

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Antimikrobiální aktivita bakterií izolovaných
z *Pectinatella magnifica***

Bakalářská práce

Autor práce: Karolína Holečková

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, PhD.

Konzultant: Ing. Hana Salmonová

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Antimikrobiální aktivita bakterií izolovaných z *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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze, dne

Podpis autora práce:

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, PhD., vedoucí mé bakalářské práce, za poskytnuté materiály, cenné rady, trpělivost při psaní této práce a vždy příjemné konzultace. Dále děkuji Ing. Haně Salmonové za vedení a pomoc při vykonávání práce v laboratoři a zpracování výsledků.

Souhrn

Bakalářská práce se skládá ze dvou částí. První část je věnována literární rešerši, přehledu, jež se zaměřuje na souhrn informací, které byly doposud zjištěny nejen o životě a rozmnožování sladkovodní mechovky *Pectinatella magnifica*, ale zároveň i významu mořských druhů mechovců. Dále je v přehledu uvedena charakteristika a význam antimikrobiálně působících látek a nejběžněji využívané laboratorní metody sloužící ke stanovení mikrobiální aktivity. Cílem přehledu bylo ucelit nejdůležitější poznatky, ze kterých vychází hypotéza druhé, experimentální části této práce. Důvodem testování antimikrobiální aktivity symbiotických bakterií izolovaných z *Pectinatella magnifica* je fakt, že u mořských mechovců byla prokázána antimikrobiální aktivita jejich bakterií i jejich extraktů. Díky tomu nabývá bližší poznání těchto nepříliš známých živočichů na důležitosti. Testovány byly izoláty bakterií z kolonií *Pectinatella magnifica* odebrané v letech 2012 a 2013 v Jižních Čechách proti sbírkovým kmenům bakterií. K testování antimikrobiální aktivity byla zvolena difuzní metoda, při které se místo papírových disků vytvořily do pevného agarů jamky, do kterých byl nadávkován přesně zvolený objem supernatantu z bakteriálních izolátů. Celkem bylo testováno 170 supernatantů proti 80 bakteriím. V případě, že by supernatant obsahoval antimikrobiálně působící látky produkované izolovanými bakteriemi, vytvořily by se na agaru kolem jamek tzv. inhibiční zóny.

Při testování těchto vybraných izolátů byla antimikrobiální aktivita potvrzena ve třech případech a to při testování supernatantu symbiotických bakterií *Aeromonas veronii* a *Pseudomonas moraviensis* proti kmenům klostridií a zároveň při testování izolovaných bakterií mezi sebou *Aeromonas veronii* prokazatelně potlačovala růst bakterie *Pseudomonas moraviensis*.

U zbylých sledovaných izolátů nebyla potvrzena antimikrobiální aktivita, která by potlačovala růst testovaných bakterií.

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

Antimicrobial activity of bacteria isolated from *Pectinatella magnifica*

Summary

The thesis is comprised of two parts. The first part is dedicated to the literature search, overview, which is focuses on the summary of information that was previously found not only about the life and reproduction of freshwater bryozoan *Pectinatella magnifica*, but also the importance of marine species bryozoans. Furthermore, importance of antimicrobial active substances and most commonly used laboratory methods for determination of microbial activity are shown in the report characteristics. The aim of the review was to summarize the most important facts underlying the experimental hypothesis described in the second part of this work. The reason for testing the antimicrobial activity of symbiotic bacteria isolated from *Pectinatella magnifica* is that antimicrobial activity of symbiotic bacteria and also bryozoans' extracts were demonstrated in the marine bryozoans. Because of this, deeper knowledge of these largely unknown animals has become of high importance. Bacteria isolated from *Pectinatella magnifica* colonies collected in 2012 and 2013 in South Bohemia were tested for their antimicrobial activity against many strains of bacteria. Diffusion method was chosen for testing of the antimicrobial activity. Instead of application by paper disks, method using holes into solid agar was used. Into these holes, precisely selected volume of the supernatant of bacterial isolates has been dosed. In total, 170 supernatants were tested against 80 strains of bacteria. In the case of supernatant containing antimicrobial substances produced by the tested bacteria, an inhibition zone around the hole would be created.

The antimicrobial activity has been confirmed in three cases while testing supernatant of symbiotic bacteria *Aeromonas veronii* and *Pseudomonas moraviensis* against strains of clostridia. Furthermore, it has also been confirmed, that *Aeromonas veronii* inhibited the growth of *Pseudomonas moraviensis*.

In the remaining studied isolates, antimicrobial activity suppressing the growth of test bacteria has not been confirmed.

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

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Hypotéza a cíl práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Bochnatka americká (<i>Pectinatella magnifica</i>)	3
3.1.1 Taxonomické zařazení <i>Pectinatella magnifica</i>	3
3.1.2 Výskyt a naleziště <i>Pectinatella magnifica</i>	3
3.1.3 Způsob života a rozmnožování	4
3.2 Bakterie mechovců a jejich antimikrobiální aktivita	8
3.2.1 Bakterie a antimikrobiální aktivita mořských mechovců	8
3.2.1.1 Symbiotické bakterie mořských mechovců.....	8
3.2.1.2 Antimikrobiální aktivita extraktů z mořských mechovců	10
3.2.2 Bakterie <i>Pectinatella magnifica</i>	10
3.3 Antimikrobiální látky	12
3.3.1 Antimikrobiální látky mikrobiálního původu	12
3.3.1.1 Primární metabolity	12
3.3.1.2 Sekundární metabolity.....	13
3.3.2 Antimikrobiální látky živočišného původu.....	15
3.3.3 Antimikrobiální látky rostlinného původu.....	16
3.4 Testování mikrobiální aktivity.....	17
3.4.1 Difuzní metoda	18
3.4.2 Diluční metoda (stanovení minimální inhibiční koncentrace).....	19
4 Metody a materiály	21
4.1 Odběr vzorků a izolace bakterií.....	21
4.2 Testované kmeny.....	21
4.3 Příprava médií.....	23

4.4	Testování antimikrobiální aktivity symbiotických bakterií.....	25
5	Výsledky.....	26
6	Diskuze.....	27
7	Závěr.....	30
8	Seznam použité literatury.....	31
9	Seznam zkratek.....	37

1 Úvod

Mechovci jsou veřejností málo známí tvorové. Vysoká pozornost je věnována především mořským druhům mechovců. Po významném objevu bryostatinu v roce 1960, látky, jež je testována při léčbě rakoviny, přitahují mechovci více pozornosti než kdy dříve. Po té, co byly mechovci zpozorováni i ve vodách na území České republiky, významně stoupl zájem o zkoumání sladkovodních druhů. U nás se na počátku 21. století invazivně rozšířil druh mechovky bochnatka americká, jejíž kolonie vytváří gelové koule o hmotnosti až několik kilogramů. Do České republiky byla pravděpodobně zavlečena lodní dopravou z Ameriky, přes Hamburk a Labe. Odtud dále došlo k rozšíření do stojatých vod a zatopených pískoven v Jižních Čechách. Kolonie bochnatky můžeme nalézt na kamenech či větvičkách ponořených do vody.

Jedny z prvních výzkumů bochnatky americké se zaměřovaly především na její zdravotní nezávadnost vůči lidem, která byla později potvrzena. Nynější studie se zabírají dopadem bochnatky na stabilitu ekosystému vod, zkoumáním mikrobiálního osídlení bochnatek a testování antimikrobiální aktivity symbiotických bakterií.

2 Hypotéza a cíl práce

Cílem bakalářské práce je vytvoření uceleného literárního přehledu o výskytu symbiotických bakterií u mechovců a popis antimikrobiálně působících látek, které tyto symbionti produkují. Dále budou popsány metody, které lze využít pro testování antimikrobiální aktivity. Cílem praktické části je testování antimikrobiální aktivity symbiotických bakterií a extraktů z mechovky *Pectinatella magnifica*. Vzhledem k tomu, že je dle literárních údajů produkce antimikrobiálních látek u mořských druhů mechovek popřípadě jejich symbiotických bakterií poměrně častá, lze jejich produkci předpokládat i u druhů sladkovodních.

3 Literární rešerše

Literární rešerše této bakalářské práce pojednává o bochnatce americké (*Pectinatella magnifica*) a o bakteriích, které byly identifikovány u mechovců. Následuje popsání a rozdělení látek s antimikrobiální aktivitou nalezených u symbiotických bakterií mechovců a obecné metody testování antimikrobiální aktivity mikroorganismů. Kromě látek s antimikrobiální aktivitou budou popsány i produkty mechovců s jinými biologickými účinky.

3.1 Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*)

Pectinatella magnifica je v našich zeměpisných podmínkách novým a nepříliš známým vodním živočichem. Vzhledem k masivnímu šíření zaujala mnohé vědce a postupně přibývá studií a výzkumů.

3.1.1 Taxonomické zařazení *Pectinatella magnifica*

Bochnatka americká se řadí mezi živočichy, spadá tedy do říše Animalia. Dále se řadí do kmene mechovců neboli Bryozoa, třída mechovky - Phylactolaemata, řád Plumatellida a čeleď *Pectinatellidae*. Druh bochnatka americká má latinský název *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851)

3.1.2 Výskyt a naleziště *Pectinatella magnifica*

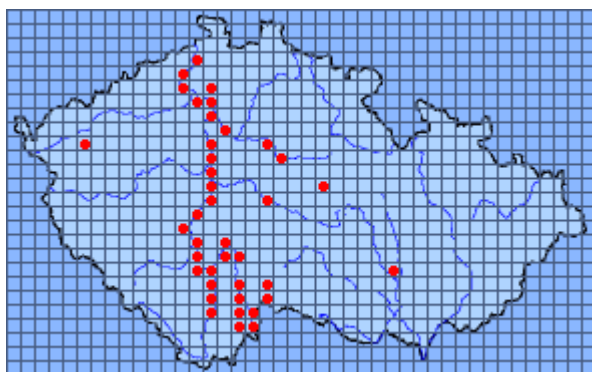
Jak již druhový název bochnatky napovídá, jejím původním biotopem je Severní Amerika. Historické prameny uvádějí, že *Pectinatella magnifica* byla v Evropě poprvé spatřena v roce 1883 u Hamburku. Dodnes není přesně známo, jak se *Pectinatella magnifica* dostala do Evropy, ale vzhledem k poloze jejího prvního naleziště, je vysoce pravděpodobné, že byla na náš kontinent zavlečena lodní dopravou z Ameriky přes Severní moře a Labe. V Čechách byla poprvé nalezena až v roce 1922 a do roku 1952 bylo zmapováno 12 lokalit výskytu bochnatky na Labi a Vltavě. K rozsáhlejší invazi, která zaujala vědce a započala hlubší výzkum života tohoto organismu, došlo až na začátku 21. století (Šinko, 2010).

