

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Metabolická aktivita bakterií z kyselých lesních půd

Bakalářská práce

Karolina Nejedlová

Obor studia: Ekologické zemědělství

Vedoucí práce: doc. RNDr. Markéta Marečková, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Metabolická aktivita bakterií izolovaných z kyselých lesních půd" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Markétě Marečkové, Ph.D. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janu Kopeckému, Ph.D., Mgr. Tereze Patrmanové z Výzkumného ústavu rostlinné výroby za pomoc a poskytnuté cenné rady při práci v laboratoři a zpracovávání výsledků. Poděkování také patří budoucím bakalářkám Markétě Mičudové a Ivaně Opletalové, že to semnou nikdy nevzdaly.

Metabolická aktivita bakterií izolovaných z kyselých lesních půd

Souhrn: S rostoucími nároky na spotřebu potravin a jejich výrobu zároveň stoupá použití pesticidních látek, které se dostávají do půdy. K těmto zásahům do biosféry se snaží najít alternativu ekologické zemědělství svým šetrnějším přístupem k přírodě a celkovému hospodaření.

Omezení používání pesticidů v udržitelném hospodářství se dá částečně dosáhnout pomocí znalosti interakcí bakterií s rostlinami. V této práci jsme se zaměřili studium bakteriálního kmene *Actinobacteria*, protože je známý tím, že jeho zástupci dokážou degradovat pesticidy a recyklovat nepřírodní organické látky a tím zlepšovat životní prostředí. K degradaci xenobiotik se využívají především bakterie z kyselých půd, kde je rozklad organické hmoty pomalý a neefektivní, a proto mají bakterie neobvyklé rozkladné schopnosti.

Tato práce se podrobněji zabývá kmenem *Actinobacteria* a jejich produkcí antibiotických látek, které se testují vůči multiresistentnímu *Acinetobacter baumannii*. V literární rešerši je představen kmen *Actinobacteria* a jeho význam v půdě. Dále se zabývá jeho taxonomií a uvádí také přehled sekundárních metabolitů tvořených aktinobakteriemi a nakonec je doplněn i samostatnou kapitolou a antibiotikách.

Teoretická část je doplněna experimentem týkající se antibiotické aktivity vůči *A. baumannii*. Z předchozích výzkumů byla potvrzena možnost nalézt v netradičním prostředí *Actinobacteria* produkující sloučeniny účinné proti multirezistentnímu gramnegativnímu kmeni.

Cílem praktické části práce bylo vyhodnotit antibiotickou aktivitu u vybraných izolátů aktinobakterií a posoudit jejich biologickou aktivitu vůči bakteriím nesoucím mnohočetné rezistence. Byly testovány frakce z kultivačního média získaného na SPE koloně po kultivaci kmene 15RT742.

Frakce využité v této práci byly získány od Dr. Zdeňka Kameníka (MBÚ AV ČR).

Pomocí diskové difuzní metody se podařilo najít mezi nejpolarnějšími frakcemi antibiotickou aktivitu vůči *A. baumannii*, multiresistentnímu kmeni izolovanému v České republice v roce 2011.

Potvrdilo se, že extrakty získané z kmenů vykazují aktivitu, která zůstane zachována, a proto identifikované frakce bude možné použít pro další zkoumání.

Klíčová slova: *Actinobacteria*, kyselá půda, antibiotická aktivita

Metabolic activity of bacteria isolated from acidic soils.

Summary:

This bachelor thesis deals with the strain actinobacteria and its production of antibiotic substances towards multi-resistant *Acinetobacter baumannii*. The literary research introduces the strain Actinobacteria and its importance in the soil. Then, the text deals with taxonomy and its partition. The study then shows an overview of secondary metabolites formed by Actinobacteria and a separate chapter on antibiotics.

The theoretical part is supplemented by an experiment on antibiotic activity toward *A. baumannii*. Previous research has confirmed the possibility of finding Actinobacteria producing compounds effective against a multi-resistant gram-negative strain in a non-traditional environment.

The aim was to evaluate the antibiotic activity of the isolates and to assess the biological activity against bacteria carrying review resistance.

The fractions used in this work were obtained from Dr. Zdeněk Kameník (MBÚ AV ČR). Pre-prepared fractions of the extract obtained by SPE by extraction of the medium after culturing strain 15RT742, from the medium after culturing 742BHL.

Using the disk diffusion method, antibiotic activity against *A. baumannii*, isolated in the Czech Republic in 2011, was found amongst the most polar fractions.

It has been confirmed that the extracts obtained from the strains show activity, it is possible to fractionate them by separation and the antibiotic activity will be maintained and the identified fractions can be used for further investigation.

Keywords: Actinobacteria, acidic soils, antibiotics

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Aktinobakterie	3
3.1.1	Aktinobakterie v půdě.....	3
3.1.2	Taxonomie	3
3.1.2.1	Chemotaxonomie	5
3.1.2.2	Molekulární klasifikace.....	5
3.1.2.3	Morfologická klasifikace	5
3.2	Metabolity.....	6
3.2.1	Streptomyces.....	7
3.2.2	Antibiotika	9
3.3	Multirezistentní <i>Acinetobacter baumannii</i>	10
4	Metodika	12
4.1	Chemikálie.....	12
4.2	Použité kmeny	12
4.2.1	Příprava kultury <i>Acinetobacteru baumannii</i>	12
4.2.2	Disková difuzní metoda	13
5	Výsledky	15
6	Diskuse.....	20
7	Závěr	21
8	Literatura.....	22

1 Úvod

S rostoucí potřebou produkovat čím dál větší množství potravin stoupá zároveň používání pesticidních látek, které se dostávají do půdy. K těmto drastickým zásahům do biosféry, které se dějí v rámci konvenčního zemědělství, se snaží najít alternativu ekologické zemědělství krácející mnohem šetrnější cestou k přírodě.

Udržitelného hospodaření se dá částečně dosáhnout využitím podpůrných interakcí mezi rostlinou a mikroorganismy žijícími v půdě. Především bakterie v půdě navazují mutualistické, komenzální, neutrální, exploatační nebo kompetitivní vztahy s hostiteli (Effects of Abiotic Stress on Soil Microbiome 2021), ale zároveň tvoří řadu prospěšných sekundárních metabolitů, které mohou mít antibiotický účinek (Barka et al. 2016).

Jedním z prospěšných skupin bakterií je kmen *Actinobacteria* pomáhající nejen produkcí biologicky aktivních látek, ale také v degradaci pesticidů s obsahem různých chemických struktur a hrají důležitou roli v recyklaci organických látek v životním prostředí. Antibioticky aktivní látky pomáhají také komunikaci mezi kmeny během rozkladu látek, které jsou energeticky náročné. Diverzita těchto látek je málo prozkoumána v přírodních podmínkách. Je ale známo, že nekontaminují životní prostředí, nýbrž pomáhají udržovat biotickou rovnováhu půdy. Zvláště v kyselých půdách je rozklad organické hmoty pomalý a neefektivní, a proto se ho účastní bakterie s velmi efektivními rozkladnými schopnostmi (Bhatti et al. 2017).

Důvodem pro výběr patogenu *A.baumannii* je riziko, které způsobuje ve všech nemocničních zařízeních po celém světě. Způsobuje velké množství infekčních onemocnění, které mohou dosáhnout úmrtnosti až 35 % (Joly-Gouillou 2005). Proto je předmětem zkoumání ve snaze naleznout antibiotika, která by proti němu působila.

2 Cíl práce

Vyhodnotit intenzitu antibiotické aktivity u vybraných aktinobakteriálních izolátů, posoudit diverzitu těchto látek a biologickou aktivitu vůči bakteriím nesoucím mnohočetné rezistence.

Hypotéza: Specifita antibioticky aktivních látek bude sdílena lokálně.

3 Literární rešerše

3.1 Aktinobakterie

Kmen *Actinobacteria* je reprezentován grampozitivními bakteriemi představujícími jeden z největších bakteriálních kmenů (Ludwig et al. 2012) společně s proteobakteriemi a acidobakteriemi (Russell 2001; Sasaki et al. 2001). Do roku 2016 se podařilo zaznamenat 374 rodů aktinových bakterií (Ochi 1995). Dominantní rodem jsou *Streptomyces* (Locci & Sharples 1984).

