

Inhibiční účinky bakteriocinů gramnegativních bakterií izolované z potravin

Bc. Martina Urbanová

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Urbanová**
Osobní číslo: **T11846**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Inhibiční účinky bakteriocinů gramnegativních bakterií izolované z potravin**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši na téma bakteriociny gramnegativních bakterií (definice, rozdělení, mechanismus účinku, vlastnosti), zaměřte se na mikrocinny
2. Popište možnosti praktického využití těchto bakteriocinů

II. Praktická část

1. Provedte experimenty sledující inhibiční vliv bakteriocinů (zejména mikrocinů) na vybrané bakterie izolované z potravin a sbírkové kmeny *Salmonella* sp.
 2. Testujte výskyt bakteriocinogenie u gramnegativních bakteriálních izolátů z potravin jiných než *Escherichia coli*
-

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. RILEY, M a Osnat GILLOR. *Research and Applications in Bacteriocins*. Wymondham: Horizon Bioscience, c2007, vi, 218, A-1 s. ISBN 978-1-904933-23-6
2. CASCALES, E., S. K. BUCHANAN, D. DUCHE, C. KLEANTHOUS, R. LLOUBES, K. POSTLE, M. RILEY, S. SLATIN a D. CAVARD. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007-03-08, vol. 71, issue 1, s. 158-229. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06
3. BUDIČ, Maruška, Matija RIJAVEC, Živa PETKOVŠEK, Darja ŽGUR-BERTOK a Mark Alexander WEBBER. Escherichia coli Bacteriocins: Antimicrobial Efficacy and Prevalence among Isolates from Patients with Bacteraemia. *PLoS ONE*. 2011-12-19, vol. 6, issue 12. DOI: 10.1371/journal.pone.0028769
4. CHALÓN, Miriam C., Leonardo ACUNA, Roberto D. MORERO, Carlos J. MINAHK a Augusto BELLOMIO. Membrane-active bacteriocins to control Salmonella in foods. *Food Research International*. 2012, vol. 45, issue 2, s. 735-744. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.08.024

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

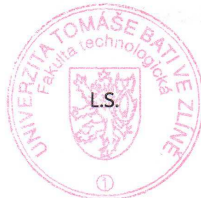
10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Bc. URBANOVÁ MARTINA

Obor: TECHNOLOGIE, HYGIENA
A EKONOMIKA VÝROBY POTRAVIN

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 30.4. 2014

Martina

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíádně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na koliciny a mikrocinny, antimikrobiální látky produkované bakteriemi *Escherichia coli* a příbuznými druhy či rody čeledi *Enterobacteriaceae*. Bylo pojednáno o jejich klasifikaci, vlastnostech a mechanismu účinku. Cílem této práce bylo sledovat inhibiční vliv bakteriocinů na vybrané bakterie izolované z potravin a sbírkové kmeny *Salmonella* sp., ke kterému byla použita metoda vpichu. Dalším cílem bylo testování výskytu bakteriocinogenie u gramnegativních bakteriálních izolátů z potravin jiných než *Escherichia coli*. Ke studiu výskytu bakteriocinogenie bylo použito 48 gramnegativních bakteriálních kmenů izolovaných převážně z těl chlazených kuřat, dále pak ze syrového masa k výrobě fermentovaných klobás a jedlého hmyzu. Ze všech testovaných 15 rodů byla potvrzena produkce bakteriocinu pouze u jednoho kmenu druhu *Pseudomonas fulva* izolovaného z jedlého hmyzu.

Klíčová slova: bakteriocinogenie, *Escherichia coli*, inhibice, koliciny, mikrocinny

ABSTRACT

This work is focused on colicins and microcins, antimicrobial substances produced by bacteria *Escherichia coli* and related species or genera of the family *Enterobacteriaceae*. It dealt with the classification, properties and mechanism of action. The aim of this study was to investigate the inhibitory activity of bacteriocins on selected bacteria isolated from food and collection strains of *Salmonella* sp. by stab method. The other aim was to determine the incidence of bacteriocinogeny in gram-negative bacteria other than *Escherichia coli* isolated from foods. Forty-eight gram-negative bacterial strains isolated mostly from chilled chicken carcasses, raw meat for the production of fermented sausages and edible insect were used to study the incidence of bacteriocinogeny. Only one strain of the species *Pseudomonas fulva* isolated from edible insects from all 15 tested genera produced bacteriocin.

Keywords: bacteriocinogeny, colicins, *Escherichia coli*, inhibition, microcins

Ráda bych velmi poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za její vedení, odborné rady, pomoc, inspiraci i trpělivost a vstřícný přístup při zpracování této diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BAKTERIOCINY	12
1.1 DEFINICE	12
1.2 ROZDĚLENÍ BAKTERIOCINŮ	12
2 BAKTERIOCINY GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ	14
2.1 VLASTNOSTI	14
2.2 KOLICINY	15
2.2.1 Koliciny skupiny A	18
2.2.2 Koliciny skupiny B.....	19
2.3 MIKROCINY	20
2.3.1 Mikrociny I. třídy	21
2.3.2 Mikrociny II. třídy	22
2.3.2.1 Mikrociny podtřídy IIa	24
2.3.2.2 Mikrociny podtřídy IIb.....	25
2.4 BAKTERIOCINY PRODUKOVANÉ JINÝMI GRAMNEGATIVNÍMI BAKTERIEMI NEŽ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	25
3 MECHANIZMUS ÚČINKU MIKROCINŮ	29
3.1 TON SYSTÉM.....	29
3.2 MECHANIZMUS ÚČINKU MIKROCINŮ I. TŘÍDY	29
3.3 MECHANIZMUS ÚČINKU MIKROCINŮ II. TŘÍDY	31
4 PRAKTICKÉ APLIKACE BAKTERIOCINŮ	33
4.1 POTRAVINÁŘSTVÍ	33
4.2 MEDICÍNA A FARMAKOLOGIE	34
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
5 CÍL PRÁCE	37
6 MATERIÁL A METODY	38
6.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	38
6.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA	38
6.3 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY	39
6.4 MIKROBIOLOGICKÉ METODY	43
6.4.1 Stanovení biologické aktivity kolicinů kvalitativně - vpichový pokus	43
6.4.2 Příprava surového bakteriocinu.....	44
6.4.3 Stanovení biologické aktivity kolicinů kvantitativně – kapková metoda.....	45
7 VÝSLEDKY PRÁCE A DISKUZE	46

7.1	INHIBIČNÍ VLIV BAKTERIOCINŮ NA GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE Z POTRAVIN A DALŠÍ SBÍRKOVÉ BAKTERIE.....	46
7.2	IZOLACE BAKTERIOCINŮ	49
7.3	STANOVENÍ INHIBIČNÍHO VLIVU BAKTERIOCINŮ KVANTITATIVNĚ.....	51
7.4	VÝSKYT BAKTERIOCINOGENIE U GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ JINÝCH NEŽ <i>E. COLI</i> IZOLOVANÝCH Z POTRAVIN	52
	ZÁVĚR	54
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK.....	65
	SEZNAM PŘÍLOH.....	66

ÚVOD

Podle údajů WHO (World Health Organization) umírá každoročně v Evropské unii, na Islandu a v Norsku 25 000 pacientů z důvodů závažné infekce způsobené rezistentními bakteriemi. Zvyšující se rezistence nepředstavuje hrozbu jen pro výsledky léčby bakteriálních onemocnění, ale také vážné ohrožení úspěšnosti některých chirurgických zákroků.

Vzhledem k celosvětově vzrůstajícímu výskytu patogenů rezistentních vůči antibiotikům se stal velký počet infekčních onemocnění obtížně léčitelný. Důvodem pro vznik rezistence je především nezodpovědné nebo nevhodné užívání antibiotik, jejich nadužívání a rezidua antibiotik v potravinách, situace se však zhoršila také díky omezenému pokroku učiněnému ve vývoji nových a silných antibiotik v posledních letech.

Z tohoto důvodu je věnována pozornost skupině antimikrobiálních látek, tzv. bakteriocinům, které mají v této oblasti velký potenciál. Bakteriociny jsou malé antimikrobiální peptidy, produkované řadou bakterií, které působí vůči druhům blízkce příbuzným s producentem ve velmi nízkých koncentracích (až pikomoly).

Bakteriociny představují velký potenciál ve zdravotnictví jako probiotika a v klinické praxi jako terapeutika.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIOCINY

1.1 Definice

Bakteriociny jsou antimikrobiální peptidové látky produkované bakteriemi. Produkce antimikrobiálních peptidů (AMP) je rozšířený jev u všech forem života, od mnohobuněčných organismů po bakteriální buňky. Ve vyšších organizmech AMP přispívají k přirozené imunitě a jsou součástí základního obranného systému proti škodlivým mikroorganismům. Pomocí těchto látek mezi sebou jednotlivé bakterie soupeří [1]. Bakteriociny hrají významnou roli v konkurenčním boji, kde poskytují producentovi výhodu oproti ostatním bakteriím [2].

Produkce bakteriocinů je u bakterií velmi rozšířená a to také díky tomu, že genetické determinanty zodpovědné za produkci bakteriocinů se často nacházejí na mobilních genetických elementech, jako jsou plazmidy nebo transpozony [3].

1.2 Rozdělení bakteriocinů

Rozlišujeme čtyři třídy klasifikace bakteriocinů (Tab. 1). Bakteriociny grampozitivních bakterií jsou rozděleny do dvou skupin: lantibiotika (třída I) a nelantibiotika (třída II). Lantibiotika jsou malé peptidy složené z 19 – 38 aminokyselin, obsahující posttranslační modifikaci zahrnující thioether (založený na kruhové struktuře – známý jako lanthionin nebo β -methyllanthionin). Ve třídě II jsou malé (25 – 60 aminokyselin) kationické, tepelně stabilní a nemodifikované antimikrobiální peptidy [1]. Bakteriociny tvořené grampozitivními bakteriemi se podobají mnoha antimikrobiálním peptidům tvořených eukaryoty, jako jsou např. defenziny [4]. Obecně jsou to kationtové, amfifilní, membránově propustné peptidy o přibližné velikosti 2 – 6 kDa [5].

Bakteriociny gramnegativních bakterií jsou děleny na mikrociny, což jsou krátké peptidy o molekulové hmotnosti do 10 kDa [6] a koliciny, což jsou proteiny, polypeptidy, nebo v malé míře oligopeptidy [7], jejichž molekulová hmotnost je maximálně 80 kDa [8]. Mikrociny jsou rozděleny na dvě podskupiny: třída I obsahuje mikrociny o malé velikosti (do 5 kDa), které jsou posttranslačně modifikované; třída II obsahuje mikrociny větší (5 – 20 kDa), které nejsou posttranslačně modifikované [1].

Tab. 1. Klasifikace bakteriocinů podle García a kol. [9].

Třída	Obecné vlastnosti	Produkováno bakteriemi mléčného kvašení
I – Lantibiotika Ia – Lineární Ib – Globulární Ic – Multi-komponentní	Modifikováno, stabilní, <15 kDa Vytvářející póry, kationtové Inhibitory enzymů, ne kationtové Dva peptidy	Nisin, Lacticin 481, Plantaricin C Žádný Lct3147, Plantaricin W
II – Neupravené peptidy IIa – Pediocin IIb – Smíšené IIc – Multi-komponentní	Tepelně stabilní, <15 kDa Anti-Listeria, shoda YGNGV Ne Pediocin Dva peptidy	Pediocin PA1/AcH, Enterocin A, Sakacin A Enterocin B, L50, Carnobactericin A Lactococcin G, Plantaricin S, Lactacin F
III – Velké proteiny IIIa – Bakteriolytické IIIb – Nelytické	Tepelně labilní, >30 kDa Degradace buněčné stěny Cytosolové cíle	Enterolysin A, Lcn972 ^a Koliciny ^b E2-E9
IV – Kruhové peptidy	Tepelně stabilní, peptidové vazby	AS-48, Gassericin A, Acidocin B

^a Lcn972 se váže na buněčné stěny prekurzorů lipidů II a blokuje biosyntézu buněčné stěny, 15kDa

^b Koliciny jsou syntetizovány *E. coli*

2 BAKTERIOCINY GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ

Bakteriociny tvoří velmi heterogenní skupinu s různými morfologickými a biochemickými vlastnostmi [10]. Některé znaky mají podobné - většinou jsou kódované na plazmidech a většinou se jedná o vysokomolekulární látky s antibiotickým účinkem [11]. Na rozdíl od antibiotik disponují bakteriociny úzkým spektrem účinku [12]. Nejlépe prostudované bakteriociny jsou koliciny a mikrocin, tvořené gramnegativními bakteriemi zejména *Escherichia coli* a příbuznými druhy z čeledi *Enterobacteriaceae* [13].

2.1 Vlastnosti

Koliciny i mikrocin mohou být buňkou produkovány zároveň, nebo může buňka produkovat hned několik kolicinů najednou [14]. Tyto dva typy bakteriocinů jsou klasifikovány podle jejich molekulové hmotnosti: koliciny 25 - 80 kDa, mikrocin menší než 10 kDa. Koliciny a mikrocin jsou podobné v mnoha ohledech, ale na rozdíl od některých kolicinů není syntéza mikrocinů letální a nehrozí poškození DNA. Dále, téměř všechny koliciny jsou plazmidově kódované, zatímco geny pro mikrocin jsou často uloženy na chromozomu. Koliciny působí buď depolarizací membrány, jako nukleáza nebo degradují peptidoglykan [15]. Kolicin se nejdříve váže na specifický receptor na vnější membráně citlivé buňky a poté se translokuje přes membránu (Tol nebo TonB mechanismus) [16].

Na druhé straně byly mikrocin klasifikovány podle přítomnosti, charakteru a lokalizace posttranslačních modifikací, organizací genových klastrů a vedoucí peptidové sekvence. Mikrocin třídy I jsou peptidy s molekulovou hmotností pod 5 kDa a jsou podrobeny rozsáhlým posttranslačním modifikacím (B17, C7 a J25). Mikrocin II třídy jsou peptidy s vyšší molekulovou hmotností (5-10 kDa) a jsou rozděleny do dvou podtříd: třída IIa mikrocin, které mohou obsahovat disulfidické vazby, ale žádné další posttranslační modifikace (L, ColV a 24), a třída IIb lineární mikrocin, které mají C-terminální posttranslační modifikace (siderofory) (E492, H47, 147 a M) [16].

Koliciny E1, E4, E7, E8, K a S4 spolu s mikrocin J25 a 24 jsou nejúčinnější inhibitory růstu patogenní bakterie *Escherichia coli* O157:H7 [4].

2.2 Koliciny

Koliciny jsou toxické exoproteiny produkované kolicinogenními kmeny bakterie *Escherichia coli* a některými příbuznými druhy bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* [7]. Inhibují citlivé bakterie blízce příbuzné a působí přes specifické receptory v buněčné stěně [17].

