



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  
**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

---

# **Hemolytická a inhibiční aktivita *Streptomyces* *spp.***

## **Hemolytic and inhibitory activity of *Streptomyces spp.***

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Studijní obor: -

Autor bakalářské práce: Eliška Filipová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jan Bobek Ph.D

---

**Kladno 2022**



# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Filipová** Jméno: **Eliška** Osobní číslo: **496201**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Hemolytická a inhibiční aktivita Streptomyces spp.**

Název bakalářské práce anglicky:

**Hemolytic and Inhibitory Activity of Streptomyces Spp.**

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude zaznamenání biologické aktivity sbírkových kmenů bakterií rodu *Streptomyces*, se zaměřením na jejich cytolytickou aktivitu především vůči eukaryotním kvasinkám. V teoretické části práce bude probírána obecná charakteristika a klasifikace rodu *Streptomyces*, schopnost produkce sekundárních metabolitů, včetně antibiotik a zhodnocení míry ovlivnění produkce bioaktivních látek streptomycetami aplikací vybraných chemických látek. Praktická část práce bude pojednávat o kultivaci jednotlivých zástupců streptomycet s hemolytickou aktivitou. Vybrané kmeny budou ko-kultivovány s klinicky významnými bakteriemi a kvasinkami a bude zaznamenávána jejich biologická aktivita, zvláště schopnost inhibice růstu vybraných mikroorganismů. Rovněž budou kmeny kultivovány na krevním agaru a bude popisována jejich hemolytická aktivita. Stejně experimenty budou dále provedeny s použitím známých induktorů, které vedou k produkci sekundárních metabolitů. Bioaktivní látky se pokusíme detekovat pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).

Seznam doporučené literatury:

- [1] ČIHÁK, Matouš, Zdeněk KAMENÍK, Klára ŠMÍDOVÁ, Natalie BERGMAN, Oldřich BENADA, Olga KOFROŇOVÁ, Kateřina PETŘÍČKOVÁ a Jan BOBEK, Secondary Metabolites Produced during the Germination of *Streptomyces coelicolor*, online, *Frontiers in Microbiology*, ed. 2017, ročník 8, číslo 1, Přístupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.02495, ISSN 1664-302X  
[2] JONES, Stephanie E a Marie A ELLIOT, 'Exploring' the regulation of *Streptomyces* growth and development, online, *Current Opinion in Microbiology*, ed. 2018, ročník 42, číslo Apr, Přístupné z: doi:10.1016/j.mib.2017.09.009, ISSN 13695274  
[3] WINK, Joachim, Fatemeh MOHAMMADIPANAH a Javad HAMEDİ, ed., *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*, ed. 1, Springer International Publishing, 2017, ISBN 978-3-319-60339-1

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**RNDr. Jan Bobek, PhD.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.  
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA  
děkan

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Hemolytická a inhibiční aktivita *Streptomyces spp.* vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 12.05.2022

.....  
Eliška Filipová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Mé poděkování patří především RNDr. Janu Bobkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, jeho cenné poznámky a připomínky a v neposlední řadě za čas, ochotu a trpělivost, kterou mi věnoval při řešení dané problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Dr. Miroslavu Petříčkovi a Ing. Matouši Čihákovi za jejich asistenci při práci a při získání potřebných informací a podkladů. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Dr. Alici Chroňákové z Ústavu půdní biologie Biologického centra AV ČR za poskytnutí Sbírkky kultur půdních aktinomycet České Budějovice (CCSACB).

## ABSTRAKT

Streptomycety mají velké farmaceutické využití, neboť produkují široké spektrum antibakteriálních a antimykotických sekundárních metabolitů. Zástupci rodu obývají především půdní ekosystémy. Žijí zde samostatně, nebo vytváří mezidruhové interakce s jinými organismy. Některé izoláty byly nalezeny i v lidském těle.

Mnoho lidských i půdních zástupců rodu vykazuje při kultivaci na krevním agaru hemolytickou aktivitu, což vyvolává otázku, zda by hemolýza mohla být jejich virulentním faktorem. Ve své práci zkoumám produkci cytolytických metabolitů u 22  $\beta$ -hemolytických kmenů streptomycet; z nich 8 je půdních a 13 vytváří mezidruhové interakce (12 se členovci, 1 kmen s rostlinami). Lidský kmen TR1341 sloužil jako pozitivní kontrola.

Kultivace na krevním agaru a ko-kultivace s jinými mikroorganismy potvrdila jejich cytolytickou (hemolytickou a inhibiční) aktivitu. U některých kmenů vedla přítomnost  $\gamma$ -butyrolaktonu (GBL) v médiu ke zvýšení produkce metabolitů odpovědných za tyto aktivity. K jejich identifikaci byla použita kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Výsledky jednotlivých vzorků kultur nebo párových ko-kultur z LC-MS odhalily produkci polyenových molekul (candicidinů, ascosinů, filipinů a strevertenu A) a také tří nových polyenových sloučenin (zde označovaných jako polyen A, B, C). Dále byly identifikovány dvě nepolyenové sloučeniny s pravděpodobnou hemolytickou aktivitou actiphenol a surugamid A.

Výsledky inhibičních aktivit streptomycet (produkujících tyto látky) vůči eukaryotním mikroorganismům (kvasinky) naznačují, že hemolýza pozorovaná na krevním agaru by mohla sloužit jako cytolytický faktor, který se uplatňuje nejen v interakcích volně žijících mikroorganismů, ale také jako faktor virulence uvnitř hostitelského mnohobuněčného organismu (rostlin a bezobratlých, jako je tomu v případě 13 zde studovaných izolátů, či klinických izolátů, jak bylo popsáno dříve (Herbrík et al., 2020)). Zvýšená aktivita sekundárního metabolismu při použití GBL a detekce nových metabolitů z párových ko-kultur naznačují, že geny řídící tuto

biosyntézu jsou aktivovány na základě signálu z vnějšího prostředí (např. tzv. *quorum sensing* signální kaskáda (Waters, & Bassler, 2005)).

### **Klíčová slova**

*Streptomyces*; sekundární metabolismus; polyenová antibiotika; hemolýza;  $\gamma$ -butyrolakton; půdní ekosystém; mezidruhové interakce.

## ABSTRACT

*Streptomyces* are of great interest in the pharmaceutical industry as they produce a plethora of secondary metabolites which act as antibacterial and antimycotic agents. The genus is prevalent mostly in soil ecosystems. They can live on their own in the soil or they are associated with other organisms. Some isolates have been found in the human body.

Lot of the human-derived and some soil-derived *Streptomyces* strains exhibit hemolytic properties when cultivated on blood agar, raising the question whether hemolysis could serve as a virulence factor of the bacteria. In this work I examined cytolytic compound production in 22  $\beta$ -hemolytic *Streptomyces* strains; of these 8 were soil-derived and 13 associated with other organisms (12 were arthropod-associated, and 1 plant-associated). An additional human-associated *Streptomyces* strain TR1341 served as a positive control.

Cultivation on blood agar and co-cultivation with microorganisms confirmed their cytolytic (hemolytic and inhibitory) capabilities. In some species, presence of  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) in medium led to increased production of hemolytic and inhibitory metabolites. Results of individual liquid cultures or paired co-cultures from liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) revealed production of polyene molecules (Candicidins, Ascosins, Filipins, A and Strevertene A) as well as three novel polyene compounds (denoted here as Polyene A, B, C). Two non-polyene compounds with possible hemolytic activity Actiphenol and Surugamid A were also identified.

The results of the inhibitory activities of *Streptomyces* (producing these inhibitory substances) against eukaryotic microorganisms (yeasts) indicate that the hemolysis observed on blood agar could serve as a cytolytic factor that play role not only in non-associated *Streptomyces* interactions but also as a virulence factor within the host multicellular organism (plants and invertebrates, as in the case of the 13 isolates or clinical isolates as described previously (Herbrik et al., 2020)). Increased secondary metabolic production in presence of GBL as well as detection of novel polyene compounds from paired co-cultures may suggest that the genes controlling this

biosynthesis are activated by signal from external environment (e.g. *quorum sensing* signal cascade (Waters, & Bassler, 2005)).

## **Keywords**

*Streptomyces*; secondary metabolism; polyene antibiotics; hemolysis;  $\gamma$ -butyrolactone; soil ecosystem; interspecies interactions



## OBSAH

1 Úvod .....	11
2 Cíle práce .....	14
3 Přehled současného stavu.....	15
3.1 Obecná charakteristika <i>Streptomyces spp.</i> .....	15
3.1.1 Životní cyklus.....	16
3.1.2 Ekologie a vztahy k organismům .....	19
3.2 Vztah mezi primárním a sekundárním metabolismem.....	21
3.3 Přehled a funkce sekundárních metabolitů <i>Streptomyces spp.</i> .....	22
3.3.1 Antibiotika a antimykotika.....	23
3.3.2 Polyenová antibiotika.....	25
3.4 Hemolýza .....	27
3.4.1 Hemolyziny .....	29
3.4.2 Hemolytická aktivita u <i>Streptomyces spp.</i> .....	31
3.5 Modulace metabolismu .....	32
3.5.1 Signální molekuly jako induktory sekundárních metabolitů .....	33
4 Metodika .....	36
4.1 Vybrané kmeny.....	36
4.2 Kultivační média a podmínky kultivace .....	38
4.3 Testování hemolytické aktivity .....	38
4.4 Ko-kultivace s patogeny a ko-kultivace v párech .....	38
4.5 Indukce hemolytické a inhibiční aktivity.....	39
4.6 Ethyl-acetátová precipitace a testování hemolytické a inhibiční aktivity .....	39
4.7 Extrakce na pevné fázi (SPE metoda).....	40
4.8 LC-MS analýza extrahovaných supernatantů .....	40
4.9 Testování přítomnosti extracelulárních hemolytických proteinů.....	41
5 Výsledky .....	42

5.1 Charakteristika morfologie a hemolytické aktivity .....	42
5.2 Pozorování hemolytické a inhibiční aktivity při ko-kultivaci.....	45
5.3 Pozorování změn hemolytické a inhibiční aktivity po přidání GBL.....	50
5.4 Otestování hemolytické aktivity extrahovaných metabolitů.....	55
5.5 Extrakce metabolitů pomocí SPE a analýza pomocí LC-MS .....	57
5.6 Test na přítomnost extracelulárních hemolytických proteinů v médiu .....	61
5.7 Ko-kultivace v párech s opakovanou LC-MS analýzou .....	62
6 Diskuze.....	67
6.1 Hemolytická a inhibiční aktivita u <i>Streptomyces spp.</i> ....	67
6.2 Vliv mezidruhových interakcí a vnějšího prostředí na metabolismus .....	70
6.3 Závislost produkce metabolitů na fázi životního cyklu .....	72
6.4 Polyenová antibiotika a hemolyziny <i>Streptomyces</i> .....	74
6.5 Identifikované substance sekundárního metabolismu: filipin, streverten A, candicidiny a ascosin a nově nalezené substance; polyen A, B, C a actiphenol.....	75
6.6 Výsledek vlivu GBL na hemolytickou a inhibiční aktivitu.....	78
7 Závěr.....	80
8 Seznam použitých zkratk.....	82
9 Seznam použité literatury.....	84
10 Seznam použitých obrázků.....	98
11. Seznam použitých tabulek.....	101
12. Seznam Příloh.....	I

# 1 ÚVOD

Streptomycety se řadí do prokaryotní skupiny gram-pozitivních, filamentních aktinomycet. V přírodě streptomycety nalezneme nejvíce v půdě, kde svou biologickou činností produkují velké množství sekundárních metabolitů. Mnoho z těchto metabolitů má antibiotický či antimykotický účinek. Snaha využít těchto metabolitů pro farmaceutické účely v posledních letech stále vzrůstá vlivem hrozby, kterou představuje antibiotická rezistence (de Lima Procópio & da Silva & Martins & de Azevedo, & de Araújo, 2012).

Schopnost biosyntézy těchto sloučenin je odrazem evolučních potřeb streptomycet a je druhově specifická (de Lima Procópio & da Silva & Martins & de Azevedo, & de Araújo, 2012). Velká část chemické rozmanitosti sekundárních metabolitů produkovaných druhy streptomycet se s největší pravděpodobností vyvinula jako přímý výsledek jejich interakcí s jinými organismy a různými vlivy prostředí. Interakce streptomycet s rostlinami a zvířaty mohou být parazitické, jako je tomu v případě *Streptomyces scabies*, způsobující prašnou strupovitost brambor (Lerat & Simao-Beauvoir, & Beaulieu, 2009), nebo *Streptomyces somaliensis* a *Streptomyces sudanensis*, které infikují lidskou populaci (Hamid et al., 2020). Ve většině případů jsou však prospěšné; jako je tomu například u mnoha druhů hmyzu, který se chrání před infekcí antibiotiky produkovanými streptomycetami (Seipke & Kaltenpoth, & Hutchings, 2012).

Hemolýza (ruptura erytrocytů) je virulentním faktorem mnoha patogenů (Thangamani et al., 2013); *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* a *Vibrio* spp. jsou některé prominentní příklady (Zhang, & Austin, 2005). Aktivita hemolyzinů však není omezena na erytrocyty; hemolyziny mohou působením na buněčné membrány poškodit i jiné eukaryotické buňky (cytolytická aktivita) (Vesper, & Jo Vesper, 2004). Hemolyziny jsou většinou lytické proteiny (enzymy nebo pór formující poriny) (Li et al., 2021) nebo polyenová antibiotika (jak mimo jiné ukazuje i tato práce).

Polyenová antibiotika jsou pododdělením třídy makrolidů, které se skládají z velké skupiny antibiotik produkovaných většinou streptomycetami. Makrolidová antibiotika se vyznačují přítomností makrocyclického kruhu atomů uhlíku uzavřeného laktonizací; polyenová skupina má navíc řadu konjugovaných dvojných vazeb (Dinos, 2017).

Všeobecně se uznává, že polyenová antibiotika jsou účinná proti širokému spektru houbových patogenů (Kristanc & Božič & Jokhadar & Dolenc, & Gomišček, 2019). Jedná se o amfipatické sloučeniny tvořené hydrofobní a hydrofilní částí. Mechanismus, kterým polyenová antibiotika působí, je tvorba pórů. Při jejich vytváření zaujímají polyeny takovou pozici, kdy hydrofobní část směřuje k lipidové membráně a hydrofilní konec směrem k vnějšímu prostředí (Kristanc & Božič & Jokhadar & Dolenc, & Gomišček, 2019).

Bylo dobře zdokumentováno, že určité polyeny, zejména filipin nebo sloučeniny podobné candicidinu, vykazují hemolytické neboli cytolytické vlastnosti (Herbrík et al., 2020). Všechny tyto sloučeniny jsou fungicidní a ty s nižší toxicitou mají využití v lékařství. Například amfotericin B a nystatin A1 se používají v antimykotických a antiprotozoálních léčích (Knopik-Skrocka, 2002).

Zatímco produkce sekundárních metabolitů u *Actinobacteria* byla rozsáhle studována (Jakubiec-Krzesniak & Rajnisz-Mateusiak & Guspiel & Ziemska, & Solecka, 2018), dopadu hemolýzy nebyla věnována velká pozornost. Jedna z prací, které se touto problematikou zabývala, identifikovala kmen streptomycety TR1341, extrahovaný z plic staršího mužského pacienta s recidivující bronchopneumonií. Kmen produkoval polyen filipin, který byl odpovědný za jeho hemolytickou aktivitu, což ukazuje na možnou roli hemolýzy jako virulentního faktoru (Herbrík et al., 2020).

Novější experimenty ukázaly, že hemolytická aktivita se netýká výlučně lidských kmenů streptomycet. Screening sbírky půdních kmenů streptomycet ze Sbírký kultur půdních aktinomycet v Českých Budějovicích (CCSACB) odhalil, že 77,5 % ze 102 lidských příbuzných kmenů bylo  $\beta$ -hemolytických, stejně jako 56 % ze 184 kmenů pocházejících z půdy (Herbrík et al., 2020). Význam těchto půdních kmenů nelze přehlížet. Koneckonců, zkoumané kmeny přizpůsobené člověku, pocházejí z půdy (Herbrík et al., 2020), což může potvrdit moji hypotézu vnímání hemolýzy jako jednu z adaptací, které bakterie používají, aby soutěžily s jinými organismy ve svém prostředí. Půdní,  $\beta$ -hemolytické kmeny byly shromážděny (Wurzer, 2019) a použity v této práci k detekci  $\beta$ -hemolytických sloučenin se zaměřením na polyenová antibiotika, neboť jejich role jako hemolysinů není dostatečně popsána.

Schopnost streptomycet vytvářet mezidruhové interakce s různými mikroorganismy byla v několika případech zdokumentována (Seipke & Kaltenpoth, & Hutchings, 2012), (Hamid et al., 2020), ale vlivu těchto interakcí na jejich hemolytické (případně inhibiční) aktivity nebylo věnováno mnoho pozornosti. Moje sbírka  $\beta$ -hemolytických, půdních kmenů obsahuje jak samostatně žijící kmeny, tak i kmeny tvořící interakce s rostlinami a členovci, které ko-kultivují s různými mikroorganismy. Porovnání cytolytických (hemolytických i inhibičních) schopností při ko-kultivaci mezi těmito kmeny může poskytnout nové poznatky týkající se metabolismu streptomycet.

Část genomu streptomycet tvoří biosyntetické kryptické genové klastry, které nejsou za běžných podmínek exprimovány (Čihák et al., 2017). Nalezení optimálních aktivačních podmínek může znamenat produkci nových bioaktivních látek. Schopnost aktivace kryptických klastrů má řada signálních autoregulační molekul například molekuly GBL (Bednarz & Kotowska, & Pawlik, 2019), (Chen & Cui & Wang & Wang, & Wen, 2020), nebo N-acetylglukosaminu (NAG) (Chen & Cui & Wang & Wang, & Wen, 2020). I když je známo několik případů, kdy GBL iniciovalo expresi kryptických klastrů (Bednarz & Kotowska, & Pawlik, 2019), jeho účinek na produkci cytolytických sloučenin nebyl podrobně zkoumán.

## **2 CÍLE PRÁCE**

Cílem práce je analyzovat morfologii spolu s hemolytickou a inhibiční aktivitou kmenů streptomycet a detekovat metabolity, které jsou za hemolytickou a inhibiční aktivitu odpovědné, a ověřit jejich hemolytickou a inhibiční aktivitu.

## 3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

### 3.1 Obecná charakteristika *Streptomyces spp.*

Streptomycety jsou prokaryotní, gram-pozitivní organismy, které patří do rodu aktinomycet. Jsou charakteristické svou mnohobuněčnou stavbou (van Dissel & Claessen, & van Wezel, 2014), aerobní sporulací nebo tvorbou mycelií a hyf, čímž se podobají říši hub.

Rod streptomycet je největší a nejvariabilnější skupinou aktinomycet. Jeho zástupci se mezi sebou liší morfologicky i fyziologicky (Taddei & José-Rodríguez & Márquez-Vilchez, & Castelli, 2021). Sekvenováním genomu vzorových zástupců rodu, jako je *S.coelicolor*, *S.griseus* a *S.venezuelae* (Chandra, & Chater, 2014) se podařilo nalézt společné rysy rodu, z nichž hlavní je homologie v 16S rRNA (ribozomální RNA, která je součástí malé ribozomální podjednotky u prokaryot) (Antony-Babu et al., 2017), (Besaury & Martinet & Mühle & Clermont, & Rémond, 2021).

V přírodě streptomycety nalezneme nejvíce v půdě a mořských sedimentech. V ekosystému hrají řadu důležitých rolí (viz kapitola 3.1.2). Zástupci mají dobrou adaptaci na změny podmínek a dosahují až překvapivě pokročilé morfologie a fyziologie. Projev pokročilé morfologie je zejména (pro bakterie) netradiční a složitý životní cyklus (viz kapitola 3.1.1) podobný růstu mycelia (van Dissel & Claessen, & van Wezel, 2014). Projevem pokročilé fyziologie je produkce širokého spektra bioaktivních látek (Keller & Turner, & Bennett, 2005). Tyto látky jsou produkty sekundárního metabolismu (viz kapitola 3.2).

Zhruba u 30 % těchto bioaktivních látek známe jejich chemickou strukturu a příslušnost k určité skupině látek. Ta se pohybuje od polyketidů, peptidů,  $\gamma$ -butyrolaktonů, furanů, terpenoidů, mastným kyselinám a polyenům, čímž seznam zdaleka nekončí (van Keulen, & Dyson, 2014). Zbýlých 70 % zůstává stále nepopsáno.

Geny, které kódují biosyntézu těchto sekundárních metabolitů, jsou umístěny na chromozomech ve formě nahuštěných klastrů a jejich exprese je přísně regulována (Bentley et al., 2002). Velký průlom učinil objev tzv. kryptických genových klastrů (Zazopoulos et al., 2003). Tyto shluky genů kódují expresi velkého množství skrytých

sekundárních metabolitů, které nejsou za běžných kultivačních podmínek exprimovány. Aktivace kryptických genových klastrů může znamenat produkci potenciálně nových látek (Čihák et al., 2017).

### 3.1.1 Životní cyklus

Životní cyklus streptomycet rozdělujeme do tří fází; (I) klíčení spory a tvorba vegetativního mycelia, (II) nárůst vzdušných hydrofobní hyf, tvorba nových spor a (III) jejich maturace (Jones, & Elliot, 2018).

Cyklus zahajuje vyklíčení spory v tzv. hyfy. K přechodu ke klíčení musí být spory v prostředí s dostatkem vody, zdrojem energie (např. threhaléza (Ranade, & Vining, 1993)) a se zbytkovou mRNA (mediátorová RNA). Tato mRNA je důležitá v počáteční fázi klíčení, kde funguje jako templát pro syntézu proteinů (hydroláz a chaperonů) (Bobek & Šmídová, & Čihák, 2017), (Bobek & Halada & Angelis & Vohradský, & Mikulík, 2004). Ve vrcholu hyf probíhá kontinuální polární růst, tvorba sept (přepážek) a větvení, což vede ke vzniku vegetativního (substrátového) mycelia (Kieser & Bibb & Buttner & Chater, & Hopwood, 2000), (Flärdh & Richards & Hempel & Howard, & Buttner, 2012).

V této vegetativní fázi růstu můžeme hyfy streptomycet morfologicky rozlišit na dva oddíly, sub-apikální (spodní) oddíl a apikální (horní) oddíl (Ultee et al., 2020). Polární růst pokračuje zejména v apikálním oddílu, kam se ukládají stavební látky (zejména peptidoglykan a teichové kyseliny) (Ultee et al., 2020). Přejít do druhé fáze cyklu iniciuje nepříznivé působení prostředí. Tento negativní vliv označujeme jako stresový podnět (např. úbytek živin v prostředí, kontakt s jinými mikroorganismy atd.).

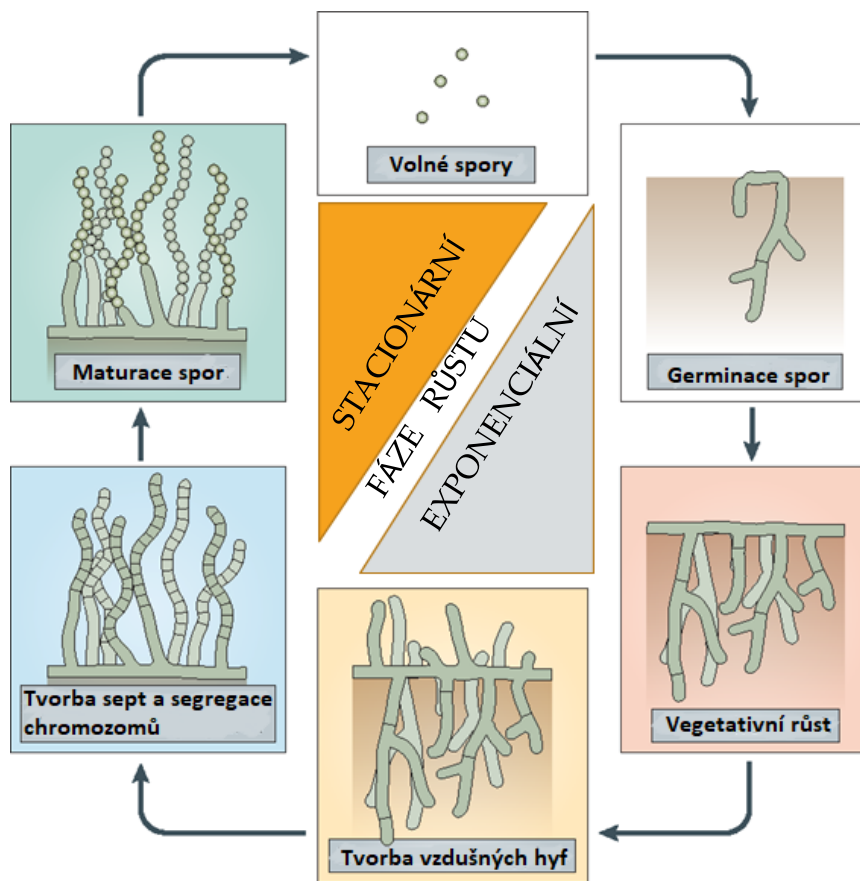


Působením stresového podnětu dochází ke třem změnám v dosavadním metabolismu:

1. Zvýšení produkce heterologních extracelulárních proteinů (Carrillo Rincón et al., 2018).
2. Částečná lýze biomasy substrátového mycelia – kanibalizace substrátu je zprostředkována proteázami z extracelulární kaskády (například serinová proteáza A a B u *Streptomyces griseus*) (Truhlar, 2004) , nebo undecylprodigiosinem. Kanibalizace vede k uvolnění skladovaných látek, nutných pro start růstu vzdušných hyf (Chater & Biró & Lee & Palmer, & Schrempf, 2010), (Bikash et al., 2021).
3. Iniciací růstu vzdušných hyf – přechod do druhé fáze životního cyklu.

Iniciací růstu vzdušných hydrofobních hyf je řízena tzv. *bld* geny (bald od slova holý). Název *bld* genů je odvozen od *bald* mutantů *S. coelicolor*, kteří sloužili k potvrzení jejich účinku na změnu fáze životního cyklu (Chater, 2006). Metodami molekulární biologie byly *bld* geny vypnuty, což vedlo k zastavení klasického morfologického vývoje. Důsledkem byla neschopnost mutantů tvořit vzdušné hyfy a produkovat některá antibiotika (Pope & Green, & Westpheling, 1996). Za běžných podmínek *bld* geny kódují (nyní již) synchronní dělení. To vede k růstu vzdušného mycelia a k tvorbě cylindrických pre-sporových oddílů s nahromaděným glykogenem (Kieser & Bibb & Buttner & Chater, & Hopwood, 2000).

Pre-sporové, cylindrické oddíly se sbíhají a jejich buněčné stěny tloustnou, čímž vznikají nové spory, až celé řetízky spor. Posledním krokem před vznikem spor je produkce pigmentu (například šedý pigment u *S. coelicolor*) (Wink & Mohammadipanah, & Hamedi, 2017). Proces regulují tzv. *whi* geny odvozené od bílých mutantů (*whi* od slova white, podle chybějícího šedého pigmentu u ne-maturovaných spor), na kterých byl jejich účinek zkoumán (Willemse & Mommaas, & van Wezel, 2012). Nově vzniklé spory maturují a za optimálních podmínek jsou schopny přejít ke klíčení (McBride, & Ensign, 1990), (Bobek & Šmídová, & Čihák, 2017), čímž se dostáváme opět na začátek cyklu.



**Obrázek 1:** Životní cyklus *Streptomyces* (Bush & Tschowri & Schlimpert & Flärdh, & Buttner, 2015).

Nově objevenou alternativou ke klasickému životnímu cyklu je tzv. explorační cesta, pojmenovaná po schopnosti tzv. průzkumných buněk rapidně prorůst napříč substrátem (Jones, & Elliot, 2018). Tento alternativní cyklus je spuštěn interakcí *Streptomyces* s acidními metabolickými produkty hub, které mění pH prostředí. Tato změna pH substrátu je asociována s produkcí alkalické, těkavé organické látky (volatile organic compound VOC)(zejména trimethylaminu (Jones et al., 2019)) schopné indukovat explorační cyklus. Signály pro iniciaci exploračního cyklu se šíří i na další *Streptomyces* v okolí a jejich rychlost růstu je až 10x rychlejší než u klasické cesty (Jones, & Elliot, 2017).

### 3.1.2 Ekologie a vztahy k organismům

Streptomycety jsou přítomné v mnoha různých ekosystémech, z nichž nejdůležitější je půdní prostředí (Guo et al., 2015), (Olanrewaju, & Babalola, 2019) nebo moře a oceány (Xu & Gu & Zhang & Li, & Tian, 2017). Méně zastoupené, ale významné jsou ekosystémy pouště (Goodfellow et al., 2017), prostředí Antarktidy (Lee et al., 2012) nebo jeskyně (Jiang et al., 2015).

Půdní substrát rychle kolonizují v podobě vegetativního mycelia. Nepříznivé období přežívají v podobě rezistentních spor i několik let (Williams & Shameemullah & Watson, & Mayfield, 1972). V půdním prostředí nežijí pouze izolovaně, ale mohou tvořit mezidruhové interakce, se zde přítomnými organismy.

Většina mezidruhových interakcí má symbiotický charakter (Seipke & Kaltenpoth, & Hutchings, 2012)). Jedná se o spolupráci mezi dvěma i více rozdílnými organismy. Konkrétním příkladem je mravenec *Camponotus vagus*, který využívá antimykotické sekundární metabolity *Streptomyces albidoflavus* k ochraně proti patogenům (Baranova et al., 2020) nebo vosy rodu *Philanthus* a *Trachypus*, pěstující si *Candidatus Streptomyces philanthi* uvnitř žlázových rezervoárů v oblasti tykadel (Kaltenpoth & Yildirim & Gürbüz & Herzner, & Strohm, 2012).

Někdy streptomyceta přechází k parazitismu (získává živiny na úkor jiného organismu). Konkrétním příkladem je zástupce *Streptomyces scabies*, způsobující prašnou strupovitost brambor nebo druhů *Streptomyces somaliensis* a *Streptomyces sudanensis*, které jsou schopné infikovat lidskou populaci (Seipke & Kaltenpoth, & Hutchings, 2012). *Streptomyces sudanensis* způsobuje chronické subkutánní onemocnění zvané aktinomykóza, které je frekventované v subtropických a tropických oblastech (Hamid et al., 2020).

Streptomycety mohou být detekovány jako kolonizátoři lidského těla (například kůže a dýchacích cest) (Lara et al., 2021). Klinický projev je vzácný, ale některé případy ukazují na možnou oportunní patogenitu streptomycet. U několika kmenů byl prokázán vliv metabolitů na imunitní systém (Maier et al., 1982), konkrétně na aktivaci a proliferaci lymfocytů (příkladem je L-asparagináza produkovaná *Streptomyces ansochromogenes* UFPEDA 3420) (Silva Lacerda et al., 2018).

Jiný výzkum Bakteriologické laboratoře, Ústavu Imunologie a Mikrobiologie 1.LF Univerzity Karlovy ukazuje na adaptaci (nebo predispozici) půdních kmenů v lidském organismu. Ze sputa pacientů s respiračními obtížemi (prodělání tuberkulózy, opakující se infekce dýchacích cest atd.) byl izolován kmen *Streptomyces* sp. TR1341, který byl následně podroben testům, které ukázaly jeho schopnost produkovat metabolity s cytotoxickou aktivitou (zejména filipin a actinomycin X2) (Herbrík et al., 2020).

### **Poznámka k půdním zástupcům a k jejich mezidruhovým interakcím**

Většina půdních zástupců hraje důležitou roli v udržení ekologické rovnováhy prostředí. Díky své extracelulární enzymatické výbavě (celulázy, xylanázy, amylázy, maltázy atd.) rozkládají jinak obtížně degradovatelné polymery a uhlovodíky a tím uvolňují část živin zpět do oběhu (McCarthy, & Williams, 1992), (Bhatti & Haq, & Bhat, 2017)).

Tyto vlastnosti mají potenciálně velké využití pro zemědělství. Adice půdních streptomycet do kontaminovaných půd zlepšuje jejich kvalitu a stimuluje fytoextrakci (schopnost určitých rostlin přijímat a akumulovat znečišťující látky z prostředí) (Ali et al., 2021). Izolované metabolity streptomycet (získané z půdy rostlin z čeledi *Fabaceae*) stimuluje lepší růst sójových bobů, konkrétně izolát 1-aminocyklopropan-1-karboxylát deamináza způsobil zrychlení růstu výhonků (o 36,63 %) a zvýšení obsahu sušiny (o 17,97 %) ve srovnání s kontrolními rostlinami (Horstmann et al., 2020).

