

Možnosti využití bakteriocinů k inhibici gramnegativních bakterií

Bc. Pavlína Starostková

Diplomová práce
2015

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavlína Starostková**
Osobní číslo: **T13595**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Možnosti využití bakteriocinů k inhibici nežádoucích gramnegativních bakterií**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **E.coli jako producent bakteriocinů.**
2. **Interakce (mechanismus účinku) bakteriocinů (koliciny, mikrocinu) s citlivými bakteriemi a možnosti jejich studia (mikrobiologické a molekulárně-biologické metody).**

II. Praktická část

1. **Studium vlivu multiprodukčních bakteriocinogenních kmenů E.coli izolovaných z potravin na sbírkové kmeny (Salmonella sp. a další) a nežádoucí gramnegativní bakterie izolované z potravin metodami mikrobiologickými a molekulárně-biologickými.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

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.

[2] RILEY, M a M CHAVAN. Bacteriocins: ecology and evolution. Berlin: Springer, c2007, x, 150 s. ISBN 978-3-540-36603-4.

[3] 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.

Dostupné z: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128>.

[4] ZIHLER, A., G. LE BLAY, T. DE WOUTERS, C. LACROIX, C.P. BRAEGGER, A. LEHNER, P. TISCHLER, T. RATTEI, H. HÄCHLER a R. STEPHAN. In vitro inhibition activity of different bacteriocin-producing Escherichia coli against Salmonella strains isolated from clinical cases. Letters in Applied Microbiology. 2009, vol. 49, issue 1, s. 31-38. DOI:

10.1111/j.1472-765X.2009.02614.x Dostupné z:

<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2009.02614.x>.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

24. dubna 2015

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

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 obhajoby ¹⁾;
- 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. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 § 60 ³⁾ 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 15.4.2015


.....

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 nevydělečně 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).

³¹ 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakteriociny jsou antimikrobiální proteiny či peptidy různých velikostí zaměřené proti citlivým kmenům stejného nebo blízce příbuzných druhů. Avšak v případě kombinace účinku různých bakteriocinů je možné pozorovat rozšíření inhibičního spektra. Multibakteriocinogenní kmen *Escherichia coli* 225 izolovaný z bažantů ve svém genomu kóduje koliciny E1, B, M, Ia/Ib a mikrocin B17. Tento kmen byl v předchozí práci vytipován pro další studium inhibice bakterií patogenních či způsobujících kažení potravin. Antibakteriální vlastnosti tohoto kmene byly testovány na vybraných gramnegativních bakteriích izolovaných z potravin a na sbírkových kmenech (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*). Na základě výsledků je možno potvrdit, že inhibiční aktivita produkčního kmene *E. coli* 225 proti kmeni *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 je nižší ve srovnání se třemi neprodukcními kmeny *Escherichia coli* a s kmenem *Shigella sonnei*. Zjištěný inhibiční účinek vpichovou metodou byl potvrzen dalšími mikrobiologickými metodami pouze u bakterií blízce příbuzných s *E. coli* (neprodukcční kmeny *E. coli* a *S. sonnei*). Inhibice gramnegativních bakterií dalších rodů (*Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*) izolovanou směsí bakteriocinů kmene *E. coli* 225 nebyla prokázána.

Klíčová slova: kolicin, *Escherichia coli*, inhibice, gramnegativní bakterie

ABSTRACT

Bacteriocins are antimicrobial proteins or peptides of various sizes active against sensitive strains of the same species or closely related species. However, an extended inhibitory spectrum can be seen in the case of multiple bacteriocin activity. Multiple bacteriocin production *Escherichia coli* strain 225, isolated from pheasants encodes colicins E1, B, M, Ia/Ib and microcin B17 in its genome. In the previous work this strain was selected for the further study of the inhibition of pathogenic bacteria or bacteria causing the food spoilage. The antibacterial properties of this strain were tested on selected Gram-negative bacteria isolated from food and on collection strains (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*). Results confirmed that the inhibitory activity of the producer strain *E. coli* 225 against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 is lower in comparison with three non-producing *Escherichia coli* strains, and *Shigella sonnei* strain. The inhibitory activity ob-

served by pin method was confirmed by other microbiological methods only for bacteria closely related to the *E. coli* (non-producing *E. coli* and *S. sonnei*). Inhibition of other genera of Gram-negative bacteria (*Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, and *Yersinia*) by mixture of bacteriocins isolated from *E. coli* strain 225 was not proved.

Keywords: colicin, *Escherichia coli*, inhibition, gramnegative bacteria

Na tomto místě chci poděkovat Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a trpělivost při zpracovávání diplomové práce.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BAKTERIOCINY	13
1.1 DEFINICE A CHARAKTERISTIKA BAKTERIOCINŮ.....	13
1.2 KLASIFIKACE BAKTERIOCINŮ	14
1.2.1 Grampozitivní bakterie.....	14
1.2.2 Gram-negativní bakterie.....	14
2 ESCHERICHIA COLI JAKO PRODUCENT BAKTERIOCINŮ	15
2.1 CHARAKTERISTIKA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	15
2.2 KOLICINY	16
2.2.1 Klasifikace kolicinů	17
2.2.2 Syntéza kolicinů	23
2.2.3 Obranný systém produkční bakterie.....	24
2.3 MIKROCINY.....	24
2.3.1 Mikrociny I. třídy	26
2.3.2 Mikrociny II. třídy.....	27
2.3.3 Mechanismus účinků mikrocinů	27
2.4 MNOHONÁSOBNÁ PRODUKCE BAKTERIOCINŮ	28
3 INTERAKCE BAKTERIOCINŮ S CITLIVOU BUŇKOU	30
3.1 VLIV PROSTŘEDÍ NA PRODUKCI KOLICINŮ	30
3.2 BAKTERIOSTATICKÉ ÚČINKY KOLICINŮ	31
3.3 METODY STUDIA BAKTERIOCINŮ.....	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	35
4 CÍL PRÁCE	36
5 MATERIÁL A METODY	37
5.1 PŘÍSTROJE	37
5.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	37
5.3 CHEMIKÁLIE.....	38
5.4 BAKTERIÁLNÍ KMENY	39
5.5 METODY.....	40
5.5.1 Studium inhibice – současná kultivace produkčního a citlivého kmene v tekutém médiu	40
5.5.2 Stanovení biologické aktivity kolicinů – kvalitativně.....	41
5.5.3 Stanovení biologické aktivity kolicinů - kvantitativně	41
5.5.4 Diluční mikrometoda	42
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	43
6.1 STANOVENÍ INHIBICE DIFUZNÍM TESTEM V AGARU	43
6.2 STANOVENÍ DYNAMIKY RŮSTU V TEKUTÉM MÉDIU	45
6.3 STANOVENÍ INHIBICE VYBRANÝCH GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ	50
6.3.1 Kapková metoda (kvantitativně)	51
6.3.2 Diluční metoda – dynamika růstu citlivých bakterií se surovou směsí bakteriocinů kmene <i>E. coli</i> 225.....	55

ZÁVĚR	64
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	66
SEZNAM TABULEK.....	73
SEZNAM OBRÁZKŮ	74
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	76

ÚVOD

Alimentární onemocnění jsou zpravidla infekční povahy a často je způsobují gramnegativní bakterie zejména z čeledi Enterobacteriaceae. Tato infekční onemocnění znamenají velké nebezpečí pro veřejné zdraví lidí a zvířat po celém světě. Mezi jedny z nejnebezpečnějších a široce distribuovaných alimentárních patogenů způsobujících každý rok onemocnění desítek milionů lidí na celém světě, patří bakterie rodu *Salmonella* a patogenní *Escherichia coli*. V posledních letech má v České republice výskyt infekčních onemocnění vyvolaných mikrobiálními patogeny mírně stoupající trend. U většiny těchto nemocí je využívána antibiotická léčba. Při použití antibiotik jsou bakterie ve snaze o svoje přežití schopny vyvíjet vlastní obranné mechanismy, které snižují účinky antibiotik.

Jelikož v dnešní době je účinnost antibiotik v důsledku rostoucí rezistence výrazně nižší než na počátku jejich užívání, je potřeba hledat nové možnosti ochrany proti patogenům způsobujícím alimentární onemocnění.

Jednou z možností zvýšení bezpečnosti potravin vůči patogenům je uplatnění antimikrobiálních látek (bakteriocinů) nejen grampozitivních, ale také gramnegativních bakterií. Bakteriociny slouží bakteriím v prostředí jako ekologická výhoda. Nejvíce bakteriocinů bylo popsáno z nepatogenní bakterie *Escherichia coli*. Vzájemné interakce kolicinů s citlivými buňkami řídí vnitrodruhovou konkurenci a podílí se na podpoře biologické rozmanitosti. Moudré využívání těchto přirozených obranných mechanismů bakterií skýtá nové možnosti pro kontrolu patogenů, zvýšení bezpečnosti a kvality potravin a s tím ruku v ruce zdraví lidí a zvířat.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIOCINY

1.1 Definice a charakteristika bakteriocinů

Bakteriociny jsou bohatá a různorodá skupina ribozomálně syntetizovaných antimikrobiálních peptidů produkovaných mnohými bakteriemi, které jsou schopny usmrtit konkurenční bakteriální druhy a zároveň nepůsobí škodlivě na produkční buňku díky specifickým imunitním proteinům [1].

Četnost a rozmanitost produkce bakteriocinů je mezi bakteriálními populacemi značně odlišná. Za tuto rozmanitost jsou pravděpodobně do značné míry zodpovědné dynamické interakce, které se vyskytují mezi buňkami. Rovněž produkce bakteriocinů je určena i místem, kde se populace bakterií vyskytuje a genomickým pozadím produkujících kmenů [2, 3].

Více než 99 % veškerých bakterií je schopno produkovat alespoň jeden bakteriocin. Většina z nich však doposud nebyla identifikována. Je proto zřejmé, že bakterie investují značné množství energie do výroby a zpracování těchto antimikrobiálních mechanismů pro zachování své vlastní ochrany. Bakteriociny mohou rovněž fungovat jako signální peptidy. Tyto peptidy se podílejí na bakteriální komunikaci buňky, přičemž fungují prostřednictvím extracelulárních difúzních signálních molekul tzv. quorum sensing, umožňující v populaci bakterií synchronizovat chování skupiny a usnadnit tak koordinované mnohobuněčné funkce [1, 3]. Schopnost bakteriocinů zabíjet je z těchto důvodů považována za úspěšnou strategii bakterií pro udržení vlastní populace a snížení počtu konkurentů v boji o dostatečné množství živin a životního prostředí [4].

Bakteriociny jsou tvořeny krátkými ribozomálně syntetizovanými proteiny. Ty jsou složené z C-koncového jádra a N-terminální vedoucí sekvence, která je rozpoznávána a štěpena peptidázou. Na peptidovém jádře mohou proběhnout posttranslační modifikace např. dehydratace, makro a heterocyklizace [5].

Genetické systémy se skládají z genů kódujících toxin a imunitního *imm* genu kódujícího protein umožňující bakteriím bránit se vůči vyprodukovanému bakteriocinu a zajistit si tak ochranu produkční buňky [6].

1.2 Klasifikace bakteriocinů

Na základě rozdílů ve stavbách buněčných stěn mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi je také odlišná konstrukce jejich bakteriocinů nejen z hlediska velikosti, ale také specifčnosti. Vnější membrána gramnegativních bakterií obsahuje receptory zodpovědné za antigenní vlastnosti O – antigenu a specifické proteiny nutné pro vazbu bakteriocinu. Naproti tomu grampozitivní bakterie mají vícevrstvou stěnu tvořenou peptidoglykanem bez vnější membrány. To zvyhodňuje malé peptidy, které pronikají do mureinové sítě bez vazby na specifický translokační receptor [7]. Jednou z možností dělení bakteriocinů je podle typu produkčního kmene [4].

1.2.1 Grampozitivní bakterie

Grampozitivní bakterie, zejména bakterie mléčného kvašení (LAB), jsou typické bakterie produkující bakteriociny různých velikostí, stavby, fyzikálně-chemických vlastností a inhibičního spektra. Tyto genově kódované bakteriociny jsou řazeny mezi nízkomolekulární antimikrobiální peptidy s méně než 60 aminokyselinami [4].

Bakteriociny grampozitivních bakterií jsou obecně rozděleny do třídy I (modifikované peptidy, lantibiotika), třídy II (nemodifikované peptidy, non-lanthionin) a třídy III (velké bílkoviny, tepelně však nestabilní) [4].

1.2.2 Gram-negativní bakterie

Gram-negativní bakterie produkují celou řadu bakteriocinů, které jsou konkrétně pojmenovány podle rodu (např. klebicingy od *Klebsiella pneumoniae*) nebo podle druhu (např. kolicingy od *E. coli*, marcescingy od *Serratia marcescens*, alveicingy od *Hafnia alvei*, kloacingy od *Enterobacter cloacae*) produkční bakterie. Bakteriociny produkované bakteriemi rodu *Pseudomonas* jsou obecně nazývány jako pyociny [8].

2 ESCHERICHIA COLI JAKO PRODUCENT BAKTERIOCINŮ

2.1 Charakteristika *Escherichia coli*

Escherichia coli jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporulující tyčinky. V anaerobním prostředí využívají různých mechanismů anaerobní fermentace za vzniku směsi produktů, zejména laktátu, sukcinátu, acetátu, etanolu a oxidu uhličitého. U *E. coli* je významná schopnost přenosu DNA bakteriální konjugací, transdukcí a transformací, což umožňuje horizontální přenos genetického materiálu a informací uvnitř existujících populací [9].

V rámci druhu *E. coli* se rozlišuje mnoho kmenů s velmi rozličnými vlastnostmi. Některé z těchto odlišností mohou být detekovány pouze na molekulární úrovni. Některé kmeny mohou mít patogenní vlastnosti, schopnost využívat neobvyklé zdroje uhlíku a v neposlední řadě i rezistenci vůči antibiotikům [9].

E. coli je řazena do čeledi *Enterobacteriaceae*. Tato čeleď se vyznačuje nejrozmanitějším a velmi propracovaným bakteriálním obranným systémem. Jedná se zejména o produkci různých obranných látek: antibiotik, lytických agens (bakteriofágy), nejrozmanitějších typů exotoxinů a bakteriocinů. Více než 30 bakteriocinů již bylo identifikováno a není pochyb, že jich bude v průběhu let objeveno ještě mnohem více [8, 10].

Zhruba polovina přírodních izolátů *Escherichia coli* jsou bakteriocinogenní, působící inhibičně na další *E. coli* nebo úzce příbuzné bakteriální druhy a rody. Hostitelskou specifitu určují vnější membránové proteiny, které jsou gramnegativními bakteriemi syntetizovány jako povrchové receptory [12, 13].

Produkce bakteriocinů *E. coli* závisí na prostředí z něhož byl hostitel izolován, na genetickém pozadí kmene a na typu hostitele. Přičemž množství a rozmanitost kolicinů izolovaných z býložravců a všežravců je výrazně vyšší než u masožravých savců. Hlavní příčinou tohoto rozdílu je doba trávení potravin gastrointestinálním traktem [14].

Samotná *Escherichia coli* je producentem dvou typů bakteriocinů rozdělujících se podle molekulových hmotností na koliciny a mikrociny.

Mikrociny mají velikost 1 až 10 kDa a jejich minimální inhibiční koncentrace jsou v nanomolárním rozsahu. Narušují širokou škálu funkcí v cílové buňce včetně ATP syn-

tetázy a DNA gyrázy. Koliciny mají velikost v rozmezí 30-80 kDa a patří k velmi účinným toxinům. K inhibici cílové buňky dostačuje pouze jedna molekula [15].

Koliciny a mikrociny jsou si v mnoha ohledech podobné, ale syntéza mikrocinů není letální pro produkční kmen a nedochází k poškození DNA, na rozdíl od kolicinů. Téměř všechny koliciny jsou kódované výhradně na plazmidových replikonech, kdežto geny pro mikrociny mohou být nesené na plazmidech nebo na chromozomu [1,16].

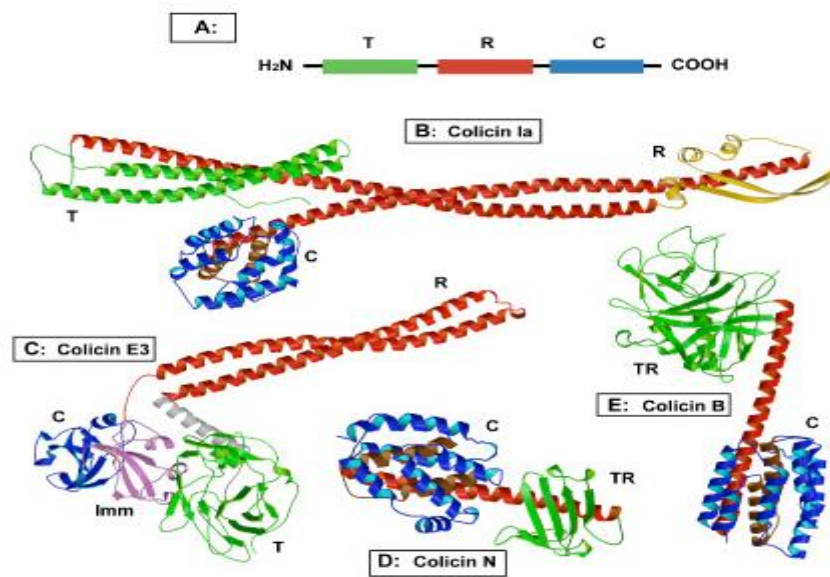
Koliciny i mikrociny mohou být buňkou produkovány současně nebo je buňka schopna produkovat hned několik kolicinů najednou [17].

2.2 Koliciny

Koliciny patří do heterogenní skupiny SOS-indukovaných vysokomolekulárních bakteriocinů, které jsou produkovány k aktivní inhibici růstu příbuzných prokaryotických buněk. Tyto toxiny jsou produkovány ve velkém množství a zpravidla jsou uvolňovány do extracelulárního média [12].

První kolicin (kolicin V) byl poprvé identifikován v roce 1925 belgickým biologem André Gratiou jako tepelně labilní produkt přítomný v kulturách *E. coli*. Název „colicin“ byl vytvořen Gratiou a Fredericqem v roce 1946 po prokázání proteinové povahy a specifčnosti jejich spektra účinku. V roce 1953 Jacob *et al.* poprvé použili termín „bacteriocin“ k označení kolicinů a jiných podobných toxických látek. Dnes je známo 34 druhů kolicinů, ale pouze 26 z nich je podrobně popsanych [8, 10].

Koliciny představují modulární proteiny s třemi lineárně organizovanými funkčními doménami působícími společně. Funkční domény tvoří: doména podílející se na rozpoznání specifického receptoru citlivé buňky, doména podílející se na translokaci kolicinu do citlivé buňky a doména zodpovědná za jejich toxický účinek. Tyto domény působí na citlivé bakterie třemi různými kroky. Prvním krokem je vazba na receptor zprostředkována R doménou, která se nachází ve střední části primární sekvence. N-terminální doména T zprostředkovává druhý krok, přesun kolicinů z vnějšího membránového receptoru k danému cíli v buňce. Za inhibiční účinek je zodpovědná karboxy-terminální C doména [18]. U různých typů kolicinů se liší v závislosti na struktuře a funkci, přičemž výměnou jiného typu C – koncové domény lze zaměnit toxickou aktivitu kolicinu [15].



Obr. 1. Grafické znázornění struktury kolicinu, složeného ze tří domén: T-translokační (zelená barva), R-receptorová (červená barva), C-cytotoxická (modrá barva)[50].

2.2.1 Klasifikace kolicinů

Klasifikace a nomenklatura je dána na základě interakcí kolicinů s citlivou bakteriální buňkou. Podle receptorové specifity se značí velkými písmeny. Při současném navázání více kolicinů na jeden receptor se připojují za písmena číslice. Navázáním na povrch specifických receptorů cílových buněk se koliciny přemisťují přes vnější membránu na cytotoxické místo působení. Receptorová doména interaguje s β -soudkovým proteinem ve vnější membráně, který se za normálních okolností podílí na importu živin a iontů, a to zejména vitamínů, sacharidů a Fe^{3+} [19].

N-terminální translokační doména prochází přes vnější membránu ve většině případů prostřednictvím interakce s dalším membránovým proteinem. Ten působí jako translokátor a napomáhá přestupu kolicinu přes zevní a vnitřní membránu cílové buňky a transportu kolicinu periplazmou prostřednictvím interakcí s proteiny označovaných jako Tol nebo Ton systém v hostitelské periplazmě [10, 19].

Při samotné inhibici cílové buňky musí však koliciny překonat obrovskou fyzickou bariéru: vnější membránu tvořenou dvojrůstvou lipopolysacharidů situovanou na vnější straně její dvojrůstvy s jejími malými póry (10 až 20 Å v průměru) [20].

Podle mechanismu translokace přes vnější membránu cílové buňky (např. OmpF nebo OmpC) jsou následně koliciny klasifikovány do dvou skupin - A nebo B.

Skupina kolicinů A

K transportu přes vnější membránu je využíván Tol-dependentní translokační systém tvořený třemi proteiny vnitřní membrány TolQ, TolR, TolA, jedním periplazmatickým proteinem TolB a Pal-lipoproteinem vnější membrány. Do této skupiny řadíme kolicin A, E1-E9, K, L, N, S4, U, Y a kloacin DF 13. Skupina je kódována malými plazmidy (6-10 kb) a uvolňována do média [10, 21].