Mechovka *Pectinatella magnifica* byla zjištěna na Třeboňsku poprvé v roce 2003 (Balounová et al., 2007a; Balounová et al., 2007b ; Balounová et al., 2011). Byla nalezena a určena pracovníky Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v pískovně Cep (Šinko, 2010). Tato pískovna je nejen nejstarším těžebním prostorem, ale zároveň je i svými rozměry

největší a nejhlubší na Třeboňsku. Rozloha je 163 ha, obvod 12,1 km a délka 4,7 km, hloubka 21 m (Balounová et al., 2007a). Ve srovnání s ostatními vodními plochami sledovanými na Třeboňsku je voda v této písčově výrazně oligotrofnější (Drbal et al., 1990), což znamená, že je chudší na živiny. Od roku 2003 byla *Pectinatella magnifica* zaznamenána na mnoha dalších lokalitách charakteristických zejména stojatou vodou, jako jsou právě písčovny, nebo rekreační rybníky na Třeboňsku, ale můžeme ji nalézt i v nádržích Orlík, Slapy a Hněvkovice (Šinko, 2010).

Mapování výskytu kolonií bochnatky stále probíhá a je průběžně aktualizováno na stránkách BioLib.cz (Obrázek 1). Zde jsou uvedené stručné informace o velikosti kolonií, způsobu rozmnožování, údaje o rozšíření ze Severní Ameriky do Evropy a výskytu v ČR. Na těchto stránkách je také uveden formulář, kam lze vyplnit data o pozorování mapovaného druhu.

Obrázek 1 - Mapa výskytu *Pectinatella magnifica* v Čechách a na Moravě (www.BioLib.cz)



3.1.3 Způsob života a rozmnožování

Sladkovodní mechovka je bezobratlý prvoústý přisedlý koloniální živočich, jehož kolonie rostou na různých substrátech pod vodní hladinou (Pejin et al., 2012). Nejčastěji se vyskytují na kamenech a větvičkách ponořených ve vodě. *Pectinatella magnifica* tvoří kolonie, které mají na povrchu žlutohnědou barvu tvořenou jednotlivými živočichy a uvnitř strukturu pevného průsvitného gelu. Gel je produkován samotnými živočichy a zvětšuje životní prostor, na kterém se mohou vyskytovat. Vnitřní želatinová hmota se skládá z 99 % z vody. Dále byla dokázána přítomnost chitinu, vápníku, chloridu sodného a proteinů (Morse, 1930). Tyto přisedlé kolonie jsou tvořeny milimetrovými jedinci, tzv. zoidy, připomínající polypové stádium žahavců. Zoidy se skládají ze dvou částí: polypidu a cystidu. Polypid je vlastní tělo jednice s destičkou, která nese zatažitelná chapadélka; cystid je tělní obal.

Jednotlivý zoidi se seskupují do mnoha růžencových útvarů, tzv. roset, tvořících celou kolonii (Šetlíková et al., 2005). Zoidy produkují gelovitou hmotu, která může dosáhnout tloušťky od několika milimetrů do několika desítek centimetrů (Opravilová, 2006). Kolonie *Pectinatella magnifica* mohou dosáhnout hmotnosti i nad 10 kg, ale průměrná hmotnost se pohybuje okolo 500 g, záleží na místě a roční době odběru vzorku (Balounová et al., 2011).

Základní podmínkou pro výskyt *Pectinatella magnifica* je vhodný substrát, na kterém se mohou vytvořit kolonie. Ty mohou růst na stoncích a kořenech vodních rostlin, živých i mrtvých kořenech okolních stromů a keřů, nebo ponořených větvích a kamenech. Tento druh dále vyžaduje vysokou průhlednost vody, na které se sám podílí filtrováním vody (Šetlíková et al., 2005). Bochnatky z vody filtrují plankton, který zahrnuje řasy, prvoky, vířník, ale také bakterie, které jim slouží jako potrava. *Pectinatella magnifica* není náročná na živiny a vyhovují jí tedy vody s nižší koncentrací živin, než nádrže využívané k intenzivnímu chovu ryb. *Pectinatella magnifica* upřednostňuje spíše štěrkopískové lokality než lokality s organickým sedimentem. Důvodem je pravděpodobně nebezpečí zanášení zoidů neživou organickou hmotou (detritem) a s tím spojeným nedostatkem kyslíku. S nároky na vysokou průhlednost vody souvisí průtok. Proto kolonie *Pectinatella magnifica* nalezneme spíše ve stojatých a mírně tekoucích vodách, než řekách, kde může vlivem proudu docházet k zakalení litorálních vod (Šetlíková et al., 2005).

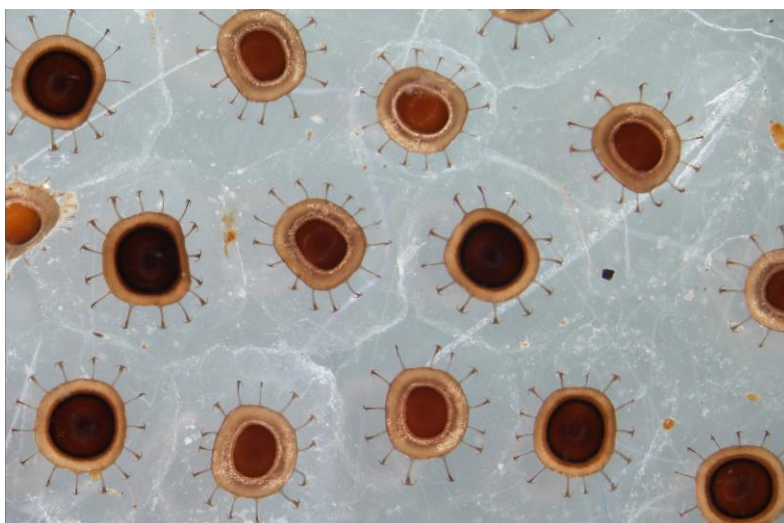
Obrázek 2: Kolonie *Pectinatella magnifica* (foto KMVD)



Dalším významným ekologickým faktorem, ovlivňující sezónní dynamiku *Pectinatella magnifica* je teplota. Autoři se shodují na termofilním charakteru tohoto druhu s optimem teploty vody vyšší než 20 °C (Brown 1933; Wood 1989; Rodriguez a Venton, 2002; Opravilová 2006; Balounová et al. 2007b; Balounová et al. 2011). Kolonie této mechovky se začínají objevovat začátkem léta, když teplota vody stoupne na 20 °C. Vyšší teploty pozitivně ovlivňují rychlost nárůstu kolonií (Balounová et al., 2007b). Při sledování v roce 2015, kdy byly v Čechách zaznamenávány extrémně vysoké teploty, bylo zjištěno, že příliš vysoké teploty růst kolonií spíše inhibují (Rajchard, 2015).

Životní cyklus *Pectinatella magnifica* zahrnuje pohlavní i nepohlavní rozmnožování. Pohlavní aktivita trvá velmi krátké období a dochází k vnitřnímu oplození. Oplodněné vajíčko se vyvine v embryo a vytvoří obrvenou planktonní larvu. Tato larva se skládá ze dvou plně vyvinutých zoidů a řasnatého pláště. Po určité době přisedá na vhodný substrát, kde začne vyrůstat první jedinec nové kolonie. Tento jedinec je plně samostatný a schopný reprodukce pučením, ze kterého postupně vzniká celá kolonie (Wood, 2001). Nepohlavní rozmnožování probíhá pomocí nepohlavních částic, statoblastů. *Pectinatella* začíná vytvářet statoblasty v nepříznivých podmínkách, zejména při extrémních výkyvech teplot. Statoblasty jsou velmi malé černé spory o velikosti cca 1 mm, diskovitěho tvaru, plovoucí na hladině (Šinko, 2010). Plování statoblastů na hladině umožňuje chitinová stěna, která je po okrajích naplněna vzduchem. Na povrchu plovacího prstence vyrůstají kotvicovité útvary sloužící k přichycení se například na ptačí peří a následnému šíření (Šetlíková et al., 2005).

Obrázek 3: Statoblasty (foto KMVD)



Nejvýznamnějšími způsoby disperze je unášení statoblastů vodním proudem a jejich roznášení vodními ptáky (Massard a Geimer, 2002). K rozvoji statoblastu začne docházet za příznivých vnějších podmínek. Statoblast se uchytí na vhodném substrátu a začne vyrůstat zoid. Pučením vznikají další zoidi, kteří na matečném substrátu nejdříve vytvoří slizovitou vrstvičku. Poté začínají produkovat gelovitou hmotu ke středu kolonie, aby se zvětšil jejich životní prostor (Wood, 2001).

Obrázek 4: Gelovitá hmota produkovaná zoidy (foto KMVD)



3.2 Bakterie mechovců a jejich antimikrobiální aktivita

Analýzou symbiotických bakterií se zabývá řada studií, které se ovšem zaměřují především na mechovce mořské. Nejen, že se studie zabývají druhovým zastoupením přítomných mikroorganismů, ale zaměřují se i na testování antimikrobiální aktivity, jak extraktů z mořských mechovců, tak i přítomných bakterií.

