

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Antimikrobiální aktivita bakterií rodu *Bacillus*

Bakalářská práce

Autor práce: Marie Pruchová

Obor studia: Živočišná produkce (ABPP)

Vedoucí práce: Ing. Hana Salmonová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Antimikrobiální aktivita bakterií rodu *Bacillus*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18. 4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Haně Salmonové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za příjemnou spolupráci, cenné rady, předané vědomosti, trpělivost, motivaci, a především za čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala manželovi a rodičům, kteří mi byli vždy oporou, nejen při studiu.

Antimikrobiální aktivita bakterií rodu *Bacillus*

Souhrn

Bacillus spp. jsou považovány za významné producenty biologicky aktivních látek, zejména s antimikrobiálními účinky. Tyto látky je možné využít jako léčiva ve farmaceutickém nebo jako aditiva v potravinářském průmyslu. Proto byla cílem bakalářské práce charakterizace kmene *Bacillus mycooides* PT89, testování jeho antagonistické aktivity a zjištění povahy látky zodpovědné za inhibiční účinky. Kmen *B. mycooides* byl identifikován pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a jeho biochemický profil byl stanoven pomocí soupravy API 50 CHB. Antimikrobiální aktivita kmene byla testována agarovou difúzní metodou proti potenciálně patogenním bakteriím a bakteriím způsobujícím kažení potravin. Do agarové plotny s indikátorovým kmenem byly vytvořeny jamky a do nich byl aplikován supernatant z PT89. Testovány byly supernatanty z aerobně i anaerobně narostlé kultury. Po kultivaci se citlivost projevila inhibiční zónou a její průměr byl měřen v milimetrech. Povaha antimikrobiálně aktivní látky byla zkoumána prostřednictvím působení různých enzymů, teplot, hodnot pH a surfaktantů. Změny v antimikrobiální aktivitě byly poté opět sledovány agarovou difúzní metodou. Biochemickou analýzou byla určena schopnost *B. mycooides* PT89 fermentovat široké spektrum substrátů za produkce organických kyselin. Antimikrobiální aktivita byla prokázána proti vysoce patogenním bakteriím *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a *Listeria monocytogenes*, pro které je společná lecitinázová aktivita. Také byl zjištěn vliv anaerobní kultivace na zvýšení inhibiční aktivity bacilu PT89. Antimikrobiální látka byla inaktivována pouze působením enzymu proteinázy K, až po 24 h inkubace, čímž byla prokázána její proteinová povaha. Také byla zjištěna aktivita v širokém rozmezí hodnot pH a vysoká odolnost vůči teplotám. Částečná aktivita byla zachována i při působení teploty 100 °C po dobu 10 minut. S ohledem na zmíněné vlastnosti, se pravděpodobně jedná o cirkulární bakteriocin. Taková látka by mohla nalézt uplatnění v potravinářském průmyslu při konzervaci potravin nebo jako léčivo. Kmen *B. mycooides* PT89 by mohl být využit například jako probiotikum k modulaci mikrobioty trávicího traktu a jako prevence proti střevním infekcím nebo jako silážního inokulant.

Klíčová slova: *Bacillus*, antimikrobiální aktivita, agarová difúzní metoda, bakteriociny, antibiotika

Antimicrobial activity of *Bacillus* spp.

Summary

Some *Bacillus* spp. are considered as important bacteria producing a variety of biologically active substances, especially with antimicrobial effects. These agents could serve as antibiotics or food preservation. Therefore, the aim of the bachelor thesis was to characterize the strain *Bacillus mycooides* PT89 to test its antagonistic activity and to explore the nature of substance responsible for the inhibitory effects. MALDI-TOF mass spectrometry was used to confirm correct strain identification. The biochemical profile of this strain was determined using the API 50 CHB kit. Antimicrobial activity of cell free supernatants from aerobically and anaerobically grown culture of *B. mycooides* PT89 was tested by agar well diffusion method against potential pathogenic and food-spoilage bacteria. After cultivation, the sensitivity of indicator strains manifested itself with inhibition zone around the well and its diameter was measured in millimetres. The nature of the antimicrobial compound was examined using supernatants from anaerobically grown *B. mycooides* PT89. The supernatants were exposed to variety of enzymes, temperatures, pH and surfactants. Changes in antimicrobial activity were then monitored by agar diffusion method. Biochemical analysis showed the ability of *B. mycooides* PT89 to ferment a wide range of substrates with the production of organic acids. Antimicrobial activity was demonstrated against the highly pathogenic bacteria *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes*, that share lecithinase activity. It was found that anaerobic conditions (low redox potential) increase the antimicrobial activity of *B. mycooides* PT89. The inhibitory activity was totally lost by the treatment with proteinase K after 24h incubation, that suggest the proteinaceous nature of antimicrobial compound. It was also active in wide range of pH and stand treatments up to 100 °C for 10 min. Regarding these properties, it may be classified as a circular bacteriocin. This substance could be used in the food industry as food preservation. The strain *B. mycooides* PT89 could be also used as probiotic to modulate the gut microbiota or as a silage inoculum.

Keywords: *Bacillus*, antimicrobial activity, agar diffusion method, bacteriocins, antibiotics

4 Metodika	31
4.1 Charakterizace <i>B. mycooides</i> PT89	31
4.1.1 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	31
4.1.2 Stanovení metabolického profilu	32
4.2 Testování antimikrobiální aktivity <i>B. mycooides</i> PT89	33
4.2.1 Použité kmeny	33
4.2.2 Stanovení antimikrobiální aktivity	34
4.3 Charakterizace antimikrobiální látky	35
4.3.1 Vliv enzymů	35
4.3.2 Vliv pH	36
4.3.3 Vliv teploty	36
4.3.4 Vliv surfaktantů	36
5 Výsledky	37
5.1 Charakterizace <i>B. mycooides</i> PT89	37
5.1.1 MALDI-TOF MS	37
5.1.2 API 50 CHB	37
5.2 Testování antimikrobiální aktivity <i>B. mycooides</i> PT89	38
5.3 Charakterizace antimikrobiální látky	40
5.3.1 Vliv enzymů	40
5.3.2 Vliv pH	40
5.3.3 Vliv teploty	41
5.3.4 Vliv surfaktantů	42
6 Diskuze	43
7 Závěr	49
8 Literatura	50
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	59
10 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Bakteriální infekce se stávají velmi náročným globálním problémem, který ohrožuje lidské zdraví. Během posledních let vyvinuli vědci mnoho úsilí v boji proti těmto infekcím. Ovšem pomalé tempo vývoje nových antibiotik bohužel neodpovídá rychle rostoucímu problému rezistencí na klasická antibiotika. Počet multirezistentních patogenů, zejména *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter* spp., se neustále zvyšuje. Navíc rezistentní kmeny rychle získávají odolnost vůči novým syntetickým derivátům. Podstatné je tedy hledání alternativ ke kontrole rezistentních patogenů, tedy nových antimikrobiálních látek pro léčebné účely, jako například bakteriocinů. Kromě toho existuje poptávka po antimikrobiálních látkách a antagonisticky působících bakteriích pro použití v potravinářském a krmivářském průmyslu, kde mohou sloužit jako přírodní konzervační látky, či startovací kultury. V neposlední řadě jsou bakteriocin produkující organismy velice atraktivní pro použití jako probiotika, která napomáhají k zajištění optimálního složení střevní mikrobioty a předcházení vzniku střevních infekcí. Významným rodem bakterií, u kterého byla popsána produkce nejrozličnějších biologicky aktivních látek, včetně běžně využívaných antibiotik, je *Bacillus*. *Bacillus* spp. jsou grampozitivní sporulující bakterie ve tvaru tyčinek. Jsou prakticky všudypřítomné, ale ve vysokých počtech se nalézají především v půdě. Potenciál druhů *Bacillus* vylučovat různé sekundární metabolity s antimikrobiálními účinky je znám již více než 50 let. Mnohé z těchto sloučenin jsou stále významnější pro různé biotechnologické aplikace v lékařství, potravinářství a zemědělství. Široká škála antimikrobiálních látek, o kterých je známo, že jsou produkovány kmeny *Bacillus* spp., zahrnuje ribozomálně a neribozomálně syntetizované peptidy, a také polyketidy.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

2.1 Vědecká hypotéza

U mnoha zástupců rodu *Bacillus* byla popsána produkce farmakologicky významných biologicky aktivních metabolitů, především s antimikrobiální aktivitou. Lze tedy předpokládat, že i kmen *B. mycoides* PT89, izolovaný z vody rybníku Kanclíř (jižní Čechy), bude mít též schopnost produkovat některé antimikrobiálně působící látky.

2.2 Cíl práce

Cílem teoretické části práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o antimikrobiálně působících látkách produkovaných zástupci rodu *Bacillus*. Cílem experimentální části práce byla charakterizace *B. mycoides* PT89, testování antimikrobiální aktivity tohoto kmene a určení povahy sloučeniny zodpovědné za antagonistický účinek.

3 Literární rešerše

3.1 *Bacillus* spp.

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* a stal se významným zástupcem (typovým druhem) rozsáhlého a diverzifikovaného rodu *Bacillus*. Pro bakterie rodu *Bacillus* je charakteristická tvorba endospor uvnitř bakteriální buňky. Sporulace byla poprvé popsána Cohnem u *B. subtilis*, později také zakladatelem bakteriologie Robertem Kochem u patogenního druhu *B. anthracis*. Z důvodů nezvyklé odolnosti spor vůči chemickým a fyzikálním činitelům, vývojovému cyklu, všudypřítomnosti zástupců a patogenitě *B. anthracis* získal rod *Bacillus* na zájmu vědců, který setrvává i v současnosti (Slepecky & Hemphill 2006).

Taxonomické zařazení rodu *Bacillus*:

kmen Firmicutes

třída Bacilli

řád Bacillales

čeleď *Bacillaceae* (Ludwig et al. 2009).

Metody klasifikace a identifikace bakterií doznaly za posledních 100 let značné proměny. Přes metabolickou a fenotypovou charakterizaci, numerickou analýzu fenotypových dat, DNA-DNA hybridizaci (DDH) a stanovení % G+C, po sekvenování genu pro 16S rRNA a multilokusovou sekvenční analýzu (MLSA), až k zavedení sekvenování kompletních genomů. To vede k neustálým změnám v taxonomickém zařazení *Bacillus* spp., kdy v květnu 2004 čítal rod 90 druhů, v roce 2009 již kolem 140 druhů a na počátku roku 2017 už dokonce 318 druhů. Je tedy zřejmé, že taxonomické přeměny rodu ještě zdaleka nejsou u konce (Logan & De Vos 2015; Thompson et al. 2015; Fan et al. 2017). Na základě zavedení sofistikovanějších analytických metoda neustálý příliv nově popsaných druhů Zeigler et Perkins (2015) uvádějí, že rod *Bacillus* nyní představuje 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 se spojují v řád Bacillales. Mnoho původních *Bacillus* spp. tito

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. amyloliquefaciens*, *B. aerophilus*, *B. pumilis*, *B. atropheus*, *B. licheniformis* a další). Bhandari et al. (2013) dokonce navrhuje, aby byl rod *Bacillus* vyhrazen pouze pro druhy, které náleží do těchto dvou skupin. Všechny ostatní by měly být dle autorů převedeny do jiných rodů.

