

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Antimikrobiální látky produkované bakteriemi rodu  
*Bacillus***

**Diplomová práce**

**Bc. Marie Pruchová  
Výživa zvířat a dietetika**

**Ing. Hana Šubrtová Salmonová, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antimikrobiální látky produkované bakteriemi rodu *Bacillus*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za veškerou projevenou pomoc a podporu, bez které by tato práce rozhodně nevznikla. Slova díky patří i mému manželovi a rodičům, kteří mi byli vždy oporou, nejen při studiu.

# Antimikrobiální látky produkované bakteriemi rodu *Bacillus*

## Souhrn

Bakterie rodu *Bacillus* jsou producenty široké škály antimikrobiálních látek s potenciálem pro využití v lékařství, zemědělství a potravinářském sektoru. Proto byla cílem diplomové práce charakterizace čtyř produkčních kmenů *Bacillus* sp. izolovaných z různých prostředí, testování jejich antimikrobiální aktivity a určení povahy antagonisticky působících látek. Identifikace kmenů byla provedena metodami MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a sekvenováním 16S rDNA. U kmenů skupiny *B. cereus* byl metodou PCR a fenotypovými testy stanoven patogenní potenciál. Antimikrobiální aktivita byla testována agarovou difúzní metodou proti potenciálně patogenním bakteriím, bakteriím způsobujícím kažení potravin a probiotickým bakteriím. Povaha aktivní látky byla studována vystavením supernatantů různým enzymům, teplotám a hodnotám pH. U kmene 1 byla také stanovena fáze iniciace exprese a fáze maximální produkce antimikrobiální látky. Dále byl studován vliv kultivační teploty na expresi inhibiční látky a stimulována exprese prostřednictvím nisinu, mitomycinu C a supernatantu z lecitináza-pozitivních bakterií. Detailněji byla zjišťována povaha antimikrobiální látky, a to účinkem surfaktantů a různých podmínek skladování. Také byl zkoumán její vliv na buňky. Pro citlivé kmene byla stanovena minimální inhibiční a baktericidní koncentrace supernatantu mikrodiluční metodou. Všechny kmene byly identifikovány jako *Bacillus*, kmen 1 jako *B. weihenstephanensis*, kmen 2 jako *B. proteolyticus*, kmene 3 a 4 jako *B. tequilensis*. U kmene 1 byla zjištěna přítomnost genů pro 2 virulentní faktory, lecitinázu C a nehemolytický enterotoxin, projevil se slabou lecitinázovou aktivitou. U kmene 2 byl zjištěn výrazně vyšší patogenní potenciál, projevil se silnou lecitinázovou aktivitou a je hemolytický. Všechny kmene vykazaly antimikrobiální aktivitu, shodně inhibovaly vysoce patogenní bakterie *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a *Listeria monocytogenes*. *B. tequilensis* 3 a 4 účinkovali také vůči *Bacillus fusiformis*, *Clostridium butyricum* a *Cl. difficile*, a kmen 4 navíc vůči *Micrococcus luteus*. U všech kmenů byla zjištěna proteinová povaha aktivních látek. Zatímco u kmenů *B. cereus* (kmene 1 a 2) byla aktivita inhibována pouze proteinázou K, u kmenů skupiny *B. subtilis* (kmene 3 a 4) i pepsinem po 24h působení. Všechny látky byly vysoce odolné vůči vysokým teplotám (až 100 °C po dobu 1h) a aktivní v širokém rozmezí hodnot pH. U *B. weihenstephanensis* 1 byla exprese antimikrobiální látky zahájena na konci exponenciální fáze a maximálních hodnot bylo dosaženo při přechodu do fáze

stacionární. Optimální teplota kultivace pro dosažení maximální produkce byla stanovena na 30 °C, přičemž na expresi neměla vliv žádná z antimikrobiálních látek ani supernatant z lecitináza-pozitivních bakterií. Antimikrobiální látka si zachovala stabilitu i během dlouhodobém skladování (1 měsíc) za vysokých teplot 30 a 37 °C. Bylo zjištěno, že aktivní látka účinkuje baktericidně, ačkoliv se zdá, že nepůsobí bakteriolyticky. Při nižších koncentracích působí bakteriostaticky. U citlivých kmenů byla stanovena minimální inhibiční a baktericidní koncentrace. Nejnižší MIC a MBC byly naměřeny u anaerobně kultivovaného *B. cereus* CCM 2010 (titr 32). S ohledem na zmíněné vlastnosti, je antimikrobiální látkou pravděpodobně cyklický bakteriocin. Taková látka by mohla nalézt uplatnění v potravinářském průmyslu při konzervaci potravin nebo jako léčivo. Stejně tak antimikrobiální látky ostatních kmenů budou pro svůj velký potenciál dále studovány. Také bude pozornost zaměřena na nepatogenní kmeny, které by mohly být využity například jako probiotika k modulaci mikrobioty trávicího traktu a jako prevence proti střevním infekcím nebo jako silážní inokulanty.

**Klíčová slova:** *Bacillus*, antimikrobiální aktivita, sekundární metabolismus, bakteriociny, antibiotika, patogenní potenciál

# Antimicrobial substances of the genus *Bacillus*

## Summary

Some *Bacillus* spp. produce a variety of antimicrobials with potential for use in medicine, agriculture and food industry. Therefore, the aim of the diploma thesis was to characterize four strains of *Bacillus* sp. isolated from various environments, testing their antimicrobial activity and determination of the nature of antagonistic compounds. Identification of the strains was performed by MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rDNA sequencing. Pathogenic potential of *B. cereus* strains was studied by PCR and phenotypic assays. Antimicrobial activity was tested by agar well diffusion method against potentially pathogenic bacteria, food spoilage bacteria and probiotic bacteria. The nature of the active substance was studied by exposing supernatants to various enzymes, temperatures and pH values. The growth phase of strain 1 when active agent begins to be expressed and phase of maximum production were determined. Effect of cultivation temperature on the expression of the inhibitory substance, and stimulation of expression by nisin, mitomycin C and supernatants from lecithinase-positive bacteria were also studied for this strain. The nature of antimicrobial compound was investigated in more detail by effects of surfactants and different storage conditions. Its effect on cells was also investigated. For sensitive strains, the minimum inhibitory and bactericidal concentrations of the supernatant were determined by the microdilution method. All strains were identified as *Bacillus*, strain 1 as *B. weihenstephanensis*, strain 2 as *B. proteolyticus*, strains 3 and 4 as *B. tequilensis*. Strain 1 showed the presence of genes coding 2 virulence factors, lecithinase C and non-hemolytic enterotoxin, with weak lecithinase activity. Strain 2 had significantly higher pathogenic potential, it showed strong lecithinase and hemolytic activity. All strains inhibited the highly pathogenic bacteria *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes*, *B. tequilensis* 3 and 4 also acted against *Bacillus fusiformis*, *Clostridium butyricum* and *Cl. difficile* and strain 4 in addition *Micrococcus luteus*. It was found that active substances of all strains tested were of proteinaceous nature. Whereas activity of *B. cereus* strains (strains 1 and 2) was inhibited only by proteinase K, activity of *B. subtilis* strains (strains 3 and 4) also by pepsin after 24 h of treatment. All antimicrobial compounds were highly resistant to high temperatures (up to 100 °C for 1 hour) and active in a wide range of pH values. In *B. weihenstephanensis* 1, antimicrobial agent began to be expressed at the end of exponential phase and the maximum values were reached during the transition to the stationary phase. The optimal culture temperature for maximal production was determined at 30 °C. No

antimicrobials or supernatants from lecithinase-positive bacteria affected expression. The antimicrobial substance retained its stability even during long-term storage (1 month) at high temperatures of 30 and 37 °C. The active substance was found to have bactericidal, at lower concentrations bacteriostatic effect, and it did not appeared to be bacteriolytic. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations were determined for sensitive strains. The lowest MIC and MBC were observed in anaerobically cultured *B. cereus* CCM 2010 (titer 32). It can be assumed that antimicrobial agent of *B. weihenstephanensis* 1 is a cyclic bacteriocin. Such substance could be used in the food industry as a preservative, for pharmaceutical purposes or as a medicine. Likewise, antimicrobials of other strains will be further studied for their great potential. Attention will also be focused on non-pathogenic strains which could be used, as probiotics modulation of the gastrointestinal microbiota, as a prevention against infections or as silage inoculants.

**Keywords:** *Bacillus*, antimicrobial activity, secondary metabolism, bacteriocins, antibiotics, pathogenic potential

## Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Úvod</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>3 Literární rešerše</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>3.1 Rod <i>Bacillus</i></b> .....  | <b>12</b> |
| 3.1.1 Taxonomie .....   | 12        |
| 3.1.2 Obecná charakteristika.....   | 13        |
| 3.1.3 Životní cyklus .....  | 15        |
| 3.1.3.1 Vegetativní růst.....   | 16        |
| 3.1.3.2 Sporulace .....   | 16        |
| 3.1.3.3 Klíčení.....  | 17        |
| 3.1.4 Skupina <i>Bacillus cereus</i> .....  | 18        |
| 3.1.4.1 <i>Bacillus mycoides</i> .....  | 18        |
| 3.1.4.2 <i>Bacillus weihenstephanensis</i> .....  | 19        |
| 3.1.4.3 <i>Bacillus proteolyticus</i> .....   | 19        |
| 3.1.5 Skupina <i>Bacillus subtilis</i> .....  | 20        |
| 3.1.5.1 <i>Bacillus tequilensis</i> .....   | 20        |
| 3.1.6 Patogenní potenciál <i>Bacillus</i> spp. a požadavky dle EFSA .....   | 21        |
| <b>3.2 Antimikrobiální látky produkované <i>Bacillus</i> spp.</b> .....   | <b>23</b> |
| 3.2.1 Primární metabolity působící antimikrobiálně .....  | 23        |
| 3.2.2 Sekundární metabolity působící antimikrobiálně .....  | 24        |
| 3.2.2.1 Antimikrobiální peptidy.....  | 24        |
| 3.2.2.1.1 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy (bakteriociny) .....  | 25        |
| 3.2.2.1.1.1 Třída I: Ribozomálně syntetizované a post-translačně modifikované peptidy (RiPP).....   | 28        |
| 3.2.2.1.1.2 Třída II: Nemodifikované nebo cyklické bakteriociny .....   | 33        |
| 3.2.2.1.2 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální proteiny.....   | 36        |
| 3.2.2.1.3 Neribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy.....  | 37        |
| 3.2.2.2 Nebílkovinné antimikrobiální látky .....  | 38        |
| <b>4 Metodika</b> .....   | <b>40</b> |
| <b>4.1 Charakterizace produkčních kmenů</b> .....   | <b>41</b> |
| 4.1.1 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)..... | 41        |
| 4.1.2 Sekvenování genu pro 16S rRNA.....  | 41        |
| 4.1.3 Stanovení metabolického profilu .....   | 42        |
| 4.1.4 Stanovení patogenního potenciálu .....  | 43        |
| 4.1.4.1 Zkouška hemolytické a lecitinázové aktivity.....  | 43        |



|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 4.1.4.2    | Detekce genů kódujících faktory virulence a enzym inhibující bakteriální buněčnou komunikaci..... | 44        |
| <b>4.2</b> | <b>Testování antimikrobiální aktivity produkčních kmenů.....</b>                                  | <b>47</b> |
| 4.2.1      | Indikátorové kmeny .....  | 47        |
| 4.2.2      | Stanovení antimikrobiální aktivity .....  | 48        |
| <b>4.3</b> | <b>Charakterizace antimikrobiálně působících látek .....</b>                                      | <b>49</b> |
| 4.3.1      | Vliv enzymů.....  | 49        |
| 4.3.2      | Vliv pH.....  | 50        |
| 4.3.3      | Vliv teplot .....   | 50        |
| <b>4.4</b> | <b>Detailní charakterizace antimikrobiální aktivity kmene 1.....</b>                              | <b>50</b> |
| 4.4.1      | Růstová křivka ve vztahu k produkci antimikrobiální látky .....                                   | 51        |
| 4.4.2      | Vliv kultivační teploty na expresi antimikrobiální látky.....                                     | 51        |
| 4.4.3      | Stimulace exprese antimikrobiální látky .....   | 51        |
| 4.4.4      | Vliv surfaktantů na aktivitu antimikrobiální látky .....  | 52        |
| 4.4.5      | Vliv délky skladování na aktivitu antimikrobiální látky .....                                     | 52        |
| 4.4.6      | Testování synergického efektu s laktoferinem.....   | 52        |
| 4.4.7      | Vliv antimikrobiální látky na buňku .....   | 53        |
| 4.4.8      | Mikrodiluční metoda testování antimikrobiální aktivity.....                                       | 54        |
| <b>5</b>   | <b>Výsledky.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Charakterizace produkčních kmenů.....</b>  | <b>56</b> |
| 5.1.1      | Identifikace kmenů.....   | 56        |
| 5.1.2      | Metabolický profil.....   | 57        |
| 5.1.3      | Patogenní potenciál kmenů skupiny <i>B. cereus</i> .....  | 58        |
| <b>5.2</b> | <b>Antimikrobiální aktivita produkčních kmenů .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Charakterizace antimikrobiálně aktivních látek – vliv enzymů, pH, teplot.....</b>              | <b>60</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Výsledky detailní charakterizace antimikrobiální aktivity kmene 1.....</b>                     | <b>62</b> |
| 5.4.1      | Růstová křivka ve vztahu k produkci antimikrobiální látky .....                                   | 62        |
| 5.4.2      | Vliv kultivační teploty na expresi antimikrobiální látky.....                                     | 62        |
| 5.4.3      | Stimulace exprese antimikrobiální látky a synergický efekt s laktoferinem .....                   | 63        |
| 5.4.4      | Vliv surfaktantů.....   | 63        |
| 5.4.5      | Vliv podmínek skladování na aktivitu antimikrobiální látky .....                                  | 64        |
| 5.4.6      | Vliv antimikrobiální látky na buňku .....   | 65        |
| 5.4.7      | Mikrodiluční metoda testování antimikrobiální aktivity.....                                       | 67        |
| <b>6</b>   | <b>Diskuze.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>7</b>   | <b>Závěr .....</b>  | <b>77</b> |
| <b>8</b>   | <b>Literatura.....</b>  | <b>78</b> |
| <b>9</b>   | <b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>  | <b>92</b> |
| <b>11</b>  | <b>Samostatné přílohy .....</b>   | <b>I</b>  |

# 1 Úvod

Rozsáhlý výskyt bakteriálních kmenů rezistentních na konvenční antibiotika a zpomalení objevu nových skupin antibiotických látek jsou považovány za závažné problémy veřejného zdraví (May, 2014; O'Neill, 2016). Rozvoj rezistentních kmenů byl v první řadě zapříčiněn dlouhodobým nadměrným užíváním antibiotik, což umožnilo infekčním organismům přizpůsobit se těmto látkám a snížit tak jejich účinnost. Dalším významným faktorem je následné šíření těchto kmenů mezi lidmi a v neposlední řadě přenos na člověka z hospodářských zvířat, která jsou určena pro produkci potravin, a byla léčena antibiotiky patřícími do stejných chemických skupin jako antibiotika používaná v humánní medicíně (Ansari, 2015; CDC, b.r.). Kvůli ztrátě účinnosti mnoha antibiotik jsou vědci pod tlakem, aby identifikovali nové typy terapeutických látek a strategií, jak s nimi zacházet. Z hlediska kvality a bezpečnosti potravin jsou celosvětovým problémem nové stravovací návyky spotřebitelů. Ti se stále více rozhodují pro tzv. potraviny určené k přímé spotřebě a minimálně zpracované potraviny. Potravinářský průmysl tak čelí výzvě poskytovat potraviny, které obsahují minimum syntetických chemických přísad a soli / cukru, jsou nutričně prospěšné, a současně stabilní a bezpečné z mikrobiálního hlediska po co nejdelší dobu (Egan et al., 2016). K zajištění kvality a bezpečnosti potravinářských výrobků je tak nutné hledat účinné alternativy s antimikrobiálními vlastnostmi, jakými jsou například bakteriociny (O'Connor et al., 2020). V neposlední řadě roste poptávka po probiotických bakteriích pro humánní použití se schopností inhibice střevních patogenů jako jsou *Clostridium perfringens*, *C. difficile* a další. Také výrazně vzrostl zájem, zejména po zákazu zkrmování antibiotických stimulatorů růstu, o využití probiotik u hospodářských zvířat ke zlepšení zdraví a tedy jejich užitkovosti (Abriouel et al., 2011; Mingmongkolchai et Panbangred, 2018). Ačkoliv v popředí výzkumu jsou zejména bakterie mléčného kvašení, které jsou všeobecně považovány za bezpečné, na zájmu vědců získává také rod *Bacillus*. *Bacillus* spp. jsou prakticky všudypřítomné grampozitivní sporulující bakterie ve tvaru tyčinek (Logan et Vos, 2015). Jejich potenciál pro produkci různorodých sekundárních metabolitů s antimikrobiálními účinky je znám již více než 50 let, avšak díky spojitosti některých druhů nebo kmenů s kažením potravin či alimentárními otravami, byl jejich význam po dlouhou dobu přehlížen (Abriouel et al., 2011).

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Hypotéza: Některé kmeny bakterií rodu *Bacillus* izolované z životního prostředí budou mít schopnost produkovat antimikrobiálně působící látky.

Cílem diplomové práce je proto shrnutí dosavadních poznatků o antimikrobiálně působících látkách produkováných rodem *Bacillus*, testování antimikrobiální aktivity izolátů tohoto rodu a detailní charakterizace produkčních kmenů i aktivních látek. U produkčních kmenů bude také studována jejich bezpečnost a vhodnost pro uplatnění v praxi.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Rod *Bacillus*

Jednou z prvních popsaných bakterií vůbec bylo „*Vibrio subtilis*“, a to německým vědcem Ehrenbergem roku 1835. V roce 1872 byl tento organismus přejmenován Ferdinandem Cohnem na *Bacillus subtilis* (Obr. 1) a stal se typovým druhem rozsáhlého a diverzifikovaného rodu *Bacillus*. Pro bakterie rodu *Bacillus* je charakteristická tvorba jedné spory uvnitř bakteriální buňky, tzv. endospora. Sporulace byla poprvé popsána Cohnem u *B. subtilis*, později také zakladatelem bakteriologie Robertem Kochem u patogenního druhu *B. anthracis*. Z důvodu nezvyklé odolnosti spor vůči chemickým a fyzikálním činitelům, vývojovému cyklu, všudypřítomnosti zástupců a značné patogenitě *B. anthracis* získal rod *Bacillus* na zájmu vědců, který setrvává i v současnosti (Slepecky et Hemphill, 2006).



**Obrázek 1:** *Bacillus subtilis*

(zdroj obrázku: <https://www.indiamart.com/proddetail/bacillus-subtilis-16805520862.html>).

#### 3.1.1 Taxonomie

Podle Taxonomic Outline of the Prokaryotes (Garrity et al., 2004) se rod *Bacillus* taxonomicky řadí do kmene Firmicutes, třídy Bacilli, řádu Bacillales a čeledi *Bacillaceae*.

Metody klasifikace a identifikace bakterií doznaly za posledních sto let značné proměny. Přes metabolickou a fenotypovou charakterizaci, numerickou analýzu fenotypových dat, DNA-DNA hybridizaci (DDH) a stanovení obsahu G+C, po sekvenování genu pro 16S rRNA a multilokusovou sekvenční analýzu (MLSA), až k zavedení sekvenování kompletních genomů (Thompson et al., 2015). To vede k neustálým změnám v taxonomickém zařazení *Bacillus* spp.,

kdy byly původně do rodu *Bacillus* řazeny veškeré aerobní sporulující bakterie. Ovšem na základě zavedení sofistikovanějších analytických metod a neustálý příliv nově popsanych druhů Zeigler et Perkins (2015) uvádějí, že rod *Bacillus* nyní tvoří jen malou část rozsáhlé skupiny *Bacillus sensu lato*. Tato skupina zahrnuje všechny rody čeledí *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae* a *Alicyclobacillaceae* a spolu s dalšími „ne-bacilovými“ čeleděmi (*Listeriaceae*, *Staphylococcaceae*) se spojují v řád Bacillales. Mnoho původních *Bacillus* spp. tuto autoři definují jako *Bacillus sensu stricto*, kam řadí dvě významné skupiny sdružující blízké příbuzné druhy, a to skupinu *Bacillus cereus* (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* a další) a skupinu *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciensis*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. aerophilus* a další). Bhandari et al. (2013) dokonce navrhli, aby byl rod *Bacillus* vyhrazen pouze pro druhy, které náleží do těchto dvou skupin. Všechny ostatní druhy by měly být dle autorů převedeny do jiných rodů. Shodný názor podložený rozsáhlými fylogenetickými a molekulárními analýzami zastávají také Gupta et al. (2020).

Rod *Bacillus* představuje velmi heterogenní skupinu mikroorganismů, která zahrnuje druhy s velkými rozdíly ve fenotypu, nutričních požadavcích a dalších fyziologických vlastnostech (Drobniewski, 1993; Jensen et al., 2003). O tom svědčí rozsáhlé druhové zastoupení, kdy v květnu 2004 čítal rod 90 druhů, v roce 2009 již kolem 140 druhů a na počátku roku 2017 už dokonce 318 druhů (Fan et al., 2017; Logan et Vos, 2015; Thompson et al., 2015). Aktuálně je v databázi LPSN „List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature“ vedeno pouze 93 druhů s validně publikovaným a správným názvem („Genus *Bacillus*“, b.r.). Například hojně průmyslově využívaný druh *Bacillus megaterium* byl na konci roku 2020 reklasifikován do rodu *Priestia* (Gupta et al., 2020) a je v současnosti veden v databázi jako homotypické synonymum druhu *Priestia megaterium* („Species: *Bacillus megaterium*“, b.r.). Je tedy zřejmé, že taxonomické přeměny rodu ještě zdaleka nejsou u konce.

### 3.1.2 Obecná charakteristika

Bakterie rodu *Bacillus* jsou převážně aerobní nebo fakultativně anaerobní, rovné nebo mírně zakřivené tyčinky, vyskytující se v párech, v řetízcích, a někdy také ve formě dlouhých vláken. Jedná se o organismy grampozitivní, grampozitivní pouze v raných fázích růstu (gramvariabilní) nebo gramnegativní. Typický znak představuje tvorba jedné endospory uvnitř bakteriální buňky, vysoce odolné vůči různým nepříznivým podmínkám – teplota, záření, desinfekční prostředky a vysušení. Velikost buněk je velice variabilní. Délka se pohybuje od 0,9 do 10,0  $\mu\text{m}$  a průměr od 0,4 do 1,8  $\mu\text{m}$ . Buňky stejného druhu mají ale poměrně pravidelné

rozměry. Například buňky *B. pumilus* měří obvykle  $2,0\text{--}3,0 \times 0,6\text{--}0,7 \mu\text{m}$ , zatímco buňky *B. megaterium* dosahují až  $2,0\text{--}5,0 \times 1,2\text{--}1,5 \mu\text{m}$ . Velikost a morfologie kolonií jsou také velice variabilní. Liší se nejen mezi druhy, ale také mezi jednotlivými kmeny téhož druhu. Pohyb mnoha *Bacillus* spp. zajišťují řídce rozptýlené peritrichní bičíky. Přítomnost či absence bičíků není považována za užitečný taxonomický znak rodu, ale při identifikaci druhů má určitou vypovídající hodnotu. Například *B. anthracis* a *B. mycooides* jsou nepohybliví, zatímco většina kmenů *B. cereus* je pohyblivá. Až na výjimky využívají bacily glukózu a/nebo jiné fermentovatelné cukry jako jediný zdroj uhlíku a energie. Pověšinou je koncovým příjemcem elektronu kyslík. Dále mohou využívat anorganické i organické zdroje dusíku. Mnoho druhů využívá jako jediný zdroj dusíku amonnou sůl, široce jsou využívány aminokyseliny a některé kmeny mohou využívat močovinu. Bylo zjištěno, že leucin, threonin a valin jsou nezbytné pro růst a produkci emetického toxinu u *B. cereus*. Navzdory velké diverzitě rodu, většina *Bacillus* spp. nemá problémy s růstem na běžných kultivačních médiích, jako jsou živný agar a trypton sójový agar. Velká část roste také na krevním agaru. Převážná většina druhů je mezofilní s teplotním optimem růstu mezi  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , typicky kolem  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ačkoliv hodnota pH 7,0 je vhodná pro růst většiny druhů, existují výjimky. Např. *B. alcalophilus* vyžaduje pH 9,0-10,0, tedy zásadité, naopak *B. acidocaldarius* potřebuje pro optimální růst kyselá pH 3,0-4,0 (Logan et Vos, 2015).

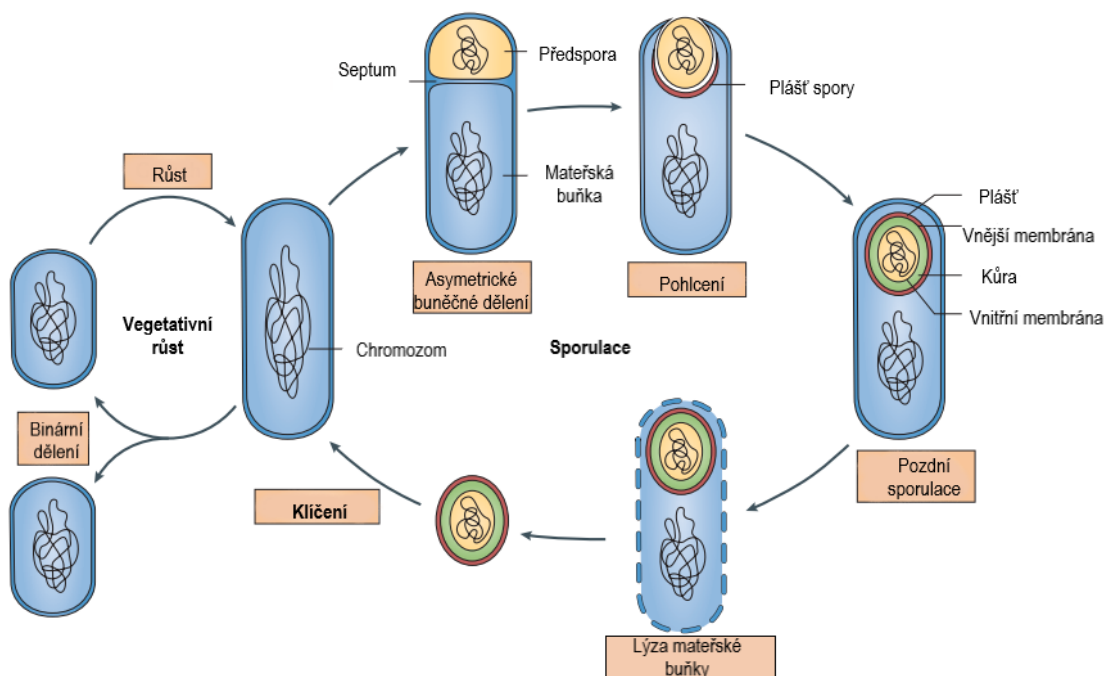
Bacily jsou prakticky všudypřítomné. Obecně se jedná o půdní mikroorganismy, ale ve vysokých počtech se vyskytují i ve vodě, na vegetaci, v potravinách a krmivech (Logan et Vos, 2015). Řada z nich, včetně druhu *B. subtilis*, byla také izolována ze zažívacího traktu hmyzu, zvířat a lidí (Nicholson, 2002). V této souvislosti sílí názor, že *B. subtilis* a pravděpodobně i jiné druhy se přizpůsobily životu v trávicím traktu, včetně schopnosti tvořit zde biofilm, anaerobně sporulovat a produkovat antimikrobiální látky (Hong et al., 2009).

Většina druhů rodu *Bacillus* je považována za bakterie s nízkým patogenním potenciálem, či za zcela nepatogenní a jen zřídka bývají spojovány s onemocněním lidí nebo zvířat (Logan & Vos 2015). Výjimku tvoří někteří zástupci skupiny *Bacillus cereus*. Všeobecně je známo, že druhy *B. cereus*, *B. anthracis* a *B. thuringiensis* produkují různé toxiny. Přítomnost některých *Bacillus* spp. bývá tedy u většiny typů potravin považována za nežádoucí. Pomineme-li riziko alimentárních otrav, produkcí proteolytických a lipolytických enzymů způsobují senzorycky nežádoucí změny. V některých případech je naopak tento proces žádoucí. Například *B. subtilis* je využíván k fermentaci sójových bobů při výrobě tradičního východoasijského pokrmu natto (Abriouel et al., 2011). Netoxinogenní *B. cereus* var *toyoi* s probiotickými vlastnostmi se pro změnu využívá jako krmné aditivum (Lodemann et al., 2008).

### 3.1.3 Životní cyklus

Vědci Cohn (1876), Koch (1876) a Tyndall (1877) nezávisle na sobě objevili, že určité bakterie mohou část svého života strávit jako dormantní buněčné struktury, dnes známé pod pojmem endospory. Schopnost vytvářet endospory za aerobních podmínek se stala od roku 1920 určujícím znakem rodu *Bacillus* (Logan et Vos, 2015).

Životní cyklus sporotvorných bacilů se skládá ze tří různých po sobě následujících fyziologických procesů, a to vegetativního růstu, sporulace a klíčení. Přechod mezi jednotlivými fázemi cyklu je řízen dostupností živin (Sella et al., 2014). Zmíněné procesy jsou schematicky zobrazeny na Obrázku 2 a jejich vlastní průběh je popsán dále.



**Obrázek 2:** *Bacillus subtilis* – životní cyklus. Sporulace začíná rozdělením sporangia na mateřskou buňku a předsporu. Dále mateřská buňka pohltí předsporu a začne se tvořit plášť budoucí spory. Během pozdní sporulace se formuje mezi vnitřní a vnější membránou předspory kůra. V posledním kroku mateřská buňka lyzuje za uvolnění zralé spory do prostředí. Spory mají schopnost v reakci na dostupnost živin rychle vyklíčit a obnovit vegetativní růst. Upraveno podle Mckenney et al., (2013).

### 3.1.3.1 Vegetativní růst

Tento proces je charakterizován binárním symetrickým dělením rostoucích buněk, ke kterému dochází za eutrofních podmínek (Sella et al., 2014). V průběhu vegetativního růstu bakterie prochází několika fázemi. Lag fáze je adaptačním obdobím, během něhož se bakteriální buňky přizpůsobují novému prostředí (Swinnen et al., 2004). V exponenciální fázi se buňky začínají dělit, dochází k logaritmickému zvýšení jejich počtu a generační čas dosahuje konstantního minima. Bakterie jsou metabolicky maximálně aktivní, syntetizují DNA, RNA, složky buněčných stěn a další látky nezbytné pro růst dělicích se buněk, tedy primární metabolity. Postupně dochází k vyčerpávání živin kulturou a začínají se hromadit odpadní produkty, populační růst se zastavuje. Bakteriální kultura přechází do stacionární růstové fáze, kdy se počet dělicích buněk rovná počtu umírajících. Zvyšuje se konkurence o živiny, bakterie jsou metabolicky méně aktivní a začínají produkovat sekundární metabolity, které poskytují specifické výhody pro přežití. Sporotvorné bakterie v této fázi vytváří endospory. Pokud počet umírajících přeroste dělicí se buňky, kultura se dostane do fáze odumírání (Madigan et al., 2010). Ačkoliv je většina antimikrobiálně působících látek produkována ve stacionární fázi, v případě ribozomálně syntetizovaných antimikrobiálních peptidů se mohou růstové fáze, kdy je jejich produkce zahájena, lišit. Kleerebezem et Quadri (2001) uvádějí, že produkce těchto látek závisí na hustotě bakteriální populace. Obvykle se spouští na konci exponenciální fáze a zvyšuje se na maximální produkční úroveň v rané stacionární fázi. To potvrzují Bizani et Brandelli (2002) u kmene *B. cereus* 8 A, kdy je bakteriocin cerein 8 A detekován již v exponenciální fázi, ale maximální aktivity je dosaženo ve stacionární fázi růstu.