3.2.1 Bakterie a antimikrobiální aktivita mořských mechovců

Antimikrobiální aktivita mořských mechovců a ekologických funkcí chemických sloučenin, které produkují, zůstává do značné míry neznámá. I přesto bylo provedeno mnoho studií a výzkumů, které se zabývají buď identifikací bakteriálních symbiontů a jejich prospěchu pro mechovce nebo stanovením antimikrobiální aktivity extraktů z mechovců. V této práci je zmíněno pouze několik z nich, pro ucelení přehledu.

3.2.1.1 Symbiotické bakterie mořských mechovců

Pukall et al. (2001) zkoumali mikrobiální diverzitu kultivovatelných symbiotických bakterií u mořského druhu mechovce *Flustra foliacea* žijícího v Severním moři. Za použití metody ribozomální RNA analýza (ARDRA) a metody částečné sekvenční analýzy 16S rDNA byl odhalen značný rozdíl ve složení mikrobiální populace kultivovatelných bakterií z jednotlivých kolonií mechovce odebraných ze dvou různých míst odběrů vzorků v Severním moři. Rozdíly ve složení mikrobiální populace byly také sledovány mezi koloniemi z jednoho odběrového místa v různých časových intervalech. U vzorků kolonií *Flustra foliacea* odebraných u ostrova Helgoland byly identifikovány bakterie *Schewanella frigidimarina*, *Pseudoalteromonas* sp a *Psychrobacter* sp. Identifikace kultivovatelných symbiotických bakterií kolonií mechovce z druhého odběrového místa v okolí Steingrundu vedly k detekci směsné bakteriální populace, která se převážně skládala z γ - a α -proteobakterií. Jelikož jsou tyto bakterie nejběžněji izolovanými mikroorganismy z mořského prostředí, lze vyvodit závěr, že mechovec *Flustra foliacea* přijímá kolonizaci svého povrchu bakteriemi, které jsou společně s ním obyvateli mořského prostředí.

V roce 1983 byli u mořské mechovky druhu *Watersipora* objeveni bakteriální symbionti připomínající třídu bakterií mollicutes z kmene Firmicutes. Tyto bakterie nemají peptidoglykanovou buněčnou stěnu. Anderson a Haygood (2007) ve své studii použili polymerázovou řetězovou reakci (PCR), sekvencování 16S rRNA genu, specifické

fluorescenční *in situ* hybridizace a fylogenetické analýzy, aby identifikovali tyto symbionty. Bylo zjištěno, že symbiotické bakterie izolované z mechovců žijících podél pobřeží Kalifornie ve skutečnosti náleží do kmene Proteobacteria. Role symbiotických proteobakterií byla prokázána u mořského mechovce *Bugula neritina*, kde zastávají chemickou obranu hostitelské larvy. Proto bylo předpokládáno, že v případě symbiózy s mechovcem *Watersipora* se tyto bakterie také podílejí na chemické obraně hostitelských larev. Například sloučenina, která byla získána ze symbiotických bakterií japonského druhu *Watersporia*, je velmi podobná látce která chrání vajíčka brouků před mravenci.

Heindel et al. (2009) zkoumali fylogenetické vztahy bakterií a jejich antimikrobiální vlastnosti u různých druhů mechovců. K výzkumu bylo shromážděno 21 vzorků 14 různých druhů mechovců z několika míst v Baltském a Středozemním moři. Celkem bylo vyizolováno 340 symbiotických bakterií, z čehož 101 vykazovalo antibiotickou aktivitu zejména proti grampozitivním kmenům bakterií. Za použití metody sekvenování 16S rRNA bylo odhaleno, že izoláty z mořských mechovců jsou gramnegativní povahy. Dále bylo zjištěno, že ze středomořských druhů mechovců byly vyizolovány a identifikovány výlučně kmeny rodů *Sphingomonas* a *Alteromonas* zatímco izoláty kmeny bakterií *Shewanella*, *Marinomonas* a *Vibrio* byly nalezeny pouze u druhu mechovců z Baltského moře. Bakterie jednoho kmene vyskytujících se u mechovců odebraných z obou stanovišť byly zástupci kmene *Pseudoalteromonas*.

U mechovců *Bugula neritina* prováděli testování bryostatinu i Lim a Haygood (2004). Díky testování aktivity bryostatinu izolovaného ze symbiotických bakterií *Bugula neritina* a chemické analýze extraktů příbuzného druhu *Bugula simplex* byla odhalena přítomnost látek podobných bryostatinu. Tyto nálezy poukazují na symbiózu γ -Proteobakterie *Candidatus Endobugula sertula* a mechovce *Bugula simplex*.

Bližším zkoumáním bakterie *Candidatus Endobugula sertula* produkující bryostatin se zabýval Davidson a Haygood (1999). V předchozích studiích tito vědci definovali dva různé chemotypy bryostatinu a sledovali jejich výskyt u mechovce *Bugula neritina* žijícího při pobřeží Kalifornie a jiných kolonií tohoto mechovce vyskytujících se v Atlantickém oceánu. Bylo zjištěno, že rozdíly v chemické konfiguraci bryostatinu jsou dány geneticky, nikoli vlivem vnějšího prostředí. Zároveň bylo potvrzeno, že některé vzorky kolonií mechovce žijícího v Atlantickém oceánu se shodují v sekvenci genů se vzorky mechovce odebraného při pobřeží Kalifornie. Tato skutečnost naznačuje, že mechovci jsou kosmopolitním živočichem rozšiřujícím se mimo jiné i díky lodní dopravě.

3.2.1.2 Antimikrobiální aktivita extraktů z mořských mechovců

Figuerola a kol. (2014) testovali éterové a butanolové extrakty získané ze 13 druhů mořských mechovců. Tyto látky byly testovány proti šesti antarktickým kmenům bakterií a dvou kmenům bakterií sbírkových (*Escherichia coli* a *Bacillus cereus*). Výsledky biologických testů ukazují, že všechny éterové extrakty vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti některým bakteriím. Butanolový extrakt rovněž prokazoval inhibiční aktivitu, což naznačuje, že antimikrobiální látky jsou převážně lipofilního charakteru.

Druh mořské mechovky *Flustra foliacea* vyskytující se v Severním moři byl zkoumán za účelem zjištění obsahu sekundárních metabolitů. Pomocí chromatografie s hmotnostní spektrometrií bylo zjištěno 11 sloučenin, které byly dále identifikovány preparativní vysokotlakou chromatografií. Bylo identifikováno 10 bromovaných alkaloidů a jedna sloučenina diterpenů. Všechny tyto sloučeniny byly testovány agarovou difúzní metou, zda vykazují antimikrobiální aktivitu proti bakteriím z mořského i suchozemského prostředí. Několik látek vykazovalo významnou antimikrobiální aktivitu vůči původním bakteriálním kmenům izolovaných z mořské mechovky *Flustra foliacea*. Proti bakteriálním kmenům suchozemského původu byla vyhodnocena pouze slabá antimikrobiální aktivita (Peters et al., 2003).

Antimikrobiální aktivita byla pozorována také u čtyř druhů mořských mechovek žijících v pobřežních vodách u Austrálie. Tyto mechovky prokázaly stupňující se znečištění inkrustací a rozdílným množstvím bakterií na povrchu kolonií. Druhy *Amathia wilsoni* a *Orthoscuticella ventricosa* měly nejvyšší antimikrobiální aktivitu extraktů a zároveň nejnižší stupeň znečištění. Oproti tomu extrakty z druhu *Cellaria pilosa* a *Bugularia dissimilis*, které neprodukují žádné známé sekundární metabolity, měly slabé antimikrobiální vlastnosti a kolonie vykazovaly velké množství zanesených organismů (Walls et al., 1993).

3.2.2 Bakterie *Pectinatella magnifica*

Izolace a identifikace bakteriálních kmenů izolovaných z *Pectinatella magnifica* prováděli Vlková a kol. (2015). Celkem bylo izolováno 135 čistých kmenů z povrchu nebo z gelové hmoty kolonií *Pectinatella magnifica*, která byla odebrána ze čtyř zkoumaných oblastí (rybníky Cep, Hejtman, Kancíř a Veselí). Morfologie izolovaných bakterií byla zhodnocena pomocí fázově kontrastní mikroskopie a barvení podle Grama. Celkem 44 kmenů s rozdílnými morfologickými vlastnostmi bylo použito pro podrobnou identifikaci pomocí

sekvenování genu pro 16S rRNA a analýzy hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry - MALDI-TOF MS). Pomocí sekvenování genu pro 16S rRNA se podařilo identifikovat všechny izolované kmeny. Identifikace bakteriálních kmenů metodou MALDI-TOF MS byla úspěšná pouze ve 34 případech (63%). Při srovnávání výsledků identifikací získaných metodou sekvenování a MALDI-TOF MS bylo odhaleno 27 případů, kdy se klasifikace bakteriálních druhů shodovaly. Čtyři bakteriální kmeny byly při použití obou metod identifikovány pouze na rodovou úroveň.

Nejčastěji izolovaným bakteriálním druhem byl v koloniích *Pectinatella magnifica* druh *Aeromonas veronii* a to celkem ve 27 případech. Dalším rozšířenějším druhem byla *Aquitalea magnusonii* (9 kmenů), méně pak druhy: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (4 kmeny), *Aquitalea denitrificans* (3 kmeny), *Enterobacter aerogenes* (2 kmeny), *Herbaspirillum lusitanum* (2 kmeny), *Herbaspirillum huttiense* (2 kmeny). Po jenom kmeny byly zastoupeny druhy *Sphingomonas pituiosa*, *Pseudomonas moraviensis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Chryseobacterium gambrini* a *Chryseobacterium culicis*.

