

Výskyt kolicinogenie u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin

Tereza Krejčířiková

Bakalářská práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza KREJČÍŘKOVÁ**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Výskyt kolicinogenie u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární rešerži na téma koliciny, zaměřte se na jejich rozdělení.
2. Charakterizujte velikost, producenty a molekulární vlastnosti. Krátce popište metodu PCR a její využití při studiu kolicinů.
3. Popište mikrobiální drůbeží kůže a možnosti její dekontaminace.
4. V experimentální části sbírejte izoláty *E. coli* z potravin a vody a proveďte testy na produkci kolicinů.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

BEDNÁŘ, M.; FRAŇKOVÁ, V.; SCHINDLER, J.; SOUČEK, A.; VÁVRA, J. Lékařská mikrobiologie–Bakteriologie, Virologie, Parazitologie. Praha 2: Nakladatelství Marvil, 1998, 558 s.

ŠMAJS, D.; ŠMARD, J. Koliciny–letální proteiny čeledi Enterobacteriaceae. Biologické listy 62(2): 107–130, 1997

CASCALES, E.; BUCHANAN, S.; Duche, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBE's, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin Biology. microbiology and molecular biology reviews, Mar. 2007, p. 158–229

VOLDŘICH, M.; JECHOVÁ, M.; a kolektiv autorů. Bezpečnost pokrmů v gastronomii–malé a střední provozovny. Praha 5: České a slovenské nakladatelství, 2006

PILS, H.; ŠMAJS, D.; BRAUN, V. The tip of the hydrophobic hairpin of colicin U is dispensable for colicin U activity but is important with the immunity protein. Journal of bacteriology, 1998, p. 4111–4115

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Magda Doležalová

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

21. listopadu 2007

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2007

Ve Zlíně dne 12. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



Ignác Hoza
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Koliciny jsou antimikrobní proteiny s baktericidním účinkem proti blízce příbuzným druhům či rodům. Práce předkládá informace o základních vlastnostech kolicinů, zabývá se klasifikací a možnostmi detekce kolicinogenie. *Escherichia coli* je běžně izolovaná z různých druhů potravin. Tato práce se zaměřila na drůbeží mikroflóru a možnosti izolace kmenů *E. coli*. Sběrka kmenů izolovaných z potravin byla testována na produkci kolicinů či mikrocinů. U vybraných produkčních kmenů byla provedena typizace metodou PCR. Nejčastěji nalezené typy byly koliciny Ia a Y a mikrocin V.

Klíčová slova: kolicin, mikrocin, *Escherichia coli*, drůbeží mikroflóra

ABSTRACT

Colicins are antimicrobial proteins with bactericidal activity against closely relative species and genera. Thesis deals with basic characterisation, classification and detection of colicins. *E. coli* strains are commonly isolated from different types of food. This work is also focused on poultry microflora. Collection of *E. coli* strains isolated from food was tested for colicinogeny. Colicinogenic strains were then analyzed by PCR-typization. The most frequently found bacteriocins were colicin Ia and U and microcin V.

Keywords: colicin, microcin, *Escherichia coli*, poultry microflora

Tímto chci poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Magdě Doležalové, za odborné vedení, rady, připomínky a všechny zodpovězené dotazy týkající se dané problematiky.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, jak je uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANIZMŮ NA KŮŽI DRŮBEŽE	10
1.1 MIKROORGANIZMY VYSKYTUJÍCÍ SE NA KŮŽI DRŮBEŽE.....	10
1.1.1 <i>Campylobacteraceae</i>	10
1.1.2 <i>Pseudomonas</i>	11
1.1.3 <i>Enterobacteriaceae</i>	11
1.1.4 <i>Clostridium</i>	11
1.1.5 <i>Listeria monocytogens</i>	12
1.1.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2 ESCHERICHIA COLI	13
2.1 <i>E. COLI</i> NISSLE 1917.....	13
2.2 <i>E. COLI</i> O157:H7.....	14
3 KOLICINY	15
3.1 INTERAKCE KOLICINU S BUŇKOU	15
3.1.1 Interakce kolicinu s citlivou bakteriální buňkou	15
3.1.2 Interakce kolicinu s necitlivou bakteriální buňkou	16
3.2 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA KOLICINŮ	16
3.3 KLASIFIKACE KOLICINŮ	17
4 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	18
II PRAKTICKÁ ČÁST	19
5 METODIKA	20
5.1 PŮDY	20
5.2 POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	21
5.3 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY	21
5.3.1 Indikátorové kmeny.....	21
5.3.2 Izolované kmeny	22
5.4 METODY.....	24
5.4.1 Izolace vzorků	24
5.4.2 Vpichový pokus na zjištění produkce kolicinů	24
5.4.3 Metoda PCR	24
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	25
ZÁVĚR	32
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	33
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	37
SEZNAM TABULEK	38
SEZNAM OBRÁZKŮ	39

SEZNAM PŘÍLOH.....	40
---------------------------	-----------

ÚVOD

Koliciny jsou toxické proteiny produkované bakteriemi kolicinogenních kmenů *Escherichia coli*. Identifikace prvního kolicinu V byla provedena v roce 1925. Ne všechny kmeny rodu *Escherichia* jsou patogenní, např. kmen *E. coli* Nissle 1917, který produkuje dva typy mikrocinů H47 a M, je využíván jako probiotikum při střevních onemocněních. Přítomnost bakterie *E. coli* v potravinách považujeme za ukazatele fekálního znečištění. Byla izolována nejen z hovězího, vepřového a drůbežího masa, ale také nepasterovaného mléka a vody. Pomocí genotypových analýz (např. AFLP) se může vysledovat zdroj kmene *E. coli* izolovaného např. z drůbežích jatek a vody. Tato práce se zaměřila na výskyt *E. coli* na povrchu drůbežího masa a incidenci kolicinogenie. Určení typu kolicinu či mikrocinu produkčních kmenů pomocí metody PCR bylo použito pro hledání souvislostí mezi izolovanými kmeny.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANIZMŮ NA KŮŽI DRŮBEŽE

Drůbeží maso má vhodnou skladbu živin pro mikrobiální růst. S prodlužujícím skladováním stoupá pH až na 7,2 (běžné pH je v rozmezí 5,7 – 6,7). Kůže, která je kontaminována mikroorganismy, chrání i po porážce svalovinu před kontaminací.

Průběh chovu a zpracování drůbeže může být zdrojem mnohých nákaz. Při jatečním zpracování je důležitým zdrojem kontaminace peří. Při paření je teplota vody 60 – 63 °C, ve které zástupci *Enterobacteriaceae* většinou nepřežívají. Během škrubání dochází na strojích ke zkříženému přenosu mikroorganismů, hlavně salmonel. Nejrizikovější pro přenos patogenních mikroorganismů je eviscerace [6].

Kažení drůbeže se projevuje zápachem, pH stoupá s obsahem čpavku. Zejména se množí psychrotrofní pseudomonády, to se projevuje osliznutím, maso je bez chuti [22]. Předchlazení a chlazení masa ovlivňuje jeho mikroflóru [6]. Před chlazením vodou, která může být kontaminována, se dává přednost chlazení vzduchem [22]. Mražení a skladování mražených výrobků snižuje spolehlivě počet mikroorganismů. Teplota pod -10 °C téměř zničené mikroorganismy usmrtí, ale zvýšením teploty se opět ožíví [7].