### 3.1.3.2 Sporulace

Za iniciaci sporulace se považuje deplece živin, zejména uhlíku a dusíku, související s rostoucí hustotou bakteriální populace a akumulací odpadních metabolitů. To vede k celé kaskádě událostí, která trvá několik hodin (Sella et al., 2014). V počátku sporulace dochází ke změnám v buněčném dělení a segregaci chromozomů. Dělení buněk je asymetrické, čímž vznikají dva různé typy buněk – předspora (menší oddíl) a mateřská buňka. Po asymetrickém dělení následuje pohlcení předspory mateřskou buňkou v procesu připomínajícím fagocytózu. Nakonec mateřská buňka lyzuje za uvolnění zralé endospory. Ta je považována za nejvíce odolnou formu života na planetě (de Hoon et al., 2010; Levin et Grossman, 1998). Mechanismus perzistence spor v prostředí není zcela objasněn. Je ovšem známo, že se na ní



podílí metabolická inaktivita spory a její částečná dehydratace společně se strukturou zevního pláště a vnitřní kůry, které chrání jádro spory s genetickým materiálem (Mckenney et al., 2013).

Stojí za zmínku, že půdní organismy, které část svého života přežívají jako dormantní spory (např. bacily, aktinomycety, houby), patří mezi nejlodnější producenty antimikrobiálních látek. To částečně odráží aspekty samotného procesu sporulace, při kterém je spotřebována notná dávka energie i živin (Tocheva et al., 2016). V populaci podstupující sporulaci je proto významná část jedinců doslova obětována, aby poskytla živiny a energetické zdroje pro významně menší podíl sporulujících buněk, tzv. kanibalismus (González-Pastor, 2011). V případě bacilů tvoří spory maximálně 10 % buněk a větší část buněk je lyzována. Živiny uvolněné z intracelulárního obsahu nejsou dostupné pouze pro sporulující organismus, ale také pro potenciálně konkurenční organismy žijící ve stejné nise. Z tohoto důvodu si některé bakterie vytvořily obrannou strategii a proces sporulace je doprovázen syntézou metabolitů s inhibiční aktivitou, kterými se sporulující organismus před konkurenty brání.

### **3.1.3.3 Klíčení**

Navzdory tomu, že spory mohou po dlouhá léta přežívat ve stavu dormance a metabolické inaktivity, neustále vnímají změny ve svém okolí a pokud přijde vhodný stimul, vrací se během pár minut k aktivnímu růstu v procesu zvaném klíčení (Setlow, 2003). Podobně jako sporulace se tento proces skládá z různých stádií, která se vyznačují klíčovými morfologickými změnami. Klíčení je zahájeno, pokud receptory ve vnitřní membráně spory zaznamenají tzv. spouštěcí molekuly ve formě specifických živin nebo fragmentů peptidoglykanu z okolních klíčících buněk (Ramirez-Peralta et al., 2012). Následně je signál k ukončení dormance přenesen do jádra spory. Za několik minut se z jádra uvolní zásoby CADPA (kalcium dipikolinát) a po depolymerizaci kůry začne aktivovaná spora přijímat vodu. Metabolická aktivita je obnovena a buňka se dostává do vegetativního stavu (Paredes-Sabja et al., 2011).

### 3.1.4 Skupina *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus sensu lato* (s.l.), nebo také skupina *Bacillus cereus*, je fenotypově velmi různorodá bakteriální skupina a v současné době zahrnuje 21 fylogeneticky úzce příbuzných druhů, z nichž mnohé jsou z medicínského, průmyslového a zemědělského hlediska velmi významné (Ehling-Schulz et al., 2019; Y. Liu et al., 2018). Mezi nejstudovanější zástupce této skupiny patří *Bacillus cereus sensu stricto* (s.s.), častý původce onemocnění z potravin. Dále *B. anthracis*, obligátní patogen, způsobující smrtelné onemocnění zejména býložravých, ale i jiných zvířat a člověka zvané anthrax, a také insekticidně působící *Bacillus thuringiensis*, jeden z nejpoužívanějších biologických pesticidů. Dalšími zástupci ustanovenými již během 20. století jsou *B. mycooides* a *B. pseudomycooides* tvořící typické rhizoidní kolonie a psychrotolerantní *Bacillus weihenstephanensis* (Broderick et al., 2006; Miller et al., 2018). Poměrně nedávno byly ustanoveny druhy *B. toynensis* (původně *B. cereus* var *toyo*), charakteristický svými probiotickými vlastnostmi (Jiménez et al., 2013), termotolerantní druh *B. cytotoxicus* (Guinebretière et al., 2013) a psychrotolerantní *B. wiedmannii*, kteří působí cytotoxicky (Miller et al., 2016). Dále jsou do skupiny řazeny tři druhy: *B. gaemokensis*, *B. manliponensis* a *B. bingmayongensis*, které ovšem nebyly doposud validně popsány (Y. Liu et al., 2015). V roce 2017 se skupina rozšířila o dalších 9 druhů izolovaných z mořského prostředí, včetně mořské vody a sedimentů, a to *B. paranthracis*, *B. pacificus*, *B. tropicus*, *B. albus*, *B. mobilis*, *B. luti*, *B. proteolyticus*, *B. nitratireducens* a *B. paramycooides* (Y. Liu et al., 2017).

#### 3.1.4.1 *Bacillus mycooides*

Bakterii *Bacillus mycooides* poprvé popsal Flüggé v roce 1886. Druhový název „*mycooides*“ byl odvozen od vzhledu kolonií připomínajících kolonie plísní (Di Franco et al., 2002). Jedná se o fakultativně anaerobní, grampozitivní, nepohyblivý organismus, tvořící elipsoidní spory uložené paracentrálně ve sporangiu. Buňky velikosti 1,0-1,2 na 3,0-5,0 µm se vyskytují jednotlivě i v řetízích. Kolonie jsou bílé až krémové, neprůhledné a od ostatních členů skupiny *Bacillus cereus* je odlišuje charakteristický rhizoidní vzhled. Minimální teplota růstu je 10-15 °C, maximální 35-40 °C, optimální pH 6-7. Jsou kataláza a oxidáza pozitivní a vykazují pozitivní lecitinázovou reakci. Mají variabilní schopnost redukovat dusičnany a neumí využít propionát. Hydrolyzují kasein a škrob. Kmeny *B. mycooides* byly izolovány z různých prostředí, ale za hlavní místo výskytu je považována půda (Logan et Vos, 2015).

Většina zástupců tohoto druhu nevykazuje žádnou nebo jen mírnou cytotoxickou a enterotoxickou aktivitu. Dokonce byl zjištěn pozitivní efekt této bakterie na trávicí trakt raka

Kainova (*Cherax cainii*). Po dvouměsíčním zkrmování této bakterie došlo ke zmnožení a prodloužení mikrokloků, zesílení střevního epitelu a rozšíření střevní mikrobioty, která chrání střevní stěnu před potenciálními patogeny (Ambas, 2015). Dále Guerrero-Barajas et al. (2020) prokázali antifungální aktivitu izolátu identifikovaného jako *B. mycooides* (A1) vůči patogenní houbě *Colletotrichum gloeosporioides* způsobující antrakózu avokáda a navrhuji ho jako potenciální biologickou kontrolu této choroby.

#### 3.1.4.2 *Bacillus weihenstephanensis*

Druh *Bacillus weihenstephanensis* byl poprvé izolován ze vzorků pasterovaného mléka v roce 1998 (Lechner et al., 1998). Patří stejně jako *B. mycooides* do skupiny *Bacillus cereus*. Oba druhy jsou fylogeneticky velice blízce příbuzné, zatímco od ostatních zástupců této skupiny se mírně liší. Analýzou sekvence genu pro 16S rRNA je od sebe dokonce není možné spolehlivě odlišit. *B. weihenstephanensis* je shodně s *B. mycooides* kataláza a oxidáza pozitivní. Dále vykazují téměř identický profil mastných kyselin v buňce. Spory obou druhů mají elipsoidní tvar. Ovšem *B. weihenstephanensis* je pohyblivý a nevytváří rhizoidní kolonie. Dále oproti *B. mycooides* hydrolyzuje arginin a neutilizuje D-sacharózu. Roste v rozmezí teplot od 5 °C do 37 °C, optimálně mezi 25-35 °C, jedná se tedy o psychrotolerantní bakterii (Logan et Vos, 2015). V roce 2018 bylo provedeno porovnání sekvencí kompletních genomů typového kmene druhu *B. weihenstephanensis* a typového kmene druhu *B. mycooides*. Na základě výsledků analýz DDH a průměrné nukleotidové identity (v angl. average nucleotide identity, ANI) byl *B. weihenstephanensis* reklasifikován a sloučen s *B. mycooides* do jednoho druhu. V současnosti je tedy považován za heterotypické synonymum druhu *B. mycooides* (Y. Liu et al., 2018).

#### 3.1.4.3 *Bacillus proteolyticus*

Jak je zmíněno výše, tento druh byl popsán teprve v nedávné době, společně s dalšími 8 zástupci skupiny *B. cereus* (Liu et al., 2017). Typový kmen, TD42<sup>T</sup> byl izolován ze sedimentu v Tichém oceánu a další kmen, *B. proteolyticus* 4D, z povrchu kořenů šáchorovité rostliny *Scirpus grossus* jako tzv. rhizobakterie se schopností podpory růstu rostliny (Kamaruzzaman et al., 2020). Lze tedy předpokládat, že se jedná o běžný environmentální druh. Obecně se jedná o grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé, tyčinkovité bakterie šířky 1,6-1,8 µm a délky 2,8–3,6 µm. Jsou kataláza a oxidáza pozitivní. Rostou v rozmezí teplot 10-39 °C (optimálně 30 °C) a při pH 5-10 (optimálně pH 8). Hydrolyzují škrob, odstředěné mléko a kasein. Test API 50CHB prokázal schopnost utilizace D-ribózy, D-glukózy, D-fruktózy, N-

acetylglukosaminu, arbutinu, eskulinu s citrátem železitým, salicinu, celobiózy, maltózy, trehalózy, škrobu a glykogenu za produkce kyselin (Y. Liu et al., 2017).

### 3.1.5 Skupina *Bacillus subtilis*

Skupina *Bacillus subtilis* spojuje v rámci rodu *Bacillus* fylogeneticky blízce příbuzné druhy. Bakterie této skupiny tvoří malé vegetativní buňky (široké <1 µm) (Caulier et al., 2019) a hojně se nacházejí v půdě, kde napomáhají recyklaci uhlíku a dusíku produkcí hydroláz, jako jsou proteázy, amylázy a celulózy (Harwood et al., 2018). Tři původní druhy; *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* a *Bacillus pumilus*; byly objeveny před více než 40-ti lety (Gordon et al., 1973). *B. subtilis* se stal nejvíce studovaným a komerčně využívaným druhem rodu *Bacillus*. Využíván je například k produkci enzymů, fermentaci potravin nebo k biologické ochraně rostlin. Také představuje modelový organismus pro studium buněčného dělení, sekrece proteinů, vývoje biofilmu, produkce sekundárních metabolitů a dalších biologických jevů (Kovács, 2019). Stejně tak *B. licheniformis* a o několik let později identifikovaný *Bacillus amyloliquefaciens* (Priest et al., 1987) jsou hojně používanými bakteriemi k produkci řady metabolitů (vitaminy, aminokyseliny a antibiotika) a průmyslových enzymů (Harwood et al., 2018). V posledních desetiletích bylo popsáno mnoho dalších druhů patřících do skupiny *B. subtilis*, a to *B. atrophaeus* (Nakamura, 1989), *B. mojavensis* (Roberts et al., 1994), *B. vallismortis* (Roberts et al., 1996), *B. sonorensis* (Palmisano et al., 2001), *B. velezensis* (Ruiz-García et al., 2005), *B. tequilensis* (Gatson et al., 2006), *B. aerius*, *B. aerophilus*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis* (Shivaji et al., 2006), *B. safensis* (Satomi et al., 2006), *B. siamensis* (Sumpavapol et al., 2010), *B. xiamenensis* (Lai et al., 2014), *B. paralicheniformis* (Dunlap et al., 2015), *B. gobiensis* (B. Liu et al., 2016) a *B. nakamurai* (Dunlap et al., 2016).

O zástupcích této skupiny je známo, že se jedná o producenty celé řady sekundárních metabolitů, a to včetně ribozomálně a neribozomálně syntetizovaných peptidů, terpenů a polyketidů (Harwood et al., 2018).

#### 3.1.5.1 *Bacillus tequilensis*

Tento druh byl prvně izolován ze vzorku odebraného z přibližně 2000 let staré šachty v mexickém státě Jalisco poblíž města Tequila a původně identifikován jako *B. subtilis* (Ramos De La Vega et Lopez Mestas Camberos, 1996). Později byl reklasifikován a ustanoven jako nový druh *B. tequilensis*. Morfologicky se jedná o tyčinkovitou bakterii velikosti 0,9 x 4,0 µm vyskytující se primárně jednotlivě, případně jako řetízky dvou až čtyř buněk. Je pohyblivý, striktně aerobní, kataláza a oxidáza pozitivní. *B. tequilensis* roste při teplotách od 25 do 50 °C

a v rozmezí hodnot pH 5,5-8,0. Na agaru s 5 % ovčí krve nevykazuje *B. tequilensis* hemolytickou aktivitu. Hydrolyzuje kasein, škrob a želatinu. Biochemicky je velmi podobný druhu *B. subtilis*, od kterého lze odlišit přítomností arginin-hydrolázy, lysin-dekarboxylázy, ornithin-dekarboxylázy a produkcí kyseliny z ramnózy (Gatson et al., 2006).

Stejně jako většina zástupců skupiny *B. subtilis* je i *B. tequilensis* považován za nepatogenní druh. Je znám produkcí řady enzymů, například vysoce stabilní lakázy, která nachází uplatnění v biotechnologických a průmyslových aplikacích (Sondhi et al., 2014) a keratinázy s potenciálem pro uplatnění v kožedělném průmyslu (Zaraï Jaouadi et al., 2015). Některé kmeny mají schopnost podporovat růst rostlin prostřednictvím produkce fytohormonů, či inhibovat plíseň *Magnaporthe oryzae* parazitující na rýži (Kang et al., 2019; Li et al., 2018).

### 3.1.6 Patogenní potenciál *Bacillus* spp. a požadavky dle EFSA

Jak již bylo zmíněno výše, velká část *Bacillus* spp. má nízký nebo prakticky žádný patogenní potenciál. Některé druhy jsou však díky produkci toxinů a přítomnosti dalších faktorů virulence považovány za nebezpečné patogeny (Ehling-Schulz et al., 2019; Logan et Vos, 2015). Dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (European food safety authority, EFSA), představuje právě produkce toxických metabolitů zásadní problém v bezpečnosti použití těchto bakterií jako probiotik či aditiv ve výživě lidí a zvířat (EFSA, 2014).

Do souvislosti s alimentárním onemocněním jsou kromě zástupců skupiny *B. cereus* dávány i jiné *Bacillus* spp. U několika druhů byla zjištěna produkce látek toxických pro buňky savců. Příkladem je tepelně stabilní toxin amylosin produkovaný některými kmeny *B. subtilis*, *B. amyloliquefaeiens* a *B. mojavensis* (Apetroaie-Constantin et al., 2009; Mikkola et al., 2007) nebo lichenysin A a pumilacidin syntetizované *B. licheniformis* a *B. pumilus* (From et al., 2007; Mikkola et al., 2007). Některé kmeny *B. megaterium*, *B. simplex* a *B. firmus* produkují tepelně stabilní toxin, který vykazuje podobné fyzikální vlastnosti jako emetický toxin *B. cereus*, cereulid (Taylor et al., 2005). Z těchto důvodů doporučuje EFSA (2014) u kmenů jiných druhů než *B. cereus* s.l. provést *in vitro* test cytotoxicity na Vero buňkách nebo jiných epiteliálních buněčných liniích. Přímé použití kmenů, které vykazují cytotoxickou aktivitu, pak není doporučováno.

*B. cereus sensu stricto* je častou příčinou alimentárních otrav, projevujících se průjemovým či emetickým syndromem. Za emetický typ nemoci je odpovědný cereulid (ces), tepelně stabilní toxin neribozomálně syntetizovaný pomocí cereulid syntetázy (Ces) (Ehling-Schulz et al., 2006). Průjemový typ onemocnění je důsledkem cytotoxické aktivity několika hemolytických toxinů. Nejvýznamnějšími jsou hemolyzin BL (Hbl, tříložkový toxin kódovaný

hblCDA), nehemolytický enterotoxin (Nhe, tříslložkový toxin kódovaný nheABC) a cytotoxin K (CytK, jednosložkový toxin kódovaný genem cytK), způsobující tvorbu pórů v cytoplazmatické membráně s následnou lýzou buňky. Na patogenezi se dále podílí několik dalších cytotoxinů, hemolyzinů a degradačních enzymů, které přispívají k enterotoxické aktivitě. Jedná se o cereololyzin O (Clo), hemolyzin II (Hly II) a hemolyzin III (Hly III), sfingomyelinázu (cereololyzin B, sph) a dvě fosfolipázy: fosfatidylinositol specifickou (lecitináza C, piplc) a fosfatidylcholin preferující (cereololyzin A, pcpl) (Kim et al., 2015; Mingmongkolchai et Panbangred, 2018). Mezi faktory virulence patří také proteáza immune inhibitor A (inhA), jejíž aktivita spočívá v inhibici humorálních složek imunitního systému. InhA bývá spojován zejména s druhem *B. anthracis*, jeho analogy jsou ale přítomné i u *B. cereus* a *B. thuringiensis* (Arolas et al., 2016).

Distribuce výše zmíněných faktorů virulence není druhově specifická. Geny kódující jednotlivé faktory mohou být rozšířeny mezi různými zástupci celé skupiny *B. cereus* (EFSA, 2018). V zásadě jsou proto všechny kmeny patřící do této taxonomické skupiny považovány za nevhodné pro přímé použití v živočišné výrobě. Pokud však jsou navrženy k použití, měl by být osekvenován a analyzován celý jejich genom, aby byla potvrzena absence genů zodpovědných za produkci toxinů. Pokud jsou takové geny u daného kmene přítomny, měla by být prokázána jejich nefunkčnost (např. mutace nebo delece) (EFSA, 2014).

## 3.2 Antimikrobiální látky produkované *Bacillus* spp.

Látky s nepříznivými účinky na mikroorganismy se nazývají antimikrobiální: buď pouze zastavují růst a rozmnožování mikroorganismů (tzv. mikrobistatické látky) nebo je usmrcují (mikrobicidní látky). Jedná se o produkty primárního nebo sekundárního metabolismu. Do primárního (obecného) metabolismu se obvykle zařazuje metabolismus sacharidů, lipidů, proteinů a metabolismus nukleových kyselin a kofaktorů. Antimikrobiální látky vznikající katabolickými procesy jsou metabolity primárními a jsou produkovány v celém životním cyklu. Naproti tomu sekundární (speciální) metabolismus zprostředkovává tvorbu látek pouze za určitých okolností nebo ve specifickém období vývoje mikroorganismu (Šilhánková, 2002).

V současnosti je přijímán názor, že primární metabolity jsou chemické složky živých organismů nezbytné pro jejich normální fungování, zatímco sekundární metabolity jsou látky postradatelné a strukturálně velmi různorodé. Každá látka je specificky produkována jen malým počtem druhů a zejména zvyšuje šanci na přežití producenta v konkurenci s ostatními organismy (Sansinenea et Ortiz, 2011).

*Bacillus* spp. produkují širokou škálu antimikrobiálních látek, z tohoto důvodu jsou intenzivně studovány a využívány v lékařství, zemědělství a potravinářském sektoru (Raaijmakers et al., 2002).

### 3.2.1 Primární metabolity působící antimikrobiálně

Antimikrobiálně působící primární metabolity vznikají katabolickými pochody zejména za anaerobních podmínek (Šilhánková 2002). Fakultativně anaerobní bakterie, jako jsou *B. subtilis* a *B. cereus*, reagují na nízký oxidoredukční potenciál změnou metabolických pochodů na anaerobní respiraci nebo fermentaci. Fermentačním metabolismem těchto bakterií se meziproducty pyruvát a acetyl-CoA přeměňují na konečné producty. Těmi jsou laktát, acetát, mravenčan, etanol, oxid uhličitý, acetoin a z něho vznikající 2,3-butanediol. Všechny uvedené organické kyseliny vykazují antimikrobiální účinky, ať už přímým baktericidním působením na buněčnou stěnu G- bakterií nebo nepřímým efektem redukce bakteriální populace díky snížení pH prostředí. Z výsledků experimentů na kmenech druhu *B. cereus* je zřejmé, že výše uvedené producty, kromě mravenčanu, vznikají i během aerobní kultivace, ovšem v odlišném množství. Za aerobních podmínek dochází k výhradní produkci acetátu, množství laktátu je podstatně nižší oproti anaerobním podmínkám a etanol se tvoří jen ve stopovém množství (Cruz Ramos et al., 2000; Rosenfeld et al., 2005; Zigha et al., 2006).

### 3.2.2 Sekundární metabolity působící antimikrobiálně

Sekundární metabolity jsou nízkomolekulární látky, které obvykle nejsou nezbytné pro růst a vývoj produkčního organismu. Poskytují organismu selekční výhody a přispívají k jeho „kondici“ v evolučním měřítku (Baltz, 2008). V mnoha případech je jejich syntéza výsledkem evolučních tlaků spojených se zvýšením konkurenceschopnosti organismu při získávání živin a prostoru (Perry et Wright, 2013). Obecně mají sekundární metabolity různorodé struktury a jejich syntéza vychází z intermediátů (aminokyselin, cukrů, mastných kyselin a dalších), které kondenzují do komplexních struktur prostřednictvím definovaných biochemických pochodů. Obvykle jsou tvořeny na počátku stacionární fáze (idiofáze) růstu mikroorganismů (Sanchez et Demain, 2011). Produkce sekundárních metabolitů je u bakterií ovlivněna různými faktory, jako je dostupnost a složení živin, teplota, pH, vlhkost či světlo. Dále může být produkce vyvolána oxidačním stresem, či nízkým redoxním potenciálem (Tyc et al., 2017). K tvorbě antimikrobiálních látek často dochází při deficitu uhlíku, dusíku, fosfátu a jiných klíčových zdrojů živin. Zvýšení produkce antimikrobiálních látek při omezení dostupnosti živin bylo prokázáno také v publikaci Ays, et al., (2017), kteří se zabývali touto problematikou u druhu *B. subtilis*. Autoři dále uvedli, že biosyntéza většiny antibiotik je regulována stejnými mechanismy jako další ochranné aktivity indukované hladověním např. sporulace.

Obrovská rozmanitost *Bacillus* spp. na taxonomické úrovni je stejně tak patrná z hlediska jejich metabolických vlastností. Bacily jsou schopny produkce velkého množství sekundárních metabolitů velmi odlišné povahy, vykazující široké spektrum účinků. V průměru 4-5 % genomu *B. subtilis* kóduje syntézu více než dvou desítek strukturně různorodých antimikrobiálních látek. Tyto metabolity; včetně antibiotik, pigmentů, toxinů, růstových faktorů, feromonů a dalších bioaktivních sloučenin; jsou navrženy tak, aby bakteriím usnadňovaly přežití ve svém přirozeném prostředí (Chaabouni et al., 2012; Stein, 2005).

Mezi sekundární metabolity bacilů s antimikrobiální aktivitou patří zejména peptidové antimikrobiální látky, ribozomálně (bakteriociny) i neribozomálně syntetizované, ale také nebílkovinné metabolity jako polyketidy, terpenoidy nebo isokumariny (Stein, 2005).

#### 3.2.2.1 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMP) představují univerzální složku obranných systémů prakticky všech forem života. Nalézají se u bakterií, rostlin, hub, bezobratlých i obratlovců včetně savců. AMP představují první linii imunitní obrany těchto organismů a mají (inhibiční) mikrobistatický nebo mikrobicidní účinek vůči grampozitivním (G<sup>+</sup>) a gramnegativním (G<sup>-</sup>)



bakteriím, houbám, některým parazitům a virům (Huan et al., 2020). Jeden z prvních AMP byl popsán v roce 1940 kolektivem Hotchkiss et Dubos. Z půdní bakterie *B. brevis* izolovali vysoce baktericidní látku gramicidin. Ta působí nejen vůči bakteriím, ale je schopná destabilizovat cytoplazmatické membrány savčích buněk (Srivastava et al., 2009).

V současnosti je známo více než 5000 AMP. Bez ohledu na jejich biologický původ sdílejí společné rysy, a to poměrně malou velikost molekul a lineární nebo cyklickou strukturu. Jde o peptidy obvykle složené z méně než 100 aminokyselin (AMK), nejčastěji mezi 12 až 50. Ve většině případů se vyskytují ve formě šroubovic, tzv.  $\alpha$ -helixů,  $\beta$ -skládaných listů nebo jejich kombinací. Převážně se jedná o kladně nabitě (kationické) molekuly, mohou ale být i záporně nabitě (anionické) nebo neutrální. Celkový náboj pak závisí na zastoupení aminokyselin v primární struktuře peptidu. Významnou antimikrobiální aktivitu vykazují zejména kladně nabitě molekuly, které jsou elektrostaticky přitahovány k negativně nabitému povrchu komponent mikrobiální membrány. Těmito komponenty jsou např. fosfátové skupiny lipopolysacharidů (LPS) G- bakterií nebo kyseliny teichová a lipoteichová u G+ bakterií. AMP tedy působí selektivně. Účinkují vůči bakteriálním buňkám, jejichž membrány mají záporný náboj, zatímco eukaryotické buňky jsou díky celkovému neutrálnímu náboji membrán rezistentní. Hlavním mechanismem účinku AMP je pak narušení struktury cytoplazmatické membrány tvorbou pórů, což vede k úniku intracelulárního obsahu a buněčné smrti (Ciumac et al., 2019; Jenssen et al., 2006; Sadredinamin et al., 2016). AMP ale také mohou pronikat do buňky a narušit různé buněčné pochody, což vede buď přímému usmrcení buňky nebo k inhibici dělení. Cílovou strukturou je pak například DNA, RNA, proteiny, enzymy nebo jiné komponenty (Cho et Kim, 2010; Jenssen et al., 2006).

AMP jsou rozdělovány na základě biosyntézy do dvou kategorií, a to na ribozomálně a neribozomálně syntetizované peptidy. Ribozomální syntéza zahrnuje translaci mRNA do polypeptidových řetězců na základě genetického kódu. U mnoha takto syntetizovaných peptidů dochází dále k post-translačním modifikacím (metylace, glykosylaci, fosforylaci). Neribozomální syntézu zprostředkovává tzv. neribozomální peptidová syntetáza (NRPS), což je multienzymový komplex, který funguje jako montážní linka, kdy jeden enzymatický modul integruje jednu aminokyselinu do polypeptidového řetězce (Yang et Yousef, 2018).

### **3.2.2.1.1 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy (bakteriociny)**

Ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy produkované bakteriemi jsou označovány jako bakteriociny. Jedná se o rozsáhlou skupinu termostabilních látek proteinové povahy s antimikrobiální aktivitou zejména vůči dalším bakteriím. Tyto peptidy vykazují

značnou rozmanitost s ohledem na velikost a strukturu molekul, mechanismus účinku a inhibiční spektrum. Mnoho bakteriocinů má úzké spektrum účinku, působí tedy jen vůči druhům blízce příbuzným produkčnímu organismu, zatímco některé vykazují antimikrobiální aktivitu napříč širokou škálou různých rodů. Antimikrobiální aktivita je zprostředkována buď skrze vazbu na specifický receptor cílového organismu, nebo skrze elektrostatickou interakci mezi AMP a buněčnou stěnou (Hegarty et al., 2016; Snyder et Worobo, 2014). Vzhledem k tomu, že produkční bakterie se musí chránit před vlastními bakteriociny, které jsou pro ně toxické, exprimují společně s bakteriociny i tzv. imunitní proteiny. Molekulární mechanismy, kterými je imunita zprostředkována, nejsou ovšem dosud zcela objasněny (Hassan et al., 2012; Ríos Colombo et al., 2018).

Cílem produkčních kmenů je získat výhodu v konkurenčním prostředí a odhaduje se, že 30 až 99 % bakterií a archeí má schopnost produkovat alespoň jeden bakteriocin (Perez et al., 2018). Environmentální význam bakteriocinů se ale zdá být daleko širší než jen v obraně proti jiným bakteriím. Plní velmi významnou roli v mezibuněčné komunikaci a také v usnadnění horizontálního přenosu genů. Chikindas et al. (2018) dokonce uvažují, že regulace různých procesů v rámci mezibuněčné komunikace bakterií (tzv. quorum sensing) je primární funkcí bakteriocinů spíše než přímé usmrcení konkurentů. Pro bakterie se zdá být produkce nízkých koncentrací bakteriocinů výhodnější. Při nižších koncentracích bývá účinně potlačována tvorba biofilmu narušiteli (např. právě inhibicí quorum sensing) a zároveň nejsou produkční organismy energeticky a nutričně vyčerpávány.

Nyní v době genomiky, kdy jsou k dispozici databáze a on-line platformy s nástroji pro automatizovanou charakterizaci a screening genových klastrů pro bakteriociny, se očekává, že objevování těchto látek bude dále zrychlovat. Jejich široká škála a narůstající zájem vědců vedly k určitému zmatku v klasifikačních schématech. Od první klasifikace, kterou navrhl Klaenhammer (1993), bylo představeno mnoho dalších schémat rozdělujících bakteriociny na základě jejich aktivity, mechanismu účinku nebo způsobu exkrece. Podle klasifikace navržené autory Cotterem, Rossem a Hillem (2013), která má výhodu v jednoduchosti, jasnosti a aplikuje se na bakteriociny G+ i G- bakterií, se bakteriociny kategorizují do dvou tříd na základě přítomnosti (Třída I), či absence (Třída II) post-translačních modifikací. Navíc tato klasifikace zahrnuje pouze antimikrobiální peptidy a větší antimikrobiální proteiny, jako koliciny a megaciny, jsou z kategorie bakteriocinů odebrány. V Tabulce 1 je uvedeno upravené klasifikační schéma bakteriocinů pro bakterie rodu *Bacillus*.

