby se tyčinka nedotýkala hran. Mikrozukavky se vzorkem se takto mohou vložit do lednice a nechat schladit na 6 °C a nechat do příštího dne nebo se rovnou přejde k dalšímu kroku.

Mikrozukavky se vzorky s ponořenou tyčinkou se vloží do termobločku a zahřívaly se při 55 °C po dobu 60 minut. Nakonec se na elektroforéze ověřilo, zda se extrakce povedla.

4.6 Izolace chromozomové DNA pomocí kitu

Jelikož se u některých kmenů nepodařilo extrahovat DNA klasickou metodou, musel se pro extrakci použít kit DNeasy PowerLyzer Microbial Kit (QIAGEN). Veškeré chemikálie použité při extrakci kitem byly již součástí kitu. Pro extrakci se použily kmeny předpěstované v tekutém mediu a zmražené na -18 °C.

Postupovalo se podle návodu. Ve stručnosti, se nejprve buňky resuspendovaly v 300 μ l PowerBead roztoku a vortexovaly po dobu 5 vteřin. Vzorek se pipetoval pipetou s ustriženou a nad plamenem vyhlazenou špičkou do mikrozukavky PowerBead Tube Glass, 0,1 mm. Přidalo se 50 μ l roztoku SL.

Homogenizace se provádí dvěma způsoby buď umístěním buněk do homogenizátoru PowerLyzer 24 s homogenizací po dobu 2,5 minuty při 2000 rpm. Čas homogenizace se upravoval v závislosti na vlastnostech a odolnosti jednotlivých kmenů. Jako druhý způsob lze využít vortexu. Mikrozukavky se vyváženě narovnají do vortexu (cat. No. 13000-V1-24) a nechají se vortexovat při maximální rychlosti 10 minut. Pro naše účely se využilo homogenizátoru PowerLyzer 24.

Mikrozukavky se po vyjmutí z homogenizátoru přendaly do centrifugy a odstředily při 10000 rpm 30 vteřin při pokojové teplotě. Supernatant se pipetoval do čisté 2 ml mikrozukavky. K supernatantu se přidalo 100 μ l roztoku IRS a vortexoval se 5 vteřin. Poté

se vzorky nechaly odležet po dobu 5 minut v teplotě 4 °C. Vzorek se následně přesunul do centrifugy a nechal se centrifugovat 1 minutu při 10000 rpm při pokojové teplotě. Po vyjmutí mikrozkumavek z centrifugy se pipetovala vodná fáze pipetou s uříznutou špičkou a nad plamenem vyhlazeným okrajem do nové 2 ml mikrozkumavky. Při přesunu tekutiny se dávalo pozor, aby se s roztokem nenabraly i skleněné peletky. Pokud se do vzorku dostalo malé množství střepin, nebyl to problém a neovlivnilo to výsledek pokusu. K supernatantu se do mikrozkumavek přidalo 900 µl roztoku SB a vortexovalo se 5 vteřin. Vzorek se odpipetoval pipetou s uříznutou a nad plamenem vyhlazenou špičkou do MB Spin Column a centrifugoval se 30 vteřin při 10000 rpm při pokojové teplotě. Roztok, který protekl skrze filtr se odstranil. Tento krok se opakoval dvakrát, než se spotřeboval původní vzorek z 2 ml mikrozkumavky.

Po přefiltrování veškerého roztoku se přidala do MB Spin Column 300 µl roztoku CB a centrifugoval se 30 vteřin při 10000 rpm při pokojové teplotě. Odstranila se tekutina, která protekla skrze filtr a vzorek se nechal znovu centrifugovat 1 minutu při 10000 rpm při pokojové teplotě. Filtrát se opatrně odlil, aby se filtr nedotkl blány a filtr se následně přesunul do nové čisté 2 ml mikrozkumavky. Na střed filtru se přidalo 50 µl roztoku EB a mikrozkumavka se centrifugovala při 10000 rpm 30 vteřin při pokojové teplotě.

Po centrifugování se odstranil filtr. Pokud se pokus provedl správně, v přefiltrovaném roztoku se nacházela DNA. Zda se experiment povedl se ověřilo pomocí elektrofrézy. Takto extrahovaná DNA se uskladnila v mrazicím boxu při teplotách -20 až -80 °C.

4.7 Elektrofréza

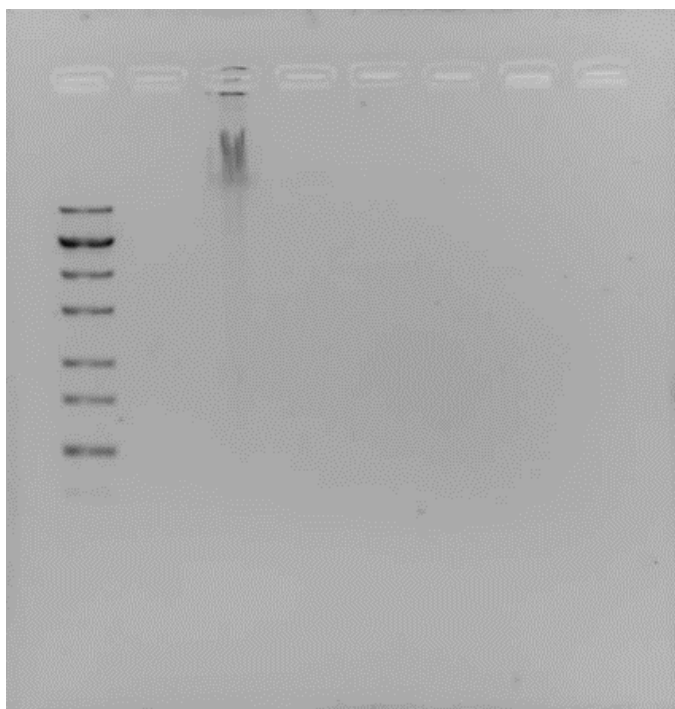
Gel pro elektrofrézu se připravil smícháním 50 ml TAE pufru (40 mM Tris-acetát a 1 mM EDTA) a 0,5 g agarózy. Aby se agaróza rozpustila v TAE pufru, musela se směs zahřát po dobu jedné minuty v mikrovlnné troubě. Roztok se ochladil pod proudem tekoucí vody, ale nesmělo dojít k úplnému ztuhnutí. Po zchlazení se přidalo 5 µl SYBR Safe DNA Gel Stain (naředěný v DMSO v poměru 1:9). Roztok se nalil do připravené formy na gel s vloženým hřebínkem pro vytvoření komůrek pro vzorky. Gel se nechal půl hodiny tuhnout při pokojové teplotě a po ztuhnutí se odstranili gumové nástavce a spolu s vaničkou i hřebínkem se přesunul do elektrofrézy, která se doplnila TAE pufrem tak, aby byl celý gel ponořený. Vzorky se připravovaly na mikrotitrační destičce, kde se v jamkách smíchaly 2 µl Yellow load pufru a 1 µl vzorku DNA. Pokud bylo počtově možné, vynechávala se postranní jamka. Mezi vzorky se do jedné komůrky přidalo 5 µl markeru GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder, pro identifikování velikosti a množství DNA. Do zbývajících jamek se naněsly vzorky. Elektrofréza se zakryla víkem a byla puštěna při napětí 95 V a 31 proudu 95 mA po dobu 25 minut. Po skončení se gel vyjmul z vaničky a byl analyzován pod UV zářením transluminátoru a focen pomocí programu GeneSnap (Syngene, Anglie).