1.1 Mikroorganismy vyskytující se na kůži drůbeže

Na drůbeží kůži se běžně vyskytují zástupci z čeledí *Campylobacteraceae*, *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae* a dále grampozitivní rody *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria* a další.

1.1.1 *Campylobacteraceae*

Organismy patřící do této čeledi jsou zakřivené gramnegativní tyčinky. Typický zástupce této čeledi je rod *Campylobacter*. Jde o bakterie, které byly dříve známy pod pojmem mikroaerofilní vibria. Kampylobaktery vyžadují speciální živné půdy a mikroaerofilní prostředí. Buňky netvoří spóry. Jejich optimální růstová teplota se pohybuje v rozmezí 42-43 °C. Bakterie produkují enterotoxiny, které jsou podobné cholerovému toxinu [8]. Kampylobaktery jsou obsaženy na drůbežím mase $10^3 - 10^6$ CFU/g [7]. Do skupiny jsou řazeny *Campylobacter coli*, *C. upsaliensis*, *C. jejuni*, který je patogenní pro člověka [9]. *C. jejuni* způsobuje infekci, která je přenosná ze zvířete na člověka. K přenosu dochází buď přímým kon-

taktem nebo po konzumaci nedostatečně tepelně ošetřeného mléka nebo masa, zejména drůbežího. V posledních letech se u nás toto onemocnění dostalo na druhé místo mezi alimentárními nákazami hned po salmonelóze. Inkubační doba je 2-7 dní [10]. Kampylobakteróza se nejvíce vyskytuje v letních měsících [8].

1.1.2 *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* jsou gramnegativní pohyblivé tyčinky striktně aerobní, kataláza pozitivní, oxidáza pozitivní. Počet těchto psychrotrofů na drůbežím mase je 10^7 - 10^8 CFU/g. Jsou to silně proteolytické mikroorganismy. Přítomnost těchto mikroorganismů se projevuje zápachem [6]. Rostou v teplotním rozmezí 4 - 42 °C. Některé druhy tvoří pigmenty např. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*. Vyskytují se v přírodě, odpadních vodách, střevním traktu zvířat i lidí [8].

1.1.3 *Enterobacteriaceae*

Název *Enterobacteriaceae* jako první navrhl v roce 1937 O. Rahn [11]. Tato čeleď zahrnuje gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky (netvoří spóry). V potravinářství se jim věnuje velká pozornost. Patří sem rody *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Proteus*. Rod *Salmonella* netvoří kyseliny a nezkvašuje cukry, ale způsobuje vážná střevní onemocnění [9]. Bakterie jsou rozšířené po celém světě, jsou patogenní pro člověka a zvířata. Jsou schopny růst na různých půdách. Rostou při teplotě 37 °C, ale jsou schopny růstu v rozmezí teplot 18 - 42 °C. Kromě rodu *Salmonella* tvoří ze sacharidů kyseliny, tvoří katalázu, oxidázu netvoří [8]. Bakterie *Salmonella* je ničena teplotou nad 70 °C, kyselým prostředím, dezinfekčními prostředky. Živočišný produkt v syrovém stavu může být zdrojem nákazy. Zdrojem nákazy mohou být i hlodavci, kteří svými výkaly znečistí potraviny [10].

1.1.4 *Clostridium*

Tento rod je striktně anaerobní, rozsáhlý a důležitý z hlediska potravinářského. Některé druhy rodu *Clostridium* produkují nebezpečné toxiny. Z potravinářského hlediska je nejdůležitější *Clostridium botulinum*, produkující tzv. botulotoxiny. Jsou to nejúčinnější jedy způsobující ochrnutí nervové soustavy. Příznaky otravy se projeví po 72 hodinách po požití. Objeví se bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, sucho v ústech. Ve 30 – 65 % případů končí

smrtí. Další druh produkující toxin je *Clostridium perfringens* [9]. Toxin vzniká v tenkém střevě a způsobuje průjmové onemocnění. Nákaza vzniká v důsledku nedostatečné hygieny lidí připravujících pokrmy či nedostatečným tepelným zpracováním pokrmů [10].

1.1.5 *Listeria monocytogens*

Listeria monocytogens je patogenní mikroorganismus. Bakterie rostou dobře na kultivačních médiích v teplotním rozmezí 4 - 39 °C. Listerie jsou rezistentní ke změnám vnějšího prostředí, dobře se pomnožují i při vysokých koncentracích soli např. 10% NaCl. Tyto vlastnosti jim umožňují dlouhodobé přežití i mimo hostitelský organismus [8]. Často se vyskytuje na syrovém mase drůbeže [7]. Tento mikroorganismus je nebezpečný pro těhotné ženy, u kterých způsobuje potraty. U zvířat způsobuje nemoc ze siláže, v potravinovém řetězci tak dochází ke kontaminaci potravin. Pasterací mléka je tato bakterie ničena [8].

1.1.6 *Staphylococcus aureus*

Druh *Staphylococcus aureus* jsou grampozitivní koky, jedná se halotolerantní bakterie. Rostou při 37 °C, 10 °C i 45 °C a nesnáší kyselé prostředí. *Staphylococcus aureus* může přenášet živá drůbež. Většina rezidentních stafylokoků žijících na drůbeži je ničena během paření, ale během dalšího zpracování může dojít k rekontaminaci na strojích. Při nízkých teplotách nákaza stafylokoky roste a enterotoxin je produkován na syrových drůbežích výrobcích [7]. Způsobuje hnisavé záněty člověka i zvířat (např. mastitida dojníc). *Staphylococcus aureus* nejlépe roste na krevním agaru [12].

2 *ESCHERICHIA COLI*

E. coli, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, je nejprozkoumanějším bakteriálním druhem. Slouží jako modelový mikroorganismus pro genetické a biochemické studie. Kmeny *E. coli* se nachází v dolní části trávicího traktu člověka a teplokrevných zvířat. Vyskytuje se ve výkalech. Přítomnost v potravinách je tedy ukazatelem fekálního znečištění. Některé kmeny jsou patogenní způsobující nejen průjemová onemocnění a na druhou stranu kmen *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) se používá jako lék při střevním onemocnění.

Zkvašuje cukry za intenzivní tvorby kyselin a plynu. Z cukrů tvoří kyselinu mléčnou, pyrohroznovou, mravenčí [9].

E. coli je dobře známá tím, že produkuje 2 typy bakteriocinů a to koliciny a mikrociny. Mikrociny jsou genově kódovány antimikrobiálními peptidy o velikosti menší než 10 kDa [16, 25]. Koliciny jsou větší než mikrociny, jejich velikost je 90 kDa [28]. Mikrociny zatím nejsou tolik probádané jako koliciny [15].

Rod *Escherichia* má kromě druhu *E. coli* ještě další druhy a to *E. blattae*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*, *E. albertii*, *E. senegalensis* [30].

V křížovém pokusu bylo testováno 30 kmenů *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii* na produkci bakteriocinů a citlivosti navzájem. U kmenů *E. hermannii* a *E. vulneris* nebyla prokázána žádná bakteriocinogenie. Pouze u kmene *E. fergusonii* bylo 11 % bakteriocinogenních [14].