**Tabulka 1:** Návrh klasifikačního schéma bakteriocinů *Bacillus* spp. Upraveno podle Cotter et al. (2013).

| Skupina   | Charakteristika  | Příklady   |
|---|--|--|
| <b>Třída I. post-translačně modifikované bakteriociny</b> |  |  |
| <b>Lantibiotika</b>                                       | Obsahují dehydroaminokyseliny (lanthionin a 3-methyl-lanthionin) vznikající dehydratací serinových a threoninových zbytků, které vytvářejí thioetherové $\beta$ -uhlíkové vazby s cysteiny<br><br>Některé vyžadují pro funkčnost dva lantibiotické peptidy (dvou-peptidová lantibiotika) | Subtilin<br>Mersacidin<br>Cerecidin<br>Lichenicidin<br>Haloduracin |
| <b>Saktibiotika</b>                                       | Obsahují síru vázanou na $\alpha$ -uhlík   | Subtilosin A<br>Thuricin H<br>Thuricin CD                          |
| <b>Lineární azol-obsahující peptidy (LAP)</b>             | Lineární peptidy obsahující kombinace thiazolových a oxazolových heterocyklů v důsledku dehydratačních / cyklizačních reakcí zbytků Cys a Ser / Thr  | Plantazolicin A  |
| <b>Thiopeptidy</b>  | Makrocyclické peptidy obsahující šestičetný dusíkový heterocyklus  | Thiociliny   |
| <b>Glykociny</b>  | Obsahují S-glykosylovaný cystein a disulfidické vazby  | Sublacin 168   |
| <b>Laso peptidy</b>                                       | Obsahují pouze nemodifikované aminokyseliny, jsou charakteristické tzv. laso strukturou  | Makrocin J25   |
| <b>Třída II. nemodifikované a cyklické bakteriociny</b>   |  |  |
| <b>IIa Bakteriociny podobné pediocinu</b>                 | Vždy obsahují sekvenci YGNGV, tzv. „pediocin box“  | Koagulin   |
| <b>IIb Dvou-peptidové bakteriociny</b>                    | Pro funkčnost vyžadují dva nebo více nemodifikovaných peptidů  | Lactacin F   |
| <b>IIc Cyklické peptidy</b>                               | Obsahují kovalentní vazbu mezi C- a N- terminální částí peptidu  | Pumilarin<br>Amylocyklicin   |
| <b>IId Nemodifikované, lineární bakteriociny</b>          | Nemodifikované lineární jednosložkové peptidy, neobsahují sekvenci YGNGV   | Lichenin<br>Cerein<br>Cereucin V                                   |

### 3.2.2.1.1.1 Třída I: Ribozomálně syntetizované a post-translačně modifikované peptidy (RiPP)

Tato třída se skládá z AMP o velikosti menší než 10 kDa, které jsou ribozomálně syntetizovány a postupují post-translační modifikace (PTM) prekurzorového peptidu, což má za následek různé struktury a vlastnosti těchto peptidů. Na základě rozdílů v úpravách a struktuře lze třídu rozdělit do několika podskupin (Soltani et al., 2021; Zhao et Kuipers, 2016). Přesto sdílejí několik jednotných kroků v biosyntéze. Ta vždy začíná produkcí prekurzorového peptidu, který je tvořen vedoucím peptidem s N-koncem (tzv. leader peptid) a C-terminální hlavní oblastí (tzv. core peptid) nesoucí místa určená k PTM. Poté biosyntetický aparát rozpozná vedoucí peptid a provede PTM v hlavní oblasti. Nakonec je vedoucí peptid odstraněn jednou nebo více peptidázami, někdy současně s cyklizací peptidu, za vzniku maturované aktivní sloučeniny. Ve výjimečných případech mohou následovat další PTM i po odstranění vedoucího peptidu (Ortega et van der Donk, 2016).

Třída I se dále rozděluje dle struktury na lantibiotika (lantipeptidy), saktibiotika (saktipeptidy), lineární azol-obsahující peptidy (LAP), thiopeptidy, glykociny a laso peptidy (Cotter et al., 2013).

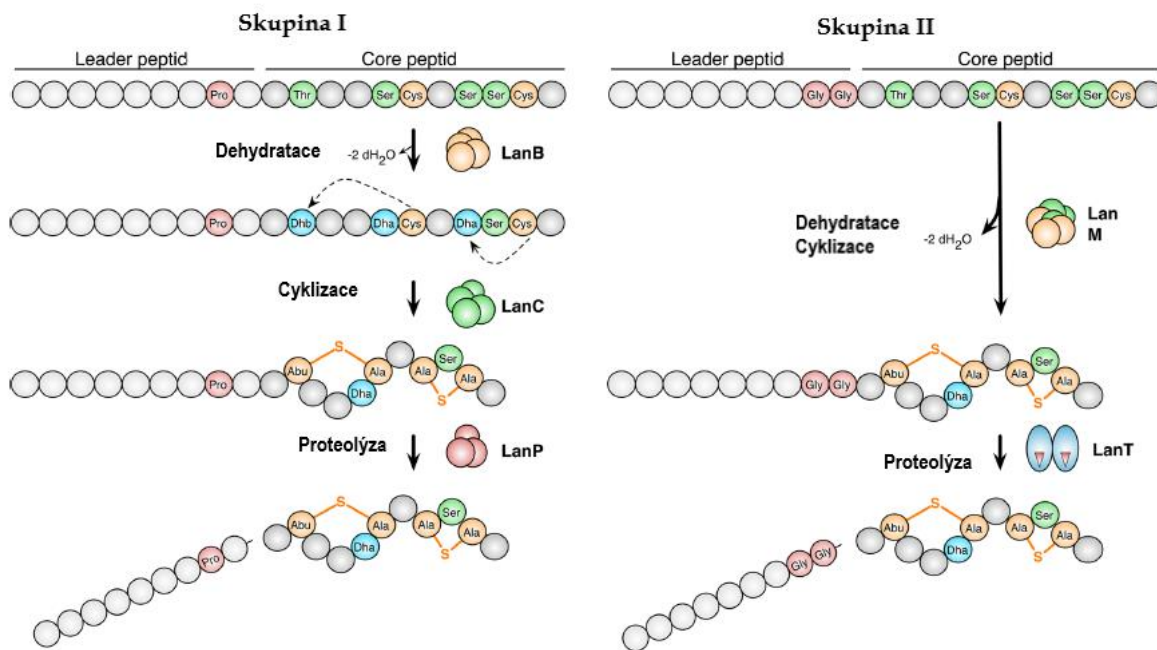
#### 3.2.2.1.1.1.1 Lantibiotika

Lantibiotika, někdy také označované jako lantipeptidy s antimikrobiální aktivitou, jsou ribozomálně syntetizované, polycyklické přírodní produkty, které jsou hojně produkovány G<sup>+</sup> bakteriemi, včetně mnoha druhů skupiny *Bacillus*. Po ribozomální biosyntéze jsou seriny a threoniny lantibiotik dehydratovány za vzniku didehydroalaninů (Dha) a didehydrobutyrinů (Dhb). Následně se prostřednictvím SH-skupin cysteinů a dvojných vazeb dehydroaminokyselin tvoří thioetherové vazby lanthioninu a 3-methyl-lanthioninu. Mohou následovat další strukturní modifikace, jako například hydroxylace asparaginu, či prolinu nebo epimerizační reakce (Barbosa et al., 2015; Dischinger et al., 2014).

Převážná většina lantibiotik vykazuje antimikrobiální aktivitu proti G<sup>+</sup> bakteriím, zejména taxonům příbuzným produkčnímu kmenu. Pro působení proti G<sup>-</sup> bakteriím je potřeba antibiotický účinek podpořit destabilizačním činidlem vnější membrány, která je pro antibiotické peptidy neprostupná (Dischinger et al., 2014).

Lantibiotika lze rozdělit do čtyř skupin, kde hlavní rozdíl mezi skupinami I, II, III a IV představují PTM enzymy. U lantibiotik skupiny I jsou za proces PTM odpovědné dva odlišné enzymy: dehydratáza LanB a cykláza LanC, zatímco skupina II je modifikována bifunkčním enzymem LanM, jak je znázorněno na Obrázku 3. Existují také dvoukomponentní lantibiotika

sestavající ze dvou peptidů patřících do skupiny II, jelikož jsou zpracovány jedním modifikujícím enzymem LanM. U ostatních lantibiotik (skupina III a IV) jsou dehydratační a cyklizační reakce katalyzovány multifunkčními enzymy: RamC / LabKC nebo LanL (Zhao et Kuipers, 2016).

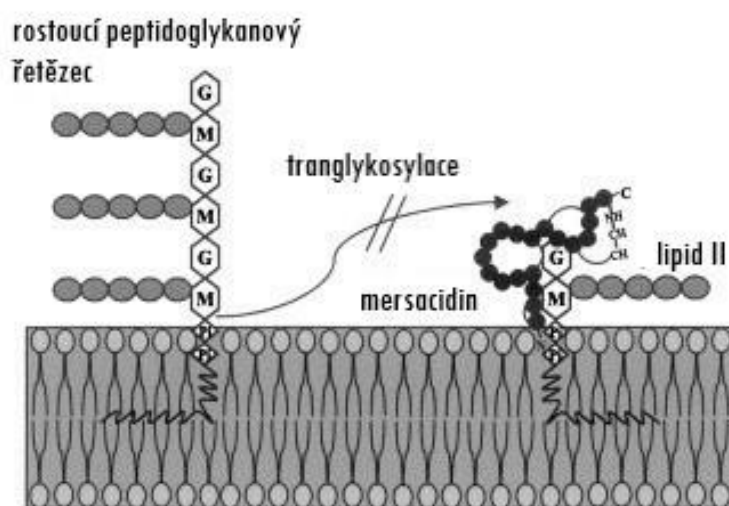


**Obrázek 3:** Obecný přehled kroků dehydratace, cyklizace a odstraňování vedoucího peptidu (leader peptid) zahrnutých v biosyntéze lantibiotik skupiny I a II. Upraveno podle Barbosa et al. (2015).

Subtilin, významný lanthipeptid skupiny I, produkuje bakterie *B. subtilis*. Je složený z 32 AMK a lineární strukturou je velmi podobný lantibiotiku nisinu, který je hojně využíván v potravinářství jako konzervant (E 234). Subtilin působí baktericidně proti širokému spektru G<sup>+</sup> bakterií. Mechanismus účinku je duální. Buď inhibuje syntézu buněčné stěny prostřednictvím vazby na lipid II, látku sloužící jako nosič peptidoglykanových monomerů, nebo může využít lipid II jako kotvící molekulu v cytoplazmatické membráně, což vede k tvorbě pórů (Caulier et al., 2019; Stein, 2005). Jeho tvorba je adaptivní reakcí na změny v životním prostředí. Předpokládá se, že úlohou subtilinu je zvýšit přísun živin produkční bakterii odstraněním konkurenčních druhů a / nebo jiných kmenů téhož druhu (Abriouel et al., 2011).

Lantibiotika skupiny II mají globulární strukturu. Zahrnují mersacidin produkovaný několika kmeny *B. amyloliquefaciens* v pozdní exponenciální a ve stacionární fázi. Tvoří jej 20

AMK a stejně jako subtilin se váže na lipid II. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny (viz Obrázek 4). Mersacidin účinkuje proti G<sup>+</sup> patogenům a *in vivo* studie prokázaly významný účinek proti meticilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus* (MRSA), srovnatelný s antibiotikem vankomycinem (Appleyard et al., 2009; Zhao et Kuipers, 2016). Dalšími popsány antimikrobiálně působícími lanthipeptidy skupiny II jsou cerecidiny A1 a A7. Produkčním organismem je *B. cereus* As 1.1846. Cerecidiny vykazují širokospektrální účinnost vůči G<sup>+</sup> bakteriím, včetně MRSA a vankomycin-rezistentímu *Enterococcus faecalis* (VRE). Zvláště cerecidin A7 je významným kandidátem pro klinické a potravinářské účely, jelikož působí inhibičně i proti patogenu brambor *Streptomyces scabiei*. Dále do této skupiny patří amylolysin produkovaný *B. amyloliquefaciens* GA1 a dvoupeptidové bakteriociny haloduracin, produkovaný alkalofilní bakterií *B. halodurans* C-125 a lichenicidin z *B. licheniformis* DSM 13 (J. Wang et al., 2014). Pro skupiny III a IV zatím nebyly popsány žádné lanthipeptidy pocházející z *Bacillus* spp. ani objeveny genové klastry v genomech, které by kódovali jejich syntézu (Dischinger et al., 2014).



**Obrázek 4:** Lantibiotikum mersacidin se váže na disacharid-pyrofosfátovou skupinu lipidu II, čímž blokuje polymerizaci peptidoglykanu. Upraveno podle Hoffmann et al. (2002).

### 3.2.2.1.1.1.2 Saktibiotika

Saktibiotika, nebo též saktipeptidy, jsou skupinou cyklických antimikrobiálních peptidů a vykazují různé biologické účinky. Jejich společným znakem je intramolekulární thioetherová vazba nezbytná pro antimikrobiální aktivitu. Tato vazba spojuje atom síry cysteinového zbytku s  $\alpha$ -uhlíkem akceptorové aminokyseliny, čímž se liší od lantibiotik, kde vazba probíhá přes  $\beta$ -uhlík. První nalezený saktipeptid byl subtilosin A získaný z *B. subtilis* 168 v roce 1985. Dlouhá léta byl řazen mezi cirkulární bakteriociny a jeho neobvyklá struktura, obsahující tři

thioetherové vazby, byla rozluštěna pomocí NMR spektroskopie až po 18 letech (Flühe et Marahiel, 2013). Subtilosin A je produkován i dalšími kmeny *B. subtilis* a také některými kmeny *B. amyloliquefaciens* a *B. atrophaeus*. Je vysoce stabilní i při extrémních teplotách (1 h při 100 °C) a pH v rozmezí 2 až 10 (Abriouel et al., 2011). Dosud jsou známy minimálně čtyři další zástupci této podtřídy: sporulation killing faktor (SKF) také produkováný *B. subtilis* 168, thuricin CD z *B. thuringiensis* DPC 6431 a thuricin H z *B. thuringiensis* SF361. U saktipeptidů byla popsána antibakteriální a antimykotická aktivita. Některé formy subtilosinu A také vykazují spermicidní a hemolytické účinky (Wieckowski et al., 2015). SKF, tzv. kanibalizační toxin, je látka schopná lyzovat citlivé buňky produkčního kmene. Předpokládá se, že lyzované buňky poskytují pro kanibaly živiny, čímž se zpomalí nebo zabrání jejich vstupu do energeticky náročného procesu sporulace (Höfler et al., 2016). Díky úzkému spektru účinku jsou některé bakteriociny této skupiny, zejména thuricin CD navrhovány jako potenciální terapeutika. Thuricin CD účinkuje výhradně proti sporulujícím bakteriím, zejména proti *Clostridium difficile*, bakterii zodpovědné za různé formy střevních onemocnění a průjmy spojené s užíváním antibiotik. Na rozdíl od mnoha antibiotik neovlivňuje negativně přirozenou mikrobiotu a nepoškozuje eukaryotické buňky (Rea et al., 2010). Nedávno také vědci prokázali u kmene *B. tequilensis* FR9 produkci bakteriocinu subtilosinu A s inhibičním efektem zejména vůči častému patogenu z potravin *Listeria monocytogenes*. A poukázali na schopnost *B. tequilensis* FR9 adherovat na epitel zažívacího traktu. Navrhují proto tento kmen jako vhodný probiotický doplněk k ochraně zdraví zvířat i člověka (Parveen Rani et al., 2016).

#### 3.2.2.1.1.1.3 Lineární azol-obsahující peptidy

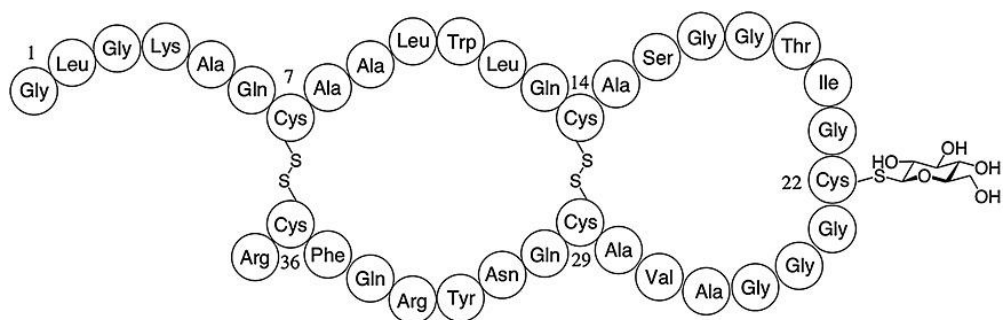
Lineární azol-obsahující peptidy (LAP) jsou tvořeny lineárním řetězcem aminokyselin, do kterého se v různých kombinacích zabudovávají pětičlenné heteroaromatické sloučeniny thiazoly a (methyl)oxazoly. Ty pocházejí z cysteinů a serinů/threoninů ribozomálně syntetizovaného prekurzorového peptidu (Arnison et al. 2013). Modelovými zástupci této skupiny jsou přírodní látky mikrocin B17 produkováný *Escherichia coli* a streptolysin S produkováný BMK (Davagnino et al., 1986; Nizet et al., 2000). Plantazolicin A, lineární dekacyklický přírodní produkt a jeho biosyntetický prekurzor plantazolicin B izolovaný z půdní bakterie *B. amyloliquefaciens* FZB42 rozšiřují skupinu LAP. Plantazolicin A je aktivní proti příbuzným G+ bakteriím, především proti původci antraxu, *B. anthracis*. U plantazolicinu B antimikrobiální účinky potvrzeny nebyly (Wilson et al. 2015).

#### 3.2.2.1.1.4 Thiopeptidy

Thiopeptidy obsahují charakteristické makrocyclické jádro sestávající z několika thiazolů, dehydroaminokyselin a šestičetného dusíkového heterocyklu (Liao et al. 2009). Makrocyclus umožňuje thiopeptidům inhibovat růst bakteriálních buněk pomocí blokování syntézy ribozomálních proteinů. Jejich velký potenciál spočívá v inhibici multirezistentních G<sup>+</sup> patogenů včetně MRSA, VRE a penicilin-rezistentnímu *Streptococcus pneumoniae* (PRSP). Malý účinek vůči G<sup>-</sup> bakteriím je přičítán neschopnosti thiopeptidů proniknout do jejich vnější membrány. Koncem čtyřicátých let byl izolován mikrokocin a od té doby bylo objeveno dalších zhruba 150 thiopeptidů. Většina je produkována aktinobakteriemi, ale některé byly získány od zástupců kmene Firmicutes, včetně bacilů, jako například thiocilliny izolované z *B. cereus* ATCC 14579 (Arnison et al. 2013; Akasapu et al. 2019).

#### 3.2.2.1.1.5 Glykociny

Glykociny (glykosylované bakteriociny) jsou bakteriální toxiny, které byly charakterizovány až v roce 2011. Jedním z nich je sublancin bakterie *B. subtilis* 168, původně řazený mezi lantibiotika. Jeho struktura se skládá z 37 aminokyselinových zbytků, z nichž je cystein zastoupen 5 molekulami. Čtyři cysteiny vytvářejí dva disulfidické můstky v pozicích Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>36</sup> a Cys<sup>14</sup>-Cys<sup>29</sup>. Na poslední Cys<sup>22</sup> je β-S-vazbou navázána molekula glukózy (Obr. 5). Nedávná studie ukázala, že S-glykosylovaná část sublancinu je zásadní pro antimikrobiální aktivitu. Dále poukázala na to, že sacharid může peptidovému skeletu poskytnout „ochranný deštník“ a sloužit například jako ochrana proti proteolytickým enzymům. (Katayama et al., 2011; G. E. Norris et Patchett, 2016). Spektrum antimikrobiální aktivity sublancinu je podobné spektru lantibiotik, tedy inhibuje pouze G<sup>+</sup> bakterie potlačením klíčení spor a růstu vegetativních buněk (Zhao et Kuipers, 2016).

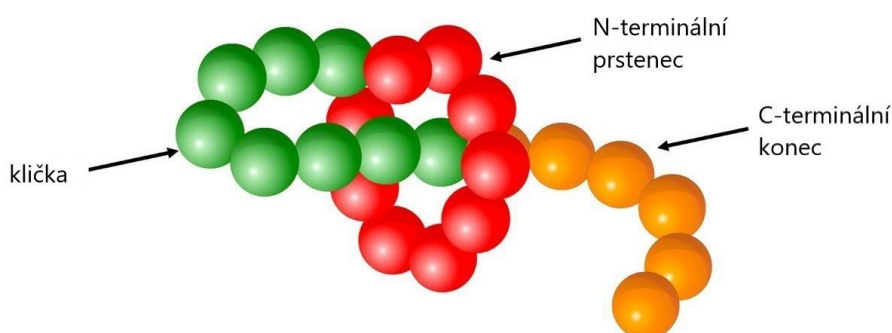


**Obrázek 5:** Chemická struktura bakteriocinu sublancinu (Katayama et al., 2011).



### 3.2.2.1.1.6 Laso peptidy

Laso peptidy byly poprvé popsány v roce 1991. Definiuje je N-terminální makrolaktamový prsteneček, kterým je provléknut C-terminální konec. Vzniká tak jedinečná laso struktura, tzv. lariatový uzel (Obr. 6). Ke studiu laso peptidů posloužil mikrocin J25 produkovaný *E. coli* AY25. V genomu několika *Bacillus* spp. byly nalezeny genové klastry, které pravděpodobně kódují laso peptidy, ale toto tvrzení je potřeba experimentálně potvrdit (Zhao et Kuipers, 2016). Laso peptidy jsou obvykle inhibitory enzymů nebo antagonisty receptorů. Tyto vlastnosti jim připisují antibakteriální aktivitu, omezenou na bakterie fylogeneticky příbuzné produkčním kmenům (Arnison et al., 2013).



**Obrázek 6:** Ilustrace struktury laso peptidů. Lineární segment, tvořený kličkou (zelená) a C-terminálním koncem (oranžový), prochází N-terminálním prstencem (červený), čímž vzniká tzv. lariatový uzel. Upraveno podle Maksimov et al. (2012).

### 3.2.2.1.1.2 Třída II: Nemodifikované nebo cyklické bakteriociny

Třída II zahrnuje malé (<10 kDa) tepelně stabilní peptidy, ale na rozdíl od třídy I nepodstupují post-translační modifikace nebo podstupují jen tzv. mírné modifikace (viz cyklické peptidy). Lze je rozdělit na čtyři podskupiny, a to IIa (bakteriociny podobné pediocinu), IIb (dvou-peptidové bakteriociny), IIc (cyklické peptidy) a IId (ne-modifikované, lineární, bakteriociny nepodobné pediocinu) (Cotter et al., 2013; Drider et al., 2006; Oppegård et al., 2007). Většina bakteriocinů třídy II působí prostřednictvím permeabilizace membrány cílových bakterií s následným únikem intracelulárního obsahu (Cotter et al., 2005).

#### 3.2.2.1.1.2.1 IIa Bakteriociny podobné pediocinu

Všechny bakteriociny této podskupiny obsahují stejnou N-terminální sekvenci – YGNGV, tzv. „pediocin box“ a jednu nebo dvě disulfidové vazby uvnitř řetězce (Ovchinnikov et al., 2016). Koagulin je bakteriocin podobný pediocinu s antilisteriální aktivitou produkovaný

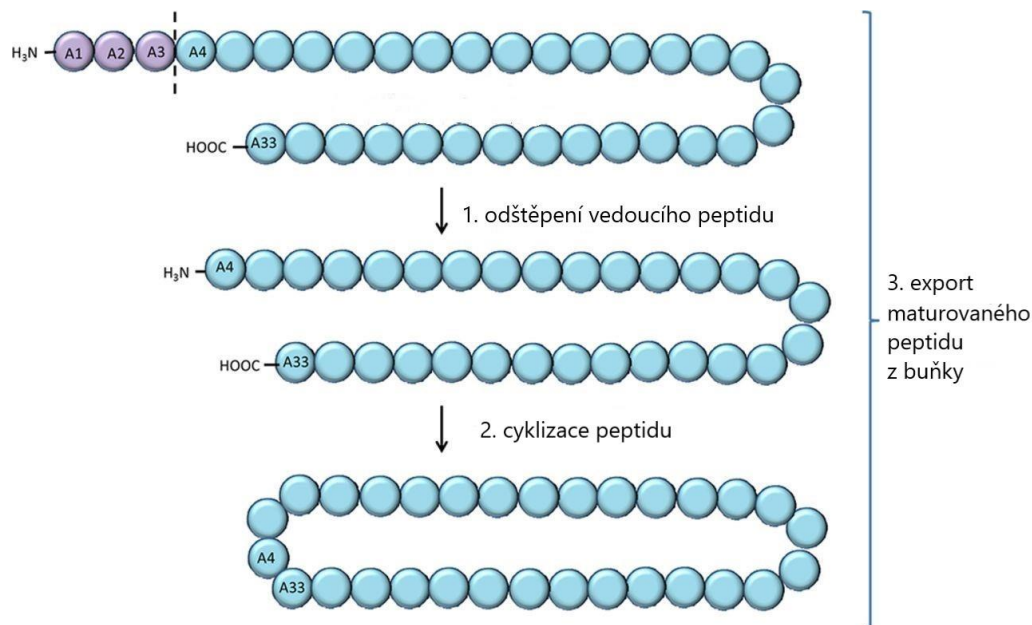
bakterií *B. coagulans* I4. Je termostabilní a citlivý k proteázám. Vykazuje baktericidní a bakteriostatickou aktivitu vůči příbuzným i nepříbuzným G<sup>+</sup> bakteriím, jako jsou *Leuconostoc*, *Oeococcus*, *Listeria*, *Pediococcus* a *Enterococcus* (Abriouel et al., 2011).

#### 3.2.2.1.1.2.2 IIb Dvou-peptidové bakteriociny

Dvou-peptidové bakteriociny třídy II sestávají ze dvou různých nemodifikovaných peptidů, přičemž oba musí být přítomny v přibližně stejném množství, aby došlo k jejich synergickému účinku a vykazali tak optimální antimikrobiální aktivitu. Samostatně jsou peptidy nefunkční i při vysokých koncentracích (Oppegård et al., 2007). Od první izolace dvou-peptidového bakteriocinu laktokokcinu G, v roce 1992, bylo izolováno a charakterizováno nejméně dalších 15 bakteriocinů této skupiny (Nissen-Meyer et al., 2010). Doposud ovšem nebyl charakterizován žádný bakteriocin této skupiny pro rod *Bacillus*.

#### 3.2.2.1.1.2.3 IIc Cyklické peptidy

Cyklické bakteriociny, také označované jako cirkulární a některými autory řazené do samostatné třídy IV (Snyder et Worobo, 2014), tvoří skupinu, která je seskupena na základě jejich kruhového peptidového řetězce vzniklého kovalentní vazbou mezi N- a C-terminální částí peptidu. Tím se liší od ostatních AMP, u nichž jsou cirkulární struktury důsledkem vzniku disulfidických můstků. Cyklické bakteriociny vznikají jako lineární prekurzory a až později dochází k cyklizaci (Obr. 7). Kompaktní kruhová struktura vede k ultrastabilitě těchto peptidů a je klíčová pro antimikrobiální aktivitu. Chrání je proti tepelnému stresu, změnám pH a degradaci mnoha proteolytickými enzymy, což v praxi znamená, že tyto bakteriociny jsou schopny odolat i pasteraci a dalším konzervačním procesům (Perez et al., 2018). Velikost zralých kruhových peptidů se pohybuje v rozmezí od 58 do 70 AMK. Zatím byly izolovány z bakterií kmene Firmicutes, zejména bakterií mléčného kvašení (BMK), několik také z bacilů a klostridií (Gabrielsen et al., 2014). Prvním identifikovaným cirkulárním bakteriocinem byl enterocin AS-48, produkováný řadou enterokoků. Od té doby bylo popsáno několik dalších látek stejné povahy, mezi nimi i pumilarin bakterie *B. pumilus* (Van Heel et al., 2017) a amylocyklicin z *B. amyloliquefaciens* (Scholz et al., 2014).



**Obrázek 7:** Ilustrace tří kroků biosyntézy cyklického bakteriocinu. 1. Tri-aminokyselinový vedoucí peptid (fialový) prekurzorového peptidu je enzymaticky odštěpen (přerušovaná čára). 2. Proces cyklizace lineárního peptidu kondenzací N- a C-terminálních částí, čímž vzniká nová peptidová vazba a výsledkem je zralý kruhový peptid. 3. Export maturovaného peptidu z buňky pomocí specializovaného transportního komplexu. Upraveno podle Gabrielsen et al., (2014).

Na základě rozdílných biochemických vlastností jsou cyklické peptidy rozděleny do dvou skupin. Skupina I zahrnuje větší silně kationické peptidy s vysokým izoelektrickým bodem ( $pI > 9$ ), kam spadá pumilarin i amylocyklicin. Peptidy skupiny II mají nižší hodnotu  $pI$  ( $pI < 7$ ) a jsou vysoce hydrofobní, díky vyššímu obsahu reziduí kyselých aminokyselin (Perez et al., 2018). Kruhové bakteriociny vykazují široké spektrum účinku především proti  $G^+$  bakteriím. Nejvíce citlivé jsou BMK a bacily. Působí ale také proti patogenům způsobujícím alimentární onemocnění, jako jsou zástupci rodů *Listeria* či *Clostridium*. V několika případech byly účinné vůči nozokomiálním patogenům (enterokokům, stafylokokům) a *Escherichia coli*. *E. coli* byla inhibována jen ve vysokých koncentracích bakteriocinu (Gabrielsen et al., 2014).

#### 3.2.2.1.1.2.4 IId Ne-modifikované, lineární bakteriociny

Zbývající bakteriociny, které nemají významnou sekvenční podobnost s ostatními bakteriociny třídy II, jsou kategorizovány jako bakteriociny třídy IId. Tato skupina zahrnuje jedno-peptidové lineární antimikrobiální látky, nepodobné pediocinu (Nishie et al., 2012). Spadá sem např. lichenin produkovaný bakterií *B. licheniformis* 26L-10/3RA, izolovaný

z buvolího bachoru. Bylo prokázáno, že produkce a biologická aktivita licheninu je striktně závislá na anaerobních podmínkách. Nejvyšší produkce je dosahováno při kultivaci v pH 6,8 a teplotě 39 °C, což nejlépe vystihuje prostředí bachoru. K účinkům licheninu jsou citlivé zejména bachorové bakterie, například *Streptococcus bovis* a *Ruminococcus albus*. Jedná se tedy o látku s velkým potenciálem, využitelnou k modulaci bachorové mikrobioty u přežvýkavců (Pattnaik et al., 2005). Významným producentem nemodifikovaných peptidů je *B. cereus*, který produkuje skupinu bakteriocinů zvanou cereiny. Cerein 8 A z *B. cereus* 8 A izolovaný z půdy lesů jižní Brazílie je citlivý k proteázám, stabilní v rozmezí pH 2 až 11 a relativně termostabilní. Inhibuje některé patogeny jako např. *L. monocytogenes* a *B. cereus* tím, že narušuje funkci buněčné membrány (Abriouel et al., 2011).

Zvláštní kategorií této podskupiny jsou tzv. leaderless bakteriociny neboli bakteriociny postrádající vedoucí řetězec. Nepodléhají žádné posttranslační modifikaci a začínají být aktivní brzy po translaci. Mechanismus, kterým se produkční buňka chrání proti účinku vlastního bakteriocinu, než je z buňky vyloučen, je zatím nevyjasněn. Leaderless bakteriociny mají kladný náboj a hodnoty pI srovnatelné s cirkulárními bakteriociny, jsou ale výrazně méně hydrofóbní. Dělí se na jedno-peptidové, dvou-peptidové a multi-peptidové (Perez et al., 2018). Ovchinnikov et al. (2016) nedávno popsali novou podskupinu multi-peptidových (3-4 peptidy) bakteriocinů produkovaných kmeny *B. cereus*. Jedná se o cereucin V, cereucin H a cereucin X. Zároveň vědci potvrdili jejich širokospektrální antibakteriální účinky.