Aeromonas veronii a *Aquitalea magnusonii* byly jediné dva druhy, které byly vyizolovány z povrchové vrstvy *Pectinatella magnifica*, jejíž vzorky byly odebrané ve třech různých lokalitách (Kanclíř, Hejtman, Veselí). Bakteriální složení u *Pectinatella magnifica* odebrané z Cepu bylo rozmanitější a polovina vzorků odebraných z povrchu mechovky byla identifikována jako druh *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Ve všech čtyřech zkoumaných lokalitách byla pozorována větší bakteriální diverzita v gelovité hmotě než na povrchu kolonií bochnatky. Nejrozšířenějším bakteriálním druhem izolovaným z kolonií bochnatky u lokalit Hejtman a Veselí byla bakterie *Aquitalea magnusonii*. V rybníku Kanclíř byl nejpočetnějším druhem *Aeromonas veronii*. Nejvyšší bakteriální diverzitu vykazovaly vzorky odebrané z vnitřní gelovité hmoty *Pectinatella magnifica* z rybníku Cep (Vlková et al., 2015).

Další izolace mikroorganismů z povrchu *Pectinatella magnifica* prováděli Sherwin a kol. (2004), kteří objevili zástupce mikrosporidií, parazitů, vyvíjejících se v epitelových buňkách této sladkovodní mechovky.

Více studií zabývajících se mikrobiální osídlením sladkovodní mechovky *Pectinatella magnifica* dosud nebylo provedeno.

3.3 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky jsou látky působící proti růstu a rozmnožování mikroorganismů. Tyto látky můžeme rozdělit do několika kategorií podle jejich původu, mechanismu účinku na mikroorganismy, způsobu aplikace a použití nebo také dle jejich role v potravinářském průmyslu či hygienickém využití.

V této bakalářské práci je uvedeno a blíže popsáno rozdělení látek antimikrobiálního charakteru dle jejich původu, který může být mikrobiální, živočišný nebo rostlinný.

3.3.1 Antimikrobiální látky mikrobiálního původu

Látky s antimikrobiálními vlastnostmi produkované mikroorganismy mohou být primárními i sekundárními metabolity. Metabolismus neboli látková přeměna probíhá v mikroorganismech, stejně jako ve všech jiných organismech, neustále. Zajišťuje tak buňkám dostatečné množství energie a stavebního materiálu pro veškeré životní projevy, jako je zachování buněčné integrity, neustálá obnova vnitrobuněčných struktur, růst a rozmnožování a v neposlední řadě také výměna látek s okolím. Metabolismus představuje organizovaný soubor biochemických reakcí, jež jsou na sobě funkčně závislé. Podle druhu reakčních procesů rozlišujeme katabolismus, neboli procesy získávající buňce energii rozkladem živin a anabolismus, který naopak za spotřeby energie syntetizuje novou buněčnou hmotu. Látky s antimikrobiálními vlastnostmi, které vznikají katabolickými reakcemi za anaerobních podmínek, jsou primárními metabolity a mikroorganismy je produkují stále v průběhu celého svého životního cyklu. Sekundární metabolity jsou produkovány pouze určitými tkáněmi nebo skupinami mikroorganismů či jen v konkrétním období vývoje (Šilhánková, 2002).

3.3.1.1 Primární metabolity

Primární metabolity mikroorganismů se liší podle způsobu rozkladu živin a také dle druhu bakterie. Fakultativně anaerobní a většina anaerobních mikroorganismů je schopna získávat energii metabolismem sacharidů. Získávání energie probíhá přeměnou hexos (šestiuhlíkatých cukrů) za anaerobních podmínek na pyruvát. Pyruvát je dále metabolizován za anaerobních podmínek u různých mikroorganismů odlišným způsobem. Například homofermentativní mléčné bakterie, jako je rod *Streptococcus* a *Lactococcus*, přeměňují pyruvát na laktát, tj. anion kyseliny mléčné. Tohoto procesu se hojně využívá v potravinářství, kdy mléčné kvašení snižuje pH a tím prodlužuje údržnost potravin a krmiv

pro hospodářská zvířata (siláž, senáž). Další jednoduchou organickou kyselinou využívanou podobným způsobem je kyselina propionová, produkovaná rodem *Propionibacterium*. Ta se využívá při výrobě sýrů a její vápenatá sůl je významná jako protiplísňové činidlo přidávané do papírů a jiných obalových materiálů. Zvláštní typ metabolismu pyruvátu probíhá u rozsáhlého anaerobního druhu *Clostridium*. Pyruvát je zde řadou oxidačních dekarboxylací, redukcí a dalších reakcí přeměněn na řadu produktů: butyrát, tj. anion kyseliny máselné, butanol, aceton a malé množství kyseliny octové. Kyselina octová je ve větším množství produkována aerobními bakteriemi rodu *Acetobacter*, čehož se využívá při výrobě octa. Ocet je běžně používán ke konzervaci potravin snížením pH. Primárním metabolitem s antimikrobiálními vlastnostmi je také etanol. Ten je produkován kvasinkami. Z pyruvátu dekarboxylací vzniká acetaldehyd a ten je dále redukován za přítomnosti specifických kofaktorů a enzymů na etanol (Šilhánková, 2002).

Některé bakterie využívají jako zdroj energie bílkoviny a jejich štěpné produkty, což jsou aminokyseliny. Do této menšinové skupiny patří rody *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* a z rodu *Clostridium* především *Clostridium histolyticum*. Tyto druhy bakterií získávají energii rozkladem aminokyselin na amoniak, oxid uhličitý a nižší mastné kyseliny. Ze sirných aminokyselin produkují sirovodík. Příslušné bakterie rodu *Peptococcus* dokáží metabolizovat puriny a pyrimidiny, jsou-li přítomny jako jediný zdroj energie (Šilhánková, 2002).

Primární metabolity mohou být indikátorem přítomnosti daného mikroorganismu, jsou produkovány vždy a neustále v celém životním cyklu a jejich antimikrobiální aktivita je nespecifická.

3.3.1.2 Sekundární metabolity

Mezi sekundární metabolity mikroorganismu patří barviva, toxiny, antibiotika a látky specifické pro bakterie nazývané bakteriociny. Tyto látky vznikají anabolickými procesy, což jsou procesy syntetické vyžadující dodání energie.

Antibiotika

Antibiotika jsou látky, které inhibují růst a množení mikroorganismů. Jedná se o látky různé chemické povahy. Významnou skupinou antibiotik jsou β -laktamová antibiotika, kam řadíme peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy. Tento typ antibiotik účinkuje na buněčnou stěnu pouze ve stádiu růstu bakterií. Proto je vhodné léčbu těmito antibiotiky zahájit co nejrychleji po nástupu klinických příznaků. Další skupinou antibiotik jsou amfenikoly, kam řadíme chloramfenikol a thiamfenikol. Jedná se o širokospektrá antibiotika

s bakteriostatickými účinky. Mezi širokospektrální antibiotika řadíme také tetracykliny. Další rozsáhlou skupinou antibiotik jsou aminoglykosidy, kam řadíme streptomycin, kanamycin, neomycin, tobramycin, amikacin a řadu dalších. Streptomycin je významné antituberkulotikum, neomycin a kanamycin jsou baktericidní a účinkují na gram-negativní tyčinky. Dalšími rozsáhlými skupinami antibiotik jsou antibiotika peptidová, kam spadá například polymyxin, colistin a bacitracin; glykopeptidová antibiotika, například vankomycin a teikoplanin; ansamyciny, kam patří rifampicin a rifabutin.

Antibiotika vyrobená pouze chemickými syntézami se nazývají chemoterapeutika. Rozdíl mezi antibiotiky a chemoterapeutiky stírají tzv. polosyntetická antibiotika. Základ jejich molekuly je vytvořen fermentací vhodného substrátu mikroorganismem a získaná látka je po izolaci a vyčištění dále přeměňována chemickými procesy (Lefnerová, Šimůnek, 2016).

Antibiotika lze také rozdělit dle jejich účinku. Některé typy antibiotik, jako například penicilín a aminoglykosidy mohou být schopna usmrtit citlivé mikroorganismy bez zásahu do humorální nebo imunitní obrany buňky. Tato schopnost se označuje jako baktericidní. Jiné látky, jako například sulfonamidy a tetracykliny, reversibilně inhibují základní metabolické procesy postižených mikroorganismů. Po poklesu jejich koncentrace v okolí, se životní projevy zasažených mikroorganismů vracejí k normálu. Tato aktivita je označována jako bakteriostatická (Scherris, 1990). Toto základní rozdělení účinku antibiotik v praxi ne vždy platí. Některá bakteriostatická antibiotika v určitých koncentracích mohou působit letálně pro jiné mikroorganismy, ale zároveň lze nalézt druhy mikroorganismů, na které nepůsobí vlastnosti baktericidních antibiotik ani ve vyšších koncentracích a mají na ně pouze slabý inhibiční účinek.

Hlavními producenty antibiotik jsou aktinomycety, konkrétně rod *Streptomyces*. Tato skupina bakterií produkuje antibiotika po chemické stránce velmi rozmanitá. Nejčastějšími typy jsou antibiotika oligosacharidová, polyenová a tetracyklinová. Dalšími producenty antibiotik jsou mikromycety. Mimořádný význam mají peniciliny produkované rodem *Penicillium*. Menší význam mají cephalosporiny, strukturou jsou podobné penicilínům a jsou produkovány rodem *Cephalosporium*. Většina ostatních plísňových antibiotik, produkovaných například rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Verticillium*, jsou silně toxická pro člověka i zvířata. Antibiotika ve velmi malé míře produkují i bakterie. Například bakterie rodu *Bacillus* produkují antibiotika polypeptidové povahy. Tato antibiotika nemají takový význam, jako antibiotika produkovaná streptomycetami (Šilhánková, 2002).

Bakteriociny

Jako bakteriociny označujeme láky polypeptidového charakteru vznikající syntézou na ribozomech bakterií. Jsou vysoce specializované povahy a velmi často působí inhibičně pouze na blízkce příbuzné rody bakterií produkčního kmenu. Bakteriociny produkují bakterie grammpozitivní i gramnegativní. Rozdělit je můžeme podle délky řetězce aminokyselin, které tvoří tento polypeptid.