3.1.1 Charakteristika

Bacillus spp. jsou pravidelné nebo mírně zakřivené tyčinky, vyskytující se jednotlivě, v párech, v řetězcích, a někdy také ve formě dlouhých vláken. Jedná se o organismy grampozitivní, grampozitivní pouze v raných stádiích růstu (gramvariabilní) nebo gramnegativní. Většina druhů je aerobní nebo fakultativně anaerobní, ale byly popsány i druhy striktně anaerobní. Až na výjimky, je koncovým příjemcem elektronu kyslík. Typický znak představuje tvorba jedné endospory uvnitř buňky, vysoce odolné vůči různým nepříznivým podmínkám – teplota, záření, desinfekční prostředky a vysušení. Velikost a morfologie kolonií jsou velice variabilní. Liší se nejen mezi druhy, ale také mezi jednotlivými kmeny téhož druhu (Logan & De Vos 2015). Kromě některých, produkují *Bacillus* spp. enzym katalázu. 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 kyselé pH 3,0-4,0. Značné rozdíly bacily vykazují i v optimálních teplotních podmínkách pro růst, termofilním vyhovují teploty v rozmezí od 45 °C do 70 °C nebo i vyšší, psychofilní bakterie rostou v teplotách od -5 °C do 25 °C (Goldman & Green 2015). Převážná většina druhů je mezofilní s teplotním optimem mezi 25 °C a 40 °C, typicky kolem 30 °C, s minimem 5-20 °C a maximem 35-55 °C (Logan & De Vos 2015).

Povrchové struktury *Bacillus* spp. tvoří S-vrstva, kapsula, bičíky, buněčná stěna a cytoplazmatická membrána. S-vrstva se skládá z proteinových nebo glykoproteinových podjednotek a v rámci kmenů se liší molekulovou hmotností (40-200 kDa), stupněm glykosylace podjednotek a geometrií mřížky (Slepecky & Hemphill 2006). Kapsula chrání mikrobiální buňky před rozpoznáním imunitním systémem a fagocytózou. U většiny druhů jsou tvořeny polysacharidy, výjimkou je poly- γ -D-glutamová (PGA) kapsula *B. anthracis* (Wen & Zhang 2015). 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. mycoides* jsou nepohybliví, zatímco většina kmenů *B. cereus* je pohyblivá (Logan & De Vos 2015). Nezbytnou a specifickou složku buněčné stěny téměř všech bakterií představuje peptidoglykan (murein), jehož hlavní funkcí je chránit integritu buňky, dále přispívá k udržování definovaného tvaru buňky a slouží jako lešení pro ukotvení dalších složek buněčné stěny, což jsou proteiny a kyselina teichová. Glykanové řetězce v peptidoglykanu bacilů (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*) mají průměrnou délku řetězce mezi 50 a 250 disacharidovými jednotkami, naproti tomu glykanové řetězce *Staphylococcus aureus* jsou mnohem kratší, s průměrnou délkou řetězce 18 disacharidových jednotek (Vollmer et al. 2008).

3.1.1.1 Životní cyklus

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 & De Vos 2015).

Životní cyklus sporotvorných bacilů se skládá ze tří různých po sobě následujících fyziologických procesů, a to vegetativního růstu, sporulace a klíčení. Vegetativní růst 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 (AMP) 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.

Tvorba endospor (sporulace) je úzce spojena s buněčným cyklem. Začíná na konci exponenciální (logaritmické) růstové fáze přičemž spouštěči procesu bývají nejčastěji faktory jako nedostatek živin, zejména uhlíku a dusíku, nebo rostoucí hustota bakteriální populace (Logan & De Vos 2015). 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, tedy vznik protoplastu obklopeného vnější a vnitřní membránou. Nakonec mateřská buňka lyzuje za uvolnění zralé spory. Takto vytvořené spory jsou považovány za nejvíce odolnou formu života na planetě (Levin & Grossman 1998; De Hoon et al. 2010). Spory mohou po dlouhá léta přežívat ve stavu dormance, ale pokud přijde vhodný stimul, vrací se během pár minut k aktivnímu růstu v procesu zvaném klíčení (Setlow 2003). S procesem sporulace může být také spojena produkce biologicky aktivních látek. Příkladem je *B. thuringiensis*, který během sporulace syntetizuje insekticidně působící proteiny, tzv. parasporální krystaly. Tyto toxiny jsou vysoce specifické a účinkují vždy proti úzkým skupinám hmyzu. Pro obratlovce a rostliny jsou neškodné (Bravo et al. 2007).

3.1.1.2 Požadavky na živiny

Navzdory velké diverzitě rodu, většina *Bacillus* spp. nemá problémy s růstem na běžných kultivačních médiích, jako jsou živný agar a trypton sójový agar. Větší část roste také na krevním agaru. Nicméně, některé izoláty, zejména ty z oligotrofních prostředí, vyžadují odlišné složení média. Například kmeny *Bacillus thuringiensis* izolované z půdy v Antarktidě dobře rostou na *Bacillus fumarioli* agaru. Až na výjimky využívají bacily glukózu a/nebo jiné fermentovatelné cukry jako jediný zdroj uhlíku a energie. *B. fusiformis*

utilizuje acetát, citrát, formiát, laktát a sukcinát, namísto glukózy. *Bacillus* spp. mohou využívat anorganické i organické zdroje dusíku. Mnoho druhů využívá jako jediný zdroj dusíku amonnou sůl, široce jsou využívány aminokyseliny a některé kmeny mohou využít močovinu. Bylo zjištěno, že leucin, threonin a valin jsou nezbytné pro růst a produkci emetického toxinu u *B. cereus* (Logan & De Vos 2015).

3.1.1.3 Výskyt

Bacily jsou prakticky všudypřítomné. Nejčastěji bývají izolované z půdy nebo z prostředí přímo či nepřímo kontaminovaných půd. Ve vysokých počtech se ale také vyskytují ve vodě, potravinách a klinických vzorcích. Většina druhů rodu *Bacillus* je považována za bakterie s malým patogenní potenciálem, či zcela nepatogenní a jen zřídka bývají spojovány s onemocněním lidí nebo zvířat (Logan & De Vos 2015). Výjimku tvoří *B. anthracis*, původce anthraxu a *B. cereus*, který je zodpovědný za dva typy alimentárního onemocnění: emetický a průjemový syndrom. Do souvislosti s otravami jídlem a oportunními infekcemi je dáváno i několik dalších druhů např. *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* a *B. thuringiensis*. Jedná se ovšem o ojedinělé případy (Logan & De Vos 2015). Přítomnost *Bacillus* spp. bývá 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* ssp. *toyoi* s probiotickými vlastnostmi se pro změnu využívá jako krmné aditivum (Lodemann et al. 2008).

3.1.2 *Bacillus mycoides*

Druh *Bacillus mycoides* poprvé popsal Flügge v roce 1886. Druhový název „mycoides“ byl odvozen od vzhledu kolonií připomínajících kolonie plísní (Di Franco et al. 2002). *B. mycoides* se řadí mezi příbuzné druhy skupiny *Bacillus cereus*. 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 řetízcích. 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 & 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 et al. 2015).

3.1.3 *Bacillus weihenstephanensis*

Bacillus weihenstephanensis byl poprvé izolován ze vzorků pasterovaného mléka v roce 1998. Patří stejně jako *B. mycooides* do skupiny *Bacillus cereus* (Logan & De Vos 2015). 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. V roce 2018 bylo provedeno porovnání sekvencí kompletních genomů typového kmene druhu *B. weihenstephanensis* a typového kmene *B. mycooides*. Na základě výsledků analýzy byl *B. weihenstephanensis* reklasifikován a sloučen s *B. mycooides* do jednoho druhu. V současnosti je tedy považován za heterotypické synonymum druhu *B. mycooides* (Liu et al. 2018).

3.2 Antimikrobiální látky produkované *Bacillus* spp.

Látky s nepříznivými účinky na mikroorganismy se nazývají antimikrobiální: buď pouze zastavují rozmnožování mikroorganismů (tzv. mikrobistatické látky) nebo je usmrcují (mikrobicidní látky). Jedná se o produkty primárního nebo sekundárního metabolismu. Metabolismus představuje organizovaný soubor biochemických reakcí, jež jsou na sobě funkčně závislé. Tyto reakce zajišťují buňkám dostatečné množství energie a stavebního materiálu pro veškeré životní projevy. Dle druhu reakčních mechanismů rozlišujeme procesy katabolické, při kterých se vytváří energie rozkládáním živin, a procesy anabolické naopak za spotřeby energie syntetizují látky složitější. 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 neustále 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 & Ortiz 2011).

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

3.2.1 Primární metabolity s antimikrobiální aktivitou

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 (fermentaci). Fermentačním metabolismem těchto bakterií se meziprodukty pyruvát a acetyl-CoA přeměňují na konečné produkty. Těmi jsou laktát, acetát, mravenčan, etanol, oxid uhličitý, acetoin a z něho vznikající 2,3-butanediol. Všechny uvedené sloučeniny vykazují antimikrobiální účinky. Z výsledků

experimentů na kmenech druhu *B. cereus* je zřejmé, že výše uvedené produkty, kromě mravenčanu, vznikají i během aerobní kultivace, ovšem v odlišném množství. Dochází k vysoké produkci výhradně acetátu, množství vyprodukovaného laktátu je podstatně nižší oproti anaerobním podmínkám a etanol se tvoří jen ve stopovém množství (Ramos et al. 2000; Rosenfeld et al. 2005).

3.2.2 Sekundární metabolity s antimikrobiální aktivitou

Mikrobiální sekundární metabolity jsou nízkomolekulární produkty sekundárního metabolismu, které jsou obvykle produkovány na počátku stacionární fáze (idiofáze) růstu mikroorganismů. Mají různorodé struktury a jejich syntéza vychází z intermediátů (aminokyselin, cukrů, mastných kyselin a dalších), které kondenzují do komplexních struktur prostřednictvím definovaných biochemických pochodů (Sanchez & 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 původně navrženy tak, aby bakteriím usnadňovaly přežití ve svém přirozeném prostředí (Stein 2005; Chaabouni et al. 2012).

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

3.2.2.1 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou univerzální složkou 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 nebo mikrobicidní účinek vůči grampozitivním (G+) a gramnegativním (G-) bakteriím, houbám, některým parazitům a virům. Jeden z prvních AMP byl popsán v roce 1940 (Srivastava et al. 2009) kolektivem Hotchkiss et Dubos. Z půdní bakterie *Bacillus brevis* izolovali vysoce baktericidní látku gramicidin. Ta působí nejen vůči bakteriím, ale je schopná destabilizovat cytoplazmatické membrány savčích buněk.