2.1 *E. coli* Nissle 1917

Nepatogenní kmen *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) se využívá jako probiotikum, hlavně při střevních onemocněních. Probiotický preparát z tohoto kmene se nazývá Mutaflor [17]. Kmen *E. coli* Nissle 1917 je jedním z nejlépe prozkoumaných kmenů. Kmen byl poprvé izolován ze střevní flóry dvou neonemocnělých příslušníků vojenské roty v průběhu první světové války [18]. Produkuje dva typy mikrocinů H47 a M [27]. Studie ukázaly, že kmen Nissle 1917 stimuluje humorální i buněčnou imunitní odpověď u dětí, které se narodily předčasně. Přípravek Mutaflor lze použít nejen při zánětlivých chorobách střev, ale i při infekčním průjmu. Velmi nadějně se zdá být i použití v neonatologii a do budoucna se předpokládá další rozšíření indikačního spektra [18].

Další probatický kmen *E. coli* H22 produkuje koliciny E1, Ib a mikrocin C7. Tento kmen inhibuje patogenní nebo potenciálně patogenní kmeny nejméně sedmi rodů z čeledi *Enterobacteriaceae*. Potenciální využití kmene H22 jako probiotikum pro dobytek vyžaduje podrobnější charakteristiku daného kmene. Primární role bakteriocinové syntézy probiotických bakterií zatím není znám. Identifikace, charakterizace a terapie aplikace probiotického kmene vzbuzuje velký zájem, protože jejich použití může redukovat množství podávání antibiotik [27].

2.2 *E. coli* O157:H7

Teprve na počátku osmdesátých let začaly být evidovány onemocnění způsobené bakterií *E. coli* O157:H7. Tato bakterie se vyskytuje zejména na syrovém mase, především hovězím, dále v neupraveném mléce a vodě. V roce 1987 byla provedena studie, která zjišťovala, ve kterých výrobcích je tento kmen přítomen. Onemocnění se vyskytovalo nejčastěji po konzumaci nedopečených hamburgerů [19].

Případ onemocnění se stal i během výletu ve Francii v roce 2002. Zde byl jako zdroj nákazy uveden drůbeží párek a okurkový salát. Analýzou vzorků stolice pacientů se prokázala přítomnost patogenního kmene *Escherichia coli* O157:H7. V případě okurkového salátu došlo pravděpodobně k fekálnímu znečištění vody [20].

3 KOLICINY

Koliciny jsou toxické proteiny, které jsou produkovány bakteriemi kolicinogenních kmenů *Escherichia coli* a některými příbuznými druhy či rody čeledi *Enterobacteriaceae*, a to během růstu jejich kultur. Do skupiny bakteriocinů patří nejen ty koliciny, které jsou produkovány *E. coli*, ale i další rody z čeledi *Enterobacteriaceae*. Avšak ne všechny bakteriociny

z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou označovány jako koliciny. Mají pouze základní vlastnosti a tato skupina patří do nadřazené skupiny bakteriocinů. Bakteriociny rodů např. *Shigella*, *Serratia* byly dříve označovány také jako koliciny. Dnes jsou označovány jinak např. bakteriociny produčních kmenů *Serratia marcescens* jsou označovány jako marcesciny [1].

První kolicin byl identifikován v roce 1925 (Gratia) jako termolabilní kolicin V, nyní je řazen k mikrocinům, ale stále se nazývá kolicin. Koliciny letálně působí na citlivé kmeny *E. coli* a příbuzné rody *Shigella*, *Citrobacter* [2].

3.1 Interakce kolicinu s buňkou

3.1.1 Interakce kolicinu s citlivou bakteriální buňkou

Tato interakce probíhá ve třech základních krocích: vazba kolicinu na specifický receptor vnější bakteriální membrány, jeho translokace přes buněčný obal, letální účinek molekuly kolicinu na buněčný terč.

Odpovědnost za vazbu kolicinu na receptor má receptorová doména, která tvoří střední část kolicinu. Vazba kolicinu na receptor je vazbou typu protein - protein, která nevyžaduje žádnou energii ze strany buňky. Specifické receptory ve vnější membráně citlivých buněk původně slouží k přenosu fyziologických ligandů (např. nukleozidy). Koliciny typu E se vážou na produkt genu *tub*, který je esenciální složkou vysoce afinitního transportního systému pro vitamín B₁₂ v *Escherichia coli* [3]. Tyto receptory jsou pak sekundárně zneužívány nejen koliciny, ale třeba také bakteriofágy. Různé typy kolicinů mohou využívat stejný receptor [1].

Odpovědnost za translokaci přes buněčný obal nese translokační doména, která je tvořena N-koncovou oblastí kolicinu. Translokace může být podle typu kolicinu asociována s Tol nebo TonB buněčnými proteiny [26]

Ton systém je tvořen třemi membránovými proteiny TonB, ExbB a ExbD. Zatímco Tol systém obsahuje proteiny, které jsou stejně uloženy TolA, TolQ, TolR plus periplazmatický protein TolB [2].

Za letální účinek kolicinu je zodpovědná letální doména, která tvoří C - koncovou oblast molekuly kolicinu.

Podle letálního účinku se koliciny dělí na dvě skupiny:

- koliciny tvořící iontové kanály v cytoplazmatické membráně,
- koliciny s nukleázovou aktivitou.

Tvorba iontových kanálů prvním typem kolicinů může způsobit depolarizaci membrány. Účinek nukleázových kolicinů je namířena proti DNA nebo rRNA. Mohou na citlivé bakterie působit jako nespecifické DNA-endonukleázy (kolicin E2, E7, E8, E9) nebo jako specifické 16S – rRNA - endonukleázy (kolicin E3, E4, E6) [1].

3.1.2 Interakce kolicinu s necitlivou bakteriální buňkou

Necitlivost bakteriální buňky může být způsobena třemi faktory - rezistence, tolerance a imunita. Tyto faktory úzce souvisí se strukturou a funkcí kolicinu.

Rezistence je podmíněna nepřítomností funkčního receptoru na buněčném povrchu. Tolerance je podmíněna nepřítomností funkčního translokačního systému.

Imunitní proteiny ochraňují produkční buňku před svým a stejným typem kolicinu z okolního prostředí. Nukleázové koliciny jsou po syntéze v cytoplazmě asociovány s imunitním proteinem, ten chrání buňky produkčních kmenů před kolicinem. Imunitní protein se odštěpí od kolicinu až při vazbě kolicinu na receptor s citlivé buňky [1]. C-koncová doména kolicinů nepolarizujících plazmatickou membránou se váže na imunitní protein, který je zanořen v membráně produkčních buněk [3].

3.2 Molekulární podstata kolicinů

Koliciny jsou převážně kódovány na plasmidech, některé chromozomálně. Syntéza kolicinu je regulována základním mechanismem, který je společný pro všechny koliciny, tzv. SOS - systémem. Ten se podílí na kontrole exprese genů, které jsou aktivovány při reparaci DNA poškozené např. UV-zářením nebo mytomycinem C.