5 Výsledky

U všech kmenů se nejprve provedla extrakce DNA za použití štěpení lyzozymem, který se nechal působit 30 minut. Tímto způsobem se nepodařilo extrahovat DNA ani z jednoho kmene, proto se začala postupně prodlužovat doba štěpení. Teprve při štěpení vzorků 16 hodin se podařilo extrahovat DNA z dvou kmenů 15Tr1444 a 15Tr1491. U ostatních kmenů nepomohlo ani zvýšení množství lyzozymu z 25 μ l na 50 μ l.

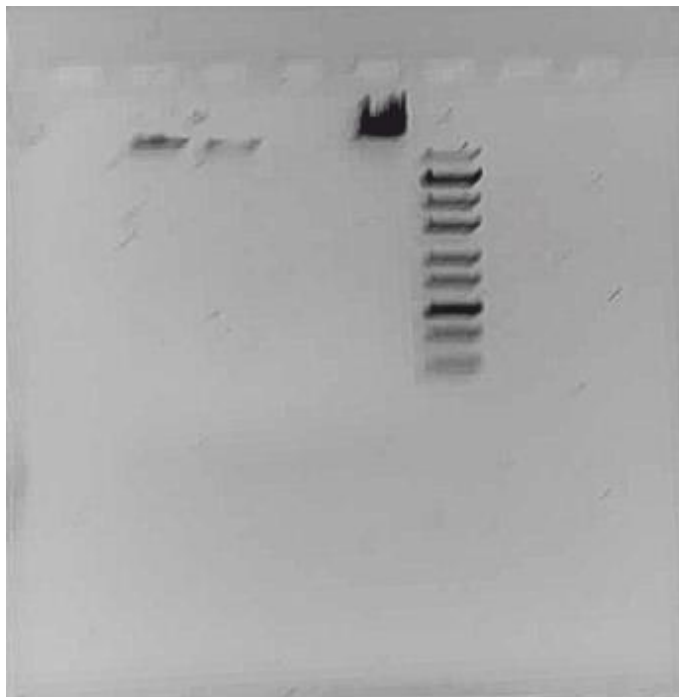
Po neúspěchu s klasickou metodou se přešlo k extrahování DNA za pomoci kitu. I u této metody se musela upravovat doba rozbíjení kmenů homogenizací. Kmen 15Tr831 stačilo rozbít po dobu 2 minut. Pokud se nechal v homogenizéru déle, došlo k přílišnému rozbití. Kmeny 15Tr67, 15Tr32, 15Tr742 a 15Tr1241 se rozbíjely 2,5 minuty. Kmeny 15Tr688 a 15Tr1487 se rozbíjely 4 minuty. Kmen 15Tr261 se musel homogenizovat nejdéle a to 5 minut, a přesto nedošlo k přílišné výtěžnosti. Pro sekvenaci to ale bylo dostatečné.

U kmenů 15Tr1444 se podařilo z 1 μ l vzorku vytěžit klasickou metodou za použití štěpení lyzozymem fragmenty o velikosti 20000 bpa více a bylo je již možné použít na sekvenaci (viz Obrázek 1).



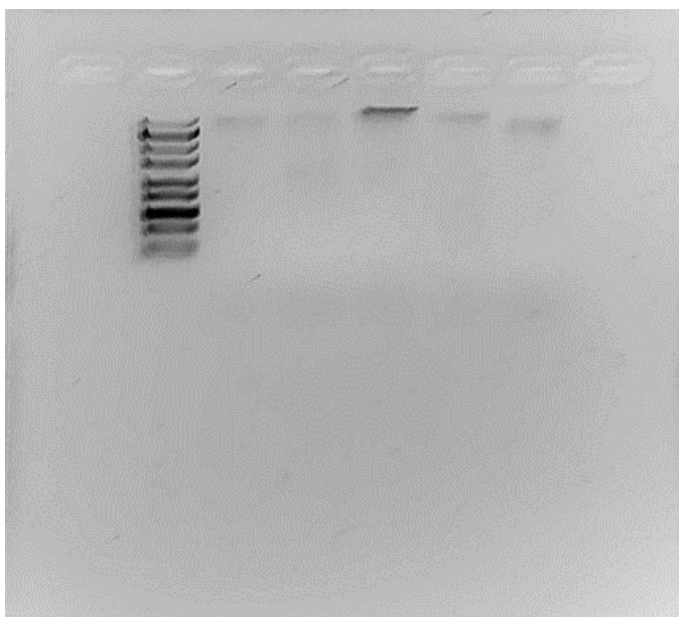
Obrázek 1: Chromozomální DNA izolovaná z kmene 15Tr1444 (dráha 3), Elektroforéza v 1% agarosovém gelu, naneseno 1 μ l vzorku, DNA ladder (dráha 1) (Zdroj: vlastní)

U kmenů 15Tr688, 15Tr32 a 15Tr742 se podařilo z 1 μ l vytěžit kitem fragmenty o velikosti 20000 bp a více a bylo je již možné použít na sekvenaci (viz Obrázek 2).