Skupina kolicinů B

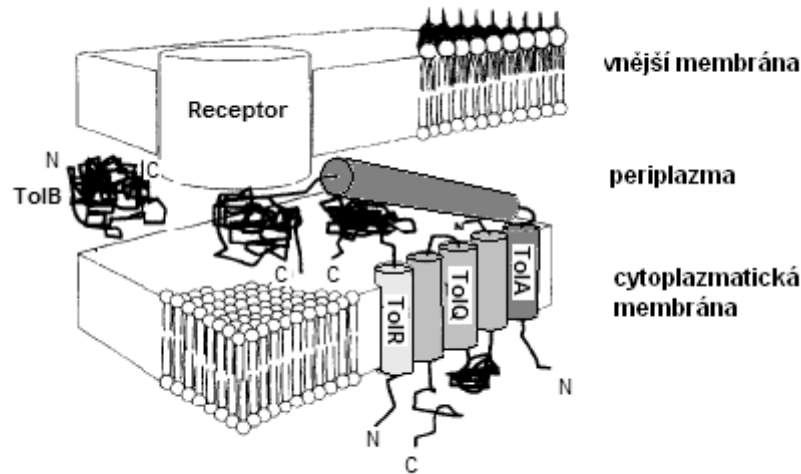
U této skupiny je k translokaci využíván Ton-systém složený ze tří proteinů vnitřní membrány TonB, ExbB a ExbD. Do této skupiny kolicinů kódovanou velkými plazmidy (40 kb) řadíme kolicin B, D, H, Ia, Ib, M, V a X [10].

Samotná translokace kolicinů přes vnější membránu ovšem stále není dostatečně objasněna. Předpokládá se však, že mechanismus přenosu přes vnější membránu pomocí Tol-dependentního systému je pravděpodobně odlišný od Ton-dependentního systému [22].

Všechny koliciny A a koliciny E (s výjimkou kolicinu E1 a N) vyžadují pro vstup do buňky vnější membránové proteiny Omp (outer membrane proteins). Po vazbě kolicinu na buněčný povrchový receptor BtuB (receptor pro vit.B12) R-doménou dochází k transportu N-konce zevní membránou, kde pomocí OmpF (trimerní porinový kanál složený ze tří β -soudků) a Tol systému proteinů vstupují do periplazmy. Vzniklá vazba BtuB-OmpF-kolicin vytváří transportní systém umožňující transport do buňky. Zde dochází k interakci s TolB proteinem, jenž je pomocí Pal-lipoproteinu ukotvený blízko porinu. C-terminální doména následně vytváří póry v cytoplazmatické membráně [23].

Důležitost Tol membránových proteinů spočívá v udržení kolicinu v rozložené konformaci, která mu napomáhá překonat periplazmu a dostat se ke konečnému cíli v cytoplazmatické membráně nebo cytoplazmě [23].

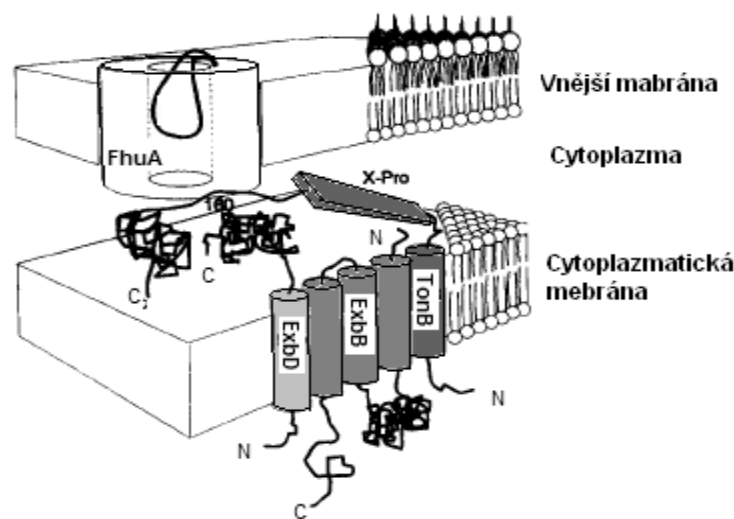
Kolicin N jako jediný používá současně k vazbě a k translokaci OmpF protein. Kolicin E1 pro translokaci nevyužívá OmpF, ale spíše kanál TolC [22].



Obr. 2. Grafické znázornění umístění proteinů Tol systému v buněčném povrchu. V cytoplazmatické membráně jsou ukotveny proteiny TolA, TolQ a TolR. Protein TolB je přítomen v periplasmě. Součástí vnější membrány je lipoprotein Pal, který však na obrázku není znázorněn [51].

V porovnání s translokací kolicinů skupiny A je v současnosti velmi málo informací o transportu kolicinů skupiny B. Koliciny skupiny B jsou různorodou skupinou proteinů, ať už se jedná o velikost, receptorovou specifitu a způsob působení. Jejich společným jménem je „TonB box“, který představuje pentapeptid v N-proximální poloze. Vlastní funkce TonB systému spočívá v transdukci energie z vnitřní membrány na specifické receptory vnější membrány, které se podílí na importu sideroforu (látky schopné vázat železo) nebo vitamínů B [4].

Na rozdíl od Tol-systému není v TonB-systému vazba kolicinu na receptor energeticky závislý proces. Zdrojem energie jsou zde oxidoredukční děje na plazmatické membráně. Pro translokaci periplazmou je nutný komplex proteinů TonB, ExbB a ExbD. Samotná translokace začíná rovněž navázáním R-domény na receptory, jenž způsobí konformační změny ve struktuře receptorů a umožní tak vstoupit N-konci molekuly kolicinu do kanálu receptoru. N-konec kolicinu se následně naváže na TonB protein ukotvený v cytoplazmatické membráně. Tato interakce umožní transport C-domény kolicinu k buněčnému cíli.



Obr. 3. Grafické znázornění umístění proteinů TonB systému v buněčném povrchu. V cytoplazmatické membráně jsou ukotveny proteiny TonB, ExbB a ExbD. Ton B je oblast bohatá na prolin (X-Pro) pomáhající spojit cytoplazmatickou membránu s vnější membránou [51].

Zbývající krok je samotný letální účinek na cílovou buňku a podle něj se koliciny zařazují do tří kategorií:

1. koliciny depolarizující plazmatickou membránu (A, E1, K, N, U, B, Ia, Ib, 5, 10, S1, S4, Y, Js, L);
2. koliciny působící jako DNAázy (E2, E7, E8, E9) nebo RNAázy (E3, E4, E5, E6, kloace DF13, D) [24];
3. koliciny degradující peptidoglykan (pouze kolicin M) [10].

Koliciny depolarizující plazmatickou membránu

Jedná se o kompaktní ve vodě rozpustné proteiny o velikosti 449-629 aminokyselin, jejichž baktericidní účinek spočívá ve vytvoření iontových kanálů ve vnitřní membráně k úniku cytoplazmy, destrukci elektrochemického gradientu, ztrátě iontů a následné buněčné smrti [1]. Mezi nejvíce prostudované koliciny patří koliciny A, E1, Ia, N a B složených z pevně sbalených deseti α -šroubovic (H1-H10). Jejich hydrofobní N-konec je tvořen spirálovou vlásenkou (H8-H9) oddělenou od vodní fáze dalšími osmi většinou amfipatickými šroubovicemi (H1-H8) [22].

Počáteční vazba kolicinu na membránu je zpravidla za určitých podmínek nevratná. Pomocí unikátního hydrofobního segmentu se šroubovicemi H8-H9 dochází k vazbě kolicinu na membránu, kde interaguje s hydrofobním jádrem. Mezitím se osm ostatních hydrofilních šroubovic H1-H8, z nichž mnohé jsou při zachování sekundární struktury amfipatické, roztáhne na povrch dvojvrstvy. Při interakci C-domény s fosfolipidy dochází ke konformačním změnám. Dojde k rozpadnutí globulární terciální struktury, přičemž sekundární struktura se zachová [22]. Tímto způsobem se šroubovice kolicinu spolu s membránovými lipidy podílí na tvorbě membránových kanálů. Otevřený kanál umožňuje průchod jednocenných iontů, což vede k odvodu zejména kationtových iontů (H^+ , K^+ , Na^+) a narušení elektrochemického gradientu cílové buňky způsobující depolarizaci cytoplazmatické membrány [20]. Iontové kanály jsou regulovány transmembránovým napětím, přičemž se otvírají při pozitivním a zavírají se při negativním náboji na cytoplazmatické straně membrány. Velikost kolicinového póru se přibližně pohybuje okolo 10 Å [10, 22].

Koliciny s nukleázovou aktivitou

Jedná se o koliciny s větším rozsahem velikosti, která se pohybuje mezi 178-777 aminokyselinami [1]. Většina těchto enzymatických kolicinů s nukleázovou aktivitou vyvolává buněčnou smrt prostřednictvím hydroláz nebo transferáz, které působí na fosfodiesterové vazby v bakteriální cytoplazmě [24]. Jedná se o různorodou skupinu cílových enzymů genomové DNA (DNázy), 16S rRNA (rRNázy) nebo tRNA (tRNázy) [22].

Translokace přes vnější membránu a periplazmatický prostor je velmi podobný s koliciny tvořícími póry, avšak rozdíly jsou v případě plazmatické membrány [20]. U pórotvorných kolicinů v případě navázání C-domény na cytoplazmatickou membránu dojde k značným konformačním změnám, které následně umožní cytotoxické doméně tvorbu pórů. Nukleázové koliciny však vyžadují transport C-domény až do cytoplazmy bakterií, kde mohou interagovat s fosfodiesterovými vazbami přítomných v DNA, 16S rRNA nebo tRNA. Samotný mechanismus transportu kolicinu s nukleázovou aktivitou přes plazmatickou membránu buňky je zatím málo prozkoumaný. Jednou z možností translokace přes vnitřní membránu představuje spojení nukleázových kolicinů s aniontovými fosfolipidy. Toto spojení vyvolává konformační změny nukleázových domén. Konformační přeskupení usnadňuje další specifické hydrofobní interakce, které řídí hloubku zanoření a destabilizaci membrány [22, 25]. Nukleázové koliciny v této fázi jsou strukturně podobné kolicinům tvořícím póry, kdy dochází k rozrušení terciální struktury a sekundární struktura je zacho-

vána. Nukleázové toxiny jsou umístěny v C-terminální doméně o velikosti 90-130 aminokyselin [22].

DNázové koliciny patří k enzymům závislých na kovech, které degradují DNA náhodně. V současné době jsou do této skupiny zařazovány koliciny E2, E7, E8, E9. Enzymy jsou tvořeny z centrálního 3-vláknitého antiparalelního β -listu obklopeného helixy s konkávním aktivním místem pro vazbu DNA. Jádro aktivního místa DNázových kolicinů je tzv. HNH motiv. Předpokládá se, že kolicinové DNázy vyvolávají buněčnou smrt prostřednictvím náhodného zničení bakteriálního genomu. Nejpravděpodobněji tato smrt nastává v důsledku zlomů na dvojšroubovici po opakovaném dělení DNA [22].

Všechny RNázové koliciny (E3, E4, E5, E6 a D) jsou schopny vyvolat buněčnou smrt inhibicí syntézy proteinů štěpením specifických fosfodiesterových vazeb na RNA. Tyto enzymy však nevyžadují ionty kovů jako kofaktory. Kolicinové RNázy jsou rozděleny do dvou různých skupin: koliciny štěpící 16SrRNA (koliciny E3, E4 a E6) a koliciny štěpící jednotlivé antikodonové smyčky tRNA (kolicin E5, D) [22].

Koliciny degradující peptidoglykan

Kolicin M je složený z 271 aminokyselinových zbytků a řadí se mezi jeden z nejmenších ribozomálně tvořených bakteriocinů (28 kDa) produkovaných bakteriemi *E. coli*. Je často kódován na velkých plazmidech a způsobuje lyzi cílových buněk, přičemž sám produkční kmen je chráněn proti vlastní lyzi buňky imunitním proteinem [26]. Jeho výjimečnost mezi ostatními toxiny spočívá v tom, že působí přímo v periplazmě a specificky inhibuje biosyntézu peptidoglykanu. Hydrolýzou pyrofosfátu dochází k rozštěpení vazby mezi prekurzorem mureinu a lipidickým nosičem C₅₅-polyisoprenolem podílejícím se na přemístění prekurzoru přes plazmatickou membránu do periplazmy. Po odštěpení C₅₅-polyisoprenolu od pyrofosfátu a zbytku vzniklého produktu (1-pyrophospho-MurNac-pentapetid-GlcNAc) vstupuje do stavebního cyklu peptidoglykanu, kdy dochází k zastavení biosyntézy a lyzi buněk. Jelikož C₅₅-polyisoprenol je rovněž nositelem O-antigenů přes plazmatickou membránu, dochází také při rozštěpení k inhibici přenosu O-antigenů na jádro lipopolysacharidu, což však nemusí vést k následné buněčné smrti [12, 18].

Tab. 1. Využití různých receptorů proteinů a způsoby translokace skupiny kolicinů A a B k proniknutí do bakterií [19].

Kolicin	Receptor	Transportní systém	Cytotoxická aktivita
Skupina A			
E1	BtuB	TolC, TolQ, R, A	Vytvářejí póry
E2, E7, E8, E9	BtuB	OmpF, TolQ, R, A, B	DNázy
E3, E4, E6	BtuB	OmpF, TolQ, R, A, B	16s rRNáza
E5	BtuB	OmpF, TolQ, R, A, B	Antikodon rRNázy
N	OmpF	TolQ, R, A	Vytvářejí póry
K	TSX	OmpF, OmpA, TolQ, R, A, B	Vytvářejí póry
U, bakteriocin 28b	OmpA	OmpF, LPS, TolQ, R, A, B	Vytvářejí póry
Kloacin DF13	lutA	TolQ, R, A	16s rRNáza
Skupina B			
5, 10	TSX	TolC, Ton B, EXB B, D	Vytvářejí póry
Ia, Ib	Cir	TolC, Ton B, EXB B, D	Vytvářejí póry
B	FEPA	TolC, Ton B, EXB B, D	Vytvářejí póry
D	FEP	TolC, Ton B, EXB B, D	tRNáza
M	FHU	TolC, Ton B, EXB B, D	Inhibitor syntézy peptidoglykanu

2.2.2 Syntéza kolicinů

Schopnost produkce kolicinu je uložena na kolicinogenním plazmidu označovaném jako pCol plazmid. Operon Col plazmidu je zpravidla tvořen třemi důležitými geny kódující vlastní kolicin, imunitní protein a lytický protein [22].

Za regulaci syntézy kolicinů je zodpovědný SOS – systém, podílející se na kontrole exprese genů zodpovědných za opravu poškozené DNA. Za normálních podmínek je syntéza

kolicinů vypnutá. Pouze velmi malá část bakterií syntetizuje kolicin jako důsledek spontánní reakce SOS systému. Jakmile však dojde k poškození buněčné DNA, aktivuje se proteáza RecA a nastává transkripce kolicinových genů. Zpětná vazba umožňuje zpočátku výraznou expresi genů proteinu RecA. Postupně však dochází k jejímu utlumení zvýšenou syntézou promotoru LexA. Před geny pro syntézu kolicinů se nacházejí dva částečně překrývající se SOS boxy, které utlumují expresi genů pro kolicin, imunitní protein a lytický protein [27].

2.2.3 Obranný systém produkční bakterie

Ochrana kolicinogenních bakterií před působením molekuly vlastního kolicinu je zajištěna pomocí *imm* genu kódující imunitní protein, jenž je součástí všech velkých Col plazmidů a *kil* genu kódující lytický protein přítomný pouze v malých Col plazmidech [27]. Imunitní protein je malý polypeptid o velikosti 11-18 kDa, jenž je kódován na stejném plazmidu jako kolicin [22, 28]. Tento protein interaguje specificky s C-koncovou doménou kolicinu ve vnitřní membráně buňky, čímž jej činí neaktivní [22, 19]. Hlavním úkolem lytického proteinu je snadnější uvolňování vytvořeného kolicinu z produkční buňky do okolí [27].

Imunitní protein nukleázových kolicinů chrání produkční buňku před působením exogenních i endogenních toxinů. Je tvořen přímo v cytoplazmě, kde vazbou na C-terminální doménu daného kolicinu vytváří heterodimerní komplex. Tento inaktivní komplex se váže na receptor cílové buňky. V určitém okamžiku po navázání dochází k uvolnění a transportu imunitního proteinu do cytoplazmy, čímž se aktivuje toxická doména. Ta následně inaktivuje nukleázovou doménu kolicinu [22, 19].

Obranný mechanismus pórtvorných kolicinů chrání buňky pouze před působením exogenních kolicinů produkovaných sousední buňkou, kdy dokáže zabránit otevření kanálu nebo blokovat již otevřený kanál. Ochrana před působením vlastního kolicinu není však nutná, jelikož polarita transmembránového potenciálu je opačná, než je potřeba k otevření pórů [22].

2.3 Mikrocin

Mikrocin jsou ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy s nízkou molekulovou hmotností (<10 kDa). Ty mohou být dále podrobeny komplexní posttranslační modifikaci, která souvisí s produkcí enzymů kódovaných v genových klastrech mikrocinů a upravených proteolytickým štěpením. Typické genové klastry, které jsou umístěny na plazmidech

nebo na chromozomu, obsahují dva geny kódující sekreční proteiny a imunitní proteiny [29].

Syntéza mikrocinů je silně aktivována, jestliže buňky dosáhnou stacionární fáze růstu a dochází k vyčerpání živin a hladovění. Je předpoklad, že produkcí mikrocinů buňka inhibuje fylogeneticky příbuzné bakteriální druhy citlivé na účinky mikrocinů. Tím získá bakteriální buňka více živin pro sebe [30, 31, 32].

Nedávné studie prokázaly, že mnoho mikrocinů využívá jako translokátory homologní ABC proteiny. Ty používají ATP hydrolyzu jako zdroj energie pro export. Tyto dopravníky tvoří transmembránový komplex se dvěma zakotvenými proteiny v plazmatické membráně a na vstupu do periplazmy. Třetí protein je ukotven na vnější membráně, kde zajišťuje finální export směrem k vnější straně buňky. Vnitřní membránové proteiny zodpovědné za zavádění mikrocinu do periplazmy jsou kódovány dvěma geny patřícím do genetického systému mikrocinů. Vnější membránový protein zapojený do exportu mikrocinů je membránový protein TolC složený z 12- β -barelů pokrývajících vnější membránu, spojený s dlouhým α -helikálním kanálem, který proniká daleko do periplazmy [33].

Většina mikrocinů je vázána na vnější receptory cílových buněk, které se podílejí na absorpci železa. Samotné uvolnění mikrocinů není důsledkem buněčné lyzy, spíše jsou mikrocinové molekuly aktivně vylučovány z buňky. Široká škála mikrocinových struktur vede k rozmanitosti mechanismu účinků, např. k inhibici vitálních funkcí nebo enzymatickému poškození vnitřní membrány. Avšak samotný způsob inhibice cílové buňky mikrocinem není doposud obecně znám [34, 35].

Mikrociny jsou klasifikovány do dvou kategorií v závislosti na molekulové hmotnosti, na přítomnosti disulfidových vazeb a post-translačních modifikací. Mikrocinová třída I zahrnuje plazmid-kódující peptidy s nižší molekulovou hmotností (>5 kDa), které podstupují rozsáhlé posttranslační modifikace. Třída II obsahuje peptidy o vyšší molekulové hmotnosti (5-10 kDa), jež se dále dělí do dvou podtříd. Podtřída IIa zahrnuje mikrocinové molekuly postrádající posttranslační modifikace, které mohou vlastnit v molekule až dvě disulfidové vazby. Do třídy IIb se řadí chromozomálně kódované lineární mikrocinové molekuly s možností posttranslační úpravy terminálního C-konce svého řetězce [17].

Tab. 2. Klasifikační schéma mikrocinů produkovaných bakteriemi *E. coli* [4].

Třída	Mikrocin	Molekulová hmotnost	Charakteristika
I	B17	3094	Nízkomolekulární peptidy (<5 kDa), posttranslačně modifikované
	C7/C51	1177	
	D93	< 1000	
	J25	2107	
II			Větší peptidy (5-10 kDa), s možností posttranslační modifikace
IIa	L	8884	Pro syntézu funkčních peptidů je zapotřebí více než jeden gen
	V	8741	
	N/24	7274	
IIb	M	7284	Lineární peptidy s posttranslační úpravou C-konce
	H47	4865	

2.3.1 Mikrocin I. třídy

Mikrociny I. třídy vykazují společné vlastnosti: (i) nízkou molekulovou hmotnost, (ii) vysoce neobvyklé konstrukce díky rozsáhlým posttranslačním modifikacím a (iii) působení na základní molekulární nástroje v cytoplazmě citlivých buněk. Geny zodpovědné za produkci posttranslačně modifikovaných mikrocinů jsou úzce seskupeny a kódovány na plazmidech. Kromě strukturálního genu kódující prekursor mikrocinu obsahuje každá skupina ještě geny, které jsou nezbytné pro posttranslační modifikace a geny zodpovědné za odvádění vyprodukovaných mikrocinů z produkční buňky čímž vytvářejí odolnost buňky vůči působení vlastních toxinů. Každý exportní protein nebo proteinový komplex je specifický pouze pro daný mikrocin. Z tohoto důvodu buňky produkující konkrétní mikrocin zůstávají citlivé na působení jiných mikrocinů [32].