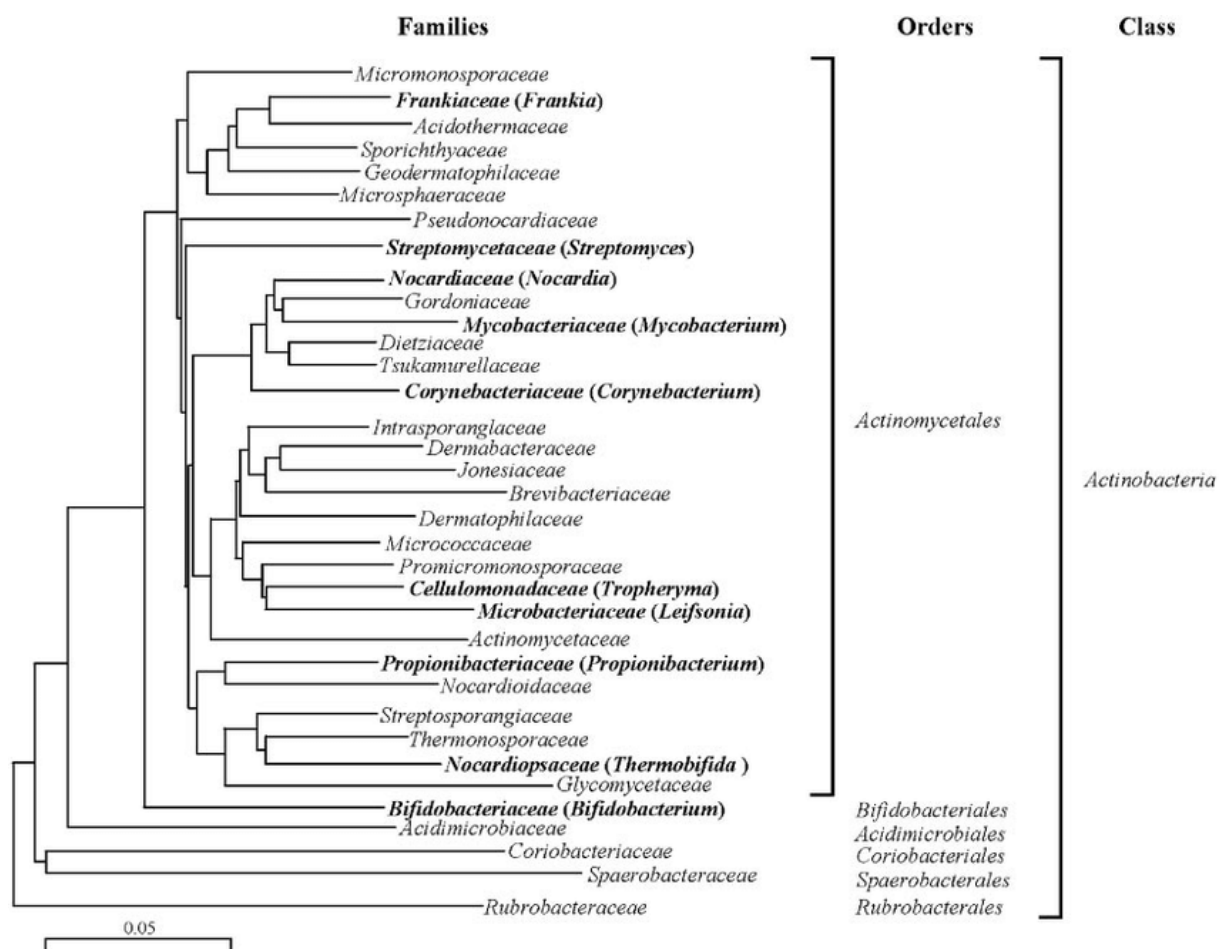
Aktinobakterie jsou přítomné ve všech ekosystémech (Barka et al. 2016). Výskyt může dosahovat do hloubky až 2 metrů pod zemí (Goodfellow & Williams 1983). Optimální teplota pro jejich růst činí 25 až 30 °C (Edwards 1993; Yadav et al. 2017). Většina z nich tvoří mycelia. Aktinobakterie jsou schopné produkovat zhruba dvě třetiny všech přirozeně odvozených antibiotik, která se v současné době komerčně využívají. Díky této schopnosti jsou velice důležité v medicíně, biotechnologii, a hlavně v zemědělství (Barka et al. 2016). Využívají se i pro čištění látek, které jsou v prostředí nežádoucí. Dokážou metabolizovat xenobiotikave prospěch svého růstu, a proto jsou bezpečnou ekonomickou a biologickou metodou pro čištění prostředí (O'Donnell 1988).

3.1.1 Aktinobakterie v půdě

Aktinobakterie vykazují podobnost s houbami, protože jsou také často mycelárního růstu a spolu s houbami jsou také velice důležitými rozkladači. Obvykle rostou ve vysoce rozvětvených myceliích (Ventura et al. 2007; Anandan et al. 2016). Největší podíl mikroorganismů v půdě zauímají na podzim, kdy se vyšplhají až na 30 % z celkového počtu organismů. Naopak nejnižší podíl mají v zimě, kdy ubývá organické hmoty a představují pouze 13 % (Barka et al. 2015). Aktinobakterie obecně hrají velkou roli v koloběhu uhlíku, napomáhají rozkládat složité organismy, díky čemuž probíhají další rozkladné procesy a uhlík se stává dostupnějším pro rostliny. Například zástupci rodu *Streptomyces* jsou schopny rozkládat látky s delším řetězcem jako jsou lignin a celulóza (Větrovský et al. 2014). Aktinobakterie jsou nepostradatelné i při fixaci dusíku, který fixují ze vzduchu podobně jako známější rhizobia. Dusík může být i znečišťovatelem půdy, v tomto případě právě nastupují aktinobakterie, které degradují i dusíkaté znečišťující látky (Singh & Sekhon 1979). Některé z nich mají přímo pozitivní vliv na růst rostlin, žijí v jejich rhizosféře a zvyšují dostupnost živin, minerálních látek (Bhatti et al. 2017).

3.1.2 Taxonomie

Aktinobakterie jsou jednou z největších taxonomických jednotek (Ludwig 2012). Rody z tohoto kmene mají velkou rozmanitost morfologie, fyziologie a metabolických schopností. Taxonomie se výrazně vyvíjela a dále vyvíjí se získáváním znalostí (Buchanan 1917). (viz Obrázek 5)



Obrázek 5: Fylogenetický strom Actinobacteria založený na 1500 nukleotidech 16S rRNA. Měřítko, 5 nukleotidů. Zdroj (Ventura et al. 2007)

3.1.2.1 Chemotaxonomie

Chemotaxonomie třídí organismy do skupin podle chemických složek. Nejčastěji používanými látkami pro chemotaxonomii jsou aminokyseliny, lipidy, proteiny, cukry a složení DNA (Goodfellow & O'Donnell 1989; Williams et al. 1989). Analýza složek buněčné stěny je taxonomicky velice významná, řídí se jí odlišné podřady (Berd 1973).

Složení buněčné stěny pomáhají rozlišovat skupiny aktinobakterií pomocí peptidoglykanu (Sherwood & Woolverton 2010). Další důležitou charakteristikou pro grampozitivní bakterie je přítomnost nebo absence specifické izomery (Lechevalier & Lechevalier 1980). Rozlišujeme 9 různých druhů chemotypů aktinobakteriální buněčné stěny.

Při hodnocení aktinobakterií by se mělo dbát na užití kombinace kritérií (Bouizgarne & (Aoumar 2014). Mastné kyseliny, které jsou obsaženy v aktinobakteriích, mají řetězce o délce od 2 do 90 atomů uhlíku, ale pouze v rozmezí 10 až 24 uhlíků mají taxonomickou hodnotu (Suzuki et al. 1993).

3.1.2.2 Molekulární klasifikace

Molekulární klasifikace je klasifikace s novějšími metodami využívajícími sekvencí vybraných genů primárního metabolismu. Bylo zjištěno, že původní rozdělení aktinobakterií pouze na základě chemotaxonomie a morfologie nebylo zcela správné (Zhi et al. 2009). Nejnovější příklad je zařazení *Kitasatospora* jako rodu v rámci čeledi *Streptomycetaceae*. Pomocí sekvence genomu se ukázalo, že jsou opravdu samostatným rodem (Zhi et al. 2009; Girard et al. 2014; Ichikawa et al. 2010; Kim et al. 2004). V dnešní době nelze zařadit nový druh bez genetické analýzy zakládající na sekvenování genu, které se stává klasikou (Euzéby 1997). Sekvenování genu 16S rRNA odhalilo 39 čeledí a 130 rodů (Raoult et al. 2001).

3.1.2.3 Morfologická klasifikace

Morfologická klasifikace vychází z fyziologických vlastností jednotlivých bakterií.

Fragmentace mycelia je zvláštní forma vegetativního rozmnožování. Aktinobakterie se převážně rozmnožují asexuálně pomocí spor. Výrazné rozdíly v morfologii jsou především přítomnost nebo nepřítomnost substrátu či vzdušného mycelia, barvě, tvorbě pigmentu, také struktuře a vzhledu spor. Rozdílné mycelium má od ostatních Sporichthya, který tvoří vzdušné hyfy, iniciují se vzpřímeně na povrchu. Aktinobakterie vytváří substrátové mycelium v pevných i submerzních kulturách (Flärdh & Buttner 2009; van Dissel et al. 2014). Z vyrůstajících klíčících rostlin vzniká substrátové mycelium, které je ve většině případů monopodiální v ojedinělých případech tvoří dichotomické větvení (Kalakoutskii & Agre 1976). Aktinobakterie tvoří kokoidy a tyčinkové kokoidy (Atlas 1997). Rodokoky vytvářejí protáhlá vlákna a nemají pravé mycelium (Locci & Schaal 1980). Jeden druh bakterií nevytváří vůbec žádné mycelium a tím jsou korynebakterie. Stejně jako u aktinobakterií i tady filamenta vyrůstají na vrcholu místo z boční stěny. Existují i aktinobakterie, které jsou specifické pro svou tvorbu

rozvětvených substrátových hyf, které se následně rozpadají na pohyblivé elementy (Prauser et al. 1970).