Nejznámější a dnes nejvíce studovanou skupinou bakteriocinů jsou koliciny. Tyto exoproteiny jsou cytotoxické povahy a jsou produkovány během růstu bakterií. Typickým zástupcem tvořící koliciny, je bakterie kmene *Escherichia coli* a některé druhy čeledi *Enterobacteriaceae* (Scherris, 1990).

3.3.2 Antimikrobiální látky živočišného původu

I živočichové jsou schopni produkovat antimikrobiálně působící látky, které jsou u vyšších živočichů vytvářené sliznicemi a žlázami. Jsou různého charakteru a vlastností, liší se chemickým složením i způsobem účinku. Ale všechny mají za úkol chránit živočichy před onemocněním způsobeným bakteriemi či viry. Tyto antimikrobiální látky jsou bílkovinami enzymové či neenzymové povahy. Enzymové povahy jsou látky působící bakteriolyticky. Lýza je obecně proces destrukce a rozkladu, který v tomto případě způsobuje smrt buňky, nejčastěji v důsledku rozpadu jejich vnější membrány. Mezi bakteriolytické enzymy patří například laktoperoxidasa a lysozym. Lysozym je antimikrobiální enzym, který byl nalezený v slzách, slinách, mateřském mléku, neutrofilních granulích a vaječném bílku (Field, 2005). Bakterie destruuje svou schopností hydrolyzovat peptidoglykay v buněčné stěně grampozitivních bakterií a ve vnější membráně gramnegativních bakterií (Ryšánek, 2007). Pro své antibakteriální účinky se může přidávat například do masa a mléčných výrobků, jako ochranný prostředek (Cardarelli et al., 2007). Laktoperoxidasa je enzym vyskytující se ve slinách, slzách. Chrání tak dutinu ústní a oční sliznice před vstupem patogenních mikroorganismů do těla. Laktoperoxidasa je však mnohem významnějším činitelem v laktoperoxidasovém systému, který je důležitým obranným mechanismem zvláště v laktaci skotu. Inhibuje růst stafylokoků, streptokoků i koliformních bakterií. Mechanismus účinku spočívá v tom, že laktoperoxidasa, produkováná epiteliárními buňkami mléčné žlázy, v přítomnosti peroxidu vodíku (který je metabolitem bakterií) oxiduje thiokyanát (pocházející ze zeleného krmení, zejména z luštěnin) na hypotiokyanát, který destruuje vnitřní bakteriální membránu bakterií (Ryšánek, 2007).

Další skupinou látek s antibakteriálními vlastnostmi jsou neenzymové bílkoviny hromadně označované jako transferriny. Do této skupiny látek patří například laktoferrin, laktoferricin, ovotransferin a avidin. Laktoferrin je glykoprotein aktivně vážící ionty železa, které jsou nezbytné pro metabolismus některých bakteriálních patogenů (Ryšánek, 2007). Vyskytuje se v mléce, slinách, slzách a v nejvyšší koncentraci v kravském kolostru. Jeho hlavní funkcí je adsorpce železitých iontů ve střevním traktu, asistence při trávení a využívání mikroprvků a makroprvků z mléka, ochrana střevní mikroflóry mladých zvířat, ale také ochrana proti mastitidě. Laktoferrin má širokospektrální účinky. Působí antibakteriálně, antivirově, antimykoticky, antikarcinogenně a imunostimulačně (Dolan et al., 2010).

U vyšších živočichů se vyvinul velmi komplikovaný a dosud ne plně probádaný obranný systém, který je nazýván souhrnným názvem imunita. Základním principem imunitního systému je schopnost rozlišit látky tělu vlastní od cizorodých. K látkám, které pomáhají tvořit imunitní systém, patří zejména imunoglobuliny. To jsou látky, které zprostředkovávají imunitní reakci. Na základě této reakce proběhne zneškodnění cizorodých mikroorganismů, mnohem složitějším mechanismem než jak je tomu například u bakteriolytických enzymů, ale výsledek je stejný. Zajistí usmrcení patogenních mikroorganismů. Proto i imunoglobuliny mohou být zařazeny mezi látky s antimikrobiální aktivitou (Ferenčík et al., 2004)

3.3.3 Antimikrobiální látky rostlinného původu

Rostliny produkují širokou škálu sekundárních metabolitů. Prozkoumaná je zatím jen velmi malá část, ale autoři studií se shodují v tom, že tyto sekundární metabolity chrání rostliny nejen před býložravci ale i před napadením bakteriemi a viry. Z chemického hlediska se jedná o taniny, terpenoidy, saponiny, alkaloidy nebo flavonoidy a další, u kterých byla v *in vitro* testování potvrzena antimikrobiální aktivita (Cowan, 1999).

Velmi rozsáhlou skupinou látek jsou koncentrované přírodní rostlinné produkty nazývané éterické nebo esenciální oleje, které jsou tvořeny těkavými aromatickými sloučeninami. Esenciální oleje jsou používány v lidovém léčitelství již celá staletí. Mezi jejich četné vlastnosti patří například antivirové a antioxidační účinky, schopnost odpuzovat hmyz, protizánětlivé a antinociceptivní vlastnosti. Některé výzkumy potvrzují i schopnost těchto olejů zvýšit prostupnost jiných léků a zabývají se například i protirakovinným působením. Mechanismus účinku těchto látek ještě není plně objasněný, ale jejich použití při léčbě bolesti, zánětech, virových onemocněních je dnes velmi rozšířené. Esenciální oleje se z rostlin

získávají destilací a jsou hojně využívány i jako složky parfémů a kosmetiky, nebo také ochucovadla potravin a nápojů (Adorjan, Buchbauer, 2010). Mezi nejznámější esenciální oleje patří například eugenol, látka obsažená ve skořici, hřebíčku a muškátovém oříšku, nebo také mentol, silice máty peprné s chladivými účinky. Kamfor, známější spíše jako kafr, získávaný z kastrovníku, ale je obsažen také v silici bazalky, šalvěže nebo rozmarýnu. Podobně jako mentol má využití v lékařství, pro své mírně anestetické účinky se přidává do mastí (Nedorostova et al, 2009).

Další rozsáhlou a ne příliš prozkoumanou skupinou látek s antimikrobiálními účinky jsou fytoalexiny a fytoanticipiny. Chemicky jsou si tyto látky velmi podobné, obojí jsou nízkomolekulární sekundární metabolity, rozdíl je v tom, jak a kdy je začne rostlina tvořit (VanEtten, 1994). Fytoanticipiny jsou antimikrobiální látky, které rostlina syntetizuje v průběhu normálního vývoje, a jsou součástí konstitutivního mechanismu obrany rostlin. V rostlině jsou tyto látky přítomny i před infekcí mikroorganismy. Fytoalexiny jsou heterogenní skupina sloučenin, která se řadí dle chemické struktury mezi fenylopropanoidy, terpenoidy, acetyleny a jiné (Ebel, 1986). Mají antibiotické a antimykotické vlastnosti a jsou syntetizovány a akumulovány v rostlině v reakci na útok patogenů (Mert-Türk, 2002). Molekuly fytoalexinů narušují metabolismus nebo buněčnou strukturu patogenů. Jsou vysoce specifické a působí jen proti určitým druhům patogenů (Freeman, Beattie, 2008). Většinou jsou také charakteristické pro určitou rostlinnou čeleď, někdy i druh. Méně specifickými fytoalexiny jsou stilbeny, které se vyskytují v poměrně širokém spektru u nepříbuzných rostlin, například u čeledi révovité, bobovité, borovcovité a lipnicovité (*Vitaceae*, *Pinaceae*, *Fabaceae* a *Poaceae*; Ebel, 1986).

3.4 Testování mikrobiální aktivity

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

Tyto testy se dělí podle metody stanovení na metody difúzní a metody diluční. Difúzní metodou je možné kvantitativně měřit citlivost mikroorganismů k antimikrobiálním látkám o

určité koncentraci, nebo stanovit neznámou koncentraci určité antimikrobiální látky. Bakterie jsou k určité antimikrobiální látce buď citlivé, přechodné (málo citlivé/rezistentní), nebo rezistentní. Citlivost nebo rezistence se určuje podle toho, zda se vytvoří kolem jamky nebo papírového disku s příslušnou antimikrobiální látkou inhibiční zóny nebo nikoliv. Prostřednictvím dilučních metod může být citlivost mikroorganismů k antimikrobiálním látkám kvantifikována. Stanovena je buď minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která viditelně inhibuje růst mikroorganismů, nebo minimální baktericidní koncentrace (MBC), tedy nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která bakterie usmrtí (99,9%). MBC je určena subkultivací ze zkumavek nevykazujících žádné známky zakalení na médium bez antimikrobiální látky, a pozorováním růstu po následné inkubaci. Při těchto metodách je citlivost mikroorganismů určována sériovým dvojkovým ředěním testované látky v agaru nebo v bujónu. Mezi diluční metody je řazena i tzv. „breakpoint“ metoda neboli metoda testování hraničních hodnot. Princip je v podstatě stejný, jako při stanovení MIC, testována je však jen jedna nebo dvě koncentrace. Koncentrace zvolené pro testování jsou takové, které odpovídají hraniční koncentraci oddělující jednotlivé kategorie citlivosti. Tuto metodu je možné použít jako alternativu difúzních testů (Collins et al., 1995).

Citlivost testů ovlivňuje řada faktorů. Kultivační médium použité pro testování by mělo podporovat přirozený růst mikroorganismů a nemělo by obsahovat látky antagonisticky působící proti testovaným antimikrobiálním látkám. Pro testování jsou vytvořena speciální média, která tyto podmínky splňují. Médium by na Petriho misce mělo tvořit souvislou vrstvu o tloušťce 3 – 4 mm. Dalším faktorem ovlivňujícím testování je množství suspenze buněk bakterií, které aplikujeme na médium. U difúzních testů je důležité provést preinkubaci a predifúzi, která úměrně snižuje nebo zvyšuje velikost antimikrobiální zóny. Inkubace by měla probíhat za přesně definovaných podmínek. S přístupem nebo bez přístupu kyslíku, v určité teplotě přirozené pro růst daných mikroorganismů a přesně stanovenou dobu (Collins and Lyne, 1995).