2.3.2 Mikrociny II. třídy

Do této třídy jsou zařazovány mikrociny s vyšší molekulovou hmotností, jejichž peptidové řetězce podstupují rozsáhlé posttranslační modifikace v podobě disulfidových můstků, případně se vážou na molekuly sideroforu, kde jsou rozpoznávány receptorem citlivé buňky. Vlastní struktura je složená z genu kódující prekursor mikrocinu sousedního imunitního genu a alespoň ze dvou genů kódujících membránové proteiny: ABC přenašeč (ATP vazebnou kazetu) a protein odpovědný za sekreci toxinu. ABC protein je vždy složen alespoň ze dvou domén: transmembránové domény (TMD) a domény vázající se k nukleotidu (NBD) [33].

2.3.3 Mechanismus účinků mikrocinů

Způsob interakce mikrocinů s citlivými buňkami je v zásadě zcela shodný s působením kolicinů, které bylo uvedeno výše. Mikrocin reaguje se specifickým receptorem. Na povrchu vnější membrány dojde k postupnému přemístění přes buněčnou stěnu a plazmatickou membránu, kde dochází k reakci s cílovou strukturou příslušné buňky [36].

Počáteční rozpoznávací dráhy jsou společné pro několik mikrocinů. S výjimkou MccB17, využívající pro vstup do periplazmy vnější membránové receptory porinu a OmpF, všechny ostatní mikrociny jsou vázány na vnější membránové receptory s železnými siderofory. Pomocí spojené energie transdukčního systému TonB-ExbB-ExbD vytvářejí vnitřní membránový komplex. Mikrociny jsou následně aktivně převedeny do periplazmy prostřednictvím Ton systému, který používá hybnou sílu z protonové energie vnitřní membrány. Jakmile mikrociny dosáhnou buněčných cílů, citlivé bakterie uplatňují vlastní antibakteriální aktivitu. U mikrocinů třídy I jsou cílem intracelulární enzymy zodpovědné za DNA nebo RNA syntézy. Z těchto důvodů musí tyto peptidy proniknout přes vnitřní membránu. Mikrociny menších rozměrů MccB17, MccJ25 vyžadují pro vstup do cytoplazmy vnitřní membránový protein SbmA, kde působí na cílové DNA gyrázy a RNA polymerázy [31]. Třída mikrocinů II se zaměřuje na plazmatickou membránu. Studie prokázaly, že MccE492 interaguje s vnitřní membránou, čímž destabilizuje membránový potenciál tvorbou pórů. MccV rovněž narušuje membránový potenciál u *E. coli*, avšak v tomto případě nebyla prokázána tvorba pórů [31].

2.4 Mnohonásobná produkce bakteriocinů

V případě bakterie *E. coli* většina bakteriocinogenních kmenů kóduje více než jeden typ bakteriocinu. Řada bakteriocinů se vyskytuje společně s dalšími typy bakteriocinů mnohem častěji než by se dalo čekat. Z pohledu bakterie je mnohonásobná produkce bakteriocinů výhodná. Jestliže společenství tvoří populace citlivých buněk a dvě populace produkčních buněk, z nichž každá kóduje jiný typ bakteriocinů pak každý z těchto producentů je schopen zabít druhého producenta a stejně tak citlivé buňky. Pokud však jedna z produkčních buněk je schopna rekombinace genu pro další typ kolicinu, pak tento vícenásobný producent kolicinu je schopen zabít nejen citlivé buňky, ale i buňky kódující pouze jeden typ kolicinu. Neexistují však žádné údaje, které by prokázaly, že např. kolicin Ia a MccV vyřadí z konkurence kmen produkující pouze jeden z těchto bakteriocinů [8].

Pravděpodobnost, že kmen bude produkovat více bakteriocinů je ovlivněna členstvím kmene ve fylogenetické skupině [8]. Kmeny *E. coli* jsou zařazovány do čtyř fylogenetických skupin A, B1, B2 a D lišících se od sebe výskytem v ekologických nikách a ve schopnosti vyvolat onemocnění [37]. V případě humánních izolátů je velmi pravděpodobné, že kmeny skupiny B2 produkují více bakteriocinů v porovnání s kmeny skupiny A nebo B1. Avšak v případě izolátů získaných ze zvířat s největší pravděpodobností více bakteriocinů produkují kmeny skupiny A [8].

Analýzou 266 humánních kmenů *E. coli* izolovaných z australské populace bylo zjištěno, že 38 % kmenů produkovalo alespoň jeden bakteriocin, 24 % kmenů produkovalo jeden nebo více kolicinů a 20 % kmenů produkovalo jeden nebo více mikrocinů. Výskyt mitomycinem indukovatelných bakteriofágů byl zjištěn u 7 % kmenů. Ze 102 bakteriocinogenních kmenů 42 % produkovalo pouze jeden druh bakteriocinu, 41 % produkovalo dva typy, 16 % produkovalo tři a jeden kmen produkoval čtyři bakteriociny [38].

K bakteriocinům, které se statisticky významně často vyskytují současně v jednom produkčním kmeni, patří koliciny B a M, mikrocin H47 a M a rovněž kolicin Ia a MccV. Kolicin E1 se vyskytuje společně s kolicinem M pouze v případě, že kmen nekóduje rovněž kolicin B. Podobná situace je i v případě kolicinu E1 a Ia. Tyto dva koliciny se objevují společně pouze za předpokladu nepřítomnosti MccV. Rovněž byly zjištěny dvě významné kombinace tří bakteriocinů. MccJ25 se vyskytoval společně s kolicinem Ia a MccV, avšak nikdy samostatně pouze s kolicinem Ia nebo Mcc V. Slabší asociace pak byla pozor-

rována mezi mikrocinem C7 a mikrociny H47 a M [38]. Naproti tomu je mnohem málo pravděpodobné, že se spolu vyskytnou mikrociny H47 a MccV [8].

U kmenů s těmito nenáhodnými kombinacemi bylo zjištěno, že vždy alespoň jeden z bakteriocinů je z produkční buňky vylučován raději než že by byl uvolněn rozpadem buňky. Samotná lyze buňky představuje značné nároky na populaci buněk produkujících kolicin v souvislosti s přenosem plazmidu a syntézou kolicinů [8].

3 INTERAKCE BAKTERIOCINŮ S CITLIVOU BUŇKOU

3.1 Vliv prostředí na produkci kolicinů

Bakteriociny jsou schopny působit na konkurenty a umožnit tak invazi vlastního kmene do zavedené mikrobiální komunity. Zároveň však mohou také zabránit invazi jiných kmenů nebo druhů do již obsazené niky. Invaze a následné působení kolicinů na konkurenční kmeny ve strukturovaném prostředí (pevné médium) je mnohem širší, než v nestrukturovaném prostředí (tekuté médium). V nestrukturovaném prostředí produkční bakterie existují jako náhodně rozmístění jednotlivci, kteří se mohou prosadit pouze v případě vyššího počtu. Malá populace producentů toxinů pak zpravidla nenapadá zavedenou populaci buněk. Důvodem je zřejmě vysoká daň, kterou producent toxinu musí zaplatit (energetické nároky na udržení plazmidu a tvorbu inhibičních proteinů) v porovnání s nízkým přínosem, kdy toxický účinek vůči citlivým buňkám je minimální a růstová rychlost je vlivem nesení Col plazmidu snižena. Naopak ve vhodném prostředí např. agar na misce kmeny rostou jako jednotlivé kolonie, přičemž produkovaný toxin se šíří z kolonie producenta a působí inhibičně na citlivé konkurenční buňky. Přístupy ke zdrojům živin jsou následně pouze pro producenta toxinů, který může zvýšit frekvenci rozmnožování a zcela vytlačit konkurenční druhy a kmeny [39].

Současné poznatky naznačují, že produkce a uvolňování kolicinu je řízena regulátory, které jsou schopny reagovat na složení živin daného prostředí. Tím je určen růst a rozmanitost bakteriálního společenství. Faktory typu a množství živin v životním prostředí tak mohou mít značný dopad na dynamiku růstu kolicinogenních bakterií a zachování biologické rozmanitosti [40].

Pro zjištění rozdílů dynamiky růstů bakterie *E. coli* v závislosti na růstových podmínkách byly zkoumány kmeny produkující kolicin E2, odolné neprodukční kmeny a citlivé kmeny na kolicin E2. Všechny tři kmeny byly naočkovány do třech tekutých růstových médií o různém složení (LB agar, M9 agar obohacený o 1 % aminokyselin a M9 agar obohacený o 4 % glukózy). Pomocí video-mikroskopie s časovou prodlevou byla několik dní sledována dynamika růstu u fluorescenčně značených kmenů. Během pozorování byly zaznamenány značné rozdíly v růstu buněk. Produkčním a rezistentním buňkám se dařilo ve všech třech médiích na rozdíl od citlivých buněk. V LB agaru a M9 agaru obohaceného o aminokyseliny vykazovaly citlivé buňky slabý většinou vláknitý růst nebo u nich proběhla lyze buňky. Znamená to, že se staly obětí kolicinu. Avšak v agaru M9 obohaceném o glukózu

docházelo u citlivých buněk k exponenciálnímu růstu i v těsné blízkosti produkčních buněk, přičemž si citlivé buňky udržely růstovou fází i poté, co produkční i rezistentní kmeny již přestaly růst. Z pozorování vyplývá, že nedocházelo k uvolňování kolicinu produkční buňkou v prostředí obohaceném o glukózu. Zjištěné výsledky tudíž naznačují, že dostupné živiny mohou rozhodnout o úspěchu kolonizovat určité prostředí a můžou mít hluboký vliv na biologickou rozmanitost [40].

3.2 Bakteriostatické účinky kolicinů

Mezi různými typy ribozomálně syntetizovaných antimikrobiálních molekul mají právě koliciny největší specifitu týkající se daného kmene v rámci téhož druhu. Extrémně vysoká specifita kolicinů je zvláště výhodná v případě zaměření jednoho bakteriálního kmene na inhibici určitého druhu patogenu bez toho, aby došlo k narušení jiného mikrobiálního společenství. Tyto kolicinogenní kmeny schopny inhibice patogenů kolonizující gastrointestinální trakt drůbeže, skotu a prasat, mají však nízký účinek na většinu prospěšných střevních bakterií. Z tohoto důvodu je snahou využívat koliciny pro kontrolu výskytu salmonel u drůbeže. Přičemž u 13 různých kolicinů, k nimž patří kolicin E2, E8, E7 byla zjištěna schopnost inhibice 11 patogenních kmenů. Kolicinogenní *E. coli* byly rovněž aktivně zkoumány k inhibici enterohemoragického kmene *E. coli* O157:H7. Výsledek studie prokázal, že kolicin E1 je schopen inhibice *E. coli* O157:H7 izolovaného z jatečně upraveného hovězího masa [41].

Mikrocin J25 (MccJ25) produkovaný bakteriemi *E. coli* řadíme k peptidovým antibiotikům jehož příjem do buňky je zprostředkováván pomocí vnějších membránových receptorů FhuA a vnitřních membránových receptorů TonB, ExbB, ExbD a SbmA. Výzkum zaměřený na citlivost některých sérovarů *Salmonella enterica* ukázal, že MccJ25 je vysoce účinný pouze proti některým sérovarům, zatímco *S. typhimurium*, *S. derby* a některé kmeny *S. enteritidis* jsou zcela rezistentní. Rezistentní kmeny se staly citlivé na MccJ25 jestliže do jejich genu byl začleněn gen pro protein FhuA z *E. coli*. Z výzkumu vyplynulo, že rezistence určitých sérotypů je dána neschopností proteinu FhuA zprostředkovat pronikání MccJ25 do buňky a inhibovat tak nejen RNA polymerázu, ale také buněčné dýchání. Rovněž byl u MccJ25 zjištěn dlouhotrvající účinek na salmonely. Buňky, které byly vystaveny účinkům mikrocinů zůstávají životaschopné, avšak nejsou schopné růst a vytvářet kolonie. Je pozoruhodné, že bakteriostatické účinky vyvolané mikrocinem se liší od běžných antibiotik v tom, že buňky nejsou schopny obnovit růst ani po odstranění mikrocinů

z prostředí. Tato trvalá inhibice růstu je zřejmě způsobena v důsledku těsné asociace mikrocínů s buňkou. Na rozdíl od běžných antibiotik, která volně difundují do nebo z buňky, jsou mikrocinu trvale zachyceny v cytoplazmě [42].

Při hledání možných nových probiotických látek byly výzkumy zaměřeny také na gram-negativní bakterie. Z této skupiny bakterií stojí za zmínku zejména kmen *E. coli* H22. Tento kmen produkuje několik bakteriocinů včetně mikrocinu C7 a kolicinu Ib a E1. U mikrocinu C bylo prokázáno, že je schopen inhibice *in vitro* na řadě patogenních enterobakterií včetně *Klebsiella pneumoniae* a *Salmonella* sp. [3]. Následně prováděné *ex vivo* testy podaly důkaz o tom, že kmen *E. coli* H22 podávaný laboratorním myším dokázal během šesti dnů snížit fekální populaci *Shigella flexneri* na nedetekovatelnou hranici. Přičemž tato inhibice trvala ještě nejméně 15 dní po inokulaci. Navíc inhibiční testy *in vitro* potvrdily, že *E. coli* H22 postrádaly inhibiční účinek vůči anaerobním bakteriím rodů *Bacteroides* a *Bifidobacterium* představující zdravou střevní mikroflóru člověka. Tyto vlastnosti kmene *E. coli* H22 naznačují jeho potencionální využití jako nadějný probiotický kmen v prevenci střevních infekcí lidí a zvířat [3, 43].

3.3 Metody studia bakteriocinů

Hlavním problémem výzkumu a aplikace bakteriocinů je jejich přesná kvantifikace. Nejvyužívanější techniky stanovení jsou biologické zkoušky založené na kvantifikaci inhibice citlivých bakterií. Ačkoli byla testována řada dalších metod pro kvantitativní stanovení bakteriocinů jako např. ELISA, PCR, RT-qPCR, ATP-bioluminometrie, radiometrie, měření vodivosti a sofistikované zkoušky na základě vlastní indukce *nis* promotoru a bioluminiscence, nejsou tyto techniky příliš využívány z důvodů vysokých nároků na laboratorní vybavení, dovednosti a znalosti. Pro běžné studie interakce bakteriocinů s citlivou bakteriální buňkou se více využívají testy prováděné na selektivních a diagnostických tuhých půdách nebo v kapalném médiu. K nejběžnějším patří difuzní test v agarovém médiu. Základem je kultivace mikroorganismu a následné vyhodnocování působení inhibiční látky, která byla na agar nanášena. Antimikrobiální látka difunduje do agaru a inhibuje růst testovaných mikroorganismů, což se projeví tvorbou inhibičních zón bez nárůstů bakterií. V kapalném médiu je využívána aplikace turbidimetrických zkoušek na určování celkového mikrobiologického materiálu. Úspěšné použití růstových inhibičních technik závisí na citlivosti zvoleného indikátorového mikroorganismu k bakteriocinu, který na něj má působit [44].

Kmen *E. coli* označený jako LR05 vykazující poměrně velký antagonistický účinek vůči *Salmonella enterica* byl izolován ze střevního traktu drůbeže. U tohoto kmene byla prokázána produkce minimálně dvou mikrocinů. K jejich identifikaci byla provedena izolace dvoustupňovou metodou. Získaný supernatant kmene *E. coli* LR05 byl aplikován na kolonku Sep Pak C18. Následně byla provedena eluce s 50% metanolem a s 30% a 45% acetonitrilem ve vodě. Frakce získané po eluci v 50% metanolu vykazovaly silný inhibiční účinek pouze proti *S. enterica* a výsledky testů potvrdily, že se jedná o mikrocin J25. Za účelem zjištění, zda frakce získaná elucí ze 45% acetonitrilu obsahovala některý známý mikrocin, byly provedeny testy odolnosti u rekombinantních kmenů *E. coli* nesoucí geny kódující sekreční a imunitní proteiny a geny pro transport. Aktivita mikrocinů a zkoušky odolnosti byly prováděny pomocí modifikovaného agar-difuzního testu [45]. U všech takto testovaných rekombinantních kmenů došlo k inhibici. Získaný neznámý vzorek byl následně analyzován metodou HPLC. Složením aminokyselin a N-terminální sekvence se tento hydrofobní peptid odlišoval od všech známých mikrocinů. Pomocí SDS-PAGE byl vyčištěný mikrocin identifikován a označen jako mikrocin L s molekulovou hmotností 6 kDa. Zjištěná inhibiční aktivita MccL je však zaměřena na velmi úzké spektrum. Jeho působení na gramnegativní bakterie je vymezeno pouze proti *Shigella sonnei* a některým enteropatogenním kmenům *E. coli* [46].

Za účelem stanovení vlivu kolicinogenních kmenů *E. coli* produkující kolicin E7 přidávaných ke krmení bylo 16 telat naočkováno sérotypem enterohemoragické *E. coli* O157:H7. Experiment byl rozdělen na tři fáze. První fáze trvala 24 dnů, přičemž první skupina se 6 telaty byla použita jako kontrolní a byla krmena pouze běžným krmivem. Druhá skupina s osmi telaty dostávala krmivo obohacené o kolicinogenní kmeny *E. coli* (10^7 CFU/g krmiva). V druhé fázi experimentu došlo k záměně, kdy telata první skupiny dostávala obohacené krmivo o kolicinogenní *E. coli* a to v rozsahu 10^8 CFU/g krmiva, zatímco druhá skupina již byla krmena pouze běžným krmivem. Tato druhá fáze trvala 15 dní. V třetí fázi došlo k opětovnému naočkování *E. coli* O157:H7 u všech telat a po 24 dnech byla telata usmrcena. Během každého období byly odebírány a průběžně vyhodnocovány pomocí CT-SMAC agaru jednotlivé vzorky. Agar byl inkubován při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Přítomnost *E. coli* O157:H7 na každém agaru byla potvrzena pomocí imunologického specifického testu pro O157. Rovněž po usmrcení zvířat byly ihned odebrány vzorky tkání gastrointestinálního traktu a podrobeny mikrobiologickému a molekulárnímu rozboru pro vyhodnocení kolonizace O157:H7 a kolicinogenních kmenů. Získané izoláty byly po-

drobeny analýze pomocí metody rep-PCR [47]. Tato metoda je založena na identifikaci celého genomu využívajícího přítomnosti repetitivních elementů v bakteriálním genomu. Specifické primery jsou navrhovány tak, aby se připojovaly přímo ke koncovým konzervativním oblastem repeticí a 3'- konce primeru směřovaly směrem ven z repetitivního elementu tak, aby se neamplifikovala samotná repetice. Rep-PCR tak umožňuje amplifikaci fragmentů (amplikonů) různých velikostí představující DNA v nekódující repetitivní sekvenci genomu. K amplifikaci však dojde pouze v případě, že sekvence se nachází v genomu v opačné orientaci a amplifikovatelné vzdálenosti. Detekce rep-PCR amplikonů se provádí pomocí agarózové gelové elektroforézy [43]. Pokud primery nasedají jen na vybrané sekvence, vznikají jako převažující produkt reakce molekuly stejné sekvence a délky. Při dělení v gelu všechny tyto molekuly putují stejnou rychlostí a po obarvení je vizualizován jen jeden specifický fragment, jehož molekulová hmotnost odpovídá při srovnání se standardem předpokládané délce detekované sekvence DNA [48]. Zjištěné výsledky z jednotlivých analýz byly statisticky zpracovány. Z nich vyplývá, že 44 % živočišných tkání z první skupiny bylo pozitivní na sérotyp O157:H7 v porovnání se 64 % tkání z druhé skupiny. Významné rozdíly mezi celkovým počtem přítomné *E. coli* O157:H7 ve vzorcích tkání z kontrolní a experimentální skupiny naznačují, že na snížení množství *E. coli* O157:H7 měly vliv vyšší dávky kolicinů E7 v krmivu, ale rovněž také pořadí léčby [47].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo provést experimenty pro studium inhibičního vlivu bakteriocinů E1, B, M, Ia/Ib a mikrocin B17 produkčního kmene *Escherichia coli* 225 na sbírkové kmeny (*Salmonella* sp. a další) a nežádoucí gramnegativní bakterie izolované z potravin.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Přístroje

- Denzitometr DENZI-LA-METER (Erba – Lachema, ČR)
- Vortex Reax top (Heidolph, Německo)
- Laboratorní třepačka LT2 (Kavalierglass, ČR)
- Biohazard box EUROFLOX (Clean Air, Holandsko)
- Laboratorní centrifuga JUAN MR23i (Jouan, USA)
- Biologický termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)
- Automatické mikropipety (Nichiryo, Japonsko)
- Microson™ XL 2000 – ultrasonic liquid procesor (Q SONICA, USA)
- Infinite M200PRO (TECAN, Švýcarsko)

5.2 Kultivační média

Složení kultivačních médií použitých v této práci je uvedeno v následujících tabulkách (Tab. 3, 4, 5, 6). Všechny složky kromě chloridu sodného (Penta, ČR) byly dodány firmou Himedia Laboratories (Indie).

Tab. 3. Složení masopeptonového bujonu.

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

Tab. 4. Složení masopeptonového agaru.

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

Tab. 5. Složení soft agaru.

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

Tab. 6. Složení Xylóza-Lyzin-Deoxycholát agaru (XLD, Himedia Laboratories, Indie).