Nejčastěji tvořené interakce streptomycet vznikají mezi mikrobiálními společenstvy asociovanými s rostlinami (konkrétně s kořeny rostlin v rhizosféře (Viaene et al., 2016), (Rey, & Dumas, 2017), (Kim et al., 2019)). Příkladem jejich účinku je modulace rezistence rostlin vůči patogenům. Konkrétním příkladem je kmen s názvem AgN23, který byl schopen kolonizovat listy *Arabidopsis thaliana*. Kolonizace rostliny vegetativním myceliem vedla k její rezistenci vůči *Alternaria brassicicola* (houbový patogen listů rostlin) (Vergnes et al., 2020). Rovněž VOC z několika izolátů streptomycet inhibují růst patogenů (např. *Rhizoctonia solani*) a zvyšují přírůstek biomasy (Cordovez et al., 2015).

### 3.2 Vztah mezi primárním a sekundárním metabolismem

Primární metabolismus můžeme nazvat jako základní biologický proces odehrávající se ve všech živých organismech v celém období jejich života. Je kódován tzv. *housekeeping* geny (např. *atpD* and *recA*) (Cordovez et al., 2015), (Zhao et al., 2022). Oproti tomu je sekundární metabolismus aktivní pouze v určité fázi životního cyklu a za určitých vnějších podmínek. Sekundárním metabolismem vznikají látky s komplexní chemickou strukturou a biologickou funkcí, které označujeme jako sekundární metabolity (Wang & Chen & Li, & Mao, 2019).

Hlavním zdrojem živin jsou rostlinné materiály (především sacharidy), které jsou primárně bohaté na uhlík a naopak chudé na dusík a fosfáty (Hodgson, 2000). Katabolické dráhy sacharidů (především glukózy) začínají rozkladem složitějších rostlinných uhlohydrátů pomocí extracelulárních enzymů. Rozkladem získaná glukóza je transportována do buněk a fosforylací je z ní uvolňována potřebná energie. Dalším významným zdrojem sacharidů je např. chitin (Iwasaki & Ichino, & Saito, 2020).

Katabolismus aminokyselin odráží jejich relativní nepřítomnost v půdě. Z toho důvodu streptomycety jen zřídka investují do jejich utilizace. Výjimkou jsou dráhy argininu, aminokyselin s rozvětveným řetězcem a některé části drah aromatických aminokyselin, které mají regulační dráhy podobné jako *Escherichia coli* a *Bacillus subtilis* (Hodgson, 2000).

K přechodu směrem k sekundární morfologii dochází při změnách podmínek prostředí, zejména při změně základních nutričních zdrojů (Martín et al., 2011). Primární a sekundární metabolismus je úzce morfologicky a fyziologicky propojen. Většina produktů a meziproduktů (intermediátů) primárního metabolismu slouží jako prekurzory pro sekundární metabolity (Hodgson, 2000). Prekurzory společné pro oba metabolismy jsou např. acetyl-CoA, malonyl-CoA nebo aminokyseliny (Hiltner & Hunter, & Hoskisson, 2015).

Tvorba sekundárních metabolitů je řízena biosyntetickými genovými klastry (Lee et al., 2021). Regulace exprese těchto genů je zajištěna signálními (regulačními) molekulami (např. cyklický AMP receptorový protein u *S. coelicolor* (Gao et al., 2012))

spojené v signální kaskády (Xia & Zhan & Mao, & Li, 2020). Nejstudovanější signální kaskádou je tzv. *quorum sensing* systém, kde se signální molekuly šíří prostředím a indukují příslušné mechanismy (Waters, & Bassler, 2005), (Polkade & Mantri & Patwekar, & Jangid, 2016). Klastry mohou být v rámci horizontálního genového transferu vyměňovány jako celé „jednotky“ napříč různými organismy (Herbrík et al., 2020). Tímto principem dochází k evoluci genomu bakterií. Projevem evoluce a adaptace je například vzniklá rezistence bakterií proti antibiotikům (Thoma, & Muth, 2015).

Sekundární metabolity nejsou pro život organismu esenciální. Svému producentovi ovšem usnadňují adaptaci na změny v prostředí a umožňují mu lépe koordinovat další vývoj. Vzhledem k nezměrné variabilitě exprese sekundárního metabolismu existuje široké spektrum sekundárních metabolitů (Al-shaibani et al., 2021).

### **3.3 Přehled a funkce sekundárních metabolitů *Streptomyces spp.***

Variabilita sekundárních metabolitů není jen napříč jednotlivými taxony, ale i mezi metabolity jednoho organismu. Například *S. coelicolor* produkuje více různých sekundárních metabolitů (antibiotikum undecylprodigiosin, polyketid aktinorhodin, nebo peptidové antibiotikum závislé na vápníku a mnoho dalších)(Hoskisson, & van Wezel, 2019). Streptomycety jsou jedním z hlavních průmyslových producentů sekundárních metabolitů (Thangamani et al., 2013). S využitím jako antimykotik, antivirotik, protinádorových léčiv, antihypertenziv, imunosupresiv a zejména jako antibiotik (de Lima Procópio & da Silva & Martins & de Azevedo, & de Araújo, 2012).

#### **Funkce metabolitů:**

##### **Obranná**

Nejčastější funkcí sekundárních metabolitů je schopnost bránit svého producenta proti konkurenčním organismům, se kterými soupeří o zdroje živin. Příkladem sekundárních metabolitů s těmito vlastnostmi je velké množství antimykotik, antivirotik a hlavně antibiotik a imunosupresiv (Ōmura et al., 2001), (de Lima Procópio & da Silva & Martins & de Azevedo, & de Araújo, 2012).

## Informační

Sekundární metabolity slouží jako signální a komunikační molekuly. Dávají informace o vnitřním a vnějším prostředí na jejichž základě dochází k morfologickým a fyziologickým změnám v organismu (Camilli, & Bassler, 2006). Jejich pozitivním, nebo negativním vlivem na fyziologii ostatních mikroorganismů vznikají komplexní interakční systémy až celé biologické komunity (Takano et al., 2016).

Příkladem je tzv. A-faktor (autoregulační faktor). Má schopnost regulovat výsledek metabolické dráhy u *Streptomyces griseus*, který v jednom případě povede ke vzniku streptomycinu a v druhém ke sporogenezi (Horinouchi, & Beppu, 1994). Díky své funkci ho můžeme pokládat za „bakteriální hormon“, který řídí sekundární metabolismus a morfogenezi. A-faktor a látky s podobnými funkcemi se vyznačují shodnou strukturou v obsahu  $\gamma$ -butyrolaktonového kruhu (Szilágyi et al., 2019).

### 3.3.1 Antibiotika a antimykotika

Rod aktinomycet je odpovědný za průmyslovou produkci až dvou třetin všech antibiotik, z toho 80 % produkují zástupci rodu streptomycet (Krouza Bergman, 2020), (Xia & Zhan & Mao, & Li, 2020), (Arafat & Abu-Tahon, & Isaac, 2021). Produkované látky patří většinou do aminoglykosidové a polyketidové skupiny antibiotik. Polyketidová antibiotika zahrnují tetracyklinová antibiotika, nepolyenová a polyenová makrolidová antibiotika. Všechny tyto skupiny antibiotik mají producenty napříč zástupci rodu streptomycet (de Lima Procópio & da Silva & Martins & de Azevedo, & de Araújo, 2012)

#### Aminoglykosidová antibiotika

První objevenou látkou této skupiny bylo antibiotikum streptomycin (Jones & Metzger & Schatz, & Waksman, 1944), (Kurtböke, 2012), (Buchholz, & Collins, 2013). Aminoglykosidy jsou látky tvořené 2 až 4 (amino-) sacharidy, resp. (amino-) cyklitoly. Mají široké spektrum uplatnění. Klinicky se stále v menší míře používá streptomycin, dále zejména gentamicin, tobramycin, amikacin, plazomicin a neomycin (Gonzalez 3rd, & Spencer, 1998). Hlavním producentem streptomycinu je *Streptomyces griseus*. Producentem neomycinů je *Streptomyces fradiae* a gentamicinu *Micromonospora* (Zheng

et al., 2020). Hlavní mechanismus jejich účinku spočívá v deaktivaci proteosyntézy, nejčastěji blokováním činnosti ribozomů (Begg, & Barclay, 1995).

### **Polyketidová antibiotika**

Látky této skupiny vznikají cestou tzv. polyketidové, resp. oligoketidové syntézy. Touto enzymovou drahou (Miyanaga, 2019) vznikají bioaktivní látky přítomné v mnoha bakteriích, houbách a rostlinách (např. rostlinné flavonoidy, fungální aflatoxiny atd.). Příkladem je vicenistatin z *Streptomyces halstedii*, nebo hitachimycin z *Streptomyces scabrisporus* (Miyanaga, 2017).

### **Tetracyklinová antibiotika**

Důležitá tetracyklinová antibiotika jsou například chlortetracyklin, oxytetracyklin, tetracyklin (Andriamanohiarisoamanana & Ihara & Yoshida, & Umetsu, 2020). Nejvýznamnějšími producenty jsou streptomycety (*Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus*) (Hleba et al., 2018), (Wang et al., 2019). Mechanismus účinku je založen na deaktivaci proteosyntézy. Deaktivace dosahují primárně interakcí s 16S rRNA v 30S ribozomální podjednotce bakteriálního ribozomu, čímž zastaví translaci (Brodersen et al., 2000), (Pioletti, 2001).

### **Nepolyenová makrolidová antibiotika**

Makrolidová antibiotika jsou hojně produkovanou skupinou antibiotik u streptomycet, příkladem je bafilomycin A1, B1, a D u kmene ZDB *Streptomyces sp.* (Dame, & Ruanpanun, 2017). Základní strukturu tvoří makrocyclický laktonový kruh. Molekula antibiotik je tvořena ze dvou částí. První část je výsledkem polyketidové metabolické dráhy a nazývá se **aglykon** (Kawahara & Izumikawa & Takagi, & Shin-ya, 2012). Druhá část je tvořena sacharidem (Dinos, 2017). Nejčastěji se jedná o amino- nebo deoxysacharid. Mechanismem účinku makrolidových antibiotik je zásah do tvorby peptidové vazby katalyzované ribozomální peptidyltransferasou. Tento zásah do proteosyntézy spočívá ve vazbě na 50S podjednotku aktivního ribozomu. Nepolyenová makrolidová antibiotika mají vysokou aktivitu proti G<sup>+</sup> bakteriím (Hoshino et al.,



2020). Známým zástupcem je erythromycin produkován *Streptomyces erythreus* (Weber & Wierman, & Hutchinson, 1985).

### 3.3.2 Polyenová antibiotika

Tyto látky vznikají podobným mechanismem jako nepolyenová makrolidová antibiotika. Liší se velikostí aglykonu a bioaktivitou. Prvním zástupcem těchto polyenů byl fungicidin (nystatin) produkován *Streptomyces noursei* (Ettliger & Corbaz, & Hütter, 1958), (Fjærvik, & Zotchev, 2005). V současnosti je známo více než 200 sloučenin těchto antibiotik (Ellis, 2002).

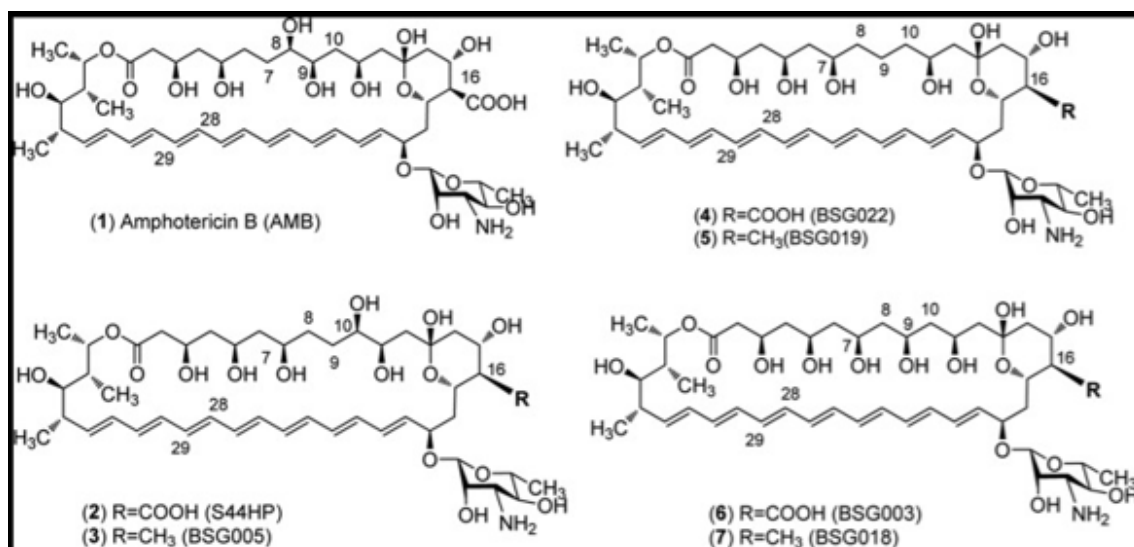
Jedná se o amfipatické sloučeniny obsahující rigidní lipofilní část (ta je tvořena systémem 3 až 7 konjugovaných dvojných vazeb a nazývaná **chromofor**) a flexibilní hydrofilní část (Aparicio & Fouces & Mendes & Olivera, & Martín, 2000). Na rozdíl od nepolyenové skupiny antibiotik mají tyto „polyeny“ větší laktonový kruh (o 26 až 38 uhlíkových atomech).

Díky přítomnosti chromoforu mají polyeny typické absorpční spektrum v ultrafialové (UV) oblasti (vrchol absorbance je v rozmezí 225-245 nm) (Selvakumar & Arun & Suguna & Kumar, & Dhevendaran, 2010) a charakteristické fyzikální a chemické vlastnosti (fotolabilita, silná absorpce záření, špatná rozpustnost ve vodě) (Aparicio & Fouces & Mendes & Olivera, & Martín, 2000), (Martin, & McDaniel, 1975). Druhá flexibilní část laktonového kruhu obsahuje navázané polární skupiny (zejména hydroxylové, karboxylové atd.). Pozice hydroxylových skupin (OH skupin) v kruhu určuje sílu antibiotika. Nejsilnější jsou látky s OH skupinami v pozici C-8 a C-9, nebo C-7 a C-10. Nejslabší naopak v pozici C-7 a C-9 (Tevyashova et al., 2013).

Mechanismus jejich účinku spočívá v selektivní interakci se steroly, které jsou uloženy v membránových strukturách. Tato vazba vede ke změně permeability membrány a ztrátě esenciálních složek z cytoplazmy (Aparicio & Fouces & Mendes & Olivera, & Martín, 2000). Výsledkem je buněčná smrt. Konkrétněji lze způsob mechanismu popsat jako formaci póru v cytoplazmatické membráně. Polyeny při vytváření pórů zaujímají takovou pozici, kdy hydrofobní část směřuje čelem k lipidové

membráně a hydrofilní konec směrem k vnějšímu prostředí (Kristanc & Božič & Jokhadar & Dolenc, & Gomišček, 2019).

Polyenová antibiotika jsou schopna lyzovat eukaryotní buňky. Některé látky této skupiny (filipiny a candicidiny) jsou hemolytické (viz. níže) (Herbrik 2020). Síla hemolýzy se odvíjí od velikosti makrolidového kruhu. Hemolytická a cytolytická aktivita molekul s větším kruhem (filipiny a candiciny) působí na membránu ve třech fázích. Nejprve (při nízké koncentraci polyenů) dochází k reverzibilní změně propustnosti membrány pro  $K^+$  ionty. V druhé fázi (při střední koncentraci polyenů) se již ireverzibilně mění propustnost membrány pro kationty. To způsobuje změnu osmotického tlaku, čímž se dostáváme do třetí fáze – lýze buňky (Brajtburg & Medoff & Kobayashi & Elberg, & Finegold, 1980). Naopak malé molekuly (s méně než sedmi dvojnými vazbami v kruhu) mají mnohem intenzivnější účinek i při malých koncentracích. Propustnost membrán pro  $K^+$  ionty se nemění a k indukci hemolýzy dochází okamžitě pouze v jednom kroku. Takové změny na membráně jsou velmi výrazné a smrt buňky je rychlá (Brajtburg & Medoff & Kobayashi & Elberg, & Finegold, 1980). Většina polyenů se vyznačuje převážně antimykotickým účinkem (Cole & Jarvis, & Schweikert, 2003). Jejich výhodou je velice nízká míra rezistence, která by mohla vyřešit problém s multirezistentními patogeny (příkladem je látka ADEP1 ze třídy acyldepsipeptidových antibiotik produkovaná *Streptomyces hawaiiensis*) (Thomy et al., 2019).



**Obrázek 2:** Ukázka struktury polyenních makrolidních antibiotik – amphotericin B (1) a jeho zkonstruovaný analog nystatin (Tevyashova et al., 2013).

### 3.4 Hemolýza

Hemolýza značí rozpad erytrocytů a uvolnění jejich vnitřního obsahu, zejména červeného krevního barviva hemoglobinu (Thangamani et al., 2013). Příčina jejího vzniku je různá (vzniká např. tepelnými, mechanickými, osmotickými nebo chemickými vlivy).

Hemolýza je projevem virulence mnoha bakterií, jmenovitě *E. coli* (Braun & Schönherr, & Hobbie, 1993), *Staphylococcus aureus* (Jenul, & R. Horswill, 2021) nebo zástupců rodu *Candida* (Furlaneto & Góes & Perini & dos Santos, & Furlaneto-Maia, 2018). Původně se předpokládalo, že hemolytická aktivita bakteriím slouží především k získávání železa z hemové části hemoglobinu jako nutričního zdroje. Příkladem je asimilace železa patogenních zástupců rodu *Candida* (Furlaneto & Góes & Perini & dos Santos, & Furlaneto-Maia, 2018). Novější studie ovšem ukazují vliv hemolytických látek i na imunitní systém. Například griseusrazin A z *Streptomyces griseus* (i další látky jako flavoglaucin a isotetrahydro-auroglaucin (Kim et al., 2014)) je schopen indukovat hemovou oxygenázu 1 (HO-1)(enzym rozkládající hemoglobin za vzniku biliverdinu, železa a oxidu uhličitého) u lipopolisacharidy (LPS) stimulovaných RAW264.7 makrofágů. Zároveň inhibuje produkci řady zánětlivých mediátorů (prostaglandinu E2, oxidu dusnatého), pomocí potlačení exprese cyklooxygenázy-2 a indukovatelné syntázy oxidu dusnatého v LPS stimulovaných RAW264.7 makrofázích a dále i pro-zánětlivých cytokininů (interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$  a tumor nekrotizující faktor (TNF)- $\alpha$ ) (Lee et al., 2016)).

Látky, které hemolýzu vyvolávají obecně označujeme jako hemolyziny. Jde o kalcium-dependentní a termolabilní molekuly (Bakás & Veiga & Soloaga & Ostolaza, & Goñi, 1998). Nejčastěji se jedná o lytické proteiny, které se vážou na sacharidy nebo lipidy tvořící membrány a membránové receptory eukaryotních buněk (Canicatti, 1990). Po vazbě je mechanismus účinku zprostředkován buď enzymatickou reakcí nebo formací pórů (Li et al., 2021).

Lytické proteiny (a další látky se stejnou funkcí a mechanismem účinku) tvoří řadu bakteriálních hemolytických toxinů. U gram pozitivních bakterií patří tyto hemolyziny do skupiny zvané exotoxiny. Příkladem jsou alfa, beta, gama či delta

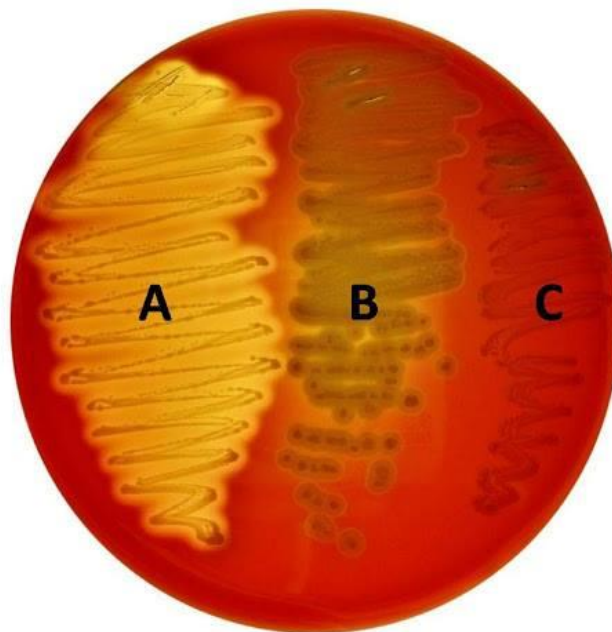
hemolyziny u *Staphylococcus aureus* (Vandenesch & Lina, & Henry, 2012), streptolyziny u *Streptococcus pyogenes* (Molloy & Cotter & Hill & Mitchell, & Ross, 2011) nebo toxiny *Clostridium perfringens* (např.  $\alpha$ -toxin,  $\beta$ -toxin nebo  $\epsilon$ -toxin) (Rood et al., 2018).

Účinek hemolyzinů vyhodnocujeme podle hemolytických zón na krevních agarrech, kde rozlišujeme celkem tři typy hemolýzy  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  (Buxton, 2016).

**$\gamma$ -hemolýza** značí případy, kdy nedochází ke vzniku hemolytické zóny a zániku erytrocytů.

**$\alpha$ -hemolýza** značí částečnou lýzu erytrocytů (neúplnou hemolýzu). Dochází při ní k oxidaci hemoglobinu za vzniku zeleného methemoglobinu.

**$\beta$ -hemolýza** je úplné rozrušení membrány erytrocytů a jejich zánik, který vede k projasnění krevního agaru kolem kolonií.



**Obrázek 3:** Ukázka hemolytických zón, A =  $\beta$ -hemolýza, B =  $\alpha$ -hemolýza, C =  $\gamma$ -hemolýza, zdroj (Buxton, 2016).

### 3.4.1 Hemolyziny

Dle mechanismu účinku můžeme hemolyziny rozdělit do několika skupin:

- Enzymy s hemolytickou funkcí
- Póry formující hemolyziny
- Ostatní hemolyziny
- Polyenová antibiotika

#### 1. Enzymy s hemolytickou funkcí

Enzymaticky aktivní hemolyziny rozrušují buněčnou membránu vazbou na zde přítomné stavební látky. Jedná se o především o lipázy (dále například lektinázy, neuraminidázy) (Telesmanich & Lomov, & Podosinnkova, 2017). Příkladem jsou hemolytické lipázy neepidemických variant *Vibrio cholerae* (Nagamune & Yamamoto, & Honda, 1995), (Ogierman et al., 1997).

Mechanismus účinku fosfolipáz spočívá v jejich vazbě na fosfolipidy v cytoplazmatické membráně erytrocytů (Baine, 1985). Touto vazbou dochází k odnímání polární skupiny z fosfolipidů, což vede k destabilizaci membrány a k lýze buňky. Příkladem jsou enzymy *Clostridium perfringens*, jehož  $\alpha$ -hemolyzin (způsobující  $\alpha$ -hemolýzu a intravaskulární hemolýzu) je fosfolipáza C a  $\beta$ -hemolyzin (způsobující  $\beta$ -hemolýzu) je sfingomyelináza (Oda & Terao & Sakurai, & Nagahama, 2015), (Bunkar et al., 2020).

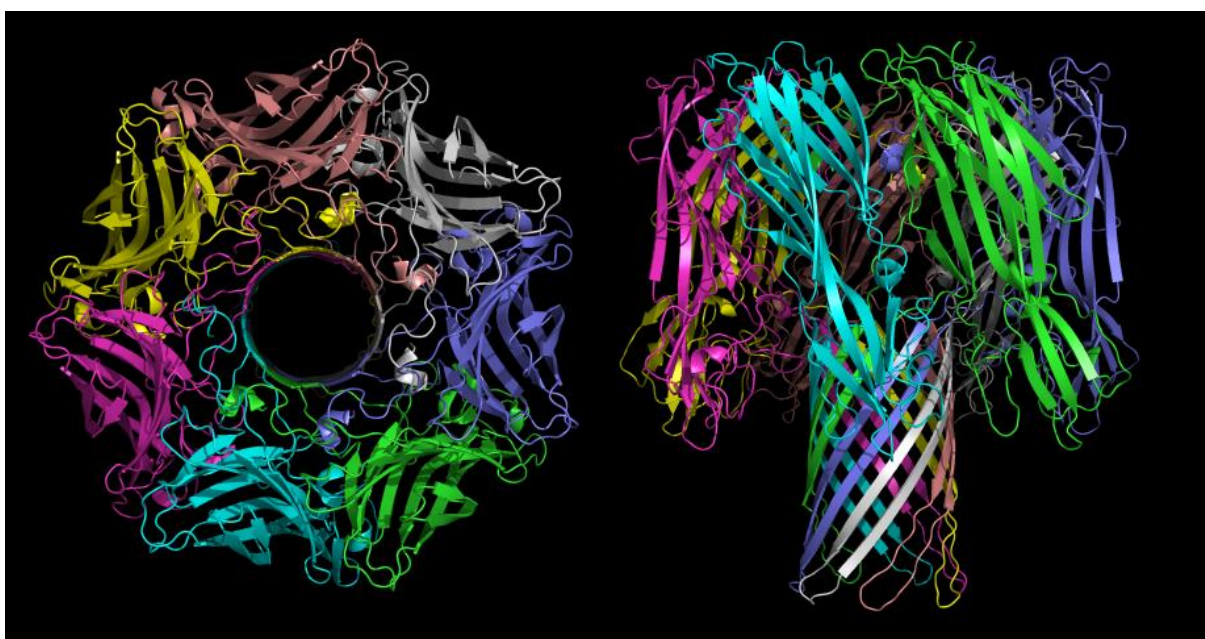
Sfingomyelináza je toxin přítomný i u *Staphylococcus aureus*. Sfingomyelinázy jsou fosforové diesterové hydrolázy, které hydrolyticky štěpí sfingomyeliny, které jsou hojně zastoupeny v eukaryotické membráně. Hemolytická aktivita tohoto toxinu je podpořena změnou kultivační teploty z 37 °C pod 10 °C, kdy způsobuje tzv. *hot-cold* hemolýzu, čili neúplnou hemolýzu vyvolanou účinkem chladu (J Smyth & Möllby, & Wadström, 1975), (Montes et al., 2008).

## 2. Hemolyziny formující póry

Poriny (molekuly formující póry) vytváří různé monomery, které se po navázání na membránu (rozpoznáním specifického receptory) zabudovávají do její struktury a vytváří transmembránové oligomery (Li et al., 2021), (Kagan, & Thundimadathil, 2010). Oligomery tvoří póry (otvory), které transportují drobné polární (hydrofilní) molekuly dovnitř a vně molekuly, čímž mění osmotický tlak a lyzují buňku.

Příčinnou lýze buňky může být i transport dalšího toxinu pórem a jeho účinek na fyziologické funkce (viz dále) (Lacomel & Dunstone, & Spicer, 2021). Oba způsoby účinku jsou neenzymatické. Příkladem je toxin cytolysin A u *Escherichia coli* nebo listeriolysin O (Roderer, & Glockshuber, 2017), tvořený bakterií *Listeria monocytogenes*, jenž napomáhá bakterii uniknout z fagozomu (Cheng et al., 2020).

V závislosti na tvaru, který monomery hemolyzinů na membráně zaujímají, můžeme poriny klasifikovat do dvou základních skupin. Buď na  $\alpha$ -pór formující proteiny ( $\alpha$ -PFP), které tvoří kanálky pomocí **alfa-šroubovic** (cytolysin A u *Escherichia coli* (Sathyanarayana et al., 2018)), nebo na  $\beta$ -pór formující proteiny ( $\beta$ -PFP), které tvoří kanálky z tzv. **beta-barelů**, které jsou znázorněny na **Obrázku 4** (Lacomel & Dunstone, & Spicer, 2021). Příkladem tohoto typu toxinu je  $\alpha$ -toxin *Staphylococcus aureus* (Reyes-Robles, & Torres, 2017).



**Obrázek 4:** Alfa-toxin *Staphylococcus aureus*, pohled ze předu a z boku, zdroj (Song et al., 1996).

Poriny mohou být tvořeny ze dvou složek (A a B). Složka B je protein formující pór, který obsahuje oblast vázající receptor na membráně cílové buňky. Struktura A je sekundární toxin (často enzym), který vstupuje pórem do nitra buňky a katalyzuje reakci inhibice buněčných funkcí (Lubran, 1988), (Zuverink, & Barbieri, 2018). Příkladem inhibice buněčných funkcí je (ADP)-ribosylace regulačních proteinů adenylátcyklázy (toxiny *Vibrio cholerae*) s následným zhroucením cytoskeletu buňky. Důvodem zhroucení je zvýšení intracelulární koncentrace cAMP (Muanprasat, & Chatsudthipong, 2013).

### **3. Ostatní hemolyziny**

Do této skupiny patří tzv. moduliny rozpustné ve fenolu (phenol-soluble modulins PSM). Jedná se amfipatické,  $\alpha$ -helikální sloučeniny hojně vylučované rodem *Staphylococcus* (Le et al., 2019). Pro *Staphylococcus epidermidis* mají důležitou roli při tvorbě biofilmů, které jsou častým zdrojem infekce (Otto, 2014).

Po izolaci jejich filtrátu fenolem byly identifikovány tři peptidy  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Tyto peptidy způsobují lýzu červených a bílých krvinek, stimulují zánětlivé reakce a přispívají k šíření infekce patogenu (například *S. aureus*, *S. haemolyticus*) (Gonzalez et al., 2014), (Da et al., 2017).

### **4. Polyenová antibiotika**

Viz kapitola 3.3.2.

#### **3.4.2 Hemolytická aktivita u *Streptomyces spp.***

Hemolyziny jsou běžnou výbavou zástupců aktinomycet. Můžeme je nalézt například u *Mycobacterium avium* (Maslow & Dawson & Carlin, & Holland, 1999), (Kozon et al., 2019), *Mycobacterium tuberculosis* (Wren et al., 1998) i u zástupců rodu streptomycet. Až překvapivě mnoho streptomycet je schopno  $\beta$ -hemolýzy.

Screening 102 zástupců (ze sbírky Národní referenční laboratoře patogenních aktinomycet v Trutnově, <http://www.nemtru.cz/sbirka-patogennich-aktinomycet-cctr>), které jsou přítomné u plicních onemocnění člověka, ukázal  $\beta$ -hemolýzu v 77,5 %.

Screening 184 půdních zástupců ukázal  $\beta$ -hemolýzu v 56 % (Herbrík et al., 2020). Podobné procentuální rozložení uvedly i další studie ( $\beta$ -hemolýza; 51,5 % půdních kmenů, 75,5 % na člověka adaptovaných kmenů) (Wurzer, 2019). Na hemolýzu lze v této souvislosti pohlížet buď jako na faktor virulence nebo jako na jeden z adaptačních mechanismů streptomycet (spory, nalezené v dýchacích cestách pacientů, pocházejí z půdy, adaptací kmenů mohlo dojít k rozvoji hemolýzy) (Herbrík et al., 2020).

Hemolyziny jsou produkty sekundárního metabolismu. Konkrétním příkladem je objev hemolytické aktivity u *S. coelicolor* po šesti dnech kultivaci na krevním agaru (Thangamani et al., 2013). Gen *SCO1782*, který je za hemolýzu *S. coelicolor* odpovědný, kóduje expresi membránových proteinů, které byly pojmenovány jako S-hemolyzin. S-hemolyzin jeví podobnost s hemolyziny *Brachyspira hyodysenteriae* (35 %) a *Mycobacterium tuberculosis* (62 %) (Thangamani et al., 2013).

Tento příklad zároveň ukazuje, že cytolytická aktivita hemolyzinů nemusí být vyhrazena jen vůči erytrocytům, ale může být mířena i proti jiným eukaryotním buňkám (S-hemolyzin je namířen proti lidským fibroblastům) (Thangamani et al., 2013). Cytolytická aktivita filipinu *Streptomyces filipinensis* je mířená nejen proti buňkám hub (testováno proti; *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon asahii*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus nidulans* a *Aspergillus niger*) (Barreales et al., 2020), ale i proti ovčím erytrocytům na krevním agaru (Herbrík et al., 2020).

### 3.5 Modulace metabolismu

Modulací metabolismu se rozumí takové nastavení stimulů a podmínek kultivace, aby došlo k aktivaci exprese kryptických klastrů. Nejjednodušším ze způsobů modulace je ko-kultivace s cizím organismem. Jedním z takových příkladů je ko-kultivace streptomycet s *Bacillus mycoides*, která vedla k indukci produkce nových algicidních derivátů tryptaminu (inhibující růst tzv. vodního květu) streptomycetou (Yu & Hu, & Ma, 2015). Ko-kultivace s konkurenčním organismem vede k boji o zdroje a tím k aktivaci obranných sekundárních mechanismů. Konkrétním příkladem je účinek aktinomycinu D ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) ze *Streptomyces parvulus* na inhibici biofilmu



*Staphylococcus aureus*. Aktinomycin D inhiboval produkci slizu, snížil hydrofobii buněk a zamezil hemolytickému účinku *Staphylococcus aureus* (She et al., 2020).