### **3.2.2.1.2 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální proteiny**

Tato skupina zahrnuje velké (větší než 10 kDa), termolabilní proteiny s antimikrobiální aktivitou, jako jsou megaciny a koliciny. Genové klastry kolicinů byly detekovány v genomech *B. thuringiensis*, *B. cereus* a *Bacillus* sp. BH072 (Zhao & Kuipers 2016). Tyto proteiny se váží na citlivé buňky, prostupují vnější membránou a translokují do místa působení. Cílem kolicinů může být rozklad hostitelských nukleáz, tvorba pórů v cytoplazmatické membráně, či inhibice syntézy peptidoglykanu (Kim et al. 2014). Megaciny jsou produkovány určitými kmeny *B. megaterium*. Poprvé byly popsány v roce 1954, kdy bylo zjištěno, že některé buňky v rostoucí kultuře *B. megaterium* 216 lyzují buňky jiných kmenů této bakterie, ale neovlivňují většinu ostatních bakteriálních druhů (Kiss et al. 2008).

### 3.2.2.1.3 Neribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy

Neribozomálně syntetizované peptidy vznikají, na rozdíl od ribozomálně syntetizovaných peptidů, činností velkých multienzymových komplexů označovaných jako NRPS (neribosomální peptidické syntetázy). NRPS katalyzují všechny kroky v biosyntéze peptidů, tedy výběr a postupnou kondenzaci aminokyselinových zbytků. Ve většině případů je neribozomální biosyntéza peptidů ukončena uzavřením cyklu lineárního peptidového řetězce, jehož koncové části jsou navzájem kovalentně vázány (Reimer et al., 2018). Neribozomálně syntetizované peptidy tvoří extrémně heterogenní skupinu bioaktivních sekundárních metabolitů produkovaných bakteriemi a houbami. Zahrnují lineární, cyklické i rozvětvené struktury. Mimořádná rozmanitost pramení z široké škály substrátů, jako jsou AMK, hydroxylové a karboxylové sloučeniny, které jsou začleňovány do peptidového řetězce. Začleněné funkční skupiny mohou být dále modifikované epimerizací, N-metylací, acylací, glykosylací nebo heterocyklizací (Eppelmann et al., 2001). Mnohé z těchto látek jsou farmakologicky významnými léčivy např. antibiotika penicilin, vankomycin a bacitracin.

Lipopeptidy jsou nejvýznamnějšími zástupci této skupiny antibiotik. Jedná se o lineární nebo cyklické peptidy s antimikrobiální aktivitou. Pro využití v humánní a veterinární medicíně byly historicky přehlíženy, především kvůli systémové toxicitě. Až v posledních letech bylo několik lipopeptidových antibiotik schváleno pro použití při léčbě bakteriálních infekcí, včetně polymyxinu B produkovaného kmeny *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa*. Bacily představují významné producenty těchto látek, jejichž mechanismus účinku zahrnuje primárně narušení buněčné membrány.

Základní rozdělení lipopeptidů je následující (Cochrane et Vederas, 2016):

- I. cyklické kationické lipopeptidy
- II. cyklické nekationické lipopeptidy
- III. lineární kationické lipopeptidy

Pro *Bacillus* spp. je charakteristická biosyntéza zejména cyklických nekationických lipopeptidů, zahrnujících rodinu iturinů, surfaktinů, fengycinů a kurstakinů. Každá rodina má stejné strukturní rysy, ale liší se v povaze a uspořádání kruhové peptidové části nebo délce koncové mastné kyseliny (Caulier et al., 2019). Látky patřící do iturinové rodiny produkují kmeny blízké příbuzné druhům *B. subtilis* a *B. amyloliquefaciens*. Jsou známa čtyři iturinová antibiotika (ituriny A, C, D, E), pět bacilomycinů a mykosubtilin. Všechny se skládají z

konzervativní LDDLLDL cyklické aminokyselinové sekvence a proměnného hydrofobního konce tvořeného  $\beta$ -amino mastnou kyselinou o 14ti až 17ti uhlících. Jejich aktivita roste se zvyšujícím se počtem uhlíků mastné kyseliny. Inhibičně působí zejména proti rostlinným a lidským patogenním houbám (kvasinkám), méně pak proti bakteriím (T. Wang et al., 2015) a vykazují silnou hemolytickou aktivitu. Fengyciny oproti tomu vykazují nižší hemolytickou aktivitu. Působí silně fungicidně a specificky vůči vláknitým houbám. Nejvíce studovanou rodinou lipopeptidů jsou surfaktiny. Jedná se o cyklické heptapeptidy s chirální konfigurací LDDLLDL sekvence, která vytváří laktonový kruh spojený s  $\beta$ -hydroxy mastnou kyselinou o 13ti až 15ti uhlících. Surfaktiny mají amfifilní vlastnosti, slouží tedy jako biosurfaktanty snižující povrchové napětí. Oproti chemickým surfaktantům jsou účinnější, a to i při extrémních teplotách a hodnotách pH. Jsou biologicky odbouratelné a méně toxické. Mají antivirotické a antimykotické účinky. Surfaktin syntetizovaný *B. subtilis* C4 působí inhibičně i vůči G+ patogenní bakterii *L. monocytogenes* (Falardeau et al., 2013). Produkce surfaktinů je široce rozšířena mezi kmeny *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* a *B. amyloliquefaciens* (Sansinenea et Ortiz, 2011).

### 3.2.2.2 Nebílkovinné antimikrobiální látky

Bacily mají schopnost produkce strukturně různorodých bioaktivních sloučenin. Ačkoliv většinu sekundárních metabolitů představují látky peptidové povahy, několik druhů syntetizuje antibiotika patřící do jiných chemických tříd. Mezi ně se řadí polyketidy, terpenoidy, izokumariny a další různorodé metabolity (Hamdache et al., 2011).

Polyketidy představují vysoce diverzifikovanou skupinu přírodních produktů. Jsou tvořeny uhlíkovými skelety, které mohou obsahovat polyfenoly, makrolidy, polyeny, endiethyny a polyethery. Bacilleane, polyenové antibiotikum, bylo objeveno jako složka fermentačního bujónu několika kmenů *B. subtilis* a *B. amyloliquefaciens*. Působí antimikrobiálně vůči širokému spektru bakterií, včetně patogenů člověka (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* a *S. aureus*). Účinek je dán inhibicí proteosyntézy. Další polyenová antibiotika difficidin a oxydifficidin, produkováné bakteriemi skupiny *B. subtilis* působí také širokospektrálně (Hamdache et al., 2011). Významnými polyketidy jsou též makrolaktiny a jejich deriváty. Ty vykazují antibakteriální a antifungální účinky. Makrolaktin A dokonce působí antivirotický, například proti virům *Herpes simplex* (Caulier et al., 2019).

Terpenoidy (terpeny a jejich deriváty), nejvíce známé jako metabolity rostlin, syntetizují všechny živé organismy pro zajištění základních fyziologických funkcí (přenos elektronů, propustnost membrány a signalizace). Terpeny mají schopnost inhibovat bakterie, houby,

hlístice nebo hmyz. Dělí se do tří kategorií: izopren, monoterpeny (C<sub>10</sub>) a seskviterpeny (C<sub>15</sub>). Způsob účinku je spojován s jejich lipofilní povahou, která umožňuje destabilizovat integritu buněčné membrány (Caulier et al., 2019). Izopren je nejmenším zástupcem skupiny přírodních terpenoidů a v největším množství je emitován druhem *B. subtilis* (Julsing et al., 2007). Pumilin je seskviterpenové antibiotikum izolované z *B. pumilis* aktivní pouze proti G<sup>+</sup> bakteriím (Hamdache et al., 2011).

Mezi další významné metabolity patří zwittermicin A, poprvé identifikovaný u *B. cereus* UW85. Jedná se o lineární hybridní sloučeninu, tvořenou spojením polyketidu a neribozomálního peptidu. Je schopen inhibovat některé grampozitivní, gramnegativní a eukaryotické organismy (Hamdache et al., 2011).

## 4 Metodika

Praktická část diplomové práce se zabývá charakterizací čtyř kmenů bakterií rodu *Bacillus* vybraných na základě předběžných laboratorních testů, dále testováním jejich antimikrobiální aktivity a studiem povahy antimikrobiálně aktivních látek. Kmen 1 byl izolován z vody rybníku Kanclíř (jižní Čechy), kmen 2 z pasterovaného medu, a kmeny 3 a 4 byly izolovány ze škeble asijské (*Sinanodonta woodiana*).

Práce je složena z několika na sebe navazujících experimentů. V první části byla provedena identifikace produkčních organismů a u kmenů náležících do skupiny *Bacillus cereus* byl stanoven patogenní potenciál. V druhé části práce byla testována antimikrobiální aktivita proti potenciálně patogenním a probiotickým bakteriím, a proti bakteriím způsobujícím kažení potravin. Dále byla zjišťována povaha látek zodpovědných za antimikrobiální účinky působením různých enzymů, teplot a hodnot pH. U kmene 1 byla provedena detailní charakterizace antimikrobiální aktivity. Nejprve byla zjišťována fáze iniciace exprese a fáze maximální produkce antimikrobiální látky, dále byl studován vliv kultivační teploty na expresi inhibiční látky a stimulována exprese prostřednictvím vybraných antimikrobiálních látek a faktoru virulence. Detailněji byla zjišťována povaha antimikrobiální látky, a to účinkem surfaktantů a různých podmínek skladování. Také byl zkoumán její vliv na buňky. Pro citlivé kmeny byla stanovena minimální inhibiční a baktericidní koncentrace supernatantu mikrodiluční metodou.

Veškeré níže popsané experimenty byly prováděny s maximálním důrazem na aseptické podmínky prostředí, aby nedošlo ke kontaminaci čistých testovaných kultur, a tedy ovlivnění výsledků práce.



## 4.1 Charakterizace produkčních kmenů

Identifikace byla provedena polyfázickým přístupem.

### 4.1.1 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)

Prvotní identifikace produkčních kmenů byla provedena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, která je založena na analýze ribozomálních proteinů.

K analýze byly použity kultury narostlé v trypton sójovém bujónu (Oxoid) při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Čistota byla ověřena pomocí mikroskopu (Nikon Instruments Europe B. V.) s fázovým kontrastem. Jeden mililitr kultury byl převeden do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a odstředěn při 14 500 ot/min po dobu 3 minut. Následně byl odstraněn supernatant a pelet resuspendován v 70% ethanolu. Tento krok byl opakován dvakrát, aby bylo zajištěno dostatečné vymytí kultivačního media. Pelet byl několik minut ponechán při laboratorní teplotě vyschnout. Poté k němu bylo přidáno 15 µl 70% kyseliny mravenčí, důkladně promícháno a přidáno 15 µl 100% acetonitrilu. Vzorek byl centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 2 minut. Jeden mikrolitr supernatantu byl nanesen na MTP 384 MALDI destičku (Bruker Daltonik GmbH) a okamžitě po zaschnutí překryt 1 µl HCCA matrice (nasycený roztok kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové v 50% acetonitrilu s 2,5% kyselinou trifluoroctovou, Bruker Daltonik GmbH). Spektra byla měřena automaticky pomocí softwaru FlexControl. Identifikace a analýza mikroorganismů byla provedena na základě porovnání hmotnostních spekter v softwaru BioTyper verze 2.0 (Bruker Daltonik GmbH). Měření každého kmene bylo provedeno ve dvou opakováních.

### 4.1.2 Sekvenování genu pro 16S rRNA

Kmeny byly dále identifikovány sekvenováním genu 16S rDNA. Tato metoda je založena na stanovení vysoce konzervované nukleotidové sekvence malé ribozomální podjednotky, která slouží jako biomarker při identifikaci organismů.

#### *Příprava buněčného lyzátu pro PCR*

Jeden mililitr čisté čerstvě narostlé kultury byl převeden do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a odstředěn při 14,5 tis. ot./min po dobu 2 minut. Supernatant byl slit a pelet resuspendován ve 100 µl PrepMan© Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems) s následnou inkubací v termobloku při 100 °C po dobu 10 minut. Po vychladnutí byl vzorek znovu odstředěn (14,5 tis. ot./min po dobu 2 minut) a 60 µl supernatantu bylo odebráno do nové

mikrocentrifugační zkumavky. Takto připravený buněčný lyzát byl uchován při -18 °C a použit pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR).

#### *Amplifikace, vizualizace a purifikace*

Pro amplifikaci 16S rDNA byly použity primery fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') a rP2 (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') navržené ve studii Weisburg et al. (1991). Celkový objem reakční směsi činil 25 µl a obsahoval: 12,5 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 8,5 µl PCR voda (Thermo Fisher Scientific), 1 µl od každého primeru (10µM) a 2 µl templátová DNA. Amplifikace byla uskutečněna v automatickém termocykleru T100 (Bio-Rad). Podmínky procesu PCR se sestávaly z počáteční denaturace 92 °C po dobu 5 minut, následované 35 cykly denaturace (92 °C, 1 min), hybridizace (52,5 °C, 90 s) a elongace (72 °C, 2 min), a finální elongace při 72 °C po dobu 5 minut.

Vznik PCR produktů o požadované délce byl ověřen gelovou elektroforézou v 1% agarózovém gelu o složení: 1 g agarózy a 100 ml 0,75 x TAE pufru (40 mM Tris, 20 mM kys. octová, 1 mM EDTA, Fermentas). Pro vizualizaci PCR produktů bylo do gelu přidáno 5 µl barviva GelRed™ (Biotium). Separace probíhala při konstantním napětí 130 V po dobu 60 min. Po uplynutí doby byly fragmenty DNA vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Bio-Rad) a pořízeny digitální snímky. Jako standard pro určení velikosti PCR produktů byl použit Mass Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific).

PCR produkty byly purifikovány pomocí komerčního E.Z.N.A. Cycle Pure kitu (OMEGA bio-tek) dle instrukcí výrobce. Poté bylo smícháno 5 µl.

#### *Sekvenování a vyhodnocení sekvencí*

Pět mikrolitrů přečištěného PCR produktu bylo smícháno s 5 µl jednoho z primerů (5µM). Každý vzorek byl sekvenován dvakrát, jednou s fD1 a podruhé s rP2 primerem. Vlastní sekvenování bylo uskutečněno Sangerovou metodou servisem GATC společnosti Eurofins Genomics. Získaná data byla zpracována prostřednictvím programů Chromas Lite a BioEdit. Nakonec byly sekvence porovnány se sekvencemi publikovanými v databázích GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) a EzBioCloud.

### **4.1.3 Stanovení metabolického profilu**

Metabolický profil kmene 1 a typových kmenů *B. mycoides* DSMZ 2048 a *B. mycoides* (*weihenstephanensis*) DSMZ 11821 byl stanoven pomocí komerčně dostupné biochemické soupravy API 50 CHB (bioMérieux). Jedná se o standardizovaný systém určený ke studiu metabolického potenciálu a identifikaci bacilů a příbuzných rodů na základě sacharidového

metabolismu. Během inkubace jsou substráty přeměňovány na organické kyseliny, které způsobují pokles pH. Na pokles pH reaguje indikátor fenolová červen a pozitivní reakce se projeví barevnou změnou (žluté zbarvení).

Pro experiment byly použity kultury narostlé za stejných podmínek, jako pro MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii a taktéž byla mikroskopicky ověřena jejich čistota. Nejprve byly do sterilní mikrozkušavky odebrány 2 ml kultury a odstředěny při 4 500 ot/min po dobu 5 minut. Následně byl odstraněn supernatant a pelet resuspendován v 1 ml fyziologického roztoku. Tento krok byl opakován dvakrát, aby bylo zajištěno dostatečné odstranění kultivačního média. Suspenze pro přípravu inokula byla koncentrována do objemu 0,5 ml. Ve zkumavce s 5 ml sterilního fyziologického roztoku byla připravena suspenze buněk o optické hustotě odpovídající stupni 2 McFarlandovi zákalové stupnice, pomocí standardu (bioMérieux). V průběhu bylo odpočítáno množství kapek, nezbytných pro vytvoření optimální hustoty. Dvojnásobné množství pak bylo převedeno do API 50 CHB/E suspenzního média (bioMérieux) a důkladně homogenizováno. Médium bylo pomocí sterilní injekční stříkačky rovnoměrně dávkováno do jednotlivých jamek tak, aby nedošlo ke styku s dehydratovanými substráty a vzniku vzduchových kapslí. Kultivace probíhala aerobně při 30 °C po dobu 48 hodin. Výsledky byly odečítány po 24 a 48 hodinách.

#### **4.1.4 Stanovení patogenního potenciálu**

Patogenní potenciál byl stanoven u kmenů 1 a 2, náležících do skupiny *B. cereus*. Testována byla hemolytická a lecitinázová aktivita, a detekovány geny kódující významné faktory virulence a enzym inhibující bakteriální buněčnou komunikaci.

##### **4.1.4.1 Zkouška hemolytické a lecitinázové aktivity**

Hemolytická aktivita byla stanovena rozetřením čerstvě narostlé kultury na plotny s Columbia blood agarem (Oxoid) s přídatkem 5 % ovčí krve (v/v). Hemolýza byla hodnocena po 24 a 48 h inkubace při teplotě 30 °C. Kmeny projevující se transparentní zónou kolem kolonií jsou považovány za kmeny s  $\beta$ -hemolytickou aktivitou a ty, které vykazují zelenou zónu v okolí kolonií, jsou hodnoceny jako kmeny s  $\alpha$ -hemolytickou aktivitou. Pokud nevzniká žádná zóna, je kmen považován za nehemolytický.

Pro posouzení lecitinázové aktivity byly čerstvě narostlé kultury rozetřeny na plotny s tuhým médiem Egg Yolk Agar Base (Himedia) obohacené o sterilní žloutkovou emulzi (100 ml/l, Oxoid) a kultivovány při teplotě 30 °C. Aktivita byla opět hodnocena po 24 a 48 h

inkubace. Kmeny projevující se zónou precipitace v okolí kolonií jsou považovány za lecitináza pozitivní.

#### **4.1.4.2 Detekce genů kódujících faktory virulence a enzym inhibující bakteriální buněčnou komunikaci**

Pro tento experiment byl použit stejný buněčný lyzát, jako v kapitole 4.1.2. Metodou PCR byly detekovány geny kódující cereulid (*ces*), hemolyzin BL (*hbl*), nehemolytický enterotoxin (*nhe*), cytotoxin K (*cytK*), cereolyzin O (*clo*), hemolyzin II (*hlyII*), hemolyzin III (*hlyIII*), fosfolipázu c - fosfatidylinositol-specifickou (*phosC*), fosfolipázu - fosfatidylcholin-preferující (*cerA*), sfingomyelinázu (*cerB*), immune inhibitor A (*inhA2*) a AHL laktonázu (*aihA*). Přehled testovaných genů, použitých primerů včetně sekvencí, předpokládaná velikost PCR produktů a použité PCR programy jsou uvedeny v Tabulce 2. PCR reakce byly provedeny v celkovém objemu reakční směsi 25  $\mu$ l, obsahující 12,5  $\mu$ l DreamTaq Green PCR Master Mixu (Thermo Fisher Scientific), 8,5  $\mu$ l PCR vody (Thermo Fisher Scientific), 1  $\mu$ l od každého primeru (10 $\mu$ M) a 2  $\mu$ l templátové DNA. PCR byla uskutečněna v automatickém termocykleru T100 (Bio-Rad). Podmínky amplifikace pro jednotlivé programy jsou uvedeny v Tabulce 3. Separace a vizualizace PCR produktů rovněž probíhala dle protokolu uvedeného v kapitole 4.1.2. Jako velikostní standard byly použity GeneRuler Low Range DNA Ladder nebo GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher), v závislosti na očekávané velikosti amplikonů.

**Tabulka 2:** Sekvence primerů použitých k detekci genů kódujících faktory virulence, výsledná velikost produktu a zvolený PCR program.

| Faktor virulence  | Gen           | Primer    | Sekvence (5' - 3')             | Velikost produktu (bp) | PCR program |
|---|---------------|-----------|--------------------------------|------------------------|-------------|
| Cereulid  | <i>ces</i>    | CesF1     | GGTGACACATTATCATATAAGGTG       | 1271                   | 1a          |
|   |               | CesR2     | GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA      |                        |             |
| Hemolyzin BL  | <i>hbl</i>    | HD2F      | GTA AAT TAI GAT GAI CAA TTTC   | 1091                   | 1           |
|   |               | HA4R      | AGA ATA GGC ATT CAT AGA TT     |                        |             |
| Nehemolytický enterotoxin   | <i>nhe</i>    | NA2F      | AAG CIG CTC TTC GIA TTC        | 766                    | 1           |
|   |               | NB1R      | ITI GTT GAA ATA AGC TGT GG     |                        |             |
| Cytotoxin K   | <i>cytK</i>   | CKF2      | ACAGATATCGGICAAAATGC           | 421                    | 1           |
|   |               | CKR5      | CAAGTIACTTGACCIGTTGC           |                        |             |
| Cereolyzin O  | <i>clo</i>    | CerOf     | GTATCTACTTGGAAATSAAAAAG        | 659                    | 6a          |
|   |               | CerOr     | TAATCTGTATTGTTATGAAC           |                        |             |
| Hemolyzin II  | <i>hlyII</i>  | BcHlyII-S | AGAAGGAGTGGCTGTCTGTA           | 535                    | 3           |
|   |               | BcHlyII-A | TTCTTTCCAAGCAAAGCTAC           |                        |             |
| Hemolyzin III   | <i>hlyIII</i> | BCHEM 1   | AATGACACGAATGACACAAT           | 444                    | 3           |
|   |               | BCHEM 3   | ACGATTATGAGCCATCCCAT           |                        |             |
| Fosfolipáza c - fosfatidylinositol-specifická (Lecitináza C, pipIc) | <i>phosC</i>  | phosC1    | CGCTATCAAATGGACCATGG           | 569                    | 3a          |
|   |               | phosC2    | GGACTATTCCATGCTGTACC           |                        |             |
| Fosfolipáza - fosfatidylcholin-preferující (Cereolysin A, pcpl)     | <i>cerA</i>   | CERA 1    | ACTGAGTTAGAGAACGGTAT           | 536                    | 3a          |
|   |               | CERA 2    | CGCTTACCTGTCATTGGTGT           |                        |             |
| Sfingomyelináza (Cereolysin B, Sph)                                 | <i>cerB</i>   | CERB 1    | TCGTAGTAGTGGAAAGCGAAT          | 457                    | 3a          |
|   |               | CERB 2    | AGTCGCTGTATGTCCAGTAT           |                        |             |
| Immune inhibitor A  | <i>inhA2</i>  | inhA2.1   | CGCGGATCCCACCGATTTATCTG        | 3087                   | 6b          |
|   |               | inhA2.2   | CCGGAATTCCTTTCCCCACATAATTTG    |                        |             |
| AHL laktonáza   | <i>aiiA</i>   | AIF       | TAAATGTAAAGGTGGATACATAATGACAGT | 750                    | 6c          |
|   |               | AIR       | AGCTCATGACTTTTTGCACTATATATA    |                        |             |

**Tabulka 3: Podmínky PCR (teplota, čas, počet cyklů) pro jednotlivé PCR programy.**

| Program   | PCR podmínky |        |       | Reference                   |
|-----------|--------------|--------|-------|-----------------------------|
|           | °C           | Čas    | Cykly |                             |
| <b>1</b>  | 95           | 15 min | 30    | Ehling-Schulz et al. (2006) |
|           | 95           | 30 s   |       |                             |
|           | 49           | 30 s   |       |                             |
|           | 72           | 1 min  |       |                             |
|           | 72           | 2 min  |       |                             |
| <b>1a</b> | 95           | 3 min  | 30    | Ehling-Schulz et al. (2006) |
|           | 95           | 30 s   |       |                             |
|           | 49           | 30 s   |       |                             |
|           | 72           | 90 s   |       |                             |
|           | 72           | 7 min  |       |                             |
| <b>3</b>  | 95           | 3 min  | 30    | Hendriksen et al. (2006)    |
|           | 94           | 15 s   |       |                             |
|           | 55           | 45 s   |       |                             |
|           | 72           | 2 min  |       |                             |
|           | 72           | 2 min  |       |                             |
| <b>3a</b> | 95           | 3 min  | 30    | Hendriksen et al. (2006)    |
|           | 94           | 30 s   |       |                             |
|           | 55           | 30 s   |       |                             |
|           | 72           | 45 s   |       |                             |
|           | 72           | 2 min  |       |                             |
| <b>6a</b> | 95           | 3 min  | 30    | Raddadi et al. (2009)       |
|           | 94           | 30 s   |       |                             |
|           | 52           | 30 s   |       |                             |
|           | 72           | 45 s   |       |                             |
|           | 72           | 5 min  |       |                             |
| <b>6b</b> | 95           | 3 min  | 30    | Raddadi et al. (2009)       |
|           | 94           | 30 s   |       |                             |
|           | 52           | 45 s   |       |                             |
|           | 72           | 1 min  |       |                             |
|           | 72           | 5 min  |       |                             |
| <b>6c</b> | 95           | 3 min  | 30    | Raddadi et al. (2009)       |
|           | 94           | 30 s   |       |                             |
|           | 50           | 30 s   |       |                             |
|           | 72           | 2 min  |       |                             |
|           | 72           | 7 min  |       |                             |

## 4.2 Testování antimikrobiální aktivity produkčních kmenů

### 4.2.1 Indikátorové kmeny

Antimikrobiální aktivita produkčních kmenů byla testována proti potenciálně patogenním mikroorganismům a bakteriím způsobujícím kažení potravin a krmiv, a proti probiotickým bakteriím.

Pro testování byly použity sbírkové kmeny ze sbírky CCM (Česká sbírka mikroorganismů), a to *Aeromonas hydrophila* CCM 7232, *Bacillus cereus* CCM 2010, *B. fusiformis* CCM 4609, *Bifidobacterium adolescentis* CCM 4987, *Clostridium difficile* CCM 3593, *Enterobacter aerogenes* CCM 7797, *Lactobacillus fermentum* CCM 91, *Moraxella canis* CCM 4590, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960 a *P. fluorescens* CCM 2115. Dále kmeny ze sbírky DSMZ (Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury), *Bacillus mycoides* DSM 2048, *B. mycoides (weihenstephanensis)* DSMZ 11821, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* DSM 10140, *Bifidobacterium longum ssp. infantis* DSM 20090, *Clostridium butyricum* DSM 10702, *Cl. clostridioforme* DSM 933, *Cl. perfringens* DSMZ 11778, *Cl. tertium* DSM 2485, *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079, *Propionibacterium acnes* DSMZ 1897 a *Serratia marcescens* DSMZ 30121. Také byly testovány kmeny ze sbírky ATCC (Americká sbírka typových kultur), *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a 2 kmeny ze sbírky CCDM (Sbírka čistých mlékařských kultur LAKTOFLORA®), *Lactobacillus plantarum* MILCOM 195 a *Lactococcus lactis ssp. lactis* MILCOM 612. Byly použity i kmeny ze sbírky KMVD (Sbírka Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky), a to *E. coli* C7050 KMVD, *E. coli* 2163 KMVD, *Enterococcus faecalis* KMVD a *Salmonella* KMVD. Taxonomické zařazení a původ sbírkových kmenů jsou uvedeny v příloze v Tabulce 1.

Pro testování byly také použity izoláty bakterií z různých prostředí. Celkem bylo testováno 74 kmenů bakterií skupiny *B. cereus*, jejichž taxonomické zařazení, označení a původ jsou uvedeny v příloze v Tabulce 2a. Dále bylo použito 8 kmenů *Clostridium perfringens* izolovaných z trávicího traktu psa a medu, 2 kmeny *Listeria monocytogenes* izolované z potravin, 1 kmen *B. aerophilus* izolovaný z vody rybníku Kanclíř a 1 kmen *B. subtilis* izolovaný z vody rybníku Hejtman. Také byly testovány 2 kmeny *Lactococcus garviae* z trávicího traktu včely medonosné a 1 kmen *Paenibacillus polymyxa* z čistícího čaje s červenou řepou. Též byla testována citlivost G- bakterií, a to 1 kmene *Acinetobacter johnsonii* izolátu ze škeble asijské, 1 kmene *E. coli* z trávicího traktu člověka, 1 kmene *Chromobacterium* sp. izolátu z bochnatky

americké (*Pectinatella magnifica*) a 1 kmene *Salmonella* sp. izolovaného z masa. Taxonomické zařazení, označení kmenů a jejich původ jsou uvedeny v příloze v Tabulce 2b.

#### 4.2.2 Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita všech kmenů byla testována agarovou difúzní metodou. Jedná se o kvalitativní metodu pro stanovení citlivosti či rezistence organismů k antimikrobiální látce. Citlivost indikátorového kmene se projeví tvorbou inhibiční zóny.

Pro tento experiment byly všechny kmeny kultivovány v trypton sójovém bujónu (TSB, Oxoid) při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Kmeny 1 a 2 byly kultivovány v anaerobních podmínkách, kmeny 3 a 4 v aerobních podmínkách. Pro anaerobní kultivaci bylo médium připraveno metodou podle Hungate (1969). Po uplynutí inkubační doby byla kultura odstředěna při 14 500 ot/min po dobu 5 minut a supernatant použit pro testování antagonistické aktivity.

Agar vhodný pro daný indikátorový kmen (Tab. 4) byl sterilován v tlakovém hrnci po dobu 45 min a následně vytemperován na teplotu 50 °C ve vodní lázni. Poté byl do Petriho misky převeden 1 ml čerstvě narostlého mikroskopicky ověřeného indikátorového kmene a pomocí sklopné pipety zalit 20 ml připraveného agarů. Pro dosažení rovnoměrného nárůstu byl agar jemným krouživým pohybem promíchán se zaočkovanou kulturou. Po zatuhnutí v něm byly sterilním korkovrtem vytvořeny po obvodu jamky, ze kterých byl sterilní jehlou odstraněn přebytečný agar. Do jamek bylo pomocí pipety dávkováno 60 µl supernatantu. Anaerobní mikroorganismy byly urychleně umístěny do anaerostatů (Oxoid) s vyvíječem anaerobní atmosféry (AnaeroGen, Oxoid). Takto připravené Petriho misky byly ponechány 4 hodiny v lednici, aby byla umožněna plná difúze supernatantu do média. Po uplynutí doby byly organismy kultivovány při teplotě optimální pro daný druh (Tab. 4). Antimikrobiální aktivita byla testována ve 3 opakováních a citlivost daného kmene byla hodnocena jako průměr inhibičních zón po 24-48 h inkubace, v závislosti na indikátorovém organismu.



**Tabulka 4:** Kultivační podmínky pro testované skupiny mikroorganismů.

| Médium   | Teplota | O <sub>2</sub> | Délka kultivace | Mikroorganismus  |
|--|---------|----------------|-----------------|--|
| Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) obohacený o cystein (0,5 g/l), sojový pepton (5 g/l) a tween 80 (1 ml/l) | 37 °C   | anaerobně      | 24 h            | <i>E. coli, Salmonella, Serratia</i>   |
|  |         |                | 48 h            | <i>Bifidobacterium, Clostridium, Enterobacter, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Propionibacterium, Staphylococcus</i> |
| Trypton sójový agar (Oxoid)  | 30 °C   | anaerobně      | 24 h            | skupina <i>Bacillus cereus</i>   |
|  |         | aerobně        |                 | ostatní druhy rodu <i>Bacillus, Aeromonas, Pseudomonas</i>   |
|  | 24 °C   | anaerobně      | 48 h            | <i>Acinetobacter, Moraxella, Micrococcus</i>   |
|  |         | aerobně        |                 | <i>Chromobacterium</i>   |
| Brain-heart infusion agar (Merck)  | 37 °C   | anaerobně      | 48 h            | <i>Listeria</i>  |
| Nutrient agar (Oxoid)  | 30 °C   | aerobně        | 24 h            | <i>Paenibacillus</i>   |

### 4.3 Charakterizace antimikrobiálně působících látek

Pro všechny následující experimenty byly použity supernatanty, připravené dle výše zmíněného protokolu.