Kvasničný extrakt	3 g
L-Lyzin HCl	5 g
Xylóza	3,5 g
NaCl	5 g
Laktóza	7,5 g
Sacharóza	7,5 g
Deoxycholát sodný	2,5 g
Thiosulfát sodný	6,8 g
Citrát železito-amonný	0,8 g
Fenolová červeň	0,8 g
Bakteriologický agar	3,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 7. Složení fyziologického roztoku.

NaCl	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

5.3 Chemikálie

- Chloroform (Penta, ČR)
- Mitomycin C (Sigma-Aldrich, USA)

5.4 Bakteriální kmeny

Pro tuto práci byly využity indikátorové a sbírkové bakteriální kmeny, které byly získány z Biologického ústavu LF MU v Brně nebo z České sbírky mikroorganismů (Tab. 8). Dále byly použity bakteriální kmeny, které byly izolovány z potravin v průběhu let 2006-2013, přičemž tyto kmeny byly identifikovány, charakterizovány a uchovávány v glycerolu při 80 °C na Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně (Tab. 9).

Všechny bakteriální kmeny byly přeočkovávány na MPA a kultivovány při 37 °C (ev. 30 °C pro *Aeromonas hydrophila*) po dobu 24 hodin. Misky byly uchovávány při 4 °C pro další práci.

Tab. 8. Seznam použitých sbírkových kmenů.

Název	Označení	Zdroj
Indikátorové kmeny		
<i>Escherichia coli</i>	K12 Row	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Escherichia coli</i>	B1	
<i>Escherichia coli</i>	φ	
<i>Escherichia coli</i>	Sabina 40	
<i>Shigella sonnei</i>	17	
Ostatní sbírkové kmeny		
<i>Shigella boydii</i>	23W U8	Biologický ústav LF MU, Brno
<i>Salmonella</i> sp.	21W 311/96	
<i>Salmonella</i> sp.	22W 79/05	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium	10W	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium	CCM 7205	Česká sbírka mikroorganismů
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis	CCM 4420	

Tab. 9. Seznam gramnegativních bakterií – izolátů z potravin [52, 53].

Název	Označení	Bakteriociny	Původ
<i>Escherichia coli</i>	119W	-	kůže chlazené drůbeže
<i>Escherichia coli</i>	122W	-	
<i>Escherichia coli</i>	125W	-	
<i>Escherichia coli</i>	232 R2	-	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	28	x	
<i>Enterobacter</i> sp.	213	x	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	x	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	88	x	
<i>Escherichia coli</i>	225 (I/3b)	E1, B, M, Ia/Ib, mB17	bažantí maso
<i>Citrobacter freundii</i>	331	x	jedlý hmyz

x – nebylo testováno na produkci inhibičních látek

5.5 Metody

5.5.1 Studium inhibice – současná kultivace produkčního a citlivého kmene v tekutém médiu

Pro studium vlivu působení bakteriocinů produkčního kmene *E. coli* 225 na bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 (zkráceně *Salmonella* CCM 4420) byl proveden experiment současné kultivace produkčního a citlivého kmene v tekutém MPB médiu. Z čerstvě narostlých kultur byly připraveny suspenze odpovídající hodnotě 0,4 McFarlandovy stupnice. Inokulum v objemu 4 ml z každé bakteriální suspenze bylo zaočkováno paralelně do dvou sterilních láhví (A, B) s 200 ml MPB.

Bakterie byly kultivovány za stálého třepání při 37 °C v aerobních podmínkách na termostatové třepačce. V průběhu kultivace bylo v hodinových intervalech odebíráno 0,5 ml vzorku a prováděno desítkové ředění. K ředění byl použit fyziologický roztok. Z každého ředění bylo souběžně do dvou sterilních misek s XLD agarem přeneseno 0,1 ml vzorku a rozetřeno sterilní kličkou a inkubováno v termostatu při 37 °C.

Souběžně bylo odebíráno 4,5 ml vzorku k měření optické hustoty.

5.5.2 Stanovení biologické aktivity kolicinů – kvalitativně

Vpichový pokus

Bakteriální kultura produkčního kmene *E. coli* 225 byla vpichem naočkována na misky s MPA agarem. Kultivace probíhala 48 hodin v termostatu při 37 °C. Poté došlo k usmrcení bakterií parami chloroformu (po dobu 30 minut). Pro odstranění zbytků par chloroformu byly misky odvětrány a následně převrstveny 3 ml 1,05% soft agarem obsahujícím 0,1 ml čerstvě narostené kultury indikátorového kmene. Po ztuhnutí agarů byly misky kultivovány v termostatu s ohledem na optimální teplotu růstu indikátorových kmenů. Druhý den byla zjišťována přítomnost a velikost inhibičních zón. Indikátorový kmen byl označen jako citlivý v případě vytvoření inhibiční zóny kolem produkčního kmene [55].

5.5.3 Stanovení biologické aktivity kolicinů - kvantitativně

Příprava surového kolicinu

V MPB médiu přes noc narostlý produkční kmen *E. coli* 225 byl zaočkován do sterilního MPB média v poměru 1:50. Kultivace probíhala aerobně při 37 °C po dobu 6 hodin. Poté byla provedena centrifugace (4000 g/15 min). Po centrifugaci odebraný supernatant byl označen jako bezbuněčný extrakt a uchováván při 4 °C. Získané pelety buněk byly následně 2x promyty sterilní destilovanou vodou. Buňky byly důkladně resuspendovány v 500 µl destilované vody a podrobeny dezintegraci buněčných obalů pomocí ultrazvukového dezintegrátoru (Microson™ XL 2000). Dezintegrace za stálého chlazení trvala tak dlouho, dokud se suspenze bakterií zcela nevyčeřila (30 s intervaly). Následovala centrifugace při 2000 g/15 min pro odstranění buněčných zbytků. Získaný supernatant byl uchováván na kapce chloroformu.

Příprava surového kolicinu s indukci mitomycinem C

Produkční kmen se nechal narůst na MPB médiu přes noc. Druhý den byl v poměru 1:50 zředěn do dvou sterilních reagenčních láhví s MPB médiem. Zředěné suspenze bakterií se ponechaly růst za neustálého třepání při 37 °C po dobu 4 hodin. Následně byla provedena indukce mitomycinem C. Do kultivační láhve byl přidán mitomycin C v konečné koncentraci 0,5 µl/ml v první láhvi a na konečnou koncentraci 0,75 µl/ml v druhé láhvi. Za stálého třepání bylo pokračováno v aerobní kultivaci při 37 °C po dobu 3 hod. Centrifugací (5000 g/5 min) získaný sediment buněk byl 2x promyt sterilní destilovanou vodou.

Vyčištěné buňky byly za stálého chlazení diskontinuálně rozrušovány ultrazvukovým dezintegrátorem a centrifugovány (5000 g/ 35 min) pro odstranění zbytků rozbitých buněk. Získané supernatanty byly uchovány na kapce chloroformu.

Titrace kolicinů kapkovou metodou

MPA plotny připraveny pro titraci kolicinů byly převrstveny 3 ml 1,05% soft agarem obsahující 0,1 ml čerstvé kultury indikátorového kmene. Na povrch soft agaru byly na jednu polovinu misky pipetovány 3 μ l kapky získaného neředěného a desítkovou řadou ředěného kolicinu. Na druhou polovinu misky pak byl pipetován ve stejném poměru získaný bezbuněčný extrakt. Následovala kultivace v termostatu do druhého dne při 37 °C. Příštího dne se odečítal výskyt inhibičních zón. Titr kolicinů byl posléze vyjádřen jako převrácená hodnota posledního ředění tvořící viditelnou zónu v arbitrárních jednotkách [47].

5.5.4 Diluční mikrometoda

Pro stanovení inhibiční aktivity kolicinu na indikátorové kmeny byla využita diluční mikrometoda. Z vybraných indikátorových kmenů byla připravena inokula v MPB médiu odpovídající zákalu 0,5 McFarlandovy stupnice. Jako testovaná inhibiční látka byla použita předem připravená směs bakteriocinů kmene *E. coli* 225 indukovaná mitomycinem C (o konečné koncentraci 0,75 μ g/ml v kultivačním médiu).

Do jamek sterilní mikrotitrační destičky bylo pipetováno 180 μ l sterilního MPB média, dále 10 μ l kolicinu (neředěný a ředěný desítkovou řadou) a 10 μ l inokula indikátorového kmene. Kontrola růstu testovaných bakterií byla připravena ze 190 μ l tekutého média (MPB) a 10 μ l inokula daného kmene. Slepý vzorek obsahoval pouze tekuté médium (MPB). Po naočkování celé destičky (12x8 jamek) byla destička umístěna do spektrofotometru (Infinite M200PRO), kde byl v pravidelných intervalech měřen zákal při vlnové délce 600 nm po dobu 16 hodin. Naměřené hodnoty byly graficky zpracovány v programu Microsoft Office Excel.

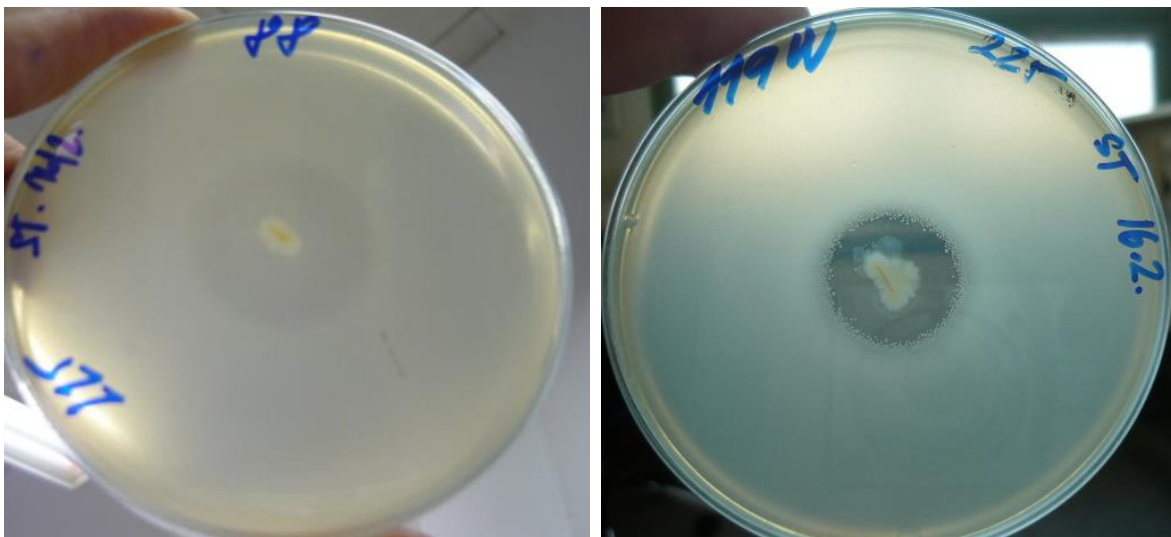
6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci byl hodnocen vliv bakteriocinů produkčního kmene bakterie *E. coli* 225 na vybrané gramnegativní bakterie. *E. coli* 225 je multibakteriocinogenní kmen izolovaný z bažantů, který ve svém genomu kóduje koliciny E1, B, M, Ia/Ib a mikrocin B17 [55].

6.1 Stanovení inhibice difuzním testem v agaru

Celkem 16 vybraných kmenů gramnegativních bakterií bylo testováno vpichovou metodou na citlivost k bakteriocinům kmene *E. coli* 225. Antimikrobiální účinek byl posuzován podle průměru inhibiční zóny kolem produkční bakterie. Z výsledků (Tab. 10) vyplývá, že 14 z 16 izolátů vykazovalo citlivost k bakteriocinům produkčního kmene *E. coli* 225 (Obr. 4). Přičemž průměry inhibičních zón na MPA plotnách u sledovaných kmenů vystavených stejné koncentraci bakteriocinu ukázaly velké odchylky (1 cm až 2,5 cm zóny inhibice). Největší inhibiční zóny byly pozorovány u kmenů *Shigella sonnei*, *Aeromonas hydrophila* a *Yersinia enterocolitica*.

Obr. 4. Testování produkce bakteriocinů – vpichová metoda: inhibiční efekt kolicinů vyjadřuje inhibiční zóna růstu kolem vpichu produkční bakterie.



Pozitivní výsledek byl rovněž zaznamenán u kmenů *Salmonella* CCM 4420, *Salmonella typhimurium* 10W, *Salmonella* sp. 21W, *Salmonella* sp. 22W. Inhibiční účinek však nebyl prokázán u kmene *Salmonella typhimurium* CCM 7205. Je předpoklad, že na inhibici většiny testovaných izolátů salmonel je podle dostupné literatury [56, 57] s největší pravděpodobností zodpovědný mikrocin B17, který pozastavuje replikaci DNA tím, že blokuje DNA gyrázy [41].

Antibakteriální aktivita kmene *E. coli* 225 však závisí na komplexním mechanismu účinků produkovaných bakteriocinů [55], čímž mohou působit na široké spektrum bakteriálních buněk. Multibakteriocinogenní kmen tak získává konkurenční výhodu ve formě rozšířené účinnosti inhibice na citlivé buňky [11]. Riley a Weetz pak ve své práci také dokládají, že některé bakteriociny jsou jednoznačně nejúčinnější k inhibici kmenů téhož druhu. Jiné se zaměřují na izoláty různých druhů [1].

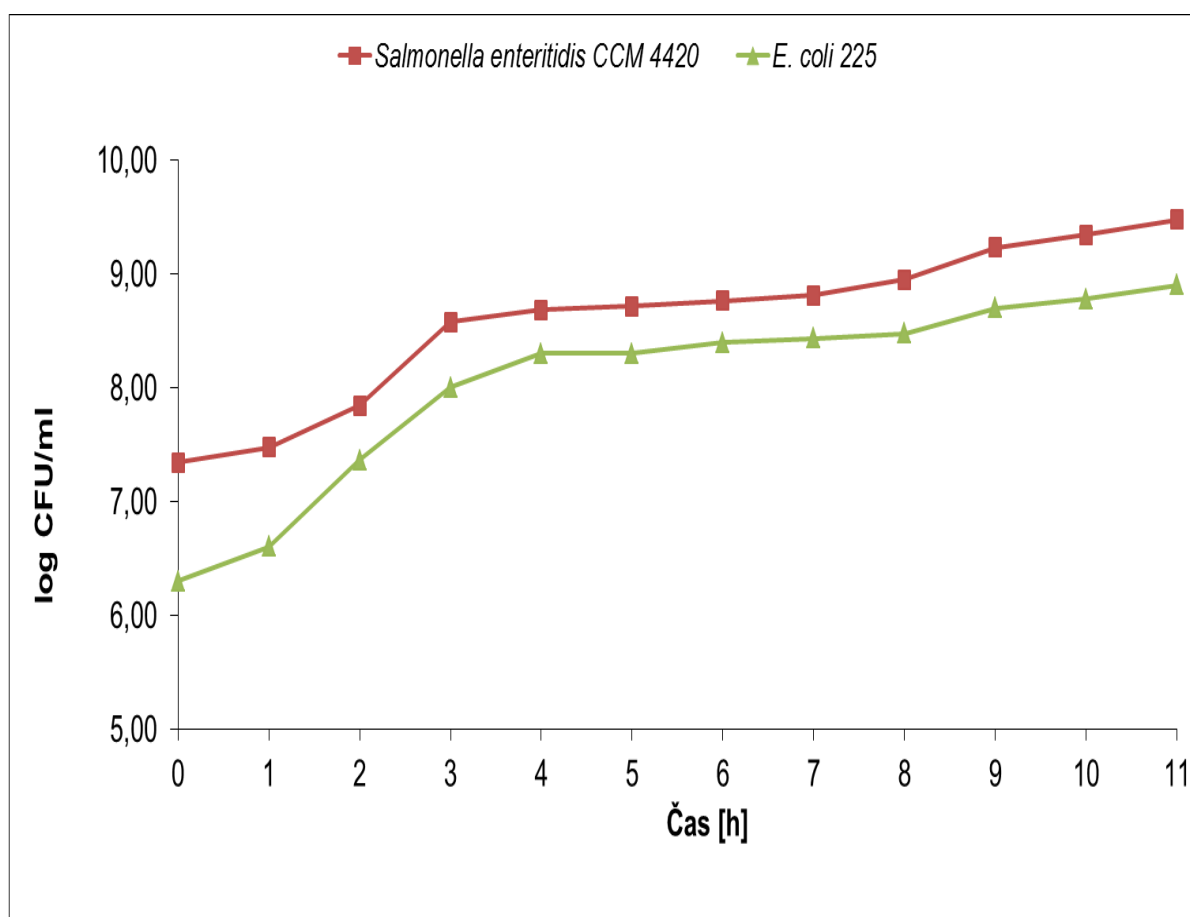
Tab. 10. Inhibiční spektrum účinku kolicinů

Označení	Indikátorový kmen	Producent
		<i>Escherichia coli</i> 225
119W	<i>Escherichia coli</i>	++ (2 cm)
122W	<i>Escherichia coli</i>	++ (2 cm)
125W	<i>Escherichia coli</i>	++ (2 cm)
232	<i>Escherichia coli</i>	++ (2 cm)
23W	<i>Shigella boydii</i>	-
17	<i>Shigella sonnei</i>	+++ (2,5 cm)
CCM 4420	<i>Salmonella enteritidis</i>	+ (polomatná zóna 1 cm)
CCM 7205	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
10W	<i>Salmonella typhimurium</i>	+ (matná zóna 1 cm)
21W	<i>Salmonella</i> sp.	+ (matná zóna 1 cm)
22W	<i>Salmonella</i> sp.	+/-
28	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+++ (2,5 cm)
213	<i>Enterobacter</i> sp.	+ (1,5 cm)
2	<i>Enterobacter</i> sp.	+ (1 cm)
88	<i>Yersinia enterocolitica</i>	+++ (matná zóna 2,5 cm)
217	<i>Citrobacter freundii</i>	++ (2 cm)

6.2 Stanovení dynamiky růstu v tekutém médiu

Inhibiční aktivita kolicinů produkovaných bakterií *E. coli* 225 na bakterii *Salmonella* CCM 4420 byla testována v tekutém živném médiu. Růst byl sledován po dobu 11 hodin měřením optické hustoty a stanovením počtu buněk kultivační metodou na XLD plotnách.

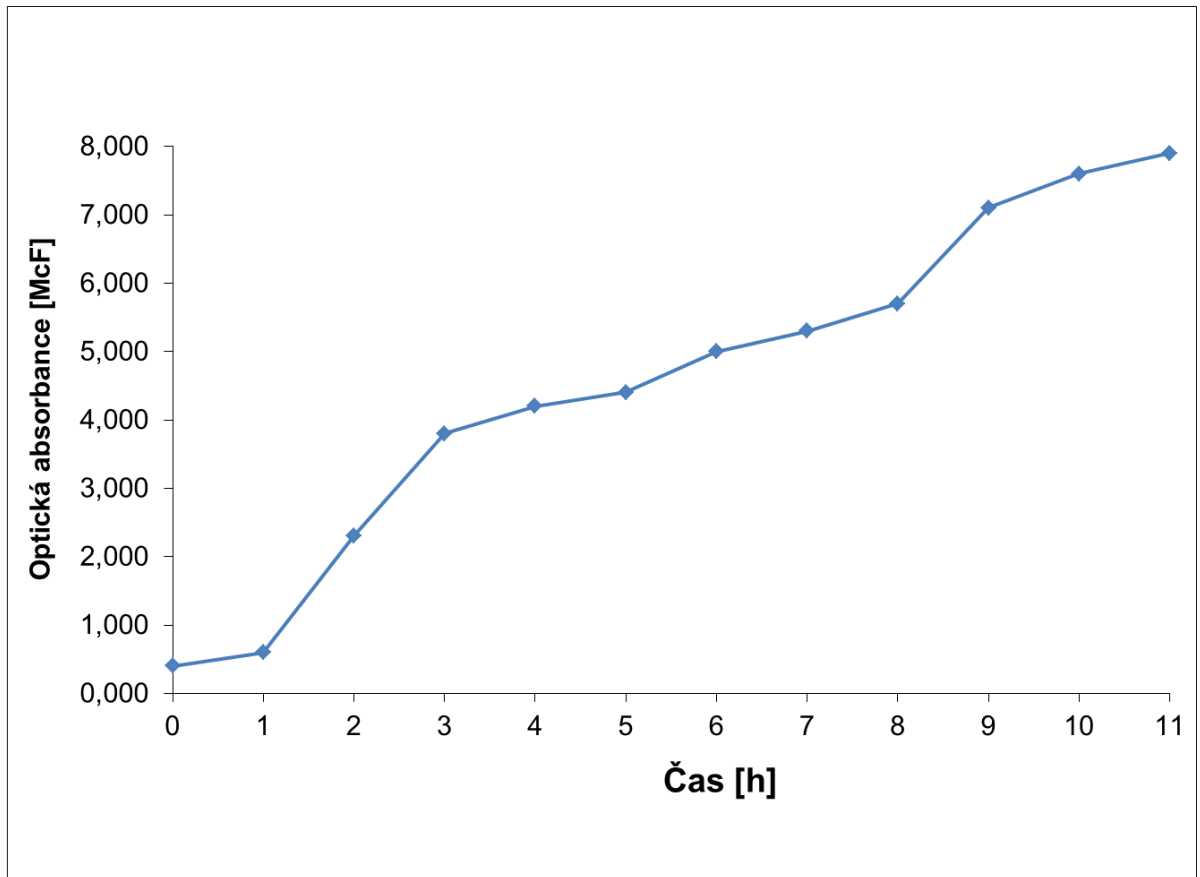
Po dobu 11 hodin probíhala inokulace bakteriální suspenze paralelně ve dvou láhvích (A, B) s 200 ml MPB. V láhvi A byla prováděna kultivace za běžných podmínek tzv. aerobní kultivace při 37 °C. Láhev B byla v 5 hodině kultivace vystavena po dobu 5 minut indukci UV záření, pro zvýšenou tvorbu kolicinu vyvoláním SOS reakce u bakterie *E. coli* 225. Ze získaných výsledků z obou metod byly sestaveny růstové křivky, které jsou znázorněny v grafech (Obr. 5, Obr. 6).



