

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
Přírodovědecká fakulta



**Změny cytoplazmatické membrány typového kmene *Streptomyces nodosus*  
*subsp. asukaensis* jako odpověď na růstové podmínky**

Diplomová práce

**Bc. Ivana Lipenská**

Školitelka: RNDr. Dana Elhottová, Ph.D.

České Budějovice, 2012

LIPENSKÁ, I., 2012. Změny cytoplazmatické membrány typového kmene *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* jako odpověď na růstové podmínky [Changes of cytoplasmatic membrane of strain *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis* as a response to growth conditions, Master Thesis, In Czech], Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

### **Anotation**

The Master thesis dealt with changes in cytoplasmatic membrane of model strain *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis*. This strain produces polyketide antibiotic called asukamycin. Changes of cytoplasmatic membrane were observed as a response to the age of bacterial culture (exponential and stationary growth phase) and addition of produced antibiotic precursor (cyclohexanecarboxylic acid) to incubation medium. Observed parametres were the composition of membrane fatty acids and the membrane fluidity.

**Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.**

**Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.**

**V Českých Budějovicích, 14. prosince 2012**

## **Poděkování**

Chtěla bych především poděkovat své školitelce Dr. Daně Elhottové za neúnavné vedení a neocenitelné připomínky, trpělivost i odborné rady.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Jiřímu Petráskovi, jehož zkušenosti a vstřícnost mi byly při práci velkou oporou. Doc. RNDr. Ivo Konopáskovi CSc. a RNDr. Janě Beranové PhD. za možnost provést část analýz pod jejich vedením na Katedře genetiky a mikrobiologie PšF UK, Ing. Miroslavu Petříčkovi, CSc. za poskytnutí pokusného kmene, Mgr. Lauře Dymáčkové, Mirce Jordákové a RNDr. Jiřímu Jiroutovi. PhD. za pomoc při pokusech a za cenné rady a Doc. Ivě Dostálkové za statistické konzultace.

Chci také poděkovat mé rodině, bez které by nebylo možné studium přežít a mým přátelům, bez kterých by nebylo možné během studia žít. Práce byla finančně podporována z projektu GAČR P504/10/2077.

## OBSAH:

<b>1. ÚVOD A CÍLE .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>2</b>
2.1. ROD STREPTOMYCES.....	3
2.2. STREPTOMYCES NODOSUS SSP. ASUKAENSIS .....	4
2.2.1. Produkce sekundárních metabolitů <i>S.nodosus. ssp asukaensis</i> .....	5
2.2.2. Struktura asukamycinu .....	5
2.2.3. Biosyntéze asukamycinu.....	6
2.2.4. Membránové MK <i>S. nodosus ssp. asukaensis</i> .....	7
2.3. CYTOPLAZMATICKÁ MEMBRÁNA BAKTERIÍ.....	9
2.3.1. Homeoviskózní adaptace a membránová fluidita.....	10
2.3.2. Propustnost membrány .....	13
2.4. CÍLE PRÁCE A PRACOVNÍ HYPOTÉZY .....	15
<b>3. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>16</b>
3.1. POKUSNÝ MIKROORGANIZMUS .....	16
3.2. SCHÉMA INKUBAČNÍHO POKUSU.....	18
3.3. STANOVENÍ BIOMASY .....	20
3.4. STANOVENÍ SLOŽENÍ MEMBRÁNOVÝCH MK .....	20
3.5. STANOVENÍ FLUIDITY MEMBRÁNY .....	23
3.6. VYHODNOCENÍ A POUŽITÉ STATISTICKÉ METODY.....	23
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>25</b>
4.1. KONTROLNÍ VARIANTA.....	25
4.1.1. Stanovení biomasy.....	25
4.1.2. Stanovení složení mastných kyselin.....	25
4.1.3. Stanovení fluidity membrány .....	28
4.2. STIMULOVANÁ VARIANTA.....	29
4.2.1. Stanovení biomasy.....	29
4.2.2. Stanovení složení mastných kyselin.....	29
4.2.3. Stanovení fluidity membrány .....	32
4.3. POROVNÁNÍ KONTROLNÍ A STIMULOVANÉ VARIANTY .....	33
4.3.1. Stanovení biomasy.....	33
4.3.2. Stanovení složení mastných kyselin.....	34
4.3.3. Stanovení fluidity membrány .....	36
4.3.4. Grafické shrnutí zastoupení skupin MK v membráně.....	36
<b>5. DISKUZE .....</b>	<b>39</b>
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>43</b>
<b>8. PŘÍLOHY.....</b>	<b>47</b>

**Klíčová slova:**

asukamycin, homeovizkózní adaptace, DPH sonda, anizotropie fluorescence, alicyklické mastné kyseliny,  $\omega$ -cyklo-větvené mastné kyseliny, polyketidový řetězec, manumycinová antibiotika

**Použité zkratky**

MK – mastné kyseliny

ATB – antibiotika

PKS- polyketide synthase, polyketidová syntetáza

FAS – fatty acid synthase, syntáza mastných kyselin

CPM – cytoplasmatická membrána

DPH – 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene

CH – cyklohexylundekanoát

FAME – fatty acid methyl ester;

GC – gas chromatography, plynová chromatografie

C<sub>5</sub>N jednotka - 2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enon

C<sub>7</sub>N jednotka - 2-amino-4hydroxy-5,6-epoxycyklohex-2-enon

3,4-AHBA - 3-amino-4-hydroxybenzoická kyselina

CHC-CoA - cyklohexylkarbonyl CoA

5-ALA - 5-aminolevulinátová kyselina

$\omega$ -FA –  $\omega$ -cyclo-branched fatty acids,  $\omega$ -cyklo-větvené mastné kyseliny

cyc-FA – cyclopropyl-branched fatty acids, cyklopropyl-větvené mastné kyseliny

STFA – saturated fatty acids, nasycené mastné kyseliny

i-STFA – iso-branched saturated fatty acids, iso-větvené nasycené mastné kyseliny

a-STFA - anteiso-branched saturated fatty acids, anteiso-větvené nasycené mastné kyseliny

MUFA – monounsaturated fatty acids, mononenasycené mastné kyseliny

t-BR-STFA – terminal-branched-saturated fatty acids, terminálně větvené nasycené mastné kyseliny

t-BR-MUFA – terminal-branched-monounsaturated fatty acids, terminálně-větvené-mononenasycené mastné kyseliny

Cyc/prec – cyclopropyl/precursor, cyklopropyl/prekurzor

## 1. ÚVOD A CÍLE

Ještě na začátku minulého století byly infekční choroby hlavní příčinou úmrtí mezi lidmi (Madigan a Martinko, 2006). S objevem antibiotik ve dvacátých letech 20.století se počet mrtvých rapidně snížil a pozornost lékařů a vědců se zaměřila na jiná onemocnění. Jak se ale v druhé polovině minulého století zjistilo, bakterie našly způsoby ochrany před antibiotiky, která se začala používat a nyní hrozí velký nedostatek těch účinných. Dnešním problémem se stávají především bakterie multi-resistentní k antibiotikům jako je například *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB), způsobující tuberkulózu nebo methicilin-resistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA, dnes už z 90% případů rezistentní na penicilin) (NIAID, 2011).

Jednou z odpovědí na vzrůstající potřebu nových antibiotik je rychlá identifikace nových producentů. Některá bakteriální antibiotika obsahují ve své struktuře prekurzor mastné kyseliny, která se vyskytuje i v membráně producentské bakterie. Pomocí metody analýzy celulárních mastných kyselin, je možné poměrně rychle a snadno nalézt bakterie, které jsou specifické přítomností určité sloučeniny v membráně. Společné prvky v biosyntéze antibiotik a mastných kyselin naznačují úzkou provázanost jejich současného výskytu uvnitř bakterie, proto lze analýzu celulárních mastných kyselin použít k pátrání po možných producentech antibiotik.

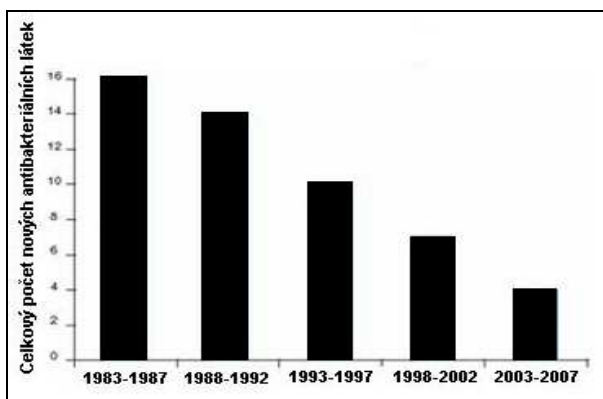
Bakterie, která má antibiotický potenciál, nebude ale produkovat antibiotika za jakýchkoli podmínek. Na produkci má vliv fáze růstu, nutriční látky v okolí a fyzikální vlastnosti prostředí. Je proto nutné nejen umět vytipovat producenty, ale také zkoumat podmínky, které k produkci vedou. Porozumění těmto mechanismům může v budoucnu ulehčit získávání nových antibiotických látek.

Tato práce si klade za cíl charakterizovat skladbu membránových MK a membránovou fluiditu v podmínkách stimulujících produkci asukamycinu typového kmene *S. nodosus* ssp. *asukaensis*.

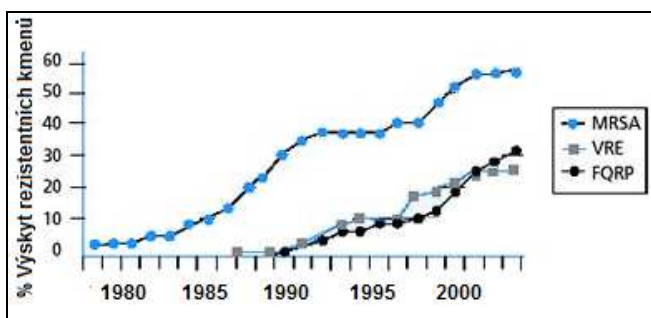
## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Antibiotika, která dnes máme k dispozici, jsou dočasným řešením. Počet objevů na poli nových antibiotik s každým rokem klesá (Obr. 1), zatímco zastoupení rezistentních kmenů oproti nerezistentním stoupá (Ob. 2). Ve 21. století bylo nalezeno jen několik účinných látek. Většina dnes známých ATB pochází ze skupiny *Actinobacteria*, půdních mikroorganismů, které jsou produkcí antibiotik známy již ze 40. let minulého století. Nejvýznamnější a zároveň nejpočetnější skupinou aktinobakterií je rod *Streptomyces*.

Antibiotika získaná z tohoto rodu dnes pokrývají 2/3 klinicky používaných ATB (Watve et al., 2001). Prvním antibiotikem rodu *Streptomyces* byla látka nazvaná streptomycin (účinná proti plicní tuberkulóze), kterou izoloval z bakterie *Streptomyces griseus* v roce 1943 Albert Schatz.



**Obr. 1.** Snižující se počet nově zavedených antibiotik (podle Fox, 2006)



**Obr. 2.** Zvyšující se procentuální výskyt rezistentních kmenů (podle CDC, 2010) - MRSA=methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, VRE=vankomycin-rezistentní *Enterococci*, FQRP=fluorochinolon-rezistentní *Pseudomonas aeruginosa*

## 2.1. Rod *Streptomyces*

Rod *Streptomyces* patří do řádu *Actinomycetales*, kmen *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*. *Streptomyces* jsou aerobní, grampozitivní, půdní bakterie. Jsou to chemoorganotrofní bakterie s oxidativním typem metabolismu. Jejich DNA se vyznačuje vysokým obsahem guaninu a cytosinu (obvykle mezi 66-74 %). Ve své membráně obsahují typicky nasycené, iso- a anteiso- větvené MK. Streptomycety vytvářejí dva typy vláken, jako první bohatě větvené mycelium a poté vzdušné mycelium produkující spory, které zajišťují vyšší odolnost bakterie za nepříznivých podmínek. Některé kmeny produkují barevné pigmenty (Korn-Wendisch a Kutzner, 1992; Kämpfer, 2006).

Streptomycety jsou typicky půdní organizmy, ale osidlují i vodní ekosystémy a byly nalezeny i ve střevech arthropod. V suchozemském prostředí tvoří i více než 90 % z celkového zastoupení všech zástupců ř. *Actinomycetales*. V jednom gramu půdy se nachází přibližně  $10^4 - 10^7$  kolonie-tvořících jednotek neboli CFU (*colony forming units*) a počty bakterií jsou tím vyšší, čím je půda bohatší na organický materiál. Většina streptomycet dává přednost neutrálnímu až mírně alkalickému pH, ale existují i kmeny žijící při pH 3,5 nebo až při pH 11,5 (Kämpfer, 2006).

Rod *Streptomyces* je zatím největším mikrobiálním rodem produkujícím antibiotika (Watve et al., 2001). Látky produkované tímto rodem nemají účinky pouze antibakteriální, ale také antifugální, antiparazitické, imunosupresorové apod. Mezi streptomycetová antibiotika patří nejznámější streptomycin bakterie *S. griseus* (Waksman, 1963), chloramfenikol (*S. venezuelae*; Akagawa et al. 1975), tetracyklin (*S. rimosus*, *S. aureofaciens*; Nelson et al., 2001), neomycin (*S. fradiae*; Dulmage, 1953) a další. Odhaduje se, že rod *Streptomyces* je schopen produkovat 100 000 – téměř 300 000 antibiotik (Watve et al. 2001).

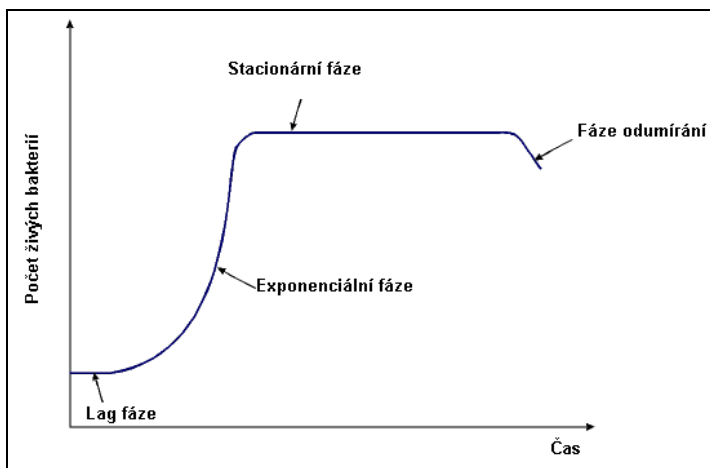
Antibiotika jsou jedněmi z látek sekundárního metabolismu. Látky sekundárního metabolismu jsou charakterizované tím, že nejsou nezbytné pro samotný život mikroorganismu, tvoří však důležitou součást životní strategie, neboť bakterie díky tomu často získává jistou selekční výhodu oproti ostatním bakteriím v konkurenčním prostředí. Sekundární metabolity se produkují v pozdější, stacionární fázi růstu bakteriální populace při statické kultivaci, kdy se počet buněk už prakticky nemění, vyčerpávají se živiny a dochází k hromadění toxických látek (Rosypal, 2003) (viz. Obr. 3.).

Bakterie produkující antibiotické látky, mají také mechanismus, jak se těchto látek zbavovat do okolního prostředí, protože i pro ně samotné jsou toxické. Díky tomu jsou zároveň více rezistentní k jiným toxickým látkám, které jsou v jejich okolí. Jedním z



mechanizmů je používání tzv. efluxních pump k odčerpávání xenobiotik, která se dostala dovnitř buňky, z buňky ven (Nikaido, 1998; Levy, 1992; Lee a Lomovskaya, 1998; Lee et al., 2001).

Vzhledem ke svým dobrým schopnostem degradovat polysacharidy a další makromolekuly zřejmě hrají významnou roli i v přeměnách toxických sloučenin. Streptomycety byly nalezeny i v půdách obsahujících těžké kovy. (Kutzner, 1981; Schrempf, 2006).