Kromě metod ko-kultivace můžeme pro dosažení modulace metabolismu použít různých chemických sloučenin, které fungují jako signální molekuly pro zahájení metabolické produkce (viz kapitola 3.5.1).

Modulace dosahujeme i způsoby metod genetického inženýrství (úpravy genů v organismu, transfer genů do heterologních zástupců atd.). Příkladem je vložení alely genu *absA1* z *S. coelicolor* do heterologního zástupce streptomycet (*S. flavopersicus*) za účelem aktivace sekundárních biosyntetických klastrů (konkrétně klastrů pro produkci antibiotika pulvomycinu, jehož produkce u *S. flavopersicus* do té doby nebyla zaznamenána)(McKenzie et al., 2010).

Produkce těchto látek je velice komplexní proces, který je nutné regulovat, aby nedocházelo například k toxické nadprodukci a vyčerpání producenta. Úlohu umělé regulace v laboratorních podmínkách plní tzv. indukovatelné regulační systémy, které kontrolují expresi biosyntetických genů a tím moduluji produkci sekundárních metabolitů (Ji & Kim, & Kang, 2019).

### **3.5.1 Signální molekuly jako induktory sekundárních metabolitů**

Nejčastěji se jedná o autoregulační sloučeniny, které fungují jako bakteriální hormony (např. A-faktor, který byl první objevenou sloučeninou této skupiny viz kapitola 3.3). Základní struktura A-faktoru i dalších sloučenin je tvořena GBL (Takano et al., 2016). GBL molekuly stimulují produkci sekundárních metabolitů. Jejich syntéza začíná na začátku exponenciální fáze růstu a maximální koncentrace (100 nM) dosahují na jejím vrcholu (Wink & Mohammadipanah, & Hamed, 2017). Do dnešní doby bylo popsáno zhruba 19 různých GBL sloučenin (Daniel-Ivad et al. 2018).

Zástupci streptomycet mohou mít v genomu dva typy genů; geny kódující expresi GBL molekul, geny kódující receptory pro GBL molekuly. Expresí těchto genů se GBL molekuly šíří prostředím a plní stejnou funkci jako *quorum sensing* komunikační kaskáda (viz kapitola 3.2) (Barreales & Payero & Jambrina & Aparicio, & Parales, 2020).

Kromě genů kódujících tvorbu receptorů pro GBL, existuje skupina tzv. pseudo GBL-receptorů, které nejsou schopny GBL molekuly vázat. Fungují tedy jako antagonisté (potlačují a regulují expresi sekundárních metabolitů) (Xu, & Yang, 2019). Potvrzení jejich antagonistické funkce je vidět v příkladu inaktivace genu *sfbR* u *S. filipinensis* (kódující GBL receptor) a genu pseudoreceptoru GBL *sfbR2*. Inaktivace genu receptoru vede k poklesu produkce filipinu, naopak inaktivace genu pseudoreceptoru vede k posílení jeho produkce (Barreales & Payero & Jambrina & Aparicio, & Parales, 2020).

Biosyntetická dráha GBL nebyla zatím dostatečně popsána. Při zkoumání biosyntézy signálních molekul (konkrétně SCBs (*S. coelicolorbutanolides*)) u vzorového zástupce *S. coelicolor* byla objevena klíčová funkce  $\gamma$ -butyrolaktosyntázy (GBL-syntáza)(kódovaná genem *ScbA*). GBL-syntáza je zodpovědná za iniciaci biosyntézy SCBs. Delecí jejího genu *ScbA* došlo u *S. coelicolor* k porušení produkce řady sekundárních metabolitů (konkrétně polyketidového pigmentovaného antibiotika, aktinorhodinu a undecylprodigosinu). Delecí byl rovněž poprvé prokázán vliv SCBs na produkci sideroforu desferrioxaminu a na expresi genů primárního metabolismu, kódujících enzymy pro primární metabolické dráhy (D'Alia et al., 2011).

Z těchto důvodů jsou geny, analogické k *ScbA* genu *S. coelicolor*, využívány v metodách genového inženýrství pro snížení nebo zvýšení metabolické produkce. Příkladem je inaktivace genu *afsA-g*, kódujícího GBL-syntázu u *S. fradiae* CGMCC 4.7387, která vedla ke snížení produkce sekundárního metabolitu (aminoglykosidového antibiotika neomycinu). Naopak nadměrná exprese tohoto genu vedla ke zvýšení produkce neomycinu, což potvrzuje vliv GBL-syntázy (Meng et al., 2017).

Další signální molekulou je například NAG, který má podobné účinky jako GBL. Příkladem účinku je vliv NAG na zvýšenou produkci bleomycinu u *Streptomyces verticillus* (Chen & Cui & Wang & Wang, & Wen, 2020).

Roli signálních molekul mohou mít i samotná antibiotika streptomycet. Příkladem je lincomycin. Pozitivní indukční účinky má ovšem jen v malé koncentraci (v tzv. subinhibiční koncentraci). Při jejím překročení naopak inhibuje proteosyntézu.

Při správné aplikaci výrazně ovlivňuje genovou expresi. V pokusu s *S. coelicolor* tato schopnost vedla k větší tvorbě modře-pigmentovaného antibiotika norhodinu (Ishizuka et al., 2018). Řada dalších antibiotik (při aplikaci v subinhibiční koncentraci) má podobné účinky. Příkladem je chloramphenicol, tetracyklin, vancomycin nebo rifampicin (Vaz Jauri & Bakker & Salomon & Kinkel, & Badger, 2013).

## 4 METODIKA

### 4.1 Vybrané kmeny

Díky spolupráci s Dr. Chroňákovou mám k dispozici izoláty  $\beta$ -hemolyzujících streptomycet ze Sbírký kultur půdních aktinomycet České Budějovice (CCSACB) při Ústavu půdní biologie Biologického centra AV ČR, v.v.i. (viz *Tabulka 1*). Jako pozitivní kontrolu pro LC-MS jsem zvolila lidský kmen TR1341, který byl použit již v dřívějším výzkumu (Herbrík et al., 2020).

Sbírka obsahuje kmeny samostatně rostoucí v půdě (BCCO0524, BCCO0670, BCCO0747, BCCO2259, BCCO2295, BCCO2309, BCCO2325 a BCCO2389), kmeny symbiotické se členovci (BCCO1092, BCCO1093, BCCO1094, BCCO1095, BCCO1097, BCCO1099, BCCO1104, BCCO1105, BCCO1106, BCCO1331, BCCO2179 a BCCO2196) a rostlinami (BCCO2282) viz *Tabulka 1*.

*Tabulka 1: Sbirka vybraných kmenů Streptomyces spp.*

<b>Kmen</b>	<b>Taxonomie</b>	<b>Zdroj</b>
<b>BCCO0524</b>	<i>Streptomyces scabia</i>	Krasová půda
<b>BCCO0670</b>	<i>Streptomyces pratensis</i>	Pastvinná půda
<b>BCCO0747</b>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Pastvinná půda poblíž úlů
<b>BCCO1092</b>	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	Tělo brouka ( <i>Hadrodemius globus</i> )
<b>BCCO1093</b>	<i>Streptomyces cavourensis</i>	Tělo brouka ( <i>Dinoplatypus pallidus</i> )
<b>BCCO1094</b>	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	Tělo brouka ( <i>Dinoplatypus pallidus</i> )
<b>BCCO1095</b>	<i>Streptomyces bacillaris</i>	Tělo brouka ( <i>Xyleborus perforans</i> )
<b>BCCO1097</b>	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> ( <i>S. ederensis</i> )	Tělo brouka ( <i>Xyleborus perforans</i> )
<b>BCCO1099</b>	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	Tykadla brouka ( <i>Diapus pussilimus</i> )
<b>BCCO1104</b>	<i>Streptomyces albolongus</i>	Tělo brouka ( <i>Crossotarsus mniszehi</i> )
<b>BCCO1105</b>	<i>Streptomyces similanensis</i>	Tykadla brouka ( <i>Hypoborus ficus</i> )
<b>BCCO1106</b>	<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i>	Tykadla brouka ( <i>Hypoborus ficus</i> )
<b>BCCO1331</b>	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Tykadla brouka ( <i>Xyleborus perforans</i> )
<b>BCCO2179</b>	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	Střevo mnohonožek 2018 ( <i>Telodeinopus aoutii</i> )
<b>BCCO2196</b>	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Střevo mnohonožek 2018 ( <i>Telodeinopus aoutii</i> )
<b>BCCO2259</b>	<i>Streptomyces xiamenensis</i>	Orná půda – produkce <i>Zea mays</i> (2018)
<b>BCCO2282</b>	<i>Streptomyces rishiriensis</i>	Kořeny <i>zea mays</i> (2018)
<b>BCCO2295</b>	<i>Streptomyces neopeptinius</i>	Orná půda – produkce <i>Zea mays</i> (2018)
<b>BCCO2309</b>	<i>Streptomyces qaidamensis</i>	Orná půda – produkce <i>Zea mays</i> (2018)
<b>BCCO2325</b>	<i>Streptomyces chartreusis</i>	Orná půda – produkce <i>Zea mays</i> (2018)
<b>BCCO2389</b>	<i>Streptomyces atratus</i>	Orná půda – produkce <i>Zea mays</i> (2018)

## 4.2 Kultivační média a podmínky kultivace

Streptomycety byly kultivovány v tekutých i na pevných kultivačních médiích. Jako tekuté médium byl použit GYM (Ochi, 1987)(0.4% kvasnicový extrakt, 1% sladový extrakt, 0.4% glukóza, 0,1% NZ Amine A (NZ-Amine®, Type A, Wako), 0,2% NaCl, pH 7.3), při kultivačních podmínkách 28 °C po dobu 72 hodin, pokud není uvedeno jinak. V případě potřeby bylo GYM médium obohaceno defibrinovanou beraní krví (7%)(Oxoid). Pro kultivaci na pevných substrátech bylo rovněž použito GYM médium s příměsí agarů (2%), nebo Columbia ovčí krevní agar (KA)(Oxoid).

Pro testování účinku GBL (nebo NAG) na hemolytickou a inhibiční aktivitu streptomycet jsem kmeny kultivovala v gradientu těchto indukčních látek. K vytvoření tohoto média jsem použila GYM s přidavkem agarů (2%). Miska byla položena na šikmé ploše (pod úhlem zhruba 5°). V této poloze misky tuhla první vrstva GYM média. Následně byla miska vrácena do vodorovné polohy, ve které tuhla druhá vrstva GYM média s obsahem GBL (nebo NAG), čímž v misce vznikl gradient této látky (rozpětí koncentrace gradientu 0-25 µg.ml<sup>-1</sup>).

## 4.3 Testování hemolytické aktivity

Kultivační média s příměsí krve sloužila k testování hemolytické aktivity. Kultivace probíhala při 28 °C po dobu 72 hodin, pokud není uvedeno jinak. Hodnotila jsem vzhled vzniklých hemolytických zón (β-hemolýza **úplná**; projasnění média, β-hemolýza **neúplná**; růžová, nebo α-hemolytická zelená zóna) a měřila jsem jejich velikost (od obvodu linie streptomycety až k okraji viditelné hemolytické zóny na médiu).

## 4.4 Ko-kultivace s patogeny a ko-kultivace v párech

Testy inhibičních aktivit streptomycet byly prováděny na následujících druzích potenciálně patogenních mikroorganismů; *Candida tropicalis* CCM 8223, *Candida albicans* CCM 8186, *Staphylococcus aureus* DSM 346, *Streptococcus pneumoniae* CCM 4424, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 ze sbírky Ústavu imunologie a mikrobiologie, 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Vzhledem k pomalejšímu růstu a jiným kultivačním podmínkám jsem jednotlivé kmeny streptomycet kultivovala v jedné linii samostatně 48 hodin předem (28 °C), pokud není uvedeno jinak. Následně jsem přidala linii patogenního organismu do tvaru písmene T (kolmo vůči čáře streptomycety). Po následujících 24 hodinách (při 37 °C) jsem odečítala morfologické a inhibiční (při kultivaci na KA i hemolytické) změny. Inhibiční zóny jsem měřila jako délku linie mikroorganismu, kde nedošlo k jeho růstu. Pro pokus na agarech s gradientem GBL (nebo NAG)(viz kapitola 4.2) jsem mikroorganismus (*Candida albicans*) předem kultivovala v tekutém médiu (48 hodin, 37 °C) a jeho suspenzi (s optickou denzitou 0,4 při 590 nm) homogenně rozetřela po pevném médiu s linií streptomycety (po 48 hod její samostatné kultivace při 28 °C) a po následných 24 hod (při 37 °C) jsem hodnotila výsledky.

Ko-kultivaci kmenů streptomycet mezi sebou v různých kombinacích označuji jako ko-kultivaci v párech. Kultivace probíhala v tekutém GYM médiu bez i s příměsí beraních erytrocytů (7%)(Oxoid) při 28 °C, 200 rpm (revolutions per minute, otáčky za minutu) po dobu 72 hodin.

#### **4.5 Indukce hemolytické a inhibiční aktivity**

Pro testování schopnosti GBL (nebo NAG) indukovat hemolytickou a inhibiční aktivitu streptomycet jsem aplikovala 1 µl GBL (ReagentPlus, ≥ 99%, Sigma-Aldrich Co. LLC, USA), nebo NAG (≥ 99%, Sigma-Aldrich Co. LLC, USA) na filtrační papírek (1 cm<sup>2</sup>), který jsem přiložila na pevné médium na dotyk s linií streptomycety (případně s ko-kultivovaným mikroorganismem). Přidání GBL bylo buď provedeno simultánně s naočkováním streptomycety, nebo až 48 hodin po samostatné kultivaci streptomycety (28 °C).

#### **4.6 Ethyl-acetátová precipitace a testování hemolytické a inhibiční aktivity**

Ethyl-acetátová precipitace je způsob extrakce sekundárních metabolitů ze supernatantu (Rajan, & Kannabiran, 2014). Po 72 hodinách kultivace na třepačce, (28 °C) v 20 ml GYM média v Erlenmeyerově baňce, jsem vzorky centrifugovala (4000 g, 10 min, 4 °C) a oddělila supernatant od peletu. K supernatantu bylo přidáno NaCl do dosažení 5M koncentrace s následnou extrakcí 1 ml ethylacetátu na třepačce

(250 rpm, 4 °C, 30 min). Po opětovné centrifugaci (4000 g, 10 min, 4 °C) jsem vzorek zakoncentrovala (pomocí vakuového odpařovače, Concentrator Plus, 2013 model, Eppendorf) a opět rozpustila v 200 µl chloroformu. Hemolytická aktivita extrahovaných metabolitů byla testována na Columbia ovčím krevním agaru (Oxoid). Na agar bylo pipetováno 10 µl od každého vzorku. Doprostřed misky jsem přidala 10 µl čistého chloroformu jako negativní kontrolu. Po odpaření chloroformu jsem misky inkubovala přes noc při 37 °C a následně jsem odečetla změny hemolýzy. Pro otestování inhibiční aktivity byla na KA přidána suspenze *Candida albicans* (kultivace v tekutém GYM médiu po 48 hod při 37 °C) s optickou denzitou 0,4 při 540 nm.

#### **4.7 Extrakce na pevné fázi (SPE metoda)**

Separace na pevné fázi (SPE, Solid-phase extraction) je metoda použita pro extrakci sekundárních metabolitů ze supernatantu za účelem jejich detekce pomocí LC-MS (Kameník et al., 2010). Po 72 hodinách kultivace na třepačce (200 rpm, 28 °C) v 20 ml GYM media v Erlenmeyerově baňce jsem vzorky centrifugovala (4000 g, 10 min, 4 °C). Po slítí supernatantu jsem pro extrakci použila SPE kolonky (Oasis HLB 3cc 60 mg váhy sorbentu, hydrofilně-lipofilně vyvážený sorbent, Waters, USA) (Čihák et al., 2017). Proces SPE extrakce probíhal podle jednotlivých kroků; kondicionání kolonky 3 ml methanolu (LC-MS třída, Biosolve, Nizozemsko), ekvilibrace 3 ml vody (připravené Milli-Q water čističem, Millipore, USA), přidání supernatantu (pH upraveno na 3, použitím kyseliny mravenčí, 98–100%, Merck, Německo), opětovné promytí 3 ml vody a eluce 1,5 ml methanolu. Následně byl eluát odpařen (pomocí Concentrator Plus, 2013 model, Eppendorf), smíchan s 150 µl 50% methanolu a centrifugován (2800 g, 5 min). Z takto připraveného vzorku mohlo být použito 50 µl pro LC-MS analýzu.

#### **4.8 LC-MS analýza extrahovaných supernatantů**

Kapalinová chromatografie slouží k separaci jednotlivých složek vzorku. Ty jsou poté analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie, která po ionizaci látek rozliší vzniklé ionty na základě poměru hmotnost ku náboji ( $m/z$ ). LC-MS byla provedena na systému Acquity UPLC s 2996 PDA detekčním systémem (194 - 600 nm), napojeným na hmotnostní spektrometr LCT premier XE time-of-flight (TOF) (Waters, USA).



Pět  $\mu\text{L}$  vzorku bylo nanášeno na kolonu Acquity UPLC BEH C18 LC (50 mm  $\times$  2.1 mm I.D., velikost částic 1.7  $\mu\text{m}$ , Waters) při 40  $^{\circ}\text{C}$ , eluováno dvousložkovou mobilní fází (A a B, 0,1% kyselina mravenčí a acetonitril) v daném pořadí, při průtoku 0.4 mL.min<sup>-1</sup>. Analýza byla prováděna v programu lineárního gradientu (min/%B) 0/5; 1.5/5; 15/70; 18/99 s následným 1 minutovým čištěním kolonky (99% B) a 1,5 minutovým ekvilibrováním (5% B). Hmotnostní spektrometr pracoval v kladném „W“ módu s nastavením: kapilární napětí na +2,800 V, napětí na kuželu na +40 V, teplota desolvatačního plynu na 350  $^{\circ}\text{C}$ , teplota bloku iontového zdroje na 120  $^{\circ}\text{C}$ , průtok desolvatačního plynu 800 L.h<sup>-1</sup>, průtok plynu v kuželu 50 L.h<sup>-1</sup>, doba skenování 0,15 s, zpoždění mezi skeny 0,01 s (Čihák et al., 2017).

Přesnost spektrometrického měření byla udržována pod 10 ppm pomocí technologie lock spray s leucin enkefalinem jako referenční sloučeninou (2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). MS chromatogramy byly extrahovány pro  $[\text{M}+\text{H}]^{+}$  ionty s tolerančním oknem 0,03 Da a upraveny metodou středního vyhlazování (velikost okna: 4 skeny, počet vyhlazení: 2). Data byla následně zpracována pomocí MassLynx V4.1 (Waters) (Čihák et al., 2017).

#### **4.9 Testování přítomnosti extracelulárních hemolytických proteinů**

Pro testování přítomnosti extracelulárních hemolytických proteinů byl odebraný supernatant (kultivovaný 72 hodin, 28  $^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, centrifugovaný při 4000 g, 10 min) přefiltrován (velikost pórů 5 mikronů) a rozdělen na třetiny (každá třetina byla podrobena jinému procesu).

První třetinu supernatantu jsem inkubovala s proteinázou K (1 mg/ml, specifická aktivita  $\geq 30$  U/mg, Roth, Německo) o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  po dobu 60 min, při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Druhou třetinu supernatantu jsem inkubovala za stejných podmínek ovšem za absence proteinázy K (tato sada sloužila jako pozitivní kontrola, neboť se u ní očekává zachování případné hemolytické aktivity). Zbytek supernatantu jsem inkubovala při 100  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 min (negativní kontrola, neboť u této sady očekáváme vlivem varu ztrátu případné hemolytické aktivity způsobenou proteiny). Od každého vzorku jsem nanášela 5  $\mu\text{l}$  na filtrační papírek (1  $\text{cm}^2$ ) umístěný na KA. Vzorky jsem nechala kultivovat přes noc (28  $^{\circ}\text{C}$ ) a ráno jsem odečetla výsledky hemolýzy (Guan et al., 2008).

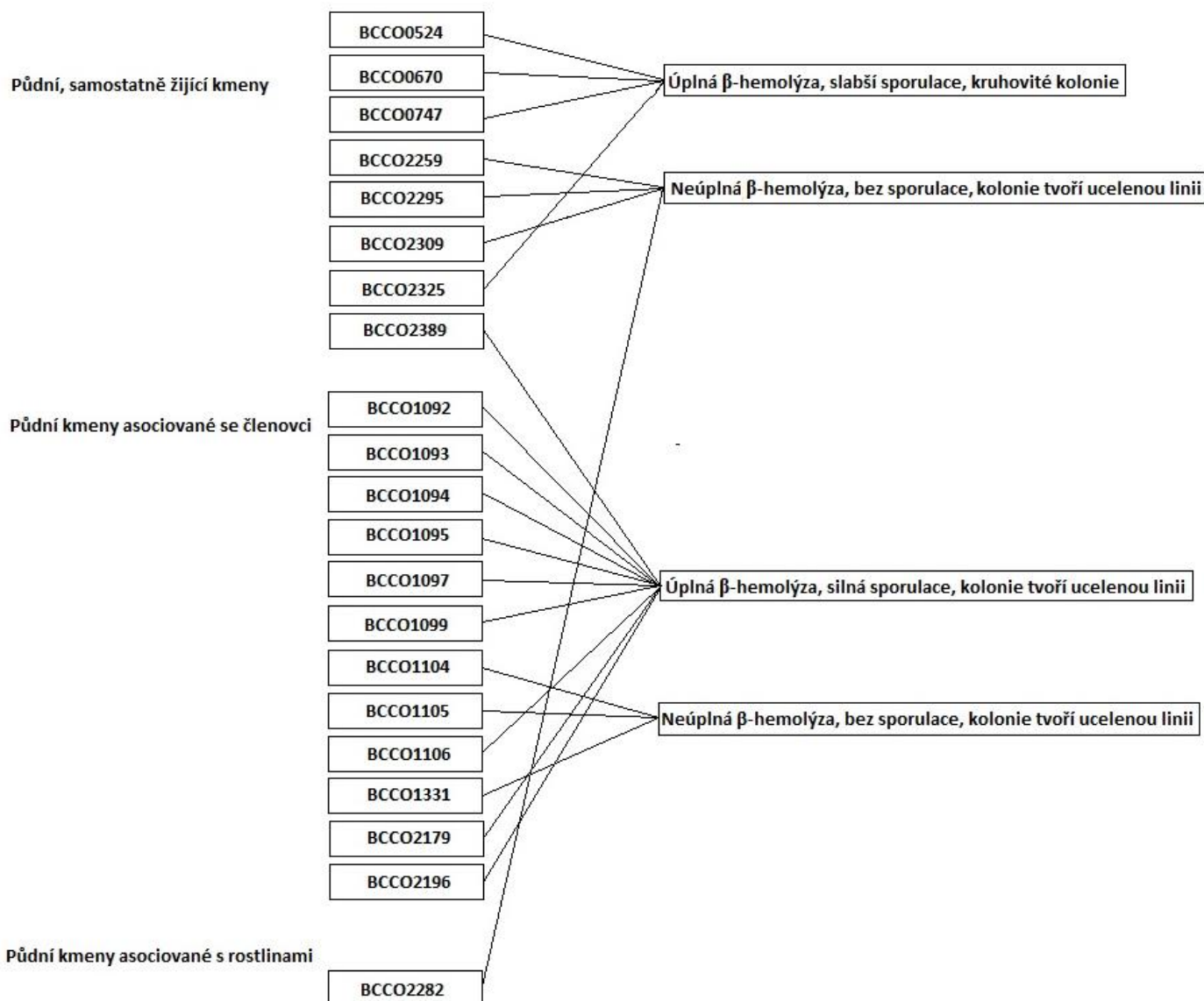
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Charakteristika morfologie a hemolytické aktivity

Kmeny byly kultivovány (podmínky kultivace viz kapitola 4.2) na KA. Po třech dnech jsem analyzovala hemolytickou aktivitu (míru projasnění média, viz kapitola 4.3) a morfologii (přítomnost sporulace) viz *Tabulka 2*, *Obrázek 5* a *Obrázek 6*. V rámci přílohy je přiloženo CD, které obsahuje obrázky všech kmenů z jednotlivých kultivací.

*Tabulka 2: Hemolytická aktivita a morfologie (sporulace) sbírky kmenů po 72 hod kultivace na KA při 29°C.*

Kmen	Hemolýza	Poznámky k hemolýze	Sporulace	Velikost hemolytické zóny (mm)
<b>BCCO0524</b>	β-hemolýza	Projasnění média	+	3
<b>BCCO0670</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna až projasnění	+	5
<b>BCCO0747</b>	β-hemolýza	Žluto-růžová zóna	+	6
<b>BCCO1092</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna až projasnění	+	8
<b>BCCO1093</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna až projasnění	+	7
<b>BCCO1094</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna až projasnění	+	6
<b>BCCO1095</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna až projasnění	+	8
<b>BCCO1097</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna až projasnění	+	7
<b>BCCO1099</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna až projasnění	+	8
<b>BCCO1104</b>	Slabá β-hemolýza	Žlutá zóna a zóna projasnění	-	7
<b>BCCO1105</b>	β-hemolýza	Žlutá, místy zelená zóna	-	2
<b>BCCO1106</b>	β-hemolýza	Projasnění média	+	4
<b>BCCO1331</b>	β/α-hemolýza	Žlutá, místy zelená zóna	-	2
<b>BCCO1341</b>	β/α-hemolýza	Žlutá, místy zelená zóna	-	2
<b>BCCO2179</b>	β-hemolýza	Projasnění média	+	3
<b>BCCO2196</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna a zóna projasnění	+	4
<b>BCCO2259</b>	β-hemolýza	Projasnění média	-	4
<b>BCCO2282</b>	β-hemolýza	Slabá žlutá, místy zelená zóna	-	1
<b>BCCO2295</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna až projasnění	-	7
<b>BCCO2309</b>	β-hemolýza	Žlutá zóna až projasnění	-	6
<b>BCCO2325</b>	β/α-hemolýza	Žlutá a zelená zóna	-	5
<b>BCCO2389</b>	β-hemolýza	Zelená zóna	+	3



**Obrázek 5:** Srovnání intenzity hemolytické aktivity a morfologie mezi kmeny streptomycet, podle jejich původu (viz **Tabulka 2** a přiložená obrazová dokumentace na CD).

Míru sporulace jsem hodnotila následovně; **silná sporulace** = bílé spory jsou po celé délce linie streptomycety, **slabší sporulace** = bílé spory pokrývají šedé vegetativní mycelium jen místy, **bez sporulace** = v žádném místě linie streptomycety nejsou vidět bílé spory.



**Obrázek 6:** Kultivace kmenů po 72 hod na KA při 29 °C  
 Kmeny BCCO1341 a BCCO1105; ukázka růstu substrátového mycelia s neúplnou  $\beta$ -hemolýzou  
 Kmeny BCCO1093 a BCCO1106; ukázka růstu vzdušného mycelia, úplné  $\beta$ -hemolýzy a sporulace  
 Kmeny BCCO0524 a BCCO0670; ukázka růstu vzdušného mycelia, úplné  $\beta$ -hemolýzy a sporulace.

## 5.2 Pozorování hemolytické a inhibiční aktivity při ko-kultivaci

Ko-kultivace s mikroorganismy sloužila ke sledování inhibiční a hemolytické aktivity streptomycet. V pokusu jsem použila 6 patogenních mikroorganismů, které byly do média přidány v exponenciální fázi růstu streptomycety (souběžné přidání mikroorganismu i streptomycety a ko-kultivace 24 hod na KA, viz **Tabulka 3**) a ve stacionární fázi růstu (po 48 hodinách samostatné kultivace streptomycet a 24 hod ko-kultivace, postup viz kapitola 4.4, výsledky viz **Tabulka 4**). V exponenciální fázi byla inhibice pozorována v 6 případech, kmeny *BCCO1105*, *BCCO2259*, *BCCO2309* a *BCCO2325* nenarostly (viz **Tabulka 3**) a ve stacionární fázi ve 37 případech, kmeny *BCCO2325* a *BCCO2309* nenarostly (viz **Tabulka 4**). Podle těchto výsledků jsem pro navazující pokusy (viz kapitola 5.3) zvolila jako optimální dobu ko-kultivace 72 hod (s předcházející samostatnou kultivací streptomycety po 48 hod).

Hemolytickou a inhibiční aktivitu vůči *Candida albicans* jsem hodnotila změřením inhibičních a hemolytických zón viz **Tabulka 5** (princip měření viz kapitola 4.3 a 4.4). Zároveň jsem sledovala změny v morfologii (sporulaci), které jsem porovnávala s výsledky z **Tabulka 2**. V navazujících pokusech jsem pro ko-kultivace streptomycet použila pouze *Candida albicans* (preferovaný mikroorganismus). Ukázka ko-kultivací je znázorněna na **Obrázek 7**.

**Tabulka 3:** Velikost inhibičních zón po 24 hod ko-kultivaci kmenů streptomycet v jejich exponenciální fázi růstu na KA s vybranými mikroorganismy. Přítomnost inhibice (+), nepřítomnost inhibice (-), ko-kultivovaný mikroorganismus nenarostl inhibici nelze hodnotit (**Mikroorg. nenarostl**).

	Druhy mikroorganismů					
	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> M fáze	<i>streptococcus pneumoniae</i> R fáze	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Kmeny	Přítomnost inhibice růstu mikroorganismů					
<b>BCCO0524</b>	Mikroorg. nenarostl	+	+	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO0670</b>	Mikroorg. nenarostl	-	-	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO0747</b>	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1092</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1093</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1094</b>	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1095</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1097</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1099</b>	+	+	-	-	-	-
<b>BCCO1104</b>	-	-	-	Mikroorg. nenarostl	+	-
<b>BCCO1106</b>	-	-	-	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1331</b>	-	-	-	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1341</b>	-	-	+	-	-	-
<b>BCCO2179</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO2196</b>	-	-	-	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO2282</b>	Mikroorg. nenarostl	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO2295</b>	Mikroorg. nenarostl	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO2389</b>	Mikroorg. nenarostl	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-

**Tabulka 4:** Velikost inhibičních zón po 48 hod samostatné kultivace kmenů streptomycet (stacionární fázi růstu) a následnou 24 hod ko-kultivací na KA s vybranými mikroorganismy. Přítomnost inhibice (+), nepřítomnost inhibice (-), ko-kultivovaný mikroorganismus nenarostl inhibici nelze hodnotit (**Mikroorg. nenarostl**).

