



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Charakterizace antibiotických aktivit nepatogenních
streptomycet izolovaných z lidských tkání

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Zuzana Žlábková

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Petříčková, Ph.D

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Charakterizace antibiotických aktivit nepatogenních streptomycet izolovaných z lidských tkání“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 16.4.2018

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala na prvním místě mé školitelce Mgr. Kateřině Petříčkové Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Poděkování patří i všem členům laboratoře Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK v Praze, v čele s RNDr. Janem Bobkem, Ph.D., dále pak Ústavu půdní biologie Biologického centra AV ČR, MUDr. Janu Závorovi z Oddělení klinické mikrobiologie a ATB centra Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za poskytnutí potřebných izolátů a v neposlední řadě mé rodině za podporu.

Charakterizace antibiotických aktivit nepatogenních streptomycet izolovaných z lidských tkání.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá pilotní charakterizací deseti zástupců streptomycet izolovaných z lidských klinických vzorků, kteří byli náhodně vybráni z unikátní, rozrůstající se kolekce klinických izolátů streptomycet uložené ve Sbirce kultur půdních aktinomycet České Budějovice (CCSACB) při Ústavu půdní biologie Biologického centra AV ČR, v.v.i. .

Streptomycety jsou až na naprosté výjimky považovány za nepatogenní bakterie, které se vyskytují primárně v půdě. Jsou studovány pro obrovský biosyntetický potenciál, jako nevyčerpatelný zdroj biologicky aktivních látek. Ty kromě klasických antimikrobiálních látek zahrnují též sekundární metabolity, které ovlivňují chování lidských buněk – kancerostatika, imunomodulátory, protizánětlivé látky apod. Kolonizace lidského těla streptomycetami nebyla nikdy systematicky studována, existují jen sporadické zprávy o jejich fakultativní patogenicitě, zejména u imunokompromitovaných osob (abscesy, pneumonie, apod.). Poslední práce studující lidský mikrobiom moderními citlivými technikami – metagenomikou a hmotnostní spektrometrií – však prokazují, že tyto mikroorganismy běžně osidlují minimálně kůži, respirační trakt a též urogenitální soustavu.

Cílem mé práce bylo provést základní mikrobiologickou charakterizaci vybraných izolátů, které pocházejí především ze sputa pacientů s chronickými zánětlivými chorobami. Sledovala jsem hemolytické schopnosti kmenů, produkci antimikrobiálních látek a její vliv na vybrané lidské patogeny a též vzájemnou interakci streptomycet s nimi. Výsledky práce naznačují, že by streptomycety mohly svými nízkomolekulárními látkami významně ovlivňovat složení lidského mikrobiomu, včetně patologického, a modulovat jeho chování (virulenci).

Klíčová slova

streptomycety; antimikrobiální látky; sekundární metabolity; kokultivace; biologicky aktivní látky; hemolýza

Characterization of antibiotic activity of nonpathogenic streptomycetes isolated from human tissue.

Abstract

The bachelor thesis is focused on pilot characterisation of ten strains of streptomycetes isolated from human clinical samples that were randomly chosen from the unique and still growing collection of clinical isolates of streptomycetes deposited in the Culture Collection of Soil Actinomycetes in České Budějovice (CCSACB), administered by the Institute of Soil Biology of the Biology Centre CAS.

Streptomycetes are believed to be nonpathogenic bacteria (with a very few exceptions) that are found primarily in soil. They are studied for their enormous biosynthetic potential as inexhaustible source of bioactive substances. These include both classic antimicrobial substances as well as secondary metabolites that influence the behaviour of human cells - cancerostatics, immunomodulators, anti-inflammatory substances, etc. Colonisation of the human body by streptomycetes has never been systematically studied. There are only rare reports about their facultative pathogenicity in immunocompromised persons (abscesses, pneumonia etc.). However, the latest research on human microbiome done with modern sensitive methods – metagenomics and mass spectrometry – proves that these microorganisms commonly colonise the skin, respiratory tract and genitourinary system.

The objective of my work was to carry out basic microbiological characterisations of the selected streptomycete isolates that originate mostly from sputum of patients with chronic inflammatory diseases. I observed hemolytic abilities of the strains, antimicrobial substance production and its effect on some human pathogens as well as interaction of streptomycetes with these pathogens. The results suggest that streptomycetes and their low-molecular-weight secondary metabolites could significantly influence the composition of human microbiome, including pathogenic, and modulate its behaviour (virulence).

Key words

streptomycetes; antimicrobial substances; secondary metabolites; cocultivation; bioactive substances; hemolysis

Obsah

Obsah.....	6
1 Úvod.....	8
2 Literární přehled.....	9
2.1 Streptomycety	9
2.1.1 Obecná charakteristika	9
2.1.2 Streptomycety jako zdroj biologicky aktivních látek	11
2.1.3 Regulace produkce sekundárních metabolitů	15
2.1.4 Interakce streptomycet s živočichy a rostlinami	16
2.1.5 Streptomycety izolované z lidských vzorků.....	18
2.2 Mikrobiom lidských dýchacích cest a jeho vliv na rozvoj onemocnění...	19
2.2.1 Astma.....	20
2.2.2 Chronická obstrukční plicní nemoc.....	20
2.2.3 Cystická fibróza.....	21
2.3 Hemolýza	21
2.3.1 Streptomycety a hemolýza	22
2.3.2 Hemolytická aktivita metabolitů streptomycet.....	23
2.3.3 Hemolýza příbuzných patogenních aktinomycet	23
3 Cíl práce a hypotézy	24
3.1 Cíl práce	24
3.2 Hypotézy	24
4 Metodika	25
4.1 Materiál.....	25
4.1.1 Chemikálie a složky kultivačních médií.....	25
4.1.2 Bakteriální kmeny	26
4.1.2.1 Streptomycety	26
4.1.2.2 Patogenní bakterie	27

4.1.2.3	Uchovávání bakteriálních kmenů	28
4.2	Metody stanovení.....	28
4.2.1	Určení hemolytických vlastností streptomycet	28
4.2.2	Kokultivační experimenty	29
4.2.3	Stanovení produkce antibiotických látek - měření zón růstové inhibice	30
4.2.4	„Pasážovaná“ kokultivace	31
5	Výsledky	31
5.1	Hemolytické vlastnosti streptomycet z lidských vzorků	31
5.2	Interakce streptomycet s lidskými patogeny.....	32
5.2.1	Interakce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a kmene TR42	34
5.2.2	Produkce antibakteriálních a antifungálních látek	35
5.2.3	Ovlivnění produkce antibiotických látek technikou kokultivace	38
5.3	Nejaktivnější izolát, kmen TR42	40
6	Diskuze.....	41
7	Závěr	44
8	Seznam použitých zdrojů	45
9	Seznam obrázků	55
10	Seznam tabulek.....	55
11	Seznam zkratk.....	56

1 Úvod

Streptomycety jsou Gram-pozitivní půdní bakterie známé svou produkcí sekundárních metabolitů s charakteristickými antibiotickými, antihelmitickými, protinádorovými a antivirovými účinky. Jsou původci většiny významných antibiotik. Z důvodu aktuálního celosvětového problému zvyšující se četnosti bakterií rezistentních na antibiotika, je zapotřebí tomuto problému věnovat pozornost a snažit se najít nové cesty k získání nových antimikrobiálních látek. Rezistence je způsobená neuváženým podáváním antibiotik, samoléčbou a předčasným ukončením antibiotické léčby. Léčba infekcí vyvolaných rezistentními bakteriemi je zdlouhavá, finančně náročná a často i neúčinná. Ideální pro zlepšení situace je předepisovat antimikrobiální látky jen tam, kde je to nejvíce zapotřebí a pokusit se získat antibiotika nová. Jedním z možných zdrojů pro získání nových antimikrobiálních látek jsou streptomycety. Možností, jak aktivovat produkci nových sekundárních metabolitů u streptomycet, je jejich kokultivace s patogenními bakteriemi (van der Meij et al., 2017).

V poslední době se objevují první práce, které dávají do souvislosti kolonizaci lidských dýchacích cest a její možný vliv na rozvoj respiračních onemocnění. Streptomycety byly v několika případech izolovány z klinického materiálu a mohou být tedy i potencionálními patogeny. Jedná se zejména o taková onemocnění, jako jsou astma, chronická obstrukční plicní choroba a cystická fibróza. Streptomycety jsou dále významné pro svou schopnost chránit četné množství živočichů a rostlin před potencionálními patogeny v rámci symbiotických vztahů (van der Meij et al., 2017).

V teoretické části této bakalářské práce bych chtěla podrobněji charakterizovat rod *Streptomyces* a s ním související produkci sekundárních metabolitů. Zmíním se též o interakci streptomycet s živočichy, streptomycetách izolovaných z lidských vzorků a o hemolytických aktivitách streptomycet i jejich metabolitů.

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo sledovat hemolytické vlastnosti streptomycet a charakterizovat jejich antibiotickou, případně antifungální aktivitu u vybraných zástupců izolovaných z lidských vzorků. Úloha těchto bakterií v lidském organismu není zcela objasněná. Kokultivace probíhala na klasických kultivačních půdách a k interakci bylo vybráno několik zástupců typických lidských patogenů.

2 Literární přehled

2.1 Streptomycety

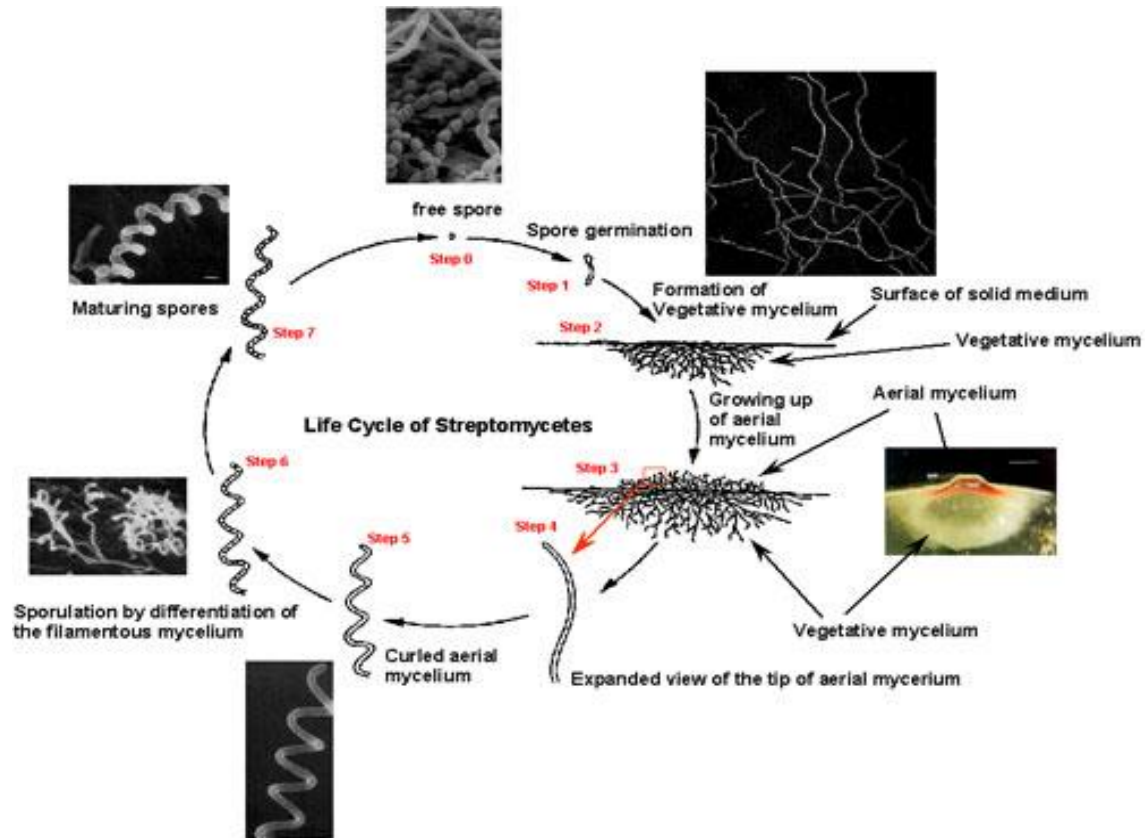
2.1.1 Obecná charakteristika

Streptomycety jsou rod Gram-pozitivních, aerobních bakterií z řádu *Actinomycetales*, který obsahuje více než 500 druhů bakterií a řadí se tím mezi nejobsáhlejší rody tohoto řádu (Hasani et al., 2014). Kromě streptomycet sem patří například rody jako *Mycobacterium*, *Nocardia* nebo *Propionibacterium* (Votava, 2003). Jejich přirozeným místem výskytu jsou různé druhy půd, kde udržují jejich pevnost, chrání je před vyschnutím a díky produkci metabolitu geosminu vytvářejí charakteristický zemitý zápach (Hasani et al., 2014). Geosmin ((4*S*,4*aS*,8*aR*) - 4,8*a* - Dimethyl - 1,2,3,4,5,6,7,8 - oktahydronaftalen - 4*a* - ol) je též zodpovědný za zemitou chuť červené řepy (Cane et al., 2006). Streptomycety patří mezi hlavní mikroorganismy, které jsou zodpovědné za rozklad zbytků rostlinných těl v půdě (Hasani et al., 2014).

Svůj název získaly z latinského slova *streptos* (zvrásněný) a *myces* (houba). Jak již název vypovídá, jedná se o vláknité bakterie, které tvoří mycelia s řetízky exospór a pigmenty a jsou makroskopicky velmi podobné houbám. Rozkládají peroxid vodíku na vodu a kyslík a řadí se proto mezi kataláza pozitivní bakterie. Buněčná stěna je složená z kyseliny L-diaminopimelové (L-DAP). Velikost spór se pohybuje okolo 1 μm a odstín pigmentu určuje finální barvu mycelia. Kolonie jsou charakteristicky hladké a později granulované, nebo sametové. Při kultivaci rostou pomalu na běžných kultivačních půdách při teplotě 10 – 37 °C a pH 6,5 - 8,0. Výjimku tvoří tři termofilní druhy, které rostou při teplotě 45 – 55 °C. Jedná se o *S. thermonitrificans*, *S. thermovulgaris* a *S. thermoflavus*. Jejich genom má vysoký obsah guaninu a cytosinu v DNA, 69 - 78 % (Hasani et al., 2014). Patří mezi eubakterie s největší velikostí genomu: 7–12 Mbp, počet genů převyšuje počet genů u jednoduchých eukaryot, např. kvasinek (Harrison a Studholme, 2014). Předpokládá se, že 2/3 těchto genů kódují adaptivní funkce a nejsou životně nezbytné (Hasani et al., 2014).

Streptomycety jsou známy produkcí sekundárních metabolitů s antibiotickými, antimykotickými, protivirovými a protinádorovými vlastnostmi. Vyrábějí kolem 2/3 prospěšných antibiotik a jsou považovány za jednu z největších skupin producentů antibiotik (Watve et al., 2001). Tyto půdní bakterie se též studují jako model prokaryotické buněčné diference – mají složitý životní cyklus, který se vyznačuje tvorbou dvou typů mycelií (Obr. 1.). Cyklus začíná usazením spór v substrátu. Substrát

stimuluje klíčení spór a dochází ke vzniku substrátového mycelia, které je mnohojaderné, větvené a může tvořit barevné pigmenty. Substrátové mycelium následně stárne a v reakci na vyčerpání živin diferencuje nový druh buněk, tzv. vzdušné hyfy, které se nevětví a na jejichž koncích se vytváří exospóry (Hasani et al., 2014).



Obrázek 11 Vývojový cyklus Streptomycet (Chater, 1998).

Kromě toho, že streptomycety osidlují hlavně půdu a podobné substráty, můžeme jejich zástupce najít například ve vodě, na rostlinách, uvnitř těl bezobratlých nebo výjimečně též jako patogeny rostlin, lidí a zvířat (Hasani et al., 2014).

U rostlin způsobují hospodářsky významnou chorobu známou jako strupovitost brambor, jejímž původcem je *Streptomyces scabies* (Klaban, 1999). *S. scabies* je rostlinný patogen, který infikuje podzemní rostlinné tkáně. Může napadat jak malé sazenice, tak i zralé plodiny (Wanner, 2006). Hlavním faktorem virulence jsou thaxtominy patřící do skupiny fyto toxinů. Jedná se o thaxtominy A a thaxtominy B (Sánchez-Ferrer et al., 1995). Jejich původcem je z největší části *S. scabies*, ale hovoří se i o jemu morfologicky podobných kmenech - *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei*. Kromě brambor tyto fyto toxiny ovlivňují také ostatní plodiny, jako například ředkvičky, řepu a mrkev. Mezi další rostlinné patogeny patří například *S. ipomoea*, *S. aureofaciens* a *S. tumescans*

(Wanner, 2006). Ve vodě, zejména mořské, jsou streptomycety významným zdrojem nových antibiotik (Hasani et al., 2014).