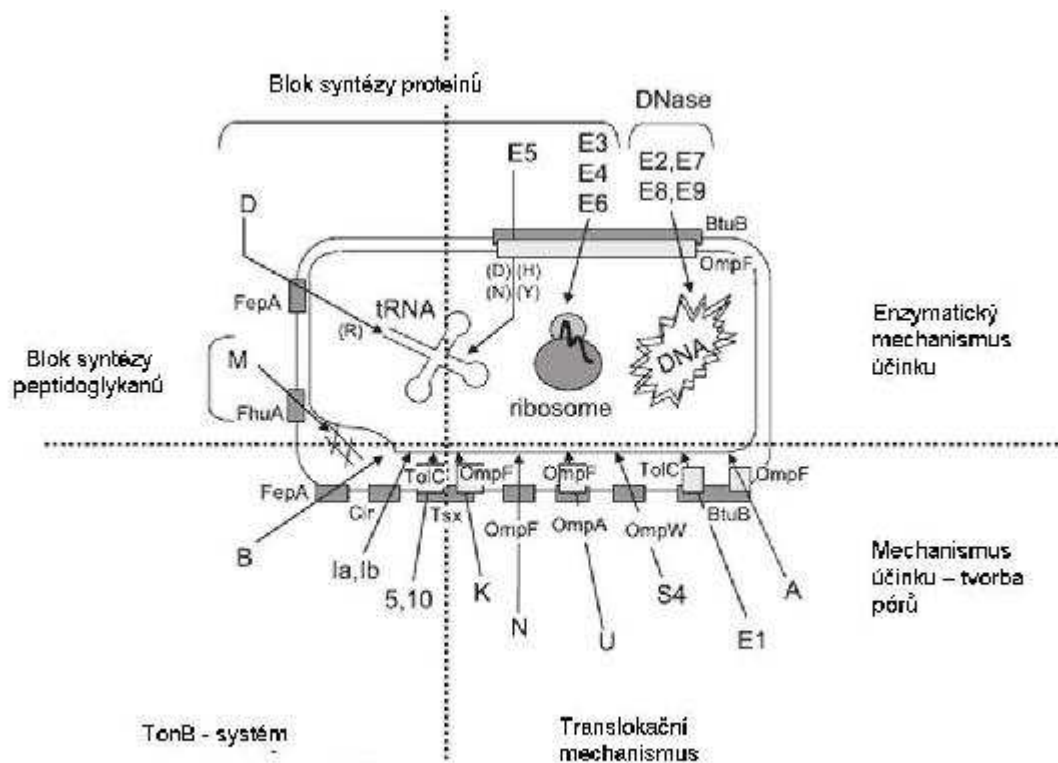
První kolicin objevil v roce 1925 Gratia jako antimikrobiální protein produkovaný *E. coli* [4], ovšem v současné době je řazen mezi mikrociny. V roce 1946 vytvořili Gratia a Fredericq název kolicin, v té době byla prokázána bílkovinná povaha kolicinů a jejich specifický způsob účinku [15]. V současné době je známo 34 kolicinů, z nichž bylo blíže zkoumáno a popsáno pouze 26 [18]. Všechny koliciny jsou uspořádány do tří oblastí: N-koncová doména se podílí na translokaci přes membránu, centrální doména je zapojena do vazby k receptoru a C-koncová doména obsahuje aktivní část s letálním účinkem [19].

Klasifikace a názvosloví kolicinů jsou odvozeny podle základního principu působení na cílovou buňku. Dle své receptorové specifity se značí velkými písmeny. V případě, že dochází k současnému navázání více kolicinů na jeden receptor, přidávají se při označování za písmena čísla [7].

Koliciny dělíme do dvou skupin (A a B), na základě typu translokačního mechanismu, který je využit při transportu přes buněčný obal (Obr. 1). Do skupiny A jsou zařazeny koliciny využívající systém Tol, dále složený z proteinů TolA, TolB, TolQ a TolR [20]. K této skupině se řadí koliciny E1 až E9, K, L, N, S4, U a Y [15]. Skupinu B tvoří koliciny využívající systém Ton, který se skládá z proteinů TonB, ExbB a ExbD. Do skupiny B jsou zařazeny koliciny B, D, Ia, Ib, M, 5 a 10 [7].

Pro správné zařazení kolicinu je třeba znát:

- a) receptorovou specifitu;
- b) typ translokačního mechanismu;
- c) přítomnost nebo absenci zkřížené imunity producenta vůči kolicinům, které využívají stejný receptor [7].



Obr. 1. Schematické shrnutí příjmu, translokace a způsob působení nejvíce studovaných kolicinů [13, upraveno].

Podle letálního účinku můžeme koliciny rozdělit do čtyř skupin:

1. Koliciny depolarizující plazmatickou membránu (A, B, E1, Ia, Ib, K, N, S4, U, Y, 5 a 10) [15]. Molekulární hmotnost těchto kolicinů se pohybuje v rozmezí 40-70 kDa. Baktericidní účinek spočívá v tvorbě iontových kanálů ve vnitřní membráně cílových buněk [21].
2. Koliciny s DNA endonukleázovou aktivitou (E2, E7, E8 a E9).
3. Koliciny blokující proteosyntézu (D, E3, E4, E5 a E6).
4. Koliciny degradující peptidoglykan (pouze kolicin M) [15].

Způsob usmrcení buňky tedy závisí na typu kolicinu [11].

V roce 1965 De Witt a Hesinski prokázali, že genetické determinanty kódující syntézu kolicinů jsou umístěny převážně na plazmidech [22]. Jejich syntéza je kódována geny na tzv. Col-plazmidech [23]. Podle velikosti, schopnosti replikace, počtu kopií v buňce a schopnosti samostatného přenosu konjugací je možno Col-plazmidy rozdělit do tří skupin [24]:

- a) Skupina Ia – malé plazmidy (3-6 kb), vyskytující se v mnoha kopiích (spontánně, bez indukce 15-30 na buňku), schopné replikace i bez syntézy proteinů hostitelskou buňkou, ale neschopné přenosu konjugací.
- b) Skupina Ib – malé v mnoha kopiích se vyskytující plazmidy, neschopné replikace ani přenosu konjugací.
- c) Skupina II – velké (70-90 kb), v málo kopiích se vyskytující plazmidy neschopné amplifikace, často však schopné přenosu konjugací [17].

Kolicinový operon, nesen na Col-plazmidu, se obvykle skládá ze tří genů, jsou to geny:

- a) gen pro kolicin – toxin;
- b) gen pro imunitní protein;
- c) gen pro lytický protein [15].

Imunitní protein chrání produkční kmen proti letálnímu účinku svého kolicinu. Lytický protein usnadňuje export většiny kolicinů z produkčních buněk a způsobuje rozpad buněčného obalu a smrt bakterie [7].

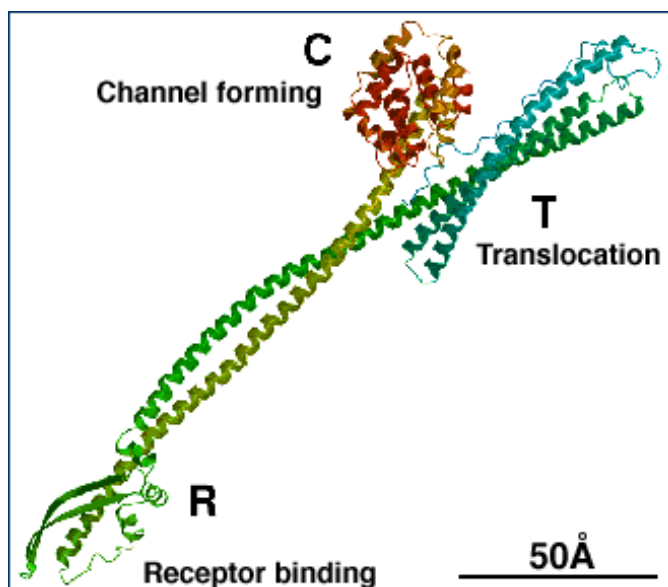
Interakce mezi volně rozpustným kolicinem a membránově vázaným imunitním proteinem je vhodným modelem pro studium protein-proteinových interakcí [25]. Imunitní protein kolicinů, které vytváří iontové kanály, je umístěn v plazmatické membráně buněk produkčního kmene a chrání je tak před účinkem exogenního kolicinu. Aktivitu endogenního kolicinu tlumí „obrácený“ membránový potenciál. Nukleázové koliciny, působící v cytoplazmě, jsou ihned po syntéze asociovány s imunitním proteinem, který chrání buňky produkujícího kmene jak před exogenním, tak i před endogenním kolicinem [7].

Koliciny jsou buňkou produkovány při stresu, tzv. SOS reakcí [26]. Stres je např. nízká hladina živin v prostředí [4]. SOS reakci vyvolávají různé látky, v laboratorních podmínkách je nejpoužívanější látkou mitomycin C [15].

Interakce kolicinu s citlivou bakteriální buňkou probíhá ve třech krocích:

1. vazba na specifický receptor ve vnější membráně bakterie;
2. translokace přes buněčný obal;
3. vlastní letální účinek.

Vazbu na receptor ve vnější membráně zprostředkovává centrální doména, vstup kolicinu přes buněčný obal zajišťuje N-terminální sekvence a C-terminální sekvence (Obr. 2) je odpovědná za letální účinky [20] a za interakci kolicinu s imunitním proteinem [17].



Obr. 2. Funkční domény kolicinu. T (translokační), R (receptorová), C (cytotoxická) [58].

Koliciny jsou obvykle uloženy na jednom ze dvou typů kolicinogenních plazmidů. Plazmidy typu A jsou malé (6 – 10 kb) a přítomné v mnoha buněčných kopiích. Plazmidy typu B mají asi 40 kb, nesou četné geny a jsou schopny konjugace [5].

2.2.1 Koliciny skupiny A

Do této skupiny patří koliciny E1 – E9, K, N, S4, U a Y. Koliciny E2, E7, E8 a E9 vykazují DNA endonukleázovou aktivitu, koliciny E3, E4, E5 a E6 blokují proteosyntézu. Pro zbylé koliciny této skupiny je mechanismem účinku tvorba iontových kanálů ve vnitřní membráně cílových buněk [26].

Kolicin E1 patří do skupiny kolicinů tvořící iontové kanály, s čímž je spojena depolarizace plazmatické membrány. Struktura kolicinu E1 byla objasněna pomocí rentgenové krystalografie. Kolicin E1 je vysoce účinný i proti bakterii *Listeria monocytogenes*. V jiné studii byl prokázán zvýšený výskyt kolicinu E1 u kmene *E. coli*, izolovaných od pacientů s infekcí močových cest. Výsledky ukázaly, že kolicin E1 se zdá být potencionálně významný faktor virulence uropatogenních kmenů *E. coli* (UPEC), které tvoří podskupinu extrastřevní patogenní *E. coli*, způsobující infekci močových cest [26]. Kolicin E1, stejně jako všechny koliciny depolarizující plazmatickou membránu se skládá ze tří funkčních domén, které souhrnně působí tvorbou pórů na citlivé bakterie. Vazebné a translokační domény

kolicinu E1 jsou vysoce specifické na rozdíl od letální domény, naznačující, že kolicin E1 by mohl být v zásadě široce efektivní [27].

Kolicin E3 patří mezi koliciny blokuující proteosyntézu [26].

Kolicin A patří mezi nejčastější skupinu bakteriocinů (E1, K, Ia, Ib, B, N). Je zajímavé, že koliciny sdílí 60-80% homologii v C-termální doméně, ale mají různé imunitní proteiny, z nichž každý je specifický pro jeden kolicin. C-termální část kolicinu N vykazuje významnou homologii s C-termální částí kolicinu A. Molekulová hmotnost kolicinu A byla stanovena přibližně na 63 kDa. Pro kolicin N je to přibližně 42 kDa [26].

Kolicin U vykazuje vysokou sekvenční homologii s kolicinem Y. Přestože je mezi koliciny U a Y 87% totožnost na úrovni aminokyselinové sekvence, nejsou jejich producenti navzájem zkříženě imunní [26].

Kolicin K je póry tvořící kolicin, u kterého byla prokázána účinnost proti kmenům *E. coli* způsobujících záněty močových cest (UPEC). Studie byla prováděna na humánních izolátech v roce 2001 a 2002 ve Slovinsku. N-terminální konec kolicinu K sdílí velkou homologii s N-terminálním koncem kolicinu S4. C-termální konec kolicinu S4 sdílí určitou homologii s kolicinem A. Kolicin S4 je zajímavý tím, že je složen ze čtyř částí: N-konec, dvě centrální domény a C-konec. Je to jediný kolicin, který má téměř totožné centrální domény, odpovědné za vazbu na receptor [26].

2.2.2 Koliciny skupiny B

Do této skupiny patří koliciny B, M, Ia, Ib, D, 5 a 10.

Kolicin M je nejmenší ze známých kolicinů, jeho molekulová hmotnost je 29 453 Da. Kolicin M blokuje syntézu peptidoglykanu, na základě čehož nastane jako druhotný efekt autolýza. Je to jediný kolicin, u kterého je známý takový mechanismus účinku. Geny pro kolicin a imunitní protein se nachází vedle sebe, ale v opačné orientaci, na ColM plasmidech. Odolnost vůči tomuto kolicinu je zprostředkována pomocí *cmi* genu. Protein Cmi nepůsobí katalyticky, ale váže kolicin M do plazmatické membrány, což vede k inaktivaci kolicinu [26].

Kolicin B je cytotoxický protein s molekulovou hmotností 55 kDa. Jako receptor využívá vnější membránový transporter FepA a systém Ton pro translokaci. Po přístupu do plazmatické membrány citlivých buněk *E. coli* tvoří póry, dochází k vyčerpávání elektrochemic-

kého potenciálu membrány, což nakonec vyústí v smrt buňky. Celková struktura kolicinu B je ve tvaru činky [26].

Koliciny B a M patří k nejčastějším kolicinům u kmenů *E. coli* a běžně se vyskytují společně u jednoho izolátu, neboť jejich geny jsou často kódovány na stejném plazmidu [26].

Koliciny Ia a Ib jsou iontové kanály tvořící a ve vodě rozpustné bakteriální toxiny. Koliciny Ia a Ib vykazují velkou sekvenční homologii a mají velmi podobnou molekulovou hmotnost 69 457,7 Da pro kolicin Ia a 69 952,45 Da pro Ib. Tyto dva koliciny adsorbují na stejné specifické buněčné receptory a mají také společný mechanismus účinku. I přes všechny společné rysy nejsou producenti vzájemně zkříženě imunní. Buňky schopné produkovat kolicin Ia jsou imunní k nízkým koncentracím kolicinu Ia, ale ne k Ib a naopak [26].

Kolicin D se od ostatních kolicinů liší vysokou molekulární hmotností. Tento kolicin má obdobné mechanismy působení jako kolicin E3, ale jejich molekulární vlastnosti jsou zcela odlišné [26]. Kolicin D je složen výhradně z aminokyselin a nevytváří komplexy s lipidy nebo lipopolysacharidy. Jedna molekula obsahuje šest zbytkových molekul cysteinu [27].

Koliciny 5 a 10 zabíjí citlivé buňky permeabilizací jejich buněčných membrán. Kolicin 5 je zkoumán pro velmi vhodné vlastnosti jako potenciální nové antibiotikum, zejména pro léčbu infekcí lidí a zvířat způsobené patogenními kmeny *E. coli* [26].

2.3 Mikrocin

Mikrocin jsou ribozomálně syntetizované peptidy [8] produkované enterobakteriemi, které působí na kmeny gramnegativních bakterií [4]. Mikrocin tvoří velmi omezenou, ale vysoce heterogenní třídu bakteriocinů [8].

Mikrocin se liší od kolicinů některými fyzikálními vlastnostmi a nejsou tak dobře prozkoumány jako koliciny [27]. Mnoho z těchto peptidů je podrobena následné posttranslační modifikaci, díky níž jsou sbaleny do funkční biomakromolekuly [28]. Genetická informace o syntéze mikrocinu může být primárně nesena na chromozomu nebo plazmidech. Jejich produkce je indukována za stresových podmínek, zejména při nedostatku živin [27]. Rozlišujeme dvě podskupiny: jedna obsahuje modifikované malé peptidy s molekulovou hmotností nižší než 3,5 kDa (mikrocin B17, C7 a J25) a druhá obsahující mikrocin s vyšší molekulovou hmotností (5 až 9 kDa) [28].