Supernatanty byly vystaveny působení různých enzymů, hodnot pH a teplot. Reziduální aktivita byla hodnocena pomocí agarové difúzní metody. Z důvodu vysoké citlivosti byl jako indikátorový organismus zvolen kmen *B. cereus* CCM 2010. Průměry inhibičních zón byly měřeny po 24 hodinách anaerobní kultivace na Wilkins-Chalgren agaru (Oxoid) při teplotě 30 °C.

#### 4.3.1 Vliv enzymů

Za účelem stanovení fyzikálně-chemické povahy antimikrobiálních substancí byly supernatanty produkčních kmenů vystaveny působení proteolytických enzymů pepsinu, proteinázy K,  $\alpha$ -chymotrypsinu a trypsinu (vše Sigma-Aldrich) a také enzymu lysozymu (Sigma-Aldrich), který štěpí glykoproteiny.

Do poměrného množství supernatantu byly asepticky přidány enzymy v takovém množství, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 1 mg/ml. Pro optimální aktivitu pepsinu,

bylo upraveno pH supernatantu pomocí 35% kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 2. Následně byly vzorky inkubovány po dobu 24 hodin v termostatu. Teplota inkubace byla zvolena tak, aby indukovala maximální aktivitu enzymů, pro proteinázu K se jednalo o teplotu 42 °C, pro ostatní enzymy 37 °C. Reziduální aktivita byla hodnocena po 1 a 24 hodinách inkubace. Hodnota pH supernatantu s pepsinem byla po inkubaci vždy upravena 2M roztokem hydroxidu sodného na hodnotu původní. Jako kontrola posloužily samotné supernatanty inkubované za stejných teplotních podmínek, jako varianty s enzymy, aby byla vyloučena případná degradace danými teplotami. Dále byla testována inhibiční aktivita samotných enzymů (1 mg/ml destilované vody).

#### 4.3.2 Vliv pH

Pro stanovení vlivu pH na antimikrobiální aktivitu byly supernatanty upraveny na hodnoty v rozmezí 2 až 9. Požadovaných hodnot pH bylo dosaženo přidávkem 2M roztoku hydroxidu sodného a 35% kyseliny chlorovodíkové. Současně byla testována antimikrobiální aktivita neupravených supernatantů (kmen 1 - pH 6,1; kmeny 2, 3 a 4 – pH 6,4). Pro ověření, zda samotné pH nepůsobí inhibičně vůči indikátorovému kmenu, byly otestovány vzorky destilované vody, upravené na obdobné hodnoty pH jako supernatanty.

#### 4.3.3 Vliv teplot

Pro analýzu termostability antimikrobiálně aktivních látek byly supernatanty vystaveny různým teplotám po definovanou dobu, jak je uvedeno v Tabulce 5. Následně u nich byl agarovým difúzním testem zjišťován rozsah reziduální inhibiční aktivity vůči indikátorovému kmenu.

**Tabulka 5:** Použité teploty a doby působení pro inkubaci supernatantu.

| Teplota (°C)        | -80 | -18 | 65 | 72 | 85 | 100 | 121 |
|---------------------|-----|-----|----|----|----|-----|-----|
| Doba působení (min) | 60  | 60  | 10 | 10 | 10 | 10  | 15  |
|                     |     |     | 30 | 30 | 30 | 30  |     |
|                     |     |     | 60 | 60 | 60 | 60  |     |

#### 4.4 Detailní charakterizace antimikrobiální aktivity kmene 1

Následující experimenty se vztahují pouze k *B. weihenstephanensis* 1. Pokud není uvedeno jinak, byly pro testování použity supernatanty, připravené dle výše zmíněného

protokolu, z kultury narostlé anaerobně v TSB (Oxoid) při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Antimikrobiální aktivita pak byla zjišťována opět agarovou difúzní metodou vždy ve třech opakováních. Z důvodu vysoké citlivosti byl jako indikátorový organismus zvolen kmen *B. cereus* CCM 2010. Průměry inhibičních zón byly měřeny po 24 hodinách anaerobní kultivace na Wilkins-Chalgren agaru (Oxoid) při teplotě 30 °C.

#### **4.4.1 Růstová křivka ve vztahu k produkci antimikrobiální látky**

Pro stanovení dynamiky produkce antimikrobiální látky během buněčného cyklu byl *B. weihenstephanensis* 1 kultivován ve zkumavkách s 10 ml TSB (Oxoid) za anaerobních podmínek při teplotě 30 °C po dobu 40 hodin, ve dvou opakováních. Jako inokulum bylo použito 0,4 ml kultury optimalizované na optickou denzitu (OD) odpovídající stupni 5 McFarlandovi zákalové stupnice, pomocí standardu (bioMérieux). Každou půl hodinu kultivace byla měřena optická denzita ( $OD_{565nm\pm 15nm}$ ) kultury pomocí denzitometru McFarland typ DEN-1B (Biosan). Každou hodinu byl asepticky odebrán vzorek a z něho připraven supernatant. Následně byla testována antimikrobiální aktivita získaných supernatantů. Na základě získaných dat, byla sestavena růstová křivka a určena růstová fáze, při níž dochází k iniciaci exprese antimikrobiální látky a fáze, kdy produkce dosahuje nejvyšších hodnot.

#### **4.4.2 Vliv kultivační teploty na expresi antimikrobiální látky**

Pro tento experiment byla čerstvě narostlá kultura zaočkována do vialek s TSB (Oxoid) a kultivována při teplotách 4, 20, 30, 37 a 42 °C po dobu 48 hodin v anaerobních podmínkách. Po uplynutí inkubační doby byl ze všech kultivačních variant připraven supernatant a naředěn dvojkovým ředěním ve sterilním fyziologickém roztoku. Míra produkce byla opět hodnocena na základě velikosti inhibičních zón, stanovených agarovou difúzní metodou.

#### **4.4.3 Stimulace exprese antimikrobiální látky**

Za účelem zvýšení exprese inhibičně aktivní látky byl kmen 1 vystaven působení bakteriocinu nisinu (Sigma-Aldrich) a antibiotika mitomycinu C (PanReac AppliChem) o koncentracích 0,5; 0,75 a 1 µg/ml. Do zkumavek s 10 ml TSB (Oxoid) byly nadávkovány látky nisin a mytomycin C o výsledné koncentraci. Následně byly inokulovány 0,3 ml čerstvě narostlé kultury *B. weihenstephanensis* 1 standardizované na optickou denzitu (O.D.) odpovídající stupni 5 McFarlandovi zákalové stupnice, pomocí standardu (bioMérieux). Takto připravené vzorky byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin při anaerobních podmínkách. Jako kontrola byl použit kmen, kultivovaný v médiu bez antimikrobiální látky. Po

48 hodinách byly ze všech variant připraveny supernatanty a testována jejich antimikrobiální aktivita. Testována byla také inhibiční aktivita samotných látek, nisinu a mitomycinu C o koncentraci 1 µg/ml.

Studován byl také potenciální vliv enzymu lecitinázy a metabolitů produkovaných citlivými indikátorovými kmeny a samotným produkčním kmenem *Bacillus* sp. 1. Pro testování byl použit supernatant kultur produkujících extracelulární lecitinázu: *Bacillus* sp. 1, *B. cereus* 3CP a *Cl. perfringens* DSMZ 11778, kultivovaných v bujónu a teplotě vhodné pro daný druh po dobu 48 hodin. Do zkumavek s TSB byly přidány supernatanty sterilované membránovým filtrem (0,22 µm) ve výsledné koncentraci 1 a 10 %. Zkumavky pak byly zaočkovány 0,3 ml čerstvě narostlé kultury kmene 1 a kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin v anaerobních podmínkách. Po uplynutí doby kultivace byly opět z kultur připraveny supernatanty a testována míra jejich antimikrobiální aktivity. Jako kontrola sloužil kmen narostlý v médiu bez supernatantu z výše uvedených kultur.

Statistická analýza získaných dat byla provedena pomocí Studentova *t*-testu v programu Statistica 12 (StatSoft).

#### **4.4.4 Vliv surfaktantů na aktivitu antimikrobiální látky**

Supernatant kmene 1 byl také vystaven účinkům povrchově aktivních látek. Pro testování byly použity surfaktanty Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) a Tween 80 (Sigma-Aldrich). Výsledná koncentrace těchto sloučenin v médiu činila 1 %. Před testováním byly oba vzorky důkladně homogenizovány na vortexu a několik minut ponechány při pokojové teplotě. U takto upravených supernatantů byla opět testována antimikrobiální aktivita. Testována byla také inhibiční aktivita samotných surfaktantů (1% koncentrace v dH<sub>2</sub>O).

#### **4.4.5 Vliv délky skladování na aktivitu antimikrobiální látky**

Alikvoty supernatantu byly rozdávkovány do mikrozskumavek a uchovány při různých skladovacích teplotách (-80, -18, 4, 30, 37, 42 °C a pokojová teplota). Změny v antimikrobiální aktivitě byly sledovány v intervalech 1, 2, a 4 týdny, a ½, 1 a 1½ roku. Reziduální aktivita byla hodnocena v porovnání s aktivitou čerstvě připraveného supernatantu, testovaného v den započetí skladovacího experimentu.

#### **4.4.6 Testování synergického efektu s laktoferinem**

Vzhledem k tomu, že samotný supernatant *B. weihenstephanensis* 1 neměl schopnost inhibovat růst G- bakterií, byl testován synergický účinek supernatantu v kombinaci

s laktoferinem. Laktoferin je přírodní antimikrobiální glykoprotein se schopností vázat železo. Pro experiment byl použit laktoferin z kravského mléka (Sigma-Aldrich). Synergický účinek byl testován proti několika vybraným kmenům G- bakterií, a to *E. coli* 045, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 a *Salmonella* sp. Nejprve byl připraven supernatant kmene 1 a k němu byl nadávkován laktoferin ve výsledné koncentraci 10 mg/ml. Synergický efekt antimikrobiální aktivity byl následně testován agarovou difúzní metodou vůči indikátorovým kmenům a citlivost byla hodnocena jako vznik inhibičních zón po 24h inkubace. Jako kontrola posloužil supernatant bez přídatku laktoferinu. Také byl testován samotný inhibiční účinek laktoferinu.

#### 4.4.7 Vliv antimikrobiální látky na buňku

Za účelem studia vlivu inhibiční látky na buňku, a tedy i možného mechanismu antimikrobiálního účinku, byly souběžně provedeny dva experimenty. Pro obě testování byl použit jako indikátor opět *B. cereus* CCM 2010 kultivovaný 16 hodin (ve střední logaritmické fázi) za aerobních podmínek. Kultivace probíhala ve zkumavkách s 10 ml TSB (Oxoid). Dále byl pro experimenty použit supernatant z kultury *B. weihenstephanensis* 1, připravený dle postupu uvedeného výše a sterilován membránovým filtrem s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$ .

Pro první experiment byly kultury indikátorového kmene odstředěny při 4 000 ot/min po dobu 5 minut, aby byla zachována životnost buněk a neprodleně byl asepticky odstraněn supernatant. Poté byl do jednotlivých zkumavek k buněčnému peletu aplikován supernatant z *B. weihenstephanensis* 1 o výsledné koncentraci 100, 50 a 25 %. U variant s 50 a 25% koncentrací byl objem doplněn supernatantem z *B. cereus* CCM 2010, kultivovaným za stejných podmínek a stejnou dobu, jako produkční *Bacillus* sp. 1. Důvodem bylo sjednocení koncentrace živin a metabolitů u všech variant. Takto připravené zkumavky byly přemístěny do termostatu a kultivovány při 30 °C. V pravidelných intervalech po dobu 30 hodin byla měřena optická densita ( $\text{OD}_{565\text{nm} \pm 15\text{nm}}$ ) pomocí denzitometru McFarland typ DEN-1B (Biosan) a odebírány vzorky kultury pro mikroskopické (Nikon Instruments Europe B. V. s fázovým kontrastem) sledování integrity buněk. Jako kontrola růstu indikátorového kmene posloužila kultura bez supernatantu z kmene 1. Na závěr byly varianty z experimentu 1 přeočkovány do TSB (Oxoid) a kultivovány za aerobních a anaerobních podmínek ve 30 °C po dobu 1 týdne a na základě přítomnosti / absence zákalu byla určena viabilita indikátorového kmene. Výsledné hodnoty OD jednotlivých koncentrací supernatantu byly vyhodnoceny analýzou rozptylu ANOVA s použitím Scheffého metody v programu Statistica 12 (StatSoft).

Pro druhý experiment byly připraveny zkumavky se supernatantem z *B. weihenstephanensis* 1, opět o výsledné koncentraci 100, 50 a 25 %. Ty byly inokulovány 0,3 ml čerstvě narostlého indikátorového kmene a přemístěny do termostatu ke kultivaci při 30 °C po dobu 30 hodin. V pravidelných intervalech byla měřena OD a sledována schopnost buněk *B. cereus* CCM 2010 pomnožit se v přítomnosti aktivní látky. Na závěr experimentu byl kultivačně stanoven počet životaschopných bakterií pomocí deskové kultivační metody. Jednotlivé varianty byly sériově desítkově naředěny do koncentrace 10<sup>-9</sup>. Jeden ml z každého ředění byl nanesen na Petriho misky s MYP agarem (Mannitol Egg Yolk Polymyxin B), na kterém se kolonie druhu *B. cereus* charakteristicky barví do růžova a projevují lecitinázovou aktivitou. Kultivace probíhala 48 hodin za aerobních podmínek při 30 °C, poté byly spočítány kolonie a určen celkový počet životaschopných bakterií.

#### 4.4.8 Mikrodiluční metoda testování antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita supernatantu kmene 1 byla testována také mikrodiluční metodou v 96-jamkové mikrotitrační destičce vůči *B. cereus* CCM 2010, dvou kmenům *Cl. perfringens* - DSMZ 11778 a N12/3D, a třem kmenům *L. monocytogenes* - ATCC 11778, 7 a 72. Stanovena byla minimální inhibiční koncentrace (MIC = minimum inhibitory concentration) a minimální baktericidní koncentrace (MBC = minimum bactericidal concentration) supernatantu. Čerstvě narostlé kultury indikátorových bakterií, kultivovaných v podmínkách popsanych výše v Tabulce 2, byly standardizovány na hustotu 1 x 10<sup>6</sup> KTJ/ml. Do mikrotitrační destičky byl pipetován supernatant z produkčního kmene a dvojkově sériově naředěn do hodnoty 0,015625 pomocí kultivačního média, vhodného pro daný organismus. Výsledný objem média v každé jamce činil 90 µl. Jamky byly následně inokulovány 10 µl příslušné kultury o definované hustotě. Jako kontroly bylo testováno: médium vhodné pro daný indikátor bez přídavku supernatantu inokulované bakteriální kulturou, médium vhodné pro daný kmen naředěné TSB a inokulované bakteriální kulturou, a médium se supernatantem bez bakteriální kultury. Výsledný objem ve všech jamkách činil vždy 100 µl. Všechny experimenty byly uskutečněny ve 3 opakováních. Takto připravené destičky inokulované kmeny *Cl. perfringens* byly kultivované anaerobně v sáčcích s vyvíječi anaerobní atmosféry (AnaeroGen, Oxoid). Ostatní kmeny byly kultivovány za aerobních podmínek. Pro ověření, zda má přítomnost kyslíku vliv na citlivost vůči antimikrobiální látce, byl *B. cereus* kultivován za aerobních i anaerobních podmínek. Destičky byly inkubovány po dobu 48 hodin při teplotě vhodné pro daný kmen. Nárůst bakterií v médiu byl stanoven spektrofotometricky měřením zákalu v jednotlivých jamkách pomocí spektrometru Infinite 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko) při

vlnové délce 610 nm. Měření bylo provedeno po 24 a 48 hodinách inkubace. MIC byly definovány jako nejnižší koncentrace supernatantu inhibující růst testovaných bakterií o  $\geq 80$  % ve srovnání s kontrolou. MBC byla stanovena subkultivací 10  $\mu$ l vzorku z každé jamky bez viditelného bakteriálního nárůstu do média bez antimikrobiální látky. Za MBC byla považována nejnižší koncentrace, která inhibovala růst 99,9 % bakterií.

## 5 Výsledky

### 5.1 Charakterizace produkčních kmenů

#### 5.1.1 Identifikace kmenů

Výsledky identifikace MALDI-TOF MS a sekvenování 16S rDNA jsou uvedeny v Tabulce 6. Prostřednictvím MALDI-TOF MS byl kmen 2 identifikován s hodnotou skóre  $\geq 2,300$ , tedy na úroveň vysoce pravděpodobné identifikace druhu, kmeny 1 a 3 byly identifikovány s hodnotami skóre 2,000 – 2,299 značící bezpečnou identifikaci rodu a pravděpodobnou identifikaci druhu, a kmen 4 se skóre mezi 1,700 – 1,999, tedy s pravděpodobnou identifikací rodu. Na základě analýzy sekvence genu pro 16S rRNA byla u všech kmenů potvrzena příslušnost k rodu *Bacillus*. Tento výsledek byl shodný s výstupem MALDI-TOF MS. Kmen 1 byl na základě MALDI-TOF MS zařazen do podskupiny druhu *B. mycoides* a shodně byl identifikován i sekvenováním (shoda 100 % s *B. mycoides* i *B. weihenstephanensis*). Kmen 2, „spolehlivě“ identifikovaný jako *B. cereus*, byl na základě komparativní analýzy sekvence 16S rDNA přiřazen do druhu *B. proteolyticus* se shodou 100 %. Pro kmeny 3 a 4 byl analýzou sekvence určen jako neblíže příbuzný druh *B. tequilensis* (shoda 99,9 %). Ačkoliv metoda MALDI-TOF MS neměla dostatečnou diskriminační schopnost určit bacily na úroveň druhu, všechny kmeny byly spolehlivě zařazeny do odpovídající skupiny *B. cereus* či *B. subtilis*.

**Tabulka 6:** Výsledky druhové identifikace kmenů analýzou MALDI-TOF MS a sekvenování genu pro 16S rRNA.

| Kmen | Identifikace na základě 16S rRNA*  | % shody (podobnosti) | Délka analyzovaného fragmentu (bp) | Identifikace na základě MALDI-TOF MS | Hodnota skóre MALDI (spolehlivost) |
|------|------------------------------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| 1    | <i>Bacillus mycoides</i>           | 100 %                | 1335                               | <i>Bacillus mycoides</i>             | 2,284 (++)                         |
|      | <i>Bacillus weihenstephanensis</i> | 100 %                |                                    | <i>Bacillus weihenstephanensis</i>   | 2,148 (++)                         |
| 2    | <i>Bacillus proteolyticus</i>      | 100 %                | 1401                               | <i>Bacillus cereus</i>               | 2,361 (+++)                        |
| 3    | <i>Bacillus tequilensis</i>        | 99,9 %               | 1366                               | <i>Bacillus subtilis</i>             | 2,220 (++)                         |
| 4    | <i>Bacillus tequilensis</i>        | 99,9 %               | 1375                               | <i>Bacillus subtilis</i>             | 1,870 (+)                          |

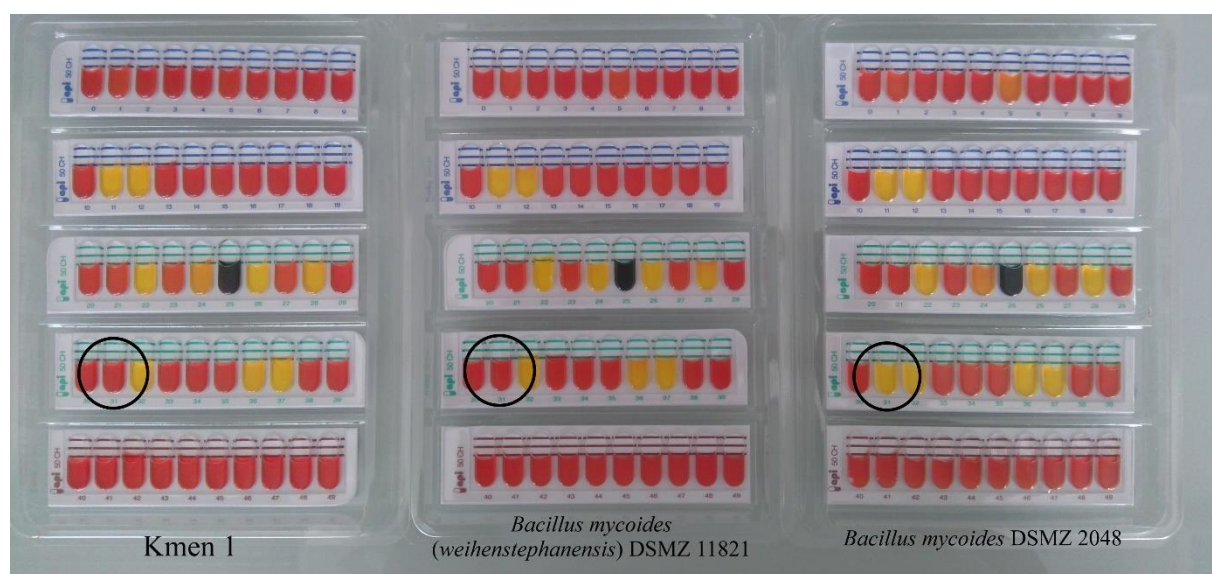
Zkratky: (+++) - vysoce pravděpodobná identifikace druhu; (++) – bezpečná identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu; (+) - pravděpodobná identifikace rodu.

\*Fylogeneticky nejbliže příbuzný stanovený analýzou BLAST; shoda vyšší než 99,9 %.



### 5.1.2 Metabolický profil

Metodou API 50 CHB byl porovnán biochemický profil kmene 1 s kmeny ze sbírkových kultur *B. mycoides* DSMZ 2048 a *B. mycoides (weihenstephanensis)* DSMZ 11821. Z výsledku testu (Obr. 8) je patrné, že kmen 1 odpovídá svým biochemickým profilem kmenu *B. mycoides (weihenstephanensis)* DSMZ 11821. Oba fermentují D-glukózu, D-fruktózu, N-acetylglukosamin, arbutin, eskulin s citrátem železitým, salicin, D-maltózu, D-trehalózu, škrob a glykogen. *B. mycoides* DSMZ 2048 umí navíc využít jako jediný zdroj uhlíku D-sacharózu (mikrozkumavka číslo 31). Rozdíly fermentačního profilu v čase, tedy po 24 a 48 hodinách kultivace, pozorovány nebyly.



**Obrázek 8:** Biochemické profily – kmen 1, *B. mycoides (weihenstephanensis)* DSMZ 11821 a *B. mycoides* DSMZ 2048, který navíc fermentuje D-sacharózu.

### 5.1.3 Patogenní potenciál kmenů skupiny *B. cereus*

Výsledky hemolytické a lecitinázové aktivity, a přítomnost či absence genů kódující faktory virulence *B. weihenstephanensis* 1 a *B. proteolyticus* 2 jsou uvedeny v Tabulce 7. Je zřejmé, že kmen 1 má ve srovnání s kmenem 2 výrazně nižší patogenní potenciál. Projevil se jen slabou lecitinázovou aktivitou a je nehemolytický. S tímto koreluje i skutečnost, že v jeho genomu byly detekovány jen geny pro fosfolipázu c a nehemolytický enterotoxin. *B. proteolyticus* 2 vykazoval jak lecitinázovou, tak i hemolytickou aktivitu. V jeho genomu byly zjištěny geny pro nehemolytický enterotoxin, cytotoxin K, cereolyzin O, hemolyzin III, fosfatidylinositol-specifickou fosfolipázu c a fosfatidylcholin-preferující fosfolipázu.

Také byla detekována přítomnost genu pro acylhomoserin laktonázu, u obou kmenů s pozitivním výsledkem. *Bacillus* sp. 1 a 2 mají tedy pravděpodobně schopnost inhibice quorum sensing (QS), tzv. mezibuněčné komunikace bakterií.

**Tabulka 7:** Hemolytická, lecitinázová aktivita a geny virulence kmenů *B. weihenstephanensis* 1 a *B. proteolyticus* 2.

| Kmen | Hemolytická aktivita | Lecitinázová aktivita | Geny virulence |            |            |             |            |              |               |              |             |             |              |             |
|------|----------------------|-----------------------|----------------|------------|------------|-------------|------------|--------------|---------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
|      |                      |                       | <i>ces</i>     | <i>hbl</i> | <i>nhe</i> | <i>cytK</i> | <i>clo</i> | <i>hlyII</i> | <i>hlyIII</i> | <i>phosC</i> | <i>cerA</i> | <i>cerB</i> | <i>inhA2</i> | <i>aiiA</i> |
| 1    | NH                   | + <sup>a</sup>        | -              | -          | +          | -           | -          | -            | -             | +            | -           | -           | -            | +           |
| 2    | β <sup>b</sup>       | + <sup>b</sup>        | -              | -          | +          | +           | +          | -            | +             | +            | +           | +           | -            | +           |

Zkratky: NH - nehemolytický; (+) - pozitivní; (-) - negativní.

<sup>a</sup>Slabá lecitinázová aktivita.

<sup>b</sup>Střední hemolytická / lecitinázová aktivita.

## 5.2 Antimikrobiální aktivita produkčních kmenů

Výsledky antimikrobiální aktivity jsou uvedeny v Tabulce 8. U všech testovaných kmenů byla zjištěna inhibiční aktivita proti zástupcům skupiny *B. cereus*, také vůči významným patogenním bakteriím *Cl. perfringens* a *L. monocytogenes*. *B. tequilensis* 3 a *B. tequilensis* 4 vykazovaly širší spektrum účinku. Oba navíc inhibovaly růst *B. fusiformis*, *Cl. butyricum* a *Cl. difficile*. Kmen 4 působil také vůči druhu *M. luteus*. Růst žádné z indikátorových probiotických bakterií ani BMK inhibován *B. weihenstephanensis* 1 nebyl, aktivita ostatních produkčních kmenů doposud testována nebyla. Také všechny indikátorové G- bakterie byly k účinkům testovaných supernatantů rezistentní.

Všechny indikátorové kmeny skupiny *B. cereus* byly více citlivé k produkčním kmenům ze stejné skupiny, tedy k *B. weihenstephanensis* 1 a *B. proteolyticus* 2. Oba tyto produkční kmeny se projeví prakticky shodným spektrem inhibičního účinku.

**Tabulka 8:** Inhibiční spektrum produkčních kmenů stanovené agarovou difúzní metodou.

| Indikátorový organismus            | Počet citlivých kmenů*/počet testovaných kmenů |        |        |        |
|------------------------------------|--|--------|--------|--------|
|                                    | Kmen 1   | Kmen 2 | Kmen 3 | Kmen 4 |
| <b>Gram-pozitivní</b>              |  |        |        |        |
| Skupina <i>Bacillus cereus</i>     | 76/76  | 72/72  | 2/2    | 2/2    |
| <i>Bacillus aerophilus</i>         | 0/1  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Bacillus fusiformis</i>         | 0/1  | 0/1    | 1/1    | 1/1    |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | 0/1  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Bifidobacterium</i> spp.        | 0/4  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Clostridium butyricum</i>       | 0/1  | 0/1    | 1/1    | 1/1    |
| <i>Clostridium clostridioforme</i> | 0/1  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Clostridium difficile</i>       | 0/1  | 0/1    | 1/1    | 1/1    |
| <i>Clostridium perfringens</i>     | 9/9  | 6/6    | 6/6    | 6/6    |
| <i>Clostridium tertium</i>         | 0/1  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Enterococcus faecalis</i>       | 0/1  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Lactobacillus</i> spp.          | 0/2  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Lactococcus</i> spp.            | 0/4  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Listeria monocytogenes</i>      | 1/3  | 1/1    | 1/1    | 1/1    |
| <i>Micrococcus luteus</i>          | 0/1  | 0/1    | 0/1    | 1/1    |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i>      | 0/1  | 0/1    | 0/1    | 0/1    |
| <i>Propionibacterium acnes</i>     | 0/1  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | 0/1  | 0/1    | 0/1    | 0/1    |
| <b>Gram-negativní</b>              |  |        |        |        |
| <i>Acinetobacter johnsonii</i>     | NT   | 0/1    | 0/1    | 0/1    |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>        | NT   | 0/1    | 0/1    | 0/1    |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>      | 0/1  | 0/1    | 0/1    | 0/1    |
| <i>Escherichia coli</i>            | 0/2  | 0/2    | 0/2    | 0/2    |
| <i>Chromobacterium</i> sp.         | 0/1  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Moraxella canis</i>             | 0/1  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | 0/1  | 0/1    | 0/1    | 0/1    |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>     | 0/1  | NT     | NT     | NT     |
| <i>Salmonella</i> spp.             | 0/2  | 0/1    | 0/1    | 0/1    |
| <i>Serratia marcescens</i>         | 0/1  | NT     | NT     | NT     |

Zkratky: NT – netestováno.

\*Citlivý kmen se projevil vznikem inhibiční zóny okolo jamky s testovaným supernatantem; stanovení bylo provedeno vždy ve třech opakováních.

### 5.3 Charakterizace antimikrobiálně aktivních látek – vliv enzymů, pH, teplot

Výsledky reziduální antimikrobiální aktivity supernatantů po vystavení enzymům, různým teplotám a pH jsou uvedeny v Tabulce 9.

Aktivita antimikrobiální látky všech kmenů byla prokazatelně narušena působením proteinázy K, což značí proteinovou povahu aktivních látek. Zatímco aktivita supernatantů kmenů 3 a 4 nebyla pozorována již po 1 hodině inkubace, v případě supernatantů z kmenů 1 a 2 došlo k úplné inaktivaci až po 24 hodinách inkubace. Aktivní látky kmenů 3 a 4 byly navíc kompletně degradovány působením pepsinu po 24h inkubaci.

Antimikrobiální aktivita všech produkčních kmenů byla prokázána v širokém spektru hodnot pH od 2 do 9. U kmenů 2, 3 a 4 prakticky nedošlo ke změně aktivity. U supernatantu *B. weihenstephanensis* 1 při hodnotě pH 5 však došlo ke snížení aktivity zhruba o 30 %. Naopak při pH 3 a 2 se aktivita významně zvýšila (o 60 %). Negativní kontrolou bylo prokázáno, že k hodnotě pH 3 je indikátorový kmen rezistentní. Při pH 2 byl ovšem indikátorový kmen inhibován i samotnou hodnotou pH.