3.4.1 Difúzní metoda

Difúzní metody testů slouží ke stanovení koncentrace určité antimikrobiální látky nebo k měření citlivosti mikroorganismů na danou antimikrobiální látku. Podstata těchto testů se nezměnila již 40 let. Pro testování je vhodné použít médium přímo navržené pro testy citlivosti. Sterilní médium se ve vodní lázni vytemperuje na 50 °C a nalije se do Petriho misek

do výšky 3 – 4 mm. Pokud nejsou připravené misky s médiem použity, lze je skladovat 1 týden při teplotě 4 °C. Inokulát může být připraven z plně narostlých kultur na živné půdě nebo ze suspenze kolonií emulgovaných v bujónu tak, aby hustota odpovídala koloniím ze živné půdy. Bakteriální kulturu je možné zaočkovat přímo do Petriho misky, zalít vytemperovaným agarem a následně promíchat, nebo aplikovat inokulum na suchý a tuhý povrch agaru. Suchým a sterilním tamponem se docílí rovnoměrného rozetření inokulátu. Poté se na povrch média aplikují disky napuštěné testovacími antimikrobiálními látkami. Na Petriho misku o průměru 9 cm se může aplikovat 4 až 6 disků pomocí sterilní pinzety, ostré jehly nebo dispensoru. Je také možné vytvořit v zatuhlém agaru pomocí korkovače jamky a do nich napipetovat roztok antimikrobiální látky o dané koncentraci. Látky, které jsou napuštěné v discích nebo napipetované v jamkách, difundují do agaru. Kultivace misek probíhá při 35 – 37 °C 24 nebo 48 hodin podle testovaného bakteriálního kmenu. Měření inhibičních zón probíhá od konce disku k okraji zóny. Kmeny rezistentní vytvářejí inhibiční zónu menší než 2 mm nebo ji nevytvářejí vůbec. Málo citlivé kmeny vytváří inhibiční zónu větší než 2 mm, ale zároveň o 3 mm menší než kontrolní kmen. Citlivé kmeny bakterií v okolí disku nenarostou vůbec (Collins et al., 1995).

3.4.2 Diluční metoda (stanovení minimální inhibiční koncentrace)

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

Agar zvolený k testování se připraví a vytemperuje na 50 °C ve vodní lázni. Testovaná antimikrobiální látka se rozředí geometrickou řadou. Na Petriho misku o průměru 9 cm se nadávkuje 20 ml roztaveného agaru (19 ml agaru + 1 ml testované antimikrobiální látky o známé koncentraci) a při laboratorní teplotě se nechá zatuhnout. Po zatuhnutí a vysušení povrchu se do agaru vytvoří jamky, do kterých se dávkuje inokuláty různých kmenů bakterií. Kultivace probíhá při optimální růstové teplotě pro testované bakteriální kmeny. Výsledkem

testování je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která kompletně inhibuje růst bakteriálního kmene.

Další možnou variantou zjišťování MIC je za použití bujonového dilučního testu. Antimikrobiální látky jsou ředěné stejným způsobem jako u agarových dilučních testů a jsou přimíchány do tekutého bujonu. Inokulát, dávkovaný do bujonu, by měl optimálně obsahovat 5×10^6 buněk. Kultivace lahvíček s bujonem probíhá za teploty optimální pro růst daného bakteriálního kmene. Výsledná MIC je vyhodnocena objektivně, a je jí koncentrace antimikrobiální látky v lahvičce, která nemá ani mírný zákal a je naprosto čirá (Collins et al., 1995).

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

4 Metody a materiály

Následující kapitola popisuje praktickou část této bakalářské práce, která se věnuje testování antimikrobiální aktivity symbiotických bakterií izolovaných z kolonií bochnatky *Pectinatella magnifica* vyskytující se na území Jižních Čech.

4.1 Odběr vzorků a izolace bakterií

Sladkovodní mechovka *Pectinatella magnifica* je v České republice rozšířená zejména v Jižních Čechách. Odběry vzorků kolonií probíhaly ve čtyřech lokalitách, a to na rybnících Cep, Hejtman, Kanclíř a Veselí v letních měsících od roku 2012 do roku 2015. První odběry probíhaly začátkem července, druhá etapa odběrů na konci srpna. Ze vzorků bochnatek byly kultivací získány kolonie bakterií, které byly pod mikroskopem zkoumány a kmeny morfologicky odlišné byly následně identifikovány pomocí izolace DNA a metodou MALDI-TOF.

4.2 Testované kmeny

Byla testována antimikrobiální aktivita bakterií izolovaných z *Pectinatella magnifica* (celkem 47 izolátů; 15 z roku 2013 a 32 z roku 2014) proti bakteriím uvedeným v tabulce 1 a dále byly testovány izoláty z bochnatky vzájemně mezi sebou. Většina kmenů izolovaných z *Pectinatella magnifica* nebyla dosud identifikována.

Tabulka 1.: Seznam testovaných bakterií

Taxonomické zařazení	Původ
<i>Acinetobacter parvus</i> CCM 7030	sbírkový kmen
<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	sbírkový kmen
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521	sbírkový kmen
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> DSMZ 20210	sbírkový kmen
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSMZ 792	sbírkový kmen
<i>Clostridium clostridioforme</i> DSMZ 933	sbírkový kmen
<i>Clostridium paraputrificum</i> 2630	sbírkový kmen
<i>Clostridium perfringens</i> CCM 4435	sbírkový kmen
<i>Clostridium perfringens</i> DSMZ 11778	sbírkový kmen
<i>Clostridium ramosum</i> DSMZ 1402	sbírkový kmen
<i>Clostridium tertium</i> DSMZ 2485	sbírkový kmen
<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 7797	sbírkový kmen
<i>Enterococcus faecalis</i>	trávicí trakt dospělého člověka
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	sbírkový kmen
<i>Escherichia coli</i> D	trávicí trakt dospělého člověka
<i>Escherichia coli</i> O55	sbírka mikroorganismů Mikrobiologického ústavu AV ČR
<i>Escherichia coli</i> O45	sbírka mikroorganismů Mikrobiologického ústavu AV ČR
<i>Escherichia coli</i> NISSLE	probiotický preparát
<i>Lactobacillus crispatus</i> CCM 7777	sbírkový kmen
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	jogurt
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSMZ 20016	sbírkový kmen
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	sbírkový kmen
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	sbírkový kmen
<i>Moraxella canis</i> CCM 4590	sbírkový kmen
<i>Propionibacterium acnes</i> DSMZ 1893	sbírkový kmen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1960	sbírkový kmen
<i>Pseudomonas moraviensis</i> CCM 7280	sbírkový kmen
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2115	sbírkový kmen
<i>Salmonella enterica</i> sérovar Enteritidis ATCC 13076	sbírkový kmen
<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium STM	sbírka mikroorganismů Mikrobiologického ústavu AV ČR
<i>Salmonella</i> sp. M	mleté maso
<i>Serratia marcescens</i> DSMZ 30121	sbírkový kmen
<i>Streptococcus thermophilus</i>	jogurt

4.3 Příprava médií

Bakterie izolované z *Pectinatella magnifica* byly kultivovány v bujónovém živném médiu, které bylo použito ve dvou variantách. Médium se skládalo ze stejných komponentů (viz tabulka 2 „Yeast extrakt-trypton-glukosa bujón“), avšak v prvním případě byly komponenty média rozpuštěny ve vodě a v případě druhém ve vývaru z bochnatky. Vývar z bochnatky byl připraven rozvařením 0,5 kolonie v 0,5 l vody a následně přefiltrován. Tyto tekuté živné půdy byly nadávkovány do vialek po 9 ml, uzavřeny a vysterilovány. Pro kultivaci anaerobních bakterií byl bujón před uzavřením ve vialce probublán CO₂, aby se docílilo anaerobního prostředí, a sterilován. Při kultivaci některých bakteriálních izolátů z bochnatky byl do Yeast extrakt-trypton-glukosa bujónu použit přídavek koňské krve v množství 5 %. Bylo posuzováno, zda bakterie kultivované v živném prostředí s přídavkem koňské krve mají hemolytické vlastnosti a jestli jsou schopné v souvislosti s hemolytickou aktivitou vytvářet antimikrobiální látky. Krev byla přidávána sterilní jehlou ze zásobní lahve do vialek těsně před naočkováním izolátu.

Vlastní testování antimikrobiální aktivity metabolitů produkovaných symbiotickými bakteriemi bochnatky probíhalo agarovou difuzní metodou. Složení agarů použitého při testování antimikrobiální aktivity se lišilo dle nároků testovaných kmenů. Agary použité při testování a jejich složení je uvedeno v následující tabulce 2. Ve většině případů byly testované bakterie uvedené v seznamu tabulky 1 kultivovány na Wilkins-Chalgren agaru za podmínek uvedených v tabulce 2. Bakterie, jejichž kultivace vyžadovala specifické podmínky a odchylky, jsou uvedené v tabulce 3. Citlivost bakterií izolovaných z kolonií *Pectinatella magnifica* byla testována na obohaceném Trypton soja agaru za podmínek uvedených v tabulce 2.

