

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Antimikrobiální aktivita sladkovodní mechovky
*Pectinatella magnifica***

Bakalářská práce

Autor práce: Lenka Petrášová

Vedoucí práce: Prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Antimikrobiální aktivita sladkovodní mechovky *Pectinatella magnifica*" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 2.4.2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za odborné a podnětné rady při zpracování bakalářské práce, za pomoc a vedení při laboratorních pokusech a především za čas, který mi věnovala při osobních konzultacích.

Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům, za podporu a shovívavost při psaní této práce.

Antimikrobiální aktivita sladkovodní mechovky

Pectinatella magnifica

Souhrn

Tato práce se zabývá teoretickým popisem mechovců všeobecně, dále popisem sladkovodní mechovky *Pectinatella magnifica* a popisem mořských mechovců produkujících antibakteriální a biologicky aktivní látky. Mezi nejvýznamnější bioaktivní látky jsou řazeny především bryostatiny, které jsou produkovány symbiotickou bakterií mechovky *Bugula neritina*. Bryostatiny jsou významné pro své protirakovinné účinky a jako aktivátory protein kinázy C. Hypotézou pro tuto práci bylo, že *Pectinatella magnifica* nebo její symbiotické bakterie jsou schopny produkovat antimikrobiálně působící látky. Cílem tedy bylo stanovit počty a izolovat bakterie z mechovky *Pectinatella magnifica* a testování antimikrobiální aktivity vodních výluhů a izolátů z bochnatky.

Během letní sezóny byly dvakrát odebírány vzorky kolonií ze 4 lokalit v Jižních Čechách. Byl proveden mikrobiologický rozbor pro stanovení počtu bakterií, izolace čistých kultur bakterií. Při druhém odběru na konci srpna bylo stanoveno celkově více bakterií než při prvním odběru na začátku července. Vzorky povrchových vrstev vykazovaly vyšší obsah bakterií, které byly hlavně aerobní a fakultativně anaerobní. Počty aerobních bakterií z povrchových vrstev se pohybovaly při prvním odběru od 5,29 log KJT/g do 7,35 log KJT/g a při druhém odběru od 6,67 log KJT/g do 8,33 log KJT/g. Počty fakultativně anaerobních bakterií se pohybovaly při prvním odběru od 6,58 log KJT/g do 7,31 log KJT/g a při druhém odběru od 6,37 log KJT/g do 8,51 log KJT/g. V další části byla testována antimikrobiální aktivita vodních výluhů a izolátů z *Pectinatella magnifica* pomocí agarové difúzní metody. Vodní výluhy a izoláty byly testovány proti kmenům salmonel, *E. coli* a klostridiím. Vodní výluh z mechovky nevykazoval antimikrobiální aktivitu na rozdíl od izolátů z mechovky, které prokázaly antimikrobiální aktivitu proti klostridiím. Bakterie inhibující růst klostridií byly identifikovány jako *Aeromonas veronii* a *Pseudomonas moraviensis*. Vzhledem k tomu, že tyto bakterie neprodukují kyseliny, je možno předpokládat, že vytvářejí sekundární metabolity podobné antibiotikům.

Klíčová slova: Mechovka, *Pectinatella magnifica*, symbiotické bakterie, antimikrobiální aktivita

Testing of antimicrobial activity of freshwater bryozoan *Pectinatella magnifica*

Summary

This work consists from the theoretical description of bryozoan in general, description of freshwater *Pectinatella magnifica* and description of marine bryozoan producing antibacterial and bioactive substances. The most known antimicrobial substances are bryostatins, which are produced by symbiotic bacteria of bryozoan *Bugula neritina*. Bryostatins are important for their anticancer effects and as activators of protein kinase C. Hypothesis for this work was, that *Pectinatella magnifica* or their symbiotic bacteria can produce antimicrobial substances. The objectives were enumeration and isolation of bacteria from bryozoan *Pectinatella magnifica* and testing of antimicrobial activity of *Pectinatella* water extract and isolates from bryozoan.

During the summer season were sampled twice colonies from 4 locations of South Bohemia. Microbiological analyses were performed to determine the number of bacteria and isolation of pure cultures of bacteria. In the second sampling at the end of August was determined generally more bacteria than in the first collection in early July. Samples of the surface layers had a higher content of bacteria, which were mainly aerobic and facultatively anaerobic. Bacterial counts of aerobic bacteria in the first sampling varied between 5,29 log CFU/g and 7,35 log CFU/g in the second sampling varied from 6,67 log CFU/g to 8,33 log CFU/g. Bacterial counts of facultatively anaerobic bacteria in the first sampling varied between 6,58 log CFU/g and 7,31 log CFU/g in the second sampling varied from 6,37 log CFU/g to 8,51 log CFU/g. Antimicrobial activity of water extract and isolates from *Pectinatella magnifica* using by the agar diffusion method was tested. Water extract and isolates were tested against strains of salmonella, *E. coli* and clostridia. Water extract of bryozoans didn't showed antimicrobial activity unlike isolates of bryozoans, which showed antimicrobial activity against clostridia. Bacteria, which inhibit the growth of strains of clostridia, were identified as *Aeromonas veronii* and *Pseudomonas moraviensis*. These bacteria do not produce acids, it can be assumed that are able to produce secondary metabolites similar to antibiotics.

Keywords: Bryozoan, *Pectinatella magnifica*, symbiotic bacteria, antimicrobial activity

OBSAH

Úvod	8
1. Teoretická část	9
1.1. Systémové zařazení <i>Pectinatella magnifica</i>	9
1.2. Charakteristika kmenu Bryozoa	9
1.2.1. Sladkovodní mechovky	14
1.2.1.1. Třída: Phyllacholaemata (mechovky)	14
1.2.2. Mořští mechovci a jejich biologická aktivita	17
1.2.2.1. Třída: Stenolamata	17
1.2.2.2. Třída: Gymnolaemata (keřnatenky)	18
2. Biologicky aktivní a antimikrobiální látky	22
2.1. Biologicky aktivní látky	22
2.2. Antimikrobiální látky	24
2.3. Biologicky aktivní látky produkované mechovci	25
2.3.1. Bryostatiny	25
2.3.2. Alkaloidy	25
2.3.3. Steroly	27
2.3.4. Nitrofenoly	28
3. Hypotéza	29
4. Cíl práce	30
5. Materiál a metody	31
5.1. Mikrobiologický rozbor	31
5.1.1. Příprava ředící řady	31
5.1.2. Agary a podmínky kultivace	31
5.2. Testování Antimikrobiálního působení <i>Pectinatella magnifica</i>	32
5.2.1. Testované kmeny potenciálních patogenů	32
5.2.2. Testování antimikrobiální aktivity výluhů z mechovky	32
5.2.3. Testování antimikrobiální aktivity bakterií izolovaných z mechovek	33
6. Výsledky	34
6.1. Stanovení bakterií v koloniích <i>Pectinatella magnifica</i>	34
6.2. Výsledky antimikrobiálního testování	36
7. Diskuze	37
8. Závěr	41

9. Přílohy	42
10. Seznam literatury	50
10.1 Seznam obrázků.....	55

Úvod

Kmen Bryozoa neboli mechovci je rozšířený takřka po celém světě. Vyskytuje se jak v mořích, tak i ve sladkých vodách, kde vytváří rozsáhlé kolonie. Mořské i sladkovodní druhy mechovek žijí zpravidla přisedlým způsobem života na pevném podkladu například na kamenech, větvích či lodních trupech.

Kmen Bryozoa je znám především svými mořskými druhy, pro které je typická symbióza s bakteriemi, které produkují ve většině případů antibakteriální látky působící proti potenciálně patogenním bakteriím nebo například látky s protirakovinným působením. Látky produkované symbiotickými bakteriemi využívají mechovky ke své ochraně před predátory a to hlavně v larválním stádiu.

Mezi mechovci se vyskytují i invazivní druhy, které často překonávají velké vzdálenosti například na trupech lodí a lodní přepravou se dostávají do doposud neosídlených krajů. Příkladem může být už i naše sladkovodní mechovka *Pectinatella magnifica*, která je původem ze Severní Ameriky. Tvoří rozsáhlé kolonie v rybnících a mírně tekoucích vodách převážně v Jižních Čechách. Kolonie jsou tvořeny jednotlivými zooidy, kteří se nacházejí na povrchu kolonií a produkují gelovou hmotu, která tvoří vnitřek kolonie. Mechovka k nám byla pravděpodobně zavlečena již v 19. století a její výskyt se od té doby masivně rozrostl, a proto se stává oblíbeným tématem zkoumání a testování, jelikož její úloha v ekosystému nebyla doposud detailně popsána.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. SYSTÉMOVÉ ZAŘAZENÍ PECTINATELLA MAGNIFICA

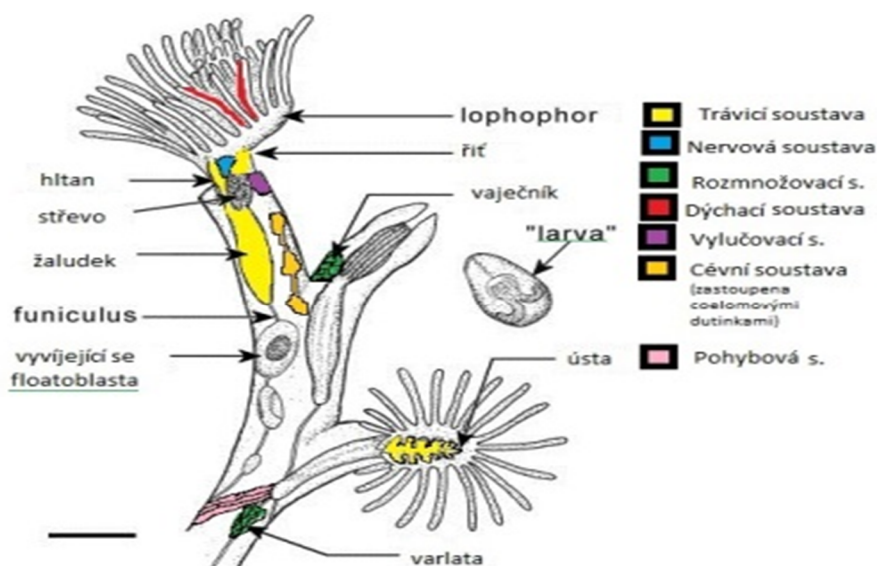
Druh bochnatka americká neboli *Pectinatella magnifica* se řadí do říše Animalia (živočichové), kmenu Bryozoa (mechovci), třídy Phylactoleamata (mechovky) a řádu Plumatellida (Mañas, 2004).

1.2. CHARAKTERISTIKA KMENU BRYOZOA

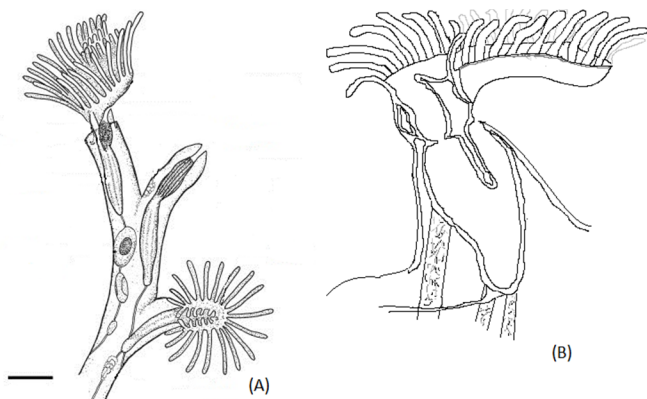
Kmen: Bryozoa

Jedná se o prvoústé živočichy žijící v koloniích, které se odborně nazývají zoaria (Allman, 1856). Kolonie bývají až několik decimetrů velké, měkké, rosolovité ale i inkrustované, barevně se odlišující od žluté až po tmavě hnědou (Lellák, 1982). Jsou tvořeny jednotlivými jedinci, kteří se nazývají zooidi nebo bryozooidi (Sedlák, 2002). Je rozlišováno několik typů kolonií, pro sladkovodní druhy mechovek je charakteristická želatinová struktura obalená zooidy ve tvaru fotbalových míčů nebo tubulární větvená stavba kolonie. Mořské druhy jsou charakteristické vzpřímenou a inkrustovanou schránkou, která ukrývá kolonie zooidů (Massard et al., 2008). Tělo zooida obsahuje orgánové soustavy, viz obrázek 1. Jeho tvar může být vakovitý nebo válcovitý viz obrázek 2 (Špinar, 1965).

Obrázek 1: Orgánové soustavy a stavba zooida řádu *Plumatellida* (upraveno z: <http://www.wright.edu/~tim.wood/bryozoans.html>)

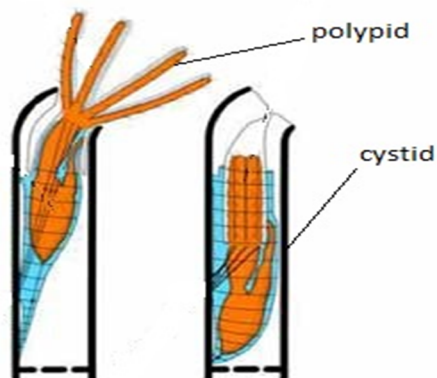


Obrázek 2: Tvar zooida (A) - válcovitý; (B) vakovitý (upraveno z: <http://www.wright.edu/~tim.wood/bryozoans.html>)



Každý zooid je tvořen dvěma částmi, pohyblivým polypidem a nepohyblivým cystidem, který umožňuje přisedlý způsob života. Polypid je zcela zatažitelný do cystidu viz obrázek 3.