	Druhy mikroorganismů					
	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> M fáze	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R fáze	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Kmeny	Přítomnost inhibice růstu mikroorganismů					
<b>BCCO0524</b>	+	+	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	-
<b>BCCO0670</b>	Mikroorg. nenarostl	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	+
<b>BCCO0747</b>	Mikroorg. nenarostl	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	-
<b>BCCO1092</b>	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	+
<b>BCCO1093</b>	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	+
<b>BCCO1094</b>	Mikroorg. nenarostl	+	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	+
<b>BCCO1095</b>	Mikroorg. nenarostl	+	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	-
<b>BCCO1097</b>	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	+
<b>BCCO1099</b>	+	+	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	+
<b>BCCO1104</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	+
<b>BCCO1105</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1106</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1331</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO1341</b>	+	+	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	+
<b>BCCO2179</b>	+	+	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	+
<b>BCCO2196</b>	+	+	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO2259</b>	-	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO2282</b>	-	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	-	-
<b>BCCO2295</b>	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	Mikroorg. nenarostl	+	+
<b>BCCO2389</b>	+	Mikroorg. nenarostl	-	+	-	+

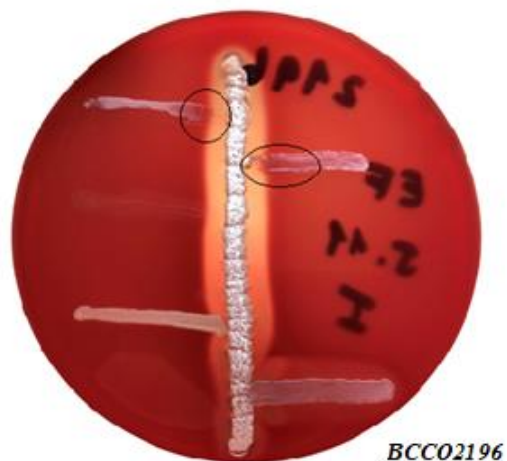
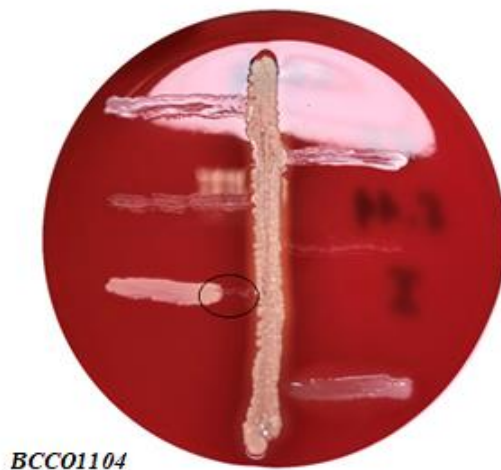
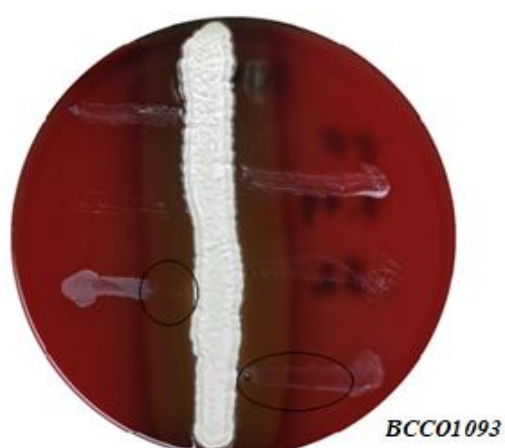
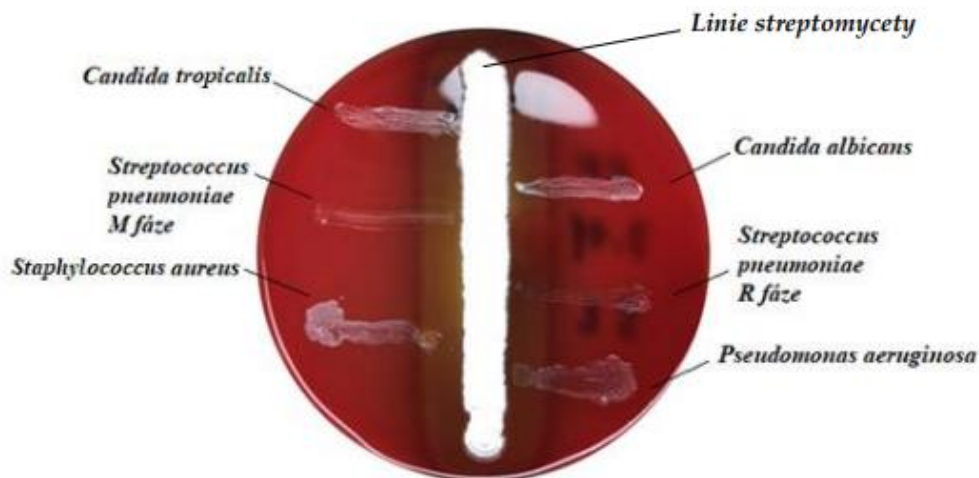


*Tabulka 5: Změřené hodnoty hemolytických zón při ko-kultivaci s 6 mikroorganismy v exponenciální a stacionární fázi, změřené hodnoty inhibičních zón při inhibici růstu Candida albicans ve stacionární fázi a pozorování přítomnosti sporulace (porovnání s výsledky sporulace z Tabulka 2).*

Kmen	Velikost hemolytické zóny (mm)		Velikost inhibiční zóny (mm)	Přítomnost sporulace bez ko-kultivace	Přítomnost sporulace při ko-kultivaci
	V exponenciální fázi	Ve stacionární fázi			
<b>BCCO0524</b>	2	5	5	+	+
<b>BCCO0670</b>	2	15	0	+	+
<b>BCCO0747</b>	1	15	0	+	+
<b>BCCO1092</b>	1	16	0	+	+
<b>BCCO1093</b>	1	15	0	+	+
<b>BCCO1094</b>	2	15	3	+	+
<b>BCCO1095</b>	2	12	10	+	+
<b>BCCO1097</b>	3	11	0	+	+
<b>BCCO1099</b>	4	9	10	+	+
<b>BCCO1104</b>	2	12	0	-	+
<b>BCCO1105</b>	Kmen nenarostl	1	0	-	+
<b>BCCO1106</b>	0	1	0	+	+
<b>BCCO1331</b>	0	0	0	-	-
<b>BCCO1341</b>	3	10	20	-	-
<b>BCCO2179</b>	4	6	6	+	+
<b>BCCO2196</b>	1	6	5	+	+
<b>BCCO2259</b>	Kmen nenarostl	4	0	-	+
<b>BCCO2282</b>	0	2	0	-	-
<b>BCCO2295</b>	0	11	0	-	-
<b>BCCO2309</b>	Kmen nenarostl	4	3	-	-
<b>BCCO2325</b>	Kmen nenarostl	10	7	-	+
<b>BCCO2389</b>	1	17	0	+	-



Schéma a popis obrázku



**Obrázek 7:** Ukázka inhibice růstu mikroorganismů streptomycetami po 72 hod ko-kultivace na KA (ve stacionární fázi růstu streptomycety).

Kmen BCC00524 inhibuje růst *Candida albicans*, kmen BCC01093 inhibuje růst *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aureginosa*

Kmen BCC01104 inhibuje růst *Staphylococcus aureus*, kmen BCC02196 inhibuje růst *Candida tropicalis* a *Candida albicans*.

### 5.3 Pozorování změn hemolytické a inhibiční aktivity po přidání GBL

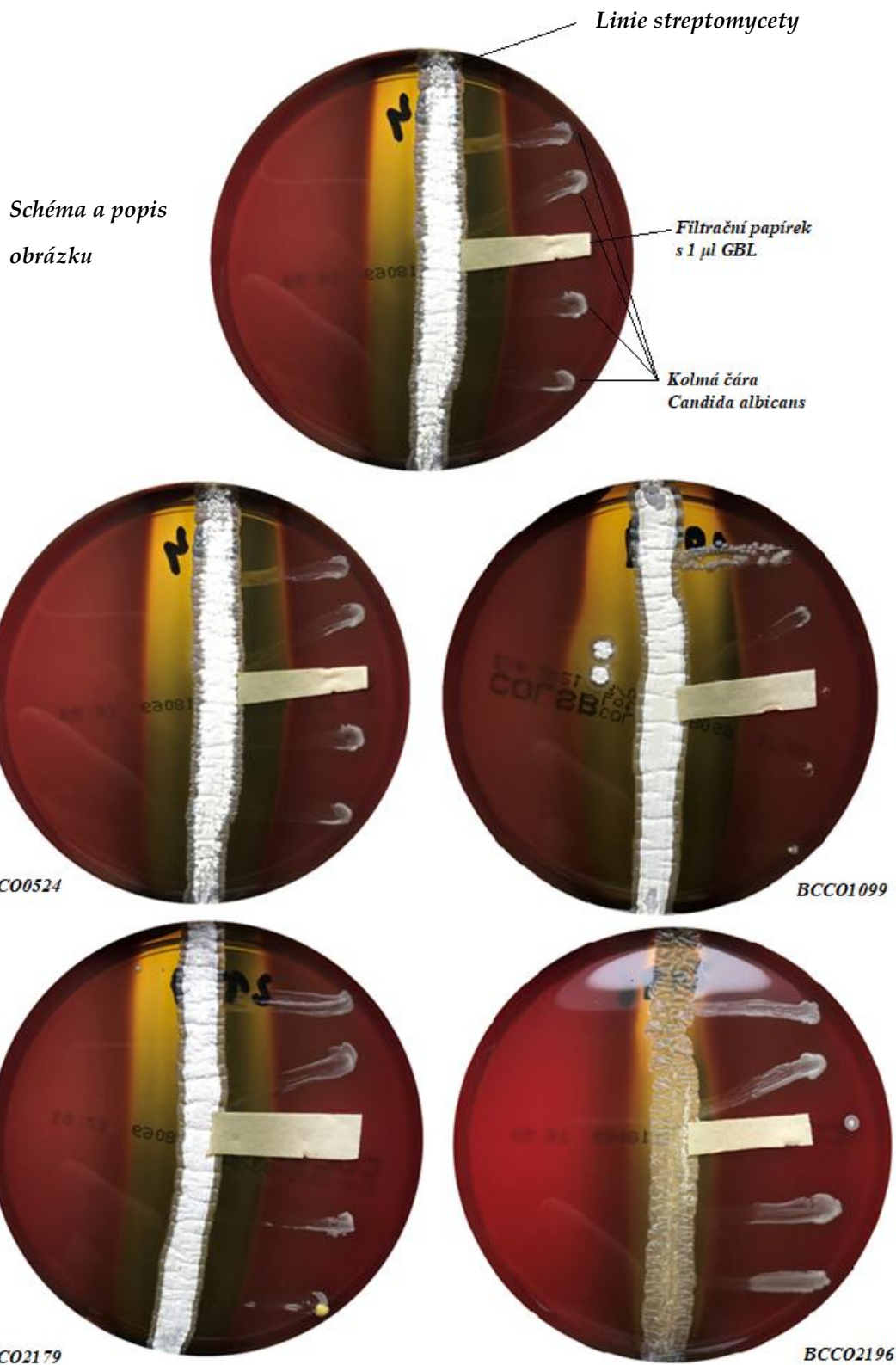
Aplikací GBL (viz kapitola 4.5) při ko-kultivaci s *Candida albicans* na KA pozorují změny hemolytické a inhibiční aktivity. Změřené hodnoty hemolytických a inhibičních zón (viz **Tabulka 5**) porovnávám s výsledky z **Tabulka 6**. V přítomnosti GBL došlo v 10 případech ke zvětšení nebo objevení hemolytických zón a v 10 případech k jejich zmenšení nebo vymizení (viz **Tabulka 6**). V přítomnosti GBL došlo v 14 případech ke zvětšení nebo objevení inhibičních zón a jen ve 2 případech ke zmenšení nebo vymizení (kmen BCCO1341 a BCCO2325)(viz **Tabulka 6**). Aplikace GBL při ko-kultivaci na KA/GYM médiu je znázorněna na **Obrázek 8** a **9**. Stejný pokus jsem provedla i pro NAG viz **Tabulka 7**.

**Tabulka 6:** Porovnání velikostí hemolytických a inhibičních zón při ko-kultivaci s *Candida albicans* na KA po 72 hod (48 samostatné kultivace s následnou 24 hod ko-kultivací) s a bez přítomnosti GBL.

Kmen	Velikost hemolytických zón (mm)			Velikost inhibičních zón (mm)		
	Bez GBL	S GBL	Porovnání velikostí hemolytických zón	Bez GBL	S GBL	Porovnání velikostí inhibičních zón
BCCO0524	5	14	Zvětšení 3x	5	25	Zvětšení 5x
BCCO0670	15	11	Zmenšení	0	4	Objevení
BCCO0747	15	16	Zvětšení	0	10	Objevení
BCCO1092	16	3	Zmenšení	0	0	Rovnají se
BCCO1093	15	9	Zmenšení	0	1	Objevení
BCCO1094	15	11	Zmenšení	3	13	Zvětšení 4x
BCCO1095	12	12	Rovnají se	10	15	Zvětšení 1,5x
BCCO1097	11	16	Zvětšení 1,5x	0	12	Objevení
BCCO1099	9	14	Zvětšení 1,5x	10	10	Rovnají se
BCCO1104	12	10	Zmenšení	0	9	Objevení
BCCO1105	1	8	Zvětšení 8x	0	0	Rovnají se
BCCO1106	1	7	Zvětšení 7x	0	8	Objevení
BCCO1331	0	5	Objevení	0	6	Objevení
BCCO1341	10	0	Vymizení	20	0	Vymizení
BCCO2179	6	14	Zvětšení 2x	6	16	Zvětšení 2,5x
BCCO2196	6	5	Zmenšení	5	16	Zvětšení 3x
BCCO2259	4	5	Rovnají se	0	0	Rovnají se
BCCO2282	2	6	Zvětšení 3x	0	5	Objevení
BCCO2295	11	5	Zmenšení	0	7	Objevení
BCCO2309	4	6	Zvětšení 1,5x	3	3	Rovnají se
BCCO2325	10	4	Zmenšení	7	3	Zmenšení
BCCO2389	17	11	Zmenšení	0	10	Objevení

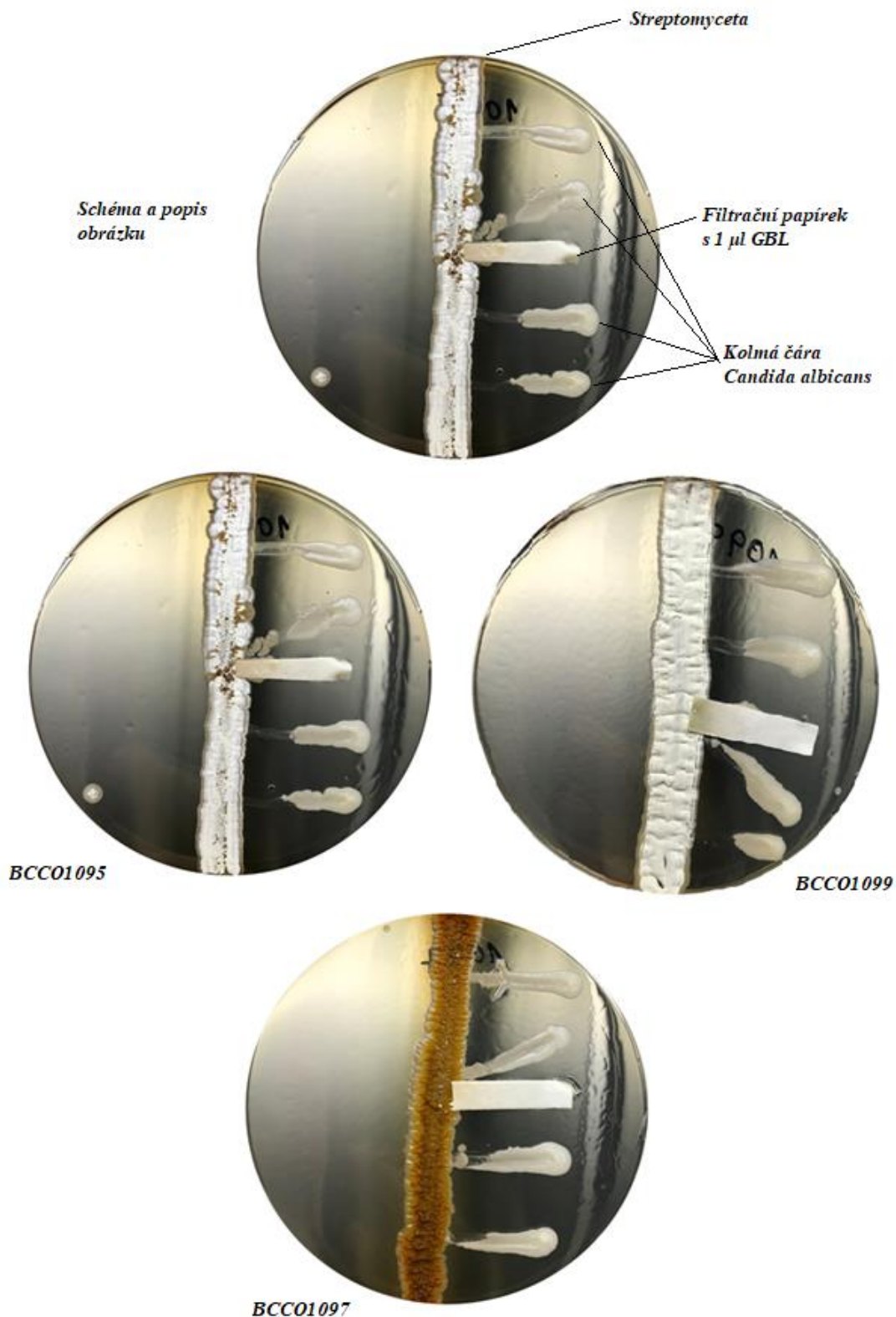
**Tabulka 7:** Porovnání velikostí hemolytických a inhibičních zón při ko-kultivaci s *Candida albicans* na KA po 72 hod (48 samostatné kultivace s následnou 24 hod ko-kultivací) s a bez přítomnosti NAG u některých kmenů streptomycet.

Kmen	Velikost hemolytických zón (mm)			Velikost inhibičních zón (mm)		
	Bez NAG	S NAG	Porovnání velikostí hemolytických s/bez NAG	Bez NAG	S NAG	Porovnání velikostí inhibičních zón s/bez NAG
BCCO0524	2	5	Zvětšení 2,5x	5	10	Zvětšení 2x
BCCO0670	5	5	Rovnají se	0	Kontaminace	Kontaminace
BCCO0747	8	11	Zvětšení 1,5x	0	3	Objevení
BCCO1092	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	0	Neměřeno	Neměřeno
BCCO1093	1	3	Zvětšení 3x	0	1	Objevení
BCCO1094	5	5	Rovnají se	3	7	Zvětšení 2x
BCCO1095	4	6	Zvětšení 1,5x	10	3	Zmenšení 3x
BCCO1097	5	10	Zvětšení 2x	0	9	Objevení
BCCO1099	3	9	Zvětšení 3x	10	6	Zmenšení 1,5x
BCCO1104	5	10	Zvětšení 2x	0	2	Zvětšení 2x
BCCO1105	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	0	Neměřeno	Neměřeno
BCCO1106	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	0	Neměřeno	Neměřeno
BCCO1331	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	0	Neměřeno	Neměřeno
BCCO1341	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	20	Neměřeno	Neměřeno
BCCO2179	2	6	Zvětšení 3x	6	14	Zvětšení 3x
BCCO2196	1	2	Zvětšení 2x	5	3	Zmenšení 1,5x
BCCO2259	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	0	Neměřeno	Neměřeno
BCCO2282	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	0	Neměřeno	Neměřeno
BCCO2295	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	0	Neměřeno	Neměřeno
BCCO2309	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	3	Neměřeno	Neměřeno
BCCO2325	Neměřeno	Neměřeno	Neměřeno	7	Neměřeno	Neměřeno
BCCO2389	6	8	Zvětšení 1,5x	0	1	Objevení



**Obrázek 8:** Ukázka inhibice *Candida albicans* (horizontálně) při kultivaci na KA (48 samostatné kultivace s následnou 24 hod ko-kultivací) v přítomnosti GBL u kmenů BCCO0524, BCCO1099, BCCO2179 a BCCO2196 (vertikálně).





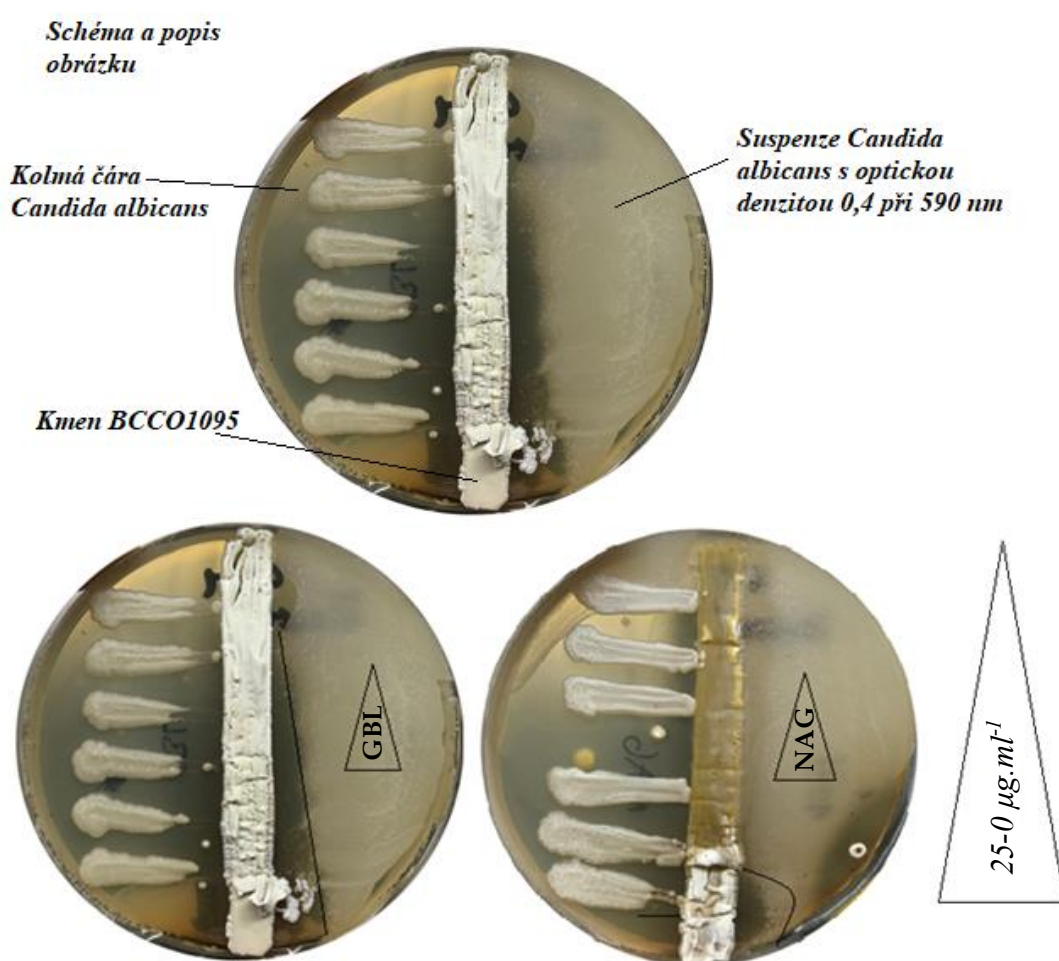
**Obrázek 9:** Ukázka inhibice *Candida albicans* (horizontálně) při kultivaci na GYM médiu po 72 hodinách (48 samostatné kultivace s následnou 24 hod ko-kultivací) v přítomnosti GBL u kmenů streptomycet (vertikálně)

BCCO1095 – BCCO1099 – BCCO1097 (kmenů BCCO2309 a BCCO2389 kultivovaných za stejných podmínek k inhibici nedošlo).

**Velikost inhibičních zón;** BCCO1095 8 mm, BCCO1099 4 mm, BCCO1097 2 mm.

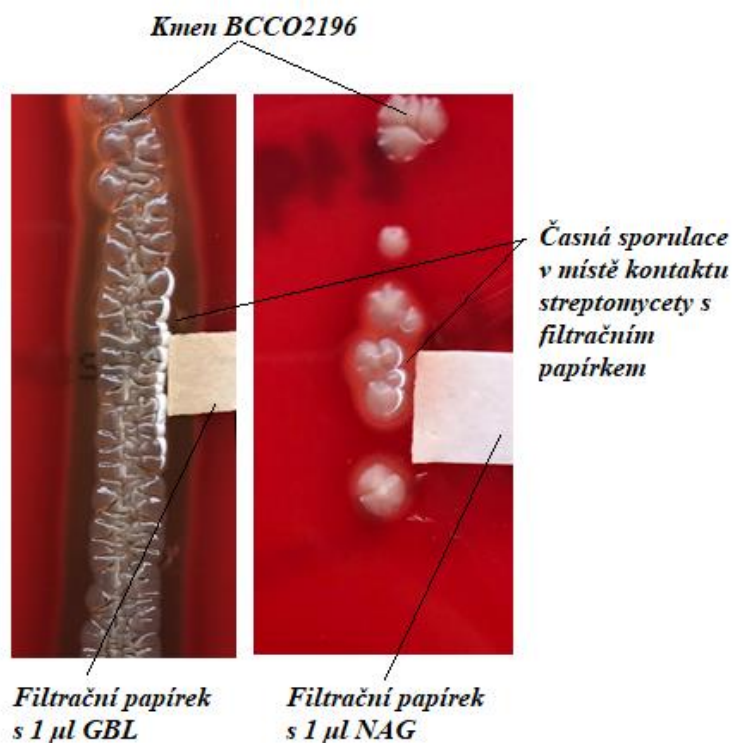
## Kultivace na agarech s koncentračním gradientem indukční látky

Pro ověření vlivu GBL na inhibici *Candida albicans* jsem kmene BCCO1095, BCCO1097, BCCO2389 ko-kultivovala na agarech s koncentračním gradientem GBL/NAG (viz kapitola 4.2). Změna intenzity inhibice v závislosti na koncentraci gradientu GBL a NAG byla dobře pozorovatelná u kmene BCCO1095 viz **Obrázek 10**. Z **Obrázek 10** v přítomnosti GBL (i NAG) je také vidět vliv gradientu na sporulaci. Podobný účinek na sporulaci byl pozorován i při kultivaci kmene BCCO2196 na KA v přítomnosti GBL (i NAG) (postup viz kapitola 4.5) viz **Obrázek 11**.



**Obrázek 10:** Ukázka vlivu GBL a NAG na inhibiční schopnost kmene BCCO1095 a jeho sporulaci při kultivaci v gradientu GBL/NAG na GYM médiu po 48 hod samostatné kultivace BCCO1095 a následným přidáním *Candida albicans* (48 hod ko-kultivace).

Koncentrace gradientu GBL/NAG (v rozmezí 0-25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) odpovídá kýlu na obrázku.

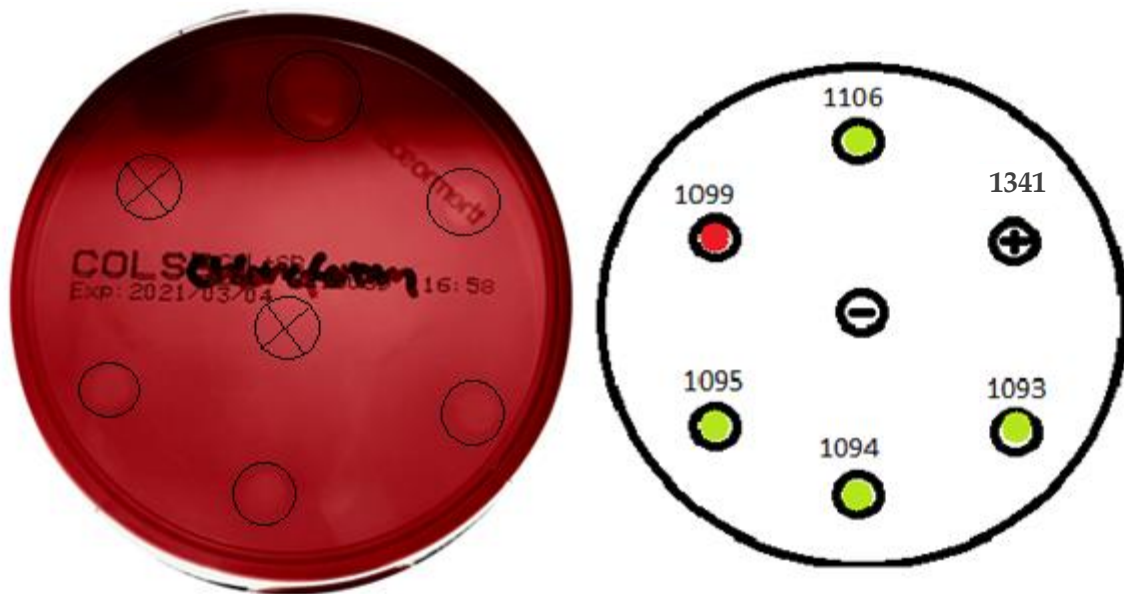


**Obrázek 11:** Ukázka účinku GBL a NAG na časnou sporulaci kmene BCCO2196, kultivace na KA po 48 hod

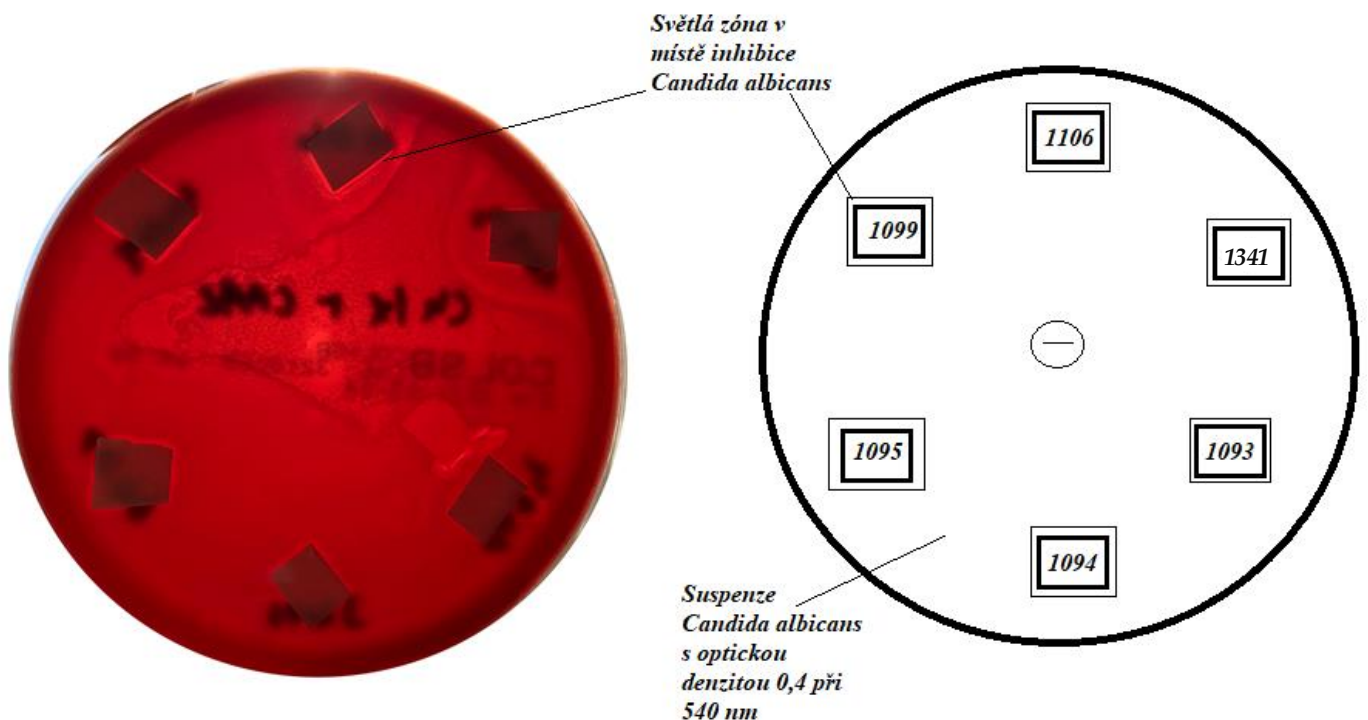
*Levý obrázek - na filtračním papírku byl přidán 1  $\mu$ l GBL  
Pravý obrázek - na filtračním papírku byl přidán 1  $\mu$ l NAG*

#### 5.4 Otestování hemolytické aktivity extrahovaných metabolitů

Pomocí ethyl-acetátové precipitace jsem u kmenů BCCO1093, BCCO1094, BCCO1095, BCCO1099 a BCCO1106 testovala, zda jsou extrahované metabolity opravdu zodpovědně za hemolytickou a inhibiční aktivitu (postup viz kapitola 4.6). Z **Obrázek 12** a **13** je vidět, že hemolytická a inhibiční aktivita může být důsledkem přítomných sekundárních metabolitů.



**Obrázek 12:** Ethyl-acetátová precipitace metabolitů a jejich hemolytická aktivita na KA (postup viz kapitola 4.6)  
 Kmen BCCOI099 ne-hemolyzoval, ostatní kmeny (BCCOI106, BCCOI095, BCCOI094, BCCOI093) již ano  
 Kmen 1341 sloužil jako pozitivní kontrola, negativní kontrola uprostřed misky byl čistý chloroform.



**Obrázek 13:** Ethyl-acetátová precipitace metabolitů a jejich inhibiční aktivita proti *Candida albicans* na KA (postup viz kapitola 4.6)  
 U všech extraktů je kolem filtračních papírků napuštěných izolovanými metabolity vidět slabá inhibiční zóna  
 Kmen BCCOI1341 sloužil jako pozitivní kontrola, negativní kontrola uprostřed misky byl čistý chloroform.