Zástupce *S. somaliensis* byl identifikován jako jeden z velkého množství původců chronického infekčního onemocnění zvaného mycetom. Jedná se o onemocnění podkožní tkáně objevující se typicky na dolních končetinách. Výskyt byl hlášen v Mexiku, Súdánu a Indii a je charakteristický vysokou morbiditou. Při tomto onemocnění dochází k tvorbě otoků podobných nádorům. Vše začíná drobným poraněním, nejčastěji na noze. Streptomycety se dostávají do podkožní tkáně, kde se shlukují do útvarů, které se popisují jako zrnka. Ze zrnka se utváří charakteristický uzel, který obsahuje hnis a poškozují až kost. Rozlišujeme dva typy mycetomu. Eumyceton, jehož původcem jsou pravé houby a v populaci častější aktinomycetom, pocházející z aerobních bakterií aktinomycet. Mezi původce druhého zmíněného typu se zařazuje rod *Nocardia*, *Actinomadura*, *S. somaliensis* a *S. sudanensis*. Onemocnění má dobrou prognózu, a pokud není zasažena kost, reaguje velmi dobře na léčbu. Při postižení kostí může onemocnění znamenat až smrt. Pro léčbu tohoto onemocnění bývají použity léčiva jako amikacin, linezolid, chinolony, streptomycin nebo karbapenemy. Léčba je komplikovaná a může trvat až rok. V případě tohoto onemocnění byly popsány možné recidivy. (Arenas et al., 2017).

2.1.2 Streptomycety jako zdroj biologicky aktivních látek

Streptomycety jsou zdrojem biologicky aktivních sekundárních metabolitů již více než 70 let. První zmínka o této skupině půdních bakterií je z roku 1942 v souvislosti s antibiotikem zvaným streptotricin produkovaným zástupcem *S. lavendulae* (Watve et al., 2001).

Sekundární metabolity jsou látky, které nejsou nutné pro základní biologické děje, ale zajišťují bakterii lepší podmínky k životní strategii (Schindler, 2010). Hlavním podnětem k tvorbě antibiotik je nedostatek živin pro růst a následné ukončení růstu. Půda, kterou streptomycety a současně i jiné mikroorganismy obývají, je typickým oligotrofním prostředím, ve kterém nacházíme mikroorganismy s pomalejším růstem a vysokou adaptační schopností. K ní patří jak produkce bioaktivních látek, tak např. produkce specializovaných extracelulárních hydrolytických enzymů (Hodgson, 2000).

Antibiotika můžeme dělit dle několika aspektů. Dle typu účinku máme antibiotika baktericidní (usmrcující buňku) a bakteriostatická (zastavující růst a množení). Druhým přístupem je dělení antibiotik dle mechanismu účinku. Sem patří například inhibice

syntézy buněčné stěny a nukleových kyselin, poškození buněčné membrány nebo inhibice tvorby bílkovin (Votava, 2005).

Mezi modelové, nejlépe prostudované streptomycety patří *S. griseus*, *S. coelicolor* a *S. avermitilis* (de Lima Procópio et al., 2012). *S. griseus* je producentem aminoglykosidového antibiotika streptomycinu, objeveného před 60 lety. Je rozpustný ve vodě a aktivní proti G⁺ i G⁻ bakteriím včetně mykobakterií (Ohnishi et al., 2009). Druhý zmíněný zástupce se využívá nejčastěji v genetických studiích morfologické a metabolické diferenciaci, produkuje barevná antibiotika aktinorhodin a undecylprodigiosin (de Lima Procópio et al., 2012).

Přehled významných zástupců streptomycet a jednotlivá antibiotika je vyznačen v Tab. 1.

Tabulka 1 Seznam některých antibiotik produkovaných streptomycetami (de Lima Procópio et al., 2012).

Streptomyceta	Antibiotikum	Streptomyceta	Antibiotikum
<i>S. orchidaccus</i>	Cykloserin	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Erytromycin
<i>S. orientalis</i>	Vankomycin	<i>S. venesuellae</i>	Chloramfenikol
<i>S. fradiae</i>	Fosfomicin, Dekamycin Neomycin, Aktinomycin	<i>S. aureofaciens</i>	Dimethylchlor tetracyklin, Chlortetracyklin
<i>S. nodosus</i>	Amfotericin B	<i>S. ambofaciens</i>	Spiramycin
<i>S. noursei</i>	Nystatin	<i>S. avermitilis</i>	Avermicin
<i>S. mediterranei</i>	Rifampin	<i>S. alboniger</i>	Puromycin
<i>S. griseus</i>	Streptomycin	<i>S. niveus</i>	Novobicin
<i>S. knanamyceticus</i>	Kanamycin	<i>S. platensis</i>	Platenmycin
<i>S. tenebrarius</i>	Tobramycin	<i>S. roseosporus</i>	Daptomycin
<i>S. spectabilis</i>	Spektinomycin	<i>S. ribosidificus</i>	Ribostamycin
<i>S. viridifaciens</i>	Tetracyklin	<i>S. garyphalus</i>	Cykloserin
<i>S. lincolensis</i>	Linkomycin, Klindamycin	<i>S. vinaceus</i>	Viomycin
<i>S. rimosus</i>	Oxytetracyklin	<i>S. clavuligerus</i>	Cefalosporin

Streptomycety produkují také metabolity zvané desferrioxaminy nebo cobalamin. K získávání železitých iontů slouží první zmíněný metabolit, který je součástí skupiny sideroforů. Cobalamin je tetrapyrol obsahující kobalt. Obecně je znám také pod názvem vitamín B12 a má důležitou funkci v krvetvorbě. Patří sem mnoho derivátů jako například adenosylkobalamin, methylkobalamin nebo hydroxokobalamin (Takano et al., 2016).

Kromě celé řady antibiotik streptomycety produkují i látky s jinou biologickou aktivitou – imunomodulační, protinádorovou, antiparazitární, protivirovou nebo herbicidní. *Streptomyces hygroscopicus*, izolovaný ze vzorků půdy na Velikonočních ostrovech, je producentem fungicidního antibiotika zvaného rapamycin. Svůj název získalo dle ostrova Rapa Nui. Je vysoce aktivní proti houbám rodu *Candida albicans*, méně proti *Microsporium gypseum* a *Trichophyton granulosum*. Rapamycin je nyní užíván hlavně jako imunosupresivum při orgánových transplantacích, selektivně snižuje produkci některých cytokinů (Vézina et al., 1975). Dále se využívá k léčbě onemocnění zvaného lymfangioleiomyomatóza. Lymfangioleiomyomatóza je onemocnění poškozující plíce, vyskytující se nejčastěji u žen. Postižení mají až dvakrát sníženou funkci plic než zdravý jedinci (McCormack, 2008). Další imunomodulační makrolid - FK506 neboli takrolimus – byl izolován ze *Streptomyces tsukubaensis* v Japonsku v roce 1984. Ten je inhibitorem kalcineurinu a je běžně využívaný při transplantacích podobně jako rapamycin (Mukherjee et al., 2010).

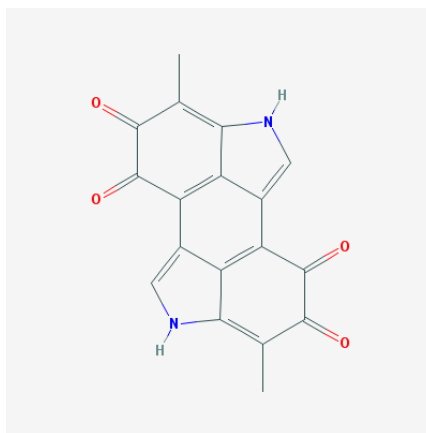
Streptomyces avermitilis je producentem skupiny 8 antihelmitik avermektinů, které jsou používané ve veterinární medicíně. Byly objeveny v roce 1976 a jsou charakteristické vysokou aktivitou proti členovcům a hlísticím. Rezistence parazitů na tento lék byla prokázána u různých druhů přežvýkavců, naopak například u psů a koček nikoliv (Maddison et al., 2008).

Mezi metabolity streptomycet najdeme i látky s protinádorovými účinky. Významným producentem kancerostatických látek je *Streptomyces verticillus*, který produkuje peptidové antibiotikum s cytotoxickým účinkem zvané bleomycin. Bleomycin se používá k léčbě Hodgkinových a non-Hodgkinových lymfomů (Boll et al., 2016). Jednou z klíčových příčin úmrtí pacientů s rakovinným onemocněním jsou bezesporu metastázy nádorů (Chen et al., 2010), klíčovým krokem k jejich vzniku je migrace rakovinných buněk z primárního nádoru (Giralt a Lo Re, 2017). Podstatným přírodním produktem izolovaným ze *Streptomyces platensis*, který slouží k inhibici buněčné migrace a potlačení rezistence vůči lékům, je migrastatin a několik jeho analogů. Jedná se o přírodní organický produkt s výrazným antimetastatickým potenciálem (Chen et al., 2010).

Streptomyces antibioticum byl popsán jako významný producent baktericidního polyethermakrolidového antibiotika zvaného boromycin. Po rozsáhlých studiích bylo

zjištěno, že se jedná o látku, která inhibuje replikaci klinicky izolovaného kmene HIV-1 a blokuje pozdější fáze HIV (Masayoshi et al., 2004). Bialaphos byl izolován ze *Streptomyces viridochromogenes* a *Streptomyces hygroscopicus*. Jedná se o tripeptidové antibiotikum obsahující fosfor, používané jako neselektivní herbicid (Krieger, 2010).

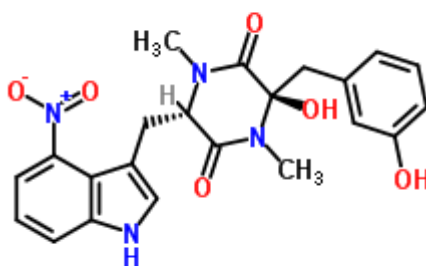
Dalšími významnými látkami produkoványi streptomycetami jsou již výše zmíněný fyto toxin thaxtomin, melanin a fytohormony. Melanin je hlavní pigment hnědo-černé barvy přítomný na povrchových strukturách obratlovců. Má mnoho biologických funkcí a u lidí se vyskytuje na kůži, ve vlasech a sítnici. Vzniká oxidací tyrozinu enzymem tyrozinázou. U člověka je nejvíce zastoupený eumelanin a feomelanin, naopak u rostlin allomelanin (Sánchez-Ferrer et al., 1995). Jeho strukturní vzorec můžeme vidět na Obr. 2.



Obrázek 2 Strukturní vzorec melaninu (Kim et al., 2016).

Fytohormony, neboli regulátory růstu rostlin, jsou nízkomolekulární rostlinné hormony a byly objeveny v roce 1963 Fredericem Addicottem (Ohri et al., 2015). Tyto nízkomolekulární hormony jsou schopny regulovat některé buněčné procesy v rostlinách. Dle struktury a funkce je můžeme rozdělit do pěti základních skupin - auxiny, gibbereliny, kyselina abscisová, etylén a cytokininy. Jejich nejvýznamnější funkcí je přenos signálu a komunikace mezi vyššími rostlinami. Některé fytohormony byly identifikovány jako tzv. stresové hormony, které hrají klíčovou roli ve vývoji rostlin (Wani et al., 2016).

Thaxtominy byly poprvé popsány v roce 1989 a název získaly po známém fytopatologovi Ronaldu Thaxterovi. Jak nám napovídá Obr. 3, thaxtomin A je cyklický dipeptid vzniklý přeměnou 4- nitrotrytofanu a fenylyalaninu. Tyto fyto toxiny mají velký význam v patogenezi rostlinných tkání (King a Calhoun, 2009).



Obrázek 3 Strukturní vzorec thaxtominu A (Fry a Loria, 2002).

2.1.3 Regulace produkce sekundárních metabolitů

Produkce sekundárních metabolitů je obecně pro živé organismy postradatelná. Jedná se o adaptační molekuly, které zlepšují konkurenceschopnost producenta v daném prostředí, poskytují mu nějakou výhodu. Na tvorbu sekundárních metabolitů má tedy ve velké míře vliv životní prostředí – jeho živá i neživá složka (van der Meij et al., 2017).

Streptomycety jsou bakterie primárně uzpůsobené životu v půdě, případně mořské vodě, oba jsou to vysoce komplexní a proměnlivé biotopy. Schopnost interakce s okolním prostředím zajišťuje tedy velké množství regulačních, signalizačních a transportních proteinů. Regulační proteiny umožňují streptomycetám, aby se dokázaly rychle adaptovat na změny okolního prostředí (van der Meij et al., 2017).

Vedle životního prostředí, případně UV záření, má na tvorbu nových antimikrobních látek vliv také nutriční stav (zejména omezení uhlíku a dusíku). Typickým příkladem je inhibiční vliv glukózy a dalších cukrů potlačující chemickou a morfologickou diferenciaci. Glukóza jako hlavní zdroj uhlíku ovlivňuje tvorbu řady specifických enzymů včetně těch, které ovlivňují produkci sekundárních metabolitů. Tento jev známe jako tzv. katabolickou represi. Centrálním proteinem v kontrole metabolismu je zde glukózokináza (G1k), která katalyzuje první krok katabolismu glukózy, její fosforylaci. Má však též zmíněný účinek regulační (van der Meij et al., 2017).

Mezi nejznámější a nejdůležitější signalizační molekuly streptomycet patří tzv. BGL, neboli γ -butyrolaktony. Jejich hlavní funkcí je regulace tvorby sekundárních metabolitů. Sekundární metabolity, vzniklé při jejich vzájemných interakcích, významně

usnadňují komunikaci mezi jednotlivými organismy a současně působí jako obranné molekuly (van der Meij et al., 2017).

Geny kódující biosyntézu sekundárních metabolitů jsou též aktivovány v situaci „ohrožení nepřítelem“, tedy interakcí s možnými konkurenty. Tento jev můžeme využívat v laboratoři k aktivaci produkce biologicky aktivních látek, k níž ve standardních laboratorních podmínkách monokultur nedochází. Potenciální producent tedy může být kokultivován např. s patogenními bakteriemi. Významným faktorem je též typ kultivačního media, změna pH nebo teploty. Při hledání nových farmaceuticky významných látek vedou tyto interakce k aktivaci kryptických genových shluků. Významným výsledkem vzájemné kultivace je například kultivace *Aspergillus fumigatus* a *Streptomyces pencetius*, která vedla k syntéze N- formyl alkaloidů, což jsou významné sloučeniny aktivní proti lidským nádorovým buňkám. Další možností je kokultivace streptomycet s bakteriemi. Zajímavým příkladem je kokultivace *Streptomyces endus* s bakterií *Tsukamurella pulmonis*, nebo *Corynebacterium glutamicum* vedoucí ke vzniku alchivemycinu A (van der Meij et al., 2017).

2.1.4 Interakce streptomycet s živočichy a rostlinami

Pro přežití některých živočichů je nezbytná symbióza s bakteriemi. Bakteriální kmen streptomycet byl v hojném počtu nalezen i jako součást mikrobiální komunity vajec mořských želv druhu *Eretmochelys imbricate*. Mořské želvy jsou ohrožená skupina zvířat a největší hrozbou pro jejich hnízda jsou patogenní houby *Fusarium falciforme* a *Fusarium keratoplasticum*. Ochránci ohrožených zvířat se snaží omezit šíření patogenů a následné infekce. Bylo dokázáno, že streptomycety, jakožto druhý nejhojnější kmen bakterií ve skořápkách vajíček, hojně inhibuje hyfální růst *F. falciforme* a potlačuje růst patogenního fusaria na vajíčkách (Sarmiento - Ramírez et al., 2014).

Dalším typickým příkladem symbiózy se streptomycetou je ochrana květolibů včelích před patogeny. Kmeny streptomycet byly nalezeny v tykadlech těchto samotářských vos a je známo, že jsou předávány z jedné generace na další. Květolib včelí vytváří hnízdo v písčité půdě, loví včely, a když nastane zima, vytvoří mateřskou komůrku, do které kromě snůšky vajec a mrtvé včely jako výživy pro potomstvo vloží i sekret žláz na tykadlech, který obsahuje kmeny streptomycet. Podmínky v plodových buňkách jsou příznivé pro růst hub a bakterií. Streptomycety, vyskytující se na vnější

straně mateřské komůrky, produkují antifungální látky sloužící jako ochrana snůšky před infekcí (Kaltenpoth et al., 2006).