Obrázek 3: Ukázka zatažení polypida do cystidu (<http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/141.htm>)



Zooidi jsou menší než 1 mm a jsou tvořeni coelomovou dutinou, která vyplňuje vnitřní prostor zooida a obsahuje všechny orgánové soustavy. Polypid nese tzv. lophophor, který je vybaven řadou obrvených a dutých tykadélek, které jsou propojeny mezi-tykadlovou

membránou. Tato membrána, vytváří společně s dvouřadým uzpůsobením krátkých a dlouhých tykadélek žlábek, který slouží k přihánění potravy a má i respirační funkci. Lophophor je cirkulární okolo úst nebo má tvar „U“ (Pechenik, 1996). Uvnitř lophophoru je ústní dutina ve které začíná trávicí soustava ektodermálního původu. Ústní otvor zooida je překryt destičkou zvanou epistom (Sedlák, 2002). Trávicí soustava je tvořena ústním otvorem, žaludkem, střevem a řití. Má tvar písmene „U“, tudíž se řiť vyskytuje v blízkosti ústního otvoru avšak ne přímo v lophophoru. Žaludek je přichycen stopkou (tzv. funiculus) ke stěně cystidu a je tvořen třemi částmi a to česlem (cardium), slepým střevem a vrátníkem (pylorus), (Kafka, 1886). Potrava je do úst přiháněna kmitáním chapadélek lophophoru tak, že je voda vtáhnuta do útrobu zooida, přední řasinky zachytí potravinové částice a následně přilehlá chapadélka vyvrhnou vodu ven z těla zooida. Potrava je tvořena především prvoky, bakteriemi a jemným organickým dendritem (Sedlák, 2002).

Cévní soustava je tvořena coelomovými dutinkami, které mohou být propojeny. Typickým vylučovacím orgánem jsou metanefridie, vyskytují se u mechovky hadovité (*Cristatella mucedo*). U většiny ostatních nejsou vytvořeny. Sladkovodní mechovky ukládají zplodiny do fagocytů, které zaplňují koncovou část trávicí trubice a vytváří tzv. hnědé těleso. Takto utvoření zooidu po naplnění hnědého tělesa buď hynou, nebo odvrhují hnědé těleso a tato část je regenerována. Nervová soustava je tvořena nadjícnovou uzlinou a smyslovými buňkami umístěnými v pokožce. Smyslové buňky reagují na podráždění rychlým zatažením do cystidu (Sedlák, 2002). Nadjícnová uzlina neboli ganglion je umístěn v dutině lophophoru. Nervy inervují trávicí a pohybovou soustavu (Kafka, 1886).

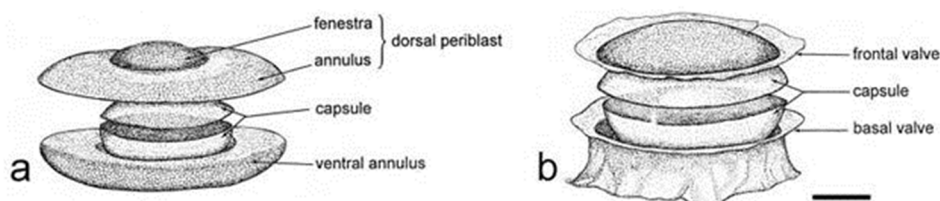
Kolonie neboli zoaria mechovek mohou být monomorfní, ty jsou tvořeny stejnými, nediferencovanými jedinci neboli autozoidy. Druhý typ kolonie se nazývá polymorfní, jedinci polymorfní kolonie bývají morfologicky i funkčně odlišní. Mezi mechovky s monoforními koloniemi patří *Plumatella repens* (mechovka plazivá), *Plumatella fungosa* (mechovka houbovitá), *Cristatella mucedo* (mechovka hadovitá), *Pectinatella magnifica* (mechovka americká) a *Fredericella sultana* (mechovka útlá), jedná se o sladkovodní mechovky. Mezi mechovky s polymorfními koloniemi patří *Cyclostomata* (mechovky kruhoústé), *Trepostomatida* (mechovky měnoústé), *Cryptostomata* (mechovky krytoústé), *Ctenostomata* (mechovky hřebínkovité) a *Cheilostomata* (mechovky okružnaté). V polymorfních koloniích mechovek se vyskytuje několik typů zooidů. Například ovicely jsou samičí váčkovití zooidi, ve kterých se vytváří a vyvíjejí vajíčka, avikulárie slouží k obraně před drobnými predátory, jsou

vybavení zobákem, který je podobný papouščímu a vibrakulárie, které mají velmi dlouhou řasinku sloužící k čištění povrchu kolonie.

Mechovky se mohou rozmnožovat pohlavně nebo nepohlavně. Nepohlavní rozmnožování neboli pučení může být vnitřní nebo vnější. Vnitřní pučení je zajišťováno procesem gemulace, kdy se na začátku podzimu vytváří statoblasty. Kolonie se rozpadají a statoblasty přečkávají zimu. Statoblasty jsou oválná nebo diskovitá tělíska, obsahující nediferenciované mesodermální buňky a jsou obalena chitinózním obalem. Statoblasty jsou dvojího typu, se vzdušnými komůrkami se nazývají floatoblasty (plovoucí) a pak lepivé (sesoblasty) viz obrázek 5, které jsou připevněny k podkladu mateřské kolonie. Statoblasty jsou velice odolné, jsou rezistentní proti vyschnutí, proti mrazu a proti nepříznivým podmínkám. Při vhodných podmínkách pro vývoj kolonie se statoblasty přichytí na povrchu kamenů, kmenů nebo i lodí a začínají se vyvíjet zooidi.

Vnější pučení je charakteristické tím, že nový jedinec vzniká nepohlavně z těla původního jedince. Kdekoliv na těle mateřského jedince vyrostle pupen, který se zvětšuje a vyvíjí v jedince, u mechovců se jedinci neoddělují od mateřského, ale zůstávají propojené, tím vznikají rozsáhlé kolonie (Pechenik, 1996).

Obrázek 4: Statoblasty (a) floatoblast, (b) sesoblast
(<http://www.wright.edu/~tim.wood/bryozoans.html>)



Pohlavním rozmnožováním vzniká larva, ze které se poté vyvine nová kolonie. Jelikož jedinci mechovek utváří samčí i samičí pohlavní buňky mluvíme o nich jako o hermafroditech. Varlata nalezneme na provazci zvaném funikulus, který také drží žaludek. Funikulus slouží k upevnění vysunovatelného polypida k cystidu. Ovaria neboli vaječník nalezneme ve stěně zooida. Pokud pohlavní buňky dozrávají současně, dochází k autogamii. Spermie jsou uvolněny do coelomové dutiny, kde dochází k oplodnění vajíčka. Následně se vajíčko vyvíjí až v obrvenou larvu, která je tvořena dvěma jedinci a řasinkovým pláštěm. Larva opouští tělo zooida tzv. termálním pórem a poté se ve vodě vznáší od několika minut po 24 hodin (Thorp et al., 2009). Po přisednutí larvy k povrchu jsou jedinci ihned schopni

reprodukce. Většinou ale dozrávají spermie dříve a opouštějí tělo pomocí speciálních otvorů nebo prasknutými coelomovými váčky (Sedlák, 2002). Spermie se dostanou do vodního prostředí, kde jsou nasáty ostatními zooidy, jako potrava a dostanou se do coelomové dutiny, kde dochází k oplození vajíček a následnému vývoji larvy (Pechenik, 1996).

1.2.1. SLADKOVODNÍ MECHOVKY

1.2.1.1. TŘÍDA: PHYLLACHOLAEMATA (MECHOVKY)

Do skupiny sladkovodních mechovek patří především druhy s monomorfními koloniemi. Lophophor je podkovitého tvaru a epistom překrývající ústní otvor je dobře vyvinutý. Tělní stěna je velmi dobře vyvinutá a obsahuje svalovinu. Mezi nejvýznamnější zástupce patří například *Plumatella repens* (mechovka plazivá), která dorůstá několika centimetrů, tvoří větvené a rychle pučící kolonie. *Plumatella repens* škodí tvorbou nárostů ve vodním potrubí a snižuje průtok vody a zhoršuje organoleptické vlastnosti vody, jelikož v jejích koloniích žijí často další organismy (Ambrožová J., 2003). Dalšími zástupci jsou *Plumatella fungosa* (mechovka houbovitá), *Cristatella mucedo* (mechovka hadovitá), která má až 1 cm velké zooidy a tvoří velké plazící se kolonie. Statoblasty obsahují vzdušné komůrky, jsou diskovitého tvaru a vybaveny háčky. Dalším zástupcem je *Fredericella sultana* (mechovka útlá) tvoří drobné a jemné kolonie (Sedlák, 2002).

Pectinatella magnifica je sladkovodní mechovka, která byla zavlečena ze Severní Ameriky do Evropy zhruba před sto lety. Je rozšířená v Německu, České republice a Rumunsku (Lacourt, 1968). *Pectinatella magnifica* se vyskytuje převážně v Třeboňských rybnících, avšak není výjimkou její výskyt ve Vltavě nebo Labi (Balounová et al., 2011). Kolonie mají tvar žárovky nebo větvena (Lacourt, 1968), viz obrázek 5.

Obrázek 5: Kolonie *Pectinatella magnifica*

(http://www.bryozoans.nl/soorten/en/pectinatella_magnifica.html)



Kolonie bochnatky americké jsou na povrchu pokryté zooidy, kteří mohou být inkrustování, a uvnitř se nalézá rosolovitá hmota, často bývá tvar přirovnáván ke tvaru fotbalového míče (Šetlíková et al., 2005). Kolonie obývají čisté vody a vyžadují teplotu

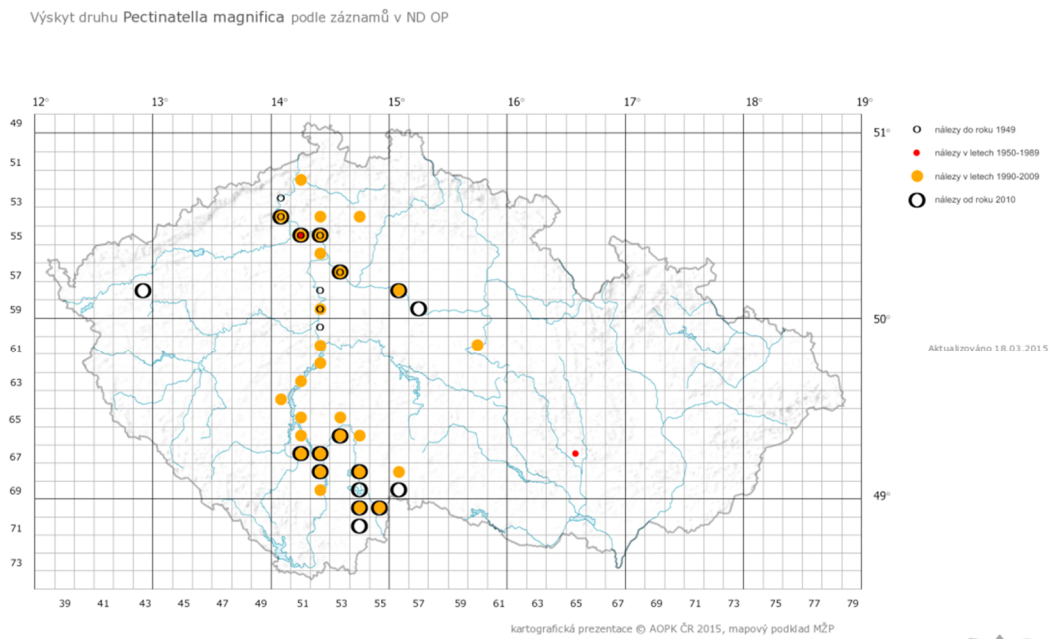
nejméně 20 °C, proto se v České republice vyskytují od poloviny června až do září, poté vytváří statoblasty, které přečkávají zimu. Žijí přisedlé u břehů rybníků přichycené na větvích či kamenech. Průměrná velikost kolonie je 20 cm a průměrná váha 2kg (Balounová et al. , 2011). Každá kolonie má růžicovitý tvar s radiální strukturou. Polypidi *Pectinatella magnifica* jsou velcí 1 mm a mají 60 až 84 chapadélek. Statoblasty jsou kulaté až mírně oválné. Statoblasty nesou 10-22 trnů, většinou 14. Trny vycházejí z vnějšího okraje, jsou ploché, lamelární pouze v hřbetní části zakončené háčkem. Annulus je šedý a kapsule je hnědá (Lacourt, 1968). Viz obrázek 6.