Mykobakterie a rodokoky nevytváří vzdušné hyfy, kromě určitých výjimek (Ochi 1995).

Pro taxonomii aktinobakterií je nepostradatelná tvorba výtrusů (Locci & Sharples 1984). Proces pučení začíná sporulací oligosporických aktinobakterií, jelikož splňuje kritéria důležitá pro pučení jiných bakterií. Spory se vytváří za přítomnosti substrátu nebo vzdušného mycelia jako jednotlivé buňky nebo řetězce. U rodů *Micromonospora*, *Micropolyspora* a *Thermoactinomyces*, které mají endospory odolné teple, dochází k tvorbě spor na substrátu (Cross & Goodfellow 1973), na rozdíl od *Streptomyces*, kde spory vyrůstají ze vzdušného. Některé druhy mají sklerocia, synnemy nebo vezikuly se sporami nebo bez nich.

Druh se dá charakterizovat také pomocí svých výtrusů, které mohou být hladké, bradavičnaté, ostnaté, chlupaté nebo bez chlupů (Pridham et al. 1958).

Délka řetězce a počet spor na něm se liší v každém rodě, některé produkují izolované spory, podélné páry případně krátké sporovité řetězce nebo dlouhé řetězce až o 100 sporách. Například druhy *Frankia* vytváří sporangia, což by se dalo charakterizovat jako sáčky naplněné sporami. Řetězce *Streptomyces* jsou rovné a ohebné, otevřené smyčky nebo například spirály (Pridham et al. 1958).

Polymer melanin zajišťuje odlišnost spor v barvě, které jsou černé nebo hnědé, vznikají oxidativní polymerací fenolu a indolu. Melanin je produkován širokým spektrem organismů od bakterií až po člověka. Aktinobakterie také dokáží produkovat barviva, zde záleží na kmeni, mediu a stáří dané kultury. Jedná se o červenou, žlutou, oranžovou, hnědou, zelenohnědou a další barvy (Lechevalier & Lechevalier 1965). Důležitost těchto polymerů se odráží nejenom v taxonomii, ale i v podobnosti s humusovými látkami (Dastager et al. 2006; Manivasagan et al. 2013). Melaniny jsou postradatelné, pokud jde o růst a vývoj aktinobakterií, naopak jsou velice důležité při jejich konkurenceschopnosti a přežití.

3.2 Metabolity

Všeobecně metabolity bakterií lze rozdělit do dvou skupin, a to na primární a sekundární metabolity. Primární metabolit přímo ovlivňuje normální růst, vývoj, reprodukci. Je potřebný pro důležité životní funkce. Primární metabolit se vyskytuje v mnoha organismech a buňkách (Demain 1980).

Sekundární metabolity nejsou tak důležité pro růst, vývoj a reprodukci organismu (Shomurat et al. 1979). Rozdílné od primárních metabolitů jsou především v těchto 4 bodech: nejsou potřebné pro růst, jejich produkce je přímo závislá na podmínkách, ve kterých roste, jako je kultivační medium, vznikají jako blízké příbuzné skupiny molekul, dají se tvořit ve větším množství, než je potřeba. Mikroorganismy je tak tvoří hlavně v období, kdy si mohou dovolit ztratit živiny a prosperují (Drew & Deamin 1977).

Nejdůležitější schopností *Streptomyces* je tvorba sekundárních metabolitů, které mají antibakteriální, antifungální, antivirové a protinádorové vlastnosti. Pro průmyslovou výrobu antibiotik se využívají pro příklad *Streptomyces griseus* a *coelicolor*.

3.2.1 Rod *Streptomyces*

Streptomyces je největší rod patřící do kmenu *Actinobacteria*. Jsou to aerobní saprofytické grampozitivní bakterie. Jejich nejčastější výskyt je v půdách. Mají zemité zápach, který způsobuje produkce těkavého metabolitu geosminu (Gerber 1967). Vlákna a spory tvoří velmi malé, standardně o průměru 1 μm nebo i méně (Willems et al. 2011). Výtrusy vznikají fragmentací vláken v přímých, zvlněných nebo spirálových řetězcích (Chater 1993). Ze začátku jsou kolonie hladké, později se jejich povrch změní na vločkovitý nebo zrnitý, práškový či sametový (Ambarwati et al. 2012). Barva vzdušného i vegetativního mycelia je způsobena produkcí pigmentů (Flärdh & Buttner 2009). Ideální teplota pro jejich růst je do 30 °C, jelikož patří mezi mezofilní mikroorganismy (Al Dhahi et al. 2016). Druhy *Streptomyces* bývají nepohyblivé, redukují dusičnany na dusitany, degradují adenin, eskulit, kasein, želatinu (Smaoui et al. 2011). Organismy to jsou chemoorganotrofní a rostou v různých rozmezích pH.

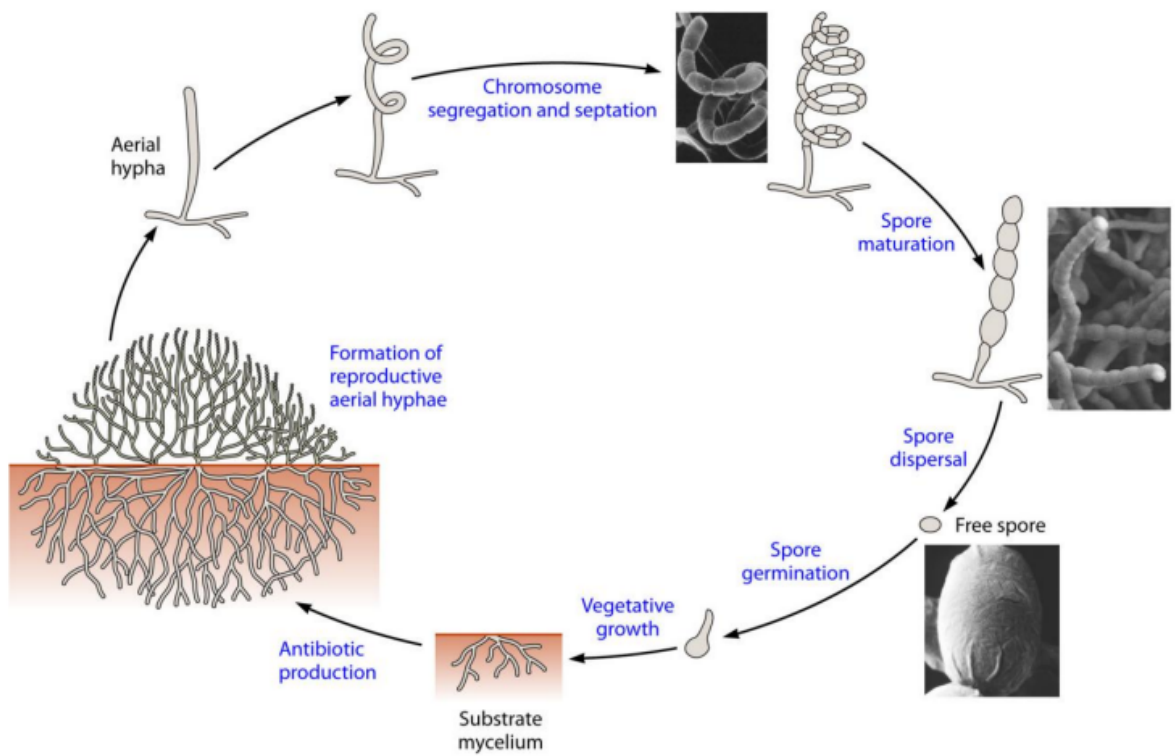
Hrají důležitou roli v půdní ekologii, zachytávají živiny a hydrolyzují přirozené makromolekuly jako je celulóza, chitin, xylan, agar (Chater et al. 2010).

V mediu bohatém na živiny začíná životní cyklus *Streptomyces*. Na začátku mnohobuněčného životního cyklu po usazení spory v mediu je klíčící spora (viz Obrázek 6), která vyrůstá ve vegetativní hyfy (Chater 1972). Kde se bude hyfa rozvětvovat určuje komplex proteinů polarisom (Flärdh et al. 2012). Větvení způsobuje složitě rozvětvené mycelium (Chater 1972). Výrazným znakem jsou rostoucí extenzivní špičky (Flärdh 2003).

Populace *Streptomyces* se nachází více v alkalických půdách, kompostu nebo říčním bahně a tvoří 40 % půdních bakterií (Kariminik & Baniasadi 2010). Díky vláknité formě, kterou vytváří chrání půdu před vymýcením větrem nebo deštěm (Vetsigian & Roy Kishony 2011). Koncentrace v půdě se odráží od pH, obsahu vody, složení půdy a fyziologických vlastnostech (Nonoh et al. 2010). *Streptomyces* velice dobře snášejí slanost, proto velké množství druhů nalezneme ve slané půdě a v moři (Slevakumar et al. 2010).

Streptomyces se dají pěstovat na Muller – Hintonově agaru, ale také sójovém a živném agaru s chloridem vápenatým (Busti & Yushi 2006).