Dle následujících faktorů jsou mikrocinny klasifikovány do dvou tříd, faktory jsou:

- přítomnost, povaha a lokalizace posttranslační modifikace;
- organizace kódující genové skupiny;
- přítomnost či nepřítomnost zaváděcí peptidové sekvence [29].

2.3.1 Mikrocinny I. třídy

Mikrocinny I. třídy jsou posttranslačně upravené, plazmidově kódované peptidy s molekulovou hmotností do 5 kDa [8]. Tyto mikrocinny jsou kódovány skupinou genů, kde gen pro imunitní faktor není uložen blízko strukturních genů. Dva až tři geny umožňující posttranslační modifikaci aminokyselinové kostry jsou naopak uloženy blízko strukturního genu [29].

Mikrocin B17 je 3,1 kDa posttranslačně modifikovaný hydrofobní peptid produkovaný *E. coli*, obsahující operon plazmidu MccB17. Studie naznačují, že primárním cílem pro tento mikrocin je DNA gyráza [30]. Tento mikrocin inhibuje DNA replikaci bakteriálního chromozomu inhibicí činnosti DNA gyrázy a spouští tak v buňkách SOS odpověď. Mikrocin působí baktericidně zejména na rody *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* i na rod *Pseudomonas*, který nepatří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jeho aminokyselinová kostra, bohatá na glycin, obsahuje čtyři oxazolové a čtyři thiazolové heterocykly. Tyto heterocykly vznikají během maturace promikrocinu úpravou dipeptidů Gly-Ser a Gly-Cys na molekuly oxazolu a thiazolu. Oblast tripeptidů Gly-Ser-Cys a Gly-Cys-Ser je upravena na dvojici heterocyklů oxazol-thiazol, resp. thiazol-oxazol [31].

Mikrocin C7/C51 je zatím nejmenší známý mikrocin. Je složen pouze ze sedmi aminokyselinových zbytků, přičemž na C-konci obsahuje N-acylovou vazbou kovalentně vázaný AMP. Jako promikrocin také neobsahuje zaváděcí peptidovou sekvenci. Strukturní gen mikrocinu C7/C51 *mccA* (21 bp) je dokonce jedním z nejmenších známých genů vůbec. Jeho antimikrobiální funkce spočívá v blokaci syntézy proteinů (konkrétně v inhibici aspartyl-tRNA syntetázy vytvořením strukturního analogu meziproductu tohoto enzymu). Účinný je zejména proti gramnegativním enterobakteriím fylogeneticky příbuzným rodu *Escherichia* (rody *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*) i vůči rodu *Proteus*. Genetická informace mikrocinu C7/C51 je nesena jednokopiovým konjugativním plazmidem pMccC7 o velikosti 43 kb a skládá se ze šesti genů – *mccABCDEFG*, kde *mccA* jako struk-

turní gen kóduje samotný mikrocin, produkty genů *mccB*, *mccC* a *mccD* tvoří proteinový komplex zajišťující transport mikrocinu z buňky a upravují (vyjma *mccC*) prekurzor mikrocinu. Geny *mccE* a *mccF* mají imunitní funkci, i když funkce *mccE* genu není zcela jasná a produkt tohoto genu má patrně více funkcí. K ochraně buňky před vlastními toxiny navíc přispívá i již zmíněný gen *mccC* exportního systému. Mikrocin C7/C51 poprvé izolovala a popsala v osmdesátých letech skupina španělských vědců, kteří tento peptid izolovali z bakterií *Escherichia coli* a pojmenovali jej mikrocin C7 po plazmidu pRYC7 (dnes pMccC7), který tyto buňky nesly. Později skupina ruských mikrobiologů izolovala peptid podobných vlastností a nazvala jej mikrocin C51, opět podle plazmidu nesoucím geny, plazmidu pC51 (dnes pMccC51). Následující srovnání genů obou izolovaných mikrocinů ukázalo, že jejich sekvenční podobnost je 100 % u *mccA* genů a 98 % u genů *mccB*, *mccC*, *mccD* a *mccE*. Proto bylo dále navrženo používat společného názvu C7/C51 [31].

Mikrocin J25 je archetyp laso peptidů, které tvoří rostoucí řada bioaktivních peptidů, které syntetizují bakterie ze skupin *Proteobacteria* a *Actinobacteria* [8]. Mikrocin J25 je antimikrobiální peptid složený z 21 aminokyselin. Tento mikrocin vykazuje silnou antibakteriální aktivitu vůči různým sérotypům rodu *Salmonella* a některým kmenům *E. coli* [32]. Peptid vykazuje cyklickou strukturu vyplývající ze vzájemného spojení obou konců prekurzoru („head-tail“). Cílem tohoto peptidu je β' podjednotka RNA polymerázy, jejíž činnost inhibuje. Čtyři geny mikrocinu J25 (*mcjABCD*) jsou uloženy na plazmidu pTUC100 o velikosti 60 kb. Produkt genu, tedy promikrocin, je posttranslačně upravován geny *mcjB* a *mcjC*, produkt genu *mcjD* plní opět imunitní a zároveň exportní funkci [31]. Vzhledem ke své struktuře je MccJ25 vysoce odolný proti proteáze, s výjimkou termolysin [19].

2.3.2 Mikrocin II. třídy

Do této skupiny patří mikrocin V, L, E492 a H47 [26]. II. třída zahrnuje mikrocin s vyšší molekulovou hmotností (5 – 10 kDa) [29] a je dále rozdělena na dvě podtřídy podle jejich struktury a genového uspořádání [33]. Jejich aminokyselinová kostra nepodléhá rozsáhlým úpravám. Jsou však u nich přítomny úpravy v podobě disulfidických můstků eventuelně navázání molekuly sideroforu, jež je rozpoznáván receptorem citlivé buňky [31].

Mikrocin II. třídy jsou identifikovány jako prekurzory obsahující N-terminální vedoucí sekvenci, která je odstraněna po externalizaci zralého mikrocinu [34].

U genů mikrocinů druhé třídy mají vždy nejméně dva geny exportní funkci. Tyto skupiny exportních genů, které jsou homologní v celé druhé třídě mikrocinů vyžadují funkční chromozomálně uložený gen *tolC* [31].

Mikrocin V byl popsán v roce 1925 jako první kolicin – tehdy kolicin V. V novějších studiích je již kolicin V řazen k mikrocinům, vzhledem k malé velikosti své molekuly a především proto, že na rozdíl od kolicinů není jeho produkce inducibilní na základě SOS reakce a není z buňky vylučován na základě lyze [26].

Mikrocin H47 je baktericidní antibiotikum produkované *E. coli* [35], patřící do skupiny mikrocinů s vyšší molekulovou hmotností, které mají 60 – 90 aminokyselinových zbytků. Je řazen mezi modifikované peptidy (katechol mikrocinů), vstupující do buněk přes některý ze tří katechol receptorů (Cir, Fiu, FepA). Současně je tento mikrocin podle jiné studie řazen i k nemodifikovaným peptidům [26]. Genetická informace je složena nejméně ze sedmi genů. Čtyři z nich jsou věnovány biosyntéze mikrocinu, dva geny jsou nezbytné pro sekreci do extracelulárního média. Produkt sedmého genu (*mchL*) dává buňce vlastní “imunitu” [35].

Tab. 2. Efekt mikrocinu E492 na různé typy lidských buněk [36].

Typ buňky	% přeživších buněk
Jurkat	4 ± 3
HeLa	56 ± 6
RJ2.2.5	57 ± 11
Ramos	79 ± 19
KG-1	91 ± 1
AMG-3	99 ± 1

Pozn. **Jurkat** – nesmrtelná buněčná linie lidských T-lymfocytů, které jsou používány ke studiu akutní leukémie T-buněk; **HeLa** – nesmrtelná buněčná linie lidských epitelálních nádorových buněk; **RJ2.2.5** – mutant odvozený z lidské B-lymfotické buňky; **Ramos** – buněčná linie B-lymfoblastoidních buněk odvozených z Burkittova lymfomu; **KG-1** – lidská myeloidní buněčná linie, **AMG-3** – bispecifická T-buňka).

Mikrocin E492 byl původně popsán jako 84 zbytkový nemodifikovaný peptid (MccE492), vyplývající z prekurzoru (MceA) [33]. Baktericidní účinky spočívají zejména v tvorbě iontových kanálků v buněčné membráně. Tento mikrocin má také cytotoxický účinek na lidské nádorové buňky (Tab. 2) [27], má schopnost vyvolávat apoptózu v lidských buněčných

liniích [36], což je požadovaný mechanismus při léčbě rakoviny a alternativně mohou být živé bakterie použity pro produkci mikrocinu u některých nádorů [26]. Vyskytuje se ve dvou formách, jako posttranslačně modifikovaný a jako nemodifikovaný peptid [26]. Mikrocin E492 má stanovenou molekulovou hmotnost 7,887 Da [36]. Srovnání aminokyselinových sekvencí ukazuje v určité části shodu s mikrocinem V. Mikrocin E492 je termorezistentní a odolný vůči kyselinám. Je aktivní vůči kmenům bakterií *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* a *Erwinia* [26].

Mikrocin L je nemodifikovaný peptid s molekulovou hmotností 8,884 Da. Jeho C-terminální část vykazuje vysokou homologii s mikrocinem V. Může být charakterizován jako termostabilní protein, odolává záhřevu až 100 °C po dobu 10 minut [26]. Tento mikrocin je produkt kmene *E. coli* LR05, který vykazuje silnou antibakteriální aktivitu proti příbuzným bakteriím čeledi *Enterobacteriaceae*, včetně *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovary Typhimurium a Enteritidis [34]. Klastř mikrocinu L se skládá ze čtyř genů: jeden strukturní gen: *mclC*, jeden imunitní gen: *mclI*, dvou exportních genů: *mclA* a *mclB*, se silnou příbuzností k ABC transportním proteinům a příslušným faktorům podílejících se na sekreci MccE492, H47 a V. Strukturní gen mikrocinu L je kódován 105 prekurzorovými aminokyselinami s 15 aminokyselinami N-terminálního konce, které jsou zakončeny Gly-Ala motivem v protisměru od štěpného místa. Mikrocin L je peptid složený z 90 aminokyselin. Jedná se o aniontový a hydrofóbní peptid s více než 45 % nepolárních aminokyselin a bez posttranslačních modifikací. Obsahuje vysoký obsah glycinu (15,6 %) [37].

2.3.2.1 Mikrocin podtřídy IIa

V podtřídě IIa jsou mikrocin, které mohou obsahovat disulfidické můstky [29], ale jinak zůstávají bez posttranslační modifikace [33]. Organizace jejich genových skupin se skládá pouze ze čtyř genů uložených na plazmidech [31]. MccV, známý jako kolicin V, byl označen jako první antibiotikum produkované *E. coli*. MccV je vylučován různými kmeny *E. coli*. Zralý MccV je složen z 88 aminokyselin, pocházejících ze 103 aminových prekurzorů (CvaC). Má jednu disulfidovou vazbu, která se nachází na C-terminální sekvenci [33].

MccL je produkován *E. coli* LR05, izolované ze střev drůbeže, zatímco Mcc24 je vylučován uropatogenní *E. coli* 2424. MccL, který je tvořen ze 105 aminových prekurzorů, se skládá z 90 nemodifikovaných aminokyselin. MccL je aniontový a vysoce hydrofóbní pep-

tid charakterizovaný dvěma disulfidovými vazbami. MccL a MccV sdílejí 13 stejných aminokyselin C-termální sekvence, která obsahuje jednu disulfidovou vazbu [33].

2.3.2.2 *Mikrociny podtřídy IIb*

Lineární mikrociny této podtřídy mohou projít úpravou C-konce svého řetězce [33]. Do podtřídy IIb patří mikrociny: MccE492, MccH47 a MccM. Na rozdíl od předešlé skupiny mikrocínů, jejichž geny jsou nesené na plasmidech, jsou geny mikrocínů podtřídy IIb uloženy chromozomálně a vykazují komplexní transkripční organizaci. Dále postrádají disulfidické můstky a všechny mají oblast C-konce bohatou na aminokyselinu serin. Může být přítomna posttranslační úprava jejich polypeptidu formou navázání molekuly sideroforu [31]. Tyto mikrociny se vyznačují vysoce konzervativními 10 aminokyselinami na C-termální sekvenci, která je považována za jejich podpis [33].

Nejlépe charakterizovaným mikrocinem skupiny IIb je MccE492, který vylučuje *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Celý mikrocín je obsažen v 13 kb fragmentu DNA, který byl klonován v *E. coli*. Deset genů organizovaných v minimálně pěti transkripčních jednotkách jsou nezbytné pro biosyntézu tohoto mikrocínu [33].

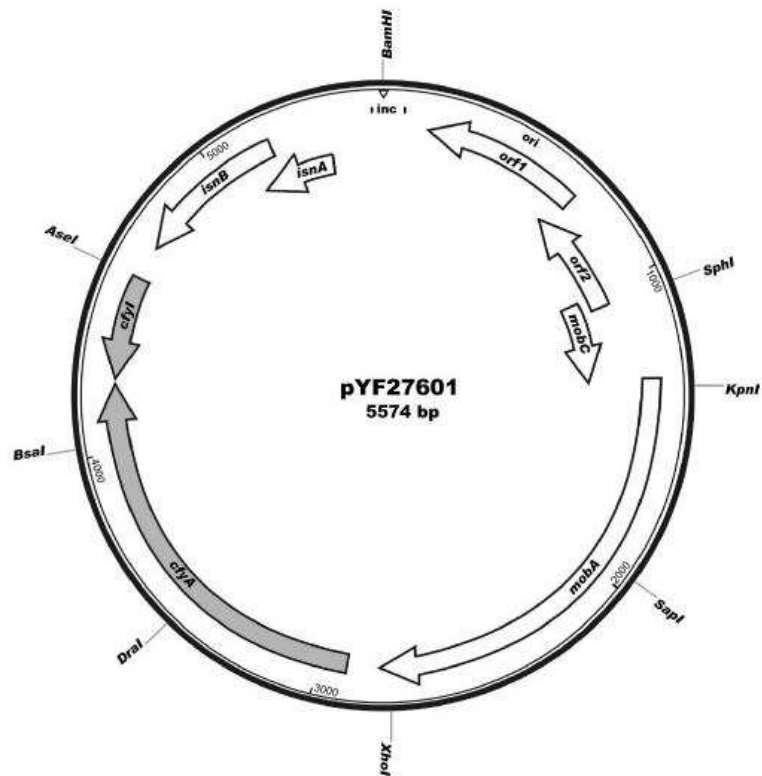
2.4 Bakteriociny produkované jinými gramnegativními bakteriemi než *Escherichia coli*

Nejlépe prostudovanými bakteriociny produkovanými gramnegativními bakteriemi jsou bakteriociny bakterií *E. coli*, jež nyní slouží jako modelový systém pro zkoumání mechanismů struktury/funkce bakteriocínů, genetické organizace, ekologie a evoluce [15]. Obecně lze říci, že produkce bakteriocínů je stimulována nepříznivými podmínkami pro růst bakterií [38]. Avšak výzkumy *Salmonella enterica*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter cloacae* prokázaly incidenci bakteriocinogenie v rozmezí 3-26 %. Jednalo se o izoláty z prostředí [39]. Incidence bakteriocinogenie u humánních izolátů *E. coli* je 30 až 50 % a produkované bakteriociny mohou být označeny za faktory virulence [40]. Mnohem vyšší incidence produkce bakteriocínů byly zjištěny u některých gramnegativních bakterií, jako je např. *Pseudomonas aeruginosa*, u kterých produkuje bakteriociny více než 90 % kmenů izolovaných z prostředí a klinických izolátů [41].