## 5.5 Extrakce metabolitů pomocí SPE a analýza pomocí LC-MS

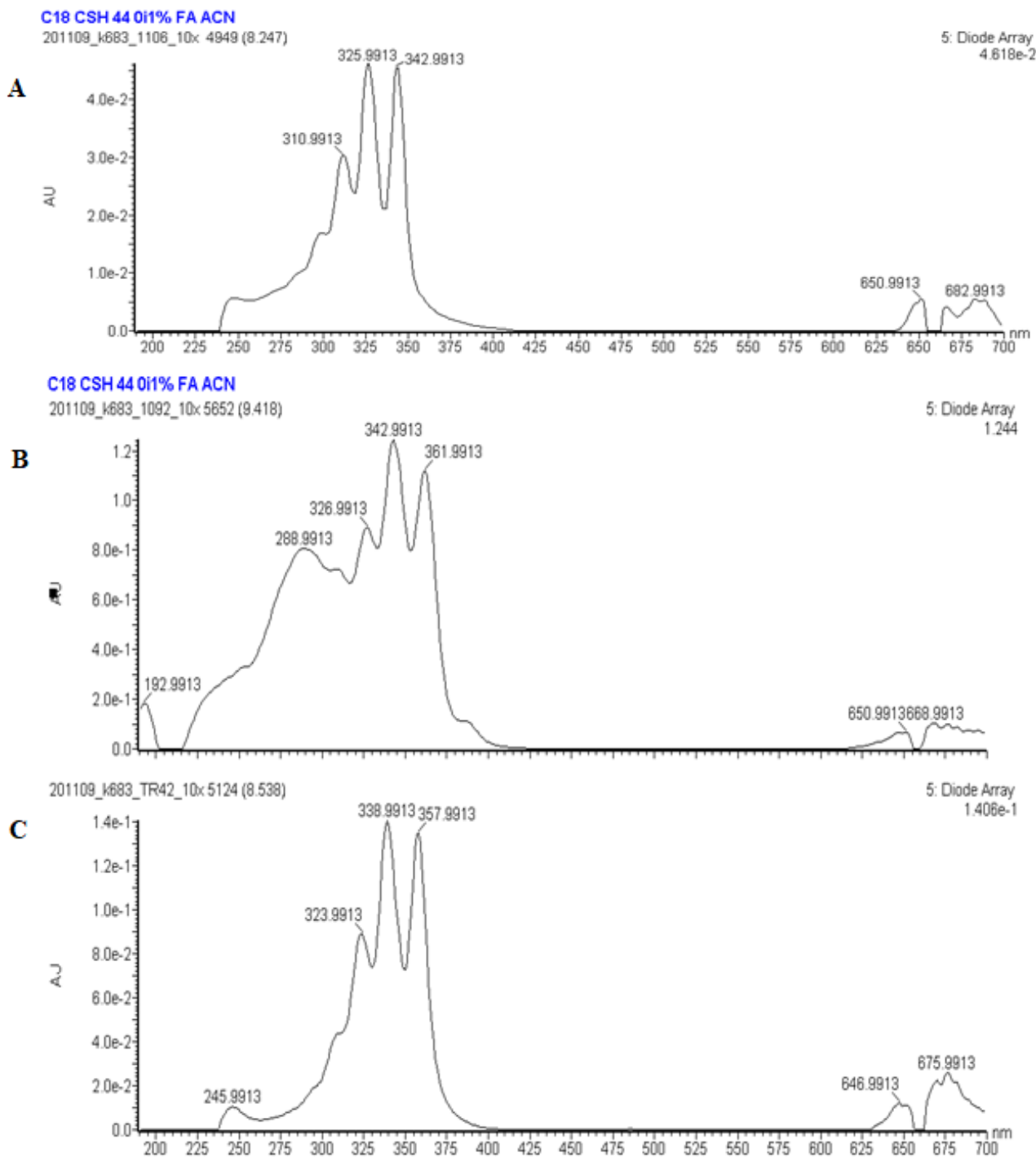
SPE metoda a LC-MS analýza sloužili k detekci a identifikaci metabolitů streptomycet (postup viz kapitola 4.7 a 4.8). Výsledky nalezených látek jsou uvedeny v **Tabulce 8**. Nově nalezené metabolity jsem se snažila identifikovat a popsat (Polyen A, polyen B). K tomu jsem využila schopnost metabolitů absorbovat světlo v UV/VIS oblasti s analýzou jejich absorpčních maxim a přesné měření  $m/z$  pomocí vysokorozlišujícího hmotnostního spektrometru. Kromě  $m/z$  byl k určení elementárního složení použit poměr detekovaných izotopických píků.

Naměřené hodnoty **Polyenu A** u kmene BCCO1106 jsou;  $t_R = 8.23$  min, UV/VIS vlnová délka absorpčních maxim: 311 nm, 326 nm, 343 nm viz **Obrázek 14**. Hmotnostní spektrum polyenu A v čase 8,23 min bylo neurčité a jeho strukturní vzorec jsem nebyla schopna určit. Naměřené hodnoty **Polyenu B** jsou (pro kmeny BCCO1092, BCCO1093, BCCO1094, BCCO1095, BCCO1097, BCCO1104, BCCO2179, BCCO2282, BCCO2325, a BCCO2389);  $t_R = 9.42$  min,  $m/z$  745.4166, UV/VIS vlnové délky absorpčních maxim: (289 nm), 327 nm, 343 nm, 362 nm viz **Obrázek 14, 15 a 16**.

U čtyř kmenů (BCCO1331, BCCO2259, BCCO2295 a BCCO2309) jsem nedetekovala žádné metabolity, přesto tyto kmeny mají hemolytickou a inhibiční schopnost (viz **Tabulka 5 a 6**). Kmeny jsem podle absence metabolitů nazvala jako tzv. „NIC“.

**Tabulka 8:** Detekované metabolity sbírky kmenů pomocí LC-MS po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu (postup izolace a LCMS viz kapitola 4.7 a 4.8)

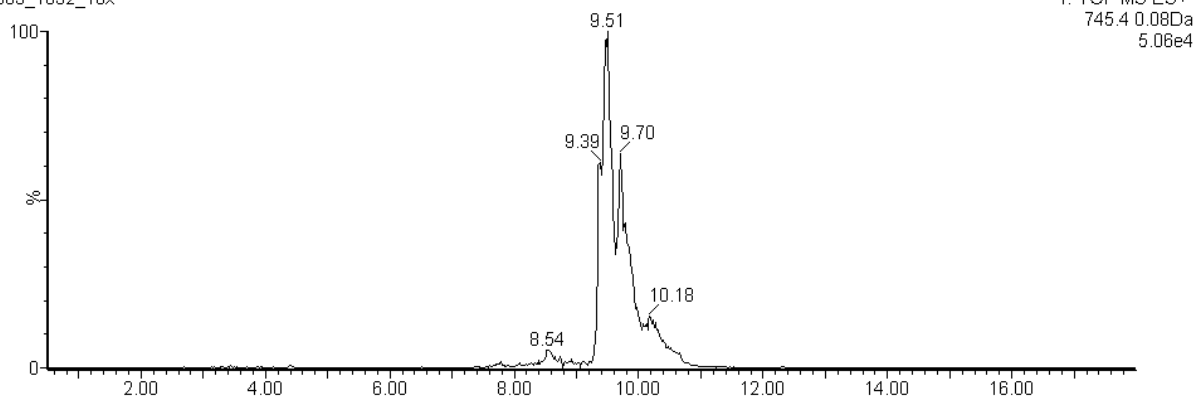
<b>Kmen</b>	<b>Detekované metabolity</b>
<b>BCCO0524</b>	Candicidin A, A1,A3, Candicidin D, D1, V, a VI a Ascospin A1-A3
<b>BCCO0670</b>	Neidentifikovaná látka, tR = 13,6 min, $\lambda$ = 399 nm
<b>BCCO0747</b>	Neidentifikovaná látka, tR = 6,7 min, $\lambda$ = 245, 305, 358 nm
<b>BCCO1092</b>	Polyen B
<b>BCCO1093</b>	Polyen B
<b>BCCO1094</b>	Polyen B
<b>BCCO1095</b>	Polyen B
<b>BCCO1097</b>	Polyen B
<b>BCCO1099</b>	Candicidin A, A1, A3 surugamid A
<b>BCCO1104</b>	Polyen B
<b>BCCO1105</b>	N/A
<b>BCCO1106</b>	Polyen A
<b>BCCO1331</b>	Polyeny, ani jiné screenované látky (targety) nebyly detekovány
<b>BCCO1341</b>	Filipin
<b>BCCO2179</b>	Polyen B
<b>BCCO2196</b>	N/A
<b>BCCO2259</b>	Polyeny, ani jiné screenované látky (targety) nebyly detekovány
<b>BCCO2282</b>	Polyen B
<b>BCCO2295</b>	Polyeny, ani jiné screenované látky (targety) nebyly detekovány
<b>BCCO2309</b>	Polyeny, ani jiné screenované látky (targety) nebyly detekovány
<b>BCCO2325</b>	Polyen B
<b>BCCO2389</b>	Polyen B



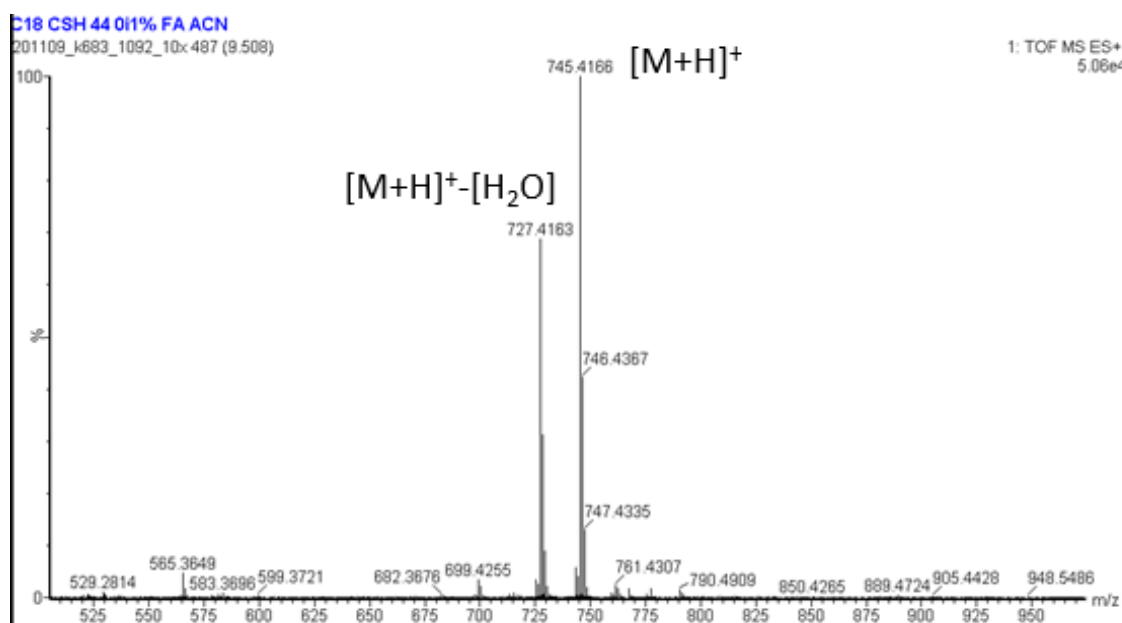
**Obrázek 14:** UV/VIS absorpční spektra; (A) polyenu A (BCCO1116 v  $t_R = 8,23$  min s absorpčními maximy; 311 nm, 326 nm, 343 nm, (B) polyenu B (BCCO1092) v  $t_R = 9,42$  min s absorpčními maximy; (289 nm), 327 nm, 343 nm, 362 nm, (C) kontrola TR1431, její absorpční maxima odpovídají údajům od výrobce pro filipin III ( $\lambda_{max}$ ; 323, 339, 357 nm) (<https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/data/datasheet/CAY/70440.pdf>)

C18 CSH 44 0i1% FA ACN

201109\_k683\_1092\_10x



**Obrázek 15:** LC-MS analýza polyenu B po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. MS chromatogram zaznamenaný pro ion 745,4166.



**Obrázek 16:** Hmotnostní spektrum látky s  $t_R = 9.42$  min z LC-MS analýzy polyenu B po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. Ve spektru je patrný ion o  $m/z = 745,4166$ , který odpovídá pseudomolekulovému  $[M+H]^+$  iontu (po ztrátě hydroxylové skupiny 727,4163). Na základě poměru izotopických piků a chyby měření ( $<10$  ppm) jsme navrhli sumární vzorce polyenu B (viz **Obrázek 17**).

### Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

1422 formula(e) evaluated with 17 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

Elements Used:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT (Norm)	C	H	N	O
745.4166	745.4163	0.3	0.4	11.5	C41 H61 O12	87.0	2.6	41	61		12
	745.4176	-1.0	-1.3	16.5	C42 H57 N4 O8	88.6	4.2	42	57	4	8
	745.4155	1.1	1.5	-0.5	C25 H61 N8 O17	91.5	7.1	25	61	8	17
	745.4182	-1.6	-2.1	-1.5	C29 H65 N2 O19	90.1	5.7	29	65	2	19
	745.4150	1.6	2.1	17.5	C38 H53 N10 O6	87.7	3.4	38	53	10	6
	745.4190	-2.4	-3.2	21.5	C43 H53 N8 O4	89.7	5.3	43	53	8	4
	745.4195	-2.9	-3.9	3.5	C30 H61 N6 O15	89.3	5.0	30	61	6	15
	745.4136	3.0	4.0	12.5	C37 H57 N6 O10	86.2	1.9	37	57	6	10
	745.4208	-4.2	-5.6	8.5	C31 H57 N10 O11	88.7	4.3	31	57	10	11
	745.4123	4.3	5.8	7.5	C36 H61 N2 O14	85.2	0.9	36	61	2	14
	745.4118	4.8	6.4	25.5	C49 H53 N4 O3	91.5	7.1	49	53	4	3
	745.4217	-5.1	-6.8	20.5	C47 H57 N2 O6	90.5	6.2	47	57	2	6
	745.4222	-5.6	-7.5	2.5	C34 H65 O17	86.9	2.6	34	65		17
	745.4104	6.2	8.3	20.5	C48 H57 O7	90.9	6.5	48	57		7
	745.4230	-6.4	-8.6	25.5	C48 H53 N6 O2	91.2	6.8	48	53	6	2
	745.4235	-6.9	-9.3	7.5	C35 H61 N4 O13	86.0	1.7	35	61	4	13
	745.4096	7.0	9.4	8.5	C32 H57 N8 O12	88.3	4.0	32	57	8	12

*Obrázek 17: Návrhy sumárního vzorce polyenu B s m/z 745.4166.*

## 5.6 Test na přítomnost extracelulárních hemolytických proteinů v médiu

Po neúspěšné detekci metabolitů pomocí LC-MS jsem supernatanty z tekuté kultivace „NIC“ kmenů podrobila testu na přítomnost extracelulárních hemolytických proteinů viz **Obrázek 18** (postup viz kapitola 4.9). U negativní kontroly (inkubace vzorků při 100 °C, 10 min) došlo ke ztrátě hemolytické aktivity. U vzorků testovaných proteinázou K byla hemolytická aktivita zachována stejně jako u pozitivních kontrolních vzorků bez proteinázy K. Experiment nevyloučil můj původní předpoklad, že hemolytickou aktivitu způsobují polyenové sekundární metabolity. Hemolytická aktivita pravděpodobně není způsobována extracelulárními proteiny.



**Obrázek 18:** Zachování hemolytické aktivity u „NIC“ kmenů  
 Horní obrázek – kmeny inkubované s proteinázou K, viditelné hemolytické zóny po 48 hodinách, při 28 °C  
 Levý dolní obrázek – pozitivní kontrola, viditelné hemolytické zóny po 48 hodinách, při 28 °C  
 Pravý dolní obrázek – negativní kontrola, nepřítomnost hemolytických zón již po 24 hodinách, při 28 °C

## 5.7 Ko-kultivace v párech s opakovanou LC-MS analýzou

Kultivování „NIC“ kmenů v párech mezi sebou (postup viz kapitola 4.4) sloužilo k iniciaci tvorby sekundárních metabolitů, které se snažím detekovat. Po 72 hod kultivaci v tekutém GYM médiu jsem metabolity separovala pomocí SPE a analyzovala použitím LC-MS (viz kapitola 4.7 a 4.8). Tímto postupem jsem byla schopná u párů BCCO2309 a BCCO1331, BCCO2259 a BCCO2295 detekovat a analyzovat přítomné látky.

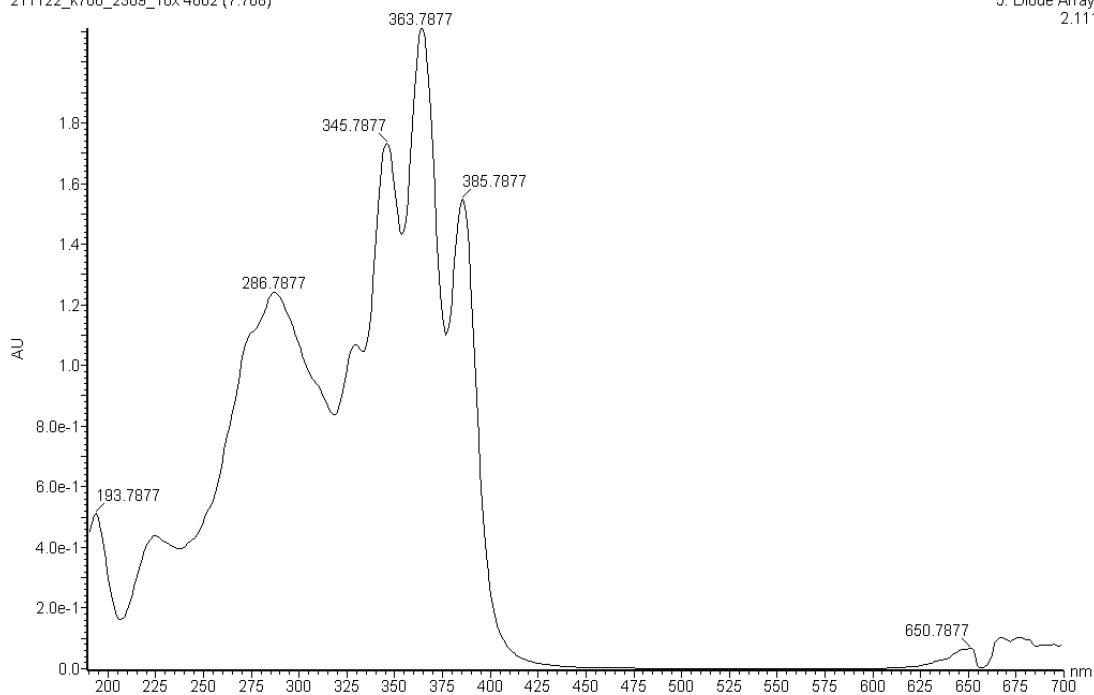
V párové ko-kultivaci mezi kmeny BCCO2309 a BCCO131 jsem detekovala neznámý polyen, který se podobal polyenu B viz **Obrázek 19** (UV-VIS absorpční maxima polyenu B jsou 327, 343 a 362 nm, absorpční maxima nového polyenu jsou 346, 364 a 386 nm). Tuto substanci jsem nazvala jako **Polyen C**. Přesným měřením  $m/z$  pomocí vysokorozlišujícího hmotnostního spektrometru jsem určila teoretickou molekulovou hmotnost Polyenu C ( $M_w = 742$ , identifikací pseudomolekulového iontu  $[M+H]^+ = 743.4131$ ) viz **Obrázek 20** a **21**.

U ko-kultivovaného páru kmenů BCCO2259 a BCCO2295 jsem nenašla žádný polyen, ale antifungální účinky těchto kmenů by mohlo způsobovat nepolyenové antibiotikum actiphneol, jehož spektrum se při analýze našlo (viz **Obrázek 22, 23** a **24**).

U ko-kultivovaných párů; (I) BCCO2259 a BCCO2309, (II) BCCO2259 a BCCO1331, (III) BCCO2295 a BCCO2309 a (IV) BCCO2295 a BCCO1331, jsem nedetekovala žádnou substanci.

C18 CSH PREMIER 83 0i1% FA ACN  
211122\_k706\_2309\_10x 4662 (7.768)

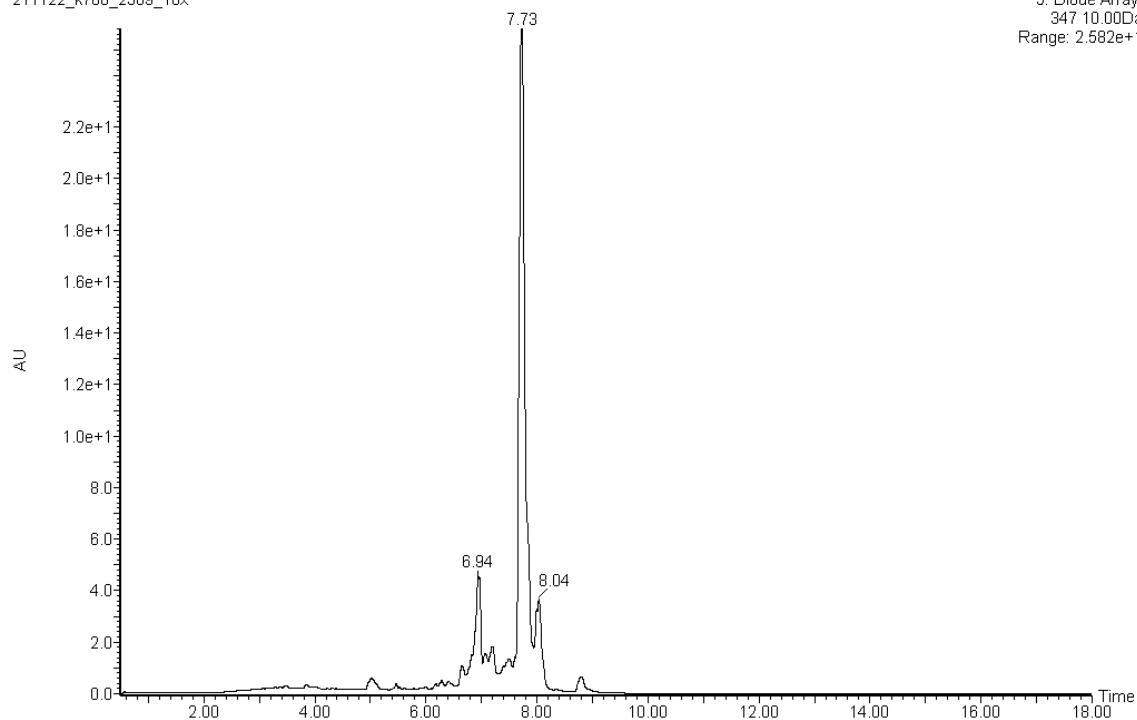
5: Diode Array  
2.111



**Obrázek 19:** UV/VIS absorpční spektrum polyenu C v  $t_R = 7,73$  min s absorpčními maximy; 346 nm, 364 nm a 386 nm

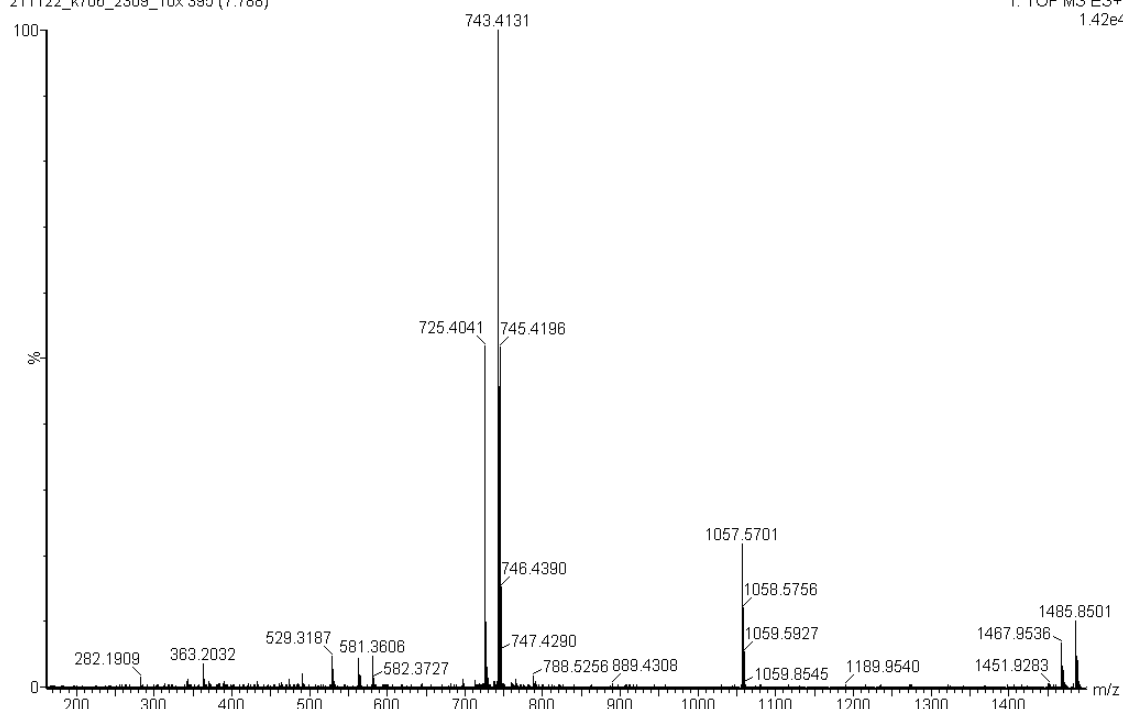
C18 CSH PREMIER 83 0i1% FA ACN  
211122\_k706\_2309\_10x

5: Diode Array  
347 10.00Da  
Range: 2.582e+1

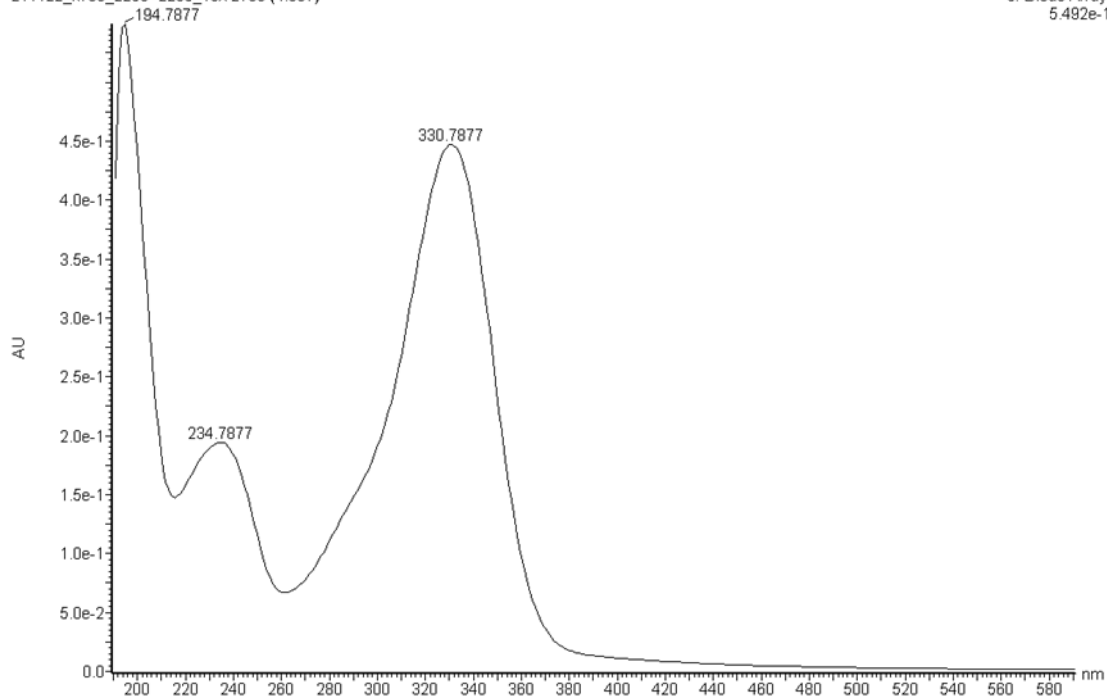


**Obrázek 20:** LC-MS analýza polyenu C z ko-kultivovaných kmenů BCCO2259 a BCCO2295 po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. MS chromatogram zaznamenaný pro ion 743.4131.

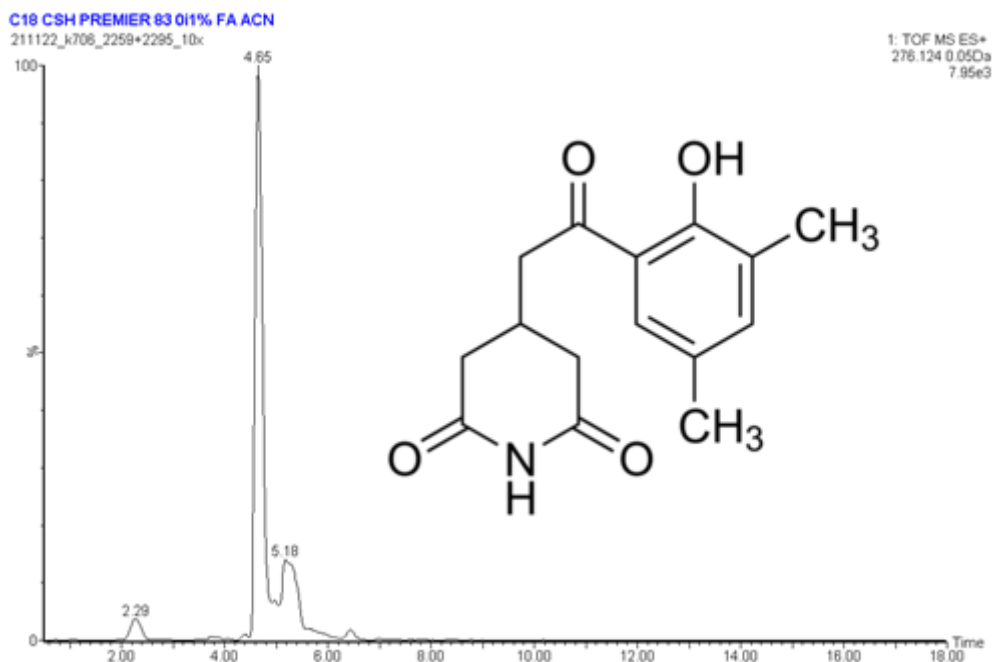




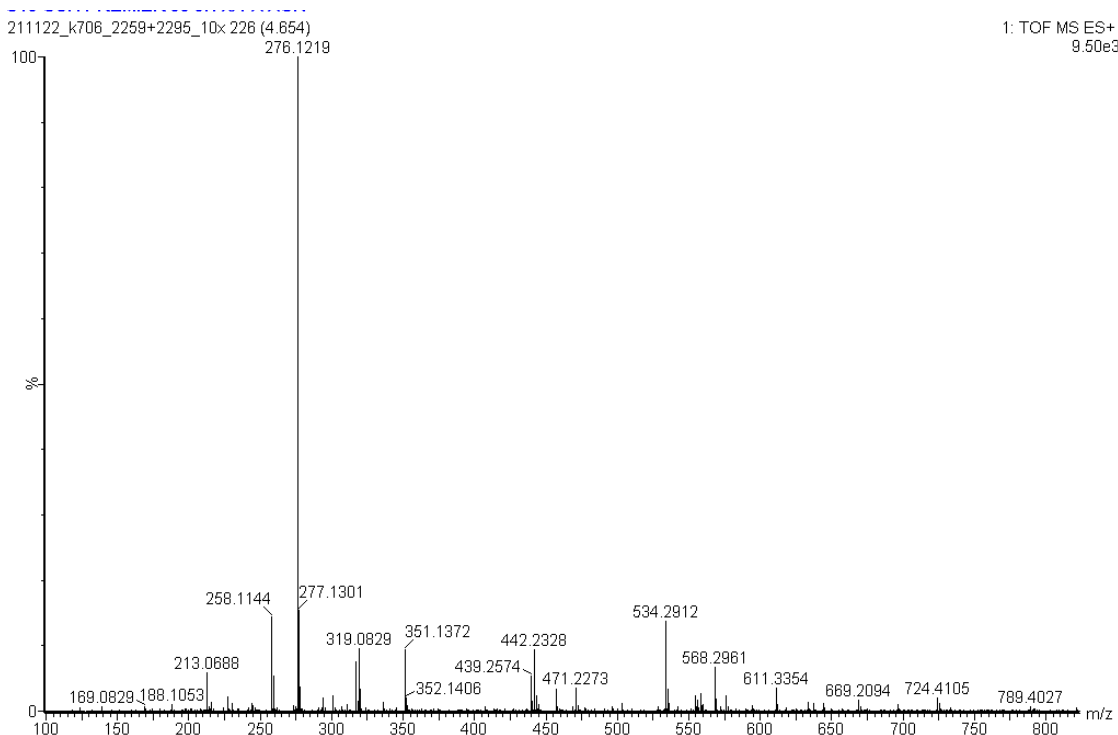
**Obrázek 21:** Hmotnostní spektrum látky s  $t_R = 7,73$  min z LC-MS analýzy extraktu sekundárních metabolitů ko-kultivovaných kmenů BCCO2309 a BCCO1331 po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. Ve spektru je patrný ion o  $m/z = 743,4131$ , který odpovídá pseudomolekulovému  $[M+H]^+$  (po ztrátě hydroxylové skupiny 725,4041) a byl nazván jako polyen C.