Kolicinový operon na Col-plazmidech zahrnuje tři strukturální geny. Jsou to: gen pro kolicin – toxin (*cea*), lytický protein (*kil*), imunitní protein (*imm*). Lytický protein umožňuje kolicinu jeho uvolnění z buňky, nemusí být přítomen u všech typů Col - plazmidů [4].

3.3 Klasifikace kolicinů

Klasifikace a nomenklatura je spjata s interakcí kolicinů s citlivou bakteriální buňkou. Koliciny jsou zařazovány a označovány na základě své receptorové specifity. Známe 34 kolicinů, ale pouze 21 z nich je popsáných do detailu a to A, B, D, E1 - E9, Ia, Ib, Js, K, M, N, U, 5, 10 [1].

Koliciny se klasifikují do dvou skupin A a B. Skupina A obsahuje koliciny translokačního Tol systému a to koliciny A, E1 - E9, K, L, N, S4, U a Y. Skupina B obsahuje koliciny, které využívají TonB systém a to koliciny B, D, H, Ia, Ib, M, 5 a 10. Kolicin E1 a K inhibují všechny makromolekulární syntézy bez vyřazení dýchání, kolicin E2 způsobuje rozklad DNA, kolicin E3 zastavuje proteinovou syntézu [2].

Další studie rozděluje koliciny podle sekvenčních podobností v letální doméně kolicinu do dvou skupin: A-typ a E1- typ. Typ A obsahuje koliciny A, B, N a U. Typ E1 zahrnuje koliciny E1, 5, K, 10, Ia, Ib [5].

4 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Tato bakalářská práce byla v praktické části zaměřena na:

- izolaci kmenů *E. coli* ze vzorků drůbeže, dalších potravin a vody
- testování izolovaných kmenů na produkci kolicinů či mikrocinů
- zpracování výsledků PCR-typizace

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

5.1 Půdy

- MPA-agar 1,5%

Pepton (HIMEDIA).....	0,5g
NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod).....	0,3g
Agar (HIMEDIA).....	1,5g
Destilovaná voda.....	1000 ml

- MPA-agar 1%

Pepton (HIMEDIA).....	0,5g
NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod).....	0,3g
Agar (HIMEDIA).....	1g
Destilovaná voda.....	1000 ml

pH 6,8-7

- Endo agar (HIMEDIA)

Živná půda.....	41,5 g
Destilovaná voda.....	1000ml

- Bio-Rad's RAPID *E.coli* 2

Selektivně chromogenní půda používaná pro přímé vyčíslení *E. coli* a dalších kolidárních bakterií v potravinářských výrobcích pro spotřebu lidí, živočichů a ve vodě. Jedná se o předpřipravenou půdu, která se rozežřeje a rozlije do misek. Půda obsahuje dva enzymy Beta-D-Glukuronidázu (GLUC) a Beta-D-Galaktozidázu (GAL). Typické pro *E. coli* je, že produkuje oba enzymy. Pak na půdě vykazuje fialové kolonie. Pokud produkuje jen enzym Beta-D-Glukuronidázu (GLUC), tak tvoří růžové kolonie a pokud produkuje enzym Beta-D-Galaktozidázu (GAL) tvoří zelenomodré kolonie.

5.2 Pomůcky a chemikálie

- Fyziologický roztok
NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod).....8,5g
Destilovaná voda.....1000ml
- Chloroform (CCl₃)
- Automatické pipety
- Běžné laboratorní vybavení

5.3 Použité bakteriální kmeny

5.3.1 Indikátorové kmeny

- *Escherichia coli* K12-Row
- *Shigella sonnei* 17
- *Escherichia coli* C6(φ)
- *Escherichia coli* B1
- *Escherichia coli* P400

Všechny tyto kmeny pocházejí z bakteriologické laboratoře Biologického ústavu lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Všechny kmeny byly kultivovány při 37 °C. [21]

5.3.2 Izolované kmeny

Tabulka 1: Přehled testovaných kmenů izolovaných z drůbeže, lahůdek a vody

označení	nákup/odběr	vzorek	výrobce/místo odběru	půda
1	9.8.2007	stehno	Diema Medlov (Kaufland)	Endo
2	9.8.2007	křídlo	Vodochody- Pavel Jirec (řeznictví u Červinků)	Endo
3	9.8.2007	křídlo	Vodochody- Pavel Jirec (řeznictví u Červinků)	Endo
4	9.8.2007	stehno	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
5	9.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
6	9.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
7	9.8.2007	špalíček	Gastroma Kroměříž	Endo
8	9.8.2007	křídlo	Gastroma Kroměříž	Endo
9	9.8.2007	špalíček	Gastroma Kroměříž	Endo
10	13.8.2007	stehýnko	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
13	13.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
14	13.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
15	13.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
16	13.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
17	13.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
18	13.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
19	13.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
20	14.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
T1	7.11.2007	potok	Luhačovice	Endo
T3	5.11.2007	studánka	Horní Bečva	Endo
T4	7.11.2007	Gothaj	Masna Kroměříž, a.s.	Endo
T5	4.11.2007	potok	Slavičín	Endo
T6	5.11.2007	studna	Březolupy	Endo
T7	6.11.2007	kuře	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
T8	13.11.2007	Vlašský salát	bufet nádraží , Zlín	Endo
T9	18.11.2007	řeka Haná	čistička Marchanice	Endo
T11	18.11.2007	řeka Haná	Dědice (Kozina)	Endo

Tabulka 2: Přehled zpracovaných kmenů (izolováno na ÚPI FT UTB ve Zlíně).

označení	nákup	vzorek kuřete	výrobce	půda
A	20.8.2007	stehýnko	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Endo
A´	20.8.2007	stehýnko	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Endo
B	20.8.2007	stehýnko	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Endo
B´	20.8.2007	stehýnko	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Endo
C	20.8.2007	křídlo	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Rapid
D	20.8.2007	křídlo	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Rapid
E	20.8.2007	špalíček	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Endo
F	20.8.2007	špalíček	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Endo
F´	20.8.2007	špalíček	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Endo
G	22.8.2007	stehýnko	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Rapid
H	22.8.2007	stehýnko	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Rapid
I	22.8.2007	křídlo	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Rapid
J	22.8.2007	křídlo	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Rapid
K	22.8.2007	křídlo	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Rapid
L	22.8.2007	špalíček	Raciola- Jehlička, s.r.o.	Rapid
M	22.8.2007	špalíček	Raciola J-ehlička, s.r.o.	Rapid
N	22.8.2007	špalíček	Raciola -Jehlička, s.r.o.	Rapid
O	leden 2007	stehýnko	Vodňanské kuře, Agrospol Food s.r.o.	Endo
O´	leden 2007	stehýnko	Vodňanské kuře, Agrospol Food s.r.o.	Endo
P	leden 2007	stehýnko	Vodňanské kuře, Agrospol Food s.r.o	Endo
P´	leden 2007	stehýnko	Vodňanské kuře, Agrospol Food s.r.o	Endo
S1	březen 2007	špalíček	Raciola Jehlička, a. s.	Endo
S2	březen 2007	špalíček	Raciola Jehlička, a. s.	Endo
S3	březen 2007	křídlo	Raciola Jehlička, a. s.	Endo
S4	březen 2007	křídlo	Raciola Jehlička, a. s.	Endo
S5	březen 2007	křídlo	Raciola Jehlička, a. s.	Endo
S6	březen 2007	křídlo	Raciola Jehlička, a. s.	Endo
17	leden 2006	celé kuře	Raciola Jehlička, a. s.	Endo
59	březen 2006	celé kuře	Raciola Jehlička, a. s.	VRBA
64	březen 2006	celé kuře	Raciola Jehlička, a. s.	VRBA
66	březen 2006	celé kuře	Raciola -Jehlička, s.r.o.	VRBA
93	červen 2006	celé kuře	Raciola -Jehlička, s.r.o.	VRBA
94	červen 2006	celé kuře	Raciola -Jehlička, s.r.o.	VRBA
104	červen 2006	celé kuře	Raciola -Jehlička, s.r.o.	PCA
148	červen 2006	balené čtvrtky	MSDZ Promt	PCA
152	červen 2006	stehno	Kostelecké uzeniny	VRBA