V rámci *Streptomyces* platí, že každý rod může produkovat více antibiotik a zároveň různá antibiotika může produkovat více rodů. Příbuzné rody dokonce dokáží do jisté míry sdílet geny pro tvorbu antibiotik, a tak se od sebe „učit“, jak produkovat nové látky (Egan et al. 2001). První antibiotikum produkované *Streptomyces* byl streptothricin F patřící do skupiny streptothricinů v roce 1942 (Waksman & Woodruff 1942).



Obr. 1 Schematické znázornění životního cyklu sporulujících aktinomycet.

Obrázek 6 : Životní cyklus sporulující aktinobakterie , zdroj (Barka et al. 2016)

3.2.2 Antibiotika

Antimikrobní látky jsou považovány za nejvýznamnější skupinu látek objevenou v první polovině dvacátého století (Příborský 2018).

Antibiotika jsou sekundárními metabolity *Streptomyces* (MCIntyre 2002) stejně jako herbicidy (Kariminik & Baniyasi 2010), léky proti rakovině (Berdy 2005) a růstové faktory jako například vitamín B12 (Bibb 2005).

Objevitelem skutečnosti, že některé mikroorganismy jsou schopné zahubit jiné organismy objevil francouzský biolog a chemik Louis Pasteur v 19. století, počítáme ho tímto za jednoho z největších objevitelů v oblasti antibiotik. Vůbec prvním objeveným antibiotikem byl penicilin. Zásluhy nese skotský lékař Alexander Fleming, který ho extrahoval z plísně *Penicillium notatum* roku 1929 (Silva & Anne 2004).

Antibiotika se začala zkoumat na základě objevu streptotricinu v roce 1942 (Sanglier et al. 1993) a streptomycinu roku 1943 (Schats et al. 1994). Mezi nejpłodnější roky v oblasti rozšiřování informací o antibiotikách patří období mezi lety 1945 a 1960 (Watve et al. 2001).

První antibiotikum bylo extrahováno Rachel Brown spolu s Elisabeth Lee Hazen v roce 1949, antibiotikum bylo určeno k léčbě plísněvého onemocnění, název získalo Nistatin (Orna 2001).

Z využitelných antibiotik je více než polovina získána od rodu *Streptomyces*. Přesto je infekční onemocnění způsobené *Acinetobacter baumannii* druhou nejčastější příčinou smrti, a proto je potřeba dále pátrat po nových účinných látkách (Nikaido 2009). Odolnost vůči antibiotikům získávají bakterie především genetickými faktory jako je mutace a přenos genetické informace (Wright 2010). U bakterií lze vyvolat odolnost určitým fyziologickým stavem, jako je tvorba biofilmu (Hassan et al. 2011). Vznikající rezistence jsou jedním z hlavních důvodů, proč je potřeba hledat stále nové antibiotické látky.

Rezistence nemusí pouze vznikat, ale některé způsoby si bakterie nesou už v genetickém kódu. Jedním ze základních rezistentních principů je schopnost buňky vylučovat antibiotika do svého okolí (Méndez & Salas 2001). Některé další bakterie dokáží přetvořit jim nebezpečné antibiotikum na pro ně neškodné látky (Sugiyama et al. 1981). Další princip rezistence dokáže modifikovat místo, kam by se jinak napojilo antibiotikum a způsobilo škodu (Reynolds 1989).

U *Streptomyces* je za rezistence zodpovědný hlavně genový klastr SARPů (Wietzorrek & Bibb 1997).

Glukóza může omezovat produkci antibiotik potlačením enzymů, které ovlivňují biosyntézu a s tím může souviset i rychlost jejich růstu (Lounes et al. 1996). Pro samotnou produkci antibiotik je lepší pomalejší rychlost růstu, kterou podporuje uhlík, jehož nejlepším zdrojem jsou polysacharidy, například škrob a glycerol (Jonsbu et al. 2002). Je prokázáno, že využití uhlíku pomáhá k nejlepšímu výsledku mikrobiálního růstu a produkci antibiotik. Maximální produkce byla pozorována v mediu s glukózou a laktózou, naopak nejnižší v mediu s ribózou (Ilić et al. 2010; Jonsbu et al. 2002).

Syntéza antibiotik je ovlivněna typem a koncentrací dusíku v mediích (Rafieenia 2013). Jednoduché a anorganické typy dusíku působí negativně na produkci antibiotik (Young & Kempe 1985). Naopak pozitivní vliv na produkci má díky pomalému rozkladu na mediu sójový šrot, kukuřičný výluh, kvasnicový extrakt.

Fosfor, draslík, železo, zinek a další minerální látky ve stopovém množství podporují produkci antibiotik (Gesheva & Genava 2005). Syntéza začíná až po snížení zdroje fosfátů (Martin 2004). Kyslík je také schopen zkvalitnit růst a produkci, jelikož *Streptomyces* jsou aerobní bakterie (Wang et al. 1999).

Velké množství antibiotik se pěstuje spíše v neutrálním pH o hodnotě 7,0 (Saadoun et al. 1999).

K produkci antibiotik u aktinobakterií dochází ve fázi růstu vzdušných hyf. V tomto období je kolonie nejzranitelnější a mycelium může být ohroženo jinými mikroorganismy. Tvorbu antibiotik podporuje rozpor vegetativního mycelia, N-acetylglukosamin se uvolňuje z buněčné stěny a může sloužit jako ukazatel pro tvorbu antibiotik, zároveň ale podporuje tvorbu pouze v případě, že je bakterie ve fázi nedostatku živin (Swiatek et al. 2012). Získaný N-acetylglukosamin je zdrojem uhlíku a dusíku a může se stát hlavní složkou buněčné stěny (Bibb 2005). Bakterie produkují antibiotika hlavně v konkurenčním prostředí, aby si zajistily klíčový přísun živin (Zhu et al. 2014).

Antibiotikum je látka usmrcující některé mikroorganismy nebo bránící jejich vývoji. Působí bakteriostaticky nebo bakteriocidně. Antibiotika zasahují do syntézy bakteriální stěny, proteosyntézy, syntézy nukleových kyselin, působí na buněčnou membránu (Příborský 2018).

Při působení antibiotik na buněčnou stěnu je důležitý bakteriální protein. Tyto proteiny nazýváme jako vázící penicilin PBP, řadíme je mezi nezbytné pro růst bakterií. Reakce PBP s antibiotikem vede ke smrti bakterie, působí bakteriocidně. Produkci inaktivačních enzymů může dojít k enzymatické rezistenci, u grampozitivních patogenů jsou enzymy uvolňovány na povrchu bakterie (Příborský 2018).

Glykopeptidová antibiotika inhibují vývoj buněčné stěny u citlivých bakterií.

Antibiotika inhibující proteosyntézu se váží na různé části bakteriálního ribozomu (Příborský 2018).

Prvním účinným antibiotikem na tuberkulózu byl streptomycin patřící do aminoglykosidových antibiotik. Bakterie z rodu *Micromonospora* mají příponu – micin (např. gentamicin). Aminoglykosidy mají více mechanismů působení, inhibují proteosyntézu, případně narušují stěny bakterie (Příborský 2018).

3.3 Multirezistentní *Acinetobacter baumannii*

Mezi bakteriemi je nejhorší formou multirezistentní bakterie, protože je široké spektrum antibiotik v tomto případě neúčinných (Perez et al. 2007). *Acinetobacter baumannii* se klasifikuje jako gramnegativní kokobacil, multirezistentní nozokomiální patogen vyskytující se ve všech nemocničních zařízeních po celém světě. Způsobuje velké množství infekčních onemocnění, které mohou dosáhnout úmrtnosti až 35 % (Joly-Gouillou 2005). Nejčastěji infekce kůže, měkkých tkání, močových cest (Bergogne-Ber Ezin & Towner 1996; Roca et al. 2012; McConnell et al. 2013). Existují i kmeny, které jsou rezistentní vůči jakýmkoliv antibiotikům (Joly-Gouillou 2005). Rod *Acinetobacter* prošel řadou taxonomických změn, druh *A. baumannii* byl pojmenován roku 1986 (Bouvet & Grimont 1986). Nynější pacienti jsou více náchylní vůči infekcím, způsobuje to například pokrok medicíny, kdy se využívají selektivní antibiotika. *Acinetobacter baumannii* infikuje tělo snadno otevřenými ranami, katetry, mechanickými ventilátory (Peleg et al. 2008) Více se infekce spojují s mužským pohlavím v kombinaci s vyšším věkem (Wisplinghoff et al. 1999). Pneumonie je v 85 % nejčastěji hlášenou

komunitní infekcí způsobenou *A. baumannii* (Chang et al. 2000; Falagas et al. 2007) úmrtnost může dosahovat až 60 % (Falagas & Rafailidis 2007).

Odolnost vůči antibiotikům souvisí s MDR fenotypem kmenů, které jsou infikující (Diancourt et al. 2010). Rezistence se od 70. let minulého století rapidně zvyšovala a do roku 2007 bylo až 70 % izolátů za určitých podmínek rezistentních (Kempf & Rolain 2012). Vznikají celosvětově zprávy o rezistenci na kolistin, což měl být nejúčinnější lék na *Acinetobacter baumannii*, zároveň byl ale spojován s řadou vedlejších účinků (Al-Sweih et al. 2011). Za posledních několik desetiletí si *Acinetobacter baumannii* získal rezistenci proti širokému spektru antimikrobiálních látek (Adams et al. 2008).