Obrázek 6: Statoblasty *Pectinatella magnifica* (http://www2u.biglobe.ne.jp/~gen-yu/pectinatella_e.html)



Statoblasty jsou velice odolné proti nepříznivým podmínkám a umožňují šíření mechovky. Vznášejí se na povrchu vodních ploch a mohou být pozřeny živočichy, například ptáky, jelikož jsou však odolné i proti trávení, rozšiřují se pomocí ptačího trusu i jiných oblastí. Od roku 2003, kdy byla poprvé objevena v Třeboňském rybníku Cep, se bochnatka rozšířila hlavně do oblasti Vltavy, Labe ale i Jižní Moravy (Macháč, 2012). Na následujícím obrázku 7 je zaznamenáno aktuální rozšíření mechovky *Pectinatella magnifica*.

Obrázek 7: Rozšíření *Pectinatella magnifica* v ČR
(http://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=67075)



1.2.2. MOŘŠTÍ MECHOVCI A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA

1.2.2.1. TŘÍDA: STENOLAMATA

Jedná se o mořské druhy s nevýrazně polymorfními koloniemi. Lophophor je kruhovitý bez epistomu. Není vytvořena svalovina. Celá kolonie je inkrustována uhličitanem vápenatým a netvoří statoblasty (Sedlák, 2002).

Řád: *Cyclostomata* (mechovky kruhoústé)

Mají inkrustované kolonie, jedinci jsou propojeni mezi sebou póry ve stěnách. Žijí připevněné k povrchu kamenů nebo mušlí (Taylor et al., 2000). Mají plazivé kolonie, zooecia jsou trubkovitého tvaru a jsou velmi tenké. Stěna kruhoústých je pórovitá uvnitř živočicha se nenalézají přepážky. Mezi zástupce patří rody *Crisevia*, *Cardioecia* a *Diaperoecia californica*, ze kterých byly izolovány biologicky aktivní látky phidolophin, desmethyl philodophin a 3-nitro-4-hydroxybenzylalkohol známé pro svou antimikrobiální aktivitu. Dalšími zástupci jsou *Heteropora alaskensis* a *Phidolopora pacifica*, ze kterých byl taktéž izolován 3-nitro-4-hydroxybenzylalkohol (Sharp et al., 2007).

Řád: *Trepostomata* (mechovky měnoústé)

Trepostomata vytvářejí masivní kolonie převážně bochníkovitého tvaru, ale mohou být i výrazně větvené (Sedlák, 2002).

Řád: *Cryptostomata* (mechovky krytoústé)

Cryptostomata jsou mechovky, které vyhynuly již na konci Permu. Vytvářely síťovité kolonie, jejichž síťovitá stavba s oky se nazývá fenestrula. Byly především větvenaté, vějířovité nebo keřovitého tvaru, kde byla jednotlivá oka spojena tzv. dessepimenty. Tyto mechovky byly neznámější pro rody *Fenestella*, *Isotrypa*, a *Utropora* (Pechenik, 1996).

1.2.2.2. TRÍDA: GYMNOLAEMATA (KEŘNATENKY)

Tyto mořské druhy mají výrazné polymorfní kolonie. Lophophor je kruhovitý bez epistomu. Není vytvořena svalovina. Cystid je nevýrazně sklerotizovaný a netvoří statoblasty (Sedlák, 2002).

Řád: *Ctenostomata* (mechovky hřebínkovité)

Mají velice jemnou strukturu a dorůstají malých rozměrů. Mezi zástupce patří *Alcyonidium diaphanum*, která produkuje sulfoxoniový ion, který způsobuje alergické reakce s kožními projevy a (2-hydroxyethyl)-methylsulfonium, který způsobuje onemocnění typické pro rybáře tzv. „Dogger bank itch“, jedná se o velice nepříjemné svědivé onemocnění kůže. Mezi další zástupce mechovek okružnatých patří *Zoobotryon verticullatum*, která produkuje sloučeninu 2,5,6-tribromo-N-methylgranin, který inhibuje kondenzaci chromatinu, *Zoobotryon pellicidum*, produkující sloučeninu 2,5,6-tribromo-1-methylgranin, který inhibuje larvální stadium korýše *Balanus amphitrite* a brání jeho dalšímu vývoji v blízkosti mechovky, což je pro mechovky významné z hlediska prostoru pro jejich růst. Dalšími zástupci jsou mechovky *Amathia wilsoni*, která produkuje amathamidy A a E, *Amathia convulata*, produkující amathamid G a *Amathia alternata*, která produkuje alteramidy A-D. Amathamidy všeobecně vynikají antimikrobiální aktivitou proti grampozitivním bakteriím, jako jsou *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*. Amathamidy A a E mají také protirakovinný účinek a antimykotické působení proti houbě *Trichophyton mentagrophytes* (Sharp et al., 2007).

Řád: *Cheilostomata* (mechovky okružnaté)

Kolonie okružnatých mechovek jsou většinou větvené a síťovité, zooecia jsou vzájemně propojeny systémem pórů, ústní otvor překrývá víčko. Některé druhy mechovek mají tzv. kompenzační vak, který slouží k vysunování zooida ze zooecia (Pechenik, 1996).

Podřád: *Malacostega*

Do této skupiny mechovek patří mechovky, které produkují biologicky aktivní látky s významnou protirakovinnou aktivitou. Jedná se například o perfragilin A a B což jsou látky izolované z *Biflustra perfragilis*, mají protirakovinný účinek přičemž perfragilin B má vyšší cytotoxicitu, jelikož ve své struktuře obsahuje navíc trimethylovou skupinu. Struktura těchto látek je podobná antibiotiku mimosamycinu, který je produkován bakterií *Streptomyces*

lavendulae. Další izolované látky jsou například methanol, dimethylsulfid, dichlormethan, chlormethan nebo mathanthiol (Sharp et al., 2007).

Podřád: *Flustrina*

Nejvýznamnějším zástupcem je mechovka *Flustra foliacea*. Jedná se o mechovku s kosmopolitním rozšířením, u které byly nalezeny a izolovány biologicky aktivní látky, které působí proti mikroorganismům, jako jsou *Bacillus subtilis* nebo *Escherichia coli*. Obsahuje však i látky, jejichž význam není doposud znám, mezi tyto látky patří cis- trans- citral, citronelol, nerol a geraniol. Nejvýznamnější biologicky aktivní látky z *Flustra foliacea* jsou flustraminy. Bylo popsáno několik typů těchto látek, avšak nejzajímavější jsou flustramin E a D. Flustramin E vyniká antimikrobiální aktivitou proti *B. subtilis*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Botrytis cinera*, a flustramin D který má antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* a *Pseudomonas aeruginosa*. Působení flustraminů je podle všeho ovlivňováno jejich geografickým umístěním. V Severním moři se vyskytují mechovky produkující hlavně flustramin E a v oblasti Kanadského pobřeží se vyskytují mechovky produkující hlavně flustramin D. Dále se ve *Flustra foliacea* vyskytují bromidové alkaloidy a diperten působící proti *Roseobacter sp.*, *Psychroserpens sp.*, *Sulfitobacter sp.*, *Paenibacillus pabulli*, *E. coli*, *B. magisterium* (Heindl et al., 2010). Dalšími zástupci jsou *Chartella papyracea*, která produkuje charteliny A-C, chartelamidy A a B, methoxydechlochartellin A, charteliny se vyznačují protirakovinnou aktivitou; *Hincksinoflustra deuticulata*, která produkuje hinckdentin A a *Securiflustra securifrons* produkující securiny A a B, securamidy A-G (Sharp et al., 2007).

Čeleď: *Bugulidae*

Bugula neritina (keřnatenka stromečkovitá) je mořský koloniální živočich dosahující velikosti okolo 15 centimetrů. Nabývá barev od světle fialové po tmavě červenou. Její kolonie jsou velice větvené tvořící trsy, viz obrázek 8. *Bugula neritina* patří z hlediska produkce biologicky aktivních látek mezi nejvýznamnější mechovky, jelikož z jejích kolonií jsou od roku 1968 izolovány látky zvané bryostatiny (Davidson et al., 2001). Bryostatiny jsou komplexy polyketidů a pyranových prstenců patřící mezi tzv. makrolaktony a jsou významné pro své účinky. Slouží jako aktivátory a modifikátory protein kinázy C, jsou významné pro své protirakovinné působení a celkově působí na centrální nervovou soustavu (Trindade-Silva et al., 2010). Mechovka tyto látky neprodukuje sama, produkuje je její symbioticky žijící bakterie *Endobugula sertula*, která se vyskytuje v jejím larválním i dospělém stádiu.

V larválním stádiu se předpokládá, že bryostatiny slouží jako ochrana proti predátorům. Dalším zástupcem této čeledi je *Bugula dentata*, která je známa pro svůj modrý antimikrobiální pigment, který je účinný proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Další látkou vyskytující se v *Bugula dentata* jsou tambjaminy, které mají antimikrobiální aktivitu a také způsobují smrt žábřonožky solné známé jako potrava pro akvariálně chované ryby. Extrakt z *Bugula pacifica*, která také žije v symbióze s *Endobugula sertula*, inhibuje růst *B. subtilis*, *E.coli* a *S.aureus* (Sharp et al., 2007).

Obrázek 8: Kolonie mechovky *Bugula neritina*

(http://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=67075)



Podřád: *Acanthostega*

Do tohoto řádu jsou řazeny mechovky, které produkují biologicky aktivní látky, které jsou antimikrobiálně účinné proti *B. subtilis*, *T. mentagrophytes*, *C. albicans*, *Cladisporum vesinae*, *E. coli* a *herpes simplex typ I*. Dále působí protirakovinně a pomáhají při léčbě leukémie. Mezi zástupce patří *Pterocella vesiculosa*, produkující pterocellin A a B, které mají antimikrobiální aktivitu proti *B. subtilis* a houbě *T. mentagrophytes*. Dalšími zástupci je skupina mechovek, které produkují β -carboly. β -carboly jsou blíže popsány v následující kapitole 2.3.2.2. Mezi tuto skupinu patří *Catenicella cribraria*, *Costaticella hastata*, která produkuje 1-ethyl- β -carboly a pavettin, nakonec *Cribricellina cribraria*. β -carboly a pavettin mají antimikrobiální účinky proti *B. subtilis*, *T. Mentagrophytes*, *C. albicans*,

Cladisporum resinae. Pavettin je specifický svou antivirotickou aktivitou proti viru *herpes simplex typ I* (Sharp et al., 2007).

2. BIOLOGICKY AKTIVNÍ A ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

2.1 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY

Biologicky aktivní látky jsou látky, které jsou součástí živých systémů a přímo se podílejí na jeho stavbě, nebo zásadně ovlivňují činnost organismu (Waisser, 2006). Za tyto látky můžeme považovat všechny sloučeniny od vody po aminokyseliny. Důraz je však kladen na slovo aktivní, což znamená, že látka specificky účinkuje v živém organismu (Dřimalová, 2005). Biologicky aktivní látky můžeme rozdělit podle způsobu interakce v živém systému, některé zasahují do biologických pochodů již ve velmi malém množství. Nejčastěji se můžeme setkat s interakcemi mezi enzymy a receptory. Tyto reakce jsou charakteristické pro nervovou soustavu. Dochází k inhibici nebo indukci mezi biologicky aktivní látkou a enzymem nebo receptorem. Biologicky aktivní látky mohou být rozděleny podle interakce, viz tabulka č. 1 (Waisser, 2006).

Tabulka č. 1: Rozdělení biologicky aktivních látek podle interakce na živý organismus

Popis interakce	působení	Účinek
Interakce s nervovou soustavou	Interakce s enzymy	Dochází k inhibici nebo indukci
	Interakce s receptory	
Interakce s membránami	Chemický charakter	Biologicky aktivní látky jsou schopny interakce s nosičem zabudovaným v membráně, který přenos přes membránu usnadní.
	Fyzikální charakter (např. propustnost membrány)	
Interakce s živočišnou strukturou	Biologicky aktivní látky jsou schopny denaturace bílkovin, alkylace bílkovin i nukleových kyselin.	Dochází ke změně makromolekul – zabudování látky do DNA, změna bílkovin v procesu degradace
Interakce s makromolekulami	Látky se mohou zabudovat do struktury makromolekul.	

Další rozdělení biologicky aktivních látek je podle tzv. selektivní toxicity. Selektivní toxicita může být využita s cílem poškodit určitý organismus bez zásahu ostatních. Rozdělení biologicky aktivních látek podle selektivní toxicity viz tabulka č.2 (Waisser, 2006).

Tabulka č. 2: Rozdělení biologicky aktivních látek podle selektivní toxicity

Selektivní toxicita	popis	příklad
Biochemická	Využívají biochemických pochodů organismů, kterými se organismy liší.	Rostliny syntetizují řadu AMK, které jsou organismy schopné přijímat pouze s potravou (aromatické kyseliny, rozvětvené AMK).
Transportní	Využívá rozdíly v transportu látek.	Tetracyklin se dostává do buněk bakterií až ve 300 krát násobném množství než do lidských buněk.
Cytologická	Využívá rozdílů v buněčné stavbě.	Herbicidy inhibující fotosyntézu v chloroplastech. Inhibitory biosyntézy v peptidoglykanu v buněčné stěně bakterií - cykloserin inhibuje racemázu, která přeměňuje L-alanin na D-alanin. D-AMK nemají pro obratlovce velký význam.