**Obr. 3.** Růst bakteriální populace (podle Madigan a Martinko, 2006)

## 2.2. *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*

Tento druh bakterie byl poprvé izolován v roce 1976 (Omura et al.). Byla u něj zároveň objevena produkce antibiotika nazvaného asukamycin. Od té doby vzniklo několik prací zaměřených na biosyntézu tohoto antibiotika a na kultivační pokusy zasahující do biosyntetických drah, aby se tak zvýšilo množství produkovatelného antibiotika nebo aby se syntetizovala antibiotika nová jako například v pracích Hu a Flosse (2006) nebo Rui a Petříčkové (2010).

### 2.2.1. Produkce sekundárních metabolitů *S. nodosus* ssp. *asukaensis*

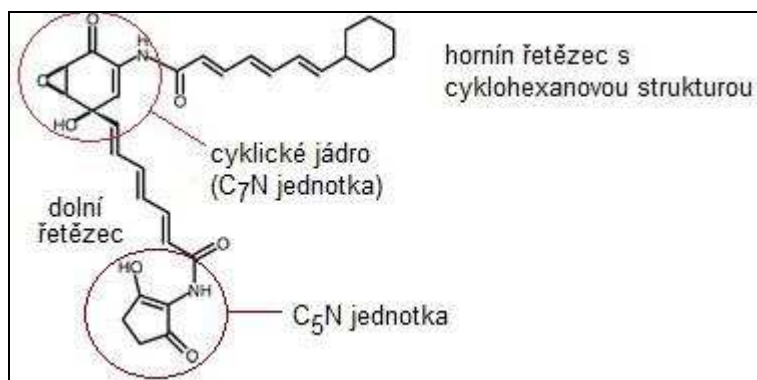
*Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* produkuje antibiotikum asukamycin. Tato látka patří do významné rodiny manumycinových antibiotik účinných antibakteriálně, antivirálně, antifungálně, protizánětlivě a například také proti Alzheimerově chorobě. Dále vykazují silnou aktivitu proti farnesyltransferáze, I $\kappa$ B kináze  $\beta$ , interleukinu-1  $\beta$ -convertním

enzymům, které se uplatňují v regulaci růstu buňky a buněčného dělení a jsou proto potenciálně účinné i jako antitumorová chemoterapeutika (Sattler et al, 1998; Shipley et al., 2009; Bernier et al, 2006).

Všechny typy manumycinových antibiotik se liší pouze ve složení horního polyketidového řetězce (viz Obr. 4). Reaktivní epoxidová skupina u cyklického jádra je pravděpodobně hlavní strukturou ovlivňující různé biologické funkce uvnitř bakterie (Sattler et al., 1998).

### 2.2.2. Struktura asukamycinu

Souhrnný vzorec asukamycinu má podobu  $C_{29}H_{22}N_2O_9$  s molekulovou hmotností 542. Skládá se ze tří částí – dolního polyketidového trienového řetězce zakončeného 2-amino-3-hydroxycyklopent-2-enonem (tzv.  $C_5N$  jednotka), z cyklického jádra tvořeného 2-amino-4hydroxy-5,6-epoxycyklohex-2-enonem (tzv.  $C_7N$  jednotka) a z horního trienového řetězce **s charakteristickou cyklohexanovou strukturou**, kterým se odlišuje od ostatních manumycinových antibiotik (Zeeck et al., 1987; Thiericke et al., 1987; viz Obr. 4.).



**Obr. 4.** Struktura antibiotika asukamycinu (podle Hu a Floss 2006)

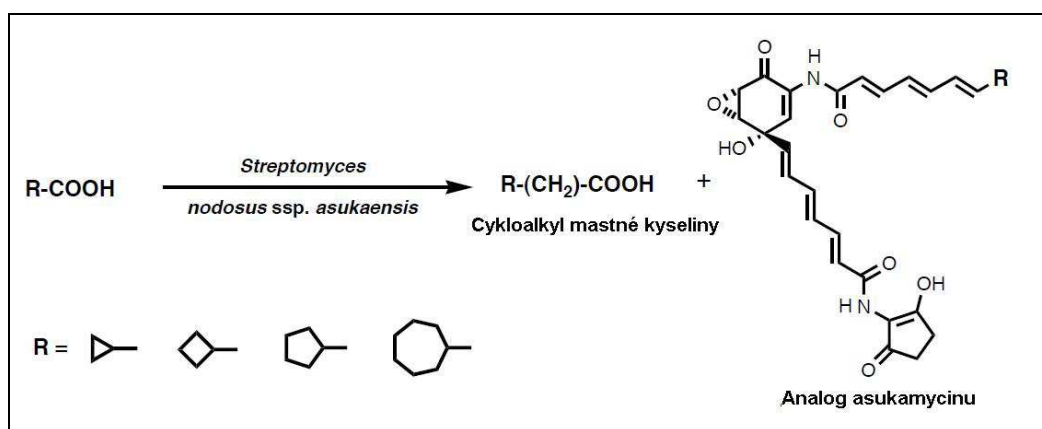
### 2.2.3. Biosyntéza asukamycinu

Startovací jednotkou (tedy jednotkou, která zahajuje sled chemických reakcí) pro horní řetězec asukamycinové struktury je cyklohexankarboxylová kyselina, která je poté rozšířena o tři molekuly malonyl-CoA. (Thiericke et al., 1990; Hu a Floss, 2004; Hu et al., 1997). Dolní řetězec pochází z 3,4-AHBA iniciovanou cyklohexylkarbonylem CoA (CHC-CoA) a vytváří se ve třech krocích postupnou kondenzací.  $C_5N$  jednotka má zřejmě původ v 5-

aminolevulinatovém (5-ALA) intermediátu (Rui, 2010; Petříček et al., 2006; Nakagawa et al., 1985).

Prekurzorem pro samotnou cyklohexanovou jednotku a C<sub>7</sub>N jádro je 3-amino-4-hydroxybenzoická kyselina (3,4-AHBA) a shikimová kyselina, ze které vzniká CHC-CoA.

Kultivační experimenty s kmenem *S. nod. ssp. asukaensis* (ATCC 29757), založené na nutričním přidavku různých alicyklických kyselin (kyselin s uzavřeným uhlíkovým řetězcem) jako prekurzorů, které bakterie využila na výrobu antibiotika i na tvorbu MK v membráně, vedly k objevu dalších 6 asukamycinu-podobných sloučenin lišících se pouze právě cyklickými konci horního polyketidového řetězce. Bylo zjištěno, že bakterie dává přednost tvorbě 4-6 cyklickým uhlíkovým strukturám v antibiotiku než cyklům s méně či více uhlíky (viz Obr. 5). Analýza analogů asukamycinu ukázala, že syntáza horního polyketidového řetězce (PKS) a syntáza větvených MK (FAS) u *S.n. ssp asukaensis* sdílí stejnou selektivitu pro startovací jednotky **pro větvené a alicyklické karboxylové kyseliny** (Hu a Floss, 2006). Zároveň podle Bentelyho studie (2002) do tvorby antibiotik a do složení membránových MK (ve stresových a adaptačních mechanismech) pravděpodobně zasahují stejné regulační geny



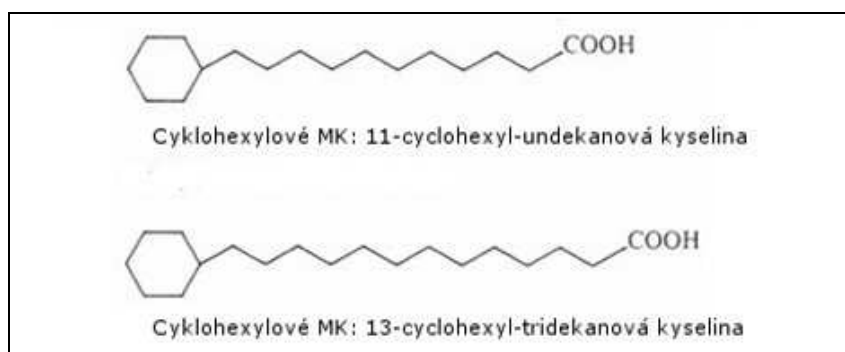
**Obr. 5.** Syntéza horního řetězce analogů asukamycinu pomocí různých cyklických uhlovodíků (Hu a Floss, 2006)

#### 2.2.4. Membránové MK *Streptomyces nodosus ssp. asukaensis*

Složení MK bakterií se běžně určuje chromatograficky. Některé MK, především cyklo- větvené ale stále nejsou v databázích programů, pomocí komerčně dostupných

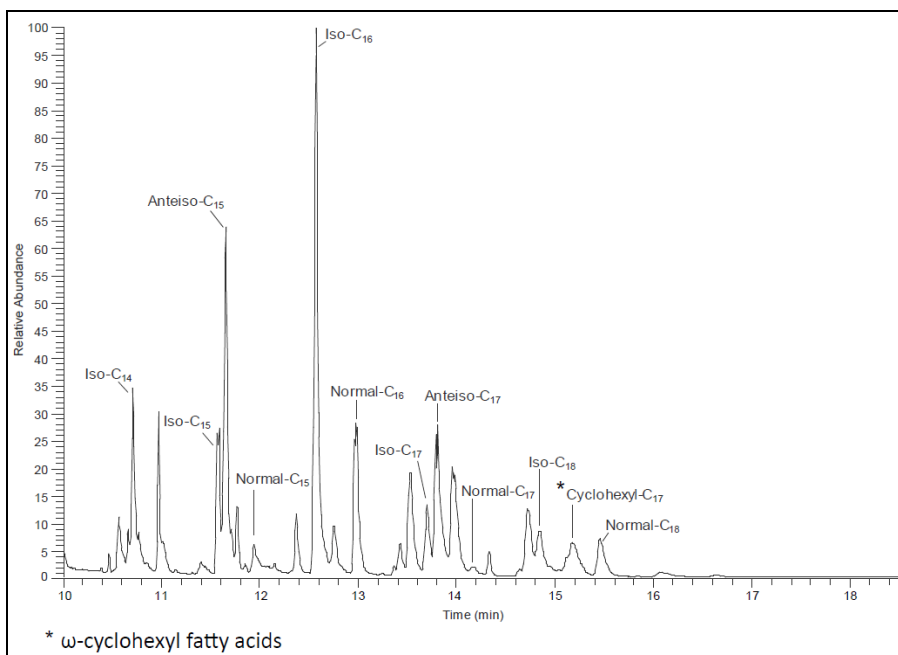
identifikačních programů je tedy nelze běžně determinovat, je třeba je identifikovat podle jejich retenčních časů.

CHC-CoA startovací jednotka k biosyntéze asukamycinového polyketidového řetězce může být použita k vytvoření  $\omega$ -cyklohexyl mastných kyselin ( $\omega$ -alicyklických mastných kyselin) v membráně (Obr. 6.). Struktura této MK indikuje zásadní vliv na tekutost (fluiditu) membrány a její vlastnosti podle studií Kanedy (1991), Zhang a Rock, (2008) a Denicha (2003) mají vliv na zvýšení fluidity membrány.



**Obr. 6.**  $\omega$ -alicyklické mastné kyseliny (podle Hu a Floss, 2006)

Typické složení *S.n. ssp.asukaensis* je graficky znázorněno na Obr. 7 (Rui et al., 2010) a v následujícím Obr. 8, kde byly navíc zaznamenány změny ve složení membránových MK podle druhu a množství přídavku prekurzoru antibiotika asukamycinu (Hu a Floss, 2006).



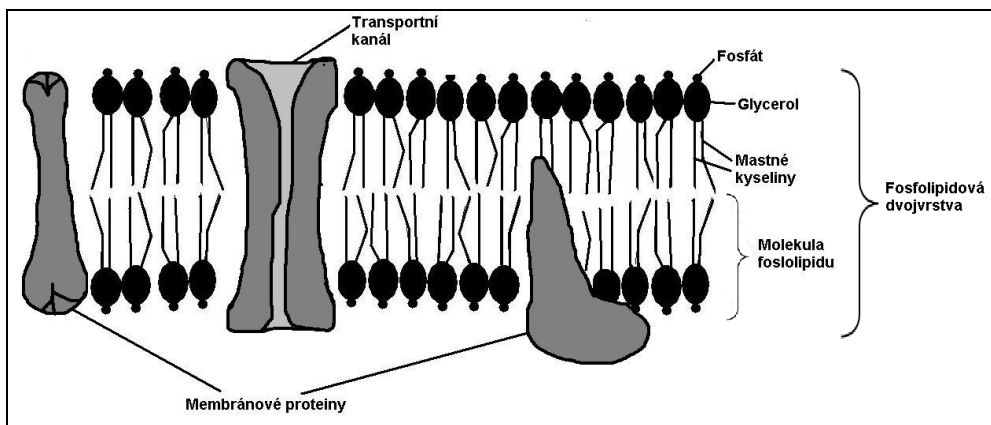
**Obr. 7** Složení mastných kyselin *S.nodosus* ssp. *asukaensis* (Rui a Petříčková, 2010)

Mastná kyselina	bez prekurzoru	1 mM 4	2 mM 4	4 mM 4	8 mM 4
iso-C <sub>14</sub>	3.8 %	4.4 %	4.2 %	4.3 %	4.0 %
C <sub>14</sub>	1.0 %	0.4 %	0.7 %	0.5 %	0.6 %
iso-C <sub>15</sub>	6.7 %	7.5 %	6.9 %	6.8 %	6.4 %
anteiso-C <sub>15</sub>	13.7 %	18.8 %	19.1 %	18.7 %	16.8 %
C <sub>15</sub>	1.5 %	<0.1 %	<0.1 %	<0.1 %	<0.1 %
iso-C <sub>16</sub>	30.0 %	23.8 %	24.2 %	24.4 %	21.6 %
C <sub>16</sub>	11.5 %	10.6 %	9.6 %	10.6 %	9.6 %
iso-C <sub>17</sub>	5.6 %	3.5 %	3.5 %	3.0 %	4.6 %
anteiso-C <sub>17</sub>	19.2 %	13.9 %	14.2 %	12.2 %	13.9 %
C <sub>17</sub>	1.6 %	<0.1 %	<0.1 %	<0.1 %	<0.1 %
iso-C <sub>18</sub>	1.3 %	0.1 %	0.2 %	0.1 %	0.4 %
C <sub>18</sub>	0.7 %	0.8 %	0.5 %	1.4 %	0.3 %
cyclohexyl-C <sub>15</sub>	-	0.7 %	0.8 %	0.8 %	1.4 %
cyclohexyl-C <sub>17</sub>	3.4 %	15.4 %	15.6 %	17.1 %	19.7 %
cyclohexyl-C <sub>19</sub>	-	0.1 %	0.4 %	0.2 %	0.8 %
celkový obsah cyklohexylu	3.4 %	16.2 %	16.8 %	18.1 %	21.9 %

**Obr. 8.** Složení membránových mastných kyseliny *S. nod.* ssp. *asukaensis* bez přidavku prekurzoru asukamycinu (cyklohexankarboxylové kyseliny) a se zvyšujícím se přidavkem prekurzoru (podle Hu a Floss, 2006)

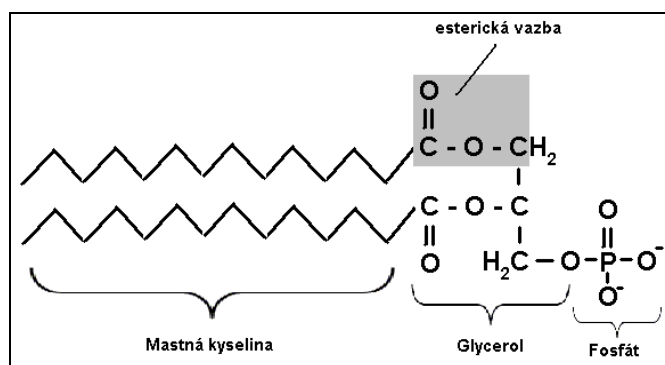
### 2.3. Cytoplazmatická membrána bakterií

Cytoplazmatická membrána (dále jen CPM) je semipermeabilní bariéra zajišťující stále vnitřní prostředí a výměnu živin a látek, jejímž prostředím buňka komunikuje s okolím. Zároveň je membrána zdrojem energie, tzv. protonmotivní síly (PMF), jejíž náboj řídí mnoho buněčných procesů.