Streptomycety dále vstupují do symbiotického vztahu s mravenci rodu *Atta*, kdy chrání mravence před houbovými patogeny. Streptomyceta je královnou přenášena do nového hnízda. Antibiotika, která produkuje, mravenci používají jako fungicidní přípravky k ochraně houbových zahrad před patogenními houbami. Podobný ochranný vliv mají pravděpodobně též na některé mořské bezobratlé – sasanky a mořské houby (Seipke et al., 2011).

Kůrovci patřící do čeledi nosatcovitých, jsou skupinou brouků, kteří způsobují škody na stromech a zařazují se tím mezi lesní škůdce. Typickým zástupcem je například *Dendroctonus frontalis*, který žije ve vzájemné symbióze s houbou *Entomocortizium*. Prostor, ve kterém je houba přenášena na těle brouka, se nazývá mykangium. *Entomocortizium* je velmi náchylná k infekci *Ophistoma minus*, která narušuje vývoj larvy. Jako ochrana pro houbu slouží symbióza se streptomycetou. Streptomycety byly také dále izolovány ze střev roztočů, stonožek a žížal (Seipke et al., 2012).

U rostlin se streptomycety vyskytují jako symbiotické organismy na povrchu nadzemních částí rostlin, ale též na kořenech. Ovlivňují přirozenou imunitu rostlin, chrání rostliny před houbovými patogeny a napomáhají při iniciaci mykorrhízy (Rey a Dumas, 2017). Mohou se vyskytovat jako endofytické nebo fytopatogenní organismy. Fytopatogenní organismy způsobují choroby rostlin. Příkladem fytopatogenních streptomycet jsou *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies*, *S. ipomoeae* a *S. scabies*, kteří mají širokou škálu hostitelů. Tyto bakterie tvoří šupinky na kořenových strukturách (např. strupovitost brambor) a produkují fytotoxiny a fytohormony, zmíněné již v kapitole o biologicky aktivních látkách. Ochrana plodin proti nim je složitá, v podstatě se ekonomické ztráty dají jen omezit volbou vhodných odrůd a vhodnými pěstebními postupy. Naproti tomu endofytický organismus rostlinám neškodí, naopak často přináší užitek. Příkladem endofytické streptomycety je *S. lydicus*. Tyto organismy také kolonizují rostliny, ale přetrvávají dlouho, aniž by způsobily onemocnění. Jejich hlavní funkcí je, že chrání rostliny před výše zmíněnými fytopatogeny a podporují její růst pomocí produkce hormonu auxinu. Rozsáhlé studie svědčí o důležitosti streptomycet v hospodářském odvětví. Zvyšují produktivitu rostlin a chrání rostliny před patogeny, což se ukázalo jako významný činitel například u zvyšování výnosu pšenice (Seipke et al., 2012).

2.1.5 *Streptomyces* izolované z lidských vzorků

Nejčastějším druhem streptomycet izolovaným z lidských vzorků jsou fakultativní původci mycetomu *S. griseus* a *S. somaliensis*, typicky patogenní jsou však spíše jiné druhy aktinomycet jako *Nocardia asteroides* a *Actinomadura madurae*. Jako fakultativní lidské patogeny byly identifikovány také *S. albus*, *S. rimosus* a *S. lavendulae*, které by potenciálně mohly mít lékařský význam (McNeil a Brown, 1994).

Streptomyces byly také kromě již výše zmíněného mycetomu vzácně hlášené jako původci jiných infekcí. Celosvětově existuje mnoho zpráv o izolaci streptomycet, ovšem bez důkazu jejich patogenní role. Například z krve, krčních mandlí nebo ze zubního kazu byli izolováni zástupci *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces albus* a *Streptomyces violaceoruber*. Další případy izolace byly zaznamenány u *Streptomyces candidus* izolované z česky a *Streptomyces willmorei* z jaterního abscesu. Ve všech těchto případech nebyly tyto bakterie popisovány jako hlavní patogeny, ale pouze jako souběžné bakterie vedle primárních patogenů. Streptomycetové infekce mohou být častější, než se zdá, protože nejsou dostatečně hlášeny. *S. griseus* a *S. somaliensis* bývají často nalezeny v klinických izolátech, ale bohužel není vždy potvrzeno, zda se jedná o primární patogeny či nikoliv. V naprosté většině klinických mikrobiologických laboratoří jsou běžně považovány za kontaminující mikroorganismus bez klinické relevance. Též neexistuje standardní způsob jejich selektivní izolace, při běžných kultivacích jsou přerůstány rychleji rostoucí běžnou florou (Dunne et al., 1998).

I přes nedostatečné hlášení výskytu streptomycet v klinických izolátech jsou nesporné důkazy o závažnosti onemocnění způsobených těmito bakteriemi. Prvním případem je izolace streptomycet, jakožto původců pneumonie, u pacientů s virem lidské imunitní nedostatečnosti. Zde byly streptomyces identifikovány jako primární patogeny, pomocí charakteristického znaku specifického pro *aktinomycetomy*. Tímto typickým nálezem byly granule označované jako „sulphur granules“. Tato žlutá zrníčka, v podstatě mikrokolonie streptomycet, se vyskytovala v plicní biopsii postižených pacientů. *Streptomyces species* byl popsán jako příčina septikémie, primárního postižení plic, endokarditidy, lymfadenitidy nebo v případě chronické perikarditidy (Dunne et al., 1998).

Mozkový absces byl v několika případech prisuzován *Streptomyces griseus* a následně úspěšně léčen pomocí minocyklinů, imipenemů, erythromycinu a doxycyklinů. *Streptomyces somaliensis* byl izolován v souvislosti s peritonitidou (Dunne et al., 1998).

Velmi zajímavým případem byla identifikace bakterií *Streptomyces cinereorubens* a *Haemophilus influenzae*, jakožto původců koinfekce plic u pacientů s chronickou obstrukční plicní chorobou. *Streptomyces cinereorubens* byl identifikován na základě srovnávací sekvenční analýzy a produkce červeného pigmentu zvaného rhodomycin (Manteca et al., 2008).

2.2 Mikrobiom lidských dýchacích cest a jeho vliv na rozvoj onemocnění

Mikrobiom se dá definovat jako společenstvo mikroorganismů v určitém prostředí, organismu či tkáni a jeho změna může mít celkový dopad na fyziologii jednotlivých onemocnění. Trakt dolních cest dýchacích byl po řadu let považován za sterilní a naprosto nekolonizovaný. Nové analytické metody (metagenomové studie a práce založené na hmotnostní spektrometrii) ukázaly, že i dolní dýchací cesty jsou kolonizovány. „Přirozený“ mikrobiom je obecně velmi důležitý pro udržování celkového zdraví a v usměrňování zánětlivých a metabolických stavů a významně se liší dle orgánové soustavy a tkáně. V dýchacích cestách je v převážné většině tvořen, zejména bakteriemi z řádů *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* a *Actinobacteria* a může se v průběhu života měnit. Další bakterie, která stojí za zmínku, je *Prevotella*, která se v hojném počtu nachází v dutině ústní, ale ve zdravých plicích již ne. To poukazuje na fakt, že mikrobiom dutiny ústní je značně eliminován při přechodu do plic. (Shukla et al., 2017). Mikrobiální složení je ovlivněné stravou, věkem a okolním prostředím (Ryšková, 2000). Ke změnám ve složení mikrobiomu dochází již po 6 týdnech od porodu, v období přerušení kojení a následnou změnou ve stravě. Důležitý je také druh porodu. Při porodu císařským řezem je prokázán snížený výskyt aktinobakterií a naopak zvýšení výskyt bakterií *Firmicutes*. Po 18-36 měsících se mikrobiom nachází ve stejné formě jako u dospělých lidí a až do období stáří se stabilizuje. K posledním změnám dochází u žen v období menopauzy (Shukla et al., 2017).

Statistiky tvrdí, že jednou z nejčastějších příčin úmrtnosti na světě je cystická fibróza, astma a chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN, COPD). Jako jeden z faktorů přispívajících k rozvoji těchto onemocnění patří dysbióza, což je nerovnováha v poměru mikroorganismů (Shukla et al., 2017). Dochází ke snížení počtu prospěšných bakterií a naopak k navýšení nežádoucích bakterií (Klaban, 1999). Současná léčba těchto onemocnění je zaměřená spíše na zmírnění příznaků, ovšem pochopení mikrobiálních

pochodů spojených s těmito nemocemi by mohlo celkovou léčbu pacientů významně zlepšit (Shukla et al., 2017).

2.2.1 Astma

Astma je onemocnění projevující se jako zánět dýchacích cest. Mezi hlavní činitele astmatického zánětu patří alergeny, stres a genetické dispozice (Žák a Petrášek, 2011). Jeho hlavní výhodou je, že pacienty mezi jednotlivými atakami netrápí žádné potíže (Mačák a Mačáková, 2004). Bylo prokázáno, že mikrobiom dýchacích cest astmatiků je jiný, než mikrobiom zdravých jedinců. U dospělých astmatických jedinců byl zaznamenán zvýšený výskyt proteobakterií. Byla provedena rozsáhlá studie s názvem BOBCAT12, která charakterizovala vztah mikrobiomu a astmatu (Huang et al., 2015). Výsledky se daly do souvislosti s ACQ testem (test posouzení kompenzace astmatu) (Juniper et al., 1992). Následně bylo zjištěno, že při zhoršeném ACQ skóre byl pozorován výskyt zástupců proteobakterií (*Enterobacteriaceae*, *Neisseriaceae*). Naopak zlepšení ACQ je spojené s izolací aktinobakterií (Huang et al., 2015). Dále byla prokázána souvislost podání antibiotik dětem a následný vznik astmatu v raném věku. Na vzniku astmatu se podílí také nosohltanový mikrobiom a mikrobiom dýchacích cest. Při výskytu *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* nebo *Streptococcus pneumoniae* u novorozenců byla prokázána souvislost s vyšším rizikem astmatu v dětství (Shukla et al., 2017).

2.2.2 Chronická obstrukční plicní nemoc

CHOPN je onemocnění dolních dýchacích cest projevující se chronickou bronchitidou a plicním emfyzémem, kdy dochází k obstrukci plicní tkáně. Toto onemocnění je úzce spjato s kouřením, výfukovými plyny a znečištěným pracovním prostředím (Shukla et al., 2017). Kouření snižuje přirozenou obranu plic tím, že potlačuje produkci antibakteriálních peptidů, ničí epiteliální bariéry a zvyšuje kolonizaci dolních dýchacích cest patogeny (Zakharkina et al., 2013). V souvislosti s CHOPN můžeme mluvit o akutní exacerbaci, což je stadium charakterizované změnou dušnosti nebo kašle. Za jeho původce se považují *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* a *Streptococcus pneumoniae*, kteří zhoršují zdravotní stav a zvyšují šanci na zánět. Mikrobiom plic lidí s CHOPN je tvořen v převážné většině z rodů *Lactobacillus*,

Streptococcus a *Campylobacter*, ale hovoří se i o možnosti geografického a časového ovlivnění (Shukla et al., 2017).

2.2.3 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je autozomálně recesivně dědičné onemocnění. Postihuje 1 z 2500-4500 narozených dětí (Vávrová, 2006). CF je onemocnění způsobené mutacemi genu CFTR a následnou poruchou prostupnosti chloridových iontů skrz buněčnou membránu (Mačák a Mačáková, 2004). V současné době je známo něco okolo 1300 mutací tohoto genu. Protein CFTR je umístěn na 7. chromozomu a patří mezi tzv. ABC transportéry (Vávrová, 2006). Současně dochází k poruše slizničního a řasinkového transportu, díky kterému dochází k přichycení bakterií (Žák a Petrášek, 2011). Nejčastěji přítomné bakteriální patogeny zde vyskytující jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a *Burkholderia cepacia* (Shukla et al., 2017). *P. aeruginosa* dokáže produkovat toxické molekuly poškozující buňky (Quinn et al., 2016). V důsledku zvýšené produkce hlenu v plicích dochází k mikrobiální dysbióze. Zhoršení imunitního systému a následný zánět vyvolává zvýšenou kolonizaci patogeny. Dále bylo prokázáno, že CF a zánět plic významně ovlivňuje i střevní mikrobiom (Shukla et al., 2017).

2.3 Hemolýza

Hemolýza a produkce hemolyzinů jsou jedním z nejběžnějších virulenních faktorů patogenních bakterií. Hemolýzu můžeme popsat jako rozpad červených krvinek - erytrocytů, následné uvolnění červeného krevního barviva hemoglobinu a jeho vylití do extracelulárních prostorů (sérum, plazma). Jako hemolyziny jsou označovány cytolytické proteiny, které ji způsobují. Jejich typickou funkcí je, že působí na membrány savčích buněk a způsobují buněčnou lýzu. Jsou jedním z hlavních faktorů virulence a někdy jsou životně důležité pro růst mikrobů (Langmeier, 2009).

Rozlišujeme tři typy hemolýzy: alfa, beta a gama. První dvě zmíněné jsou na Obr. 4.

Alfa hemolýza, nazývaná jako zelená hemolýza, částečná nebo neúplná hemolýza, se vyznačuje zeleným zbarvením agarů v okolí naočkované bakterie. Je způsobená peroxidem vodíku, produkovaným bakterií, který oxiduje hemoglobin na zelený methemoglobin (Ryan et al., 2004).

Beta hemolýza bývá někdy také označovaná jako úplná hemolýza, vzhledem k úplné lýze červených krvinek. Ta je způsobována enzymem streptolysinem (streptolysin O a S) a dalšími typy lytických hemolyzinů (Ryan et al., 2004).

Posledním typem je gama hemolýza (non - hemolýza), kdy bakterie nevyvolává na krevním agaru žádnou změnu a červené krvinky nepoškozuje (Ryan et al., 2004).



Obrázek 4 Ukázka alfa a beta hemolýzy (Levinson, 2014).

2.3.1 *Streptomyces* a hemolýza

Streptomyces coelicolor, typový zástupce půdních nepatogenních streptomycet, produkuje homolog tzv. S - hemolyzinu (Rajesh et.al., 2013). S - hemolyzin je cytolytický toxin, který byl identifikovaný jako nový typ fosfolipázy C. U *S. coelicolor* byl sekretován na krevním agaru po 48 hodinách inkubace (Suzuki et al., 2014). Je sekvenčně podobný s hemolyziny bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. Jeho absence ovlivňuje produkci antibiotik a tvorbu spór. Byla také dokázána jejich důležitost v interakcích s patogenními bakteriemi, například v souvislosti s již zmíněným mycetomem. Kolonie *S. coelicolor* díky němu na krevním agaru vykazují typickou alfa hemolýzu (Rajesh et.al., 2013).

V pobřeží Bengálského zálivu v Indii byl ze vzorků mořského sedimentu zizolován kmen streptomycet s označením S.sp.VITSDK1. Dle rozsáhlých studií je tento kmen fyziologicky odlišný od ostatních druhů streptomycet a je významný svou hemolytickou aktivitou proti krysím a lidským erytrocytům, což naznačuje, že může být klinicky velmi důležitý (Suthindhiran a Kannabiran, 2009).

V dnešní době byly identifikovány hemolyziny také u jiných aktinomycet. Jedná se zejména o mykobakterie, například o *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium tuberculosis* (Rajesh et.al., 2013).

2.3.2 Hemolytická aktivita metabolitů streptomycet

Významná je také hemolytická aktivita sekundárních metabolitů streptomycet. Jedná se například o polyenová antibiotika, kterých existuje velké množství. Klinicky významné jsou ovšem pouze filipin, amfotericin B a nystatin. Polyeny se běžně používají k léčbě především mykotických, ale též parazitárních onemocnění (Knopik-Skrocka a Bielawski, 2002).

Polyenová antibiotika jsou přírodní látky produkované nejen streptomycetami, používaná pro léčbu systémových onemocnění. Polyeny jsou ve vodě špatně rozpustné, amfipatické sloučeniny. Ačkoliv není znám přesný mechanismus, dochází k tomu, že polyeny tvoří v membránách shluky s lipidy, což vede k jejímu poškození. Polyenová antibiotika se dělí dle velikosti laktónového kruhu na polyeny s velkým (amfotericin B a nystatin) a malým kruhem (filipin) (Knopik-Skrocka a Bielawski, 2002).