**Obrázek 22:** UV/VIS absorpční spektrum actiphenolu v  $t_R = 4,637$  min s absorpčním maximem 330,7877 nm



**Obrázek 23:** LC-MS analýza actiphenolu z ko-kultivovaných kmenů BCCO2259 a BCCO2295 po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. MS chromatogram zaznamenaný pro ion 276,1219.



**Obrázek 24:** Hmotnostní spektrum látky s  $t_R = 4,65$  min z LC-MS analýzy extraktu sekundárních metabolitů ko-kultivovaných kmenů BCCO2259 a BCCO2295 po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. Ve spektru je patrný ion o  $m/z = 276,1219$ , který odpovídá pseudomolekulovému  $[M+H]^+$  iontu actiphenolu (po ztrátě  $H_2O$ /po ztrátě hydroxylové skupiny 258,1144) s teoretickou hodnotou  $[M+H]^+$  iontu  $m/z = 276,1158$ . Na základě poměru izotopických piků a chyby měření  $<10$  ppm lze konstatovat, že detekovaná látka má molekulový vzorec  $C_{15}H_{17}NO_4$ , což odpovídá actiphenolu.

## 6 DISKUZE

Ve své práci se věnuji zmapování produkce cytolytických metabolitů u streptomycet. Sekundárnímu metabolismus streptomycet bylo věnováno hodně pozornosti, neboť jeho produkty mají velké klinické využití (např. amphotericin B, nystatin A1, pentamycin jsou důležitá antimykotika a antiprotozoika (Knopik-Skrocka, 2002)) (Zhang et al., 2020). Přestože hemolytická aktivita (v širším slova smyslu cytolytická aktivita, tj. schopnost lyzovat eukaryotní buňky) je součástí sekundárního metabolismu, její samostatné projevy nebyly moc zkoumány.

Z důvodu vysoké adaptability mikroorganismů čelíme problémům vznikající rezistence na aktuálně používané látky (de Lima Procópio & da Silva & Martins & de Azevedo, & de Araújo, 2012). Z tohoto důvodu je snaha o nalezení nových substancí (například s menší možností vzniku rezistence) klíčová.

### 6.1 Hemolytická a inhibiční aktivita u *Streptomyces spp.*

Hemolytická aktivita streptomycet má dva důležité významy – 1. usnadnění schopnosti kolonizovat hostitelský organismus nebo 2. přizpůsobení se samostatnému růstu např. v půdním ekosystému. Prvním je její role jako faktoru virulence a nástroje oportunní patogenity při průniku streptomycet do hostitelského organismu. Druhým je její role jako nástroje pro adaptaci a přežití ve vnějším konkurenčním prostředí. Novější studie podporují význam hemolýzy jako faktoru virulence (Krouza Bergman, 2020) i přesto, že klinický projev streptomycet je vzácný (Dunne & Burman, & Wilson, 1998). Například *Streptomyces coelicolor* je schopna  $\alpha$ -hemolýzy na KA (Thangamani et al., 2013). Gen kódující tuto schopnost (*SCO1782*) vykazuje sekvenční podobnost s hemolýziny *Mycobacterium tuberculosis* (62 %) spolu s cytolytickou aktivitou proti lidským fibroblastovým buňkám (Thangamani et al., 2013). Filipin produkovaný kmenem *Streptomyces sp.* TR1341, který byl izolovaný ze sputa pacienta s chronickým zánětlivým onemocněním plic, je odpovědný za  $\beta$ -hemolýzu kmene (Herbrík et al., 2020). Z tohoto důvodu lze předpokládat, že hemolýza je (podobně jako inhibice) součástí virulence potenciálně patogenních kmenů. Hemolytická aktivita pravděpodobně streptomycetám zajišťuje přísun živin (železa). Hemolýziny mají obecně cytolytický efekt (nelýzují tedy jen erythrocyty, ale i jiné eukaryotické buňky) (Vesper, & Jo Vesper, 2004), který vede k uvolnění hemového železa a dalších živin

z rozpadlých buněk a jejich utilizaci bakteriemi. Čím efektivnější mechanismy zisku živin organismus má k dispozici, tím lépe dokáže ve vysoce kompetitivním prostředí, jakým je půdní ekosystém (mikromycety) nebo tělo hostitelského organismu (bezobratlí), přežít, růst a množit se. Takto se může cytolytická aktivita (detekovatelná hemolýzou na KA) projevit jako faktor virulence při vstupu streptomycet do lidského těla. V průběhu zánětu tělo zahajuje mechanismy pro automatické snížení koncentrace železa, které se uvolňuje z rozpadlých erytrocytů a slouží jako zdroj živin pro patogeny. Zvyšuje syntézu feritinu a transferinu (bílkovinné přenašeče železa) za současného omezení asimilace železa z potravy a jeho vstřebání v tenkém střevě (Kalidasan & Joseph & Kumar & Hamat, & Neela, 2018).

Screening 102 lidských a 184 půdních kmenů streptomycet ukázal, že hemolytická aktivita není výlučně jen u kmenů žijících uvnitř těla hostitele, ale i u kmenů žijících v půdě ( $\beta$ -hemolýza; 56 % půdních kmenů, 77,5 % klinických izolátů) (Herbrík et al., 2020). Podobné výsledky poskytla i jiná studie ( $\beta$ -hemolýza; 51,5 % půdních kmenů, 75,5 % na člověka adaptovaných kmen) (Wurzer, 2019). Z tohoto screeningu vycházela i bakalářská práce Natalie Krouza Bergman, která měla k dispozici sbírku půdních  $\beta$ -hemolytických kmenů, z nichž některé jsou použity i v této práci; BCCO0524, BCCO0670 (Krouza Bergman, 2020). Bergman v izolátech  $\beta$ -hemolytických kmenů (BCCO0486, BCCO0519, BCCO0524, BCCO0670, BCCO1499, BCCO1747 a BCCO2155) detekovala filipin, streverten, ascocin a candicidin (polyenová antibiotika) a jejich hemolytickou aktivitu potvrdila pomocí ethyl-acetátové precipitace (postup viz kapitola 4.6). V mojí práci jsem pracovala s širší sbírkou  $\beta$ -hemolytických streptomycet, které byly izolovány nejen z čistě půdního prostředí (BCCO524, BCCO670, BCCO747, BCCO2259, BCCO2295, BCCO2309, BCCO2325 a BCCO2389), ale též z těl bezobratlých živočichů (BCCO1092, BCCO1093, BCCO1094, BCCO1095, BCCO1097, BCCO1099, BCCO1104, BCCO1105, BCCO1106, BCCO1331, BCCO2179 a BCCO2196), či z kořenového systému rostlin (BCCO2282). Výsledky mojí práce, obdobně jako výsledky v práci Bergman, by mohli potvrdit druhý význam hemolýzy jako nástroje pro adaptaci a přežití v konkurenčním prostředí. Vzhledem k tomu, že lidské kmeny streptomycet původně s nejvyšší pravděpodobností z půdy pocházely (převažovaly izoláty z plic horníků či zemědělců (Herbrík et al., 2020)), je důležité této hypotéze věnovat větší pozornost.

Inhibiční aktivitou mám na mysli produkci metabolitů (antimykotik, antibiotik atd.), které zastavují růst konkurenčního organismu (eukaryotního, ale i prokaryotního). Ve své práci zkoumám aktivitu inhibiční i hemolytickou, neboť se domnívám, že jsou spolu provázány a navzájem se doplňují. Polyenová antibiotika, jako je streverten A, filipinové sloučeniny nebo candididiny, mají antifungální a také hemolytické schopnosti (Kim et al., 2011), což naznačuje, že tyto dvě vlastnosti jdou ruku v ruce. Kmen *Streptomyces* TR1341 produkcí filipinu způsobuje hemolýzu a zároveň inhibuje tvorbu polysacharidového pouzdra *Streptococcus pneumoniae* (Herbrík et al., 2020).

Výběrem vhodného modelového eukaryotního organismu (*Candida albicans*) a jeho ko-kultivací na KA jsem mohla hemolytickou a inhibiční aktivitu vzájemně sledovat. Při ko-kultivaci v exponenciální fázi (24 hod) převládala neúplná  $\beta$ -hemolytická aktivita a k inhibici *Candida albicans* došlo jen u kmene BCCO0524 a BCCO1099 (viz **Tabulka 3** a fotografie v rámci přílohy na CD). Při ko-kultivaci ve stacionární fázi růstu (48 hod samostatná kultivace, celkově 72 hod ko-kultivace) byla u všech kmenů viditelná úplná  $\beta$ -hemolytická aktivita (viz fotografie v rámci přílohy na CD) a k inhibici *Candida albicans* došlo u 9 kmenů (viz **Tabulka 4** a **5**). Produkce antibiotik a antimykotik, které inhibují růst organismů, běžně nastupuje mezi přechodem z exponenciální fáze do stacionární, kdy je streptomyceta zranitelnější (dochází ke kanibalizaci vlastního substrátového mycelia z důvodu malnutrice (Chater & Biró & Lee & Palmer, & Schrempf, 2010)) a proto zahajuje obranné mechanismy proti konkurentům ve vnějším prostředí. Velikost inhibičních zón byla ve většině případů shodná s délkou zón hemolytických (viz **Tabulka 5**). Při ko-kultivaci kmenů (BCCO1095, BCCO1097, BCCO1099, BCCO2309 a BCCO2389) na GYM médiu (bez erytrocytů) docházelo k inhibici růstu mikroorganismu méně (u 3 případů z 5 viz **Obrázek 9**, inhibiční zóny byly u kmenů BCCO1095 a BCCO1099 kratší než na KA viz porovnání hodnot z **Tabulka 5** a **Obrázek 9**). Výsledky by mohly potvrzovat vzájemnou souvislost hemolytické a inhibiční aktivity, neboť je z nich patrné, že; (I) obě aktivity jsou v exponenciální fázi slabé a jejich úplný projev se dostaví až ve fázi stacionární (velikost hemolytických zón je nejdelší ve stacionární fázi, viz porovnání hodnot z **Tabulka 5**, k největšímu počtu inhibic růstu mikroorganismů dochází ve stacionární fázi), (II) velikost hemolytických a inhibičních zón (pro *Candida albicans*, ve stacionární fázi) je přibližně stejná, viz **Tabulka 5**. Zaznamenala jsem případ, kdy se úplná  $\beta$ -hemolytická aktivita v exponenciální fázi projevila, ale k inhibici *Candida*

*albicans* došlo až při ko-kultivaci ve stacionární fázi (kmen BCCO2179 viz **Tabulka 3 a 4** a fotografie v rámci přílohy na CD). Dřívější činnost hemolýzy by mohla potvrzovat její roli jako mechanismu k zajištění přísunu živin pro další vývoj a produkci bioaktivních (v tomto případě antimykotických) látek.

## **6.2 Vliv mezidruhových interakcí a vnějšího prostředí na metabolismus**

Je známo, že se streptomycety účastní mnoha mezidruhových interakcí symbiotického, nebo patogenního rázu. Kromě *Streptomyces somaliensis* a *Streptomyces sudanensis* (Seipke & Kaltenpoth, & Hutchings, 2012) nebyly streptomycety v humánní medicíně často uváděny jako příčina infekce (Dunne & Burman, & Wilson, 1998). Novější studie ovšem ukazují přítomnost streptomycet při lidských onemocněních plic, kde figurují jako primární patogeny (po vyloučení jiných patogenů kultivací byly izolovány v čisté kultuře vzorků tkáně (Dunne & Burman, & Wilson, 1998), nebo pomocí mezidruhové interakce zvyšují virulenci např. *Haemophilus influenzae* (Manteca et al., 2008). Interakce s organismy z různých taxonů stimuluje produkci příslušných metabolitů a vede k rozvoji biosyntetických drah sekundárního metabolismu (jako například dráhy syntézy polyenových antibiotik). Například aktinomycety, které žijí mutualisticky s hnědými řasami, produkují filipiny (Parrot et al., 2019), zatímco symbionti mravenců produkují candididiny (Haeder & Wirth & Herz, & Spiteller, 2009).

Pro testování morfologie a sekundárního metabolismu streptomycet jsem kmeny kultivovala na mediích s krví i bez krve. Výsledky ukázaly rozdíly v morfologii mezi jednotlivými streptomycetami, které produkovaly různé sekundární metabolity s  $\beta$ -hemolytickou aktivitou (hemolyziny). U kmenů, které pocházejí z rozdílného prostředí a vedou jiný způsob života (samostatný, nebo asociovaný s jinými organismy) došlo k rozdílným projevům sporulace a k rozdílné velikosti a intenzitě hemolytických zón viz **Obrázek 5**. Většina kmenů asociovaných se členovci BCCO1092, BCCO1093, BCCO1094, BCCO1095, BCCO1097, BCCO1099, BCCO1106, BCCO2179 a BCCO2196 (a půdní samostatně žijící kmen BCCO2389) tvořila úplnou  $\beta$ -hemolýzou a silnou sporulaci. Většina samostatně žijících půdních kmenů tvořila úplnou  $\beta$ -hemolýzu s menší mírou sporulace (BCCO0524, BCCO0670, BCCO0747 a BCCO2325), jejich

kolonie byly kruhovitě a dobře ohraničené. Kmen BCCO2282 asociovaný s kořenou *Zea mays* (kukuřice) se morfologicky podobal půdním kmenům se slabší  $\beta$ -hemolytickou aktivitou a bez sporulace viz **Obrázek 5**. Výsledky naznačují, že kmene tvořící mezidruhové interakce se členovci by mohly mít větší schopnost tvorby hemolytických metabolitů (nebo mohou mít jejich hemolyziny vyšší toxicitu) a větší míru sporulace.

Pro ověření vlivu mezidruhových interakcí na metabolismus streptomycet jsem kmene ko-kultivovala s šesti různými mikroorganismy (*Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus pneumoniae* M fáze, *Streptococcus pneumoniae* R fáze, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*) za různých podmínek (v exponenciální a stacionární fázi na KA viz **Tabulka 3** a **4**). Velikost hemolytických zón byla při ko-kultivaci kmenů s mikroorganismy větší než při samostatné kultivaci streptomycet na KA (viz porovnání hodnot změřených hemolytických zón z **Tabulka 2** a **5**). K podobným výsledkům došla ve své práci i Mgr. Wurzer, která ukázala, že velikost  $\beta$ -hemolýzy je výraznější u kmenů streptomycet (půdních i klinicky odvozených) při ko-kultivaci s lidskými patogeny; *P. aeruginosa* a *S. aureus* (Wurzer, 2019). Hemolýza by tedy mohla hrát roli jako mechanismus související se soutěžením s kompetitivním organismem o zdroje prostředí, případně k jeho predaci.

Streptomycety velice často sdílejí půdní prostředí s houbami a většina produkovaných metabolitů streptomycet má antimykotické účinky (Cole & Jarvis, & Schweikert, 2003). Je možné, že interakce mezi nimi jsou příčinou podobnosti životního cyklu streptomycet s životním cyklem většiny hub. Houby jsou známými producenty antibiotik a hemolyzinů v půdním prostředí (Nayak et al., 2011). Vylučují fosfolipázy, které interagují s membránami hostitelských buněk a vedou k lýze. Mezidruhové interakce s houbami by tedy mohly být příčinou exprese hemolyzinů u půdních streptomycet. Z těchto důvodů jsem jako vzorový mikroorganismus pro další ko-kultivace (viz **Tabulka 5** a **6**) zvolila kvasinku *Candida albicans*.

U „NIC“ kmenů jsem nebyla při běžné kultivaci (72 h v GYM tekutém médiu) schopna detekovat žádné metabolity, nicméně jejich hemolytická a inhibiční aktivita byla prokázána (viz kultivace na KA **Tabulka 2**). Po vyloučení přítomnosti extracelulárních hemolytických proteinů pomocí experimentu s proteinázou K (viz **Obrázek 18**) bylo zřejmé, že produkované hemolytické metabolity buď nejsou polyeny,

(na které jsem se při identifikaci látek zaměřovala), nebo nejsou mémi postupy izolovány v dostatečné koncentraci pro analýzu (velké ztráty při přípravě vzorku pomocí SPE). Předpokládala jsem, že experiment párové ko-kultivace (postup viz kapitola 4.4) mezi jednotlivými zástupci streptomycet, by mohl vést ke zvýšené produkci metabolitů. Výsledky párové ko-kultivace mezi „NIC“ kmeny můj předpoklad podpořily, neboť v izolátech páru BCCO2309 a BCCO1331 jsem úspěšně detekovala novou polyenovou substanci (označenou jako Polyen C)(viz **Obrázek 20**) a u páru BCCO2259 a BCCO2295 ne-polyenové antimykotikum actiphenol (viz **Obrázek 23**). Výsledky naznačují, že přítomnost konkurenčního mikroorganismu (v tomto případě stejného rodu) aktivují produkci sekundárních metabolitů, což je podpořeno již publikovanými výsledky (Boruta, 2021).

### 6.3 Závislost produkce metabolitů na fázi životního cyklu

Z fyziologického hlediska má význam rozdělení životního cyklu streptomycet na exponenciální a stacionární fázi růstu. Základním předpokladem je, že produkce sekundárních metabolitů při kultivaci za laboratorních podmínek nastává na začátku stacionární fáze růstu (respektive mezi přechodem z exponenciální do stacionární fáze) streptomycet, kdy je substrátové mycelium dobře viditelné a dochází k růstu vzdušných hyf (Wink, 2017). Při kultivaci streptomycet v tekutých médiích, kde se vzdušné hyfy většinou nediferencují, nastává produkce metabolitů rovněž ve stacionární fázi, kdy se růst zpomaluje až zcela zastavuje v závislosti na malnutrici (Wink, 2017), (McCormick, & Flärdh, 2012).

Současné studie ukazují, že i produkce proteinů specifických pro stacionární fázi může být ovlivňována geny exprimovanými ještě v exponenciální fázi. Aktinorhodin je polyketidové antibiotikum produkované *S. coelicolor A3* a jeho produkce je normálně pozorovatelné u kultur ve stacionární fázi růstu. Gen *actII-ORF4* za běžných podmínek aktivuje biosyntetické strukturní geny (*actIII* a *actVI-ORF1*) a tím produkci aktinorhodinu. Vložení mnoha kopií plazmidu s *actII-ORF4* vedlo ke zvýšení hladiny mRNA biosyntetického strukturního genu *actIII-orf4* (dále i *actIII*) a k produkci aktinorhodinu již během exponenciální fáze růstu. Tento výsledek naznačuje, že syntéza aktinorhodinu závisí pouze na dostatečném množství aktivačního genu (*actII-ORF4*) a ne jen na období fáze růstu (Gramajo & Takano, & Bibb, 1993).



V mojí práci jsme kmeny kultivovala v exponenciální a pak stacionární fázi růstu a pozorovala jsem jejich hemolytickou a inhibiční aktivitu (viz **Tabulka 3 a 4**). Z výsledků je patrné, že k inhibici dochází mnohem častěji až ve stacionární fázi růstu streptomycety (v 37 případech, na rozdíl od 6 případů v exponenciální fázi, viz **Tabulka 3 a 4**). Podobné výsledky platí i pro hemolytickou aktivitu (ve stacionární fázi převládá úplná  $\beta$ -hemolýza a větší hemolytické zóny než ve fázi exponenciální, viz **Tabulka 5** a fotografie v rámci přílohy na CD), čímž moje výsledky odpovídají výše uvedeným studiím (Wink, 2017), (McCormick, & Flärdh, 2012).

Nové poznatky poskytla práce Ing. Čiháka, který upozornil na produkci metabolitů ve fázi klíčení spor (Čihák et al., 2017). Tyto metabolity jsou pro toto období životního cyklu specifické (v exponenciální a stacionární fázi nebyly zachyceny). Pomocí LC-MS Ing. Čihák detekoval produkci antibiotika albaflavenonu, polyketidu germicidinu A a chalkonu u *S. coelicolor*. U posledních dvou sloučenin Ing. Čihák odhalil jejich inhibiční účinek na maturaci spor (germicidin je první známý autoregulační inhibitor klíčení spor rodu streptomycet (Petersen & Zähler & Metzger & Freund, & Hummel, 1993) a bylo prokázáno, že rovněž inhibuje prodloužení vzdušných hyf (Aoki & Matsumoto & Kawaide, & Natsume, 2011)), což vedlo k teorii, že sekundární metabolity pocházející z rané fáze mikrobiálního růstu mohou koordinovat další vývoj (v rámci *quorum sensing* kaskády), a/nebo hrát roli v kompetici s organismy v jejich přirozeném prostředí (Čihák et al., 2017).

Závěry z práce Ing. Čiháka mě vedly k úvaze, zda v našich ko-kultivacích v exponenciální fázi nemohly vzniknout specifické metabolity. Tato teorie nebyla v této práci testována. Návrhem pro detekci metabolitů exponenciální fáze je ko-kultivace streptomycet (BCCO0524, BCCO1099, BCCO1104 a BCCO1341) s mikroorganismy, které inhibovaly (viz **Tabulka 3**) v tekutém GYM médiu po dobu 24 hodin a ověření, zda se tyto potenciálně detekované metabolity liší od metabolitů detekovaných ve stacionární fázi (viz **Tabulka 8**) pomocí LC-MS.

## 6.4 Polyenová antibiotika a hemolyziny *Streptomyces*

Předpokladem této práce je, že polyenová antibiotika mohou být hlavní příčinou hemolytické aktivity u *Streptomyces spp.* Můj předpoklad vycházel z práce Bergman, která popisovala možný cytolytický účinek polyenů na membrány erytrocytů. Jak bylo vysvětleno v kapitole 3.3.2, nejčastěji se předpokládá, že mechanismem, kterým polyenová antibiotika indukují hemolýzu, je tvorba pórů. Destabilizace fosfolipidů v eukaryotní membráně je důsledkem absorpce ergosterolu polyenem (Kristanc & Božič & Jokhadar & Dolenc, & Gomišček, 2019). Polyeny mohou také tvořit reaktivní formy kyslíku nebo inhibovat membránový transport určitých aminokyselin a glukózy (Kristanc & Božič & Jokhadar & Dolenc, & Gomišček, 2019).

Nové polyeny byly nepřetržitě objevovány od druhé poloviny dvacátého století. Některé z nich jsou uvedeny i v této práci, konkrétně jde o filipin, streverten A a candididiny. Většina těchto sloučenin, včetně strevertenu a filipinu, má antifungální a také hemolytický účinek (Kim et al., 2011). Příklady známých polyenových antibiotik produkovaných *Streptomyces spp.* s hemolytickou aktivitou jsou: (I) filipiny produkované *S. filipinensis*, *S. avermitilis* a *S. miharaensis* (Payero et al., 2015), které vedou k tvorbě velkých agregátů v membráně erytrocytů, a tím k perforaci (Knopik-Skrocka, 2002); (II) amfotericin B, produkován *S. nodosus* (Caffrey & Lynch & Flood & Finnan, & Oliynyk, 2001) a nystatin, produkován *S. noursei* (Fjærvik, & Zotchev, 2005), které tvoří menší agregáty v membránách, čímž je činí propustnými pro molekuly s nízkou hmotností (Knopik-Skrocka, 2002); (III) candididiny, produkované různými kmeny streptomycet pocházejícími z půdy, ale i z moře (She et al., 2020), mění permeabilitu buněčné membrány, což vede k hemolýze (Brajtburg & Medoff & Kobayashi & Elberg, & Finegold, 1980).

Pro ověření inhibiční a hemolytické aktivity produkovaných metabolitů jsem sekretované metabolity izolovala ethyl-acetátovou precipitací s následnou kultivací disků filtračních papírků napuštěných izolovanými metabolity na KA (v jednom případě)(viz **Obrázek 12**) a na KA spolu s *Candida albicans* (v druhém)(viz **Obrázek 13**). Výsledky uvedené v kapitole 5.4 nevyvracejí hemolytickou a antimykotickou funkci polyenů. Pro potvrzení těchto výsledků by se musela provést delece genu

kódujícího produkci jednotlivých metabolitů, čímž by hemolytická a inhibiční aktivita již neměla být pozorovatelná.

Výsledky mojí práce ukazují, že mnoho půdních zástupců produkuje antifungální látky s cytolytickou aktivitou, z nichž některé by snad mohly být využity v medicíně. Předběžný screening dalších přírodních zástupců na jejich  $\beta$ -hemolytickou aktivitu a následné testování na fungicidní sloučeniny by mohl být jednou z možností využití poznatků práce pro nalezení nových substancí. Šlo by o levný a snadný způsob předběžného testování, umožňující screening mnoha kmenů najednou.

## **6.5 Identifikované substance sekundárního metabolismu: filipin, streverten A, candicidiny a ascosin a nově nalezené substance; polyen A, B, C a actiphenol**

### **Filipin:**

Filipin je pentaenové makrolidové antibiotikum (neglykosylovaný polyen) s hemolytickou a antimykotickou aktivitou, která je dobře zdokumentována (Whitfield & Brock & Ammann & Gottlieb, & Carter, 1955). Průmyslovým producentem filipinu je *S. filipinensis* a jeho využití spočívá například v detekci a kvantifikaci cholesterolu v biologických membránách a jako nástroj pro diagnostiku Niemann-Pickovy choroby typu C (Payero et al., 2015). Kmen TR1341, který je producentem filipinu, byl v mojí práci použit jako pozitivní kontrola hemolytických schopností, neboť jeho  $\beta$ -hemolytická aktivita byla prokázána již v práci Ing. Herbríka (Herbrík et al., 2020). Ing. Herbrík potvrdil aktivitu filipinu vypnutím odpovídajícího biosyntetického genového klastru; jeho delece vedla u kmene TR1341 ke ztrátě hemolytických schopností testovaných na KA (Herbrík et al., 2020). Pomocí SPE a LC-MS jsem filipin III detekovala rovněž u kmene BCCO2155 porovnáním absorpčních maxim z UV/VIS spektra (323, 339 a 357 nm). Jeho hemolytickou aktivitu jsem potvrdila kultivací na KA viz **Tabulka 2**.

### **Candicidiny a surugamid A**

Sloučeniny Candicidinů byly detekovány u kmene BCCO0524 a BCCO1099 (viz **Tabulka 8**). Candicidiny jsou aromatická, polyenová, makrolidová antibiotika

produkovaná *S. griseus* IMRU3570 (Szczeblewski et al., 2017). Hlavní složky candicidinu a ascosinu (detekovaného u kmene BCCO0524) jsou strukturálně identické a liší se jen relativním množstvím jednotlivých složek (Candicidin D je identický s ascosinem A2 a levorinem A2) (Szczeblewski et al., 2017). Podle literatury se candicidinový komplex skládá až z devíti složek, označených jako candicidin A až I, z nichž pouze hlavní složka, candicidin D byla strukturně charakterizována (Szczeblewski et al., 2017).

Surugamid A byl detekován rovněž u kmene BCCO1099. Surugamidy jsou skupinou neribozomálních peptidů, které byly poprvé izolované z mořských zástupců streptomycet asociovaných s mořskými houbami (např. *Streptomyces sp.* SM17) (Almeida et al., 2019), ale jejich produkce byla nedávno zaznamenána i u půdního kmene *S. albidoflavus* J11074 při kultivaci za speciálních podmínek (působením stresového faktoru) (Almeida et al., 2019). Jde o látky s protirakovinnými a antitumorovými účinky. Surugamid A a jeho blízké příbuzné deriváty, surugamidy B-E, jsou cyklické oktapeptidy obsahující D-aminokyselinu (D-isoleucin). Protirakovinné aktivity dosahují inhibicí bovinního katepsinu B a cysteinové proteázy (Almeida et al., 2019).

### **Actiphenol**

Sloučenina byla detekována u ko-kultivovaného páru kmenů BCCO2259 a BCCO2295. Actiphenol patří mezi fenolové kyseliny produkované zástupci streptomycet. Je známý pro své antifungální účinky, které byly prokázány v diskovém testu; actiphenol (50 µg/disk) potencoval antifungální aktivitu mikonazolu (položka č. 15420) proti *Candida albicans* (Human et al., 2016). Actiphenol má i antivirové účinky (je aktivní proti viru *coxsackie* B3 a viru chřipky A (IC<sub>50</sub>s = 14,37 a 34,4 µg/ml)). Jeho funkce je založena na inhibici translace u eukaryot (Human et al., 2016).

### **Nové substance:**

U kmenů BCCO0670 a BCCO0747 byly nalezeny nové látky (viz **Tabulka 8**). Tyto látky pravděpodobně nejsou polyeny, protože nevykazují jim odpovídající absorpční spektra. Nelze však vyloučit, že se jedná o látky, které mají u těchto kmenů

hemolytický účinek, nebo se nějak na hemolýze podílejí (komunikace s Ing. Čihákem). Nepolyenové látky vychytávající uvolněné železo z lyzovaných erytrocytů jsou například siderofory; malé peptidy, které tvoří komplexy se železem (Chater & Biró & Lee & Palmer, & Schrempf, 2010). Siderofory pravděpodobně nezpůsobují samotnou hemolýzu, ale po jejím proběhnutí mohou napomáhat streptomycetám zajistit si z okolí dostatek iontů železa.

U kmenů BCCO1092, BCCO1093, BCCO1094, BCCO1095, BCCO1097, BCCO1104, BCCO1106, BCCO2179, BCCO2282, BCCO2325, BCCO2389 a BCCO2309+BCCO1331 (viz **Tabulka 8** a **Obrázek 19, 20** a **21**) jsem detekovala nově nalezené substance, které jsou označovány jako polyen A, B a C. Tyto látky mají na základě specifických absorpčních spekter ve své struktuře přítomný polyenový kruh; Polyen A (311, 326 a 343 nm), Polyen B (327, 343 a 362 nm), Polyen C (346, 364 a 386 nm). Přesným měřením  $m/z$  pomocí vysoko rozlišujícího hmotnostního spektrometru a poměrem detekovaných izotopických píků jsem navrhla několik sumárních vzorců polyenu B (viz **Obrázek 17**). Ideální jsou návrhy, které mají nízké ppm a zastoupení atomů prvků odpovídající polyenům, tj. C, H, O (jako např. filipin III);  $C_{41}H_{61}O_{12}$  (nízké ppm 0,4),  $C_{34}H_{65}O_{17}$  (vysoké ppm 7,5, ale akceptovatelné <10 ppm) a  $C_{48}H_{57}O_7$  (vysoké ppm 8,3, ale akceptovatelné <10 ppm). Pokud by se podařilo nalézt již popsany polyen se sumárním vzorcem  $C_{41}H_{61}O_{12}$  mohl by se použít jako standard pro ověření správnosti mého navrženého sumárního vzorce (látky by ve srovnání měly poskytovat stejné retenční časy a měly by být ztotožněny s hmotou, tzn. byl by identifikován stejný pseudomolekulový ion  $[M+H]^+$ ). Nicméně pouhá LC-MS nestačí a pro přímé určení struktury polyenu B by se musela provést nukleární magnetická rezonance pro kterou je potřeba mít dostatek čisté látky polyenu B (při SPE i samotné LC-MS dochází k velkým ztrátám). Pokud produkce bakteriálního kmene není dostatečná, musí se zvýšit (např. vhodnou genetickou manipulací), anebo se musí optimalizovat procesy extrakce, purifikace a zakoncentrování, aby se ztráty co nejvíce minimalizovaly.

Hmotnostní spektrum polyenu A bylo neurčitě a jeho sumární vzorec jsem z něj nebyla schopna určit. Polyen C se absorpčními maximy v UV/VIS oblasti (viz **Obrázek 19**) podobal polyenu B (viz **Obrázek 14**) proto je možné, že jejich sumární vzorce se rovněž budou podobat. V obou případech (u polyenu B i C) by se mohlo jednat o látku s 6 dvojnými vazbami. Vycházím ze skutečnosti získanou měřením, kdy rostoucí počet

konjugovaných dvojných vazeb v polyenovém kruhu vede k posunu absorpčních maxim k vyšším hodnotám (např. filipin vs. candicidin) (Brown, 2000). Oproti filipinu, nebo fungichrominu (s 5 dvojnými vazbami) má polyen B a C vyšší maxima spektra a současně má nižší maxima oproti candicidinu (s 7 dvojnými vazbami).

## 6.6 Výsledek vlivu GBL na hemolytickou a inhibiční aktivitu

Molekuly GBL se v laboratořích používají pro stimulaci a iniciaci metabolické produkce, neboť i v přirozeném prostředí hrají roli autoregulačních signálních molekul (Daniel-İvad & Pimentel-Elardo, & Nodwell, 2018). Zprostředkovávají mezidruhovou komunikaci prostřednictvím komunikačních drah, které jsou svou funkcí podobné *quorum sensing* systému. Podobné účinky jako GBL mají i molekuly NAG (Chen & Cui & Wang & Wang, & Wen, 2020).