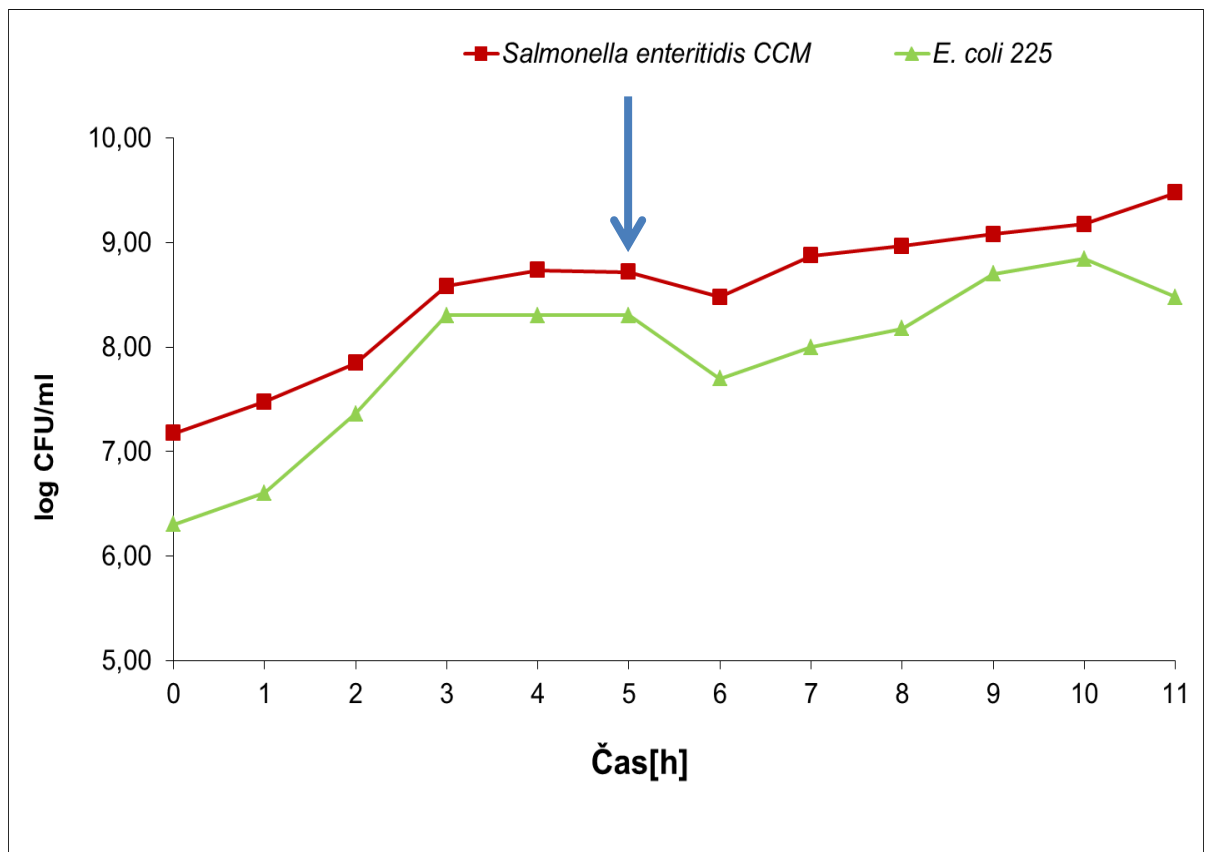
Obr. 5. Růstové křivky bakterií *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 bez indukce UV zářením.

Na výsledných růstových křivkách (Obr. 5) jsou patrné jednotlivé fáze růstu. Počáteční lag-fáze trvala zhruba 1 hodinu. Následná exponenciální fáze, přešla po čtvrté hodině od

začátku měření do stacionární fáze setrvávající v podstatě po celou dobu dalšího stanovení. Na grafu závislosti optické hustoty na čase je také vidět nástup exponenciální fáze zhruba po 1 hodině.



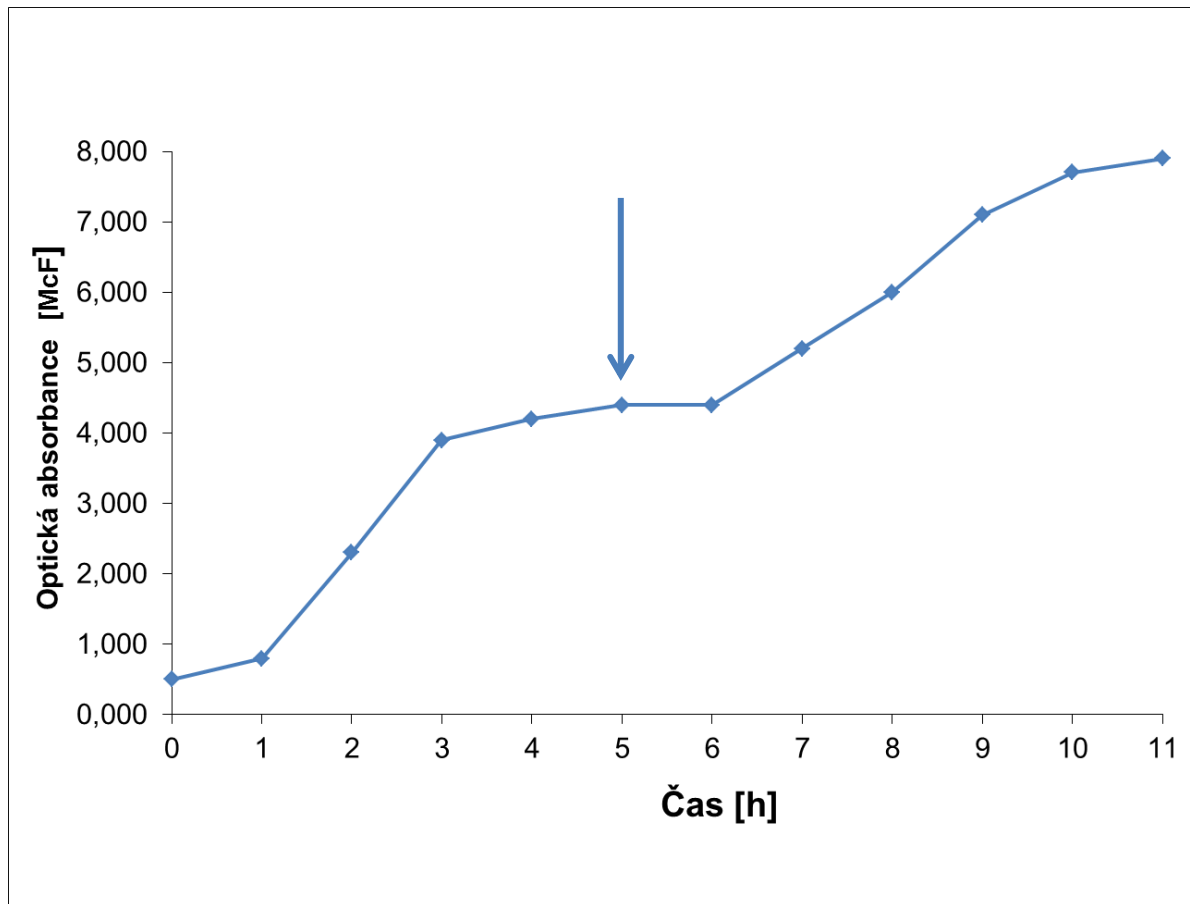
Obr. 6. Růstová křivka bakterií *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 bez indukce UV zářením (závislost optické hustoty na čase)



Obr. 7. Růstové křivky kmenů *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 po indukci UV zářením

Pro vyvolání SOS reakce u bakterie *E. coli* 225 byl vzorek (láhev B) v páté hodině od začátku kultivace indukován UV zářením. Účinkem UV zářením dochází v bakteriální buňce k aktivaci SOS systému. Tento systém ochraňuje buňku před jejím poškozením a zároveň po jeho spuštění dochází u některých bakteriálních buněk ke zvýšené tvorbě bakteriocinů jako odezva buňky na ohrožení [24].

Z růstové křivky (Obr. 7) lze vypočítat, že zhruba 1 hodinu trvala počáteční lag fáze. Po této době započala exponenciální fáze. Po indukci UV zářením v páté hodině kultivace došlo k redukci mikrobiálních buněk zhruba o jeden řád. *Salmonella* CCM 4420 pak byla daleko rychleji schopna adaptace a opětovného růstu na rozdíl od *E. coli* 225. Po deváté hodině od začátku měření nastala u bakterií *E. coli* 225 stacionární fáze. Rovněž z grafu závislosti optické hustoty v čase (Obr. 8) je patrné zastavení růstu bakteriálních buněk po indukci UV zářením.



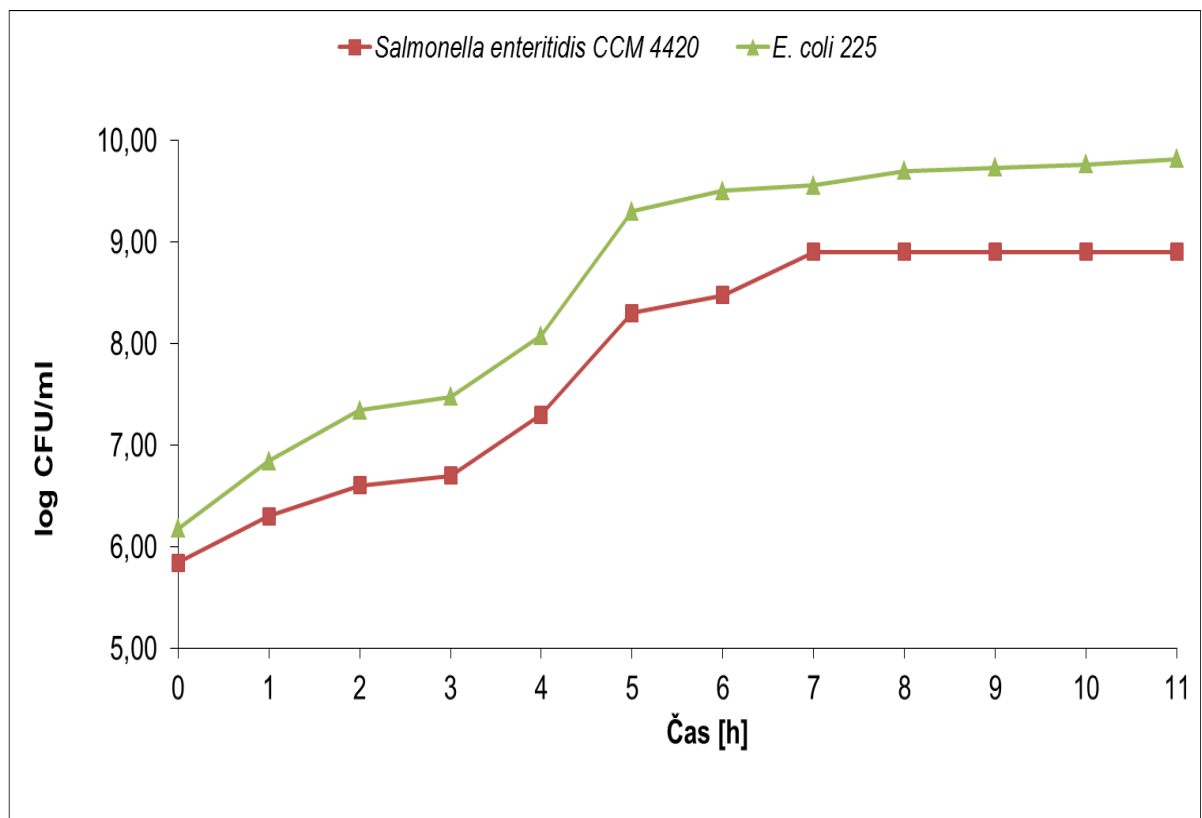
Obr. 8. Růstové křivky kmenů *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 během kultivace, po indukci UV zářením (závislost absorbance na čase)

Počty jednotek tvořící kolonie (CFU) získané v různých časových intervalech během tohoto experimentu však neprokázaly inhibiční účinek bakteriocinů na sledovaný kmen *Salmonella* CCM 4420. Možné příčiny tohoto výsledku jsou naznačeny v nedávné studii zabývající se výzkumem bakteriální dynamiky v závislosti na podmínkách daného prostředí. Experimentální a teoretické studie kolicinů ukázaly, že podmínky pro produkci a následné působení kolicinů na citlivé buňky se zcela liší v závislosti na prostředí, v němž se buňky nacházejí. V tekutém médiu jsou produkční bakterie rozmístěny náhodně a malé shluky produkčních buněk zpravidla neprodukují bakteriocin a tím neútočí na přítomné konkurenční buňky. K tomuto selhání dochází zřejmě z důvodů vysoké daně, kterou producenti musí za produkci kolicinu zaplatit v porovnání s nízkým účinkem na konkurenční buňky [39].

Rovněž Grieg a Travisano ve své studii [49] prokázali, že důležitým faktorem alelopatických interakcí mezi produkčními a citlivými kmeny je hustota produkčních kmenů. Producenti toxinů nejsou schopni invaze, je-li jejich celková mikrobiální hustota nízká.

V takovém případě dochází pouze k omezeným interakcím mezi výrobcem toxinů a citlivou buňkou. Příčinou je zřejmě nízká účinnost toxinů na citlivou buňku. V případě, že producent toxinů přesto napadne citlivé kmeny, bude v nevýhodě kvůli metabolickým a pleiotropním nákladům na výrobu bakteriocinu.

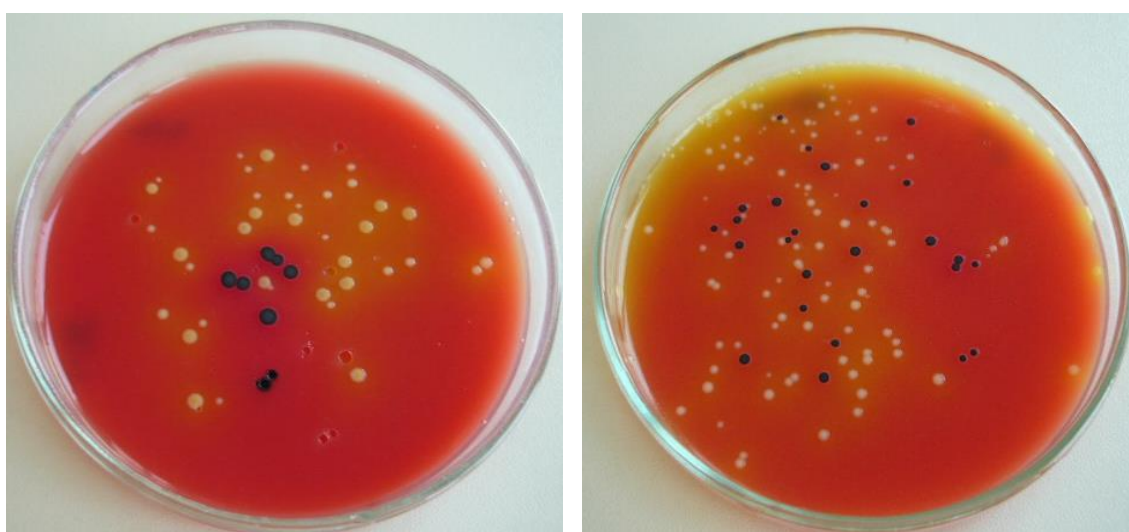
Vzhledem k výše zmíněným faktům bylo provedeno opakování experimentu naočkováním indikátorového kmene *Salmonella* CCM 4420 a produkčního kmene *E. coli* 225 ve vzájemném poměru 1:50 do tekutého média (MPB). Podmínky kultivace zůstaly nezměněny. Růstové křivky jsou znázorněny v grafu (Obr. 9).



Obr. 9. Růstové křivky kmenů *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 při inokulaci v zájemném poměru 1:50.

Přestože byl předpoklad, že poměr vkládaných buněk do inokula na základě měření optické hustoty byl v poměru 1:1, z růstových křivek (Obr. 5, 7) plyne, že počáteční množství bakteriálních buněk se o řád liší. Při změně poměru na 1:50 se však počáteční počty buněk obou bakteriálních kmenů téměř shodují (Obr. 9). Zřejmě to bylo způsobeno nepřesností, které v sobě skrývá měření optické hustoty v porovnání s nepřímým stanovením počtu buněk kultivační metodou (Obr. 7).

V průběhu dynamiky růstu bakterií je pak již zřetelná vyšší růstová aktivita kmene *E. coli* 225 na rozdíl od bakterie *Salmonella* CCM 4420 (Obr. 9). Ačkoli růstová křivka bakterie *Salmonella* CCM 4420 kopíruje růstovou křivku *E. coli* 225 a počáteční počty buněk obou kmenů byly srovnatelné, jsou počty salmonel zhruba desetkrát nižší. Ve srovnání s prvním pokusem (Obr. 5), kde počáteční počty buněk obou kmenů se lišily zhruba o řád (více bylo salmonely), v průběhu růstu je možno pozorovat množství *E. coli* přibližně jen o půl řádu menší. Z obou experimentů lze usuzovat na to, že bakterie *E. coli* má inhibiční účinek na růst bakterie *Salmonella* CCM 4420 v tekutém médiu. Na druhou stranu, nejedná se o zásadní redukci, ani o zastavení růstu.



Obr. č. 10. Kolonie bakterií na XLD agaru – *Salmonella* CCM4420 (černé kolonie), *Escherichia coli* 225 (žluté kolonie).

K faktorům, které rovněž mohly ovlivnit tyto výsledky, patří také složení růstového prostředí. Hol a kol. [40] se zabývají tím, do jaké míry podněty životního prostředí ovlivňují regulaci kolicinového operonu. Ukazují, že *E. coli* je schopna aktivně reagovat na informace o množství a složení živin (glukóza, aminokyseliny, železo) v médiu a následně regulovat procesy vedoucí k lyzi buňky a uvolnění kolicinu.

Na základě těchto argumentů by bylo určitě zajímavé sledovat inhibiční aktivitu kolicinů v závislosti na růstových faktorech.

6.3 Stanovení inhibice vybraných gramnegativních bakterií

Geny bakteriocinů a imunitní geny jsou kódovány na stejném plazmidu nebo v přilehlých oblastech chromozomu. Tyto geny mohou vstoupit pomocí konjugace do jiných bakteriál-

ních buněk. V důsledku konjugace je schopna bakterie získat imunitní geny a tím být imunní vůči bakteriocinu. Pro zabránění vzniku mutace mikroorganismů je proto výhodnější použití čištěného bakteriálního proteinu než použití bakterií produkujících bakteriocin. Této skutečnosti bylo využito v dalším experimentu [4].

6.3.1 Kapková metoda (kvantitativně)

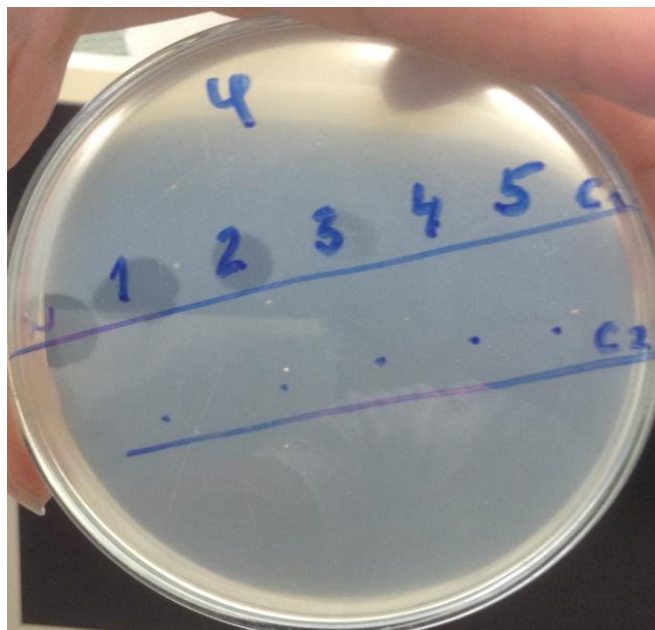
Titrace kolicinů kapkovou metodou byla prováděna bezbuněčným extraktem a připravenou směsí bakteriocinů izolovaného z *E. coli* 225 na vybrané sbírkové indikátorové kmeny: ϕ (*E. coli*), K12 Row (*E. coli*), B1 (*E. coli*), SAB 40 (*E. coli*), 17 (*Shigella sonnei*), 10W (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium).

Inhibiční účinek byl zaznamenán na všechny testované indikátorové kmeny *E. coli* v případě použití izolovaného kolicinu (Tab. 11). Avšak pouze u indikátorového kmene *E. coli* ϕ (Obr. 8) se prokázala inhibice v případě neředěného bezbuněčného extraktu matnou zónou. U ostatních kmenů nebyl zaznamenán žádný inhibiční efekt. Taktéž nebyl prokázán inhibiční účinek izolované směsi bakteriocinů na další indikátorové kmeny (17, 10W).