Tabulka 2.: Seznam použitých médií, standardní doby, teploty a způsobu kultivace

Název média	Složení/obohacení	Doba kultivace	Teplota kultivace	Způsob kultivace
Yeast extrakt-trypton-glukosa bujón	23 g Yeast extract bujon, 2 g tryptonu, 1 g glukosy, 1 l výluhu z bochnatky nebo voda	3 - 5 dní	24°C	anaerobně
Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	Obohacený o cystein (0,5 g/l), sojový pepton (5 g/l) a tween 80 (1 ml/l)	48 hod	37°C	anaerobně
Trypton soja agar	Obohacený o kvasničný extrakt (3 g/l) a glukózu (1 g/l)	48 hod	30-37°C	aerobně
Brain-heart infusion agar	Bez obohacení, příprava dle návodu výrobce	24 hod	37°C	aerobně

Tabulka 3.: Seznam bakterií s konkrétními odlišnými podmínkami kultivace

Taxonomické zařazení	Použitý agar	Teplota kultivace	Způsob kultivace
<i>Moraxella</i> CCM 4590	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	30°C	aerobně
<i>Acinetobacter parvus</i> CCM 7030	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	30°C	aerobně
<i>Lactobacillus sp.</i>	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	37°C	mikroaerofilně
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	37°C	aerobně
<i>Bacillus cereus</i> CCM2010	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	30°C	anaerobně
<i>Pseudomonas fluerescens</i> CCM 2115	Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)	30°C	aerobně
<i>Pseudomonas moraviensis</i> CCM 7280	Obohacený trypton soja agar	37°C	aerobně
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Brain-heart infusion agar	37°C	anaerobně

4.4 Testování antimikrobiální aktivity symbiotických bakterií

Vyizolované a identifikované symbiotické bakteriální kmeny jsou uchovávány v mrazáku při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před testováním jejich antimikrobiální aktivity se vybrané izoláty rozmrazily a 0,3 ml suspenze bylo sterilně přeočkováno do vialky se sterilním bujónem. Byla použita kultivace v Yeast extrakt-trypton-glukosa bojínu rozpuštěném ve vodě, bochnatkovém výluhu nebo s přidavkem krve. Tyto čerstvě naočkované kultury se kultivovaly při $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 – 2 dny podle kmenu bakterií, tak aby bylo dosaženo potřebné hustoty bakteriálních buněk v roztoku. Z plně vzrostlých bakteriálních izolátů bylo odebrané množství 1 ml odstředeno v mikrozkuvkách při maximální rychlosti odstředivky 12 000 ot/min po dobu 5 minut. Supernatant byl ihned po odstředění přelit do čisté mikrozkuvky, aby nedošlo k rozpouštění pelety buněk.

Pro stanovení antimikrobiální aktivity bakterií izolovaných z *Pectinatella magnifica* byla použita metoda difuzního testu. Nejprve byl uvařen a vysterilován příslušný agar a poté vytemperován na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve vodní lázni. Testované kmeny bakterií byly naočkovány v množství 1 ml na Petriho misku a následně zality 20 ml agarů. Misky s agarem a zaočkovanou kulturou byly krouživými pohyby promíchány tak, aby došlo k rovnoměrnému promísení a tím i k pozdějšímu rovnoměrnému nárůstu. Poté co agar na misce zatuhnul, byly sterilním korkovačem vytvořeny okraje šesti jamek a sterilní jehlou byl odstraněn vyříznutý agar, aby vznikl důlek. Do těchto jamek bylo automatickou pipetou nadávkováno 60 μl supernatantu. Testování antimikrobiální aktivity metabolitů bakteriálních kmenů uvolněných do supernatantu probíhalo ve dvou opakováních. Na každé Petriho misce byla stanovena antimikrobiální aktivita třech bakteriálních izolátů. Petriho misky s nadávkovaným supernatantem byly uloženy do ledničky alespoň na dvě hodiny, aby došlo k difuzi supernatantu do média a poté byly misky přendány do termostatu o teplotě ideální pro testované kmeny patogenních bakterií. Kultivace anaerobních kmenů bakterií probíhala v anaerostatu naplněném plynem CO_2 a H_2 v poměru 1:9. Výsledky testů byly odečítány po 48 hodinách změřením průměru inhibiční zóny v mm.

5 Výsledky

Celkem bylo testováno 170 supernatantů proti 80 bakteriím. Antimikrobiální aktivita byla prokázána pouze u třech izolátů. Jednalo se o kmen *Pseudomonas moraviensis* a dva kmeny *Aeromonas veronii*, které vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti kmenům klostridií izolovaných z trávicího traktu člověka a přežvýkavců. Průměr inhibičních zón byl 8 – 16 mm. Dále byla prokázána antimikrobiální aktivita při testování kmenů bakterií izolovaných z bochnatky mezi sebou navzájem. Supernatant z *Aeromonas veronii* potlačoval růst kmenů *Pseudomonas moraviensis*. V tomto případě byla naměřena inhibiční zóna o průměrné velikosti ze dvou opakování $11,50 \pm 2,12$ mm. U ostatních izolátů antimikrobiální aktivita prokázána nebyla.

Složení kultivačního média, ze kterého byl vytvořen supernatant, neovlivnilo antimikrobiální aktivitu testovaných kmenů.

6 Diskuze

Pectinatella magnifica je jedním z mnoha druhů sladkovodních mechovců. Jejím původním biotopem je Severní Amerika a do Evropy byla pravděpodobně zavlečena lodní dopravou. Bochnatka americká byla poprvé zpozorována v roce 1883 v Labi v přístavním městě Hamburk a odtud se rozšířila dále do Čech. Záznamy o prvním výskytu bochnatky americké na našem území pocházejí z roku 1922 a o 30 let později bylo zmapováno celkem 12 lokalit, kde byly zpozorovány kolonie bochnatky (Šinko, 2010). Masivnější rozvoj tohoto invazivního vodního živočicha souvisí pravděpodobně se vzrůstáním průměrné roční teploty v Čechách, a proto silně zaujala hydrobiology a vědce až v roce 2003. V tom to roce započaly hlubší studie a výzkumy, které objasňují životní nároky, způsoby rozmnožování, přezimování larev a statoblastů, vliv bochnatky na původní osídlení našich vod a křehkou rovnováhu vodního ekosystému. Je známo, že bochnatka není příliš náročná na množství živin nacházejících se ve vodě (Drbal et al., 1990), vyžaduje však stojaté a klidné vody, protože je citlivá na usazování detritu, který zabraňuje přístupu kyslíku. Kolonie bochnatky se vytváří a rostou postupně na substrátech ponořených ve vodě, jako jsou například stonky či kořeny vodních rostlin, ponořené větve nebo kameny. Na povrchu mají žlutohnědou barvu tvořenou jednotlivými živočichy, tzv. zoidy a uvnitř strukturu pevného průsvitného gelu. Gel je produkován samotnými živočichy a zvětšuje tak životní prostor, na kterém se mohou vyskytovat. Gelová hmota se skládá z 99 % z vody, dále byla dokázána přítomnost chitinu, vápníku, chloridu sodného a proteinů (Morse, 1930) Pravděpodobně nejvýznamnějším faktorem, který ovlivňuje růst kolonií bochnatky americké, je teplota. Autoři několika studií se shodují, že bochnatka je termofilního charakteru a kolonie začínají vyrůstat, když teplota vody dosáhne minimálně 20°C (Brown 1933; Wood 1989; Rodriguez a Venton, 2002; Opravilová 2006; Balounová et al. 2007b; Balounová et al. 2011). V létě roku 2015, kdy dosahovaly průměrné denní teploty přes 30°C několik po sobě jdoucích dnů v kuse opakovaně v průběhu celého léta bylo vyzorováno, že kolonie bochnatek, které se normálně nacházejí ve vodách až do září, byly již v srpnu téměř všechny rozpadlé a uvolňovaly statoblasty. Nicméně i přesto byl v září, po opadnutí vysokých denních teplot, pozorován opětovný nárůst nových kolonií bochnatek (Vlková, 2015). Tvorba statoblastů tedy není zapříčiněna pouze klesajícími teplotami začínajícího podzimu, ale slouží také k překonání období s vyššími teplotami, než je pro růst kolonií bochnatek ideální. V roce 2015 taktéž probíhalo nezávislé pozorování kolonií bochnatek a pravidelné měření teploty vody. Bylo

zjištěno, že kolonie bochnatek se vyskytovaly ve vodě, která mě teplotu pouze 7,6 °C. Nejvyšší teplota zaznamenaná při výskytu bochnatek byla 27,6 °C; průměrná teplota vody v období, po kterém byly kolonie bochnatek sledovány dosahovala hodnoty 16 °C (Balounová, 2015).

Statoblasty jsou černé diskovité útvary, sloužící k nepohlavnímu rozmnožování. Jsou 1mm velké, díky chitinovému krunýřku naplněného vzduchem se volně vznášejí na hladině a pomocí kotvicovitých chapadélek se snadno zachytí na peří vodního ptactva, které tyto nepohlavní spory roznášejí do širokého okolí (Massard a Geimer, 2002; Šetlíková et al., 2005; Šinko, 2010). Rozvoj statoblastu spouští příznivé okolní podmínky, zejména ideální teplota, dojde k uchycení statoblastu na vhodném substrátu, pučením se vytvoří zoid, ze kterého začne postupně vyrůstat nová kolonie. Bochnatka americká je schopna se rozmnožovat také pohlavním způsobem. Pohlavní aktivita trvá velmi krátké období a dochází k vnitřnímu oplození. Oplodněné vajíčko se vyvine v embryo a vytvoří obrvenou planktonní larvu, která se skládá ze dvou plně vyvinutých zooidů a řasnatého pláště. Po určité době přisedá na vhodný substrát, kde začne vyrůstat první jedinec nové kolonie. Tento jedinec je plně samostatný a schopný reprodukce pučením, ze kterého postupně vzniká celá kolonie (Wood, 2001).

Invazivní rozvoj sladkovodní mechovky spustil řadu výzkumů zabývajících se jejím dopadem na ekosystém v České republice, avšak její bakteriální osídlení je stále velmi málo prozkoumané. V souvislosti s antimikrobiálními látkami, které byly nalezeny a úspěšně izolovány ze symbiotických bakterií mořských druhů mechovců, vyvstává domněnka, zda by i sladkovodní druhy mechovky mohly mít podobné schopnosti. Proto bylo cílem této bakalářské práce testovat antimikrobiální aktivitu jejich symbiotických bakterií.