Filipin tvoří velké komplexy s lipidy buněčných membrán a vyvolává tzv. „poškozující hemolýzu“. Hemolýza se projevuje tvorbou rozsáhlých shluků v membráně erytrocytů, která je propustná pro makromolekuly, včetně hemoglobinu. Naproti tomu amfotericin B a nystatin tvoří menší komplexy s lipidy buněčné membrány a jsou uspořádané v kanálcích propustných pro sloučeniny o nízké molekulové hmotnosti (Knopik-Skrocka a Bielawski, 2002).

2.3.3 Hemolýza příbuzných patogenních aktinomycet

Mycobacterium tuberculosis je patogenní bakterie, která způsobuje tuberkulózu. Tuberkulóza je onemocnění, které představuje velký problém hlavně v zemích třetího světa a souvisí zde s vysokou morbiditou. Vysoká úmrtnost je způsobená rezistentním kmenem zvaným XDR (**E**x**t**ensively **d**rug-**r**esistant tuberculosis). Hlavním faktorem virulence mykobakterií je gen *tlyA*, označovaný jako Rv1694. Jím kódovaný protein TlyA je typický hemolyzin, schopný lyzovat erytrocyty (Maslow et al., 1999).

Mycobacterium avium je respirační patogen způsobující onemocnění podobné tuberkulóze, zejména u imunokompromitovaných pacientů. Je častou komplikací u pacientů s HIV. Produkuje hemolyzin závislý na hořčičku, který může mít roli v patogenezi invazivních chorob (Maslow et al., 1999).

3 Cíl práce a hypotézy

3.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo mikrobiologicky charakterizovat deset zástupců streptomycet izolovaných z lidských vzorků. Většina zástupců pocházela z respiračního traktu, výjimečně z dělohy a spojivkového vaku. Po mikrobiologické stránce docházelo k charakterizaci hemolytických vlastností, dále pak antibakteriálních a antifungálních aktivit na typických lidských zástupcích patogenů. Zástupci byli vybráni ze skupiny G⁺ (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) i G⁻ bakterií (*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis* aj.), kvasinek a plísní (*Candida albicans*, *Rhizomucor*, *Aspergillus oryzae*). Význam kolonizace lidského organismu streptomycetami není zatím zcela objasněn, předpokládá se ovšem, že jejich produkce sekundárních metabolitů by zde mohla mít zásadní vliv nejen na samotné lidské buňky, ale též na celý přítomný mikrobiom.

3.2 Hypotézy

1. Lidský organismus je jednou z potenciálních nik, kterou půdní streptomycety mohou příležitostně kolonizovat.
2. Příležitostná kolonizace respiračního traktu je logická, ve vzduchu se běžně nacházejí volné spory streptomycet, streptomycety mohou též být součástí prachových částic.
3. Kolonizace lidských tkání vyžaduje specifické fenotypové adaptace, mezi něž může patřit produkce látek ovlivňujících chování a životaschopnost lidských buněk a též mikroorganismů lidského mikrobiomu a patogenů.
4. „Lidské“ streptomycety mohou svými vlastnostmi přispívat k patogenezi zánětlivých onemocnění respiračního traktu.

4 Metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie a složky kultivačních médií

MS agar:

Sójová mouka hladká:	20 g
Manitol (D-manit, Lach-Ner):	20 g
Agar bacteriological No.1 (Oxoid):	20 g

Chemikálie se rozpouštěly v 1000 ml kohoutkové vody. Následně se provedla 15 minut sterilizace média v autoklávu při 120°C.

MH agar:

Sladový extract - Malt extract (Oxoid):	10 g
Kvasničný extract -Yeast extract(Oxoid):	4 g
Glukóza (Lach-Ner):	4 g
Agar bacteriological No.1 (Oxoid):	20 g

Složky se rozpouštěly v 1000 ml destilované vody. Po úpravě pH na hodnotu 7,2 bylo přidáno 20 g agaru. Následně se provedla 15 minut sterilizace média v autoklávu při 120 °C.

Mueller- Hinton agar s krví:

Masová infúze (Oxoid):	4,0 g
Kaseinový hydrolyzát (Oxoid):	17,5 g
Kukuřičný škrob (Oxoid):	1,5 g
Agar (Oxoid):	12 g
Beraní krev (Oxoid):	50,0 ml (1 %) (přidává se po

vyklávkování do zchlazeného agarového základu)

Chemikálie se rozpouštějí v 1000 ml destilované vody a výsledné pH činí 7,3 (Mueller a Hinton, 1941).

SNA agar:

Agar (Oxoid):	5 g
Živný bujon - Nutrient broth (Oxoid):	8 g

Chemikálie se rozpouštěly v 1000 ml destilované vody. Následně se provedla 15 minut sterilizace média v autoklávu při 120°C.

Krevní agar:

Směs peptonů:	23 g
Škrob:	1 g
Chlorid sodný:	5g
Agar:	10 g
Beraní krev:	50 ml (5 %) přidává se do

zchladlého základu po autoklávování.

Chemikálie se rozpouštějí v 1000 ml destilované vody a výsledné pH činí 7,3 (Atlas, 2004).

Roztoky:

Glycerol 20 % (v/v) v destilované vodě. Sterilizováno autoklávováním.

4.1.2 Bakteriální kmeny

V této bakalářské práci byla použita kolekce kmenů streptomycet a patogenních bakterií.

4.1.2.1 Streptomycety

Použité kmeny streptomycet byly získány ze Sbírkky kultur aktinomycet CCSACB Ústavu půdní biologie Biologického centra AV v Českých Budějovicích. Původně pocházejí z Národní referenční laboratoře pro patogenní aktinomycety v Trutnově, s původem především v Oblastní nemocnici v Příbrami a nově též ze zdrojů Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě.

Vzorky streptomycet byly odebrány z bronchoalveolární laváže či sputa od pacientů s respiračními obtížemi. Schopnost streptomycet částečně přežít specifickou dekontaminaci při cílené kultivaci na mykobakterie umožnila jejich lepší izolaci. Výjimečně byly izoláty získány i z jiných tkání - nejčastěji dělohy a spojivkového vaku. Mezi pacienty s respiračními obtížemi patřili zejména lidé, kteří jsou vystaveni zvýšené expozici půdnímu prachu (zejména horníci). Pro lepší orientaci získaly vzorky přidělené laboratorní číslo. Přehled použitých streptomycet a odebraných materiálů, včetně diagnóz

pacientů jsou uvedeny v Tab. 2. Taxonomické určení bylo provedeno pracovníky BC AVČR pomocí 16S rRNA taxonomie s použitím databáze EzTaxon (Yoon et al., 2017).

Tabulka 2 Přehled použitých *Streptomyces* a odebraných materiálů.

Taxonomie	Lab. označení	Diagnóza pacienta	Zdroj
<i>S. hydrogenans</i> - <i>albidoflavus</i> - <i>daghestanicus</i> - <i>violascens</i>	TR1	Cévní mozková příhoda	Sputum
<i>S. hydrogenans</i> - <i>albidoflavus</i> - <i>daghestanicus</i>	TR9	Obrna hlasivek a hrtanu, Pneumokonióza	Sputum
<i>S. diastaticus</i> subsp. <i>diastaticus</i> - <i>gougerotii</i> - <i>rutgersensis</i>	TR15	CHOPN, zhoubný novotvar hrtanu	Sputum
<i>S. albidoflavus</i> <i>somaliensis</i> group	TR20	Bronchopneumonie	Sputum
<i>S. albidoflavus</i> <i>somaliensis</i> group	TR24	Chronická nefritida, Plicní embolie, Akutní zánět slinivky, Respirační selhání	Sputum
<i>S. diastaticus</i> subsp. <i>diastaticus</i> - <i>gougerotii</i> - <i>rutgersensis</i>	TR32	ND	Sputum
<i>S.s albidoflavus</i> <i>somaliensis</i> group	TR38	ND	Děloha
<i>S. costaricanus</i> - <i>graminearus</i> - <i>griseofuscus</i> - <i>murinus</i>	TR42	ND	Sputum
<i>S. violascens</i>	TR43	ND	Spojivkový vak
<i>S. hydrogenans</i> - <i>albidoflavus</i> - <i>daghestanicus</i>	TR45	Bronchopneumonie, Tuberkulóza	Sputum
<i>S. coelicolor</i> , typový kmen	M145	-	Půda

Použité zkratky: ND – nedohledáno

4.1.2.2 Patogenní bakterie

Pro jednotlivé experimenty byly vybráni různí zástupci G⁺ a G⁻ bakterií, kvasinek a plísní. Přehled všech použitých patogenních bakterií a jejich morfologické zařazení je uveden v Tab. 3.

Tabulka 3 Přehled použitých patogenů

Skupiny patogenních bakterií	Zástupci
G - tyčinky	<i>Citrobacter freundii</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Proteus vulgaris</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Salmonella enterica</i>
	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Shigella dysenteriae</i>
G - koky	<i>Neisseria pharyngis</i>
G + koky	Meticilin - rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Kvasinky a plísně	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Candida albicans</i>
	<i>Rhizomucor</i>
G- koky až tyčinky	<i>Moraxella catarrhalis</i>

U *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* byly použity nejen standardní laboratorní kmeny, ale také klinické izoláty citlivé na běžné antibiotika i multirezistentní. Tyto klinické izoláty byly poskytnuty MUDr. Janem Závorou z Oddělení klinické mikrobiologie a ATB centra Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

4.1.2.3 Uchovávání bakteriálních kmenů

Kmeny bakterií byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu při -80 °C jako suspenze bakteriálních buněk ve sterilním 20 % glycerolu.

4.2 Metody stanovení

Celý proces stanovení probíhal v přísně sterilním prostředí laminárního boxu. Při rozočkování jednotlivých bakterií byla použita vždy čerstvě vyžíhaná bakteriologická klička, případně jednorázové laboratorní pomůcky.

4.2.1 Určení hemolytických vlastností streptomycet

K určení hemolytických vlastností jsme použili krevní agar.

Postup:

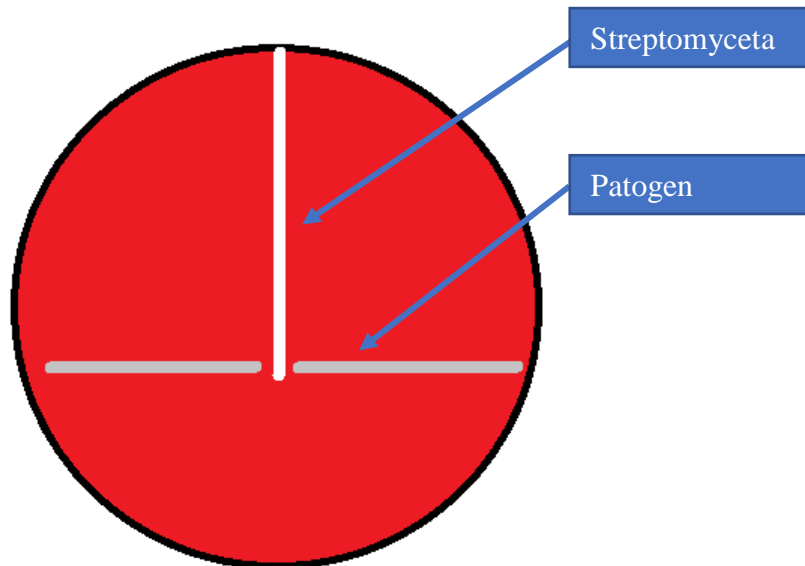
- 1) Jednotliví zástupci streptomycet byli rozočkováni vypálenou bakteriologickou kličkou na krevní agar na jednotlivé kolonie, pomocí tzv. křížového roztěru, kdy dochází k postupnému nařezávání vzorku.
- 2) Dále byly Petriho misky s krevním agarem vloženy do termostatu a kultivovány při 28°C.
- 3) Vývoj hemolýzy a růst kolonií byl pozorován a zaznamenáván po 4 dnech.
- 4) Následně jsme vyhodnocovali typ hemolýzy.

4.2.2 Kokultivační experimenty

Kokultivační experimenty probíhaly na krevním agaru, případně na MS agaru.

Postup:

- 1) Připravili jsme si potřebné Petriho misky s krevním agarem (případně MS agarem) a označili jsme je přiděleným číslem pro konkrétní vzorek streptomycety.
- 2) Následně jsme vypálenou bakteriologickou kličkou naočkovali asi 8 cm dlouhou čáru vybraných streptomycetových kmenů.
- 3) Misky jsme kultivovali v termostatu při 28 °C 2-3 dny.
- 4) Po vyndání z termostatu jsme k již naočkovaným streptomycetám kolmo naočkovali čáru vybraných patogenů ve tvaru písmene T (viz Obr. 5).
- 5) Misky jsme opět kultivovali v termostatu při 28 °C (případně u *Streptococcus pneumoniae* při 37 °C) dva dny a pozorovali vzájemné interakce. Za pozitivní výsledek – detekci produkce antibakteriálních látek - lze považovat potlačení růstu patogenních bakterií v blízkosti nárůstu jednotlivých streptomycet.



Obrázek 5 Schéma očkování streptomycetové a patogenové čáry.

4.2.3 Stanovení produkce antibiotických látek - měření zón růstové inhibice

Ke stanovení inhibičních zón jsme bakterie očkovali na Mueller - Hinton agar s krví a krevní agar.

Postup:

- 1) Na označené Petriho misky s krevním agarem jsme hustě naočkovali jednotlivé kmeny streptomycet, které jsme kultivovali 2 dny v termostatu při 28°C.
- 2) Z vykultivovaných kmenů vybraných zástupců patogenů jsme vytvořili suspenzi ve fyziologickém roztoku.
- 3) 5 ml suspenze jsme přepipetovali na Mueller - Hinton agar a pomocí skleněné hokejky jsme vytvořili souvislou vrstvu po celé Petriho misce.
- 4) Pomocí korkovrtu jsme vykrojili z agarových ploten s narostlými vysporulovanými streptomycetami kulaté bločky o průměru cca 0,5 cm. Bločky jsme kladli na připravené Mueller - Hinton agary a kultivovali 2-3 dny v termostatu při 28°C.
- 5) Sledovali jsme vznik zón růstové inhibice patogena v okolí bločku se streptomycetou a zaznamenávali si naměřené průměry inhibičních zón.

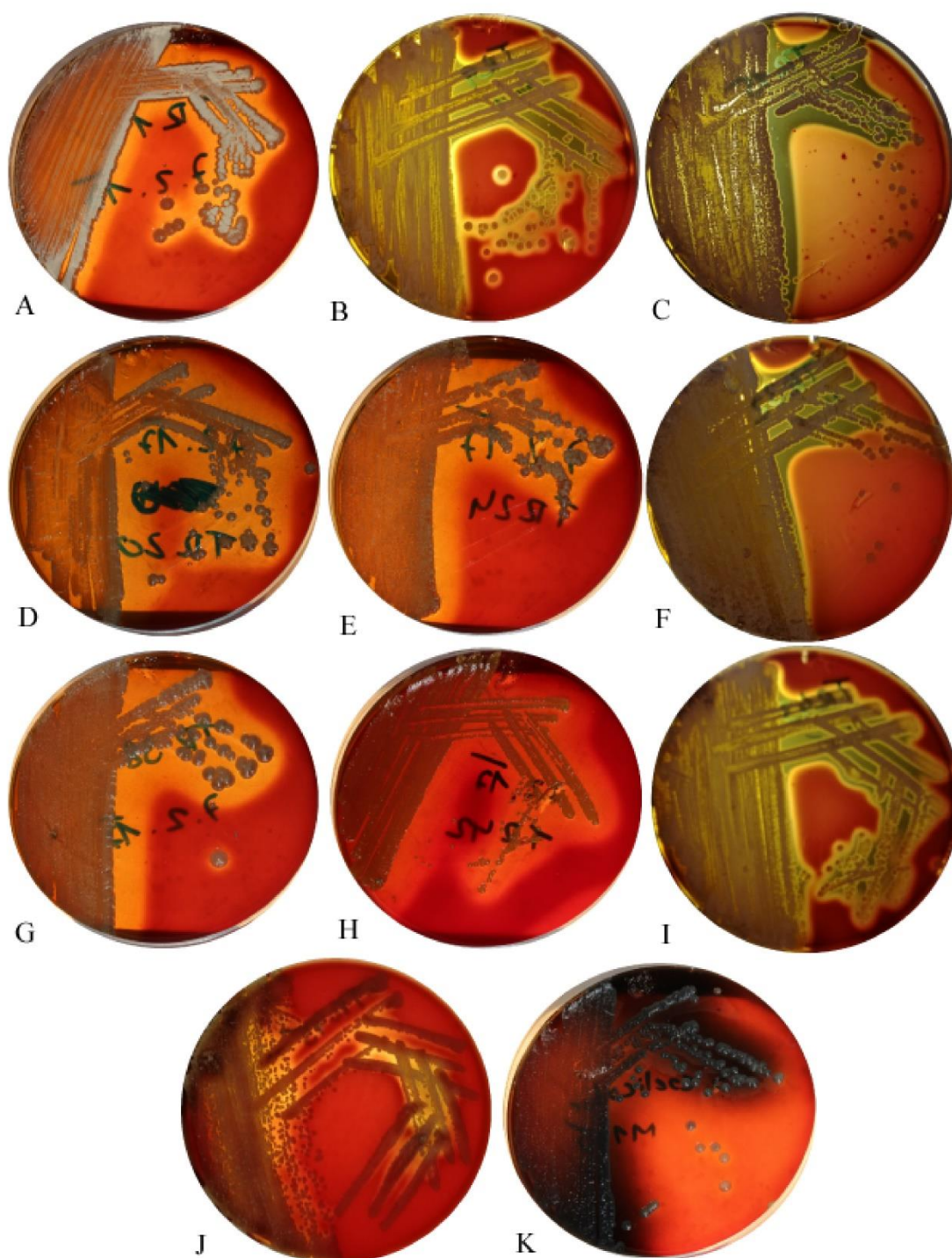
4.2.4 „Pasážovaná“ kokultivace

- 1) Na krevní agar jsme naočkovali streptomycey s vybraným patogenem jako v bodě 4.2.2.
- 2) Po nárůstu vybraných patogenních bakterií jsme vždy provedli nové kokultivační očkování. Vždy byly použity streptomycey z předchozího kokultivačního očkování.
- 3) Celkem jsme provedli 6 na sebe navazujících kokultivačních experimentů.
- 4) Porovnávali jsme antibiotické schopnosti původního izolátu a jeho vzorku po 3. a 6. pasáži.