5.4 Metody

5.4.1 Izolace vzorků

Testováno bylo celkem 63 vzorků drůbeže, lahůdek a vody. Ze vzorků potravin bylo odebráno 10 g a vloženo do 50 ml fyziologického roztoku, poté následovalo 15 minutové třepání. Vzorky byly kultivovány na Endo nebo Rapid agaru a inkubovány 24 hodin při 37 °C.

5.4.2 Vpichový pokus na zjištění produkce kolicinů

Čisté kultury izolovaných kmenů *E. coli* byly kultivovány 48 h při 37 °C ve vpichu. Testované kmeny byly usmrceny parami chloroformu po dobu 30 minut. Po 5 minutovém odvětrání byly misky přelity 24 hodinovou kulturou indikátorových kmenů (0,1 ml bakteriální suspenze ve 3 ml 1% agaru MPA). Následovala inkubace po 24 h při 37 °C. Produkční kmeny vytváří kruhové inhibiční zóny kolem vpichu.

5.4.3 Metoda PCR

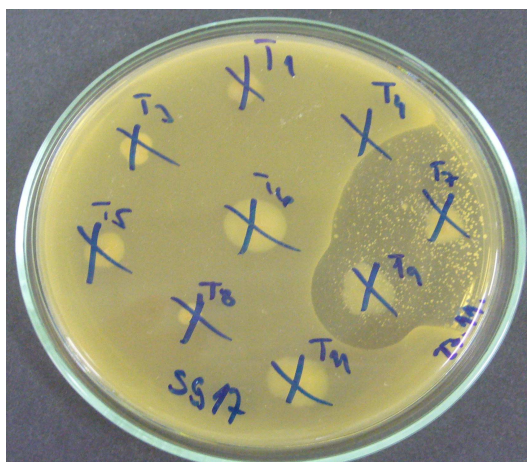
Při této metodě dochází ke zmnožení molekuly DNA. Dochází k opakované syntéze DNA. Denaturací DNA při 94 ° - 98 °C dochází k roztržení vodíkových můstků na jednořetězcové DNA. Následuje hybridizace cílové DNA s primery [23]. DNA primer kříží konec cílové DNA, aby poskytl počátek syntézy DNA vlákna pro DNA - polymerázu [24]. Dále při 72 °C následuje připojení volných deoxyribonukleotidů DNA-polymerázou na základě komplementarity bází. Cyklus se nechá proběhnout 30 - 40x, kde dochází k logaritmickému nárůstu počtu kopií cílové DNA [23]. Pomocí této metody je možno charakterizovat a identifikovat bakterie [11].

PCR-typizace, založená na detekci genu pro kolicin a mikrocin, byla u produkčních kmenů provedena na Biologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Byl použit systém PCR-typizace pro 24 kolicinů (ColA, ColB, ColD, ColE1-ColE9, ColIa, ColIb, ColJs, ColK, ColL, ColM, ColN, ColS4, ColU, ColY, Col5, Col10) a 7 mikrocinů (MccB17, MccC7, MccH47, MccJ25, MccL, MccM, MccV).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Kmeny *E. coli* byly izolovány ze vzorků zejména drůbeže, dále lahůdek a vody z půdy Endo, RAPID, VRBA nebo PCA. Počty *E. coli* byly stanoveny na vybraných vzorcích drůbežního masa jako log CFU/g. Nejvyšší počet výskytu 5,84 log CFU/g byl izolován z kmene 9 (kuřecí špalíček) z období srpna 2007. Nejmenší hodnota 2,11 log CFU/g se vyskytovala u kmene K (kuřecí křídlo) z období také srpna 2007 (Tab. 4, Příloha 1). Autoři Sexton a kol. uvádějí průměrný výskyt 1,55 log CFU/cm² *E. coli* na kůži chlazené drůbeže, což je nižší hodnota než počet zjištěný v této práci zřejmě z důvodu počtů bakterií na cm² [31]. Další práce autorů Northcut a kol. uvádí výskyt 5,9 log CFU/ml *E. coli* na kusech drůbeže [32].

Z každého vzorku byla odebrána jedna kolonie. Byla testována citlivost všech izolátů vůči pěti indikátorovým kmenům. Tato sada indikátorů by měla odhalit produkci téměř všech typů kolicinů či mikrocinů. Produkční kmeny vytvářejí inhibiční zóny růstu indikátorových kmenů (Obr. 1). Všechny kmeny měli kovový lesk na půdě Endo, což nezávisí na produkci kolicinu.

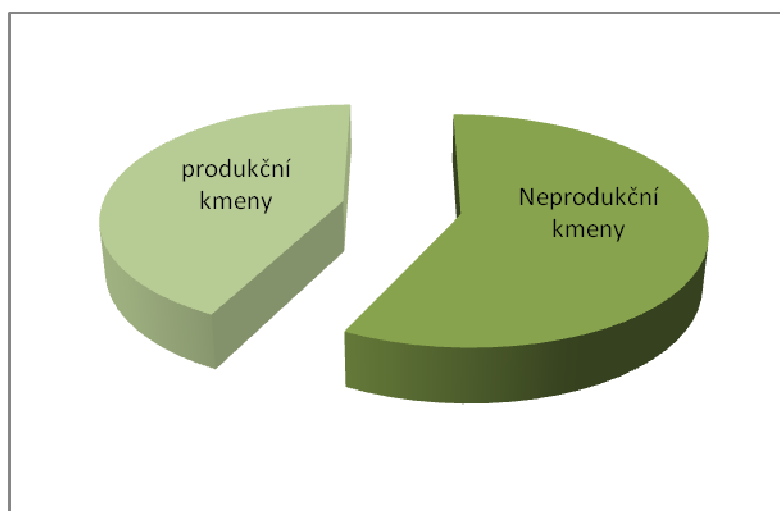


Obrázek 1: Test na produkci kolicinů u kmenů T1-T11 na indikátoru *S. sonnei* 17.

V souboru 27 kmenů, které byly izolovány v průběhu srpna 2007, byly nalezeny pouze dva produkční kmeny – T7 a T9 (Obr. 1). Kmen T7 byl izolován z kuřete a kmen T9 z řeky Haná. U těchto dvou kmenů zatím nebyla provedena PCR-typizace.