Byly popsány 3 typy pyocinů: F-typ, R-typ a S-typ. F a R typy jsou produkovány u více jak 90 % kmenů a S-typ u více jak 70 % zkoumaných kmenů *P. aeruginosa* [39]. Díky tak vysoké frekvenci těchto tří pyocinů, rod *Pseudomonas* často produkuje více než jeden pyocin. F- a R- typy jsou fágy podobné bakteriocinům, odolné proti nukleázám a proteázám, pyociny S-typu jsou na proteázy citlivé bakteriociny podobné kolicinům [39]. Pyociny jsou chromozomálně kódované a jejich produkce je indukovatelná mutagenními činidly jako je mitomycin C [42].

Bakteriociny produkované *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* a *Shigella boydii* již byly popsány [43], avšak detailní charakteristika chybí [44]. Bakteriociny rodu *Shigella* hrají důležitou roli při úspěšné kolonizaci sliznice tlustého střeva tímto patogenem a potlačení původní střevní mikroflóry [45]. Byly provedeny studie s cílem vyhledat bakteriociny produkované *Shigella sonnei* a zhodnotit vliv kultivačních podmínek na bakteriociny. Devět kmenů vykazovalo zkříženou imunitu vůči *S. flexneri* a *E. coli* [7].

Tři ze 17 druhů rodu *Yersinia* (čeleď *Enterobacteriaceae*) jsou známé jako významné lidské patogeny (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*), zatímco jiné druhy představují nepatogenní kmeny nebo oportunní patogeny [46]. Produkce bakteriocinů byla již popsána u dvou patogenních druhů *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) a u dvou nepatogenních druhů (*Y. intermedia*, *Y. kristensenii*) [47]. Avšak pouze pesticin I byl charakterizován na molekulární úrovni jako aktivní proti kmenům *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* a *E. coli* C6 [48]. Bosák a kol. [49] popsal nový typ colicinu (F_Y), včetně kompletní sekvence plazmidu pYF27601, který byl izolovaný z kmene *Yersinia frederiksenii*, (Obr. 3).



Obr. 3. Mapa plazmidu pYF27601 (5,574 bp). Jsou zobrazeny lokalizace a polarita předpokládaných genů, pozice několika restrikčních cílových míst, kódování *inc* a pozice předpokládaného počátku replikace (*ori*) [49].

Tab. 3. Inhibiční spektrum kolicinu F_Y na různé druhy rodu *Yersinia*.

	kolicin F_Y -citlivé/testováno (%)
<i>Y. frederiksenii</i>	3/13 (23,08)
<i>Y. intermedia</i>	2/9 (22,22)
<i>Y. kristensenii</i>	5/15 (33,33)
<i>Y. aldovae</i>	4/6 (66,67)
<i>Y. enterocolitica</i>	30/31 (96,77)
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	0/15 (0,00)
<i>Y. rohdei</i>	0/4 (0,00)
<i>Y. ruckeri</i>	0/6 (0,00)

Colicin F_Y, produkovaný kmenem *Y. frederiksenii* Y27601, inhiboval růst kmenů pěti z osmi druhů rodu *Yersinia* (Tab. 3), které byly na citlivost testovány. *Y. frederiksenii* (3 citlivé kmeny z 13 testovaných), *Y. intermedia* (2 citlivé kmeny z 9 testovaných), *Y. kristensenii* (5 citlivých kmenů z 15 testovaných), *Y. aldovae* (4 citlivé kmeny z 6 testovaných), a *Y. enterocolitica* (30 citlivých kmenů z 31 testovaných). Nebyla nalezena citlivost u čtyř testovaných bakteriálních kmenů *Y. rohdei*, šesti kmenů *Y. ruckeri*, a 15 kmenů *Y. pseudotuberculosis* [49].

3 MECHANIZMUS ÚČINKU MIKROCINŮ

Většina bakteriocinů narušuje plazmatickou membránu citlivé bakterie. Mikrocinů jsou tedy bakteriociny působící na gramnegativní bakterie [19]. Způsob interakce mikrocinů s citlivými buňkami je zcela shodný u mikrocinů i kolicinů, pro něž byl popsán následující postup a který můžeme použít i pro popis interakce mikrocinů. Mikrocin reaguje se specifickým receptorem na povrchu vnější membrány, přemístí se přes buněčnou stěnu a plazmatickou membránu (opět za účasti membránově vázaných přenašečů) a v buňce vyhledá a reaguje s cílovou strukturou [7].

3.1 Ton systém

Ton-systém je důležitý transportní systém gramnegativních bakterií, kterým je do buňky aktivně transportováno mnoho různých látek, jako např. vitamín B₁₂ nebo molekuly sideroforů, včetně některých mikrocinů, kolicinů i bakteriofágů [31].

Ton-systém se skládá ze tří vnitřních membránových proteinů: TonB, ExbB a ExbD [15]. TonB je periplazmatický protein zajišťující přenos látek mezi plazmatickou membránou a vnější membránou, ExbB a ExbD jsou proteiny plazmatické membrány zajišťující stabilizaci a upravující konformaci TonB proteinu. Tyto proteiny jsou sice důležité, nicméně nejsou nepostradatelné. V případě poškození či mutace jejich genů je mohou zčásti nahradit produkty genů *tolC* a *tolQ*, tedy Tol-systému. Mezi Ton-dependentní mikrocinů patří MccJ25, MccV, MccE492, MccH74, Mcc24 a MccM. Všechny tyto mikrocinů jsou do popředí secerovány sekrečním systémem typu I, který se skládá ze tří komponent: ABC transportéru v plazmatické membráně, konektorového periplazmatického proteinu, který je ukotven do vnitřní membrány, a TolC proteinu zajišťujícího přenos mikrocinu z periplazmatického prostoru do vnějšího prostředí přes vnější membránu. Koliciny obsahují na N-konci oblast zvanou „TonB box“, která je rozeznávána TonB proteinem. Pokud je tato oblast zasažena bodovou mutací, TonB protein není schopen transportovat kolicin do buňky. Mikrocinů však takto rozeznávanou oblast nemají [31].

3.2 Mechanismus účinku mikrocinů I. třídy

Na druhé straně mikrocinů I. třídy jsou posttranslačně modifikované peptidy, které působí na intracelulární úrovni interakcí se specifickými cíli. Mikrocin J25 působí ve vnitřní

membráně indukcí produkce peroxidových radikálů a vazby na RNA polymerázu a inhibuje růst transkripce po překročení vnitřní membrány. Mikrocin C blokuje translaci inhibicí aspartyl-tRNA syntetázy. Tento mikrocin je heptapeptid nukleotid. Jakmile je intracelulární proteázou uvnitř cílové buňky štěpen, uvolní se aspartyl-adenylát, který blokuje funkci aspartyl-tRNA syntetázy. Mikrocin B17 inhibuje replikaci DNA tím, že blokuje DNA gyrázu [19].

Mikrocin B17 inhibuje replikace DNA a indikuje v buňkách SOS odpověď, konkrétně poškozením DNA gyrázy. K tomuto objevu vedlo poznání, že: (i) rychlost replikace DNA se po přijetí mikrocinu napadenou buňkou dramaticky sníží, zatímco masivní degradace DNA se objevuje až po více jak třiceti minutách, (ii) RecBC-závislou SOS odpověď indukují látky poškozující elongaci bakteriálního chromozomu a nikoliv látky poškozující přímo strukturu DNA, a že (iii) mikrocin B17 nevyvolává SOS odpověď v buňkách, kde není přítomna replikační vidlice. Jako konkrétní důvod inhibice replikace 22 DNA se následně ukázalo být zablokování činnosti podjednotky B DNA gyrázy, kdy mikrocin spojuje tyrosinové zbytky této podjednotky s DNA řetězcem do komplexu za následných zlomů DNA. DNA gyráza patří mezi DNA topoizomerázy II, skládá se ze dvou podjednotek tvořících tetrametr A_2B_2 , a její funkce spočívá v konformačních úpravách DNA dvoušroubovice. Pokusy zaměřené na import mikrocinu do buňky ukázaly, že mutanty se sníženou citlivostí k mikrocinu B17 (ale také ke kolicinům a bakteriofágům) nesou mutace v genech: *ompF* a *ompR*, tedy v genech kódujících protein *ompF*, tvořící porin vnější membrány, z čehož lze usuzovat o jeho významu během transportu přes vnější membránu. Přenašečem plazmatické membrány se ukázal být receptor *SbmA*, který také zprostředkovává transport bleomycinu – antibiotika obsahujícího ve své struktuře thiazolové heterocykly. To naznačuje, že thiazolový kruh by mohl být strukturním znakem rozpoznávaným *SbmA* receptorem [31].

Mikrocin C7/C51 - cesta heptapeptidu-mikrocinu C do buňky zůstává zatím stále neznámá. Pokusy s mutovanými geny pro „klasické transportní systémy“, jako je například Tol systém, k navození rezistence nevedly. Mikrocin C7/C51 zabraňuje translaci inhibicí syntézy aminoacylové tRNA^{asp}, k čemuž využívá tzv. „strategie trojského koně“. Mikrocin je rozeznán a přijat do buňky jako neznámá látka a následně proteolyticky štěpen za vzniku látky strukturně analogické aspartyl-adenylátu, který je meziproduktem reakce katalyzované aspartyl-tRNA syntetázou. To vede k potlačení syntézy aminoacylové tRNA^{asp} a v konečném výsledku k inhibici translace [31].

Transport **mikrocinu J25** do buňky zprostředkovává receptor FhuA – multifunkční receptor vnější membrány, který (kromě transportu tohoto mikrocinu) zajišťuje i transport antibiotika albomycinu, kolicinu M a bakteriofágů T5, T1 a $\Phi 80$ i Fe^{3+} kationů. Za přenos mikrocinu přes vnitřní membránu je zodpovědný Ton-systém a protein SbmA, který známe z transportní cesty mikrocinu B17 [31].

3.3 Mechanismus účinku mikrocinů II. třídy

Mechanismus účinků mikrocinů je více komplexní. Mikrocin jsou bakteriociny působící na gram-negativní bakterie. Vzhledem ke skutečnosti, že jejich vnější membrána je nepřekonatelnou překážkou pro peptidy a proteiny, je třeba mikrocin II třídy dopravit do periplazmatického prostoru pomocí proteinu vnější membrány. Transportní protein vnější membrány je první receptor, který musí být mikrocinem rozpoznán. Poté co je v periplazmě, musí být ukotven na vnitřní membráně receptoru s cílem proniknout do buněčné membrány. Proto je také vyžadována přítomnost specifických proteinů ve vnitřní membráně, které by mohly působit podobně jako membránový receptor nutný pro bakteriociny. SdaC je proteinový receptor pro kolicin V, známý také jako mikrocin V. Pro mikrocin E492 je receptor manózy permeáza a pro mikrocin H47 je to F_0 proton ze syntetázového komplexu ATP [19].

Mikrocin E492, produkovaný bakterií *Klebsiella pneumoniae*, využívá rovněž jako mikrocin B17 strategii „trojského koně“. Membránovými receptory jsou katecholátové receptory FepA, Cir a Fiu, proteiny, které do buňky za normálních okolností transportují siderofory (nízkomolekulární sloučeniny, které obsahují chelátově vázané železo), přičemž mikrocin E492 vykazuje nejvyšší afinitu k receptoru FepA, receptory Cir a Fiu jsou využívány v menší míře. Tyto proteiny slouží jako receptory i pro ostatní mikrocin II. třídy, u kterých známe jejich mechanismus transportu do buněk. Ton-systém zajišťuje přenos mikrocinů z periplazmy do cytoplazmy a je opět využíván i ostatními mikrocin II. třídy [31]. Mikrocin E492 byl izolován v neupravené i v upravené formě. Úprava mikrocinu spočívá v připojení trimetru N-(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-serinu glykosidickou vazbou přes β -D-glukózový zbytek na serin C-konce mikrocinu. Takto upravený C-konec potom doslova „přelstí“ katecholátové receptory, protože úprava v podobě připojení 2,3-dihydroxybenzoylserinu je strukturálním znakem sideroforu enterochelinu, který tyto receptory běžně rozeznávají a transportují. N-konec je naopak nositelem specifity účinku. Jako

esenciální struktury vnitřní membrány se ukázaly být ManY a ManZ složky manóзовé permeázy, která spojuje transport tohoto sacharidu s jeho fosforylací. Samotný letální účinek mikrocinu spočívá v jeho inzerci do vnitřní membrány, v jejímž důsledku dochází k nekontrolovatelnému toku protonů přes membránu a následnému poklesu membránového potenciálu [31].

Ostatní mikrocin V. třídy sdílí s mikrocinem E492 mnoho znaků. Mikrocin V, H47 a M s ním sdílí stejný transportní systém (jak skupinu receptorů, tak translokaci pomocí Ton-systému), a tedy pravděpodobně i úpravu v podobě navázání sideroforů na C-konce svých aminokyselinových řetězců. Aminokyselinová sekvence mikrocinu vykazuje 50% shodu s mikrocinem E492, u mikrocinu M byla identifikována 43% shoda v C-terminální sekvenci s mikrocinem V a 65 – 70% homologie s mikrocinem H47 a E492 [31].

Cílem mikrocinu V je patrně také plazmatická membrána, jak bylo pozorováno na neschopnosti aktivního transportu a poklesu membránového potenciálu u poškozených buněk [31].

Mechanismus účinku třídy IIa je prostudován méně než mechanismus třídy IIb. MccV (ColV) je účinný proti gram-negativním bakteriím, které patří do rodu *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* a *Shigella*. Aktivita tohoto mikrocinu závisí na vnitřním membránovém proteinu [33].

Spektrum aktivity mikrocinu L zahrnuje velké množství gramnegativních druhů, včetně *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Providencia stuartii*. Mechanismus účinku tohoto mikrocinu nebyl zcela popsán. Vzhledem ke skutečnosti, že 32 zbytků C-terminální sekvence je velmi podobné jako u MccV (identita 87,5 %), mohl by tento mikrocin mít také závislost na membránové propustnosti [33].

Mcc24 je aktivní proti *E. coli* a *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, ale ne proti *Listeria monocytogenes* či *Campylobacter jejuni* [33].

4 PRAKTICKÉ APLIKACE BAKTERIOCINŮ

V uplynulých letech si některé bakteriociny, obecně považované za bezpečné, získaly zvláštní pozornost, vzhledem k jejich potenciální aplikaci v konzervaci potravin. Dr. Yang se ve své studii zabýval možným využitím kolicinu 5 jako náhrady běžných antibiotik a došel k závěru, že kolicin 5 je díky úzkému spektru působnosti vysoce efektivní pro léčbu infekcí u lidí i zvířat způsobených patogenními kmeny *E. coli* [26].

Rostoucí zájem o přírodní produkty naproti uměle vyrobeným chemikáliím by mohl vést k dalším možnostem aplikace bakteriocinů v oblastech jako je kontrola chorob rostlin bakteriálního původu, ale také například při kontrole zubního kazu nebo při léčbě cystické fibrózy [26]. V další studii je uvedena možnost aplikace bakteriocinů v probiotických přípravcích používaných k zabránění vzniku mikrobiálních střevních patogenů nebo jako prevence patogenů mimo střevní trakt, například ústní dutina nebo dýchací cesty [26].