5 Výsledky

5.1 Hemolytické vlastnosti streptomycet z lidských vzorků

U deseti vybraných zástupců streptomycet z lidských klinických vzorků jsme charakterizovali jejich hemolytické aktivity na krevním agaru. Jednotlivé kolonie byly bílé, pomalu rostoucí s charakteristickým půdním zápachem. Všechny vzorky streptomycet vykazovaly typickou β -hemolytickou aktivitu. Vzorky TR1, TR9, TR15, TR20, TR24, TR32, TR38, TR43, TR45 měly žluto-oranžové zbarvení hemolytických zón. Odlišné zbarvení měl pouze vzorek TR42, který měl hemolytické zóny červené. Jednotlivé misky dokumentující hemolytické aktivity jsou zobrazené na Obr. 6. Ve vzorcích číslo TR32, TR38 a TR45 byla hemolýza patrná jen v nejhustší inokulaci (Obr. 6 C, F, G a J). Jako kontrolní kmen byl použit typový kmen *S. coelicolor*, půdní streptomycey s popsanou α -hemolytickou aktivitou (Obr. 6 K, Rajesh et.al., 2013).



Obrázek 6 Beta hemolýza „lidských“ streptomyces Hemolytické zóny byly dokumentovány po 4 - denní kultivaci při 28 °C. Testované kmeny: A- TR1, B- TR9, C- TR15, D- TR20, E- TR24, F- TR32, G- TR38, H- TR42, I- TR43, J- TR45, K- Kontrolní půdní kmen *S. coelicolor* M145.

5.2 Interakce streptomyces s lidskými patogeny

Interakce streptomyces s lidskými patogeny byla prokazována na krevním agaru (v případě bakterie *Streptococcus pneumoniae* na Mueller - Hinton agaru s krví). V Tab. 4

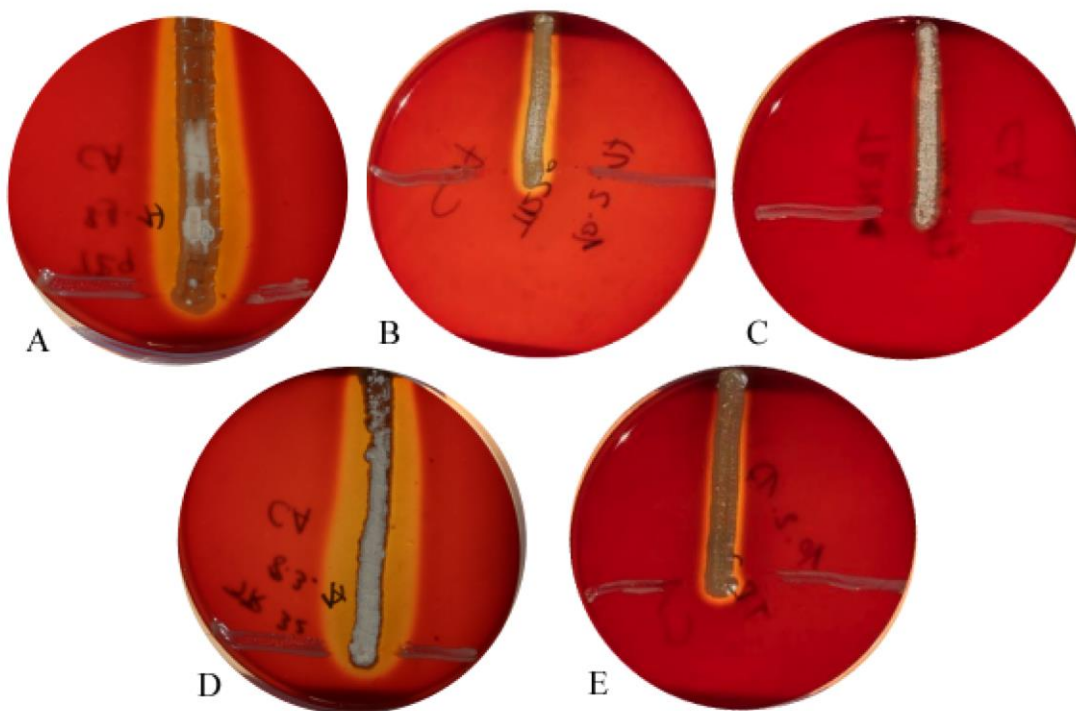
jsou podrobně zaznamenány jednotlivé interakce mezi vybranými patogenními bakteriemi a streptomycetami. Produkce antimikrobních látek byla pozorována jako velikost zóny potlačeného růstu patogenů v blízkosti jednotlivých streptomycet.

Tabulka 4 Interakce streptomycet s lidskými patogeny – průměr zóny inhibice růstu patogena v okolí streptomycety je uváděna v mm.

	TR1	TR9	TR15	TR20	TR24	TR32	TR38	TR42	TR43	TR45	M145
CaAl	0	5	0	10	5	5	10	0	0	0	0
PrVu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EsCo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PsAe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StAu	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
Rhiz	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
StPn	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0
AsOr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MRSA	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
StAu c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
StPn c	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0
PsAu r	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PsAu c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MoCa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Použité zkratky: CaAl - *Candida albicans*, PrVu - *Proteus vulgaris*, EsCo - *Escherichia coli*, PsAe - *Pseudomonas aeruginosa*, StAu - *Staphylococcus aureus*, Rhiz - *Rhizomucor*, StPn - *Streptococcus pneumoniae* AsOr - *Aspergillus oryzae*, MRSA – *Meticilin - rezistentní Staphylococcus aureus*, StAu c - *Staphylococcus aureus citlivý na běžná antibiotika*, StPn c - *Streptococcus pneumoniae citlivý na běžná antibiotika*, PsAe r - *Pseudomonas aeruginosa multirezistentní*, PsAe c - *Pseudomonas aeruginosa citlivá na běžná antibiotika*, MoCa - *Moraxella catarrhalis*.

Téměř všechny kmeny streptomycet vykazovaly antimikrobní aktivitu proti kvasince *Candida albicans*. V Tab. 4 a na Obr. 7 jsou uvedeny výsledky pozitivních kokultivačních experimentů.

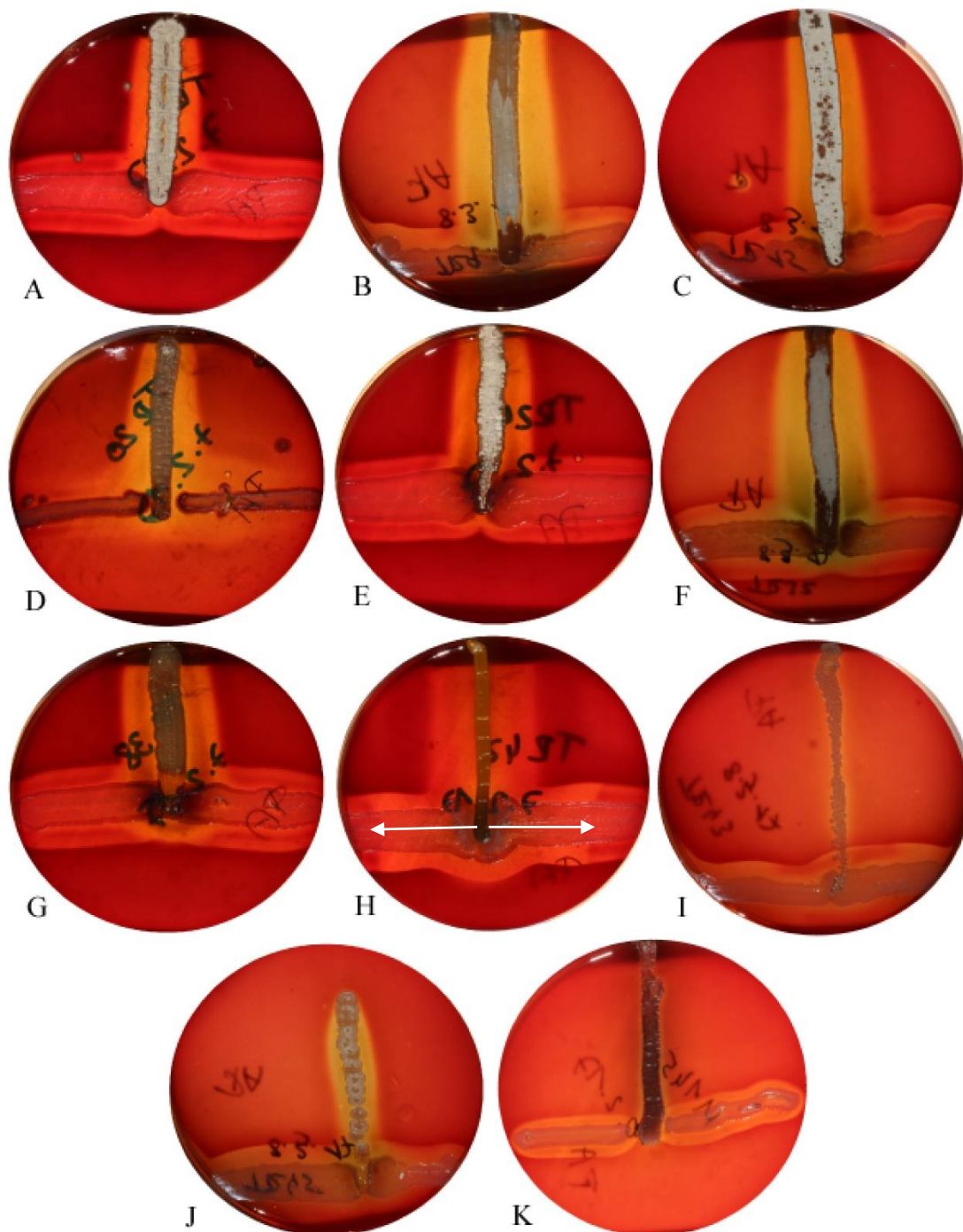


Obrázek 7 Interakce streptomycet s kvasinkou *Candida albicans*. Inhibice růstu kandidy v blízkosti *istreptomycetových* kmenů: A - *Candida albicans* + TR9, B - *Candida albicans* + TR20, C - *Candida albicans* + TR24, D - *Candida albicans* + TR32, E - *Candida albicans* + TR38.

5.2.1 Interakce *Pseudomonas aeruginosa* a kmene TR42

Při řadě kokultivačních experimentů jsme nejzajímavější výsledky získali u kmene TR42. Kultivace probíhala opět na krevním agaru při 28 °C. Na Obr. 8 můžeme pozorovat všechny provedené kokultivační experimenty streptomycet s pseudomonádou. Žádný z kmenů neprodukoval antibiotika vůči tomuto patogenu. Některé kmeny streptomycet podpořily produkci barevných sekundárních metabolitů *P. aeruginosa* pyocyaninu a pyoverdinu, které mají mírné antibiotické schopnosti – výrazně třeba v blízkosti TR32 (Obr. 8 F). Pseudomonáda naopak zbrzdila diferenciaci (sporulaci) některých streptomycet - též např. TR32, aniž by byl postižen jejich růst.

K nejvýraznější interakci s pseudomonádou docházelo u kmene TR42 (Obr. 8 H). Pseudomonáda v místě kontaktu obklopuje streptomycetu a v její blízkosti se jí posilují hemolytické schopnosti (analogie ke CAMP testu, interakce hemolyzinů mezi některými bakteriemi a *Staphylococcus aureus*). Viditelná je také produkce pyocyaninu a pyoverdinu, která je soustředěná v místě kontaktu. U ostatních streptomycetových kmenů k interakci hemolyzinů nedochází.



Obrázek 8 Interakce streptomycet s bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. A- TR1, B- TR9, C- TR15, D- TR20, E- TR24, F- TR32, G- TR38, H- TR42, I- TR43, J- TR45, K- Kontrolní kmen *S. coelicolor* M145.

5.2.2 Produkce antibakteriálních a antifungálních látek

Po provedení kokultivačních experimentů na krevním agaru popsáných v kapitole 5.2, jsme produkci antimikrobních látek ověřovali produkcí antibakteriálních a antifungálních látek streptomycetami *in vivo* na MH agaru. Opět jsme zvolili různé kombinace patogenních bakterií a streptomycet. Na miskou hustě zaočkovanou cílovým

patogenem jsme aplikovali agarové bločky s vysporulovanými kmeny streptomycet a sledovali vznik zón růstové inhibice patogena v důsledku produkce antimikrobiálních látek streptomycetou. Naměřené velikosti jsou zaznamenány v Tab. 5.