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 AMK. Ve většině případů se vyskytují ve formě šroubovic, tzv. α -helixů, β -skládaných listů a smyček nebo jejich kombinací. Převážně se jedná o amfipatické molekuly, kladně nabitě, mohou být i záporně nabitě nebo neutrální. Kladně nabitě peptidy jsou elektrostaticky přitahovány k negativně nabitému povrchu mikrobiální membrány. Hlavním mechanismem účinku AMP je porušení struktury cytoplazmatické membrány tvorbou pórů, což vede k buněčné smrti. Mohou ale také narušovat funkci některých enzymů a nukleových kyselin (Sadredinamin et al. 2016; Ciumac et al. 2019).

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 & Yousef 2018).

3.2.2.1.1 Ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy (bakteriociny)

Bakteriociny jsou malé, ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy produkované bakteriemi. Jedná se o rozsáhlou skupinu látek proteinové povahy s řadou biologických aktivit, 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 jiné 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. (Snyder & Worobo 2014; Hegarty et al. 2016). Produkční organismy se samozřejmě musí chránit před působením vlastních bakteriocinů. Toho je dosaženo produkcí specifických imunitních proteinů (Deegan et al. 2006).

Cílem produkčních kmenů je získat výhodu v konkurenčním prostředí a odhaduje se, že až 99 % bakterií 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. V laboratořích bývají podmínky kultivace optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co možná nejvyšší produkce. Takové koncentrace pak působí na testované organismy baktericidně. V přirozených podmínkách však mohou být úrovně exprese příliš nízké, než aby měly na konkurenty baktericidní účinek, nebo bakteriocin samotný působí spíše bakteriostaticky (Snyder & Worobo 2014). Chikindas et al. (2018) dokonce uvažují, že regulace různých procesů v rámci mezibuněčné komunikace 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. inhibicí quorum sensig) 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, ta se ale věnují zejména bakteriocinům produkovaným bakteriemi mléčného kvašení (BMK, Perez et al., 2018). Proto Zhao et Kuipers (2016) navrhují pro ribozomálně syntetizované AMP bacilů upravené klasifikační schéma, ve kterém je dělí do tří hlavních tříd (viz Tabulka 1).

Tabulka 1. Návrh klasifikačního schéma bakteriocinů *Bacillus* spp. Upraveno podle Zhao et Kuipers (2016).

Návrh klasifikace	Příklady
Třída I. Posttranslačně modifikované peptidy	
<i>Podtřída I.1. Lanthipeptidy</i>	Subtilin, mersacidin, cerecidin, amylolicin, lichenicidin
<i>Podtřída I.2. Cirkulární peptidy</i>	Pumilarin, amylocyklicin
<i>Podtřída I.3. Saktipeptidy</i>	Subtilosin A, thuricin H, thuricin CD
<i>Podtřída I.4. Lineární azol-obsahující peptidy</i>	Plantazolicin A
<i>Podtřída I.5. Thiopeptidy</i>	Thiociliny
<i>Podtřída I.6. Glykociny</i>	Sublacin 168
<i>Podtřída I.7. Laso peptidy</i>	Makrocín J25
Třída II. Nemodifikované peptidy	
<i>Podtřída II.1. Pediocin-like peptidy</i>	Koagulin
<i>Podtřída II.2. Ostatní nemodifikované peptidy</i>	Lichenin, cerein, cereucin V
Třída III. Velké proteiny	Megaciny, Koliciny

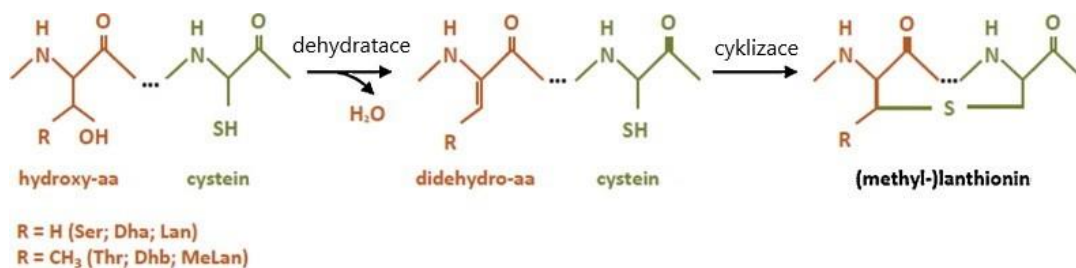
3.2.2.1.1.1 Třída I: Ribozomálně syntetizované a posttranslačně modifikované peptidy (RiPP)

Tato třída se skládá z AMP o velikosti menší než 10 kDa, které jsou ribozomálně syntetizovány a postupují posttranslační modifikace (PTM) prekurzorového peptidu. Na základě rozdílů v úpravách a struktuře lze třídu rozdělit do sedmi podtříd (Zhao & Kuipers 2016). Přesto sdílejí několik jednotných kroků v biosyntéze. Ta vždy začíná produkcí prekurzorového peptidu, který je tvořen vedoucím peptidem s N-koncem a C-terminální hlavní oblastí 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 & van der Donk 2016).

3.2.2.1.1.1.1 Podtřída I.1. Lanthipeptidy

Lanthipeptidy jsou ribozomálně syntetizované, polycyklické přírodní produkty, které jsou hojně produkovány G⁺ bakteriemi, včetně mnoha druhů skupiny *Bacillus*. Po ribozomální biosyntéze jsou seriny a threoniny lanthipeptidů dehydratovány za vzniku didehydroalaninů (Dha) a didehydrobutyrinů (Dhb). Následně se prostřednictvím SH-skupin cysteinů a dvojných vazeb dehydroaminokyselin tvoří thioetherové vazby lanthioninu a methylanthioninu (viz Obrázek 1). Mohou následovat další strukturní

modifikace, jako například hydroxylace asparaginu, či prolinu nebo epimerizační reakce (Dischinger et al. 2014).



Obrázek 1. Tvorba thioetherové vazby (methyl-)lanthioninu. Upraveno podle Dischinger et al. (2014).

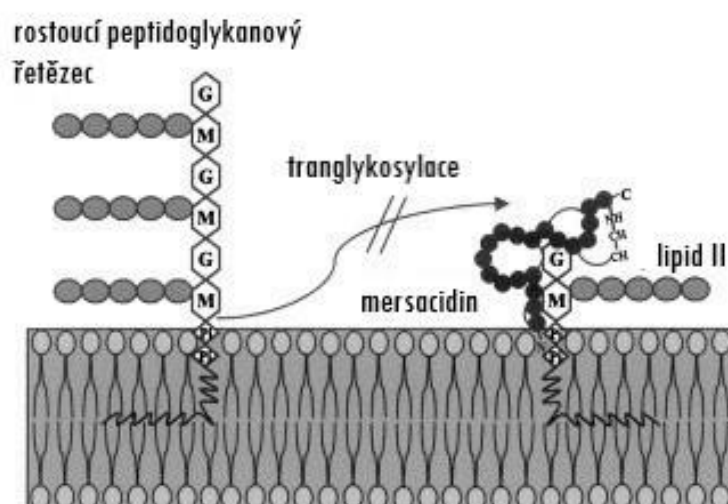
Vzhledem ke specifickému způsobu biosyntézy a antibakteriálním účinkům, byla tato skupina bioaktivních peptidů nejprve označována jako lantibiotika. V současnosti jsou díky značným rozdílům v biologické aktivitě označovány jako lanthipeptidy (Legala & Neubauer 2016). Převážná většina lanthipeptidů vykazuje antimikrobiální aktivitu proti G+ bakteriím, zejména taxonům příbuzným produkčnímu kmenu. Při působení proti G- bakteriím je potřeba antibiotický účinek podpořit destabilizačním činidlem vnější membrány, která je pro antibiotické peptidy neprostupná (Dischinger et al. 2014).

Lanthipeptidy lze rozdělit do čtyř skupin, kde hlavní rozdíl mezi skupinami I, II, III a IV představují PTM enzymy. U lanthipeptidů skupiny I jsou za proces PTM odpovědné dva odlišné enzymy: dehydratáza LanB a cykláza LanC, zatímco skupina II je modifikována bifunkčním enzymem LanM. Existují také dvoukomponentní lanthipeptidy sestávající ze dvou peptidů patřících do skupiny II, jelikož jsou zpracovány jedním modifikujícím enzymem LanM. U jiných lanthipeptidů (skupina III a IV) jsou dehydratační a cyklizační reakce katalyzovány multifunkčními enzymy: RamC / LabKC nebo LanL (Zhao & Kuipers 2016).

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+ 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 (Stein 2005; Caulier et al. 2019). Jeho

tvorba je adaptivní reakcí na změny v životním prostředí. Předpokládá se, že úlohou subtilinu je zvýšit přísun živin produkční bakterií odstraněním konkurenčních druhů a / nebo jiných kmenů téhož druhu (Abriouel et al. 2011).

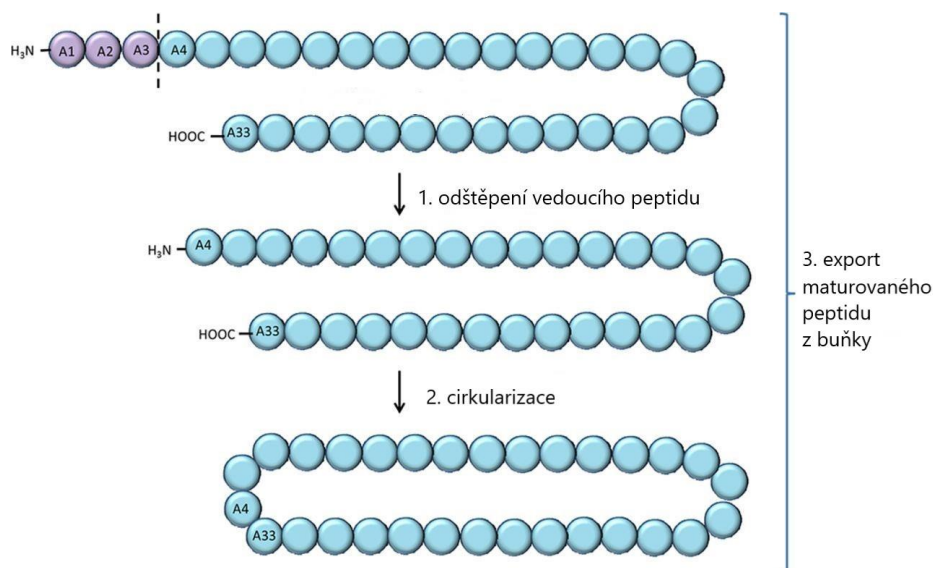
Lanthipeptidy skupiny II mají globulární strukturu. Zahrnují mersacidin produkovaný několika kmeny *B. amyloliquefaciens* v pozdní exponenciální a ve stacionární fázi. Tvoří jej 20 AMK a stejně jako subtilin se váže na lipid II. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny (viz Obrázek 2). Mersacidin účinkuje proti G⁺ patogenům a *in vivo* studie prokázaly významný účinek proti meticilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus* (MRSA), srovnatelný s antibiotikem vankomycinem (Appleyard et al. 2009; Zhao & 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⁺ bakteriím, včetně MRSA a vankomycin-rezistentnímu *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 (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 2. Lantibiotikum mersacidin se váže na disacharid-pyrofosfátovou skupinu lipidu II, čímž blokuje polymerizaci peptidoglykanu. Upraveno podle Hoffmann et al. (2002).