2.2. ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Antimikrobiální látky jsou látky, které potlačují růst a množení mikroorganismů. Antimikrobiální látky jsou rozděleny podle působení, tedy podle toho, na které organismy přímo působí. Nejznámějšími antibakteriálními látkami jsou antibiotika. Antibiotika jsou jedny z látek, která inhibičně působí na metabolismus bakterií. Jsou produkována mikroorganismy nebo mohou být vytvořena synteticky. Působí inhibičně proti bakteriím, stejný účinek vykazují například organické kyseliny, různé sekundární metabolity rostlin a bakteriociny (Tanwar et al., 2014).

Další látky s antimikrobiálním účinkem jsou antimykotika, jejichž specifický účinek spočívá v inhibici růstu hub. Antimykotika zabraňují růstu a množení především kvasinkám (Moghaddan et al., 2010). Antivirotika také patří k antimikrobiálním látkám, které znemožňují růst mikroorganismům, a to sice virům. Antivirotika jsou používána na léčbu infekčních onemocnění způsobených virem, například vir HIV, hepatitida a především chřipka. Důležité třídy antivirotik zahrnují i léky, které inhibují funkci proteáz. Dalším typem antimikrobiálních látek jsou antiparazitika, která účinně působí proti střevním parazitům. Jedná se o makroorganismy, jako jsou například háďátka, tasemnice či motolice. Společným znakem antimykotik, antivirotik a antiparazitik je skutečnost, že jejich působením ničí požadované mikroorganismy či makroorganismy v případě antiparazitik, bez vážného zásahu a poškození hostitele.

Všechny doposud zmíněné antimikrobiální látky vykazují farmakologický účinek, avšak existují i antimikrobiální látky, které se nepoužívají k léčení. Antimikrobiální látky se mohou využívat i ke konzervaci potravin například kyselina mléčná, kyselina citronová, kyselina octová či jejich soli. Antimikrobiální účinek vykazují i rostliny ve formě svých esenciálních olejů (Kalemba et al., 2003). Je známo, že esenciální oleje mohou působit i proti *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus aureus* (Smith-Palmer et al., 1998).

2.3. BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY PRODUKOVANÉ MECHOVCI

Mnoho skupin bezobratlých živočichů produkuje specifické biologicky aktivní látky, které slouží jako obrana proti predátorům, parazitům, infekcím anebo jako přenašeče pro komunikaci mezi jednotlivými jedinci. Mnoho biologicky aktivních látek může být využito ve farmacii hlavně pro své příznivě působící účinky na lidský organismus. Mezi nejvýznamnější biologicky aktivní látky produkované mechovci patří bryostatiny (Sinko et al., 2012). Bryostatiny produkuje symbioticky žijící bakterie *Endobugula serula* v čeledi *Bugulidae*, jedná se o symbiózu mezi makro a mikro organismem. Další látky izolované z mechovek jsou alkaloidy, indolové alkaloidy, steroly (steroidy), sacharidy, nitrofenoly a disulfidy (Konig et al., 2006).

2.3.1. BRYOSTATINY

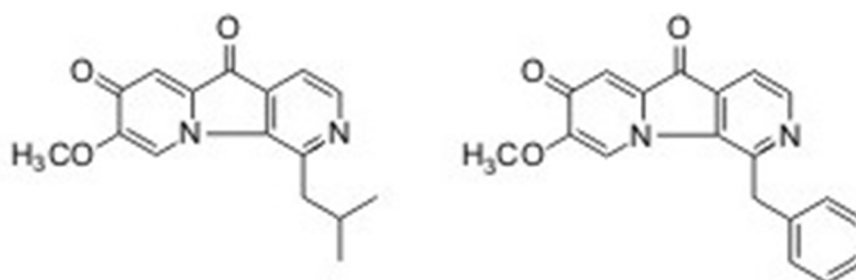
Bryostatiny patří mezi makrolidové laktony a jsou známy pro své protirakovinné účinky a jako modulátory a aktivátory protein kinázy C. Vyznačují se přítomností makrocyclického laktonu, na který jsou navázané sacharidy. V současnosti je známo 20 druhů bryostatinů viz příloha 1. Jejich hlavním účinkem ve farmacii je protirakovinné působení, aktivace protein kinázy C a také podpora paměti. Bryostatin-1 je potencionální lék na leukémii, rakovinu, traumatické mozkové újmy, deprese, Alzheimerovu chorobu a ostatní onemocnění centrální nervové soustavy (Sinko et al., 2012). Při testování léčby bryostatiny byly zjištěny i celkem zanedbatelné vedlejší účinky vzhledem k jejich terapeutickým účinkům. Mezi tyto vedlejší účinky patří především bolesti svalů a kloubů (Kraft et al., 1996). Bryostatin-1 je potencionálním lékem proti viru HIV. Dalším významným účinkem je, že Bryostatin-1 spolupracuje s již používanými léčivy proti viru HIV, jako je například kyselina valorová (Perez et al., 2010).

2.3.2. ALKALOIDY

2.3.2.1. Pterocelliny

Alkaloidy z mechovky *Pterocella vesiculosa*, pterocellin A a pterocellin B, vykazují silnou protirakovinnou aktivitu a antimikrobiální aktivitu. Byl zaznamenán i jejich účinek proti leukémii u myši (Yao et al., 2003). Alkaloidy jsou přírodní dusíkaté organické látky bazického charakteru. Pterocellin A a B jsou znázorněny na obrázku 9.

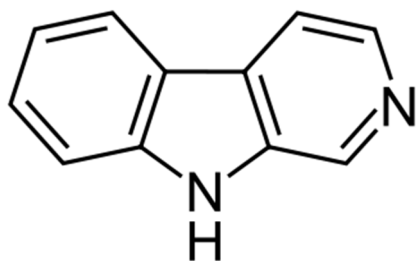
Obrázek 9: Pterocelin A; Pterocelin B (<http://sci.waikato.ac.nz/about-us/people/michele>)



2.3.2.2. β -karboliny

Mezi další biologicky aktivní alkaloidy patří β -karboliny, které existují ve čtyřech různých formách, a to jako kationy, aniony, neutrální iony a jako molekuly které mají separované kladně a negativně nabitě skupiny. Mezi nejvýznamnější sloučeniny patří norharman, harman, harmin, harmalin a harmalan. Všechny tyto látky vykazují příznivé účinky na lidský organismus a to konkrétně na centrální nervovou soustavu. Účinky β -karbolinů mají široké spektrum farmakologických vlastností, jako jsou například sedativa, anebo uvolňování svalů proti křečím. Vynikají také protirakovinnou aktivitou, antimikrobiální a antiparazitickou aktivitou. V prokaryotických i eukaryotických buňkách mají schopnost příznivě působit na replikaci DNA (Cao et al., 2007). Struktura β -karbolinů je znázorněna na obrázku 10.

Obrázek 10: β -karbolin (<http://www.quickiwiki.com/pl/%CE%92-Karbolina>)



2.3.2.3. Amathamidy

Mezi alkaloidy řadíme i látky označené jako amathamidy. Amathamidy patří do skupiny bromidových alkaloidů a vynikají svou antimikrobiální aktivitou. Amathamidy jsou izolovány z *Amathia wilsoni*, z mořské mechovky, která dorůstá přibližně 5 až 30 centimetrů (Sherwood et al., 1998). Amathamidy působí antimikrobiálně proti grampozitivním bakteriím *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, proti gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a *Pseudomona aeruginosa* a také proti kvasince *Candida albicans* (Ramírez et al., 2005).

2.3.2.4. Flustraminy

Další skupinou biologicky aktivních látek jsou flustraminy izolované z *Flustra foliacea*. Jedná se o bromidové alkaloidy s isoprenylovou skupinou, která nahrazuje dvě methylové skupiny (Breitmaier, 2008). Flustramin E vykazuje antimikrobiální aktivitu proti *Bacillus subtilis*, *Rhizotonia solani* a *Botrytis cinera* (Holst et al., 1994). Flustramin E vykazuje antimikrobiální aktivitu i proti *Fusarium oxysporum* a *Saccharomyces cerevisiae* (Sharp et al., 2007). Mezi další flustraminy patří flustramin A, flustramin D, dihydroxyflustramin B a také deformylflustrabromin, který vykazuje antimikrobiální účinky proti *Staphylococcus aureus* (Lysec N., 2002). Flustramin D má antimikrobiální účinky proti *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* a *Pseudomonas aeruginosa* (Sharp et al., 2007).

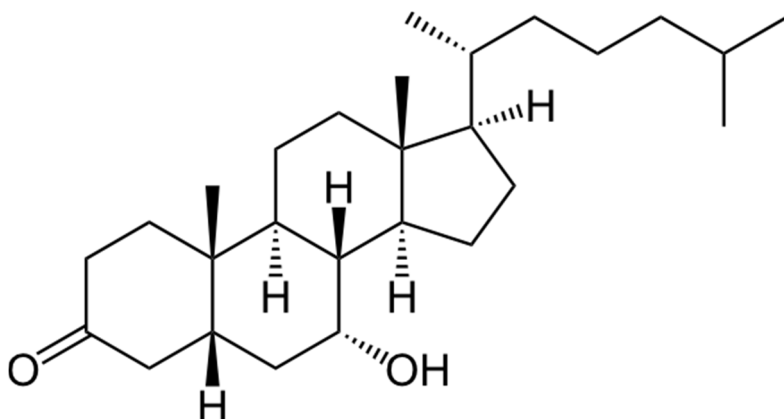
2.3.2.5. Securiny

Securamin A je tricyklický pyroindolový alkaloid, který také vykazuje určité biologicky aktivní účinky. Slouží jako prekurzor pro rozmanité přírodní produkty (Korakas et al., 2004). Securiny se vyznačují svou protirakovinnou aktivitou, při níž způsobují smrt nádorových buněk tzv. apoptózu (Huang et al., 2014).

2.3.3. STEROLY

Steroly jsou přírodní látky odvozené od cholestanu. Patří do skupiny steroidů a jedná se o sekundární alkoholy. Cholestan je znázorněn na obrázku 11.

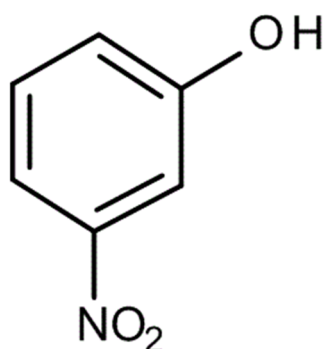
Obrázek 11: cholestan (http://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=67075)



2.3.4. NITROFENOLY

Nitrofenoly jsou látky, které mají hydroxyl a nitroskupinu na benzenovém kruhu. Mezi nitrofenoly patří phidolophin, desmethyl phidolophin a 3-nitro-4-hydroxybenzylalkohol izolované z mořské mechovky *Phidolopora pacifica* a dále například z *Heteropora alaskensis* (Tischler et al., 1986). Phidolophin neboli 7-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-1,3-dimethylxanthine, desmethyl phidolophin a 3-nitro-4-hydroxybenzylalkohol jsou známy pro své antimikrobiální účinky a pro své účinky proti řasám (Hirota et al., 1985). Na obrázku 12 je znázorněna základní stavba nitrofenolu.

Obrázek 12: Nitrofenol (http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/,MDA_CHEM-820895)



3. HYPOTÉZA

Pectinatella magnifica je invazivní druh původem z Ameriky žijící v České republice. Její úloha v ekosystému nebyla doposud popsána. Byla popsána celá řada antimikrobiálně působících látek u příbuzných druhů mořských mechovců. Antimikrobiální látky byly izolovány zejména ze symbioticky žijících bakterií mechovců, proto předpokládáme, že *Pectinatella magnifica* nebo její symbiotické bakterie jsou schopny produkovat antimikrobiálně působící látky.

4. CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo izolovat a určit morfologické charakteristiky bakterií mechovky *Pectinatella magnifica*. Dále bylo cílem testování antimikrobiální aktivity symbiotických bakterií a extraktů z mechovky *Pectinatella magnifica* proti potenciálně patogenním mikroorganismům.

5. MATERIÁL A METODY

Byly odebrány vzorky mechovky *Pectinatella magnifica* ze čtyř lokalit v Jižních Čechách a to sice z rybníků Hejtman, Cep, Veselí a Kanclíř. Mechovky byly odebírány ve dvou etapách. První etapa proběhla na začátku července a druhá ke konci srpna. Povrchová vrstva se zooidy byla odebírána odděleně od vnitřní gelové hmoty. Ve vzorcích bylo zjišťováno množství bakterií pomocí kultivace a byly izolovány čisté bakteriální kultury. Následně proběhla jejich mikroskopická kontrola ke stanovení morfologie. Dále byla zjišťována citlivost potenciálně patogenních bakterií k vodnímu výluhu a k izolátům z *Pectinatella magnifica*.

5.1. MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR

Pro mikrobiologický rozbor byly připraveny ředící řady a bakterie byly stanoveny kultivačně. Pro mikrobiologický rozbor byl použit agar s kvasničným extraktem viz kapitola 5.1.2.