Také byla u všech čtyř kmenů zjištěna vysoká termostabilita látek zodpovědných za inhibiční účinky. Mrazničkové teploty (-80 a -18 °C) neměly na antimikrobiální aktivitu žádný vliv. Aktivita byla také zachována nebo jen zanedbatelně snížena (méně než 10 %) při teplotě a době působení 65 °C 30 min, u *B. weihenstephanensis* 1 a *B. tequilensis* 3 až do teploty 85 °C po dobu 10 min. *B. tequilensis* 3 se projevil nejvyšší tepelnou stabilitou, kdy k úplné inaktivaci inhibiční látky došlo až při působení teploty 121 °C po dobu 15 min. Antimikrobiální látka kmene 4 vykazovala jen mírně nižší odolnost. Aktivní látka byla zcela degradována až při teplotě 100 °C po dobu 60 min. Kmeny 1 a 2 se projeví prakticky shodnou termostabilitou inhibiční látky, ačkoliv supernatant z *B. weihenstephanensis* 1 si zachoval vyšší aktivitu v případě dlouhodobého působení pasteračních teplot 65, 72 a 85 °C.

**Tabulka 9:** Reziduální aktivita (%) antimikrobiálně aktivních látek po vystavení supernatantů vlivu enzymů, pH a teplot.

|                     |                        | Reziduální aktivita (%)* |     |     |     |
|---------------------|------------------------|--------------------------|-----|-----|-----|
|                     |                        | 1                        | 2   | 3   | 4   |
| <b>Kmen</b>         |                        |                          |     |     |     |
| <b>Enzymy</b>       |                        |                          |     |     |     |
|                     | Trypsin                | 100                      | 100 | 100 | 100 |
|                     | $\alpha$ -Chymotrypsin | 100                      | 100 | 100 | 100 |
|                     | Proteináza K           | 0                        | 0   | 0   | 0   |
|                     | Pepsin                 | 100                      | 100 | 0   | 0   |
|                     | Lysozym                | 100                      | 100 | 100 | 100 |
| <b>pH</b>           |                        |                          |     |     |     |
|                     | 2                      | >158                     | 98  | 92  | 96  |
|                     | 3                      | 158                      | 100 | 96  | 100 |
|                     | 4                      | 95                       | 100 | 100 | 100 |
|                     | 5                      | 68                       | 100 | 100 | 100 |
|                     | 7                      | 100                      | 100 | 100 | 100 |
|                     | 8                      | 100                      | 94  | 92  | 96  |
|                     | 9                      | 89                       | 92  | 88  | 92  |
| <b>Teplota (°C)</b> | <b>čas (min)</b>       |                          |     |     |     |
| -80                 | 60                     | 100                      | 100 | 100 | 100 |
| -18                 | 60                     | 100                      | 100 | 100 | 100 |
| 65                  | 10                     | 100                      | 100 | 100 | 100 |
|                     | 30                     | 98                       | 94  | 100 | 90  |
| 72                  | 60                     | 96                       | 90  | 98  | 85  |
|                     | 10                     | 100                      | 100 | 98  | 83  |
|                     | 30                     | 96                       | 89  | 94  | 83  |
| 85                  | 60                     | 86                       | 83  | 90  | 83  |
|                     | 10                     | 93                       | 89  | 95  | 83  |
|                     | 30                     | 70                       | 63  | 87  | 82  |
| 100                 | 60                     | 0                        | 0   | 79  | 74  |
|                     | 10                     | 51                       | 63  | 87  | 82  |
|                     | 30                     | 0                        | 0   | 76  | 69  |
| 121                 | 60                     | 0                        | 0   | 71  | 0   |
|                     | 15                     | 0                        | 0   | 0   | 0   |

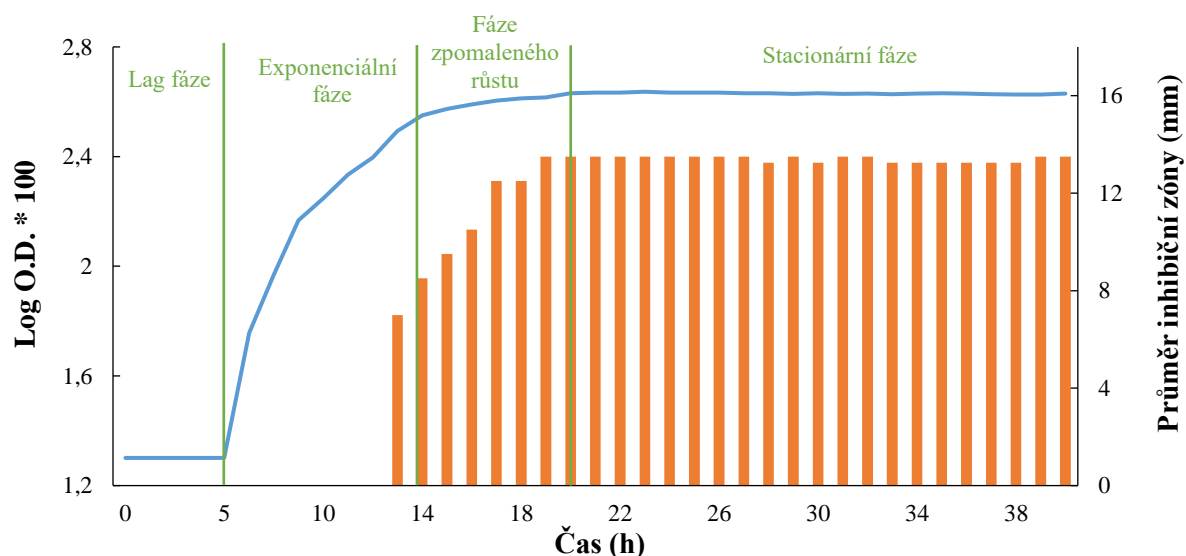
Pozn.: Zelená – rezistentní (reziduální aktivita 100 – 90 %); žlutá – částečná inaktivace; bílá – úplná inaktivace; červená – zvýšení aktivity.

\*Aktivita neošetřeného supernatantu byla definována jako 100 %.

## 5.4 Výsledky detailní charakterizace antimikrobiální aktivity kmene 1

### 5.4.1 Růstová křivka ve vztahu k produkci antimikrobiální látky

Růstová křivka *B. weihenstephanensis* 1 znázorňuje, že kultura se dostala do časně exponenciální fáze 6 hodin po inokulaci, do stacionární fáze po 20 hodinách kultivace a setrvala v ní až do konce experimentu. Expres antimikrobiální látky byla zahájena již na konci exponenciální fáze, tedy po 13 hodinách kultivace. Maximální úroveň produkce pak bylo dosaženo po 19 hodinách, kdy kultura přecházela do rané stacionární fáze. Od tohoto okamžiku se rozsah inhibiční aktivity prakticky neměnil.



**Obrázek 9:** Růst a dynamika produkce antimikrobiální látky kmene 1. „—“ představuje růstovou křivku; „■“ představuje inhibiční aktivitu vůči *B. cereus* CCM 2010.

### 5.4.2 Vliv kultivační teploty na expresi antimikrobiální látky

Výsledky testování vlivu teploty kultivace *B. weihenstephanensis* 1 na míru produkce antimikrobiální látky jsou uvedeny v Tabulce 10. Za anaerobních podmínek byl kmen 1 schopný růstu v rozmezí teplot od 4 do 37 °C, při kultivaci ve 42 °C byl růst potlačen, a to i pokud byl kmen kultivován v aerobních podmínkách. Ovšem po přemístění kultur ze 42 °C do pokojové teploty, byla varianta kultivovaná za přítomnosti kyslíku schopná růstu.

K expresi inhibiční látky došlo při teplotách 20, 30 a 37 °C. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u kultury inkubované při 30 °C. Tato teplota se tedy jeví jako optimální z hlediska maximální produkce antimikrobiální látky. U kultur kultivovaných při 20 a 37 °C, nebyl téměř žádný rozdíl ve velikosti inhibičních zón. Při snížení koncentrace supernatantu však byla

aktivita pozorována pouze u varianty kultivované při 20 °C. Při této teplotě tedy zřejmě dochází k vyšší expresi antimikrobiální látky.

**Tabulka 10:** Míra exprese antimikrobiální látky v závislosti na teplotě kultivace *B. weihenstephanensis* 1 (vyjádřeno jako aritmetický průměr inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka dané koncentrace supernatantu).

| Koncentrace supernatantu (v/v) | Průměr ± SD inhibiční zóny (mm) při různých teplotách kultivace |              |              |              |       |
|--------------------------------|---|--------------|--------------|--------------|-------|
|                                | 4 °C  | 20 °C        | 30 °C        | 37 °C        | 42 °C |
| <b>1:1</b>                     | R   | 13,00 ± 0,00 | 18,33 ± 0,58 | 12,67 ± 0,58 | N     |
| <b>1:2</b>                     | R   | 11,00 ± 0,00 | 14,83 ± 0,29 | R            | N     |
| <b>1:4</b>                     | R   | 10,00 ± 0,00 | 11,00 ± 0,00 | R            | N     |

Zkratky: R – rezistentní; N – kultura při dané teplotě nenarostla.

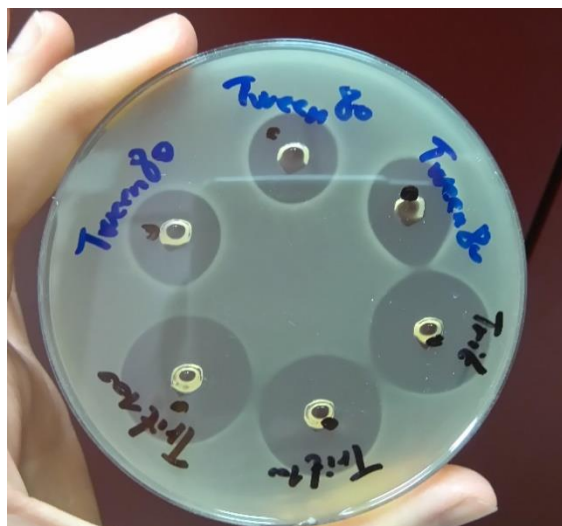
#### 5.4.3 Stimulace exprese antimikrobiální látky a synergický efekt s laktoferinem

Na základě výsledků testování navýšení exprese antimikrobiální látky nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi kontrolním kmenem *B. weihenstephanensis* 1 kultivovaným bez přídavku antimikrobiální látky a variantami s nisinem a mitomycinem C o daných koncentracích. Průměrné velikosti inhibičních zón se prakticky nelišily. Stejně tak nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) v antimikrobiální aktivitě mezi kmenem 1 kultivovaným za přídavku 1 a 10% koncentrace supernatantu z bakterií produkujících extracelulární lecitinázu a aktivitě samotného *Bacillus* sp. 1.

Také bylo zjištěno, že přídavek laktoferinu v koncentraci 1 mg/ml nepodpořil antimikrobiální účinek supernatantu vůči testovaným G- bakteriím, růst žádného z testovaných kmenů inhibován nebyl. Bakterie byly též rezistentní k účinkům samotného laktoferinu (1mg/ml v dH<sub>2</sub>O).

#### 5.4.4 Vliv surfaktantů

Surfaktant Triton™ X-100 zvýšil aktivitu supernatantu o 15 % oproti kontrole. Přičemž negativní kontrolou byla prokázána citlivost indikátorového kmene k samotnému působení surfaktantu. Naproti tomu při použití Tweenu 80 se inhibiční aktivita ve srovnání s kontrolou o 15 % snížila.



**Obrázek 10:** Antimikrobiální aktivita supernatantu vystaveného působení surfaktantů Triton™ X-100 a Tweenu 80 o 1% koncentraci.

#### 5.4.5 Vliv podmínek skladování na aktivitu antimikrobiální látky

Výsledky vlivu délky skladování při různých teplotách na antimikrobiální aktivitu jsou uvedeny v Tabulce 11. Je patrné, že uchování supernatantu v mrazničkových teplotách (-80 a -18 °C) nemá na aktivitu absolutně žádný vliv. Také chladničková teplota 4 °C zajišťuje vysokou stabilitu antimikrobiální látky, a to po dobu 0,5 roku, ovšem po roce skladování došlo k inaktivaci. Významná je také schopnost inhibiční látky *B. weihenstephanensis* zachovat si aktivitu až do teploty 37 °C po dobu minimálně 4 týdnů. Naproti tomu skladování při teplotě 42 °C působí úplnou ztrátu aktivity již po 1 týdnu.

**Tabulka 11:** Reziduální aktivita (%) supernatantu v závislosti na teplotě a délce skladování.

| Teplota skladování (°C) | Reziduální aktivita (%)* |         |         |          |       |          |
|-------------------------|--------------------------|---------|---------|----------|-------|----------|
|                         | 1 týden                  | 2 týdny | 4 týdny | 0,5 roku | 1 rok | 1,5 roku |
| -80                     | 100                      | 100     | 100     | 100      | 100   | 100      |
| -18                     | 100                      | 100     | 100     | 100      | 100   | 100      |
| 4                       | 100                      | 100     | 85      | 75       | 0     | 0        |
| Pokožová teplota        | 100                      | 100     | 75      | 0        | 0     | 0        |
| 30                      | 100                      | 100     | 60      | 0        | 0     | 0        |
| 37                      | 85                       | 60      | 45      | 0        | 0     | 0        |
| 42                      | 0                        | 0       | 0       | 0        | 0     | 0        |

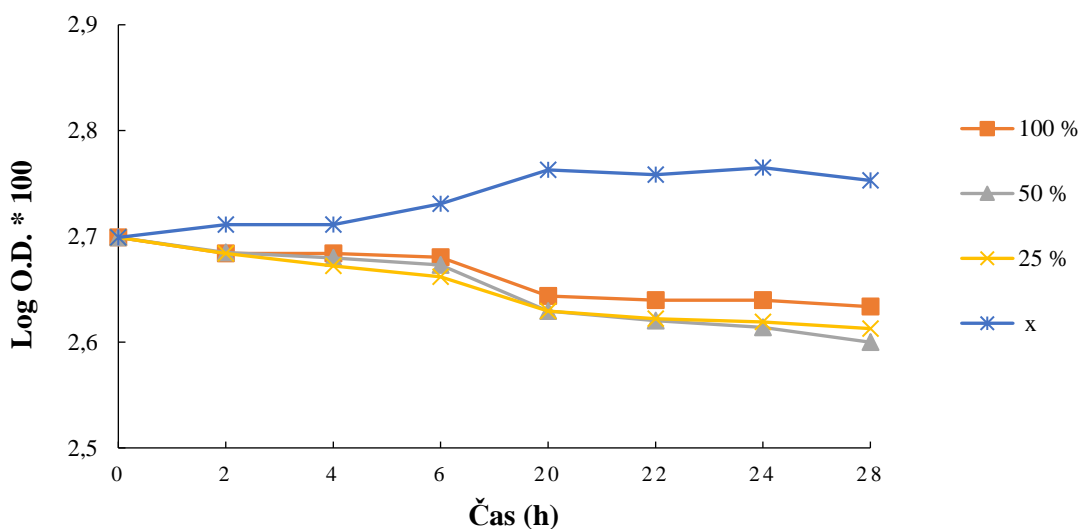
Pozn.: Zelená – rezistentní (reziduální aktivita 100 – 90 %); žlutá – částečná inaktivace; bílá – úplná inaktivace.

\*Aktivita čerstvého supernatantu byla definována jako 100 %.



#### 5.4.6 Vliv antimikrobiální látky na buňku

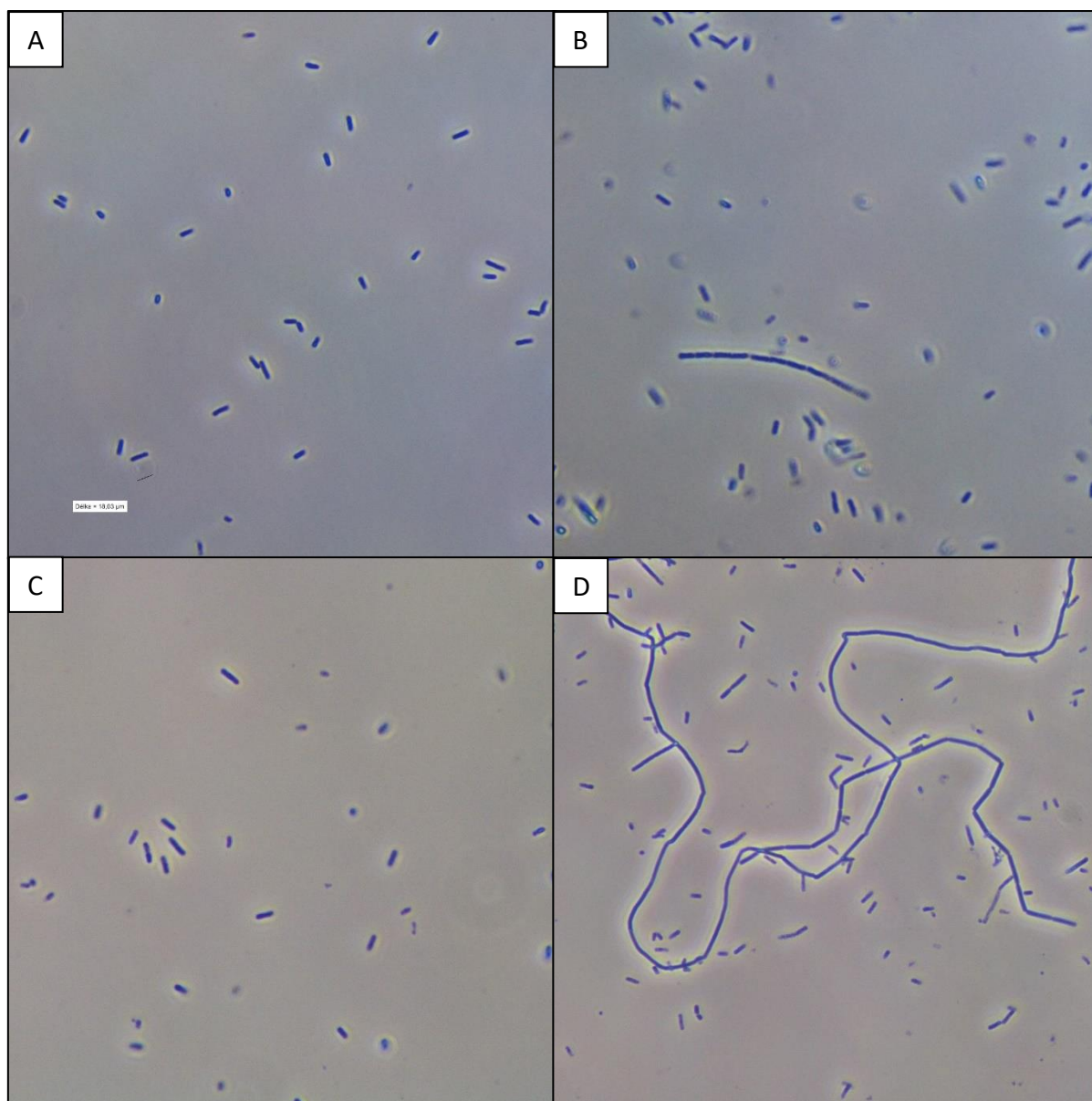
Účinek inhibiční látky produkované kmenem 1 na buněčný růst indikátorového kmene *B. cereus* CCM 2010 byl sledován po 30 hodin a je znázorněn na Obrázku 11. Je zřejmé, že přidání supernatantu o koncentraci 100, 50 i 25 % z kmene 1 k buněčnému peletu kmene *B. cereus* ve fázi exponenciálního růstu vedlo k mírnému snížení optické denzity (O.D.). Došlo tedy ke snížení počtu životaschopných buněk ve srovnání s kontrolou, kdy naopak O.D. vzrostla a byl prokázán nárůst bakteriální kultury. Mezi jednotlivými koncentracemi supernatantu nebyl z hlediska poklesu O.D. zaznamenán statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ). Na základě subkultivace v TSB (Oxoid) byl zjištěn baktericidní účinek 100 a 50% koncentrace supernatantu. Ani po týdnu subkultivace v aerobních i anaerobních podmínkách, nebyl u žádné z variant pozorován nárůst indikátoru. V případě 25% koncentrace supernatantu došlo po subkultivaci k nárůstu kultury v aerobních i anaerobních podmínkách, daná koncentrace tedy působila bakteriostaticky.



**Obrázek 11:** Účinek antimikrobiální látky na růst indikátorového kmene *B. cereus* CCM 2010. Kultura se 100, 50, 25 % a bez (x) supernatantu z kmene 1; supernatant byl aplikován po 16 hodinách růstu indikátorového kmene.

Integrita buněk indikátorové kultury byla zjišťována mikroskopicky po 2, 20 a 30 hodinách kultivace (Obr. 12). Ačkoliv došlo v čase k mírnému poklesu O.D. vlivem odumírání buněk, mikroskopicky se buňky jevíly nepoškozené s hladkým povrchem, buněčná membrána se zdála být neporušena a taktéž nebyly pozorovány fragmenty buněk. Lze tedy předpokládat, že došlo k inhibici schopnosti buněčného dělení.

V experimentu 2 byla zjišťována schopnost buněk indikátorového kmene pomnožit se. U variant se 100 a 50 % supernatantu nedošlo na MPY agaru k žádnému nárůstu kolonií již od nultého ředění, v těchto koncentracích účinkovala antimikrobiální látka baktericidně a zcela zabránila schopnosti množení *B. cereus* CCM 2010. U varianty s 25 % supernatantu došlo k mírnému zvýšení optické density, přičemž celkový počet životaschopných bakterií v této variantě byl  $2 \cdot 10^5$  KTJ/ml.



**Obrázek 12:** Mikroskopie buněk *B. cereus* CCM 2010 po působení supernatantu *B. weihenstephanensis* 1 po dobu 2 h (A), 20 h (B) a 30 hodin (C); buňky *B. cereus* CCM 2010 z kontrolní varianty bez supernatantu (D); zvětšení 400x.

#### 5.4.7 Mikrodiluční metoda testování antimikrobiální aktivity

Výsledky minimálních inhibičních a baktericidních koncentrací supernatantu jsou uvedeny v Tabulce 12. Citlivé byly všechny indikátorové bakterie, a to včetně dvou izolátů *L. monocytogenes* 7 a 72, které se za použití agarové difúzní metody jeví jako rezistentní. Také je zřejmé, že MIC po 48 hodinách inkubace s výjimkou kmene *L. monocytogenes* 7, odpovídají MBC. Nejcitlivějším kmenem byl *B. cereus* CCM 2010. V anaerobních podmínkách byl inhibován 4x nižší koncentrací supernatantu (1:32), než při aerobní kultivaci (1:8). Přítomnost či absence kyslíku tedy hraje významnou roli ve schopnosti *B. cereus* CCM 2010 odolávat antimikrobiální látce. Velmi dobré výsledky byly také dosaženy při působení supernatantu na vysoce patogenním izolátu *Cl. perfringens* N12/3D (MIC a MBC 1:4), kdežto sbírkový kmen téhož druhu byl citlivý jen k neředěnému supernatantu.

**Tabulka 12:** Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) supernatantu *B. weihenstephanensis* 1 vyjádřeny jako titr.

| Bakteriální kmen                                | MIC  |      | MBC  |
|---|------|------|------|
|   | 24 h | 48 h | 48 h |
| <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010 <sup>AE</sup>   | 8    | 8    | 8    |
| <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010 <sup>ANAE</sup> | 32   | 32   | 32   |
| <i>Clostridium perfringens</i> DSMZ 11778       | 1    | 1    | 1    |
| <i>Clostridium perfringens</i> N12/3D           | 4    | 4    | 4    |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644         | 2    | 1    | 1    |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 7                 | 2    | 2    | 1    |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 72                | 2    | 1    | 1    |

<sup>AE</sup>*B. cereus* CCM 2010 kultivovaný za aerobních podmínek.

<sup>ANAE</sup>*B. cereus* CCM 2010 kultivovaný za anaerobních podmínek.

## 6 Diskuze

*Bacillus* spp. představují velmi heterogenní skupinu aerobních nebo fakultativně anaerobních grampozitivních sporotvorných bakterií. Nacházejí se prakticky ve všech prostředích a obecně jsou považováni za významné producenty strukturně rozmanitých bioaktivních látek, zejména s antimikrobiálními účinky. Tyto látky mají velký potenciál pro využití k lékařským, potravinářským a zemědělským účelům. V současné době se poptávka po inhibičně působících látkách přírodního charakteru v těchto odvětvích stále zvyšuje a hledání nových produkčních kmenů není jen předmětem výzkumu vědeckých pracovišť, ale i komerčního sektoru (Sumi et al., 2015). Také narůstá zájem o využití produkčních kmenů jako probiotických bakterií se schopností potlačení nežádoucích patogenů v trávicím traktu lidí i zvířat nebo jako startovacích kultur pro výrobu fermentovaných potravin. Ovšem, jak bylo uvedeno v literární rešerši, některé druhy nebo kmeny bacilů se podílejí na alimentárních otravách a kažení potravin, jedná se zejména o zástupce skupiny *B. cereus* (Abriouel et al., 2011). Z tohoto důvodu je pro výběr a vývoj vhodných kandidátů vyžadován přísný proces selekce s ohledem na odlišné mezidruhové vlastnosti virulence (EFSA, 2014).

Prvním cílem praktické části diplomové práce byla bližší charakterizace čtyř kmenů izolovaných z různých prostředí. U izolátů náležících do skupiny *B. cereus* byl vzhledem k možnému praktickému využití určen také patogenní potenciál. U všech kmenů byla předběžným testováním zjištěna antimikrobiální aktivita a také schopnost si tuto vlastnost zachovat i v laboratorních podmínkách. Prvotní identifikace byla provedena analýzou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Byla zjištěna příslušnost kmenů 1 a 2 ke skupině *B. cereus*, kmenů 3 a 4 ke skupině *B. subtilis*, ale na úroveň druhu byl spolehlivě identifikován pouze kmen 1. Vzhledem k tomu, že metoda identifikace pomocí MALDI-TOF MS je založena na komparativní analýze naměřených spekter s referenčními spektry, může být jedním z důvodů nespolehlivé identifikace právě kvalita získaných hmotnostních spekter. V případě sporulujících bakterií hraje při identifikaci pomocí MALDI-TOF důležitou roli růstová fáze. Proces sporulace ovlivňuje profily hmotnostních spekter, a to zapříčiňuje méně spolehlivou identifikaci. Hlavním důvodem neúspěšné identifikace je pravděpodobně úzký příbuzenský vztah mezi jednotlivými druhy v rámci skupiny. Obecně panuje shoda, že sekvence genu pro 16S rRNA nemá dostatečnou diferenciací schopnost odlišit bakterie této skupiny pro její vysokou konzervovanost (Y. Liu et al., 2015). Stejný fenomén je patrný i v případě MALDI-TOF MS.

V případě kmene 1, izolovaného z vody rybníku Kanclíř (jižní Čechy), vyšly výsledky obou těchto metod shodně. V obou případech byl identifikován s obdobnou shodou jako *B. mycoides* nebo *B. weihenstephanensis*. Jak bylo zmíněno v literární rešerši, *B. weihenstephanensis* je na rozdíl od *B. mycoides* schopen růstu již při chladničkových teplotách a netvoří rhizoidní kolonie, to je ve shodě s námi testovaným *Bacillus* sp. 1. Přes mírné fenotypové rozdíly, byly na základě analýzy celých genomů tyto druhy sloučeny do jednoho druhu, *B. mycoides* (Y. Liu et al., 2018; Logan et Vos, 2015). To je opět v souladu s výsledky identifikace obou metod, které nebyly schopny tyto dva druhy od sebe odlišit. Dále byl zjišťován biochemický potenciál *Bacillus* sp. 1 pomocí soupravy API 50 CHB. Výsledný biochemický profil ukázal, že kmen 1 je schopen fermentovat široké spektrum substrátů za produkce organických kyselin. Shodně s *B. weihenstephanensis* však neumí fermentovat D-sacharózu. Dané skutečnosti může být využito při hledání vhodné aplikace tohoto kmene, pomineme-li použití čisté antimikrobiální látky. Uplatněn by mohl být jako inokulant při konzervaci krmiv, například siláží. Obecně se uvádí, že druhy *B. mycoides* i *B. weihenstephanensis* nevykazují žádnou nebo jen mírnou cytotoxickou či enterotoxickou aktivitu. Dle pokynů EFSA (2014) by ovšem u kmenů ze skupiny *B. cereus* s potenciálem pro využití v praxi měla být potvrzena absence toxinových genů, případně jejich nefunkčnost. V genomu *B. weihenstephanensis* 1 byla detekována přítomnost genu pro lecitinázu C (*piplc*) a nehemolytický enterotoxin (*Nhe*). Funkčnost genu pro *piplc* byla ověřena i zkouškou lecitinázové aktivity za vzniku zóny precipitace v okolí kolonií vlivem hydrolýzy fosfatidylinositolu obsaženého ve žloutkové emulzi. Jak uvádějí Visiello et al. (2016), z hlediska cytotoxicity je problematická zejména přítomnost sfingomyelinázy v kombinaci s fosfatidylcholin preferující fosfolipázou působících hemolyticky, které u kmene 1 detekovány nebyly. Rovněž nevykazoval hemolytickou aktivitu na krevním agaru. *Nhe* je tříložkový enterotoxin a geny kódující jeho syntézu se nalézají prakticky u všech kmenů *B. cereus*, ale byly zjištěny i u dalších zástupců *B. cereus* s.l., včetně *B. mycoides* a *B. weihenstephanensis*. Pro aktivitu *Nhe* je zásadní přítomnost všech tří složek (*NheA*, *B*, *C*) a to v optimálním poměru (Lindbäck et al., 2004). Navíc, jak ve své studii upozorňují Cai et al. (2017), ani přítomnost *Nhe* v genomu bakterie neznamena, že je toxin exprimován a účastní se na rozvoji průjmového onemocnění. Cytotoxickou aktivitu kmene 1 bude tedy potřeba laboratorně ověřit na epiteliálních buněčných liniích. Pokud bude tato aktivita potvrzena, využití kmene bude umožněno jen za předpokladu vyjmutí genů kódujících dané virulentní faktory.

Patogenní potenciál byl také zjišťován u kmene 2, izolátu z pasterovaného medu. Analýzou MALDI-TOF byl spolehlivě identifikován jako druh *B. cereus*, ale sekvenováním

byl se 100% shodou přiřazen do druhu *B. proteolyticus*. *B. proteolyticus* byl jako druh ustanoven teprve v nedávné době (Y. Liu et al., 2017) a na základě dostupné literatury se jeví jako běžný environmentální druh (Kamaruzzaman et al., 2020). Detekcí genů kódujících faktory virulence jsme u tohoto kmene zjistili přítomnost několika toxinových genů zodpovědných za rozvoj průjmového typu onemocnění a další toxiny přispívající k enterotoxické aktivitě. Vysoký patogenní potenciál byl také potvrzen zkouškou hemolytické a lecitinázové aktivity. Jakákoliv aplikace *B. proteolyticus* 2, ať už v podobě probiotika, startovací kultury v potravinářství, či krmného aditiva není vhodná, v úvahu tedy přichází využití izolované čisté antimikrobiální látky.

U některých bakterií skupiny *B. cereus* byla zjištěna produkce AHL-laktonázy, enzymu, který má schopnost degradovat N-Acyl-homoserinové laktony (AHL) a tím inhibovat quorum sensing (QS), tzv. mezibuněčnou komunikaci bakterií (Dong et al., 2001; Huma et al., 2011). Metodou PCR jsme tuto vlastnost prokázali u obou testovaných kmenů. Vzhledem k tomu, že QS zprostředkované AHL se zapojuje do tvorby biofilmu a exprese faktorů virulence některých G- bakterií, a to i medicínsky významných druhů *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia* sp. (Park et al., 2006), uvažuje se do budoucna o využití této vlastnosti.