3.2.2.1.1.2 Podtřída I.2. Cirkulární (kruhové) peptidy

Cirkulární bakteriociny tvoří rodinu RiPP, 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. Cirkulární bakteriociny vznikají jako lineární prekurzory a až později dochází k cirkularizaci (viz Obrázek 3). 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, produkovaný 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 kmene *B. amyloliquefaciens* (Scholz et al. 2014).



Obrázek 3. Ilustrace tří kroků biosyntézy cirkulárního bakteriocinu. 1. Tri-aminokyselinový vedoucí peptid (fialový) prekurzorového peptidu je enzymaticky odštěpen (přerušovaná čára). 2. Proces cirkularizace 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 cirkulární 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).

3.2.2.1.1.3 Podtřída I.3. Saktipeptidy

Saktipeptidy představují nově vznikající třídu RiPP a vykazují různé biologické aktivity. Jejich společným znakem je intramolekulární thioetherová vazba nezbytná pro antimikrobiální aktivitu. Tato vazba spojuje atom síry cysteinového zbytku s α -uhlíkem akceptorové aminokyseliny, čímž se liší od lanthipeptidů, kde vazba probíhá přes β -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 & Marahiel 2013). Subtilosin A je produkován i dalšími kmeny *B. subtilis* a také některými kmeny *B. amyloliquefaciens* a *B. atropheus*. 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).

3.2.2.1.1.1.4 Podtřída I.4. Lineární azol-obsahující peptidy (LAP)

LAP jsou tvořeny lineárním řetězcem aminokyselin, do kterého se v různých kombinacích zabudovávají pětičetné heteroaromatické sloučeniny thiazoly a (methyl)oxazoly. Ty pocházejí z cysteinů a serinů/threoninů ribozomálně syntetizovaného prekurzorového peptidu (Arnison et al. 2013). Plantazolicin A, lineární dekacyklický přírodní produkt a jeho biosyntetický prekurzor plantazolicin B izolovaný z půdní bakterie *B. amyloxylophilus* FZB42 zastupují novou třídu LAP. Plantazolicin A je aktivní proti příbuzným G⁺ bakteriím, především proti původci antraxu, *B. anthracis*. U plantazolicin B antimikrobiální účinky potvrzeny nebyly (Wilson et al. 2015).

3.2.2.1.1.1.5 Podtřída I.5. Thiopeptidy

Thiopeptidy obsahují charakteristické makrocyclické jádro sestávající z několika thiazolů, dehydroaminokyselin a šestičetného dusíkového heterocyklu (Liao et al. 2009). Makrocycklus umožňuje thiopeptidům inhibovat růst bakteriálních buněk pomocí blokování syntézy ribozomálních proteinů. Jejich velký potenciál spočívá v inhibici multirezistentních G⁺ patogenů včetně MRSA, VRE a penicilin-rezistentnímu *Streptococcus pneumoniae* (PRSP). Malý účinek vůči G⁻ 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).

3.2.2.1.1.1.6 Podtřída I.6. 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 Cys⁷-Cys³⁶ a Cys¹⁴-Cys²⁹. Na poslední Cys²² je β-S-vazbou navázána molekula glukózy (viz Obrázek 4). Nedávná studie ukázala, že S-glykosylovaná část sublancinu je zásadní pro antimikrobiální aktivitu. Dále poukázala na to, že sacharid může

3.2.2.1.1.2 Třída II: Nemodifikované bakteriociny

Bakteriociny třídy II zahrnují malé (méně než 10 kDa), ribozomálně syntetizované, termostabilní a membránově aktivní lineární peptidy. Dělí se do dvou podtříd na pediocin-like peptidy a ostatní nemodifikované peptidy (Zhao & Kuipers 2016).

3.2.2.1.1.2.1 Podtřída II.1. Pediocin-like peptidy

Všechny bakteriociny této podtřídy obsahují stejnou N-terminální sekvenci – YGNGV, tzv. „pediocin box“ a jednu nebo dvě disulfidové vazby uvnitř řetězce (Ovchinnikov et al. 2016). Koagulin je pediocin-like peptid s antilisteriální aktivitou produkovaný bakterií *B. coagulans* I4. Je termostabilní a citlivý k proteázám. Vykazuje baktericidní a bakteriostatickou aktivitu vůči příbuzným i nepříbuzným G+ bakteriím, jako jsou *Leuconostoc*, *Oeonococcus*, *Listeria*, *Pediococcus* a *Enterococcus* (Abriouel et al. 2011).

3.2.2.1.1.2.2 Podtřída II.2. Ostatní nemodifikované peptidy

Do této podtřídy spadá 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 skupinou této podtřídy 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 záhadou. 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.

3.2.2.1.1.3 Třída III: Velké antimikrobiální proteiny

Třída III zahrnuje velké (větší než 10 kDa), termolabilní proteiny s antimikrobiální aktivitou, jako jsou megaciny a koliciny. Genové klastry kolicinů byli 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).

3.2.2.1.2 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 humání 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 & 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 β -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 (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 LLDLLDL sekvence, která vytváří laktonový kruh spojený s β -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 *Listeria monocytogenes* (Falardeau et al. 2013). Produkce surfaktinů je široce rozšířena mezi kmeny *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* a *B. amyloliquefaciens* (Sansinenea & Ortiz 2011).

3.2.2.2 Antimikrobiální nebílkovinné metabolity

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 (*Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* a *S. aureus*). Účinek je dán inhibicí proteosyntézy. Další polyenová antibiotika difficidin a oxydifficidin, produkované 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 (C₁₀) a seskviterpeny (C₁₅). 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⁺ 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 bakalářské práce se zabývá charakterizací *Bacillus mycoides* PT89, testováním jeho antimikrobiální aktivity a studiem povahy antimikrobiálně aktivní látky, která je tímto kmenem produkována.

Kmen PT89 byl izolován z rybníku Kanclíř (jižní Čechy) v rámci studie Salmonová et al. (2018) a identifikován srovnávací analýzou sekvence genu pro 16S rRNA. Pro další studium byl tento kmen vybrán na základě výsledků diplomové práce Karolíny Holečkové (2018), která se zabývala testováním antimikrobiální aktivity bakterií izolovaných z bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*) a okolní vody.

Práce je složena z několika na sebe navazujících experimentů. V první části byla u *B. mycoides* PT89 analyzována hmotnostní spektra ribozomálních proteinů metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a stanoven metabolický potenciál pomocí biochemické soupravy API 50 CHB. V druhé části práce byla testována antimikrobiální aktivita tohoto kmene agarovou difuzní metodou a v poslední etapě byla studována povaha látky zodpovědné za antimikrobiální účinky, působením různých enzymů, surfaktantů, teplot a hodnot pH.

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 *B. mycoides* PT89

4.1.1 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Bacillus PT89 byl již dříve identifikován jako druh *B. mycoides*. Pro potvrzení byla také použita metoda MALDI-TOF MS (Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem), která je založena na analýze ribozomálních proteinů.

Pro analýzu byla použita kultura narostlá 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 axenické kultury byl převeden do 1,5 ml 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 μ l 70% kyseliny mravenčí, důkladně promícháno a přidáno 15 μ l 100% acetonitrilu a vzorek byl centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 2 minut. Jeden mikrolitr supernatantu byl pomocí pipety převeden na čistou MTP 384 MALDI destičku (Bruker Daltonik GmbH). Po zaschnutí byl každý vzorek překryt 1 μ l HCCA matrice (nasycený roztok kyseliny α -kyano-4-hydroxycinnamové 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 Stanovení metabolického profilu

Metabolický profil kmene *B. mycooides* PT89 a typových kmenů *B. mycooides* DSMZ 2048 a *B. mycooides* (*weihenstephanensis*) DSMZ 11821 byl stanoven pomocí komerčně dostupné biochemické soupravy API 50 CHB (bioMérieux). Jedná se o standardizovaný systém obsahující 49 biochemických testů, určených 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 červeň 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.

Do sterilní mikrozkušavky byly 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 denzitě 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

4.2 Testování antimikrobiální aktivity *B. mycooides* PT89

4.2.1 Použité kmeny

Antimikrobiální aktivita kmene *B. mycooides* PT89 byla testována proti potenciálně patogenním mikroorganismům a bakteriím způsobujícím kažení potravin a krmiv.

Pro testování bylo použito 15 kmenů bakterií skupiny *B. cereus*, izolovaných z krmiva pro psy, 1 kmen *B. mycooides* ze senáže a 1 kmen *Clostridium perfringens*, izolovaný z medu. Dále byl pro testování použit 1 kmen *B. aerophilus* a 1 kmen *B. thuringiensis*, oba izolované z vody rybníku Kanclíř odkud pochází i *B. mycooides* PT89. Testován byl dále 1 kmen *B. mycooides* a 1 kmen *B. subtilis*, izolované z vody okolních rybníků (Veselí, Hejtman). Též byly testovány G- bakterie *Escherichia coli* z trávicího traktu člověka a *Salmonella* sp. izolovaná z masa. Taxonomické zařazení, označení kmenů a jejich původ jsou uvedeny v příloze v Tabulce 1.

Pro testování byly použity také sbírkové kmeny ze sbírky CCM (Česká sbírka mikroorganismů), a to *B. cereus* CCM 2010, *B. fusiformis* CCM 4609, *Cl. difficile* CCM 3593, *Cl. perfringens* CCM 4435, *Enterobacter aerogenes* CCM 7797 a *Moraxella canis* CCM 4590. Dále kmeny ze sbírky DSMZ (Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury), a to *B. mycooides* DSM 2048, *B. weihenstephanensis* DSM 11821, *Cl. butyricum* DSM 10702, *Cl. clostridioforme* DSM 933, *Cl. perfringens* DSMZ 11778, *Cl. tertium* DSM 2485, *Propionibacterium acnes* DSMZ 1897 a *Serratia marcescens* DSMZ 30121. Také byly testovány 3 kmeny ze sbírky ATCC (Americká sbírka typových kultur), *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Byly použity i kmeny ze sbírky KMVD (Sbírka Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky), a to *E. coli* C7050 KMVD a *Enterococcus faecalis* KMVD. Taxonomické zařazení a původ sbírkových kmenů jsou uvedeny v příloze v Tabulce 2.

4.2.2 Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita *B. mycooides* PT89 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 byl *B. mycooides* PT89 kultivován v Trypton sójovém bujónu (Oxoid) při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin v aerobních i anaerobních podmínkách. Pro anaerobní kultivaci bylo kultivační médium připraveno metodou dle Hungate et Macy (1973). 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 kmen (viz Tabulka 2) 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 indikátorového kmene a pomocí sklopné pipety zalit 20 ml připraveného agaru. 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 difuze supernatantu do média. Po uplynutí doby byly organismy kultivovány při teplotě optimální pro daný druh (viz Tabulka 2). Antimikrobiální aktivita byla testována ve 3 opakováních a hodnocena jako průměr inhibičních zón v mm po 24-48 h inkubace, v závislosti na indikátorovém organismu.