Sable a kol. hodnotí ve své práci inhibiční aktivitu mikrocinu J25 proti *E. coli* způsobující závažná onemocnění, zejména sérotyp O157:H7, který byl příčinou několika velkých epidemií v Evropě, Severní Americe a Japonsku, většinou po požití masa nebo mléčných výrobků. Inhibiční aktivita J25 proti *E. coli* O157:H7 byla testována ve třech produktech (sterilní odstředěné mléko, vaječný žloutek, masový extrakt). Výsledky prokázaly vysokou inhibiční aktivitu mikrocinu J25 vůči tomuto patogenu [26].

V dalších studiích je uveden toxický účinek mikrocinu E492 na zhoubné buňky a jeho možné využití při léčbě rakoviny [26].

4.1 Potravinářství

Patton a kol. studoval účinnost kolicinu E1 proti *Listeria monocytogenes* v bujónu a na povrchu potravin určených k přímé spotřebě. Výsledky naznačují, že kolicin E1 má výrazný inhibiční účinek vůči patogenní bakterii *Listeria monocytogenes*. Tato studie prokázala potenciál využití kolicinů při zvyšování bezpečnosti potravin [27].

Bakteriociny, zejména produkované grampozitivními bakteriemi, mají velký potenciál jako přírodní konzervanty v potravinářském průmyslu. Aplikace bakteriocinů v procesu konzervování přináší mnoho výhod, jako příklad lze uvést lepší zachování vitamínů a výživných látek v potravinách, prodloužení trvanlivosti potravin, snižování přísad chemických látek atd. Kromě dnes již dostupných komerčních preparátů nisinu a pediocinu

PA-1/AcH, lze chemické konzervanty v mléčných produktech nahrazovat např. enterocinem 1146, který má antilisteriální vlastnosti, ale nepůsobí negativně na startovací kultury [27].

4.2 Medicína a farmakologie

Od objevu penicilinu v roce 1928 bylo vyvinuto přes 100 antibiotik účinných proti širokému spektru lidských patogenů. Na druhou stranu je v současnosti stále největším

Tab. 4. Bakteriociny jako antibiotika [4].

Bakteriocin	Producent	Potenciální využití
Lantibiotika		
Ancovenin	<i>Streptomyces</i> spp.	Léčba vysokého krevního tlaku
Cinnamycin	<i>Streptoverticillium</i> , <i>Streptomyces</i> spp.	Léčba zánětů a alergií
Duramycin	<i>Streptoverticillium</i> , <i>Streptomyces</i> spp.	Léčba zánětů a alergií
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Léčba kožních infekcí
Gallidermin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Léčba kožních infekcí
Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i>	Léčba mastitidy
Lanthiopeptin	<i>Streptoverticillium cinnamomeum</i>	Léčba viru Herpes simplex
Mersacidin	<i>Bacillus subtilis</i>	Léčba rezistentních kmenů vankomycinu
Mutacin	<i>Streptococcus mutans</i>	Dentální léčba
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>	Léčba peptidických vředů, antimikrobiální inhibice multirezistentních patogenů
Koliciny		
Ia	<i>Escherichia coli</i>	Složka druhově specifických antibiotik
E1, E4, E7, E8, K a S4	<i>Escherichia coli</i>	Léčba hemoragické kolitidy
Mikrociny		
24	<i>Escherichia coli</i>	Léčba salmonelózy u kuřat
B17	<i>Escherichia coli</i>	Antibakteriální prostředek u skotu
E294	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ovládnutí proliferace buněk
J25	<i>Escherichia coli</i>	Léčba salmonelózy u kuřat
L	<i>Escherichia coli</i>	Léčba salmonelózy
Pyociny		
S-35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Léčba plicní infekce

problémem vznik a nárůst rezistence vůči antibiotikům. Výzkum nových alternativ je zaměřen také na bakteriociny, které jsou velkým příslibem další generace antimikrobiálních látek. Většina bakteriocinů se liší od tradičních antibiotik jedním zásadním způsobem: mají relativně úzké spectrum působení, a jsou tedy toxické pouze pro bakterie. Bakteriociny však zřejmě nemůžou plně nahradit antibiotika. Nicméně mají léčebný potenciál při mikrobiologickém onemocnění zažívacího traktu, hnisavých infekcí kůže a spojivky (Tab. 4) [27].

Další možností je využití bakteriocinogenních bakterií jako probiotik. Probiotické bakterie pomáhají hostitelskému organismu udržovat a obnovovat jeho přirozenou mikroflóru. Schopnost těchto bakterií eliminovat nežádoucí druhy je často způsobena právě produkcí bakteriocinů. Mnoho studií se zabývá využitím produkčních bakterií v probiotických terapiích pro lidský organismus (gastrointestinální trakt, ústní dutina, dýchací trakt, vagína), dobytek a vodní kultury. Ve studii Trautnera a kol. bylo *in vitro* prokázáno, že kolicin E2 produkovaný kmenem *E. coli* K-12 inhibuje růst uropatogenních kmenů *E. coli* a tím předchází vzniku infekcí močového traktu při používání katetrů [27].

E. coli kmen H22 se ukazuje být velmi slibným kandidátem pro probiotické použití jak pro hospodářská zvířata, tak i pro člověka. Při prevenci a léčbě střevních infekcí vykazuje široké spektrum inhibiční aktivity proti patogenním enterobakteriím, neovlivňuje striktně anaerobní mikroorganismy zažívacího traktu a disponuje selektivní výhodou oproti ostatním kmenům *E. coli* produkcí několika dalších antimikrobiálních sloučenin [50].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cíle této diplomové práce zahrnují:

- provedení experimentů pro studium inhibičního vlivu bakteriocinů na vybrané bakterie izolované z potravin a sbírkové kmeny *Salmonella* sp.;
- testování výskytu bakteriocinogenie u gramnegativních bakteriálních izolátů z potravin jiných než *Escherichia coli*.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Použité přístroje a pomůcky

- Biologický termostat BT 120 (Laboratorní přístroje, Praha)
- Vortex Reax top (Heildolph, Německo)
- Laboratorní třepačka LT2 (Kavalierglass, ČR)
- Denzitometr DENZI-LA-METER (Erba - Lachema, ČR)
- Laboratorní centrifuga JOUAN MR23i (Jouan, USA)
- Biohazard box EUROFLOX (Clean Air, Holandsko)
- Automatické mikropipety (Nichiryo, Japonsko)
- Běžné laboratorní sklo

6.2 Kultivační média

Složení použitých kultivačních médií – masopeptonový bujón, masopeptonový agar č. 1 a č. 2 a soft agar je uvedeno v následujících tabulkách (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

Tab. 5. Složení masopeptonového bujonu.

NaCl	3 g
Masový extrakt	3 g
Pepton	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 6. Složení masopeptonového agaru č. 1.

NaCl	3 g
Masový extrakt	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 7. Složení masopeptonového agaru č. 2.

NaCl	5 g
Masový extrakt	10 g
Pepton	10 g
Agar	15 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 8. Složení soft agaru.

NaCl	5 g
Masový extrakt	3 g
Pepton	5 g
Agar	10,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

6.3 Použité bakteriální kmeny

V práci byly použity sbírkové bakteriální kmeny kontrolní (Tab. 9), kmeny indikátorové (Tab. 10) a ostatní sbírkové kmeny (Tab. 11), které byly získány z Biologického ústavu LF MU v Brně nebo z České sbírky mikroorganismů.

Všechny kmeny byly vyočkovány ze zamražených zkumavek na masopeptonový agar č. 2 křížovým roztěrem a pro další práci byly přeočkovávány a uchovávány na masopeptonovém agaru č. 1.

Tab. 9. Seznam použitých sbírkových kmenů – kmeny kontrolní.

kontrolní kmeny	označení	produkce bakteriocinů	zdroj
<i>Escherichia coli</i>	73W	E7	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	76W	Ia	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	77W	Ib	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	82W	mB17	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	83W	mC7	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	84W	mH47	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	85W B475	E1, mJ25	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	86W	mV	Biologický ústav LF MU, Brno

Tab. 10. Seznam použitých sbírkových kmenů – kmeny indikátorové.

indikátorové kmeny	označení	zdroj
<i>Escherichia coli</i>	K12 Row	Biologický ústav LF MU, Brno; [54]
<i>Escherichia coli</i>	B1	Biologický ústav LF MU, Brno; [54]
<i>Escherichia coli</i>	φ	Biologický ústav LF MU, Brno; [54]
<i>Escherichia coli</i>	P400	Biologický ústav LF MU, Brno; [54]
<i>Escherichia coli</i>	Sabina40	Biologický ústav LF MU, Brno; [54]
<i>Shigella sonnei</i>	17	Biologický ústav LF MU, Brno; [54]

Tab. 11. Seznam ostatních sbírkových kmenů.

ostatní sbírkové kmeny	označení	zdroj
<i>Shigella boydii</i>	23W U8	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Shigella flexneri</i>	25W	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis	CCM 4420	Česká sbírka mikroorganismů
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium	CCM 7205	Česká sbírka mikroorganismů
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium	10W	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Salmonella</i> sp.	20W 311/96	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Salmonella</i> sp.	21W 569/99	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Salmonella</i> sp.	22W 79/05	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Enterobacter aerogenes</i>	31W 1832	Biologický ústav LF MU, Brno

Dále byly v této diplomové práci zkoumány bakteriální kmeny, které byly izolovány z potravin v průběhu let 2006-2013 (Tab. 12, Tab. 13, Tab. 14, Tab. 15). Tyto kmeny byly identifikovány a uloženy v glycerolu na -80 °C na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně.

Tab. 12. Seznam a charakteristika izolátů ostatních gramnegativních bakterií z potravin - ze syrového masa na výrobu fermentovaných klobás.

	označení	původ
<i>Ewingella</i> sp.	324	syrové maso na výrobu ferm. klobás
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	323	syrové maso na výrobu ferm. klobás

Tab. 13. Seznam a charakteristika izolátů *Escherichia coli* z potravin.

	označení	původ	produkce bakteriocinů
<i>Escherichia coli</i>	93W	kůže chlazené drůbeže	E8
<i>Escherichia coli</i>	94W	kůže chlazené drůbeže	E7, mC7
<i>Escherichia coli</i>	96W	kůže chlazené drůbeže	Ia
<i>Escherichia coli</i>	97W	kůže chlazené drůbeže	mC7
<i>Escherichia coli</i>	98W	kůže chlazené drůbeže	E7,E8
<i>Escherichia coli</i>	101W	kůže chlazené drůbeže	E5,mC7
<i>Escherichia coli</i>	103W	kůže chlazené drůbeže	mV
<i>Escherichia coli</i>	105W	kůže chlazené drůbeže	Ia
<i>Escherichia coli</i>	107W	kůže chlazené drůbeže	E5, E9, B, M, Y
<i>Escherichia coli</i>	119W	kůže chlazené drůbeže	neprodukuje
<i>Escherichia coli</i>	122W	kůže chlazené drůbeže	neprodukuje
<i>Escherichia coli</i>	123W	kůže chlazené drůbeže	neprodukuje
<i>Escherichia coli</i>	125W	kůže chlazené drůbeže	neprodukuje
<i>Escherichia coli</i>	17	kůže chlazené drůbeže	Ia, mL
<i>Escherichia coli</i>	59	kůže chlazené drůbeže	mV
<i>Escherichia coli</i>	93	kůže chlazené drůbeže	E1, E2, E6, E7, E8, mV, mM
<i>Escherichia coli</i>	94	kůže chlazené drůbeže	Ia
<i>Escherichia coli</i>	222	bažantí maso	B, M, Ia/Ib, mB17, mV
<i>Escherichia coli</i>	224	bažantí maso	B, M, Ia/Ib, mB17, mV
<i>Escherichia coli</i>	225	bažantí maso	E1, B, M, Ia/Ib, mB17
<i>Escherichia coli</i>	229	bažantí maso	B, M, Ia/Ib, mB17
<i>Escherichia coli</i>	230	bažantí maso	B, M, mB17
<i>Escherichia coli</i>	232 R2	kůže chlazené drůbeže	neprodukuje
<i>Escherichia coli</i>	245 R17	kůže chlazené drůbeže	neprodukuje
<i>Escherichia coli</i>	248 R20	kůže chlazené drůbeže	neprodukuje

Tab. 14. Seznam a charakteristika izolátů ostatních gramnegativních bakterií z potravin - z kůže chlazené drůbeže.

	označení	původ
<i>Aeromonas hydrophila</i>	28	kůže chlazené drůbeže
<i>Aeromonas</i> sp.	32	kůže chlazené drůbeže
<i>Aeromonas caviae</i>	55	kůže chlazené drůbeže
<i>Citrobacter freundii</i>	217	kůže chlazené drůbeže
<i>Enterobacter</i> sp.	118W	kůže chlazené drůbeže
<i>Enterobacter</i> sp.	124W	kůže chlazené drůbeže
<i>Enterobacter</i> sp.	212	kůže chlazené drůbeže
<i>Enterobacter</i> sp.	213	kůže chlazené drůbeže
<i>Enterobacter</i> sp.	214	kůže chlazené drůbeže
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	kůže chlazené drůbeže
<i>Klebsiella</i> sp.	69	kůže chlazené drůbeže
<i>Klebsiella</i> sp.	98	kůže chlazené drůbeže
<i>Klebsiella oxytoca</i>	210	kůže chlazené drůbeže
<i>Klebsiella oxytoca</i>	215	kůže chlazené drůbeže
<i>Klebsiella</i> sp.	216	kůže chlazené drůbeže
<i>Klebsiella oxytoca</i>	218	kůže chlazené drůbeže
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	40	kůže chlazené drůbeže
<i>Moraxella</i>	78	kůže chlazené drůbeže
<i>Pantoea agglomerans</i>	21	kůže chlazené drůbeže
<i>Proteus</i> sp.	100	kůže chlazené drůbeže
<i>Pseudomonas fragi</i>	19	kůže chlazené drůbeže
<i>Pseudomonas fragi</i>	74	kůže chlazené drůbeže
<i>Pseudomonas putida</i>	23	kůže chlazené drůbeže
<i>Serratia marcescens</i>	3	kůže chlazené drůbeže
<i>Serratia liquefaciens</i>	24	kůže chlazené drůbeže
<i>Serratia liquefaciens</i>	48	kůže chlazené drůbeže
<i>Yersinia enterocolitica</i>	88	kůže chlazené drůbeže

Tab. 15. Seznam a charakteristika izolátů ostatních gramnegativních bakterií z potravin - z jedlého hmyzu.

	označení	původ
<i>Citrobacter freundii</i>	331	jedlý hmyz
<i>Citrobacter freundii</i>	349	jedlý hmyz
<i>Citrobacter freundii</i>	351	jedlý hmyz
<i>Citrobacter freundii</i>	354	jedlý hmyz
<i>Enterobacter cloaceae</i>	346	jedlý hmyz
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	347	jedlý hmyz
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	348	jedlý hmyz
<i>Enterobacter asburiae</i>	374	jedlý hmyz
<i>Hafnia alvei</i>	352	jedlý hmyz
<i>Hafnia alvei</i>	355	jedlý hmyz
<i>Hafnia alvei</i>	356	jedlý hmyz
<i>Hafnia alvei</i>	363	jedlý hmyz
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	332	jedlý hmyz
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i>	336	jedlý hmyz
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	342	jedlý hmyz
<i>Morganella morganii</i>	340	jedlý hmyz
<i>Providencia rettgeri</i>	344	jedlý hmyz
<i>Pseudomonas fulva</i>	345	jedlý hmyz
<i>Pseudomonas putida</i>	364	jedlý hmyz
<i>Pseudomonas fulva</i>	365	jedlý hmyz
<i>Pseudomonas fulva</i>	373	jedlý hmyz

6.4 Mikrobiologické metody

6.4.1 Stanovení biologické aktivity kolicinů kvalitativně - vpichový pokus

Bakterie produkčního kmene byly vpichem naočkovány do misky s masopeptonovým agarem č. 1 a kultivovány 48 hodin při teplotě 37 °C pro enterobakterie a při teplotě 30 °C pro bakterie rodu *Pseudomonas*. Po usmrcení parami chloroformu (po dobu 30 minut) byly misky přelity 3 ml 1,05% agaru s 0,1 ml přes noc narostlé kultury indikátorového kmene [54]. Po 24h kultivaci dle optimální teploty růstu indikátorového kmene (viz. výše) byla zjišťována přítomnost inhibičních zón okolo nárůstu produkčních kolonií a hodnocena velikost zón (-/+, +, ++, +++, +++++) .