4 Metodika

4.1 Chemikálie

Agar	Sigma- Aldrich, Missouri, USA
Beef extrakt	Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Francie
Chlorid sodný (NaCl)	Penta, Česká republika
Ethanol	Penta, Česká republika
Hydroxid sodný	Lachner, Česká republika
Methylalkohol	Penta, Česká republika
Peptone	HiMedia, Mumbai, Indie

4.2 Použité kmeny

Antibiotická aktivita se testovala na pevných agarových mediích. Gramnegativní *Acinetobacter baumannii* ANC 4097 má větší množství rezistencí vůči antibiotikům.

Aktinobakterie použité ve výzkumu byly izolovány v roce 2015 v podmačené kyselé lesní půdě v okolí Opatovického rybníku v Třeboni. Hladina podzemní vody byla řízena regulací rybníka o průměrné hloubce 2 m a ploše 1,6 km². Půda v této oblasti je stagnoglej, vyznačuje se redukcí železa. Odebraná půda byla rozdělena na dvě části, horní představuje hlinitopísčité horizont s mírnějším humusem a spodní horizont byla písčité půda se skvrnitostí. Horizonty se výrazně lišily v pH, obsahu organických látek, množství kořenů rostlin bylo v horních horizontu dvojnásobné oproti spodnímu. Vzorky půdy byly odebrány na náhodných třech místech v letním a zimním období. V každé oblasti o rozloze cca 25 m² byla odstraněna podestýlka a odebrána sterilizovaným nožem a rýčem. Materiály z horní a spodní části byly odděleny a pro transport zachlazeny. Před další analýzou byly ručně homogenizovány promícháním. Kmenů bylo izolováno celkem 211, v předchozím výzkumu byla zjištěna antibiotická aktivita u kmenů 15RT67, 15RT742, 15RT792, všechny z lokality Opatovického rybníka. Aktivita byla detekována v mediu submersní kultivací, z odstředěného media byly metabolity přečištěny SPE extrakcí na kolonkách Oasis HLB a Oasis MCX, aktivita nalezena i v tomto extraktu (A. Majid, Bakalářská práce, 2020). následně byly uchovány pomocí glycerolové konzervace v teplotě -70°C.

4.2.1 Příprava kultury *Acinetobacter baumannii*

Ke kultivaci bylo použito médium B1 skládající se z těchto látek: 5 g peptonu, 5 g hovězího extraktu, 2,5 g NaCl, 10 g agaru, 0,5 l destilované vody. Upravilo se pH mikroprocesorovým pH – metrem HI 221 (Hanna instruments) na hodnotu 7,2 pomocí 1M Hydroxidu sodného (NaOH). Medium rozděleno do dvou 0,5 l skleněných lahví SIMAX „Blue Screw Cap Lab“, které jsou vhodné k použití v autoklávu (auto PS20A, Chirana). Lahve byly

označeny sterilní páskou a naplnily se pouze do poloviny, aby se předešlo vyublání kapaliny během procesu v autoklávu. Označené láhve se sterilizovaly v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121 °C.

V laminárním boxu (Aura vertical SD4, Tecoma, Itálie) se sterilovaly nové rukavice po dobu 10 minut. Po sterilizaci UV světlem bylo nalito medium B1 na misky.

Na předem připravené Petriho misky s mediem B1 byly naočkovány jednorázovou plastovou kličkou z konzervy *Acinetobacter baumannii* a uloženy do inkubátoru (Q- CELL, Pol Lab, Polsko) v plastové uzavíratelné krabičce do teploty 37 °C po dobu 24 hodin.

Z narostlé kultury *A. baumannii* byla zaočkována ve vysvíceném flowboxu overnight kultura pomocí plastové kličky do 2 ml media B1 bez agaru v modrých jednorázových zkumavkách. Kultura se nechala růst, doba neměla překročit 18 hodin. Zaočkované zkumavky byly upevněny v plastovém stojanu na zkumavky do třepačky (ES-20, Biosan, Litva) s teplotní hodnotou 37 °C a 200rpm.

Předem uchované a označené kmeny podle způsobu izolace byly umístěny v mrazáku při teplotě -20°C.

Extrakty z kmene 15RT742 izolované na kolonce Oasis MCX byly frakcionovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reversní fázi v gradientu 5 – 100% acetonitrilu ve vodě, frakcionaci provedl Dr. Zdeněk Kameník (MBÚ AV ČR).

Frakce byly v předchozím výzkumu odpařené, musely se rozpustit pomocí methanolu, do každé zkumavky bylo použito 0,5ml tekutiny, vše se provedlo v digestoři s latexovými rukavicemi. Pomocí vortexu (cat. No. 13000- IV- 24) byly opláchnuty stěny dolní poloviny zkumavek. Rozpuštěná frakce se přepipetovala do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml, které byly označeny čísly 1-15.

4.2.2 Disková difuzní metoda

Z filtračního papíru byly připraveny kancelářskou děrovačkou kolečka, která se ve skleněné petriho misce zabalila do alobalu, přelepila se sterilní páskou a byla vložena do autoklávu na 20 minut při 121 °C a následně byla sušena v horkovzdušné sušárně při 40 °C stupních po dobu 24 hodin.

Vysušené papírové terčíky se rozložily po dvou na skleněné Petriho misky v digestoři, které se označily čísly 1-15. Na každý terčík bylo nanášeno 7x 10 μ l z ependorfek, které jsme byly připraveny výše. Po nanášení tekutiny na terčíky byl uložen zbytek ependorfek s tekutinou do mazáku o teplotě -20°C.

Flowbox se vysvítí UV světlem na 15 minut, plocha se poté otřela 70 % ethanolem. Overnight kultura z třepačky se zředila sterilní destilovanou vodou. V první zkumavce bylo nanášeno pipetou 4ml vody a 1ml suspenze, tím se dosáhlo ředění 5x. Do druhé se přepipetovalo 4,5ml sterilní destilované vody a 0,5ml suspenze, ředění 10x. Zkumavky se popsaly hodnotou ředění. Z první zkumavky se opět odebralo 1 ml naředěné suspenze do nové zkumavky a přidalo se k tomu 4ml sterilované vody, tím vzniklo ředění 25x. Pro výzkum byly využity zkumavky 10x a 25x ředění.

Petriho misky s vychladlým mediem B1 se popíší 10x a 25x po 3 kusech od každého ředění, dále se ke každému dopsala písmena A, B, C. Na každou Petriho misku bylo nanášeno 1000 μ l suspenze podle názvu na misce, po dvou minutách se zbytek suspenze odpipetoval. Vydezinfikovanou pinzetou plamenem se nanášely naočkované papírové terčíky. Do prvních

zkumavek 25xA, 10xA se daly terčičky ze skleněných misek s čísly 1-5, do druhého páru 6-11, do třetího 11-15.

Petriho misky s terčičky se uložily do inkubátoru na 24 hodin při teplotě 37°C.

Druhý den se popsaly inhibiční zóny vzniklé okolo papírových terčičků a výsledky se zdokumentovaly pomocí fotoaparátu.

5 Výsledky

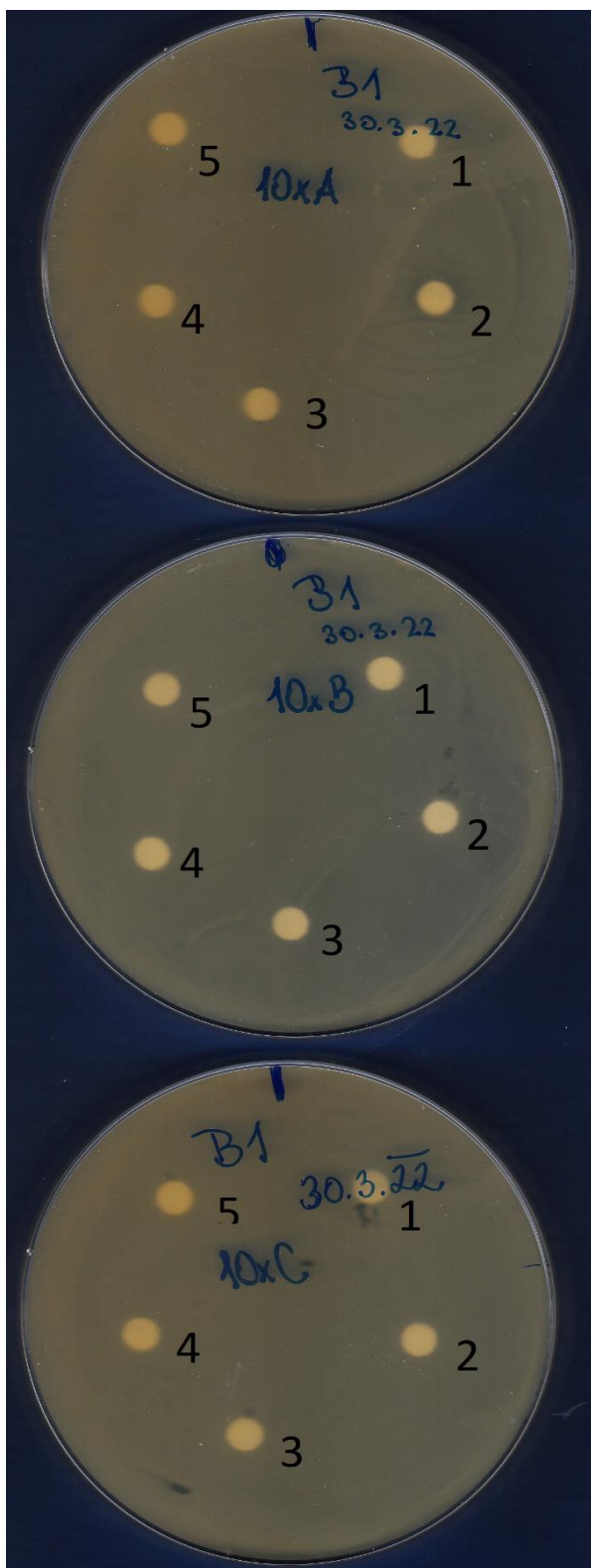
Pomocí diskové difúzní metody se prokázala antibiotická aktivita vůči multirezistentnímu kmeni *Acinetobacter baumannii* ANC 4097. Nejsilnější antibiotická aktivita se projevila ve frakcích 1-3 (viz Obrázek 1), které jsou nejpolarnější.