Tabulka 2. Kultivační podmínky pro testované skupiny mikroorganismů.

Médium	Teplota	O ₂	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>Salmonell, E. coli, Serratia</i>
			48 h	<i>Clostridium, Enterobacter, Enterococcus, Propionibacterium, Staphylococcus</i>
Trypton sójový bujón (Oxoid)	30 °C	anaerobně	24 h	skupina <i>Bacillus cereus</i>
		aerobně		ostatní druhy rodu <i>Bacillus</i>
		anaerobně	48 h	<i>Moraxella, Micrococcus</i>
Brain-heart infusion agar (Merck)	37 °C	anaerobně	48 h	<i>Listeria</i>

4.3 Charakterizace antimikrobiální látky

Pro všechny následující experimenty byl použit supernatant, připravený dle výše zmíněného protokolu, z kultury narostlé anaerobně v Trypton sójovém bujónu (Oxoid) při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin

Supernatant byl následně vystaven působení různých enzymů, surfaktantů, hodnot pH a teplot. Změny v antimikrobiální aktivitě byly sledovány prostřednictvím agarové difúzní metody. Z důvodu vysoké citlivosti byl jako indikátorový organismus zvolen kmen *Bacillus 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 chemické povahy antimikrobiální sloučeniny produkované *B. mycoides* PT89, byl supernatant vystaven působení proteolytických enzymů pepsinu, proteinázy K, α -chymotrypsinu a trypsinu (vše Sigma-Aldrich) a také enzymu lysozymu (Sigma-Aldrich), který štěpí glykoproteiny.

Supernatant byl rozdávkován do sterilních mikrozkušavek a do každé byl přidán 1 z enzymů v takovém množství, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 1 mg/ml supernatantu. Pro optimální aktivitu pepsinu, bylo sníženo 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. Vliv enzymů na antimikrobiální aktivitu byl testován po 1 hodině a 24 hodinách inkubace s tím, že před testováním byla hodnota pH supernatantu s pepsinem vždy upravena 1M roztokem hydroxidu sodného na hodnotu původní. Jako pozitivní kontrola posloužil samotný supernatant inkubovaný 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). Antimikrobiální aktivita byla testována agarovou difúzní metodou ve třech opakováních.

4.3.2 Vliv pH

Pro stanovení vlivu pH na antimikrobiální aktivitu byl supernatant upraven na hodnoty v rozmezí 2 až 9. Požadovaných hodnot pH bylo dosaženo přidavkem 1M roztoku hydroxidu sodného nebo ledové kyseliny octové. Současně byla testována antimikrobiální aktivita neupraveného supernatantu (pH 6,1), jako pozitivní kontrola. Pro ověření, zda samotné pH nepůsobí inhibičně vůči indikátorovému kmenu, byly otestovány vzorky destilované vody, upravené na obdobné hodnoty pH jako supernatant (negativní kontrola).

4.3.3 Vliv teploty

Pro analýzu termostability antimikrobiálně aktivní látky byly supernatanty vystaveny různým teplotám po definovanou dobu, jak je uvedeno v Tabulce 3. Následně u nich byl agarovým difúzním testem zjišťován rozsah reziduální inhibiční aktivity vůči indikátorovému kmenu.

Tabulka 3. 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	

4.3.4 Vliv surfaktantů

Supernatant 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 dH₂O).

5 Výsledky

5.1 Charakterizace *B. mycooides* PT89

5.1.1 MALDI-TOF MS

Analýza MALDI-TOF MS byla použita k potvrzení druhové identifikace kmene PT89. Míra spolehlivosti identifikace je hodnocena tzv. skóre, kdy maximální spolehlivosti je dosaženo hodnotou skóre 3 a hodnota skóre $\geq 2,0$ svědčí o spolehlivé identifikaci mikroorganismu na úrovni druhu. V Tabulce 4 jsou uvedeny referenční kmeny, které se hmotnostním spektrem ribozomálních proteinů nejvíce shodují s testovaným kmenem. Výsledná skóre dosahují hodnot nad 2, což poukazuje na spolehlivou druhovou identifikaci. Na základě provedené analýzy je tedy možné potvrdit, že kmen PT89 patří do skupiny druhu *Bacillus mycooides*. Výsledné hmotnostní spektrum bude také v budoucnu použito pro srovnání se spektry neprodukčních kmenů stejného druhu.

Tabulka 4. Výsledky druhové identifikace *Bacillus* PT89 analýzou MALDI-TOF MS.

Vzorek	Organismus	Hodnota skóre	Organismus	Hodnota skóre
PT89	<i>Bacillus mycooides</i>	2,284	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	2,148

5.1.2 API 50 CHB

Metodou API 50 CHB byl porovnán biochemický profil *B. mycooides* PT89 s kmeny ze sbírkových kultur *B. mycooides* DSMZ 2048 a *B. mycooides (weihenstephanensis)* DSMZ 11821. Z výsledku testu (viz Obrázek 6) je patrné, že *B. mycooides* PT89 odpovídá svým biochemickým profilem kmenu *B. mycooides (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. mycooides* 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 6. Biochemické profily *B. mycooides* PT89, *B. weihenstephanensis* DSMZ 11821 a *B. mycooides* DSMZ 2048, který navíc využívá D-sacharózu.

5.2 Testování antimikrobiální aktivity *B. mycooides* PT89

Inhibiční aktivita *B. mycooides* PT89 byla pozorována proti několika G⁺ bakteriím, včetně významných patogenů a mikroorganismů působících kažení potravin a krmiv, jako jsou *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a *Listeria monocytogenes*. Výsledky testování jsou uvedeny v Tabulce 5. Nejvyšší citlivost vykazoval kmen *L. monocytogenes* ATCC 7644 s průměrem inhibičních zón 22,5 mm. Vysoce citliví byli také zástupci skupiny *B. cereus* (*B. cereus*, *B. mycooides* a *B. thuringiensis*). Průměry inhibičních zón dosahovaly až 19 mm. V rámci této skupiny nebyl nalezen žádný rezistentní kmen. O něco menší inhibiční zóny byly pozorovány u bakterie *Cl. perfringens*, průměrně 10,67 mm. Citlivé byly všechny divoké kmeny. Sbírkový kmen *Cl. perfringens* DSMZ 11778 byl inhibován pouze supernatantem z anaerobně pěstované kultury a kmen *Cl. perfringens* CCM 4435 byl rezistentní. Vyšší inhibiční aktivita byla pozorována u supernatantů z kultury narostlé v anaerobních podmínkách. Růst žádné z testovaných G⁻ bakterií inhibován nebyl.

Tabulka 5. Výsledky testování antimikrobiální aktivity *B. mycoides* PT89 (vyjádřeno jako aritmetický průměr inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka, stanovení bylo provedeno ve třech opakováních).

Gram-pozitivní	PT89 AE	PT89 ANAE	Gram-pozitivní	PT89 AE	PT89 ANAE
<i>Bacillus cereus</i> 1CP o ₂	11,00 ± 0,00	11,67 ± 0,47	<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	16,50 ± 0,50	18,50 ± 0,50
<i>Bacillus cereus</i> 1CP	10,67 ± 0,47	12,00 ± 0,00	<i>Bacillus fusiformis</i> CCM 4609	R	R
<i>Bacillus cereus</i> 2CP o ₂	10,67 ± 0,47	11,67 ± 0,47	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048	11,00 ± 0,00	12,33 ± 0,47
<i>Bacillus cereus</i> 3CP o ₂	9,67 ± 0,47	11,00 ± 0,00	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> DSM 11821	8,83 ± 0,24	13,00 ± 0,82
<i>Bacillus cereus</i> 3CP	11,00 ± 1,41	12,00 ± 0,82	<i>Clostridium butyricum</i> DSM 10702	R	R
<i>Bacillus cereus</i> 4CP o ₂	11,00 ± 0,00	11,33 ± 0,47	<i>Clostridium clostridioforme</i> DSM 933	R	R
<i>Bacillus cereus</i> 5CP o ₂	11,00 ± 0,82	12,33 ± 0,47	<i>Clostridium difficile</i> CCM 3593	R	R
<i>Bacillus cereus</i> 5CP	10,00 ± 0,82	13,00 ± 1,41	<i>Clostridium perfringens</i> DSMZ 11778	R	8,67 ± 0,47
<i>Bacillus cereus</i> 6CP o ₂	10,33 ± 0,47	11,33 ± 0,47	<i>Clostridium perfringens</i> CCM 4435	R	R
<i>Bacillus cereus</i> 6CP	11,67 ± 0,94	11,67 ± 0,94	<i>Clostridium tertium</i> DSM 2485	R	R
<i>Bacillus thuringiensis</i> 9CP o ₂	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	<i>Enterococcus faecalis</i> KMVD	R	R
<i>Bacillus cereus</i> 10CP o ₂	10,00 ± 0,00	10,67 ± 0,47	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	21,00 ± 0,00	22,5 ± 2,5
<i>Bacillus cereus</i> 10CP	9,67 ± 0,47	13,00 ± 2,16	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	R	R
<i>Bacillus cereus</i> 12CP o ₂	10,67 ± 0,47	11,33 ± 0,47	<i>Propionibacterium acnes</i> DSMZ 1897	R	R
<i>Bacillus cereus</i> 12CP	10,00 ± 1,41	14,00 ± 2,83	Gram-negativní	PT89 AE	PT89 ANAE
<i>Clostridium perfringens</i> pk2bif	10,50 ± 0,50	12,00 ± 0,00	<i>E. coli</i> C7050 KMVD	R	R
<i>Bacillus mycoides</i> seba 1-3 2. rozbor	2,67 ± 3,78	10,67 ± 0,47	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	R
<i>Bacillus aerophilus</i> 2015010	R	R	<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 7797	R	R
<i>Bacillus mycoides</i> 2014004	15,50 ± 0,50	19,00 ± 0,00	<i>Moraxella canis</i> CCM 4590	R	R
<i>Bacillus thuringiensis</i> 2014013	R	15,50 ± 0,50	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076	R	R
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> 2015001	R	R	<i>Serratia marcescens</i> DSMZ 30121	R	R
Gram-negativní	PT89 AE	PT89 ANAE			
<i>E. coli</i>	R	R			
<i>Salmonella</i> sp.	R	R			

Pozn.: PT89 AE – *B. mycoides* PT89 kultivovaný aerobně, PT89 ANAE – *B. mycoides* PT89 kultivovaný anaerobně, R – rezistentní.

5.3 Charakterizace antimikrobiální látky

5.3.1 Vliv enzymů

Žádný z enzymů neměl po 1 hodině inkubace na aktivitu antimikrobiální látky vliv. Aktivita byla prokazatelně narušena až působením proteinázy K po 24 hodinách inkubace (viz Tabulka 6). Reziduální aktivita byla vypočtena, jako zbytková aktivita supernatantu vystaveného působení enzymu a teplotě oproti supernatantu vystaveného pouze daným teplotám.