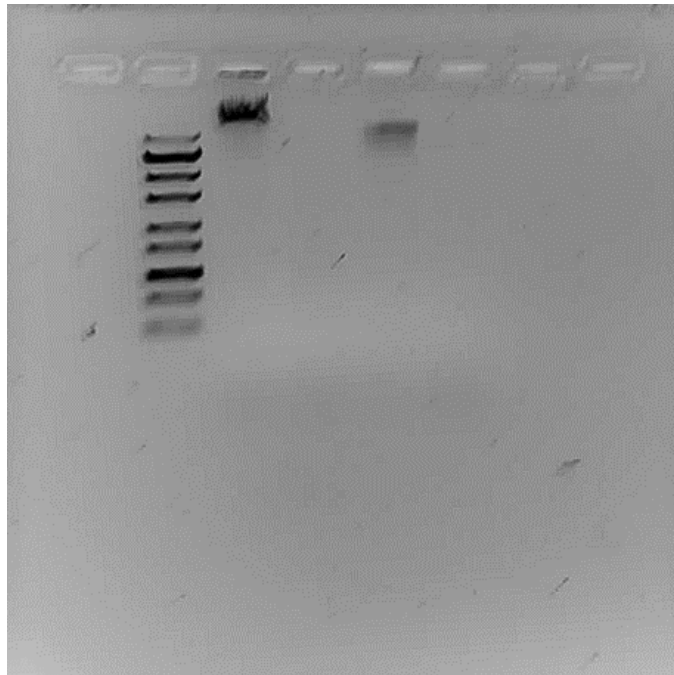
Obrázek 2: Chromozomální DNA izolovaná z kmenů 15Tr688 (dráha 2), 15Tr32 (dráha 3), 15Tr742 (dráha 5), Elektroforéza v 1% agarosovém gelu, nanášeno 1 μ l vzorků, DNA ladder (dráha 6) (Zdroj: vlastní)

U kmenů 15Tr831, 15Tr742, 15Tr67 a 15Tr688 se podařilo z 1 μ l vzorku vytěžit kitem fragmenty o velikosti 20000 bp. U kmene 15Tr1487 se z 1 μ l vzorku podařilo vytěžit fragmenty o velikosti 10000 bp a bylo je již možné použít na sekvenaci (viz Obrázek 3).



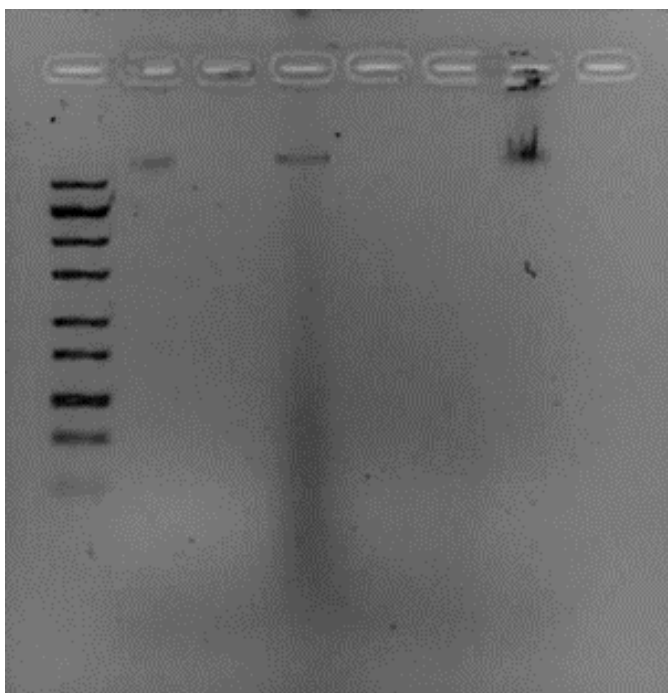
Obrázek 3: Chromozomální DNA izolovaná z kmenů 15Tr831 (dráha 3), 15Tr742 (dráha 4), 15Tr67 (dráha 5), 15Tr688 (dráha 6), 15Tr1487 (dráha 7), Elektroforéza v 1% agarosovém gelu, nanášeno 1 μ l vzorku, DNA ladder (dráha 2) (Zdroj: vlastní)

U kmenů 15Tr1241 a 15Tr831 se podařilo z 1 μ l vzorku vytěžit kitem fragmenty o velikosti 20000 bp a více a bylo je již možné použít na sekvenaci (viz Obrázek 4).



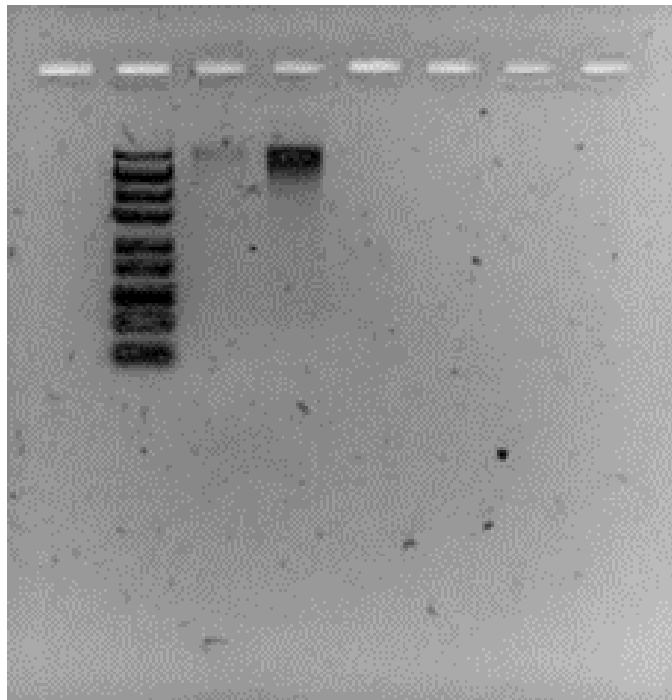
Obrázek 4: Chromozomální DNA izolovaná z kmenů 15Tr1241 (dráha 3), 15Tr831 (dráha 5), Elektroforéza v 1% agarosovém gelu, nanášeno 1 μ l vzorků, DNA ladder (dráha 2) (Zdroj: vlastní)

U kmenů 15Tr1444 a 15Tr1491 se podařilo z 1 μ l vzorku vytěžit klasickou metodou za použití štěpení lysozyme fragmenty o velikosti 20000 bp a více a bylo možné je již použít na sekvenaci (viz Obrázek 5).



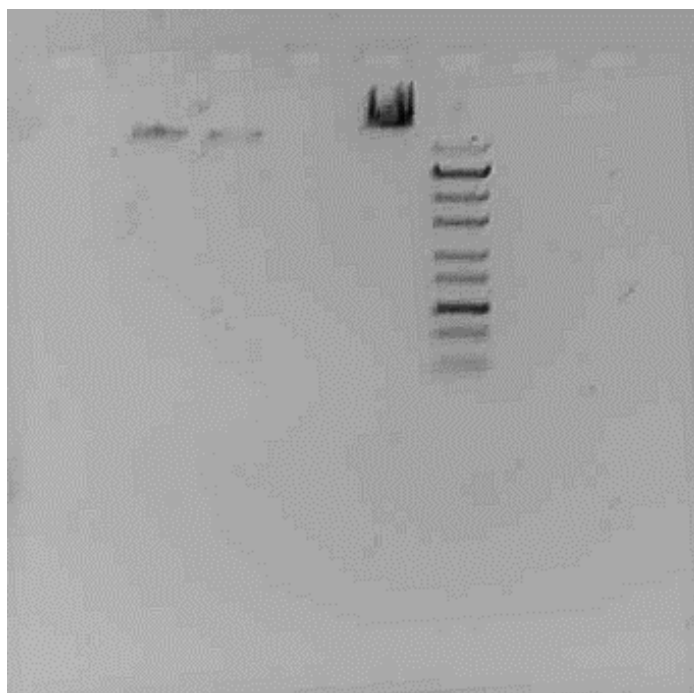
Obrázek 5: Chromozomální DNA izolovaná z kmenů 15Tr1444 (dráha 2), 15Tr1491 (dráha 4), 15Tr1444 (dráha 7), Elektroforéza v 1% agarosovém gelu, nanášeno 1 μ l vzorků, DNA ladder (dráha 1) (Zdroj: vlastní)