V rámci experimentů pro naplnění prvního cíle praktické části této diplomové práce byly jako indikátorové kmeny pro detekci kolicinů a mikrocinů použity sbírkové kmeny *E. coli*

(Tab. 10). Dále byl testován inhibiční vliv produkčních kmenů (Tab. 9, 13) na sbírkové kmeny rodů *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* (Tab. 11) a zejména vůči gramnegativním izolátům z potravin (Tab. 12, 13, 14).

V rámci druhého cíle diplomové práce byl testován výskyt produkce inhibičních látek u gramnegativních bakterií jiných než *E. coli* izolovaných z potravin. V těchto experimentech byly jako produkční použity kmeny uvedené v Tabulkách 12, 14 a 15. Jako indikátorové kmeny byly použity typové indikátory (Tab. 10) a další vybrané kmeny (Tab. 11, 13, 14).

6.4.2 Příprava surového bakteriocinu

První izolace

Přes noc narostlý produkční kmen v bujónu byl rozředěn 1:50 sterilním bujónem a třepán 6 hodin při 37 °C. Pak byly buňky centrifugovány (2000 g/15 min) a 2x promyty sterilní vodou [16]. Takto připravený surový kolicin byl rozdělen na poloviny, jedna polovina objemu byla uchovávána na kapce chloroformu při 4 °C, druhá polovina byla přefiltrována přes bakteriologický filtr a taktéž uchovávána při 4 °C.

Pro zvýšení výtěžnosti této metody bylo v plánu dle literatury [34] zařadit mezikrok - teplotní ošetření. Pro vyvrácení nežádoucího vlivu teploty na účinek bakteriocinu byl zařazen test, kdy se surový kolicin uchovávaný na kapce chloroform podrobil jednotlivému ošetření 70 °C a 100 °C po dobu 10 minut.

Druhá izolace

Dva dny narostlé kultury (100 ml MPB bylo zaočkováno 1 ml čerstvě narostlé kultury kmenů *E. coli* 83W, 85W a 225; 25 ml MPB bylo zaočkováno 0,25 ml čerstvě narostlé kultury kmenů *E. coli* 97W a 107W) byly centrifugovány (4000 g/ 20 min), supernatanty byly odebrány a uloženy při 4 °C jako bezbuněčný extrakt (1 BE) pro další testování. Pelety buněk byly dále 2x promyty sterilní destilovanou vodou. Poté byla polovina buněk z každého vzorku doplněna 500 ul sterilní destilované vody. První polovina byla ošetřena 95 °C/20 min, poté centrifugována (5000 g/15 min) a supernatant byl označen a uložen při 4 °C jako var (2 VAR). Druhá polovina buněk byla rozbita ultrazvukem (30 s intervaly po dobu 3 min) a poté centrifugována (5000 g/ 15 min) a supernatant označen a uložen při 4 °C jako ultrazvuk (3 UZV). Vzorek označený 4 UZV je paralelní zkumavka

s přípravou vzorku č. 3, avšak s menší hustotou buněk. Všechny takto připravené vzorky bakteriocinů byly uchovávány na kapce chloroformu při 4 °C.

6.4.3 Stanovení biologické aktivity kolicinů kvantitativně – kapková metoda

Nejdříve byly připraveny MPA plotny, které byly přelity 3 ml soft agaru s 0,1 ml čerstvě narostené kultury indikátorového kmene. Na tuto horní vrstvu pak byly nanášeny 3 µl kapky neředěného a v případě titrace i ředěného bakteriocinu. Po inkubaci v 37 °C přes noc byl odečítán vznik inhibičních zón. Titr kolicinů je poté udáván v dohodnutých jednotkách AU (AU je převrácená hodnota nejvyššího ředění, které ještě vyvolává zřetelnou inhibici růstu indikátorového kmene).

7 VÝSLEDKY PRÁCE A DISKUZE

7.1 Inhibiční vliv bakteriocinů na gramnegativní bakterie z potravin a další sbírkové bakterie

V této práci byl sledován inhibiční vliv vpichovým pokusem (Obr. 4) vybraných bakteriocinů – kontrolních (Tab. 9) a zejména bakteriocinů produkovaných kmeny *E. coli* izolovanými z potravin (celkem 18 kmenů) na indikátorové kmeny sbírkových *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* a zejména na 27 gramnegativních bakteriálních izolátů z potravin. V rámci těchto izolátů bylo testováno 6 kmenů *E. coli*, 3 kmeny rodu *Enterobacter*, 1 kmen rodu *Citrobacter*, 1 kmen rodu *Leclercia*, 6 kmenů rodu *Klebsiella*, 1 kmen rodu *Proteus*, 2 kmeny rodu *Serratia*, 1 kmen rodu *Yersinia*, 2 kmeny rodu *Pseudomonas*, 2 kmeny rodu *Aeromonas* a 1 kmen rodu *Moraxella* (Příloha I).



Obr. 4. Vpichový pokus: inhibiční efekt bakteriocinů se projevuje jako inhibiční zóna růstu indikátorového kmene kolem vpichu.

Kmen 82W inhiboval ze sbírkových kmenů 3 kmeny *E. coli*, *S. sonnei* 17 a *Shigella flexneri* a z izolátů 6 kmenů *E. coli*, 3 kmeny *Enterobacter* a kmen *Aeromonas hydrophila*. Nejsilněji ze všech produkčních kmenů inhiboval kmen *Proteus sp.* a *Leclercia adecarboxylata*.

Kmen 85W ze sbírkových kmenů inhiboval 5 kmenů *E. coli*, *Shigella flexneri* a nejsilněji ze všech se projevila inhibice kmene *Salmonella enteritidis*. Z izolátů pak dále inhiboval 2 kmeny *E. coli*.

Kmen 93 inhiboval stejně silně všech 5 sbírkových kmenů *E. coli*, *S. sonnei* 17 a *Shigella flexneri* a z izolátů pak dále 3 kmene *E. coli*.

Největší pozornost si zaslouží výsledky odečtené u kmene 225. Vyjma kmene *Salmonella* sp. 569/99 inhiboval všechny sbírkové kmene, tzn. 5 kmenů *E. coli*, *S. sonnei* 17, jako jeden z mála kmen *Shigella boydii* U8, kmen *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, a *Salmonella* sp. 79/05. Jako jediný inhiboval 2 kmene *S. typhimurium*, a *Salmonella* sp. 311/96. Z izolátů z potravin byla pozorována inhibice u 5 kmenů *E. coli* (z toho u kmenů 119W, 122W a 123W byly zaznamenány největší inhibiční zóny), 1 kmen *Enterobacter*, *Citrobacter freundii* (opět největší účinek), 1 kmen *Leclercia adecarboxylata*, kmen *Klebsiella oxytoca*, dále pak kmen *Proteus* sp. a působil jako nejsilnější inhibitor dle projevů účinku i u kmene *Aeromonas hydrophila* a *Moraxella*.

Kmeny 93W, 96W, 97W a 105W inhibovaly pouze sbírkové kmene, inhibice izolátů z potravin se nepotvrdila. Je zajímavé, že ačkoli kmene 96W a 97W produkují jiný bakteriocin, v inhibičním spektru se objevila naprostá shoda. Inhibice byla prokázána u kmenů *E. coli*, *S. sonnei* 17, *Shigella boydii* U8 a *Shigella flexneri*.

Izolát *E. coli* 125W je zajímavý tím, že citlivost na testované bakteriociny je velmi podobná sbírkovým indikátorovým kmenům a dal by se tento kmen dále používat jako indikátorový kmen pro detekci bakteriocinů *E. coli*.

Nejpodobnější inhibiční spektrum jako kontrolní kmen produkující mikrocin C7 (83W) má kmen 101W produkující kromě mikrocinu C7 ještě kolicin E5, co do rozsahu a také intenzity.

Nejzajímavějším výsledkem pro mikrocin V je kmen 103W, který kromě běžných indikátorů inhibuje také jeden kmen rodu *Enterobacter* a bakterii *Yersinia enterocolitica*. Ostatní kmene produkující mikrocin V však tuto vlastnost neprokázaly.

Mikrocin C7 by měl mít inhibiční účinky na rod *Proteus* [31], což se v této práci při testu na jeden izolát rodu *Proteus* nepotvrdilo. Naopak byl izolát tohoto rodu (a také dalších čtyř testovaných kmenů z rodů *Leclercia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*) nejvíce citlivý na kontrolní produkční kmen produkující mikrocin B17 (82W) a multibakteriocinogenní kmen 225, který ve svém genomu kromě dalších také kóduje mikrocin B17. Toto zjištění podporuje myšlenku, že mikrocin B17 je jedním z bakteriocinů u tohoto kmene, který velmi rozšiřuje jeho inhibiční spektrum. Zásadně se však liší v účinnosti vůči bakteriím rodu *Salmonella*,

kdy kmen 225 inhibuje 5 ze 6 testovaných kmenů a kmen 82W pouze jeden (Tab. 16). Na druhou stranu kmen 85W, produkující kolicin E1 (a také mikrocin J25, který by měl působit vůči bakteriím rodu *Salmonella* [32]), také inhibuje pouze jeden kmen ze šesti testovaných. Tato fakta podpírají domněnku, že účinek producenta 225 na rod *Salmonella* je způsoben nejpravděpodobněji synergickým účinkem všech bakteriocinů.

Tab. 16. Počet citlivých kmenů rodu *Salmonella* ze 6 testovaných na 7 bakteriocinogenních producentů.

producent	bakteriocin	původ	počet citlivých/testovaných kmenů rodu <i>Salmonella</i>
225	E1, B,M,Ia/Ib,mB17	izolát	5/6
229	B,M,Ia/Ib,mB17	izolát	2/6
224	B, M, Ia/Ib,mB17,mV	izolát	2/6
222	B, M, Ia/Ib,mB17,mV	izolát	2/6
82w	mB17	kontrola	1/6
85W	E1,J25	kontrola	1/6
230	B,M,mB17	izolát	1/6

Salmonella enterica subsp. *enterica* ser. Enteritidis je spolehlivě inhibována kombinací kolicinů B, M s mikrocinem B17. Druhá a poslední kombinace inhibující tuto bakterii je kolicin E1 s mikrocinem J25. Podle dostupné literatury [32], [51], [52] je rozhodně z těchto dvou bakteriocinů příčinou inhibice bakterií rodu *Salmonella* mikrocin J25.

Určitě zajímavým výsledkem, který zřejmě nemá podporu v literatuře, je pozorování inhibičního účinku na gramnegativní bakterie neřadící se do čeledi *Enterobacteriaceae*. Byl prokázán tento vliv na bakterii *Aeromonas hydrophila*, a to opět zejména multibakteriocinogenními kmeny (222, 224, 225, 229, 93) a dále kmenem produkujícím pouze mikrocin B17 (82W) a kmenem produkujícím kolicin E7 (73W). Z těchto výsledků vyplývá jednoznačně výrazný inhibiční účinek mikrocinu B17. Bakterie rodu *Moraxella* byla inhibována pouze kmeny 224, 225 a 229, avšak ne kmenem 82W, což vylučuje vliv mikrocinu B17. V tomto případě může být účinnost připsána zřejmě jen kombinaci kolicinů B, M, Ia/Ib s mikrocinem B17.

Celkově se dá shrnout, že největší inhibiční efekt na gramnegativní bakterie izolované z potravin mají multibakteriocinogenní kmeny *E. coli*. V této práci to byl konkrétně zejména kmen *E. coli* 225, který byl izolován z bažantího masa. Potenciál tohoto kmene je třeba dále prostudovat. Dále je možno vyvodit obecný závěr, že účinnější na tuto skupinu bakte-

rií jsou mikrocin, z nichž nejefektivnější se jeví mikrocin B17 a dále pak mikrocin J25. Inhibiční vliv se oproti tvrzení v literatuře [37] neprojevil u mikrocinů L a H47.

Bakteriocinogenie je evidentně jev, který dává svým producentům značnou ekologickou výhodu, a to zejména v případě produkce kombinace několika kolicinů a mikrocinů. Ve studii Šmardy a kol. [53] bylo shromážděno 53 kmenů *E. coli* z tračnicku 53 zdravých dobrovolníků a testováno na spontánní a indukované produkce inhibičních exoproduktů. Z testovaných kmenů 37,7 % produkovalo bakteriofágy, 41,5 % produkovalo od jednoho po několik LMW kolicinů, 11,3 % tvořilo HMW koliciny a 15,1 % produkovalo exocelulární siderofory odlišné od enterochelinu. Z toho sedm kmenů tvořilo aerobaktin a jeden kmen tvořil netypové siderofory. Kmeny *E. coli* se velmi liší ve výskytu kolicinogenie a lyzogenie od svých nejbližších systémových příbuzných rodu *Escherichia*, a proto by v tomto ohledu neměl být považován za modelovou bakterii.

Ve studii Šmardy a Obdržálka [54] bylo v průběhu let 1993 - 1999 nashromážděno 1043 humánních izolátů. U izolátů pocházejících ze zdravého střeva bylo nalezeno 41,4 % produkčních kmenů. U pacientů trpících salmonelózou byla incidence kolicinogenie stejná jako u zdravých. Významný rozdíl nebyl shledán mezi uropatogenními nehemolytickými kmeny *E. coli*, kdy incidence kolicinogenie byla stejná jako u izolátů ze zdravého tračnicku, avšak u hemolytických kmenů byl výskyt kolicinogenie nižší, a to pouze 22,4 % [54]. V rámci rodu *Escherichia* byla kromě *E. coli* produkce kolicinů prokázána pouze u druhu *E. fergusonii*. Šmarda a kol. [53] izolovali 30 kmenů *E. hermanii* z lidských orgánů, dále 30 kmenů *E. vulneris* (26 humánních a 4 z čističky odpadních vod) a 50 kmenů *E. fergusonii* (48 humánních, 1 z vepře a 1 z čističky vod). Bakteriociny produkovala pouze *E. fergusonii*, kde bylo nalezeno 6 bakteriocinogenních kmenů. Ostatní kmeny neprodukovaly ani jeden bakteriocin.

7.2 Izolace bakteriocinů

Za účelem zjišťování inhibičního vlivu izolovaných bakteriocinů na gramnegativní bakterie izolované z potravin jinou, přesnější metodou než pouze vpichovou, byly zahájeny pokusy o izolaci co nejsilnějších bakteriocinů z vybraných produkčních kmenů.