Tabulka 6. Efekt enzymů na aktivitu antimikrobiální látky po 24 h inkubace.

Upravený supernatant	Reziduální aktivita (%)
Trypsin	100
α -Chymotrypsin	100
Proteinase K	0
Lysozyme	100
Pepsin	100

5.3.2 Vliv pH

Antimikrobiální aktivita byla prokázána v širokém spektru hodnot pH (viz Tabulka 7). Při hodnotě pH 5 se však aktivita oproti kontrole snížila zhruba o 30 %. Naopak při pH 3 a 2,2 se aktivita supernatantu významně zvýšila (o 60 %). Negativní kontrolou bylo prokázáno, že k hodnotě pH 3 je indikátorový kmen rezistentní. Při pH 2,2 byl ovšem indikátorový kmen inhibován i samotnou hodnotou pH, kdy byla naměřena průměrná inhibiční zóna o velikosti 16,70 mm.

Tabulka 7. Vliv pH na aktivitu produkované antimikrobiální látky ve srovnání s pozitivní kontrolou (vyjádřeno jako aritmetický průměr inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka).

pH	aktivita (Ø inh. zón ± SD)
2,2	> 30,00 ± 0,00
3	30,00 ± 0,00
4	18,00 ± 0,00
5	13,00 ± 0,00
7	19,00 ± 0,00
8,1	19,00 ± 0,00
9	18,00 ± 0,00

zelená – nárůst aktivity, žlutá – významný pokles aktivity

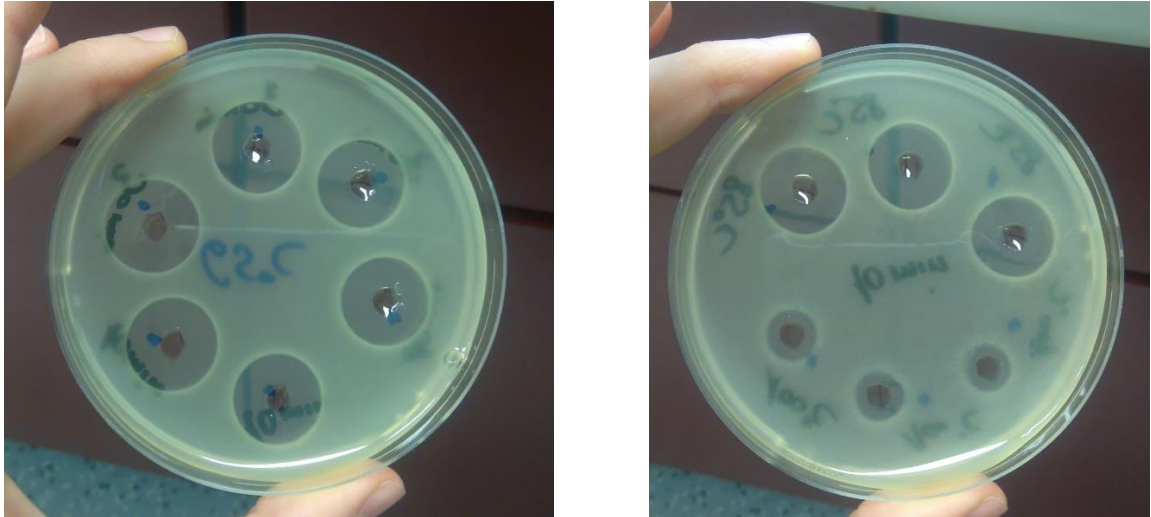
5.3.3 Vliv teploty

Nízké teploty -80 a -18 °C neměly na antimikrobiální aktivitu žádný vliv. Aktivita byla také zachována nebo jen zanedbatelně snížena (méně než 10 %) při teplotách a době působení 65 °C 60 min, 72 °C 30 min i při 85°C po dobu 10 min (viz Obrázek 7). K úplné inaktivaci došlo až při působení teplot 80 °C po dobu 60 min, 100 °C 30 min, včetně teploty 125 °C 15 min. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8. Reziduální aktivita byla vypočtena, jako zbytková aktivita supernatantu vystaveného působení daných teplot po určitou dobu oproti neupravenému supernatantu.

Tabulka 8. Termostabilita produkované antimikrobiální látky za různých podmínek.

Teplota (°C)	Doba působení (min)	Reziduální aktivita (%)
-80	60	100
-18	60	100
65	10	100
	30	98
	60	96
72	10	100
	30	96
	60	86
85	10	93
	30	70
	60	0
100	10	51
	30	0
	60	0
121	15	0

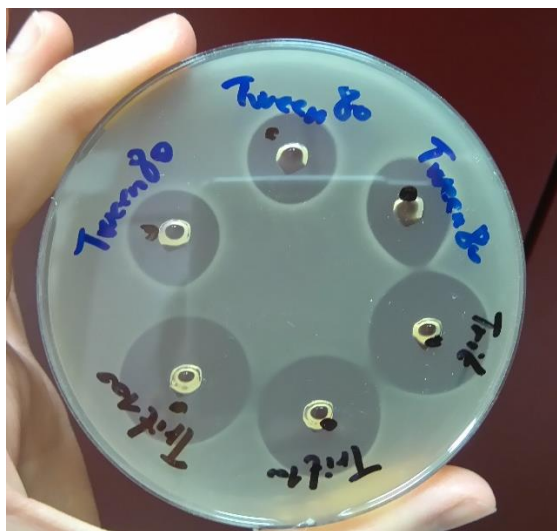
zelená – rezistentní, žlutá – částečná inaktivace, šedá – úplná inaktivace



Obrázek 7. Antimikrobiální aktivita supernatantu vystaveného tepelnému ošetření 65 °C po dobu 10 a 30 minut (vlevo) a aktivita po působení teploty 85 a 100 °C po dobu 10 minut (vpravo).

5.3.4 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 (viz Obrázek 8).



Obrázek 8. Antimikrobiální aktivita supernatantu vystaveného působení surfaktantů Triton™ X-100 a Tweenu 80 o 1% koncentraci.

6 Diskuze

Bacillus mycoides je grampozitivní, fakultativně anaerobní, sporulující bakterie ve tvaru tyčinek. Řadí se mezi druhy skupiny *Bacillus cereus*, ale na rozdíl od ostatních členů je považován za bakterii s velmi nízkým patogenním potenciálem. Vyskytuje se, stejně jako další zástupci rodu *Bacillus*, zejména v půdě, v prostředí přímo či nepřímo kontaminovaném půdou a v rhizosféře. Obecně jsou *Bacillus* spp. 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).

Prvním cílem praktické části bakalářské práce byla bližší charakterizace *B. mycoides* PT89. V rámci této práce byla analýzou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie potvrzena jeho druhová identifikace. Již dříve byl PT89 identifikován na základě sekvenování genu pro 16S rRNA, tato molekula ovšem nemá vždy dostatečnou diskriminační schopnost pro odlišení některých blízce příbuzných druhů a nižších taxonomických jednotek (poddruhů). To platí právě pro některé druhy skupiny *B. cereus* (Miller et al. 2018). Výsledky obou těchto metod vyšly shodně. V obou případech byl PT89 identifikován s obdobnou shodou jako *B. mycoides* nebo *B. weihenstephanensis*. Jak již bylo zmíněno v literární rešerši, *B. weihenstephanensis* je na rozdíl od *B. mycoides* schopen růstu již při chladničkových teplotách, netvoří rhizoidní kolonie a neumí utilizovat D-sacharózu. Přes mírné fenotypové rozdíly, byly na základě analýzy celých genomů tyto druhy sloučeny do jednoho druhu, *B. mycoides* (Liu et al. 2018; Logan & De 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 tohoto kmene pomocí soupravy API 50 CHB. Výsledný biochemický profil ukazuje, že *B. mycoides* PT89 je schopen fermentovat široké spektrum substrátů za produkce organických kyselin. Shodně s *B. weihenstephanensis* však neumí fermentovat D-sacharóru. Dané skutečnosti může být využito při hledání vhodné aplikace tohoto kmene, pomineme-li použití čisté antimikrobiální látky. Uplatněn by mohl být například jako inokulant při konzervaci krmiv.

Dalším cílem bakalářské práce bylo testování antimikrobiální aktivity *B. mycoides* PT89, vůči potenciálně patogenním bakteriím a bakteriím způsobujícím kažení potravin.

Antagonistická aktivita byla prokázána proti patogenním bakteriím skupiny *B. cereus*, *Listeria monocytogenes* a *Clostridium perfringens*. Ačkoliv byly již dříve v genomech několika kmenů *B. mycooides* detekovány genové klastry kódující antimikrobiální proteiny (Zhao et Kuipers 2016), doposud byla popsána antibakteriální aktivita pouze jediného kmene *B. mycooides*, 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, produkováný *B. mycooides* PT89, byl po 1 h inkubace rezistentní proti všem testovaným proteolytickým enzymům. Degradován byl až po 24 hodinách působení proteinázy K. 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, nicméně byly pozorovány výkyvy. Při hodnotě pH 5 došlo ke snížení aktivity o 30 %, zatímco při pH 3 byla aktivita navýšena o cca 60 %. V návaznosti na uvedené vlastnosti autoři navrhli jeho uplatnění 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 PT89 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 ± 0,0 mm, v případě aerobně kultivovaného *B. mycooides* PT89, 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. Vyššího inhibičního účinku bylo dosaženo při anaerobní kultivaci *B. mycooides* PT89, tento pokus ovšem ve výše zmíněné publikaci proveden nebyl. Antagonistická aktivita vůči *L. monocytogenes* je významnou vlastností testovaného kmene. 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).

Antagonisticky PT89 působil také proti patogenní bakterii *Cl. perfringens*, která je zodpovědná za různé formy střevních onemocnění (Petit et al. 1999). Citlivé byly všechny divoké kmeny, sbírkový kmen *Cl. perfringens* DSMZ 11778 byl inhibován pouze

anaerobně kultivovaným PT89 a kmen *Cl. perfringens* CCM 4435 byl rezistentní. To mohlo být způsobeno vysokou odolností daného kmene, případně nízkou koncentrací inhibiční látky v médiu. Labbe et Juneja (2017) uvádějí, že *Cl. perfringens* 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. 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. Dalším popsáním produkčním kmenem této skupiny je *B. pseudomycooides* DSM 12442. Basi-chipalu et al. (2015) u tohoto kmene prokázali produkci inhibiční látky, kterou pojmenovali pseudomycoicidin a identifikovali ji, jako nový bakteriocin patřící mezi lantibiotika. Při testování proti různým indikátorovým kmenům autoři zjistili, že je účinný proti širokému spektru G+ bakterií, jako je *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. a další. Aktivita proti G- bakteriím prokázána nebyla. Oproti tomu Ahern et al. (2003) izolovali z kmene *B. thuringiensis* B439 bakteriocin thuricin 439, látku aktivní pouze proti *B. cereus*, *B. thuringiensis* (bakteriím skupiny *B. cereus*) a *Listeria innocua*. Žádnou z dalších indikátorových G+ ani G- bakterií thuricin 439 nepotlačil.