**Obr. 9.** Ilustrativní model membrány (podle Madigan a Martinko, 2006)

Základem cytoplazmatické membrány je fosfolipidová dvojrstva s proteiny (Obr. 9.). Celistvost struktury zajišťuje jak přirozená vlastnost fosfolipidů (Obr. 10) obracet se k vodnému prostředí hydrofilními a samy k sobě hydrofóbními konci molekuly, tak mezimolekulové Van der Waalsovy síly mezi jednotlivými fosfolipidy. Navíc ke stabilitě membrány přispívá i přítomnost iontů  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$ . Tento komplexní membránový systém byl nazván „Modelem tekuté mozaiky“ (Singer a Nicolson, 1972)



**Obr.10.** Struktura fosfolipidu (podle Madigan a Martinko, 2006)

---

Každý druh bakterie má svou unikátní skladbu membránových MK. I některé jednotlivé MK jsou druhově specifické. Za optimálních růstových podmínek se MK využívají k identifikaci druhu mikroorganismu (The Sherlock® Microbial Identification System, Newark, Delaware USA). Například grampozitivní bakterie jsou typické větvenými MK - i14:0; i15:0; a15:0; i16:0; i17:0; a17:0, gramnegativní cy17:0, cy19:0,16:1ω5c, 18:1ω9c, 15:1ω4c, 18:1ω7c, 17:1ω9c (O'Leary and Wilkinson, 1988; White et al.,1996; Zelles, 1997). Aktinomyceety obsahují typicky 10Me16:0; 10Me17:0; 10Me18:0 fosfolipidové mastné kyseliny (Kroppenstedt, 1985).

Cytoplazmatická membrána se aktivně vytváří a mění v průběhu života buňky a díky těsnému vztahu s vnějším prostředím je schopná reagovat svým složením na změnu okolních podmínek.

### **2.3.1. Homeoviskózní adaptace a membránová fluidita**

Bakterie je schopna měnit složení membránových MK v závislosti na vnitřních (růstová fáze) a vnějších (teplota, pH, tlak, dostupnost živin atd.) faktorech a tím přizpůsobovat svou membránu tak, aby uchovala její funkční stav, tedy určitou míru propustnosti a fluidity.

Membránová fluidita je schopnost membránových fosfolipidů a proteinů se vůči sobě pohybovat. Modifikace membránové fluidity v případě potřeby buňky probíhá přes tři různé procesy: změna délky, větvení a nasycení. Obecně nenasycené MK, MK s krátkým řetězcem či větvené MK (včetně cyklicky-větvených MK) zvyšují tekutost membrány MK. Pohyblivost komponent membrány vůči sobě navzájem závisí také na teplotě, pH apod. (de Mendoza a Cronan, 1983; Russell, 1984; de Mendoza et al., 1993; Shinitzki, 1984; Denich 2003). Jedním z nejzákladnějších procesů je snižování fluidity se stářím bakterie (Nagy, 1979).

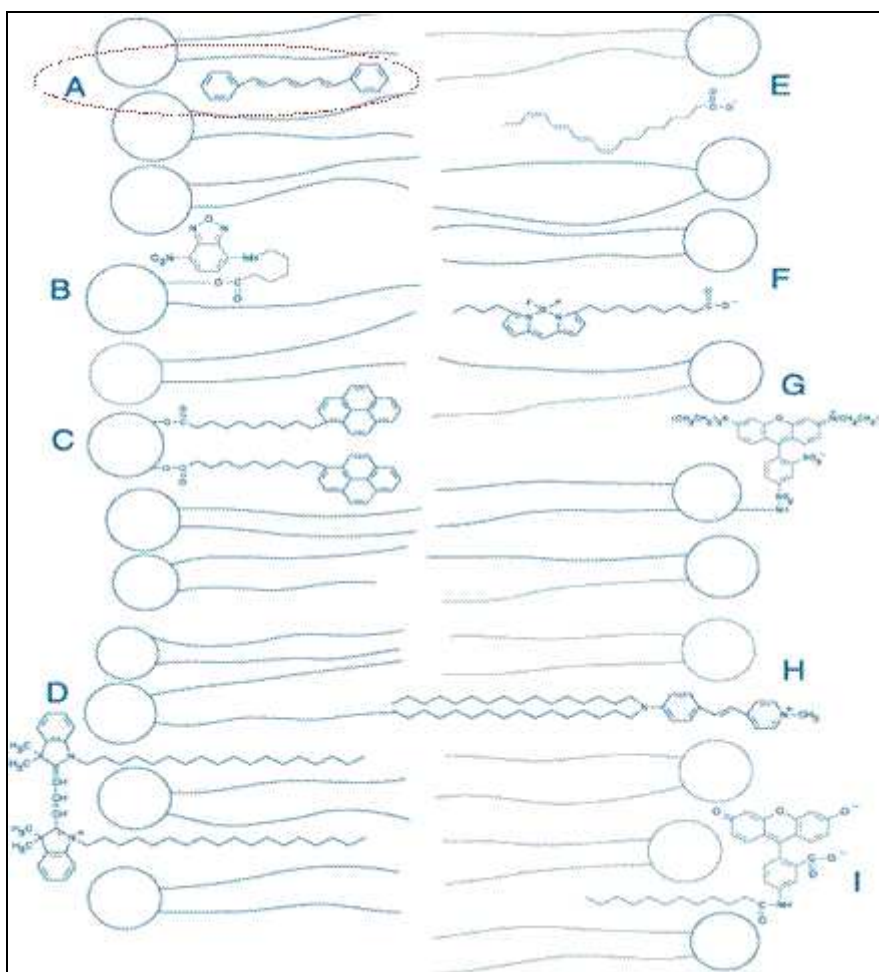
Pokud buňka například roste při zvýšené teplotě, její membrána má podle Sinenského (1974) tendenci být tekutější, proto bakterie zabudovává do své membrány delší a nasycené řetězce MK, které změnu vyrovnávají, neboť mají vyšší bod tání. Naopak pokud je bakterie vystavena šoku nízké teploty, přejde z tekutého stavu do tužší, gelovité formy a je nutné inkorporovat do membrány MK, které udrží původní tekutost a které mají zároveň nižší bod tání, tedy například větvené či cyklické MK. Bakterie musí korigovat fluiditu membrány podle aktuálních podmínek k optimálnímu funkčnímu stavu, který tak udrží potřebnou homeostázu buňky a propustnost membrány. Toto přizpůsobování se nazývá **homeoviskózní adaptace**. Nejvýznamější bakterie, které obsahují cyklicky-větvené MK ve své membráně jako majoritní složku, je gram-pozitivní termofilní rod *Alicyclobacillus*, zvláště pak termo-

acidofilní *Alicyclobacillus acidophilus*, jehož hlavní membránovou komponentou je  $\omega$ -cyklohexyl (Matsubara et al., 2002). Dalšími jsou bakterie z rodu *Sulfobacilli*, také termoacidofilní bakterie mající jako hlavní složku v membráně  $\omega$ -cyklohexylovou MK (Dufresne, et al., 1996; Golovacheva a Karavaiko, 1979; Norris et al., 1996). Zde pravděpodobně cyklicky-větvené MK slouží k ochraně před acidním prostředím a případně vyšší teplotou (Kannenberg, 1984; Chang a Kang, 2004).

K měření fluidity se dnes běžně používá fluorescenční anizotropie sond, které se zabudují do fosfolipidové dvojvrstvy. Je to biofyzikální metoda, jejíž princip spočívá v excitaci fluoroforu polarizovaným světlem (vektor intenzity  $E$  má konstantní směr). Přednostně jsou excitovány ty molekuly fluoroforu, jejichž excitační dipól je paralelní s vektorem  $E$  (fotoselekce). Pro výpočet anizotropie fluorescence se používá následující vzorec:  $r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 I_{\perp})$ , kde  $I_{\parallel}$  a  $I_{\perp}$  jsou složky světelné intenzity rovnoběžné (vertikálně orientované) nebo kolmé (horizontálně orientované) ke směru polarizace budícího záření, při excitaci vertikálně polarizovaným světlem. Celková intenzita fluorescence je pak  $I_0 = I_{\parallel} + 2 I_{\perp}$ .

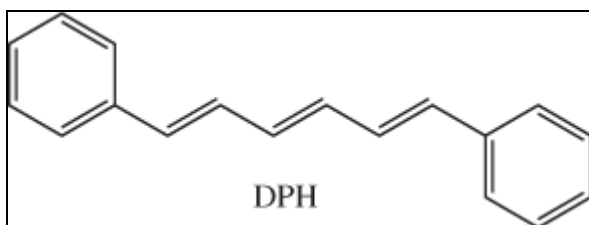
Metoda je vhodná pro různé biofyzikální a biochemické studie, například zkoumání fyzikálních vlastností biologických membrán a jejich změn, tj. například měření fluidity, kdy fluidita je inverzní hodnota k polarizaci či k anizotropii (Litman a Berenholz, 1982; Trevors, 2003). Při studiu biomembrán prostřednictvím této metody se využívá fluorescenčních sond (Obr. 11.), což jsou molekuly, které různým způsobem s membránami interagují. Vyvolané změny odrážejí vlastnosti membrány (Lakowicz, 1999).





**Obr. 11.** Lokalizace a orientace vybraných fluorescenčních sond ve fosfolipidové dvojvrstvě: A)DPH, B)NBD-C<sub>6</sub>-Hpc, C)bis-pyrene-PC, D) Dil, E) *cis*-parinaric acid, F)BODIPY 500/510 C<sub>4</sub>, C<sub>9</sub>, G) *N*-Rh-PE, H)DiA, I)C<sub>12</sub>-fluorescein (podle Haugland, 2002)

Nejčastěji využívanou sondou při studium dynamiky membrán, například při značení zbytků MK, je hydrofóbní molekula 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu (DPH, absorpční maximum 355 nm, emisní maximum 425nm ; viz Obr.12. ).



**Obr. 12.** Molekula sondy DPH (převzato od Gracetto et al., 2010)

Tato fluorescenční molekula se dostane mezi MK a zabuduje se kolmo k rovině membrány, její intenzita fluorescence se poté zvýší až tisíckrát. Pokud by byla DPH sonda ale v polárním prostředí, nedošlo by k fluorescenci, stejně tak, pokud se vyskytne při vyšších koncentracích, fluorescence ustane. Tyto vlastnosti jsou při studiu membrán velmi výhodné (Heřman et al., 1994).

Nejvíce experimentů s adaptací membránových MK bylo provedeno na gram pozitivní modelové bakterii *Bacillus subtilis*. Zjistilo se, že změny fosfolipidových MK závisících na teplotě jsou ovlivněny enzymy syntetázou acyl-CoA a acyl-CoA glycerolfosfáttransacylázou a desaturázou (Sinenski, 1971; Overath et al., 1969). Byly prokázány změny složení MK při teplotní adaptaci bakterie *Bacillus subtilis* a s tím spojená změna fluidity membrány. Při optimální teplotě růstu této bakterie tvořily větvené MK z celkového složení 80% (především a15:0 s nízkou teplotou tání) a nevětvené MK jako 16:0, 18:0 a 18:1 byly zastoupeny minoritně. Po upravení teploty ze 40°C na 20°C tyto nevětvené MK převládly, zároveň se zvýšilo zastoupení a15:0 a membrána bakterie se rigidizovala, tedy byla méně fluidní (Heřman et al., 1994; Konopásek et al., 1999; Beranová, 2008; Beranová, 2010).

Zajímavou pokusnou skupinou pro alternace MK jsou termofilní nebo termoacidofilní organismy. Například práce Siristové (2011) se zabývala bakteriemi *Geobacillus stearothermophilus* a *Meiothermus ruber*, které byly kultivovány v mediu s přidavkem  $\omega$ -cyklopropylu,  $\omega$ -cyklobutylu,  $\omega$ -cyklopentylu nebo  $\omega$ -cyklohexylu a byly u nich sledovány rozdíly ve fluiditě. Siristová zjistila, že u těchto termofilních organismů je fluidita membrány vyšší s vyšším množstvím  $\omega$ -cyklo-větvených MK vyskytujících se v membráně.

U bakterie *S. n. ssp. asukaensis* je dominantní mastnou kyselinou také již zmíněná a15:0, ale především kyselina i16:0 (Hu a Floss, 2006). I-větvené MK v porovnání s a-větvenými snižují membránovou fluiditu, a-větvené ji zvyšují. Je to díky rozdílným teplotám tání těchto MK, i-větvené mají vyšší teploty tání než a-větvené. Jejich vzájemný poměr je velmi důležitý pro konečnou tekutost membrány (Russell, 1984). Změny tohoto poměru byly dobře popsány například u gram-pozitivní bakterie *Listeria monocytogenes* v pracích Zhu et al. (2005) a Giotise et al. (2007). Podobně i nasycené MK (STFA) jsou do membrány inkorporovány při zvýšené růstové teplotě, aby ji tak rigidizovaly, jak ukázala již práce Sinenského (1971).

### 2.3.2. Propustnost membrány

Bakterie mění skladbu MK a ovlivňují fluiditu a prostupnost membrány i v závislosti na stáří buňky a produkci sekundárních metabolitů. Ty se vytvářejí ve stacionární fázi bakteriálního růstu. S tím je spjato nutné zvýšení propustnosti membrány. Pravděpodobným prostředkem transportu těchto látek ven z buňky jsou tzv. efluxní pumpy v CPM.

Efluxní pumpy jsou vázané proteinové kanály, které umožňují selektivní tok látek oběma směry. Membránové transportéry mohou být úzce látkově specifické nebo mohou transportovat široké rozmezí látek, ty jsou pak nazývány „multidrug-transporters“. Širokospektré transportéry zřejmě reagují jen na hydrofóbní povahu molekul a ne na přesnější molekulární složení. Aktivně se jimi přenášejí právě nadbytečné nebo pro buňku toxické látky, včetně antibiotik (Blackmore, 2001).

Zde také mimo jiné leží mechanismus rezistence některých grampozitivních bakterií k makrolidům, tetracyklinům a fluorochinolonům. Inhibitory efluxních pump jsou jedním z prostředků blokování tohoto nejrozšířenějšího mechanismu bakteriální rezistence (Levy, 1992; Lee a Lomovskaya, 1998; Lee et al., 2001).

Funkčnost efluxních pump je také podmíněna okolní membránou, tedy její tekutostí a složením. Na tom tedy závisí schopnost bakterie zbavovat se přebytečných látek metabolismem. Experimenty na bakterii *Listeria monocytogenes* a *Listeria innocua* ukázaly zvýšenou schopnost rezistence k antibiotikům QACs (povrchově aktivní látky), např. k cetrimidu, pokud byla bakteriální membrána tekutější. S vyšší fluiditou se totiž také zvýšila hydrofobicita membrány, která brání těmto antibiotikům se na membránu navázat a proniknout dovnitř buňky (Moorman et al., 2007).

## 2.4 Cíle práce a pracovní hypotézy

Vedle druhově typických i- a a-větvených MK se v membráně producentských streptomycet objevují i neobvyklé  $\omega$ -alicyklicky-větvené MK. Některé z nich jsou úzce spjaté s tvorbou antibiotik.

Podle jejich struktury lze předpokládat, že budou významně zasahova do stavu fluidity cytoplazmatické membrány. Ačkoli literatura uvádí změnu obsahu těchto  $\omega$ -alicyklicky-větvených MK v membráně v závislosti na zvýšené produkci antibiotik (Hu a Floss, 2006), doposud nebylo ověřeno, zda a jak se tato změna promítne ve změně fluidity membrány.

**Cílem této diplomové práce bylo získat tyto nové informace; tj. zjistit, zda a jak se změni fluidity cytoplazmatické membrány a skladba membránových MK typového produkčního kmene *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* v podmínkách zvýšené produkce antibiotika asukamycinu.**

Podmínky zvýšené produkce antibiotika bylo docíleno tzv. stimulovanou kultivací kultury (v podmínkách přidavku prekursoru antibiotika; stimulovaná varianta), kontrolu reprezentovala kultivace bez přidavku prekursoru antibiotika (kontrolní varianta) (Hu a Floss, 2006). Parametry skladby MK a fluidity membrány byly sledovány v exponenciální (24 hod) a stacionární (96 hod) fázi růstu.