5.1.1. PŘÍPRAVA ŘEDÍCÍ ŘADY

Vzorky bochnatky *Pectinatella magnifica* byly homogenizovány v mixéru a probublány CO₂, poté byly uzavřeny do vzorkovnic. Vypočítané množství homogenizované bochnatky bylo aplikováno do druhého ředění a dále ředěno desítkovým ředěním. Médium pro ředící řady bylo složeno z tryptonu v množství 5 g/l, živného bujónu 2 v množství 5 g/l, kvasničného extraktu v množství 2,5 g/l, tweenu v množství 0,5 ml/l a cysteinu v množství 0,25 g/l. Všechny složky byly naváženy do Erlemayerovy baňky a rozpuštěny v příslušném množství destilované vody. Následovalo upravení pH pomocí NaOH na pH=7. Médium bylo převedeno do penicilinek po 9 ml, poté bylo ředící médium probubláno CO₂ a uzavřené penicilinky byly vysterilovány v autoklávu.

5.1.2. AGARY A PODMÍNKY KULTIVACE

Pro mikrobiologický rozbor byl použit agar s kvasničným extraktem, který se používá ke stanovení celkového počtu kultivovatelných mikroorganismů ve vodě. Agar s kvasničným extraktem v množství 23 g/l byl smíchán s tryptonem který byl používán v množství 5 g/l a glukózou v množství 1 g/l. Navážené složky byly rozpuštěny v Erlemayerově baňce s příslušným množstvím destilované vody a vysterilovány v autoklávu. Před použitím byla média temperována na 48 °C. Do kultivačního média pro anaerobní bakterie bylo přidáno

antibiotikum neomycin 70 mg/l, které působí proti aerobním a fakultativně anaerobním bakteriím. Přídavkem antibiotika bylo docíleno selektivního kultivačního média. Na Petriho misky byly převedeny naředěné vzorky. Byl převeden 0,5 ml vzorku a přelit kultivačním médiem. Pro aerobní bakterie probíhala kultivace za přítomnosti vzduchu. Anaerobní bakterie a fakultativně anaerobní bakterie byly kultivovány v anaerostatu. Všechny vzorky byly kultivovány 72 hodin při 24 °C. Po kultivaci byly spočítány počty kolonií bakterií narostlých na agaru. Poté byly kolonie izolovány do kultivačního bujónu, kultivovány, mikroskopicky zkontrolovány pomocí fázově kontrastní mikroskopie a byla popsána jejich morfologie.

5.2. TESTOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍHO PŮSOBNÍ PECTINATELLA MAGNIFICA

Pro testování antimikrobiálního působení *Pectinatella magnifica* byly použity kmeny bakterií *E. coli*, salmonel a klostridií. Proti uvedeným bakteriím se testoval vodní výluh a bakterie izolované z kolonií *Pectinatella magnifica*.

5.2.1. TESTOVANÉ KMENY POTENCIÁLNÍCH PATOGENŮ

Byla testována antimikrobiální aktivita vodních výluhů z bochnatky a bakterií izolovaných z kolonií *Pectinatella magnifica* proti 3 kmenům *E. coli*, 3 kmenům salmonel a 6 kmenům klostridií. Před samotným testováním byly bakterie kultivovány v masopeptonovém bujónu.

5.2.2. TESTOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY VÝLUHŮ Z MECHOVKY

Pro testování antimikrobiální aktivity výluhů z mechovky *Pectinatella magnifica* byla použita agarová difúzní metoda. Pomocí této metody lze stanovit neznámou koncentraci určité antimikrobiální látky. Antimikrobiální látka difunduje do agaru a inhibuje růst testovaných mikroorganismů, což se projeví inhibiční zónou okolo jamek. Pokud je kmen na látku rezistentní, inhibiční zóna se nevytvoří. Do Petriho misek byl aplikován 1 ml potenciálně patogenních bakterií uvedených v kapitole 5.2.1. Bakterie byly zality 20 ml agaru pomocí sklopné pipety. Pro testování byla použita následující média. Prvním médiem pro kultivaci *E. coli* a salmonel byl masopeptonový agar. Dalším médiem použitým pro kultivaci klostridií byl Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem. Všechny navážené složky médií byly rozpuštěny a sterilovány v autoklávu po 15 min na 121 °C. Krouživými pohyby byl agar promíchán s mikroorganismem. Po utužení agaru byly vytvořeny jamky, do kterých byl napipetován vodní výluh z homogenizované bochnatky v množství 60 µl. Petriho misky byly 24 hodin v lednici, aby došlo k difúzi výluhu z bochnatky do agaru. Poté byly Petriho misky umístěny do termostatu nastaveného na 37 °C na dalších 24-48 hodin, kdy došlo k nárůstu

bakterií. Kultivace vzorků probíhala anaerobně v anaerostatu, v případě klostridií a aerobně v případě salmonel a *E. coli*. Po kultivaci byly Petriho misky kontrolovány na přítomnost inhibičních zón. Pokud byly pozorovány inhibiční zóny, znamenalo to, že testované vzorky měly antimikrobiální účinky proti potenciálně patogenním bakteriím.

5.2.3. TESTOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z MECHOVEK

Při mikrobiologickém rozboru byly získány čisté kultury symbiotických bakterií, jejichž morfologický seznam je uveden v příloze této práce. Bylo vybráno 6 kmenů s rozdílnou morfologií pro testování antimikrobiálních vlastností. Při antimikrobiálním testování bylo postupováno jako v kapitole 5.2.2., ale do jamek byly místo výluhů z mechovek pipetovány supernatanty ze symbiotických bakterií. Supernatanty byly získány odstředěním plně narostlých čistých bakteriálních kultur, které byly před testováním kultivovány v bujónu složeném z tryptonu v množství 5 g/l, glukózy v množství 1 g/l, kvasničného extraktu 3 g/l a sójového peptonu v množství 5 g/l. Po aplikaci supernatantů do jamek byly Petriho misky uloženy do lednice na 24 hod a následně kultivovány v termostatu po dobu 24-48 hodin při 37 °C. Kultivace vzorků probíhala anaerobně v případě klostridií a aerobně v případě salmonel a *E. coli*. Po kultivaci byly Petriho misky kontrolovány na přítomnost inhibičních zón.

6. VÝSLEDKY

6.1. STANOVENÍ BAKTERIÍ V KOLONIÍCH *PECTINATELLA MAGNIFICA*

Výsledky kultivačního stanovení jsou uvedeny v tabulce č. 3. Z tabulky vyplývá, že v povrchových vrstvách kolonií mechovky *Pectinatella magnifica* se vyskytovalo více bakterií než v gelové hmotě kolonií. Z tabulky též vyplývá, že počty bakterií v koloniích *Pectinatella magnifica* byly při druhém odběru vyšší. Při prvním odběru na začátku července byly nejvíce zaznamenány aerobní bakterie v povrchové vrstvě kolonií v rozmezí 5,29-7,35 log KTJ/g a fakultativně anaerobní bakterie v povrchové vrstvě kolonií v rozmezí 6,58-7,31 log KTJ/g. Největší hodnota u aerobních bakterií a fakultativně anaerobních bakterií byla ve vzorcích z rybníku Hejtman. Anaerobní bakterie se při prvním odběru pohybovaly v počtech 3,70-7,09 log KTJ/g, kdy nejvyšší zjištěná hodnota pocházela z rybníku Kanclíř. V gelové hmotě byly také zaznamenány bakterie avšak v menším množství než v povrchové vrstvě. Aerobní bakterie se vyskytovaly v rozmezí 4,56-4,88 log KTJ/g, fakultativně anaerobní v rozmezí 3,42-6,01 log KTJ/g a anaerobní v rozmezí 3,26-5,85 log KTJ/g. Při prvním odběru nebyla kolonie bochnatky v rybníku Cep narostlá, proto nemohlo být stanoveno množství bakterií.

Při druhém odběru na konci srpna převládaly fakultativně anaerobní a aerobní bakterie v povrchových vrstvách a gelových hmotách kolonií z rybníku Cep. Aerobní bakterie se vyskytovaly v rozmezí 6,67-8,33 log KTJ/g a fakultativně anaerobní v rozmezí 6,37-8,51 log KTJ/g. Anaerobní bakterie byly nejvíce zastoupeny v povrchových vrstvách v koloniích z rybníku Veselí a to v rozmezí 3,84-5,36 log KTJ/g. V gelových vrstvách kolonií byly při druhém odběru vzorků nejvíce zaznamenány fakultativně anaerobní bakterie v počtech 3,73-7,93 log KTJ/g. Aerobní bakterie byly ze vzorků nekultivovány v množství 5,63-6,65 log KTJ/g a anaerobní bakterie v rozmezí 3,43-3,87 log KTJ/g z rybníku Veselí.

Tabulka č. 3: Počty bakterií (log KTJ/g) stanovené v koloniích *Pectinatella magnifica*

		1. odběr			2. odběr		
Lokalita	Typ vzorku	Aerobní	Fakult. Anaerobní	Anaerobní	Aerobní	Fakult. Anaerobní	Anaerobní
Cep	Gelová hmota	Nebyly nalezeny kolonie mechovky			6,65	6,50	3,82
	Povrchová vrstva				8,33	8,51	4,82
Hejtman	Gelová hmota	4,79	3,42	3,29	5,78	7,93	3,76
	Povrchová vrstva	7,35	7,31	3,7	8,31	7,90	3,84
Kanclíř	Gelová hmota	4,88	6,01	5,85	5,63	5,66	3,43
	Povrchová vrstva	5,29	7,19	7,09	8,06	7,70	4,47
Veselí	Gelová hmota	4,56	5,38	3,26	5,63	3,73	3,87
	Povrchová vrstva	6,49	6,58	4,15	6,67	6,37	5,36
Průměr ± směrodatná odchylka	Gelová hmota	4,74 ± 0,13	4,94 ± 1,10	4,13 ± 1,21	5,92 ± 0,42	5,96 ± 1,52	3,72 ± 0,17
	Povrchová vrstva	6,38 ± 0,84	7,03 ± 0,32	4,98 ± 1,50	7,84 ± 0,69	7,62 ± 0,78	4,62 ± 0,55

Ze vzorků bochnatky *Pectinatella magnifica* byly izolovány čisté kultury bakterií, u kterých byla následně popsána jejich morfologie. Bakterie byly rozděleny podle podmínek kultivace na aerobní, anaerobní a fakultativně anaerobní. Mezi aerobními bakteriemi převládaly pravidelné tyčinky, jednotlivě nebo v páru, výjimkou nebyla produkce plynu a pohyb. Anaerobní bakterie byly krátké pravidelné tyčinky tvořící řetězky a fakultativně anaerobní bakterie byly převážně pravidelné tyčinky, koky nebo vlasovité tyčinky vytvářející řetězky viz příloha 2.

6.2. VÝSLEDKY ANTIMIKROBIÁLNÍHO TESTOVÁNÍ

V případě testování antimikrobiální aktivity výluhů z mechovky *Pectinatella magnifica* nebyla zaznamenána žádná antimikrobiální aktivita. V případě testování antimikrobiální aktivity bakterií izolovaných z mechovky *Pectinatella magnifica* byla zaznamenána antimikrobiální aktivita proti 2 kmenům klostridií. Byly naměřeny inhibiční zóny o velikosti 8-16 mm. Zbylé kmeny bakterií neprojevily antimikrobiální aktivitu. Kmeny, u nichž byla zaznamenána aktivita proti klostridiím, byly následně identifikovány pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA jako *Aeromonas veronii* a *Pseudomonas moraviensis*.

7. DISKUZE

Do kmene Bryozoa (mechovci) jsou řazeny mořští i sladkovodní živočichové, pro které je častým jevem přítomnost symbiotických bakterií, které produkují antibakteriální, a jinak biologicky aktivní. Antimikrobiální látky vykazující aktivity proti potenciálně patogenním a patogenním bakteriím. Pro mořské mechovce je charakteristický výskyt symbiotických bakterií, které produkují bioaktivní látky působící v larválním i dospělém stádiu proti predátorům. Pro člověka mají některé tyto látky významné účinky, které nacházejí využití ve farmakologii jako potenciální léky civilizačních chorob. Například symbiotická bakterie *Endobugula sertula*, mechovky *Bugula neritina* produkuje látky zvané bryostatiny, u kterých byl objeven protirakovinný účinek (Davidson et al., 1999). Příkladem mořské mechovky produkující antibakteriální látky proti potenciálním patogenům je *Flustra foliacea*, která se hojně vyskytuje v Severním moři, její kolonie produkují především bromové alkaloidy. Antibakteriální účinek bromových alkaloidů je především proti grampozitivní bakterii *Bacillus subtilis* a proti gramnegativním bakteriím *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* (Peters et al., 2003). Jelikož u mořských mechovek se vyskytují symbiotické bakterie s antibakteriálními účinky, předpokládáme, že se symbiotické bakterie produkující specifické látky s antibakteriálním účinkem budou vyskytovat i u sladkovodních mechovek.

Byly proto testovány kolonie mechovky *Pectinatella magnifica*, kdy byl proveden mikrobiologický rozbor, izolace čistých kultur, kultivace čistých kultur a testování jejich antimikrobiální aktivity. Vzorky byly odebrány ze čtyř rybníků v Jižních Čechách. Byla odebrána povrchová vrstva oddělená od vnitřní gelové hmoty. Nejdříve byl proveden mikrobiologický rozbor vzorků mechovky. Mikrobiologický rozbor byl rozdělen na dvě části a to sice na stanovení celkového počtu kolonií bakterií a na izolování čistých bakteriálních kultur, u kterých byla provedena mikroskopická kontrola a poté popsána jejich morfologie.