U kmenů 15Tr261 a 15Tr1487 se podařilo z 1 μ l vzorku vytěžit kitem fragmenty o velikosti 20000 bp a bylo je již možné použít na sekvenaci. Výtěžek z kmene 15Tr1487 byl podstatně větší než u kmene 15Tr261 (viz Obrázek 6).



Obrázek 6: Chromozomální DNA izolovaná z kmenů 15Tr261 (dráha 3), 15Tr1487 (dráha 4), Elektroforéza v 1% agarosovém gelu, nanášeno 1 μ l vzorků, DNA ladder (dráha 2) (Zdroj: vlastní)

U kmenů 15Tr688, 15Tr32 a 15Tr742 se podařilo z 1 μ l vytěžit kitem fragmenty o velikosti 20000 bp a více a bylo možné je již použít na sekvenaci (viz Obrázek 7).



Obrázek 7: Chromozomální DNA izolovaná z kmenů 15Tr688 (dráha 2), 15Tr32 (dráha 3), 15Tr742 (dráha 5), Elektroforéza v 1% agarosovém gelu, naneseo 1 μ l vzorků, DNA ladder (dráha 6) (Zdroj: vlastní)

6 Diskuse

U všech deseti kmenů se nakonec podařilo extrahovat DNA, ale muselo dojít kromě klasické metody s lyozymem i na použití kitu. U osmi kmenů se nepodařilo rozštěpit bakteriální stěnu lyozymem, proto bylo třeba využít střepiny v kitu (velikost skleněných střepin ve speciálních zkumavkách byla 0,1 mm), které to udělaly místo něj, aby bylo vůbec možné získat DNA. Pro každý z deseti aktinobakteriálních kmenů se upravoval čas, ať už se jednalo o chemické štěpení lyozymem nebo rozbíjení pomocí střepin v homogenizátoru.

Ukázalo se, že metoda využívající kitu je rychlejší a úspěšnější, protože se pomocí kitu podařilo extrahovat DNA ze všech vzorků. Za pomoci lyozymu se extrahovala DNA jen u dvou vzorků a bylo třeba protáhnout dobu štěpení na maximální možnou dobu a to 16 hodin. Metoda s využitím chemického rozkladu buněčné stěny (přesněji rozvolnění vazeb v peptidoglykanu) lyozymem je mnohem méně agresivní než roztříštění celých buněk skleněnými střepinami z kitu. Naše výsledky jsou odlišné od práce Babadi et al. (2021), kde se při metodě využívající lyozym podařilo získat vyšší koncentraci DNA než při využití kitu.

Lyozym je enzym se přirozeně vyskytuje například ve slinách nebo v mateřském mléce. V živočišných organismech je součástí mechanismů vrozené imunity. Lyozym enzymaticky štěpí glykosidickou vazbu v peptidoglykanovém komplexu v bakteriálních stěnách gram pozitivních bakterií (Ellison & Giehl 1999). Této vlastnosti se využívá při extrakci DNA, kdy se rozštěpí buněčná stěna a je možné uvolnit DNA z buňky. Různé kmeny a rody mají rozdílné složení bakteriální stěny, a proto štěpení lyozymem nemusí být vždy dostatečné, nebo nemusí vůbec proběhnout (Jiang et al. 2011).

Peptidoglykan je síť sacharidových polymerů spojená krátkými postranními řetězci peptidů. Funguje jako exoskelet bakterií a dodává jim tvar a pevnost (Melzer et al. 2018; Verma et al. 1989; Udou et al. 1983). Rozdíly ve složení peptidoglykanu se vyskytují nejen mezi různými liniemi aktinobakterií, ale i v rámci jednoho druhu. To způsobuje velkou variabilitu odolnosti různých druhů na vlivy prostředí (Leyh-Bouille et al. 1974; Wietzerbin et al. 1974; Lavollay et al. 2009; Lavollay et al. 2011; Kumar et al. 2012).

Sacharidová část peptidoglykanové vrstvy se skládá z opakujících se jednotek beta-1,4-vázaného N-acetylglukosaminu (GlcNAc), N-acethylmuramové kyseliny (MuraNAc) a tetrapeptidů vycházejících z MuraNAc zbytků. Peptidovou komponentu peptidoglykanu aktinobakterií tvoří L-alanin-D-isoglutamin-L-diaminokyseliny-D-alaninu, přičemž třetí pozice L-diaminokyseliny se v různých fylogenetických liniích liší (Petit et al. 1969; Kato et al. 1968). Specifická prostorová izomerie aminokyselinového složení peptidů se používá pro taxonomickou klasifikaci aktinobakterií (Schleifer & Kandler 1972).

Na rozdíl od velmi variabilní třetí polohy je první poloha L-alaninu téměř neměnná. Kromě této základní struktury podléhají glykanové jednotky a peptidové domény modifikacím, které vytvářejí další variace ve struktuře peptidoglykanu (von Wintzingerode et al. 2001; Hamada et al. 2009).

Tato izomerie a rozmanitost peptidoglykanu v rámci linií a druhů, by mohla být zodpovědná za rozdílnost štěpení stěny různých kmenů aktinobakterií. Proto je třeba upravovat délku lyze nebo délku rozbíjení a přizpůsobit se jednotlivým kmenům. Celkově se

dá doporučit používání komerčních kitů s tím, že je potřeba upravit čas rozbíjení, aby se DNA střepinami příliš nefragmentovala.

7 Závěr

Podářilo se vypracovat literární rešerši zabývající se aktinobakteriemi, jejich sekundárními metabolity a základní analýzou genomu PGPR bakterií.

V laboratoři se úspěšně dokončila extrakce DNA z deseti zástupců kmene *Aktinobakteria* s dostatečnou velikostí fragmentů. DNA bude následně použita k dalšímu zkoumání.