**Na základně literárního přehledu lze předpokládat:**

- 1. Rozdíly ve složení membránových MK mezi exponenciální a stacionární fází růstu *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*** (v exponenciální fázi růstu lze předpokládat více MK podporujících vyšší fluiditu membrány – předpokládáme vyšší aktivitu na membránách)
- 2. Fluidita membrány *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*** v exponenciální fázi růstu bude vyšší než ve stacionární
- 3. Rozdíly ve složení membránových MK i fluidity membrány se v podmínkách produkce antibiotika** mezi exponenciální a stacionární fází růstu ještě zvětší oproti kontrolním podmínkám. (Stimulovaný růst v podmínkách přidavku prekursoru asukamycinu je doprovázený zvýšeným obsahem  $\omega$ -alicyklicky-větvených MK – zejména ve stacionární fázi růstu – a zvýšenou fluiditou membrány, zejména v exponenciální fázi.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Pokusný mikroorganismus

K pokusu byl použit typový kmen *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* (ATCC29757), produkující antibiotikum asukamycin.



**Obr. 13.** Kultura *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* na zpevněném agarovém médiu

Kultura *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis* byla uchovávána při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve formě glycerolových konzerv (poměr živného média a 50% roztoku glycerolu byl 7 : 3; použité médium: TSB - Trypticase Soy Broth, (Becton & Dickinson). Po rozmražení glycerolové konzervy byla kultura oživena na zpevněném agarovém médiu (TSBA) na Petriho miskách při teplotě  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Obr. 13.).

### **Složení živného média TSB (A) - Trypticase Soy Broth (Agar):**

Kasein	17 g
Sojová mouka	3 g
Dextróza	2,5 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Destilovaná voda	1000 ml
(Agar)	(18,0 g)
pH	7,3±0,2

Oživená kultura byla použita pro přípravu inokula pro vlastní experiment.

U pokusného kmene byla provedena doprovodná charakteristika - citlivost k vybraným antibiotikům (Tab. 1.), která je uvedena v příloze na konci práce.

### **3.2. Schéma inkubačního pokusu**

20 ml TSB média ve 100 ml Erlenmayerové baňce bylo zaočkováno 1-2 kličkami kultury (cca 3-6 mg) a inkubováno při 28 °C 24 hodin, za aeračních podmínek (inkubační třepačka KS15, Edmund Buhler GmbH, 160 kvyů/min).

Takto připravené inokulum bylo použito na vlastní inkubační pokus studovaného kmene, který probíhal při teplotě 28 °C za aerobních podmínek ve 40 ml tekutého média GYM (Shima et al., 1996) ve 250ml Erlenmayerových baňkách, které byly zaočkovány ze stejného předkultivačního inokula.

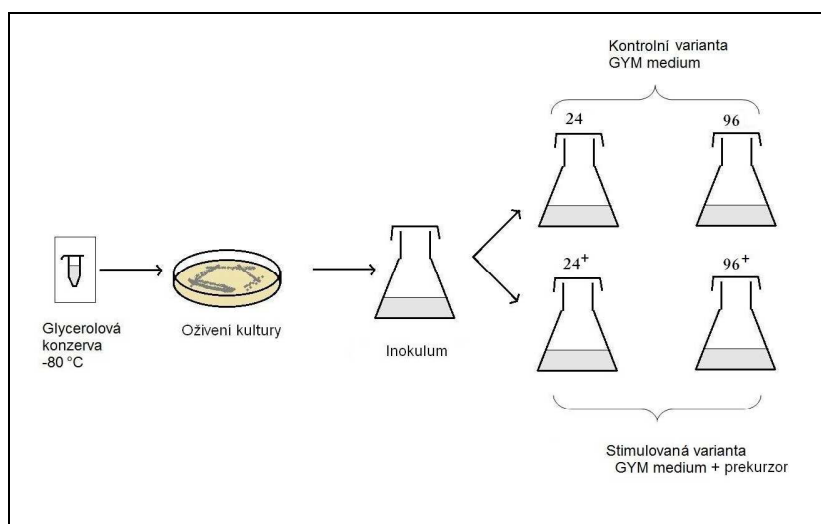
### **Složení živného média GYM – Glucose, Yeast, Malt:**

Glukóza	4 g
Malt extract	10 g
Yeast extract	4 g
NZ amin A	1 g
OB soli	3 ml
Destilovaná voda	1000 ml
pH	7,2

Inokulace média GYM vždy probíhala v poměru 1ml inokula / 10ml media. Pokus sestával ze dvou růstových variant – z **kontrolní a stimulované varianty** (viz dále, schéma Obr. 14.). Všechny varianty byly po 24 h a 96 h použity k analýze skladby membránových mastných kyselin, ke stanovení fluidity membrány a ke stanovení biomasy.

Kontrolní růst probíhal ve 2 nezávislých pokusech celkem v 7 opakováních (dále jen „**kontrolní varianta**“).

Stimulace produkce ATB probíhala za přidání jeho prekurzoru - kyseliny cyklohexankarboxylové (Sigma-Aldrich) do GYM media (1  $\mu$ l kyseliny / 1 ml média, vzniklé pH = 4,3, neutralizováno 1,4 $\mu$ l 5M NaOH, dále jen „**stimulovaná varianta**“) ve dvou opakováních (1 nezávislý pokus, který však následoval po předpokusu). Kultivace probíhala za stejných podmínek jako kultivace bez přídavku kyseliny v 1000ml Erlenmayerových baňkách. U všech těchto opakování byly odebrány vzorky pro stanovení složení MK a membránové fluidity.



**Obr. 14.** Schéma kultivace *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*

Pro stanovení přírůstků biomasy byl proveden samostatný pokus se stejnými růstovými variantami, ve dvou opakováních. Růst byl navíc kromě 24 a 96 hodinové inkubace sledován také po 48 a 72 hodinách, (tj. v časovém rozestupu 24-48-72-96h).

### 3.3 Stanovení biomasy

Narostlá kultura byla po stanovené době (24h, 48, 72 a 96h) zfiltrována (filtrační zařízení pro vakuovou filtraci Sartorius, filtry PROGAPOR, póry 0,3  $\mu$ m). Takto získaná

biomasa po vysušení (60°C, 4h) byla zvážena na analytických vahách (s přesností na 0,01mg).

### **3.4 Stanovení složení membránových MK**

Část zfiltrované 24- a 96-hodinové kultury byla odebrána na analýzu skladby mastných kyselin (MK) stanovovaných ve formě jejich methylesterů (FAME) pomocí plynově chromatografické (GC) metody Instant FAME Method (Microbial ID System Sherlock MIDI, Inc., USA). Bakteriální biomasa zfiltrované kultury (1 klička, cca 3 mg) byla převedena do 2 ml GC vialky k následné extrakci celulárních MK za použití extrakčního kitu (Instant FAME Start Up Kit; MIDI, Inc., USA). Biomasa po přidavku 250 µl roztoku 1 (Instant FAME Reagent 1; směs 95% metanolu a hydroxidu 5% draselného byla za důkladné homogenizace (60 sekund, vortex) lyzována za současné transmethylsterifikace uvolněných celulárních MK. Následovalo přidání 250 µl hexanu (Instant FAME Reagent 2) a homogenizace reakční směsi (10 sekund, vortex). V posledním kroku bylo k vzorku přidáno 250 µl HCl (Instant FAME Reagent 3), k neutralizaci nezreagovaného hydroxidu draselného a oddělení fáze obsahující methylestery MK (horní bezbarvá fáze) od zbytku reakční směsi. Pro dobré oddělení fází byla použita separace na mini-centrifuze (Spectrafuge™ Mini complete, 1.5/2.0 ml rotor). Z horní fáze vzorku pak bylo odebráno 70µl vzorku a převedeno do inzertu GC vialky k následné analýze pomocí plynové chromatografie.

Pro separaci a detekci methylesterů mastných kyselin (FAME) byl použit plynový chromatograf s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID) Agilent 7890A (Agilent Technologies, USA) s kolonou J&W HP-Ultra 2 (25 m x 0,200 mm x 0,33 µm; (5%-fenyl)-metylpolsiloxan; Agilent Technologies, USA). Teplotní program na koloně byl 170 °C 0 min – 28 °C/min – 288 °C 0 min – 60 °C/min – 310 °C 1,25 min (celkový čas 5.83 min). GC-FID pracoval v režimu konstantního průtoku (1,529 ml/min); nástřík byl 2 µl v režimu split (splitový poměr 40:1), teplota na inletu 250 °C, teplota na detektoru 300 °C. Vzorky byly měřeny metodou Instant FAME Method (ITSA1, Sherlock verze 6.0). Před vlastním měřením vzorků byla provedena kalibrace metody pomocí kalibrační směsi standardu (Rapid Method Calibration Standard MIDI 1300-AA). Výsledkem analýzy byl profil detekovaných mastných kyselin s jejich relativním zastoupením (mol %) (100%=suma všech detekovaných MK ve vzorku). Jelikož databáze MIS Sherlock neobsahuje ω-allycyklické MK, bylo nutné zjistit retenční čas této mastné kyseliny v individuálních analýzách pomocí



syntetizovaného standardu a BC-MS verifikace. Potřebné detekční údaje byly poskytnuty školitelkou.

Detekované MK byly podle struktury rozděleny do skupin podle následujícího schématu (Tab. II.) a z vybraných naměřených dat byly spočítány indikátory růstu bakteriální buňky (Tab. III.). Zvláštní pozornost byla věnována  $\omega$ -cyklicky-větveným MK.

**Tab. II.** Rozdělení MK do skupin podle své struktury

Skupina	Zkratka	Mastné kyseliny
Nasyčené i-větvené	<b>i-STFA</b>	i13:0, i14:0, i15:0, i16:0, i17:0, i18:0
Nasyčené a-větvené	<b>a-STFA</b>	a13:0, a14:0, a15:0, a16:0, a17:0,
Terminálně iso- a anteiso-větvené nasycené	<b>t-BR-STFA</b>	i13:0, a13:0, i14:0, a14:0, i15:0, a15:0, i16:0, a16:0, i17:0, a17:0, i18:0
Terminálně větvené mononenasycené	<b>t-BR-MUFA</b>	i16:1H, i17:1 $\omega$ 9, a17:1 $\omega$ 9c, i18:1H
Cyklo-propyl větvené	<b>cyc-FA</b>	cyklopropyl 17:0
$\omega$ -cyklo-větvené	<b><math>\omega</math>-FA</b>	$\omega$ -cyklohexyl 9:0, $\omega$ -cyclohexyl 11:0
Nevětvené mononenasycené	<b>MUFA</b>	15:1 $\omega$ 6c, 16:1 $\omega$ 7/ $\omega$ 6, 17:1 $\omega$ 8c, 19:1 $\omega$ 6/ $\omega$ 7/cyc19, 19:1 $\omega$ 11/ $\omega$ 9, 17:1 $\omega$ 7/ $\omega$ 6, 18:1 $\omega$ 9c
Nevětvené nasycené	<b>STFA</b>	13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0

K zkrácenému popisu jednotlivých MK byl použit následující zápis:

**i/a A:B C**

A = počet uhlíkových atomů

B = počet nenasycených vazeb

C = pozice nenasycené vazby od  $\omega$  konce MK

$\omega$  = poloha dvojná vazba či cyklické struktury od methylového konce řetězce

i = iso větvení (methylová skupina je na posledním uhlíku řetězce před  $\omega$ -konce)

a = anteiso větvení (methylová skupina je na předposledním uhlíku řetězce před  $\omega$ -konce)

cyc=cyclopropylové větvení

**Tab. III.** Indikátory růstu bakteriální buňky

Označení indikátoru	Interpretace hodnot	Literární odkaz
<b>Cyc/prec</b> (cyclopropyl 17:0/16:1 $\omega$ 7)	>2,5 = stres buňky, přechod do stacionární fáze růstu	Navarrete et al., 2000; Kieft et al., 1997
<b>STFA/MUFA</b>	zvýšení poměr = růstový stres	Kieft et al., 1997
<b>iso/anteiso</b> (i-STFA/a-STFA)	zvýšení poměru = rigidnější membrána bakterie	Russell, 1984

### 3.5. Stanovení fluidity membrány

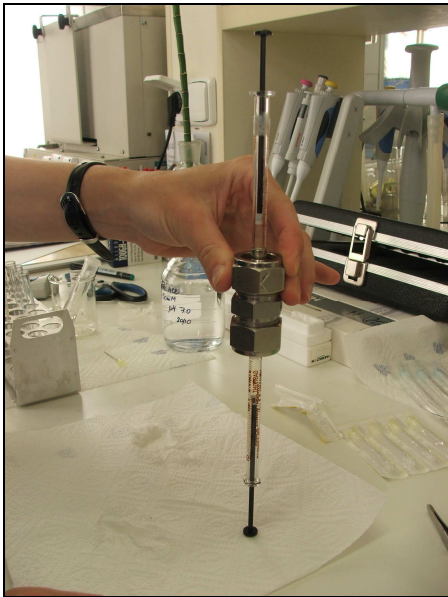
Z filtrované 24- a 96-hodinové biomasy (6 - 30 mg) byly pomocí 1 fázové extrakční směsi chloroform : metanol : fosfátový pufr (v poměru 1,2 : 2,0 : 0,8) extrahovány membránové lipidy (Beranová et al., 2008).

#### Složení 60mM fosfátového pufru:

0,2M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19 ml
0,2M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	81 ml
Destilovaná voda	233 ml
pH	7,4

Po této chloroform-metanolové extrakci byla odebrána spodní chloroformová fáze obsahující lipidy, po odpaření chloroformu dusíkem byla stanovena jejich hmotnost a následně byly uskladněny v – 20 °C.

Před začátkem měření anizotropie fluorescence se vzorky nechaly několik minut vytemperovat při laboratorní teplotě. Vzorky lipidů byly rozpuštěny v chloroformu tak, aby bylo vždy dosaženo stejné koncentrace jednotlivých výsledných suspenzí (3 mg/ml). Do čisté zkumavky bylo odebráno 200  $\mu$ l suspenze. K odpaření chloroformu byl použit proud plynného dusíku tak, aby lipidický extrakt zanechal na stěnách zkumavky tenký film. Následně byly přidány 4 ml pufru (TRIS HCl, 50mM, pH7) a za občasného zahřátí v lázni (38 °C) a třepání byla připravena vzorek mnohovrstevných liposomů. Velikost liposomů se upravila pomocí Liposofastu (AVESTIN, polykarbonový filtr, průměr 100 nm, viz obr. 15.), tím se vytvořily jednovrstevné liposomy. Poté se odebralo 2,5 ml vzorku do křemenné kyvety.



**Obr. 15.** Sestavený Liposofast

Kyveta byla umístěna do spektrofluorometru (Fluoromax-3, Jobin Yvon Horriba, France) a při 37 °C se měřila fluorescence (excitační a emisní maxima při 360 nm a 430 nm) bez přidané sondy (pozadí), dokud se hodnoty neustálily. Poté byl vzorek označen sondou DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien; 2,5 µl; při minimálním osvětlení) a nechal se temperovat (5 - 20 minut).

Anizotropie se měřila v závislosti na teplotě, která se snižovala z 37 °C až na teplotu 14 °C. Výsledné hodnoty se zaznamenávaly po 20 sekundách s přesností na 0,1 °C. Z naměřených dat byly sestrojeny křivky závislosti anizotropie fluorescence DPH sondy na teplotě měření a určena směrnice těchto křivek. **Fluidita odpovídala inverzní hodnotě anizotropie.**

Celý postup byl optimalizován v samostatném nezávislém předpokusu, který potvrdil použitelnost této metody u studovaného kmene.