Tabulka 5 Průměr inhibičních zón v mm

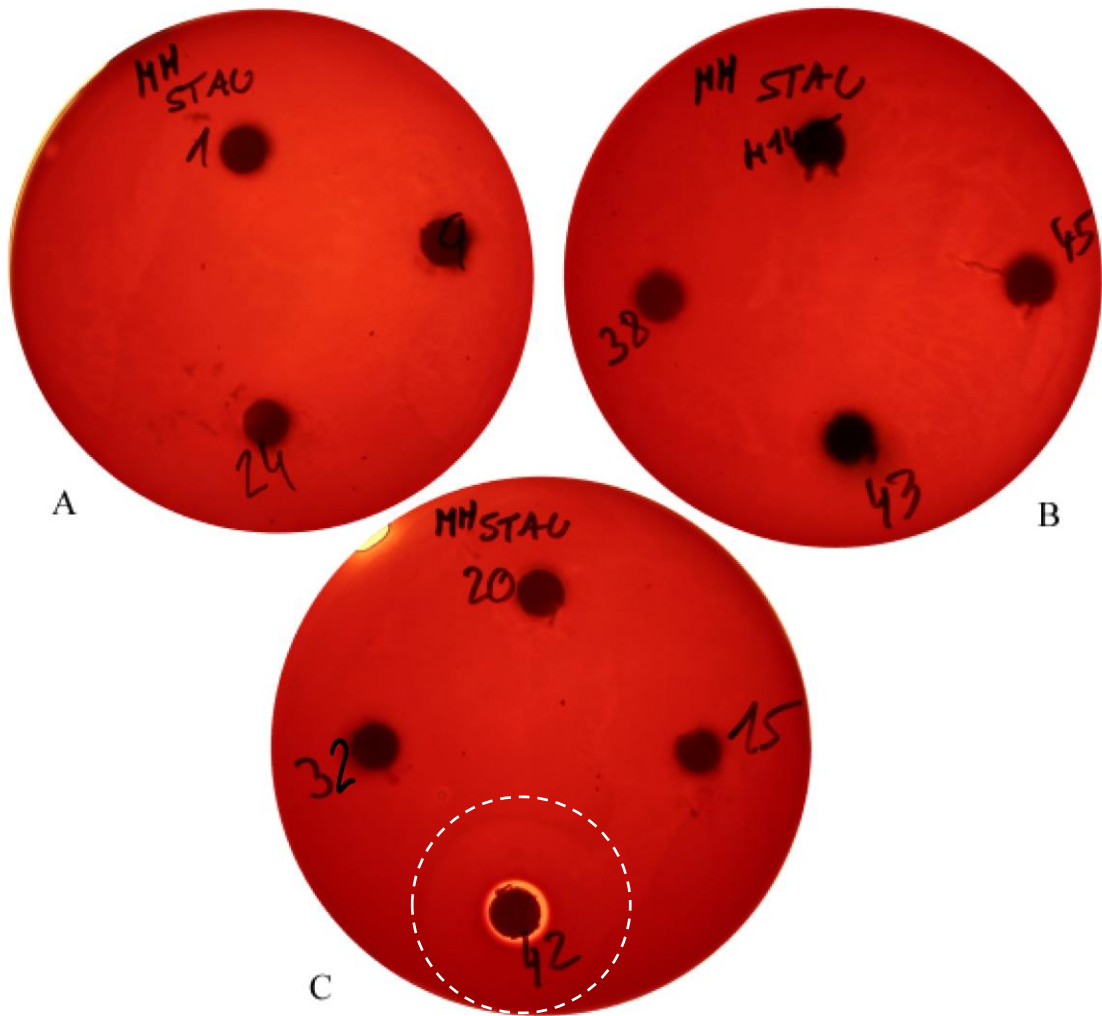
	TR1	TR9	TR 15	TR 20	TR 24	TR 32	TR 38	TR 42	TR 43	TR 45	M145
StAu	0	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0
StPn	0	0	0	0	0	0	0	34	0	0	11
CaAl	15	17	0	0	17	0	0	0	0	0	0
MoCa	0	0	0	16	25	14	16	37	26	18	0
Rhiz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ShDy	/	/	/	/	0	/	/	0	0	/	/
NeiPh	/	/	/	/	/	/	/	27	/	/	/
KlPn	/	/	/	/	0	/	/	0	0	/	/
SeMa	/	/	/	/	0	/	/	0	0	/	/
SaEn	/	/	/	/	0	/	/	0	0	/	/
CiFr	/	/	/	/	0	/	/	0	0	/	/
MRSA 1386	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
MRSA 1382	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0

Použité zkratky: StAu - *Staphylococcus aureus*, StPn - *Streptococcus pneumoniae*, CaAl - *Candida albicans*, MoCa - *Moraxella catarrhalis*, Rhiz - *Rhizomucor*, ShDy - *Shigella dysenteriae*, NeiPh - *Neisseria pharyngis*, KlPn - *Klebsiella pneumoniae*, SeMa - *Serratia marcescens*, SaEn - *Salmonella enterica*, CiFr - *Citrobacter freundii*, MRSA - *Meticilin-rezistentní Staphylococcus aureus*, / - *neprovedeno*

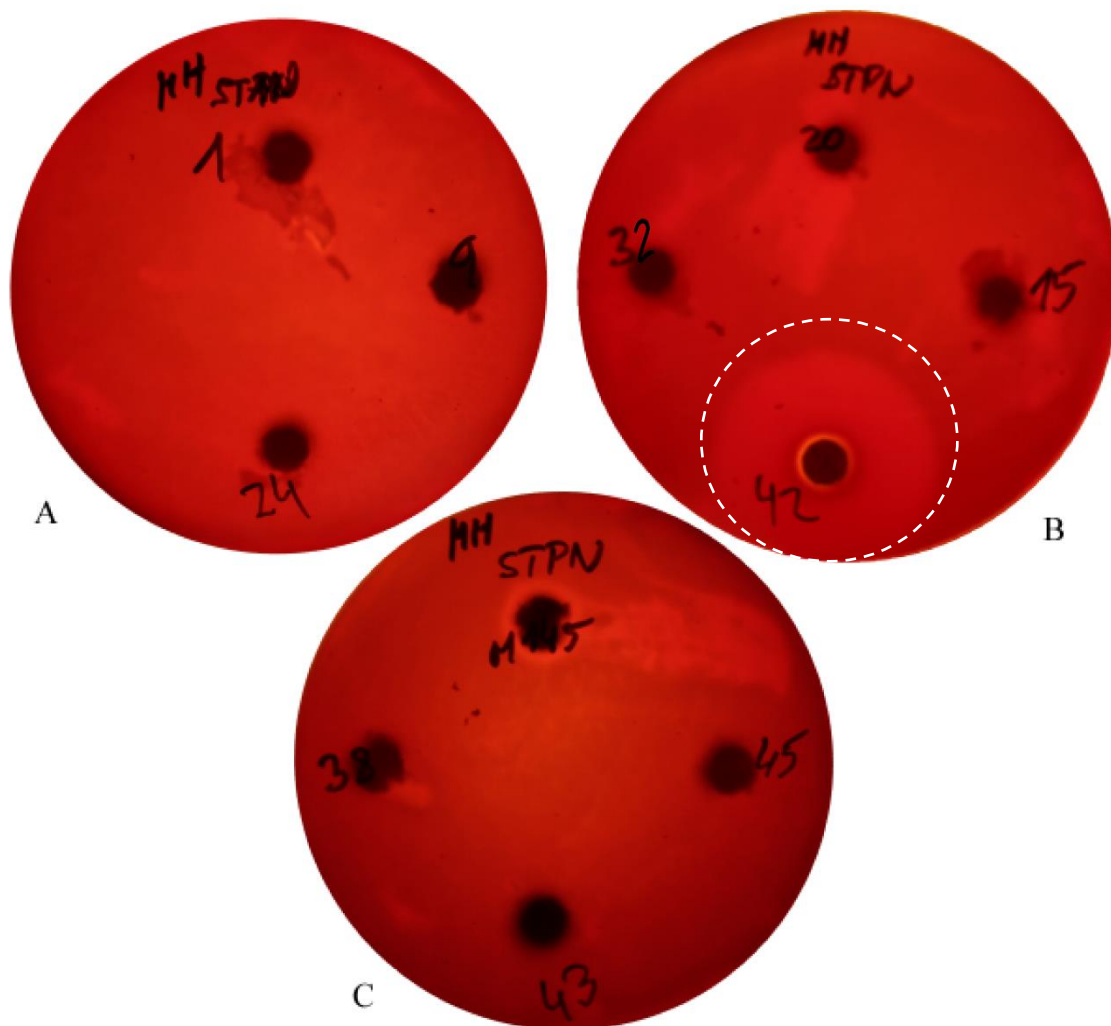
Je patrné, že nejaktivnější streptomycetou byl opět kmen číslo TR42, který vykazoval velké inhibiční zóny s některými patogeny. Nejvyšší antimikrobní aktivita byla pozorována u zástupců G⁺ bakterií, konkrétně u bakterie *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pneumoniae*. Na Obr. 9 a 10 je vidět, že inhibiční zóny pro jednotlivé streptomycety jsou rozdílné. Bločky streptomycet jsou označeny jejich laboratorním číslem přímo na Petriho misce.

Zajímavá je vysoká aktivita proti vybraným Gram-negativům – *Neisseria pharyngis* a *Moraxella catarrhalis*. Při interakci s *Moraxella catarrhalis* došlo ke vzniku inhibičních zón při kokultivaci až 7 z 11 streptomycetových vzorků. Aktivity proti Gram-negativním bakteriím jsou totiž u streptomycet méně obvyklé. Ve srovnání s ostatními kmeny mají

antibiotické aktivity TR42, tedy významně širší spektrum cílových mikroorganismů a jsou nejsilnější.



Obrázek 9 Stanovení inhibičních zón při interakci bakterie *Staphylococcus aureus* a jednotlivých streptomycet. A - Kmeny TR1, TR9 a TR 24, B - Kmeny TR38, TR43, TR45 a kontrolní *S. coelicolor* M145, C - Kmeny TR32, TR20, TR15 a TR42

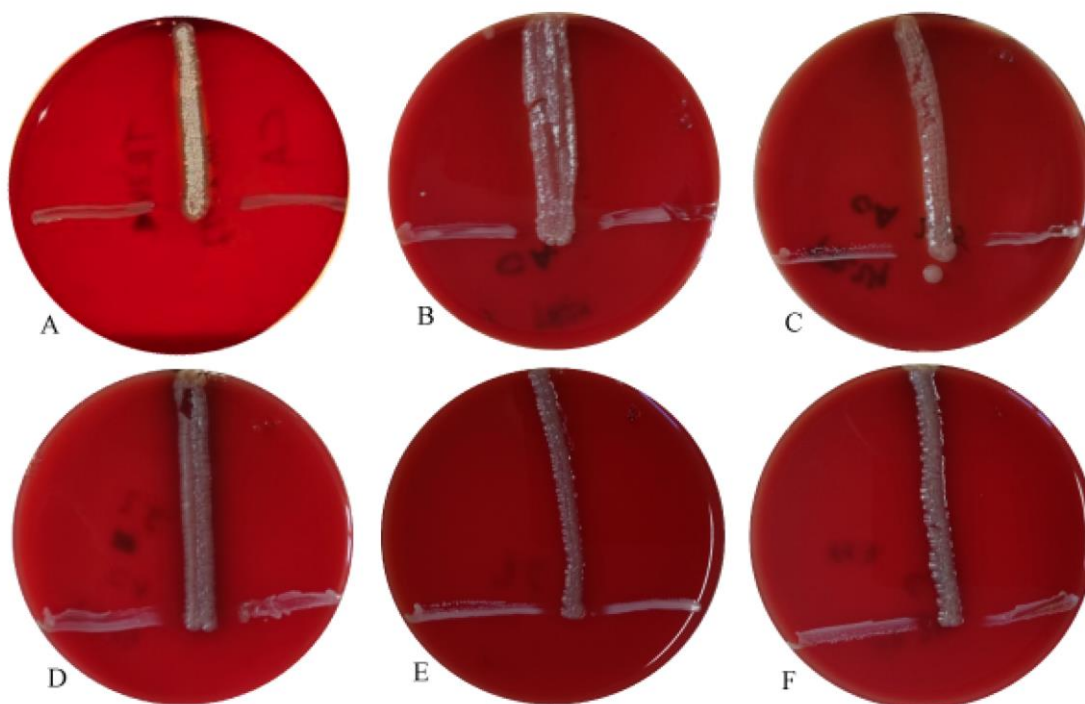


Obrázek 10 Stanovení inhibičních zón při interakci bakterie *Streptococcus pneumoniae* a jednotlivých streptomycet A - Kmeny TR1, TR9 a TR 24, B - Kmeny TR32, TR20, TR15 a TR42, C - Kmeny TR38, TR43, TR45 a kontrolní *S. coelicolor* M145

5.2.3 Ovlivnění produkce antibiotických látek technikou kokultivace

V metodě „pasážované“ kokultivace jsme postupně provedli na krevním agaru celkem 6 opakovaných kokultivací jednotlivých vzorků streptomycet a patogenních bakterií. Snahou bylo aktivovat produkci antimikrobních látek dlouhodobou interakcí s cílovým patogenem. Tato metoda je běžně používána při aktivaci tzv. kryptických genových shluků pro antibiotika, tj. pro aktivaci biosyntetických drah pro antibiotika, které nejsou v laboratorních podmínkách exprimovány (Gottelt et al., 2010). Pro pokus byly vybrány dvojice streptomyceta – patogen, kde v předchozích testech streptomyceta vykazovala jen velmi slabou antibiotickou aktivitu vůči patogenu (přehled viz Tab. 4). Z našich výsledků je ale zřejmé, že produkce antimikrobních látek aktivována nebyla. Pro

ukázkou jsou jednotlivé pasážované kokultivace znázorněné na Obr. 11. Zde vidíme jednotlivé kokultivace streptomycety TR24 s *Candida albicans*.

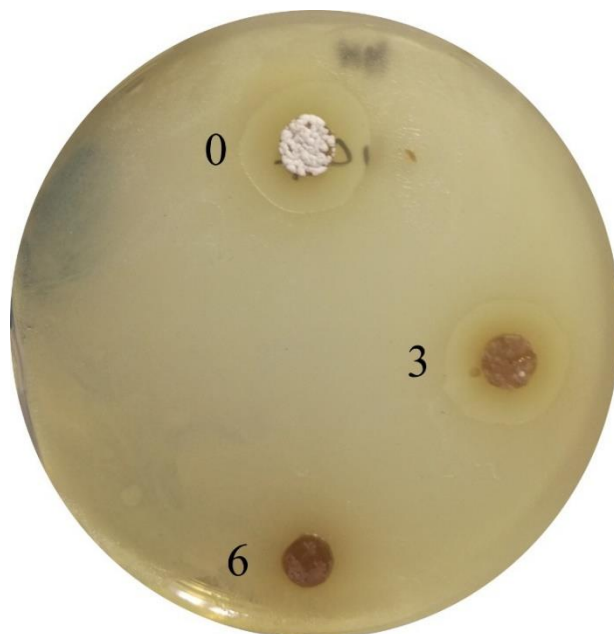


Obrázek 11 Metoda pasážování vzorku TR24 a *Candida albicans*. Obrázky A-F: Pasáž 1-6

Následně jsme porovnali produkci antimikrobních látek na MH agaru u původního kmene a kmene po 3. a 6. pasážované kokultivaci. Velikosti inhibičních zón je uvedena v Tab. 6. U výše zobrazených vzorků *Candidy albicans* a vzorku TR24 jsme došli k zajímavému závěru, kdy byla v pasáži 0 a 3 inhibiční zóna velikosti asi 18 mm. V pasáži 6 inhibiční zóna přítomná nebyla (Obr. 12). Pozorovali jsme tedy efekt opačný, represí produkce antimikrobních látek po dlouhodobé interakci s patogenem.

Tabulka 6 Velikosti inhibičních zón (mm) po sériové kokultivaci v pasáži 0, 3 a 6.

	0	3	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + TR24	0	0	0
<i>Moraxella catarrhalis</i> + TR24	0	0	0
<i>Moraxella catarrhalis</i> + TR38	0	0	0
<i>Candida albicans</i> + TR24	18	18	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + TR38	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> + TR45	0	0	0

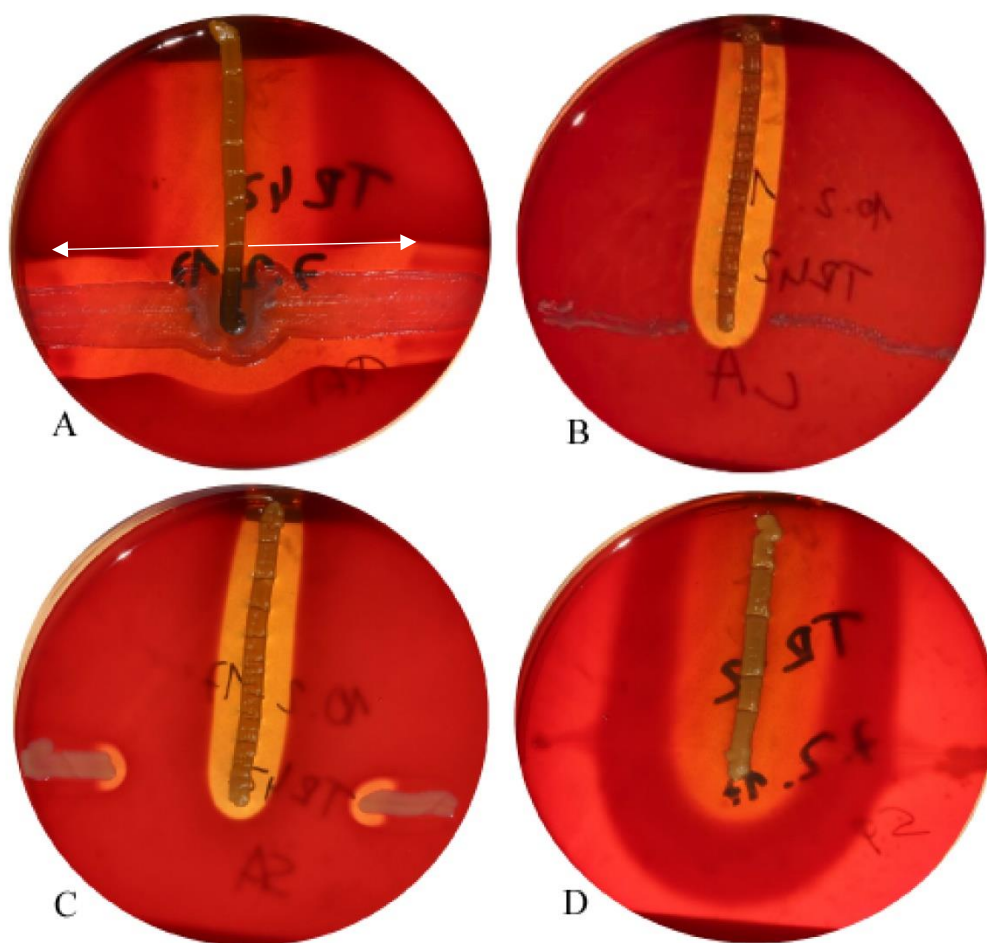


Obrázek 12 Inhibiční zóny po sériové kokultivaci vzorku TR24 a *Candida albicans* v pasáži 0,3 a 6.