8 Literatura

Adnani N, Rajski SR, Bugni TS. 2017. Symbiosis-inspired approaches to antibiotic discovery. *Nat. Prod. Rep.* **34**:784-814.

Agar JN, Yuvaniyama P, Jack RF, Cash VL, Smith AD, Dean DR, Johnson MK. 2000. Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the *NifU* protein. *J Biol Inorg Chem* **5**:167-177.

Ambarwati A, Sembiring L, Soegihardjo C. 2012. Antibiotic produced by streptomycetes associated with rhizosphere of purple nut sedge (*Cyperus rotundus* L.) in Surakarta, Indonesia. *African Journal of Microbiology Research* **6**:52-57.

Aminov RI. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol.* **11**:2970-88.

Anderson AS, Wellington EM. 2001. The taxonomy of streptomyces and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**:797-814.

Andersson DI, Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* **8**:260-71.

Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB, Phler A. 1988. Nucleotide sequence of a 25,206base pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J Mol Biol* **203**:715-738.

Atlas R. 1997. Principles of microbiology. WCB McGraw-Hill, New York, NY.

Babadi ZK, Narmani A, Ebrahimipour GH, Wink J. 2021. Combination and Improvement of Conventional DNA Extraction Methods in Actinobacteria. Research Square. (e1) DOI: 10.21203/rs.3.rs-180155/v1.

Baltz RH. 2007. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. *Microbe* **2**:125-131.

Baltz RH. 2008. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr Opin Pharmacol* **8**:557-563.

Baltz RH. 2010. Genomics and the ancient origins of the daptomycin biosynthetic gene cluster. *J Antibiot* **63**:506-511.

Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H, Clément C, Ouhdouch Y, Wezel GP. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **80**:1-43.

Bashan Y, de-Bashan LE. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum promotes* plant growth – a critical assessment. *Adv Agron* **108**:77-136.

Bashan Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl Environ Microbiol* **51**:1089-1098.

Behal V. 2000. Bioactive products from *Streptomyces*. *Adv Appl Microbiol* **47**:113-56.

Beinert H, Kiley PJ. 1999. Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr Opin Chem Biol* **3**:152–157.

Bennett JW. 1998. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J Biotechnol* **66**:101-107.

- Bennett MJ, Marchant A, May ST, Swarup R. 1998. Going the distance with auxin: unrevealing the molecular basis of auxin transport. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* **353**:1511-1515.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**:141-147.
- Bhatti AA, Haq S, Bhat RA, 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis* **111**:458-467.
- Bilyk O, Luzhetskyy A. 2016. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **42**:98-107.
- Bouizgarne B, Ait Ben Aoumar A. 2014. Bacterial diversity in sustainable agriculture. International, Heidelberg, Germany.
- Brandl MT, Lindow SE. 1996. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3- acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol* **62**:4121-4128.
- Brötz-Oesterhelt H, Brunner NA. 2008. How many modes of action should an antibiotic have? *Curr Opin Pharmacol.* **8**:564-73.
- Bruto M, Prigent-Combaret C, Muller D, Moëgne-Loccoz Y. 2014. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and related Proteobacteria. *Sci Rep.* **4**:6261.
- Buchanan RE. 1917. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. II. The primary subdivisions of the *Schizomycetes*. *J Bacteriol* **2**:155-164.
- Bull AT, Goodfellow M. 2019. Dark, rare and inspirational microbial matter in the extremobiosphere: 16 000 m of bioprospecting campaigns. *Microbiology* **165**:1252-1264.
- Busscher GF, Rutjes FP, van Delft FL. 2005. 2 – Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics. *Chem Rev* **105**:775-791.
- Butler MS, Hansford KA, Blaskovich MA, Halai R, Cooper MA. 2014. Glycopeptide antibiotics: back to the future. *J Antibiot* **67**:631-644.
- Cabello A, Gonzalez A, Genilloud O. 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil *Actinomycetes* isolated under different conditions of pH. *Salinity journal of Applied microbiology* **95**:814-823.
- Colquhoun JA, Heald SC, Li L, Tamaoka J, Kato C, Horikoshi K, Bull AT. 1998. Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. *Extremophiles* **2**:269-277.
- Costacurta A, Keijers V, Vanderleyden J. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol Gen Genet* **243**:463-472.
- Cross T, Goodfellow M. 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **2**:11-112.

- Cummins C, Harris H. 1958. Studies on the cell-Wall composition and taxonomy of *Actinomycetales* and related groups. *J. gen. Microbiol.* **18**:173-189.
- da-Silva SC, Fermino SA, da-Silva MG. 2008. Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. *Sci Agri* **65**:50-55. (da-Silva et al. 2008)
- Dastager S, Dayanand LWJA, Tang SK, Tian XP, Zhi XY, Xu LH, Jiang C. 2006. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *Afr J Biotechnol* **5**:1131-1134.
- De Schrijver A, De Mot R. 1999. A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* **145**:1287-1288.
- Demain A. 1980. Microbial production of primary metabolites. *Naturwissenschaften* **67**:582-587.
- Demain AL, Sanchez S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot* **62**:5-16.
- Dhakal D, Sohng JK, Pandey RP. 2019. Engineering actinomycetes for biosynthesis of macrolactone polyketides. *Microb Cell Fact* **18**:137.
- Dietz A, Mathews J. 1971. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Appl Microbiol* **21**:527-533.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Broek AV, Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* **212**:155-164.
- Ellison RT, Giehl TJ. 1999. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* **88**:1080-1091.
- El-Tarabily K, Sivasithamparam K. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* **38**:1505-1520.
- Euzéby JP. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* **47**:590-592.
- Fayyad UM, Piatetsky-Shapiro G, Smyth P. 1996. From data mining to knowledge discovery in databases. *AI Mag* **17**:37-54.
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M, O'Gara F. 1992. Exploiting gene(s) involved in 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in order to improve the biocontrol ability of a pseudomonad strain. *Appl Environ Microbiol* **58**:3873-3878.
- Flärdh K, Buttner MJ. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Review Microbiol* **7**:36-49.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496-512.
- Fraser CM, Gocayne JD, White O. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**:397-403.
- Fu W, Jack RF, Morgan V, Dean DR, Johnson MK. 1994. *NifU* gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical [2Fe-2S] clusters. *Biochemistry* **33**:13455-13463.
- Gao B, Gupta RS. 2012. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**:66-112.

- Gardner JM, Chandler JL, Feldman AW. 1984. Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonads on citrus roots. *Plant Soil* **77**:103-113.
- Gaynor M, Mankin AS. 2003. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr Top Med Chem* **3**:949-961.
- Gesheva V, Ivanova V, Genava R. 2005. Effects of nutrients on the production of microbial antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbial Res* **160**:243-248.
- Girard G, Traag BA, Sangal V, Mascini N, Hoskisson PA, Goodfellow M, van Wezel GP. 2013. A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Open Biol* **3**:130073.
- Glick BR. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)* **2012**:963401.
- Gomez-Escribano JP, Alt S, Bibb MJ. 2016. Next generation sequencing of *Actinobacteria* for the discovery of novel natural products. *Mar. Drugs* **14**:78.
- Goodfellow M, Minnikin DE. 1985. Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, London, United Kingdom.
- Goodfellow M, O'Donnell AG. 1989. Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. Pages 343-383 in Baumberg S, Hunter IS, Hodes PM, editors. *Microbial products: new approach*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Goodfellow M. 1989. The genus *Rhodococcus* Zopf 1891. Pages 2362-2371 in Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1st ed, vol 4. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* **17**:333-51.
- Gulve RM, Deshmukh AM. 2012. Antimicrobial activity of the marine *Actinomycetes*. *Inter multidiscip Res J* **2**:16-22.
- Haas D, Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol* **41**:117-153.
- Hamada M, Iino T, Tamura T, Iwami T, Harayama S, Suzuki K-I. 2009. *Serinibacter salmoneus* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from the intestinal tract of fish, and emended descriptions of the families *Beutenbergiaceae* and *Bogoriellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:2809-2814.
- Hasani A, Kariminik A, Issazadeh K. 2014. Streptomyces: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* **2**:63-75.
- Hopwood DA, Chater KF, Bibb MJ. 1995. Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete. *Biotechnology* **28**:65-102.
- Challis GL, Hopwood DA. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:14555-14561.
- Chater K. 1993. Genetics of Differentiation in *Streptomyces*. *Annual Review of Microbiology*, **47**:685-711.
- Chopra I, Hesse L, O'Neill AJ. 2002. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *J Appl Microbiol.* **92**:4-15.

- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Ikuchi H, Shiba T, Omura S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology* **21**:526-531.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**:526-531.
- Ilić S, Konstantinović S, Veljković V, Savić D, Gojgić-Cvijović G. 2010. The impact of different carbon and nitrogen sources on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7. *Current research, Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* **2**:1337-1342.
- Ilic S, Konstantinovic S, Todorovic Z, Lazic M, Veljkovic V, Jokovic N, Radovanovic B. 2007. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Mikrobiologija* **76**:480-487.
- Jain M, Olsen HE, Paten B. 2016. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol* **17**:239.
- James P, Edwards C. 1989. The effects of temperature on growth and production of the antibiotic granaticin by thermotolerant streptomycete. *J Gen microbiology* **135**:1997-2003.
- Jensen SE, Paradkar AS. 1999. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**:125-133.
- Jiang Y-X, Wu J-G, Yu K-Q, Ai C-X, Zou F, Zhou Integrated HW. 2011. Lysis procedures reduce extraction biases of microbial DNA from mangrove sediment. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **111**:153-157.
- Joerger RD, Bishop PE. 1988. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *nifB-nifQ* region from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **170**:1475-1487.
- Johnson D, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. 2005. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* **74**:247-281.
- Johnston NJ, Mukhtar TA, Wright GD. 2002. Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Curr Drug Targets* **3**:335-344.
- Jonsbu E, McIntyre M, Neilson J. 2002. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *J Biotechnol* **95**:133-144.
- Jose PA, Jha B. 2016. New Dimensions of Research on Actinomycetes: Quest for Next Generation Antibiotics. *Front Microbiol* **7**:1295.
- Jose PA, Maharshi A, Jha B. 2021. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research* **246**:126708
- Jose PA, Sivakala KK, Jha B. 2019. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier.
- Kalakoutskii LV, Agre NS. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol Rev* **40**:469-525.
- Kang Q, Shen Y, Bai L. 2012. Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. *Nat Prod Rep* **29**:243-263.
- Kato K, Strominger JL, Kotani S. 1968. Structure of the cell wall of *Corynebacterium diphtheriae*. I. Mechanism of hydrolysis by the L-3 enzyme and the structure of the peptide. *Biochemistry* **7**:2762-2773.
- Kharat K, Kharat A, Hardikar B. 2009. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Streptomyces* sp. from Lonar Lake. *African Journal of Biotechnology* **8**:6645-6648.

- Kharel MK, Pahari P, Shepherd MD, Tibrewal N, Nybo SE, Shaaban KA, Rohr J. 2012. Angucyclines: biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis. *Nat Prod Rep* **29**:264-325.
- Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood D. 2000. *Practical streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Crowes, Norwich, England.
- Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C. 2005. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYS-TIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis* **9**:216-24.
- Kiley PJ, Beinert H. 2003. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**:181-185.
- Kirby R. 2011. Chromosome diversity and similarity within the *Actinomycetales*. *FEMS Microbiol Lett* **319**:1-10.
- Kloepper JW, Schroth MN. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria* **2**:879-882.
- Koga J, Adachi T, Hidaka H. 1991. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Mol Gen Genet* **226**:10-16.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*. **8**:423-35.
- Kominek L. 1975. Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: control mechanisms of cycloheximide biosynthesis. *Antimicrob Agents Chem* **7**:856-860.
- Kroppenstedt R. 1985. *Chemical methods in bacterial systematics*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Kumar P, Arora K, Lloyd JR, Lee IY, Nair V, Fischer E, Boshoff HIM, Barry CE. 2012. Meropenem inhibits D,D-carboxypeptidase activity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **86**:367-381.
- Labeda D. 1987. Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Dev Ind Microbiol* **28**:115-121.
- Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Défago G, Keel C, Haas D. 1998. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*. **180**:3187-96.
- Lavollay M, Arthur M, Fourgeaud M, Dubost L, Marie A, Riegel P, Gutmann L, Mainardi J-L. 2009. The beta-lactam-sensitive D,D-carboxypeptidase activity of *Pbp4* controls the L,D and D,D transpeptidation pathways in *Corynebacterium jeikeium*. *Mol Microbiol* **74**:650-661.
- Lavollay M, Fourgeaud M, Herrmann J-L, Dubost L, Marie A, Gutmann L, Arthur M, Mainardi J-L. 2011. The peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* is predominantly cross-linked by L,D-transpeptidases. *J Bacteriol* **193**:778-782.
- Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**:399-405.
- Lee N, Hwang S, Kim J, Cho S, Palsson B, Cho BK. 2020. Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**:1548-1556.

Lechevalier HA, Lechevalier MP. 1965. Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. *Ann Inst Pasteur* **108**:662-673.

Lechevalier MP, De Bievre C, Lechevalier HA. 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem Syst Ecol* **5**:249-260.

Lechevalier MP, Lechevalier H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* **20**:435-443.

Lechevalier MP, Lechevalier HA. 1980. The chemotaxonomy of actinomycetes. *Special Publications Society for Industrial Microbiology* **6**:225-292.

Lechevalier MP, Stern AE, Lechevalier HA. 1981. Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes. Pages 111–116 in Schaal KP, Pulverer G, editors. *Actinomycetes*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.

Lechevalier MP. 1977. Lipids in bacterial taxonomy: a taxonomist's view. *Crit Rev Microbiol* **5**:109-210.

Leung K, Errampalli D, Cassidy M, Lee H, Trevors JT, Okamura H, Bach HJ, Hall B. 1997. A case study of bioremediation of polluted soil: biodegradation and toxicity of chlorophenols in soil. Pages 577-602 in van Elsas JD, Trevors JT, Wellington EMH, editors. *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker, New York.

Lewin GR, Carlos C, Chevrette MG, Horn HA, McDonald BR, Stankey RJ, Fox BG, Currie CR. 2016. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**:235-254.

Leyh-Bouille M, Bonaly R, Ghuysen JM, Tinelli R, Tipper D. 1970. LL-diaminopimelic acid containing peptidoglycans in walls of *Streptomyces* sp. And *Clostridium perfringens* (type A). *Biochemistry* **9**:2944-2952.

Li L, Liu X, Jiang W, Lu Y. 2019. Recent advances in synthetic biology approaches to optimize production of bioactive natural products in Actinobacteria. *Front Microbiol* **10**:2467-2467.

Liras P. 1999. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. Cephamycins produced by actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**:109-124.

Liu J, Reid D. 1992. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. IV. The role of changes in endogenous free and conjugated indole-3-acetic acid. *Physiol Plant* **86**:285-292.

Locci R, Sharples G. 1984. Morphology. Pages 165–199 in Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST, editors. *The biology of Actinomycetes*. Academic Press, London, United Kingdom.

Mahajan GB, Balachandran L. 2012. Antibacterial agents from actinomycetes – a review. *Front. Biosci.* **4**:240-253.

Malhotra M, Srivastava S. 2008. An ipdC gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**:425-433.

Malzer ES, Sein CE, Chambers JJ, Siegrist MS. 2018. DivIVA concentrates microbial cell envelope assembly for initiation and stabilization of polar growth. *Cytoskeleton (Hoboken)* **75**:498-507.

Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. 2013. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol Res* **168**:311-332.

- Martin JF. 2004. Phosphate control of the biosynthesis antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the *PhoR-PhoP* system: an unfinished story. *J Bacteriol* **186**:5197-5201.
- Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L. 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* **33**:44-65.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**:185-229.
- Misra HS, Rajpurohit YS, Khairnar NP. 2012. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *J Biosci* **37**:313-325.
- Mohammadi O, Lahdenpera ML. 1992. International Symposium on Modern Fungicides and Antifungal Compounds, Thuringia, Germany.
- Mohan R, Vijayakumar R. 2007. Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. *Med Biol* **15**:13-19.
- Mohanraj G, Sekar T. 2013. Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potential to produce antimicrobials. *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res* **2**:115-126.
- Moynihan JA, Morrissey JP, Coppoolse ER, Stiekema WJ, O’Gara F, Boyd EF. 2009. Evolutionary history of the *phl* gene cluster in the plant-associated bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* **75**:2122-2131.
- Mulinos MG. 1955. Cycloserine: an antibiotic paradox. *Antibiot Annu* **3**:131-135.
- Nikaido H. 2009. Multidrug Resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* **78**:119-46.
- Nitiss JL. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **9**:338-350.
- O’Donnell AG. 1988. Recognition of novel actinomycetes. Pages 69-88 in Goodfellow MM, Williams ST, Mordarski M, editors, *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* **190**:4050-4060.
- Ochi K, Tanaka Y, Tojo S. 2014. Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**:403-414.
- Ochi K. 1995. Phylogenetic analysis of mycolic acid-containing wall chemotype IV actinomycetes and allied taxa by partial sequencing of ribosomal protein AT-L30. *Int J Syst Bacteriol* **45**:653-660.
- Okami Y, Hotta K. 1988. Search and discovery of new antibiotics. Pages 33-67 in Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M, editors. *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF, Leadlay PF. 2007. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol* **25**:447-453.
- Omura S, Takahashi Y, Iwai Y, Tanaka H. 1982. *Kitasatosporia*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *J Antibiot* **35**:1013-1019.

O'Neill GA, Radley RA, Chanaway CP. 1992. Variable effects of emergence-promoting rhizobacteria on conifer seed growth under nursery conditions. *Biol. Fertil. Soils* **13**:45.

Ouzounis C, Bork P, Sander C. 1994. The modular structure of *NifU* proteins. *Trends Biochem Sci* **19**:199-200.

Paciorek T, Friml J. 2006. Auxin signaling. *J Cell Sci* **119**:1199-1202.

Park SR, Park JW, Ban YH, Sohng JK, Yoon YJ. 2013. 2 – Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways. *Nat Prod Rep* **30**:11-20.

Paterson J, Jahanshah G, Li Y, Wang Q, Mehnaz S, Gross H. 2017 The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains. *FEMS Microbiology Ecology* (e93) DOI: 10.1093/femsec/fiw249.

Patten CL, Blakney AJC, Coulson TJD. 2013. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **39**:395-415.

Petit JF, Adam A, Wietzerbin-Falszpan J, Lederer E, Ghuysen JM. 1969. Chemical structure of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. I. Isolation and partial characterization of the peptidoglycan. *Biochem Biophys Res Commun* **35**:478-485.

Pickens LB, Tang Y, Chooi YH. 2011. Metabolic engineering for the production of natural products. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **2**:211-236.

Poehlsgaard J, Douthwaite S. 2003. Macrolide antibiotic interaction and resistance on the bacterial ribosome. *Curr Opin Investig Drugs* **4**:140-148.

Pridham TG, Hesseltine CW, Benedict RG. 1958. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Appl Microbiol* **6**:52-79.

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

Rutledge PJ, Challis GL. 2015. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat Rev Microbiol* **13**:509-523.

Ruzicka, FJ, Beinert H. 1978. The soluble “high potential” type iron-sulfur protein from mitochondria is aconitase. *J Biol Chem.* **253**:2514-2517.

Ryu RJ, Patten CL. 2008. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J Bacteriol* **190**:7200-7208.

Saudagar PS, Survase SA, Singhal RS. 2008. Clavulanic acid: a review. *Biotechnol Adv* **26**:335-351.

Sayed AM, Hassan MHA, Alhadrami HA, Hassan HM, Goodfellow M, Rateb ME. 2019. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. *J Appl Microbiol* **128**:630-657.

Shrivastava S, D'Souza FD, Desai PD. 2008. Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora* spp.) for soil applications. *Curr Sci* **94**:1595-1604.

Schleifer KH, Kandler O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**:407-477.

Schütz A, Golbik R, König S, Hübner G, Tittmann K. 2005. Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR study

on wild-type indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrates. *Biochemistry* **44**:6164-6179.

Schütz A, Sandalova T, Ricagno S, Hübner G, König S, Schneider G. 2003. Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem*, **270**:2312-2321.

Singh L, Baruah I, Bora T. 2006. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology* **5**:217-221.

Sivakala, KK, Gutiérrez-García K, Jose PA, Thinesh T, Anandham R, Barona-Gomez F, Sivakumar N. 2021. Desert environments facilitate unique evolution of biosynthetic potential in *Streptomyces*. *Molecules* **26**:588.

Sivasithamparam FJ, Rincon J, Martín JF. 2003. Characterization of the iron regulated *desA* promoter of *Streptomyces pilosus* as a system for controlled gene expression in actinomycetes. *Microb Cell Factories* **2**:1-10.

Spaepen S, Versées W, Gocke D, Pohl M, Steyaert J, Vanderleyden J. 2007. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* **189**:7626-7633.

Suslow TV, Kloepper JW, Schroth MN. 1979. Beneficial bacteria enhance plant growth. *Calif Agr* **33**:15-7.

Suzuki K, Goodfellow M, O'Donnell AG. 1993. Handbook of new bacterial systematics. Academic Press, London, United Kingdom.

Tahvonen R. 1982. Preliminary experiments into the use of *Streptomyces* spp. isolated from peat in the biological control of soil and seedborne disease in peat culture. *J. Agric. Sci. Fini* **54**:357-369.

Tahvonen R. 1982. The suppressiveness of Finnish light coloured *Sphagnumpeat*. *J Agric Sci Fini* **54**:345-356.

Takesue Y, Nakajima K, Ichki K. 2010. Impact of a hospital-wide programme of heterogeneous antibiotic use on the development of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *J Hosp Infect.* **75**:28-32.

Tiwari K, Gupta RK. 2011. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit Rev Biotechnol* **32**:108-132.

Udou T, Ogawa M, Mizuguchi Y. 1983. An improved metody for the preparation of mycobacterial spheroplasts and the mechanism involved in the reversion to bacillary from: electron microscopic and physiological study. *Can J Microbiol* **29**:60-68.

Udwary DW, Zeigler L, Asolkar RN, Singan V, Lapidus A, Fenical W, Jensen PR, Moore BS. 2007. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proc Natl Acad SciUSA* **104**:10376-10381.

Vakulenko SB, Mobashery S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* **16**:430-450.

Van Bambeke F. 2006. Glycopeptides and glycodepsipeptides in clinical development: a comparative review of their antibacterial spectrum, pharmacokinetics and clinical efficacy. *Curr Opin Investig Drugs* **7**:740-749.

Van der Meij A, Worsley, SF, Hutchings, MI, van Wezel GP. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* **41**:392-416.

- Van Dissel D, Claessen D, van Wezel GP. 2014. Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Adv Appl Microbiol* **89**:1-45.
- Van Veen JA, van Overbeek L, van Elsas JD. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil, *Microbiol. Mol Biol Rev* **61**:121-135.
- Verma V, Quazi GN, Parshad R, Chopra CL. 1989. A fast spheroplast formation procedure in some 2,5-diketo-D-gluconate and 2-keto-L-glulonate-producing bacteria. *Biotechniques* **7**:449-452.
- Vining LC, Stuttard C. 1994. Chloramphenicol, genetics and biochemistry of antibiotic production. Butterworth-Heinemann, Boston, MA.
- von Wintzingerode F, Gobel UB, Siddiqui RA, 2001. *Salana multivorans* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from an anaerobic bioreactor and capable of selenate reduction. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1653-1661.
- Waksman SA, Woodruff HB. 1940. Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomycetes. *Proc Soc Exp Biol Med* **45**:609.
- Walker V, Bruto M, Bellvert F, Bally R, Muller D, Prigent-Combaret C, Moënne-Loccoz Y, Comte G. 2013. Unexpected phytostimulatory behavior for *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* model strains. *Mol Plant-Microbe Interact* **26**:495-502.
- Wang J, Soisson SM, Young K. 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nat* **441**:358-61.
- Wang Y, Zhang ZS, Ruan J, Wang YM, Ali S. 1999. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**:178-187.
- Wietzerbin J, Das BC, Petit JF, Lederer E, Leyh-Bouille M, Ghuysen JM. 1974. Occurrence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of mycobacteria. *Biochemistry* **13**:3471-3476.
- Willemsse J, Borst J, Waal E, Bisseling T, Wezel G. 2011. Positive control of cell division: *FtsZ* is recruited by *SsgB* during sporulation of *Streptomyces*. *Genes & Dev.* **25**:89-99.
- Wiley JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. 2010. Prescott's microbiology. McGraw-Hill, New York.
- Wiley JM, van der Donk WA. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* **61**:477-501.
- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and *Henrici* 1943. Bergey's manual of systematic bacteriology **4**:2452-2492.
- Williams ST, Vickers JC. 1988. Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. *Biology of actinomycetes*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
- Wright GD. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol* **13**:589-94.
- Yabe T, Morimoto K, Kikuchi S, Nishio K, Terashima I, Nakai M. 2004. The Arabidopsis chloroplast *NifU*-like protein *CnfU*, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for the biogenesis of ferredoxin and photosystem I. *Plant Cell* **16**:993-1007.

- Yang F, Cao Y. 2012. Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms—review. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**:487-495.
- Yang Z, He J, Wei X, Ju J, Ma J. 2019. Exploration and genome mining of natural products from marine *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biot* **104**:67-76.
- Yokota A, Tamura T. 1994. Transfer of *Nocardioides fastidiosa* Collins and Stackebrandt 1989 to the genus *Aeromicrobium* as *Aeromicrobium fastidiosum* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **44**:608-611.
- Yoon V, Nodwell JR. 2014. Activating secondary metabolism with stress and chemicals. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**:415-424.
- Young M, Kempe L. 1985. Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell Growth and lincomycin production by *Streptomyces irncoensis* in chemically defined media. *Biotechnology and Bioengineering* **55**:327-333.
- Zheng L, Cash VL, Flint DH, Dean DR. 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **273**:13264-13272.
- Zhi XY, Li WJ, Stackebrandt E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:589-608.
- Zhu H, Sandiford SK, van Wezel GP. 2014. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**:371-386.