### **3.6. Vyhodnocení a použité statistické metody**

Data ze získaného profilu detekovaných mastných kyselin s jejich relativním zastoupením (%) byly před statistickým hodnocením transformovány podle vzorce:

$$x = \arcsin ( \text{SQRT} ( \% / 100 ) )$$

Touto transformací se dosáhlo normálního (Gaussova) rozdělení. K vyhodnocení průkaznosti rozdílů byl použit dvoustranný t-test v programu STATISTIKA 10. Zvolená hladina významnosti testů  $\alpha$  byla 0,05.

## 4.VÝSLEDKY

### 4.1. Parametry kontrolní varianty *S. nodosus* ssp. *asukaensis* v exponenciální a stacionární fázi růstu

#### 4.1.1. Stanovení biomasy

Charakteristiku kontrolního růstu *S. nodosus* ssp. *asukaensis* v průběhu 24h – 96h shrnují údaje o biomase kultury v Tab. IV.

**Tab. IV.** Hmotnost biomasy bakteriální populace v jednotlivých fázích růstu ( $n=2$ )

Biomasa (mg s.h. / ml)	Doba inkubace (hod)			
	24	48	72	96
Kontrolní varianta	2,6038	4,4096	5,7736	5,6059

Z údajů je dobře patrné, že biomasa kultury v exponenciální fázi růstu (24 hod) se významně statisticky lišila v porovnání s 96hodinovou ( $P=0,0023$ ), která se naopak nelišila od biomasy 72hodinové kultury ( $P=0,7975$ ) a dobře tak charakterizovala stacionární fázi růstu.

#### 4.1.2 Stanovení složení mastných kyselin

Vzorky bakteriální kultury kontrolní varianty obsahovaly v exponenciální fázi 21-27 a ve stacionární fázi 22-31 MK, celkem bylo detekováno 46 MK. (Tab. V.).

**Tab. V.** Porovnání obsahu MK (%) 24h a 96h kontrolní varianty ( $n=7$ ),  $P=0,05$

Mastné kyseliny	Doba inkubace (hod)		
	24	96	P
i11:0	0,027	0,000	0,337
i12:0	0,000	0,000	1,000
12:0	0,000	0,274	0,337
i13:0	0,118	0,072	0,286
a13:0	0,118	0,047	0,092
13:0	0,010	0,218	0,783
i14:0	8,029	9,066	0,154
a14:0	0,000	0,054	<b>0,002</b>
14:0	0,684	0,602	0,515
i15:0	5,203	6,212	<b>0,051</b>
a15:0	22,755	16,780	<b>&lt;0,001</b>
15:1 $\omega$ 6c	0,215	0,281	0,435
15:1 $\omega$ 5c	0,050	0,052	0,999
15:0	1,450	0,740	<b>0,031</b>
i16:1 H	2,394	2,735	0,537
i16:0	25,117	30,186	<b>0,031</b>
a16:0	0,080	0,226	<b>0,004</b>
16:1 $\omega$ 7c / 16:1 $\omega$ 6c	3,442	1,054	<b>0,024</b>
<b><math>\omega</math>-cyklohexyl 9:0</b>	0,000	0,119	<b>0,016</b>
16:0	10,138	7,804	<b>0,025</b>
i17:1 $\omega$ 9c	1,951	2,065	0,657
a17:1 $\omega$ 9c	1,790	2,276	<b>0,019</b>
i17:0	2,493	2,523	0,773
a17:0	8,177	6,573	<b>0,022</b>
17:1 $\omega$ 8c	0,349	0,086	<b>0,046</b>
cyc17:0	2,455	5,632	<b>&lt;0,001</b>
17:0	0,464	0,283	<b>&lt;0,001</b>
i18:1H	0,444	0,523	0,927
i18:0	0,575	1,101	<b>0,001</b>
18:1 $\omega$ 9c	0,545	0,714	0,903
18:1 $\omega$ 7c	0,219	0,263	0,378
<b><math>\omega</math>-cyklohexyl 11:0</b>	0,219	0,385	<b>0,005</b>
18:0	0,491	1,148	<b>0,023</b>
19:1 $\omega$ 9c/19:1 $\omega$ 11c	0,000	0,013	0,337
20:0	0,000	0,057	<b>0,024</b>

MK 15:0 anteiso a 16:0 iso byly zastoupeny v profilu kultury v exponenciální (22,8 % a 25,1 %) i stacionární fázi (16,8 % a 30,1 %) majoritním množstvím.

Obsah některých membránových mastných kyselin kontrolní kultury byl prokazatelně rozdílný v závislosti na růstové fázi bakteriální populace. V exponenciální fázi byl oproti stacionární fázi vyšší obsah 15:0, 16:0, 17:0, 16:1  $\omega$ 7c, a17:1 $\omega$ 8c a a13:0, **a15:0**, a17:0, z a17:1 $\omega$ 8c, naopak nižší bylo zastoupení 18:0 a 20:0, a14:0, i15:0, **i16:0**, a16:0, i18:0, 16:1 $\omega$ 7c / 16:1 $\omega$ 6c, a17:1 $\omega$ 9c a také obsahu všech cyklicky-větvených MK ( **$\omega$ -cyklohexyl 9:0**, **cyklopropyl 17:0** a  **$\omega$ -cyklohexyl 11:0**).

Tab. VI. ukazuje hodnoty zastoupení skupin MK v různé fázi růstu.

**Tab. VI.** Skupiny MK kontrolní varianty v exponenciální (24h) a stacionární (96h) fázi růstu ( $n=7$ ),  $P=0,05$

	Doba inkubace (hod)		
	24	96	P
t-BR-STFA	72,691	72,841	0,989
t-BR-MUFA	6,580	7,076	0,563
cyc-FA	2,455	5,632	<b>&lt;0,001</b>
$\omega$ -FA	0,219	0,504	<b>&lt;0,001</b>
MUFA	4,820	2,591	0,150
STFA	13,236	10,684	<b>0,039</b>

V exponenciální fázi růstu byl prokazatelně nižší obsah **cyc-FA** a  **$\omega$ -FA**, a naopak vyšší obsah STFA než u stacionární fáze růstu.

V tabulce VII. jsou uvedeny poměry mezi vybranými MK či skupinami MK, které jsou růstovými indikátory bakteriální buňky.

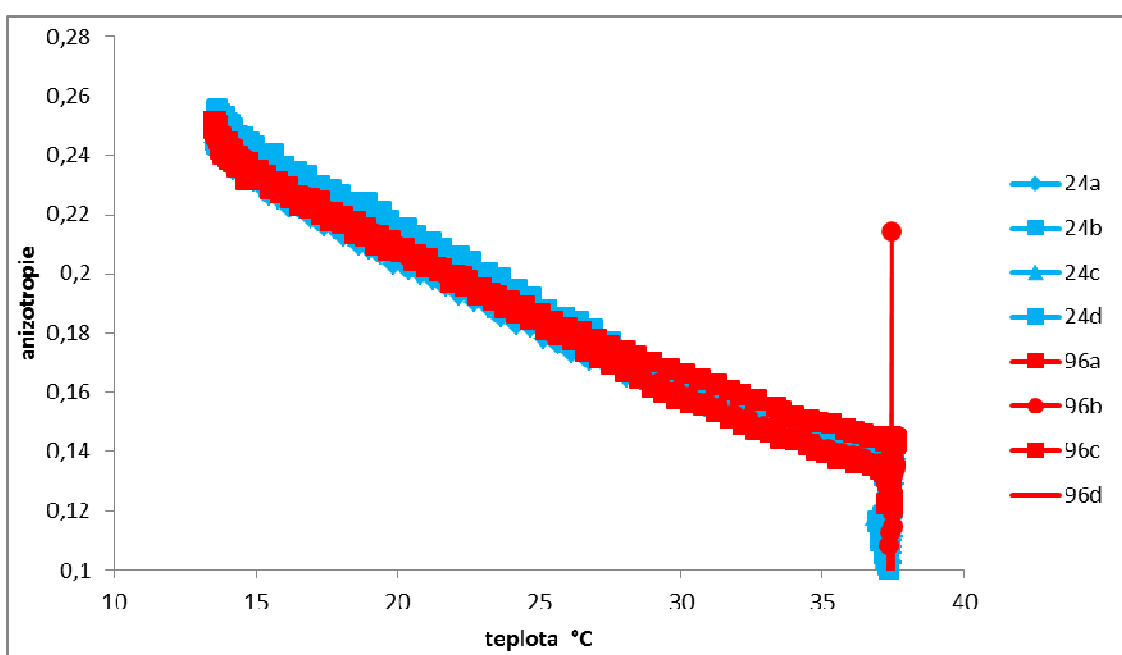
**Tab. VII.** Indikátory růstu buňky podle poměrů MK - poměry mezi exponenciální a stacionární fází kontrolní varianty ( $n=7$ ),  $P=0,05$

	Doba inkubace (hod)		
	24	96	P
Cyc/prec	1,314	<b>7,907</b>	<b>0,001</b>
STFA /MUFA	4,200	4,996	0,531
iso/anteiso	1,348	2,126	<b>0,001</b>

Ve stacionární fázi kontrolní varianty bylo vyšší množství Cys vůči jejímu prekurzoru a jejich poměr činil 7,907. Prokazatelně vyšší bylo také množství i-STFA vůči a-STFA. Porovnání STFA a MUFA neprokázalo žádné rozdíly mezi růstovými fázemi.

#### 4.1.3. Stanovení fluidity membrány

Grafu 1. ukazuje srovnání kultur kontrolní varianty v exponenciální fázi růstu (modrá křivka) a ve stacionární fázi růstu (červená křivka), Tab. VIII. pak porovnání směrníc proložených přímk.



**Graf 1.** Anizotropie fluorescence - srovnání 24h ( $n=4$ ; 24a,b,c,d) a 96h ( $n=4$ ; 96a,b,c,d) kontrolní varianty.

**Tab. VIII.** Průměrné hodnoty směrníc proložených přímk kontrolní varianty

	Doba inkubace (hod)		
	24	96	P
<b>směrnice</b>	-0,0107	-0,0105	0,4648

Mezi křivkami není patrný rozdíl, ani statistické porovnání směrníc proložených přímk (Tab. 9.) neprokázalo výrazně rozdílné hodnoty, a tedy rozdíl ve fluiditě membrán pokusné kultury v exponenciální a stacionární fázi růstu nebyl prokázán.

## 4.2. Parametry stimulované varianty *S. nodosus* ssp. *asukaensis* v exponenciální a stacionární fázi růstu

Podobně jako u kontrolní varianty byly porovnávány rozdíly mezi 24h a 96h kulturou pěstovanou za podmínek stimulace produkce antibiotika.

### 4.2.1 Stanovení biomasy

Charakteristiku růstu 24-96h kultury stimulované k produkci antibiotika shrnují údaje o biomase v Tab. IX.

**Tab. IX.** Hmotnost biomasy bakteriální populace v jednotlivých fázích růstu, ( $n=2$ )

Biomasa (mg s.h. / ml)	Doba inkubace (hod)			
	24+	48+	72+	96+
Stimulovaná varianta	2,926	5,1216	5,8092	5,5065

Stejně jako u kontrolní varianty i biomasa stimulované varianty, ve fázi exponenciálního růstu byla téměř poloviční v porovnání se stacionární 96h kulturou; rozdíl byl statisticky významný ( $P=0,0003$ ). Podobně jako u kontrolní varianty, 96h kultura stimulované varianty už nevykazovala růst (porovnání 72h - 96h,  $P = 0,3098$ ).

### 4.2.2. Stanovení složení mastných kyselin

Vzorky bakteriální kultury stimulované varianty obsahovaly v exponenciální fázi 22-a ve stacionární fázi 27 MK (Tab. X.). MK **a15:0** a **i16:0** opět dominovaly v profilu 24h kultury (23 % a 29,4 %) a i 96h kultury (14,1 % a 17,2 %).



**Tab. X.** Porovnání obsahu MK (%) 24h a 96h kultury stimulované varianty ( $n=2$ ),  
 $P=0,05$

Mastné kyseliny	Doba inkubace (hod)		
	24 <sup>+</sup>	96 <sup>+</sup>	P
i11:0	0,000	0,000	1,000
i12:0	0,074	0,000	1,000
12:0	0,099	0,136	0,921
i13:0	0,133	0,000	<0,001
a13:0	0,165	0,000	0,002
13:0	0,000	0,048	1,000
i14:0	11,000	5,117	0,004
a14:0	0,000	0,000	1,000
14:0	0,635	0,675	0,672
i15:0	4,671	3,198	0,051
a15:0	22,989	14,064	0,001
15:1 $\omega$ 6c	0,000	0,000	1,000
15:1 $\omega$ 5c	0,092	0,153	0,499
15:0	0,859	0,522	0,060
i16:1 H	0,158	0,584	0,092
i16:0	29,415	17,237	0,009
a16:0	0,063	0,028	0,808
16:1 $\omega$ 7c / 16:1 $\omega$ 6c	0,394	2,390	0,030
<b><math>\omega</math>-cyklohexyl 9:0</b>	0,000	0,000	1,000
16:0	9,744	7,677	0,054
i17:1 $\omega$ 9c	0,279	0,660	0,158
a17:1 $\omega$ 9c	0,634	1,394	0,095
i17:0	3,226	1,933	0,013
a17:0	8,494	6,108	0,013
17:1 $\omega$ 8c	0,000	0,000	1,000
cyc17:0	1,421	4,176	0,026
17:0	0,688	0,353	0,007
i18:1H	0,000	0,000	1,000
i18:0	1,128	1,344	0,390
18:1 $\omega$ 9c	1,007	1,847	0,060
18:1 $\omega$ 7c	0,110	0,000	0,016
<b><math>\omega</math>-cyklohexyl 11:0</b>	1,503	28,938	<0,001
18:0	0,579	0,813	0,231
19:1 $\omega$ 9c/19:1 $\omega$ 11c	0,000	0,000	1,000
20:0	0,000	0,000	1,000

Také u stimulované podobně jako u kontrolní varianty růstu byl zaznamenán rozdíl v relativním zastoupení některých membránových mastných kyselin v exponenciální a

stacionární fázi růstu. V převážné většině průkazných rozdílů (15:0, 16:0, 17:0 a i13:0, a13:0, i14:0, i15:0, **a15:0**, **i16:0**, i17:0, a17:0, 18:1ω9c) se jednalo o pokles % zastoupení MK ve stacionární fázi v porovnání s exponenciální fází. Stoupl pouze obsah 3MK: 16:1ω7c / 16:1ω6c, **cyklopropylu17:0** a **ω-cyklohexyl 11:0**. Nárůst **ω-cyklohexyl 11:0** ve stacionární fázi byl enormní (z 1,5 na 29%).

Porovnání skupin MK stimulované varianty shrnuje Tab. XI.

**Tab. XI.** Skupiny MK stimulovaného růstu liší se růstovou fází - 24h ( $n=2$ ) a 96h ( $n=2$ ),  $P=0,05$

	Doba inkubace (hod)		
	24 <sup>+</sup>	96 <sup>+</sup>	P
t-BR-STFA	81,359	49,348	<b>0,003</b>
t-BR-MUFA	1,070	2,715	<b>0,047</b>
cyc-FA	1,421	4,176	0,026
ω-FA	1,503	28,938	<b>&lt;0,001</b>
MUFA	1,705	4,547	<b>0,022</b>
STFA	12,604	10,162	0,114

Porovnání prokázalo vyšší obsah **ω-FA**, **cyc-FA**, **t-BR-MUFA**, **MUFA** a naopak nižší obsah **t-BR-STFA** u kultury ve stacionární fázi růstu.

V tabulce XII. jsou uvedeny MK-indikátory stavu bakteriální kultury, které naznačují lepší růstové podmínky ve stacionární než exponenciální fázi růstu za podmínek stimulace produkce antibiotik.