Tab. 11. Kvantitativní stanovení účinku surové směsi bakteriocinů a bezbuněčného extraktu (AU)

	Indikátorový kmen					
	ϕ	K12 Row	B1	SAB 40	17	10W
Izolovaný kolicin	1(3)*	1 (2)	1 (2)	1 (2)	-	-
Buněčný extrakt	(0)	-	-	-	-	-

*první číslo vyjadřuje čírou zónu, číslo v závorce uvádí ještě viditelnou matnou zónu u daného ředění



Obr. 11. Kapková metoda – titr kolicinu

Maximální dosažená výše účinku směsi bakteriocinů byla 1(3) na indikátorový kmen *E. coli* ϕ . To, že je tento kmen nejcitlivější potvrzuje i skutečnost, že jako jediný byl citlivý i na bezbuněčný extrakt.

Kromě indikátorových kmenů byla kapkovým testem rovněž sledována účinnost bakteriocinů produkčního kmene *E. coli* 225 na vybrané gramnegativní bakterie pocházející ze sbírkových kmenů a izolátů z potravin (Tab. 12).

Z literatury je známo, že je možné dosáhnout mnohem vyšší účinnosti izolovaného kolicinu, proto byla další izolace provedena za indukce mitomycinem C. V bakteriální buňce mitomycin C vyvolává reakce, jaké nastávají rovněž po indukci UV zářením. V důsledku jejich působení dochází k aktivaci SOS systému a tím ke zvýšené tvorbě bakteriocinů. Pro porovnání inhibičního účinku byl použit mitomycin C o konečných koncentracích 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 0,75 $\mu\text{g/ml}$ v kultivačním médiu.

Tab. 12. Kvantitativní stanovení účinku surového kolicinu indukovaného mitomycinem
C – kapková metoda.

Označení	Indikátorový kmen	směs bakteriocinů	
		0,5 µg/ml mit.C	0,75 µg/ml mit. C
119W	<i>Escherichia coli</i>	(0) matná	(0)1
122W	<i>Escherichia coli</i>	1(3)	2(3)
125W	<i>Escherichia coli</i>	2(4)	3(4)
232	<i>Escherichia coli</i>	(0) matná	(0) matná
23W	<i>Shigella boydii</i>	-	-
17	<i>Shigella sonnei</i>	2(3)	2(4)
CCM 4420	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-
CCM 7205	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
10W	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
21W	<i>Salmonella sp.</i>	-	-
22W	<i>Salmonella sp.</i>	(0) matná	(0) matná
28	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	(0)
213	<i>Enterobacter sp.</i>	--	-
2	<i>Enterobacter sp.</i>	(0) matná	(0) matná
88	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-
217	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-

*první číslo vyjadřuje čistou zónu, číslo v závorce uvádí ještě viditelnou matnou zónu u vzorků v závislosti na desítkovém ředění



Obr. 12. Testování působení bakteriocinů – kapková metoda: účinek se projevil jako inhibiční zóna u kmene *Shigella sonnei*

Inhibice byla zaznamenána u všech testovaných izolátů *Escherichia coli*. Nicméně na kmeny 119W a 232 působily bakteriociny po indukci nižší koncentrací mitomycinu C pouze v neředěné formě s tvorbou matných inhibičních zón. Rovněž byl zaznamenán inhibiční účinek u bakterie *Shigella sonnei* (Obr. 12) a to u obou bakteriocinů. Konkrétně u směsi bakteriocinů po indukci vyšší koncentrací mitomycinu C byla jasná inhibiční zóna do ředění 10^{-2} , v ředění 10^{-4} pak byla zřetelná ještě matná zóna.

Negativní výsledek byl však zaznamenán u všech kmenů *Salmonella* s výjimkou *Salmonella* sp. 22W, kde došlo k vytvoření matné inhibiční zóny v případě neředěných bakteriocinů.

Přestože byla produkce kolicinů podpořena indukci mitomycinem C, získané koliciny měly jednoznačně daleko menší účinnost v porovnání s vpichovou metodou. Na vpichovém testu byl inhibiční účinek prokázán jasnými zónami inhibice taktéž u bakterií *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii* a *Enterobacter* sp. 213. U těchto bakterií však nebyl v kvantitativním kapkovém testu prokázán žádný inhibiční účinek.

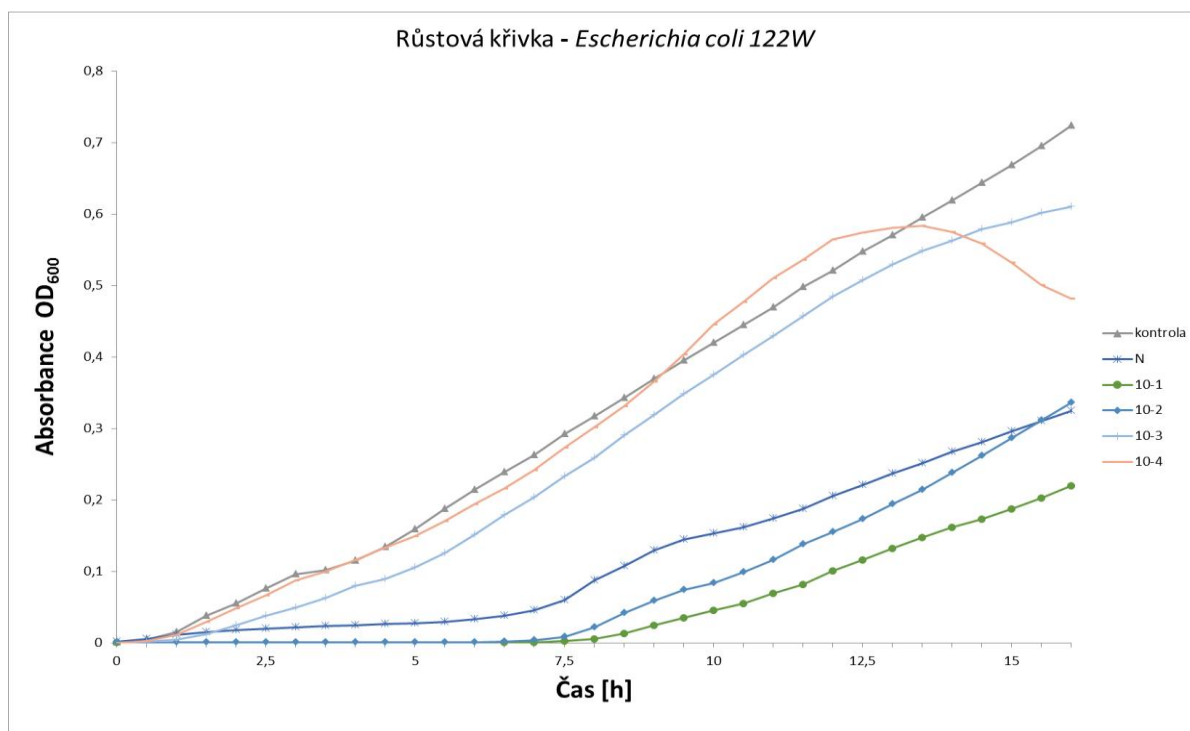
Literatura uvádí dva základní mechanismy vedoucí k necitlivosti buněk na působení kolicinů: (i) necitlivost způsobená mutací bakteriální buňky nebo nepřítomnosti kolicinového receptoru a (ii) tolerance vztahující se k absenci funkčního translokačního systému kolicinu [28]. S největší pravděpodobností můžeme tyto důvody zamítnout, jelikož

v experimentu byl využit čištěný bakteriocin a u vpichového testu se inhibiční účinky projevily. Je tudíž možné, že připravený bakteriocin nebyl dostatečně silný a nevykazoval tak potřebnou inhibiční aktivitu.

6.3.2 Diluční metoda – dynamika růstu citlivých bakterií se surovou směsí bakteriocinů kmene *E. coli* 225

Pro prokázání inhibičního účinku na vybrané kmeny gramnegativních bakterií byl na základě předešlých výsledků použit bakteriocin připravený indukcí mitomycinem C (0,75 $\mu\text{g/ml}$). Růstové křivky byly získány experimentem v mikrotitrační destičce měřením absorbance ve spektrofotometru (Infinite M200 PRO). Z každé jamky byla automaticky každou půl hodinu po dobu 16 hodin měřena optická hustota (optical density, OD) při vlnové délce 600 nm (OD_{600}). Před každým měřením došlo k protřepání vzorku po dobu 15s.

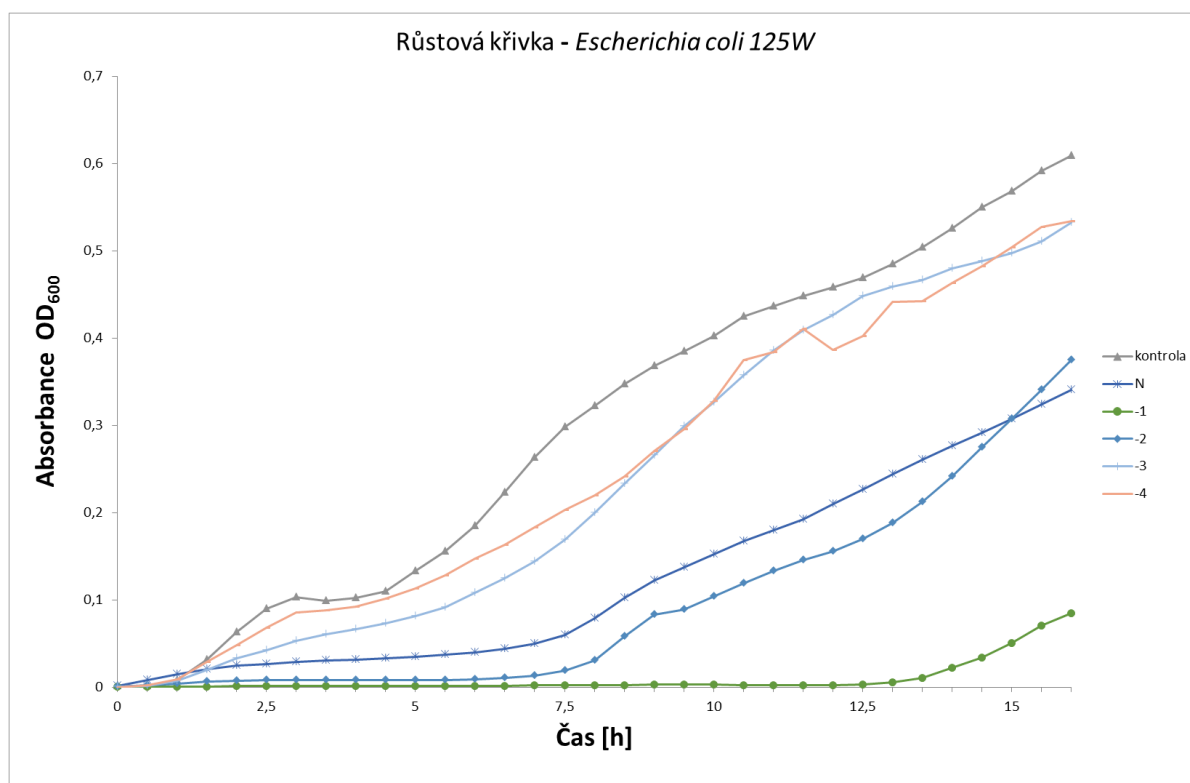
Z růstových křivek jednotlivých kmenů bakterií *E. coli* na grafu závislosti absorbance na čase (Obr. 13, 14, 15) je vidět, že citlivé bakteriální buňky po kontaktu s bakteriociny zastavují či zpomalují svůj růst a dělení.



Obr. 13. Růstové křivky *E. coli* 122W (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění.

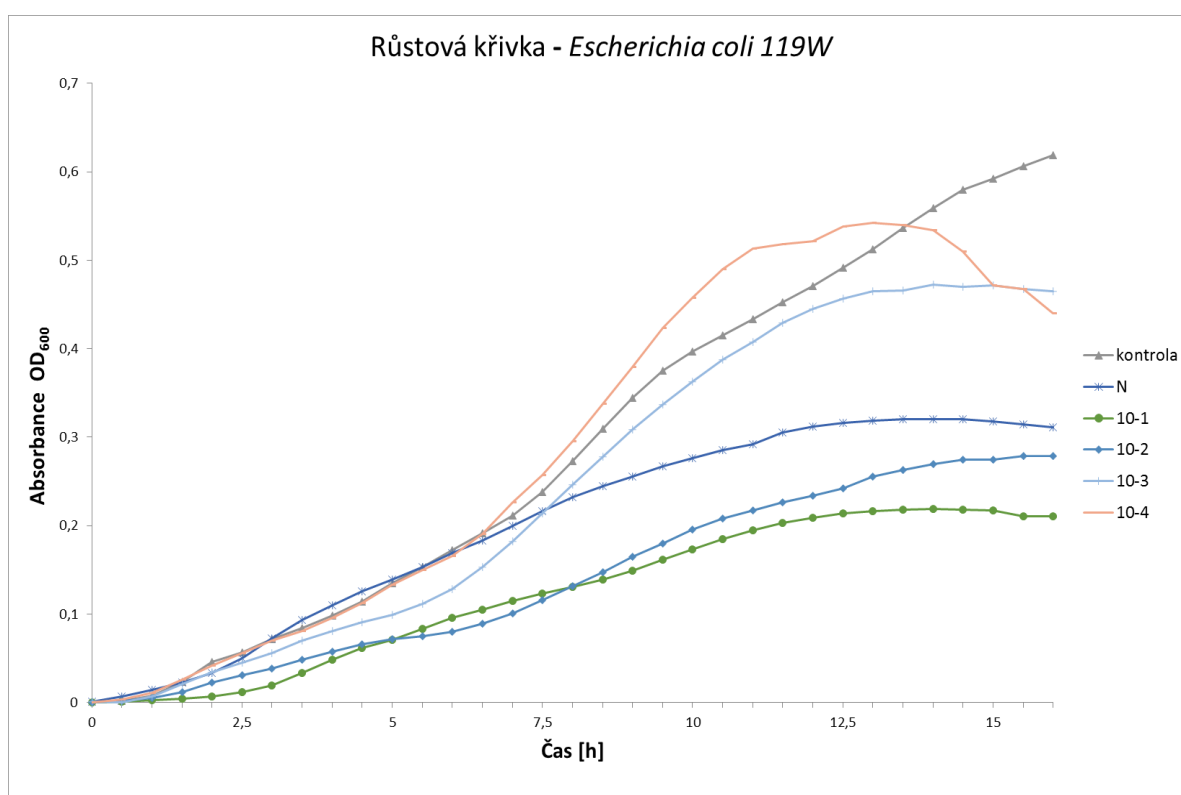
Zřetelného inhibičního účinku kolicinu dosahovalo ředění 10^{-1} a 10^{-2} u kmene *E. coli* 122W (Obr. 13), kdy účinek kolicinu byl největší. Teprve po 7,5 hodinách od začátku měření absorbance došlo k nárůstu zákalu, a tudíž nárůstu bakterií. U vyššího ředění (10^{-3} , 10^{-4}) nebyl shledán žádný inhibiční vliv kolicinu na růst bakterií, což je v souladu se zjištěným titrem kolicinu kapkovou metodou. Ve třinácté hodině od začátku měření byl zaznamenán u vzorků obsahující ředění 10^{-4} kolicinu pokles optické denzity. Tento pokles však s určitostí nebyl způsobem inhibičním působením kolicinů, ale zřejmě vysokou koncentrací buněk, kdy již nedocházelo k důkladnému promíchání a tudíž správnému měření, příp. mohlo dojít k vyschnutí média v jamce.

Naměřené vysoké hodnoty absorbance u neředěného kolicinu mohly být způsobeny nedostatečnou dezintegrací produkčních buněk při přípravě kolicinu (některé buňky mohly zůstat živé). Po zaočkování destičky pak s největší pravděpodobností mohlo dojít k jejich pomnožení, což celkově zvýšilo zákal a není možné rozlišit, zda zákal tvoří produkční buňky (které jsou vůči svému bakteriocinu odolné) či buňky indikátorové. U ředění tento problém odpadá, jelikož živé produkční buňky byly vyředěny.



Obr. 14. Růstové křivky *E. coli* 125W (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění.

V případě kmene 125W (Obr. 14) inhibiční účinek kolicinu v ředění 10^{-1} trval po dobu dvanácti a půl hodiny od začátku inkubace. Po tomto časovém období bakterie obnovily svůj růst, který se projevil zvýšením absorbance. Opětovný růst bakterií by mohl být pravděpodobně způsoben mutací citlivého kmene a tím rezistenci k bakteriocinům. Rovněž Riley a Gordon ve své studii [28, 54] dokládají, že vznik mutantních rezistentních buněk na kolicin z citlivých kmenů je poměrně častý proces. Tyto rezistentní buňky zvyšují energetickou náročnost produkčního kmene na tvorbu kolicinu a postupně ovládají životní prostor. Růstové křivky v grafu (Obr. 14) také vyznačují značné prodloužení lag-fáze v ředění kolicinu 10^{-2} , kdy exponenciální fáze nastala až po osmé hodině od začátku měření.



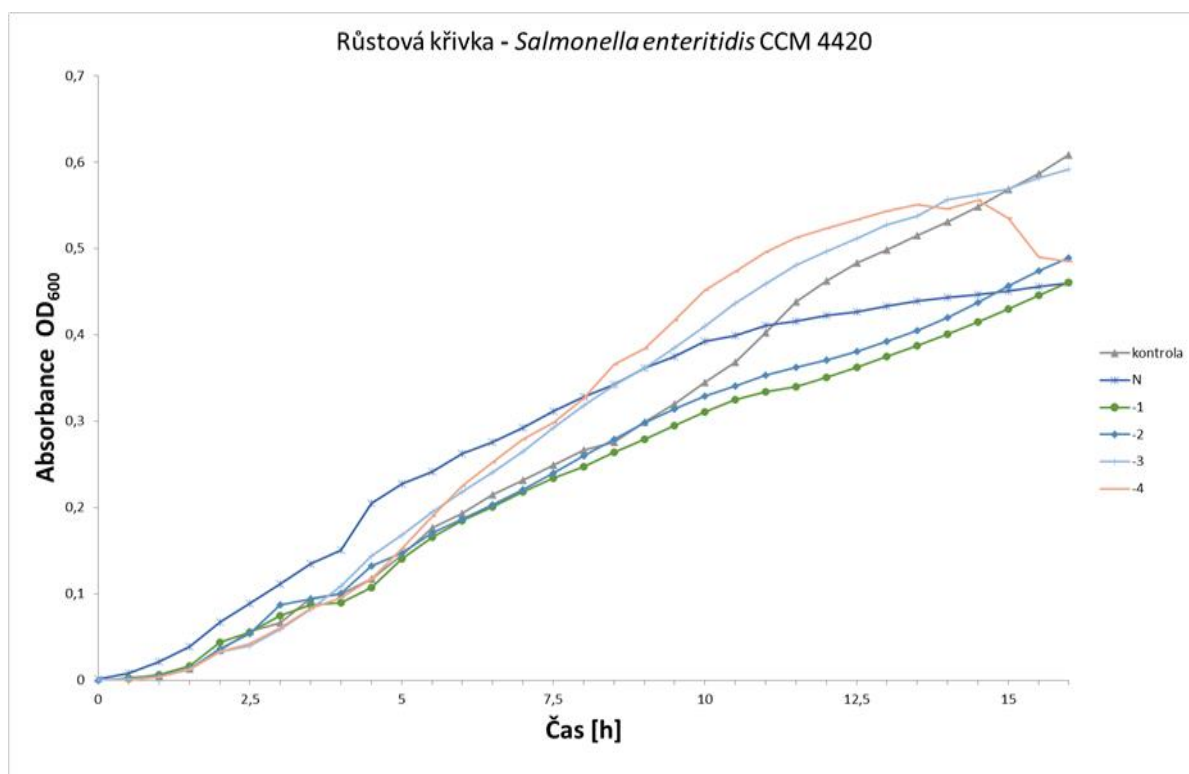
Obr. 15. Růstové křivky *E. coli* 119W (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění.

Z grafu (Obr. 15) je patrné, že přechodná inhibice kmene 119 W trvala přibližně 1,5 hodiny. Jelikož bakteriostatický účinek nebyl vysoký, došlo po této době k opětovnému růstu bakterií, který byl zaznamenán jako změna optické hustoty bakterií.

Získané hodnoty odpovídají výsledkům, které byly shledány v předešlém testu (kapková metoda), kdy největší inhibiční účinek bakteriocinu ($0,75 \mu\text{g/ml}$) byl zaznamenán rovněž u kmene *Escherichia coli* 125W. Z tohoto zjištění vyplývá, že kmen 125 W je citlivější ke kolicinům produkovaným *E. coli* 225 než kmeny 122W a 119W.