Pro zkoumání vlivu GBL na metabolismus u mezidruhových interakcí jsou vhodnými modely kmeny streptomycet, které obsahují jen jeden typ genů pro GBL. Příkladem je kmen *Streptomyces albidoflavus* J1074, který má gen kódující receptor GBL (*XNR\_468I*) a gen pro biosyntézu GBL chybí. Heterologní exprese biosyntetických GBL genů (*ScbA*, *ScbC* a *ScbB*) z *S. coelicolor* v *S. albidoflavus* vedla k nové produkci paulomycinu (Zhang et al., 2020). Dalším příkladem je gen *SVBI* z *Streptomyces venezuelae*, který je strukturálně identický s genem *SCB3* z *S. coelicolor*. Gen *SCB3* může modulovat produkci příbuzných sekundárních metabolitů u obou kmenů (*S. venezuelae* i *S. coelicolor*) (Zou et al., 2014).

V mojí práci jsem ukázala možný pozitivní účinek GBL zejména na produkci inhibičních metabolitů. Přítomnost signálních molekul GBL dispergovaných v médiu vedla ke zvýšení produkce inhibičních metabolitů, což bylo patrné zvětšením inhibičních zón (viz **Tabulka 6**), ovšem hemolytická aktivita nebyla přidavkem GBL příliš ovlivněna (průměrná velikost hemolytických zón zůstala zhruba stejná, viz **Tabulka 6**). U kmene BCCO2196 byl patrný účinek GBL (i NAG) na časnou sporulaci (respektive na urychlený přechod k růstu vzdušných hyf a k tvorbě spor)(viz **Obrázek II**). Pro potvrzení tohoto vlivu jsem kmeny BCCO1095, BCCO1097 a BCCO2389 kultivovala na agarech v koncentračním gradientu GBL/NAG (rozmezí koncentrace 0-25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Míra sporulace a velikost inhibičních zón byly přímo úměrné koncentraci

GBL v gradientu (se zvyšující se koncentrací se zvětšovala inhibiční zóna a míra sporulace, která byla hodnocena subjektivně viz **Obrázek 10**). Tyto výsledky ukazují na možný pozitivní účinek GBL na indukci cytolytických metabolitů. Zvýšená biosyntéza je pravděpodobně důsledkem signální funkce GBL molekul. Přirozená produkce těchto látek do média pomáhá streptomycetám koordinovat vývojový cyklus v závislosti např. na dostupnosti živin či signálů a efektivně reagovat na kompetitivní ko-kultivovaný organismus (urychlují přechod do stacionární fáze k růstu vzdušných hyf a k sporulaci, včetně zvýšené produkce bioaktivních látek).

Pokud vezmeme v úvahu, že část genomu streptomycet je tvořena kryptickými genovými klastry pro produkci sekundárních metabolitů (Zazopoulos et al., 2003) je možné předpokládat, že po přidání GBL by mohla být aktivována exprese některých kryptických klastrů a produkce nových bioaktivních metabolitů. Tuto hypotézu podporuje již zmíněný výzkum mezidruhových interakcí u *S. albidoflavus* J1074, který při detailnějším pozorování heterologní exprese SCBs genů *S. coelicolor* ukázal nezbytnou přítomnost genu *S. albidoflavus* pro receptor SCBs (*XNR\_4681*) pro produkci paulomycinu (Zhang et al., 2020). Z toho plyne, že informace o biosyntéze SCBs molekul a paulomycinu by mohla být uložena již v původním genomu *S. albidoflavus*, ale je kódována kryptickými klastry, tzn. exprese těchto genů není za standardních laboratorních podmínek aktivovaná. K aktivaci těchto kryptických klastrů je třeba exogenních biosyntetických genů (např. *ScbA*, *ScbC* a *ScbB* z *S. coelicolor*) z jiných streptomycet při jejich mezidruhové interakci (Zhang et al., 2020).

Pro ověření účinku GBL na produkci nových metabolitů v půdních izolátech z této práce navrhuji navazující experiment. Kmeny streptomycet by se kultivovaly v tekutém médiu s přidaným GBL (bez i s ko-kultivací s *Candida albicans*, nebo v párové ko-kultivaci s jinou streptomycetou) s následnou izolací metabolitů ze stacionární fáze růstu pomocí SPE a detekcí pomocí LC-MS. Porovnání nově detekovaných metabolitů (viz **Tabulka 8**) a metabolitů z této práce by mohl ukázat, zda je GBL schopen aktivovat kryptické klastry a iniciovat produkci nových substancí.

## 7 ZÁVĚR

1. Půdní kmeny streptomycet, samostatně žijící, nebo asociované se členovci a rostlinami, mají  $\beta$ -hemolytickou aktivitu spolu s inhibiční aktivitou proti různým mikroorganismům.
2. Hemolytická a inhibiční aktivita se navzájem ovlivňují. Velikost hemolytických zón se zvětšuje při ko-kultivaci streptomycet s jinými organismy, jejichž růst inhibují (viz porovnání velikostí hemolytických zón z **Tabulka 2** a hemolytických zón stacionární fáze z **Tabulka 5**). U kmenů BCCO0670, BCCO0747 a BCCO1094 došlo při ko-kultivaci až k 3x zvětšení hemolytické zóny (u kmene BCCO1341 až k 5x zvětšení). Obě aktivity dosahují maximální činnosti ve stacionární fázi růstu streptomycet a velikosti jejich hemolytických a inhibičních zón jsou ve většině případů shodné, což bylo potvrzeno porovnáním hodnot z **Tabulka 3, 4 a 5**.
3. Kmeny, které pocházejí z podobného zdroje a účastní se podobných mezidruhových interakcí, se shodují v morfologii a intenzitě  $\beta$ -hemolýzy (viz **Obrázek 5**). Většina kmenů asociovaných se členovci (BCCO1092, BCCO1093, BCCO1094, BCCO1095, BCCO1097, BCCO1099, BCCO1106, BCCO2179 a BCCO2196) má úplnou  $\beta$ -hemolytickou aktivitu a silnou bílou sporulaci (viz **Obrázek 6**). Samostatně žijící kmeny a kmen BCCO2282 (asociace s rostlinami) mají slabou míru sporulace a častější výskyt neúplné  $\beta$ -hemolýzy (viz **Obrázek 5 a 6**).
4. Mezi významné mezidruhové interakce streptomycet v půdním prostředí patří interakce s houbami. Ko-kultivace kmenů BCCO0524, BCCO1094, BCCO1095, BCCO1099, BCCO1341, BCCO2179, BCCO2196, BCCO2309 a BCCO2325 v jejich stacionární fázi s *Candida albicans* vedla k inhibici růstu kvasinky (viz **Tabulka 5**).
5. Přidání GBL do média v další ko-kultivaci s *Candida albicans* vedlo k objevení nových inhibičních zón (BCCO0670, BCCO0747, BCCO1093, BCCO1097, BCCO1104, BCCO1106, BCCO1331, BCCO2282, BCCO2295 a BCCO2389) a k jejich zvětšení a neměnilo zóny hemolytické (viz **Tabulka 6**). Vliv GBL na metabolismus streptomycet je podle těchto výsledků pozitivní. Pozitivní vliv GBL byl u kmene BCCO1095 dále potvrzen kultivací na agaru s koncentračním



gradientem GBL, kde kmen BCCO1095 inhiboval *Candida albicans* v přímé závislosti na koncentraci GBL (viz **Obrázek 10**).

6. Kultivace půdních kmenů s následnou SPE a LC-MS potvrdila přítomnost polyenů (viz **Tabulka 8**) a ethyl-acetátová precipitace nevyvrátila jejich hemolytickou a antimykotickou aktivitu (viz **Obrázek 12 a 13**). Filipin, candicidin, ascosin, surugamid A a actiphenol jsou již předtím popsáné a známé látky. Polyeny A, B a C jsou nově nalezené látky, které ukazují na stále nevyčerpané možnosti detekce nových substancí.
7. Párová ko-kultivace jednotlivých „NIC“ kmenů streptomycet mezi sebou vedla k produkci nových substanc (polyen C) a actiphenolu (viz **Obrázek 19-24**).

Moje výsledky práce mohou přispět nejen k objevu nových klinicky využitelných antimykotik, ale mohou napovědět roli streptomycet v půdním ekosystému nebo v hostitelském organismu. Pozitivní účinky GBL na inhibiční aktivitu by se mohly využít pro zvýšení produkce cytolytických metabolitů s potenciálně klinickým využitím.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADEP1 .....	Acyldepsipeptide 1
A-faktor .....	Autoregulační faktor
cAMP .....	Cyklický adenosinmonofosfát
GBL .....	Gama-butyrolakton
GBL-syntáza .....	Gama-butyrolaktontsyntáza
IL .....	Interleukin
KA .....	Krevní agar
LC-MS.....	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LPS .....	Lipopolisacharidy
mRNA .....	Mediátorová RNA
NAG .....	N-acetylglukosamin
NIC .....	Kmeny streptomycet u kterých nebyly detekované žádné metabolity
PFP .....	Protein formující protein
PSM .....	Phenol-soluble modulín, modulíny rozpustné ve fenolu
ROS .....	Reaktivní formy kyslíku
rRNA .....	Ribozomální RNA
SARPs .....	Streptomyces antibiotic regulatory proteins, antibiotické regulační proteiny streptomycet

SCBs ..... S. coelicolorbutanolides, butanolidy S. coelicolor

SPE .....Solid-phase extraction, separace na pevné fázi

TMA .....Trimethylamin

TNF ..... Tumor nekrotizující faktor

VOC .....Volatile organic compound, těkavé organické látky

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Ali, A., Guo, D., Li, Y., Shaheen, S., Wahid, F., Antoniadis, V., Abdelrahman, H., Al-Solaimani, S., Li, R., Tsang, D., Rinklebe, J., & Zhang, Z. (2021). Streptomyces pactum addition to contaminated mining soils improved soil quality and enhanced metals phytoextraction by wheat in a green remediation trial. *Chemosphere*, vol. 273.
2. Almeida, E., Kaur, N., Jennings, L., Rincón, A., Jackson, S., Thomas, O., & Dobson, A. (2019). Genome Mining Coupled with OSMAC-Based Cultivation Reveal Differential Production of Surugamide A by the Marine Sponge Isolate Streptomyces sp. SM17 When Compared to Its Terrestrial Relative S. albidoflavus J1074. *Microorganisms*, 7(10), pp. 394.
3. Al-shaibani, M., Radin Mohamed, R., Sidik, N., Enshasy, H., Al-Gheethi, A., Noman, E., Al-Mekhlafi, N., & Zin, N. (2021). Biodiversity of Secondary Metabolites Compounds Isolated from Phylum Actinobacteria and Its Therapeutic Applications. *Molecules*, 26(15).
4. Andriamanohiarisoamanana, F., Ihara, I., Yoshida, G., & Umetsu, K. (2020). Kinetic study of oxytetracycline and chlortetracycline inhibition in the anaerobic digestion of dairy manure. *Bioresource Technology*, vol. 315.
5. Antony-Babu, S., Stien, D., Eparvier, V., Parrot, D., Tomasi, S., & Suzuki, M. (2017). Multiple Streptomyces species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Scientific Reports*, 7(1).
6. Aoki, Y., Matsumoto, D., Kawaide, H., & Natsume, M. (2011). Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in Streptomyces coelicolor A3(2). *The Journal of Antibiotics*, 64(9), pp. 607-611.
7. Aparicio, J., Fouces, R., Mendes, M., Olivera, N., & Martín, J. (2000). A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in Streptomyces natalensis. 7(11), pp. 895-905.
8. Arafat, H., Abu-Tahon, M., & Isaac, G. (2021). Production of antibiotic carbomycin from Streptomyces graminofaciens with high lipid content mutation. *Archives of Microbiology*, 203(3), pp. 901-911.
9. Baine, W. (1985). Cytolytic and Phospholipase C Activity in Legionella Species. *Microbiology*, 131(6), pp. 1383-1391.
10. Bakás, L., Veiga, M., Soloaga, A., Ostolaza, H., & Goñi, F. (1998). Calcium-dependent conformation of E. coli  $\alpha$ -haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1368(2), pp. 225-234.
11. Baranova, A., Chistov, A., Tyurin, A., Prokhorenko, I., Korshun, V., Biryukov, M., Alferova, V., & Zakalyukina, Y. (2020). Chemical Ecology of Streptomyces albidoflavus Strain A10 Associated with Carpenter Ant Camponotus vagus. *Microorganisms*, 8(12).
12. Barreales, E., Payero, T., Jambrina, E., Aparicio, J., & Parales, R. (2020). The Streptomyces filipinensis Gamma-Butyrolactone System Reveals Novel Clues for Understanding the Control of Secondary Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(18).
13. Barreales, E., Rumbero, Á., Payero, T., de Pedro, A., Jambrina, E., & Aparicio, J. (2020). Structural and Bioactivity Characterization of Filipin Derivatives from

- Engineered *Streptomyces filipinensis* Strains Reveals Clues for Reduced Haemolytic Action. *Antibiotics*, 9(7).
14. Bednarz, B., Kotowska, M., & Pawlik, K. (2019). Multi-level regulation of coelimycin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), pp. 6423-6434.
  15. Begg, E., & Barclay, M. (1995). Aminoglycosides--50 years on.. *British journal of clinical pharmacology*, 39(6), pp. 597-603.
  16. Bentley, S., Chater, K., Cerdeño-Tárraga, A., Challis, G., Thomson, N., James, K., Harris, D., Quail, M., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B., Parkhill, J., & Hopwood, D. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), pp. 7-141.
  17. Besaury, L., Martinet, L., Mühle, E., Clermont, D., & Rémond, C. (2021). *Streptomyces silvae* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(12).
  18. Bhatti, A., Haq, S., & Bhat, R. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*, vol. 111, pp. 458-467.
  19. Bikash, B., Vilja, S., Mitchell, L., Keith, Y., Mikael, I., Mikko, M., & Jarmo, N. (2021). Differential regulation of undecylprodigiosin biosynthesis in the yeast-scavenging *Streptomyces* strain MBK6. *FEMS Microbiology Letters*, 368(8).
  20. Bobek, J., Halada, P., Angelis, J., Vohradský, J., & Mikulík, K. (2004). Activation and expression of proteins during synchronous germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. *PROTEOMICS*, 4(12), pp. 3864-3880.
  21. Bobek, J., Šmídová, K., & Čihák, M. (2017). A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, vol. 8.
  22. Boruta, T. (2021). A bioprocess perspective on the production of secondary metabolites by *Streptomyces* in submerged co-cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(10), pp. 171.
  23. Brajtborg, J., Medoff, G., Kobayashi, G., Elberg, S., & Finegold, C. (1980). Permeabilizing and hemolytic action of large and small polyene antibiotics on human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(4), pp. 586-592.
  24. Braun, V., Schönherr, R., & Hobbie, S. (1993). Enterobacterial hemolysins: activation, secretion and pore formation. *Trends in Microbiology*, 1(6), pp. 211-216.
  25. Brodersen, D., Clemons, W., Carter, A., Morgan-Warren, R., Wimberly, B., & Ramakrishnan, V. (2000). The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit. *Cell*, 103(7), pp. 1143-1154.
  26. Brown, D. (2000). Advanced Level Organic Chemistry: UV and visible light absorption spectroscopy: The uv and visible absorption spectrum of alkenes. *docbrown.info*. Retrieved from: <https://docbrown.info/page06/spectra/0uv-visible-spectra-02alkenes.htm>

27. Buchholz, K., & Collins, J. (2013). The roots—a short history of industrial microbiology and biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), pp. 3747-3762.
28. Bunkar, N., Sharma, J., Chouksey, A., Kumari, R., Gupta, P., Tiwari, R., Lodhi, L., Srivastava, R., Bhargava, A., & Mishra, P. (2020). Clostridium perfringens phospholipase C impairs innate immune response by inducing integrated stress response and mitochondrial-induced epigenetic modifications. *Cellular Signalling*, vol. 75.
29. Bush, M., Tschowri, N., Schlimpert, S., Flärth, K., & Buttner, M. (2015). c-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), pp. 749-760.
30. Buxton, R. (2016). Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. In: *American society for microbiology*. American Society for Microbiology. Retrieved from: <https://asm.org/Protocols/Blood-Agar-Plates-and-Hemolysis-Protocols>
31. Caffrey, P., Lynch, S., Flood, E., Finnan, S., & Oliynyk, M. (2001). Amphotericin biosynthesis in Streptomyces nodosus: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chemistry & Biology*, 8(7), pp. 713-723.
32. Camilli, A., & Bassler, B. (2006). Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science*, 311(5764), pp. 1113-1116.
33. Canicatti, C. (1990). Hemolysins: Pore-forming proteins in invertebrates. *Experientia*, 46(3), pp. 239-244.
34. Carrillo Rincón, A., Magdevska, V., Kranjc, L., Fujs, Š., Müller, R., & Petković, H. (2018). Production of extracellular heterologous proteins in Streptomyces rimosus, producer of the antibiotic oxytetracycline. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), pp. 2607-2620.
35. Cole, R., Jarvis, B., & Schweikert, M. (2003). *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*. (3-Volume Set). New York: Elsevier.
36. Cordovez, V., Carrion, V., Etalo, D., Mumm, R., Zhu, H., van Wezel, G., & Raaijmakers, J. (2015). Diversity and functions of volatile organic compounds produced by Streptomyces from a disease-suppressive soil. *Frontiers in Microbiology*, vol. 6.
37. Čihák, M., Kameník, Z., Šmídová, K., Bergman, N., Benada, O., Kofroňová, O., Petříčková, K., & Bobek, J. (2017). Secondary Metabolites Produced during the Germination of Streptomyces coelicolor. *Frontiers in Microbiology*, vol. 8.
38. Čihák, M., Kameník, Z., Šmídová, K., Bergman, N., Benada, O., Kofroňová, O., Petříčková, K., & Bobek, J. (2017). Secondary Metabolites Produced during the Germination of Streptomyces coelicolor. *Frontiers in Microbiology*, 8(1), pp. 13.
39. Da, F., Joo, H., Cheung, G., Villaruz, A., Rohde, H., Luo, X., & Otto, M. (2017). Phenol-Soluble Modulins of Staphylococcus haemolyticus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 7.
40. D'Alia, D., Eggle, D., Nieselt, K., Hu, W., Breitling, R., & Takano, E. (2011). Deletion of the signalling molecule synthase ScbA has pleiotropic effects on secondary metabolite biosynthesis, morphological differentiation and primary metabolism in Streptomyces coelicolor A3(2). *Microbial Biotechnology*, 4(2), pp. 239-251.
41. Dame, Z., & Ruanpanun, P. (2017). Production of macrolide antibiotics from a cytotoxic soil Streptomyces sp. strain ZDB. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(7).

42. Daniel-Ivad, M., Pimentel-Elardo, S., & Nodwell, J. (2018). Control of Specialized Metabolism by Signaling and Transcriptional Regulation: Opportunities for New Platforms for Drug Discovery?. *Annual Review of Microbiology*, 72(1), pp. 25-48.
43. de Lima Procópio, R., da Silva, I., Martins, M., de Azevedo, J., & de Araújo, J. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), pp. 466-471.
44. Dinos, G. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, 174(18), pp. 2967-2983.
45. Dunne, E., Burman, W., & Wilson, M. (1998). Streptomyces Pneumonia in a Patient with Human Immunodeficiency Virus Infection: Case Report and Review of the Literature on Invasive Streptomyces Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 27(1), pp. 93-96.
46. Ellis, D. (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(suppl\_1), pp. 7-10.
47. Ettliger, L., Corbaz, R., & Hütter, R. (1958). Zur Arteinteilung der Gattung Streptomyces Waksman et Henrici. *Experientia*, 14(9), pp. 334-335.
48. Fjærvik, E., & Zotchev, S. (2005). Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in Streptomyces noursei. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(4), pp. 436-443.
49. Flärdh, K., Richards, D., Hempel, A., Howard, M., & Buttner, M. (2012). Regulation of apical growth and hyphal branching in Streptomyces. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), pp. 737-743.
50. Furlaneto, M., Góes, H., Perini, H., dos Santos, R., & Furlaneto-Maia, L. (2018). How much do we know about hemolytic capability of pathogenic Candida species?. *Folia Microbiologica*, 63(4), pp. 405-412.
51. Gao, C., Hindra., Mulder, D., Yin, C., Elliot, M., Winkler, M., & Bush, K. (2012). Crp Is a Global Regulator of Antibiotic Production in Streptomyces. *mBio*, 3(6).
52. Gonzalez 3rd, L., & Spencer, J. (1998). Aminoglycosides: a practical review. *American family physician*, 58(8), pp. 20-1811.
53. Gonzalez, D., Vuong, L., Gonzalez, I., Keller, N., McGrosso, D., Hwang, J., Hung, J., Zinkernagel, A., Dixon, J., Dorrestein, P., & Nizet, V. (2014). Phenol Soluble Modulins (PSM) Variants of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Captured Using Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. *13(5)*, pp. 1262-1272.
54. Goodfellow, M., Busarakam, K., Idris, H., Labeda, D., Nouioui, I., Brown, R., Kim, B., del Carmen Montero-Calasanz, M., Andrews, B., & Bull, A. (2017). Streptomyces asenjonii sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soils and emended description of Streptomyces viridosporus Pridham et al. 1958. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(9), pp. 1133-1148.
55. Gramajo, H., Takano, E., & Bibb, M. (1993). Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in Streptomyces coelicolor A3(2) is transcriptionally regulated. *7(6)*.
56. Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q., & Niu, T. (2008). Aflatoxin B1 Degradation by Stenotrophomonas Maltophilia and Other Microbes Selected Using Coumarin Medium. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(8), pp. 1489-1503.
57. Guo, X., Liu, N., Li, X., Ding, Y., Shang, F., Gao, Y., Ruan, J., Huang, Y., & Löffler, F. (2015). Red Soils Harbor Diverse Culturable Actinomycetes That Are

- Promising Sources of Novel Secondary Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), pp. 3086-3103.
58. Haeder, S., Wirth, R., Herz, H., & Spiteller, D. (2009). Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), pp. 4742-4746.
  59. Hamid, M., Reitz, T., Joseph, M., Hommel, K., Mahgoub, A., Elhassan, M., Buscot, F., & Tarkka, M. (2020). Diversity and geographic distribution of soil streptomycetes with antagonistic potential against actinomycetoma-causing *Streptomyces sudanensis* in Sudan and South Sudan. *BMC Microbiology*, 20(1).
  60. Herbrík, A., Corretto, E., Chroňáková, A., Langhansová, H., Petrásková, P., Hrdý, J., Čihák, M., Křišťufek, V., Bobek, J., Petříček, M., & Petříčková, K. (2020). A Human Lung-Associated *Streptomyces* sp. TR1341 Produces Various Secondary Metabolites Responsible for Virulence, Cytotoxicity and Modulation of Immune Response. *Frontiers in Microbiology*, vol. 10.
  61. Hiltner, J., Hunter, I., & Hoskisson, P. (2015). Tailoring Specialized Metabolite Production in *Streptomyces*. *Advances in applied microbiology*, 91, pp. 237-255.
  62. Hleba, L., Charousova, I., Cisarova, M., Kovacik, A., Kormanec, J., Medo, J., Bozik, M., & Javorekova, S. (2018). Rapid identification of *Streptomyces* tetracycline producers by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 53(12), pp. 1083-1093.
  63. Hodgson, D. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Advances in applied microbiology*, 42, pp. 47-238.
  64. Horinouchi, S., & Beppu, T. (1994). A-factor and streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(2), pp. 177-186.
  65. Horstmann, J., Dias, M., Ortolan, F., Medina-Silva, R., Astarita, L., & Santarém, E. (2020). *Streptomyces* sp. CLV45 from Fabaceae rhizosphere benefits growth of soybean plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), pp. 1861-1871.
  66. Hoshino, K., Imai, Y., Mukai, K., Hamazu, R., Ochi, K., & Hosaka, T. (2020). A putative mechanism underlying secondary metabolite overproduction by *Streptomyces* strains with a 23S rRNA mutation conferring erythromycin resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), pp. 2193-2203.
  67. Hoskisson, P., & van Wezel, G. (2019). *Streptomyces coelicolor*. *Trends in Microbiology*, 27(5), pp. 468-469.
  68. Human, Z., Moon, K., Bae, M., de Beer, Z., Cha, S., Wingfield, M., Slippers, B., Oh, D., & Venter, S. (2016). Antifungal *Streptomyces* spp. Associated with the Infructescences of *Protea* spp. in South Africa. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7.
  69. Chandra, G., & Chater, K. (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(3), pp. 345-379.
  70. Chater, K., Biró, S., Lee, K., Palmer, T., & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), pp. 171-198.
  71. Chater, K. (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1469), pp. 761-768.
  72. Cheng, C., Sun, J., Yu, H., Ma, T., Guan, C., Zeng, H., Zhang, X., Chen, Z., & Song, H. (2020). Listeriolysin O Pore-Forming Activity Is Required for ERK1/2



- Phosphorylation During *Listeria monocytogenes* Infection. *Frontiers in Immunology*, vol. 11.
73. Chen, H., Cui, J., Wang, P., Wang, X., & Wen, J. (2020). Enhancement of bleomycin production in *Streptomyces verticillus* through global metabolic regulation of N-acetylglucosamine and assisted metabolic profiling analysis. *Microbial Cell Factories*, 19(1).
  74. Ishizuka, M., Imai, Y., Mukai, K., Shimono, K., Hamauzu, R., Ochi, K., & Hosaka, T. (2018). A possible mechanism for lincomycin induction of secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(5), pp. 705-716.
  75. Iwasaki, Y., Ichino, T., & Saito, A. (2020). Transition of the Bacterial Community and Culturable Chitinolytic Bacteria in Chitin-treated Upland Soil: From *Streptomyces* to Methionine-auxotrophic *Lysobacter* and Other Genera. *Microbes and Environments*, 35(1).
  76. J Smyth, C., Möllby, R., & Wadström, T. (1975). Phenomenon of hot-cold hemolysis: chelator-induced lysis of sphingomyelinase-treated erythrocytes. *Infection and immunity: American society for microbiology*, 12(5), pp. 1104-1111.
  77. Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., & Solecka, J. (2018). Secondary Metabolites of Actinomycetes and their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. *Polish Journal of Microbiology*, 67(3), pp. 259-272.
  78. Jenul, C., & R. Horswill, A. (2021). Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiology spectrum*, 7(2).
  79. Jiang, Z., Guo, L., Chen, C., Liu, S., Zhang, L., Dai, S., He, Q., You, X., Hu, X., Tuo, L., Jiang, W., & Sun, C. (2015). Xiakemycin A, a novel pyranonaphthoquinone antibiotic, produced by the *Streptomyces* sp. CC8-201 from the soil of a karst cave. *The Journal of Antibiotics*, 68(12), pp. 771-774.
  80. Ji, C., Kim, H., & Kang, H. (2019). Synthetic Inducible Regulatory Systems Optimized for the Modulation of Secondary Metabolite Production in *Streptomyces*. *ACS Synthetic Biology*, 8(3), pp. 577-586.
  81. Jones, D., Metzger, H., Schatz, A., & Waksman, S. (1944). CONTROL OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN EXPERIMENTAL ANIMALS BY STREPTOMYCIN. *Science*, 100(2588), pp. 103-105.
  82. Jones, S., & Elliot, M. (2017). *Streptomyces* Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours. *Trends in Microbiology*, 25(7), pp. 522-531.
  83. Jones, S., Pham, C., Zambri, M., McKillip, J., Carlson, E., Elliot, M., & Davies, J. (2019). *Streptomyces* Volatile Compounds Influence Exploration and Microbial Community Dynamics by Altering Iron Availability. *mBio*, 10(2).
  84. Jones, S., & Elliot, M. (2018). ‘Exploring’ the regulation of *Streptomyces* growth and development. *Current Opinion in Microbiology*, 42(Apr), pp. 25-30.
  85. Jones, S., & Elliot, M. (2018). ‘Exploring’ the regulation of *Streptomyces* growth and development. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 42, pp. 25-30.
  86. Kagan, B., & Thundimadathil, J. (2010). Amyloid Peptide Pores and the Beta Sheet Conformation. *Proteins Membrane Binding and Pore Formation*, 677(13), pp. 150-167.
  87. Kalidasan, V., Joseph, N., Kumar, S., Hamat, R., & Neela, V. (2018). The ‘Checkmate’ for Iron Between Human Host and Invading Bacteria: Chess Game Analogy. *Indian Journal of Microbiology*, 58(3), pp. 257-267.

88. Kaltenpoth, M., Yildirim, E., Gürbüz, M., Herzner, G., & Strohm, E. (2012). Refining the Roots of the Beewolf-*Streptomyces* Symbiosis: Antennal Symbionts in the Rare Genus *Philanthinus* (Hymenoptera, Crabronidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), pp. 822-827.
89. Kameník, Z., Hadacek, F., Marečková, M., Ulanova, D., Kopecký, J., Chobot, V., Plháčková, K., & Olšovská, J. (2010). Ultra-high-performance liquid chromatography fingerprinting method for chemical screening of metabolites in cultivation broth. *Journal of Chromatography A*, 1217(51), pp. 8016-8025.
90. Kawahara, T., Izumikawa, M., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2012). Relative Configuration of JBIR-129, a Cytotoxic 34-Membered Glycosidic Polyol Macrolide from *Streptomyces* sp. RK74. *Organic Letters*, 14(17), pp. 4434-4437.
91. Keller, N., Turner, G., & Bennett, J. (2005). Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), pp. 937-947.
92. Kieser, T., Bibb, M., Buttner, M., Chater, K., & Hopwood, D. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. (6). Norwich: John Innes Foundation.
93. Kim, D., Cho, G., Jeon, C., Weller, D., Thomashow, L., Paulitz, T., & Kwak, Y. (2019). A mutualistic interaction between *Streptomyces* bacteria, strawberry plants and pollinating bees. *Nature Communications*, 10(1).
94. Kim, J., Han, J., Lee, S., Lee, D., Hwang, I., & Kim, B. (2011). Disease Control Effect of Streptolysins Produced by *Streptomyces psammoticus* against Tomato Fusarium Wilt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), pp. 1893-1899.
95. Kim, K., Cui, X., Lee, D., Ko, W., Sohn, J., Yim, J., An, R., Kim, Y., & Oh, H. (2014). Inhibitory Effects of Benzaldehyde Derivatives from the Marine Fungus *Eurotium* sp. SF-5989 on Inflammatory Mediators via the Induction of Heme Oxygenase-1 in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), pp. 23749-23765.
96. Knopik-Skrocka, A. (2002). The mechanism of the hemolytic activity of polyene antibiotics. *Cellular and molecular biology letters*, 7(1), pp. 31-48.
97. Kozon, D., Mierzejewska, J., Kobiela, T., Grochowska, A., Dudnyk, K., Głogowska, A., Sobiepanek, A., Kuźmińska, A., Ciach, T., Augustynowicz-Kopeć, E., & Jańczewski, D. (2019). Amphiphilic Polymethyloxazoline–Polyethyleneimine Copolymers: Interaction with Lipid Bilayer and Antibacterial Properties. *Macromolecular Bioscience*, 19(12).
98. Kristanc, L., Božič, B., Jokhadar, Š., Dolenc, M., & Gomišček, G. (2019). The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1861(2), pp. 418-430.
99. Krouza Bergman, N. (2020). *Identifikace důležitých bakteriálních patogenů metodami molekulární biologie* (Bakalářská práce, UNIVERZITA JANA EVANGELISTY PURKYŇE, Ústí nad Labem).
100. Kurtböke, D. (2012). Biodiscovery from rare actinomycetes: an ecotaxonomical perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5), pp. 1843-1852.
101. Lacomel, C., Dunstone, M., & Spicer, B. (2021). Branching out the aerolysin, ETX/MTX-2 and Toxin\_10 family of pore forming proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 186.
102. Lara, A., Corretto, E., Kotrbová, L., Lorenc, F., Petříčková, K., Grabic, R., & Chroňáková, A. (2021). The Genome Analysis of the Human Lung-

- Associated *Streptomyces* sp. TR1341 Revealed the Presence of Beneficial Genes for Opportunistic Colonization of Human Tissues. *Microorganisms*, 9(8).
103. Lee, D., Yoon, C., Jung, Y., Yoon, J., Kim, Y., & Oh, H. (2016). Marine-Derived Secondary Metabolite, Griseusrazin A, Suppresses Inflammation through Heme Oxygenase-1 Induction in Activated RAW264.7 Macrophages. *Journal of Natural Products*, 79(4), pp. 1105-1111.
  104. Lee, L., Cheah, Y., Mohd Sidik, S., Ab Mutalib, N., Tang, Y., Lin, H., & Hong, K. (2012). Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for antimicrobial metabolite production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), pp. 2125-2137.
  105. Lee, N., Hwang, S., Kim, W., Lee, Y., Kim, J., Cho, S., Kim, H., Yoon, Y., Oh, M., Palsson, B., & Cho, B. (2021). Systems and synthetic biology to elucidate secondary metabolite biosynthetic gene clusters encoded in *Streptomyces* genomes. *Natural Product Reports*, 38(7), pp. 1331-1361.
  106. Le, K., Villaruz, A., Zheng, Y., He, L., Fisher, E., Nguyen, T., Ho, T., Yeh, A., Joo, H., Cheung, G., & Otto, M. (2019). Role of Phenol-Soluble Modulins in *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation and Infection of Indwelling Medical Devices. *Journal of Molecular Biology*, 431(16), pp. 3015-3027.
  107. Lerat, S., Simao-Beauvoir, A., & Beaulieu, C. (2009). Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 10(5), pp. 579-585.
  108. Li, Y., Li, Y., Mengist, H., Shi, C., Zhang, C., Wang, B., Li, T., Huang, Y., Xu, Y., & Jin, T. (2021). Structural Basis of the Pore-Forming Toxin/Membrane Interaction. *Toxins*, 13(2).
  109. Lubran, M. (1988). Bacterial toxins.. *Annals of clinical and laboratory science*, 18(1), pp. 58-71.
  110. Maier, B., Baron, D., Bockhorn, H., Drautz, H., Langhärig, J., & Bessler, W. (1982). Mitogenic and Suppressive Activity of Mycelia from Gram-Positive Bacteria on Murine and Human Lymphocytes. *Immunobiology*, 163(5), pp. 427-435.
  111. Manteca, A., Pelaez, A., del Mar Garcia-Suarez, M., Hidalgo, E., del Busto, B., & Mendez, F. (2008). A rare case of lung coinfection by *Streptomyces cinereoruber* and *Haemophilus influenzae* in a patient with severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization at species level using molecular techniques. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(3), pp. 307-311.
  112. Martin, J., & McDaniel, L. (1975). Candihexin Polyene Macrolide Complex: Physicochemical Characterization and Antifungal Activities of the Single Components. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8(2), pp. 200-208.
  113. Martín, J., Sola-Landa, A., Santos-Beneit, F., Fernández-Martínez, L., Prieto, C., & Rodríguez-García, A. (2011). Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microbial Biotechnology*, 4(2), pp. 165-174.
  114. Maslow, J., Dawson, D., Carlin, E., & Holland, S. (1999). Hemolysin as a Virulence Factor for Systemic Infection with Isolates of *Mycobacterium avium* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2), pp. 445-446.
  115. McBride, M., & Ensign, J. (1990). Regulation of trehalose metabolism by *Streptomyces griseus* spores. *Journal of Bacteriology*, 172(7), pp. 3637-3643.