Druhové zastoupení bakterií osídlující povrch *Pectinatella magnifica* se dynamicky mění v souladu s měnící se mikrobiotou nacházející se ve vodě, podloží i na okolních rostlinách. Ovšem symbiotický vztah mezi bakteriemi a pektinatelou nelze vyloučit. Identifikacemi izolovaných bakterií se zabývali Vlková a kol. (2015). Z výsledků jejich práce je zřejmé, že nejdominantněji zastoupenými bakteriemi byly druhy rodů *Aeromonas* a *Aquitalea*. V menších počtech pak byly identifikovány rody *Chryseobacterium*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* a *Sphingomonas*. Nejhojněji zastoupená bakterie izolovaná z bochnatky je *Aeromonas veronii*. Tato gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie, je všudypřítomná ve sladké vodě a je prokázána její asociace s různými druhy obratlovců a bezobratlých, jako prospěšná, tak i s patogenními vlastnostmi (Silver et al. 2011). *Aeromonas veronii* je mimo jiné nacházena v trávicím traktu pijavic. Zdá se, že

napomáhá ke stabilizaci osídlení trávicího traktu jinými bakteriemi díky tomu, že při rozkládání krve, potravy pijavic, vznikají i látky, které mají antimikrobiální charakter a proto zabráňují množení patogenních mikroorganismů v trávicím traktu pijavic (Indergand and Graf, 2000). V experimentální části této práce byla prokázána antimikrobiální aktivita dvou kmenů *Aeromonas veronii*, které potlačovaly růst klostridií izolovaných z trávicího traktu člověka a přežvýkavců. V testování bylo použito několik izolátů rodu *Aeromonas*, které byly kultivovány na několika různých médiích, včetně média s přídavkem koňské krve. I přesto byla antimikrobiální aktivita prokázána pouze u dvou kmenů a přídavek krve nijak neovlivnil produkci látek, které by potlačovaly rozvoj dalších testovaných bakterií. Klostridie byly také citlivé na látky obsažené v supernatantu kmene *Pseudomonas moraviensis*, taktéž izolovaného z kolonií *Pectinatella magnifica*. Bakterie rodu *Pseudomonas* mají schopnost produkovat antibiotikum známé jako mupirocin. Mupirocin je vysoce aktivní zejména proti stafylokokům, streptokokům a některým gramnegativním bakteriím. Méně aktivní je proti většině anaerobních gramnegativních tyčinek (Sutherland et al., 1985). Je možné, že i druhy symbiotických pseudomonád *Pectinatella magnifica*, mají schopnost produkovat podobné antibiotikum nebo jinou látku s antimikrobiálním charakterem. Přestože kultivace kmenů bakterie *Pseudomonas* probíhala na několika různých médiích, na produkci antimikrobiálních látek to vliv nemělo a tato aktivita nebyla u dalších kmenů prokázána.

Nejen samotná produkce, ale i množství a stupeň účinnosti antimikrobiálně působících látek může být ovlivněna mnoha vnějšími faktory. Mezi ty patří zejména kultivační podmínky a složení kultivačních médií. Lze také předpokládat, že výsledky testování antimikrobiální aktivity mohou být ovlivněny i zvolenou metodou testování. Je známo, že při použití mikrodiluční metody jsou stanovovány vyšší minimální inhibiční koncentraci než při testování agarovou difuzní metodou. Zároveň je možné, že produkce antimikrobiálních látek probíhá ve specifické fázi růstu, u některých bakterií to může být v exponenciální fázi růstu, u jiné ve stacionární fázi. Tento faktor lze jen těžko při průběhu vlastního testování zohlednit, protože veškeré supernatanty izolovaných kmenů bakterií byly vždy připravovány z plně vzrostlých kultur o vysoké hustotě. Je pravděpodobné, že samotné čisté kultury samy o sobě antimikrobiální aktivitu nevykazují a že k produkci účinných antimikrobiálních látek je třeba aktivního symbiotického vztahu s jinými bakteriemi kolonizujícími kolonie bochnatky a zároveň s tím i symbióza s bochnatkou samotnou.

7 Závěr

Byla testována antimikrobiální aktivita kmenů bakterií izolovaných ze sladkovodní mechovky *Pectinatella magnifica*. Vzhledem k tomu, že u mořských druhů mechovců byla dokázána antimikrobiální aktivita, jak jejich symbiotických bakterií, tak jejich extraktů, bylo předpokládáno, že se podobná aktivita může projevit i u sladkovodních druhů. Úkolem bylo ověřit, zda bakteriální izoláty *Pectinatella magnifica* odebrané v letech 2012 a 2013 v Jižních Čechách vykazují antimikrobiální aktivitu. Při testování těchto vybraných izolátů byla antimikrobiální aktivita potvrzena ve třech případech a to při testování supernatantu symbiotických bakterií *Aeromonas veronii* a *Pseudomonas moraviensis* proti kmenům klostridií a zároveň při testování izolovaných bakterií mezi sebou *Aeromonas veronii* prokazatelně potlačovala růst bakterie *Pseudomonas moraviensis*.

Z výsledků vyplývá, že většina čistých kmenů nevykazuje antimikrobiální aktivitu, proto budou v diplomové práci testovány různé extrakty připravené přímo z kolonií *Pectinatella magnifica*.

8 Seznam použité literatury

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

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

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

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

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

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

BioLib [online]; [cit 30. 11. 2015] dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxonmap/id383/>

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

Cardarelli H. R., Saad S. M., Gibson G. R., Vulevic J. (2007): Functional petit-suisse cheese: measure of the prebiotic effect. *Anaerobe* 13: s 200–207

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

Cowan M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): s 564-582

Davidson S. K., Haygood M. G. (1999): Identification of Sibling Species of the Bryozoan *Bugula neritina* That Produce Different Anticancer Bryostatins and Harbor Distinct Strains of the Bacterial Symbiont „*Candidatus Endobugula sertula*“, *The Biological Bulletin*, s 273 - 280

Desser S. S., Koehler A., Barta J. R., Kamyab J., Ringuette M. J. (2004): *Trichonosema algonquinensis* n. sp. (Phylum Microsporidia) in *Pectinatella magnifica* (Bryozoa: Phylactolaemata) from Algonquin Park, Ontario, Canada. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51(4), s 389 - 393

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

Drbal K., Kroupa M., Bican J. (1990): Heavy metals in waters of flooded sand pits. In: Krupauer V., Bican J., Drbal K. (eds.): *Extracted Sand Pits: Man-made Ecosystem of Třeboň Biosphere Reserve. Studie ČSAV 13.90. Academia Praha*, s. 71 - 81.

Ebel J. (1986): Phytoalexin Synthesis: The Biochemical Analysis of the Induction Process. *Annual Review of Phytopathology*, 24(1): s 235-264.

Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Mat'ha V. (2004): *IMUNITNÍ SYSTÉM – informace pro každého. Grada Publishing, a. s. Havlíčkův brod. Počet stran 236. ISBN 80 247 1196 6*

Field C. J. (2005): The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 135: s 1 – 4

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

Freeman, B. C., Beattie, G. A. (2008): An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. The Plant Health Instructor, DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01

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

Heindel H., Wiese J., Thial V., Imhoff J. F. (2009): Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats, Sytematic and Applied Microbiology 33, s 94 - 104

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

Leidy, 1851 [online]; [cit 26. 11. 15]; BioLib. Dostupné z <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id44166/>

Lefnerová D., Šimůnek J. [online]; [cit 15. 2. 2016]; dostupné z <http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/atb.pdf>

Lim G. E., Haygood M. G. (2004): “Candidatus Endobugula glebosa,” a Specific Bacterial Symbiont of the Marine Bryozoan Bugula simplex, Applied and Enviromental Microbiology, s 4921 - 4929

Lochmann O. (1998): Stručný průvodce léčbou antibiotiky a chemoterapeutiky, BristolMyerss Squibb

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

Mert-Türk F. (2002): Phytoalexins: Defence or just a response to stress?. Journal of Cell & Molecular Biology, 1(1): s 1.

Morse W. (1930): The chemical constitution of Pectinatella. Science 7 March 930: 265

Nedorostova L., Kloucek P., Kokoska L., Stolcova M., Pulkrabek J. (2009): Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborn bacteria; FOOD CONTROL; vol 20, Issue 2, s 157 - 160

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

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

Peters L., König G. M., Wright A. D., Pukall R., Stackebrandt E., Eberl L., Riedel K. (2003): Applied and Enviromental Microbiology, s 3469 - 3475

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

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

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

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

Ryšánek D. (2007): Vliv mastitid na jakost a zdravotní nezávadnost mléka

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

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

Sutherland, R., Boon, R.J., Griffin, K.E., Masters, P.J., Slocombe, B., White, A.R. (1985): Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 27, s 495-498

Šetlíková I., Balounová Z., Lukavský J., Rajchard J. (2005): Nepůvodní druh mechovky na Třeboňsku; Nakladatelství Živa

Šinko, Jan 2010 [online]; [cit 26. 11. 2015]; příroda.cz. Dostupné z <http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=1210>

Tvrzová L., Schumann P., Spröer C., Sedláček I., Páčová Z., Šedo O., Zdráhal Z., Steffen M., Lang E. (2006): *Pseudomonas moraviensis* sp. nov. and *Pseudomonas vranovensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 56: s 2657–2663

VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., Farmer, E. E. (1994): Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". The Plant Cell, 6(9), s 1191-1192

Vlková (2015) Eva, prof. Ing. PhD., Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinářských a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbátka, ústní sdělení

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

Walls J. T., Ritz D. A., Blackman A. J. (1993): Fouling, surface bacteria and antimicrobial agents of four bryozoans species found in Tasmania, Australia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 169 (1993), s 1 - 13

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

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

9 Seznam zkratk

ATCC - Americká sbírka typových kultur

ARDRA – ribozomální DNA analýza

CCM – Česká sbírka mikroorganismů

DSMZ – Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury

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

MBC – Minimální baktericidní koncentrace

MIC – Minimální inhibiční koncentrace

PCR – Polymerázová řetězová reakce