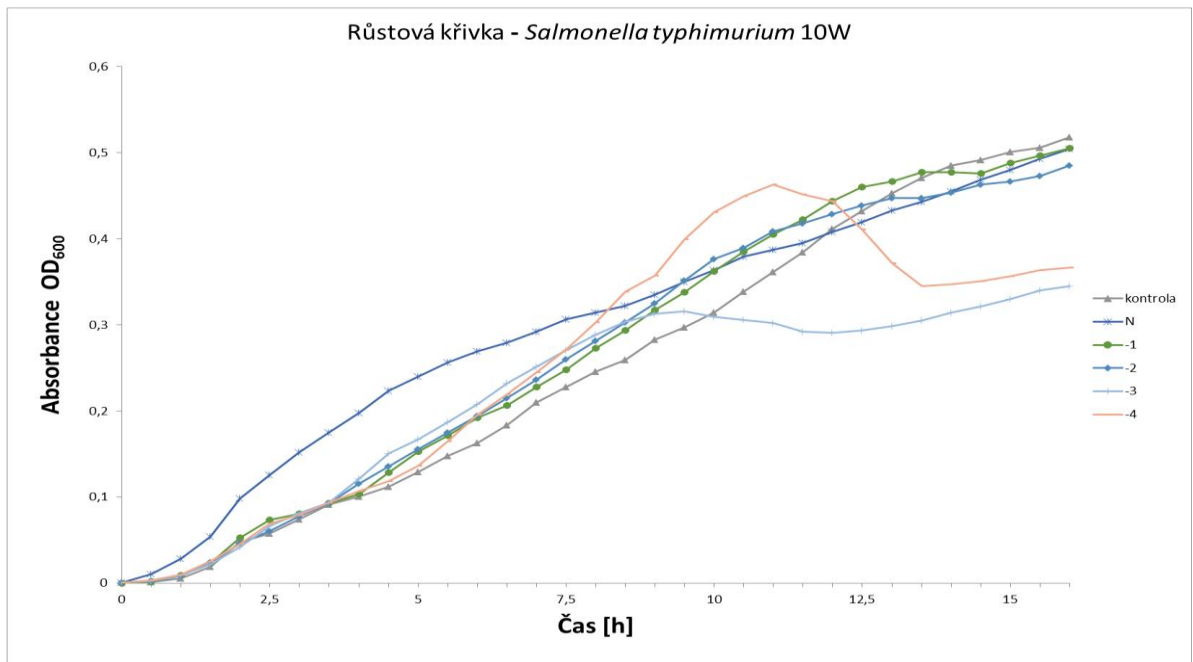
Ze všech grafů je také patrné, že účinek kolicinů byl pouze bakteriostatický, jelikož kolicin bakterie neusmrtil, pouze inhiboval jejich růst a zabraňoval dalšímu množení po dobu jeho působení.

U bakterie *Salmonella* byly na základě pozitivního výsledku u vpichového testu vybrány pro tento experiment kmeny CCM 4420, 10 W a 22W.

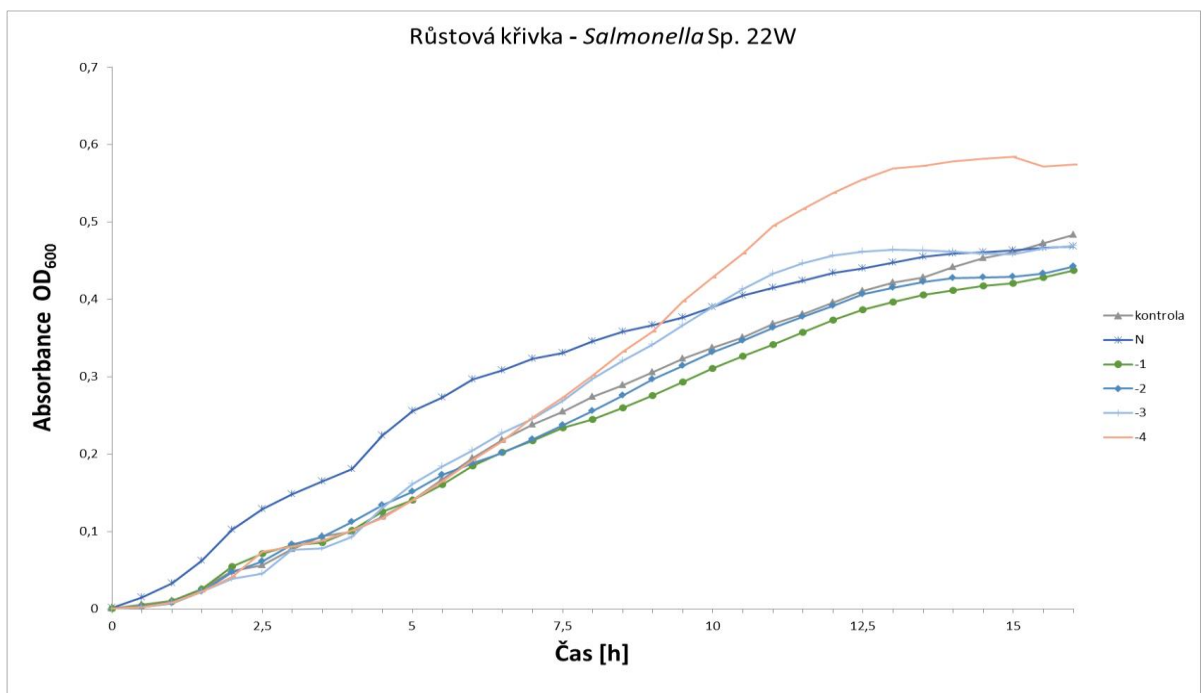


Obr. 16. Růstové křivky *Salmonella* CCM4420 (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění.

Z růstové křivky (Obr. 16) lze konstatovat, že zhruba po jedné hodině od začátku kultivace byl bakteriální kmen *Salmonella* CCM 4420 schopen obnovit svůj růst projevující se zvýšenou absorbancí, přestože byl vystaven účinkům bakteriocinů. Znamená to, že připravený bakteriocin nebyl dostatečně silný a tudíž nebyl schopen inhibice vůči bakteriálnímu kmeni *Salmonella* CCM 4420. V počáteční fázi tak zřejmě docházelo k adaptaci bakteriálních buněk na nové prostředí.



Obr. 17. Růstové křivky *Salmonella typhimurium* 10W (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění.



Obr. 18. Růstové křivky *Salmonella* sp. 22W (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění.

Z grafů růstových křivek kmenů *Salmonella typhimurium* 10W a *Salmonella* sp. 22W (Obr. 17, 18) je zřejmé, že u kmenů vystavených působení kolicinu došlo po dobu jedné

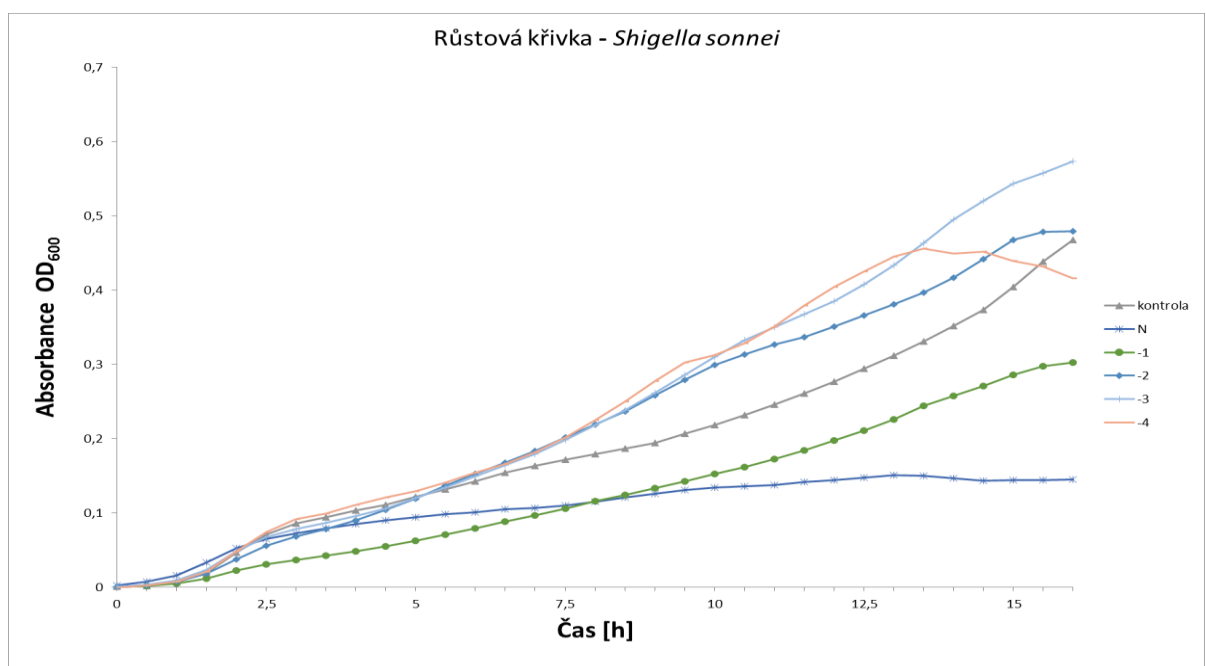
hodiny od začátku inkubace pouze k adaptaci bakteriálních kmenů na nové prostředí. Po této době začala optická absorbance jednotlivých vzorků narůstat.

Z výsledku experimentu lze konstatovat, že připravené bakteriociny nedosahovaly takového efektu jako v případě vpichové metody. U všech testovaných kmenů *Salmonella* (vyjma *Salmonella typhimurium* CCM7205) byly u vpichového testu zaznamenány inhibiční zóny, avšak inhibiční účinek připraveného bakteriocinu byl v destičce zanedbatelný.

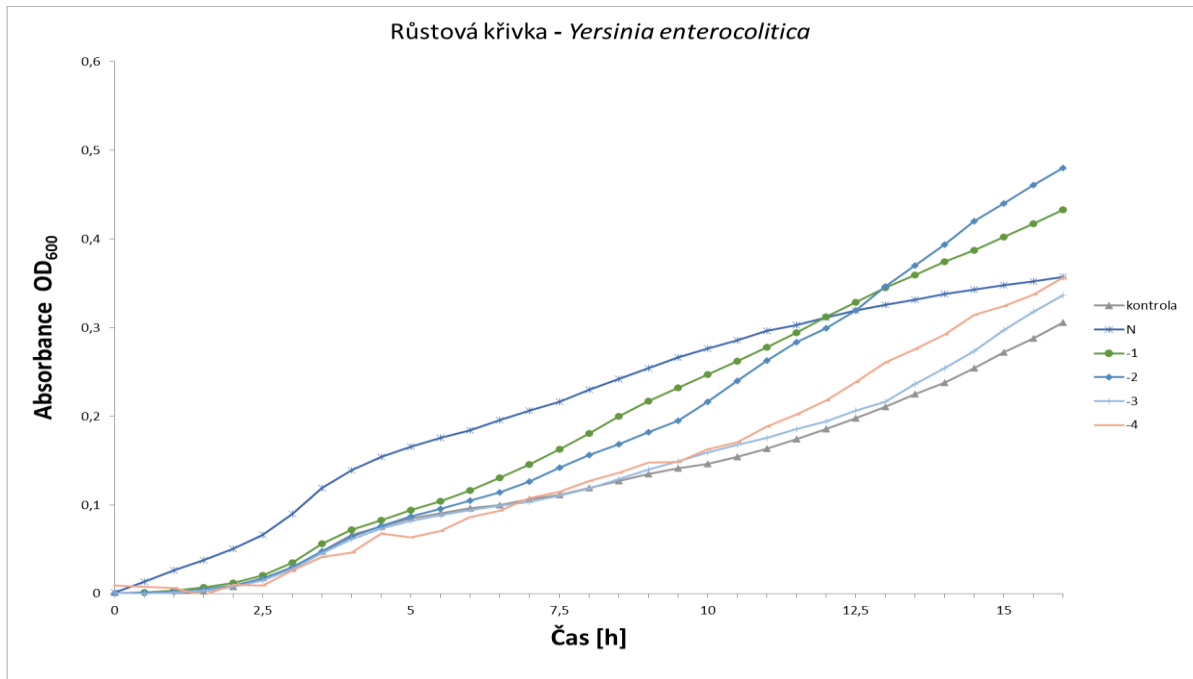
Z dalších gramnegativních bakterií patřících do čeledi Enterobacteriaceae bylo prováděno měření zákalu u kmenů -*Klebsiella oxytoca*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp.a *Shigella sonnei*.

Z jednotlivých růstových křivek bylo zjištěno, že u testovaných kmenů 88, 217, 213, 2 (Obr. 20,21, 22, 23) nebyla registrována žádná mikrobiální aktivita. I přes přítomnost bakteriocinů došlo u těchto kmenů k obnovení růstu bakterií. Ten byl zaznamenán rovněž zvýšenou optickou absorbancí, přičemž hodnoty optické hustoty byly srovnatelné.

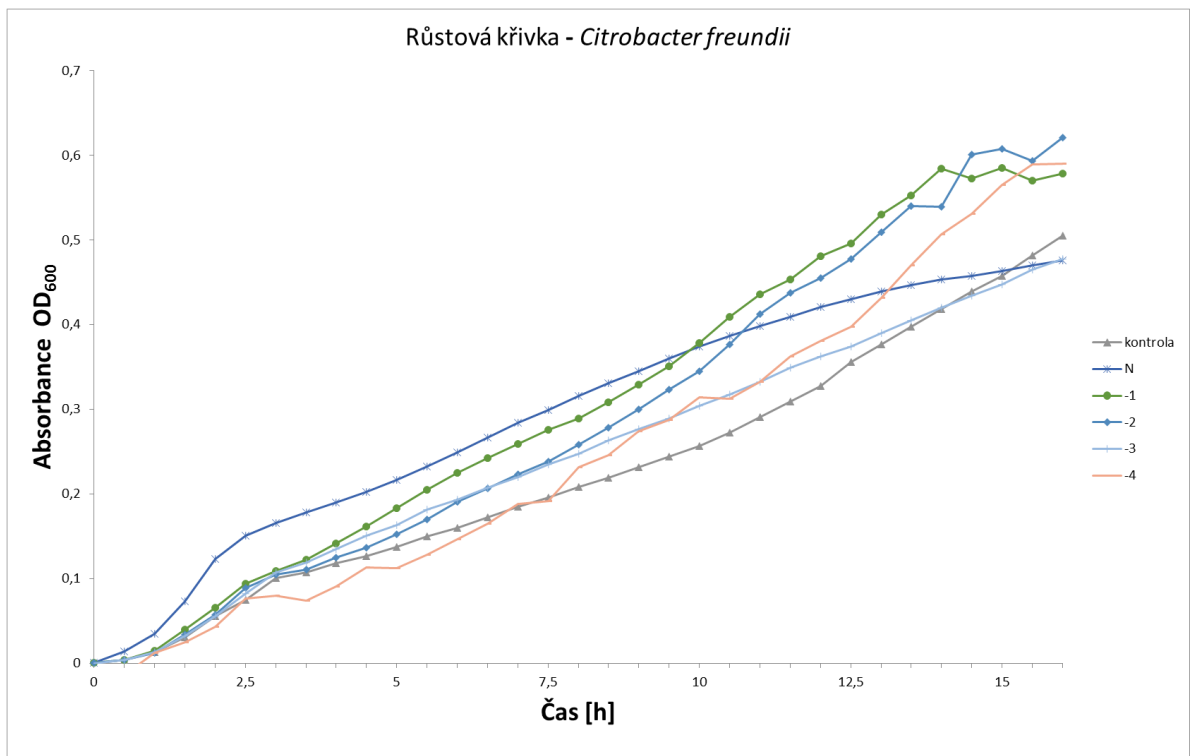
Z růstové křivky bakterie *Shigella sonnei* (Obr. 19) lze vypočítat mírnou inhibiční aktivitu bakteriocinů u ředění 10^{-1} , projevující se zpomaleným nárůstem bakteriálního kmene v porovnání s kontrolním vzorkem. Inhibice u této bakterie byla potvrzena nejen metodou vpichu, ale zároveň v kapkovém testu, kdy došlo k vytvoření inhibičních zón u obou připravených bakteriocinů s koncentrací mitomycinu 0,5 a 0,75 $\mu\text{g/ml}$.



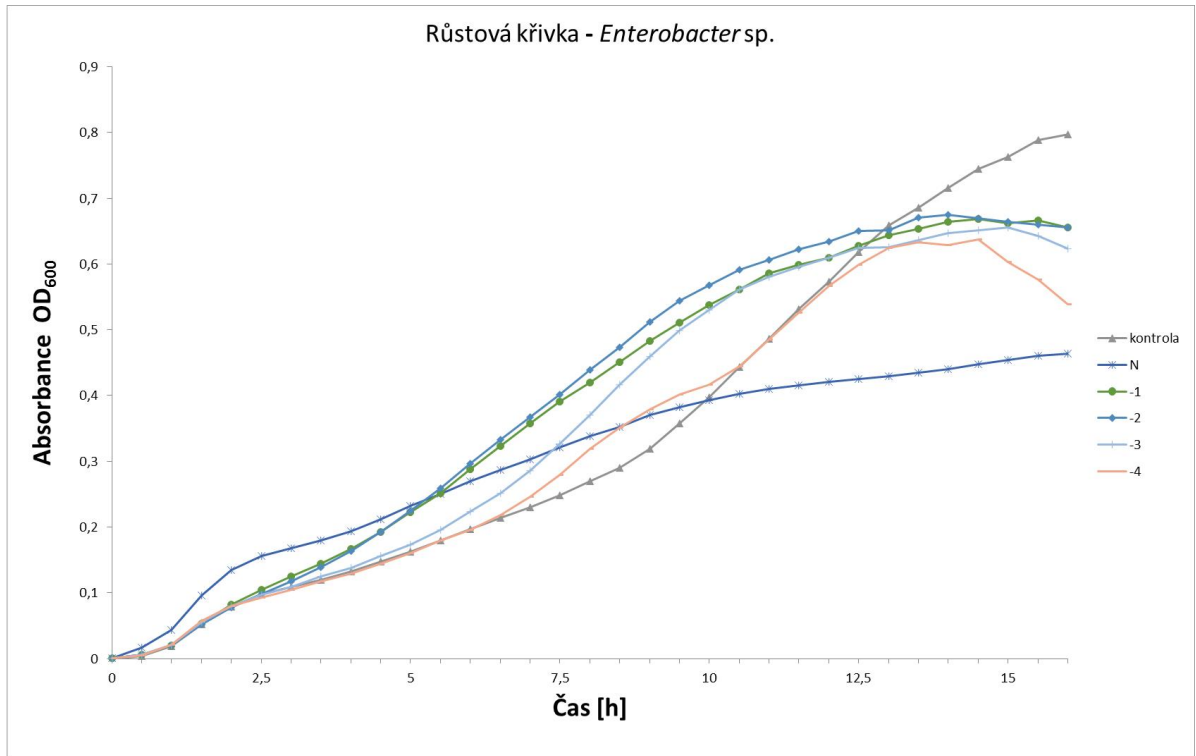
Obr. 19. Růstové křivky *Shigella sonnei* (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění.



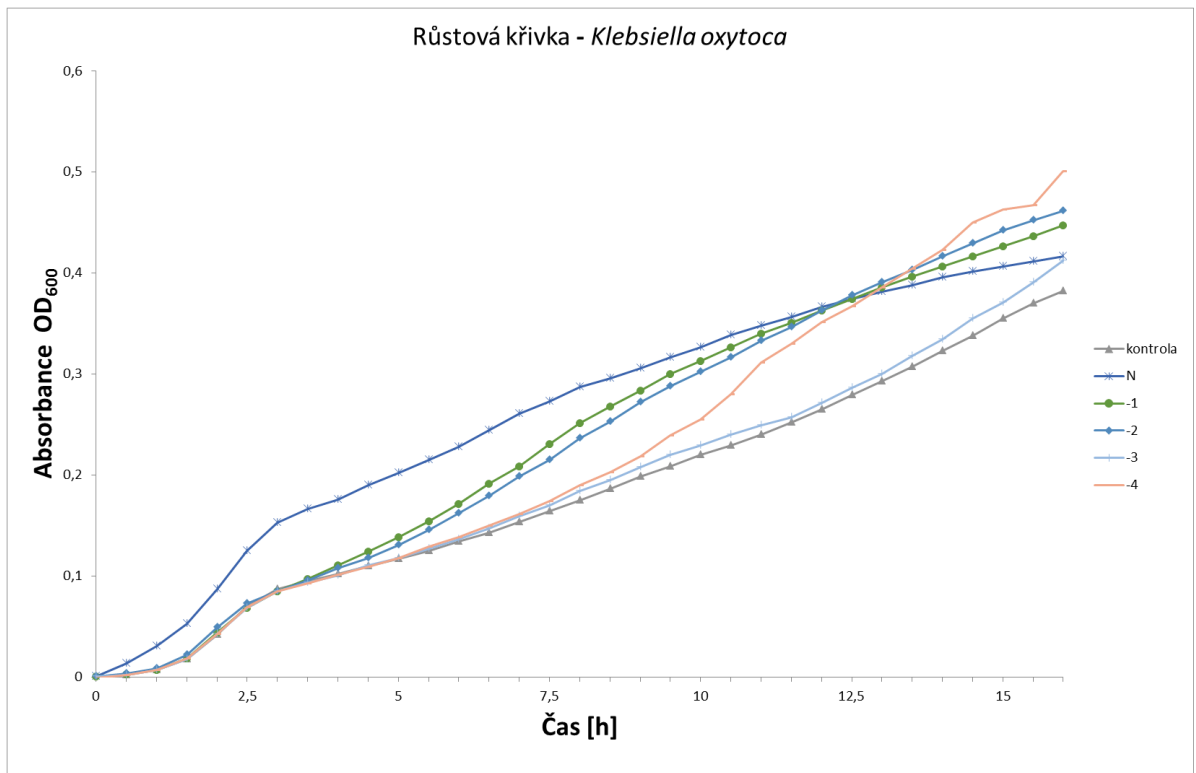
Obr. 20. Růstové křivky *Yersinia enterocolitica* (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění



Obr. 21. Růstové křivky *Citrobacter freundii* (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění



Obr. 22. Růstové křivky *Enterobacter* sp. (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění



Obr. 23. Růstové křivky *Klebsiella oxytoca* (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění

Výsledky experimentu ukazují, že bakteriostatický účinek nebyl na všechny citlivé bakterie stejný. Největší antimikrobiální účinek kolicinu byl zaznamenán u kmenů bakterie *E. coli* 122W a 125W. Mírné inhibice bylo, také dosaženo u bakterie *Shigella sonnei*. Tato bakterie v přítomnosti bakteriocinu vykazovala pomalejší růst v porovnání s kontrolním vzorkem. U ostatních testovaných bakteriálních kmenů byl vykázán růst i v přítomnosti bakteriocinů, i když zpočátku testování byla zaznamenána inhibice po dobu jedné hodiny. Tato přechodná inhibice mohla být způsobena adaptací na nové prostředí, protože po této době, kdy došlo k opětovnému růstu bakterií, již nebyl pozorován žádný inhibiční účinek.