Celkem byly provedeny 4 pokusy testování na pevném médium.

Při zkušebním pokusu, byla zavedena metoda kontroly účinnosti za využití gentamicinu, který patří mezi antibiotika, ke kterým je i tento kmen *A. baumannii* citlivý (viz Obrázek 2). V tomto případě byly zóny výrazně větší a znatelnější.

Při prvním pokusu byly použity předem připravené frakce z extraktu získaného SPE extrakcí média po kultivaci kmene 15TR742, zde vytvořily antibiotickou aktivitu frakce 1-3, pravděpodobně ty nejpolarnější. Oproti dalším dvěma pokusům zde byla antibiotická aktivita výraznější.

V druhém pokusu nebyla dostatečně narostlá overnight kultura *A. baumannii*, a to způsobilo neúspěch pokusu (viz Obrázek 3). Nebyla viditelná vůbec žádná antibiotická aktivita. Postup pokusu se shodoval s ostatními, dá se vyloučit vnější vliv nebo pochybení v postupu. Ve třetím pokusu byla použita kultura *Acinetobacteru baumannii* jako ve druhém pokusu, ale tentokrát byla správně narostlá, a frakce číslo 2 vyšla jako účinná vůči *A. baumannii* (viz Obrázek 4). Oproti prvnímu pokusu měl tento kmen nižší antibiotickou aktivitu a nepotlačoval *A. baumannii* tak efektivně.



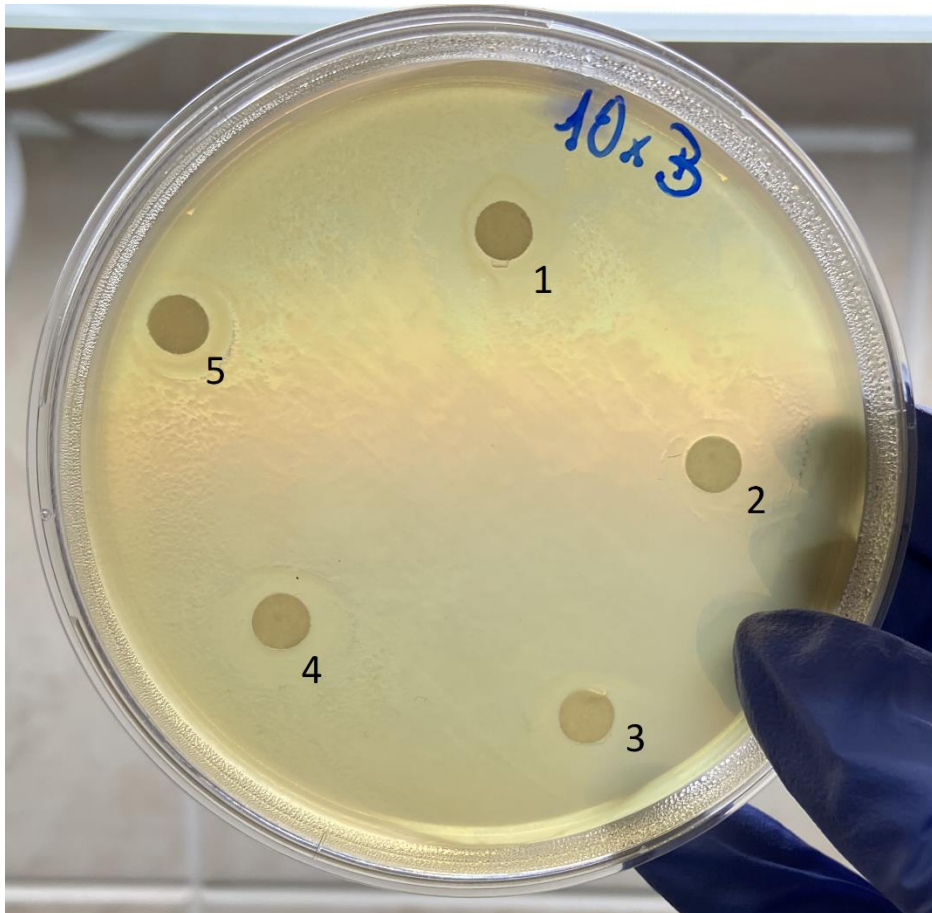
Obrázek 1: Diskovou difuzní metodou byl proveden test antibiotické aktivity pro 5 frakcí extrahovaných z kultivačního média kmene 742HBL. Patrná antibiotická aktivita ve frakci 1-3 na Petriho misce 10xA, největší zóna je viditelná ve frakci číslo 2, v této frakci se aktivita také opakuje v ostatních pokusech. Na této misce byla nanesena 10x ředěná kultura *A. baumannii* a po 2 minutách zbytek odstraněn pomocí pipety poté se na agarové medium nanesly terčičíky,

na které bylo nanášeno 70µl suspenze z předem izolovaných frakcí kmene 742HBL. (zdroj fotografie vlastní)

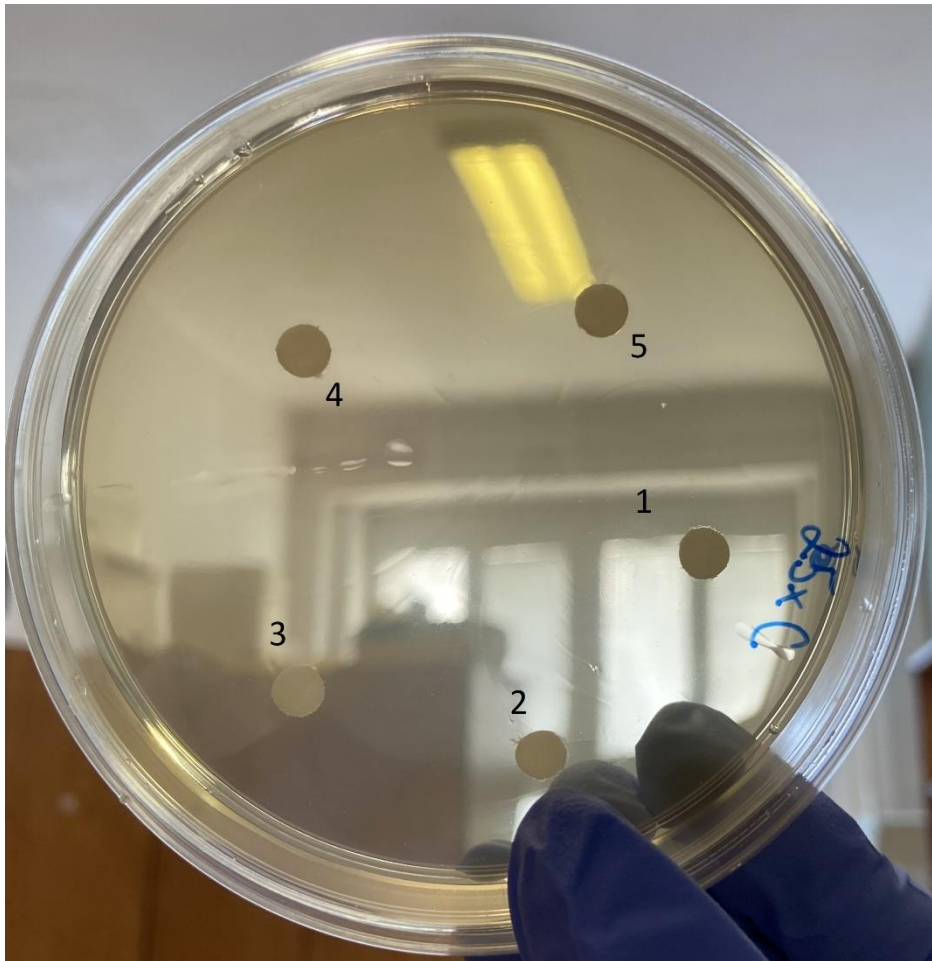


Obrázek 2: Test antibiotické aktivity pro různé koncentrace gentamicinu s použitím gentamicinových disků a overnight kultury *A.baumannii*.