V rámci této práce se prokázaly vysokou citlivostí k PT89 sbírkové i divoké kmeny druhu *B. cereus*. 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 & Sarkar 2016). Citlivé byly i další duhy skupiny *B. cereus* (*B. cereus*, *B. mycooides* a *B. thuringiensis*), sbírkové i divoké kmeny, u kterých dosahovaly průměry inhibičních zón až 19 mm. Nejvíce citlivý byl *B. mycooides* 2014004, izolovaný z vody rybníku Veselí, což je prostředí velmi blízké tomu, odkud pochází testovaný kmen. Může se tedy jednat o životní strategii bacilu PT89, kdy se produkcí antibakteriální látky snaží o potlačení konkurenčních bakterií. Inhibován byl také *B. thuringiensis* z vody rybníku Kanclíř, ovšem pouze anaerobně kultivovaným *B. mycooides* PT89. *B. subtilis* i *B. aerophilus*, izolované z vody rybníků Kanclíř a Hejtman, byli rezistentní. Stejně tak nebyl ovlivněn růst druhu *B.*

fusiformis ani dalších testovaných sbírkových bakterií (*Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* a *Propionibacterium acnes*). Také žádná z testovaných G- bakterií nebyla k produkované antimikrobiální látce 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). *B. mycooides* PT89 tedy účinkuje antagonisticky vůči blízkce příbuzným bakteriím skupiny *B. cereus* a také proti G+ 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. Lecitináza je také nazývána α -toxin a je považována za hlavní příčinu nekrózy buněk při plynné sněti, onemocnění způsobené *Cl. perfringens* (Actor 2012). Z tohoto důvodu budou jako indikátorové organismy pro testování antimikrobiální aktivity *B. mycooides* PT89 zvoleny i další druhy s lecitinázovou aktivitou.

Jak již bylo zmíněno výše, absence či přítomnost kyslíku v průběhu kultivace produkčního kmene měla vliv na míru antimikrobiální aktivity. Průměrné hodnoty inhibičních zón se pohybovaly při anaerobní kultivaci PT89 od $10,67 \pm 0,47$ mm do $22,5 \pm 2,5$ mm, zatímco u kultury narostlé za aerobních podmínek byly neměřeny průměrné velikosti zón v rozmezí od $2,67 \pm 3,78$ mm do $21,00 \pm 0,00$ mm. Rosenfeld et al. (2005) ve své studii porovnávali vegetativní růst fakultativně anaerobní bakterie *B. cereus*, blízkce příbuzné druhu *B. mycooides*, za aerobních a anaerobních podmínek. Prokázali, že v závislosti na dostupnosti kyslíku dochází ke změně koncentrací jednotlivých produktů metabolismu, jak je uvedeno výše v literární rešerši v kapitole: primární metabolity s antimikrobiální aktivitou. Na to navázali Zigha et al. (2006), kteří se zabývali proměnou metabolických procesů a změnou exprese enterotoxinů, též u bakterie *B. cereus*, při snížení oxidoredukčního potenciálu. Zjistili, že v anaerobních podmínkách dochází k výraznému zvýšení exprese hemolyzinu BL (Hbl) a v menší míře i nehemolytického enterotoxinu (Nhe). Přesto, že se toxiny a bakteriociny liší svými účinky, v obou případech se jedná o sekundární metabolity, které jsou produkovány jen za určitých podmínek nebo životní fázi, a produkčnímu organismu poskytují selekční výhody (Sansinenea & Ortiz 2011). Lze tedy dojít k závěru, že pro bakterie skupiny *B. cereus* je nízký oxidoredukční potenciál podstatným ne-li hlavním faktorem ovlivňujícím produkci sekundárních metabolitů obecně. Této skutečnosti je opět možné využít při hledání vhodné aplikace *B. mycooides* PT89 v praxi. Použit by mohl být například pro modulaci trávicího traktu, jako probiotikum

za účelem prevence proti alimentárním onemocněním nebo jako silážní inokulant. Supernatant či čistý protein by pak mohl být využit např. jako konzervant. Zigha et al. (2006) také uvádějí, že Nhe je produkován v průběhu exponenciální růstové fáze a Hbl později v časně stacionární fázi růstu. Obecně se uvádí, že bakterie tvoří sekundární metabolity až ve stacionární fázi, ale jak potvrzují i Bizani et Brandelli (2002) na příkladu bakteriocinu cereinu 8 A, k produkci může docházet již v dřívější fázi. Pro další testování antimikrobiální aktivity bacilu PT89 a zpřesnění výsledků bude tedy potřeba stanovit růstovou fázi, kdy dochází k iniciaci exprese a fázi, kdy je dosaženo maximální produkce inhibiční látky.

Dalším cílem praktické části bakalářské práce bylo určit povahu sloučeniny zodpovědné za antagonistické účinky. Supernatant byl tedy vystaven působení různých enzymů, surfaktantů, hodnot pH a teplot. Inhibiční aktivita testovaného supernatantu nebyla ovlivněna žádným z proteolytických enzymů ani lysozymem, pouze působením proteinázy K a to až po 24 hodinách inkubace, čímž byla odhalena proteinová povaha antimikrobiální látky. Protein také vykázal vysokou termostabilitu, jak je již uvedeno výše, a stabilitu v širokém rozmezí hodnot pH, od 2 do 9. Výjimkou byla hodnota pH 5, kdy byla aktivita snížena zhruba 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. Tato extrémní odolnost, především vůči proteolytickým enzymům, je charakteristickým rysem cirkulárních bakteriocinů (Gabrielsen et al. 2014).

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. Také je možné, že byla ovlivněna struktura proteinu či jeho náboj (Kerwin 2006), to se ale zdá méně pravděpodobné.

S ohledem na vlastnosti antimikrobiální látky a spektrum účinku lze dojít k závěru, že antimikrobiální protein PT89 pravděpodobně patří mezi posttranslačně modifikované peptidy třídy I, přesněji do podtřídy I.2 cirkulárních (kruhových) bakteriocinů (Zhao & Kuipers 2016). V některých klasifikačních schématech jsou cirkulární bakteriociny označovány také jako podtřída IIc či třída V (Cotter et al. 2005) a do roku 2018 bylo popsáno pouze 14 bakteriocinů, náležících této skupině. Obecně jsou cirkulární 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. V současnosti je jediným bakteriocinem, schváleným pro použití v potravinářství jako konzervant, nisin (E234). Jeho aplikace je však omezena pouze na potraviny s kyselým pH (Abriouel et al. 2011).

Vzhledem k výsledkům této práce se *B. mycooides* PT89 jeví jako bakterie s velkým potenciálem pro využití v praxi. To je dáno nejen produkcí velmi stabilního antimikrobiálního proteinu PT89, který je schopen účinně potlačovat patogenní bakterie, ale také pro schopnost samotného kmene produkovat tuto látku ve velkém množství za anaerobních podmínek a fermentovat celou řadu substrátů za vzniku organických kyselin. Z těchto důvodů bude v budoucnu podroben dalšímu zkoumání.

7 Závěr

Byla prokázána antimikrobiální aktivita kmene *Bacillus mycoides* PT89. Tento kmen působí antagonisticky vůči blízkce příbuzným druhům skupiny *B. cereus*, a také vůči vysoce patogenním G⁺ bakteriím *Clostridium perfringens* a *Listeria monocytogenes*. Jako společná vlastnost citlivých druhů byla zjištěna lecitinázová aktivita. Další testování antimikrobiální aktivity bude proto zaměřeno na lecitináza pozitivní bakterie.

Dále bylo zjištěno, že látka zodpovědná za antimikrobiální aktivitu je proteinové povahy. Na základě fyzikálně-chemických charakteristik a spektru účinku lze předpokládat, že se jedná cirkulární bakteriocin. Díky výjimečným technologickým vlastnostem by tato látka mohla nalézt uplatnění v potravinářském průmyslu jako bioprotektivum ke zvýšení údržnosti potravin a ochraně spotřebitelů. Samotný kmen *B. mycoides* PT89 by mohl být využit, vzhledem ke schopnosti fermentovat řadu různých substrátů a zvýšené expresi bakteriocinu v anaerobních podmínkách, jako probiotikum, či jako inokulant při konzervaci krmiv, například siláží.

8 Literatura

- Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, Galvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews* **35**:201–232.
- Actor JK. 2012. Clinical bacteriology. Pages 105–120 in Elsevier's integrated review immunology and microbiology, second edition. W.B. Saunders. Philadelphia.
- Ahern M, Verschueren S, Van Sinderen D. 2003. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiology Letters* **220**:127–131.
- Akasapu S, Hinds AB, Powell WC, Walczak MA. 2019. Total synthesis of micrococcin P1 and thiocillin I enabled by Mo(VI) catalyst. *Chemical Science* **10**:1971–1975.
- Ambas I, Fotedar R, Buller N. 2015. *Bacillus mycoides* improves health of gastrointestinal tract in marron (*Cherax cainii*, Austin 2002). *Journal of Aquaculture & Marine Biology* **2**:00023. DOI: 10.15406/jamb.2015.02.00023
- Appleyard AN et al. 2009. Dissecting structural and functional diversity of the lantibiotic mersacidin. *Chemistry & Biology* **16**:490–498.
- Arnison PG et al. 2013. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* **30**:108–160.
- 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.
- Basi-chipalu S, Dischinger J, Josten M, Szekat C, Zweynert A, Sahl H. 2015. Pseudomycoicidin, a Class II Lantibiotic from *Bacillus pseudomycooides* **81**:3419–3429.
- Bhandari V, Ahmod NZ, Shah HN, Gupta RS. 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**:2712–2726.

- Bizani D, Brandelli A. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8 A. *Journal of Applied Microbiology* **93**:512–519.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**:423–435.
- 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.
- Chaabouni I, Guesmi A, Cherif A. 2012. Secondary metabolites of *Bacillus*: potentials in biotechnology. Pages 347–366 in *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LMT. 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology* **49**:23–28.
- Chopra L, Singh G, Choudhary V, Sahoo DK. 2014. Sonorensin: an antimicrobial peptide, belonging to the heterocycloanthracin subfamily of bacteriocins, from a new marine isolate, *Bacillus sonorensis* MT93. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:2981–2990.
- Ciumac D, Gong H, Hu X, Ren Lu J. 2019. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science* **537**:163–185.
- Cochrane SA, Vederas JC. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews* **36**:4–31.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* **3**:777–788.
- De Hoon MJL, Eichenberger P, Vitkup D. 2010. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Current Biology* **20**:735–745.
- Deegan LH, Cotter PD, Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* **16**:1058–1071.
- 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**:33. Available from: <http://www.biomedcentral.com/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**:51–62.
- EFSA. 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 2018. **16**:5500-5762.
- Eppelmann K, Doekel S, Marahiel MA. 2001. Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* **276**:34824–34831.
- Falardeau J, Wise C, Novitsky L, Avis TJ. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology* **39**:869–878.
- Fan B, Blom J, Klenk HP, 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.2017.0002.
- Flühe L, Marahiel MA. 2013. Radical S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* **17**:605–612.
- Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF, Diep DB. 2014. Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:6854–6862.
- Goldman E, Green HL. 2015. *Practical handbook of microbiology*, third edition. CRC Press, NW.
- Hamdache A, Lamarti A, Aleu J, Collado IG. 2011. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of Natural Products* **74**:893–899.
- Hegarty JW, Guinane CM, Ross RP, Hill C, Cotter PD. 2016. Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? *F1000 Research* **5**:2587. DOI: 10.12688/f1000research.9615.1
- Hoffmann A, Pag U, Wiedemann I, Sahl H-G. 2002. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *Il Farmaco* **57**:685–691.