První izolací bakteriocinů z producentů 17, 59, 73W, 76W, 77W, 82W, 83W, 84W, 85W, 86W, 93W, 94W, 96W, 97W, 98W, 103W, 105W, 106W, 107W, 222, 224, 225, 229 a 230

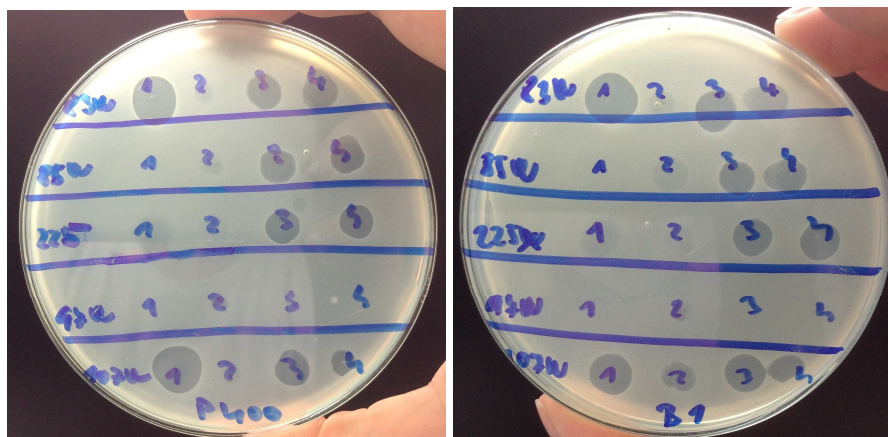
byla zjištěna účinnost na indikátorové kmeny *E. coli* Row a B1 pouze u kmenů 73W, 77W, 83W, 86W, 98W, 103W a 230 a to pouze u bakteriocinů uchovávaných na kapce chloroformu. Bakteriociny, které byly přefiltrovány, svou účinnost ztratily ve všech případech. Proto byly další připravované bakteriociny již uchovávány pouze na chloroformu.

U 4 bakteriocinů (83W, 86W, 103W, 230), které prokázaly inhibiční účinky kapkovou metodou, byl za účelem upravení metodiky izolace dle literatury [55] dále proveden experiment, zda teplotní záhřev (70 a 100 °C po dobu 10 min) může ovlivnit jejich účinnost. Výsledky nebyly jednoznačné (Tab. 17) a protože u některých bakteriocinů byla účinnost ovlivněna, nebyl tento krok do další izolace zařazen.

Tab. 17. Změna účinnosti mikrocinů a kolicinů po tepelném záhřevu.

indik. kmeny	Row		B1	
	70°C/10 min	100°C/10 min	70°C/10 min	100°C/10 min
producent				
83W	-	-	+	-
86W	+	+	+	+
103W	+	-	-	-
230	-	-	+	+

Další izolace bakteriocinů byla již provedena pouze u 5 vybraných producentů (83W, 85W, 225, 97W, 107W) záměrně vybraných i z těch, které se již naizolovat povedlo i z těch u kterých první pokus izolace byl neúspěšný. Jelikož některé experimenty probíhaly paralelně, je součástí druhé izolace ještě ošetření tepelným záhřevem. Při druhé izolaci byly získány 4 vzorky bakteriocinů od každého producenta (viz. Kapitola 6.4.2) a jejich účinnost byla testována na indikátorových kmenech *E. coli* P400 a B1 (Obr. 5).



Obr. 5. Testování účinnosti připravených supernatantů: produkce kolicinů se projevila jako inhibiční zóna růstu.

Na základě získaných výsledků byl vyhodnocen jako prokazatelně nejsilnější vzorek 3 UZV. Toto ovšem neplatí pro producenta 97W, kde mikrocin C7 zřejmě nebyl produkován a tudíž ani naizolován. U vzorku 4 UZV vyrobeného z menšího množství buněčné suspenze než vzorek UZV, byla potvrzena předpokládaná slabší účinnost. Pro další testování inhibičního vlivu bakteriocinů na gramnegativní bakterie izolované z potravin byl tedy vybrán vzorek 3 UZV.

7.3 Stanovení inhibičního vlivu bakteriocinů kvantitativně

Inhibiční vliv bakteriocinů izolovaných pomocí ultrazvuku byl kvantitativně (koliciny ředěnými desítkovou řadou) testován kapkovou metodou na tyto indikátorové sbírkové kmeny: 125W (*E. coli*), 10W (*Salmonella typhimurium*), 25W (*Shigella flexneri*), 31W (*Enterobacter aerogenes*); a tyto izoláty z potravin: 2 (*Klebsiella oxytoca*), 19 (*Pseudomonas fragi*), 24 (*Serratia liquefaciens*), 245 (*E. coli*) (Obr. 6).

Pozitivní výsledek byl zaznamenán pouze u kmene 125W (Tab. 18). Všechny ostatní indikátory byly vůči takto připraveným bakteriocinům odolné, ačkoli se inhibiční účinek při kvalitativní metodě vpichem prokázal. Např. bakteriociny kmene 225 jednoznačně prokázaly inhibiční vliv na *Salmonella typhimurium* (10W) vpichovou metodou (Příloha I), avšak při kapkové metodě neměl žádný účinek ani neředěný bakteriocin, jehož jednoznačný účinek byl prokázán do ředění 10^{-1} (10^{-2} se vytvořila ještě matná zóna) na kmen *E. coli* 125W.

Tab. 18. Stanovení účinnosti (titru) izolovaných bakteriocinů kvantitativně (desítkové ředění) v AU.

indikátor	izolovaný bakteriocin				
	83W*	85W	225	97W	107W
125W	0(1)	0(2)	1(2)	-	0(1)

*nejvyšší čirá zóna u neředěného vzorku nebo u ředění 10^{-1} (10x), v závorce je uvedena nejvyšší matná zóna



Obr. 6. Kapková metoda – stanovení titru kolicinu.

Porovnání citlivosti metody kvalitativní a kvantitativní vychází citlivější metoda vpichu, jelikož prokázané výsledky u této metody se neprokázaly po izolaci bakteriocinu a testování kapkovou metodou.

Pro další testování by bylo nutné připravit silnější bakteriociny modifikovanou metodou izolace, což již z časových důvodů nebylo v rámci této diplomové práce možné.

7.4 Výskyt bakteriocinogenie u gramnegativních bakterií jiných než *E. coli* izolovaných z potravin

Celkem bylo na výskyt produkce bakteriocinů testováno 48 gramnegativních bakteriálních kmenů izolovaných z potravin. Z nichž 3 patří do rodu *Aeromonas*, 5 do rodu *Citrobacter*, 9 do rodu *Enterobacter*, 1 do rodu *Ewingella*, 4 do rodu *Hafnia*, 9 do rodu *Klebsiella*, 1 do rodu *Leclercia*, *Moraxella*, *Morganella*, *Pantoea* a *Providencia*, 6 do rodu *Pseudomonas*, 1 do rodu *Raoutella*, 3 do rodu *Serratia*, 1 do rodu *Yersinia*.

Jako indikátorové kmeny byly použity nejenom sbírkové kmeny *E. coli* (Tab. 10), ale také další kmeny z rodů stejných nebo blízce příbuzných testovaným kmenům.

Rody *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Leclercia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Raoutella*, *Serratia* a *Yersinia* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*.

Jedná se o izoláty většinou z těl chlazených kuřat, dále pak ze syrového masa k výrobě fermentovaných klobás a jedlého hmyzu.

Ze všech testovaných rodů vykazoval pozitivní výsledek pouze rod *Pseudomonas*. Z něj byly testovány druhy *Pseudomonas fulva* (345, 365 a 373) a druh *Pseudomonas putida* (364). Ze zmiňovaných prokázal pozitivní reakci pouze kmen 373 *Pseudomonas fulva* izolovaný z jedlého hmyzu.

Pseudomonas fulva byl poprvé izolován z japonských rýžových polí v roce 1963 [56]. Dosud byl od lidí izolován pouze jako infekční agens a spojení s infekcí z jiného pohledu dosud nebyl znám. Nyní však už byl izolován i ze vzorků lidské krve [57]. *Pseudomonas fulva* sdílí fenotypové charakteristiky se členy fluorescenční skupiny *Pseudomonas*, zejména *P. putida*, ale má některé unikátní vlastnosti. Nejvíce pozoruhodnou je produkce žlutých pigmentů, vzhledem k tomu, že neprodukuje fluorescenční pigment, na rozdíl od *P. putida* a není také schopná asimilovat malonát a m-hydroxybenzoát [57].

Určitě bude velmi zajímavé další studium tohoto objeveného bakteriocinu, klasifikace do stávajícího systému, ačkoli se jedná o netypický druh rodu *Pseudomonas*, což by mohlo naznačovat i úplně nový bakteriocin. Zcela jistě se nabízí bližší srovnání s nejvíce studovanou *Pseudomonas aeruginosa*, jež je významným lidským patogenem a u které produkuje bakteriociny více než 90 % kmenů izolovaných z prostředí a klinických izolátů [3].

ZÁVĚR

Bakteriociny jsou antimikrobiální peptidové látky produkované bakteriemi. Ve vyšších organizmech AMP přispívají k přirozené imunitě a jsou součástí základního obranného systému proti škodlivým mikroorganismům. Bakteriociny gramnegativních bakterií jsou děleny na menší mikrocinů a větší koliciny. Koliciny i mikrocinů mohou být buňkou produkovány zároveň nebo může buňka produkovat hned několik kolicinů najednou.

Cílem této práce bylo sledování inhibičního vlivu bakteriocinů na vybrané bakterie izolované z potravin a sbírkové kmeny *Salmonella* sp. a testování výskytu bakteriocinogenie u gramnegativních bakteriálních izolátů z potravin jiných než *Escherichia coli*.

Pro sledování inhibičního vlivu bakteriocinů byla zvolena vpichová metoda, při které se pozitivní reakce projevila vytvořením inhibiční zóny kolem místa vpichu narosteného produkčního kmene.

Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že největší inhibiční efekt na gramnegativní bakterie izolované z potravin mají multibakteriocinogenní kmeny *E. coli*. Dále je možno vyvodit obecný závěr, že účinnější na tuto skupinu bakterií jsou mikrocinů, z nichž nejefektivnější se jeví mikrocin B17 a dále pak mikrocin J25. Inhibiční vliv se neprojevil u mikrocinů L a H47. Multiprodukce je evidentně ekologická výhoda pro kmeny izolované z potravin.

Při pokusech o izolaci bakteriocinů bylo zjištěno, že použité metody nejsou dostačující k získání tak silného bakteriocinu, který by projevil stejný účinek jako při testování vpichovou metodou.

V rámci druhého cíle bylo podrobena testování výskytu bakteriocinogenie 48 gramnegativních bakteriálních kmenů jiných než *E. coli* izolovaných z potravin zařazených do 15 rodů. Jako indikátorové kmeny byly použity jak sbírkové kmeny *E. coli*, tak i další kmeny z rodů stejných či blízkých příbuzných testovaným kmenům. Jednalo se o izoláty většinou z těl chlazených kuřat, dále pak ze syrového masa k výrobě fermentovaných klobás a jedlého hmyzu. Ze všech testovaných rodů vykazoval pozitivní výsledek pouze rod *Pseudomonas*, a to jeden kmen druhu *Pseudomonas fulva* izolovaný z jedlého hmyzu. Vzhledem k tomu, že bakteriociny u rodu *Pseudomonas* jsou z literatury známy zejména u *P. aeruginosa*, pak je tu možnost, že se jedná o zcela nový bakteriocin, což však musí být potvrzeno dalším výzkumem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HASSAN, M., M. KJOS, I.F. NES, D.B. DIEP a F. LOTFIPOUR. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, vol. 113, issue 4, s. 723-736. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>
- [2] COTTER, Paul, Colin HILL a R. ROSS. Bacterial Lantibiotics: Strategies to Improve Therapeutic Potential. *Current Protein*. 2005, vol. 6, issue 1, s. 61-75. DOI: 10.2174/1389203053027584. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
- [3] JACK, W Ralph., John R. TAGG, Bibek RAY. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 1995, vol. 59, issue 2, s. 171-200.
- [4] GILLOR, Osnat, Lisa NIGRO a Margaret RILEY. Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*. 2005, vol. 11, issue 8, s. 1067-1075. DOI: 10.2174/1381612053381666. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
- [5] GILLOR, O., A. ETZION and M. A. RILEY. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, vol. 81, issue 4, s. 591-606. DOI: 10.1007/s00253-008-1726-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-008-1726-5>
- [6] DESTOUMIEUX-GARZÓN, Delphine, Jean PEDUZZI a Sylvie REBUFFAT. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*. 2002, vol. 84, 5-6, s. 511-519. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01411-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908402014116>
- [7] ŠMARDA, J. and D. ŠMAJS. Colicins—Exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*. 1998, vol. 43, issue 6, s. 563-582. DOI: 10.1007/BF02816372. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02816372>
- [8] REBUFFAT, Sylvie. Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochemical Society Transactions*. 2012, vol. 40, issue 6, s. 1456-1462. DOI:

- 10.1042/BST20120183. Dostupné z:
<http://www.biochemsoctrans.org/bst/040/bst0401456.htm>
- [9] GARCÍA, Pilar, Lorena RODRÍGUEZ, Ana RODRÍGUEZ and Beatriz MARTÍNEZ. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science*. 2010, vol. 21, issue 8, s. 373-382. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.04.010. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224410001275>
- [10] DAW, Mohamed A. and Fredrick R. FALKINER. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*. 1996, vol. 27, issue 6, s. 467-479. DOI: 10.1016/S0968-4328(96)00028-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432896000285>
- [11] GORDON, D. M. and C. L. O'BRIEN. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006-11-01, vol. 152, issue 11, s. 3239-3244. DOI: 10.1099/mic.0.28690-0. Dostupné z:
<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.28690-0>
- [12] RILEY, Margaret A. and John E. WERTZ. BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*. 2002, vol. 56, issue 1, s. 117-137. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024. Dostupné z:
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- [13] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.
- [14] RILEY, Margaret A. and David M. GORDON. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*. 1999, vol. 7, issue 3, s. 129-133. DOI: 10.1016/S0966-842X(99)01459-6. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X99014596>
- [15] CASCALES, E., S. K. BUCHANAN, D. DUCHE, C. KLEANTHOS, R. LLOUBES, K. POSTLE, M. RILEY, S. SLATIN and D. CAVARD. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007, vol. 71, issue 1, s. 158-229. DOI: 10.1128/MMBR.00036-06. Dostupné z: <http://mibr.asm.org/cgi/doi/10.1128>
- [16] BUDIČ, Maruška, Matija RIJAVEC, Živa PETKOVŠEK, Darja ŽGUR-BERTOK and Mark Alexander WEBBER. *Escherichia coli* Bacteriocins: Antimicrobial Efficacy and Pre-

valence among Isolates from Patients with Bacteraemia. *PLoS ONE*. 2011, vol. 6, issue 12, e28769-. DOI: 10.1371/journal.pone.0028769. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028769>

[17] ŠMAJS, David a Jan ŠMARDA. Koliciny- letální proteiny z čeledi Entobacteriaceae. *Biologické listy*, Praha: Ústav molekulární genetiky AV ČR, 1997, roč. 62, č. 2, s. 135-158. ISSN 0366-486.