Jsou zřetelně vidět vytvořené zóny antibiotické aktivity na všech terčících. Největší zóna koncentrace je u čísla 1. Velikost zóny souvisí s ředěním, které bylo na jednotlivých terčících použito, u čísla 1 byla suspenze ředěna nejméně, tudíž byla nejvíce koncentrovaná. (zdroj fotografie vlastní)



Obrázek 3: Diskovou dufuzní metodou byla otestována antibiotická aktivita pro 5 frakcí extrahovaných z kultivačního média. První pokus s použitím kmene z extraktu 742HBL, nanášeno na papírové disky 7x 10 μ l ředěné kultury z extraktu, která se předem musela znovu rozpustit použitím methanolu. Antibiotická aktivita nejvíce viditelná ve frakcích 4 a 5. Opakovaně je antibiotická aktivita ve frakci 2, jako na předchozích obrázcích. Oproti zkušebnímu pokusu s použitím gentamicinu jsou zóny aktivity zřetelně menší (zdroj fotografie vlastní).



Obrázek 4: Nenarostlá overnight kultura *A. baumannii* zapříčinila neúspěch pokusu, jak je patrné z fotky, není viditelná žádná antibiotická aktivita ve frakcích. Postup pokusu se shodoval s ostatními pokusy, lze proto tvrdit, že nešlo o vnější vliv nebo pochybení v postupu, ale neúspěch opravdu způsobila overnight kultura. (zdroj fotografie vlastní)

6 Diskuse

Kmen Actinobacteria je využitelný také v zemědělství, některé z frakcí mohou obsahovat látky, které by mohly výrazně pomoci v boji proti bakteriálním nebo houbovým chorobám, které komplikují hospodaření.

Antimikrobiální rezistence *Acinteobacter baumannii* se výrazně zvyšovala od 70. let 20. století, v té době většina kmenů byla citlivá na používaná antibiotika (Keen et al. 2010; Mera et al. 2010). Rezistence *A. baumannii* souvisí se schopností této bakterie získávat geny pro rezistenci horizontálním přenosem na plasmidech (Adams et al. 2008). Jedná se o bakterii ohrožující lidské zdraví, a to je také jeden z důvodů proč se začaly provádět výzkumy hledající kmény bakterií tvořící antibiotické látky potlačující růst této bakterie.

Důvodem pro výběr patogenu *A.baumannii* riziko, které způsobuje ve všech nemocničních zařízeních po celém světě. Způsobuje velké množství infekčních onemocnění, které mohou dosáhnout úmrtnosti až 35 % (Joly-Gouillou 2005). Proto je předmětem zkoumání ve snaze naleznout antibiotika, která by proti němu působila.

A.baumannii byla nalezena ve frakci eluované metanolem s přídavkem 5% NH₄OH. Kromě toho, že je hledaná aktivní látka polární, což vyplývá z toho, že při RP-HPLC byla eluována na začátku gradientu, lze tedy předpokládat, že molekula obsahuje bazickou funkční skupinu. Může se tedy jednat o látku ze skupiny aminoglykosidových antibiotik, u nichž je aktivita známá.

Antibiotická aktivita byla při prvním testu a využití kmene 15TR742 silnější, tento fakt by se dal odůvodnit rozdílným složením sekundárních metabolitů. Dalo by se říct, že tento kmen měl nejlepší účinnost proti *A. baumannii*.

V naší laboratoři byly nalezeny kmény aktinobakterií s potencionálem k tvorbě antibiotických látek, které by mohly potlačovat *A. baumannii*. Ze tří pokusů, testující tyto kmény se potvrdila tvorba látek potlačující *A. baumannii* ve dvou případech. Všechny pokusy měly stejné podmínky, tudíž byla odstraněna variabilita z hlediska vnějších podmínek a pokud nastaly nějaké rozdílnosti ve výsledcích, jednalo se čistě o rozdílné charakteristiky a vlastnosti kmenů.

Podle zjištěné aktivity ve frakci číslo 2, látka vykazující aktivitu vůči *A. baumannii* by měla být polárního charakteru, dá se předpokládat, že to může být molekula ze skupiny pseudodisacharidů jako je gentamicin.

Výsledky tohoto výzkumu mohou přispět k podrobnějšímu popisu produkovaných látek po přečištění a následné analýze.

7 Závěr

- Byl zaveden postup testování inhibičního účinku látek vůči *A. baumannii* diskovou difuzní metodou.
- Potvrdilo se, že extrakty získané z kmenů vykazující aktivitu vůči *A. baumannii* je možné frakcionovat separací na preparativní HPLC koloně, přičemž antibiotická aktivita zůstane zachována a identifikované aktivní frakce bude možné použít k další analýze produkovaných látek.
- Hledaná molekula bude patřit do skupiny aminoglykosidových antibiotik nebo jim příbuzných látek

8 Literatura

Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, MacDonald IJ, Martin KM, Russo T, Campagnari AA, Hujer AM, Bonomo RA, Gill SROV. 2008. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology* **190**: 8053-8064.

Al-Dhabi NA, Esmail GA, Duraipandiyan V, Valan Arasu M, Salem-Bekhit MM. 2016. Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces* sp. AIDhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia. *Extremophiles* **20**:79-90.

Al-Sweih NA, Al-Hubail MA, Rotimi VO. 2011. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. *Journal of Chemotherapy* **23**:13-16.

Ambarwati A, Sembiring L, Soegihardjo C. 2012. Antibiotic produced by streptomycetes associated with rhizosphere of purple nut sedge (*Cyperus rotundus* L.) in Surakarta, Indonesia. *African Journal of Microbiology Research* **6**(1):52-57.

Atlas R. 1997. Principles of microbiology. WCB McGraw-Hill, New York.

Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H, Clément C, Ouhdouch Y, Wezel GP. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **80**:1-43.

Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. 2015. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology* **80**:1-43.

Berd D. 1973. Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology* **25**:665-681.

Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *Journal Antibiotics* **58**(1):126.

Bergogne-Berezin E, Towner KJ. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* **9**:148-165.

Bhatti AA, Haq S, Bhat RA. 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis* **111**:458-467.

Bibb M. 2005. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* **8**:208-215.

Bouizgarne B, Ait Ben Aoumar A. 2014. Diversity of plant associated Actinobacteria. Pages 41-100 in Maheshwari DK, editors. *Bacterial diversity in sustainable agriculture*. Springer International, Heidelberg, Germany.

Bouizgarne B, Ait Ben Aoumar A. 2014. Diversity of plant associated Actinobacteria. Pages 41-100 in Maheshwari DK, editors. *Bacterial diversity in sustainable agriculture*. Springer International, Heidelberg, Germany.

Bouvet PJM, Grimont PAD. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **36**:228-240.

- Buchanan RE. 1917. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. II. The primary subdivisions of the Schizomycetes. *Journal of Bacteriology* **2**:155-164.
- Cross T, Goodfellow M. 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. *The Society for Applied Bacteriology Symposium Series* **2**:11-112.
- Dastager S, Dayanand LWJA, Tang SK, Tian XP, Zhi XY, Xu LH, Jiang C. 2006. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology* **5**:1131-1134.
- Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S. 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* (**5**:e10034) DOI: 10.1371/journal.pone.0010034.
- Edwards C. 1993. Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **42**:161-179.
- Egan S, Wiener P, Kallifidas D, Wellington EMH. 2001. Phylogeny of *Streptomyces* species and evidence for horizontal transfer of entire and partial antibiotic gene clusters. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**:127-133.
- Euzéby JP. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **47**:590-592.
- Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I, Kelesidis T. 2007. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **26**:857-868.
- Falagas ME, Rafailidis PI. 2007. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Critical Care* **11**:134.
- Flärdh K, Buttner MJ. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology* **7**:36-49.
- Flärdh K, Richards DM, Hempel AM, Howard M, Buttner MJ. 2012. Regulation of apical growth and hyphal branching in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* **15**:737-743.
- Flärdh K. 2003. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* **6**:564-571.
- Gerber NN. 1967. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Biotechnology and Bioengineering* **9**:321-327.
- Gesheva V, Ivanova V, Genova R. 2005. Effects of nutrients on the production of microbial antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiological Research* **160**(3):243-248.
- Girard G, Willemsse J, Zhu H, Claessen D, Bukarasam K, Goodfellow M, van Wezel GP. 2014. Analysis of novel kinasatospores reveals significant evolutionary changes in conserved developmental genes between *Kinasatospira* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **106**:365-380.
- Goodfellow M, O'Donnell AG. 1989. Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. Pages 343-383 in Baumberg S, Hunter IS, Rhodes PM, editors. *Microbial products: new approach*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Goodfellow M, Williams ST. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* **37**(1):189-216.

Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **15**:305-311.

Chang WN, Lu CH, Huang CR & Chuang YC. 2000. Community-acquired *Acinetobacter meningitis* in adults. *Infection* **28**:395-397.

Chater K. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annual Review of Microbiology* **47**:685- 711.

Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews* **34**:171-198.

Chater KF. 1972. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology* **72**:9-28.

Ichikawa N, Oguchi A, Ikeda H, Ishikawa J, Kitani S, Watanabe Y, Nakamura S, Katano Y, Kishi E, Sasagawa M, Ankai A, Fukui S, Hashimoto Y, Kamata S, Otoguro M, Tanikawa S, Nihira T, Horinouchi S, Ohnishi Y, Hayakawa M, Kuzuyama T, Arisawa A, Nomoto F, Miura H, Takahashi Y, Fujita N. 2010. Genome sequence of *Kitasatospora setae* NBRC 14216T: an evolutionary snapshot of the family Streptomycetaceae. *DNA Research* **17**:393-406.