- 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.
- Holečková K. 2018. Antimikrobiální aktivita biomasy a bakterií *Pectinatella magnifica*. [DSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Hungate RE, Macy J. 1973. "Modern Methods in the Study of Microbial Ecology" *Bulletins from the Ecological Research Committee* **17**:123-126.
- Julsing MK, Rijpkema M, Woerdenbag HJ, Quax WJ, Kayser O. 2007. Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of isoprene in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**:1377–1384.
- Katayama H, Asahina Y, Hojo H. 2011. Chemical synthesis of the S-linked glycopeptide, sublancin. *Journal of Peptide Science* **17**:818–821.
- Kerwin AB. 2006. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **95**:2145–2157.
- Kim YC, Tarr AW, Penfold CN. 2014. Colicin import into *E. coli* cells: A model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**:1717–1731.
- Kiss A, Balikó G, Csorba A, Chuluunbaatar † Tungalag, Medzihradzky KF, Alföldi L. 2008. Cloning and characterization of the dna region responsible for megacin A-216 production in *Bacillus megaterium* 216. *Journal of Bacteriology* **190**:6448–6457.
- Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **12**:39–85.
- Kleerebezem M, Quadri LE. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* **22**:1579–1596.
- Kumari S, Sarkar P. 2016. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control* **69**:20–29.
- Labbe RG, Juneja VK. 2017. *Clostridium perfringens*. Pages 235-242 in *Foodborne Diseases: Third Edition*. Elsevier Inc.

- Legala OE, Neubauer P. 2016. Lanthipeptides: chemical synthesis versus in vivo biosynthesis as tools for pharmaceutical production. *Cell Fact* **15**:97. DOI: 10.1186/s12934-016-0502-y
- Levin PA, Grossman AD. 1998. Cell cycle and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **1**:630–635.
- Liao R, Duan L, Lei C, Pan H, Ding Y, Zhang Q, Chen D, Shen B, Yu Y, Liu W. 2009. Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications. *Chemistry & Biology* **16**:141–147.
- Liu Y, Lai Q, Shao Z. 2018. Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**:106–112.
- Lodemann U, Lorenz MB, Weyrauch DK, 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**:87–106.
- Logan NA, De Vos P. 2015. *Bacillus*. Pages 21–184 in Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB. 2009. Revised road map to the phylum Firmicutes. Pages 1–5 in W. W. B. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., editor. Bergey's manual of systematic bacteriology, 3. The Firmicutes. Springer, New York, NY.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. 2010. Brock biology of microorganisms (13th). Benjamin Cummings, San Francisco.
- Maksimov MO, Pelczer I, Link AJ. 2012. Precursor-centric genome-mining approach for lasso peptide discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:15223–15228.
- Miller RA, Jian J, Beno SM, 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**:2479–2496.
- Norris GE, Patchett ML. 2016. The glycocins: in a class of their own. *Current Opinion in Structural Biology* **40**:112–119.

- Ortega MA, van der Donk WA. 2016. New insights into the biosynthetic logic of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products. *Cell Chemical Biology* **23**:31–44.
- Oscariz JC, Pisabarro AG. 2000. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology* **89**:361–369.
- Ovchinnikov K, Chi H, Mehmeti I, Holo H, Nes IF, Diep DB. 2016. Novel group of leaderless multipetide bacteriocins from gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:5216–5224.
- Pattnaik P, Grover S, Batish KV. 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**:213–218.
- Perez RH, 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.
- Petit L, Gibert M, Popoff M. 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology* **7**:104–110.
- Raaijmakers JM, Vlami M, De Souza JT. 2002. Antonie van Leeuwenhoek. *Journal of Microbiology* **81**:537–547.
- Ramos HC, Hoffman 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**:3072–3080.
- Rea MC, Sit CS, Clayton E, O’connor PM, Whittall RM, Zheng J, Vederas JC, Ross RP, Hill C. 2010. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *PNAS* **107**:9352–9357.
- Reimer JM, Haque AS, Tarry MJ, Schmeing TM. 2018. Piecing together nonribosomal peptide synthesis. *Current Opinion in Structural Biology* **49**:104–113.
- Rosenfeld E, Duport 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**:149–158.

- Sadredinamin M, Mehrnejad F, Hosseini P, Doustdar F. 2016. Antimicrobial Peptides (AMPs). *Novel Biomed* **4**:70–76.
- Sanchez S, Demain AL. 2011. Secondary Metabolites. *Comprehensive Biotechnology* **1**:155–167.
- Sansinenea E, Ortiz A. 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters* **33**:1523–1538.
- 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**:1842–52.
- Sella SRBR, Vandenberghe LPS, Soccol CR. 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research* **169**:931–939.
- Setlow P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* **6**:550–556.
- Sharma N, Gautam N. 2008. Antibacterial activity and characterization of bacteriocin of *Bacillus mycoides* isolated from whey. *Indian Journal of Biotechnology* **7**:117–121.
- Šilhánková L. 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. Academia.
- Slepecky RA, Hemphill HE. 2006. The genus *Bacillus*—nonmedical. Pages 530–562 in Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., editor. *The Prokaryotes*. Springer US, New York, NY.
- Snyder AB, Worobo RW. 2014. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**:28–44.
- Srivastava SK, Babu N, Pandey H. 2009. Traditional insect bioprospecting - As human food and medicine. *Indian Journal of Traditional Knowledge* **8**:485–494.
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* **56**:845–857.
- Sumi CD, Yang BW, Yeo I-C, Hahm YT. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology* **61**:93–103.
- Swinnen IAM, Bernaerts K, Dens EJJ, Geeraerd AH, Van Impe JF. 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**:137–159.

- Thompson CC, Amaral GR, Campeão M, Edwards RA, Polz MF, Dutilh BE, Ussery DW, Sawabe T, Swings J, Thompson FL. 2015. Microbial taxonomy in the post-genomic era: Rebuilding from scratch? *Archives of Microbiology* **197**:359–370.
- Tyc O, Song C, Dickschat JS, Vos M, Garbeva P. 2017. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in Microbiology* **25**:280–292.
- Van Belkum MJ, Martin-Visscher LA, Vederas JC. 2011. Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology* **19**:411–418.
- Van Heel AJ, Montalban-Lopez M, Oliveau Q, Kuipers OP. 2017. Genome-guided identification of novel head-to-tail cyclized antimicrobial peptides, exemplified by the discovery of pumilarin. *Microbial genomics* **3**:1–9. DOI: 10.1099/mgen.0.000134
- Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* **32**:149–167.
- 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**:2633–2643.
- 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.
- Wen Z, Zhang J-R. 2015. Bacterial Capsules. Pages 33–53 in *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier.
- Wieckowski BM, Hegemann JD, Mielcarek A, Boss L, Burghaus O, Marahiel MA. 2015. The PqqD homologous domain of the radical SAM enzyme ThnB is required for thioether bond formation during thurincin H maturation. *FEBS Letters* **589**:1802–1806.
- Wilson ZE, Fenner S, Ley SV. 2015. Total syntheses of linear polythiazole/oxazole plantazolicin A and its biosynthetic precursor plantazolicin B. *Angewandte Chemie International Edition* **54**:1284–1288.
- Yang X, Yousef AE. 2018. Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **34**:57. DOI: 10.1007/s11274-018-2437-4

- Zeigler DR, Perkins JB. 2015. The Genus *Bacillus*. Pages 429–450 in E. Goldman a L. Green, editors. Practical Handbook of Microbiology third. CRC Press.
- Zhao X, Kuipers OP. 2016. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of *Bacillales* species. BMC Genomics **17**: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**:222–233.

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+	Gram-pozitivní bakterie
G-	Gram-negativní bakterie
KMVD	Sbírka Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky
LAP	Lineární azol-obsahující peptidy
PTM	Posttranslační modifikace
MALDI-TOF MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
MRSA	Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
RiPP	Ribozomálně syntetizované a posttranslačně modifikované peptidy
VRE	Vankomycin-rezistentí <i>Enterococcus faecalis</i>

10 Samostatné přílohy

Tabulka 1. Testované izoláty různého původu

Taxonomické zařazení	Označení kmene	Původ
<i>Bacillus cereus</i>	1CP o ₂	psí granule
<i>Bacillus cereus</i>	1CP	psí granule
<i>Bacillus cereus</i>	2CP o ₂	psí granule
<i>Bacillus cereus</i>	3CP o ₂	psí granule
<i>Bacillus cereus</i>	3CP	psí granule
<i>Bacillus cereus</i>	4CP o ₂	psí granule
<i>Bacillus cereus</i>	5CP o ₂	psí granule
<i>Bacillus cereus</i>	5CP	psí granule
<i>Bacillus cereus</i>	6CP o ₂	psí granule
<i>Bacillus cereus</i>	6CP	psí granule
<i>Bacillus thuringiensis</i>	9CP o ₂	losos sušený
<i>Bacillus cereus</i>	10CP o ₂	losos sušený
<i>Bacillus cereus</i>	10CP	losos sušený
<i>Bacillus cereus</i>	12CP o ₂	kuřecí pařáty sušené
<i>Bacillus cereus</i>	12CP	kuřecí pařáty sušené
<i>Bacillus mycoides</i>	seba 1-3 2. rozbor	senáž
<i>Clostridium perfringens</i>	pk2bif	med
<i>Bacillus aerophilus</i> 2015010	2015010	voda (Kancelář)
<i>Bacillus thuringiensis</i> 2014013	2014013	voda (Kancelář)
<i>Bacillus mycoides</i> 2014004	2014004	voda (Veselí)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> 2015001	2015001	voda (Hejtman)
<i>E. coli</i>		trávicí trakt (člověk)
<i>Salmonella</i> sp.		maso

Tabulka 2. Testované sbírkové kmeny

Taxonomické zařazení	Původ
<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	sbírkový kmen
<i>Bacillus fusiformis</i> CCM 4609	sbírkový kmen
<i>Bacillus mycooides</i> DSM 2048	sbírkový kmen
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> DSM 11821	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 perfringens</i> CCM 4435	sbírkový kmen
<i>Clostridium tertium</i> DSM 2485	sbírkový kmen
<i>E. coli</i> C7050 KMVD	sbírkový kmen
<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 7797	sbírkový kmen
<i>Enterococcus faecalis</i> KMVD	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>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076	sbírkový kmen
<i>Serratia marcescens</i> DSMZ 30121	sbírkový kmen
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	sbírkový kmen