Celkem bylo testováno 63 kmenů izolovaných z drůbeže, potravin a vody, na produkci kolicinů. Ale bylo bráno v úvahu pouze 61 kmenů pro incidenci kolicinogenie z důvodu, že kmeny O', P' byly zřejmě zdvojené s kmeny O, P. Z celkového počtu 63 kmenů bylo testováno

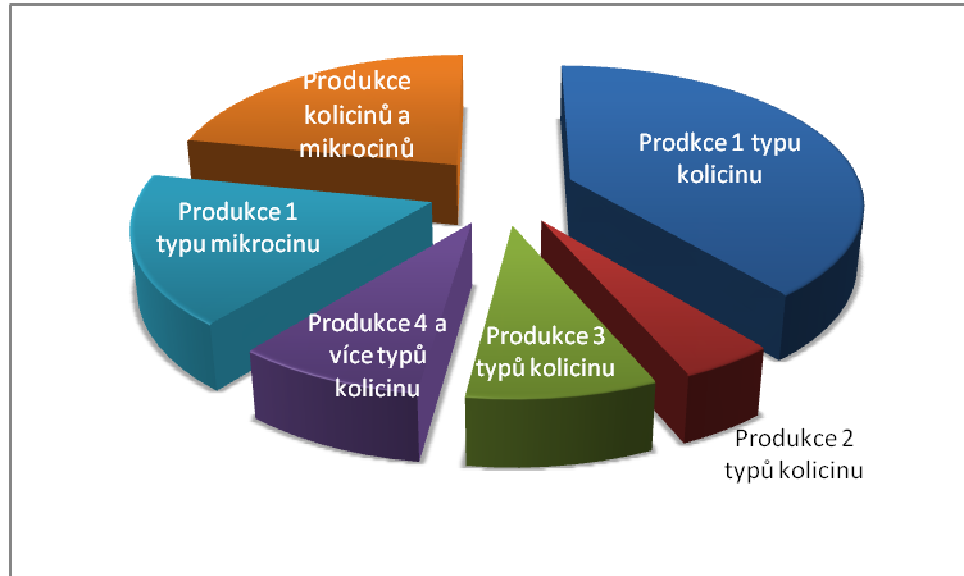
váno 54 kmenů izolovaných z drůbeže. Pouze 26 drůbežích kmenů bylo produkčních (Obr. 2), což dělá 42,6 % incidence kolicinogenie. Autoři Šmarda a Lhotová uvádějí výskyt kolicinogenie u *E.coli* izolovaných z lidských kmenů 41 % [14]. Na Výzkumném ústavu Veterinárního lékařství Brno bylo izolováno v bazénových vzorcích syrového mléka 109 produkčních kmenů *E. coli* z celkového počtu 502, což dělá 21,7 % [29]. V této práci byla zjištěna incidence kolicinogenie 42,6 % z celkového počtu testovaných kmenů, což je hodnota, která je v souladu s ostatními publikovanými výsledky.



Obrázek 2: Grafické znázornění produkčních a neprodukčních kmenů.

Dále byly zpracovávány výsledky dřívějších pokusů zjišťování kolicinogenie, které byly zpracovávány na Ústavu potravinářského inženýrství fakulty Technologické UTB ve Zlíně. Tyto kmeny (24) byly dále podrobeny PCR-typizaci. Zde došlo k rozlišení produkujícího typu kolicinu či mikrocinu (Obr. 3). Z toho 1 typ kolicinu produkovalo 9 kmenů (37,5 %), 2 typy kolicinu produkoval 1 kmen (4,3 %), 3 typy kolicinu produkovaly 2 kmeny (8,3 %), 4 a více typů kolicinu produkovaly 2 kmeny (8,3 %). Jeden typ mikrocinu produkovaly 4 kmeny (16,7 %). Mikrocin a kolicin produkovalo 5 kmenů (20,8 %).

Určení typů kolicinů a mikrocinů jsou uvedeny v Tab. 4. Výsledky podle procentuálního zastoupení kolicinů a mikrocinů jsou uvedeny v Tab. 5. Autoři Gordon, O'Brien testovali 266 kmenů z fekálií z toho bylo 102 kmenů produkčních (38 %). Z toho 42 % produkovalo aspoň 1 kolicin, 41 % 2 koliciny, 16 % 3 koliciny a jeden kmen produkoval 4 koliciny. Nejčastěji byl detekován kolicin Ia a mikrocin H47.



Obrázek 3: Grafické znázornění produkce kolicinů a mikrocinů.

Matné zóny vykazovalo 7 kmenů (17, 59, D, B, S, M, N). Nelze přesně určit, že matnou zónu vykazuje jen jeden nebo dva typy indikátorů, nebo že ji tvoří jen určitý typ kolicinu. Matná zóna se vyskytuje u všech indikátorů, ale nejvíce se projevuje u indikátoru *Shigella sonnei* 17. Matná zóna se podílí na produkci kolicinů a mikrocinů, nejvíce se vyskytuje u kolicinu Ia a mikrocinu V.

Tabulka 3: Převzaté výsledky testovaných kmenů na produkci kolicinů

označení	Morfologie kolonií	log CFU <i>E.coli</i> /g kůže	indikátorové kmeny				
			Row	B1	P400	SS 17	φ
A	kovový lesk/Endo	4,30	-	-	-	-	-
A´	tmavě fialová/Endo	-*					
B	kovový lesk/Endo	3,90	-	-	-	-	-
B´	tmavě fialová/Endo	-*	M	M	M	M	M
C	fialová/RAPID	3,60	-	-	-	-	-
D	fialová/RAPID	3,57	+ M	M	M	M	M
E	kovový lesk/Endo	3,80	+	-	-	+	+
F	kovový lesk/Endo	4,00	-	-	-	-	-
F´	kovový lesk/Endo	-*	+	-	-	+	+
G	fialová/RAPID	3,18	+	-	-	+	+
H	fialová/RAPID	3,48	++	++	++	+	+
I	fialová/RAPID	3,04	+	++	++	+	+++
J	fialová/RAPID	2,85	+	+	+	-	+
K	fialová/RAPID	2,11	-	-	-	-	-
L	fialová/RAPID	3,46	+	++	+	+	+
M	fialová/RAPID	3,54	-	-	M	M	-
N	fialová/RAPID	3,32	+	M	M	++	-
O	kovový lesk/ENDO	nt	+	-	-	+	+
O´	kovový lesk/ENDO	nt	+	-	-	+	+
P	kovový lesk/ENDO	nt	+	+	-	+	+
P´	kovový lesk/ENDO	nt	+	-	+	+	+
S1	kovový lesk/ENDO	nt	-	-	-	-	-
S2	kovový lesk/ENDO	nt	++	++	++	++	++
S3	tmavě fialová/Endo	nt	-	-	-	-	-
S4	kovový lesk/ENDO	nt	-	-	-	-	-
S5	tmavě fialová/Endo	nt	-	-	-	-	-
S6	tmavě fialová/Endo	nt	-	-	-	-	-
17	tmavě fialová/Endo	nt	+	+	+ M	- M	-
59	tmavě růžová/VRBA	nt	++	+ M	++	+	+
64	tmavě růžová/VRBA	nt	++	+	+	+	-
66	tmavě růžová/VRBA	nt	-	-	-	-	-
93	tmavě růžová/VRBA	nt	+++	+++	+++	+++	+++
94	tmavě růžová/VRBA	nt	++	++	+	++	++
104	lesklá, okrouhlá/PCA	nt	+++	+++	+++	+++	+++
148	lesklá, okrouhlá/PCA	nt	+	+	+	+	++
152	tmavě růžová/VRBA	nt	+++	+	++	+	-

*- kolonie jsou získány ze stejné označeného vzorku, nt- netestováno, M - matná zóna

Kmeny H, 59, 152 produkují pouze mikrocin V. Tyto kmeny nepocházejí ze stejného období ani ze stejného místa zpracování, což ale nevylučuje, že ke kontaminaci mohlo dojít na stejné farmě. Mikrocin V se vyskytoval i spolu s produkcí kolicinů ve vzorcích zakoupených od společnosti Raciola Jehlička, a. s. a nezáleží na tom, jestli pocházejí ze stejného období.