Za nadějně kandidáty z hlediska získávání nových antimikrobiálních látek jsou všeobecně považovány kmeny skupiny *B. subtilis*. Již více než 50 let jsou známy produkcí široké škály inhibičních látek zejména peptidové povahy (Stein, 2005). V rámci této práce se podařilo identifikovat dva kmeny náležící do této skupiny, izolované z těla sladkovodního mlže škeble asijské. U obou kmenů byly potvrzeny antimikrobiální účinky a také jim byl shodně analýzou sekvence genu 16S rDNA přiřazen jako nejbližší druh *B. tequilensis*, úzce příbuzný druhu *B. subtilis*.

Dalším cílem diplomové práce bylo testování antimikrobiální aktivity produkčních kmenů, vůči potenciálně patogenním bakteriím, bakteriím způsobujícím kažení potravin a probiotickým bakteriím. Také byla provedena charakterizace antimikrobiálně aktivních látek. Antagonistická aktivita všech kmenů byla prokázána proti patogenním bakteriím skupiny *B. cereus*, *L. monocytogenes* a *Cl. perfringens*. Ačkoliv byly již dříve v genomech několika kmenů *B. mycoides* detekovány genové klastry kódující antimikrobiální proteiny (Zhao et Kuipers, 2016), doposud byla popsána antibakteriální aktivita pouze jediného kmene *B. mycoides*, izolovaného ze syrovátky. Sharma et Gautam (2008) zjistili inhibiční aktivitu tohoto kmene vůči *L. monocytogenes* a *Leuconostoc mesenteroides*. Antagonisticky působící látku autoři identifikovali jako bakteriocin, na základě kompletní ztráty aktivity po 1 h inkubace s trypsinem při 37 °C. Antimikrobiální protein, produkovaný *B. weihenstephanensis* 1, byl po 1 h inkubace

rezistentní proti všem testovaným proteolytickým enzymům. Degradován byl až po 24 hodinách působení proteinázy K, čímž byla odhalena jeho proteinová povaha. Autoři dále uvádějí, že bakteriocin působí v širokém rozmezí pH (4 až 11) a odolává teplotám do 100 °C. To je ve shodě s našimi výsledky, kdy úplná ztráta aktivity byla pozorována až při teplotě 85 °C a době působení 60 minut, a při 100 °C po 30 minutách. Též byla prokázána aktivita v širokém spektru pH (2 až 9), nicméně byly pozorovány výkyvy. Při hodnotě pH 5 došlo ke snížení aktivity o 30 %, to mohlo být způsobeno dosažením hodnoty izoelektrického bodu (pI) bakteriocinu, test je ale třeba zopakovat s čistou či částečně purifikovanou látkou a se zcela přesnými hodnotami pH. Zatímco při pH 2 a 3 byla aktivita navýšena o cca 60 %, to bylo pravděpodobně dáno synergickým účinkem nízkého pH a antimikrobiální látky vůči indikátorovému kmeni. Této skutečnosti by mohlo být využito například při aplikaci látky jako léčiva pro potlačení patogenních bakterií již v žaludku, kde je právě takto nízké pH. V návaznosti na uvedené vlastnosti autoři navrhli uplatnění dané látky v oblasti biologické konzervace potravin. Jako výhodu autoři také uvádějí, že díky proteinové povaze, je bakteriocin degradován proteolytickými enzymy v gastrointestinálním traktu a neovlivňuje tak složení přirozené střevní mikrobioty. Na straně druhé, právě odolnost vůči proteolytickým enzymům a vysokým teplotám jsou v současnosti technologicky vysoce ceněné vlastnosti (Gabrielsen et al., 2014). Supernatant kmene 1 vykazoval vysoký stupeň inhibiční aktivity, shodně s výše zmíněným bakteriocinem, vůči grampozitivní bakterii *L. monocytogenes*. Velikost námi naměřených inhibičních zón ovšem činila v průměru  $21,0 \pm 0,0$  mm, zatímco v práci Sharma et Gautam (2008) byly naměřeny inhibiční zóny u *L. monocytogenes* pouze 3 mm při testování supernatantu a 10 mm při testování částečně purifikovaného bakteriocinu. Navíc mikrodiluční metodou jsme prokázali mikrobicidní účinek neředěného supernatantu vůči divokým kmenům *L. monocytogenes* izolovaným z mletého masa a feferonek se sýrem naložených v oleji, ačkoliv za použití agarové difúzní metody se kmeny jevíly rezistentní. To mohlo být způsobeno vysokou odolností daných kmenů, případně nízkou koncentrací inhibiční látky v médiu. Ross et al. (2000) uvádějí, že *L. monocytogenes* je organismus s krátkou generační dobou, je tedy možné, že rezistence souvisí právě s koncentrací antimikrobiální látky v médiu. Čím rychleji se bakteriální buňky množí, tím rychleji je bakteriocin vyčerpáván. Po delší době kultivace se tedy může výsledek jevit jako rezistentní. Problematický je zejména výskyt *L. monocytogenes* v tzv. potravinách určených k přímé spotřebě (v angl. ready to eat, RTE), a to i v RTE potravinách s kyselým pH (<4,6), které vůči běžným kontaminujícím mikroorganismům působí inhibičně (Paudyal et Karatzas, 2016). V roce 2018 bylo potvrzeno 2,5 tisíc případů listeriózy u lidí v zemích Evropské unie, které byly příčinou zdaleka nejvyššího počtu úmrtí spojených s

alimentárním onemocněním (EFSA, 2018). Antagonistická aktivita vůči *L. monocytogenes* je tedy významnou vlastností testovaného kmene. Čisté antimikrobiální látky, s ohledem na odolnost k nízkému pH a minimální půl roční stabilitě v chladničkových teplotách, by mohlo být využito právě ke konzervaci RTE potravin, a tedy ochraně konzumentů. Nisin A je širokospektrální lantibiotikum třídy I produkovaný druhem *Lactococcus lactis*, vyznačuje se vysokou termostabilitou a odolností vůči proteázám. Jedná se o nejvíce studovaný bakteriocin a doposud jediný komerčně vyráběný bakteriocin schválený regulačními agenturami, včetně Světové zdravotnické organizace (WHO), Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA). Jeho aplikace jsou kvůli velmi nízké aktivitě v neutrálním nebo alkalickém pH značně omezeny (O'Connor et al., 2020). Hledání nových alternativ je proto v popředí zájmu.

*B. weihenstephanensis* 1 působil inhibičně také proti patogenní bakterii *Cl. perfringens*. Citlivý byl jak sbírkový kmen, tak všechny divoké kmeny, přičemž divoké kmeny vykazaly vyšší citlivost. To bylo potvrzeno také mikrodiluční metodou, kdy MIC i MBC supernatantu vůči patogenním izolátu *Cl. perfringens* N12/3D činila titr 4, kdežto sbírkový kmen téhož druhu byl citlivý jen k neředěnému supernatantu. Žádný z dalších testovaných druhů rodu *Clostridium* ovlivněn nebyl. Rea et al. (2010) se zabývali inhibiční aktivitou bakteriocinu thuricinu CD, který byl rovněž izolován z druhu náležícího do skupiny *B. cereus*, z *B. thuringiensis* DPC 6431. Tento bakteriocin také působí proti *Cl. perfringens*, navíc ale také proti několika dalším druhům klostridií včetně *Cl. difficile*. Vysoká účinnost thuricinu CD je zde pravděpodobně zapříčiněna jeho strukturou, kdy sestává ze dvou synergicky působících odlišných peptidů. *Cl. perfringens* způsobuje různé formy střevních onemocnění lidí (Labbe et Juneja, 2017). Také se jedná o významného původce akutně nebo perakutně probíhajících enterotoxemií telat, jehňat a kůzlat na mléčné výživě a v období odstavu, projevující se vysokou mortalitou. To má za důsledek značné ekonomické ztráty v chovech (Lebrun et al., 2010). Léčba je vzhledem k rychlému průběhu onemocnění zpravidla neúčinná, navíc je snaha o omezení používání antibiotik, a to jak k léčebným, tak zejména preventivním účelům (Fischer et al., 2019). Řešením se nabízí využití přírodních alternativ, jako například bakteriocinů. Bakteriocin produkovaný *B. weihenstephanensis* 1 má díky odolnosti k trávicím enzymům a nízkému pH schopnost průchodu trávicím traktem, inhibuje jen úzkým spektrum patogenních bakterií, přičemž běžné komenzální, probiotické bakterie a BMK neovlivňuje. Jeho využití v tomto směru bude proto dále studováno.

V rámci této práce se prokázaly vysokou citlivostí k *B. weihenstephanensis* 1 všechny sbírkové i divoké kmeny druhu *B. cereus*. Jak je uvedeno v literární rešerši, tento druh



produkuje řadu toxinů, díky nimž způsobuje dva různé typy alimentárních otrav, emetický a průjemový syndrom. Kromě toho, je také považován za významného původce kažení potravin, v první řadě mléčných výrobků (Kumari et Sarkar, 2016). Citlivé byly i další druhy skupiny *B. cereus* (*B. cereus*, *B. mycoides* a *B. thuringiensis*), sbírkové i divoké kmeny, u kterých dosahovaly průměry inhibičních zón až 19 mm.

Žádná z testovaných G- bakterií nebyla k produkované antimikrobiální látce kmene 1 citlivá. To je typické pro bakteriociny G+ bakterií. Ty obecně působí výhradně proti jiným G+ bakteriím, protože vnější membrána G- bakterií je pro ně neprostupná (van Belkum et al., 2011). Vzhledem k tomu, že byla prokázána schopnost přírodního glykoproteinu laktoferinu permeabilizovat membránu *E. coli* a dalších bakterií (Chapple et al., 2004), předpokládali jsme zesílení inhibičního účinku supernatantu kmene 1 při kombinaci s bovinním laktoferinem vůči vybraným G- bakteriím, to se ale nepotvrdilo. Murdock et al. (2007) ve své studii prokázali synergický účinek nisinu, který též inhibuje jen G+ bakterie, a laktoferinu vůči *E. coli* a *L. monocytogenes*. Autoři však poukázali na to, že běžně používaná média, jako TSB nebo Wilkins-Chalgren médium, která byla použita při našem testování, obsahují vysoké hladiny divalentních kationtů ( $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  a  $Cu^{2+}$ ). Ty se mohou vázat na oblast molekuly laktoferinu související s antimikrobiální aktivitou, a tím snižovat jeho účinnost. Branen et Davidson (2004) upozorňují na to, že vyšší saturace bovinního laktoferinu železem (20-30 %) ve srovnání s humánním laktoferinem (6-8%), snižuje jeho aktivitu, což mohlo také přispět k neúspěšnému průkazu synergického účinku v našem experimentu.

Doposud byl nalezen jediný bakteriocin druhu *B. tequilensis*. Parveen Rani et al. (2016) izolovali a identifikovali kmen *B. tequilensis* FR9 z trávicího traktu kuřat z volného chovu a prokázali jeho širokospektrální antimikrobiální aktivitu vůči *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, ale také některým G- bakteriím a kvasinkám. Inhibiční látku purifikovali a na základě sekvenování stanovili jako cyklický bakteriocin subtilosin A, náležící do skupiny saktibiotik s výraznou antilisteriální aktivitou. Nami izolované kmeny, *B. tequilensis* 3 a 4, taktéž inhibovaly široké spektrum bakterií, shodně s *Bacillus* sp. FR9 vykazovali výraznou antimikrobiální aktivitu vůči *B. cereus* a *L. monocytogenes*. Oba navíc inhibovaly růst *Bacillus fusiformis*, *Clostridium perfringens*, *Cl. butyricum* a *Cl. difficile*, ve studii však autoři neuvádí, zda jsou tyto druhy vůči subtilosinu A rezistentní nebo zda nebyly testovány. Kmen 4 účinkoval také proti druhu *Micrococcus luteus*, to bylo prokázáno i v případě subtilosinu A kmene *B. subtilis* K KU213, úzce příbuznému *B. tequilensis* (Khochamit et al., 2015). Ve shodě s našimi výsledky kmen K KU213 neinhiboval růst žádné z G- bakterií. Také neúčinkoval proti kvasinkám. Zajímavé je, že v této studii prokázali rezistenci druhu *B.*

*subtilis* k účinku subtilosinu A, ačkoliv pro bakteriociny je typická právě antimikrobiální aktivita vůči blízkým druhům. Tuto skutečnost budeme v budoucnu také ověřovat. V obou studiích, včetně této práce, byla stanovována antimikrobiální aktivita supernatantů, které však mohou obsahovat kromě bakteriocinu i další antimikrobiální látky například surfaktiny, jak poukázali Khochamit et al. (2015). To je pravděpodobně důvodem rozdílných inhibičních spekter jednotlivých kmenů. Obecně se uvádí, že subtilin A je vysoce stabilní i při extrémních teplotách (1 h při 100 °C) a pH v rozmezí 2 až 10 (Abriouel et al., 2011), to je ve shodě s našimi výsledky. Bakteriocin *B. tequilensis* 3 si zachoval vysokou aktivitu při působení teploty 100 °C po dobu 1 hodiny, inhibiční látka kmene 4 byla aktivní po 30 minutách působení této teploty. Též si zachovali prakticky nezměněnou antagonistickou aktivitu v širokém rozmezí pH (2 až 9). Autoři Khochamit et al. (2015) zjistili pokles aktivity subtilosinu A po 2 hodinách inkubace s proteinázou K, v případě námi testovaných supernatantů došlo k úplné ztrátě aktivity již po 1 hodině inkubace. Navíc byly aktivní látky degradovány působením pepsinu po 24 hodinách inkubace, to ovšem v této studii nezjišťovali. Ve studiích Khochamit et al. (2015) i Parveen Rani et al. (2016) určovali probiotický potenciál kmenů *B. tequilensis* FR9 a *B. subtilis* KKU213. Vzhledem ke schopnosti obou kmenů adherovat na střevní epitel, odolávat nízkému pH žaludku, přítomnosti žlučových kyselin ve střevech, dále konkurovat / antagonizovat enterické patogeny a dalším příznivým vlastnostem vč. produkce bakteriocinů s výše uvedenými vlastnostmi, navrhuji tyto kmeny jako vhodné probiotické doplňky k ochraně zdraví zvířat i člověka. Tyto vhodné probiotické vlastnosti budou v budoucnu posuzovány také u kmenů *B. tequilensis* 3 a 4.

V poslední části práce byla detailněji studována antimikrobiální aktivita *B. weihenstephanensis* 1 a povaha inhibičně aktivní látky. Obecně se uvádí, že bakterie tvoří sekundární metabolity až ve stacionární fázi. V případě bakteriocinů produkce začíná již během exponenciální fáze a vrcholí v přechodu mezi exponenciální a stacionární fází (Willey et van der Donk, 2007), jak potvrzují i Bizani et Brandelli (2002) na příkladu bakteriocinu cereinu 8 A. Stejně tak v naší práci byla prokázána iniciace exprese inhibiční látky na konci exponenciální fáze, nejvyšší antibakteriální aktivita, a tedy maximální produkce byla pozorována po 19 hodinách kultivace v přechodu kultury do rané stacionární fáze. Detekce inhibiční aktivity na konci stacionární fáze poukázala na stabilitu látky. Růst i antimikrobiální aktivita bacilu 1 byly inhibovány při teplotě 42 °C, varianta kultivovaná anaerobně nebyla schopná růstu ani po přemístění do pokojové teploty, kombinace tepelného stresu a nízkého redoxního potenciálu tedy působí vůči kmenu baktericidně. Při teplotách 20, 30 a 37 °C vykazoval podobný růst, ačkoliv nejvyšší úroveň antibakteriální aktivity bylo dosaženo při 30

°C, jedná se tedy o optimální teplotu pro kultivaci *B. weihenstephanensis* 1. U kultury kultivované ve 20 °C byla inhibiční aktivita pozorována i při snížení koncentrace supernatantu, oproti 37 °C, kdy byl aktivní jen supernatant neředěný. To je pravděpodobně dáno psychrofilní povahou bacilu 1, kdy lépe toleruje nižší teploty. Při 4 °C je kmen 1 schopen mírného růstu, ale není schopen produkovat bakteriocin, což ukazuje, že při tepelném stresu zůstávají zachovány pouze nezbytné fyziologické funkce.

*B. weihenstephanensis* 1 účinkuje antagonisticky vůči blízkce příbuzným bakteriím skupiny *B. cereus* a také proti G<sup>+</sup> patogenům *L. monocytogenes* a *Cl. perfringens*. Všechny tyto organismy mají, kromě obdobné struktury buněčné stěny, jako společnou vlastnost produkci lecitinázy (fosfolipázy). Tento enzym je považován za jeden z faktorů virulence, který je schopen narušit strukturu buněčné membrány eukaryotických buněk, a tím způsobit jejich lýzu (Actor, 2012). Proto byla snaha stimulovat expresi bakteriocinu za použití supernatantu z kultur produkujících extracelulární lecitinázu, ovšem neúspěšně. To mohlo být dáno nízkou koncentrací lecitinázy v supernatantu. Spíše se zdá pravděpodobné, že vzhledem k produkci lecitinázy samotným kmenem, nemá důvod reagovat na její přítomnost expresí antimikrobiální látky. Stimulace exprese nebyla prokázána ani za použití antimikrobiálně působících látek nisinu a mitomycinu C.

Zajímavé je, že aktivita bakteriocinu vzrostla v přítomnosti neiontového surfaktantu Triton™ X-100. Podobné výsledky byly zaznamenány v případě bakteriocinů sonorensinu bakterie *B. sonorensis* MT93 (Chopra et al. 2014) a cereinu 7, produkovaného *B. cereus* Bc7 (Oscariz & Pisabarro 2000). Chopra et al. (2014) se domnívá, že ke zvýšení antimikrobiální aktivity dochází díky rozptýlení agregátů bakteriocinu po přidání Triton™ X-100. Agregáty vznikají z důvodu hydrofóbní povahy peptidu. V tomto případě, bylo zvýšení inhibiční aktivity pravděpodobně zapříčiněno antimikrobiální aktivitou surfaktantu samotného. Jedná se tedy o synergický efekt spíše než o zvýšení antimikrobiální aktivity bakteriocinu. Tween 80 je také neiontový surfaktant a účinek naopak mírně snížil. To by mohlo být způsobeno znemožněním navázání bakteriocinu na povrch či průniku do buňky.

Ukázalo se, že dle klesajícího počtu životaschopných buněk indikátorového kmene a neschopnosti následně se po subkultivaci pomnožit, působí bakteriocin *B. weihenstephanensis* 1 na buňky baktericidně. Obdobných výsledků dosáhli i Cherif et al. (2001) v případě bakteriocinu thuricinu 7, ačkoliv autoři na základě výrazného poklesu O.D. zjistili, že pokud je thuricin 7 aplikován ve vyšší koncentraci, účinkuje bakteriolyticky. Bakteriolytický účinek byl prokázán také u subtilinu L-Q11, kdy opět po aplikaci bakteriocinu k indikátorové kultuře došlo k výraznému poklesu O.D. vlivem lýzy buněk, což bylo potvrzeno i prostřednictvím transmisní

elektronové mikroskopie (Qin et al., 2019). Obecně jsou uváděny dva mechanismy účinku bakteriocinů, buďto primárně narušují cytoplazmatické membrány nebo jsou primárně aktivní v buňce a ovlivňují zde genové exprese a produkci proteinů, případně blokují některé metabolické pochody (Dobson et al., 2012). U mnoha doposud popsaných bakteriocinů byl prokázán účinek na cytoplazmatickou membránu. V případě bakteriocinu *B. weihenstephanensis* 1 došlo i v případě 100% koncentrace supernatantu jen k mírnému poklesu O.D. indikátorového kmene a mikroskopicky se buňky jevily nepoškozené, ačkoliv ztratily schopnost pomnožit se. Zdá se tedy, že bakteriocin primárně účinkuje na struktury uvnitř buňky, například DNA, RNA či proteiny. To by vysvětlovalo úzké spektrum inhibičního účinku, kdy pro přenos bakteriocinu do buňky jsou vyžadovány specifické receptory, jako je tomu například u mikrocinu J25 (Vincent et Morero, 2009).

Z výsledků práce tedy vyplývá, že všechny testované kmeny produkují antimikrobiální látky proteinové povahy. Všechny látky jsou taktéž odolné vůči vysokým teplotám a aktivní v širokém spektru hodnot pH. Zatímco zástupci skupiny *B. subtilis* vykazali širší spektrum antimikrobiální aktivity, inhiční látky zástupců skupiny *B. cereus* vykazali vyšší odolnost vůči trávicím enzymům. S ohledem na vlastnosti antimikrobiální látky kmene *B. weihenstephanensis* 1 a spektrum účinku lze dojít k závěru, že antimikrobiální protein pravděpodobně patří mezi nemodifikované peptidy třídy II, přesněji do skupiny IIc či třídy V cyklických (kruhových) peptidů (Cotter et al., 2013). Obecně jsou cyklické bakteriociny považovány za látky s vysokou termostabilitou, odolností k působení různých pH a mnoha proteolytických enzymů. Tato výjimečná stabilita je dána kompaktní kruhovou strukturou, která vzniká kovalentním spojením N- a C- konci peptidu, jak je uvedeno v literární rešerši (Perez et al., 2018). Díky tomu je této skupině přisuzován nezměrný potenciál pro aplikaci v potravinářském či farmaceutickém průmyslu. Z výše uvedených důvodů budou všechny kmeny v budoucnu podrobeny dalšímu zkoumání, také budou izolovány čisté antimikrobiální proteiny. Ty mohou být vzhledem ke svým vlastnostem použity pro výrobu konzervačních látek nebo léčiv, a to buď v nezměněné podobě, modifikací stávajícího proteinu nebo jako předloha pro výrobu nových syntetických molekul.

## 7 Závěr

U všech čtyř testovaných kmenů, identifikovaných jako *B. weihenstephanensis* 1, *B. proteolyticus* 2 a *B. tequilensis* 3 a 4 byla prokázána antimikrobiální aktivita. Antagonisticky působily vůči blízce příbuzným druhům skupiny *B. cereus*, a také vůči vysoce patogenním G+ bakteriím *Clostridium perfringens* a *Listeria monocytogenes*. Kmeny 3 a 4 ze skupiny *B. subtilis* navíc inhibovaly růst některých dalších G+ bakterií. Dále bylo zjištěno, že látky zodpovědné za antimikrobiální aktivitu jsou proteinové povahy, v případě kmenů skupiny *B. cereus* vysoce odolné vůči trávicím enzymům. Všechny látky byly také vysoce termostabilní a aktivní v širokém spektru hodnot pH. U obou kmenů skupiny *B. cereus* byl zjištěn patogenní potenciál.

V případě *B. weihenstephanensis* 1 lze na základě fyzikálně-chemických charakteristik a spektru účinku předpokládat, že se jedná o cyklický bakteriocin se značným potenciálem k praktickému využití.

Díky svým vlastnostem budou antimikrobiální látky všech kmenů v budoucnu izolovány a podrobeny dalšímu testování. Je ale zřejmé, že již na základě doposud zjištěných vlastností, se jedná o látky s velkým potenciálem. Mohly by nalézt uplatnění v potravinářském průmyslu jako přírodní konzervační látky, v humánní či veterinární medicíně jako léčiva infekčních onemocnění nebo jako předloha pro výrobu nových syntetických molekul.

Pozornost bude věnována i nepatogenním produkčním kmenům, u kterých bude studována jejich vhodnost pro využití jako probiotických doplňků k ochraně zdraví člověka i zvířat, případně startovacích kultur v potravinářství nebo inokulantů ke konzervaci krmiv, například siláží.

## 8 Literatura

- Genus *Bacillus*. (b.r.). Získáno 19. leden 2021, z <https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus>
- Species: *Bacillus megaterium*. (b.r.). Získáno 9. únor 2021, z <https://lpsn.dsmz.de/species/bacillus-megaterium>
- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. Ben, Galvez, A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*. 35 (1). 201–232. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.
- Actor, J. K. 2012. 12 - Clinical bacteriology. In: Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology. s. 105–120. W.B. Saunders. ISBN: 978-0-323-07447-6.
- Ambas, I. 2015. *Bacillus mycoides* Improves Health of Gastrointestinal Tract in Marron (*Cherax cainii*, Austin 2002). *Journal of Aquaculture & Marine Biology*. 2 (2). 1–0. doi: 10.15406/jamb.2015.02.00023.
- Ansari, A. 2015. Bacteriocin from LAB for Medical and Health Applications. s. 199–221. Springer, Cham.
- Apetroaie-Constantin, C., Mikkola, R., Andersson, M. A., Teplova, V., Suominen, I., Johansson, T., Salkinoja-Salonen, M. 2009. *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. *Journal of Applied Microbiology*. 106 (6). 1976–1985. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04167.x.
- Appleyard, A. N., Choi, S., Read, D. M., Lightfoot, A., Boakes, S., Hoffmann, A., Chopra, I., Bierbaum, G., Rudd, B. A. M., Dawson, M. J., Cortes, J. 2009. Dissecting structural and functional diversity of the lantibiotic mersacidin. *Chemistry & Biology*. 16 (5). 490–498. doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2009.03.011.
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K.-D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., Göransson, U., Gruber, C. W., Haft, D. H., Hemscheidt, T. K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A. R., Jaspars, M., Kelly, W. L., Klinman, J. P., Kuipers, O. P., Link, A. J., Liu, W., Marahiel, M. A., Mitchell, D. A., Moll, G. N., Moore, B. S., Müller, R., Nair, S. K., Nes, I. F., Norris, G. E., Olivera, B. M., Onaka, H., Patchett, M. L., Piel, J., Reaney, M. J. T., Rebuffat, S., Ross, R. P., Sahl, H.-G., Schmidt, E. W., Selsted, M. E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Süßmuth, R. D., Tagg, J. R., Tang, G.-L., Truman, A. W., Vederas, J. C., Walsh, C. T., Walton, J. D., Wenzel, S. C., Willey, J. M., van der Donk, W. A. 2013. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* 30 (1). 108–160. doi: 10.1039/C2NP20085F.
- Arolas, J. L., Goulas, T., Pomerantsev, A. P., Leppla, S. H., Gomis-Rüth, F. X. 2016. Structural basis for latency and function of immune inhibitor A metallopeptidase, a modulator of the *Bacillus anthracis* secretome. *Structure*. 24 (1). 25–36. doi: 10.1016/j.str.2015.10.015.
- Ays, A., Avcı, A., Ça Grı-Mehmeto, A., Arslan, D. 2017. Production of antimicrobial substances by a novel *Bacillus* strain inhibiting *Salmonella Typhimurium*. *LWT - Food Science and Technology*. 80 . 265–270. doi: 10.1016/j.lwt.2017.02.030.

- Baltz, R. H. 2008. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier.
- Barbosa, J., Caetano, T., Mendo, S. 2015. Class I and class II Lanthipeptides produced by *Bacillus* spp. *Journal of Natural Products*. American Chemical Society.
- Bhandari, V., Ahmod, N. Z., Shah, H. N., Gupta, R. S. 2013. Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 (Pt 7). 2712–2726. doi: 10.1099/ijs.0.048488-0.
- Bizani, D., Brandelli, A. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8 A. *Journal of Applied Microbiology*. 93 (3). 512–519. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01720.x.
- Branen, J. K., Davidson, P. M. 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*. 90 (1). 63–74. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00172-7.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (41). 15196–15199. doi: 10.1073/pnas.0604865103.
- Cai, Y., Huang, · Tingxuan, Xu, · Yuekang, Zhou, G., Zou, P., Zeng, G., Liu, · Xiaojin 2017. Genetic and genomic diversity of NheABC locus from *Bacillus* strains. 199 . 775–785. doi: 10.1007/s00203-017-1350-9.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., Mahillon, J. 2019. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*. 10 . 302. doi: 10.3389/fmicb.2019.00302.
- CDC (b.r.) About Antibiotic Resistance, Centers for disease control and prevention, 2018. Získáno 25. duben 2021, z <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- Chaabouni, I., Guesmi, A., Cherif, A. 2012. Secondary metabolites of *Bacillus*: Potentials in biotechnology. In: *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. s. 347–366. Dordrecht. Springer Netherlands.
- Chapple, D. S., Hussain, R., Joannou, C. L., Hancock, R. E. W., Odell, E., Evans, R. W., Siligardi, G. 2004. Structure and association of human lactoferrin peptides with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 (6). 2190–2198. doi: 10.1128/AAC.48.6.2190-2198.2004.
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S., Boudabous, A. 2001. Thuricin 7: A novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*. 32 (4). 243–247. doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.00898.x.
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., Dicks, L. M. T. 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*. 49 . 23–28. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.011.

- Cho, J. H., Kim, S. C. 2010. Non-membrane targets of antimicrobial peptides: Novel therapeutic opportunities? In: *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*. s. 128–140. CABI Publishing. ISBN: 9781845936570.
- Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., Ren Lu, J. 2019. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*. 537. 163–185. doi: 10.1016/j.jcis.2018.10.103.
- Cochrane, S. A., Vederas, J. C. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal Research Reviews*. 36 (1). 4–31. doi: 10.1002/med.21321.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3 . 777–788. doi: 10.1038/nrmicro1273.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. 2013. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group.
- Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., Jahn, D. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of bacteriology*. 182 (11). 3072–80. doi: 10.1128/JB.182.11.3072-3080.2000.
- Davagnino, J., Herrero, M., Furlong, D., Moreno, F., Kolter, R. 1986. The DNA replication inhibitor microcin B17 is a forty-three-amino-acid protein containing sixty percent glycine. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1 (3). 230–238. doi: 10.1002/prot.340010305.
- de Hoon, M. J. L., Eichenberger, P., Vitkup, D. 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation Network. *Current Biology*. 20 (17). 735–745. doi: 10.1016/J.CUB.2010.06.031.
- Di Franco, C., Beccari, E., Santini, T., Pisaneschi, G., Tecce, G. 2002. Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiology*. 2 (1). 33. doi: 10.1186/1471-2180-2-33.
- Dischinger, J., Basi Chipalu, S., Bierbaum, G. 2014. Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. *International Journal of Medical Microbiology*. 304 (1). 51–62. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.09.003.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Paul Ross, R., Hill, C. 2012. Bacteriocin production: A probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology.
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F., Zhang, L. H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*. 411 (6839). 813–817. doi: 10.1038/35081101.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., Prévost, H. 2006. The continuing story of class iia bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70 (2). 564–582. doi: 10.1128/mnbr.00016-05.
- Drobniewski, F. A. 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*.



- 6 (4). 324–338. doi: 10.1128/CMR.6.4.324.
- Dunlap, C. A., Kwon, S. W., Rooney, A. P., Kim, S. J. 2015. *Bacillus paralicheniformis* sp. Nov., isolated from fermented soybean paste. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65 (10). 3487–3492. doi: 10.1099/ijsem.0.000441.
- Dunlap, C. A., Saunders, L. P., Schisler, D. A., Leathers, T. D., Naeem, N., Cohan, F. M., Rooney, A. P. 2016. *Bacillus nakamurai* sp. Nov., a black-pigment-producing strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66 (8). 2987–2991. doi: 10.1099/ijsem.0.001135.
- EFSA 2014. Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition. *EFSA Journal*. 12 (3665). doi: 10.2903/j.efsa.2014.3665.
- EFSA 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. Roč. 16. John Wiley & Sons, Ltd. Získáno z <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., Cotter, P. D. 2016. Bacteriocins: Novel solutions to age old spore-related problems? *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M., Scherer, S. 2006. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiology*. 6 . 20. doi: 10.1186/1471-2180-6-20.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., Koehler, T. M. 2019. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum*. 7 (3). doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018.
- Eppelmann, K., Doekel, S., Marahiel, M. A. 2001. Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry*. 276 (37). 34824–31. doi: 10.1074/jbc.M104456200.
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., Avis, T. J. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*. 39 (7). 869–878. doi: 10.1007/s10886-013-0319-7.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., Borriss, R. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an „Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*. 8 (22). doi: 10.3389/fmicb.2017.00022.
- Fischer, K., Sjöström, K., Stiernström, A., Emanuelson, U. 2019. Dairy farmers’ perspectives on antibiotic use: A qualitative study. *Journal of Dairy Science*. 102 (3). 2724–2737. doi: 10.3168/jds.2018-15015.
- Flühe, L., Marahiel, M. A. 2013. Radical S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 17 (4). 605–612. doi: 10.1016/J.CBPA.2013.06.031.