Počet bakterií stanovených v koloniích *Pectinatella magnifica* jsou uvedené v tabulce č. 3. Z tabulky vyplývá, že v povrchových vrstvách se vyskytuje více bakterií než ve vnitřní gelové hmotě. Množství bakterií je nadále ovlivňováno datem odběru vzorků, kde u druhého odběru byl zaznamenán vyšší obsah bakterií. V prvním odběru převládaly aerobní a fakultativně anaerobní bakterie z rybníku Hejtman. Průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou v gelové vrstvě pro aerobní bakterie při prvním odběru byla $4,74 \pm 0,13$ log KJT/g, $4,94 \pm 1,10$ log KJT/g pro fakultativně anaerobní bakterie a $4,13 \pm 1,21$ log KJT/g pro anaerobní bakterie. V povrchových vrstvách kolonií byly hodnoty výrazně vyšší, u aerobních

bakterií to bylo $6,38 \pm 0,84$ log KJT/g, fakultativních bakterie se vyskytovaly v počtech $7,03 \pm 0,32$ log KJT/g a anaerobních bakterií dosahovaly množství $4,98 \pm 1,50$ log KJT/g. Při druhém odběru převládaly fakultativně anaerobní a aerobní bakterie z rybníku Cep, ve kterém při prvním odběru nebyl zaznamenán nárůst kolonie mechovky *Pectinatella magnifica*. Průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou v gelových vrstvách při druhém odběru byla pro aerobní bakterie $5,92 \pm 0,42$ log KJT/g, pro fakultativní bakterie $5,96 \pm 1,52$ log KJT/g a pro anaerobní bakterie $3,72 \pm 0,17$ log KJT/g. V povrchových vrstvách nabývaly vyšších hodnot stejně jako při prvním odběru. Průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou pro aerobní bakterie byly $7,84 \pm 0,69$ log KJT/g, fakultativně anaerobní bakterie se vyskytovaly v množství $7,62 \pm 0,78$ log KJT/g a anaerobní bakterie v množství $4,62 \pm 0,55$ log KJT/g. Z průměrných hodnot vyplývá, že při druhém odběru byly hodnoty bakterií o poznání vyšší. Může to být způsobeno stářím kolonií, kdy se dá předpokládat, že množství bakterií je přímo úměrné ke stářím kolonií. Jedním z vysvětlení vyšších hodnot bakterií v povrchových vrstvách je přítomnost zooidů na povrchu kolonií, kteří filtrují vodu svým trávicím traktem, a tím přijímají potravu. Při filtraci vody dochází i k filtraci bakterií, které se běžně vyskytují ve sladkých vodách. V trávicím traktu jsou bakterie částečně stráveny (Pechenik, 1996), ale určitá část bakterie v tělech zooidů pravděpodobně zůstává a hromadí se v trávicím traktu. Tato teorie je podpořena vyšším obsahem bakterií ve starších koloniích. Dále je také pravděpodobné, že se v trávicím traktu vyskytují bakterie, které pomáhají zooidům s trávením filtrované potravy. Je známo, že mořští mechovci obsahují symbioticky žijící bakterie (Sharp et al., 2007, Davidson et al., 2001), proto nelze vyloučit, že i sladkovodní mechovka *Pectinatella magnifica* má své symbioticky žijící bakterie. Další možností je skutečnost, že symbiotické bakterie mechovek napomáhají jejich ochraně před predátory v larválním stádiu (Sharp et al., 2007). Vzhledem k tomu, že existuje pouze jedna studie, která je zaměřena na sledování bakterií u *Pectinatella magnifica* (Vlková et al., 2015), dosažené výsledky lze porovnat pouze s touto prací. Autoři zabývající se sledováním bakterií u mořských mechovců (Sharp et al., 2007, Davidson et al., 2001, Trindade-Silva et al., 2010), stanovovali pouze druhové zastoupení nikoliv jejich četnost. Vlková et al. (2015) při testování v roce 2012 zjistili, že počty bakterií jsou taktéž z pravidla vyšší při posledním odběru v srpnu. Stejně jako v této bakalářské práci, i v práci Vlková et al. (2015) byl zaznamenán vyšší počet aerobní a fakultativně anaerobní bakterie. Bakterie, které byly nakultivovány při prvním stanovení by mohly být pozůstatkem z larválního stádia, kdy symbiotické bakterie tvořily ochranu mechovky (Woollacott, 1981). Znamenalo by to však, že se symbiotické bakterie vyskytovaly

již ve statoblastech, tím by mohly být vysvětleny i vyšší hodnoty při posledních odběrech v srpnu, kdy se mechovka pomalu připravuje na svou klidovou fázi ve formě statoblastů.

V další části práce byla testována antimikrobiální citlivost potenciálně patogenních bakterií k vodnímu výluhu a k izolátům z *Pectinatella magnifica*. Vodní výluh a izolované bakterie z *Pectinatella magnifica* byly testovány proti 3 kmenům *E. coli*, 3 kmenům salmonel a 6 kmenům klostridií. Pro antimikrobiální testování byla použita agarová difúzní metoda. Při testování vodních výluhů z mechovky *Pectinatella magnifica* proti potenciálně patogenním bakteriím, nebyla zaznamenána antimikrobiální aktivita. Můžeme tedy tvrdit, že vodní výluhy ze vzorků mechovek nemají žádnou antimikrobiální aktivitu. Antimikrobiální efekt kolonií mechovek nemůžeme zcela vyloučit, ale jestliže jsou aktivní látky přítomny, jsou tak v malém množství, které neovlivňuje růst testovaných bakterií. Při testování antimikrobiální citlivosti supernatantů z izolátů z mechovky proti potenciálně patogenním bakteriím, byla zaznamenána antimikrobiální aktivita proti dvěma kmenům klostridií. Izoláty z mechovky, které projevily antimikrobiální aktivitu, byly následně identifikovány sekvenací 16S RNA jako *Aeromonas veronii* a *Pseudomonas moraviensis*. U obou kmenů vznikly při kultivaci inhibiční zóny v rozmezí 8-16 mm. *Aeromonas veronii* je gramnegativní, tyčinkovitá, fakultativně anaerobní bakterie. *Aeromonas veronii* se běžně vyskytuje ve sladkovodních vodách u různých obratlovců a bezobratlých. *Aeromonas veronii* je přítomna ve vysokých počtech v trávicím traktu pijavic, kde má důležitou úlohu při trávení bílkovin z nasáté krve, jelikož produkuje proteolytické enzymy, které trávení usnadňují. Při trávení krve navíc produkuje antimikrobiálně působící metabolity, které pomáhají udržovat stálé střevní mikrobioty pijavic. Ačkoli *Aeromonas veronii* má významnou úlohu v trávicím traktu pijavic, pro člověka bývá často příčinou infekcí ran (Silver et al., 2007). Druhou identifikovanou bakterií, která projevila antimikrobiální aktivitu, byla *Pseudomonas moraviensis* původně izolovaná z půdy, ale vyskytuje se i v ostatních přírodních stanovištích a hlavně ve vodě (Tvrzová et al., 2006). Vzhledem k tomu, že uvedené dva druhy s antimikrobiální aktivitou neprodukují jako primární metabolity organické kyseliny, které jsou častou příčinou omezování růstu ostatních bakterií, lze předpokládat, že antimikrobiálně by mohly působit jejich sekundární metabolity, například antibiotika. Tato hypotéza však musí být ověřena v dalších studiích. Produkce antibiotik byla popsána již v roce 1945 (Hays et al., 1945) i u jiných druhů rodu *Pseudomonas* (Clarkson et al., 1997). *Pseudomonas fluorescence* produkuje antibiotikum mupirocin (Gao et al., 2014), *Pseudomonas cepacia* produkuje

antibiotika proti rostlinným patogenům (Yoshihisa et al., 1989), *Pseudomonas aurefaciens* produkuje antibiotikum fenazin (Pierson et al., 1995, Carruthers et al., 1994).

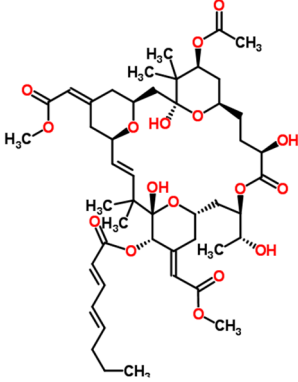
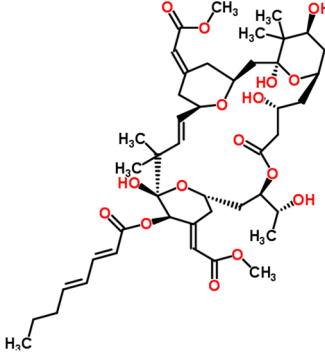
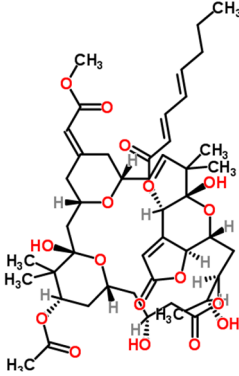
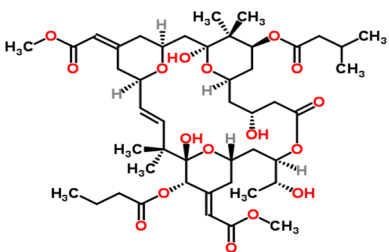
8. ZÁVĚR

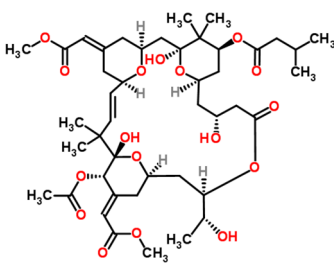
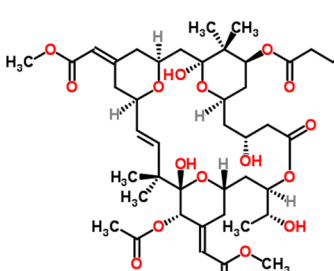
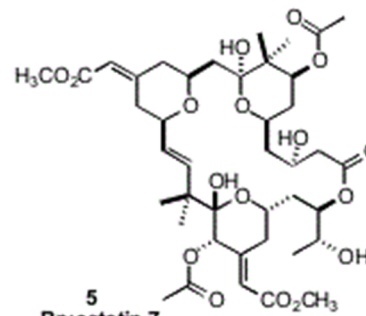
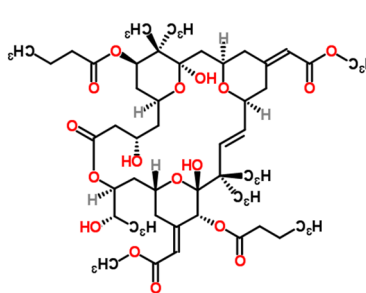
Výsledky práce lze shrnout v následujících bodech:

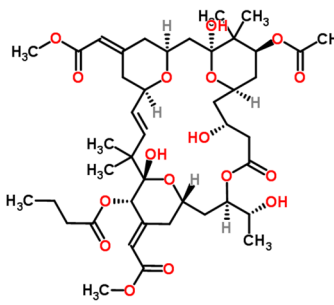
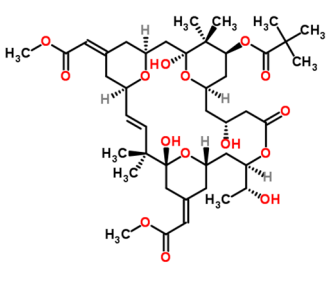
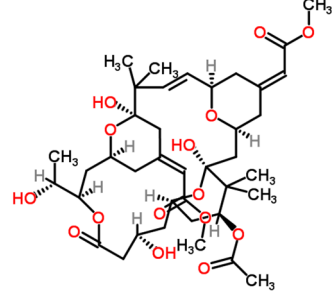
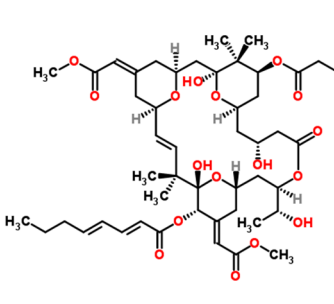
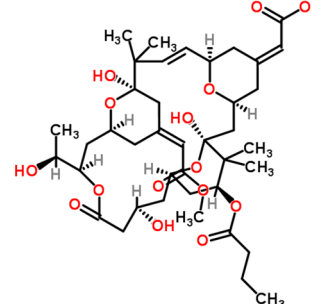
- Povrchové vrstvy kolonií mechovky *Pectinatella magnifica* obsahují vyšší počty bakterií než vnitřní gelové hmoty.
- V koloniích mechovek se vyskytovaly aerobní a fakultativně anaerobní bakterie, ve vyšších počtech než anaerobní bakterie.
- Při antimikrobiálním testování vodních výluhů z mechovky *Pectinatella magnifica* nebyla zaznamenána antimikrobiální aktivita.
- Antimikrobiální aktivitu proti střevním klostridiím vykazovaly dva izoláty z *Pectinatella magnifica*. Tyto bakterie byly identifikovány jako *Aeromonas veronii* a *Pseudomonas moraviensis*.