Ilić S, Konstantinović S, Veljković V, Savić D, Gojgić-Cvijović G. 2010. The impact of different carbon and nitrogen sources on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7. *Current research, Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* **2**: 1337-1342.

Joly-Guillou ML. 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clinical Microbiology and Infection* **11**:868-873.

Jonsbu E, McIntyre M, Neilson J. 2002. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *Journal of Biotechnology* **95**(2):133-144.

Kalakoutskii LV, Agre NS. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Reviews* **40**:469-525.

Kariminik A, Baniyadi F. 2010. Pageantagonistic activity of Actinomycetes on some gram negative and gram positive bacteria. *World Applied Sciences Journal* **8**(7):828-832.

Keen EF III, Murray CK, Robinson BJ, Hospenthal DR, Co EM, Aldous WK. 2010. Changes in the incidences of multidrug-resistant and extensively drug-resistant organisms isolated in a military medical center. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **31**:728-732.

Kempf M, Rolain JM. 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents* **39**: 105-114.

Kim BJ, Kim CJ, Chun J, Koh YH, Lee SH, Hyun JW, Cha CY, Kook YH. 2004. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase beta-subunit gene (rpoB) sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:593-598.

Lechevalier HA, Lechevalier MP. 1965. Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. *Ann Inst Pasteur* **108**:662–673.

Lechevalier MP, Lechevalier HA. 1980. The chemotaxonomy of actinomycetes. Pages 225-292 in Dietz A, Thayer DW, editors. *Actinomycetes taxonomy*. Virginia Society of Ind, London, United Kingdom.

Locci R, Sharples G. 1984. Morphology. Pages 165-199 in Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST, editors. The biology of Actinomycetes. Academic Press, London, United Kingdom.

Locci R, Schaal KP. 1980. Apical growth in facultative anaerobic actinomycetes as determined by immunofluorescent labeling. *Zentralbl Bakteriol* **246**:112-118.

Lounes A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1996. Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: effects of glucose and inorganic phosphate. *Applied Microbiology Biotechnology* **45(1-2)**:204-211.

Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Buss HJ, Trujillo ME, Kämpfer P, Whitman WB. 2012. Road map of the phylum Actinobacteria. Pages 1-28 in Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, New York.

Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Busse HJ, Trujillo ME, Kämpfer P, Whitman WB. 2012. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, New York.

Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. 2013. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiological Research* **168**:311-332.

Martin JF. 2004. Phosphate control of the biosynthesis antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *Journal of Bacteriology* **186(16)**:5197-5201.

McConnell MJ, Actis L, Pachon J. 2013. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews* **37**:130-155.

MCIntyre J. 2002. Antibiotic drugs. *Journal of Antibiotics* **34**:356-370.

Méndez C, Salas JA. 2001. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: Drug secretion and resistance mechanisms. *Research in Microbiology* **152**:341-350.

Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, Sahn DF. 2010. *Acinetobacter baumannii* 2002–2008: increase of carbapenem-associated multiclass resistance in the United States. *Microbial Drug Resistance* **16**:209-215.

Mijad A., 2020, *Metabolická aktivita bakterií izolovaných z kyselá lesní půdy* (BSc. Thesis) Czech University of life Sciences Prague, Prague

Nikaido H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry* **78**:119-146.

O'Donnell AG. 1988. Recognition of novel actinomycetes. Pages 69 –88 in Goodfellow MM, Williams ST, Mordarski M, editors. *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, London.

Ochi K. 1995. Phylogenetic analysis of mycolic acid-containing wallchemotype IV actinomycetes and allied taxa by partial sequencing of ribosomal protein AT-L30. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **45**:653-660.

Orna M. 2001. Women chemists in the national inventors hall of fame: Their remarkable lives and their award-winning research. *Bulletin for the History of Chemistry* **34(1)**:50-60.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* **21**: 538-582.

Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**:3471-3484.

Prauser H, Lechevalier MP, Lechevalier H. 1970. Description of *Oerskovia* gen. n. to harbor Orskov's motile *Nocardia*. *Journal of Applied Microbiology* **19**:534.

Pridham TG, Hesseltine CW, Benedict RG. 1958. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Journal of Applied Microbiology* **6**:52-79.

Příborský J. 2018. Antibiotika. Pages 701-756 in Švihovec J, Bultas J, Anzenbacher P, Chládek J, Příborský J, Slíva J, Votava M, editors. *Farmakologie*. Grada, Praha.

Rafieenia R. 2013. Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in Streptomycetes. *Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences* **3(3)**:810-821.

Raoult D, La Scola B, Lecocq P, Lepidi H, Fournier PE. 2001. Culture and immunological detection of *Tropheryma whippelii* from the duodenum of a patient with Whipple disease. *JAMA* **285**:1039-1043.

Raoult D, Lepidi H, Harle JR. 2001. *Tropheryma whippelii* circulating in blood monocytes. *The New England Journal of Medicine* **345**:548.

Reynolds PE. 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **8**:943-950.

Roca I, Espinal P, Vila-Farres X, Vila J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol* **3**:148.

Russell DG. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**:1-9.

Saadoun I, Momani A, Malkawi H, Mohammad M. 1999. Isolation, identification and analysis of antibacterial activity of soil streptomycetes isolates from north Jordan. *Microbios* **100**: 41-46.

Sanglier J, Haag H, Huck T, Fehr T. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Research in Microbiology* **144(8)**:661-663.

Sasaki S, Takeshita F, Okuda K, Ishii N. 2001. *Mycobacterium leprae* and leprosy: A compendium. *Microbiology and Immunology* **45**:729-736.

Sherwood LM, Woolverton CJ. 2010. *Prescott's microbiology*, 7th ed. McGraw-Hill, New York.

Schats A, Bugie E, Waksman S. 1994. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proceeding of Society for Experimental Biology and Medicine* **55**:66-69.

Silva M, Anne D. 2004. The best penicillin for resistant bacteria. *Journal of antibiotics* **48**:562-569.

Singh B, Sekhon GS. 1979. Nitrate pollution of groundwater from farm use of nitrogen fertilizers – A review. *Agriculture and Environment* **4**:207-225.

Smaoui S, Mathieu F, Fguira L, Merlina G, Mellouli L. 2011. Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in the soil from an Oasis in Tunis. *Archives of Biological Sciences* **63(4)**:1047-1056.

Sugiyama M, Mochizuki H, Nomi R, Nimi O. 1981. Mechanism of protection of protein synthesis against streptomycin inhibition in a producing strain. *The Journal of Antibiotics* **34**:1183-8.

Suzuki K, Goodfellow M, O'Donnell AG. 1993. Cell envelopes and classification. Pages 195-250 in Goodfellow M, O'Donnell AG, editors. *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press, London, United Kingdom.

Swiatek MA, Tenconi E, Rigali S, van Wezel GP. 2012. Functional analysis of the N-acetylglucosamine metabolic genes of *Streptomyces coelicolor* and role in control of development and antibiotic production. *J Bacteriol* **194**:1136-1144.

van Dissel D, Claessen D, van Wezel GP. 2014. Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Adv Appl Microbiol* **89**:1-45.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**:495-548.

Větrovský T, Steffen KT, Baldrian P. 2014. Potential of cometabolic transformation of polysaccharides and lignin in lignocellulose by soil Actinobacteria. *PLoS One* (**9**:e89108) DOI: 10.1371/journal.pone.0089108.

Vetsigian K, Kishony R. 2011. Structure and evolution of *Streptomyces* interaction networks in soil and in silico. *PLoS Biology* (**9**(10):e1001184) DOI: 10.1371/journal.pbio.1001184.

Waksman SA, Woodruff HB. 1942. Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram-negative bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **49**:207-210.

Wang Y, Zhang ZS, Ruan J, Wang YM, Ali S. 1999. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **23**:178-187.

Watve M, Tichoo R, Jog MM, Bhole B. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *streptomyces*? *Archives of Microbiology* **17**:386-390.

Wietzorrek A, Bibb M. 1997. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Molecular Microbiology* **25**:1181-1184.

Willems J, Borst J, Waal E, Bisseling T, Wezel G. 2011. Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. *Genes & Development* **25**:89-99.

Williams ST, Goodfellow M, Alderson G. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. Pages 2452-2492 in Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.

Wisplinghoff H, Perbix W & Seifert H. 1999. Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*: a case-control study of adult burn patients. *Clinical Infectious Diseases* **28**: 59-66.

Wright G. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology* **13**: 589-594.

Yadav AN, Verma P, Sachan SG, Saxena AK. 2017. Biodiversity and biotechnological applications of psychrotrophic microbes isolated from Indian Himalayan regions. *EC Microbiol ECO* **1**:48-54.

Young, M., & Kempe, L. 1985. Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces irncoensis* in chemically defined media. *Biotechnology and Bioengineering* **55**(2):327-333.

Zhi XY, Li WJ, Stackebrandt E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**:589-608.

Zhu H, Sandiford SK, van Wezel GP. 2014. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **41**:371-386.