[18] ŠMAJS, David, Lenka MICENKOVÁ, Jan ŠMARDA, Martin VRBA, Alena ŠEVČÍKOVÁ, Zuzana VALIŠOVÁ and Vladana WOZNICOVÁ. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology*. 2010, vol. 10, issue 1, s. 288-. DOI: 10.1186/1471-2180-10-288. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/288>

[19] CHALÓN, Miriam C., Leonardo ACUÑA, Roberto D. MORERO, Carlos J. MINAHK and Augusto BELLOMIO. Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods. *Food Research International*. 2012, vol. 45, issue 2, s. 735-744. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.08.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911005187>

[20] ŠMAJS, David, Holger PILSL, Volkmar BRAUN. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *Journal of Bacteriology*. 1997, vol. 179, s. 4919-4928.

[21] LAZDUNSKI, Claude J. Colicin import and pore formation: a system for studying protein transport across membranes?. *Molecular Microbiology*. 1995, vol. 16, issue 6, s. 1059-1066. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02331.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02331.x>

[22] DEWITT, William and Donald R. HELINSKI. Characterization of colicinogenic factor E1 from a non-induced and a mitomycin C-induced *Proteus* strain. *Journal of Molecular Biology*. 1965, vol. 13, issue 3, s. 692-703. DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80136-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228366580136X>

[23] BRADLEY, D.E. Colicins G and H and their host strains. *Canadian Journal of Microbiology*. 1991, vol. 37, s. 751-757

[24] PUGSLEY, A.P., The ins and outs of colicins. Part I: Production, and Franskocation across membranes. *Microbiological Sciences*. 1984, vol. 1, s. 168-175.

- [25] ŠMAJS, David, Magda DOLEŽALOVÁ, Pavel MACEK and Lukáš ŽÍDEK. Inactivation of colicin Y by intramembrane helix-helix interaction with its immunity protein. *FEBS Journal*. 2008, vol. 275, issue 21, s. 5325-5331. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06662.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2008.06662.x>
- [26] MIKOVÁ Kristýna. *Bakteriocinotypizace kmenů Escherichia coli izolovaných z potravin*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [27] JANÁKOVÁ, L. Optimalizace multiplex PCR pro současnou detekci kolicinů a mikrocínů. Diplomová práce. 2010, Technologická fakulta UTB ve Zlíně. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [28] AZPIROZ, M. F. and M. LAVINA. Modular Structure of Microcin H47 and Colicin V. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007, vol. 51, issue 7, s. 2412-2419. DOI: 10.1128/AAC.01606-06. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01606-06>
- [29] DUQUESNE, Sophie, Vanessa PETIT, Jean PEDUZZI and Sylvie REBUFFAT. Structural and Functional Diversity of Microcins, Gene-Encoded Antibacterial Peptides from Enterobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2007, vol. 13, issue 4, s. 200-209. DOI: 10.1159/000104748. Dostupné z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000104748>
- [30] HEDDLE, Jonathan G, Stephen J BLANCE, Deborah B ZAMBLE, Florian HOLLFELDER, Deborah A MILLER, Lois M WENTZELL, Christopher T WALSH and Anthony MAXWELL. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. *Journal of Molecular Biology*. 2001, vol. 307, issue 5, s. 1223-1234. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4562. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283601945620>
- [31] SOUČEK, O. *Mikrociny čeledi Enterobacteriaceae: typy, syntéza, regulace, export a letální účinek*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie. Vedoucí bakalářské práce David Šmajš.
- [32] DUPUY, Fernando and Roberto MORERO. Microcin J25 membrane interaction: Selectivity toward gel phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2011, vol. 1808, issue 6, s. 1764-1771. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.02.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273611000514>

- [33] DRIDER, Djamel and Sylvie REBUFFAT. *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. New York: Springer Verlag, c2011, xiii, 451 p. ISBN 14-419-7692-2.
- [34] PONS, A.-M., F. DELALANDE, M. DUARTE, S. BENOIT, I. LANNELUC, S. SABLE, A. VAN DORSSELAER and G. COTTENCEAU. Genetic Analysis and Complete Primary Structure of Microcin L. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, vol. 48, issue 2, s. 505-513. DOI: 10.1128/AAC.48.2.505-513.2004. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.48.2.505-513.2004>
- [35] RODRÍGUEZ, Eliana and Magela LAVIÑA. Genetic analysis of microcin H47 immunity. *Canadian Journal of Microbiology*. 1998, vol. 44, issue 7, s. 692-697. DOI: 10.1139/w98-044. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w98-044>
- [36] HETZ, C., M. R. BONO, L. F. BARROS and R. LAGOS. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, vol. 99, issue 5, s. 2696-2701. DOI: 10.1073/pnas.052709699. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052709699>
- [37] MORIN, N., I. LANNELUC, N. CONNIL, M. COTTENCEAU, A. M. PONS and S. SABLE. Mechanism of Bactericidal Activity of Microcin L in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011, vol. 55, issue 3, s. 997-1007. DOI: 10.1128/AAC.01217-10. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01217-10>
- [38] DE VUYST, L., R. CALLEWAERT a K. CRABBE. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*. 1996, vol. 142, issue 4, s. 817-827. DOI: 10.1099/00221287-142-4-817. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00221287-142-4-817>
- [39] RILEY, M a M CHAVAN. *Bacteriocins: ecology and evolution*. New York: Springer, c2007, x, 150 p. ISBN 978-354-0366-034
- [40] RILEY, M. A. a D. M. GORDON. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. *Journal of General Microbiology*. 1992, vol. 138, issue 7, s. 1345-1352. DOI: 10.1099/00221287-138-7-1345. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00221287-138-7-1345>

1345

- [41] MICHEL-BRIAND, Yvon a Christine BAYSSE. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*. 2002, vol. 84, 5-6, s. 499-510. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01422-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908402014220>
- [42] DUPORT, Catherine, Christine BAYSSE, and Yvon MICHEL-BRIAND. Molecular characterization of pyocin S3, a novel S-type pyocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, vol. 270, s. 8920-8927.
- [43] HORÁK, Vladimír a Christine BAYSSE. Seventy colicin types of *Shigella sonnei* and an indicator system for their determination. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1994, vol. 281, issue 1, s. 24-29. DOI: 10.1016/S0934-8840(11)80633-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093488401180633X>.
- [44] ŠMAJS D, PILSL H, BRAUN V. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *J Bacteriol* 1997;179:4919–28.
- [45] SOUSA, MIREILLE ÂNGELA BERNARDES, EDILBERTO NOGUEIRA MENDES, ANA CAROLINA MORAIS APOLÔNIO, LUIZ DE MACÊDO FARIAS a PAULA PRAZERES MAGALHÃES. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea. *APMIS*. 2010, vol. 118, issue 2, s. 125-135. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02570.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2009.02570.x>
- [46] SULAKVELIDZE A., 2000, *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes Infect.* 2:497–513.
- [47] BOTTONNE, E.J., SANDHU, K.K., PISANO, M.A., 1979, *Yersinia intermedia*: temperature-dependent bacteriocin production. *J. Clin. Microbiol.* 10: 433– 436.
- [48] RAKIN, A., E. BOOLGAKOWA a J. HEESEMANN. Structural and functional organization of the *Yersinia pestis* bacteriocin pesticin gene cluster. *Microbiology*. 1996-12-01, vol. 142, issue 12, s. 3415-3424. DOI: 10.1099/13500872-142-12-3415. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/13500872-142-12-3415>
- [49] BOSÁK, J, LAIBLOVA, P., ŠMARDÁ, J., DEDICOVÁ, D., ŠMAJSA, D., 2012, Novel Colicin FY of *Yersinia frederiksenii* Inhibits Pathogenic *Yersinia* Strains via YiuR-Mediated Reception, TonB Import, and Cell Membrane Pore Formation, *Journal of Bakte-*

riology, vol. 194(8):s.1950-1959 DOI: 10.1128/JB.05885-11

[50] CURSINO, L., D. SMAJS, J. SMARDA, R.M.D. NARDI, J.R. NICOLI, E. CHARTONE-SOUZA a A.M.A. NASCIMENTO. Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, vol. 100, issue 4, s. 821-829. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02834.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2006.02834.x>

[51] PORTRAIT, V, S GENDRON-GAILLARD, G COTTENCEAU a A M PONS. Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Canadian Journal of Microbiology*. 1999, vol. 45, issue 12, s. 988-994. DOI: 10.1139/w99-106. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w99-106>

[52] VINCENT, P. Inhibition of *Salmonella enterica* serovars by microcin J25. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, vol. 236, issue 1, s. 103-107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378109704003659>

[53] ŠMARDA, J., D. ŠMAJS a S. HORYNOVÁ. Incidence of lysogenic, colicinogenic and siderophore-producing strains among human non-pathogenic *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*. 2006, vol. 51, issue 5, s. 387-391. DOI: 10.1007/BF02931581. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02931581>

[54] ŠMARDA, J., OBDRŽÁLEK, V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*. 2001, vol. 41, s. 367-374

[55] GAILLARD-GENDRON, Sandrine, David VIGNON, Gilles COTTENCEAU, Marie-Anne GRABER, Nathalie ZORN, Alain DORSSELAER a Anne-Marie PONS. Isolation, purification and partial amino acid sequence of a highly hydrophobic new named microcin L produced by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, vol. 199, issue 1, s. 151-151. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10666.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10666.x>

[56] Uchino, M., O. Shida, T. Uchimura, and K. Komagata. 2001. Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata 1963, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremoricolorata* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47:247-261.

[57] SEOK, Y., H. SHIN, Y. LEE, I. CHO, S. NA, D. YONG, S. H. JEONG a K. LEE.

First Report of Bloodstream Infection Caused by *Pseudomonas fulva*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, vol. 48, issue 7, s. 2656-2657. DOI: 10.1128/JCM.01609-09. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01609-09>

[58] STROUD LAB - Structure gallery/colicin. [online]. [cit.02-04-2014]. Dostupné z WWW:<http://www.msg.ucsf.edu/stroud/structure/colicin.htm>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

kDa	kilodalton
AMPs	antimikrobiální peptid
TonB	protein plazmatické membrány
ColV	kolicin V
TolA	membránový protein
TolB	membránový protein
TolQ	membránový protein
TolR	membránový protein
ExbB	proteinový komplex
ExbD	proteinový komplex
kB	kilobajt
UPEC	uropatogenní <i>Escherichia coli</i>
FepA	bakteriální protein vnější membrány
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Mcc	mikrocin
Gly	glycin
Ser	serin
Cys	cystein
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
pMcc	plazmid mikrocinu
Ala	allantoin

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1. Schematické shrnutí příjmu, translokace a způsob působení nejvíce studovaných kolicinů [13, upraveno].
- Obr. 2. Funkční domény kolicinu. T (translokační), R (receptorová), C (cytotoxická) [58].
- Obr. 3. Mapa plazmidu pYF27601 (5,574 bp). Jsou zobrazeny lokalizace a polarita předpokládaných genů, pozice několika restričních cílových míst, kódování *inc* a pozice předpokládaného počátku replikace (*ori*) [49].
- Obr. 4. Vpichový pokus: inhibiční efekt bakteriocinů se projevuje jako inhibiční zóna růstu indikátorového kmene kolem vpichu
- Obr. 5. Testování účinnosti připravených supernatantů: produkce kolicinů se projevila jako inhibiční zóna růstu.
- Obr. 6. Kapková metoda – stanovení titru kolicinu.

SEZNAM TABULEK

- Tab. 1. Klasifikace bakteriocinů podle García a kol. [9].
- Tab. 2. Efekt mikrocinu E492 na různé typy lidských buněk [36]
- Tab. 3. Inhibiční spektrum kolicinu F_Y na různé druhy rodu *Yersinia*.
- Tab. 4. Bakteriociny jako antibiotika [4].
- Tab. 5. Složení masopeptonového bujonu
- Tab. 6. Složení masopeptonového agaru č.1
- Tab. 7. Složení masopeptonového agaru č.2
- Tab. 8. Složení soft agaru
- Tab. 9. Seznam použitých sbírkových kmenů – kmeny kontrolní
- Tab. 10. Seznam použitých sbírkových kmenů – kmeny indikátorové
- Tab. 11. Seznam ostatních sbírkových kmenů.
- Tab. 12. Seznam a charakteristika izolátů ostatních gramnegativních bakterií z potravin - ze syrového masa na výrobu fermentovaných klobás
- Tab. 13. Seznam a charakteristika izolátů *Escherichia coli* z potravin
- Tab. 14. Seznam a charakteristika izolátů ostatních gramnegativních bakterií z potravin - z kůže chlazené drůbeže
- Tab. 15. Seznam a charakteristika izolátů ostatních gramnegativních bakterií z potravin - z jedlého hmyzu
- Tab. 16. Počet citlivých kmenů rodu *Salmonella* ze 6 testovaných na 7 bakteriocinogenních producentů.
- Tab. 17. Změna účinnosti mikrocinů a kolicinů po tepelném záhřevu
- Tab. 18. Stanovení účinnosti (titru) izolovaných bakteriocinů kvantitativně (desítkové ředění) v AU.

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha I Výsledky vpichového pokusu – testování inhibičního vlivu bakteriocinů na gramnegativní bakteriální izoláty z potravin.

**PŘÍLOHA P I: VÝSLEDKY VPICHOVÉHO POKUSU – TESTOVÁNÍ
INHIBIČNÍHO Vlivu BAKTERIOCINŮ NA GRAMNEGATIVNÍ
BAKTERIÁLNÍ IZOLÁTY Z POTRAVIN.**

producent			indikátorový kmen													
			Row	B1	φ	P400	Sabina 40	S.sonnei 17	23W	25W	CCM 7205	CCM 4420	10 W	20W	21W	22W
73W	kontrola	E7	++	+	++	++	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-
76W	kontrola	la	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77W	kontrola	lb	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
82W	kontrola	mB17	-	++	++	++	-	+	-	++	-	-	-	-	-	+
83W	kontrola	mC7	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	-	-	-	-	-	-
84W	kontrola	mH47	++	+++	+	++	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85W	kontrola	E1,J25	+	+++	+	+	+	-/+	-	+	-	+	-	-	-	-
86W	kontrola	mV	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-
93W	izolát	E8	+	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94W	izolát	E7, mC7	-/+	+	+	+	-/+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
96W	izolát	la	+++	+++	+++	-	+++	+++	+	+++	-	-	-	-	-	-
97W	izolát	mC7	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-
98W	izolát	E7,E8	+	+	+	++	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
101W	izolát	E5,mC7	++	++	+++	++	++	+	-	+++	-	-	-	-	-	-
103W	izolát	mV	-/+	-/+	++	-/+	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-
105W	izolát	la	-/+	+++	++	-	++	++	-	+++	-	-	-	-	-	-
107W	izolát	E5,E9,B,M,Y	++	++	++	++	++	++	-	+++	-	+	-	-	-	-
17	izolát	la, mL	+++	+++	+++	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
59	izolát	mV	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-
93	izolát	E1,E2,E6,E7,E8,mV,mM	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-
94	izolát	la	+	+	+	++	-/+	+	-	++	-	-	-	-	-	-
222	izolát	B, M, la/lb,mB17,mV	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	+++	-	+	-	-	-	-/+
224	izolát	B, M, la/lb,mB17,mV	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	+++	-	++	-	-	-	-/+
225	izolát	E1, B,M,la/lb,mB17	+	+++	+++	++	+	+++	+	+++	++	++	++	+	-	+
229	izolát	B,M,la/lb,mB17	++	+++	+++	++	+++	+++	-	+++	-	++	-	-	-	-/+
230	izolát	B,M,mB17	+	+++	+++	++	++	-	-	+	-	+	-	-	-	-