ZÁVĚR

Koliciny jsou antimikrobiální látky produkované bakteriemi proti bakteriálním kmenům *Escherichia coli* a blízké příbuzným bakteriím. Koliciny jsou produkovány za stresových podmínek, zejména v prostředí vysoké hustoty bakterií. Produkční kmeny *E. coli* tak získávají konkurenční výhodu vůči ostatním bakteriím. Multiprodukční kmeny by tudíž mohly mít extra výhodu a případně rozšířené spektrum inhibice.

Cílem této diplomové práce bylo zabývat se inhibičními účinky bakteriocinů E1, B, M, Ia/Ib, mB17 kmene *Escherichia coli* 225 izolovaného z bažantího masa vůči v potravinách nežádoucím či patogenním gramnegativním bakteriím.

V první fázi experimentu byly sledovány inhibiční účinky produkčního kmene *E. coli* 225 na vybrané gramnegativní bakterie vpichovým testem. Citlivost gramnegativních bakterií na účinky kolicinů se projevila vytvořením inhibiční zóny kolem místa vpichu. Největší inhibiční zóny byly zaznamenány u bakterií *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* a u všech testovaných neprodukčních kmenů *Escherichia coli*.

Na základě pozitivního výsledku vpichového testu u bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 bylo provedeno stanovení dynamiky růstu v tekutém médiu. Z experimentu vyplynulo, že při stejné optické hustotě bakterií na začátku kultivace nebylo dosaženo žádaného poměru bakterií 1:1 v kultivačním médiu. Bakteriociny produkčního kmene *E. coli* 225 v důsledku nebyly schopny inhibice kmene *Salmonella*, ani při indukci UV zářením. Další experiment byl proveden v poměru 1:50 ve prospěch produkčního kmene. Získané výsledky růstových křivek vykazovaly vyšší nárůst bakteriálních buněk u *E. coli* 225 než u bakterie *Salmonella* CCM 4420.

V další fázi experimentu byl kapkovou metodou sledován inhibiční účinek směsi bakteriocinů kmene *E. coli* 225 izolovaného po indukci mitomycinem C ve dvou konečných koncentracích (0,5 µg/ml a 0,75 µg/ml) v kultivačním médiu. Největší inhibiční efekt byl prokázán na neprodukční kmeny *E. coli* a na bakterii *Shigella sonnei*. Při stanovení dynamiky inhibičního účinku izolované směsi bakteriocinů na vybrané gramnegativní bakterie izolované z potravin v destičkovém uspořádání byl pozorován největší inhibiční efekt podobně jako u vpichového či kapkového testu u neprodukčních kmenů *E. coli* 122 W, 125 W a 119 W. Částečná rezistence byla zaznamenána u bakterie *Shigella sonnei* projevující se zpomaleným růstem.

V tomto experimentu nebyl prokázán stejný účinek produkčního kmene *E. coli* 225 (vpi-
chová metoda) a izolované směsi bakteriocinů (kapková metoda) na testované gramnega-
tivní bakterie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] RILEY, M. A. a J. E. WERTZ. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*. 2002, vol. 84, 5-6, s. 357-364. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01421-9.
- [2] GÁLVEZ, A., H. ABRIOUEL, N. BENOMAR a R. LUCAS. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*. 2010, vol. 21, issue 2, s. 142-148. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.01.005.
- [3] DOBSON, A., P. D. COTTER, R. P. ROSS a C. HILL. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait?. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011-12-16, vol. 78, issue 1, s. 1-6. DOI: 10.1128/AEM.05576-11.
- [4] YANG, S.-C., C.-H. LIN, C. T. SUNG a J.-Y. FANG. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*. 2014-05-26, vol. 5, s. -. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241.
- [5] WANG, H., D. P. FEWER, K. SIVONEN a M. A. BLAZQUEZ. Genome Mining Demonstrates the Widespread Occurrence of Gene Clusters Encoding Bacteriocins in Cyanobacteria. *PLoS ONE*. 2011-7-20, vol. 6, issue 7, e22384-. DOI: 10.1371/journal.pone.0022384.
- [6] INGLIS, R. F., B. BAYRAMOGLU, O. GILLOR a M. ACKERMANN. The role of bacteriocins as selfish genetic elements. *Biology Letters*. 2013-03-06, vol. 9, issue 3, s. 20121173-20121173. DOI: 10.1098/rsbl.2012.1173.
- [7] SILHAVY, T. J., D. KAHNE a S. WALKER. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2010, vol. 2, issue 5, a000414-a000414 [cit. 2015-03-31]. DOI: 10.1101/cshperspect.a000414.
- [8] *Bacteriocins: ecology and evolution*. Editor M Riley, M Chavan. New York: Springer, c2007, x, 150 p. ISBN 9783540366034.
- [9] *Klinicky významné bakterie*. 1 vyd. Praha: Triton, 2012, 123 s. ISBN 978-807-3875-886
- [10] KOHOUTOVÁ D. Střevní mikrobiota u idiopatických střevních zánětů a kolorektálních neoplázií. Hradec Králové, 2013. Dizertační práce. Lékařská fakulta UK v Hradci Králové. Školitel Jan Bureš

- [11] CHRISTENSON, J. K. a D. M. GORDON. Evolution of colicin BM plasmids: the loss of the colicin B activity gene. *Microbiology* [online]. 2009, vol. 155, issue 5, s. 1645-1655 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1099/mic.0.026666-0.
- [12] USÓN, I., S. I. PATZER, D. D. RODRÍGUEZ, V. BRAUN a K. ZETH. The crystal structure of the dimeric colicin M immunity protein displays a 3D domain swap. *Journal of Structural Biology*. 2012, vol. 178, issue 1, s. 45-53. DOI: 10.1016/j.jsb.2012.02.004.
- [13] CAO, Z. A P. E KLEBBA. Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie*. 2002, vol. 84, 5-6, s. 399-412. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01455-4.
- [14] BARNES, B., H. SIDHU a D. M. GORDON. Host gastro-intestinal dynamics and the frequency of colicin production by *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2007-09-01, vol. 153, issue 9, s. 2823-2827. DOI: 10.1099/mic.0.2007/007120-0.
- [15] JOHNSON, Christopher L., Helen RIDLEY, Robert J. PENGELLY, Mohd Zulkifli SALLEH a Jeremy H. LAKEY. The unstructured domain of colicin N kills *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 2013, vol. 89, issue 1, s. 84-95. DOI: 10.1111/mmi.12260.
- [16] BUDIČ, M., M. RIJAVEC, Ž. PETKOVŠEK, D. ŽGUR-BERTOK a M. A. WEBBER. *Escherichia coli* Bacteriocins: Antimicrobial Efficacy and Prevalence among Isolates from Patients with Bacteraemia. *PLoS ONE*. 2011-12-19, vol. 6, issue 12, e28769-. DOI: 10.1371/journal.pone.0028769.
- [17] REBUFFAT, S. Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochemical Society Transactions*. 2012-12-1, vol. 40, issue 6, s. 1456-1462. DOI: 10.1042/BST20120183.
- [18] ETH, K., C. ROMER, S. I. PATZER a V. BRAUN. Crystal Structure of Colicin M, a Novel Phosphatase Specifically Imported by *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 2008-09-05, vol. 283, issue 37, s. 25324-25331. DOI: 10.1074/jbc.M802591200.
- [19] KIM, Y. Ch., A. W. TARR a Ch. N. PENFOLD. Colicin import into *E. coli* cells: A model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2014, vol. 1843, issue 8, s. 1717-1731 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.04.010.

- [20] LAZDUNSKI, C. J., E. BOUVERET A H. BENEDETTI. Colicin Import into *Escherichia coli* Cells. 1998. Dostupné z:<http://jb.asm.org/content/180/19/4993.full#ref-list-1>
- [21] BOUVERET, E., L. JOURNET, A. WALBURGER, CASCALES, H. BÉNÉDETTI a R. LLOUBÈS. Analysis of the *Escherichia coli* Tol–Pal and TonB systems by periplasmic production of Tol, TonB, colicin, or phage capsid soluble domains. *Biochimie*. 2002, vol. 84, 5-6, s. 413-421. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01423-2.
- [22] CASCALES, E., S. K. BUCHANAN, D. DUCHE, C. KLEANTHOS, R. LLOUBES, K. POSTLE, M. RILEY, S. SLATIN a D. CAVARD. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007, vol. 71, issue 1, s. 158-229. DOI: 10.1128/membr.00036-06.
- [23] LAZZARONI, J. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, vol. 177, issue 2, s. 191-197. DOI: 10.1016/s0378-1097(99)00293-1.
- [24] SINGH, J. a Ch. GHOSH. Ribosomal Encoded Bacteriocins: Their Functional Insight and Applications. *Journal of Microbiology Research*. 2012-3-9, vol. 2, issue 2, s. 19-25. DOI: 10.5923/j.microbiology.20120202.04.
- [25] VANKEEMELBEKE, M., P. O'SHEA, R. JAMES, Ch. N. PENFOLD a Eric CASCALES. Interaction of Nuclease Colicins with Membranes: Insertion Depth Correlates with Bilayer Perturbation. *PLoS ONE*. 2012-9-28, vol. 7, issue 9, e46656-. DOI: 10.1371/journal.pone.0046656.
- [26] BRAUN, V., S. I PATZER, K. HANTKE, R. JAMES, T. ITOH a S. HIRAGA. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*. 2002, vol. 84, 5-6, s. 397-411.
- [27] ŠMARDA, J. a D. ŠMAJS. Colicins—Exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica* [online]. 1998, vol. 43, issue 6, s. 563-582 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1007/bf02816372.
- [28] CURSINO, L., J. MARDA, E. CHARTONE-SOUZA a A. M. A. NASCIMENTO. Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002, vol. 33, issue 3. DOI: 10.1590/S1517-83822002000300001.

- [29] REBUFFAT, S. Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochemical Society Transactions*. 2012-12-1, vol. 40, issue 6, s. 1456-1462. DOI: 10.1042/BST20120183.
- [30] PONS, A-M., F. DELALANDE, M. DUARTE, S. BENOIT, I. LANNELUC, S. SABLE, A. VAN DORSSELAER a G. COTTENCEAU. Genetic Analysis and Complete Primary Structure of Microcin L. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004-01-23, vol. 48, issue 2, s. 505-513. DOI: 10.1128/AAC.48.2.505-513.2004.
- [31] MORIN, N., I. LANNELUC, N. CONNIL, M. COTTENCEAU, A. M. PONS a S. SABLE. Mechanism of Bactericidal Activity of Microcin L in Escherichia coli and Salmonella enterica. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011-02-24, vol. 55, issue 3, s. 997-1007. DOI: 10.1128/AAC.01217-10.
- [32] SEVERINOV, K., E. SEMENOVA, A. KAZAKOV, T. KAZAKOV a M. S. GELFAND. Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Molecular Microbiology*. 2007, vol. 65, issue 6, s. 1380-1394. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05874.x.
- [33] DESTOUMIEUX-GARZÓN, D., J. PEDUZZI a S. 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.
- [34] DUQUESNE, S., D. DESTOUMIEUX-GARZÓN, J. PEDUZZI a S. REBUFFAT. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*. 2007, vol. 24, issue 4, s. 708-. DOI: 10.1039/b516237h.
- [35] ZSCHÜTTIG, A., K. ZIMMERMANN, J. BLOM, A. GOESMANN, Ch. PÖHLMANN, F. GUNZER a S. BERESWILL. Identification and Characterization of Microcin S, a New Antibacterial Peptide Produced by Probiotic Escherichia coli G3/10. *PLoS ONE*. 2012-3-30, vol. 7, issue 3, e33351-. DOI: 10.1371/journal.pone.0033351.
- [36] 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.
- [37] CLERMONT, O., S. BONACORSI a E. BINGEN. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*.

- gy. 2000-10-01, vol. 66, issue 10, s. 4555-4558. DOI: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.
- [38] GORDON, D. M. a 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.
- [39] MAJEED, H., O. GILLOR, B. KERR a M. A RILEY. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *The ISME Journal*. 2010-07-22, vol. 5, issue 1, s. 71-81. DOI: 10.1038/ismej.2010.90.
- [40] HOL, F., M. J VOGES, C. DEKKER a J. E KEYMER. Nutrient-responsive regulation determines biodiversity in a colicin-mediated bacterial community. *BMC Biology* [online]. 2014, vol. 12, issue 1 [cit. 2015-02-14]. DOI: 10.1186/s12915-014-0068-2.
- [41] CHALÓN, M. C., L. ACUÑA, R. D. MORERO, C. J. MINAHK a A. 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.
- [42] VINCENT, P. Inhibition of *Salmonella enterica* serovars by microcin J25. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, vol. 236, issue 1, s. 103-107. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.05.027.
- [43] 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.
- [44] PAPAGIANNI, M., N. AVRAMIDIS, G. FILIOUSSIS, D. DASIOU a I. AMBROSIADIS. *Microbial Cell Factories*. vol. 5, issue 1, s. 30-. DOI: 10.1186/1475-2859-5-30.
- [45] BETINA, V. *Mikrobiologické laboratorne metódy*. 1. vyd. Bratislava: Vyd. tech. a ekon. lit, 1987, 536 s.
- [46] GAILLARD-GENDRON, S., D. VIGNON, G. COTTENCEAU, M. GRABER, N. ZORN, A. DORSSELAER a A.- M. PONS. Isolation, purification and partial amino acid sequence of a highly hydrophobic new microcin named microcin L produced by

- Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, vol. 193, issue 1, s. 95-98. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09408.x.
- [47] SCHAMBERGER, G. P., R. L. PHILLIPS, J. L. JACOBS a F. DIEZ-GONZALEZ. Reduction of Escherichia coli O157: H7 Populations in Cattle by Addition of Colicin E7-Producing E. coli to Feed. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004-10-04, vol. 70, issue 10, s. 6053-6060. DOI: 10.1128/AEM.70.10.6053-6060.2004.
- [48] BURDYCHOVÁ, R. a P. SLÁDKOVÁ. Mikrobiologická analýza potravin. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 208 s., [6] l. barev. obr. příl. ISBN 978-80-7375-116-6.
- [49] BROWN, S. P., R. F. INGLIS a F. TADDEI. SYNTHESIS: Evolutionary ecology of microbial wars. *Evolutionary Applications* [online]. 2009, vol. 2, issue 1, s. 32-39 [cit. 2015-03-03]. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2008.00059.x.
- [50] FOREST, K. a C. SCHUTT. Protein engineering for structure determination. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 1992, vol. 2, issue 4, s. 576-581 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.1016/0959-440x(92)90088-o.
- [51] BRAUN, V. Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiology Reviews*. 1995, vol. 16, issue 4, s. 295-307. DOI: 10.1016/0168-6445(95)00003-U.
- [52] MIKOVÁ K.. *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.
- [53] CHUCHMOVÁ M. *Antibiotická rezistence a kolicinogenie u kmenů Escherichia coli izolovaných z potravin*. Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [54] RILEY, Margaret A. a David M. GORDON. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology* [online]. 1999, vol. 7, issue 3, s. 129-133 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.1016/s0966-842x(99)01459-6.
- [55] URBANOVÁ M. *Inhibiční účinky bakteriocinů gramnegativních bakterií izolované z potravin*. Zlín, 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta

technologická, Ústav analýzy a chemie potravin. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová

- [56] ZIHLER, A., M. GAGNON, Ch. CHASSARD a Ch. LACROIX. Protective effect of probiotics on Salmonella infectivity assessed with combined in vitro gut fermentation-cellular models. *BMC Microbiology*[online]. 2011, vol. 11, issue 1 [cit. 2015-03-05]. DOI: 10.1186/1471-2180-11-264.
- [57] ZIHLER, A., G. Le BLAY, T. de WOUTERS, C. LACROIX, C.P. BRAEGGER, A. LEHNER, P. TISCHLER, T. RATTEI, H. HÄCHLER a R. STEPHAN. In vitro inhibition activity of different bacteriocin-producing *Escherichia coli* against *Salmonella* strains isolated from clinical cases. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2009, vol. 49, issue 1, s. 31-38 [cit. 2015-03-05]. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2009.02614.x.

SEZNAM TABULEK

- Tab. 1 Využití různých receptorů proteinů a způsoby translokace skupiny kolicinů A a B k proniknutí do bakterií [19].
- Tab. 2 Klasifikační schéma mikrocinů produkovaných bakteriemi *E. coli* [4].
- Tab. 3 Složení masopeptonového bujonu.
- Tab. 4 Složení masopeptonového agaru.
- Tab. 5 Složení soft agaru.
- Tab. 6 Složení Xylóza-Lyzin-Deoxycholát agaru
- Tab. 7 Složení fyziologického roztoku.
- Tab. 8 Seznam použitých sbírkových kmenů.
- Tab. 9 Seznam gramnegativních bakterií – izolátů z potravin [52, 53].
- Tab. 10 Inhibiční spektrum účinku kolicinů – kvalitativně (desítkové ředění) v AU.
- Tab. 11 Kvantitativní stanovení účinku surové směsi bakteriocinů a bezbuněčného extraktu (AU)
- Tab. 12 Kvantitativní stanovení účinku surového kolicinu indukovaného mitomycinem C – kapková metoda.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr.1. Grafické znázornění struktury kolicinu, složeného ze tří domén: T-translokační (zelená barva), R-receptorová (červená barva), C-cytotoxická (modrá barva) [50].
- Obr.2. Grafické znázornění umístění proteinů Tol systému v buněčném povrchu. [51].
- Obr.3. Grafické znázornění umístění proteinů TonB systému v buněčném povrchu. [51].
- Obr.4. Testování produkce bakteriocinů – vpichová metoda: inhibiční efekt kolicinů vyjadřuje inhibiční zóna růstu kolem vpichu produkční bakterie
- Obr.5. Růstové křivky bakterií *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 bez indukce UV zářením.
- Obr.6. Růstová křivka bakterií *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 bez indukce UV zářením
- Obr.7. Růstové křivky kmenů *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 během kultivace, po indukci UV zářením
- Obr.8. Růstové křivky kmenů *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 během kultivace, po indukci UV zářením
- Obr.9. Růstové křivky kmenů *E. coli* 225 a *Salmonella* CCM 4420 během kultivace
- Obr.10. Kolonie bakterií na XLD agaru – *Salmonella* CCM4420 (černé kolonie), *Escherichia coli* 225 (žluté kolonie).
- Obr.11. Kapková metoda – titr kolicinu
- Obr.12. Testování působení bakteriocinů – kapková metoda: účinnost se projevila jako inhibiční zóna růstu kmene *Shigella sonnei*
- Obr.13. Růstové křivky *E. coli* 122W (průměrné hodnoty zákalu(OD₆₀₀)) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění.
- Obr.14. Růstové křivky *E. coli* 125W (průměrné hodnoty zákalu (OD₆₀₀))v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění
- Obr.15. Růstové křivky *E. coli* 119W (průměrné hodnoty zákalu (OD₆₀₀)) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění
- Obr.16. Růstové křivky *Salmonella* CCM4420 (průměrné hodnoty zákalu (OD₆₀₀)) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění

- Obr.17. Růstové křivky *Salmonella Typhimurium* 10W (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění
- Obr.18. Růstové křivky *Salmonella* Sp. 22W (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění
- Obr.19. Růstové křivky *Shigella sonnei* (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění
- Obr.20. Růstové křivky *Yersinia enterocolitica* (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění
- Obr.21. Růstové křivky *Citrobacter freundii* (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění
- Obr.22. Růstové křivky *Enterobacter* sp. (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění
- Obr.23. Růstové křivky *Klebsiella oxytoca* (průměrné hodnoty zákalu (OD_{600})) v přítomnosti bakteriocinů v různém ředění

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Lab	bakterie mléčného kvašení
ATP	adenosintrifosfát
DNáza	deoxyribonukleáza
RNáza	ribonukleáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
kDA	kilodalton
TonB	protein plazmatické membrány
TolA	mebránový protein
TolB	mebránový protein
TolQ	mebránový protein
TolR	mebránový protein
ExbB	proteinový komplex
ExbD	proteinový komplex
EepA	vnější mebránový receptor
TMD	transmembránová doména
Mcc	mikrocin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie