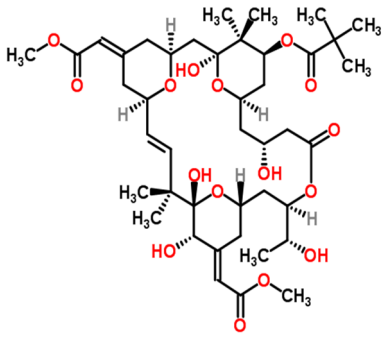
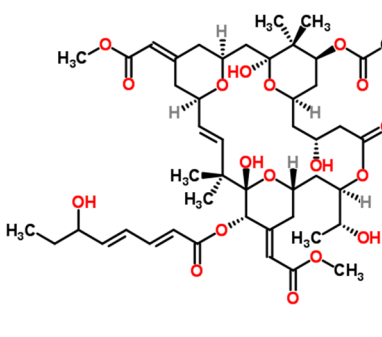
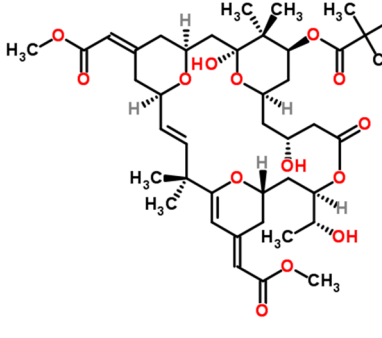
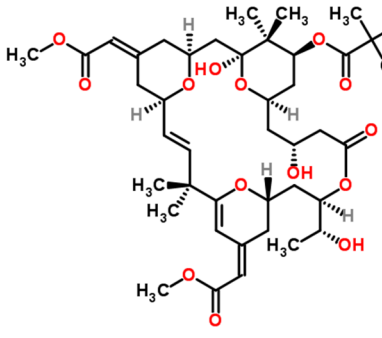
9. PŘÍLOHY

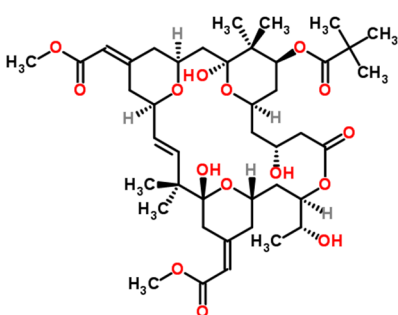
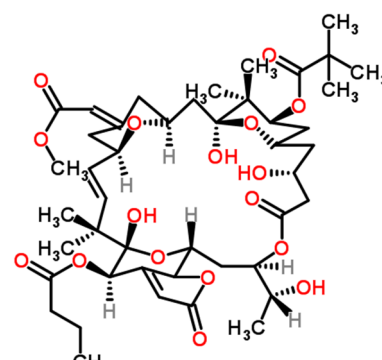
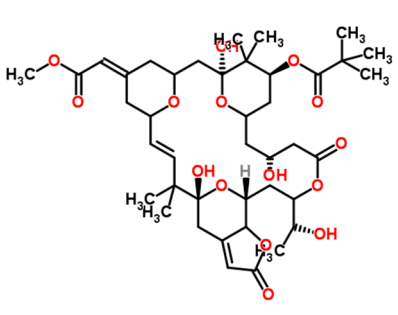
Příloha 1 - Vzorce Bryostatinů

Název	Vzorec
<p>Bryostatin 1; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=27022418</p>	 <p>The structure of Bryostatin 1 is a complex polycyclic molecule. It features a central core with multiple fused rings, including a decalin system. The molecule is heavily substituted with various functional groups: several hydroxyl groups (OH) are attached to the rings, some in axial and some in equatorial positions. There are also several methyl groups (CH₃) and a long, branched side chain containing a terminal methyl group (CH₃) and a terminal hydroxyl group (OH). The overall structure is highly stereoselective, with many chiral centers indicated by wedged and dashed bonds.</p>
<p>Bryostatin 2; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=27022425</p>	 <p>Bryostatin 2 is a complex polycyclic molecule, similar in structure to Bryostatin 1. It features a central core with multiple fused rings, including a decalin system. The molecule is heavily substituted with various functional groups: several hydroxyl groups (OH) are attached to the rings, some in axial and some in equatorial positions. There are also several methyl groups (CH₃) and a long, branched side chain containing a terminal methyl group (CH₃) and a terminal hydroxyl group (OH). The overall structure is highly stereoselective, with many chiral centers indicated by wedged and dashed bonds.</p>
<p>Bryostatin 3; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=8571368</p>	 <p>Bryostatin 3 is a complex polycyclic molecule, similar in structure to Bryostatin 1 and 2. It features a central core with multiple fused rings, including a decalin system. The molecule is heavily substituted with various functional groups: several hydroxyl groups (OH) are attached to the rings, some in axial and some in equatorial positions. There are also several methyl groups (CH₃) and a long, branched side chain containing a terminal methyl group (CH₃) and a terminal hydroxyl group (OH). The overall structure is highly stereoselective, with many chiral centers indicated by wedged and dashed bonds.</p>
<p>Bryostatin 4; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10290330</p>	 <p>Bryostatin 4 is a complex polycyclic molecule, similar in structure to Bryostatin 1, 2, and 3. It features a central core with multiple fused rings, including a decalin system. The molecule is heavily substituted with various functional groups: several hydroxyl groups (OH) are attached to the rings, some in axial and some in equatorial positions. There are also several methyl groups (CH₃) and a long, branched side chain containing a terminal methyl group (CH₃) and a terminal hydroxyl group (OH). The overall structure is highly stereoselective, with many chiral centers indicated by wedged and dashed bonds.</p>

<p>Bryostatin 5; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=23327165</p>	
<p>Bryostatin 6; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10278484</p>	
<p>Bryostatin 7; http://www.organic-chemistry.org/Highlights/2012/02July.shtm</p>	 <p style="text-align: center;">5 Bryostatin 7</p>
<p>Bryostatin 8; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10311641</p>	

<p>Bryostatin 9; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=23327112</p>	 <p>The chemical structure of Bryostatin 9 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Substituents include a methyl ester group, a methyl group, a hydroxyl group, and a propyl ester group. The stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds.</p>
<p>Bryostatin 10; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10237010</p>	 <p>The chemical structure of Bryostatin 10 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Substituents include a methyl ester group, a methyl group, a hydroxyl group, and a propyl ester group. The stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds.</p>
<p>Bryostatin 11; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=8163311</p>	 <p>The chemical structure of Bryostatin 11 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Substituents include a methyl ester group, a methyl group, a hydroxyl group, and a propyl ester group. The stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds.</p>
<p>Bryostatin 12; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10196542</p>	 <p>The chemical structure of Bryostatin 12 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Substituents include a methyl ester group, a methyl group, a hydroxyl group, and a propyl ester group. The stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds.</p>
<p>Bryostatin 13; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=4975964</p>	 <p>The chemical structure of Bryostatin 13 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Substituents include a methyl ester group, a methyl group, a hydroxyl group, and a propyl ester group. The stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds.</p>

Název	Vzorec
<p>Bryostatin 14; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10315179</p>	 <p>The structure of Bryostatin 14 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Key substituents include a methyl ester group at C1, a methyl group at C2, a methyl group at C3, a methyl group at C4, a methyl group at C5, a methyl group at C6, a methyl group at C7, a methyl group at C8, a methyl group at C9, a methyl group at C10, a methyl group at C11, a methyl group at C12, a methyl group at C13, and a methyl group at C14. The structure also contains several hydroxyl groups and a double bond.</p>
<p>Bryostatin 15; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10315181</p>	 <p>The structure of Bryostatin 15 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Key substituents include a methyl ester group at C1, a methyl group at C2, a methyl group at C3, a methyl group at C4, a methyl group at C5, a methyl group at C6, a methyl group at C7, a methyl group at C8, a methyl group at C9, a methyl group at C10, a methyl group at C11, a methyl group at C12, a methyl group at C13, and a methyl group at C14. The structure also contains several hydroxyl groups and a double bond.</p>
<p>Bryostatin 16; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10237008</p>	 <p>The structure of Bryostatin 16 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Key substituents include a methyl ester group at C1, a methyl group at C2, a methyl group at C3, a methyl group at C4, a methyl group at C5, a methyl group at C6, a methyl group at C7, a methyl group at C8, a methyl group at C9, a methyl group at C10, a methyl group at C11, a methyl group at C12, a methyl group at C13, and a methyl group at C14. The structure also contains several hydroxyl groups and a double bond.</p>
<p>Bryostatin 17; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10237009</p>	 <p>The structure of Bryostatin 17 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Key substituents include a methyl ester group at C1, a methyl group at C2, a methyl group at C3, a methyl group at C4, a methyl group at C5, a methyl group at C6, a methyl group at C7, a methyl group at C8, a methyl group at C9, a methyl group at C10, a methyl group at C11, a methyl group at C12, a methyl group at C13, and a methyl group at C14. The structure also contains several hydroxyl groups and a double bond.</p>

<p>Bryostatin 18; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10237010</p>	 <p>The structure of Bryostatin 18 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Key features include a methyl ester group at C1, a methyl group at C2, a methyl group at C3, a methyl group at C4, a methyl group at C5, a methyl group at C6, a methyl group at C7, a methyl group at C8, a methyl group at C9, a methyl group at C10, a methyl group at C11, a methyl group at C12, a methyl group at C13, and a methyl group at C14. The structure also contains several hydroxyl groups and a double bond.</p>
<p>Bryostatin 19; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10481396</p>	 <p>The structure of Bryostatin 19 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Key features include a methyl ester group at C1, a methyl group at C2, a methyl group at C3, a methyl group at C4, a methyl group at C5, a methyl group at C6, a methyl group at C7, a methyl group at C8, a methyl group at C9, a methyl group at C10, a methyl group at C11, a methyl group at C12, a methyl group at C13, and a methyl group at C14. The structure also contains several hydroxyl groups and a double bond.</p>
<p>Bryostatin 20; http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10480254</p>	 <p>The structure of Bryostatin 20 is a complex polyhydroxylated macrolide. It features a 14-membered macrolide ring with multiple stereocenters. Key features include a methyl ester group at C1, a methyl group at C2, a methyl group at C3, a methyl group at C4, a methyl group at C5, a methyl group at C6, a methyl group at C7, a methyl group at C8, a methyl group at C9, a methyl group at C10, a methyl group at C11, a methyl group at C12, a methyl group at C13, and a methyl group at C14. The structure also contains several hydroxyl groups and a double bond.</p>

Příloha 2 - Morfologie bakterií

Aerobní bakterie

Číslo izolátu	morfologie
1_1	Velmi krátké, tlusté pravidelné tyčinky, ve dvojicích, koko-tyčinka
1_2	Koko-tyčinky, podlouhlé, úzké, pravidelné, v páru nebo řetězcích
2_1	Dlouhé, pravidelné tyčinky, v páru, pohyblivé, produkce plynu
2_2	Dlouhé, pravidelné tyčinky, v páru nebo řetězku, produkce plynu
3_1	Krátké pravidelné tyčinky, jednotlivě nebo v páru s výrazným pohybem
3_2	Krátké pravidelné tyčinky, jednotlivě nebo v páru
3_10	Krátké tyčinky, jednotlivě nebo v páru, intenzivní pohyb
4_1	Delší pravidelné tyčinky, v páru nebo řetězku, produkce plynu
4_7	Dlouhé pravidelné tyčinky, řetězky, produkce plynu
5_1	Krátké pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, výrazný pohyb
5_4	Krátké pravidelné tyčinky, jednotlivě nebo v páru, pohyblivé, produkce plynu
7_1	Krátké pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, výrazný pohyb, produkce plynu
7_3	Koky, jednotlivé nebo v páru
7_9	Koko-tyčinky, malé, pohyblivé, jednotlivé nebo v páru
8_1	Krátké pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, pohyblivé
8_3	Koky, jednotlivé nebo v páru
8_4	Krátké, úzké tyčinky s intenzivním pohybem
8_6	Rovné nebo rohlíčkovitě zahnuté tyčinky, jednotlivé nebo v páru

Fakultativně anaerobní bakterie

Číslo izolátu	morfologie
1_1	Malé pravidelné tyčinky, výrazný pohyb, řetízky, jednotlivé nebo v páru
1_3	Diplokoky, v páru, jednotlivé
1_4	Delší úzké, pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, tvořící řetízky, pohyblivé
2_1	Malé pravidelné tyčinky, pohyblivé, produkce plynu
2_2	Malé pravidelné tyčinky, výjimečně řetízky
3_1	Dlouhé, úzké pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, výrazný pohyb - vlnitý
3_3	Delší pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, tvoří shluky
3_4	Dlouhé, úzké tyčinky, v páru, esovitý pohyb
4_7	Krátké pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, občas řetízky
5_1	Pravidelné tyčinky, tvorba pohyblivých shluků
5_2	Dlouhé vlasovité pravidelné tyčinky
5_3	Dlouhé, vlasovité, pravidelné tyčinky
7_1	Krátké pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, pohyblivé
7_2	Diplokoky
7_3	Velmi dlouhé a úzké, pravidelné tyčinky
8_1	Krátké, pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, pohyblivé
8_3	Koky, jednotlivé nebo v páru