5.3 Nejaktivnější izolát, kmen TR42

Nejaktivnějším izolátem byl bezesporu vzorek *Streptomyces costaricanus* izolovaný ze sputa, uváděný pod laboratorním číslem TR42. Jednotlivé zaznamenané interakce najdeme podrobně rozepsané v Tab. 4.

Vzorek vykazoval silnou antibiotickou aktivitu při kokultivaci s bakterií *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pneumoniae*, což je patrné na Obr. 13 C a D. Na Obr. 13 D je viditelné, že *Streptococcus pneumoniae* je silně limitován až k okrajům Petriho misky a je zde inhibiční zóna o velikosti přibližně 30 mm. Dále je patrná nápadná zóna koagulace po obvodu celé hemolytické zóny. Takto rozsáhlou koagulovanou zónu můžeme vidět pouze u tohoto druhu streptomycety. Při kokultivaci tohoto vzorku s bakterií *Staphylococcus aureus* dochází též k interakci hemolyzinů jen u tohoto streptomycetového kmene (Obr. 13 C). Dochází k indukci hemolýzy, nárůst stafylokoků je limitován a vzniká inhibiční zóna o velikosti 20 mm. Hemolýza je posílena též u *Pseudomonas aeruginosa* – viz. Kapitola 5.2.1 výše. Detailně je tato situace znázorněna na obr. 13 A. Naopak například s kvasinkou *Candida albicans* nevykazoval tento kmen žádnou aktivitu (Obr. 13 B).



Obrázek 13 Interakce streptomycety s označením TR42 s patogenními bakteriemi. A - *Pseudomonas aeruginosa* – posílení hemolytických schopností *PsAe*, B - *Candidou albicans* – slabá antibiotická aktivita TR42, C - *Staphylococcus aureus* – indukce hemolytických schopností *StAu* a inhibice jeho růstu, D - *Streptococcus pneumoniae*- inhibice růstu *StPn*, vznik zóny koagulace kolem streptomycety

6 Diskuze

Streptomycety jsou bakterie, které mají široké spektrum využití ve zdravotnickém, potravinářském i zemědělském odvětví. Jejich schopnost produkovat sekundární metabolity s velkým spektrem účinků vybízí k jejich dalšímu prozkoumávání a bádání. Mohly by být jedním z hlavních zdrojů získávání nových antibiotických, antifungálních nebo protinádorových látek. Ve výjimečných případech se tyto bakterie mohou vyskytovat jako primární patogeny u osob v případě onemocnění zvaného mycetom, který představuje rozsáhlý problém hlavně v zemích třetího světa.

Vzorky použité v těchto experimentech byly získány od pacientů vystavených zvýšené expozici půdním prachem. Jedná se o světově unikátní sbírku streptomycet izolovaných z lidských tkání. Organismy pocházejí z klinických vzorků pacientů, kteří velmi často trpěli chronickými onemocněními dýchacích cest s nejasnou etiologií. Izolované kmeny jsou tedy nepochybně zajímavé i z pohledu jejich možného vlivu na progresi těchto onemocnění. Dá se předpokládat, že „lidské“ kmeny jsou specificky adaptovány na prostředí lidského těla a mohou produkovat biologicky aktivní látky, které se vyvinuly v důsledku jejich kontaktu s lidským imunitním systémem a mikrobiomem postižených orgánových soustav. Mohou tedy být též významným zdrojem látek, které svou aktivitou přímo cílí na lidské buňky a mikrobiální obyvatele.

Na Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze bychom rádi charakterizovali, jaké specifické adaptace tyto kmeny nesou. Streptomycety mají jedny z největších genomů mezi bakteriemi a celé 2/3 jejich genetické informace tvoří adaptivní geny – např. extracelulární enzymy, transportní systémy, rezistenční geny a hlavně geny pro biosyntézu sekundárních metabolitů s rozmanitými biologickými aktivitami.

Z výsledků vyplynulo, že všechny vybrané vzorky „lidských“ streptomycet vykazovaly β -hemolytickou aktivitu, což bylo dokázáno na krevním agaru i po opakovaných provedeních (Obr. 6). Výjimkou byl kontrolní typový kmen *S.coelicolor* M145, u kterého byla již díky Rajesh et.al (2013) popsána alfa-hemolytická aktivita, kterou jsme potvrdili. U kontrolního vzorku klasických půdních kmenů není β -hemolýza zdaleka tak častá, pozorujeme ji jen u cca 10 % izolátů (A. Chroňáková, osobní sdělení). Zdá se, že všechny kmeny streptomycet nesou v genomu potenciální geny pro proteinové hemolyziny, např. typu TlyA (Arenas et al., 2011). Prvotní analýza metabolického extraktu jednoho z izolátů, TR42, však ukázala, že pravděpodobným hlavním hemolytickým faktorem jsou látky z rodiny polyenového antibiotika filipinu, které jsou cytolytické mechanismem vytváření pórů v cytoplazmatické membráně cílových buněk. Přítomnost filipinu a jeho derivátů v extraktu sekundárních metabolitů z TR42, jeho hemolytické vlastnosti i přítomnost příslušných biosyntetických genů v genomu tohoto kmene jsme v laboratoři prokázali (A. Herbrík a E. Corretto, osobní sdělení). Původně půdní streptomycety tak pravděpodobně volí odlišný mechanismus lyze buněk při získávání živin a kovových iontů než většina patogenů. Účinek proteinových hemolyzinů významně doplňují produkcí cytolytických sekundárních metabolitů.

Dalším krokem bylo charakterizovat interakce streptomycet s lidskými patogeny. V literatuře se setkáváme s mnoha odkazy na symbiotické vztahy streptomycet s vyššími organismy, jejichž společným mechanismem je ochranná funkce streptomycetových metabolitů proti mikrobiálním patogenům. Kromě klasických antagonistických vztahů – streptomycety produkovaly látky antimikrobiálního charakteru namířené proti Gram-pozitivním bakteriím, houbám a v omezeném rozsahu i Gram-negativním bakteriím (Tab. 4), jsme pozorovali i interakce na dalších úrovních. Některé kmeny ovlivňovaly *in vivo* produkci sekundárních metabolitů patogeny, jejich motilitu a indukovaly jejich hemolytické schopnosti (viz.kap. 2.3, 5.2.1 a 5.3). Tyto efekty mohou být způsobeny jak přímou interakcí buněk či produkovanými hemolyzinů, tak vzájemným ovlivňováním systémů quorum sensing, tzv. quorum quenchingem (Hassan et al., 2016). Nejvíce interakcí jsme pozorovali u páru TR42 – *Pseudomonas aeruginosa*. To může souviset s dlouhou koevoluční historií obou rodů mikroorganismů, oba se běžně potkávají i v půdě a dají se zde považovat za potravní konkurenty.

Po provedení několika kokultivačních kombinací jsme zjistili, že mikroorganismus, proti které streptomycety obecně vykazovaly nejvyšší aktivitu, je kvasinka *Candida albicans* (Obr. 7). Četnost antifungálních aktivit u streptomycet by šla přisoudit faktu, že streptomycety a houby jsou v půdním prostředí největšími potravními konkurenty.

Abychom aktivovali produkci antimikrobiálních látek, pokusili jsme se provést metodu tzv. „pasážované“ kokultivace. Předpokládali jsme, že díky opakovanému vystavení streptomycety patogenu dojde k zahájení nebo posílení produkce příslušných antimikrobiálních látek. Tuto obecně uznávanou hypotézu se nám u našich kmenů potvrdit nepodařilo. Překvapivý výsledek jsme zaznamenali u interakce streptomycety s označením TR24 a kvasinky *Candida albicans* (Obr. 11 a 12). Při kokultivaci na krevním agaru jsme žádné ovlivnění nezaznamenali, ovšem při kultivaci *in vivo* na MH agaru ano. Absence aktivity na krevním agaru a naopak naměřené velikosti inhibičních zón na HM agaru, lze vysvětlit použitím odlišných kultivačních půd, kdy MH agar je co se týče složení obecně pro streptomycety přirozenější živnou půdou. Na MH agaru bylo vidět postupné zmenšování inhibiční zóny kolem streptomycety, což je přesně opačný efekt než jsme očekávali. To lze vysvětlit domněnkou, že se vzorek streptomycety adaptoval na přítomnost patogenní houby a zastavil produkci antimikrobiálních látek.

Za metabolicky neaktivnější vzorek lze považovat vzorek TR42, který vykazoval pozitivní výsledky téměř ve všech provedených metodách. V souladu s předpokladem

selektivní evoluce antimikrobních aktivit v závislosti na přítomných mikrobiálních populacích jsme pozorovali jistou preferenci antibiotických aktivit směrem ke Gram-negativům přítomným v respiračním traktu (*Neisseria*, *Moraxella*), zatímco Gram-negativní organismy typické pro zažívací trakt (*Proteus*, *Escherichia*) byly k produkovaným látkám rezistentní. Dalším krokem by měla být izolace a charakterizace aktivních látek a objasnění dalších mechanismů interakcí streptomycet s patogeny.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo poskytnout literární přehled obecných poznatků o streptomycetách a produkci sekundárních metabolitů, především v souvislosti s jejich schopnostmi vstupovat do symbiotických vztahů s vyššími organismy. V této práci bylo charakterizováno deset zástupců streptomycet izolovaných z lidských vzorků získaných ze sbírky Biologického centra AV v Českých Budějovicích. Charakterizovali jsme jejich β -hemolytické schopnosti a produkci látek s antimikrobním účinkem. Popsali jsme, jak ovlivňují chování některých patogenů včetně vlivu na jejich virulenci (hemolytické schopnosti).

V tomto ohledu se jedná o pilotní studii streptomycet pocházejících z lidského mikrobiomu, žádné podobné práce v literatuře neexistují. Výsledky mé práce naznačují, že specifické fenotypové adaptace „lidských“ streptomycet by mohly mít přímý vliv na vývoj chronických onemocnění plic. Mohou významně ovlivňovat složení plicního mikrobiomu a též přispívat k virulenci patogenních druhů, ať už přímo produkcí hemolytických metabolitů nebo zprostředkovaně posílením jejich hemolytických aktivit nebo motility.

Výsledky mé práce tvoří základ pro další studie, jejichž cílem bude charakterizovat detailně antibiotické aktivity vybraných kmenů a objasnit mechanismus jejich působení na lidské plicní patogeny. Příkladem je antibiotická aktivita kmene TR42, která selektivně působí na respirační Gram-negativní bakterie (*Moraxella*), a zároveň nemá žádný efekt na životaschopnost běžných střevních bakterií. Přitom právě *Moraxella catarrhalis* je jedním z patogenů, který bývá v poslední době zmiňován v souvislosti s rostoucí rezistencí na běžně používaná antibiotika.

8 Seznam použitých zdrojů

1. ARENAS, N. E., SALAZAR, L. M., SOTO, C. Y., VIZCAÍNO, C., PATARROYO, M. E., PATARROYO, M. A., GÓMEZ, A., 2011. Molecular modeling and in silico characterization of *Mycobacterium tuberculosis* TlyA: Possible misannotation of this tubercle bacilli-hemolysin. *BMC Structural Biology* [online]. **11**(1), 16- [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1186/1472-6807-11-16. ISSN 1472-6807. Dostupné z: <http://bmcstructbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6807-11-16>
2. ARENAS, R., MARTINEZ, R. F. F, TORRES-GUERRERO, E., GARCIA, C., 2017. Actinomycetoma: An Update on Diagnosis and Treatment. *Cutis* [online]. **99**(2), E11-E15 [cit. 2018-01-01]. Dostupné z: <https://www.mdedge.com/cutis/article/131384/infectious-diseases/actinomycetoma-update-diagnosis-and-treatment>
3. ATLAS, R. M., 2004. *Handbook of microbiological media*. 3rd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, ISBN 0-8493-1818-1.
4. BOLL, B., GOERGEN, H., BEHRINGER, K., BRÖCKELMANN, P. J., HITZ, F., KERKHOFF, A., GREIL, R., VON TRESCKOW, B., EICHENAUER, D. A., BÜRKLE, C., BORCHMANN, S., FUCHS, M., DIEHL, V., ENGERT, A., BORCHMANN, P., 2016. Bleomycin in older early-stage favorable Hodgkin lymphoma patients: analysis of the German Hodgkin Study Group (GHSG) HD10 and HD13 trials. *Blood* [online]. **127**(18), 2189-2192 [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1182/blood-2015-11-681064. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2015-11-681064>
5. CANE, D. E., HE, X., KOBAYASHI, S., ŌMURA, S., IKEDA, H., 2006. Geosmin Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular Cloning, Expression and Mechanistic Study of the Germacradienol/Geosmin Synthase. *The Journal of Antibiotics* [online]. **59**(8), 471-479 [cit. 2018-02-19]. DOI: 10.1038/ja.2006.66. ISSN 0021-8820. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ja200666>
6. DE LIMA PROCÓPIO, R. E., DA SILVA, I. R., MARTINS, M. K., DE AZEVEDO, J. L., DE ARAÚJO, J. M., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. **16**(5),

- 466-471 [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.1016/j.bjid.2012.08.014. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867012001341>
7. DUNNE, E. F., BURMAN, W. J., WILSON, M. L., 1998. *Streptomyces* pneumonia in a patient with human immunodeficiency virus infection: case report and review of the literature on invasive streptomyces infections. *Clinical Infectious Diseases*. **27**(1), 93-96 [cit. 2018-04-05] DOI: 10.1086/514612. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/514612>
 8. FRY, B. A., LORIA, R., 2002. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [online]. **60**(1), 1-8 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1006/pmpp.2001.0371. ISSN 08855765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0885576501903716>
 9. GIRALT, E., LO RE, D., 2017. The Therapeutic Potential of Migrastatin-Core Analogs for the Treatment of Metastatic Cancer. *Molecules* [online]. **22**(2), 1-26 [cit. 2017-12-27]. DOI: 10.3390/molecules22020198. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/2/198>
 10. GOTTELT, M., KOL, S., GOMEZ-ESCRIBANO, J. P., BIBB, M., TAKANO, E., 2010. Deletion of a regulatory gene within the cpk gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* [online]. **156**(8), 2343-2353 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1099/mic.0.038281-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.038281-0>
 11. HARRISON, J., STUDHOLME, D. J., 2014. Recently published *Streptomyces* genome sequences. *Microbial Biotechnology* [online]. **7**(5), 373-380 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1111/1751-7915.12143. ISSN 17517915. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12143>
 12. HASANI, A., KARIMINIK, A., ISSAZADEH, K., 2014. Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* [online]. **2**(1), 63-75 [cit. 2017-11-21]. DOI: 10.18869/IJABBR. Dostupné z: http://www.ijabbr.com/article_7033.html

13. HASSAN, R., SHAABAN, M. I., ABDEL BAR, F. M., EL-MAHDY, A. M., SHOKRALLA, S., 2016. Quorum Sensing Inhibiting Activity of *Streptomyces coelicoflavus* Isolated from Soil. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7**, - [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00659. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00659/abstract>
14. HODGSON, D. A., 2000, Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology* [online]. **42**(1), 47-238 [cit. 2017-11-27]. DOI: 10.1016/S0065-2911(00)42003-5. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065291100420035?via%3Dihub>
15. HUANG, Y. J., NARIYA, S., HARRIS, J. M., LYNCH, S. V., CHOY, D. F., ARRON, J. R., BOUSHEY, H., 2015. The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *J Allergy Clin Immunol* [online]. **136**(4), 874-884 [cit. 2017-11-28]. DOI:10.1016/j.jaci.2015.05.044. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26220531>
16. CHATER, K. F., 1998. Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* [online]. **144**(6), 1465-1478 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1099/00221287-144-6-1465. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-144-6-1465>
17. CHEN, L., YANG, S., JAKONCIC, J., ZHANG, J. J., HUANG, X., 2010. Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature* [online]. **464**(7291), 1062-1066 [cit. 2018-01-01]. DOI: 10.1038/nature08978. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature08978>
18. JUNIPER, E. F., GUYATT, G. H., EPSTEIN, R. S., FERRIE, P. J., JAESCHKE, R., HILLER, T. K., 1992. Evaluation of impairment of health related quality of life in asthma: development of a questionnaire for use in clinical trials. *Thorax* [online]. **47**(2), 76-83 [cit. 2018-04-10]. DOI:

- 10.1136/thx.47.2.76. ISSN 0040-6376. Dostupné z:
<http://thorax.bmj.com/cgi/doi/10.1136/thx.47.2.76>
19. KALTENPOTH, M., GOETTLER, W., DALE, C., STUBBLEFIELD, J. W., HERZNER, G., ROESER-MUELLER, K., STROHM, E., 2006. Candidatus *Streptomyces philanthi*, an endosymbiotic streptomycete in the antennae of *Philanthus digger* wasps. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 56(6), 1403-1411 [cit. 2017-11-22]. DOI: 10.1099/ijs.0.64117-0. ISSN 1466-5026. Dostupné z:
<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.64117-0>
20. KIM, S., THIESSEN, P. A., BOLTON, E. E., CHEN, J., FU, G., GINDULYTE, A., HAN, L., HE, J., HE, S., SHOEMAKER, B. A., EANG, J., YU, B., ZHANG, J., BRYANT, S. H., 2016. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research* [online]. 44(D1), D1202-D1213 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1093/nar/gkv951. ISSN 0305-1048. Dostupné z:
<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv951>
21. KING, R. R., CALHOUN, L. A., 2009. The thaxtomin phytotoxins: Sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry* [online]. 70(7), 833-841 [cit. 2018-02-06]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.04.013. ISSN 00319422. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942209001678>
22. KLABAN, V., 1999. *Svět mikrobů: malý mikrobiologický slovník*. Hradec Králové: Gaudeamus, ISBN 80-7041-639-4.
23. KNOPIK-SKROCKA, A., BIELAWSKI, J., 2002. The mechanism of the hemolytic activity of polyene antibiotics. *Cell Mol Biol Lett* [online]. 7(1), 31-48 [cit. 2018-02-19]. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11944048>
24. KRIEGER, R. I., 2010. *Hayes' handbook of pesticide toxicology*. Third edition. Boston: Elsevier/AP, ISBN 978-0-12-374367-1.
25. LANGMEIER, M., 2009. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, ISBN 9788024725260.

26. LEVINSON, W., 2014. *Review of medical microbiology and immunology*. 13th ed. New York: McGraw-Hill Education Medical, ISBN 978-0-07-181811-7.
27. MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J., 2004. *Patologie*. Praha: Grada, ISBN 80-247-0785-3.
28. MADDISON, J. E., W. PAGE, S. W., CHURCH, D., 2008. *Small animal clinical pharmacology*. 2nd ed. New York: Saunders/Elsevier, ISBN 978-0-7020-2858-8.
29. MANTECA, A., PELAEZ, A. I., DEL MAR GARCIA-SUAREZ, M., HIDALGO, E., DEL BUSTO, B., MENDEZ, F. J., 2008. A rare case of lung coinfection by *Streptomyces cinereoruber* and *Haemophilus influenzae* in a patient with severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization at species level using molecular techniques. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. **60**(3), 307-311 [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.10.009. Dostupné z: [http://www.dmidjournal.com/article/S0732-8893\(07\)00468-3/fulltext](http://www.dmidjournal.com/article/S0732-8893(07)00468-3/fulltext)
30. MASAYOSHI, A., KOIZUMI, Y., SATO, H., KAWABE, T., SUGANUMA, M., KOBAYASHI, H., TOMODA, H., OMURA, S., 2004. Boromycin Abrogates Bleomycin-induced G2 Checkpoint. *The Journal of Antibiotics* [online]. **57**(10), 662-668 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.7164/antibiotics.57.662. ISSN 0021-8820. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/57.662?from=CrossRef>
31. MASLOW, J. N., DAWSON, D., CARLIN, E. A. HOLLAND, S.M. 1999 Hemolysin as a virulence factor for systemic infection with isolates of *Mycobacterium avium* complex. *Journal of clinical microbiology* [online]. **37**(2), 445-446 [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/37/2/445.full>
32. MCCORMACK, F. X., 2008. Lymphangioliomyomatosis. *Chest* [online]. **133**(2), 507-516 [cit. 2018-02-22]. DOI: 10.1378/chest.07-0898. ISSN 00123692. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369215491020>

33. MCNEIL, M M, BROWN, J. M., 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **7**(3), 357-417 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1128/CMR.7.3.357. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.7.3.357>
34. MUELLER, J. H., HINTON, J, 1941. A Protein-Free Medium for Primary Isolation of the Gonococcus and Meningococcus. *Experimental Biology and Medicine* [online]. **48**(1), 330-333 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.3181/00379727-48-13311. ISSN 1535-3702. Dostupné z: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-48-13311>
35. MUKHERJEE, A., MORALES-SCHEIHING, D., GONZALEZ-ROMERO, D., GREEN, K., TAGLIALATELA, G., SOTO, C., MABBOTT, N., 2010. Calcineurin Inhibition at the Clinical Phase of Prion Disease Reduces Neurodegeneration, Improves Behavioral Alterations and Increases Animal Survival. *PLoS Pathogens* [online]. **6**(10), e1001138- [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001138. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1001138>
36. OHNISHI, Y., ISHIKAWA, J., HARA, H., SUZUKI, H., IKENOYA, M., IKEDA, H., YAMASHITA, A., HATTORI, M., HORINOUCI, S., 2009. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology* [online]., **190**(11), 4050-4060 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1128/JB.00204-08. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00204-08>
37. OHRI, P., BHARDWAJ, R., BALI, S., KAUR, R., JASROTIA, S., KHAJURIA, A., PARIHAR, R., 2015. The Common Molecular Players in Plant Hormone Crosstalk and Signaling. *Current Protein & Peptide Science* [online]. **16**(5), 369-388 [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.2174/1389203716666150330141922. ISSN 13892037. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2037&volume=16&issue=5&spage=369>
38. QUINN, R. A., PHELAN, V. V, WHITESON, K. L., GARG, N., BAILEY, B. A., LIM, Y. W., CONRAD, D. J., DORRESTEIN, P. C., ROHWER, F. L., 2016. Microbial, host and xenobiotic diversity in the cystic fibrosis

- sputum metabolome. *The ISME Journal* [online]. **10**(6), 1483-1498 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1038/ismej.2015.207. ISSN 1751-7362. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ismej2015207>
39. RAJESH, T., JEON, J. M., KIM, Y. H., KIM, H. J., YI, S. H., PARK, S. H., CHOI, K. Y., KIM, Y. G., KIM, J., JUNG, S., PARK, H. Y., YANG, Y. H., 2013. Functional analysis of the gene SCO1782 encoding *Streptomyces* hemolysin (S-hemolysin) in *Streptomyces coelicolor* M145. *Toxicon* [online]. **71**, 159-165 [cit. 2018-02-13]. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.05.023. ISSN 00410101. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010113002043>
40. REY, T., DUMAS, B., 2017. Plenty Is No Plague: *Streptomyces* Symbiosis with Crops. *Trends in Plant Science* [online]. **22**(1), 30-37 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.10.008. ISSN 13601385. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138516301674>
41. ROSYPAL, S., 2003. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, ISBN 80-7183-268-5.
42. RYAN, K. J., RAY, C. G., SHERRIS, J. C., 2004. *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, c2004. ISBN 978-0-8385-8529-0.
43. RYŠKOVÁ, O., 2000. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. 1. Praha: Univerzita Karlova v Praze-Nakladatelství Karolinum, ISBN 978-80-246-0135-9.
44. SÁNCHEZ-FERRER, Á., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N., GARCÍA-CÁNOVAS, F., GARCÍA-CARMONA, F., 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* [online]. **1247**(1), 1-11 [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1016/0167-4838(94)00204-T. ISSN 01674838. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016748389400204T>
45. SARMIENTO-RAMÍREZ, J. M., VAN DER VOORT, M., RAAIJMAKERS, J. M., DIE'GUEZ-URIBEONDO, J., 2014 Unravelling the Microbiome of Eggs of the Endangered Sea Turtle *Eretmochelys imbricata* Identifies Bacteria with Activity against the Emerging Pathogen

- Fusarium falciforme*. *PLOS ONE* [online]. 9(4), 1-8 [cit. 2017-11-22]. DOI: 10.1371/journal.pone.0095206. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095206>.
46. SEIPKE, R. F., BARKE, J., BREARLEY, CH., HILL, L., YU, D. W., GOSS, R. J. M., HUTCHINGS, I. M., YU, J., 2011. A Single *Streptomyces* Symbiont Makes Multiple Antifungals to Support the Fungus Farming Ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS ONE* [online]. 6(8), e22028- [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1371/journal.pone.0022028. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022028>
47. SEIPKE, R. F., KALTENPOTH, M., HUTCHINGS, M. I., 2012. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 36(4), 862-876 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00313.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00313.x>
48. SHUKLA, S. D., BUDDEN, K. F., NEAL, R., HANSBRO, P. M., 2017. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clinical & Translational Immunology* [online]. 6(1), 1-12 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1038/cti.2017.6. Dostupné z: <https://www.nature.com/cti/journal/v6/n3/full/cti20176a.html>
49. SCHINDLER, J., 2010. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, ISBN 978-80-247-3170-4.
50. SUTHINDHIRAN, K., KANNABIRAN, K., 2009. Hemolytic activity of *Streptomyces* VITSDK1 spp. isolated from marine sediments in Southern India. *Journal de Mycologie Médicale* [online]. 19(2), 77-86 [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1016/j.mycmed.2009.01.001. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S115652330900002X?via%3Dihub>
51. SUZUKI, K., MATSUNAGA, K., EHARA, T., SAKUMURA, Y., SIDDIQUE, T., UYEDA, M., 2014. Purification and Some Properties of S-Hemolysin Produced by *Streptomyces* sp. Strain No. A-6288. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 59(11), 2081-2086 [cit. 2018-02-

- 19]. DOI: 10.1271/bbb.59.2081. ISSN 0916-8451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.59.2081>
52. TAKANO, H., NISHIYAMA, T., AMANO, S., BEPPU, T., KOBAYASHI, M., UEDA, K., 2016. *Streptomyces* metabolites in divergent microbial interactions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. **43**(2-3), 143-148 [cit. 2017-11-21]. DOI: 10.1007/s10295-015-1680-z. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10295-015-1680-z>
53. VAN DER MEIJ, A., WORSLEY, S. F., HUTCHINGS, M. I., VAN WEZEL, G. P., 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **41**(3), 392-416 [cit. 2018-03-26]. DOI: 10.1093/femsre/fux005. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1093/femsre/fux005>
54. VÁVROVÁ, V., 2006. *Cystická fibróza*. Praha: Grada, ISBN 80-247-05311.
55. VÉZINA, C., KUDELSKI, A., SEHGAL, S. H., 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics* [online]. **28**(10), 721-726 [cit. 2018-02-22]. DOI: 10.7164/antibiotics.28.721. ISSN 0021-8820. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/28.721?from=CrossRef>
56. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, ISBN 80-902896-6-5.
57. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. Brno: NEPTUN, ISBN 80-86850-00-5.
58. WANI, S. H., KUMAR, V., Varsha SHRIRAM, V., SAH, S. K., 2016. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal* [online]. **4**(3), 162-176 [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1016/j.cj.2016.01.010. ISSN 22145141. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214514116300228>
59. WANNER, L. A., 2006. A Survey of Genetic Variation in *Streptomyces* Isolates Causing Potato Common Scab in the United States. *Phytopathology* [online]. **96**(12), 1363-1371 [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1094/PHYTO-96-

1363. ISSN 0031-949x. Dostupné z:
<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-96-1363>
60. WATVE, M. G., TICKOO, R., JOG, M. M., BHOLE, B. D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology* [online]. **176**(5), 386–390 [cit. 2017-11-27]. DOI: 10.1007/s002030100345. Dostupné z:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002030100345>
61. YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H., CHUN, J., 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2017, **67**(5), 1613-1617 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1099/ijsem.0.001755. ISSN 1466-5026. Dostupné z:
<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001755>
62. ZAKHARKINA, T., HEINZEL, E., KOCZULLA, R. A., GREULICH, T., RENTZ, K., PAULING, J. K., BAUMBACH, J., HERRMANN, M., GRÜNEWALD, CH., DIENEMANN, H., VON MÜLLER, L., BALS, R., 2013. Analysis of the Airway Microbiota of Healthy Individuals and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease by T-RFLP and Clone Sequencing. *PLoS ONE* [online]. **8**(7), 1-11 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1371/journal.pone.0068302. Dostupné z:
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068302>
63. ŽÁK, A., PETRÁŠEK, J., 2011. *Základy vnitřního lékařství*. Praha: Galén, Zubní lékařství. ISBN 978-80-7262-697-7.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1 Vývojový cyklus Streptomycet (Chater, 1998).	10
Obrázek 2 Strukturní vzorec melaninu (Kim et al., 2016)	14
Obrázek 3 Strukturní vzorec thaxtominu A (Fry a Loria, 2002).	15
Obrázek 4 Ukázka alfa a beta hemolýzy (Levinson, 2014).	22
Obrázek 5 Schéma očkování streptomycetové a patogenové čáry.	30
Obrázek 6 Beta hemolýza „lidských“ streptomycet.....	32
Obrázek 7 Interakce streptomycet s kvasinkou <i>Candida albicans</i>	34
Obrázek 8 Interakce streptomycet s bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Obrázek 9 Stanovení inhibičních zón při interakci bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> a jednotlivých streptomycet.....	37
Obrázek 10 Stanovení inhibičních zón při interakci bakterie <i>Streptococcus pneumoniae</i> a jednotlivých streptomycet	38
Obrázek 11 Metoda pasážování vzorku TR24 a <i>Candida albicans</i>	39
Obrázek 12 Inhibiční zóny po sériové kokultivaci vzorku TR24 a <i>Candida albicans</i> v pasáži 0,3 a 6.....	40
Obrázek 13 Interakce streptomycety s označením TR42 s patogenními bakteriemi.	41

10 Seznam tabulek

Tabulka 1 Seznam některých antibiotik produkovaných streptomycetami (de Lima Procópio et al., 2012).	12
Tabulka 2 Přehled použitých Streptomycet a odebraných materiálů.	27
Tabulka 3 Přehled použitých patogenů	28
Tabulka 4 Interakce streptomycet s lidskými patogeny – průměr zóny inhibice růstu patogena v okolí streptomycety je uváděna v mm.....	33
Tabulka 5 Průměr inhibičních zón v mm	36
Tabulka 6 Velikosti inhibičních zón (mm) po sériové kokultivaci v pasáži 0, 3 a 6.	39

11 Seznam zkratek

ACQ	test posouzení kompenzace astmatu
AsOr	<i>Aspergillus oryzae</i>
ATB	antibiotické
AV	Akademie věd
BC	Biologické centrum
BGL	γ -butyrolaktony
CCSACB	Sbírka kultur aktinomycet ÚPB BC AVČR
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
c/r	izolát citlivý / rezistentní
CaAl	<i>Candida albicans</i>
CF	cystická fibróza
CiFr	<i>Citrobacter freundii</i>
EsCo	<i>Escherichia coli</i>
FK – 506	takrolimus
Glk	glukózokináza
CHOPN, COPD	chronická obstrukční plicní nemoc, chronic obstructive pulmonary disease
KIPn	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L – DAP	kyselina L - diaminopimelová
MoCa	<i>Moraxella catarrhalis</i> .
MRSA	<i>Meticilin - rezistentní Staphylococcus aureus</i>
ND	nedohledáno
NeiPh	<i>Neisseria pharyngis</i>
PrVu	<i>Proteus vulgaris</i>
PsaE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Rhiz	<i>Rhizomucor</i>
SaEn	<i>Salmonella enterica</i>
SeMa	<i>Serratia marcescens</i>
ShDy	<i>Shigella dysenteriae</i>
StAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
StPn	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
XDR	Extensively drug-resistant tuberculosis