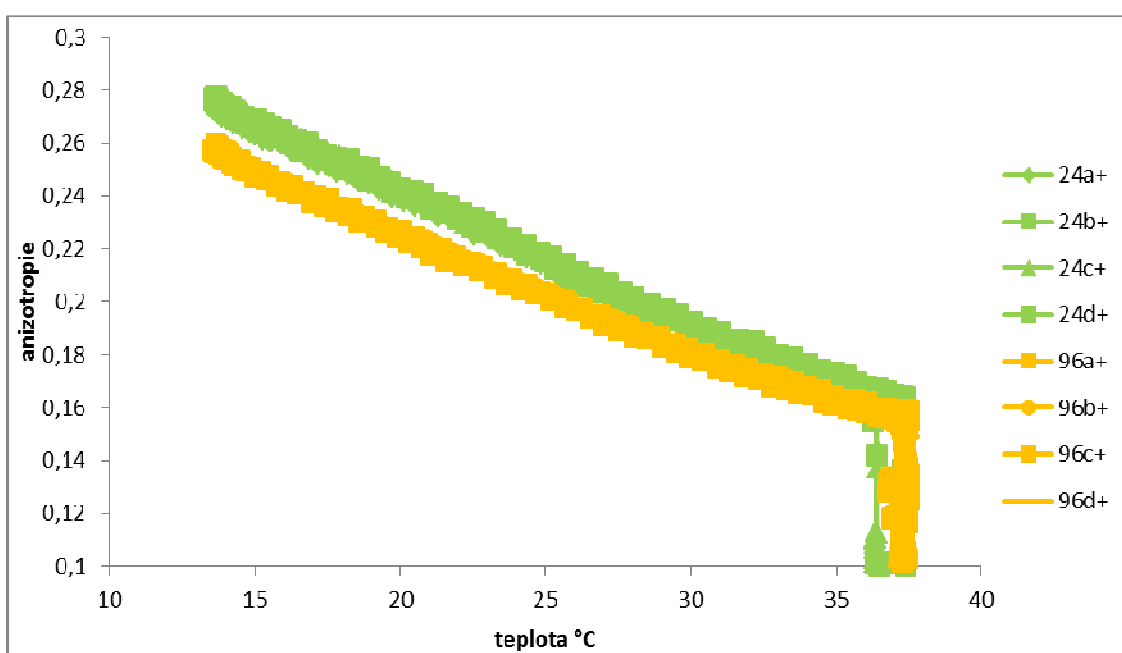
**Tab. XII.** Indikátory buňky podle poměrů MK - poměry mezi exponenciální a stacionární fází růstu stimulovanou kulturou ( $n=2$ ),  $P=0,05$

	Doba inkubace (hod)		
	24 <sup>+</sup>	96 <sup>+</sup>	P
Cyc/prec	3,607	1,995	0,121
STFA /MUFA	7,520	2,241	<b>0,016</b>
iso/anteiso	1,566	1,450	0,267

V exponenciální fázi růstu byl zjištěn vyšší poměr **STFA/MUFA**, poměr **Cyc/prec** ukázal na hodnoty stresu buňky, hodnota  $3,607 > 2,5$ , poměr iso- a anteiso- větvených MK se prokazatelně nezměnil.

#### 4.2.3. Stanovení fluidity membrány

Graf 2. porovnává rozdíl mezi kulturami stimulované varianty v exponenciální fázi růstu (zelená křivka) a stacionární fáze růstu (žlutá křivka), Tab. XIII. pak porovnává směrnice proložených přímek.



**Graf 2.** Anizotropie fluorescence - srovnání 24h ( $n=4$ ; 24a,b,c,d) a 96h kultury stimulované varianty ( $n=4$ ; 96a+,b+,c+,d+)

**Tab. XIII.** Průměrné hodnoty směrnic proložených přímek stimulované varianty

	Doba inkubace (hod)		
	24+	96+	P
<b>směrnice</b>	-0,0098	-0,0092	<b>0,0022</b>

Membrána v exponenciální fázi stimulované varianty má vyšší anizotropii než ve stacionární fázi kultura stimulované varianty, což prokázalo i statistické srovnání směrnic

proložených přímk (Tab. VIII.). Tento výsledek ukazuje nižší míru fluidity membrány ve stacionární fázi růstu než v exponenciální fázi.

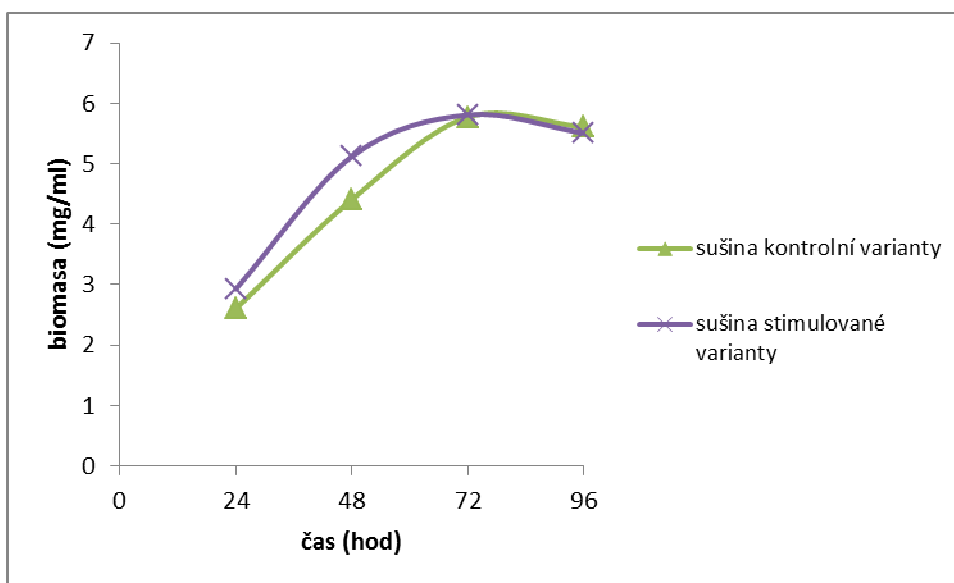
### 4.3. Porovnání parametrů kontrolní a stimulované varianty *S. nodosus* ssp. *asukaensis*

#### 4.3.1. Stanovení biomasy

Charakteristiku růstu kontrolní a stimulované varianty shrnují údaje o biomase v Tab. XIV a Graf 3.

**Tab. XIV.** Hmotnost biomasy bakteriální populace v jednotlivých fázích růstu ( $n=2$ ) kontrolní a stimulované varianty,  $P=0,05$

Biomasa (mg s.h. / ml)	Doba inkubace (hod)			
	24	48	72	96
Kontrolní varianta	2,6038	4,4096	5,7736	5,6059
Stimulovaná varianta	2,9260	5,1216	5,8092	5,5065
P	<b>0,018</b>	0,054	0,958	0,561



**Graf 3.** Graf růstu bakteriální populace

Statistické vyhodnocení prokázalo **rozdíl hmotnosti v exponenciální fázi růstu**, ve 24h, mezi kontrolní a stimulovanou variantou. Kultura stimulované varianty rostla rychleji. V dalších fázích růstu nebyl tak velký rozdíl již patrný.

### 4.3.2. Stanovení složení mastných kyselin

Obsah některých MK se prokazatelně lišil v závislosti na růstové variantě (Tab. XV.).

**Tab. XV.** Porovnání obsahu MK (%) kontrolní a stimulované varianty ve stejných růstových fázích, 24 a 96 ( $n=7$ ), 24<sup>+</sup> a 96<sup>+</sup> ( $n=2$ ),  $P=0,05$

Mastné kyseliny	Doba inkubace (hod)					
	24	24 <sup>+</sup>	P	96	96 <sup>+</sup>	P
i11:0	0,027	0,000	0,626	0,000	0,000	1,000
i12:0	0,000	0,074	0,052	0,000	0,000	1,000
12:0	0,000	0,099	0,052	0,274	0,136	0,271
i13:0	0,118	0,133	0,662	0,072	0,000	0,090
a13:0	0,118	0,165	0,432	0,047	0,000	0,093
13:0	0,010	0,000	0,626	0,218	0,048	0,466
i14:0	8,029	11,000	<b>0,054</b>	9,066	5,117	<b>&lt;0,001</b>
a14:0	0,000	0,000	1,000	0,054	0,000	0,091
14:0	0,684	0,635	0,854	0,602	0,675	0,653
i15:0	5,203	4,671	0,571	6,212	3,198	<b>&lt;0,001</b>
a15:0	22,755	22,989	0,878	16,780	14,064	0,156
15:1 $\omega$ 6c	0,215	0,000	0,336	0,281	0,000	0,092
15:1 $\omega$ 5c	0,050	0,092	0,610	0,052	0,153	0,127
15:0	1,450	0,859	0,358	0,740	0,522	<b>0,022</b>
i16:1 H	2,394	0,158	<b>0,004</b>	2,735	0,584	<b>0,009</b>
i16:0	25,117	29,415	0,225	30,186	17,237	<b>0,001</b>
a16:0	0,080	0,063	0,682	0,226	0,028	<b>0,001</b>
16:1 $\omega$ 7c / 16:1 $\omega$ 6c	3,442	0,394	0,071	1,054	2,390	0,069
<b><math>\omega</math>-cyklohexyl 9:0</b>	0,000	0,000	1,000	0,119	0,000	0,194
16:0	10,138	9,744	0,822	7,804	7,677	0,951
i17:1 $\omega$ 9c	1,951	0,279	<b>&lt;0,001</b>	2,065	0,660	<b>0,002</b>
a17:1 $\omega$ 9c	1,790	0,634	<b>0,001</b>	2,276	1,394	<b>0,008</b>
i17:0	2,493	3,226	0,385	2,523	1,933	0,054
a17:0	8,177	8,494	0,739	6,573	6,108	0,490
17:1 $\omega$ 8c	0,349	0,000	<b>0,050</b>	0,086	0,000	0,224
cyc17:0	2,455	1,421	0,138	5,632	4,176	0,057
17:0	0,464	0,688	<b>0,001</b>	0,283	0,353	0,218
i18:1H	0,444	0,000	<b>&lt;0,001</b>	0,523	0,000	0,046
i18:0	0,575	1,128	<b>0,003</b>	1,101	1,344	0,336
18:1 $\omega$ 9c	0,545	1,007	0,222	0,714	1,847	0,125
18:1 $\omega$ 7c	0,219	0,110	0,610	0,263	0,000	<b>&lt;0,001</b>
<b><math>\omega</math>-cyklohexyl 11:0</b>	0,219	1,503	<b>&lt;0,001</b>	0,385	28,938	<b>&lt;0,001</b>
18:0	0,491	0,579	0,627	1,148	0,813	0,561
19:1 $\omega$ 9c/19:1 $\omega$ 11c	0,000	0,000	1,000	0,013	0,000	0,626
20:0	0,000	0,000	1,000	0,057	0,000	0,230

U stimulované varianty v **exponenciální fázi** růstu byl zjištěn vyšší obsah i14:0, 17:0, i18:0, **ω-cyklohexylu 11:0** a naopak nižší obsah u i16:1H, i18:1H, i17:1ω9c, a17:1ω9c, 17:1ω8c, i18:1H než u kontrolní varianty ve stejné fázi růstu.

U stimulované varianty byl ve **stacionární fázi** zjištěn vyšší obsah MK **ω-cyklohexylu 11:0** a nižší obsah i14:0, i15:0, 15:0, i16:1 H, **i16:0, ω-cyklohexyl 9:0**, i17:1ω9c, a17:1 ω9c, 18:1ω7c.

Porovnání skupin MK lišících se růstovou variantou ukazuje Tab. XVI.

**Tab. XVI.** Skupiny MK kontrolní a stimulované varianty - 24 ( $n=2$ ), 24<sup>+</sup> ( $n=2$ ) a 96 ( $n=2$ ), 96<sup>+</sup> ( $n=2$ ),  $P=0,05$

	Doba inkubace (hod)					
	24	24 <sup>+</sup>	P	96	96 <sup>+</sup>	P
t-BR-STFA	72,691	81,359	0,051	72,841	49,029	<0,001
t-BR-MUFA	6,580	1,070	<0,001	7,076	2,637	0,003
cyc-FA	2,455	1,421	0,138	5,632	4,176	0,057
ω-FA	0,219	1,503	<0,001	0,504	28,938	<0,001
MUFA	4,820	1,705	0,227	2,591	4,549	0,077
STFA	13,236	12,604	0,692	10,684	10,224	0,824

. Byl prokázán vyšší obsah **ω-cyklo-větvených** MK a nižší obsah **t-BR-MUFA** u stimulované varianty v exponenciální fázi než u kontrolní varianty ve stejné fázi růstu.

U stimulované kultury ve stacionární fázi růstu byl zjištěn vyšší obsah **ω-cyklo-větvených** a nižší obsah **t-BR-STFA** a **t-BR-MUFA** než u kontrolní varianty.

V tabulce XVII. jsou uvedeny poměry mezi vybranými MK či skupinami MK ve stejné fázi růstu, lišící se růstovou variantou.

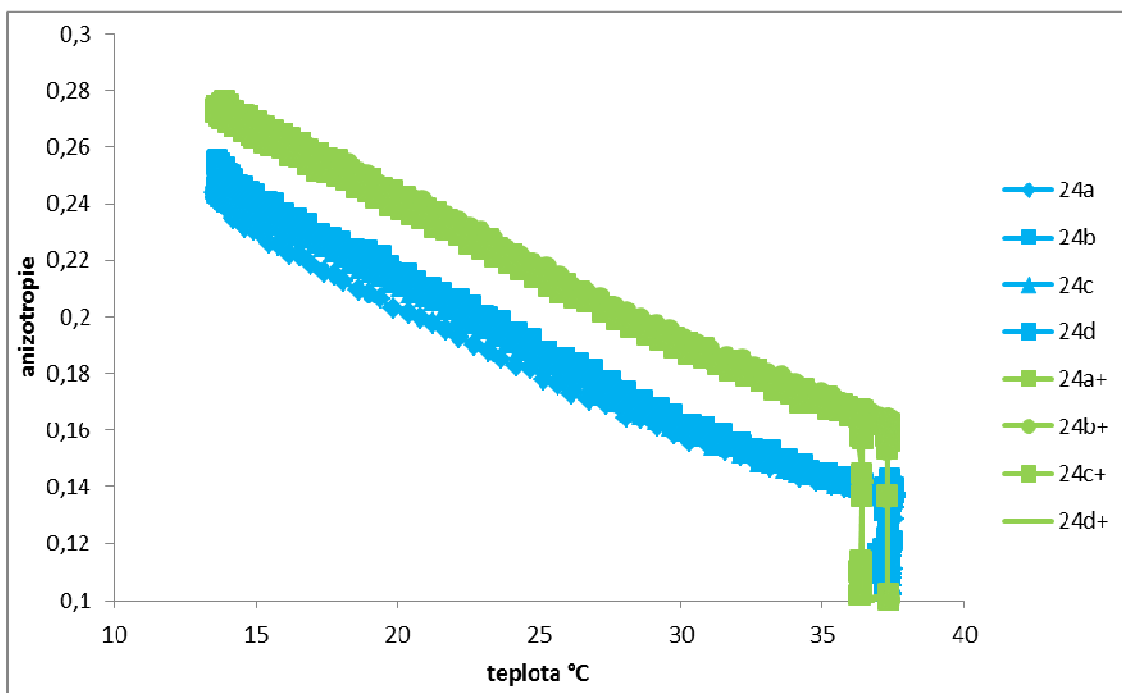
**Tab. XVII.** Indikátory růstu buňky podle poměrů MK - poměry mezi kontrolní a stimulovanou variantou ve stejných fázích růstu, 24 a 96 ( $n=7$ ), 24<sup>+</sup> a 96<sup>+</sup> ( $n=2$ ),  $P=0,05$

	Doba inkubace (hod)					
	24	24 <sup>+</sup>	P	96	96 <sup>+</sup>	P
Cyc/prec	1,314	3,607	0,055	7,907	1,861	0,085
STFA /MUFA	4,200	7,520	0,153	4,996	0,066	0,160
iso/anteiso	1,348	1,566	0,173	2,126	1,427	0,064

Statistické zhodnocení dat neprokázalo žádné rozdíly mezi růstovými variantami.

### 4.3.3. Stanovení fluidity membrány

Graf 4. porovnává anizotropii fluorescence u kontrolní a stimulované varianty v exponenciální fázi růstu, Tab. XVIII. porovnává směrnice proložených přímek.