Anaerobní bakterie

Číslo izolátu	morfologie
2_1	Velmi krátké, pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, pohyblivé
2_3	Středně dlouhé, silné, pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru
2_5	Krátké, silné, pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru
4_1	Krátké, silné, pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru, pohyblivé
4_4	Velmi drobné pravidelné tyčinky, jednotlivé nebo v páru
5_2	Úzké, dlouhé, pravidelné tyčinky
7_1	Úzké, dlouhé pravidelné tyčinky, řetízky, jednotlivé, pohyblivé
7_4	Koko-tyčinky, jednotlivé nebo v páru, řetízky
8_1	koky
8_2	Úzké, dlouhé, jednotlivé tyčinky
8_3	Silnější koko-tyčinky, jednotlivé nebo v páru

10. SEZNAM LITERATURY

- Ambrožová J.; 2003; Aplikovaná a technická hydrobiologie; Vysoká škola chemicko-technologická; Praha; 226s; ISBN: 80-7080-521-8
- Allman G. J.; 1857; A monograph of the fresh-water *Polyzoa*, including all the known species, both british and foreign; Ray Society; Londýn; 184s.
- Balounová Z., Rajchard J., Švehla J., Šmahel L.; 2011; The onset of invasion of bryozoan *Pectinatella magnifica* in South Bohemia (Czech republic); *Biologia*; vol. 66; Issue 6; pp 1091- 1096
- Breitmaier E.; 2008; Alkaloide – Betäubungsmittel, Hlluzinogene and andere Wirkstoffe; Leitstrukturen aus der Natur; 3. Vydání Vieweg + Teubner; Wiesbaden; 207s.; ISBN: 978-3-8348-0531-7
- Cao R., Peng W., Wang Z, Xu A.; 2007; β -Carboline alkaloids:biochemical and pharmacological functions; *Current Medicinal Chemistry*; vol. 14; pp 479-500
- Carruthers F. L, Shum-Thomas T., Conner A. J., Mahanby H. K.; 1994; The significance of antibiotic production by *Pseudomonas aureofaciens* PA 147-2 for biological control of *Phytophthora megasperma* root rot of asparágus; *Plant and Soil*; vol. 170; pp 339-344
- Clarkson J. P., Lucas J. A.; 1997; The role of antibiotic production by a strain of *Pseudomonas fluerescens* in the suppression of *Pseudocercospora herpothrichoides*, the causal agent of eyespot disease of cereals; *Journal of Applied Microbiology*; vol. 82; pp 499-506
- Davidson S. K., Allen S. W., Lim G. E., Anderson C. M., Haygood M. G; 2001; Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont „*Candidatus Endobugula sertula*“ of the bryozoan *Bugula neritina*; *Applied Environmental Microbiology*; vol. 67; Issue 10; pp 4531 – 4537
- Dřimalová D.; 2005; Růstové regulátory v řasách; *Czech Phycology*; vol. 5; pp 101-112

Gao S. S., Hothersall J., Wu J., Murphy M. C., Song Z., Stephens R. E., Thomas M. Ch., Crump P. M., Cox R. J., Simpson T- J., Willis Ch. L.; 2014; Biosynthesis of mupirocin by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 involves parallel pathways; Journal of the American Chemical Society; vol. 136; Issue 14; pp 5501-5507

Hays E. E., Wells I. C., Katzman P. A., Cain C. K., Jacobs F.A., Thayer S. A., Doisy E. A., Gaby W. L., Roberts E. C., Muir R. D., Carrol C., J., Jones L. R., Wade J. N.; 1945; Antibiotic substances by *Pseudomonas aeruginosa*; The Journal of Biological Chemistry; vol. 159; pp 725-750

Hirota K., Kubo K., Kitade Y., Maki Y.; 1985; Synthesis of phidolophin 7-(4-hydroxy-3-nitrobenzyl)-1,3-dimethylxanthine from the bryozoan *Phidolopora pacifica*; Tetrahedron Letters; vol. 26; Issue 19; pp 2355 - 2356

Holst P. B., Anthoni U., Christophersen C., Nielsen P. H.; 1994; Marine alkaloids, 15. two alkaloids, flustramine E and debromoflustramin B, from the marine bryozoan *Flustra foliacea*; Journal of Natural Products; vol. 57; Issue 7; pp 997 – 1000

Huang Y. T., Lin Cl., Chien PH., Tang TT., Lin J., Chao J.; 2014; The depletion of securin enhances butein-induced apoptosis and tumor inhibition in human colorectal cancer; Chemico-Biological Interactions; vol. 220; pp 41-50

Macháč O.; 2012; [online]; 2012, [cit. 2012-09-25]; Natura Bohemica; dostupné z: <http://www.naturabohemica.cz/pectinatella-magnifica/>

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

Massard J. A.; Geimer G.; 2008; Global diversity of bryozoans (bryozoa or ectoprocta) in freshwater; Hydrobiologia; vol. 595; pp 93 – 99

Moghaddam K. M., Arfan M., Ratique J., Razaee S., Fesharaki J. P., Gohari A. R., Shaverdi A. R.; 2010; The antifungal activity of *Sarcococca saligna* ethanol extract and its combination effect with fluconazole against different resistant *Aspergillus* species; Applied Biochemistry and Biotechnology; vol. 162; Issue 1; pp 127 - 133

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

- Kalemba D., Kunicka A.; 2003; Antibacterial and antifungal properties of essential oils; Current Medicinal Chemistry; vol. 10; Issue 10; pp 813 – 829
- Korakas P., Chaffee S., Shotwell J. B., Duque P., Wood J. L.; 2004; Efficient construction of the securine A carbon skeleton; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; vol. 101, Issue 33; pp 12054-12057
- König G. M., Kehraus S., Seibert F. S., Abdel-Lateff A., Müller D.; 2006; Natural products from marine organisms and their associated microbes; Journal of Chemical Biology; vol. 7; pp 229-238
- Kraft A.S., Woodley S., Pettit G. R., Gao F., Coll J. C., Wagner F.; 1996; Comparison of the antitumor activity of bryostatins 1, 5 and 8; Cancer Chemother Pharmacol; vol. 37; Issue 3; pp 271-278
- Lacourt A.; 1968; A Monograph of the freshwater; Leiden; The Netherlands; 172 s.
- Lellák J. a kol.; 1982; Biologie vodních živočichů; Př. F. Univerzity Karlovy, Praha; 220 s.
- Lysec N.; Tryptophan – Derivates in marine invertebrates: isolation, structure and function; [netištěná dizertační práce]; Heidelberg; The Faculty of Bio Sciences; Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology; 2002
- Pechenik J. A.; 1996; Biology of the invertebrates; the McGraw – Hill Companies.Inc; 576 s.; ISBN-13: 9780697137128
- Perez M., de Vinesa A. G., Sanchez-Duffhues G., Marquez N., Bellido M. L., Munoz-Fernandez M. A., Moreno S., Castor T. P., Calzado M. A., Munoz E.; 2010; Bryostatin-1 synergizes with histone deacetylase inhibitors to reactive HIV-1-from latency; Current HIV Research; vol. 8; Issue 6; pp 418 – 429
- Peters L., König M. G., Wright A. D., Pukall R., Stackebrandt E., Eberl L., Riedel K.; 2003; Secondary metabolites of *Flustra foliacea* and their influence on bacteria; Applied and Environmental Microbiology; vol. 69; Issue 6; pp 3469-3475
- Pierson S. L., Pierson A. E.; 1995; Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aerofaciens* role in rhizosphere ecology and pathogen suppression; FEMS Microbiology Letters; vol. 136; Issue 2; pp 101-108

- Ramírez-Osuna M., Chavéz D., Hernández L., Molins E., Jonathan R., Aguirre G.; 2005; Synthesis of analogs of amathamide A and their preliminary antibicrobial activity; *Molecules*; vol. 10; Issue 1; pp 295 – 301
- Silver A. C., Rabinowitz N. M, Küffer S., Graf J.; 2007; Identification of *Aeromonas veronii* genes required for colonization of the medical leech, *Hirudo verbana*; *Journal of Bacteriology*; vol. 189; Issue 19; pp 6736-6772
- Sedlák E.; 2002; *Zoologie bezobratlých*; Brno; Masarykova Univerzita; 336 s.; ISBN: 80-210-2892-0
- Sharp J. H., Winson M. K., Porter J. S.; 2007; Bryozoan metabolites: an ecological perspective; *Natural Products Report*; vol. 24; Issue 4; pp 659-673
- Sherwood J., Walls J. T., Ritz D. A.; 1998; Amathamide alkaloids in the pycnogonid stylopallene longicauda, epizoic on the chemically defended bryozoan, *Amathia wilsoni*; *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania*; vol. 132; pp 65-70
- Sinko J., Rajchard J., Balounová Z., Fikotová L.; 2012; Biologically active substances from water invertebrates: A review; *Veterinarní medicína*; vol. 57; no. 4; pp 177 – 184
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L.; 1998; Antimicrobial of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens; *Letters in Applied Microbiology*; vol. 26; Issue 2; pp 118 - 122
- Tanwar J., Das S., Fatima Z., Hameed S.; 2014; Multidrug resistance: An emerging crisis; *Interdiscip Perspectives on Infectious Diseases*; vol. 2014; pp 7
- Taylor P. D., Weedon M. J.; 2000; Skeletal ultrastructure and phylogeny of cyclostome bryozoans; *Zoological Journal of the Linnean Society*; vol. 128; Issue 4; pp 337-399
- Tischler M., Ayer S. W., Anderson J. R.; 1986; Nitrophenols from northeast pacific bryozoans; comparative biochemistry and physiology, Part B: *Comparative Biochemistry*, vol. 84; no. 1; pp 43 -45
- Thorp J. H., Covich A. P.; 2009; Ecology and classification of North American freshwater invertebrates; 2nd ed. Academic Press; 1021 s.; ISBN: 978-0-690647-9

Trindade-Silva A. E., Lim-Fong G. E., Sharp K. H., Haygood M. G.; 2010; Bryostatins: biological context and biotechnological prospects; *Current Opinion in Biotechnology*; vol. 21; pp 834-842

Tvrzová L., Schumann P., Spröer C., Sedláček I., Páčová Z., Šedo O., Zdráhal Z., Steffen M., Lang E.; 2006; *Pseudomonas moraviensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*; *International Journal of Systematic and Evolutionary*; vol. 56; Issue 11; pp 2657-2663

Vlková E., Killer J., Kmet' V., Rada V., Musilová Š., Bunešová V., Hovorková P., Božik M., Salmonová H., Rajchard J.; 2015; Identification of microbiota associated with *Pectinatella magnifica* in South Bohemia; *Biologia*; vol. 70; Issue 3

Waisser K.; 2006; *Biologicky aktivní organické látky*; Hradec Králové; Gaudeamus; 175 s.; ISBN: 80-7041-092-2

Woollacott R. M.; 1981; Association of bacteria with bryozoan larvae; *Marine Biology*; vol. 65; Issue 2; pp 155-15

Yao B., Prinsep M. R., Nicholson B. K., Gordon D. P.; 2003; The Pterocellins, Novel bioactive alkaloids from the marine bryozoan *Pterocella vesiculosa*; *Journal of Natural Products*; vol. 66; Issue 8; pp 1074-1077

Yoshihisa H., Zenji S., Fukushi H., Katsuhiko K., Haruhisa S., Takahito S.; 1989; Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens; *Soil Biology and Biochemistry*; vol. 21; Issue 5; pp 723-728

Šetlíková I., Balounová Z., Lukavský J., Rajchard J.; 2005; Nepůvodní druh mechovky na Třeboňsku; *Živa*; vol. 4; pp 172-174.

Špínar Z. V.; 1965; *Systematická paleontologie bezobratlých*; Praha: Academia; 1049 s.

10.1 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 9: Orgánové soustavy a stavba zooida řádu *Plumatellida* (upraveno z: <http://www.wright.edu/~tim.wood/bryozoans.html>)

Obrázek 10: Tvar zooida (A) - válcovitý; (B) vakovitý (upraveno z: <http://www.wright.edu/~tim.wood/bryozoans.html>)

Obrázek 11: Ukázka zatáhnutí polypida do cystidu (<http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/141.htm>)

Obrázek 12: Statoblasty (a) floatoblast, (b) sesoblast (<http://www.wright.edu/~tim.wood/bryozoans.html>)

Obrázek 13: Kolonie *Pectinatella magnifica* (http://www.bryozoans.nl/soorten/en/pectinatella_magnifica.html)

Obrázek 14: Statoblasty *Pectinatella magnifica* (http://www2u.biglobe.ne.jp/~gen-yu/pectinatella_e.html)

Obrázek 15: Rozšíření *Pectinatella magnifica* v ČR (http://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=67075)

Obrázek 16: Kolonie mechovky *Bugula neritina*
(http://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=67075)

Obrázek 9: Pterocelin A; Pterocelin B (<http://sci.waikato.ac.nz/about-us/people/michele>)

Obrázek 10: β -karbolin (<http://www.quickiwiki.com/pl/%CE%92-Karbolina>)

Obrázek 11: cholestan (http://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=67075)

Obrázek 12: Nitrofenol (http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/,MDA_CHEM-820895)