Tabulka 4: Určení typu kolicinu či mikrocinu u produkčních kmenů

Kolicinogenní kmeny	koliciny a mikrocinu
B´	Ia
F´	E5, E9, B, M, Y
D	Ia
E	?
G	Ia, mC7, mV
H	mV
I	E5, mC7
J	Y
L	E5, E9, Y
M	Ia
N	mC7
O	Y
O´	Y
P	Y
P´	Y
S2	B, E1, E7, M
17	Ia, mL
59	mV
64	Ia, Y
93	E1,E2,E6,E7,E8,mV,mM
94	Ia
104	E1,E2,E6,E7,E8,mV,mM
148	B, M, E1
152	mV

U kmene označeného E nebyl detekován žádný z testované sady kolicinů či mikrocinů. Tento kmen tedy může být producentem kolicinu, který nebyl testován nebo zatím nebyl popsán.

Ve dvou případech (93 a 104) se stalo, že kmeny produkovaly zcela stejný soubor kolicinů a mikrocinů. Zde existuje možnost, že byl izolován stejný kmen, jelikož byly izolovány ve

stejném období, kdy ještě nebylo dohlíženo na striktní odběr jedné suspektní kolonie z jednoho vzorku.

V případech výskytu kolicinu Y u kmenů O, O' se zjistilo, že se jedná o shodné izoláty. Je to dále potvrzeno tím, že se jedná o kmeny ze stejného období a odběr byl zřejmě prováděn ze stejného vzorku kuřete. V této době nebyl kladen dostatečný důraz na odběr jednoho kmene z jednoho vzorku potravin. U kmenů P, P' se jedná o obdobný případ. Což může udávat, že ke kontaminaci došlo na stejné farmě nebo během zpracování. Z těchto důvodů byly kmeny O' a P' vyřazeny z celkového hodnocení.

Tabulka 5: Přehled typů kolicinů a mikrocinů dle zastoupení (z celkového počtu 61 sesbíraných kmenů *E. coli*).

typ kolicinu a mikrocinu	počet kmenů produkcujících daný typ	% zastoupení daného typu
Ia	7	11,5
B	3	4,9
E1	3	4,9
E2	2	3,3
E5	3	4,9
E6	2	3,3
E7	3	4,9
E8	2	3,3
E9	2	3,3
M	3	4,9
Y	6	9,8
mC7	3	4,9
mL	1	1,6
mV	6	9,8
mM	2	3,3

Nejčastěji se vyskytoval kolicin Ia, Y a mikrocin V. Občas se vyskytovaly koliciny B, E1, E2, E5, E6, E7, E8, E9, M. Z mikrocinů se občas vyskytovaly C7, L, M. Z testované sady všech kolicinů a mikrocinů se vůbec nevyskytovali ColA, Col Ib, ColD, ColE3, ColE4, ColK, ColL, ColN, ColS4, ColU, ColJs, Col5, Col10, mB17, mH47, mJ25.

Bakteriociny grampozitivních bakterií jsou využívány ke konzervaci potravin. Nejčastěji se využívá bakteriocin nizin. V současné době je uvažováno o využití gramnegativních bakterií v potravinářských aplikacích. Uvažuje se o použití kolicinů, objevují se totiž vlivy kolicinů na patogeny. Byla provedena studie stanovující účinnost kolicinu E1 vůči *Listeria*

monocytogenes v čisté kultuře a na povrchu potravin určených k přímé spotřebě (plátky šunky). Na plátky šunky skladované při 10 °C bylo aplikováno 10 µg/ml kolicinu E1, který významně snížil růst *L. monocytogenes* do tří dnů [33].

ZÁVĚR

E. coli produkuje dva typy bakteriocinů. Jedním typem jsou koliciny a druhým mikrocin. Koliciny jsou toxické exoproteiny produkované bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. Klasifikují a označují se na základě receptorové specifity. PCR-typizace byla využita na určení daného typu kolicinu či mikrocinu. Kmeny 93 a 104 produkovaly naprosto stejné typy kolicinů a mikrocinů, což je v počtu sedmi různých typů zcela výjimečné a nelze to považovat za náhodu. Zřejmě se jedná o shodný izolát. Dále se nejvíce vyskytovaly koliciny Ia a Y. Výskyt mikrocinů nebyl tak častý, nejvíce se vyskytovaly ve spojení s koliciny, což je v pěti případech. Pouze mikrocin produkovaly 4 kmeny. Nejvíce byl detekován mikrocin V. Celkem bylo testováno 63, produkčních kmenů bylo 26. V úvahu bylo bráno pouze 61 kmenů a to z důvodu, že u dvou kmenů (O', P') se jednalo zřejmě o shodné izoláty s kmeny O, P. Incidence kolicinogenie byla zjištěna 42,6 %, což udává hodnotu, která je v souladu s ostatními publikovanými výsledky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠMAJS, D; ŠMARDA, J. Koliciny-letální proteiny čeledi *Enterobacteriaceae*. *Biologické listy* 62(2). 1997, s. 107-130
- [2] CARCALES, E.; BUCHANAN, S.; DUCHE, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBE'S, R.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin Biology. *microbiology and molecular biology reviews*, Mar.2007, s. 158-229
- [3] JAMES, R.; KLANTHOUS, C.; MOORE, G. The biology of E colicins: paradigm and paradoxes. *Microbiology* 142, , s.1569-1580,
- [4] ŠMARDA, J.; ŠMAJS, D. Colicins-Exocellular lethal protein of *Escherichia coli*. *Folia microbiology* 43 (6), , s. 563-582
- [5] PILSL, H.; ŠMAJS, D.; BRAUN, V. The tip of hydrophobic hairpin of colicin U is dispensace for colicin U aktivity but is important for interaction with the imunity protein. *Journal of bakteriology* vol. 180, , s. 4111-4115
- [6] GROSSMANN, M. *Mikrobiologie v hygieně*, 1998, ISBN 80-7231-037-2
- [7] ICMFS. *Microorganisms in food*. 2005, ISBN 0-306-48675-x
- [8] BEDNÁŘ, M.; FRAŇKOVÁ, V.; SCHINDLER, J.; SOUČEK, A.; VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha 2: Nakladatelství Marvil 1998, 558 s.
- [9] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře*. Praha 1: Nakladatelství technické literatury, 1983
- [10] VOLDŘICH, M.; JECHOVÁ, M.; a kolektiv autorů. *Bezpečnost pokrmů v gastronomii-malé a střední provozovny*. Praha 5: České a slovenské nakladatelství, 2006
- [11] BLACKBURN, C. *Food spoilage microorganisms*. 2006
- [12] KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galen