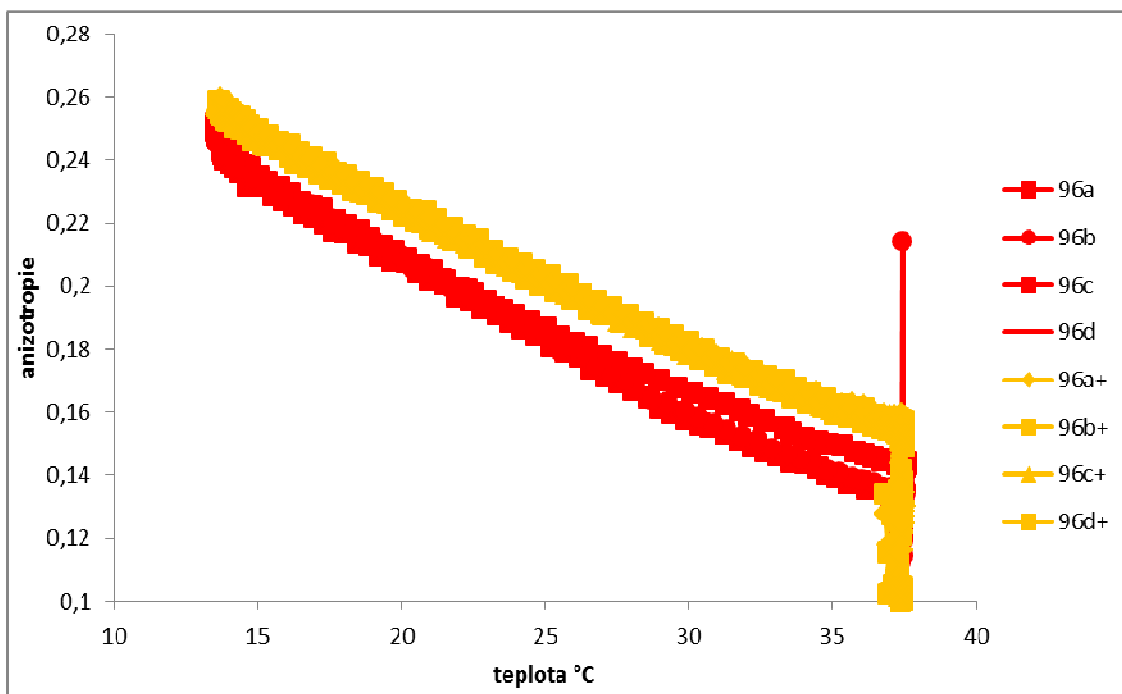
**Graf 4.** Anizotropie fluorescence - srovnání 24h ( $n=4$ ; 24a,b,c,d) kultury kontrolní varianty a 24h stimulované varianty ( $n=4$ ; 24a+,b+,c+,d+)

**Tab. XVIII** Průměrné hodnoty směrnic proložených přímek 24h kultury kontrolní a stimulované varianty

	Doba inkubace (hod)		P
	24	24+	
<b>směrnice</b>	-0,0107	-0,0098	<b>0,0016</b>

U kontrolní kultury (modrá křivka) je anizotropie nižší, u kultury stimulované varianty (zelená křivka) je anizotropie vyšší, což ukazuje na vyšší rigiditu bakteriální membrány u stimulované varianty. To prokázalo i statistické srovnání směrnic proložených přímek.

V Grafu 5. jsou graficky porovnány kultury kontrolní varianty (červená křivka) a stimulované varianty (žlutá křivka) ve stacionární fázi růstu, Tab. XIX. porovnává směrnice proložených přímk.



**Graf 5.** Anizotropie fluorescence - 96h kultura kontrolní varianty ( $n=4$ ; 96a,b,c,d) a 96h kultura stimulované varianty ( $n=4$ ; 96a+,b+,c+,d+)

**Tab. XIX.** Průměrné hodnoty směrnic proložených přímk 96h kultura kontrolní a stimulované varianty

Doba inkubace (hod)			
	96	96+	P
<b>směrnice</b>	-0,0105	-0,0092	<b>0,0035</b>

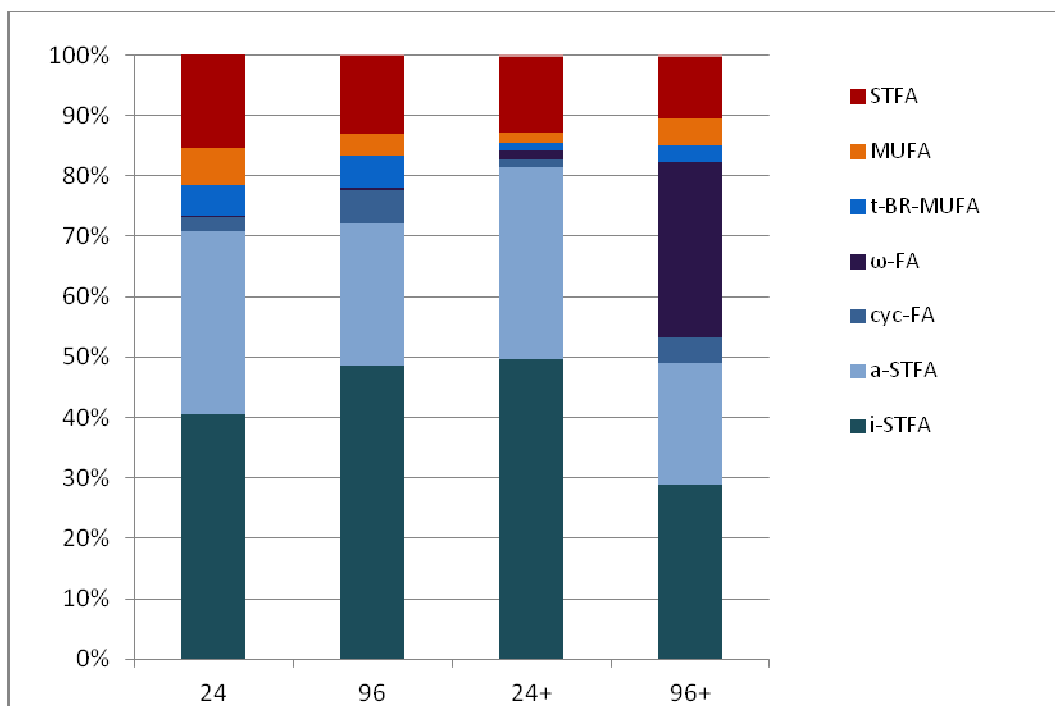
Stimulovaná varianty má opět vyšší anizotropii, tudíž rigidnější membránu, což potvrzuje i statistické zhodnocení.



#### 4.3.4. Grafické shrnutí zastoupení skupin MK v membráně

Výsledky profilů MK jsou shrnuty v Grafu 6.

Fluidita membrán jednotlivých růstových variant se zvyšovala v pořadí  $24^+ < 96^+ < 24 = 96$ .



**Graf 6.** Relativní obsah skupin MK v kultuře kontrolní (24 a 96) a stimulované ( $24^+$  a  $96^+$ ) varianty.

## 5. DISKUZE

Podle předpokladu byly zjištěny rozdíly ve složení a obsahu MK kontrolní varianty mezi fázemi růstu, přičemž bylo předpokládáno, že membrána buňky ve fázi exponenciální (24h) měla vykazovat parametry více fluidní membrány než buňka ve stacionární fázi růstu (96h) z důvodů vyšší metabolické aktivity. Tento předpoklad byl ale potvrzen pouze nepřímo skladbou MK nikoli však měřením fluidity.

Rozdíly ve složení MK byly nejvíce patrné u majoritních **i16:0** (zvýšení o 5 %) a **a15:0** (snížení o 6 %). Jelikož jsou zastoupeny v takovém množství, mají vzhledem ke svým rozdílným teplotám tání (i16:0 - 62,4°C; a15:0 - 23,0°C) zásadní vliv na fluiditu membrány (Kaneda, 1983; Konopásek, 2000). V tomto případě vyšší hodnota a15:0 a nižší hodnota i16:0 v **exponenciální fázi růstu ukazuje na vyšší fluiditu** oproti fázi stacionární.

Celkový poměr i-STFA/a-STFA byl mezi exponenciální a stacionární fází růstu rozdílný. Celkový obsah **a-větvených** MK, které mají oproti i-větveným fluidizační efekt (Suutari a Laakso, 1994; Beranová, 2008), byl **nižší** ve stacionární fázi růstu. Podle tohoto parametru membrána buňky v **exponenciální fázi také měla vyšší fluiditu** než buňka ve stacionární fázi růstu.

Obsah  **$\omega$ -cyklohexylu 9:0** se v exponenciální fázi růstu vůbec nevyskytoval, ale ve stacionární fázi již byl zjištěn (0,119 %), obsah  **$\omega$ -cyklohexylu 11:0** byl v exponenciální fázi zastoupen 0,219 % a ve stacionární fázi byl jeho obsah vyšší o 0,166 % . Celkový obsah  **$\omega$ -FA** byl prokazatelně vyšší ve stacionární fázi (o 3,187 %).  $\omega$ -FA by podle předpokladu měly mít pozitivní vliv na fluiditu membrány (Kaneda, 1991), nicméně v takto malém množství se patrně jejich **vliv neprojevil**.

Rozdíly hodnot mezi růstovými fázemi byly prokázány i u STFA. U fáze exponenciální bylo jejich celkové zastoupení 13,2 %, u fáze stacionární 10,7 %. Nicméně poměr STFA/MUFA, který ukazuje konečný vliv na fluiditu membrány, neprokázal významný rozdíl, tj. nezměněný podíl **STFA ani MUFA by neměl mít vliv na celkovou fluiditu membrány**.

Podle poměru Cyc/prec (vyšší hodnota než 2,5 značí stres buňky), byla kultura **ve zhoršených růstových podmínkách až ve fázi stacionární, což je ve shodě s literaturou** (Navarrete et al., 2000; Kieft et al., 1997).

Z měření anizotropie fluorescence DPH sondy vyplývá, že mezi exponenciální a stacionární fází růstu kontrolní kultury **není výrazný (prokazatelný) rozdíl ve fluiditě**,

ačkoli rozdíly i-STFA/a-STFA ukazují na vyšší fluiditu v exponenciální fázi. To by totiž odpovídalo předpokladu méně fluidní membrány v pozdní fázi růstu, kdy bakterie produkuje sekundární metabolity a její membrána je méně funkční.

MK v membráně kultury **stimulované varianty** (kultura rostoucí v mediu s přidavkem prekurzoru asukamycinu) se lišily v závislosti na fázi růstu. Zde bylo předpokládáno, že stacionární fáze růstu stimulované varianty bude svým složením více fluidní než exponenciální fáze, neboť bakterie v této fázi produkuje větší množství ATB, kterého je potřeba se zbavovat transportem přes membránu, jejíž zvýšená fluidita to bude dovolovat.

MK **a15:0** a **i16:0** byly zastoupeny v majoritním množství, stejně jako u kontrolní varianty. Ve stacionární fázi byl zaznamenán nižší obsah obou těchto MK, což je neobvyklé. Poměr i-STFA/a-STFA se prokazatelně nelišil. Celkový obsah t-BR-STFA klesl o výrazných 32 % a naopak mírně vzrostl obsah mononenasyčených t-BR-MUFA a MUFA (o 1,77 % a 2,8 %). To ukazuje na desaturaci MK, která podporuje **fluidizaci ve stacionární fázi**. Naopak změna poměru STFA/MUFA naznačuje menší fluiditu membrány stacionární fáze růstu (změna o 5,3 %), tyto hodnoty ale nejsou tak výrazné jako u ostatních skupin..

Protože syntáza MK (FAs) díky přísunu prekurzoru ATB začala vytvářet větší množství  **$\omega$ -FA**, podporuje to fakt, že ve stacionární fázi došlo také k výrazné produkci antibiotika asukamycinu, neboť polyketidová syntáza (PKs) také odpovídá na přísun cyklohexankarboxylové kyseliny, jak naznačuje studie Hu a Flosse (2006).

Indikátory růstu (Cyc/prec) ukázaly na zhoršené růstové podmínky již **ve fázi exponenciální** ( $3,6 > 2,5$ ), kdežto ve fázi stacionární již ne.

Měřením anizotropie fluorescence se potvrdilo, že membrána bakterie **ve stacionární fázi růstu je více fluidní** než membrána ve fázi exponenciální.

Porovnáním **exponenciálních fází** kontrolní a stimulované varianty vyšlo, že ve **stimulované variantě** je vyšší obsah  **$\omega$ -cyklohexylu 11:0**, nejde však o velký rozdíl (1,3 %), přestože je statisticky významný. Zde byl zaznamenán také nižší obsah t-BR-MUFA (o 5,5 %). Zajímavé je, že měření anizotropie fluorescence ukázala jednoznačně na menší fluiditu membrány stimulované varianty. t-BR-MUFA měly tedy rozhodující vliv na tekutost. Tomu odpovídá předpoklad, že desaturované a větvené MK mají fluidizační efekt na membránu (Suutari a Laakso, 1994; de Mendoza et al., 1993). Naopak to vyvrací hypotézu o více fluidní membráně ve stimulované variantě, která byla založena na

fluidizačním efektu cyklicky-větvených MK. Po 24h tedy bakterie nestačila využít prekurzor v mediu a nenasyntetizovala více  $\omega$ -FA, naopak se stala její membrána méně fluidní, dokonce nejméně fluidní ze všech růstových variant i fází růstu. Prekurzor byl tedy nejspíše bakterií považován za toxickou látku, vůči níž se bránila ztuhnutím membrány.

Ve **stacionární fázi stimulované varianty** byl zaznamenán nižší obsah majoritní **i16:0** (o 12, 949 %) než u kontrolní varianty ve stejné fázi růstu, také byl nižší celkový obsah t-BR-STFA a t-BR-MUFA (o 23,8 % a o 4,4 %) v porovnání s kontrolní variantou

Obsah  **$\omega$ -cyklohexylu 11:0**, který byl u stimulované kultury ve stacionární fázi růstu o 28,6 % vyšší než u kontrolní varianty, **naznačuje vyšší fluiditu** membrány. To ukazuje, že bakterie pravděpodobně použila cyklohexankarboxylovou kyselinu (prekurzor antibiotika), jejíž zásobu měla v kultivačním mediu, a inkorporovala ji do své membrány v podobě  $\omega$ -FA. Tomu odpovídají i kultivační experimenty Drehera (1976), Hu a Flosse (2006) a Siristové (2011), kde studované bakterie také využily přídavek nabídnutého cyklického prekurzoru k tvorbě membránových MK.

Měřením anizotropie fluorescence se ale ukázalo, že ačkoli membrána obsahuje značné množství  **$\omega$ -FA**, je méně fluidní než u kontrolní varianty.  **$\omega$ -FA** zřejmě mají menší fluidizační efekt než terminálně větvené STFA a MUFA, proto změny ve složení MK měly opačný efekt, než bylo předpokládáno. Podle Siristové (2011) mají cyklohexyl-větvené MK malý fluidizační efekt oproti cyklopropyl-, cyklostyl- a cyklopentyl-větveným. Podle Kannenberg (1984) naopak  **$\omega$ -FA** způsobují stabilizaci membrány a tím obecně nižší fluiditu.

Z porovnání indikátorů růstu nebyly patrné **žádné rozdíly** mezi růstovými variantami.

## 6. ZÁVĚR

1. Složení membránových MK kontrolní varianty se měnilo v závislosti na fázi růstu (fáze exponenciální – fáze stacionární). Nejvýznamnější byl vyšší obsah i16:0,  $\omega$ -cyklohexylu 9:0, cyc17:0,  $\omega$ -cyklohexylu 11:0, celkově pak i-STFA,  $\omega$ -FA a nižší obsah a15:0 ve stacionární fázi růstu u kontrolní varianty. Fluidita membrány v exponenciální a stacionární fázi růstu se nelišila.