116. McCarthy, A., & Williams, S. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment — a review. *Gene*, *115*(1-2), pp. 189-192.
117. McCormick, J., & Flårdh, K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), pp. 206-231.
118. McKenzie, N., Thaker, M., Koteva, K., Hughes, D., Wright, G., & Nodwell, J. (2010). Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene *absA1*. *The Journal of Antibiotics*, *63*(4), pp. 177-182.
119. Meng, X., Wang, W., Xie, Z., Li, P., Li, Y., Guo, Z., Lu, Y., Yang, J., Guan, K., Lu, Z., Tan, H., & Chen, Y. (2017). Neomycin biosynthesis is regulated positively by *AfsA-g* and *NeoR* in *Streptomyces fradiae* CGMCC 4.7387. *Science China Life Sciences*, *60*(9), pp. 980-991.
120. Miyanaga, A. (2019). Michael additions in polyketide biosynthesis. *Natural Product Reports*, *36*(3), pp. 531-547.
121. Miyanaga, A. (2017). Structure and function of polyketide biosynthetic enzymes: various strategies for production of structurally diverse polyketides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *81*(12), pp. 2227-2236.
122. Molloy, E., Cotter, P., Hill, C., Mitchell, D., & Ross, R. (2011). Streptolysin S-like virulence factors: the continuing *sagA*. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(9), pp. 670-681.
123. Montes, L., López, D., Sot, J., Bagatolli, L., Stonehouse, M., Vasil, M., Wu, B., Hannun, Y., Goñi, F., & Alonso, A. (2008). Ceramide-Enriched Membrane Domains in Red Blood Cells and the Mechanism of Sphingomyelinase-Induced Hot–Cold Hemolysis. *Biochemistry*, *47*(43), pp. 11222-11230.
124. Muanprasat, C., & Chatsudthipong, V. (2013). Cholera: pathophysiology and emerging therapeutic targets. *Future Medicinal Chemistry*, *5*(7), pp. 781-798.
125. Nagamune, K., Yamamoto, K., & Honda, T. (1995). Cloning and sequencing of a novel hemolysis gene of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letters*, *128*(3), pp. 265-269.
126. Nayak, A., Blachere, F., Hettick, J., Lukomski, S., Schmechel, D., & Beezhold, D. (2011). Characterization of Recombinant Terrelysin, a Hemolysin of *Aspergillus terreus*. *Mycopathologia*, *171*(1), pp. 23-34.
127. Oda, M., Terao, Y., Sakurai, J., & Nagahama, M. (2015). Membrane-Binding Mechanism of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin. *Toxins*, *7*(12), pp. 5268-5275.
128. Ogierman, M., Fallarino, A., Riess, T., Williams, S., Attridge, S., & Manning, P. (1997). Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon *lipAB* and a protease gene downstream of the *hly* region. *Journal of Bacteriology*, *179*(22), pp. 7072-7080.
129. Ochi, K. (1987). Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. *Journal of Bacteriology*, *169*(8), pp. 3608-3616.
130. Olanrewaju, O., & Babalola, O. (2019). *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(3), pp. 1179-1188.
131. Ōmura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi,

- H., Shiba, T., Sakaki, Y., & Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(21), pp. 12215-12220.
132. Otto, M. (2014). *Staphylococcus epidermidis* Pathogenesis. *Staphylococcus Epidermidis*, pp. 17-31.
133. Parrot, D., Blümel, M., Utermann, C., Chianese, G., Krause, S., Kovalev, A., Gorb, S., & Tasdemir, D. (2019). Mapping the Surface Microbiome and Metabolome of Brown Seaweed *Fucus vesiculosus* by Amplicon Sequencing, Integrated Metabolomics and Imaging Techniques. *Scientific Reports*, *9*(1).
134. Payero, T., Vicente, C., Rumbero, Á., Barreales, E., Santos-Aberturas, J., de Pedro, A., & Aparicio, J. (2015). Functional analysis of filipin tailoring genes from *Streptomyces filipinensis* reveals alternative routes in filipin III biosynthesis and yields bioactive derivatives. *Microbial Cell Factories*, *14*(1).
135. Petersen, F., Zähler, H., Metzger, J., Freund, S., & Hummel, R. (1993). Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551. *The Journal of Antibiotics*, *46*(7), pp. 1126-1138.
136. Pioletti, M. (2001). Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *The EMBO Journal*, *20*(8), pp. 1829-1839.
137. Polkade, A., Mantri, S., Patwekar, U., & Jangid, K. (2016). Quorum Sensing: An Under-Explored Phenomenon in the Phylum Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7.
138. Pope, M., Green, B., & Westpheling, J. (1996). The bld mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. *Molecular Microbiology*, *19*(4), pp. 747-756.
139. Rajan, B., & Kannabiran, K. (2014). Extraction and Identification of Antibacterial Secondary Metabolites from Marine *Streptomyces* sp. VITBRK2. *International Journal of Microbial and Cellular Medicine*, *3*(3), pp. 7-130.
140. Ranade, N., & Vining, L. (1993). Accumulation of intracellular carbon reserves in relation to chloramphenicol biosynthesis by *Streptomyces venezuelae*. *Canadian Journal of Microbiology*, *39*(4), pp. 377-383.
141. Reyes-Robles, T., & Torres, V. (2017). *Staphylococcus aureus* Pore-Forming Toxins. *Staphylococcus aureus*, pp. 121-144.
142. Rey, T., & Dumas, B. (2017). Plenty Is No Plague: *Streptomyces* Symbiosis with Crops. *Trends in Plant Science*, *22*(1), pp. 30-37.
143. Roderer, D., & Glockshuber, R. (2017). Assembly mechanism of the  $\alpha$ -pore-forming toxin cytolysin A from *Escherichia coli*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*(1726).
144. Rood, J., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B., Melville, S., Moore, R., Popoff, M., Sarker, M., Songer, J., Uzal, F., & Van Immerseel, F. (2018). Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*, vol. 53, pp. 5-10.
145. Sathyanarayana, P., Maurya, S., Behera, A., Ravichandran, M., Visweswariah, S., Ayappa, K., & Roy, R. (2018). Cholesterol promotes Cytolysin A activity by stabilizing the intermediates during pore formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(31), pp. E7323-E7330.

146. Seipke, R., Kaltenpoth, M., & Hutchings, M. (2012). Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme?. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), pp. 862-876.
147. Selvakumar, D., Arun, K., Suguna, S., Kumar, D., & Dhevendaran, K. (2010). Bioactive potential of Streptomyces against fish and shellfish pathogens. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(3), pp. 157-164.
148. She, W., Ye, W., Shi, Y., Zhou, L., Zhang, Z., Chen, F., & Qian, P. (2020). A novel chresdihydrochalcone from Streptomyces chrestomyceticus exhibiting activity against Gram-positive bacteria. *The Journal of Antibiotics*, 73(7), pp. 429-434.
149. Silva Lacerda, G., Melo, C., Araújo Soares, A., Moreira, L., Coriolano, M., Souza Lima, G., Napoleão, T., Lorena, V., Oliveira da Silva, L., & Nascimento, S. (2018). L-asparaginase isolated from Streptomyces ansochromogenes promotes Th1 profile and activates CD 8 T cells in human PBMC: an in vitro investigation. *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), pp. 1122-1130.
150. Song, L., Hobaugh, M., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., & Gouaux, J. (1996). 7AHL: ALPHA-HEMOLYSIN FROM STAPHYLOCOCCUS AUREUS. In: *RCSB PDB*. Science. Retrieved from: 10.2210/pdb7AHL/pdb
151. Szczeblewski, P., Laskowski, T., Kubacki, B., Dziergowska, M., Liczmańska, M., Grynda, J., Kubica, P., Kot-Wasik, A., & Borowski, E. (2017). Analytical studies on ascosin, candicidin and levorin multicomponent antifungal antibiotic complexes. The stereostructure of ascosin A2. *Scientific Reports*, 7(1).
152. Szilágyi, M., Márton, É., Lukács, D., Birkó, Z., Kele, Z., & Biró, S. (2019). Mutation in *afsR* Leads to A-Factor Deficiency in *Streptomyces griseus* B2682. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28(5), pp. 216-224.
153. Taddei, A., José-Rodríguez, M., Márquez-Vilchez, E., & Castelli, C. (2021). Isolation and identification of Streptomyces spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. I. *Microbiological Research, Volume 161*(3), pp. 222-231.
154. Takano, H., Nishiyama, T., Amano, S., Beppu, T., Kobayashi, M., & Ueda, K. (2016). Streptomyces metabolites in divergent microbial interactions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(2-3), pp. 143-148.
155. Telesmanich, N., Lomov, I., & Podosinnkova, L. (2017). Vibrio cholerae hemolytic activity. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*, 4, pp. 85-92.
156. Tevyashova, A., Olsufyeva, E., Solovieva, S., Printsevskaya, S., Reznikova, M., Trenin, A., Galatenko, O., Treshalin, I., Pereverzeva, E., Mirchink, E., Isakova, E., Zotchev, S., & Preobrazhenskaya, M. (2013). Structure-Antifungal Activity Relationships of Polyene Antibiotics of the Amphotericin B Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), pp. 3815-3822.
157. Thangamani, R., Jong-Min, J., Yong-Hyun, K., Hyun-Joong, K., Da Hye, Y., Sung-Hee, P., Kwon-Young, C., Yun-Gon, K., Jaebum, K., Seunho, J., Hyung-Yeon, P., & Yung-Hun, Y. (2013). Functional analysis of the gene SCO1782 encoding Streptomyces hemolysin (S-hemolysin) in Streptomyces coelicolor M145. *Toxicon*, vol.71(71), pp. 7.

158. Thoma, L., & Muth, G. (2015). The conjugative DNA-transfer apparatus of *Streptomyces*. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(2), pp. 224-229.
159. Thomy, D., Culp, E., Adamek, M., Cheng, E., Ziemert, N., Wright, G., Sass, P., Brötz-Oesterhelt, H., & Master, E. (2019). The ADEP Biosynthetic Gene Cluster in *Streptomyces hawaiiensis* NRRL 15010 Reveals an Accessory *clpP* Gene as a Novel Antibiotic Resistance Factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(20), pp. e01292-19.
160. Truhlar, S. (2004). The folding landscape of *Streptomyces griseus* protease B reveals the energetic costs and benefits associated with evolving kinetic stability. *Protein Science*, 13(2), pp. 381-390.
161. Ultee, E., van der Aart, L., Zhang, L., van Dissel, D., Diebold, C., van Wezel, G., Claessen, D., & Briegel, A. (2020). Teichoic acids anchor distinct cell wall lamellae in an apically growing bacterium. *Communications Biology*, 3(1).
162. van Dissel, D., Claessen, D., & van Wezel, G. (2014). Morphogenesis of *Streptomyces* in Submerged Cultures. *Advances in applied microbiology*, 89, pp. 1-45.
163. van Keulen, G., & Dyson, P. (2014). Production of Specialized Metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Advances in applied microbiology*, 89, pp. 217-266.
164. Vandenesch, F., Lina, G., & Henry, T. (2012). Staphylococcus aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 2.
165. Vaz Jauri, P., Bakker, M., Salomon, C., Kinkel, L., & Badger, J. (2013). Subinhibitory Antibiotic Concentrations Mediate Nutrient Use and Competition among Soil *Streptomyces*. *PLoS ONE*, 8(12).
166. Vergnes, S., Gayraud, D., Veyssi re, M., Toulotte, J., Martinez, Y., Dumont, V., Bouchez, O., Rey, T., & Dumas, B. (2020). Phyllosphere Colonization by a Soil *Streptomyces* sp. Promotes Plant Defense Responses Against Fungal Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 33(2), pp. 223-234.
167. Vesper, S., & Jo Vesper, M. (2004). Possible Role of Fungal Hemolysins in Sick Building Syndrome. *Advances in applied microbiology*, 55, pp. 191-213.
168. Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., Goormachtig, S., & Muyzer, G. (2016). *Streptomyces* as a plant's best friend?. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8).
169. Wang, K., Chen, X., Li, Y., & Mao, X. (2019). Identification of a secondary metabolism-responsive promoter by proteomics for over-production of natamycin in *Streptomyces*. *Archives of Microbiology*, 201(10), pp. 1459-1464.
170. Wang, X., Yin, S., Bai, J., Liu, Y., Fan, K., Wang, H., Yuan, F., Zhao, B., Li, Z., & Wang, W. (2019). Heterologous production of chlortetracycline in an industrial grade *Streptomyces rimosus* host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), pp. 6645-6655.
171. Waters, C., & Bassler, B. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), pp. 319-346.

172. Weber, J., Wierman, C., & Hutchinson, C. (1985). Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *Journal of Bacteriology*, *164*(1), pp. 425-433.
173. Whitfield, G., Brock, T., Ammann, A., Gottlieb, D., & Carter, H. (1955). Filipin, an Antifungal Antibiotic: Isolation and Properties. *Journal of the American Chemical Society*, *77*(18), pp. 4799-4801.
174. Willemse, J., Mommaas, A., & van Wezel, G. (2012). Constitutive expression of *ftsZ* overrides the *whi* developmental genes to initiate sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *101*(3), pp. 619-632.
175. Williams, S., Shameemullah, M., Watson, E., & Mayfield, C. (1972). Studies on the ecology of actinomycetes in soil—VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biology and Biochemistry*, *4*(2), pp. 215-225.
176. Wink, J., Mohammadipanah, F., & Hamedi, J. (2017). Biology and Biotechnology of Actinobacteria. In *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. (1, pp. 200-203). Gewerbstrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG.
177. Wink, J., Mohammadipanah, F., & Hamedi, J. (2017). Biology and Biotechnology of Actinobacteria. In *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. (1, pp. 29-50). Gewerbstrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG.
178. Wink, J. (ed.), Mohammadipanah, F. (ed.), & Hamedi, J. (ed.). *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. (2017). (1). Gewerbstrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG.
179. Wren, B., Stabler, R., Das, S., Butcher, P., Mangan, J., Clarke, J., Casali, N., Parish, T., & Stoker, N. (1998). Characterization of a haemolysin from *Mycobacterium tuberculosis* with homology to a virulence factor of *Serpulina hyodysenteriae*. *Microbiology*, *144*(5), pp. 1205-1211.
180. Wurzer, T. (2019). *The interaction of Streptomyces-like bacteria and model microorganisms in secondary metabolite production, motility and hemolytic activities - Experimental* (Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Č. Budějovice).
181. Xia, H., Zhan, X., Mao, X., & Li, Y. (2020). The regulatory cascades of antibiotic production in *Streptomyces*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *36*(1).
182. Xu, G., & Yang, S. (2019). Regulatory and evolutionary roles of pseudo  $\gamma$ -butyrolactone receptors in antibiotic biosynthesis and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(23-24), pp. 9373-9378.
183. Xu, J., Gu, K., Zhang, D., Li, Y., & Tian, L. (2017). Ghanamycins A and B, two novel  $\gamma$ -butyrolactones from marine-derived streptomyces *ghanaensis* TXC6-16. *The Journal of Antibiotics*, *70*(6), pp. 733-736.
184. Yu, L., Hu, Z., & Ma, Z. (2015). Production of bioactive tryptamine derivatives by co-culture of marine *Streptomyces* with *Bacillus mycoides*. *Natural Product Research*, *29*(22), pp. 2087-2091.
185. Zazopoulos, E., Huang, K., Staffa, A., Liu, W., Bachmann, B., Nonaka, K., Ahlert, J., Thorson, J., Shen, B., & Farnet, C. (2003). A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nature Biotechnology*, *21*(2), pp. 90-187.
186. Zhang, X., & Austin, B. (2005). Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(5), pp. 1011-1019.



187. Zhang, Y., Wang, M., Tian, J., Liu, J., Guo, Z., Tang, W., & Chen, Y. (2020). Activation of paulomycin production by exogenous  $\gamma$ -butyrolactone signaling molecules in *Streptomyces albidoflavus* J1074. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(4), pp. 1695-1705.
188. Zhao, M., Wang, M., Wang, S., Xiong, L., Gao, B., Liu, M., Tao, X., Wang, F., & Wei, D. (2022). A Self-Sustained System Spanning the Primary and Secondary Metabolism Stages to Boost the Productivity of *Streptomyces*. *ACS Synthetic Biology*, *11*(1), pp. 353-365.
189. Zheng, J., Li, Y., Guan, H., Li, J., Li, D., Zhang, J., & Tan, H. (2020). Component Optimization of Neomycin Biosynthesis via the Reconstitution of a Combinatorial Mini-Gene-Cluster in *Streptomyces fradiae*. *ACS Synthetic Biology*, *9*(9), pp. 2493-2501.
190. Zou, Z., Du, D., Zhang, Y., Zhang, J., Niu, G., & Tan, H. (2014). A  $\gamma$ -butyrolactone-sensing activator/repressor, JadR3, controls a regulatory mini-network for jadomycin biosynthesis. *Molecular Microbiology*, *94*(3), pp. 490-505.
191. Zuverink, M., & Barbieri, J. (2018). Protein Toxins That Utilize Gangliosides as Host Receptors. *Gangliosides in Health and Disease*, pp. 325-354.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

- Obrázek 1:** Životní cyklus Streptomycet (Bush & Tschowri & Schlimpert & Flärdh, & Buttner, 2015).....18
- Obrázek 2:** Ukázka struktury polyenních makrolidních antibiotik – amphotericin B (1) a jeho zkonstruovaný analog nystatin (Tevyashova et al., 2013).....26
- Obrázek 3:** Ukázka hemolytických zón, A =  $\beta$ -hemolýza, B =  $\alpha$ -hemolýza, C =  $\gamma$ -hemolýza, zdroj (Buxton, 2016).....28
- Obrázek 4:** Alfa-toxin Staphylococcus aureus, pohled ze předu a z boku, zdroj (Song et al., 1996).....30
- Obrázek 5:** Srovnání intenzity hemolytické aktivity a morfologie mezi kmeny streptomycet, podle jejich původu (viz Tabulka 2 a přiložená obrazová dokumentace na CD). Míru sporulace jsem hodnotila následovně; silná sporulace = bílé spory jsou po celé délce linie streptomycety, slabší sporulace = bílé spory pokrývají šedé vegetativní mycelium jen místy, bez sporulace = v žádném místě linie streptomycety nejsou vidět bílé spory.....43
- Obrázek 6:** Kultivace kmenů po 72 hod na KA při 29°C Kmeny BCCO1341 a BCCO1105; ukázka růstu substrátového mycelia s neúplnou  $\beta$ -hemolýzou Kmeny BCCO1093 a BCCO1106; ukázka růstu vzdušného mycelia, úplné  $\beta$ -hemolýzy a sporulace Kmeny BCCO0524 a BCCO0670; ukázka růstu vzdušného mycelia, úplné  $\beta$ -hemolýzy a sporulace.....44
- Obrázek 7:** Ukázka inhibice růstu mikroorganismů streptomycetami po 72 hod ko-kultivace na KA (ve stacionární fázi růstu streptomycety). Kmen BCCO0524 inhibuje růst Candida albicans, kmen BCCO1093 inhibuje růst Staphylococcus aureus a Pseudomonas aureginosa. Kmen BCCO1104 inhibuje růst Staphylococcus aureus, kmen BCCO2196 inhibuje růst Candida tropicalis a Candida albicans.....49
- Obrázek 8:** Ukázka inhibice Candida albicans (horizontálně) při kultivaci na KA (48 samostatné kultivace s následnou 24 hod ko-kultivací) v přítomnosti GBL u kmenů BCCO0524, BCCO1099, BCCO2179 a BCCO2196 (vertikálně).....52
- Obrázek 9:** Ukázka inhibice Candida albicans (horizontálně) při kultivaci na GYM médiu po 72 hodinách (48 samostatné kultivace s následnou 24 hod ko-kultivací) v přítomnosti GBL u kmenů streptomycet (vertikálně) BCCO1095 – BCCO1099 – BCCO1097 (kmenů BCCO2309 a BCCO2389 kultivovaných za stejných podmínek k inhibici nedošlo). Velikost inhibičních zón; BCCO1095 8 mm, BCCO1099 4 mm,

BCCO1097 2 mm.....	53
<b>Obrázek 10:</b> Ukázka vlivu GBL a NAG na inhibiční schopnost kmene BCCO1095 a jeho sporulaci při kultivaci v gradientu GBL/NAG na GYM médiu po 48 hod samostatné kultivace BCCO1095 a následným přidáním <i>Candida albicans</i> (48 hod kultivace). Koncentrace gradientu GBL/NAG (v rozmezí 0-25 µg.ml-1) odpovídá kýlu na obrázku.....	54
<b>Obrázek 11:</b> Ukázka účinku GBL a NAG na časnou sporulaci kmene BCCO2196, kultivace na KA po 48 hod Levý obrázek - na filtračním papírku byl přidán 1 µl GBL Pravý obrázek - na filtračním papírku byl přidán 1 µl NAG.....	55
<b>Obrázek 12:</b> Ethyl-acetátová precipitace metabolitů a jejich hemolytická aktivita na KA (postup viz kapitola 4.6), Kmen BCCO1099 ne-hemolyzoval, ostatní kmeny (BCCO1106, BCCO1095, BCCO1094, BCCO1093) již ano, Kmen 1341 sloužil jako pozitivní kontrola, negativní kontrola uprostřed misky byl čistý chloroform.....	56
<b>Obrázek 13:</b> Ethyl-acetátová precipitace metabolitů a jejich inhibiční aktivita proti <i>Candida albicans</i> na KA (postup viz kapitola 4.6) U všech kmenů je kolem filtračních papírků napuštěných izolovanými metabolity vidět slabá vrstva inhibiční zóny Kmen 1341 sloužil jako pozitivní kontrola, negativní kontrola uprostřed misky byl čistý chloroform.....	56
<b>Obrázek 14:</b> UV/VIS absorpční spektra; (A) polyenu A (BCCO1116 v tR = 8,23 min s absorpčními maximy; 311 nm, 326 nm, 343 nm, (B) polyenu B (BCCO1092) v tR = 9,42 min s absorpčními maximy; (289 nm), 327 nm, 343 nm, 362 nm, (C) kontrola TR1431, její absorpční maxima odpovídají údajům od výrobce pro filipin III ( $\lambda_{max}$ ; 323, 339, 357 nm)( <a href="https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/data/datasheet/CAY/70440.pdf">https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/data/datasheet/CAY/70440.pdf</a> ).....	59
<b>Obrázek 15:</b> LC-MS analýza polyenu B po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. MS chromatogram zaznamenaný pro ion 745,4166.....	60
<b>Obrázek 16:</b> Hmotnostní spektrum látky s tR = 9.42 min z LC-MS analýzy polyenu B po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. Ve spektru je patrný ion o m/z = 745,4166, který odpovídá pseudomolekulovému $[M+H]^+$ iontu (po ztrátě hydroxylové skupiny 727,4163). Na základě poměru izotopických píků a chyby měření (<10 ppm) jsme navrhli sumární vzorce polyenu B (viz Obrázek 17).....	60
<b>Obrázek 17:</b> Návrhy sumárního vzorce polyenu B s m/z 745.4166.....	61
<b>Obrázek 18:</b> Zachování hemolytické aktivity u „NIC“ kmenů (postup viz kapitola	

4.9) Horní obrázek – kmeny inkubované s proteinázou K, viditelné hemolytické zóny po 48 hodinách, při 28°C Levý dolní obrázek – pozitivní kontrola, viditelné hemolytické zóny po 48 hodinách, při 28°C Pravý dolní obrázek – negativní kontrola, nepřítomnost hemolytických zón již po 24 hodinách, při 28°C.....	62
<b>Obrázek 19:</b> UV/VIS absorpční spektrum polyenu C v tR = 7,73 min s absorpčními maximy; 346 nm, 364 nm a 386 nm.....	64
<b>Obrázek 20:</b> LC-MS analýza polyenu C z ko-kultivovaných kmenů BCCO2259 a BCCO2295 po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. MS chromatogram zaznamenaný pro ion 743,4131.....	64
<b>Obrázek 21:</b> Hmotnostní spektrum látky s tR = 7,73 min z LC-MS analýzy extraktu sekundárních metabolitů ko-kultivovaných kmenů BCCO2309 a BCCO1331 po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. Ve spektru je patrný ion o m/z = 743,4131, který odpovídá pseudomolekulovému [M+H] <sup>+</sup> (po ztrátě hydroxylové skupiny 725,4041) a byl nazván jako polyen C.....	65
<b>Obrázek 22:</b> UV/VIS absorpční spektrum actiphenolu v tR = 4,637 min s absorpčním maximem 330,7877 nm.....	65
<b>Obrázek 23:</b> LC-MS analýza actiphenolu z ko-kultivovaných kmenů BCCO2259 a BCCO2295 po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. MS chromatogram zaznamenaný pro ion 276,1219.....	66
<b>Obrázek 24:</b> Hmotnostní spektrum látky s tR = 4,65 min z LC-MS analýzy extraktu sekundárních metabolitů ko-kultivovaných kmenů BCCO2259 a BCCO2295 po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu. Ve spektru je patrný ion o m/z = 276,1219, který odpovídá pseudomolekulovému [M+H] <sup>+</sup> iontu actiphenolu (po ztrátě H <sub>2</sub> O/po ztrátě hydroxylové skupiny 258,1144) s teoretickou hodnotou [M+H] <sup>+</sup> iontu m/z = 276,1158 . Na základě poměru izotopických píků a chyby měření <10 ppm lze konstatovat, že detekovaná látka má molekulový vzorec C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub> , což odpovídá actiphenolu.....	66

## 11. SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Sbíрка vybraných kmenů <i>Streptomyces</i> spp.....	37
<b>Tabulka 2:</b> Hemolytická aktivita a morfologie (sporulace) sbírky kmenů po 72 hod kultivace na KA při 29°C.....	42
<b>Tabulka 3:</b> Velikost inhibičních zón po 24 hod ko-kultivaci kmenů streptomycet v jejich exponenciální fázi růstu na KA s vybranými mikroorganismy. Přítomnost inhibice (+), nepřítomnost inhibice (-), ko-kultivovaný mikroorganismus nenarostl inhibici nelze hodnotit ( <b>Mikroorg. nenarostl</b> ). .....	46
<b>Tabulka 4:</b> Velikost inhibičních zón po 48 hod samostatné kultivace kmenů streptomycet (stacionární fázi růstu) a následnou 24 hod ko-kultivací na KA s vybranými mikroorganismy. Přítomnost inhibice (+), nepřítomnost inhibice (-), ko-kultivovaný mikroorganismus nenarostl inhibici nelze hodnotit ( <b>Mikroorg. nenarostl</b> ). .....	47
<b>Tabulka 5:</b> Změřené hodnoty hemolytických zón při ko-kultivaci s 6 mikroorganismy v exponenciální a stacionární fázi, změřené hodnoty inhibičních zón při inhibici růstu <i>Candida albicans</i> ve stacionární fázi a pozorování přítomnosti sporulace (porovnání s výsledky sporulace z <b>Tabulka 2</b> ). .....	48
<b>Tabulka 6:</b> Porovnání velikostí hemolytických a inhibičních zón při ko-kultivaci s <i>Candida albicans</i> na KA po 72 hod (48 samostatné kultivace s následnou 24 hod ko-kultivací) s a bez přítomnosti GBL.....	50
<b>Tabulka 7:</b> Porovnání velikostí hemolytických a inhibičních zón při ko-kultivaci s <i>Candida albicans</i> na KA po 72 hod (48 samostatné kultivace s následnou 24 hod ko-kultivací) s a bez přítomnosti NAG u některých kmenů streptomycet. ....	51
<b>Tabulka 8:</b> Detekované metabolity sbírky kmenů pomocí LC-MS po 72 h kultivaci v tekutém GYM médiu (postup izolace a LCMS viz kapitola 4.7 a 4.8) .....	58

## 12. SEZNAM PŘÍLOH

Součástí přílohy je CD, přiložené ve vazbě, obsahující všechny fotografie kultivovaných a ko-kultivovaných kmenů streptomycet.

Fotografie jsou rozděleny a popsány dle následujícího seznamu;

1. **SP1** –  $\beta$ -hemolýza sbírky kmenů na KA
  - Název kmene – (1): Fotografie misky ze spodu*
  - Název kmene – (2): Fotografie misky shora*
2. **SP2** - Ko-kultivace kmenů s 6 mikroorganismy, ukázka inhibice a hemolýzy
  - **Ko-kultivace v exponenciální fázi růstu**
  - **Ko-kultivace ve stacionární fázi růstu**
    - Název kmene - (1,2 . . .): více kultur daného kmene*
3. **SP3** - Vliv GBL na hemolytickou a inhibiční aktivitu
  - **Vliv GBL před přidáním *Candida albicans* (24 hod)**
  - **Vliv GBL po 48 hodinách růstu s *Candida albicans***
    - Název kmene - (1,2 . . .): více kultur daného kmene*
    - Název kmene - (1,2 . . .) – GYM/KA: kultivace na GYM/KA médiu*
4. **SP4** - Vliv NAG na hemolytickou a inhibiční aktivitu
  - **Vliv NAG před přidáním *Candida albicans* (24 hod)**
  - **Vliv NAG po 48 hodinách růstu s *Candida albicans***
5. **SP5** - Výsledky kultivace kmenů na agaru s koncentračním gradientem GBL/NAG
  - **Vliv gradientu GBL/NAG před přidáním *Candida albicans* (48 hod)**
  - **Vliv gradientu GBL/NAG po 48 hodinách kultivace s *Candida albicans***
    - Název kmene - (1,2 . . .): více kultur daného kmene*
    - Název kmene - (1,2 . . .) – GBL/NAG, bez GBL/NAG: kultivace v gradientu GBL/NAG, nebo kultivace na GYM médiu bez gradientu (negativní kontrola)*

6. **SP6** - Testování přítomnosti extracelulárních hemolytických proteinů
7. **SP7** – Ethyl-acetátová precipitace
  - **Testování hemolytické aktivity metabolitů**
  - **Testování schopnosti metabolitů inhibovat *Candida albicans***