- From, C., Hormazabal, V., Granum, P. E. 2007. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology*. 115 (3). 319–324. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.005.
- Gabrielsen, C., Brede, D. A., Nes, I. F., Diep, D. B. 2014. Circular bacteriocins: Biosynthesis and mode of action. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Second edition. In: Springer. s. 172. New York, NY.
- Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., Hart, M. E. 2006. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56 (7). 1475–1484. doi: 10.1099/ijs.0.63946-0.
- González-Pastor, J. E. 2011. Cannibalism: A social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*. 35 (3). 415–424. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00253.x.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., Pang, C. H.-N. 1973. The Genus *Bacillus*. Washington, DC. Department of Agriculture. p. 109–126.
- Guerrero-Barajas, C., Constantino-Salinas, E. A., Amora-Lazcano, E., Tlalapango-Ángeles, D., Mendoza-Figueroa, J. S., Cruz-Maya, J. A., Jan-Roblero, J. 2020. *Bacillus mycoides* A1 and *Bacillus tequilensis* A3 inhibit the growth of a member of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* species complex in avocado. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 100 (10). 4049–4056. doi: 10.1002/jsfa.10450.
- Guinebretière, M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., de Sarrau, B., de Buyser, M. L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., de Vos, P., Nguyen-The, C., Sorokin, A. 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63 (1). 31–40. doi: 10.1099/ijs.0.030627-0.
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., Chen, S. 2020. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *subtilis* and *cereus* clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70 (11). 5753–5798. doi: 10.1099/ijssem.0.004475.
- Hamdache, A., Lamarti, A., Aleu, J., Collado, I. G. 2011. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of Natural Products*. 74 (4). 893–899. doi: 10.1021/np100853e.
- Harwood, C. R., Mouillon, J.-M., Pohl, S., Jos', J., Arnau, J. 2018. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews*. 028 . 721–738. doi: 10.1093/femsre/fuy028.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., Lotfipour, F. 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 113 (4). 723–736. doi: 10.1111/j.1365-

2672.2012.05338.x.

- Hegarty, J. W., Guinane, C. M., Ross, R. P., Hill, C., Cotter, P. D. 2016. Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Research*. 5. 2587. doi: 10.12688/f1000research.9615.1.
- Hendriksen, N. B., Hansen, B. M., Johansen, J. E. 2006. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. 89 (2). 239–249. doi: 10.1007/s10482-005-9025-y.
- Hoffmann, A., Pag, U., Wiedemann, I., Sahl, H.-G. 2002. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *Il Farmaco*. 57 (8). 685–691. doi: 10.1016/S0014-827X(02)01208-9.
- Höfler, C., Heckmann, J., Fritsch, A., Popp, P., Gebhard, S., Fritz, G., Mascher, T. 2016. Cannibalism stress response in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 162 . 164–176. doi: 10.1099/mic.0.000176.
- Hong, H. A., Khaneja, R., Tam, N. M. K., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., Brisson, A., Gasbarrini, A., Barnes, I., Cutting, S. M. 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in Microbiology*. 160 (2). 134–143. doi: 10.1016/j.resmic.2008.11.002.
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H. 2020. , řijen 16 Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.
- Huma, N., Shankar, P., Kushwah, J., Bhushan, A., Joshi, J., Mukherjee, T., Raju, S. C., Purohit, H. J., Kalia, V. C. 2011. Diversity and polymorphism in AHL-Lactonase gene (aiiA) of *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21 (10). 1001–1011. doi: 10.4014/jmb.1105.05056.
- Hungate, R. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: J. Norris, D. Ribbons (Ed.). *Methods in microbiology*. Roč. 3B. s. 117–132. London. Academic Press.
- Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J., Mahillon, J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*. 5 (8). 631–640. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00461.x.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R. E. W. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 19 (3). 491–511. doi: 10.1128/CMR.00056-05.
- Julsing, M. K., Rijpkema, M., Woerdenbag, H. J., Quax, W. J., Kayser, O. 2007. Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of isoprene in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75 (6). 1377–1384. doi: 10.1007/s00253-007-0953-5.
- Kamaruzzaman, M. A., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Hassan, M., Othman, A. R., Idris, M. 2020. Characterisation of Pb-resistant plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from *Scirpus grossus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 23. 101456. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101456.

- Kang, S. M., Khan, A. L., Waqas, M., Asaf, S., Lee, K. E., Park, Y. G., Kim, A. Y., Khan, M. A., You, Y. H., Lee, I. J. 2019. Integrated phytohormone production by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean. *Journal of Plant Interactions*. 14 (1). 416–423. doi: 10.1080/17429145.2019.1640294.
- Katayama, H., Asahina, Y., Hojo, H. 2011. Chemical synthesis of the S-linked glycopeptide, sublancin. *Journal of Peptide Science*. 17 (12). 818–821. doi: 10.1002/psc.1406.
- Khochamit, N., Siripornadulsil, S., Sukon, P., Siripornadulsil, W. 2015. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain. *Microbiological Research*. 170 . 36–50. doi: 10.1016/j.micres.2014.09.004.
- Kim, M. J., Han, J. K., Park, J. S., Lee, J. S., Lee, S. H., Cho, J. Il, Kim, K. S. 2015. Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among bacillus cereus and *Bacillus thuringiensis* strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25 (6). 872–879. doi: 10.4014/jmb.1502.02003.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12 (1–3). 39–85. doi: 10.1016/0168-6445(93)90057-G.
- Kleerebezem, M., Quadri, L. E. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides*. 22 (10). 1579–1596. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00493-4.
- Kovács, Á. T. 2019. *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. 27 (8). 724–725. doi: 10.1016/j.tim.2019.03.008.
- Kumari, S., Sarkar, P. 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*. 69 . 20–29. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2016.04.012.
- Labbe, R. G., Juneja, V. K. 2017. *Clostridium perfringens* Foodborne Diseases: Third Edition. Third Edit. Elsevier Inc. p. 235–242. ISBN: 9780123850072.
- Lai, Q., Liu, Y., Shao, Z. 2014. *Bacillus xiamenensis* sp. Nov., isolated from intestinal tract contents of a flathead mullet (*Mugil cephalus*). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. 105 (1). 99–107. doi: 10.1007/s10482-013-0057-4.
- Lebrun, M., Mainil, J. G., Linden, A. 2010. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens* : description, diagnosis and prophylaxis. *Veterinary Record*. 167 (1). 13–22. doi: 10.1136/vr.167.1.12.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Prüß, B. M., Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E., Stewart, G. S. A. B., Scherer, S. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48 (4). 1373–1382. doi: 10.1099/00207713-48-4-1373.
- Levin, P. A., Grossman, A. D. 1998. Cell cycle and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*. 1 (6). 630–635. doi: 10.1016/S1369-5274(98)80107-0.

- Li, H., Guan, Y., Dong, Y., Zhao, L., Rong, S., Chen, W., Lv, M., Xu, H., Gao, X., Chen, R., Li, L., Xu, Z. 2018. Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *Magnaporthe oryzae*. PLoS ONE. 13 (10). doi: 10.1371/journal.pone.0203505.
- Lindbäck, T., Fagerlund, A., Rødland, M. S., Granum, P. E. 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. Microbiology. 150 (12). 3959–3967. doi: 10.1099/mic.0.27359-0.
- Liu, B., Liu, G. H., Cetin, S., Schumann, P., Pan, Z. Z., Chen, Q. Q. 2016. *Bacillus gobiensis* sp. nov., isolated from a soil sample. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 66 (1). 379–384. doi: 10.1099/ijsem.0.000729.
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., Shao, Z. 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 67 (8). 2499–2508. doi: 10.1099/ijsem.0.001821.
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., Shao, Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. Scientific Reports. 5 . doi: 10.1038/srep14082.
- Liu, Y., Lai, Q., Shao, Z. 2018. Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycooides*. Int J Syst Evol Microbiol. 68 . 106–112. doi: 10.1099/ijsem.0.002466.
- Lodemann, U., Martha Lorenz, B., Dietrich Weyrauch, K., Martens, H. 2008. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. Archives of Animal Nutrition. 62 (2). 87–106. doi: 10.1080/17450390801912068.
- Logan, N. A., Vos, P. De 2015. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. s. 21–184. Chichester, UK. John Wiley & Sons, Ltd.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P. 2010. Brock Biology of Microorganisms (13th) Benjamin Cummings. p. 123–126. ISBN: 78-0-321-64963-8.
- Maksimov, M. O., Pelczer, I., Link, A. J. 2012. Precursor-centric genome-mining approach for lasso peptide discovery. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109 (38). 15223–8. doi: 10.1073/pnas.1208978109.
- May, M. 2014. Drug development: Time for teamwork. Nature. 509 (7498 SUPPL.). S4–S5. doi: 10.1038/509S4a.
- Mckenney, P. T., Driks, A., Eichenberger, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. Nature Reviews Microbiology. 11 (1). 33–44. doi: 10.1038/nrmicro2921.
- Mikkola, R., Andersson, M. A., Teplova, V., Grigoriev, P., Kuehn, T., Loss, S., Tsitko, I., Apetroaie, C., Saris, N. E. L., Veijalainen, P., Salkinoja-Salonen, M. S. 2007. Amyloisin from *Bacillus amyloliquefaciens*, a K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channel-forming toxic peptide containing a polyene structure. Toxicon. 49 (8). 1158–1171. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.02.010.

- Miller, R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J., Kovac, J. 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66 (11). 4744–4753. doi: 10.1099/ijsem.0.001421.
- Miller, R. A., Jian, J., Beno, S. M., Wiedmann, M., Kovac, J., Björkroth, J. 2018. Intraclade variability in toxin production and cytotoxicity of *Bacillus cereus* group type strains and dairy-associated isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 84 (6). doi: 10.1128/AEM.02479-17.
- Mingmongkolchai, S., Panbangred, W. 2018. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*. 124 (6). 1334–1346. doi: 10.1111/jam.13690.
- Murdock, C. A., Cleveland, J., Matthews, K. R., Chikindas, M. L. 2007. The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 44 (3). 255–261. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02076.x.
- Nakamura, L. K. 1989. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. doi: 10.1099/00207713-39-3-295.
- Nicholson, W. L. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59 (3). 410–416. doi: 10.1007/s00018-002-8433-7.
- Nishie, M., Nagao, J. I., Sonomoto, K. 2012. Antibacterial peptides „bacteriocins“: An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Science*. *Biocontrol Sci.*
- Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., Kristiansen, P. E. 2010. Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2 (1). 52–60. doi: 10.1007/s12602-009-9021-z.
- Nizet, V., Beall, B., Bast, D. J., Datta, V., Kilburn, L., Low, D. E., De Azavedo, J. C. S. 2000. Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. *Infection and Immunity*. 68 (7). 4245–4254. doi: 10.1128/IAI.68.7.4245-4254.2000.
- Norris, G. E., Patchett, M. L. 2016. The glycocins: in a class of their own. *Current Opinion in Structural Biology*. 40 . 112–119. doi: 10.1016/J.SBI.2016.09.003.
- O'Connor, P. M., Kuniyoshi, T. M., Oliveira, R. P., Hill, C., Ross, R. P., Cotter, P. D. 2020. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd.
- O'Neill, Lord 2016. BVA welcomes report on tackling drug-resistant infections. *Veterinary Record*. 178 (23). 590–590. doi: 10.1136/vr.i3114.
- Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: Structure, production, and mode of action. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. Roč. 13. s. 210–219. *J Mol*

- Ortega, M. A., van der Donk, W. A. 2016. New Insights into the biosynthetic logic of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products. *Cell Chemical Biology*. 23 (1). 31–44. doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2015.11.012.
- Ovchinnikov, K., Chi, H., Mehmeti, I., Holo, H., Nes, I. F., Diep, D. B. 2016. Novel group of leaderless multipetide bacteriocins from gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 82 (17). 5216–5224. doi: 10.1128/AEM.01094-16.
- Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A., Cohan, F. M. 2001. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert Arizona. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51 . 1671–1679. doi: 10.1099/00207713-51-5-1671.
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M. R. 2011. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: Mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd.
- Park, S.-Y., Hwang, B.-J., Shin, M.-H., Kim, J.-A., Kim, H.-K., Lee, J.-K. 2006. N-acylhomoserine lactonase producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. *FEMS Microbiology Letters*. 261 (1). 102–108. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00336.x.
- Parveen Rani, R., Anandharaj, M., Hema, S., Deepika, R., David Ravindran, A. 2016. Purification of antilisterial peptide (Subtilosin A) from novel *Bacillus tequilensis* FR9 and demonstrate their pathogen invasion protection ability using human carcinoma cell line. *Frontiers in Microbiology*. 7 (DEC). 1910. doi: 10.3389/fmicb.2016.01910.
- Pattnaik, P., Grover, S., Kumar Batish, V. 2005. Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocin-like compound produced by *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA. *Microbiological Research*. 160 (2). 213–218. doi: 10.1016/J.MICRES.2005.01.006.
- Paudyal, R., Karatzas, K. A. 2016. Stress adaptation of *Listeria monocytogenes* in acidic ready-to-eat products. In: *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*. s. 167–182. Elsevier Inc. ISBN: 9780128020081.
- Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K. 2018. Circular and leaderless bacteriocins: Biosynthesis, mode of action, applications, and prospects. *Frontiers in Microbiology*. 9 . 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2018.02085.
- Perry, J. A., Wright, G. D. 2013. The antibiotic resistance „mobilome": Searching for the link between environment and clinic. *Frontiers in Microbiology*. 4 (MAY). doi: 10.3389/fmicb.2013.00138.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., Berkeley, R. C. W. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37 (1). 69–71. doi: 10.1099/00207713-37-1-69.
- Qin, Y., Wang, Y., He, Y., Zhang, Y., She, Q., Chai, Y., Li, P., Shang, Q. 2019. Characterization of Subtilin L-Q11, a novel class i bacteriocin synthesized by *Bacillus subtilis* L-Q11

- Isolated From Orchard Soil. *Frontiers in Microbiology*. 10 (MAR). 484. doi: 10.3389/fmicb.2019.00484.
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M., De Souza, J. T. 2002. Antonie van Leeuwenhoek. *Journal of Microbiology*. 81. 537–547. doi: <https://doi-org.infozdroje.czu.cz/10.1023/A:1020501420831>.
- Raddadi, N., Belaouis, A., Tamagnini, I., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., Boudabous, A., Cherif, A., Daffonchio, D. 2009. Characterization of polyvalent and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol. *Journal of Basic Microbiology*. 49 (3). 293–303. doi: 10.1002/jobm.200800182.
- Ramirez-Peralta, A., Zhang, P., Li, Y. qing, Setlow, P. 2012. Effects of sporulation conditions on the germination and germination protein levels of *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (8). 2689–2697. doi: 10.1128/AEM.07908-11.
- Ramos De La Vega, J., Lopez Mestas Camberos, M. L. 1996. Datos preliminares sobre el descubrimiento de una tumba de tiro en el sitio de Huitzilapa, Jalisco. *Ancient Mesoamerica*. 7 (1). 121–134. doi: 10.1017/s0956536100001334.
- Rea, M. C., Sit, C. S., Clayton, E., O'Connor, P. M., Whittal, R. M., Zheng, J., Vederas, J. C., Ross, R. P., Hill, C. 2010. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107 (20). 9352–9357. doi: 10.1073/pnas.0913554107.
- Reimer, J. M., Haque, A. S., Tarry, M. J., Schmeing, T. M. 2018. Piecing together nonribosomal peptide synthesis. *Current Opinion in Structural Biology*. 49. 104–113. doi: 10.1016/J.SBI.2018.01.011.
- Ríos Colombo, N. S., Chalón, M. C., Navarro, S. A., Bellomio, A. 2018. Pediocin-like bacteriocins: new perspectives on mechanism of action and immunity. *Current Genetics*. Springer Verlag.
- Roberts, M. S., Nakamura, L. K., Cohan, F. M. 1994. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*. doi: 10.1099/00207713-44-2-256.
- Roberts, Michael S., Nakamura, L. K., Cohan, F. M. 1996. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *International Journal of Systematic Bacteriology*. doi: 10.1099/00207713-46-2-470.
- Rosenfeld, E., Dupont, C., Zigha, A., Schmitt, P. 2005. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430 / 73 strain. *Canadian Journal of Microbiology*. 158 (2). 149–158. doi: 10.1139/W04-132.
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology*. 62 (3). 231–245. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00340-8.
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Quesada, E. 2005. *Bacillus*



- velezensis sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55 (1). 191–195. doi: 10.1099/ijs.0.63310-0.
- Sadredinamin, M., Mehrnejad, F., Hosseini, P., Doustdar, F. 2016. Antimicrobial Peptides (AMPs). *Novel Biomed*. 4 (2). 70–76.
- Sanchez, S., Demain, A. L. 2011. Secondary Metabolites. *Comprehensive Biotechnology*. 155–167. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00018-0.
- Sansinenea, E., Ortiz, A. 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*. 33 (8). 1523–1538. doi: 10.1007/s10529-011-0617-5.
- Satomi, M., La Duc, M. T., Venkateswaran, K. 2006. *Bacillus safensis* sp.nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56 (8). 1735–1740. doi: 10.1099/ijs.0.64189-0.
- Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., Dietel, K., Schwecke, T., Herfort, S., Lasch, P., Borriss, R. 2014. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of bacteriology*. 196 (10). 1842–52. doi: 10.1128/JB.01474-14.
- Sella, S. R. B. R., Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R. 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*. 169 (12). 931–939. doi: 10.1016/J.MICRES.2014.05.001.
- Setlow, P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*. 6 (6). 550–556. doi: 10.1016/J.MIB.2003.10.001.
- Sharma, N., Gautam, N. 2008. Antibacterial activity and characterization of bacteriocin of *Bacillus mycoides* isolated from whey. *Indian Journal of Biotechnology*. 7 (1). 117–121.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., Narlikar, J. V., Bhargava, P. M. 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56 (7). 1465–1473. doi: 10.1099/ijs.0.64029-0.
- Šilhánková, L. 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Academia. p. 364. ISBN: ISBN: 80-200-1024-6.
- Slepecky, R. A., Hemphill, H. E. 2006. The genus *Bacillus*—Nonmedical. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Ed.). *The Prokaryotes*. s. 530–562. New York, NY. Springer US.
- Snyder, A. B., Worobo, R. W. 2014. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94 (1). 28–44. doi: 10.1002/jsfa.6293.
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. Ben, Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., Fliss, I. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity

aspects and regulations. FEMS Microbiology Reviews. Oxford University Press. volume, pages, doi

- Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N., Gupta, N. 2014. Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. PLoS ONE. 9 (5). doi: 10.1371/journal.pone.0096951.
- Srivastava, S. K., Babu, N., Pandey, H. 2009. Traditional insect bioprospecting - As human food and medicine. Indian Journal of Traditional Knowledge. 8 (4). 485–494. doi: 10.1128/CMR.00056-05.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology. 56 (4). 845–857. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I.-C., Hahm, Y. T. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. Canadian Journal of Microbiology. 61 (2). 93–103. doi: 10.1139/cjm-2014-0613.
- Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P., Visessanguan, W. 2010. *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60 (10). 2364–2370. doi: 10.1099/ijss.0.018879-0.
- Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F. 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. International Journal of Food Microbiology. 94 (2). 137–159. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.01.006.
- Taylor, J. M. W., Sutherland, A. D., Aidoo, K. E., Logan, N. A. 2005. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. FEMS Microbiology Letters. 242 (2). 313–317. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.022.
- Thompson, C. C., Amaral, G. R., Campeão, M., Edwards, R. A., Polz, M. F., Dutilh, B. E., Ussery, D. W., Sawabe, T., Swings, J., Thompson, F. L. 2015. Microbial taxonomy in the post-genomic era: Rebuilding from scratch? Archives of Microbiology. 197 (3). 359–370. doi: 10.1007/s00203-014-1071-2.
- Tocheva, E. I., Ortega, D. R., Jensen, G. J. 2016. Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. Nature Reviews Microbiology. 14 (8). 535–542. doi: 10.1038/nrmicro.2016.85.
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., Garbeva, P. 2017. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. Trends in Microbiology. 25 (4). 280–292. doi: 10.1016/J.TIM.2016.12.002.
- van Belkum, M. J., Martin-Visscher, L. A., Vederas, J. C. 2011. Structure and genetics of circular bacteriocins. Trends in Microbiology. 19 (8). 411–418. doi: 10.1016/J.TIM.2011.04.004.
- Van Heel, A. J., Montalban-Lopez, M., Oliveau, Q., Kuipers, O. P. 2017. Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin. Microbial genomics. 3 (10). 1–9. doi: 10.1099/mgen.0.000134.

- Vincent, P., Morero, R. 2009. The Structure and Biological Aspects of Peptide Antibiotic Microcin J25. *Current Medicinal Chemistry*. 16 (5). 538–549. doi: 10.2174/092986709787458461.
- Visiello, R., Colombo, S., Carretto, E. 2016. *Bacillus cereus* hemolysins and other virulence factors. In: *The Diverse Faces of Bacillus cereus*. s. 35–44. Elsevier.
- Wang, J., Zhang, L., Teng, K., Sun, S., Sun, Z., Zhong, J. 2014. Cerecidins, Novel Lantibiotics from *Bacillus cereus* with potent antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 89 (8). 2633–2643. doi: 10.1128/AEM.03751-13.
- Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J., Yang, L. 2015. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 23 . 744–754. doi: 10.1016/j.cjche.2014.05.020.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173 (2). 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Wieckowski, B. M., Hegemann, J. D., Mielcarek, A., Boss, L., Burghaus, O., Marahiel, M. A. 2015. The PqqD homologous domain of the radical SAM enzyme ThnB is required for thioether bond formation during thurincin H maturation. *FEBS Letters*. 589 (15). 1802–1806. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2015.05.032.
- Wiley, J. M., van der Donk, W. A. 2007. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annual Review of Microbiology*. 61 (1). 477–501. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093501.
- Yang, X., Yousef, A. E. 2018. Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 34 (4). 57. doi: 10.1007/s11274-018-2437-4.
- Zaraï Jaouadi, N., Rekik, H., Ben Elhoul, M., Zohra Rahem, F., Gorgi Hila, C., Slimene Ben Aicha, H., Badis, A., Toumi, A., Bejar, S., Jaouadi, B. 2015. A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process. *International Journal of Biological Macromolecules*. 79 . 952–964. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.038.
- Zeigler, D. R., Perkins, J. B. 2015. The Genus *Bacillus*. In: E. Goldman, L. Green (Ed.). *Practical Handbook of Microbiology*. third. s. 429–450. CRC Press. ISBN: 978-1-4665-8739-7.
- Zhao, X., Kuipers, O. P. 2016. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of *Bacillales* species. *BMC Genomics*. 17 (1). 882. doi: 10.1186/s12864-016-3224-y.
- Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., Duport, C. 2006. Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Archives of Microbiology*. 185 (3). 222–233. doi: 10.1007/s00203-006-0090-z.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

|      |   |
|------|---|
| AMP  | Antimikrobiální peptidy   |
| ATCC | Americká sbírka typových kultur                                 |
| AMK  | Aminokyseliny   |
| BMK  | Bakterie mléčného kvašení                                       |
| CCM  | Česká sbírka mikroorganismů                                     |
| DSMZ | Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury             |
| G+   | Grampozitivní bakterie  |
| G-   | Gramnegativní bakterie  |
| KMVD | Sbírka Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky                |
| LAP  | Lineární azol-obsahující peptidy                                |
| MBC  | Minimální baktericidní koncentrace                              |
| MIC  | Minimální inhibiční koncentrace                                 |
| MRSA | Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>              |
| O.D. | Optická denzita   |
| PTM  | Posttranslační modifikace                                       |
| QS   | Quorum sensing  |
| RiPP | Ribozomálně syntetizované a posttranslačně modifikované peptidy |
| RTE  | „Ready to eat“  |
| TSB  | Trypton sojový bujón  |
| VRE  | Vankomycin-rezistentí <i>Enterococcus faecalis</i>              |

## 11 Samostatné přílohy

**Tabulka 1:** Testované sbírkové kmeny.

| <b>Taxonomické zařazení</b>  | <b>Původ</b>  |
|--|---------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> CCM 7232   | sbírkový kmen |
| <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010  | sbírkový kmen |
| <i>Bacillus fusiformis</i> CCM 4609  | sbírkový kmen |
| <i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048  | sbírkový kmen |
| <i>Bacillus mycoides (weihenstephanensis)</i> DSMZ 11821                         | sbírkový kmen |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> CCM 4987                                     | sbírkový kmen |
| <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140                     | sbírkový kmen |
| <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700  | sbírkový kmen |
| <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i> DSM 20090                     | sbírkový kmen |
| <i>Clostridium butyricum</i> DSM 10702   | sbírkový kmen |
| <i>Clostridium clostridioforme</i> DSM 933                                       | sbírkový kmen |
| <i>Clostridium difficile</i> CCM 3593  | sbírkový kmen |
| <i>Clostridium perfringens</i> DSMZ 11778  | sbírkový kmen |
| <i>Clostridium tertium</i> DSM 2485  | sbírkový kmen |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922  | sbírkový kmen |
| <i>E. coli</i> C7050 KMVD  | sbírkový kmen |
| <i>E. coli</i> 2163 KMVD   | sbírkový kmen |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 7797   | sbírkový kmen |
| <i>Enterococcus faecalis</i> KMVD  | sbírkový kmen |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSMZ 20079                                      | sbírkový kmen |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> CCM 91  | sbírkový kmen |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> MILCOM 195  | sbírkový kmen |
| <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 11454                          | sbírkový kmen |
| <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> MILCOM 612                          | 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 1897   | sbírkový kmen |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1960   | sbírkový kmen |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2115  | sbírkový kmen |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076 | sbírkový kmen |
| <i>Salmonella</i> KMVD   | sbírkový kmen |
| <i>Serratia marcescens</i> DSMZ 30121  | sbírkový kmen |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923  | sbírkový kmen |

**Tabulka 2a: Testované kmeny skupiny *Bacillus cereus*.**

| Taxonomické zařazení                   | Označení kmene      | Původ                           |
|--|---------------------|---------------------------------|
| <i>Bacillus mycoides</i> 2014004       | 2014004             | voda (rybník Veselí)            |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> 2014013  | 2014013             | voda (rybník Kanclíř)           |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 1CP o <sub>2</sub>  | psí granule                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 1CP                 | psí granule                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 2CP o <sub>2</sub>  | psí granule                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 3CP o <sub>2</sub>  | psí granule                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 3CP                 | psí granule                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 4CP o <sub>2</sub>  | psí granule                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 5CP o <sub>2</sub>  | psí granule                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 5CP                 | psí granule                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 6CP o <sub>2</sub>  | psí granule                     |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 6CP                 | psí granule                     |
| <i>Bacillus thuringiensis</i>          | 9CP o <sub>2</sub>  | losos sušený                    |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 10CP o <sub>2</sub> | losos sušený                    |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 10CP                | losos sušený                    |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 12CP o <sub>2</sub> | kuřecí pařáty sušené            |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 12CP                | kuřecí pařáty sušené            |
| <i>Bacillus mycoides</i>               | seba 1-3 2. rozbor  | senáž                           |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 2/2D                | kakaové boby                    |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 1vz. M1             | kakaové boby                    |
| <i>Bacillus thuringiensis</i>          | 1/3 A1              | trávicí trakt (včela medonosná) |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 1/3 A2              | trávicí trakt (včela medonosná) |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 1/3 B1              | trávicí trakt (včela medonosná) |
| <i>Bacillus mycoides/thuringiensis</i> | RM1/1               | ricotta                         |
| <i>Bacillus mycoides/thuringiensis</i> | RM1/2               | ricotta                         |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | A72b HEM            | vzduch                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | A119K               | vzduch                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 2-1 bac             | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 5-1 bac             | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 6-1 bac             | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 7-1 bac             | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 1-1 bc              | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 1-2 bc              | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus/mycoides</i>        | 4 bc                | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 6 bc                | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 6-2 bc              | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 7-1 bc              | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 7-2 bc              | cvrček                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 8-1 bac             | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 9-1 bac             | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 14-1 bac            | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 14-2 bac            | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 8 bc                | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 11bc                | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 12 bc               | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 14 bc               | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 8a                  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 8b                  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 10a                 | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 10b                 | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 10c                 | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 11a                 | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 11b                 | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 14a                 | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 14b                 | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 8a O <sub>2</sub>   | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 10a O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 10b O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 10c O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus/mycoides</i>        | 11a O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 11b O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 12a O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 12b O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 12c O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 13a O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 13b O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 14a O <sub>2</sub>  | cvrček - vařený                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | 14c O <sub>2</sub>  | vzduch                          |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | D39                 | kontaminace Bif                 |
| <i>Bacillus cereus</i>                 | S6                  | škeble asijská                  |

**Tabulka 2b:** Testované potenciálně patogenní kmeny a kmeny skupiny *Bacillus subtilis*.

| <b>Taxonomické zařazení</b>                                | <b>Označení kmene</b> | <b>Původ</b>                        |
|--|-----------------------|-------------------------------------|
| <i>Acinetobacter johnsonii</i>                             | TSB 6/9               | škeble asijská                      |
| <i>Bacillus aerophilus</i> 2015010                         | 2015010               | voda (rybník Kanclíř)               |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> 2015001 | 2015001               | voda (rybník Hejtman)               |
| <i>Clostridium perfringens</i>                             | N12/3D                | trávicí trakt (pes)                 |
| <i>Clostridium perfringens</i>                             | N20/3D                | trávicí trakt (pes)                 |
| <i>Clostridium perfringens</i>                             | PesMup                | trávicí trakt (pes)                 |
| <i>Clostridium perfringens</i>                             | MiaMup                | trávicí trakt (pes)                 |
| <i>Clostridium perfringens</i>                             | M12/5E                | trávicí trakt (pes)                 |
| <i>Clostridium perfringens</i>                             | M20/4A                | trávicí trakt (pes)                 |
| <i>Clostridium perfringens</i>                             | M19/4A1               | trávicí trakt (pes)                 |
| <i>Clostridium perfringens</i>                             | pk2bif                | med                                 |
| <i>E. coli</i>   |                       | trávicí trakt (člověk)              |
| <i>Chromobacterium</i> sp.                                 | PT 61                 | bochnatka americká                  |
| <i>Lactococcus garviae</i>                                 | BC 2/3 C1             | trávicí trakt (včela medonosná)     |
| <i>Lactococcus garviae</i>                                 | BC 2/3 C4             | trávicí trakt (včela medonosná)     |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                              | 72                    | mleté maso                          |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                              | 7                     | feferonky se sýrem naložené v oleji |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i>                              | ČČ2/1                 | čistící čaj s červenou řepou        |
| <i>Salmonella</i> sp.                                      |                       | maso                                |