U stimulované varianty (varianta s přidavkem prekurzoru asukamycinu do inokulačního media) byly zjištěny téměř stejné rozdíly ve složení MK. Rozdíl byl v obsahu i16:0 ve stacionární fázi oproti fázi exponenciální a poměr STFA/MUFA, který byl vyšší, a ukazoval tak na vyšší fluiditu ve stacionární fázi. Mezi růstovými fázemi byl na rozdíl od kontrolní varianty změřen rozdíl ve fluiditě, který potvrdil výsledky ze složení MK.

2. Přídavek prekurzoru asukamycinu do inokulačního media se projevil ve zvýšeném obsahu  $\omega$ -FA v membráně bakterie stimulované růstové varianty a nejvíce pak v její stacionární fázi.
3. Nepodařil se potvrdit předpoklad zvýšené fluidity membrány u stimulované varianty. Naopak byla změřena nižší fluidita v porovnání s kontrolní variantou. Fluidita u růstových variant se zvyšovala následujícím způsobem:  $24^+ < 96^+ < 24 = 96$ . Indikátory růstu buňky kontrolní varianty ukazovaly podle očekávání na zvýšený stres ve stacionární fázi růstu. Indikátory růstu stimulované varianty naopak naznačovaly zvýšený stres v exponenciální fázi, kdy se zřejmě bakterie ještě nevyrovnala s přidavkem prekurzoru antibiotika do media.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Akagawa, H., Okanishi, M., Umezawa, H.,** (1975). A Plasmid Involved in Chloramphenicol Production in *Streptomyces venezuelae*: Evidence from Genetic Mapping. *Microbiol.* 90 (2), p336
- Beranová, J., Jemiola-Rzemińska, M., Elhottová, D., Strzalka, K., Konopásek, I.** (2008). Metabolic control of the membrane fluidity in *Bacillus subtilis* during cold adaptation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1778 (2008), p445-453
- Beranová, J., Mansilla M.C., de Mendoza, D., Elhottová, D., Konopásek, I.** (2010). Differences in Cold Adaptation of *Bacillus subtilis* under Anaerobic and Aerobic Conditions, *J. Bacteriol.* p4164-4171
- Bernier, M., Kwon, Y., K., Pandey, S., K., Zhu, T-N., Zhao, R-J., Maciuk, A., He, H-J., DeCabo, R., Kole, S.,** (2006): Binding of manumycin A inhibits I $\kappa$ B kinase activity. *J. Biol. Chem.* 281, p2551-2561.
- Blackmore, C., G., McNaughton, P., A., van Veen, H., W.,** (2001). Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. *Mol. Membr. Biol.* 18, p97-103.
- Chang, S-S., Kang, D-H.,** (2004). Alicyclobacillus spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Crit. Rev. Microbiol.* 30, p55-74
- CDC - Centre for Disease Control and Prevention.** Dostupné z www: <http://www.cdc.gov/mrsa/statistics/MRSA-Surveillance-Summary.html>
- de Mendoza, D., and Cronan, J.E., Jr,** (1983). Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 8, p49±52.

- de Mendoza, D., Klages U.A., and Cronan, J.E., Jr, (1983).** Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl Carrar protein synthase I. *J. Biol. Chem.* 258, p2098±2101.
- de Mendoza, D., Grau, R., and Cronan, J.E., Jr, (1993)** Biosynthesis and function of membrane lipids. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Losick, R., Sonenshein, A.L., and Hoch, J.A. (eds). Washington, DC: *American Society for Microbiology Press*, p411±425.
- Dufresne, S., Bousquet, J., Boissinot, M., Guay, R., (1996).***Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, Gram-positive, spore-forming bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 46, p1056–1064.
- Dreher, R., K., Poralla, K., Kong, W., A., (1976).** Synthesis of  $\omega$ -alicyclic fatty acids from cyclic precursors in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 127, p1136-1140.
- Dulmage, H., T., (1953).** The Production of Neomycin by *Streptomyces fradiae* in Synthetic Media. *Appl. Microbiol.* 1 (2), p103–106.
- Floss, H.G., Casati R., Cho H., Beale J.M., (1989).** Studies on the biosynthesis of antibiotik. *Pure & Appl. Chem.*, Vol 61, No.3, p485-488.
- Fox, J. L., (2006),** The business of developing antibacterials. *Nat Biotech.* 24, p1521 (Obrázek dodatečně upraven). Dostupné na:  
<http://www.weizmann.ac.il/molgen/Sorek/antimicrobials.html>
- Giotis, E. S., McDowell, D. A., Blair, I. S., Wilkinson, B. J., (2007).** Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, p997-1001
- Golovacheva, R., S., Karavaiko, G. I. (1979).** *Sulfobacillus* – a new genus of spore-forming thermophilic bacteria. *Microbiology* (English translation of *Mikrobiologiya*) 47, p658–665.

- Gracetto**, A.C., Batistela, V. R., Caetano, W., de Oliveira' H. P. M., Santos, W.G., Cavalheiro, C.C.S., N., (2010). Unusual 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) spectrophotometric behavior in water/ethanol and water/DMSO mixtures, *J. Braz. Chem. Soc.* São Paulo. 21, p8
- Haugland**, R.P., (2002). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9<sup>th</sup> edition, Molecular Probes, Inc.
- Heřman** P., Konopásek I., Plášek J., Svobodová J. (1994). Time-resolved polarized fluorescence studies of the temperature adaptation in *Bacillus subtilis* using DPH and TMA-DPH fluorescence probes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1190, p1-8
- Hu**, Y. D., Melville, C. R., Gould, S. J., Floss, H.G., (1997). 3-Amino-4-hydroxybenzoic Acid: the Precursor of the C7N Unit in Asukamycin and Manumycin. *J. Am. Chem. Soc.* 119, p4301-4302
- Hu**, Y. D. and Floss, H.G., (2004). Further studies on the biosynthesis of the manumycin type antibiotic, asukamycin, and the chemical synthesis of protoasukamycin. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (12), p3837–3844
- Hu**, Y.D. and Floss, H.G. (2006). Starter unit specificity of the asukamycin „upper“ chain polyketide synthase and the branched-chain fatty acid synthase of *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis*. *Heterocycles* 69, p133-149
- Kämpfer**, P. (2006). The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria Vol. 3* (Dworkin, M. et al., eds.). Berlin: Springer. 3, p538–604
- Kaneda**, T., (1991). Iso- and Anteiso- Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Funktion, and Taxonomic Significance. *Microbiol. Rev.*, Vol. 55, No.2, p288-302



- Kaneda, T.**, (1977). Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol. Rev.*, 41(2):391–418.
- Kannenbergh, E.**, Blume, A., Poralla, K., (1984). Properties of  $\omega$ -cyclohexane fatty acids in membranes. *FEBS* 172, p331–334
- Kieft, T. L.**, Wilch, E., O'Connor, K., Ringelberg, D., B., White, D., C., (1997). Survival and phospholipid fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1531-1542.
- Konopásek, I.**, Strzalka, K., Svobodová, J., (2000). Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation. *Biochim. Biophys. Acta* 1464, 18-26
- Korn-Wendisch F.**, Kutzner H.J. (1992): The family Streptomycetaceae; In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H. (eds.), *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* 2nd edition p921-995. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork.
- Kroppenstedt, R. M.** (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, p173–199. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. New York: Academic Press.
- Kutzner, H. J.**, (1981). The Family Streptomycetaceae. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, and H. Schlegel (Eds.) *The prokaryotes : A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Vol. 2 ( Starr, M. P. et al, eds)* Springer-Verlag. Berlin,Germany. p2028–2090.
- Lakowicz, J.R.**, Masters, B.R., (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2nd edition, 2006, Springer, New York- London

- Lee, M., D., Galazzo, J., L., Staley, A., L., Lee, J., C., Warren, M., S., Fuernkranz, H., Chamberland, S., Lomovskaya., O., Miller, G., H., (2001).** Microbial fermentation-derived inhibitors of efflux-pump-mediated drug resistance. *Il Farmaco* 56, p81–85
- Lee, V., J., Lomovskaya, O., (1998).** Efflux-mediated resistance to antibiotics in bacteria: challenges and opportunities, *CLEAR* 1, p39–40.
- Levy, S., B., (1992).** Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, p695–703.
- Litman, B. J., and Y. Barenholz, (1982).** Fluorescent probe: diphenylhexatriene. *Methods Enzymol.* 8, p678-685
- Madigan, M.T., Martinko, J.N. (2006).** *Brock biology of Microorganisms.* Upper Saddle River: Pearson Education, Prentice Hall 992. p64
- Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M. & Yamasato, K. (2002).** *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a new thermo-acidophilic  $\omega$ -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, p1681–1685.
- MIDI, Oficiální stránky společnosti MIDI.** Dostupné na : [www.midi-inc.com](http://www.midi-inc.com)
- Moorman, M., A., Theleman, C., A., Zhou, S., Pestka, J., J., Linz, J., E., Ryser, E., T., (2007).** Altered hydrophobicity and membrane composition in stress-adapted *Listeria innocua*. *J. Food Protect.*, Vol.71, No. 1, p182-185.
- Nagy, I.Z., (1979).** The role of membrane structure and function in cellular aging: A review, *Mech. Ageing Dev.*, 9, p237-246.

- Navarette**, A., Peacock, A., Macnaughton, S., J., Mas-Castalla, J., White, D., C., Guerrero, R., (2000). Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro delta, Spain, by signature lipid biomarkers. *Microb. Ecol.* 39, 92-99.
- Nelson**, M., Greenwald, R., A., Hillen, W., Nelson, M., L., (2001). Tetracyclines in biology, chemistry and medicine. *Birkhäuser*, p8
- NIAID** – National institute of Allergy and Infectious Diseases, (2011). Dostupné na: <http://www.niaid.nih.gov/topics/antimicrobialResistance/Research/Pages/goals.aspx>
- Nikaido**, H., (1998). Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps, *Clin. Infect. Dis.* 27, p32–S41.
- Norris**, P., R., Clark, D., A., Owen, J. P. & Waterhouse, S., (1996) .Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiol.* 142, p775–783.
- O’Leary**, W., M., Wilkinson, S., G., (1988). Gram-positive bacteria. In: Ratledge, C., Wilkinson, S., G., (eds) *Microbial lipids*, vol 1. Academic Press, London, p117–202.
- Omura** S, Kitao C, Tanaka H, Oiwa R, Takahashi Y. 1976 A new antibiotic, asukamycin, produced by Streptomyces. *J. Antibiot.* (Tokyo). 29(9), p876-81.
- Overath**, P., G. Pauli, and H. U. Schairer. 1969. Fatty acid degradation in Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.* 7, p559
- Petrackova**, D., Vecer, J., Svobodova, J., Herman, P., (2010). Long-term adaptation of Bacillus subtilis 168 to extreme pH affects chemical and physical properties of the cellular membrane. *J. Membr. Biol.*, 233(1-3), p73-83
- Rosypal**, S., (2003). *Nový přehled biologie*. [s.l.]. Scientia, Praha, 797p.

- Rui, Z.,** Petříčková, K., Škanta, F., Pospíšil, S., Yang, Y., Chen, CH.-Y., Tsai, S.-F., Floss, H., G., Petříček, M., Yu, T.-W., (2010). Biochemical and genetic insights into asukamycin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 285 (32), p24915–24924
- Russell, N.J.** (1984). Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends Biochem. Sci.* 3, p108±112.
- Sattler, I.,** Thiericke, R., Zeeck, A., (1998). The manumycin-group metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 15, p221-240,.
- Shima, J.,** Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S., Ochi, K., (1996). Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 178, p7276 – 7284.
- Shipley, P., R.,** Donnelly, C., C., A., Le, C., H., Bernauer, A., D., Klegeris, A., (2009). in *Internat. Jour. Mol. Med.* Vol. 24: 5, p711-715
- Sinensky, M.,** (1971). Temperature Control of Phospholipid Biosynthesis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, Vol. 106. No. 2, p449-455.
- Singer, S.J.,** Nicolson G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, p720–31.
- Schrempf, H.,** (2006). The Family Streptomycetaceae, Part II: Microbiology. *The prokaryotes a handbook on the biology of bacteria Vol. 3 (Dworkin, M. et al., eds.)*. Berlin: Springer. 3, p605–622
- Suutari, M.,** Laakso, S., (1994). Microbial fatty acids and thermal adaptation. *CRC Crit Rev Microbiol.* 20, p285–328
- Thiericke, R.,** Stellwaag, M., Zeeck, A., Snatzke, G., (1987). The structure of manumycin .3. Absolute-configuration and conformational studies. *J Antibiot*, 40(11): 1549 – 1554.

- Thiericke, R., Zeeck, A., Nakagawa, A., Omura, S., Herrold, R. E., Wu, S. T. S., Beale, J. M., Gloss, H. G., (1990).** Biosynthesis of the manumycin group of antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.*, 112, p3979 – 3987.
- Trevors, J.T., (2003).** Fluorescence probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 57, p87-103.
- Waksman, S., A., (1963).** The actinomycetes and their antibiotics. *Adv. appl. microbiol.*, vol 5., p235–316.
- Watve, M., G., Tickoo, R., Jog, M., M., (2001).** How many antibiotics are produced by genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.*, 176, p386-390
- White, D., Stair, J., Ringelberg, D., (1996).** Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17, p185–196.
- Zeeck, A., Schroder, K., Frobel, K., Grote, R., Thiericke, R., (1987).** The structure of manumycin .1. characterization, structure elucidation and biological-activity. *J. Antibiot.*, 40(11), p1530 – 1540
- Zelles, L., (1997).** Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosph.* 35, p275–294
- Zhang, Y., Rock, Ch. O., (2008).** Membrane Lipid Homeostasis in Bacteria. *Nature Rev., Microbiology*, Vol.6, 222-233
- Zhu, K., Bayles, D. O., Xiong, A., Jayaswel, R. K., Wilkinson, B. J., (2005)** Precursor and temperature modulation of fatty acid composition and growth of *Listeria monocytogenes* cold-sensitive mutants with transposon-interrupted branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase. *Microbiol.* 151, p615-623

## PŘÍLOHY

### Test antibiotické citlivosti (podkapitola 3.1. Pokusný mikroorganismus)

Test antibiotické citlivosti probíhal na zpevněném agarovém mediu (MH) na Petriho miskách při teplotě 28°C.

#### Složení živného media MH:

Malt extrakt	10 g
Yeast extrakt	4 g
Glukosa	4 g
Destilovaná voda	1000 ml
(Agar)	(18,0 g)
pH	7,3

Kultura (1 klička, cca 3mg) byla z Petriho misky přenesena do krátkých zkumavek s fyziologickým roztokem a byla ve fyziologickém roztoku rozmíchána tak, aby se vytvořil zákal (0,5 stupňů McFarlandovy stupnice, densitometr BioRad). Na MH mediu byl rovnoměrně rozprostřen 1ml této suspenze, přebytečná suspenze byla odsáta a povrch se nechal 15min zaschnout. Poté na něj byly aplikovány ATB disky (BioRad, susceptibility disks, průměr 6,5mm) a zóny byly odečteny po 24h (Tab. I.).

**Tab. I.** Velikost zón ATB rezistence k 15 vybraným druhům antibiotik, ( $n=3$ )

ATB	zkratka	průměrná velikost ATB zóny (mm)
Tigecycline	TGC 15	35,0
Penicillin	P	16,0
Clarithromycin	CLR	26,0
Vancomycin	VA	36,0
Rifampin	RA 5	18,0
Ciprofloxacin	CIP	18,3
Trimethoprim	TMP	0,0
Amikacin	AN	48,0

Amoxycillin	AMC	<b>31,0</b>
Gentamicin	GM	<b>46,0</b>
Polymixin	PB	<b>25,0</b>
Chloramphenicol	C	<b>11,0</b>
Lincomycin	L	<b>11,3</b>
Tetracyclin	TE	<b>22,7</b>
Meropenem	MEM	<b>35,7</b>

Největší citlivost byla zjištěna u antibiotik amikacinu (48,0 mm) a gentamycinu (46,0 mm) a bakterie byla naopak úplně rezistentní vůči trimethoprimu.