- [13] Vysokotlaké parní ošetření drůbeže [online]. [cit. 2007-2-21]
Dostupný z WWW:
< <http://www.bezpecnostpotravin.cz>>
- [14] Incidence kolicinogenie mezi kmeny rodu *Escherichia* humáního původu [online]
Dostupný z WWW:
<<http://www.szu.cz/cem/zpravy/zpr0200/inci02.htm>>
- [15] GORDON, D.; O'BRIEN, L. Bactriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology* 152, 2006, s. 3239-3244,
- [16] DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie* 84, 2002, s. 511-519
- [17] GROZDANOV, L.; RAASCH, C.; SCHULZE, J.; SONNENBORN, U.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. Analysis of the genome structure of nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strains Nissle 1917. *Journal of bacteriology* vol.186, 2004, s. 5432-5441,
- [18] *Escherichia coli* (*Escherichia coli* kmen Nissle 1917, sérotyp O6:K5:H1) jako probiotikum v klinické praxi [online]. [cit. 2003-4-13]
Dostupný z WWW:
<<http://www.remedia.cz/archiv-cisel.php>>
- [19] Onemocnění potravinového původu [online]. [cit. 2007-8-16]
Dostupný z WWW:
<http://www.vegspol.cz>
- [20] Mezinárodní epidemiologické šetření průjmového onemocnění dětí vyvolané kmenem *Escherichia coli* O157 [online]. [cit. 2007-8-16]
Dostupný z WWW:
< <http://www.szu.cz/cem/zpravy/zpr0503/vtec.htm>>
- [21] ŠMARDA, J.; ŠMAJS, D.; LHOTOVÁ, H. Three recently acknowledged *Escherichia* species strikingly differ in the incidence of bacteriocinogenic and lysogenic strains. *J.basic mikrobiology* 42, 2002, s. 429-433,
- [22] PIPEK, P. Základy technologie masa. Vyškov, 1998
- [23] ROSYPAL, S.; DOŠKAŘ, J.; PETRZIK, K.; RŮŽČKOVÁ, V. Úvod do molekulární biologie 4. díl. Brno: Grafex, 2002

- [24] PCR-animation [online]
Dostupný z WWW:
< <http://highered.mcgraw-hill.com/olc/dl/120078/micro15.swf>>
- [25] DUQUESNE, S.; PETIT, V.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from *Enterobacteriaceae*. *Journal of molecular mikrobiology and biotechnology*, 2007, s. 200-209,
- [26] LAZDUNSKI, C.; BOUVERET, E.; RIGAL, A.; JOURNAT, L.; LLOUBÉS, R.; BÉNÉDETTI, H. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *Journal of bacteriology*, 1998, s. 4993-5002,
- [27] ŠMAJS, D.; STROUHAL, M.; MATĚJKOVÁ, P.; ČEJKOVÁ, D.; CURSINO, L.; CHARTONE-SOUZA, E.; ŠMARDA, J.; NASCIMENTO, A. Complete sennence of low-copy-numer plasmid MccC7-H22 of probiotic *Escherichia coli* H22 and prevalence of *mcc* genes among human *E. coli*. *Plasmid* 59, p. 1-10, 2008
Dostupný z WWW:
< www.elsevier.com/locate/yplas>
- [28] PRUSLEY, AP. The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membrane. *Microbiological sciennces* 1984, no. 7
- [29] Analýza rizik průniku shigatoxigenních *Escherichia coli* a entero-toxigenních *Staphylococcus aureus* do konzumního mléka [online]. [cit. 2008-5-23]
Dostupný z WWW: < <http://www.vri.cz/news/prilohy/pril495.pdf>>
- [30] Taxonomy [online]. Dotupný z WWW:
<www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=561>
- [31] SEXTON, M.; RAVEN, G.; HOLDS, G.; POINTON, A.; KIERMEIER, A.; SUMMER, J. Effect of acidified sodium chloride treatment on chicken carcasses processed in South Australia. *International Journal of food microbiology* [online]. 2007 [cit. 2007-06-08], s. 252-255. Dostupný z WWW: <[elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)>.
- [32] Recovery of bakteria from broiler carcasses after spray washing with acidified electrolyzed water or sodium hypochlorite solutions [online]. [cit 2008-5-29]. Dostupný z WWW: <www.pubmed.com>

- [33] PATTON, B.; DICKON, J.; LONERGAN, S.; CUTLER, S.; STAHL, C. Inhibitory activity of colicin E1 against *Listeria monocytogens*. *Journal of food protection*, vol. 70, no. 5, 2007, s. 1256-1262

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

SS 17	<i>Shigella sonnei</i> 17.
CFU	Kolonie tvořících jednotek.
PCR	Význam třetí zkratky.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
AFLP	Polymorfismus v délce amplifikovaných fragmentů

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled testovaných kmenů izolovaných z drůbeže, lahůdek a vody	22
Tabulka 2: Přehled zpracovaných kmenů (izolováno na ÚPI FT UTB ve Zlíně).....	23
Tabulka 3: Převzaté výsledky testovaných kmenů na produkci kolicinů	28
Tabulka 4: Určení typu kolicinu či mikrocinu	29
Tabulka 5: Přehled typů kolicinů a mikrocinů dle zastoupení.....	30

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Test na produkci kolicinů u kmenů T1-T11 na indikátoru <i>S. sonnei</i> 17	25
Obrázek 2: Grafické znázornění produkčních a neprodukčních kmenů	26
Obrázek 3: Grafické znázornění produkce kolicinů a mikrocinů	27

SEZNAM PŘÍLOH

P I Přehled testovaných kmenů na produkci kolicinů

PŘÍLOHA P I: Přehled testovaných kmenů na produkci kolicinů

označení	kovový lesk (Endo)	log CFU <i>E. coli</i> /g kůže	indikátory				
			Row	B1	P400	SS 17	φ
1	+	5,60	-	-	-	-	-
2	+	4,70	-	-	-	-	-
3	+	4,70	-	-	-	-	-
4	+	5,47	-	-	-	-	-
5	+	5,18	-	-	-	-	-
6	+	4,67	-	-	-	-	-
7	+	5,30	-	-	-	-	-
8	+	5,33	-	-	-	-	-
9	+	5,84	-	-	-	-	-
11	-	4,91	-	-	-	-	-
13	-	4,70	-	-	-	-	-
14	-	4,97	-	-	-	-	-
15	-	4,70	-	-	-	-	-
16	-	4,80	-	-	-	-	-
17	-	4,82	-	-	-	-	-
18	-	4,86	-	-	-	-	-
19	-	4,77	-	-	-	-	-
20	-	4,81	-	-	-	-	-
T1	+	nt	-	-	-	-	-
T3	+	nt	-	-	-	-	-
T4	+	nt	-	-	-	-	-
T5	+	nt	-	-	-	-	-
T6	+	nt	-	-	-	-	-
T7	+	nt	++	++	++	++	++
T8	+	nt	-	-	-	-	-
T9	+	nt	++	++	++	++	++
T11	+	nt	-	-	-	-	-